

用类脂液晶研究桉叶油的透皮促渗机理

张志燕 平其能 达尤·阿博杜拉

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘 要 采用类脂液晶模型研究桉叶油促进药物透皮吸收机理。用偏振光显微镜确证液晶的形成和结构;并结合 DSC X-ray 衍射、双折射率等研究方法,证明桉叶油可影响液晶形成,改变液晶结构,但并不与类脂分子发生相互作用。油酸可增强桉叶油对液晶的作用。

关键词 类脂液晶;桉叶油;渗透促进剂

角质层细胞间隙是药物经皮吸收的重要通道。研究表明^[1],细胞间隙中充满了类脂成分,阻碍许多药物分子渗透,使很多药物透皮吸收无法满足治疗需要。随着对皮肤结构的深入研究,角质细胞间隙类脂组成已基本明确^[2],其中一些特征脂肪酸在皮肤 pH 下自动排列成典型的液晶结构,如类脂双分子层即为一种液晶结构现象。根据这一特点,国外很多学者提出利用类脂成分制备皮肤替代模型^[3-5],用以进行药物透皮吸收及渗透机理的研究。

促进药物经皮吸收有多种手段,其中促渗剂的利用最为广泛。将药物与促渗剂混合,利用促渗剂与皮肤类脂或蛋白质结构发生相互作用而增加药物渗透。一些研究已证明挥发油可促进药物经皮渗透。桉叶油是一种常用的挥发油,其主要成分 1,8-桉油精已经证明有强大的促渗作用^[6,7],采用差示扫描热分析检查 1,8-桉油精处理过的皮肤角质层,发现角质层类脂热转变峰前移或消失,表明桉叶油可能对类脂结构有作用^[8,9]。本文模拟皮肤类脂成分直接制备类脂液晶,采用偏振光显微镜、差示热分析、X 射线衍射及折射率等方法研究桉叶油与类脂液晶之间的相互作用,以进一步确定和阐明其透皮促进机理。

1 药品与仪器

胆固醇(华美生物工程公司),油酸(化学纯,常州化学工业研究院),棕榈酸(化学纯,上海化学试

剂站),十四烷酸(化学纯,上海化学试剂站),亚油酸(化学纯,上海来泽精细化学品研究所),硬脂酸(化学纯,南京海灵精细化工厂),桉叶油(广州大群化工厂)。DSC 分析仪(Perkin-Elmer 公司, 7-Series),X 射线粉末衍射仪(Rigaku Corporation, Japan),偏振光显微镜(国营江南光学仪器厂),752C 紫外可见分光光度计(上海第三仪器厂)。

2 实验方法

2.1 类脂液晶制备^[5]

类脂组成如表 1,按表中脂肪酸比例,取适量脂肪酸,研磨均匀,置 37℃ 水浴中,保存 12 h,取出后,室温放置 24 h 以上,得类脂液晶。

Tab 1. Composition of model epidermal lipid membrane^[10]

Free fatty acids	W % in mixture
Myristic acid	10
Linoleic acid	15
Oleic acid	55
Palmitic acid	5
Palmitoleic acid	10
Stearic acid	5

2.2 类脂液晶影响因素考察

2.2.1 胆固醇及水的影响 类脂液晶制备过程中,适当比例脂肪酸研磨的同时,加入与脂肪酸等量的胆固醇,均匀混合,续加入 32% (w/w) 蒸馏水,均匀混合,用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 5 左右,在 37℃ 水浴条件下保存 12 h,取出室温放置 24

h以上。观察偏振光显微镜下液晶形态的变化。

2.2.2 桉叶油的影响 按以上相同比例类脂成分,制备液晶,但分别加入一定量桉叶油,然后将混合物在 37°C 水浴条件下放置 12 h,取出,室温放置 24 h 以上。进行各项物理分析。

