

計畫編號：DOH90-TD-1110

行政院衛生署九十年科技研究發展計畫

Flurbiprofen 水性凝膠之生體外及
生體內經皮吸收研究

研究報告

執行機構：臺北醫學大學

計畫主持人：方嘉佑

研究人員：黃婉翠、邱顯智、鄭曉菁

執行期間：90 年 1 月 1 日至 90 年 12 月 31 日

※※本研究報告僅供參考，不代表本署意見※※

目 錄

一、 中文摘要及英文摘要	page 1
二、 前言	page 4
三、 材料與方法	page 15
四、 結果與討論	page 21
五、 結論與建議	page 51
六、 參考文獻	page 52

圖 次

圖一	page 27
圖二	page 32
圖三	page 38
圖四之一	page 41
圖四之二	page 42
圖四之三	page 43
圖四之四	page 44
圖五之一	page 46
圖五之二	page 47
圖五之三	page 48
圖五之四	page 49

表 次

表一-----page 22

表二-----page 25

表三-----page 30

表四-----page 39

一、摘要

Flurbiprofen (2-(2-fluoro-4-biphenyl)-propionic acid) 為一種非固醇類抗發炎劑 (Non-steroidal Anti-inflammatory drugs, NSAIDs)。在藥物動力學方面 flurbiprofen 之體內半衰期僅約 3 至 4 小時，因此基本上 flurbiprofen 合適以經皮輸藥系統方式投與以避免肝臟首渡效應 (first-pass effect) 的發生並達到控制釋出 (controlled release) 的目的以減少投藥頻率。藥物以經皮輸藥方式給予時其載體 (carriers; vehicles) 之不同會明顯影響其經皮吸收能力，今擬以 flurbiprofen 為模式藥物，設計其水性凝膠半固體劑型從事生體外及生體內經皮吸收研究。本計畫將分為生體外評估及生體內評估兩部份進行，在體外評估方面最主要是以人工 cellulose 膜及裸鼠全皮為主要滲透障壁，經由選擇生體外試驗較適宜之處方進行生體內經皮吸收之評估，配合藥物動力學研究檢視 flurbiprofen 於生體內之經皮吸收能力，並與體內實驗數據結果進行比較以評定是否具有相關性。實驗結果顯示 carboxymethyl. cellulose 水性凝膠具有較佳之載體效果提供 flurbiprofen 經皮吸收能力，而加入助溶劑後並不會增加 flurbiprofen 之穿透速率。一系列之促進劑中以 d-limonene 此精油成份效果最佳，相反的磷脂質類不但沒有促進效用反而有抑制 flurbiprofen 經皮吸收的效應。體內試驗結果發現在十二小時內大白鼠的血漿中並不含

有任何 flurbiprofen 之含量。此計畫之實驗結果可作為未來 flurbiprofen 經皮吸收甚至局部皮膚投與製劑之參考。

關鍵詞：flurbiprofen；經皮輸藥系統；水性凝膠；促進劑

1, Abstract

Flurbiprofen is a chiral nonsteroidal anti-inflammatory drug of the 2-arylpropionic acid class. It is one of the most potent inhibitors of platelet aggregation currently available. Because of its short elimination half-life of 3.9 h and requires frequent dosing, a long-term percutaneous absorption of flurbiprofen at a controlled rate is needed. This study is focus on the use of chemicals to alter the skin permeation and drug retained in skin of flurbiprofen. The cellulose polymers with or without charges were used to form hydrogels as the vehicles of flurbiprofen. The result shows that carboxymethyl cellulose-formed hydrogels exhibited an excellent vehicle for flurbiprofen to permeate across skin. The incorporation of cosolvents into hydrogels did not enhance the transdermal flux and drug reservoir in skin for flurbiprofen. The d-limonene, a cyclic monoterpene, showed the highest enhancement for flurbiprofen permeation among a series of enhancers. However, phospholipid retarded the skin permeation of flurbiprofen which was opposite to the other enhancers. In the in vivo experiments, no detectable amount of flurbiprofen was observed in the plasma of rat during 12 h after application of hydrogels with or without d-limonene. The results of this study is helpful for the future development of transdermal or topical application of flurbiprofen.

Keywords: flurbiprofen; transdermal drug delivery systems; hydrogels; enhancers

二、前言

二之一：Flurbiprofen 經皮輸藥系統之發展背景

Flurbiprofen (2-(2-fluoro-4-biphenyl)-propionic acid) 為一種非固醇類抗發炎劑 (Non-steroidal Anti-inflammatory drugs, NSAIDs)，其具有止痛、抗發炎及退熱等藥理療效。先前之研究顯示 flurbiprofen 抑制體內 prostaglandin 合成之效果較 indomethacin 為佳，且對消除 leukocyte chemotaxis 之發炎範圍之作用極強 (Crook & Collins, 1975; Adams et al., 1977)。而且 flurbiprofen 抑制血小板凝集之能力顯著較其他 NSAIDs 藥物為強 (Marsh et al., 1986)，因此此藥物為一相當強效之治療藥物。在藥物動力學方面 flurbiprofen 之體內半衰期謹約 3 至 4 小時，且一般投藥頻率一天須 3 甚至 4 次，較其他 NSAIDs 藥物為高，因此基本上 flurbiprofen 合適以經皮輸藥系統方式投與以避免肝臟首渡效應 (first-pass effect) 的發生並達到控制釋出 (controlled release) 的目的以減少投藥頻率。除此之外，口服 flurbiprofen 在 37% 的病患中會產生胃腸道毒性作用 (gastrointestinal toxicity) (Sheldrake et al., 1977)，因此若能以經皮方式投與則亦可降低其副作用。經皮輸藥系統最大的限制在於若藥物之每日投與劑量過大則無法或不適合藉此方式投與 (Finnin & Morgan, 1999)，而 flurbiprofen 每日劑量較其他 NSAIDs 藥物如：fenbufen,

etodolac, fenclofenac 等為低 (Marsh et al., 1986)，由此可證明 flurbiprofen 確實可經由皮膚穿透模式達到治療目的。而雖然 flurbiprofen 之每日劑量還是較 oxicam 類為高，但是依 Finnin 與 Morgan 於 1999 年 Journal of Pharmaceutical Sciences (Vol.88, Page 955-958) 所發表之回顧文章所言，傳統之經皮輸藥系統之模式藥物選擇其中之劑量不宜過高此限制已由這幾年化學或物理性促進方法之發展與進步而被打破，意即劑量的限制是可以被克服的。因此本研究計劃之設計加入經皮吸收促進劑之篩選的理由亦即在此。

藥物以經皮輸藥方式給予時其載體 (carriers; vehicles) 之不同會明顯影響其經皮吸收能力，若藥物將來擬應用於臨床上則固體或半固體劑型較溶液製劑更為適當，一般而言現今臨床上使用之劑型以貼片型式及軟膏製劑較常被應用，明尼蘇達礦業公司 (3M Co.) 亦於 1997 年申請一種 flurbiprofen 之貼片處方專利 (Minnesota Mining & Manufacturing Co., WO9723205-A (1997))。貼片劑型雖然有投與劑量準確、可達緩釋效果 (sustained release) 及製造品質均一等優點，但是實際上對於藥品製造業如藥廠而言由於其製作成本高，而且於實驗室之研究處方於現場製造時常常會遭遇瓶頸而無法順利量產。尤其對國產藥廠而言大多屬於中小企業，若其產品最主要為內銷市場而無法拓展外銷時，為製作貼片而購入昂貴的機器則幾乎不

可能，且為了反應成本則貼片之售價必然昂貴，消費者購買之意願有限，加上台灣地處潮濕悶熱氣候，而貼片大都為覆蓋形式 (occlusive dressing)，消費者貼上後易流汗且有濕熱黏稠感亦為難以解決之問題。綜上所述，今擬以 flurbiprofen 為模式藥物，設計其水性凝膠半固體劑型從事生體外及生體內經皮吸收研究。由於水性凝膠其處方除了少部份高分子聚合物 (polymers) 以外，其餘幾乎皆為水或緩衝液，因此其製造成本基本上相當低廉，而且外觀透明質感極佳，消費者接受度頗高 (Kim et al., 1992)。若考慮台灣濕熱之氣候則可於凝膠處方內加入乙醇等溶媒則消費者投與後甚至有清涼的自覺感受。於藥廠的角度來說，其成本低廉，製程簡易不須複雜技術，現今於化妝品工業之應用已頗多，因此今擬以水性凝膠為主從事處方設計，並且除了 flurbiprofen 以外可推廣及其他經皮吸收或皮膚局部作用藥物，期望有一定研究成果後可申請專利並技術轉移與國產藥廠。

於計畫主持人之先前論文中有關水性凝膠做為經皮吸收藥物載體之相關研究已發表 10 篇於國際性科學期刊上 (Fang et al., 1995; 1996; 1997; 1998; 1999)，並已建立一套完整之處方篩選模式，經由此一系系列基礎學術研究後應是開花結果回饋並應用於產業界的時候，於本計畫中擬使用製備水性凝膠之高分子聚合物皆為較新型之

原料，以有別於之前本研究室常用之傳統材料包括：Carbopol 934、polyvinylpyrrolidone、Eudragit 及 methylcellulose 等。本計畫所使用之聚合物包括帶陽離子電荷之天然聚甲殼糖 (chitosan)、帶陰離子之 carboxymethyl cellulose (CMC) 及不帶電荷之 Pluronic F-127 和 Gelrite。皆為近年來於藥劑研究上相當熱門之聚合物。聚甲殼糖是衍生自甲殼類外殼的鹼性去乙酰化產品 (Lu et al., 1999)。此天然陽離子聚糖具有生物可利用的性質，如無毒性、生體相容性高級無抗原性 (Lu et al., 1999.; Tsai et al., 1999)。陰離子性的 CMC 為一種合成的水溶性纖維素(water soluble cellulose)，大部分可用為藥物傳輸系統的基質 (Doelker et al., 1987)。茲可比較自 CMC 自不同的對等離子(counterion)，如-NH₄⁺及-Na⁺的藥物釋出性質。Pluronic 是被用在藥物傳輸系統的聚合物之一。此聚合物的獨特性是具有可逆性的感溫膠質。20-30% W/W 的 Pluronic 聚合物的濃溶液在冰箱貯存下是流體(5°C)，而在體溫下則是形成軟凝膠 (Barichello et al., 1999)。Gelrite 之特點在於其處方加入離子後會呈現不同之物理化學性質及黏稠度 (Rozier et al., 1989)，其大多應用於眼用製劑，具有可變之諸多性質藉以改變調節藥物之釋出能力。以上四種聚合物除個別製成處方外，另外也將不同之聚合物以不同比例加以混合設計成 binary 甚至於 triple polymer systems 以改善彼此之間之缺點，例如

chitosan 之機械性質或 Pluronic 之過於黏稠性等，以為將來應用於臨床之合適性及藥物釋出能力。

二之二：經皮輸藥系統之簡介(Trnasdermal Drug Delivery System)

2-2-1 定義

所謂藥物傳輸系統(Drug Delivery System)是利用各種載體以適當的方法和用藥途徑將藥物有效地送入體內，以達到治療效果。而經皮輸藥系統則是一種可控制的輸藥系統，能持續的控制藥物釋出到達皮膚的表皮，藥物經穿透表皮後進入微血管，再經循環系統到達治療標的區以達到療效。其最大的優點便在於使用方便，施用於皮膚上可隨時停止用藥，不致於發生藥物快速大量釋出的危險。一位正常的成年人其皮膚總面積約為 2m^2 左右，而微血管之血流量約佔全身血流量之三分之一，因此經皮輸藥系統是一種極富潛力的給藥途徑 (Chien, 1983)。

