

## 石杉碱甲水凝胶微针的制备及经皮传递研究

严琴英, 文娇丽, 翁嘉琦, 王炜玮, 方敏, 杨根生\*

浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014

**摘要:**目的 研究石杉碱甲水凝胶微针的制备条件, 并考察微针的性能及其经皮给药的可行性。方法 采用聚乙烯醇和葡聚糖混合水凝胶作为微针的基质材料, 考察材料的溶胀性能和拉伸性能, 确定最优处方; 以两步夹心法将石杉碱甲药粉载入微针基质材料中, 采取离心及冷冻-解冻工艺制备针形为圆锥体, 针长为 500  $\mu\text{m}$ , 针间距为 1000  $\mu\text{m}$  的水凝胶微针阵列, 并对其机械性能、皮肤穿刺性能进行评价; 建立石杉碱甲质量分析方法, 采用改良的 Franz 扩散池对载药微针阵列进行体外透皮释药性能考察。结果 得到的最优处方: 聚乙烯醇与葡聚糖质量比为 9:1, 0.15 g/mL 混合溶液作为针尖材料, 0.08 g/mL 混合溶液作为阵列基底材料; 每根微针可承受大于 0.5 N 的极限压力, 表明微针可成功穿刺角质层, 进入皮内; 体外透皮实验表明, 72 h 内石杉碱甲的累积透皮率达 85%以上。结论 以聚乙烯醇和葡聚糖这 2 种复合高分子材料制备的石杉碱甲水凝胶微针阵列, 具有良好的机械性能和皮肤穿刺性能, 为难溶性药物石杉碱甲实现高效、无痛经皮缓释给药, 提高患者依从性提供了一种新的可能。

**关键词:** 石杉碱甲; 水凝胶微针; 经皮给药; 聚乙烯醇-葡聚糖复合水凝胶; 光学相干断层扫描

**中图分类号:** R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)12-3530-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.12.008

## Preparation and transdermal delivery of huperzine A hydrogel microneedles

YAN Qin-ying, WEN Jiao-li, WENG Jia-qi, WANG Wei-wei, FANG Min, YANG Gen-sheng

College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

**Abstract: Objective** To investigate the preparation conditions of hydrogel microneedles loaded huperzine A, and examine the performance of microneedles as well as the feasibility of percutaneous drug delivery. **Methods** Polyvinyl alcohol (PVA) and dextran mixed hydrogel were used as the matrix material of the microneedles. The swelling performance and tensile properties of the material were investigated to determine the optimal prescription. The huperzine A powder was loaded into the microneedles matrix material by a two-step sandwiching method. The hydrogel microneedle array with the cone-like-shaped needles, 500  $\mu\text{m}$  in length and 1000  $\mu\text{m}$  in needle spacing, was prepared by centrifugation and freeze-thawing process. The mechanical properties and skin penetration performance of the drug-loaded microneedle array were evaluated. The quality analysis method of huperzine A was established, and the *in vitro* transdermal release behavior of the drug-loaded microneedles was investigated by a modified Franz diffusion cell. **Results** The optimal prescription was as follows: the mass ratio of polyvinyl alcohol to dextran was 9:1, 0.15 g/mL mixed solution was used as the needle tip material, and 0.08 g/mL mixed solution was used as the array substrate material. Each microneedle can withstand the ultimate pressure greater than 0.5 N, indicating that the microneedle can successfully puncture the stratum corneum and enter the skin. *In vitro* transdermal test showed that the cumulative transdermal rate of huperzine A reached more than 85% within 72 h. **Conclusion** The hydrogel microneedle array prepared with two kinds of composite polymer materials, polyvinyl alcohol and dextran, had good mechanical and skin puncture properties, which provided a new possibility to realize efficient, painless, and percutaneous sustained-release for the insoluble drug huperzine A, as well as improve patient compliance greatly.

**Key words:** huperzine A; hydrogel microneedles; transdermal drug delivery; polyvinyl alcohol-dextran composite hydrogel; optical coherence tomography

收稿日期: 2021-02-20

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY20H300005)

作者简介: 严琴英 (1983—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为药剂学。Tel: (0571)88871077 E-mail: yqy@zjut.edu.cn

\*通信作者: 杨根生, 博士生导师, 教授, 主要从事药物创新制剂的研究。E-mail: yanggs@zjut.edu.cn

石杉碱甲 [(5R,9R,11E)-5-氨基-11-亚乙基-5,8,9,10-四氢-7-甲基-5,9-亚甲基环辛四烯并[b]吡啶-2(1H)-酮, huperzine A] 是于 1986 年从石杉科石杉属植物蛇足石杉 *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. 中分离得到的 1 种新型石松类生物碱有效单体, 是一种相对安全, 且具有高度特异性、中枢活性和选择性的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 能增强脑内胆碱能神经元功能, 并且可以帮助阿尔茨海默病患者缓解症状。市面上已有石杉碱甲胶囊<sup>[1]</sup>、石杉碱甲片<sup>[2]</sup>、石杉碱甲注射剂<sup>[3]</sup>等剂型。

