

計畫編號：DOH89-TD-1202

行政院衛生署八十八年下半年及八十九年度
科技研究發展計畫

水溶性維生素 E 改善 Estradiol 經皮吸收之研究

研 究 報 告

執行機構：台北醫學大學

計畫主持人：何 秀 娥

研究人員：

執行期間： 88 年 11 月 1 日至 89 年 12 月 31 日

* * 本研究報告僅供參考，不代表本署意見 * *

目 錄

目錄	2
中文摘要	3
英文摘要	5
前言	7
材料與方法	14
實驗理論	21
結果與討論	23
參考文獻	28
圖、表	30

計 劃 摘 要

中文摘要：

關鍵詞：水溶性維生素 E，ESTRADIOL，統計實驗設計法，局部皮膚製劑，溶媒組合

本研究探討水溶性維生素 E (tocopherol polyethylene glycol succinate, TPGS)對於可改善停經後症候群治療劑 estradiol 在經皮吸收效果及溶解度方面的影響。estradiol 穿皮劑型的使用可避免口服時造成的胃腸道首渡效應。TPGS 在結構上同時擁有親水基和親油基，具有界面活性劑的性質，使它可當作很好的助溶劑、吸收促進劑，所以應值得利用脂溶性的 estradiol 作為模式藥，來探討 TPGS 增強穿皮吸收劑型之藥物吸收的功效。

根據 Fick's law，溶媒的性質和角質層的結構變化在藥物穿透皮膚上扮演著重要的角色。所以在本實驗中，測量 estradiol 在不同濃度 EtOH/TPGS 溶媒組合中的溶解度及黏度，以了解溶媒的相關物理性質。以裸鼠皮為主要的障礙層模式，在 Franz 滲透裝置中探討 estradiol 穿皮吸收的情形。將 0.06%(w/v) estradiol 溶於不同濃度的 EtOH/TPGS 溶媒組合中，置於給藥室。於預設的時間由接受室取樣後，利用已確效的螢光液相層析法分析樣品中 estradiol 的含量。

實驗結果顯示，TPGS 藉由微膠體的助溶作用而增加 estradiol 溶解度。而且 TPGS 的 CMC 會隨著酒精濃度的增加而提高。在相同酒精含量下，溶媒系統的黏度會隨著 TPGS 濃度的增加而增加。而在相同 TPGS 濃度之下，溶

媒系統的黏度亦會隨著酒精含量增加而增加，且在 40%~60%酒精含量時達到最高的黏度。固定量之 estradiol，於相同酒精含量下，estradiol 的通透量不會隨著 TPGS 濃度增加而增加，對於改善 estradiol 的通透量而言，增加酒精濃度比增加 TPGS 濃度顯著。另一方面，TPGS 增加 estradiol 溶解度的作用，並無法相對的提高其滲透量。且實驗結果顯示 TPGS 幾乎沒有穿透過皮膚(<2ug/ml)。

英文摘要：

Key words: water-soluble tocopherol , estradiol , experimental statistical design , transdermal delivery

The effect of tocopheryl polyethylene glycol succinate (TPGS) was examined on the solubility and in vitro percutaneous penetration of estradiol, which is used to treat postmenopause syndroms. Percutaneous delivery of estradiol would provide a mean to avoid the first-pass effect associated with administration by the oral route. TPGS is a water-soluble derivative of natural-source vitamin E. Structurally, it comprises a dual nature of lipophilicity and hydrophilicity, similar to a surface-active agent.

From Fick's law, both solvent system and skin structure play an important role in percutaneous penetration. Therefore, the aqueous solubility and viscosity of estradiol in EtOH/TPGS cosolvent system were measured in this study. The hairless mouse skin was employed as the principal barrier and Franz diffusion cells were used as a device to assess the percutaneous penetration. At a fixed concentration of 0.06% (w/v) estradiol, different ratios of solvent composition were added to the donor compartment. The cumulative amount of estradiol permeated per unit skin surface area was plotted against time and the slope of the linear portion of the graph was estimated as the flux.

Results show that the solubility of estradiol was improved in the presence of TPGS through micelle solubilization. The CMC (critical micelle concentration) of TPGS increased with increasing EtOH concentration in the cosolvent system. The viscosity was also found to increase with increasing TPGS concentration at the same alcohol level. For the same concentration of TPGS, viscosity increased

with increasing alcohol content and then was maximized in the range of 40-60% alcohol. At the fixed concentration of estradiol, the flux was not enhanced accordingly with increasing TPGS concentration at the same level of alcohol content. The influence of increasing alcohol content on the flux of estradiol seems to be much greater than that of increasing TPGS concentration. On the other hand, the efficacy to enhance estradiol penetration is low by increasing estradiol solubility with the use of TPGS. It also found that only an insignificant amount of TPGS transported across the skin ($< 2 \text{ ug/ml}$). The incorporation of TPGS in the cosolvent system only had an insignificant influence on the skin, resulting that the improvement on the penetration of estradiol by TPGS was not obvious.

本 文

前言

使用 ESTRADIOL 於治療停經後症候群方面，經皮給藥方式已是被認為優於口服方式，因為 ESTRADIOL 口服給藥後的藥物血中濃度會有高低起伏的變動，而導致不良的副作用反應，又肝臟的首渡效性也相對的降低 ESTRADIOL 口服給藥的生體可用率，使得臨床效果有較大的個體差異。因此雖然 ESTRADIOL 在於治療停經後症候群是優先選用的藥物，卻常因為不穩定的血中濃度所導致的不良反應而降低其臨床接受性。而劑型的發展至今，由皮膚給藥途徑不但能達到全身性效果，尚且可以維持較低而恆定的血中濃度，對於藥物的不同藥理療效與血中濃度成對應關係者，則較易於利用皮膚給藥途徑維持適當血中濃度，而選擇性的達到所需的臨床療效，且能減緩不必要的副作用。而局部皮膚給藥的另一優點是，如在給藥期間發生嚴重的不良反應或有必要中斷藥物治療時，都可以將劑型由給藥部位的皮膚移除而停止藥物繼續由給藥部位滲入皮膚，這如果由口服管道給藥時就必須大費周章的才能達到此目的，甚至有時候卻無法有效的終止口服藥物的繼續吸收。因此 ESTRADIOL 的劑型設計由早期的口服劑型漸漸開發穿皮吸收的軟膏或霜劑，以及最近幾年發展的經皮吸收的貼片劑型(1-4)。

但局部皮膚給藥的穿皮或經皮吸收也並非全然無缺點，這也造成劑型設計者需花費相當的研究投資，才能有效的達到臨床有效的處方劑型設計，尤其對於如 ESTRADIOL 等難溶性藥物的經皮或穿皮吸收劑型的處方設計更是需要突破性的創意。

經由局部皮膚給藥的另一特點也是缺點是所能維持的全身性血中濃度較低，此是因為如上所述，皮膚是用於保護而不是作為給藥用途，所以藥物滲入皮膚，甚至再吸收進入全身循環系統，就受到層層的障礙所阻擋，因此滲透進入被吸收而所能達到的就只是較低的全身性血中濃度，也就是此局部皮膚給藥途徑所能適用的藥物就必須具有低劑量與低血中濃度的特點。相對的，如果選擇性的藥理作用須在較低的血中濃度才能表現，又無法由口服途徑所達成時，那局部皮膚的給藥途徑就是另一可行的選擇。這也是 ESTRADIOL 適合利用局部皮膚給藥的原因之一，因其使用的劑量低，而且所需達到的血中濃度也低。