2-2-2 皮膚特性

人體皮膚的結構大致上可以分為表皮(epidermis)、真皮(dermis)及皮下組織(hypodermis)三層，而表皮層的最外層為角質層(stratum corneum)所覆蓋，角質層為多層排列緊密、含水量少、低活性的角質化細胞所構成。此角質層通常是藥物穿透皮膚時最大的障礙區域，而

這也是發展經皮輸藥系統最需要突破的瓶頸 (Chien, 1984)。

藥物穿透皮膚的途徑最主要可分為下列五種方式(Kligman, 1983):

1. 直接穿透角質層
2. 經由細胞間隙穿透
3. 經由汗腺穿透
4. 經由毛囊穿透
5. 經由皮脂腺穿透

上述的五種途徑，以後面三者之穿透速率較快速，但汗腺、毛囊及皮脂腺僅佔皮膚總面積的 0.1%，因此藥物穿透皮膚之途徑以前二者為主。

2-2-3 原理

至於藥物對皮膚的穿透原理，可以用 Fick's law 說明，由物質穿透薄膜（半透膜）的方式來加以解釋。若薄膜的面積與厚度分別為 A 及 h ，薄膜置於兩個腔室之間，左邊含有藥物稱為施藥端 (Donor site)，右邊實驗時初為不含藥物之溶液為受藥端 (Receptor site)，藥物可由施藥端穿透薄膜而達到受藥端，經過了一段時間後而達到穩定狀態 (steady state)。

假設施藥端及受藥端的濃度分別為 C_a 及 C_b ，薄膜近施藥端及受

藥端的濃度分別為 C_{ma} 及 C_{mb} ，則此時單位時間內穿透的藥量可依 Fick's first law 來加以說明：

$$J = dQ/dt = DA(C_{ma} - C_{mb})/h \dots\dots\dots(1)$$

J 為流通量， D 為擴散係數， A 為穿透之面積， h 為薄膜之厚度。

若設 K 為藥物在薄膜兩水溶液間的分配係數，則：

$$C_{ma} = K C_a \dots\dots\dots(2)$$

$$C_{mb} = K C_b \dots\dots\dots(3)$$

$$DQ/dt = DKA(C_a - C_b)/h \dots\dots\dots(4)$$

但是擴散係數 D 與分配係數 K 之數值不易得到，故將 D 、 K 及 h

合併即得穿透係數 P ：

$$P = DK/h \dots\dots\dots(5)$$

受藥端的藥物濃度若控制成 Sink condition，也就是 $C_a \gg C_b$ ，則

可得下列公式：

$$dQ/dt = PAC_a \dots\dots\dots(6)$$

$$Q = PAC_a t \dots\dots\dots(7)$$

以藥物之累積量對時間作圖，可得一斜率為 PAC_a 的直線，利用此直線的斜率可求得藥物的穿透係數 P 。穿透係數的值代表藥物穿透薄膜的能力。

2-2-4 經皮輸藥系統

經皮輸藥系統最主要的優點為(Karim, 1983):

1. 吸收不經胃腸道及肝臟，因此可以適用於高首渡效應或對胃腸道產生不適的藥物。
2. 血中濃度變化較小，可是用於療效指數較窄的藥物。
3. 易除去，可停止藥物再進入體內，可避免藥物大量且快速釋出被吸收的危險性。
4. 給藥次數減少，半夜不需起床服藥。
5. 用藥方便，病人較願意合作。

但是經皮輸藥系統也有幾項缺點：

1. 一般藥物穿透皮膚困難，僅有少數穿透性良好，且劑量小藥效強的藥物才較適用於經皮輸藥方式。
2. 皮膚易發生過敏反應。
3. 價格較貴。

經皮輸藥系統 (transdermal drug delivery system, TDDS) 是為軟膏或貼片製劑施用於皮膚產生全身性療效用，以改進口服或其他投與方法之缺點的劑型。因為藥物經皮吸收的量十分有限，所以目前市面上所販售的已開發經皮吸收產生全身性療效的藥物，通常仍舊是以劑量小的藥物為主，如 Clonidine, Scopolamine, Nitroglycerine 和 Estradiol 等。另外市售凝膠型軟膏如 Etofenamate, Flufenamic 及 Niflumic acid 等非類固醇類抗炎劑，由於劑量較大，雖屬於經皮吸收軟膏，但使用

上仍以塗服於患部以產生局部作用為主。

二之三：研究目的

- (1) 本計畫將分為生體外評估及生體內評估兩部份進行，在體外評估方面最主要是以人工 cellulose 膜、離體人類上皮組織及裸鼠全皮為主要滲透障壁，施藥端充填 flurbiprofen 處方，受藥端充填 pH 7.4 緩衝液，經由 Franz diffusion cell 裝置計算辣椒素於不同處方之釋出速率。而於生體內試驗方面則以 Wistar 系大白鼠為實驗動物模式進行血中 flurbiprofen 濃度監測，將水性凝膠以覆蓋法投與於大白鼠去毛腹部，經時以頸動脈滯留針取樣並以高效能液相層析儀 (HPLC) 定量之。最後並且計算生體外及生體內試驗是否具相關性並評量此一系系列實驗方法之適用性。
- (2) 經由測定一系列 flurbiprofen 之水性凝膠之體外釋出速率及經皮吸收速率可比較不同處方對 flurbiprofen 經皮吸收能力之影響，並配合凝膠之物理化學性質測定如：pH 值及黏稠度 (viscosity) 篩選出較合適之處方進行進一步的評估，且歸納處方對 flurbiprofen 釋出之主要影響原因或關鍵為何。本研究計劃所選用之人工膜為親水性 cellulose 材質之半透膜，選擇此人工膜之目的在於由於藥物穿透皮膚吸收主要分為二個 steps，第一個

step 為藥物必須先從處方中釋放出來，第二個 step 則為藥物穿越皮膚角質層此滲透障壁，flurbiprofen 之水性凝膠穿透人工膜之試驗其主要目的為瞭解第一個 step 於整個 flurbiprofen 穿透皮膚吸收佔何種程度之重要性，經由計算藥物釋放速率 (release rate) 可知若釋放速率與整體穿透速率成正比或有線性關係，則可推測第一個 step 為速率決定步驟，反之則為第二個 step 為速率決定步驟。

- (3) 本研究計劃所採用之經皮吸收促進劑最主要選自四種 groups，分別是 (1) 18 個碳不同雙鍵數目之不飽和脂肪酸，選擇之理由為一個南韓研究群曾經以 oleic acid、linoleic acid 及 linolenic acid 促進 flurbiprofen 之體外經皮吸收而獲至良好的正面效果 (Int. J. Pharm. 126, 267-274)；(2) Azone 為目前在商業上或臨床上最汎用之經皮吸收促進劑，其一系列衍生物亦廣泛被研究；(3) d-Limonene 為自植物精油中抽取之 cyclic monoterpene，其他如 1,8-cineole、eugenol、terpeniol 等皆顯示其高促進效果及低毒性之優勢；(4) l- α -Lecithin 即為卵磷脂，在一些研究報告中指稱其可促進 NSAIDs 之經皮吸收速率。
- (4) 經由選擇生體外試驗較適宜之處方進行生體內經皮吸收之評估，配合藥物動力學研究檢視 flurbiprofen 於生體內之經皮吸收

能力，並與體內實驗數據結果進行比較以評定是否具有相關性，

除此之外亦與其他 NSAIDs 藥物做比較並藉以修正處方設計。

- (5) 經由上述一系列體外及體內試驗之研究成果，由此決定數種於經皮吸收能力、藥理作用、物理化學性質皆理想的 flurbiprofen 水性凝膠製劑，將嘗試申請專利並將處方內容、製作技術及實驗數據提供給予所須要或有興趣之國產藥廠，並協助解決其大量生產所可能遭遇的障礙及問題，以俾使將來能有機會量產成市售產品。

三、材料與方法

三之一：材料

Na_2HPO_4 , Merck. U.S.A.

Citric acid, Merck. U.S.A.

Acetonitrile, BDH. England

Acetic acid, NIHON SHIYAKU. Japan

Methanol, BDH. England

Lactic acid, WAKO. Japan

TransporeTM, 3M. U.S.A.

MicroporeTM, 3M. U.S.A.

不織布手術巾, Johnson. U.S.A.

小棉球. Taiwan

Parafilm. American National CAN. U.S.A.

CMCNa, WAKO. Japan

CMCNH₄, WAKO. Japan

EtOH, FLUKA. Japan

Azone. Taiwan

Propylene glycol, NIHON SHIYAKU. Japan

Pluronic F127, Sigma. U.S.A.

Chitosan 100, WAKO. Japan

三之二：儀器設備

微量天平 TR 64 Denver Instrument company, U.S.A.

多磁點攪拌器 VaARI MAG, U.S.A.

電動天平 Mettler Toledo MonoBloc PB 602-s, U.S.A.

離心機, Denver instrument, U.S.A.

離心機, Digisystem Laboratory Instrument, U.S.A.

粘度計 Brookfield, Model DV-2 plus, U.S.A.

試管震盪混合器 Scientific industries, U.S.A.

超音波震盪器 Power Sonic 410, Korea

酸鹼度測定器 Suntex, Taiwan

試管含橡皮蓋, Taiwan

水浴震盪器 Chering Huei, Taiwan

HPLC, Hitachi, Japan

Column: Merck 50943 RP-18 層析管, 長 25cm 管內直徑 3.9mm

三之三：溶媒配製

3-3-1 自製處方 pH4 溶媒

每 200ml 中含 0.2M Na_2HPO_4 16.4 ml, 0.1M Citric acid 4.4 ml

3-3-2 體外釋出實驗與 HPLC 分析檢品稀釋 pH7.4 溶媒

每 200ml 中含 0.2M Na_2HPO_4 18.2 ml, 0.1M Citric acid 3.1 ml

三之四：水性凝膠粘稠度之性質測定

使用 Brookfield viscometer RVT DV II plus type 粘度計, spindle 51。
稱取各種軟膏處方 0.3gm 置於粘度計之圓盤中，在 0.5 rpm 的轉速下，60 秒後，測定 37°C 之粘度值。粘度單位定義為 cps。

三之五：體外釋出實驗

本實驗採用的軟膏釋出裝置參考自 Yie W. Chien 設計之體外釋出實驗裝置 (Chien et al., 1983)。其構造為一組直立式，上下可分離的雙層擴散玻璃容器。下端容器內充填 10ml 之 pH=7.4 磷酸鹽 citric acid (McIlvaine) 緩衝溶液，底部並且放置攪拌石於多磁點攪拌器上以 600 rpm 之定速加以攪拌。(由於有 stagnant layer 形同在供藥端底層有類似角質層屏障，因此用攪拌石攪拌打破此屏障，改善軟膏滲透)。在釋出裝置中的內外壁夾層以 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 之循環水充填之，以維持恆定的溫度。上端之容器內則放置一充滿軟膏樣品 1.00 g 的圓柱型中空玻璃管，其高度為 1.00 cm，內徑為 1.10 cm。上端的開口則以保鮮膜加以覆蓋。上下二容器間夾著所需之人工膜 (molecular porous membrane “SpectralPor® 2” MW cut-off, 12,000 – 14,000) 或裸鼠 (nude mouse, Balb /c-nu) 背部皮膚作為滲透障壁，並且利用金屬固定夾加以固定，即完成釋出裝置。在不同形式皮膚之穿透試驗方面，去

