

# 氨基酸酯类衍生物对咖啡因体外透皮吸收的影响

李颖 王显赫<sup>[通讯作者]</sup>

珠海科技学院 应用化学与材料学院

DOI:10.12238/jpm.v3i11.5430

**[摘要]** 本文研究了几种不同氨基酸酯类盐酸盐对咖啡因透皮吸收的影响。采用 Franz 直立式扩散池, 以生理盐水为接收介质, 以离体小鼠皮肤为渗透屏障, 考察制剂中咖啡因体外透皮吸收的累积透过量及各种促渗剂的促渗效果。结果表明五种氨基酸酯类盐酸盐能够显著改善咖啡因的体外透皮吸收效果, 其中赖氨酸甲酯盐酸盐的效果最为显著, 透皮渗透促进作用的顺序为: 赖氨酸甲酯盐酸盐>半胱氨酸甲酯盐酸盐>苯丙氨酸甲酯盐酸盐>亮氨酸甲酯盐酸盐>色氨酸甲酯盐酸盐。

**[关键词]** 咖啡因; 氨基酸酯; 透皮吸收

## Effects of amino acid ester derivatives on transdermal absorption of caffeine in vitro

Li Ying, Wang Xianhe [corresponding author]

(School of Applied Chemistry and Materials, Zhuhai University of Science and Technology, Zhuhai, Guangdong 519040)

**[Abstract]** In this paper, we studied the effects of several different amino acid esters hydrochloride on caffeine transdermal absorption. Using the Franz upright diffusion pool, with normal saline as the receiving medium and isolated mouse skin as the penetration barrier, the cumulative amount of caffeine transdermal absorption and the permeability effect of various permeable agents in the preparation were investigated. The results show that five amino acid esters hydrochloride can significantly improve the transdermal absorption effect of caffeine in vitro, among which lysine methyl hydrochloride is the most significant effect, transdermal penetration-promoting order is: lysine methyl hydrochloride> cysteine methyl hydrochloride> phenylalanine methyl hydrochloride> leucine methine hydrochloride> tryptopine methyl hydrochloride.

**[Key words]** Caffeine; amino acid ester; transdermal absorption

咖啡因是一类具有精神活性的化合物, 它可以刺激神经系统, 使人体亢奋。在一些植物的种子和水果中有不同数量的存在, 特别是咖啡豆, 茶叶当中, 因此大部分的咖啡因应用在食品和饮料中<sup>[1]</sup>。然而, 越来越多的咖啡因被用于化妆品工业当中, 它被用于许多面霜和洗液中。作为生物碱, 咖啡因具有很强的抗氧化活性, 它可以通过抑制还原酶的活性, 增加皮肤的微循环, 减缓皮肤衰老并刺激头发的生长。咖啡因也是一种有效的药物成分, 它可以防止细胞中脂肪的过度积累, 还可以增强心脑血管韧性, 促进人体新陈代谢。因此在医学治疗上咖啡因是被广泛使用的镇痛剂和利尿剂。一般情况下咖啡因都是口服给药, 但口服咖啡因具有首过效应, 刺激胃肠道, 增加肝、肾等负荷。因此, 咖啡因透皮给药的研究成为咖啡因口服给药的重要补充。与口服相比, 它有许多优点, 即可以一次性大面积使用, 获得相对安全的低峰浓度。绕开首过效应<sup>[2-8]</sup>, 可以持续缓慢吸收, 维持长时间的药效。文章根据相关报道, 首次选用苯丙氨酸甲酯盐酸盐、半胱氨酸甲酯盐酸盐、色氨酸甲酯盐酸

盐、亮氨酸甲酯盐酸盐和赖氨酸甲酯盐酸盐等五种氨基酸酯衍生物作为促渗剂, 探索研究氨基酸酯类衍生物对咖啡因透皮吸收的影响。根据累积渗透量( $Q_n$ )、速率常数( $J_s$ ), 增渗比(ER)作为考察指标, 对所用的几种促渗剂进行比较筛选。

### 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1260 型高效液相色谱仪器 (G1314F 型检测器, G1311C 型四元泵, OpenLAB 色谱工作站); EX224 型精密分析天平 (奥豪斯仪器上海有限公司); YB-P6 型智能透皮试验仪 (天津药典标准仪器厂); H-1 型微型混合器 (上海康禾光电仪器有限公司); KH-100B 型超声仪 (昆山禾创超声仪器有限公司)。

