

马钱子碱双层聚合物可溶性微针的制备及其在不同载药方式下的体外经皮渗透性研究[△]

汪云霞^{1*}, 宋信莉^{1#}, 陈欢欢¹, 陈振龙¹, 刘文²(1. 贵州中医药大学药学院, 贵阳 550025; 2. 贵州医科大学附属医院党办, 贵阳 550004)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)17-2112-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.17.12

摘要 目的:制备马钱子碱(Bru)双层聚合物可溶性微针,并考察其在不同载药方式下的体外经皮渗透特性。方法:以微针揭膜难易程度、阵列完整性、气泡量、针型、针尖硬度、背衬韧性等为考察指标分别筛选微针的针尖材料和背衬材料,并以微针形态为考察指标筛选基质溶胀方法和干燥方法,然后采用两步法制备双层聚合物可溶性微针,并进行表征和安全性评价。通过Franz扩散池法考察针尖载药、背衬载药、全载药Bru双层聚合物可溶性微针的体外经皮渗透特性,绘制体外透皮曲线并计算累积渗透量(Q)和累积渗透率。结果:优选的双层聚合物可溶性微针的制备工艺为以硫酸软骨素-聚乙烯吡咯烷酮K30(1:1, m/m)作为针尖材料,15%聚乙烯醇作为背衬材料,在4℃冰箱静置1h进行基质溶胀,干燥器室温干燥24h。所制微针阵列完整,机械性能良好,能成功刺穿铝箔和大鼠皮肤,微针处理后皮肤在6h内即可恢复到原来的状态。体外透皮试验结果显示,微针递药可大大提高Bru的经皮累积渗透量,针尖材料可在10min内溶解并释放药物;针尖载药微针在8h内基本释放完全, Q_{8h} 为102.185 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,累积渗透率达到94.05%;背衬载药、全载药微针在8h内的药物累积渗透率均超过50%,48h药物累积渗透率均超过90%, Q_{48h} 分别为840.77、1156.73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,显示出缓释特性。结论:成功制备了针尖层硬、背衬层软的Bru双层聚合物可溶性微针,通过全载药的方式可实现药物的有效经皮递送并达到缓释效果。

关键词 马钱子碱;双层聚合物;可溶性微针;制备工艺;经皮递药

Study on the Preparation of Brucine Bilayer Polymer Soluble Microneedle and Its *in vitro* Transdermal Permeability under Different Drug Loading Modes

WANG Yunxia¹, SONG Xinli¹, CHEN Huanhuan¹, CHEN Zhenlong¹, LIU Wen²(1. School of Pharmacy, Guizhou University of TCM, Guiyang 550025, China; 2. Party Office, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare Brucine (shorted for "Bru") bilayer polymer soluble microneedles, and to investigate their *in vitro* transdermal permeation characteristics under different drug loading modes. METHODS: Taking the degree of difficulty of microneedle film uncovering, array integrity, bubble amount, needle shape, tip hardness and backing toughness as the indexes, tip and backing materials were screened. The swelling method and drying method of matrix were screened using the morphology of microneedles as index. The double-layer polymer soluble microneedle was prepared by two-step method, then it was characterized and evaluated in the safety. The *in vitro* transdermal permeation characteristics of tip-loaded, backing-loaded and full-loaded Bru bilayer polymer soluble microneedles were investigated by Franz diffusion cell. The *in vitro* skin penetration curve was drawn, and the cumulative permeability amount (Q) and cumulative permeability rate were calculated. RESULTS: The optimal preparation technology of bilayer polymer soluble microneedles included chondroitin sulfate (CS) and polyvinylpyrrolidone K30 (PVP K30) (1:1, m/m) as tip materials, 15% polyvinyl alcohol (PVA) as backing material, matrix swelling in the refrigerator at 4℃ for 1h, and drying at room temperature for 24h in dryer. Prepared microneedle array was complete and had good mechanical

[△] 基金项目:贵州省科技厅2017年度学术新苗培养及创新探索专项项目(No.黔科合平台人才[2017]5735号-26);贵州省教育厅普通高等职业院校科技拔尖人才支持计划(No.黔教教KY字[2017]074);贵州省一流专业(中药学)建设项目子课题(No.黔高教发[2017]158号-02-32号);贵州省国内一流建设学科项目(中药学)(No.GNYL[2017]008号);国家中医药管理局邱德文全国名老中医药专家传承工作室建设项目

* 硕士研究生。研究方向:中药新技术与新制剂。E-mail: 317081060@qq.com

通信作者:副教授,硕士生导师,硕士。研究方向:中药新技术与新制剂。E-mail:392347047@qq.com

properties, and could successfully puncture aluminum foil and rat skin. After microneedle treatment, the skin could return to its original state within 6h. The results of *in vitro* transdermal test showed that microneedle drug delivery could greatly increase the cumulative transdermal permeability amount of Bru, and the tip material could dissolve and release the drug within 10min; the tip-loaded microneedle was basically released within 8h, Q_{8h} was 102.185 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ and the cumulative permeability rate reached 94.05%; the drug cumulative permeability rate of backing-loaded and full-loaded microneedles exceeded 50% within 8h and exceeded 90% within 48h; Q_{48h}

were 840.77 and 1 156.73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, showing sustained-release characteristics. CONCLUSIONS: Bru bilayer polymer soluble microneedles with hard tip and tough backing material are successfully prepared to achieve effective transdermal delivery and sustained release through full-loaded mode.