角質層皮膚是以一般膠帶撕取皮膚二十次；而於去脂質皮膚方面則是以 methanol 及 chloroform 混合溶液前處理皮膚一小時而得。當放入第一片軟膏開始計時，並於 1h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h, 12h 分別抽取藥液 0.3 ml，再注入 0.3 ml medium 以維持直立式雙層擴散玻璃容器容量固定，及分析受藥端藥品累積透過量。

三之六：體內經皮吸收試驗

3-6-1 靜脈注射

Wistar 大白鼠於進行生體內實驗之前須先禁食 24 小時，於實驗中則橫躺固定於特製的木板上以利於取血。先將大白鼠以 pentobarbiturate 麻醉，靜脈注射用溶液為生理食鹽水，必要時可加入乙醇或 Tween 80 以增加 flurbiprofen 之溶解度。注射用藥物溶液由大白鼠尾靜脈以注射針筒投與至體內，以固定於頸靜脈之流滯針經時取血，將取出之靜脈血置於含有 sodium heparin 之離心管中以 4000 rpm 的離心轉速離心 20 分鐘，同時以 0.1 ml 的 100 U/ml sodium heparin 注入置留軟針以防止軟管內產生血塊栓塞。離心後之血漿樣品貯存於 -20°C 冰櫃等待以 HPLC 分析。

3-6-2 經皮吸收

Wistar 大白鼠之腹部毛髮以電動剪刀除去，將 2 克的水性凝膠均

勻分散於不織布上，之後將此片不織布以 occlusive dressing technique (ODT) 模式投與於去毛之腹部皮膚上。血液樣品之取樣及離心貯存方法則和靜脈注射的方法相同。ODT 材料的選擇方面則將以具透氣性之不織布為主。在血漿萃取方面是以 3ml 之 Chloroform 加入 0.5ml 之血漿樣品，以反復震盪器震盪 20 分鐘，取上清液 2.5ml 並以氮氣吹乾，最後加入 0.5ml 之 HPLC 移動相加以溶解以 HPLC 分析定量之。

三之七：HPLC 分析

3-7-1 檢量線

以 pH=7.4 磷酸鹽 citric acid 緩衝溶液泡製 flurbiprofen 0.02mg/mL, 0.04mg/mL, 0.1mg/mL, 0.2mg/mL, 0.4mg/mL 各 5 支

3-7-2 分析條件

Mobile phase: Acetonitrile : pH 2.6 adjusted water phase by acetic acid = 60:40

Flow rate: 1 ml/min

Dectector: Hitachi L-7400 UV detector

λ : 245nm

Integrator: Waters 740 data module

Autosampling injector Hitachi L-7200

Inject vol.: 20 μ l

三之八：皮膚結構之評估

皮膚結構會由於促進劑或阻礙劑之加入而有所改變，因此分別以 H & E stain 及掃描式電子顯微鏡 (scanning electronic microscopy, SEM) 二種方法觀察經二個小時之後 5% 的促進劑或阻礙劑對皮膚結構縱切面及皮膚表面造成之影響，皮膚樣本在前處理後立即以 10% 甲醛溶於 pH 7.4 緩衝液中浸泡至少 48 小時，再以 ethanol 去水並固定於 paraffin wax 上，以 hematoxylin 及 eosin 染色，每個實驗組觀察三片，所使用之光學顯微鏡為 Nikon Eclipse 4000, Japan。

四、結果與討論

3.1. Flurbiprofen 水性凝膠之體外穿透試驗

Flurbiprofen 分佈於 pH 7 緩衝液中，並加入 5% 之纖維素高分子聚合物製備成水性凝膠，將其作為藥物處方進行體外穿透試驗。實驗結果以藥物累積量—時間圖繪成曲線，其回歸之斜率計算之而當作是穿透速率 (flux)，其單位為 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{per h}$ 。迴歸結果發現所有不同處方之穿透速率皆符合以零次速率方程式來描述。在表一當中即顯示 flurbiprofen 經由不同水性凝膠劑所測得之穿透速率，皮膚內含量及經由纖維素半透膜之釋放速率。在三種不同水性凝膠中,包括：CMCNa, CMCNH₄ 及 HPC，其穿透速率皆無顯著差異 (ANOVA test, $P>0.05$)，除此之外，此三種凝膠劑型和不含高分子聚合物之單純 pH 7 緩衝溶液其穿透速率在統計學上亦無顯著差異。而在比較藥物之皮膚內含量在不同處方的差異方面，pH 7 緩衝溶液比起水性凝膠劑則提供了藥物較大之皮內貯藥空間 (skin reservoir) (表一)。在藥物經由一親水性處方穿透皮膚過程當中，藥物必須先以擴散的方式釋離其處方而再以分配係數的不同決定其分配穿透至皮膚層的能力。因此為了明 flurbiprofen 整個經皮吸收過程的機轉，flurbiprofen 穿透纖維素半透膜之能力必須先加以研究以了解此藥物在處方中擴散之快慢及其特性。結果發現 flurbiprofen 其釋放速率並不隨著處方之不同而有所

Table 1. The flurbiprofen flux, amount in skin, release rate, and viscosity after topical application of various hydrogels in vitro

Formulation	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Amount in skin at 12h ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\times 10^2$	Release rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Viscosity ($\text{cps}\times 10^{-3}$)
pH 7 solution	116.74 $\pm$ 26.77	274.55 $\pm$ 31.29	187.81 $\pm$ 4.29	—
CMCNa	113.35 $\pm$ 22.23	137.38 $\pm$ 13.95	231.61 $\pm$ 23.74	61.00 $\pm$ 0.50
CMCNH ₂	97.06 $\pm$ 19.06	91.35 $\pm$ 57.39	175.29 $\pm$ 10.83	116.33 $\pm$ 2.08
HPC	106.12 $\pm$ 10.29	122.77 $\pm$ 46.52	206.98 $\pm$ 11.64	73.50 $\pm$ 0.87
Chitosan	27.39 $\pm$ 3.26	30.98 $\pm$ 2.71	11.41 $\pm$ 2.77	139.00 $\pm$ 2.65
Pluronic®	33.33 $\pm$ 8.68	27.52 $\pm$ 7.34	122.10 $\pm$ 23.37	154.67 $\pm$ 1.53
Gelrite®	36.04 $\pm$ 5.21	24.95 $\pm$ 4.11	36.04 $\pm$ 5.21	61.33 $\pm$ 1.04

Polymer concentration in hydrogel formulation was 5%.

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).

改變 (ANOVA test, $P > 0.05$) (表一)，此結果表示由於高分子聚合物水化而形成之交錯結構 (cross-linkage structure) 並不會和 flurbiprofen 本身產生任何交互作用而影響其之釋放或皮膚穿透能力。

一般而言，一個水性凝膠系統作為一模式藥物之傳遞媒介時其巨觀之流動性或微觀之流動性會影響整個系統之藥物輸送能力。黏度的測量是在檢測一個高分子聚合物水化後之結構最常使用使用之參考數據，雖然它不能完全地代表一個高分子聚合物處方的基本物理化學性質。在測量不同水性凝膠的黏度結果發現：CMCNa 及 HPC 之黏度明顯 CMCNH₄ 為低 (t-test, $p < 0.05$)，此結果初步顯示水性凝膠本身之黏稠度和其藥物之皮膚穿透速率並無關聯性，由於當藥物本身在高分子聚合物之結構當中擴散若是藥物穿透皮膚之整個過程的速率決定步驟，則大致上水性凝膠本身之黏度則為一重要參數去控制藥物之穿透速率 (Ho et al., 1994; Bentley et al., 1999)。在此研究中顯示無此關聯性產生，因此 flurbiprofen 之經皮吸收機轉最主要為 skin-controlled 而非 vehicle-controlled。

3.2 助溶劑對 flurbiprofen 水性凝膠皮膚穿透之影響

由於包括 CMCNa, CMCNH₄ 及 HPC 水性凝膠劑對 flurbiprofen

之穿透速率大小影響不大 (表一)，一個局部投予的劑型設計中製劑本身必須要有黏附性質如此才可促進製劑本身於生體黏膜或組織之黏著能力，延長有效時間並改善臨床投予效果 (Jones et al., 1997)。由於 CMCNa 在所有一系列之高分子聚合物有最佳之生物黏附性效果 (bio-adhesive property) (Doelker, 1987)，因此在本研究中最後選擇 CMCNa 為模式水性凝膠另行添加助溶劑或促進劑以進行對 flurbiprofen 經皮吸收能力之進一步研究。在添加助溶劑於 CMCNa 水性凝膠的實驗當中，如表二所示 flurbiprofen 之穿透速率並不變，加入 20% 之 propylene glycol (PG) 或 ethanol (EtOH) 之影響而有所改變 (t-test, $p>0.05$)。在黏稠度方面在加入助溶劑之後則有所改變。加入 PG 或 EtOH 後黏稠度明顯增大。雖然助溶劑的加入並不影響 flurbiprofen 之穿透速率，但是這並不一定就代表助溶劑完全不對 flurbiprofen 之經皮穿透毫無任何穿透產生。在助溶劑加入處方後許多機轉諸如：藥物溶解度的改變，處方與皮膚之間分配能力的改變及對皮膚結構產生影響 (Bendas et al., 1995; Zhao and Singh, 2000)。

雖然加入 PG 至 CMCNa 水性凝膠後不會明顯改變 flurbiprofen 之穿透速率，但是 PG 的加入卻會阻礙 flurbiprofen 進入皮膚內之含量 (t-test, $p<0.05$)。如表二所示，PG 的加入會增加藥物之溶解度但卻不改變 flurbiprofen 穿越纖維素半透膜之釋放速率，因此皮膚本身

Table 2. The effect of cosolvent on flurbiprofen flux, amount in skin, release rate, and viscosity after topical application of CMCNa hydrogels in vitro

Formulation	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Amount in skin at 12h ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\times 10^2$	Release rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Viscosity (cps $\times 10^{-3}$)
No cosolvents	113.35 $\pm$ 22.23	137.38 $\pm$ 13.95	231.61 $\pm$ 23.74	61.00 $\pm$ 0.50
+PG	101.58 $\pm$ 17.99	77.51 $\pm$ 15.59*	200.92 $\pm$ 27.34	103.67 $\pm$ 1.15*
+EtOH	140.35 $\pm$ 26.80	118.87 $\pm$ 29.53	285.93 $\pm$ 26.80*	109.33 $\pm$ 11.93*

Polymer concentration in hydrogel formulation was 5%.

Cosolvent concentration in hydrogel formulation was 20%.

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).

