

胶带粘贴技术结合 LC-MS 法测定人体皮肤角质层中艾迪康唑浓度

吴黎莉¹, 周 可², 徐兰芳¹, 陈 运^{1*}, 盛春泉^{3**}

(¹中国医学科学院皮肤病研究所药物研究室, 南京 210042; ²天津长征医院皮肤科, 天津 300120;

³第二军医大学药物化学教研室, 上海 200433)

摘 要 采用胶带粘贴技术采集人体浅层皮肤样本, 经提取处理后进行 LC-MS 测定, 建立了人体皮肤角质层中艾迪康唑的定量分析方法。LC-MS 测定以酮康唑为内标, 甲醇-0.01% 甲酸水溶液 (65:35) 为流动相, 经 Shim-pack VP ODS C₁₈ 柱分离后, 电喷雾离子化, 选择性正离子检测。研究表明该方法在 0.6~1 800 ng/mL 范围内线性关系良好 ($r=0.9998$), 方法回收率、批内及批间精密度均符合生物样本药物浓度测定要求。运用该方法对 10 例健康志愿者外用艾迪康唑乳膏后皮内药物浓度的动态变化过程进行了初步考察, 结果表明该方法灵敏、专属, 可用于人体局部外用艾迪康唑乳膏后角质层中药物浓度测定及人体皮肤药代动力学研究。

关键词 艾迪康唑; 皮肤药代动力学; LC-MS; 胶带粘贴; 角质层; 含量测定

中图分类号 R969.1 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)01-0079-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140114

Tape stripping technique in combination with LC-MS method for the determination of iodiconazole in human stratum corneum

WU Lili¹, ZHOU Ke², XU Lanfang¹, CHEN Yun^{1*}, SHENG Chunquan^{3**}

¹Department of Pharmacology, Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Nanjing 210042; ²Department of Pharmacology, Changzheng Hospital of Tianjin, Tianjin 300120; ³Department of Medicinal Chemistry, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Abstract A quantitative analysis method of iodiconazole concentrations in human stratum corneum was established. Human superficial skin samples were obtained by tape stripping technique and iodiconazole concentrations were determined by LC-MS method after extraction. Ketoconazole was used as the internal standard (IS). The analytes were chromatographically separated on a Shim-pack VP-ODS C₁₈ column with the mobile phase consisting of methanol and 0.01% formic acid aqueous solution (65:35). Mass spectrometer was operated in positive ion and selective ion monitoring (SIM) mode using electrospray ionization (ESI) technique. The method showed excellent linearity over the concentration range of 0.6-1 800 ng/mL. The recovery and the intra- and inter-batch precisions met the requirements for the determination of biological samples. The dynamic process of intradermal drug concentrations in 10 healthy volunteers after topical application of iodiconazole cream was investigated using this method. The method proved to be selective and sensitive, and suitable for the determination of iodiconazole concentration in human stratum corneum and the pharmacokinetic study after topical application of iodiconazole cream.

Key words iodiconazole; dermatopharmacokinetic; LC-MS; tape stripping; stratum corneum; determination

三唑类抗真菌药是目前临床上应用最为广泛的抗真菌药物, 国外已有多个该类药物上市或进入临

床研究。艾迪康唑 (iodiconazole, 结构式见图 1) 是由第二军医大学张万年教授课题组基于唑类化合物

的构效关系研究结果,通过计算机辅助设计研发的新一代三唑类广谱抗真菌药物^[1-2]。艾迪康唑为麦角固醇生物合成抑制剂,可抑制真菌羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶,干扰细胞膜麦角固醇的合成,导致细胞膜的改变和胞浆内容物的渗出而起抑菌作用,具有广谱、高效和低毒的特点,对深部真菌和浅部真菌均有很强的抗真菌活性,对目前临床上难以治疗的曲霉菌感染也有很强活性^[2,4]。鉴于国内浅部真菌病的发病率较高,艾迪康唑被制成局部皮肤给药的外用制剂,用于皮肤浅部真菌感染的治疗。