1.2 试药 咖啡因标准品 (阿拉丁); 无水甲醇 (欧普森, 色谱纯); 苯丙氨酸甲酯盐酸盐 98%、半胱氨酸甲酯盐酸盐 98%、色氨酸甲酯盐酸盐 98%、亮氨酸甲酯盐酸盐 98%和赖氨酸甲酯盐酸盐 98% (阿拉丁); 氯化钠注射液 0.9% (广东科伦药业有限公司)。

1.3 实验动物 大鼠 SD, 体重/日龄 (180-220g/56-63 天), 性别 (雄性), 广东省医学实验动物中心, 许可证号: SCXK (粤) 2013-0002。

## 2 方法与结果

### 2.1 HPLC 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件 色谱柱: 流动相: 甲醇-水 (70:30), 检测波长: 270nm, 柱温: 38℃, 流速: 1.0ml/min, 进样量: 10 $\mu$ l。

2.1.2 标准曲线的制备 精密称取咖啡因对照品 1.00g, 置 100ml 量瓶中, 加流动相使溶解, 并稀释至刻度, 涡旋 3min, 超声 30min, 得标准储备液。精密量取标准储备液 20、40、60、80、100、120、160 $\mu$ l, 置 10ml 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 旋涡 3min, 超声 30min, 得咖啡因浓度分别为 20、40、60、80、100、120、160 $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup> 的系列标准液。过 0.45 $\mu$ m 有机微孔滤膜, 按“2.1.1”项下色谱条件测定。以咖啡因的质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行线性回归, 得回归方程  $A=538.11X-574.57$ ,  $r^2=0.9995$ 。

2.1.3 供给液的配制 分别精密称取一定量的氨基酸酯类盐酸盐, 加入流动相, 旋涡 3min, 超声 30min, 使氨基酸酯类盐酸盐充分溶解, 制得质量浓度分别为 5% 的溶液。以不加氨基酸酯类盐酸盐的流动相为空白对照溶液。将一定量的咖啡因分别加入到上述溶液中, 涡旋 3min, 超声 30min, 经 0.45 $\mu$ m 有机微孔滤膜过滤, 取滤液为供试药液。

2.1.4 接受液的制备 以医用生理盐水为接收液。

2.1.5 精密度试验 取浓度为 120 $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup> 的标准品溶液, 自动进样 10 $\mu$ l, 重复 6 次, 咖啡因峰面积 RSD 值为 1.21%, 表明该仪器精密度较好。

2.1.6 稳定性试验 取浓度为 120 $\mu$ g $\cdot$ ml<sup>-1</sup> 的标准品溶液, 自动进样 10 $\mu$ l, 每隔 2h 进样 1 次, 12 小时 6 次进样测定咖啡因峰面积 RSD 值为 0.98%, 表明供试品溶液在 12h 内基本稳定。

2.1.7 加样回收率试验 取空白接受液 3 份, 分别加入一定量的咖啡因对照品, 制成高、中、低质量浓度分别为 0.2、0.5、0.8mg $\cdot$ ml<sup>-1</sup> 的系列溶液, 按照“2.1.1”项下色谱条件进行测定, 计算平均回收率为 98.67%, RSD 值为 1.37% (n=3)。

### 2.2 体外透皮实验

2.2.1 透皮实验 将处理好的大鼠皮肤固定于 Franz 直立扩散池中 (扩散池有效扩散面积为 1.5386cm<sup>2</sup>, 接收池体积为 15ml, 角质层面向上, 真皮层面向接收池。在供给池中加入供给液, 接收池中加入 15ml 接受液。池内温度控制在 37℃, 搅拌转子转速为 300r $\cdot$ min<sup>-1</sup>。分别于 0.5、2、4、6、8、10、12h 在接收池中取样 1ml, 立即补加等量新鲜接收液, 所得样品经 0.45 $\mu$ m 有机微孔滤膜过滤, 按照所建立的 HPLC 方法测定药物含量。

#### 2.2.2 结果

咖啡因累积渗透量  $Q$  ( $\mu$ g $\cdot$ cm<sup>-2</sup>), 按下式计算。

$$Q_n = \frac{C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} (C_i V_i)}{A}$$