綜合以上，為能有效的讓藥物由劑型分配滲入表皮的角質層，劑型的溶媒組合選擇以及併用穿皮吸收促進劑就成為成功設計處方的關鍵重點(5-10)。尤其當藥物如 ESTRADIOL 一樣是屬於親脂性時，如何將處方的溶媒組合以及併用的穿皮吸收促進劑之濃度適宜化，將成為劑型處方設計者探討研究之重點(11, 12)。一般藥物由劑型分配滲入表皮之角質層，大都藉由被動運輸的由高濃度往低濃度的方式滲入，當然藥物在劑型與皮膚角質層間的分配係數也將扮演一個重要角色，依照如下的 Fick's Law 可以詳細的說明此關係：

$$J = D * K * (C_s - C_b)/h$$

其中 J 代表單位時間內通過單位面積之藥量，D 是藥物在角質層的滲透係數，K 是藥物在劑型與角質層間的分配係數，C_s 與 C_b 分別表示

藥物在鄰近角質層兩側於劑型端以及於真皮層端的藥物濃度（如以角質層為主要障礙層時），而 h 則是角質層的厚度。 K 可進一步表示為藥物在角質層介質中飽和藥物濃度 (C_{so}) 與劑型中飽和藥物濃度 (C_o) 的相對比 (C_{so}/C_o)。一般 C_b 的濃度可視為很小或遠小於 C_s ，所以上一方程式可簡化為：

$$J = D * K * C_s/h$$

在此條件下，如果劑型中的藥物濃度 (C_s) 可以維持恆定，如過飽和時，藥物分配滲入角質層通透量在到達穩定狀態之後就可維持恆定，而藥物將以固定的速率滲入皮膚，維持穩定的血中濃度。所以藉由變動此些參數 (D , K , 或 C_s) 就可調整所須的血中濃度，以達到特定的臨床療效。當劑型中的藥物濃度為飽和濃度的常數時 ($C_s = C_o$)，而 $K = C_{so}/C_o$ ，上述關係式可轉換為：

$$J = D * K * C_s/h = D * (C_{so}/C_o) * C_o/h = D * C_{so}/h$$

所以此時藥物分配進入角質層完全受到角質層與藥物之相互作用之特質所影響。 D 是藥物在角質層的滲透係數，影響此係數的主要因子包括溫度、介質黏度或緻密程度、以及藥物之分子大小。如果於相同溫度下對於同一藥物而言，介質黏度或緻密程度就是影響藥物之滲透係數最主要的因子。就因為劑型的溶媒組合與吸收促進劑也同時會滲透進入角質層，其中角質層的定義正確一點應該是受到溶媒組合與吸收促進劑共同影響之角質層，因為此劑型中所使用的溶媒組合以及吸收促進劑種類將也會滲入角質層，進而修飾角質層細胞結構的舒鬆程度，因此改變藥物在角質層的滲透係數，所以溶媒組合以及吸收促進劑對藥物在角質層中的滲透係數也應有某些程度之影響。

C_{so} 是代表藥物在經溶媒組合以及吸收促進劑修飾過之角質層內之溶解度，而不是單純的指藥物在角質層介質中的溶解度。而影響藥物在介質中（角質層或經修飾之角質層）之溶解度可以利用 solubility parameter 的觀念說明，其基本假設是當藥物與介質的 solubility parameter 越接近，互溶程度就越高，所以藥物在介質的溶解度就越高，因此可以利用角質層之 solubility parameter 為 10 作為基礎，配合不同溶媒組合存在時對其 solubility parameter 的修飾，可以計算何種溶媒組合作用下的 solubility parameter 與藥物的最接近，以作為篩選溶媒組合之參考或依據。但因為一般添加的吸收促進劑除了修飾角質層之細胞舒鬆性而改變滲透係數之外，有些也會幫助藥物在介質中的溶解，所以進而改變藥物在介質的溶解度。既然如此，吸收促進劑滲入角質層之量與速率也將影響其對角質層修飾的程度，而同時影響藥物的滲透係數與溶解度。相對的，吸收促進劑的滲透量也應該受到劑型之溶媒組合的影響。所以如何將吸收促進劑由不同溶媒組合之劑型的通透性達到最佳化，以使得藥物之滲透達到最理想狀態，應該是有效改善藥物經皮或穿皮吸收的關鍵。

同樣的，表示為角質層厚度的 h ，也應該是指經溶媒組合以及吸收促進劑修飾過之角質層的厚度，因為角質層因緻密度之改變，在厚度方面也應有某種程度的變異，但或許其改變程度與其他因素相比，較不足為道。所以綜合而言，同時考慮溶媒組合對藥物與吸收促進劑滲透之影響以及吸收促進劑對角質層修飾的總體影響，才是決定通透過角質層之藥量的關鍵因素。

ESTRADIOL 是屬於一個親脂性藥物，已知它主要是經由角質層細胞間的脂質結構滲透進入皮膚之後再被吸收入全身循環系統。所以不管以現有的任何劑型（軟膏、霜劑、凝膠或貼片）由局部皮膚給藥，改善 ESTRADIOL 由角質層的細胞間脂質之滲透，將有助於 ESTRADIOL 的臨床效果，甚至使得個人角質層之影響性均一化，而降低個體差異。角質層細胞間脂質的主要結構成分為 ceramide I，再加上 Cholesterol 與其 sulfate 衍生物，以及一些長鏈的脂肪酸酯。文獻也指出，在適當水分存在下，角質細胞間脂質所形成的液晶結構對於維持角質層結構之完整性以及降低水分之散失，扮演相當重要的角色(13-15)。所以在正常狀態下，角質細胞間的脂質是以液晶結構存在於維持角質層之障礙作用，以阻斷任何物質的侵入或流失。因此如能藉由具有能形成類似的液晶結構又能有助溶效果的水溶性維生素 E，依靠其類似結構性能攜帶滲入細胞間脂質，並更有效的經由此管道進入角質層，必能有效的達到改善 ESTRADIOL 經皮或穿皮吸收之效果，並且可降低個體差異所造成的影響，而使 ESTRADIOL 局部皮膚給藥療程之臨床療效更佳且更為病人所樂於接受。

水溶性維生素 E 是一種維生素 E 的聚乙二醇衍生物，學名為 Tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS)。結構上就同時具有維生素 E 本體的親脂性以及聚乙二醇的親水性，所以呈現出界面活性劑的特質。因此種特異的性質，TPGS 已被建議用於作為乳化劑、助溶劑、吸收促進劑、以及維生素 E 的水溶性來源。TPGS 可溶解於水性溶液，達到 20% (w/v) 的濃度而仍能維持澄清狀態。它具有界面活性劑的特性，於 37°C 的 CMC 約為 0.02% (w/v)，所以易於

自體結合成微膠結構，可幫助難溶性藥物溶解於水溶液中(16)。當 TPGS 的濃度提高超過 20% 之後，較高黏度的液晶結構開始形成，繼續提高 TPGS 的濃度，TPGS 與水所形成的液晶結構由 isotropic 球型微膠體，漸次演變成 isotropic 的圓柱型微膠體、圓柱型與六角型混合微膠體、六角型微膠體、六角型與反六角型混合微膠體、反六角型微膠體、反球型微膠體、最後形成層狀微膠體。這些液晶相的形成與變化已經由小角度 X-射線散射實驗證實。

使用 TPGS，已證明可於動物體或人體加速吸收而提高維生素 E 乙酸酯口服的生體可用率。於 Sokol 等人(17)的研究也證明 TPGS 作為維生素 E 的代替品，可以有效治癒維生素 E 缺乏病人，使其維生素 E 狀態恢復正常而改善神經性病變。除了可以改善維生素 E 的吸收效果之外，TPGS 也可使用作為藥物口服吸收促進劑。Sokol 等人(18)於臨床試驗證明 TPGS 可以增強非常親脂性藥物 cyclosporin 的口服吸收，要達到相似的血漿濃度，其臨床劑量可以降低 40-72%，所以臨床治療成本可以大幅度的降低。況且 TPGS 是一個具有不同液晶相層變化的界面活性劑，因不同液晶相層的藥物包覆與釋出將有不同，所以能有效的控釋藥物，其釋出模式已由 Traber 等人提出。在其他應用方面，Kawata 等人(19)利用 TPGS 作為助溶劑，以調製抗癌藥物油性組成的乳化劑型，應用的藥物包括 carmofur、fluorouracil、mitomycin C、acracinomycin A，與 cyclosporin。Reichert 等人(20)利用 TPGS 作為濕潤劑，以緩和細胞膜表面的平滑性，因而降低流通管道，有助於改善鼻咽黏膜的濕潤程度而防止打噴嚏。美國專利 (3,102,078 與 3,137,555) 也揭露 TPGS 作為單酸三甘酯的助溶劑與乳化劑之用。在

