



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103308564 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 18

(21) 申请号 201310217709. 2

(22) 申请日 2013. 06. 03

(71) 申请人 拉芳家化股份有限公司

地址 515000 广东省汕头市龙湖区万吉工业
区龙江路 13 号

(72) 发明人 谷志静 洪盛杰 陈贤鹰 赵文忠

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 温旭

(51) Int. Cl.

G01N 27/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种化妆品活性成分经皮吸收效率的检测方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种用于体外评估化妆品活性成分经皮吸收率的高通量方法。该方法包括以下步骤: 组装高通量扩散池、制备样品及加样、测定样品池电导率、数据统计分析。所述高通量扩散池是将 2 块面积为 $(3-5\text{cm}) \times (3-5\text{cm})$, 厚 1-1.2cm 规格的聚四氟乙烯涂层筛孔板分别作为顶板和底板, 中间夹层为仿生皮肤或者猪皮, 四角由螺栓固定组成三明治结构; 所述筛孔板上有 24-100 个均一排列的、直径为 3-10mm 的孔, 分别作为供体池和受体池。本发明将 Franz 扩散池的单室扩增到 24-100 个单室, 其效率提高 24-100 倍; 以电导率代替渗透率, 还可以大大缩短检测时间, 进一步提高检测效率 12 倍以上。

1. 一种化妆品活性成分经皮吸收效率的检测方法,按以下步骤进行:

(1)组装高通量扩散池

将 2 块面积为 3-5cm×3-5cm,厚 1-1.2cm 的聚四氟乙烯涂层筛孔板分别作为顶板和底板,中间夹层为仿生皮肤或者猪皮,四角用螺栓固定组成三明治结构;所述两块筛孔板上各有 24-100 个排列均匀且对应的、直径为 3-10mm 的通孔,分别作为供体池和受体池;

(2)制备样品及加样;

a 配制检测样品

b 活性成分-促渗剂组合物样品

所述活性成分和促渗剂组合物是将活性成分和促渗剂分别按照一定浓度和比例溶于 PBS-乙醇溶剂,活性成分质量体积浓度为 100~250mg/ml,促渗剂的总质量百分比浓度为 0%-5%;所述的活性成分为极性化合物,分子量为 1-10kD,所述 PBS-乙醇溶剂中 PBS:乙醇=1:0~2:3;

按照供体池孔径大小,每个供体池加入 60-800 μ l 样品,以不加促渗剂的活性成分溶液作为空白对照,每个样品 3-5 个重复;底板的受体池加满 PBS-乙醇溶剂;

(3)电导率测定;

每个供体池通过皮肤的电流由 2 个金属电极测定,一个电极插进皮肤中心位置的真皮层或表皮层作为公用电极,另外一个电极则按序排放在供体池中;通过万用表测量其电流,电压和频率设置为 100-145mV,100Hz;测定 2~24h 的电导率读数;

(4)数据统计分析

将电导率读数用统计学软件 spss 进行方差分析:P<0.05 为差异显著,P<0.01 为差异极显著;

a. 分析不同化妆品配方中某一活性成分的经皮吸收效率差异,P<0.05 则判定活性成分为显著吸收,配方有效;

b. 分析促渗剂或促渗剂组合的促渗效果和协同作用关系,P<0.05 则判定促渗剂或促渗剂组合显著促进吸收,促渗剂或组合有效。

一种化妆品活性成分经皮吸收效率的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,涉及一种化妆品活性成分经皮吸收效率的检测方法,特别涉及一种促渗剂及组合的高通量筛选方法。

背景技术

[0002] 在化妆品科学领域,营养、保湿、抗衰老、美白等功效化妆品的开发是满足人们对美的更高层次的诉求;但简单原料的添加不一定能发挥活性成分的作用,还可能滋生细菌引起皮肤的感染等负面效果。因此,功效化妆品的研发还要重视化妆品的经皮吸收现象,合理的评价活性成分对作用部位的靶向性、有效浓度及持续时间。化妆品的经皮吸收指其有效成分通过表皮角质层,达到不同作用皮肤层发挥各种作用的过程;与药物“经皮吸收”的主要区别在于化妆品功能性成分是以经皮渗透后积聚作用在皮肤表面、表皮层或真皮层为最终目的;而药物经皮吸收则是以进入血液循环系统,遍布脏腑器官为最终目的。例如,防晒产品中的美白剂常作用于表皮中的基底层,阻断黑色素;而抗衰老产品的活性成分则常作用于真皮层的成纤维细胞,使皮肤富有弹性。