2.2.3 油酸对桉叶油作用效果的影响 在桉叶油处理液晶的同时,改变类脂组成中油酸的量,用偏振光显微镜观察使含有不同油酸量的液晶模型发生变化及完全被破坏所需桉叶油量的大小,以考察二者的协同作用。

2.3 类脂液晶的物理分析

2.3.1 形态观察 用刮刀挑取少量液晶,置载玻片上,用盖玻片推压使成一薄层,然后放于偏光显微镜载物台上,调节检偏镜及起偏镜偏振方向,观察液晶在偏振光下的外观形态,并拍照。

2.3.2 双折射率测定^[10] 在 752C 紫外可见分光光度计光路中添加两面偏振片,并使其偏振方向相垂直,然后将液晶注入比色杯中,以空白比色杯为对照,测定其吸收度,即为液晶双折射率。

2.3.3 DSC 分析 分别对脂肪酸混合物、液晶及桉叶油处理后的液晶进行 DSC 分析。DSC 条件:空白铝皿为对照,升温速度 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升温范围 $25 \sim 150^{\circ}\text{C}$ 。

2.3.4 X-射线衍射 分别对脂肪酸混合物、液晶及桉叶油处理后的液晶进行 X 射线衍射分析。测定条件:石墨弯晶单色器使衍射束单色化,高压 40 kV,管流 50 mA,扫描速度 $5^{\circ}/\text{min}$ 。

3 结果与讨论

3.1 外加成分对类脂液晶形态的影响

类脂液晶的形态如图 1 各脂肪酸间相互作用

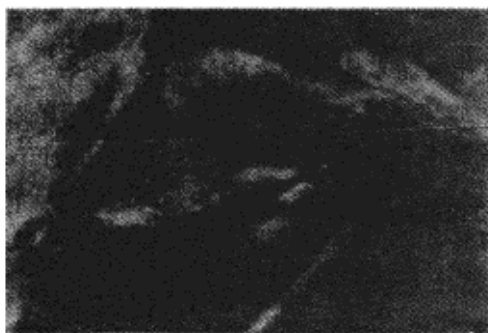


Fig 1. The microscopy patterns in polarized light of model membrane (magnification: 10×40)

形成层状液晶结构。当加入胆固醇及大量 (32%) 蒸馏水并进行碱化后,原有的液晶结构并未破坏,但形态发生了改变,形成了典型的马耳他十字型液晶结构 (图 2)。很显然,生理类脂组分只影响液晶形成的类型,但并不破坏已形成的液晶结构;而且在制备中观察到,未加热的类脂混合物不显现液晶结构,适宜的温度促进液晶的形成,这可能与类脂分子在一定温度下才能产生自由运动,相互间组成整齐排列有关。

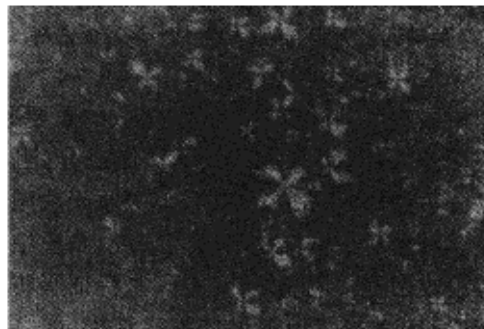


Fig 2. The microscopy patterns in polarized light of model membrane after added cholesterol and water (magnification 10×40)

继续在该类脂液晶中加入桉叶油后,与其加入水及胆固醇不同,在低浓度 (10%) 时,液晶形状发生膨胀,高浓度时 (20% 以上),液晶结构被完全破坏 (图 3)。由此可以推测,少量桉叶油可以插入到类脂液晶结构中,使晶态分子之间距离扩大,增加脂质双分子层结构的流动性,而高浓度的桉叶油则可以完全破坏类脂分子的整齐排列,这与桉叶油增加药物透皮吸收具有浓度依赖性相一致。