皮肤外用制剂主要针对皮损局部病理靶组织发挥药理作用,因而测定药物在局部靶组织的浓度是了解药物在靶部位的量-效关系和量-时关系的关键步骤。系统药代动力学试验方法只表示外用制剂皮肤局部给药后,药物非病理靶点的作用及可能对人体带来的系统不良反应和毒性作用,无法提供药物在病理靶点的相关信息及特点,从而难以对外用制剂的有效性和安全性作出准确评价。胶带粘贴法作为一种采样技术,适用于作用靶位为角质层及表皮上层的局部外用制剂的皮内药物动态过程的研究^[5-7]。本研究运用胶带粘贴技术结合 LC-MS 法,建立了人体皮肤局部外用艾迪康唑乳膏后角质层中药物浓度的定量分析方法,并对人体皮肤外用艾迪康唑乳膏后角质层中药物浓度的动态变化过程进行了初步考察,为艾迪康唑乳膏后续进行深入的皮肤药代动力学研究提供了依据和基础。

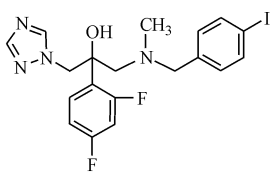


Figure 1 Chemical structure of iodiconazole

1 材料

1.1 药品和试剂

艾迪康唑乳膏(安徽济人药业有限公司、第二军医大学药学院,规格 2%,批号 20091008);艾迪康唑对照品(第二军医大学,纯度 99.67%);酮康唑对照品(中国药品生物制品检定所);甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司);甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司);三蒸水自制。胶带(Scotch 845,美国 3M 公司)

1.2 仪器

LCMS-2010EV 液质联用系统及应用软件 LC-MS solution Version 3.30(日本岛津公司);BP211D 电子天平(德国赛多利斯公司)。

2 方法

2.1 LC-MS 测定条件

色谱柱: Shim-pack VP-ODS C₁₈ (150 mm × 2.0 mm, 5 μ m);流动相: 甲醇-0.01% 甲酸水溶液 (65:35);流速: 0.2 mL/min;ESI-MS 选择性正离子检测,艾迪康唑测定离子 $[M+H]^+$ m/z 484.85;内标酮康唑测定离子 $[M+H]^+$ m/z 531.90。主要 ESI-MSD 工作参数: CDL 温度 250 $^{\circ}$ C; Block 温度 200 $^{\circ}$ C; Probe 电压 +4.5 kV;检测电压 1.45 kV;雾化气流速 1.5 L/min。

2.2 皮肤样品的采集

给药部位擦去剩余药物及限制框,用干医用纱布轻擦至手轻触无黏性感,同一部位固定取样限制框。20 片空白胶带合并称重。1 片胶带中心区域置取样限制框内框,用 400 g 砝码在取样区域做圆周移动,使胶带充分接触皮肤,快速撕脱。同一取样部位采集 20 次,再次合并称重,两次称重质量之差即为粘取的角质层重量 m_{sc} 。

2.3 生物样品处理

将同一部位采集的 20 层粘有皮肤样品的胶带合并置于同一 100 mL 锥形瓶中,加入提取液(甲醇-0.01% 甲酸水,60:40)100 mL,精密加入内标溶液(1 mg/mL)100 μ L,室温浸泡 12 h。涡旋混匀 2 min,取提取液 1 mL,14 000 r/min 高速离心后,上清液供 HPLC-MS 分析。

2.4 健康受试者皮内药物消除的初步考察

试验经中国医学科学院皮肤病医院国家药物临床研究机构伦理委员会审核批准后实施。10 名健康受试者(男性 5 名,女性 5 名,年龄 19~28 岁,体重 51~73 kg,身高 157~180 cm),常规体检及生化检验结果证明肝肾功能正常、心电图正常、精神状态良好。受试前 4 周内未参加过其他皮肤外用药物临床试验,受试前 2 周及实验期间未系统应用其他药物。受试前对试验目的与要求完全了解,并自愿签署知情同意书。