[0003] 经皮吸收的主要途径有角质层、毛囊和汗腺;一般认为经皮渗透的主要屏障来自角质层。就化妆品配方设计本身来说,添加化学促渗剂是至今应用最普遍的促渗透方法,不仅可逆地改变皮肤角质层屏障作用,且不损伤任何细胞。通常化学促渗剂或者有利于促进水溶性活性成分吸收,或者有利于促进亲脂性活性成分的吸收,或者有利于促进活性成分透过真皮层进入循环系统,或者有利于促进活性成分透过角质层进入皮层,需要结合活性成分自身性质和靶向位点筛选合适的促渗剂和配方。

[0004] 但化妆品经皮吸收基础理论及检测行业中还是沿用医药的理论及检测方法,缺少统一的化妆品的经皮吸收检测方法及评价标准。选用与人皮肤相似的猪耳皮肤、仿生皮肤,建立体外渗透模型是药物和化妆品经皮吸收检测都适用的方法。目前实验室最常用的体外法是Franz扩散池法。其具体操作方法如下:将活性物或配方涂布于离体皮肤角质层面,皮肤样本固定于扩散池的上方,皮肤角质层面向上,底面与接收池中液体接触,定时提取接收液,分析测定活性物含量以表征吸收效率。Franz扩散池法的准确性依赖于活性成分经皮传输的稳定状态,虽然能够定量分析经皮吸收率,但不适于大量检测。因为Franz扩散池法所需皮肤的面积较大(直径16mm),需要分别单次收集和样品,操作繁琐、工作量大;再者达到传输稳定状态耗时较长,整个检测的周期需24h以上,严重影响了促渗透配方的开发效率。

[0005] 鉴于以上经皮吸收检测方法在化妆品配方开发中应用的严重缺陷,根据化妆品活性成分和药物的作用靶点的差异性,本发明设计一种高通量筛选化妆品配方或促渗剂的经皮吸收实验方法。

[0006] 本发明的基本原理:促进经皮吸收的化学渗透剂引起溶质在皮肤上的渗透效率改变的同时引起皮肤电导率改变,电导率和渗透率的相关性遵循Nernst-Planck和Nernst-Einsten方程,即渗透率与皮肤电导率呈正相关。因此,电导率测定提供了一种检测

溶质,优选极性溶质,渗透效率的快速方法。本发明将电导仪的一个电极定位于化妆品活性成分作用靶点真皮层或表皮层,采用合适的高通量装置,将 Franz 扩散池法改进为适用于化妆品的高通量、高效率的经皮吸收评价方法。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种用于体外评估化妆品活性成分经皮吸收率的高通量方法。

[0008] 本发明的检测方法包括组装高通量扩散池、制备样品及加样、测定样品池电导率、数据统计分析 4 步。

[0009] 所述高通量扩散池由 2 块规格相同(3-5cm) × (3-5cm)大小,厚 1-1.2cm 的聚四氟乙烯涂层筛孔板,分别作为顶板和底板;顶板和底板上各有 24-100 个排列均匀且对应的直径为 3-10mm 的通孔,分别作为供体池和受体池;中间夹层为仿生皮肤或者猪皮组成的三明治结构。实验所用皮肤从 -70℃取出室温融化,测定电阻率保证其完整性,然后将其角质层朝上面向顶板放置,两板由 4 个螺栓扣拧紧固定。

[0010] 所述活性成分和促渗剂组合物是将活性成分和促渗剂分别按照一定浓度和比例溶于 PBS-乙醇溶剂,活性成分体积质量浓度为 100-250mg/ml,而促渗剂的总质量百分比浓度为 0%-5%;所述活性成分为极性化合物,分子量为 1-10kD;所述 PBS-乙醇溶剂中 PBS : 乙醇 = 1 : 0 ~ 2 : 3。加样要求如下:按照顶板的供体池孔径大小,每个供体池加 60-800 μl 活性成分-促渗剂组合物样品或配方样品,每个样品做 3-5 个平行处理,以不加促渗剂的样品或已知渗透速率的化合物作为对照;底板的受体池加满 PBS-乙醇溶剂。

[0011] 每个样品池中通过皮肤的电流由 2 个金属电极测定,一个电极插进皮肤真皮层或表皮层作为公用电极,另外一个电极则按序排放在供体池中。经信号波形转换器进行交流电电频信号转换,最终通过万用表显示读数,其精确度达 0.01 微安。波形器的电压和频率设置可根据信号强弱,优选 100-145mV,100Hz;放置于恒温恒湿环境,电导率读数可在不同间隔时间记录,如分别取 0h、2h、4h、8h、16h 和 24h 的读数。