油酸作为角质层类脂成分之一,本身又是一种透皮促进剂。改变液晶结构中油酸含量,用偏振光显微镜观察桉叶油对液晶作用效果,结果见图 4。阴影区以上为液晶完全受破坏区域,以下为液晶形态完整区域。当油酸量超过角质层中脂肪酸组成中固有量时,随油酸增多,使液晶结构发生同等变化所需桉叶油量下降,由此可推测二者之间存在协同作用。

3.2 桉叶油对液晶双折射率的影响

液晶不同于非晶态化合物,由于其组成分子相互整齐排列,已具有类似于固体的性质。双折射率是晶体的特征物理参数,表征晶体分子间结构的变化。类脂液晶双折射率测定结果见表 2。虽然在加入 5% 桉叶油后使液晶结构膨胀,但仍保持相同

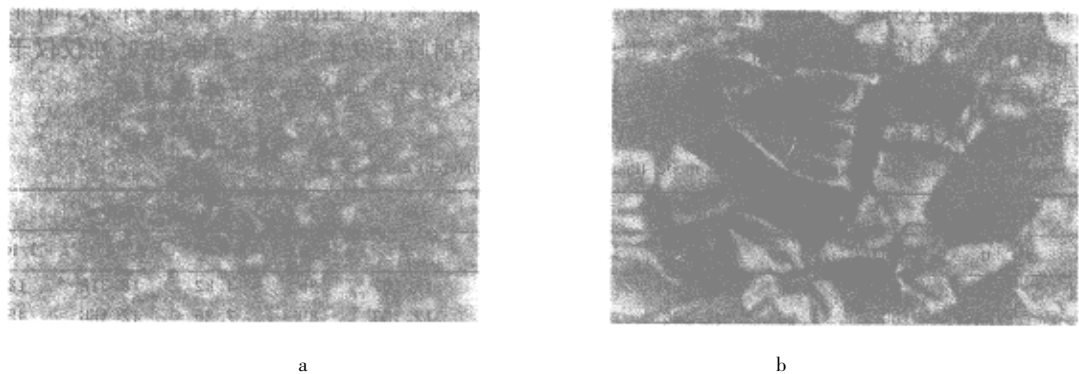


Fig 3. The effect of eucalyptus oil on microscopy patterns of lipid membrane containing cholesterol and water
(a)10% eucalyptus oil (b) 20% eucalyptus oil(magnification: 10 \times 40)

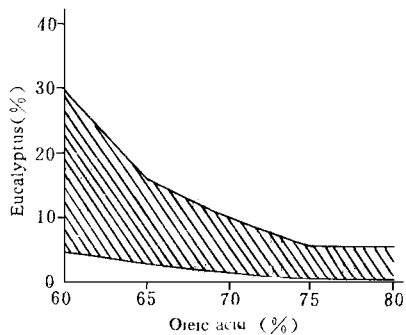


Fig 4. The confluence of oleic acid and eucalyptus oil on model membrane

晶态特征,所以液晶双折射率均无显著变化。当加入的桉叶油达 10%时,液晶结构被破坏,使液晶整齐 的分子排列产生明显变动,双折射率增大,表明液晶透光性增加,证实桉叶油插入到液晶结构中,改变了原有的致密结构。

Tab 2. The effect of eucalyptus oil on model lipid membrane birefractive indices(BI)

Eucalyptus oil(%)	0	1	5	10	20
BI	0.08	0.09	0.10	0.20	0.26

3.3 桉叶油对液晶 DSC特征的改变

类脂混合物 液晶及其加有桉叶油后的 DSC 图谱如图 5所示。类脂混合物的 DSC图谱中有十几个峰,表明各脂肪酸相互独立,不发生相互作用。而液晶仅有 6个峰出现,证明脂肪酸之间发生相互作用,形成不同于混合物的结构。当加入桉叶油时,类脂吸热峰前移甚至消失,表明液晶结构被破坏。这与 Williams等人^[11]用人体皮肤角质层及 1,8-桉油精所作 DSC图谱有完全相似的倾向,虽然吸热