阿尔茨海默病属于一种进行性慢性神经退行性疾病, 多发生于 65 岁及以上的老年人当中<sup>[4]</sup>。随着病程发展, 阿尔茨海默病患者的学习、记忆和执行功能将持续下降<sup>[5]</sup>, 但通过长期药物治疗或可减慢病程发展。目前, 石杉碱甲片需每日按时服用 2~3 次, 不得间断, 对执行力已处较低状态的患者, 其依从性极低。而注射用石杉碱甲往往需要专业医疗人员的介入, 日常家用给药可能性不高。本研究旨在开发一种新型、高效的石杉碱甲经皮递药系统, 作为解决注射给药和口服给药弊端的有效替代途径, 其使用便捷, 既可帮助患者规避药物在胃肠道内消化代谢引起的副作用, 还可以实现药物的持续可控释放, 并以无痛、无创、可自我给药的方式显著提高患者的依从性<sup>[6]</sup>。

微针经皮给药技术突破了传统经皮递药系统的应用瓶颈, 成为近几年药物递送领域的一大热点。微针是指直径大小为微米级的针状集合, 长度一般小于 1 mm, 主要通过短暂性破坏皮肤角质层产生微孔道, 并将所需治疗量药物经微孔递送至皮内, 既保持了传统经皮递药系统的优势, 又克服了传统经皮递药系统渗透性不够、递送效率不高等问题<sup>[7]</sup>。微针尖端锋利且针长不足与真皮痛觉神经广泛接触, 从而达到既可刺穿角质层又实现无痛给药的目的<sup>[8-9]</sup>。目前研究最为广泛的是可溶性微针或水凝胶微针<sup>[10]</sup>, 即将药物封装在可溶解或可溶胀的聚合物基质中, 在插入皮肤时能够完全溶解或充分溶胀以释放所载药物。

为保证可溶性微针及水凝胶微针刺入皮肤后的安全性, 常用的基质材料大多为各种可降解、生物相容性高的聚合物或糖, 例如: 硫酸软骨素<sup>[11]</sup>、聚乳酸<sup>[12]</sup>、聚乙醇酸<sup>[13]</sup>、丝素蛋白<sup>[14]</sup>、羧甲基纤维素<sup>[15]</sup>、透明质酸<sup>[16]</sup>、聚乙烯吡咯烷酮<sup>[17]</sup>、壳聚糖<sup>[18]</sup>、麦芽糖<sup>[19]</sup>、葡聚糖<sup>[20]</sup>、聚乙烯醇<sup>[21]</sup>、聚甲基乙烯基

马来酸酐共聚物<sup>[22]</sup>等。

由于单一材料所制成的微针往往存在机械强度低、稳定性差等缺陷, 所以一般载药微针多选择多种材料复合作为微针基质。本研究选用聚乙烯醇和葡聚糖作为微针基质材料, 通过复合水凝胶薄膜的溶胀指标确定了最佳混合比例, 考察了不同浓度配比基质材料的拉伸性能, 用循环冷冻解冻法制作微针, 对成功制备的微针进行机械强度的评价和皮肤刺入性能的研究。采取两步夹心法装载干粉药物, 并研究其体外透皮释放行为, 以期为难溶性药物石杉碱甲经皮递送提供新的策略。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器设备

P70F20L-DG 微波炉, 广东格兰仕电器制造有限公司; Centra GP8R 离心机, 美国 Thermo 公司; JJ-1 精密增力电动搅拌器, 常州国华电器有限公司; HD-B 万能材料试验机, 杭州明凯科技有限公司; DS-5510DTH 超声波清洗器, 上海生析超声仪器有限公司; RCT 磁力搅拌器, 上海志威电器有限公司; TU-1900 双光束紫外可见分光光度计, 上海志威电器有限公司; BE-1100 四维旋转混合仪, 其林贝尔仪器制造有限公司; MDQ-105M 数字千分尺, 日本 Mitutoyo 公司; Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 德国戴安公司; B-491 数显恒温水浴锅, 国华电器有限公司; DZG-6050 真空干燥箱, 上海精宏实验设备有限公司; FA1604S 型分析天平, 上海天平仪器厂; S-4700 (II) 型场发射扫描电子显微镜 (SEM), 日本 Hitachi 公司; RYJ-12B 药物透皮扩散试验仪, 上海黄海药检仪器有限公司; TA.XT plus 物性测试仪, 英国 SMS 公司; RM2245 石蜡切片机, Leica 公司; 光学相干断层扫描仪 (optical coherence tomography, OCT), 浙江工业大学信息与工程学院自制。