化妝品方面，也利用其濕潤性以提高與皮膚的接觸性，有助於藥物的治療效果與化妝品的實際效果。

TPGS 的安全性相當好，在年輕的雌雄成鼠的急性口服 LD₅₀ 都大於 7000 mg/kg (21)。其 HLB 值約為 13，應是很好的助溶劑與吸收促進劑，但已知的文獻中對於 TPGS 應用於經皮或穿皮吸收劑型仍非常有限，所以應值得利用難溶性的 ESTRADIOL 作為模式藥，探討 TPGS 增強經皮與穿皮吸收劑型之藥物吸收的功效。並同時探究 TPGS 的滲透量與速率如何受不同溶媒組合的影響，進而影響到 ESTRADIOL 由相對溶媒組合分配滲入皮膚的通透量。

材料與方法

材料:

1. β -estradiol (Sigma)
2. D- α -Tocopheryl PEG 1000 Succinate (Eastman)- [TPGS]
3. Polyethyl glycol 400 (Fluck)
4. Sodium Chloride (RDH)
5. Disodium hydrogen phosphate (Merck)
6. Potassium dihydrogen phosphate (RDH)
7. Sodium azide (Merck)
8. Methyl alcohol
9. Acetonitrile (Merck)

實驗方法:

1. 高效液相層析(HPLC) 之分析

(1)分析條件:

本實驗採用幫浦 PU-980 Intelligent HPLC PUMP (Jasco), 偵測器 FL3000 Fluorescence (Tsp) excitation 280nm、emission 312nm 及自動取樣器 851 AS Intelligent Sampler (Jasco) 來進行分析試驗; 資料處理系統為 SISC 32 (Model 9724-2); 高液相層析管柱為 5 μ m C18 reversed-phase column (Inersil 5 ODS-2 250-4.6mm, 建吾) 35 $^{\circ}$ C; 移動相為 Acetonitrile/H₂O (60/40, v/v); 流速為 1ml/min; 樣品注射量為 100 μ l。

(2)分析方法:

檢量線配製

取 0.05g estradiol 以 alcohol 定量至 100 毫升, 從其中取出 1 毫

升以移動相定量至 25 毫升，依適當比例用 medium 配製檢量線
各濃度 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2mg/ml，取上列各濃度溶液 0.75 毫
升分別加入移動相 0.75 毫升混合均勻。

2. 藥物穿皮吸收之分析

(1) 用 6~8 週之公裸鼠的皮膚作為穿透膜置於 Franz diffusion cells
(穿透面積為 2.54 平方公分，瓶內體積為 4.5 毫升)上，把 cell
分為兩部分，上部分(donor cell) 放樣品 0.8 毫升，下部分
(receptor cell) 放 saline pH 7.4 phosphate buffered solution-
PEG400 (50/50, v/v) 溶液，此溶液(medium)是由 0.69g
Na₂HPO₄、0.095gKH₂PO₄、4g NaCl、0.05g Sodium azide 加去
離子水定量至 500 毫升配置而成；下部分持續用小磁石及螺旋
鐵絲攪拌。

(2)樣品配置

含 0% alcohol

取 0.006g estradiol 和 TPGS(0g、0.001g、0.01g、0.1g、0.5g、
1g、1.5g) 加去離子水定量至 10 毫升，使成含 0% alcohol，
0.06%(w/v) estradiol 的 0%、0.01%、0.1%、1%、5%、10%、
15%(w/v)TPGS 樣品。

含 10% alcohol

取 0.6g estradiol 加 alcohol 定量至 100 毫升，從其中取出 1 毫
升加入 TPGS(0g、0.001g、0.01g、0.1g、0.5g、1g、1.5g) 再
加入去離子水定量至 10 毫升，使成含 10% alcohol，0.06%(w/v)
estradiol 的 0%、0.01%、0.1%、1%、5%、10%、15%(w/v)TPGS
樣品。

(3)取樣時間

在 0、1、2、4、6、8、10、12、24、36、48、60、72、84、96hr 時，由自動取樣機 (Hanson research) 取出 0.2 μ l。

3. 溶解度分析

(1)樣品配置

含 0% alcohol 之 TPGS 樣品

把適量的 TPGS 溶於去離子水中，使成為濃度是 0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%(w/v) 的 TPGS 水溶液。

含 10% alcohol 之 TPGS 樣品

把適量的 TPGS 和 1 毫升 alcohol 用去離子水定量至 10 毫升，使成為含 10% alcohol 之 0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%、1%、2%、5%、10%、15%、20%(w/v) TPGS 樣品溶液。

(2)取樣品溶液 1 毫升置於離心管中，並加入過量的 estradiol，離心管置於恆溫槽 37°C、三天，三天中若 estradiol 完全溶解再加入 estradiol 以保持過飽合狀態，三天後把離心管拿去離心(37°C、2700rpm、15min)，上清液用 0.45 μ m 的濾膜過濾後，用 HPLC 分析樣品所溶解的 estradiol 濃度。

4. 高效液相層析(HPLC)分析 vitamin E 與 TPGS 含量之方法

(1)分析條件:

本實驗採用的幫浦是 PU-980 Intelligent HPLC PUMP (Jasco)，偵

測器為 UV-975 Intelligent UV/VIS Detector (Jasco) 於 UV 284 nm 分析及自動取樣器為 851 AS Intelligent Sampler (Jasco) 來進行分析試驗；資料處理系統為 SISC 32 (Model 9724-2)；層析管柱為 5 μ m C8 reversed-phase cartridge column (Lichrospher® 250-4 , Merck)；內部標準品採用維生素 E-Acetate；移動相為 MeOH/10 mM 磷酸 (95/5, v/v)；流速為 1 ml/min；樣品注射量為 100 μ l。

(2)分析方法:

維生素 E 標準品的配製

稱取 0.1 克的維生素 E 加入酒精水溶液 (酒精和水以 1:1 比例混合，且加入 0.1 % ascorbic acid 泡製成的) 定量至 100 毫升(1 mg/ml)，之後取出 0.125 毫升以酒精水溶液定量至 50 毫升(2.5 μ g/ml)，再加入 5 毫升維生素 E-acetate 內部標準品振搖混合約 60 秒，待分成二層時，取上層液 2 毫升用氮氣吹乾，最後加入 0.5 毫升的移動相溶液，混合後裝入小瓶子用上述條件分析。

內部標準品配製

取 0.1 克維生素 E-acetate 以 iso-octane 定量至 100 毫升，然後由這 100 毫升中取出 1.25 毫升並以 iso-octane 定量至 50 毫升，此使成濃度為 25 μ g/ml 溶液。

TPGS 標準品的配製

取 0.1 克的 TPGS 以酚泰酒精溶液(由 1 升酒精加入 10 滴 0.2 % 酚泰配製成)定量至 100 毫升(1 mg/ml)，之後取適量配製成 2、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ TPGS 標準品溶液。

樣品溶液

取 0.8 毫升的 15% TPGS 水溶液置於 Franz diffusion cell 的給藥室，經 96 小時後，取接受瓶內 1 毫升的溶液，直接注入 HPLC 系統分析維他命 E 的含量；另外，又取 2.5 毫升進行皂化反應，分析其中含有 TPGS 的量。

皂化反應

參照文獻採用皂化反應來測量樣品中 TPGS 的含量 (Traber et al., 1988)。其皂化原理為利用氫氧化鉀皂化 TPGS，使 TPGS 轉變成維生素 E，且由 iso-octane 萃取出來，然後用維生素 E 的分析方法分析，間接得知 TPGS 的含量，反應方程式如圖。