在 PG 減少藥物皮內含量的整個過程中應該扮演相當重要的角色。所以另外將 20% PG 及 80% pH7 緩衝液的混合溶液前處理皮膚兩個小時，接著再以 flurbiprofen 單純的 CMCNa 水性凝膠投予皮膚進行體外穿透試驗，以觀察助溶劑本身對皮膚造成之效應。此前處理皮膚法之優點在於可避免助溶劑直接加入處方中對藥物熱力學活性 (thermodynamic activity) 所帶來之影響。如圖一所顯示，皮膚經由 20% PG 前處理後和完全不處理之正常皮膚及二小時 pH7 緩衝液前處理之皮膚比較，其 flurbiprofen 之穿透速率及皮內含量皆無顯著之改變。此實驗結果表示 PG 基本上並不會對皮膚的結構產生決定性的改變。基於已排除此影響因素，則 flurbiprofen 於含有 PG 之處方其皮內含量降低之可能原因可歸咎於藥物在處方及皮膚之間的分配係數改變所引發之後果。這是由於加入助溶劑後會造成整個水性凝膠系統之極性 (polarity) 變低，而親脂性的 flurbiprofen 在加入具有 PG 之水性凝膠後會和整個系統產生較強之親合力 (affinity)，因此 flurbiprofen 經由凝膠系統再分佈至皮膚之意願或能力在含有 PG 的系統當中便明顯地降低，此解釋方法或可闡釋為何加入 PG 後皮內藥物含量反而降低。

在以 EtOH 為助溶劑之實驗方面，flurbiprofen 之穿透速率及皮內含量並不隨著 EtOH 之加入而有明顯之變化 (t-test, $p>0.05$)，然而如

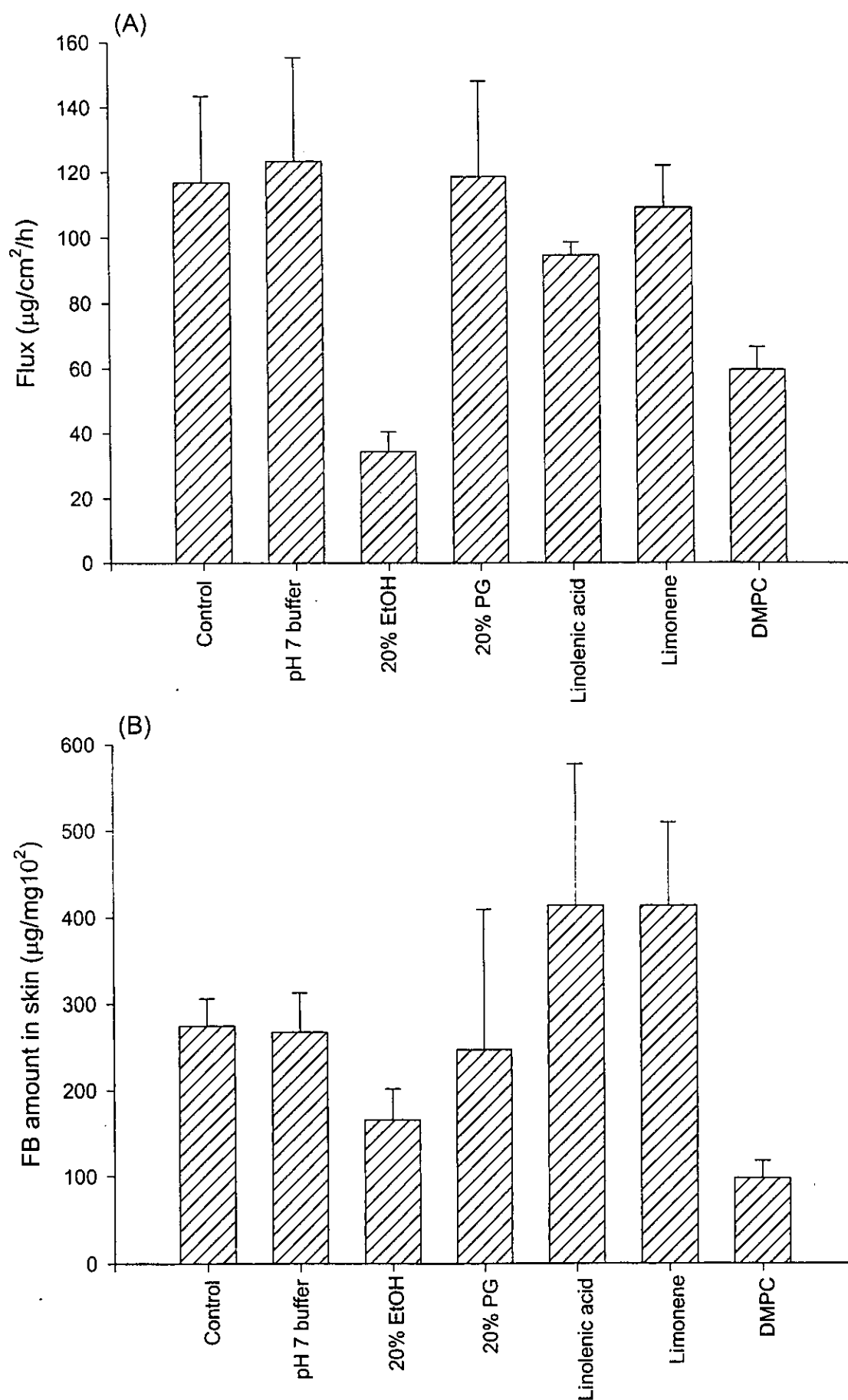


Fig.1. Flux and drug amount in skin of flurbiprofen across nude mouse skin from various CMCNa hydrogels with enhancers

表二所示 flurbiprofen 從含有 EtOH 之水性凝膠知釋放速率則明顯較不加入 EtOH 之處方增加(t-test, $p < 0.05$)，然而如表二所示 flurbiprofen 從含有 EtOH 之水性凝膠之釋放速率則明顯較不加入 EtOH 之處方增加 (t-test, $p < 0.05$)，雖然此增加幅度並不十分明顯。綜觀加入 PG 及 EtOH 之數據可見二種助溶劑對 flurbiprofen 經皮吸收能力之控制機轉並不盡相同。令人驚訝的是以 20% EtOH 及 80% pH7 緩衝液混合前處理皮膚之 flurbiprofen 經皮吸收試驗中，flurbiprofen 穿透此前處理皮膚之速率及皮膚含量明顯受到抑制 (圖一)。在之前文獻曾提及 EtOH 可以藉由改變皮膚的結構而降低某些藥物之經皮吸收能力 (Inagi et al., 1981; Fang et al., 1999)，在皮膚角質層中之蛋白質去活化 (protein denaturation) 可能是造成此種現象最主要之原因。雖然 EtOH 的直接前處理會造成 flurbiprofen 穿透皮膚能力之負面的影響，但是若以含 20% EtOH 之水性凝膠投予 flurbiprofen 卻不至於對藥物本身之穿透能力有抑制的效果，此結果表示尚有其它因素操控 flurbiprofen 之在含 20% EtOH 凝膠處方之皮膚吸收能力，在先前已提及 EtOH 可增加 flurbiprofen 之於水性凝膠之溶解度因而促進藥物之釋放速率。因此可見包括皮膚結構之改變及藥物溶解度的助溶效果此二要素會彼此成為競爭程序而造成 flurbiprofen 經由含 EtOH 之凝膠劑經皮吸收時二種力量互相抵消而

使藥物之穿透速率及皮內含量持平。

3.3. 促進劑/阻礙劑對 flurbiprofen 水性凝膠皮膚穿透之影響

在接續之實驗當中將以一系列之經皮吸收促進劑，包括：脂肪酸 (fatty acids)，環單帖類(cyclic monoterpenes) 及磷脂質 (phospholipids) 以嚐試加入水性凝膠中以促進 flurbiprofen 之經皮吸收能力。在 CMCNa 水性凝膠劑中促進劑設定之劑量為 5%。在不飽和脂肪酸方面先前已有研究發現其對 flurbiprofen 之皮膚吸收有相當強之促進作用 (Chi et al., 1995)，所以在本研究當中亦選擇了三種不同的不飽和脂肪酸以作為促進 flurbiprofen 經皮穿透之處方添加劑。所選用之脂肪酸為具有相同之長碳鏈但其不飽和雙鍵數目不同之 oleic acid、linoleic acid 及 linolenic acid 三種促進劑。如表三所示，三種不同的脂肪酸皆會促進 flurbiprofen 之穿透速率，而且此三種脂肪酸其促進之程度皆差不多。這可能是由於不飽和脂肪酸可以大量增加 flurbiprofen 分佈至皮膚之分配係數 (Chi et al., 1995)。而在藥物皮內含量方面，oleic acid 則顯示出最高之促進效果，linolenic acid 次之，再來才是 linoleic acid。Oleic acid，linoleic acid 及 linolenic acid 之化學結構中雙鍵數目分別為一，二，三個，基本上 cis- 雙鍵數目增加則不飽和脂肪酸愈不容易進入皮膚的脂質雙層結構中，此原因應是造

Table 3. The effect of enhancers on flurbiprofen flux, amount in skin, release rate, and viscosity after topical application of CMCNa hydrogels in vitro

Formulation	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Amount in skin at 12h ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\times 10^2$	Release rate ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Viscosity (cps $\times 10^{-3}$)
CMCNa	113.35 $\pm$ 22.23	137.38 $\pm$ 13.95	231.61 $\pm$ 23.74	61.00 $\pm$ 0.50
+ oleic acid	176.25 $\pm$ 22.33*	283.06 $\pm$ 67.16*	190.12 $\pm$ 41.58	55.17 $\pm$ 0.76
+ linoleic acid	188.97 $\pm$ 13.86*	128.40 $\pm$ 85.25	229.40 $\pm$ 33.14	61.00 $\pm$ 0.87
+ linolenic acid	207.38 $\pm$ 10.50*	171.01 $\pm$ 22.28*	155.73 $\pm$ 14.51*	72.33 $\pm$ 1.89
+ Azone	101.54 $\pm$ 26.50	100.20 $\pm$ 8.42*	110.49 $\pm$ 10.00*	46.33 $\pm$ 0.29
+ limonene	298.63 $\pm$ 34.06*	143.92 $\pm$ 12.79	238.75 $\pm$ 35.09	58.83 $\pm$ 1.04
+ l- α -lecithin	110.41 $\pm$ 10.30	100.34 $\pm$ 21.00*	241.44 $\pm$ 17.52	67.67 $\pm$ 1.89
+ DMPC	57.77 $\pm$ 15.66*	30.93 $\pm$ 18.33*	180.79 $\pm$ 30.04*	63.83 $\pm$ 0.58
+ PG + linolenic acid	143.14 $\pm$ 12.22	67.99 $\pm$ 22.92*	178.91 $\pm$ 7.95*	101.67 $\pm$ 0.58
+ EtOH + linolenic acid	161.17 $\pm$ 26.64*	101.48 $\pm$ 13.24*	191.97 $\pm$ 25.67	116.00 $\pm$ 7.94

Polymer concentration in hydrogel formulation was 5%.

Cosolvent concentration in hydrogel formulation was 20%.

Enhancer concentration in hydrogel formulation was 5%.

Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).