### 1.2 药品与试剂

聚乙烯醇, 国药集团化学试剂有限公司, 批号 T20080327; 葡聚糖, 阿拉丁试剂上海有限公司, 批号 J1617016; 磷酸二氢钾, 湖州湖试化学试剂有限公司; 乙腈, Fisher Scientific, 批号 102489; 甲醇, Sigma-Aldrich 公司, 批号 WXBC4003V; 石杉碱甲对照品, 质量分数 99%, 浙江万邦药业股份有限公司, 批号 Q04Y160201; 台盼蓝, 碧云天试剂有限公司, 批号 ST798; 多聚甲醛, 武汉塞维尔生物科技有限公司, 批号 180320; 甲醇, 色谱纯,

Sigma-Aldrich 公司；水为双蒸水，自制。

### 1.3 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠，体质量 (200±20) g，BALB/c 小鼠，体质量 (20±2) g。由浙江省医学科学院实验动物中心提供，生产许可证号：SCXK(浙)2014-0001，合格证号：No.1704100008。所有动物实验遵循浙江工业大学实验动物福利伦理委员会有关实验动物管理和使用的规定，均符合 3R 原则。

## 2 方法与结果

### 2.1 聚乙烯醇复合水凝胶制备

称取一定量的聚乙烯醇于圆底烧瓶中，加适量双蒸水，在机械搅拌下水浴加热至 90 °C，持续加热 3 h，至聚乙烯醇完全溶解，制得的聚乙烯醇溶液冷却至室温备用。再称取一定量的葡聚糖粉末，加适量双蒸水，室温下搅拌至溶解备用。将聚乙烯醇溶液与葡聚糖溶液按不同比例，于室温条件下充分混合，得到多种比例的混合凝胶基质。将基质放入自制模具中，-40 °C 冷冻 1 h 后取出，微波解冻 30 s，重复冷冻解冻多次。室温下自然干燥 24 h 后置于真空干燥箱中干燥至恒定质量。

### 2.2 聚乙烯醇复合水凝胶溶胀性能考察

将聚乙烯醇-葡聚糖复合水凝胶置于真空干燥箱中干燥至恒定质量，准确称量并记录聚乙烯醇-葡聚糖复合水凝胶的初始质量。将其放入装有足量双蒸水的烧杯中进行溶胀实验，每隔一段时间取出复合水凝胶，擦干表面水分，准确称定质量并记录，直至复合水凝胶质量不再增加，按以下公式计算溶胀比。绘制溶胀曲线，分别考察不同质量比的聚乙烯醇-葡聚糖和冷冻解冻次数对复合水凝胶溶胀性能的影响。

$$\text{溶胀比} = (W_s - W_d) / W_d$$

$W_s$  为溶胀后的复合水凝胶质量<sup>[23]</sup>， $W_d$  为上一时刻的复合水凝胶质量

高分子聚合物材料在应用于药物递送时，溶胀能力是一项重要指标<sup>[24]</sup>。复合水凝胶作为微针基质材料，在吸收皮肤间质液后会明显溶胀，高的溶胀率往往表现出更好的药物释放效果<sup>[25]</sup>。因此，本研究中，对不同条件下复合水凝胶的溶胀性能分别进行了考察。通过分析复合水凝胶的溶胀曲线(图 1)发现，随着冷冻解冻循环次数的增加，复合水凝胶的溶胀率均有所下降，可能是由于多次循环后，复合水凝胶形成的物理交联结晶密度增大所致；不同

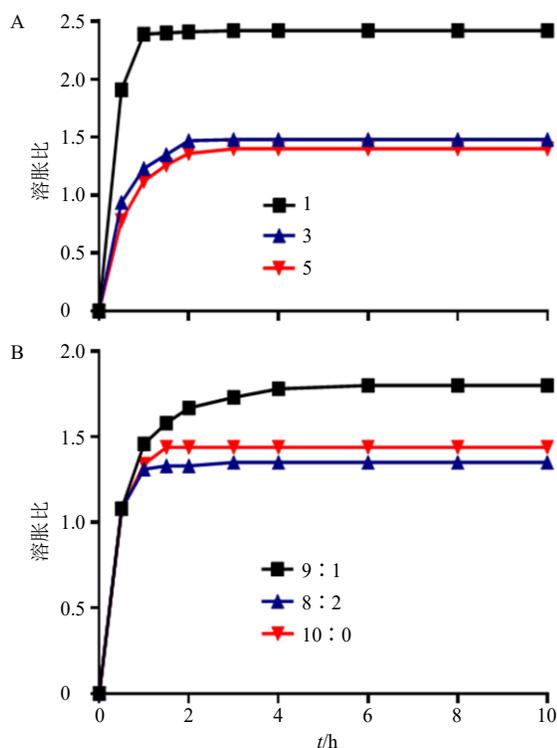


图 1 不同冷冻解冻循环次数 (A) 和聚乙烯醇-葡聚糖不同质量比下 (B) 的聚乙烯醇复合水凝胶的溶胀曲线 ( $n = 3$ )  
 Fig. 1 Swelling curve of polyvinyl alcohol composite hydrogel of different freezing and thawing cycles (A) and different ratios of PVA/dextran (B) ( $n = 3$ )