受试者左侧前臂下段及右侧前臂上、中、下共 4 处,两处区域相距至少 2 cm,每处 2 \times 2 cm² 区域

2% 艾迪康唑乳膏 0.5 g 封包给药,1 h 后擦去剩余药物。分别于去除药物后 4,8,12,24 h 按“2.2”项方法采集皮肤样本。按“2.3”项操作后,LC-MS 法测定其中的艾迪康唑浓度 c_v ,按公式(1)换算成皮肤药物浓度 c_{sc} 。式中, V 为提取液的体积, m_{sc} 为角质层重量。

$$c_{sc}(\mu\text{g/g}) = \frac{c_v(\text{ng/mL}) \times V(\text{mL})}{m_{sc}(\text{g}) \times 1\,000} \quad (1)$$

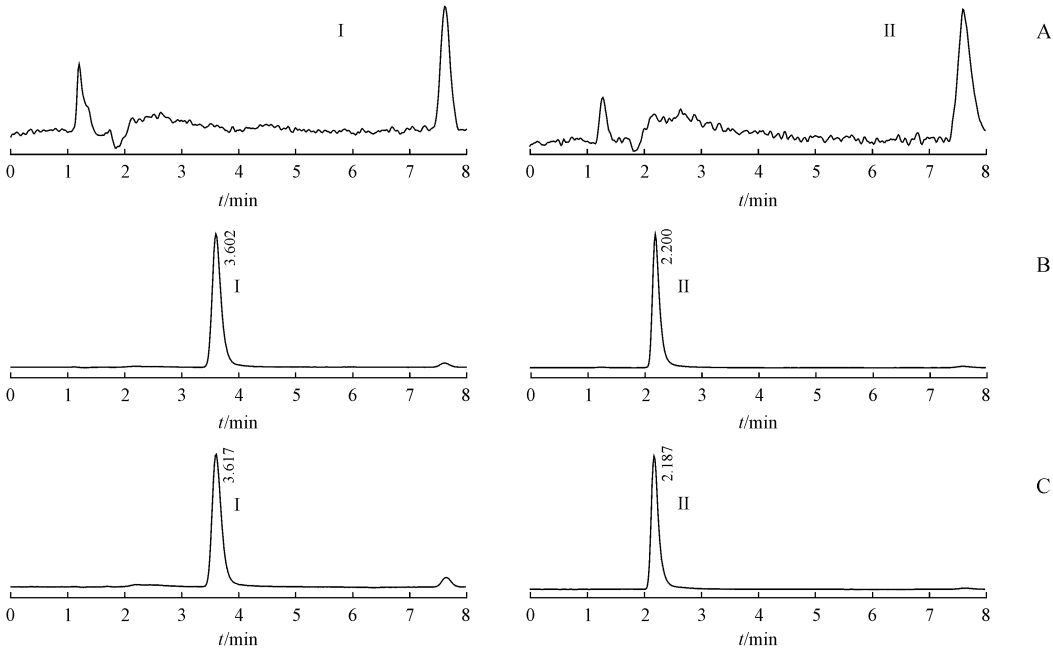


Figure 2 Representative SIM (+) chromatograms of blank stratum corneum sample (A), supplemented stratum corneum sample (B) and stratum corneum sample of a healthy volunteer (iodiconazole 90.30 ng/mL) (C). I: iodiconazole II: ketoconazole

3.2 标准曲线及定量下限

分别精密吸取艾迪康唑标准贮备液适量,置粘有空白皮肤的胶带上,配制成艾迪康唑质量浓度分别为 0.6,3,12,60,300,600,1 800 ng/mL 的生物样本,每一浓度点均为 20 层皮肤胶带的总和。自然挥干后分别按“2.3”项下生物样品处理方法,自“加入 100 mL 提取液”起同样操作,并进行色谱分析,记录色谱峰面积(A_s)与内标色谱峰面积(A_r)。以峰面积比 $R(R = A_s/A_r)$ 对质量浓度(c , ng/mL)进行线性回归,回归方程: $R = 3.467 \times 10^{-3} c +$