KEYWORDS Brucine; Bilayer polymer; Soluble microneedle; Preparation technology; Transdermal drug delivery

马钱子碱(Brucine,简称“Bru”)是从马钱科植物马钱(*Strychnos nux-vomica* L.)的干燥成熟种子中提取的一种生物碱类成分,是马钱子发挥药效的主要成分,但同时也是其主要毒性成分^[1]。Bru具有抗炎、镇痛、抗肿瘤及增强机体免疫力等作用,在治疗类风湿性关节炎方面受到了广泛关注^[2-4]。但其存在溶解度差、半衰期短、生物利用度低等缺点^[5-6],制约了其临床应用。制成经皮给药制剂能够利于Bru局部起效,降低进入循环系统的药物浓度,从而降低毒性,并可以维持平稳的血药浓度,从而提高其生物利用度^[7-8]。但是,如何使药物能够透过皮肤,特别是透过角质层,是经皮给药能否起效的关键。

微针作为一种新型经皮递药技术,能突破皮肤角质层的屏障作用,提供一种将药物输送到皮肤的微创途径,而不考虑成分的分子量和极性^[9-10]。其主要分为固体微针、涂层微针、空心微针和可溶性微针4种^[11-13]。其中,可溶性微针是由可生物降解材料与药物混合制备而成,针体刺入皮肤后,针体高分子材料溶解于少量组织液中,药物随着针体融化而释放,而微针材料也会在体内自行降解,不会对人体造成危害,是透皮递送药物中使用最广泛的微针^[14-15]。

目前,国内外研究制备的微针多是针尖载药,其载药量低,无法长时间持续释放药物;同时,单一材料制备的微针存在难以使含药针体滞留在皮内实现缓释、控释的问题^[16]。因此,本研究以Bru为模型药物,对常用的具有高度生物相容性、可降解性的韧性或脆性高分子材料进行考察,筛选出性能较优的不同材料,制备针尖层硬、背衬层软的Bru双层聚合物可溶性微针,并通过Franz扩散池法考察不同载药方式(针尖载药、背衬载药、全载药)Bru双层聚合物可溶性微针的体外经皮渗透特性,为Bru和此类经皮递药技术的开发利用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

微针模具(台州薇凯生物科技有限公司);KQ-500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AUY220型万分之一分析天平(日本Shimadzu公司);AE/240型十万分子一电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];TD5A-120型台式低速离心机(常州金坛良友仪器有限公司);DZF-6050型真空干燥箱(上海齐欣科学仪器有限公司);101-3AB型电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);SIPTOP型光学显微镜(宁波舜宇仪器有限公司);SU8100型扫描电子显

微镜(日本Hitachi公司);1260型高效液相色谱(HPLC)仪(美国Agilent公司);RYJ-12B型药物透皮扩散试验仪(上海黄海药检仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

马钱子碱对照品(北京中科质检生物技术有限公司,批号:17091910,纯度:99.27%);聚乙烯醇(PVA,国药集团化学试剂有限公司,批号:30153160);聚乙烯吡咯烷酮K30(PVP K30)、羟丙基甲基纤维素K15(HPMC K15,合肥巴斯夫生物科技有限公司,批号:BSF190822、BSF190622);硫酸软骨素(CS,江苏鑫瑞生物科技有限公司,批号:20191028);羧甲基纤维素(CMC I、CMC II、CMC III、CMC V、CMC IV,上海阿拉丁工业公司,批号:A1922037、C1925158、D1926039、G1802064、L1827038);透明质酸(HA,山东银河生物科技有限公司,批号:HA180422-3);明胶(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号:20110420);其余试剂均为分析纯,水为去离子水。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠8只,雌性,体质量170~210 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001。购入后在本实验室常规饲养,饮用自来水,饲以标准大鼠饲料。本实验经贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会审查,符合动物福利伦理相关要求。

2 方法与结果

2.1 Bru双层聚合物可溶性微针的制备工艺研究

2.1.1 基本制备工艺

采用两步离心法制备可溶性微针^[17]:将单一或复合针尖材料充分溶胀于水中(或Bru水溶液中),配制成均一的溶液,然后倒入微针模具中,以4 000 r/min离心10 min(下同),刮去针尖外多余的基质溶液,干燥器室温干燥30 min后,倒入充分溶胀好的单一或复合背衬材料溶液中(水溶液或Bru水溶液),相同条件下离心处理,去除基质溶液中的气泡,干燥后脱模即得。

2.1.2 微针成型性评价

为了考察基质材料的成型性,筛选出制备双层聚合物可溶性微针的最佳针尖材料和背衬材料,以微针揭膜难易程度、阵列完整性、气泡量、针型、针尖硬度、背衬韧性为指标对单一及复合材料的成型性进行综合评分,评分标准见表1。