聚乙烯醇-葡聚糖质量比中，9：1 溶胀率明显较好。此外，当冷冻解冻循环次数为 1 次时，复合水凝胶气泡较多难以去除，对微针形态及其机械性能有严重的影响，而冷冻解冻次数为 3 次和 5 次时均未出现气泡问题。综合考虑溶胀率、气泡等因素，确定冷冻解冻循环 3 次、聚乙烯醇-葡聚糖质量比 9：1 为最优条件。

### 2.3 聚乙烯醇复合水凝胶拉伸性能考察

考察不同质量浓度(聚乙烯醇+葡聚糖的总质量浓度)微针基质材料下聚乙烯醇-葡聚糖复合水凝胶的拉伸性能。复合水凝胶薄膜的厚度由数字千分尺测得，薄膜平均厚度为 (0.33±0.06) mm。采用万能材料试验机测试其力学性质，设定测试材料的应变速率为 100 mm/min，拉伸样品的尺寸大小均符合国际标准拉伸工件要求，测定其断裂伸长率、拉伸强度<sup>[26]</sup>。表 1 显示了 3 种不同质量浓度的微针基质材料复合水凝胶的断裂伸长率和拉伸强度。随着微针基质材料质量浓度的提高，复合水凝胶的断裂伸长率和拉伸强度都呈现先增加后减小的趋势，其中 0.15 g/mL 聚乙烯醇-葡聚糖复合水凝胶拉伸强度

表1 不同质量浓度微针基质材料复合水凝胶对拉伸性能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of different concentrations of composite hydrogel on tensile properties ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

微针基质材料/(g·mL <sup>-1</sup> )	断裂伸长率/%	拉伸强度/MPa
0.08	30.24 ± 2.78	29.08 ± 2.22
0.15	50.42 ± 2.25	37.55 ± 4.00
0.20	27.08 ± 3.15	19.35 ± 1.24

最大。结合拉伸试验结果,分别选取 0.08、0.15、0.20 g/mL 3 种质量浓度微针基质材料以“2.4”项所述制备工艺制作微针,发现 0.20 g/mL 高质量浓度组材料流动性较差,微针制作离心困难且成型性差;0.15 g/mL 中质量浓度组制作的微针硬度较强,但与皮肤的贴合性差,适合作为针尖材料;0.08 g/mL 低质量浓度组制作的贴片表面较为平整且与皮肤的贴合性较好,适合作为背衬材料。

#### 2.4 石杉碱甲复合水凝胶微针的制备

选用聚乙烯醇-葡聚糖质量比为 9:1,按照背衬贴片最佳质量浓度 0.08 g/mL,针尖材料最佳质量浓度 0.15 g/mL,反复冻融次数 3 次作为最优条件制作微针。

**2.4.1 微针阴模的制备** 采用倒模法制备微针的阴模,阴模材料为聚二甲基硅氧烷(PDMS)。将 PDMS 与固化剂充分混合均匀,置入 6 孔板中并通过真空干燥除去混合时产生的气泡;随后,将金属微针阳模固定于平板容器的中心位置,控制金属微针的浸入深度;将其放入 60 °C 干燥箱中干燥 8 h,使 PDMS 材料充分凝固;最后剥离金属微针,得到微针阴模。

**2.4.2 微针针尖的制备** 将 0.15 g/mL 复合水凝胶基质溶液倒入微针模具中,将装有水凝胶基质溶液的模具放入离心机,设置转速为 3500 r/min,水平离心 5 min 后旋转 180°继续离心 5 min,重复操作 3 次,去除气泡,并使 0.15 g/mL 复合水凝胶基质进入微针模具后保持底部平整。离心结束,取出模具,用药匙刮去多余材料,后置于-40 °C 冰箱中冷冻 1 h,取出模具,中火微波 30 s 解冻,制得针头。

**2.4.3 载药微针贴片的制备** 将解冻完成的微针针头模具置于水平桌面上,精确称量 2 mg 石杉碱甲干粉,加入微针模具中,用药匙压平,再加入 0.08 g/mL 复合水凝胶基质溶液,以 3500 r/min 离心 5 min 后旋转 180°继续离心,重复操作至水凝胶完全水平形成背衬层。将模具置于-40 °C 冰柜内冷冻 1 h,取出模具,中火微波 30 s 解冻,重复冻融 3 次后经