[0012] 数据统计分析

[0013] 将电导率读数用统计学软件 spss 进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。本发明所提供的检测方法可以用来筛选活性成分经皮吸收效果较好的配方组合物;筛选对极性活性成分有效的新型促渗剂;确定促渗剂的适宜浓度;分析不同促渗剂组合和配比的协同作用。

[0014] 对同一时间点,同一活性成分与不同促渗剂的组合物样品电导率读数 E_s 进行统计,与不加促渗剂的对照池的电导率 E_0 之比值作为电导率增强指数 ER ,用以表征活性成分的吸收率;以相同处理的渗透率增强指数 PR 进行对比验证。

[0015] 对不同时间点的电导率读数进行统计,对比不同测定时间的电导率增强指数的规律性,确定合适检测时间。

[0016] 发明的有益效果

[0017] 本发明成功地解决了化妆品经皮吸收检测技术的瓶颈因素,将 Franz 扩散池由单室扩增至 24-100 个单室,其效率提高 24-100 倍。通过定量检测接收池溶质含量的传统方法,需 24-48h 的扩散才能有效检测;而电导率增强的信号通常是在相对较短的时间 2-4h 内

发生。所以本发明的优势还在于可以大大缩短检测时间,进一步提高检测效率 12 倍以上。此外,电导率检测方法将活性物的靶向位点定位在皮肤的表皮层或者真皮层,更符合化妆品开发的要求;且不需要通过同位素标记活性成分作为检测指标,也大大提高了实验的安全性和可操作性。

附图说明

- [0018] 图 1 为高通量扩散池及电导率检测装置侧视图;
 [0019] 图 2 为筛孔板顶视图;
 [0020] 图 3 表示电导率增强指数与渗透率增强指数的正相关性;
 [0021] 图 4 表示电导率的有效测定时间。
 [0022] 图中标示说明:1 螺栓,2 供体池,3 电极,4 皮肤,5 受体池,6PBS-乙醇,7 公用电极。

具体实施方式

- [0023] 实施例 1 菊糖经皮吸收的电导率与渗透率相关性分析
 [0024] 1.1 实验材料与试剂
 [0025] 试剂:菊糖(CAS 登录号:9005-80-5),终浓度 100mg/ml;溶剂为 PBS 缓冲液与等体积的乙醇混合;促渗剂及促渗剂组合浓度(w/w)和配比见下表:
 [0026] 表 1 促渗剂及组合的浓度和配比
 [0027]

促渗剂	缩写	CAS	浓度 /%	促渗剂组 合	浓度 /%	配比
月桂基氯化吡啶	DPC	104-74-5	2.0	SLS+DPC	2.0	1:1
月桂基磺酸钠	SLS	151-21-3	2.0	SLS+DPC	2.0	1:3
吐温-20	T20	9005-64-5	—	T20+MEN	4.0	1:1
薄荷脑	MEN	89-78-1	—	T20+MEN	4.0	1:3
曲拉通-X100	TR	9002-93-1	—	SLS+TR	4.0	1:9

[0028] 仪器:波形转化器(Agilent33120A, PaloAlto, California);万用表(Fluke189, Everett, Washington);多功能微孔板检测仪(BioTek Synergy™ H4);恒温水浴箱;微量移液器;Ag/AgCl 电极(Invivo Metrics, Healdsburg, CA, USA)。

[0029] 1.2 操作步骤

[0030] 1.2.1 扩散池的组装

[0031] 将 2 块 3cm×3cm,厚 1.2cm 的特氟龙涂层筛孔板分别作为顶板和底板,每板共 36 个直径为 4mm 的单室。将实验所用猪皮从 -70℃ 冷冻室取出室温融化 2h,选用 0.1KHz、0.2V 电流电压条件,PBS 溶液中测定电阻大于 20KΩ cm² 的无渗漏猪皮,将其角质层面向顶板放置,四角螺栓拧紧固定。

[0032] 1.2.2 活性成分-促渗剂组合物样品制备及加样

[0033] 10g 菊糖溶于 PBS: 乙醇 =1:1 溶剂定容至 100ml 配成 10%(w/v) 菊糖溶液;每个供体池加 30 μ l, 将表 1 中促渗剂溶于 PBS: 乙醇 =1:1 溶剂分别配成 2% (w/w)和 4% (w/w)浓度溶液, 每个供体池加 30 μ l, 至 SLS 和 DPC 及其组合的终浓度为 1%, T20+MEN 组合、SLS+TR 组合的终浓度为 2%;对照池加入 30 μ l PBS: 乙醇 =1:1 溶剂;每个样品 4 个重复。