2.1.3 双层聚合物可溶性微针基质材料的筛选

①针尖材料的筛选。在预试验的基础上分别将PVP K30、CS、明胶等脆性材料以及CMC(I、II、III、

表1 可溶性微针成型性评分标准

Tab 1 Scoring standard for the formability of soluble microneedle

项目	评分标准
揭膜难易程度	不易揭膜(0分);容易揭膜(1分)
阵列完整性	不能成膜(0分);干燥固化后成膜状、严重皱缩或碎裂(1分);干燥固化后略有皱缩或有裂纹,但不影响使用(2分);干燥固化后形成厚度适中、完整的微针阵列(3分)
气泡量	背衬层充满大量气泡或形成许多空针,致使微针无法使用(0分);背衬层有少量气泡或略有空针(1分);背衬层有少量气泡但不影响使用,无空针(2分);无肉眼可见的气泡(3分)
针型	严重弯曲或多数断裂(0分);弯曲或少数断裂(1分);不弯曲、无断裂(2分)
针尖硬度	不能刺穿铝箔(0分);能刺穿铝箔但不能刺穿大鼠皮肤,针尖发生断裂(1分);能刺穿铝箔及大鼠皮肤,针尖发生断裂(2分);能刺穿铝箔及大鼠皮肤,且针尖不发生断裂(3分)
背衬韧性	微针阵列不能弯曲(0分);微针阵列可略微弯曲,但有针尖断裂(1分);微针阵列可任意弯曲,但有针尖断裂(2分);微针阵列可任意弯曲,且不影响针尖层(3分)

IV、V)、HA、PVA、HPMC K15等韧性材料配制成一定浓度的单一或混合基质水溶液,并按“2.1.1”项下方法制备成可溶性微针,对微针揭膜难易程度、阵列完整性、气泡量、针型、针尖硬度等考察指标进行评分(评分标准见表1),以筛选合适的针尖材料。结果显示,以单一韧性材料10% HA、12% HA、5% CMC II、5% CMC III、5% CMC V、10% HPMC K15、15% PVA、20% PVA制备的微针容易揭膜、阵列完整、没有气泡或几乎没有气泡,但针尖缺乏硬度而易弯曲,故此类材料不宜单独用于制备微针。脆性材料CS以及含有CS的复合材料制备的微针整体评分较高,其中以CS-PVP(1:1, m/m)制备出来的微针容易揭膜、阵列完整、硬度最好,故被认为是针尖材料的最佳选择。不同针尖材料的成型性评分结果见表2。

表2 不同针尖材料的成型性评分结果(分)

Tab 2 Results of formability scoring of different tip materials(score)

材料	针尖材料	单个指标评分					总分
		揭膜难易程度	阵列完整性	气泡量	针型	针尖硬度	
单一材料	5%HA	0	1	3	0	0	4
	10%HA	1	2	3	1	0	7
	12%HA	1	3	3	1	0	8
	15%HA	1	2	1	1	0	5
	5%CMC I	1	1	3	0	0	5
	5%CMC II	1	3	3	1	0	8
	5%CMC III	1	2	3	1	1	8
	5%CMC IV	1	1	3	1	0	6
	5%CMC V	1	3	3	1	1	9
	10%PVA	1	3	3	1	0	8
	15%PVA	1	3	3	2	0	9
	20%PVA	1	3	2	2	0	8
	62.5%CS	1	3	3	3	2	12
	62.5%PVP K30	1	3	3	3	2	12
5%HPMC K15	1	2	2	2	0	7	
10%HPMC K15	1	3	2	3	0	9	
复合材料	CS-PVP(1:1, m/m)	1	3	3	3	3	13
	CS-PVP(1:2, m/m)	1	3	3	3	2	12
	CS-PVP(2:1, m/m)	1	3	3	3	2	12
	明胶-CS-PVP(2:1:1, m/m/m)	1	3	3	3	2	12
	CMC-PVA(1:1, m/m)	1	1	3	2	0	7

②背衬材料的筛选。以CS-PVP(1:1, m/m)作为针尖材料,再将“2.1.2①”项下明胶等韧性或脆性材料配制成一定浓度的单一或混合基质水溶液,作为微针背衬层,并按“2.1.1”项下方法制备成可溶性微针。试验过程中发现,即使针尖材料固定,使用不同单一或复合材料作为背衬材料仍然会影响微针揭膜的难易程度、针尖硬度和阵列完整性等。因此,本研究以微针揭膜难易程度、阵列完整性、气泡量、针型、针尖硬度、背衬韧性为考察指标进行评分(评分标准见表1),以筛选合适的背衬材料。结果显示,以15%PVA作为背衬材料制得的微针阵列完整、厚度适中、针尖有足够的硬度且背衬柔软,是背衬材料的最佳选择。以最佳基质材料[针尖材料为CS-PVP K30(1:1, m/m),背衬材料为15%PVA]制备的可溶性微针光滑平整、无皱缩、无气泡、针体完好、背衬柔软。不同背衬材料的成型性评分结果见表3,以最佳基质材料制备的可溶性微针示例图见图1。

表3 不同背衬材料的成型性评分结果(分)

Tab 3 Results of formability scoring of different backing materials(score)

针尖材料	背衬材料	单个指标评分						总分
		揭膜难易程度	阵列完整性	气泡量	针型	针尖硬度	背衬韧性	
CS-PVP(1:1, m/m)	PVA-CS-PVP K30(1:1:1, m/m/m)	1	1	3	1	0	1	5
	PVA-CS-PVP K30(1:2:1, m/m/m)	1	1	3	1	0	1	7
	PVA-CS-PVP K30(1:1:2, m/m/m)	1	0	3	1	0	1	6
	10%HA	1	2	3	1	0	3	10
	12%HA	1	2	3	1	0	3	10
	10%HPMC K15	1	2	2	1	0	3	9
	甘油+明胶(1:1, m/m)	0	0	2	0	1	3	6
	5%CMC II	1	1	3	1	0	3	9
	5%CMC III	1	1	3	1	1	3	10
	5%CMC V	1	1	3	1	0	3	9
	15%PVA	1	3	3	3	3	3	16