室温干燥 24 h。用尖头镊子小心取出微针,在 SEM 下观察,所制备的微针呈圆锥状、形态良好、针尖锐利(图 2)。

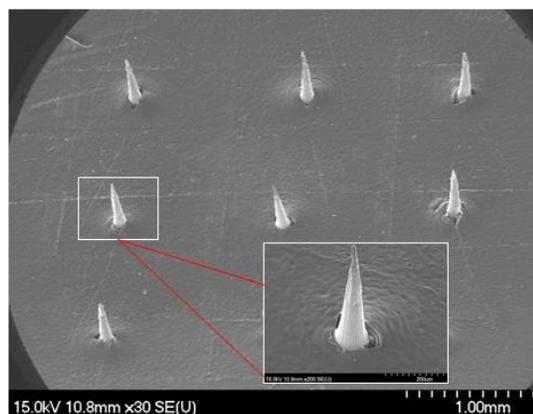


图2 石杉碱甲复合水凝胶微针的 SEM 图

Fig. 2 SEM image of huperzine A composite hydrogel microneedles

#### 2.5 石杉碱甲微针力学性能考察

采用物性测试仪的压缩模式研究了石杉碱甲微针的力学性能,用胶带将微针固定在分析仪的铝制底座上,选用 p/6 探针,压缩速度设置为 0.1 mm/s,触发力设置为 0.049 N,数据采集率设置为 25。将微针剪成 2×2 阵列,保持微针与探针轴向平行,以设定的条件进行压缩实验,得到力-位移曲线。

由图 3 的力-位移曲线可看出,在压缩过程中,随着压缩位移的增加,微针承受的力也在同步增加,且载药微针所承受的力始终大于空白微针。这可能是因为药物进入水凝胶中,填补了水凝胶薄膜的空隙,使水凝胶薄膜更加致密,从而使载药微针可承受更大的压力。当压缩距离达到 0.5 mm 时,微针所承受的压力达到最大且均未断裂,其中空白微针为 0.63 N/针,载药微针为 0.76 N/针,均具备刺入皮

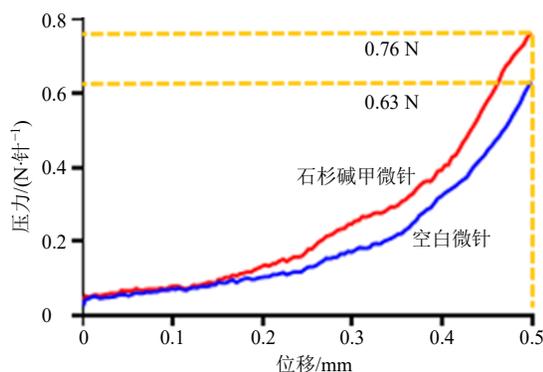


图3 聚乙烯醇-葡聚糖微针的力学评价

Fig. 3 Mechanical evaluation of polyvinyl alcohol-dextran microneedles

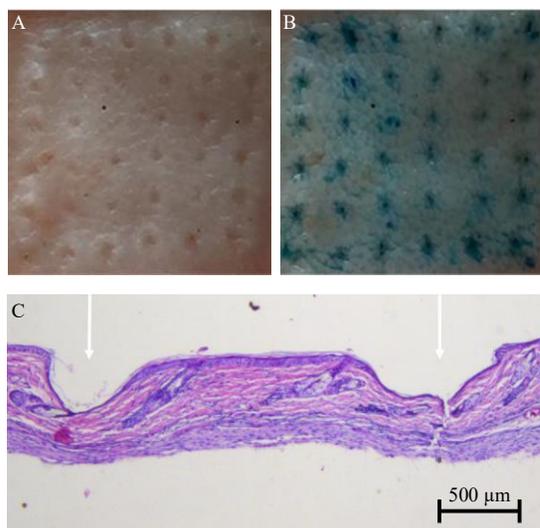
肤所需的机械强度(针尖直径为 24  $\mu\text{m}$  的微针成功穿透皮肤,约需要 0.15 N/针的力<sup>[27]</sup>)。

## 2.6 皮肤穿刺性能考察

**2.6.1 离体皮肤实验** 将健康 SD 大鼠脱颈椎处死并脱毛,进行皮肤剥离,用脱脂棉擦去皮下脂肪后,经生理盐水反复冲洗干净,将皮肤保存在生理盐水中备用。使用前擦干水分,角质层侧朝上放置并固定在泡沫板上,用自制的 500  $\mu\text{m}$  微针贴片对皮肤进行垂直按压给药,微针在皮肤上停留 30 s 后移除,拍照记录穿刺后皮肤针孔阵列,用 1%台盼蓝对穿刺后皮肤样本进行染色,并用 PBS 洗去浮色,拍照记录。

**2.6.2 活体皮肤实验** BALB/c 小鼠用水合氯醛麻醉,麻醉剂量为 300~400 mg/kg,背腹部去毛擦干后,将微针装于实验室自制给药装置上进行皮肤垂直接压,微针在皮肤上停留 30 s,移去微针后立即剥离微针穿刺后的皮肤,用 4%多聚甲醛固定 24 h,取出后用不同梯度的酒精作脱水剂,脱去皮肤中的水分,再将皮肤置于二甲苯中使其透明。之后将皮肤放置于熔化的石蜡,保温。包埋后将蜡块固定于切片机上,切成微米级的薄片。最后将皮肤切片用苏木精-伊红染色(HE染色),制备 HE 染色切片,在光学显微镜下观察并拍摄。