成 linoleic acid 及 linolenic acid 所促進之 flurbiprofen 皮膚含量明顯低於 oleic acid 的原因 (表三)。然而若藥物存在於皮膚之後，由於皮膚內有許多較寬之孔道 (wider channel)，致使藥物之穿透率提升，這是造成三個促進劑處方之 flurbiprofen 穿透速率大同小異之主要原因。

將 5% 之 linolenic acid 加入 20% 之 EtOH 溶液後再以二小時之時間前處理皮膚以觀察脂肪酸對皮膚造成之影響，結果顯示若和只單純以 20% EtOH 前處理的皮膚相比，5% linolenic acid 之前處理皮膚明顯提供 flurbiprofen 較高之穿透速率以及皮內含量 (t-test, $p < 0.05$) (圖一)。此脂肪酸於皮膚上的效應應可促成 flurbiprofen 從含有 linolenic acid 之 CMCNa 水性凝膠劑中穿透至皮膚，但是如圖一所示比較完全未處理之皮膚，其 flurbiprofen 之穿透速率完全沒有顯著性差異 (t-test, $p > 0.05$)。此現象之原因可能是由於前處理溶液是採用具親脂性的 20% EtOH 及 80% pH7 緩衝液之混合溶媒，其會與同屬親脂性的 linolenic acid 產生強親和力，因此阻礙了 linolenic acid 分配至皮膚的能力。

為了進一步闡明 linolenic acid 於皮膚上之作用，一系列不同形態的皮膚作為體外穿透試驗之滲透障避以獲取 flurbiprofen 經 linolenic acid 促進後之經皮吸收機轉。如圖二所示，flurbiprofen 經由 CMCNa 水性凝膠 (控制組) 穿進去角質層皮膚之穿透速率僅為穿透正常全皮

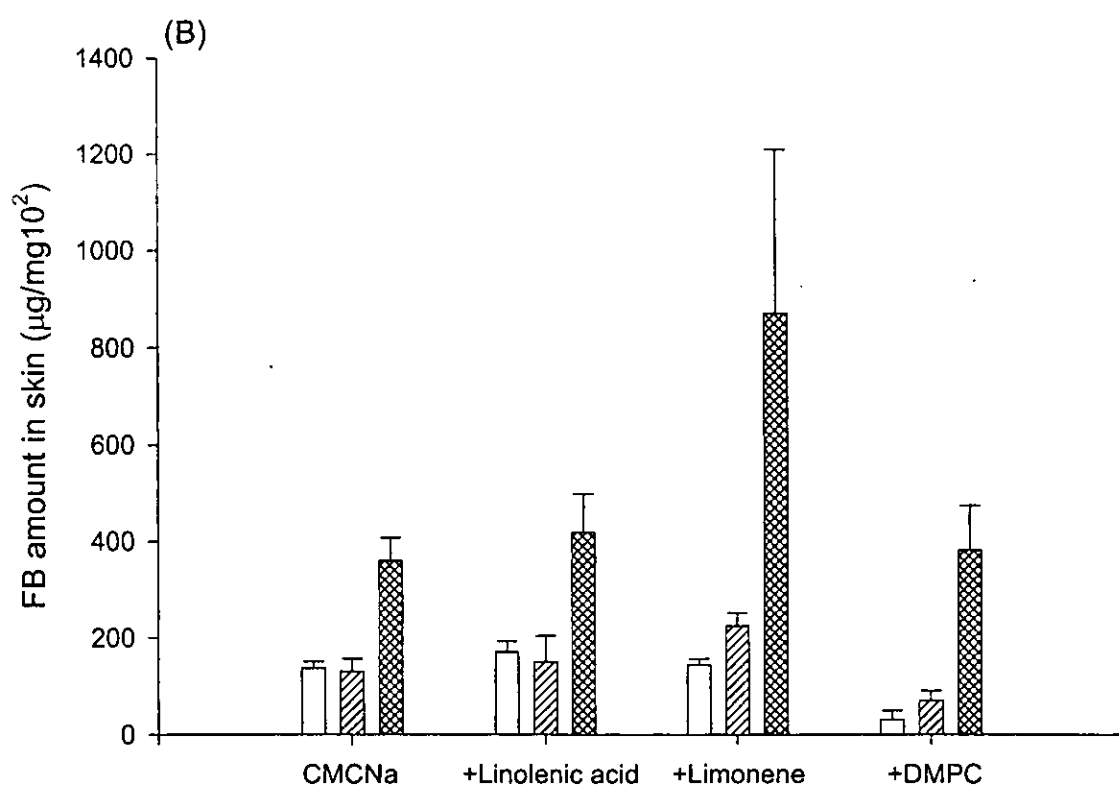
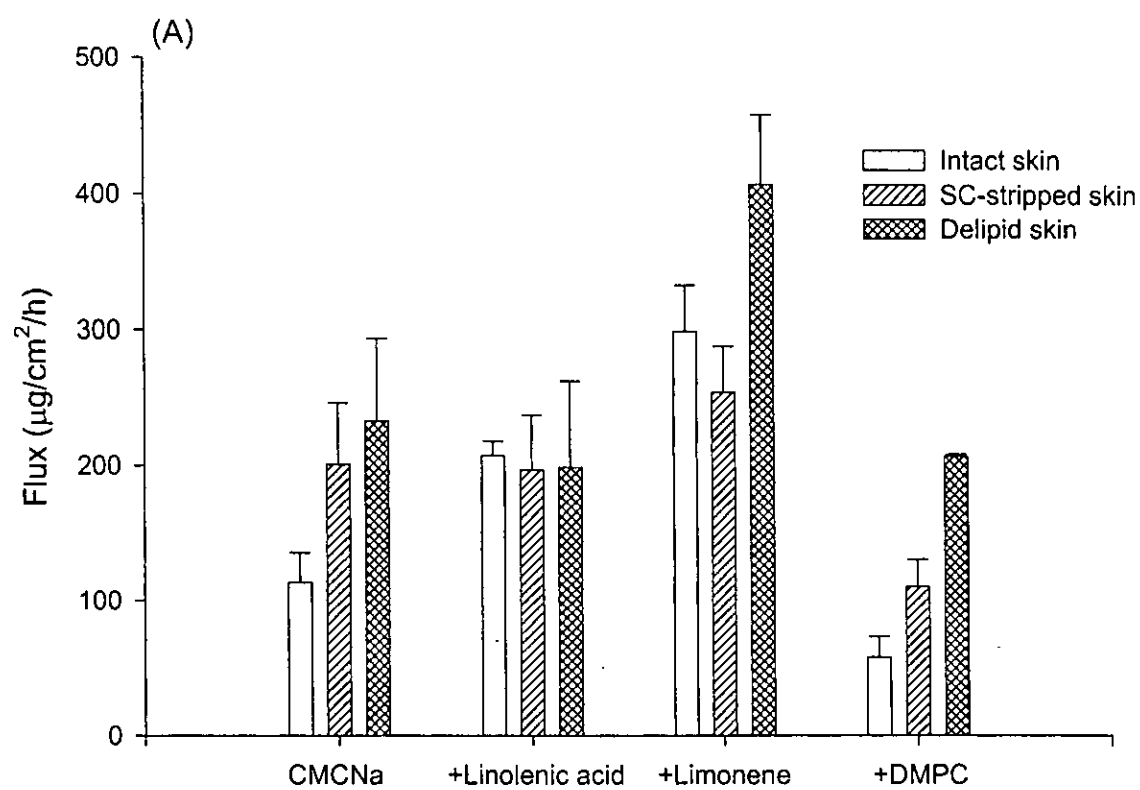


Fig.2. Flux and drug amount in skin of flurbiprofen across SC-stripped and delipid skin from various formulations

的 1.77 倍而已，這應是由於 flurbiprofen 為一親脂性，也就是低極性藥物，因此其很容易分佈至同屬親脂性的角質層上面，在體外穿透試驗方面，上皮及真皮層所扮演的皮膚障壁角色是不可已被輕易忽略的 (Morimoto et al., 2001)。此想法的來由是因為藥物不僅要從處方中釋出進入角質層，而且接下來必須層角質層移動至上皮及真皮層 (Wenker and Lippold, 1999)。Flurbiprofen 穿透去脂質之皮膚及去角質層之皮膚其穿透速率相當接近，此結果顯示皮膚中的細胞間質途徑 (intercellular pathway) 為 flurbiprofen 的主要經皮吸收途徑。值得注意的是經顯微鏡切片證明本實驗之去脂質方法可以去除裸鼠全皮之脂質成分。

在投予具有 linolenic acid 之水性凝膠後，flurbiprofen 穿透正常全皮之穿透速率與穿透去角質皮膚之速率無顯著性差異 (t-test, $p>0.05$)。除此之外，相同的現象也發生在相同的處方穿透全皮及去脂質皮膚，由這些實驗數據可得知 flurbiprofen 穿透時所帶來的阻礙吸收之障壁效果可以藉由加入 linolenic acid 而加以克服，而 linolenic acid 於皮膚上的作用最主要是經由細胞間隙而發揮其效果。

如表三所示，一種環單萜類即 d-limonene 可以致使 flurbiprofen 之穿透速率大幅提升，而且是本研究中促進倍數最高的一種促進劑。而 d-limonene 的此種促進 flurbiprofen 穿透速率能力並不影響藥物

在皮內含量的變化。就如同 linolenic acid 一樣，d-limonene 也可對皮膚結構產生一些改變進而促進 flurbiprofen 的穿透能力 (圖一)。如文獻所提及 d-limonene 主要是會擾亂細胞間之脂質雙層排列並改善藥物分配至角質層之分配係數因而促進藥物的經皮吸收效果 (Zhao and Singh,2000)。當檢視含有 d-limonene 之水性凝膠投予至去脂質皮膚的實驗結果可以發現含有 d-limonene 之水性凝膠其 flurbiprofen 之穿透速率明顯高於未含 d-limonene 的控制組 (t-test, $p<0.05$) (圖二)。此結果表示 d-limonene 不僅可以藉由改變皮膚結構而增加 flurbiprofen 之富含脂質的穿透途徑 (water-rich routes)，也就是非脂質途徑 (nonlipoidal pathways)。

接著使用二種磷脂質，包括 1- α -lecithin，即卵磷質，及屬於純物質的 DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine) 以調控 flurbiprofen 之經皮吸收能力。在先前的許多文獻即已證明磷脂質可以促進許多藥物的經皮吸收能力 (Bhattachar et al., 1992; Yokomizo, 1996; Kim et al., 1997)。然而在本研究中如表三所示二種磷脂質不會，甚至是減低了 flurbiprofen 的經皮吸收能力。尤其是以 DMPC 其阻礙 flurbiprofen 吸收的能力更甚於 1- α -lecithin 所造成的效應。將 DMPC 只分布於 pH7 緩衝液當中在以前處理方式處理皮膚，最後在進行 flurbiprofen 之 CMCNa 水性凝膠之體外穿透試驗。使用單純 pH7 緩衝液為溶媒