峰出现的数量及温度互有差异,这是由于所用类脂成分与角质层组织不完全一致,液晶性质不同的结果。

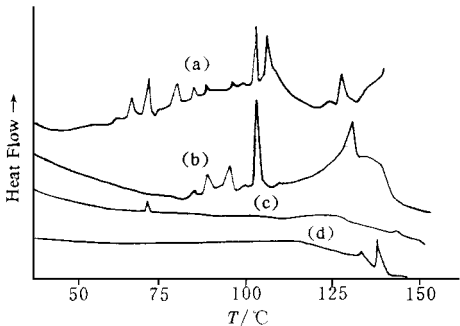


Fig 5. DSC scans for model membrane and the effect of eucalyptus oil on it
a. physical mixture of fatty acids; b. model membrane; c. model membrane containing 5% eucalyptus oil; d. model membrane containing 10% eucalyptus oil

3.4 桉叶油对液晶 X-射线衍射的影响

脂肪酸混合物 液晶及其加有桉叶油后的 X 射线衍射图谱如图 6所示。物理混合物及液晶结构

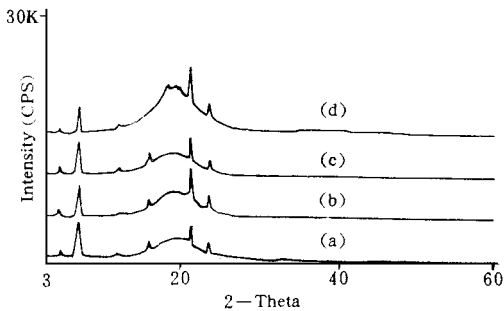


Fig 6. X-ray diffraction patterns of model membrane
a. physical mixture of fatty acids; b. model membrane; c. model membrane containing 5% eucalyptus oil; d. model membrane containing 10% eucalyptus oil

中均有晶体区和液晶区谱带,但类脂液晶与物理混合物的图谱相比,布喇格空间及峰密度、峰数明显降低(如表3所示),显然结构存在差异。当加入桉叶油处理后,液晶布喇格空间进一步增大,峰密度

进一步下降,而且液晶区有衍射峰消失,而非液晶区的衍射峰未发生变化。因而,桉叶油仅仅干扰液晶结构,并未影响类脂分子本身结构。

Tab 3. Mean bragg spacings(d), and relative intensities of model lipid membranes at different angles (2θ)

	1A ^a			1B ^b			1C ^c			1D ^d		
	2-θ	d	I/I0	2-θ	d	I/I0	2-θ	d	I/I0	2-θ	d	I/I0
1	4.84	18.243	37	4.86	18.167	24	4.86	18.167	35	4.82	18.318	18
2	7.2	12.267	100	7.26	12.166	63	7.28	12.133	89	7.26	12.166	45
3	9.6	9.205	25									
4	12.08	7.32	30	12.14	7.284	22	12.18	7.26	34	12.16	7.272	24
5	16.24	5.453	54	16.22	5.46	43	16.22	5.46	67			
6										18.7	4.741	77
7										19.16	4.628	78
8	21.48	4.133	88	21.46	4.137	100	21.48	4.349	100	21.34	4.16	100
9	22.28	3.986	44									
10	23.6	3.766	44	23.68	3.754	50	23.76	4.133	48	23.64	3.76	52
11	32.82	2.726	13	32.8	2.728	12	32.8	3.741	15			
12	40.2	2.241	10				40.38	2.231	11	40.24	2.239	14
13	40.9	2.204	9							40.7	2.215	15
14				41	2.199	9	41.02	2.198	11			
15	45.36	1.997	8	45.34	1.988	8	45.46	1.993	10	45.26	2.001	11