3 结果

3.1 特异性

空白皮肤胶带、空白皮肤胶带加艾迪康唑对照品和内标、受试者用药后皮肤胶带的典型图谱如图 2 所示。艾迪康唑和内标酮康唑的保留时间分别为 3.6 min 和 2.2 min 左右,皮肤中的内源性物质及胶带成分对测定无干扰。

2.846×10^{-4} , $r = 0.999\,8$ ($w = 1/c^2$)。表明艾迪康唑生物样品质量浓度在 0.6 ~ 1 800 ng/mL 范围内色谱响应线性关系良好。最低定量限为 0.6 ng/mL。

3.3 精密度和准确度

按标准曲线测定方法配制高、中、低 3 种质量浓度(1.8,300,1 500 ng/mL)的生物样本,进样分析。在一个分析批内测定 5 次,计算批内精密度;在不同天连续制备并测定 3 个分析批,计算批间精密度。结果见表 1。

Table 1 Intra-batch and inter-batch precision and accuracy of iodiconazole($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Added/(ng/mL)	Intra-batch			Inter-batch		
	Found/(ng/mL)	Accuracy/%	RSD/%	Found/(ng/mL)	Accuracy/%	RSD/%
1.8	1.78 ± 0.13	98.71	7.36	1.77 ± 0.10	98.33	5.38
300	293.20 ± 11.66	97.73	3.98	312.87 ± 16.44	104.29	5.25
1 500	1 465.01 ± 12.89	97.67	0.88	1 477.51 ± 30.17	98.50	2.04

3.4 提取回收率

按标准曲线测定方法配制 1.8, 300, 1 500 ng/mL 3 种不同浓度的生物样本各 5 份, 按“2.3”项下方法处理后进样分析, 记录艾迪康唑与内标的色谱峰面积比 A_{s-r} 。另取空白样品 6 份, 分别加入提取液(甲醇-0.01% 甲酸水, 60:40) 100 mL, 浸泡 12 h。加入等量的艾迪康唑应用液适量, 配成各浓度水平标准液各 2 份。精密加入内标溶液(1 mg/mL) 100 μ L, 涡旋混匀 2 min, 取提取液 1 mL, 高速离心后上清液进样分析。测定艾迪康唑与内标的色谱峰面积比 A_{r-r} 。按 $A_{s-r}/A_{r-r} \times 100\%$ 计算, 即得生物样品处理方法的回收率。测得低、中、高 3 种浓度生物样本的回收率(%) 分别为 82.20, 79.20 和 82.59。

3.5 基质效应

取粘有空白皮肤的胶带共 15 份, 每份 20 条(5 种不同来源、每种 3 份)置 100 mL 锥形瓶中, 加入提取液(甲醇-0.01% 甲酸水, 60:40) 100 mL 浸泡 12 h 后, 参照标准曲线测定方法, 分别加入艾迪康唑标准液的稀释液适量, 配成 1.8, 300, 1 500 ng/mL 3 种浓度水平, 每一浓度各 5 份; 另分别取与基质样品组 1.8, 300, 1 500 ng/mL 3 种浓度水平等量的艾迪康唑标准液的稀释液, 置 100 mL 锥形瓶中, 每一浓度各 5 份, 各加入甲醇-0.01% 甲酸水(60:40)液 100 mL。精密加入内标溶液(1 mg/mL) 100 μ L, 涡旋混匀 2 min, 取 1 mL 高速离心后, 上清液供 HPLC/MS 分析, 记录艾迪康唑和内标酮康唑的色谱峰面积。

计算含基质样品组峰面积与无基质对照组峰面积的比值, 以考察不可见干扰(即共流出成分, 主要是内源性物质)对艾迪康唑和酮康唑离子化效率的影响情况, 结果表明艾迪康唑与内标的基质效应均在 85%~115% 之间, 基质对两者离子化效率的影响基本稳定。