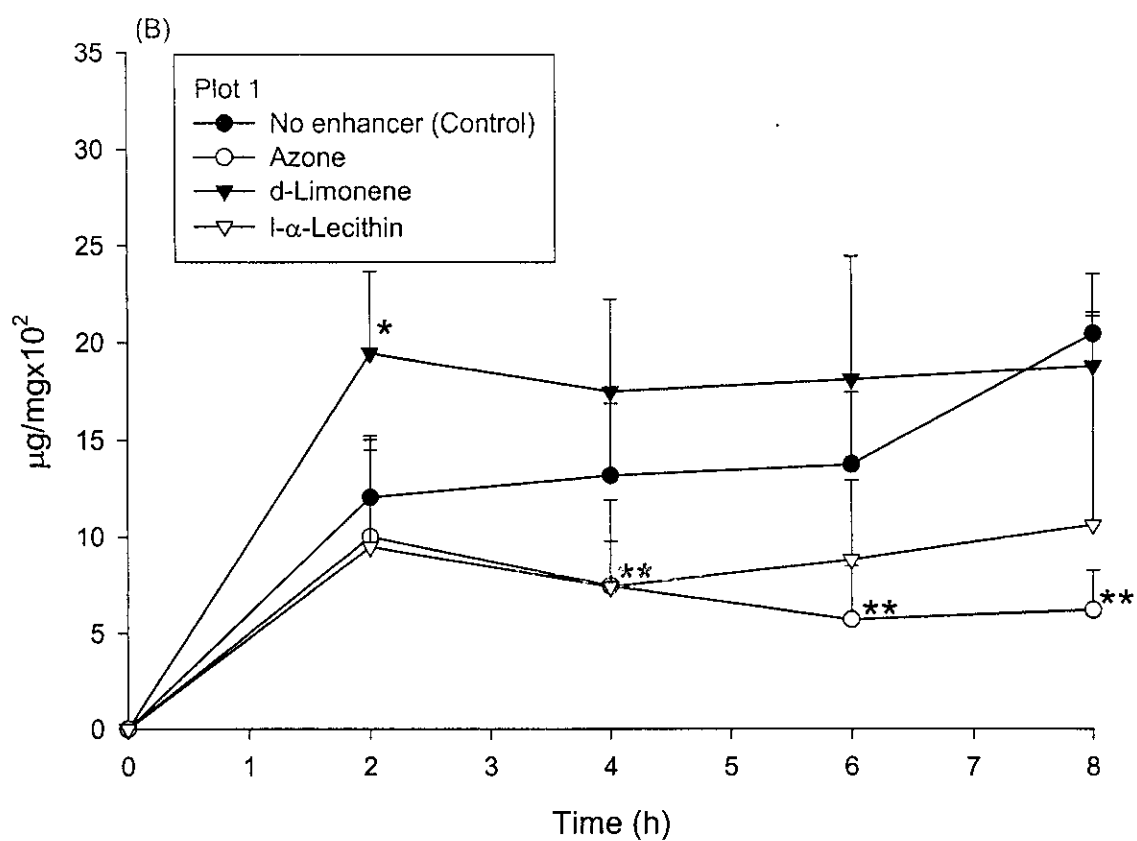
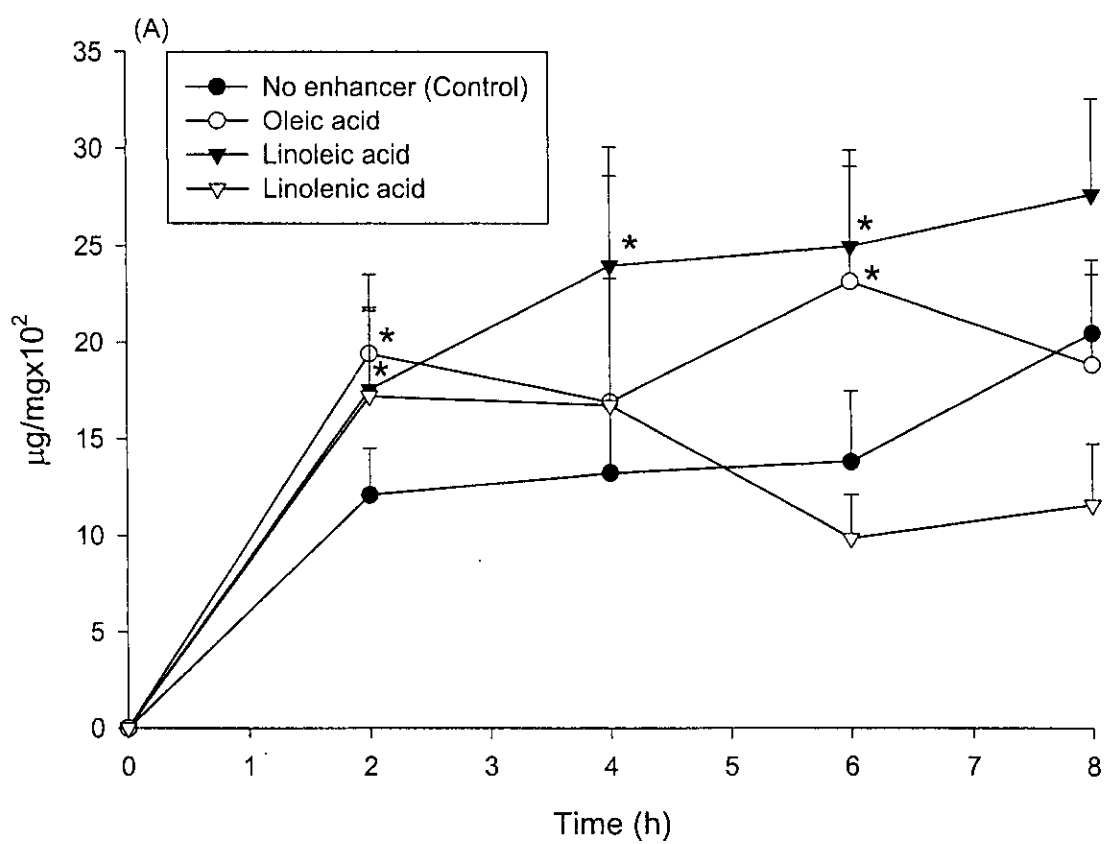
的理由是 DMPC 具有不錯的水溶解度。結果發現 flurbiprofen 之穿透速率及皮內含量兩者皆會由於 DMPC 的處理而明顯下降 (t-test, $p < 0.05$), 顯示 DMPC 確實會改變皮膚結構而造成對 flurbiprofen 經皮吸收之負面影響。這種現象可能是因為 DMPC 具有較高的 gel-liquid crystalline 相轉換點 (T_c), DMPC 的高相轉換溫度 (23°C) 使得其具有比其他脂質更堅韌的化學結構 (Kirjavainen et al., 1999)。而處於 gel state 的磷脂質並不影響, 或甚至會增加皮膚脂質的障壁效果, 而使得藥物的皮膚吸收能力變差。若與不飽和脂肪酸比較, 不論是 1- α -lecithin 或是 DMPC 其相轉換點皆高於脂肪酸 ($-50^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$), 因此推測此兩種磷脂質較不飽和脂肪酸有較低的脂質溶解度 (Chi et al., 1995)。所以磷脂質擾亂皮膚角質層脂質排列的能力與機率便低於具有高脂質溶解度的不飽和脂肪酸。

如圖二所示不論所使用之皮膚形式為何, 加入 DMPC 之 CMCNa 水性凝膠的 flurbiprofen 穿透速率皆明顯降低, 一個合理的解釋方法為許多磷脂質不容易經由水性凝膠分佈至角質層中, 因此會累積於皮膚表面上形成額外的一層阻礙障壁 (Valjakka-Koskela et al., 1998)。而此解釋也可進一步闡明為何 DMPC 之水性凝膠其 flurbiprofen 之穿透半透膜之釋放速率較控制組低。另一解釋機轉為高濃度 (5%) 的磷脂質在水溶液中會形成為膠粒 (micelles), 而藥物

在水性凝膠中移動必需穿越膠粒外之水性通道才可進入皮膚內 (Bentley et al., 1999)，額外的這些微膠粒會減低 flurbiprofen 在處方中之擴散速率。因此藥物之穿透速率及皮內累積量也隨之降低。如表三所示，在 CMCNa 水性凝膠中加入促進劑基本上會改變處方之粘稠度，但是此黏稠度的改變並不大甚至可以是被忽略的，因此加入促進劑或阻礙劑應不會影響將來使用於臨床時之可行性。

除此之外將 20% 之 PG 或 EtOH 加入 CMCNa 水性凝膠劑中再加入 5% 的促進劑嘗試了解助溶劑對促進劑發揮其效力之影響。所使用的促進劑為 linolenic acid。如表三所示與單純的 CMCNa 水性凝膠 (控制組) 作比較，flurbiprofen 在含有促進劑及助溶劑之處方中之穿透速率明顯較高 (t-test, $p < 0.05$)，雖然升高的程度並不十分明顯。然而在皮內含量方面卻呈現相反的結果，這是由於加入親脂性的助溶劑會增加 linolenic acid 在處方當中的親和力因而阻礙了 linolenic acid 分佈至角質層的能力 (Okabe et al., 1992)，因此其促進藥物經皮吸收的能力當然也隨之降低。而在本研究的這個例子當中顯示這種特殊現象僅止於影響 flurbiprofen 進入皮膚內之含量而不影響 flurbiprofen 之穿透皮膚的效果。

另外也補作了體外試驗以大白鼠皮為滲透障壁的部份，結果分述於圖三及表四。於本研究計劃，體外實驗所使用之實驗動物為裸鼠 (Balb/c-nu)，而體內試驗所使用的實驗動物則為大白鼠 (Wistar rat)。在體外實驗使用裸鼠之理由為裸鼠皮之毛囊於皮膚之密度與人皮較為接近，而大白鼠由於為多毛鼠，因此毛囊於皮膚之密度與人皮有較大的差距，但是由於裸鼠缺乏 T cells，且身形脆弱，因此並不適合用來從事體內試驗，造成本實驗體外實驗與體內試驗所使用之動物不同。為彌補此落差，因此本實驗室補作了一系列之大白鼠體外經皮吸收實驗，且於體內試驗部份雖然無法測得 flurbiprofen 藥物濃度，但是加入體內試驗皮膚組織研磨方法以測得藥物皮內含量。結果顯示大白鼠皮之穿透較裸鼠為低，但是加入經皮吸收促進劑之促進效率則二者有一致性，而體內試驗之皮內含量則與體外試驗之結果亦有一致性。



圖三, In vivo kinetics of flurbiprofen amount in rat skin

表四. Effect of polymers and enhancers on flurbiprofen flux and amount in the rat skin after topical application in vitro

Formulation	Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Amount in skin at 12 h ($\mu\text{g}/\text{mg}$) $\times 10^2$
pH 7 solution	8.27 $\pm$ 1.07	69.72 $\pm$ 8.19
CMC hydrogel	6.21 $\pm$ 0.65	61.62 $\pm$ 19.03
+ oleic acid	47.11 $\pm$ 15.19*	85.18 $\pm$ 16.49
+ linoleic acid	49.88 $\pm$ 8.54*	94.32 $\pm$ 10.76*
+ linolenic acid	56.26 $\pm$ 11.82*	62.56 $\pm$ 9.69
+ Azone	5.54 $\pm$ 0.45	15.72 $\pm$ 2.52**
+ limonene	33.31 $\pm$ 6.74*	78.99 $\pm$ 5.05
+ l- α -lecithin	6.98 $\pm$ 0.32	24.57 $\pm$ 6.57**

The polymer concentration in the hydrogel formulation was 5%.

The enhancer concentration in the hydrogel formulation was 5%.

* $p < 0.05$ higher than the control group (CMC hydrogel);

** $p < 0.05$ lower than the control group (CMC hydrogel).

Each value represents the mean $\pm$ SD ($n=4$).