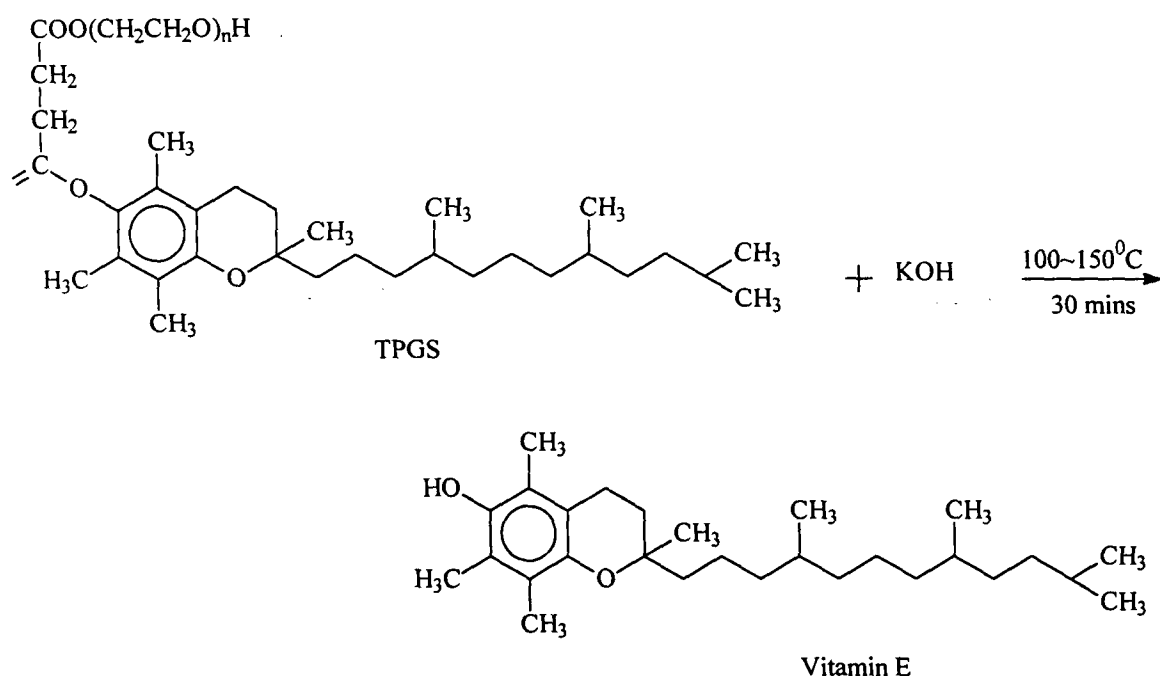


Fig. The reaction of saponification.

首先取上述樣品溶液置於磨砂圓底瓶中，加入 50 毫克 ascorbic acid 作抗氧化劑及 2~3 顆沸石以防止突沸，最後再加入 25 毫升的酚泰酒精溶液，架設迴流裝置，使圓底瓶在油浴鍋中加熱，溫度約在 $100\sim 150^{\circ}\text{C}$ ，待圓底瓶中的樣品溶解完全時，加入 0.25 克氫氧化鉀，之後持續迴流加熱至少 30 分鐘；把圓底瓶從油浴鍋移出後，迅速沿著管壁加入 1~2 毫升鹽酸，再加 25 毫升的去離子水並確定溶液不呈粉紅色（若呈粉紅色再加鹽酸）；此溶液和 5 毫升的內部標準品振搖混合均勻約 60 秒，當瓶中的溶液分成二層時，取上層 2 毫升用氮氣吹乾，之後加入 2 毫升移動相溶液混合，然後用維生

素 E 的分析條件分析，間接的測得樣品中 TPGS 的含量。TPGS 標準品也是利用上述方法進行皂化反應，測知 TPGS 的含量。

實驗理論

一. 溶解度實驗：

當 TPGS 的濃度大於 CMC 時，溶液中會有游離態的溶質(free form)及與微膠結合的溶質(micelle-bound)，所以溶液中溶質的濃度可表示為：

$$S_{total} = S_{free} + S_{bound} \quad \text{Eq(1)}$$

S_{total} ：溶質總濃度

S_{free} ：游離態的溶質濃度

S_{bound} ：與微膠體結合的溶質濃度

而游離態、與微膠結合的溶質在溶液中的平衡分布係數 (k_a) 為：

$$k_a = \frac{S_{bound}}{S_{free} \cdot (SAA)_m} \quad \text{Eq(2)}$$

k_a ：平衡分布係數(equilibrium distribution coefficient)

$(SAA)_m$ ：TPGS 的微膠體濃度(=TPGS 濃度－CMC) (Yu et al.,1999)

由 Eq.(2) 可得：

$$\begin{aligned} S_{total} &= S_{free} [1 + k_a (SAA)_m] \\ &= S_{free} + k_a \cdot S_{free} \cdot (TPGS_t - CMC) \\ &= S_{free} (1 - k_a CMC) + k_a \cdot S_{free} \cdot TPGS_t \quad \text{Eq(3)} \end{aligned}$$

$TPGS_t$ ：TPGS 的總濃度

所以可利用 S_{total} 對 $TPGS_t$ 作圖，游離態的溶質濃度(S_{free})即為斜率乘上 CMC 再加截距所得的值，其曲線斜率除以游離態的溶質濃度即為 k_a 。

二. 穿皮吸收實驗：

根據 Fick's Law，累積穿透量 (M_t) 可表示為：

$$M_t = A \int_0^t J dt$$

假設實驗進行前膜內不含藥物，於穩定狀態時：

$$M_t = \frac{DAS}{H} \left(t - \frac{H^2}{6D} \right)$$
$$\Rightarrow \frac{M_t}{A} = \frac{DS}{H} \left(t - \frac{H^2}{6D} \right) = J \left(t - \frac{H^2}{6D} \right)$$

S: 膜內藥物的濃度

D: 擴散係數

H: 薄膜厚度

A: 穿透表面積

結果與討論

一. 高效液相層析分析方法之確效試驗結果(validation)

利用螢光在入射波 280nm、出射波 312nm 測量 estradiol 的吸收，減量線以 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 μ g/ml 配製，進行同日內(interday) 及異日內(intraday)的確效試驗評估。同日內的檢量線方程式為 $y=206.9268795058+1506473.912x$ ($r^2=0.9999930105$)，且其精確度及準確度皆在可接受範圍($CV\%=0.19\sim2.48\%$)；異日內的檢量線方程式為 $y=13828.8733264675+1579633.444x$ ($r^2=0.999967402$)，且其精確度及準確度皆在可接受範圍($CV\%=0.19\sim2.40\%$)。(圖 1、2)

二.Estradiol 在不同濃度 TPGS 及酒精中的穿皮吸收結果

把 0.06% estradiol 溶於不含酒精或含 10%酒精的 0%、0.01%、0.1%、1%、5%、10%、15% TPGS 中，96 小時穿皮吸收的結果，皆隨時間的增加穿皮的量也跟著增加，但含酒精的樣品穿皮吸收的量皆比不含酒精的多。

三.溶解度分析結果

Estradiol 在 0.005%、0.01%、0.02%、0.05%、0.1%、0.2%、0.5、1%、2%、5%、10%、15%、20%TPGS 中的溶解度呈 $r^2=0.997$ 的線性關係。由表 1 可看出 estradiol 的溶解量會隨著 TPGS 的量增加而增加，所以可知道 TPGS

會增加 estradiol 的溶解度。而在同樣 TPGS 濃度，不同酒精濃度時，estradiol 的溶解量同樣會因酒精含量增加而增加，所以在所有溶媒處方中，80 % EtOH/200 mg/ml TPGS 的溶媒組合能溶解的 estradiol 量最多。

圖 3 為 estradiol 溶解量對 TPGS 的濃度所作的圖，小圖為 TPGS 濃度較低時 estradiol 溶解情況，箭頭所指的是 TPGS 的 CMC（取其溶解量變化最大（量變多）的那一點），大圖為 TPGS 濃度大於 CMC 時對 estradiol 溶解量的影響，做迴歸線並列出迴歸方程式，由圖可發現有 0 %、10 %、20 % 酒精存在時，estradiol 溶解量和 TPGS 濃度較呈比例關係($r^2=0.999$)，且 TPGS 的 CMC 會隨著酒精濃度增高而提高。estradiol 的溶解在 TPGS 的濃度大於 CMC 之後增加很多，所以可知道 TPGS 是藉由形成微膠體來達到助溶的效果。

假設游離態的 estradiol 不隨 TPGS 濃度之增加而改變，維持為一定值，則把溶解度實驗所得的值代入實驗理論 Eq(3)，所得到的數值列於表 2，結果顯示在同濃度的酒精中，與微膠體結合的 estradiol 濃度 (S_{bound}) 會因 TPGS 濃度增加而變多，而游離態的 estradiol 濃度在同一酒精溶液是一定值，但也隨著酒精量之增加而提高，所以大於微膠體濃度後，溶解度的增加完全來自微膠體的形成，所以隨著微膠體形成越多，estradiol 可