3.6 稳定性考察

按标准溶液配制方法配制艾迪康唑质量浓度分别为 1.8 和 1 500 ng/mL 的皮肤样品, 进行室温放置及处理后进样溶液的稳定性考察, 结果表明皮肤样品室温放置 24 h, 处理液室温放置 24 h, 4 $^{\circ}$ C 自动进样器中放置 24 h, -20 $^{\circ}$ C 长期放置 20 d, 稳定性均良好(RSD 均小于 10%)。

3.7 皮内药物浓度动态变化过程的初步考察结果

10 例健康受试者前臂屈侧皮肤外用 2% 艾迪

康唑乳膏 1 h, 去除药物后艾迪康唑平均皮肤药物浓度-时间曲线见图 3。

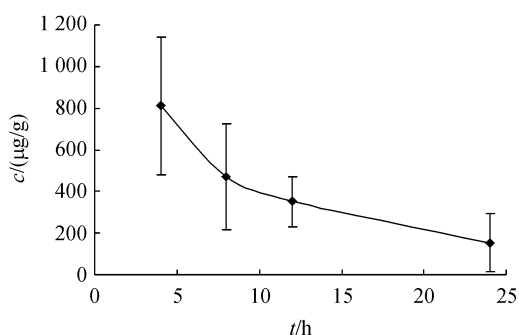


Figure 3 Mean stratum corneum drug concentration-time curve of iodiconazole from 10 volunteers after topical application 2% iodiconazole cream for 1 h ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

与系统给药不同, 局部外用治疗药物要求在规定时间内有足量的药物到达并保持在皮肤和浅表组织中, 以发挥最大的药理学作用。皮肤药代动力学研究药物在皮肤靶部位的吸收、分布、代谢和转归过程, 对创新性局部外用药物的研发具有重要的指导作用^[8]。目前皮肤药代动力学研究方法较多, 如胶带粘贴法、微透析法、激光扫描共聚焦显微镜等, 主要针对外用制剂不同的作用靶位进行选择。这些方法中, 胶带粘贴法对皮肤的伤害相对较小、可自然恢复, 且采集的皮肤样本来自于艾迪康唑外用给药的作用靶部位。虽然不能在同一部位获得连续的时-量数据, 但采用相邻多点给药、采样, 也能得到类似的时-量数据, 计算出动力学参数。

国内外关于生物样本中艾迪康唑浓度测定方法主要有 LC/UV 法^[9]、LC-MS/MS 法^[10]测定血浆中药物浓度, UPLC-UV 法结合微透析技术测定真皮中艾迪康唑药物浓度^[11], 均无法获得药物在其作用靶位中的相关信息。本研究采用胶带粘贴技术结合 LC-MS 法建立了人体皮肤角质层中艾迪康唑浓度的定量分析方法, 并应用该方法考察了局部外用艾迪康唑乳膏后健康受试者角质层中药物浓度动态变化过程。该方法灵敏度高、专属性好、简便、快速、可操作性强, 为艾迪康唑乳膏的进一步深入研究及其临床合理应用、临床治疗的给药剂量及给药频度的确定提供参考。

人体各部位表皮厚度具有差异性, 皱褶部位皮

肤最薄,足部皮肤最厚,而前臂内侧皮肤表皮厚度接近全身表皮厚度平均值。外用制剂人体试验的给药部位大多选择前臂屈侧及背部。虽然背部区域给药及取材均较为方便,但存在毛发、痤疮、毛囊炎等的干扰,而前臂屈侧的干扰因素相对较少。因此本次试验选择在受试者双前臂屈侧用药。

胶带的选择是实验能否顺利进行的重要因素,不同种类胶带的黏性和成分均会影响实验结果。国产普通胶带黏性较小,相同条件下粘取的皮肤样品很少,且其黏性成分对药物的含量测定有干扰。美国 3M 胶带黏性较强,在同一部位粘取数次后即能采集大部分角质层,且黏性成分不干扰艾迪康唑的浓度测定。