3.4. 體內經皮吸收試驗

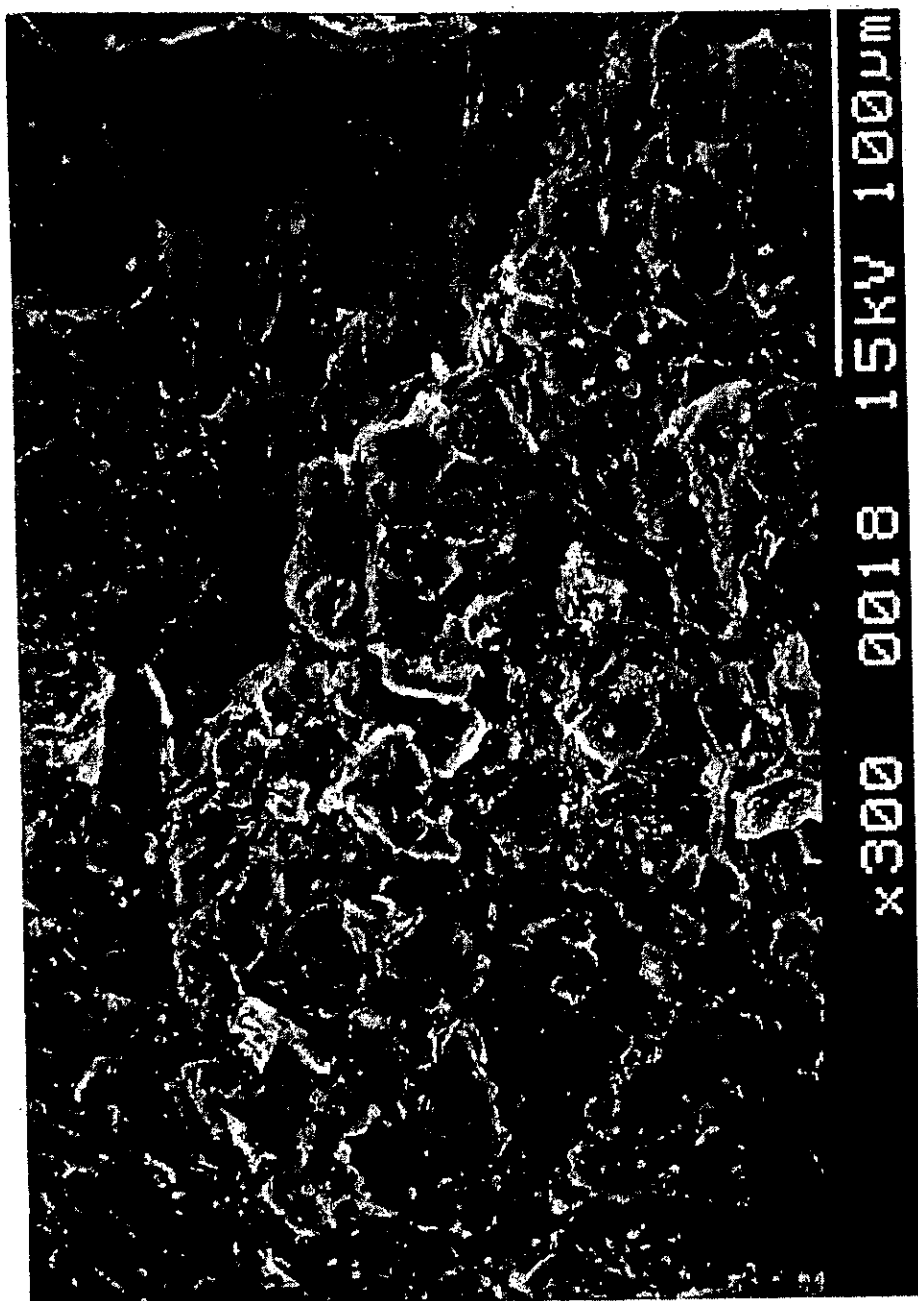
在體內之投與試驗當中所使用之處方分別為單純之 CMCNa 水性凝膠劑（控制組）及含有 d-limonene 之水性凝膠，由於體外試驗所使用之模式動物裸鼠並不適於使用於體內之抽血試驗，因此在體內試驗方面則使用 Wistar 大白鼠為模式動物。實驗結果顯示不論在具有促進劑之處方或不含有促進劑之處方 12 個小時的採血時間點皆檢測不到任何 flurbiprofen 之血中濃度，顯示再體內皮膚藥物頭與實驗中 flurbiprofen 並不會穿透皮膚至全身循環系統內，因此推測藥物應都累積在皮膚內，此結果和體外試驗的結果大異其趣，進一步的實驗或如何克服體內試驗的結果大異其趣，進一步的實驗或如何克服體內試驗的盲點則有待進一步研究。

3.5. 皮膚結構之檢測

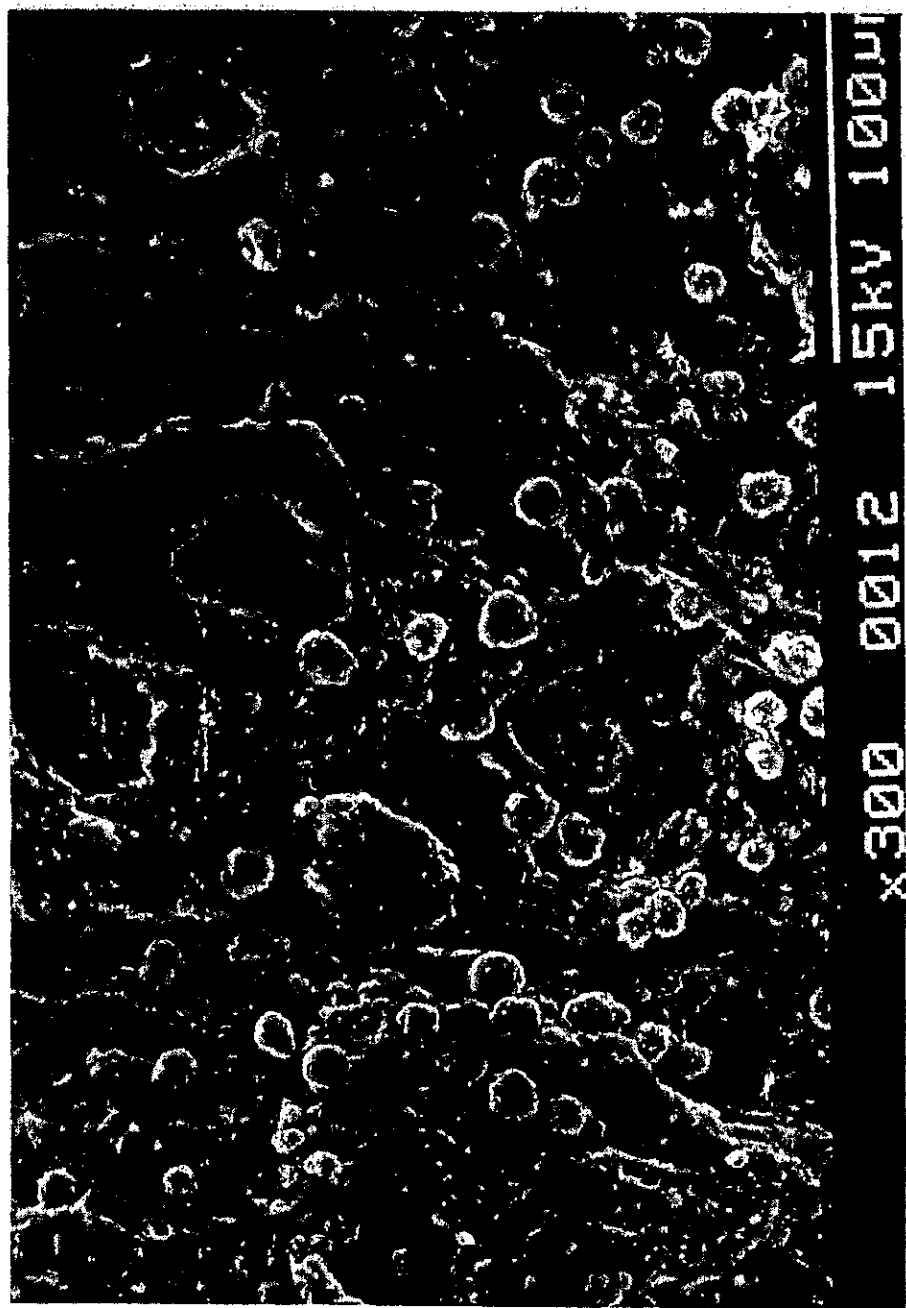
在皮膚結構的檢測方面以病理切片的標準方法描述經 20% EtOH (positive control)、5% linolenic acid、5% d-limonene 及 5% DMPC 前處理 2 個小時之後的皮膚組織狀態，並以 SEM 及光學顯微鏡分別觀察之。在 SEM 方面，如圖四所示：

圖四之一：20% EtOH—

1. Smooth surface like dissolution
2. Keratin denaturation
3. Flaky appearance



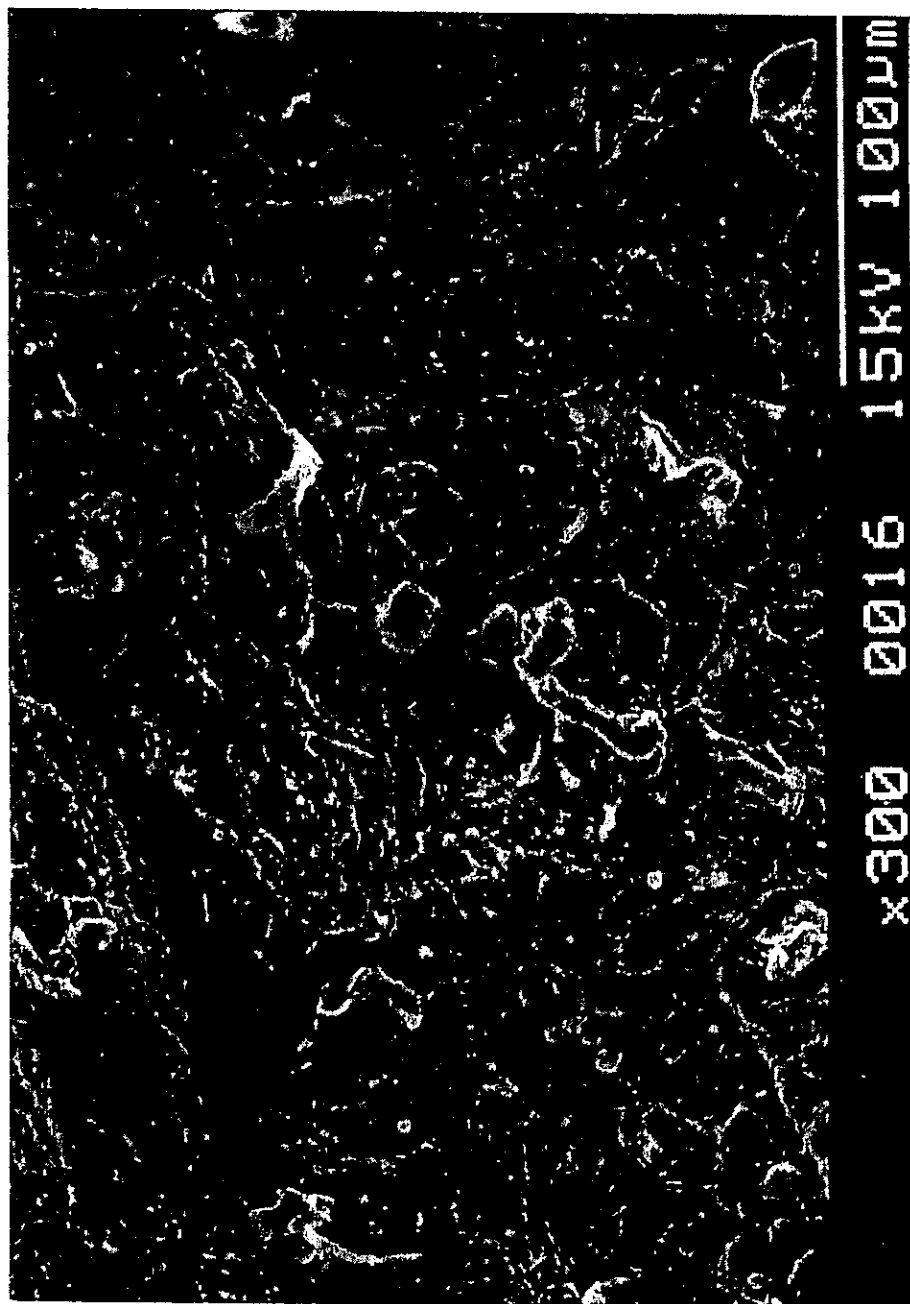
圖田之一



圖四之二



圖三之田



圖田之四

圖四之二：linolenic acid

1. Aggregates of globes caused by fused, degenerated lipids
2. Some deep cavities with loss of hairs

圖四之三：d-limonene

1. Holes are created by loss of hairs
2. The surface is eroded and appears rougher than 20% EtOH- and linolenic acid-treated skin