和微膠體結合的量就越多，而溶液中所能溶解的 S_{free} 仍維持一定值。 S_{free} 也會隨酒精含量增加而增加，是因為單純的酒精之助溶效果。但也有可能是 TPGS 的微膠體結構隨著酒精濃度的增加而改變了，讓平衡分布係數 (k_a) 因酒精濃度越高而變小；也有可能是溶媒組合對於 estradiol 的親和力改變，呈現 S_{free} 隨酒精含量增加而增加，又如果 estradiol 對微膠體親和力不變，則平衡分布係數會因而下降。

把 S_{free} 和 k_a 在不同酒精濃度中的變化作成圖 4，可發現酒精的增加可增加游離態 estradiol 濃度，但反而降低游離態與結合態間之平衡分布係數，是否此因為改變微膠體之結構所致，或是改變溶媒組合對 estradiol 之親和力所致，仍有待進一步探討。

四.不同濃度 EtOH/TPGS 溶媒系統對 estradiol 穿皮吸收之影響

圖 5、6 是 estradiol 在不同濃度的 EtOH/TPGS 溶媒系統中的單位面積累積穿透量對時間的圖，隨著時間增加，累積穿透量會越來越多，到最後和時間會呈線性關係，表示穿透已達穩定狀態，而此直線的斜率即為通透量 (J)。

Estradiol 在不同溶媒系統中的通透量 (J) 及延遲時間 (lag time) 作成表

3, 結果顯示 20 % EtOH/0.01 % TPGS 有最高通透量, 而在同酒精濃度中, 隨著 TPGS 濃度增加, 固定量下之 estradiol 的通透量不會隨著增加; 但在相同 TPGS 濃度中 (圖 7), estradiol 的通透量會隨著酒精濃度 (0 %~40 %) 增加而增加, 所以在本實驗中顯示, 對於改善 estradiol 的通透量, 增加酒精濃度比增加 TPGS 濃度來的有效。配合溶解度結果來看, TPGS 雖可增加 estradiol 的溶解度, 但卻不因此而顯著地增加它穿皮吸收的效果。

五. TPGS 是否會穿透皮膚之探討

用維生素 E 當作標準品, 維生素 E-acetate 當作內部標準品, 在 UV 284 nm 時分析, 可分別在約 8 分鐘及 9 分鐘處得到分析波峰 (圖 8), 而 2、5、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的 TPGS 皂化反應後所得的溶液用相同方法分析, 也可在約 8 分鐘得到維生素 E 的分析波峰, 此結果表示利用皂化反應確實可使 TPGS 轉變為維生素 E, 所以可用此方法來分析 TPGS 的含量。把 96 小時後, 15 % TPGS 所穿透過裸鼠皮膚到接受室的樣品溶液拿去分析, 在 8 分鐘附近並沒有出現任何分析波峰, 表示 TPGS 沒有斷裂成維生素 E 穿透過裸鼠皮膚; 而樣品溶液皂化反應後去分析, 結果也沒有維生素 E 存在。綜合以上結果, 顯示 TPGS 幾乎沒有穿透過裸鼠皮膚或是低於可偵測最低

濃度以下 ($<2\text{ }\mu\text{g/ml}$)，也沒有斷裂成維生素 E 穿透過裸鼠皮膚。

参考文献

1. Sator MO, Joura EA, Gloaszewski T, Gruber D, Frigo P, Metka, M, Hommer, A. Huber, JC *British Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1998; 105:100-102.
2. Setnikar I, Rovati LC, Vens-Cappell B, Hilgenstock C, *Arzneimittel-Forschung* 1998; 48:275-285.
3. Hirvonen E, Cacciatore B, Wahlstrom T, Rita H, Wilen-Rosenqvist, G. *British Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1997; 104:26-31.
4. Foidart JM, Beliard A, Hedon B, Ochsenbein E, Bernard AM, Bergeron C, Thomas JL *British Journal of Obstetrics & Gynaecology* 1997; 104:305-310.
5. Priborsky J, Muhlbachova E, *J Pharm Pharmacol* 1990; 42:468-472.
6. Aungst BJ, Rogers NJ, Schefter E, *Int J Pharm* 1986; 33:225-234.
7. Tsuzuki N, Wong O, Higuchi T *Int J Pharm* 1988; 46:19-23.
8. Katayama K, Takahashi O, Matsui R, Morigaki S, Aiba T, Kakemi M, Koizumi T *Chem Pharm Bull* 1992; 40:3108-3109.
9. Chiang CM, Flynn GL, Weiner ND, Szpunar GJ, *Int J Pharm* 1989; 55:229-236.
10. Irwin WI, Sanderson FD, Li Wan Po A *Int J Pharm* 1990; 66:193-200.
11. Megrab NA, Williams AC, Barry BW *Int J Pharm* 1995; 116:101-112.
12. Moghimi HR, Williams AC, Barry BW *Int J Pharm* 1996; 131:117-129.
13. Friberg SE, Kayali I *J Pharm Sci* 1989; 78:639-643.
14. Kayali I, Suhery T, Friberg SE, Simion FA, Rhein LD, *J Pharm Sci* 1991; 80:428-431.
15. Lange-Lieckfeldt R, Lee G, *J Controlled Release* 1992; 20:183-194.
16. Rosen MJ *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 2nd ed., p.107, John Wiley & Sons, New York, 1989.
17. Sokol RJ, Heubi JE, Iannaccone S, Bove KE, Balistreri WF *Gastroenterology*

1983; 85:1172-1182.