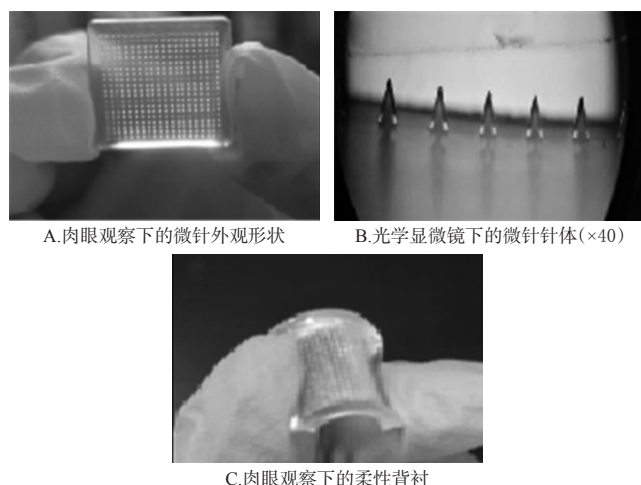


图1 最佳基质材料制备的可溶性微针示例

Fig 1 Example for soluble microneedle prepared by the best matrix

2.1.4 基质溶胀方法的筛选

在溶胀基质时,本课题组发现PVA类材料由于黏度大会产生较多气泡,离心后仍无法除尽,严重影响微针的外观形态,甚至出现空针,这将直接影响微针给药剂量的准确性。因此,本研究考察了4℃冰箱静置1h、80℃水浴加热15min、超声(频率:40kHz,功率:300W)溶解1h等3种不同溶胀方法对微针形态的影响。结果显示,4℃冰箱静置1h后,PVA基质溶胀完全,没有气泡,制备的微针完整、美观;80℃水浴加热15min后,PVA基质完全溶胀,但溶胀过程若搅拌过快,制备的微针会有很多气泡,并且缓慢搅拌制备的微针仍有少量气泡;超声溶解1h后,基质完全溶胀,但制备的微针仍有气泡。因此,最终确定以4℃冰箱静置1h作为基质溶胀方法。不同溶胀方法对可溶性微针形态的影响见图2。

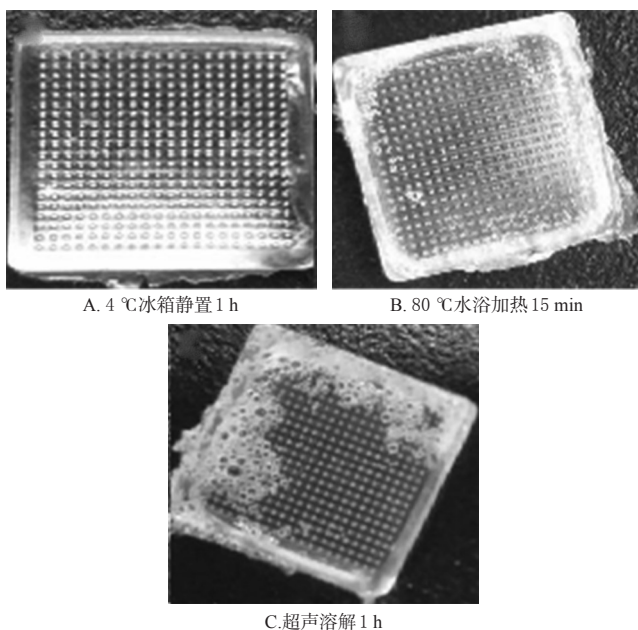


图2 不同溶胀方法对可溶性微针形态的影响
Fig 2 Effects of different swelling methods on the morphology of soluble microneedles

2.1.5 干燥方法的筛选

在制备微针的过程中,干燥方法、干燥温度对微针的成型性有较大的影响。干燥温度过高微针容易产生气泡且易碎,干燥温度过低容易造成干燥时间长,故适宜的干燥方式可以减少气泡的产生同时缩短制备周期。本研究考察了烘箱60℃干燥3h、真空(60℃)干燥30min、干燥器室温干燥24h对微针形态的影响。结果显示,烘箱60℃干燥24h后微针严重皱缩,这可能是由于温度上升,微针基质水分迅速蒸发导致;真空(60℃)干燥30min后微针有较多气泡,甚至出现空针,这可能是因为微针一直处于真空负压状态下,水分迅速蒸发后留下的空隙得不到周围分子的收缩填补所致;干燥器室温干燥24h后的微针无收缩、无气泡、阵列整齐、针型完