[0034] 1.2.3 电导率与渗透率的测定

[0035] 加入样品后, 将扩散池整体放置于恒温水浴箱, 设置温度为 37 $^{\circ}$ C 恒温, 每个供体池依序插入 1 个金属电极, 真皮层插入 1 个电极作为公用电极。扩散池和电导率检测装置如图 1 和图 2 所示。波形器的电压和频率设置 100mV, 100Hz; 37 $^{\circ}$ C 恒温静置 24h, 在 0h、2h、4h、8h、16h 和 24h 各时间点记录加促渗剂的供体池的电导率 E_s , 不加促渗剂的供体池的电导率 E_0 , 电导率的增强指数 $ER=E_s/E_0$ 。

[0036] 微量蒽酮法测定受体池菊糖含量即经皮传输量, 扩散 24h, 微量移液器吸取受体池内 1-2 μ l 样品, 加入 96 孔板, 再加蒽酮-浓硫酸溶液 200 μ l, 685nm 波长读数, 根据 OD685- 菊糖浓度标准曲线换算检测样品的含量, 记录加促渗剂样品的渗透率为 P_s , 而不加促渗剂的对照的渗透率为 P_0 , 则渗透率的增强指数 $PR=P_s/P_0$ 。

[0037] 1.2.4 电导率与渗透率的相关性分析

[0038] 以 24h 测定的 ER 为横坐标, 以 PR 为纵坐标绘制散点图, 如图 3 所示。添加趋势线, 并计算 PR 与 ER 的相关系数 R^2 。 $R^2>0.8$ 表明电导率增强指数与渗透率增强指数具有较好的正相关性, 即同样实验条件下, 电导率可以代替菊糖的经皮传输率来表征不同促渗剂及组合的促渗效果。

[0039] 实施例 2 电导率有效测定时间的选择

[0040] 实验材料与试剂及操作步骤与同实施例 1。

[0041] 选择总浓度为 1% 的 SLS+DPC 组合, 按照 0:1、1:3、1:1 和 1:0 配比的 4 个样品, 分别在 0h、2h、4h、8h、16h 和 24h 测定电导率增强指数 ER 。如图 4 所示, 2h、4h、8h、16h 和 24h 检测均可以体现 4 个样品中菊糖的经皮传输量的差异, 即在 2-24h 检测, 均可以表征促渗剂及组合的促渗效果。