1A^a: model lipid membrane mixture; 1B^b: model lipid liquid crystal preparation; 1C^c: model lipid liquid crystal preparation containing 5% eucalyptus oil; 1D^d: model lipid liquid crystal preparation containing 10% eucalyptus oil

4 小 结

以上系列研究表明,皮肤类脂层游离脂肪酸在适当条件下可形成层状液晶结构,胆固醇的加入及适宜的皂化后形成另一种马耳它十字形液晶。促渗剂桉叶油的加入则使液晶结构发生改变。偏振光显微镜下可见液晶结构疏松化;双折射率变大;DSC图谱中热转变峰前移直至消失;X射线衍射图谱中有衍射峰消失,而且上述变化具有明显的浓度依赖性。表明在较高浓度时,桉叶油渗透进入液晶结构中,打乱甚至破坏液晶结构,但并不影响类脂分子本身结构,这也许是桉叶油促进药物经皮吸收的原因之一。

参 考 文 献

1 Elias PM, Gierke J, Friend DS. Permeability barrier lipids. Composition and influence of epidermal structure. *J Invest Dermatol.* 1977, **69**: 535

2 Friberg SE, Osborne DW. Small angle X-ray diffraction patterns of stratum corneum and a model structure for its lipids. *J Disp Sci Technol*, 1985, **6**: 485

3 Abraham W, Wertz PW, Downing DT. Linoleate-rich acylglucosylceramides of pig epidermis: structure determination by

proton magnetic resonance. *J Lipid Res*, 1985, **26**: 761

4 Hussein G, Ibrahim K. Release studies from lyotropic liquid crystal systems. *J Pharm Sci*, 1989, **78**: 683

5 Stig EF, Ibrahim K. Water evaporation rates from a model of stratum corneum lipids. *J Pharm Sci*, 1989, **78**: 639

6 达尤·阿博杜拉, 平其能, 刘国杰. Enhancing effect of eucalyptus oil, and itsβ-cyclodextrin complex on the permeation of 5-Fu through excised rat skin. *中国药科大学学报*, 1996, **27**(2): 77

7 达尤·阿博杜拉, 平其能, 刘国杰. Effect of essential oils on the penetration of 5-FU through rat skin. *药科学报*, 1996, **31**(3): 214

8 郑梁元, 平其能. 促渗剂对水合肼脂类脂转变影响的差示扫描热分析研究. *中国药科大学学报*, 1994, **25**(2): 92

9 平其能, 孙国庆, 刘国杰. 角质层及其脂类对5氟脲嘧啶经皮渗透的作用. *药科学报*, 1993, **28**(12): 924

10 Lampe MA, Burlingame AL, Whitney J. Human stratum corneum lipids: characterization and regional variations. *J Lipids Res*, 1983, **24**: 120

11 Iiams AC, Barry BW. Permeation, FTIR and DSC investigation of terpene penetration enhancers in human skin. *J Pharm Pharmacol*, 1989, **41**: 12(Suppl)

12 Paul A, Kenneth AW, Keith RB. Surfactant effects in percutaneous absorption: Effects on protein and lipid structure of the stratum corneum. *Int J Pharm*, 1992, **87**: 265

Studies on the Mechanism of Eucalyptus Oil Enhancing Percutaneous Absorption

Zhang Zhiyan, Ping Qineng, D Abdullah

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract The mechanism of eucalyptus oil enhancing percutaneous absorption has been studied by using a model lipid membrane. The polarized microscopy was used to identify the structure of liquid crystal and the influence of eucalyptus oil loading on it. Methods such as DSC, X-ray, and birefractive index were combined to prove that the eucalyptus oil, at higher loading, can insert into liquid crystal structures causing the expansion or disappearing of its lamellar structure, but does not cause any change in the chemical structure of lipid molecular. So it can be concluded that the interaction between the eucalyptus oil and lipid membrane may be reversible. Furthermore, oleic acid can increase the ability of eucalyptus oil.

Key words Liquid crystal; Eucalyptus oil; Enhancer