18. Sokol RJ *Gastroenology* 1987;111:1172-1182.

19. Kawata et al. U.S. Patent 4,578,391 (1986)

20. Reichert U.S. Patent 4,668,513 (1987)

21. Krasavage WJ, Terhaar CJ, *Agric Food Chem* 1977; 25:273-278.

圖、表

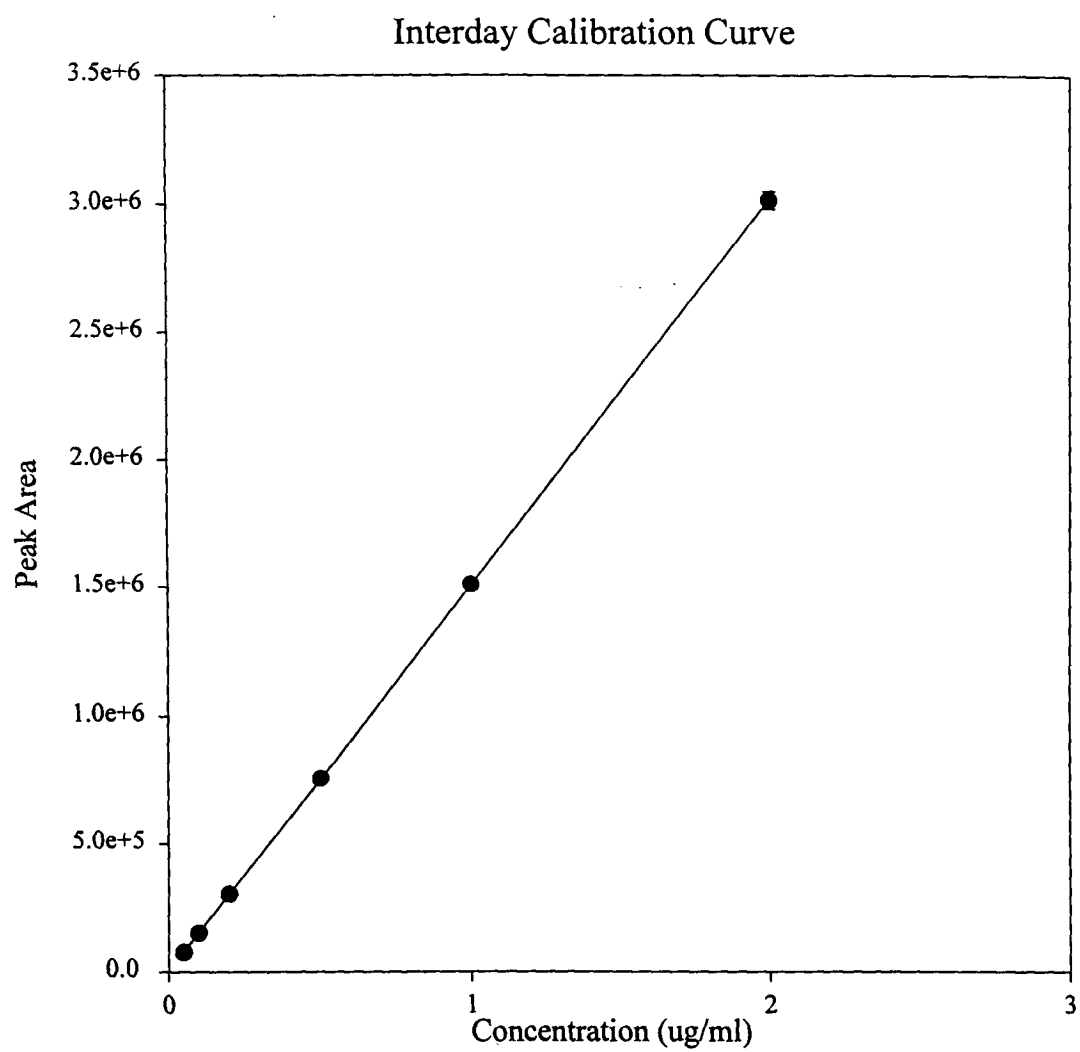


Fig. 1 : The calibration curve of estradiol (Interday)

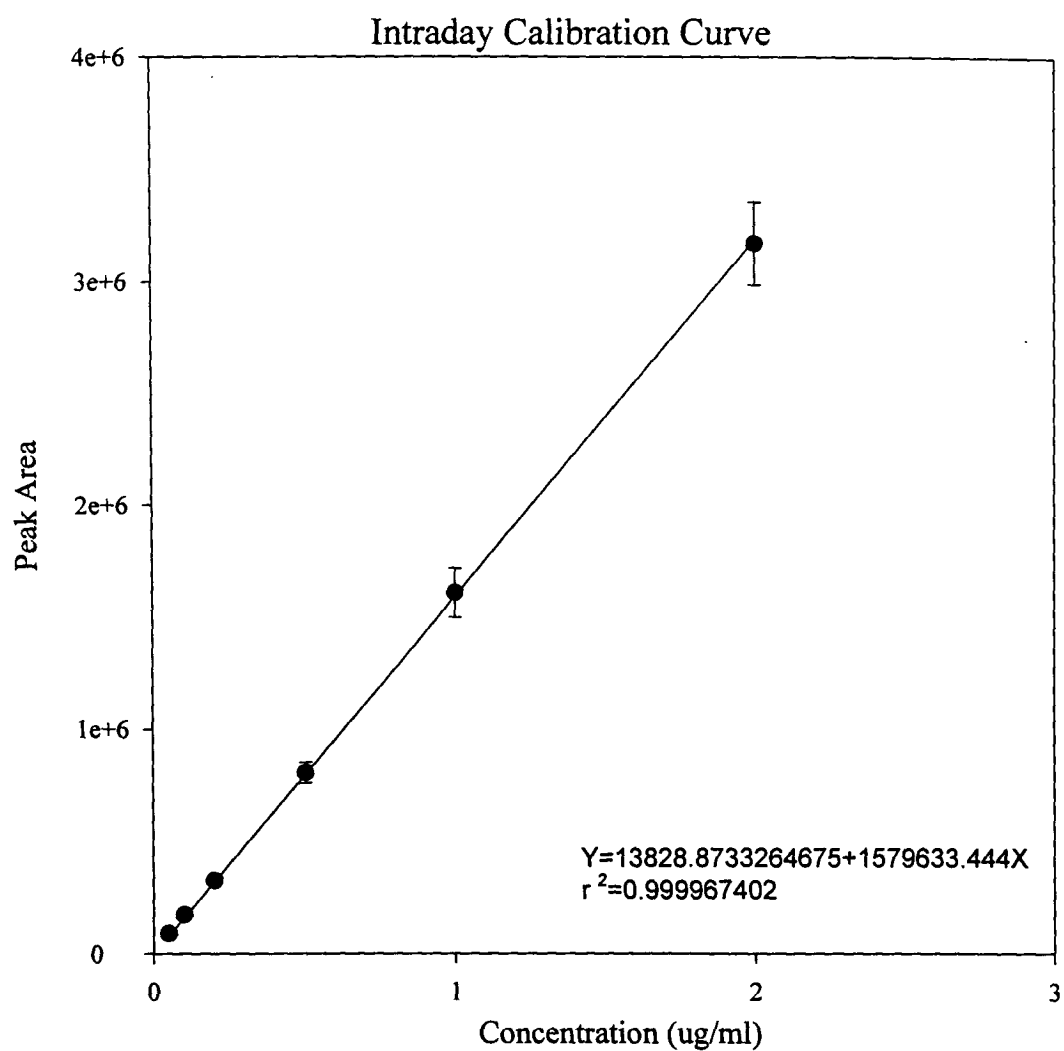


Fig.2 : The calibration curve of estradiol (Intraday)

Table1: The solubility of estradiol of estradiol in EtOH/TPGS cosolvent system

TPGS concentration (mg/ml)	Estradiol solubility (mg/ml)					
	0% alcohol	10% alcohol	20% alcohol	40% alcohol	60% alcohol	80% alcohol
0	0.002±0.000	0.004±0.000	0.012±0.000	0.231±0.074	2.340±0.288	10.887±0.972
0.05	0.002±0.000	0.005±0.000	0.012±0.000	0.254±0.018	2.445±0.161	10.709±0.798
0.1	0.003±0.000	0.005±0.000	0.013±0.001	0.297±0.019	2.794±0.128	9.025±0.526
0.2	0.003±0.000	0.006±0.000	0.015±0.000	0.256±0.060	2.599±0.170	8.724±1.361
0.5	0.005±0.000	0.008±0.001	0.016±0.001	0.253±0.007	2.159±0.175	8.212±0.484
1	0.009±0.000	0.012±0.000	0.020±0.000	0.253±0.007	2.467±0.128	9.601±1.051
2	0.014±0.000	0.020±0.001	0.027±0.001	0.268±0.006	2.546±0.150	10.334±0.064
5	0.034±0.002	0.037±0.000	0.054±0.005	0.276±0.075	2.753±0.036	10.355±0.736
10	0.072±0.001	0.073±0.003	0.116±0.007	0.332±0.109	2.313±0.200	12.487±0.291
20	0.129±0.004	0.117±0.006	0.203±0.007	0.578±0.077	4.034±0.111	13.487±1.109
50	0.295±0.006	0.287±0.012	0.347±0.004	0.740±0.085	4.002±0.716	12.870±1.067
100	0.576±0.045	0.594±0.012	0.701±0.015	1.662±0.162	5.512±0.363	23.253±1.555
150	0.872±0.034	0.866±0.013	1.059±0.052	2.762±0.115	7.630±0.136	27.531±0.988
200	1.136±0.022	1.225±0.067	1.451±0.135	5.096±1.835	8.149±1.347	34.447±4.623

Fig.3 The solubility of estradiol in EtOH/TPGS cosolvent system. The data point and error bars represent the means $\pm$ S.D. of three replicates.