好。因此,最终确定以干燥器室温干燥24h作为可溶性微针的干燥方法。不同干燥方法对可溶性微针形态的影响见图3。

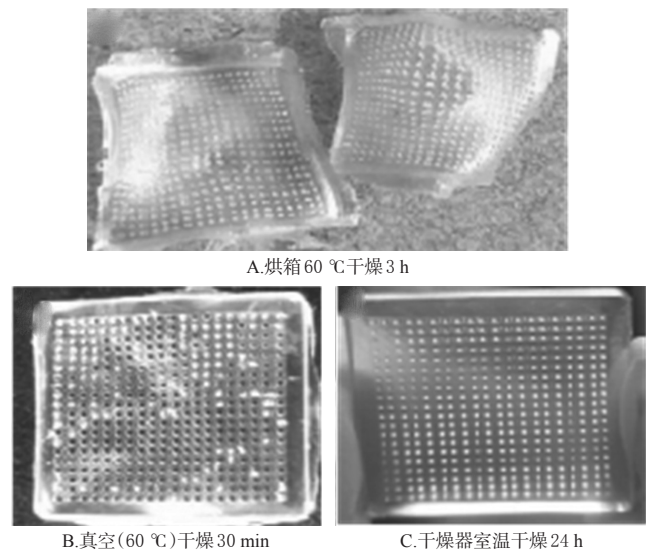


图3 不同干燥方法对可溶性微针形态的影响
Fig 3 Effects of different drying methods on the morphology of soluble microneedles

根据以上试验结果,最终确定了双层聚合物可溶性微针的制备工艺:针尖材料为CS-PVP K30(1:1,m/m),背衬材料为15%PVA,基质溶胀方法为4℃冰箱静置1h,干燥方法为干燥器室温干燥24h。

2.2 Bru 双层聚合物可溶性微针的表征与安全性评价

根据最终筛选出的制备工艺,参照“2.1.1”项下方法制备Bru 双层聚合物可溶性微针(针尖载药微针,材料和药物用量见“2.3.1①”项),并进行表征和安全性评价。

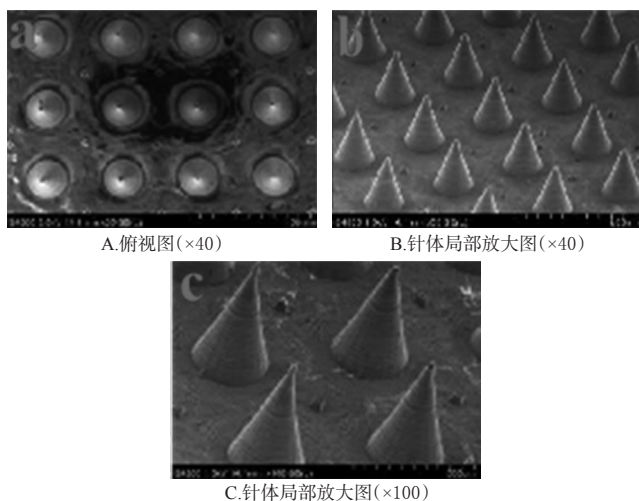
2.2.1 形态学考察

将所制备的微针置于扫描电子显微镜下,观察其形态学特征。结果发现,微针整体排列整齐,分布均匀,表面光滑,针体呈圆锥状、粗细均匀,长度为550μm,底部直径为300μm,中心间距为700μm。可溶性微针在扫描电子显微镜下的表现形态见图4。

2.2.2 机械性能考察

离体皮肤的处理:取健康SD大鼠,脱颈椎处死,小心剔干净腹部的毛,取下皮肤,剥离脂肪组织和筋膜,用生理盐水反复清洗后,用滤纸吸干,再用锡箔纸包裹,然后放入-80℃冰箱中保存。使用时,先将皮肤放入生理盐水中浸泡30min。

分别采用铝箔穿刺试验和离体大鼠皮肤穿刺试验对微针的机械性能进行考察。铝箔穿刺时,用一定的力将微针垂直刺入铝箔中并维持2min。结果显示,微针可轻易刺穿铝箔并留下清晰可见的小孔。离体大鼠皮肤穿刺时,微针以同样方法刺入健康无损伤大鼠离体皮肤,10min后取出微针,立即用0.4%台盼蓝溶液染色皮肤,15min后用异丙醇除去皮肤表面多余的染色剂,并

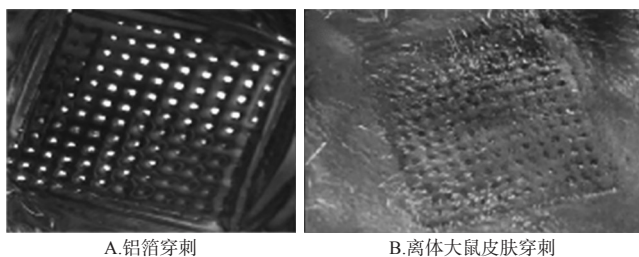


A.俯视图($\times 40$)
B.针体局部放大图($\times 40$)
C.针体局部放大图($\times 100$)

图4 可溶性微针在扫描电子显微镜下的表现形态

Fig 4 Apparent morphology of soluble microneedle under optical microscope

用生理盐水清洗干净,观察皮肤表面染色小孔的情况。结果,经台盼蓝染色后可以在大鼠皮肤上看到清晰可见的小孔。以上结果说明,制备的可溶性微针具有足够的机械强度,能穿透铝箔和离体皮肤,符合试验要求。可溶性微针穿刺试验图见图5。