由图 4-A 可见,经微针处理后的皮肤表面针孔



A-微针插入后的皮肤(未染色) B-1%台盼蓝染色后的皮肤 C-微针刺入皮肤后的组织学切片

A-skin after microneedles insertion (unstained) B-skin stained with 1% trypan blue C-histological section of the skin after insertion of microneedles

图 4 微针刺入皮肤性能考察

Fig. 4 Skin penetration test of microneedles

阵列整齐清晰,与刺入贴片一致。采用台盼蓝对刺入后的皮肤进行染色,以验证微针可成功刺入皮肤。这是因为正常活细胞的细胞膜结构完整,染料不能进入胞内,可被水或者有机洗剂完全清除;而微针刺入皮内造成了皮肤细胞的死亡,细胞不再完整,胞膜的通透性增加,可被染成蓝色,且染料与死细胞结合后不能被完全清洗。图 4-B 表明微针刺破了皮肤,并在皮肤表面形成了针孔阵列;图 4-C 组织学染色切片显示,针头成功穿透角质层进入皮内。综上,复合水凝胶微针可穿透小鼠表皮,为药物有效递送至皮内提供基础。

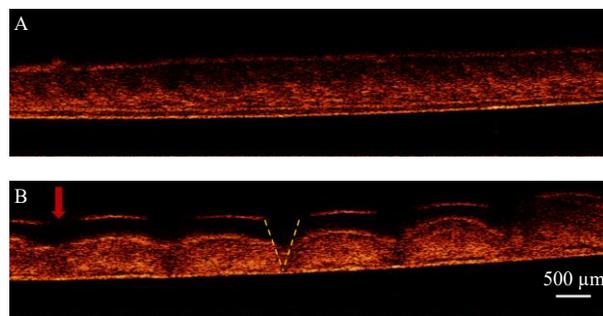
## 2.7 光学相干断层扫描仪测定皮肤刺入深度

为了进一步考察微针在皮内的刺入深度,将水凝胶微针刺入离体大鼠皮肤中,用自行改装的 OCT 对皮肤层进行 2D 横截面扫描。所获得图像文件的比例尺为纵向 1.0 像素=8.8  $\mu\text{m}$ ,横向 1.0 像素=10  $\mu\text{m}$ <sup>[28]</sup>,使用成像软件 Image J 可以精确计算微针的穿透深度。

由图 5 对比清晰可见,微针已成功刺入皮肤。通过成像软件 Image J 计算出刺入皮肤的深度大约是 500  $\mu\text{m}$ 。本研究使用的光学相干断层成像技术可直观地判断微针是否能够刺入皮肤以及刺入皮肤的深度,是一种富有前景的无创成像技术,为微针刺入皮肤行为的表征提供了一种快速便捷的手段。

## 2.8 微针刺入皮肤后的愈合评价

为评价微针给药后穿刺部位的皮肤愈合情况,将小鼠用 50 g/L 水合氯醛麻醉后用剃毛机脱毛,将微针贴于小鼠背部持续 2 min 后,用相机记录皮肤愈合整个过程。结果如图 6 所示,随着时间的延长



A-微针未插入时的皮肤 OCT 图像 B-复合水凝胶微针刺入皮肤的 OCT 图像

A-OCT image of skin before microneedles insertion B-OCT image of composite hydrogel microneedles inserting into the skin

图 5 石杉碱甲复合水凝胶微针的 OCT 图像

Fig. 5 OCT images of huperzine A composite hydrogel microneedle

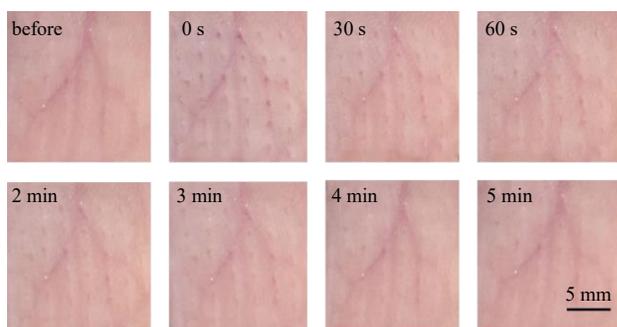


图6 微针刺入皮肤愈合情况

Fig. 6 Image of skin would healing process after microneedles puncture

微针在皮肤中形成的孔逐渐消失, 5 min 左右针孔已经消失不见, 而且微针刺入后并没有红肿和炎症现象发生, 说明本实验制备的可溶性微针生物相容性较好, 微小创伤能够尽快恢复。

## 2.9 石杉碱甲体外定量 HPLC 分析方法

**2.9.1 色谱条件** C<sub>18</sub> 色谱柱 (200 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-1.0 mol/L 磷酸缓冲液 (86:14); 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 307 nm; 柱温 25 °C; 进样量 20 μL。