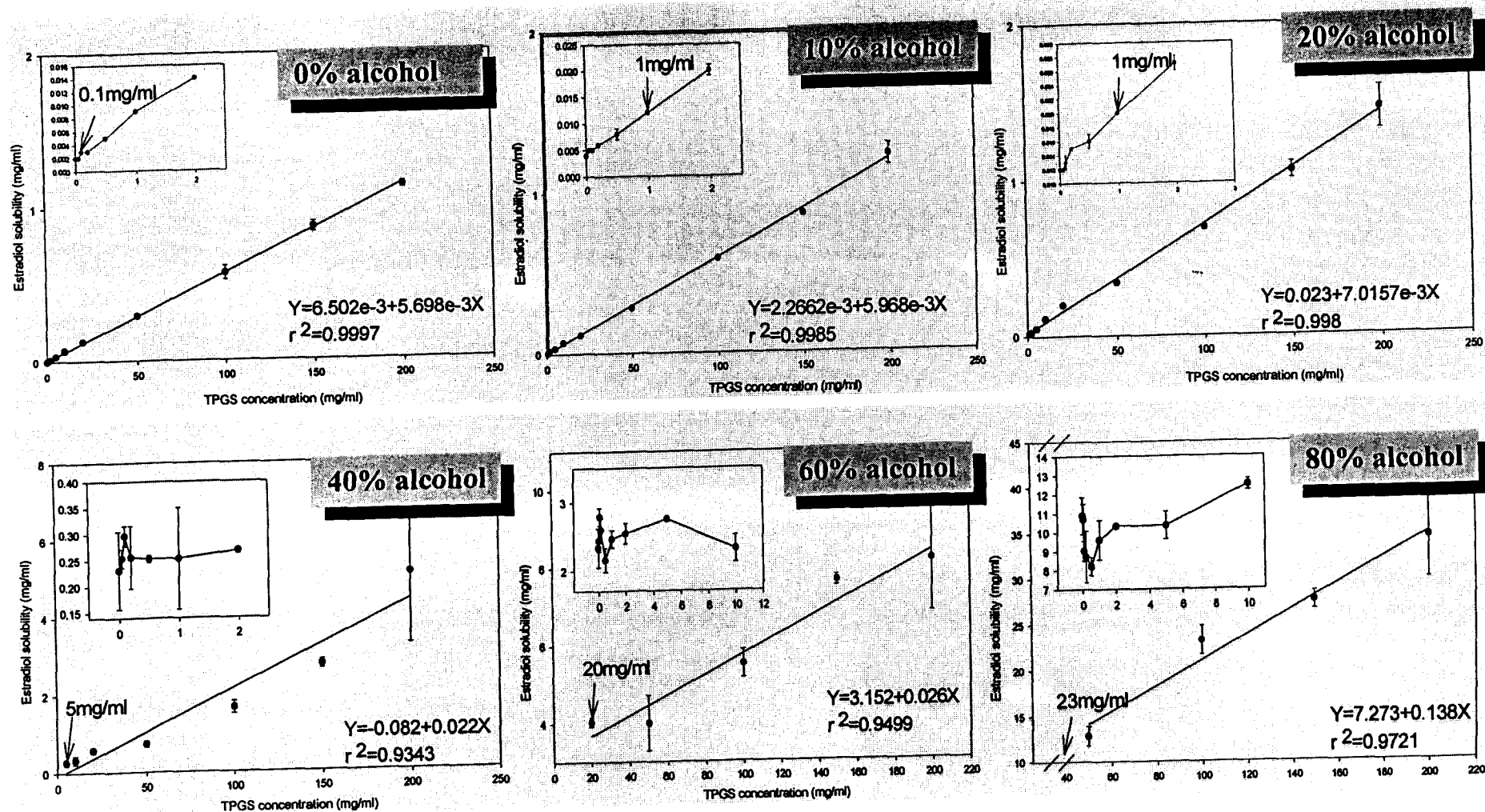


Table 2: CMC of TPGS, S_{bound} , S_{free} and K_a of estradiol in different EtOH/TPGS cosolvent system

Alcohol concentration (v/v%)	TPGS CMC (mg/ml)	S_{bound} (mg/ml)							S_{free} (mg/ml)	k_a (mg/ml) ⁻¹
		TPGS concentration (w/v%)								
		0	0.01	0.1	1	5	10	15		
0	0.1	0	-	0.0019	0.0649	0.2879	0.5689	0.8649	0.0071	0.8028
10	1	0	0	0.0037	0.0647	0.2787	0.5857	0.8577	0.0083	0.7229
20	1	0	0	-	0.0864	0.3174	0.6714	1.0294	0.0296	0.2365
40	5	0	0	0	0.1375	0.5455	1.4675	2.5675	0.1945	0.1157
60	20	0	0	0	0	0.3281	1.8381	3.9561	3.6739	0.0071
80	23	0	0	0	0	2.3873	12.7703	17.0483	10.4827	0.0132

Fig.4 The influence of different alcohol concentration on the free form concentration of solubilized estradiol and equilibrium distribution coefficient in EtOH/TPGS cosolvent system.

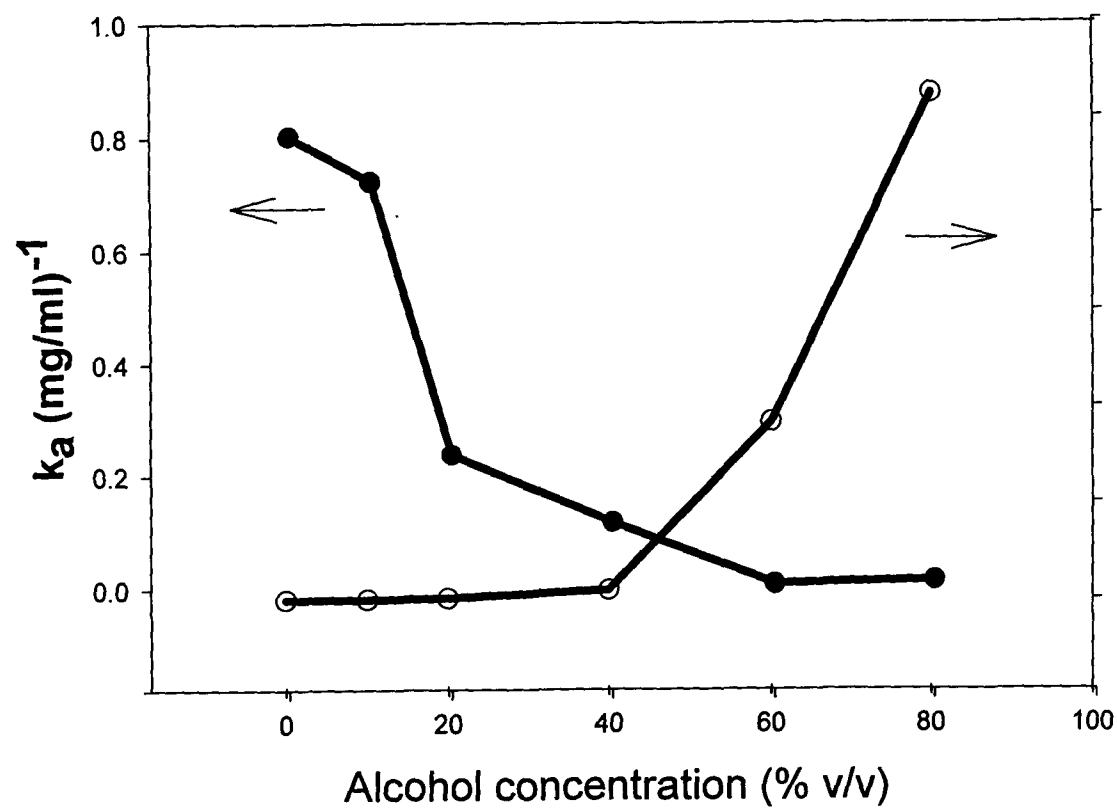


Fig. 5: The effect of EtOH/TPGS cosolvent system on the in vitro transport of estradiol through nude mouse skin (0% , 10% and 20% alcohol)