A.铝箔穿刺 B.离体大鼠皮肤穿刺

图5 可溶性微针穿刺试验图

Fig 5 Diagram of microneedle puncture test

2.2.3 皮肤屏障恢复试验

皮肤角质层孔道的闭合情况被认为是评估角质层屏障功能的指标,用于评估微针对角质层的破坏程度。为了考察皮肤经微针作用后角质层的恢复情况,笔者制备了载台盼蓝的Bru双层聚合物可溶性微针(将0.4%台盼蓝水溶液代替水作为溶剂,按“2.2”项下方法制备而得),然后作用于大鼠去毛腹部皮肤(皮肤处理方法同“2.2.2”项),10 min后取下,分别观察取下5 min、30 min、2 h、6 h后皮肤中台盼蓝的扩散情况,以此判断微针对角质层的破坏作用。结果显示,作用5 min后,可看见明显的微针阵列斑点,说明台盼蓝已经进入皮肤。随着时间推移,台盼蓝往皮肤深处扩散:作用30 min后,微针作用部分皮肤边缘处颜色开始变浅;作用2 h后,大鼠皮肤表面蓝色斑点已经变得很浅;作用6 h后,皮肤表面几乎看不见蓝色斑点,此时皮肤角质层孔道基本闭合。以上结果表明,微针给药后不会对皮肤造成永久破坏,皮肤屏障功能很快(6 h左右)就可以恢复到原来的状态。

2.3 不同载药方式Bru双层聚合物可溶性微针的体外经皮渗透性研究

2.3.1 不同载药方式Bru双层聚合物可溶性微针的制备

①针尖载药微针。按1:1(m/m)的比例分别称取针尖材料CS与PVP K30各500 mg,置于同一烧杯中,加入32 mg/mL的Bru水溶液0.8 mL,4℃冰箱静置1 h;同时称取背衬材料PVA 1.5 mg,溶于10 mL水中,搅拌均匀,4℃冰箱静置1 h。将上述含有Bru的CS和PVP K30溶液注入微针模具中,离心,除去并收集微针模具表面的含药基质液,放入干燥器中室温干燥30 min后取出;再将上述PVA溶液注入微针模具中,离心,取出具有含药基质液微针模具后放入干燥器中室温干燥24 h,脱模即得。制备流程见图6。

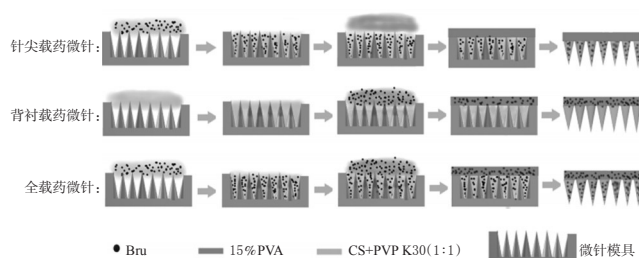


图6 不同载药方式Bru双层聚合物可溶性微针的制备流程

Fig 6 Preparation process of Bru bilayer polymer soluble microneedles with different drug loading methods

②背衬载药微针。取针尖层材料CS和PVP K30各500 mg直接溶于0.8 mL水中,将背衬层材料PVA 1.5 mg溶于32 mg/mL的Bru水溶液(10 mL)中,其余操作同“2.3.1①”项。制备流程见图6。

③全载药微针。取针尖层材料CS和PVP K30各500 mg溶于32 mg/mL的Bru水溶液(0.8 mL)中,取背衬层材料PVA 1.5 mg溶于32 mg/mL的Bru水溶液(10 mL)中,其余操作同“2.3.1①”项。制备流程详见图6。

2.3.2 透皮试验方法

向Franz透皮扩散试验仪(有效扩散面积为2.8 cm²,接收室容积为7 mL)内注入含20%乙醇的生理盐水作为接收液^[18-19],同时超声排出接收室内多余的空气。将制备的微针置于处理好的离体大鼠皮上(皮肤处理方法同“2.2.2”项),并施加一定力度的力使微针刺入鼠皮。然后将鼠皮置于供给池与接收池之间,角质层朝向供给池,皮肤组织朝向接收室,保证皮肤的有效扩散面与接收液的液面相接触。用夹子固定好供给池和接收室后,将扩散池置于恒温磁力搅拌器上,设置磁力搅拌速度为300 r/min、接收室水浴温度为37℃恒温。针尖载药微针于透皮0、10、20、40 min和1、2、4、6、8 h时分别取样0.5 mL,背衬载药微针、全载药微针分别于透皮0、10、20、40 min和1、2、4、6、8、12、24、48 h时各取样0.5 mL,每次取

样后均立即补足相同体积和温度的新鲜接收液。将透皮接收样品液用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,收集滤液,采用HPLC法^[20]测定其中药物含量。通过公式(1)计算累积渗透量(Q_n),通过公式(2)计算累积渗透率。并以 Q_n 为纵坐标、对应的时间(t)为横坐标作图,绘制药物流透曲线。

$$Q_n = (c_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} c_i \times V) / S \dots\dots\dots (1)$$

$$\text{累积渗透率}(\%) = Q_n / \text{载药量} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中, Q_n 为第 n 个取样点药物的单位面积累积渗透量($\mu\text{g}/\text{cm}^2$), c_n 为第 n 个取样点接收样品液中药物的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), c_i 为第 $i(i \leq n-1)$ 个取样点测得的接收样品液中药物的质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$), V_0 为取样体积(mL), S 为药物透过时有效透过面积(cm^2), V 为接收池体积(mL)。