**2.9.2 对照品溶液的配制** 精密称取石杉碱甲对照品 2.00 mg, 用甲醇溶解, 转移至 100.0 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 摇匀, 既得对照品储备液 (质量浓度为 20.00 μg/mL)。

**2.9.3 专属性考察** 对比空白皮肤透析液和石杉碱甲对照品的典型 HPLC 图, 考察方法的专属性。由图 7 可见, 空白接收液对石杉碱甲的色谱峰没有干

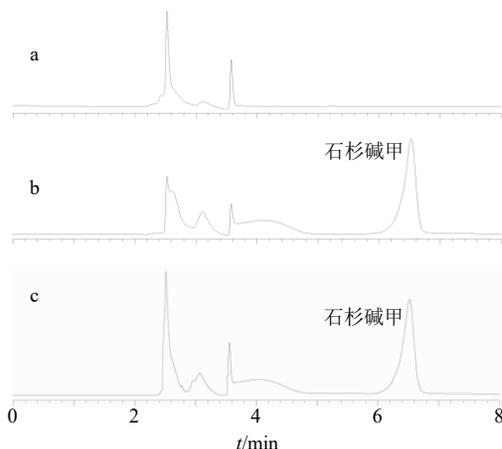


图7 空白皮肤透析液 (a)、石杉碱甲对照品 (b) 和石杉碱甲微针皮肤透析液 (c) 定量测定 HPLC 图

Fig. 7 Representative chromatograms of HPLC quantitative determination for blank skin dialysate (a), huperzine A reference (b) and huperzine A microneedles skin dialysate (c)

扰, 方法的专属性良好。

**2.9.4 线性关系考察** 精密称取干燥至恒定质量的石杉碱甲 2.00 mg 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并加至刻度, 摇匀。精密吸取 10.0、7.5、5.0、2.5、1.0、0.5 mL 置于 10.0 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。按照上述色谱条件进行测定, 以石杉碱甲峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性回归, 得回归方程  $Y=0.7397X+0.513$ ,  $r=0.9999$ , 线性范围 1.00~20.00 μg/mL。

**2.9.5 精密度试验** 精密吸取石杉碱甲对照品溶液 20 μL, 照上述色谱条件测定, 重复进样 6 次, 测定其峰面积, RSD 为 1.99%。

**2.9.6 加样回收率试验** 精密移取含药基质 6 份, 加入 0.01 mol/L 盐酸 10 mL, 涡旋 2 min, 再以 3000 r/min 转速离心 5 min, 取上清液稀释后作回收率测定, 结果平均加样回收率为 99.43%, RSD 为 1.47%。

**2.9.7 重复性试验** 取石杉碱甲微针贴片 6 片, 将其溶解配制成质量浓度为 10.00 μg/mL 的供试品溶液, 过 0.22 μm 滤膜, 按照“2.9.1”项下色谱条件测定。结果显示, 石杉碱甲质量浓度为 (9.318±1.460) μg/mL, RSD 为 1.93%, 表明该方法重复性较好。

**2.9.8 稳定性试验** 取石杉碱甲供试品溶液, 于 0、4、8、12、24 h 取样, 按上述方法测定石杉碱甲峰面积, 结果测定显示, 5 个取样时间点的 RSD 为 0.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

## 2.10 石杉碱甲微针体外透皮研究

采用改良的 Franz 扩散池, 用离体大鼠皮肤进行体外透皮作用的研究。对健康大鼠麻醉后脱毛并立即处死, 采集背部皮肤样本, 除去皮下脂肪后, 用手术剪修剪成合适大小, 固定在扩散池上。微针采用“2.6”项下方法进行穿刺, 同时设置石杉碱甲溶液组作为对照, 盖上扩散池池盖, 用注射器往接收室中注入生理盐水 6.5 mL。在使用前进行脱气, 设定温度为 37 °C, 转速为 200 r/min。分别于透皮 0、1、2、4、8、12、24、36、48、60、72 h 后抽取全部接收室液体, 并补充相应的生理盐水。抽取的液体先经 0.22 μm 滤膜滤过, 后取 20 μL 进入高效液相色谱仪检测。

微针在皮肤中能吸收组织间液发生溶胀, 并因此打开扩散通道以释放药物<sup>[29]</sup>。由图 8 可见, 在 0~4 h 时, 释放较为缓慢; 在 4~12 h 时, 释放速率显著提高; 在 12~36 h 时, 释放速率急剧上升。分析

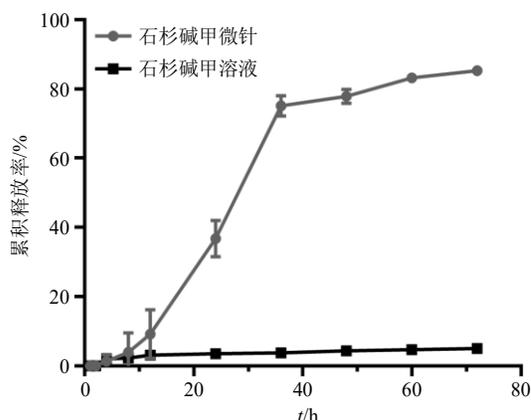


图8 石杉碱甲微针累积释放曲线 ( $n=3$ )