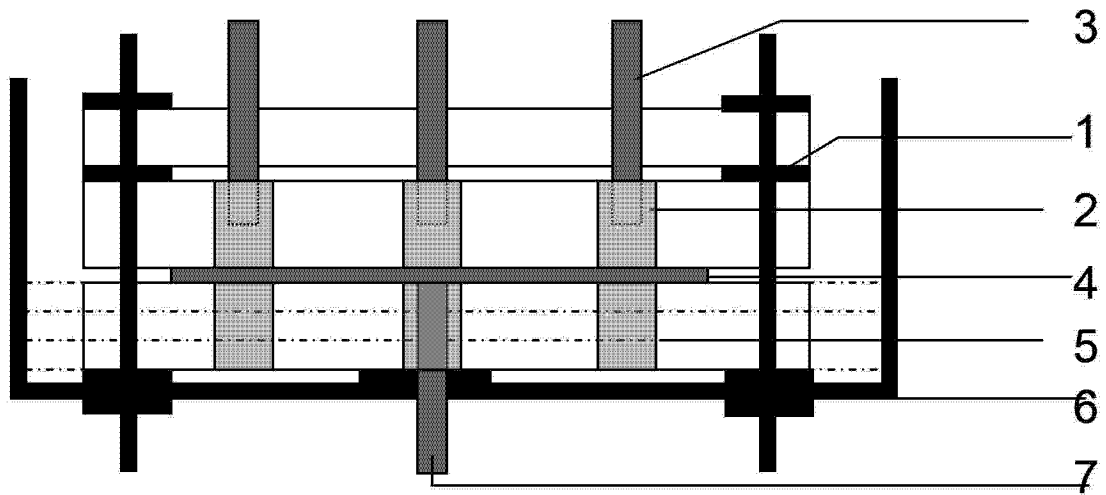


图 1

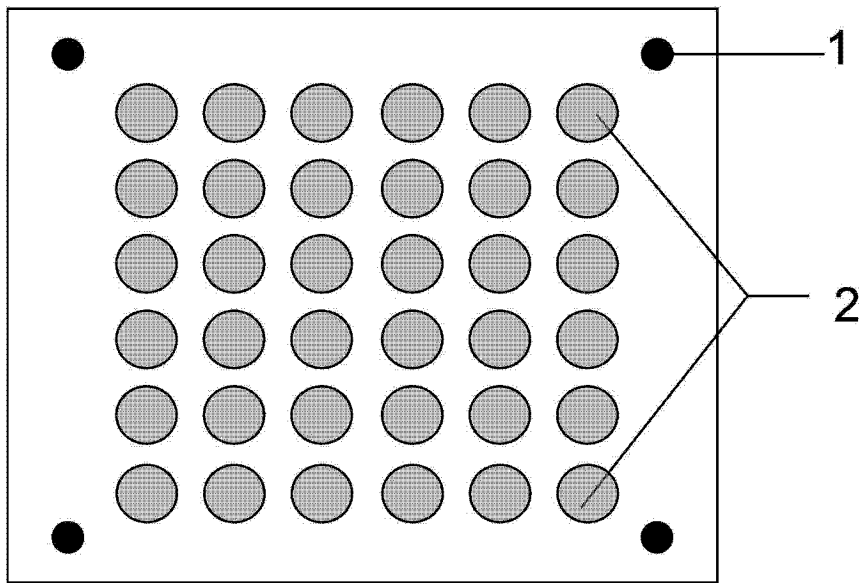


图 2

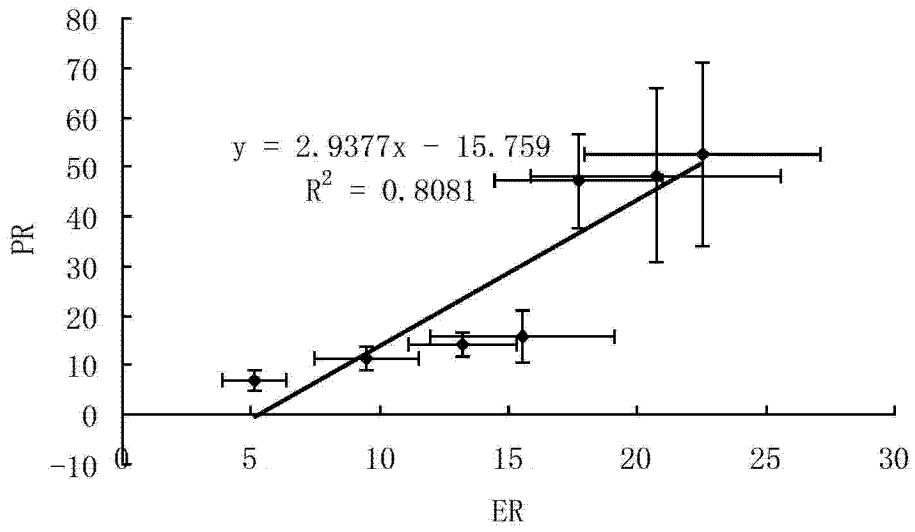


图 3

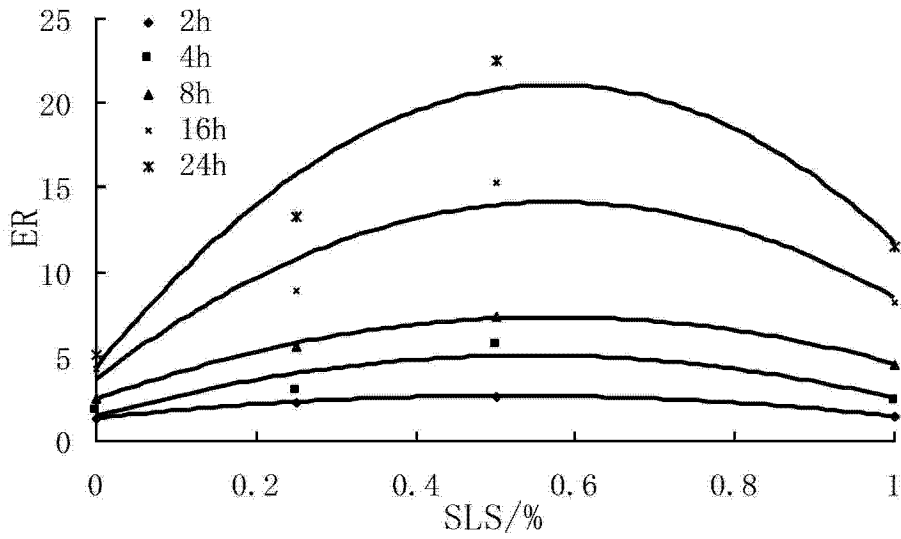


图 4