2.3.3 针尖载药微针的体外透皮特性研究

将制备的针尖载药微针(载药量为108.65 μg)作用于处理好的大鼠离体皮肤上,并设立溶液对照组(针尖材料CS-PVP K30与Bru按1:1的质量比制成的水溶液,药物含量同载药微针)。体外透皮试验结果显示,在作用10 min时,便可检测到微针组的Bru,这提示以复合材料CS-PVP K30(1:1, m/m)制备的针尖可在10 min内溶解并释放药物。作用2 h时,微针组Bru的累积渗透率超过50%;溶液对照组Bru的累积渗透率不到20%。作用8 h时,微针组Bru的累积渗透率达到94.05%, Q_{8h} 为102.185 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$;而溶液对照组Bru的累积渗透率不到40%, Q_{8h} 为42.04 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。由此可见,微针组的 Q_{8h} 是溶液对照组的2.43倍,这表明制成微针后可大大地提高Bru的皮肤透过量。针尖载药Bru双层聚合物可溶性微针及其溶液对照的体外透皮曲线见图7。

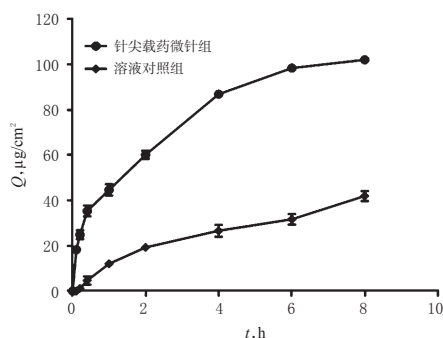


图7 针尖载药Bru双层聚合物可溶性微针及其溶液对照的体外透皮曲线

Fig 7 *in vitro* transdermal curves of tip-loaded Bru bilayer polymer soluble microneedle and its solution control

2.3.4 背衬载药微针的体外透皮特性研究

将制备的背衬载药微针(载药量为920.72 μg)作用于处理好的大鼠离体皮肤上。体外透皮试验结果显示,在前10 min内并未检测到Bru,而在20 min时可检测到

微针中的Bru,这表明空白针尖材料(PVP K30、CS)可在10 min内溶解,10 min后载药背衬层开始溶解并释放药物。作用8 h时,微针中Bru的累积渗透率超过50%,之后持续缓慢释放,作用24 h时的累积渗透率达到86.73%,作用48 h时的累积渗透率达到91.32%、 Q_{48h} 为840.77 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这提示通过背衬载药的方式可使微针载药量增大,成功实现药物的有效透皮递送,并具有缓释作用;其缓释特性有可能是因为背衬材料PVA具有的水凝胶性质,能在一定程度上按一定的释药速率长时间释放药物。背衬载药Bru双层聚合物可溶性微针体外透皮曲线见图8。

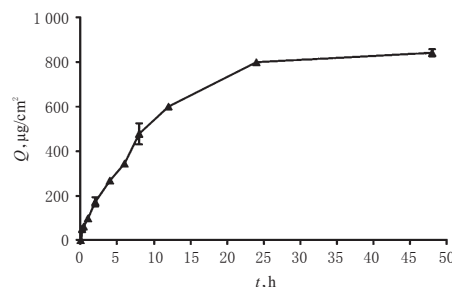


图8 背衬载药Bru双层聚合物可溶性微针的体外透皮曲线

Fig 8 *in vitro* transdermal curve of backing-loaded Bru bilayer polymer soluble microneedle

2.3.5 全载药微针的体外透皮特性研究

将制备的全载药微针(载药量为1 429.80 μg)作用于处理好的大鼠离体皮肤上。体外透皮试验结果显示,10 min内即可检测到Bru。作用8 h时微针中Bru的累积渗透率超过50%,之后持续缓慢释放,作用24 h时的累积渗透率达到82.26%,作用48 h时的累积渗透率达到94.06%、 Q_{48h} 为1 156.73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,显示出缓释特性。该结果进一步表明,可通过全载药的方式增大微针载药量并成功实现药物透皮递送,使用凝胶性质的材料作为微针背衬层可达到缓释效果。全载药Bru双层聚合物可溶性微针体外透皮曲线见图9。

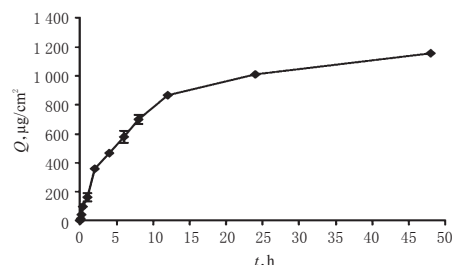


图9 全载药Bru双层聚合物可溶性微针的体外透皮曲线

Fig 9 *in vitro* transdermal curve of full-loaded Bru bilayer polymer soluble microneedle

3 讨论

目前常用于制备可溶性微针的生物可降解材料多

为高分子聚合物,这些材料单一使用时或因机械强度不足而无法刺入皮肤,或因过脆而易发生断裂。本研究根据可溶性微针针体和背衬有不同的力学性能要求(由于皮肤的弹性和异质性,尖端需要足够的机械强度来穿透角质层;相反,基座要能够灵活地附着在皮肤上,并能将力传递到顶端)分别对多种单一或复合材料进行考察,成功制备了以CS和PVP K30复合材料为针尖层、PVA单一材料为背衬层的Bru双层聚合物可溶性微针,该微针在形态结构、机械强度等方面均表现出优良的性能。微针处理后皮肤在6 h内即可恢复到原来的状态。