采用胶带粘贴法采集皮肤样品,在同一部位粘取 20 层,可除去大约 $(66 \pm 12)\%$ 的角质层,粘取 50 层即可除去几乎全部角质层。用经皮肤水份丧失 (TEWL) 作为指标考核角质层屏障,当 TEWL 达到初始值的 6 倍以上时,75% ~ 80% 的角质层已被除去。以往的研究一般在同一部位粘取 15 ~ 30 层不等。另外,同一部位胶带粘取 20 层,受试者的主观没有异常的不适感;而继续粘取至 30 层时,痛感明显,皮肤外伤性刺激损伤较大。综合上述结果,本研究最终确定的采样层数为每处给药部位粘取 20 次(层)。

胶带采集的皮肤样本不同于血、尿等生物样本,初始样本中除一般的生物杂质外,还含有胶带中的黏性化合物,成分更为复杂。本研究对药物的提取方法进行了探索,考察了酸性、中性及碱性条件下药物回收率和胶带成分的干扰情况。结合 LC-MS 分析对进样溶液的限制,最终选择以甲醇-0.01% 甲酸水 (60:40) 为提取液浸泡 12 h 提取。按本研究建立的生物样品处理方法操作,艾迪康唑的回收率较高且稳定,内源性物质及胶带成分均不干扰艾迪康唑的测定。

胶带粘贴法采集皮肤样品,可使取样部位皮肤产生外伤性的应激性反应(如红、肿等)。针对这些因采样方法所导致的急性皮肤外伤性刺激,参照

临床治疗的经验,在皮肤样本采集后,立即于给药部位涂搽金霉素眼膏,预防可能发生的感染及减少皮肤水份丧失,维持涂搽 1 周后,用硅油乳膏常规皮肤保湿滋润,以减轻皮肤不良反应。本研究 10 例受试者无一例出现继发性皮肤不良反应。

参考文献

- [1] Sheng CQ, Zhang WN, Ji HT, *et al.* Synthesis and antifungal activity of 1-(1*H*-1,2,4-triazole)-2-(2,4-difluorophenyl)-3-(*N*-methyl-*N*-substitutedbenzylamino)-2-propanols [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, **11**(2): 5-10.
- [2] Sheng CQ. Computer-aided design and synthesis of novel antifungal agents (计算机辅助新型抗真菌药物设计与合成) [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2005.
- [3] Zhang WN, Ji HT, Zhou YJ, *et al.* Synthesis of triazole alcohol antifungal compounds (三氮唑醇类抗真菌化合物及其制备方法): CN, 1292378A [P]. 2001-04-25 [2013-09-24].
- [4] Sheng CQ, Zhang WN, Ji HT, *et al.* Innovative design of novel antifungal agents [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 2004, **13**(2): 97-102.
- [5] Herkenne C, Alberti I, Naik A, *et al.* *In vivo* methods for the assessment of topical drug bioavailability [J]. *Pharm Res*, 2008, **25**(1): 87-103.
- [6] Narkar Y. Bioequivalence for topical products—an update [J]. *Pharm Res*, 2010, **27**(12): 2 590-2 601.
- [7] Lionberger RA. FDA critical path initiatives: opportunities for generic drug development [J]. *AAPS J*, 2008, **10**(1): 103-109.
- [8] Xie SM. Pay attention to dermatopharmacokinetics in investigation on the topical dermatological drugs [J]. *Chin J Clin Pharmacol* (中国临床药理学杂志), 2007, **23**(4): 313-315.
- [9] Wen J, Fan GR, Hong ZY, *et al.* High performance liquid chromatographic determination of a new antifungal compound, ADKZ in rat plasma [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, **43**(2): 655-658.
- [10] Gao SH, Tao X, Sun LN, *et al.* An liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for determination of trace amount of new antifungal drug iodiconazole in human plasma [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2009, **877**(4): 382-386.
- [11] Sun N, Wen J, Lu GC, *et al.* An ultra-fast LC method for the determination of iodiconazole in microdialysis samples and its application in the calibration of laboratory-made linear probes [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, **51**(1): 248-251.