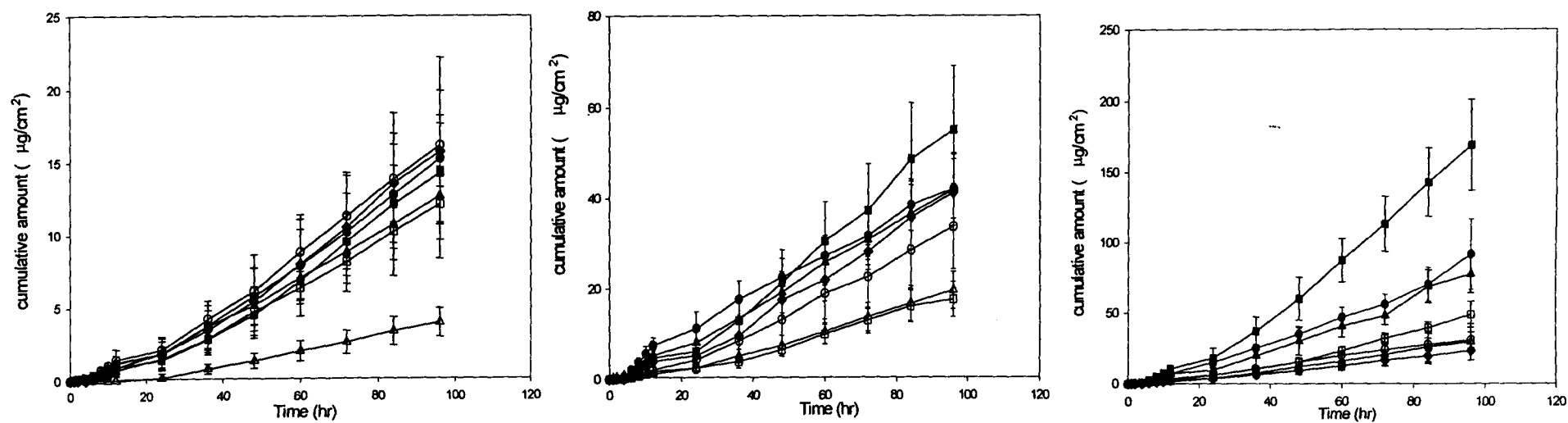


Fig. 6: The effect of EtOH/TPGS cosolvent system on the in vitro transport of estradiol through nude mouse skin (40% , 60% and 80% alcohol)

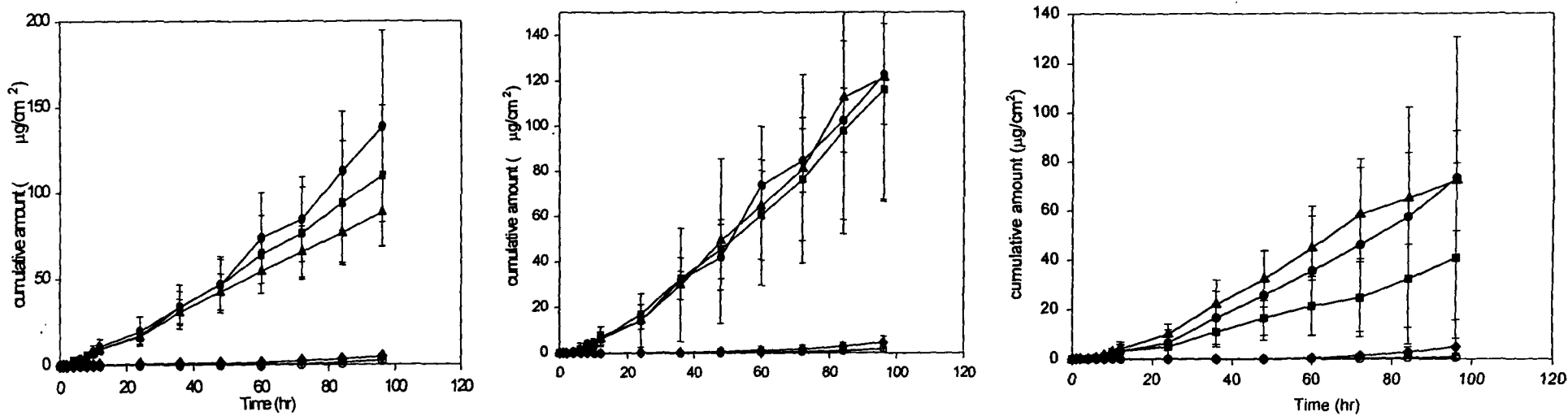


Table 3: Flux and lag time of estradiol

TPGS concentration (w/v%)	0% Alcohol		10% Alcohol		20% Alcohol	
	Flux±S.D. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	Lag time (hr)	Flux±S.D. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	Lag time (hr)	Flux±S.D. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	Lag time (hr)
0	0.211±0.002	23.924	0.471±0.057	3.040	1.484±0.166	35.049
0.01	0.207±0.004	26.193	0.698±0.018	16.613	2.279±0.025	21.803
0.11	0.161±0.002	17.410	0.453±0.008	3.430	0.951±0.051	15.995
1	0.219±0.005	23.406	0.547±0.024	20.013	0.283±0.010	14.537
5	0.205±0.003	16.756	0.463±0.017	23.009	0.338±0.013	3.112
10	0.162±0.003	20.864	0.240±0.011	19.425	0.696±0.012	26.543
15	0.055±0.001	23.782	0.243±0.002	15.449	0.362±0.010	15.008

TPGS concentration (w/v %)	40% Alcohol		60% Alcohol		80% Alcohol	
	Flux±S.D. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	Lag time (hr)	Flux±S.D. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	Lag time (hr)	Flux±S.D. ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr}$)	Lag time (hr)
(0)	2.261±0.062	34.535	1.587±0.061	18.934	0.899±0.036	18.492
(0.01)	1.408±0.051	17.712	1.570±0.060	22.169	0.669±0.027	35.230
(0.1)	0.963±0.006	4.195	1.544±0.072	16.245	0.573±0.020	29.646
(1)	0.089±0.006	45.157	0.118±0.014	59.119	0.124±0.015	59.298
(5)	0.092±0.012	68.130	0.048±0.009	63.167	0.019±0.001	54.579

Fig. 7 The flux of EtOH/TPGS cosolvent system on the in vitro transport of estradiol through nude mouse skin

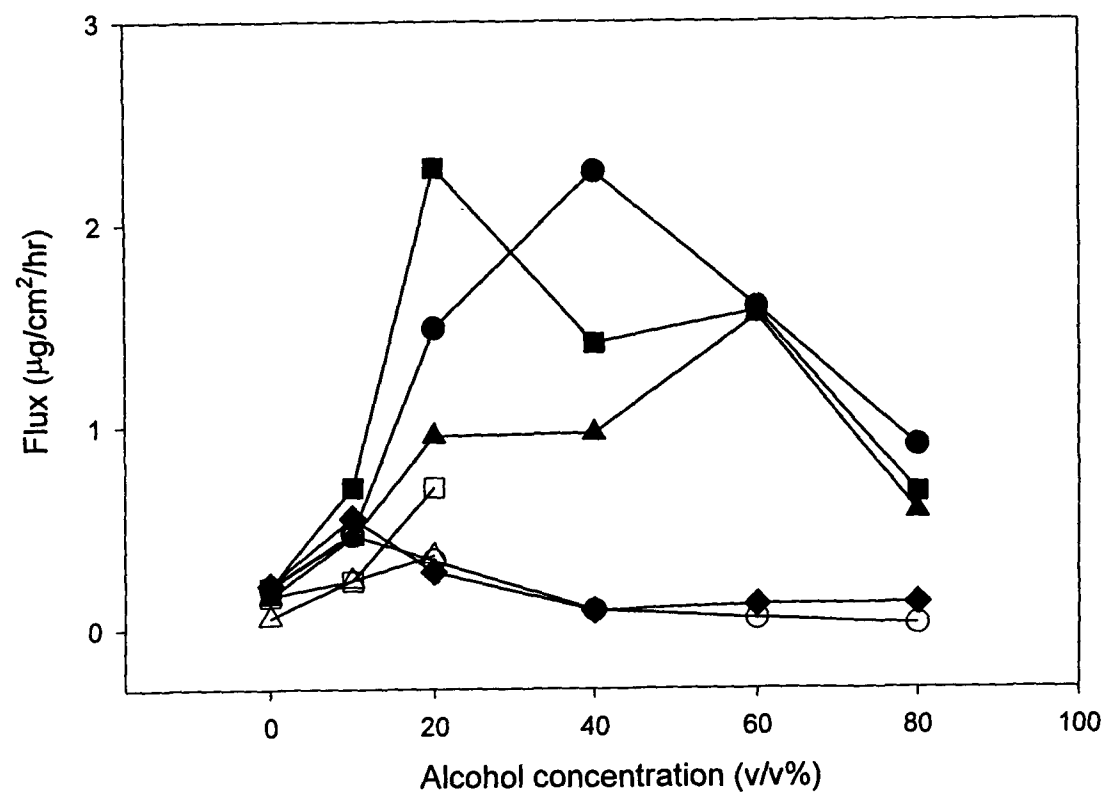


Fig. 8 Chromatogram of 1) vitamin E 2) vitamin E acetate