圖四之四：DMPC

1. Globules (may be micelles formed by DMPC) studded on the surface of stratum corneum
2. Spongiosis is seen in some areas
3. Widened intercellular space

而在光學顯微鏡方面，如圖四所示：

圖五之一：20% EtOH—

1. Inflammation cells in epidermis
2. Mild dermal edema
3. Mild congestion of dermal vessels (hyperemia)
4. Scattered and loose stratum corneum

圖五之二：linolenic acid

1. Moderate inflammatory cell infiltration in the dermis and superficial subcutis
2. Disruption and fragmentations of hair shafts
3. Hyperemia, dermal capillary dilatation



圖五之一



圖五之二



三之五圖



圖之四

圖 五之三：d-limonene

1. Mild lymphocytic infiltration congestion
2. Hyperemia

圖 五之四：DMPC

1. Few acute and mild chronic inflammation
2. Mild cell infiltration

五、結論與建議

1. Flurbiprofen 之經皮吸收機轉最主要為 skin-controlled 而非 vehicle-controlled。
2. 在黏稠度方面在加入助溶劑之後則有所改變，加入 PG 或 EtOH 後黏稠度明顯增大。
3. 以 20% EtOH 及 80% pH7 緩衝液混合前處理皮膚之 flurbiprofen 經皮吸收試驗中，flurbiprofen 穿透此前處理皮膚之速率及皮膚含量明顯受到抑制。
4. 環單帖類即 d-limonene 可以致使 flurbiprofen 之穿透速率大幅提升，而且是本研究中促進倍數最高的一種促進劑。
5. Flurbiprofen 之穿透速率及皮內含量兩者皆會由於 DMPC 的處理而明顯下降。
6. 不論在具有促進劑之處方或不含有促進劑之處方 12 個小時的採血時間點皆檢測不到任何 flurbiprofen 之血中濃度，顯示再體內皮膚藥物頭與實驗中 flurbiprofen 並不會穿透皮膚至全身循環系統內。
7. 在皮膚結構的檢測方面 20% EtOH 及 一系列促進劑/阻礙劑無論在 SEM 及光學顯微鏡分別觀察皆顯示皮膚結構有明顯變化。

六、參考文獻

- Adams, S.S., Burrows, C.A., Skelton, N., Yates, D.B., Inhibition of prostaglandin synthesis and leucocyte migration by flurbiprofen. *Curr. Med. Res. Opin.* 5 (1977) 11-19.
- Barichello, J.M., Morishita, M., Takayama, K., Nagai, T., Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 189-198.
- Bendas, B., Schmalfuß, U., Neubert, R., 1995. Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanism of drug transport from hydrogels. *Int. J. Pharm.* 116,19-30.
- Bentley, L.B., Marchetti, J.H., Ricardo, N., Ali-Abi, Z., Collett, J.H., 1999. Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: Isological microscopic and in vitro permeation studies, *Int. J. Pharm.* 193,49-55.
- Bhattachar, S.N., Rytting, J.H., Itoh, T., Nishihata, T., 1992. The effects of complexation with hydrogenated phospholipid on transport of salicylic acid, diclofenac and indomethacin across snake stratum corneum. *Int. J. Pharm.* 79, 263-271.
- Chen, H.Y., Fang, J.Y., 2000. Therapeutic patents for topical and transdermal drug delivery systems. *Exp. Opin. Ther. Patents* 10, 1035-1043.
- Chien, Y.W., Logic of transdermal controlled drug administration. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9: 497-520.
- Chien, Y.W. Pharmaceutical considerations of transdermal nitroglycerin delivery- The various approaches. *Am. Heart J.* 1984, 108: 207-16.

- Chi, S.C., Park, E.S., Kim, H., 1995. Effect of penetration enhancers on flurbiprofen permeation through rat skin. *Int. J. Pharm.* 126, 267-274.
- Crook, D., Collins, A.J., Prostaglandin synthetase activity from human rheumatoid synovial tissue and its inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Prostaglandins* 9 (1975) 857-868.
- Doelker, E., Water-swollen cellulose derivatives in pharmacy. In: N.A. Peppas (Eds.), *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. Vol. II: Polymers. CRC Press, Boca Raton, FL, 1987, pp. 115-160.
- Effing, J.J., Gruhlk, E.A., Godbey, K.J., Welsing, W., 1997. Transdermal device for the delivery of flurbiprofen. W009733205-A, 1997.1.3.
- Fang, J.Y., Wu, P.C., Huang, Y.B., Tsai, Y.H., In vitro permeation study of capsaicin and its synthetic derivatives from ointment bases using various skin types. *Int. J. Pharm.* 126 (1995) 119-128.
- Fang, J.Y., Wu, P.C., Huang, Y.B., Tsai, Y.H., Percutaneous absorption of capsaicin, nonivamide and sodium nonivamide acetate from gel and ointment bases : in vitro formulation evaluations in pigs and in vivo bioengineering methods in humans. *Int. J. Pharm.* 130 (1996) 121-135.
- Fang, J.Y., Huang, Y.B., Wu, P.C., Tsai, Y.H., Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate II. Optimization and evaluation on solutions and gels. *Int. J. Pharm.* 145 (1996) 175-186.
- Fang, J.Y., Tsai, M.J., Huang, Y.B., Wu, P.C., Tsai, Y.H., Percutaneous absorption and skin erythema : Quantification of capsaicin and its synthetic derivatives from gels incorporated with benzalkonium chloride by using non-invasive bioengineering methods. *Drug Dev.*

Res. 40 (1997) 56-67.

Fang, J.Y., Huang, Y.B., Lin, H.H., Tsai, Y.H., Transdermal iontophoresis of sodium nonivamide acetate. IV. Effect of polymer formulations. *Int. J. Pharm.* 173 (1998) 127-140.

Fang, J.Y., Kuo, C.T., Huang, Y.B., Wu, P.C., Tsai, Y.H., Transdermal delivery of sodium nonivamide acetate from volatile vehicles: effects of polymers. *Int. J. Pharm.* 176 (1999) 157-167.

Fang, J.Y., Sung, K.C., Lin, H.H., Fang, C.L., Transdermal iontophoretic delivery of diclofenac sodium from various polymer formulations: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Pharm.* 178 (1999) 83-92.

Fang, J.Y., Hsu, L.R., Huang, Y.B., Tsai, Y.H., Evaluation of transdermal iontophoresis of enoxacin from polymer formulations: in vitro skin permeation and in vivo microdialysis using Wistar rat as an animal model. *Int. J. Pharm.* 180 (1999) 137-149.

Finnin, B.C., Morgan, T.M., 1999. Transdermal penetration enhancers: application, limitation, and potential. *J. Pharm. Sci.* 88, 955-958.

Heyneman, C.A., Lawless-Liday, C., Wall, G.C., 2000. Oral versus topical NSAID in rheumatic disease. *Drugs* 60, 555-574.

Ho, H.O., Huang, F.C., Sokoloski, J.D., Sheu, M.T., 1994. The influence of cosolvents on the in-vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from a gel system. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 636-642.

Inagi, T., Muramatsu, T., Nagai, H., Terada, H., 1981. Influence of vehicle composition on the penetration of indomethacin through guinea pig skin. *Chem. Pharm. Bull.* 9, 1707-1714.

Jones, D.S., Woolfson, A.D., Brown, A.F., 1997. Textural, viscoelastic

- and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. *Int. J. Pharm.* 151,223-233.
- Karim, A. Transdermal absorption-a unique opportunity for constant delivery of nitroglycerin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9: 671-89.
- Kim, M.K., Chung, S.J., Lee, M.H., Cho, A.R., Shim, C.K., 1997. Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *J. Control. Release* 40, 243-251.
- Kim, S.W., Bae, Y.H., Okano, T, Hydrogels: swelling, drug loading, and release. *Pharm. Res.* 9 (1992) 283-290.
- Kirjava, M., Monklcoen, J., Saukkosaar, M., Valjaklca-Koskela, R., Kiesvaara, J., Urtti, A., 1999. Phospholipids affect stratum corneum lipid bilayer fluidity and drug partitioning into the bilayers. *J. Control. Release* 58, 207-2147.
- Kligman, A.M. A biological brief on percutaneous absorption. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1983, 9: 521-60.
- Lee, D.J., Burt, C.T., Koch, R.L., 1992. Percutaneous absorption of flurbiprofen in the hairless rat measured in vivo using ¹⁹F magnetic resonance spectroscopy. *J. Invest. Dermatol.* 99, 431-434.
- Lu, J.X., Prudhommeaux, F., Meunier, A., Sedel, L., Guillemin, G., Effects of chitosan on rat knee cartilages. *Biomaterials* 20 (1999) 1937-1944.
- Marsh, C.C., Schuna, A.A., Sundstrom, W.R., A review of selected investigational nonsteroidal antiinflammatory drugs of the 1980s. *Pharmacotherapy* 6 (1986) 10-25.
- Morimoto, Y., Hatanaka, T., Sugibayashi, K., Omiya, H., 1992. Prediction

- of skin permeability of drugs: comparison of human and hairless rat skin. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 634-639.
- Okabe, H., Takayama, K., Nagai, T., 1992. Percutaneous absorption of Ketoprofen from acrylic gel patches containing d-limonene and ethanol as absorption enhancers. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1906-1910.
- Phillips, C.A., Michniak, B.B., Transdermal delivery of drugs with differing lipophilicities using Azone analogs as dermal penetration enhancers. *J. Pharm. Sci.* 84 (1995) 1427-1433.
- Poul, J., West, J., Buchanan, N., Grahame, R., 1993. Local anesthetic transcutaneous flurbiprofen in the treatment of soft tissue rheumatism. *Brit. J. Pharmacol.* 32, 1000-1003.
- Rozier, A., Mazuel, C., Grove, J., Plazonnet, B., Gelrite: A novel, ion-activated, in-situ gelling polymer for ophthalmic vehicles. Effect on bioavailability of timolol. *Int. J. Pharm.* 57 (1989) 163-168.
- Sheldrake, F.E., Webber, J.M., Marsh, B.D., A long-term assessment of flurbiprofen. *Curr. Med. Res. Opin.* 5 (1977) 106-116.
- Sung, K.C., Fang, J.Y., Hu, O.Y.P., 2000. Delivery of nalbuphine and its precursor across skin by passive diffusion and iontophoresis. *J. Control. Release* 67, 1-8.
- Tsai, C.J., Hsu, L.R., Fang, J.Y., Lin, H.H., Chitosan hydrogel as a base for transdermal delivery of berberine and its evaluation in rat skin. *Biol. Pharm. Bull.* 22 (1999) 397-401.
- Valjakka-Koskela, R., Kirjavainen, M., Monkkonen, J., Urtti, A., Kiesvaara, J., 1998. Enhancement of percutaneous absorption of naproxen by phospholipids. *Int. J. Pharm.* 175, 225-230.
- Wenk, B.P., Lippold, B.C., 1999. Skin penetration of nonsteroidal

anti-inflammatory drugs out of a lipophilic vehicle influence of the viable epidermis. *J. Pharm. Sci.* 88, 1362-1331.

Wu, P.C., Huang, Y.B., Fang, J.Y., Tsai, Y.H., Percutaneous absorption of captopril from hydrophilic cellulose derivatives through excised rabbit skin and human skin. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24 (1998) 179-182.

Yokomizo, Y., 1996. Effect of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro and analysis of the molecular mechanism using ATR-FTIR spectroscopy. *J. Control. Release* 4, 249-262.

Zhao, K., Singh, J., 2000. Mechanisms of in vitro percutaneous absorption enhancement of tamoxifen by enhancers. *J. Pharm. Sci.* 89, 771-780.