$C_n$  和  $C_i$  分别为第  $n$  次和第  $i$  次取样时接收液的浓度;  $A$  为有效扩散面积;  $V_0$  为接收池内接收液体积;  $V_i$  为每次取样体积。

以咖啡因累积渗透量  $Q_n$  对  $t$  进行线性回归, 所得  $Q-t$  曲线上直线部分的斜率即为稳态渗透速率  $J_s$  ( $\mu$ g $\cdot$ cm<sup>-2</sup> $\cdot$ h<sup>-1</sup>)。采用增渗比  $ER=J_s/J_0$  用来衡量促渗剂对咖啡因渗透促进作用的大小,  $J_s$  为含促渗剂药物的稳态透过速率,  $J_0$  为未加促渗剂的稳态透皮速率。结果见表 1、图 1。所有数据采用方差分析, 用  $t$  检验做统计学处理。

表 1 不同促渗剂对咖啡因体外经皮渗透的影响。  $\bar{x} \pm s$ , n=3

Table 1 effects of different osmotic enhancers on percutaneous permeation of caffeine in vitro.  $\bar{x} \pm s$ , n=3

促渗剂	$Q_{12}$	$Q-t$ 回归方程	$r^2$	$J_s$	ER
空白	19.69 $\pm$ 2.15	$y=1.432x+9.013$	0.9930	1.432	1
苯丙氨酸甲酯盐酸盐	30.04 $\pm$ 2.19	$y=3.341x+5.378$	0.9663	3.341	2.333
半胱氨酸甲酯盐酸盐	32.29 $\pm$ 2.30	$y=3.814x+4.804$	0.9550	3.814	2.663
色氨酸甲酯盐酸盐	29.13 $\pm$ 2.33	$y=2.855x+10.216$	0.9959	2.855	1.994
亮氨酸甲酯盐酸盐	27.61 $\pm$ 3.23	$y=3.111x+7.315$	0.9679	3.111	2.172
赖氨酸甲酯盐酸盐	35.26 $\pm$ 2.54	$y=3.957x+4.341$	0.9429	3.957	2.763

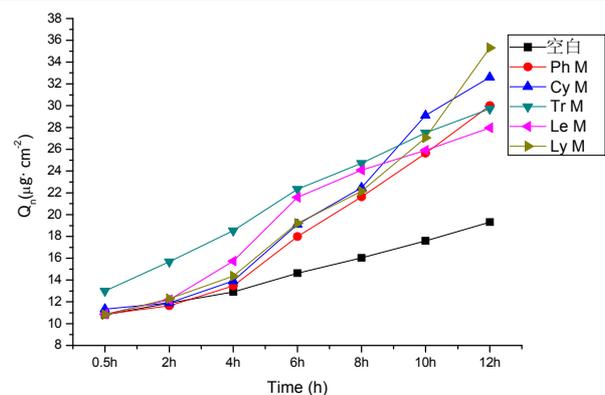


图 1 不同促渗剂对咖啡因体外经皮 12h 累计渗透量曲线。  
Fig. 1 cumulative permeation curve of caffeine for 12 hours in vitro with different osmotic enhancers.

从表 1 和图 1 可以看出与不含促渗剂的空白溶液相比, 含促渗剂的咖啡因溶液累积渗透量  $Q_n$ 、稳态渗透速率  $J_s$  和增渗比 ER 均明显增加。不同促渗剂对咖啡因透皮促渗作用的大小为: 赖氨酸甲酯盐酸盐 > 半胱氨酸甲酯盐酸盐 > 苯丙氨酸甲酯盐酸盐 > 亮氨酸甲酯盐酸盐 > 色氨酸甲酯盐酸盐。