体外透皮试验表明,微针对Bru经皮递药具有极大的促进作用,针尖材料CS、PVP K30可在10 min内溶解并逐渐释放药物,针尖载药微针8 h内药物基本释放完全,这表明CS、PVP K30可作为速溶型微针的材料。当针尖溶解后,背衬材料逐渐软化并溶解释放药物,背衬载药、全载药微针8 h内的药物累积渗透率均超过50%,48 h的药物累积渗透率均超过90%, Q_{48h} 分别为840.77、1 156.73 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$,显示出缓释特性。这表明微针通过全载药也可以成功实现药物的有效透皮递送,具有凝胶性质的材料作为背衬层可使药物缓慢释放达到缓释效果,这为毒性药物和给药剂量大、给药次数频繁、半衰期短、生物利用度低的药物的给药方式设计提供了思路。

笔者在试验过程中发现,使用不同材料作为微针针尖层和背衬层时,针尖层材料的特性会受背衬材料的特性及其所占比例影响,使得微针的外观形态、机械性能和稳定性等发生变化。背衬材料PVA水溶液呈凝胶状,其微针系统的药物缓释效应体现出持续给药效果,可以减慢药物释放的速度,提高释放速度的稳定性,是背衬缓释材料的最佳选择。但PVA溶液含水量过大,存在下渗到针尖层的现象,在一定程度上会降低针尖硬度,故背衬层的设计还需进一步研究和改进。

参考文献

- [1] KATIYAR C, KUMAR A, BHATTACHARYA SK, et al. Ayurvedic processed seeds of nux-vomica: neuropharmacological and chemical evaluation[J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(3):190-194.
- [2] 唐敏,伍冠一,朱婵,等.马钱子碱镇痛研究进展[J]. *中草药*, 2014, 45(12):1791-1795.
- [3] TANG M, ZHU WJ, YANG ZC, et al. Brucine inhibits TNF- α -induced HFLS-RA cell proliferation by activating the JNK signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(1):735-740.
- [4] WU P, LIANG Q, FENG P, et al. A novel brucine gel transdermal delivery system designed for anti-inflammatory and analgesic activities[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4):757-769.
- [5] 赵引利,何燕宁,杨宇杰,等.马钱子及其制剂药动学研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(11):1710-1714.
- [6] 吴小娟,马凤森,郑高利.马钱子吡啶类生物碱毒性研究进展[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(6):231-235.
- [7] 金晨,陈家乐,徐玲霞,等.马钱子总碱脂质液晶纳米粒的制备和体外评价研究[J]. *中草药*, 2018, 49(22):5305-5312.
- [8] 吴玉,陈军,方芸,等.马钱子碱传递体的体外透皮与促渗性质研究[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(16):3009-3015.
- [9] DONNELLY RF. How can microneedles overcome challenges facing transdermal drug delivery[J]. *Ther Deliv*, 2017, 8(9):725-728.
- [10] VERBAAN FJ, BAL SM, VAN DEN BERG DJ, et al. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin[J]. *J Control Release*, 2007, 117(2):238-245.
- [11] NORMAN JJ, BROWN MR, RAVIELE NA, et al. Faster pharmacokinetics and increased patient acceptance of intradermal insulin delivery using a single hollow microneedle in children and adolescents with type 1 diabetes[J]. *Pediatr Diabetes*, 2013, 14(6):459-465.
- [12] NORMAN JJ, CHOI SO, TONG NT, et al. Hollow microneedles for intradermal injection fabricated by sacrificial micromolding and selective electrodeposition[J]. *Biomed Microdevices*, 2013, 15(2):203-210.
- [13] GILL HS, PRAUSNITZ MR. Coated microneedles for transdermal delivery[J]. *J Control Release*, 2007, 117(2):227-237.
- [14] WAGHULE T, SINGHVI G, DUBEY SK, et al. Microneedles: a smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019. DOI:10.1016/j.biopha.2018.10.078.
- [15] JEONG HR, LEE HS, CHOI IJ, et al. Considerations in the use of microneedles: pain, convenience, anxiety and safety[J]. *J Drug Target*, 2017, 25(1):29-40.
- [16] 章捷,马凤森,占浩慧,等.用于构建可溶性微针的基质材料及其复合材料[J]. *材料导报*, 2017, 31(19):129-134、161.
- [17] DHARADHAR S, MAJUMDAR A, DHOBLE S, et al. Microneedles for transdermal drug delivery: a systematic review[J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2019, 45(2):188-201.
- [18] 管庆霞,华晓丹,张喜武,等. HPLC法测定马钱子碱纳米结构脂质载体的主药含量及包封率[J]. *中国药房*, 2015, 26(21):2983-2986.
- [19] 涂碎萍,侯雅琴,边原,等.6种甘草酸盐乳膏中甘草酸的体外经皮渗透特性比较[J]. *中国药房*, 2018, 29(9):1205-1208.
- [20] 宋信莉,刘文,冯果,等.一种马钱子碱可溶性微针、制备方法及其检测方法和应用:中国,109884223A[P]. 2019-06-14.

(收稿日期:2020-04-30 修回日期:2020-07-09)

(编辑:林 静)