## 3 讨论

本文考察了五种氨基酸酯类盐酸盐对咖啡因的透皮促渗

性能。与空白对照组相比,ER 最大的为 2.763,最小的为 1.994。其中赖氨酸甲酯盐酸盐和半胱氨酸甲酯盐酸盐的促渗作用明显,而色氨酸甲酯盐酸盐和亮氨酸甲酯盐酸盐的促渗效果相对较小。亮氨酸甲酯盐酸盐在 12h 的考察过程中,渗透速率相对稳定,且前 9h 一直维持较高促渗活性。其它四种促渗剂在 4h 前,累积渗透量增长缓慢,4h 后达到最大促渗活性,渗透速率增大。色氨酸甲酯盐酸盐在 6h 后,促渗性能减弱,这可能因其杂环结构对皮肤角质层细胞作用有限所致。氨基酸酯类衍生物作为渗透促进剂,具有高活性、可逆作用和低毒等优点<sup>[9]</sup>,同时其酯链的生物降解性,也得到了研究证实<sup>[10]</sup>。它可以提高药物溶解性的同时结合到角质层脂质屏障中<sup>[11]</sup>,破坏膜脂的紧密排列,进而改变皮肤的通透性,起到透皮促渗的作用。虽然大鼠皮肤结构和通透性与人皮肤不同,但已建立的促渗剂的活性是相当相似的<sup>[12]</sup>。目前研究的局限性包括缺乏关于长期皮肤和全身毒性的数据,以及促进剂的吸收、代谢和消除。氨基酸酯类衍生物这种潜在的具有前途的促进剂值得进一步研究。

#### [参考文献]

- [1]Ayala J, Simons K, Kerrigan S. Quantitative determination of caffeine and alcohol in energy drinks and the potential to produce positive transdermal alcohol concentrations in human subjects[J]. *Journal of analytical toxicology*, 2009, 33(1): 27-33.
- [2]Gajewska M, Paini A, Benito J V S, et al. In vitro-to-in vivo correlation of the skin penetration, liver clearance and hepatotoxicity of caffeine[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2015, 75: 39-49.
- [3]Batchelder R J, Calder R J, Thomas C P, et al. In vitro transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Cameilia sinensis*[J]. *International journal of pharmaceuticals*, 2004, 283(1-2): 45-51.
- [4]Luo L, Lane M E. Topical and transdermal delivery of caffeine[J]. *International journal of pharmaceuticals*, 2015, 490(1-2): 155-164.
- [5]Joo S, Kim E, Kang W. Effect of terpinyl acetate on the percutaneous absorption of caffeine in rats[J]. *Experimental*

*dermatology*, 2017, 26(5): 439-441.

[6]Samah N H A, Heard C M. Enhanced in vitro transdermal delivery of caffeine using a temperature- and pH-sensitive nanogel, poly (NIPAM-co-AAc)[J]. *International journal of pharmaceuticals*, 2013, 453(2): 630-640.

[7]Joo S, Kim E, Kang W. Effect of terpinyl acetate on the percutaneous absorption of caffeine in rats[J]. *Experimental dermatology*, 2017, 26(5): 439-441.

[8]Muhammad F, Riviere J E. Differential effects of some natural compounds on the transdermal absorption and penetration of caffeine and salicylic acid[J]. *International journal of pharmaceuticals*, 2015, 483(1-2): 151-157.

[9]张兴盈, 林亚蒙, 曲媛, 等. 氨基酸酯类离子液体的经皮促渗活性考察[J]. *中国医药工业杂志*, 2017, 48(4): 536-542

[10]Vávrová K, Hrabálek A. Amino Acid-Based Transdermal Penetration Enhancers[M]//*Percutaneous Penetration Enhancers Chemical Methods in Penetration Enhancement*. Springer, Berlin, Heidelberg, 2015: 325-336.

[11]Brychtova K, Dvorakova L, Opatrilova R, et al. Investigation of substituted 6-aminohexanoates as skin penetration enhancers[J]. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2012, 20(1): 86-95.

[12]Barbora Jan ů š ov á , Barbora Školová, Katarína Tůkřová, Lea Wojnarová, Tomáš Šimůnek, Přemysl Mlad ě nka, Tom á š Filip ský, Michal Ř í ha, Jaroslav Roh, Karel Pal á t, Alexandr Hrab á lek, Kateřina V á vrov á et, et al. Amino acid derivatives as transdermal permeation enhancers[J]. *Journal of controlled release*, 2013, 165(2): 91-100.

#### 作者简介:

李颖, 女, 1989.09, 初级实验员, 硕士研究生。

#### 基金项目:

吉林大学珠海学院质量工程建设项目: 化工与新能源材料学院-珠海奥博凯生物医药技术有限公司实践教学基地建设项目 (ZLGC20200703)