Fig. 8 *In vitro* cumulative release of huperzine A microneedles ( $n=3$ )

原因可能是一开始处于干燥状态的水凝胶微针在刺破角质层后在皮肤上形成微孔道,在0~4 h时,聚乙烯醇处于玻璃态;随着水凝胶逐渐接触皮肤间质液后发生溶胀并释放药物,药物的释放速率快速提高,在72 h时的累积释放率为 $(173.71 \pm 0.27) \mu\text{g}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ,药物透皮率达到85.31%。而石杉碱甲溶液组在72 h时的药物透皮率仅为5%,与石杉碱甲微针组对比可知,石杉碱甲微针贴片可显著提高药物的透皮效果。

### 3 讨论

本研究旨在采用物理交联法制备由聚乙烯醇和葡聚糖构成的复合水凝胶微针,开发一种新型的经皮递药系统来改善难溶性药物石杉碱甲的递送路径和效率,从而提高患者依从性、实现经皮缓释之目的。本研究选用韧性较好的聚乙烯醇和脆性较好的葡聚糖2种高分子材料,以反复冷冻-解冻法制备复合水凝胶,并考察了不同比例的聚乙烯醇和葡聚糖对水凝胶溶胀性能的影响。结果显示,聚乙烯醇-葡聚糖配比为9:1时,溶胀率明显较好;综合考察水凝胶的溶胀性能及性状,确定冷冻解冻循环3次作为最优工艺条件。考察微针基质材料不同质量浓度下复合水凝胶的拉伸强度、断裂伸长率以及制备成微针的可行性,确定背衬层最佳用量为0.08 g/mL聚乙烯醇-葡聚糖(9:1),针尖材料最佳用量为0.15 g/mL聚乙烯醇-葡聚糖(9:1)。

本研究所制微针形状较好,且具备合适的机械强度,皮肤实验证实了此微针能成功刺入皮肤,透皮实验显示了72 h内药物累积释放量大于85%。此外,本研究还采用无创简便的光学相干断层成像技术,将微针插入皮肤的过程实时记录下来,精确计

算其刺入皮肤的深度,提供了一种简便、快捷、可视化的新型测定手段。

综上所述,水凝胶微针制备简便、使用方便、前景光明,为难溶性药物石杉碱甲实现高效、无痛、缓释递送提供了一种新的策略。除此之外,药物通过微针进入皮内的扩散、吸收及代谢过程的机制还需进一步研究。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Ye J C, Zeng S, Zheng G L, *et al.* Pharmacokinetics of huperzine A after transdermal and oral administration in beagle dogs [J]. *Int J Pharm*, 2008, 356(1/2): 187-192.
- [2] Peng T T, Shi Y, Zhu C E, *et al.* Huperzine A loaded multiparticulate disintegrating tablet: Drug release mechanism of ethyl cellulose microparticles and pharmacokinetic study [J]. *Powder Technol*, 2019, 355: 649-656.
- [3] Ferreira A, Rodrigues M, Fortuna A, *et al.* Huperzine A from *Huperzia serrata*: A review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Phytochem Rev*, 2016, 15(1): 51-85.
- [4] Katie M. 2015 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimer's Dement*, 2015, 11(3): 332-384.
- [5] Sevigny J, Ping C A, Bussière T, *et al.* The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 50-56.
- [6] Prausnitz M R, Langer R. Transdermal drug delivery [J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(11): 1261-1268.
- [7] Prausnitz M R. Microneedles for transdermal drug delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2004, 56(5): 581-587.
- [8] Sivamani R K, Stoeber B, Liepmann D, *et al.* Microneedle penetration and injection past the stratum corneum in humans [J]. *J Dermatolog Treat*, 2009, 20(3): 156-159.
- [9] Larrañeta E, Lutton R E M, Woolfson A D, *et al.* Microneedle arrays as transdermal and intradermal drug delivery systems: Materials science, manufacture and commercial development [J]. *Mat Sci Eng R*, 2016, 104: 1-32.
- [10] Ye Y, Yu J, Wen D, *et al.* Polymeric microneedles for transdermal protein delivery [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2018, 127: 106-118.
- [11] Kim Y T, Il Ahn S, Park H J, *et al.* Microneedle-mediated transdermal delivery of chondroitin sulfate [J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2009, 6(4-11): 756-761.
- [12] Chen J M, Guo L, Qiu Y Q, *et al.* Fabrication of biodegradable polymer microneedles for transdermal drug

- delivery applications [J]. *Nanotechnol Prec Eng*, 2013, 11(5): 402-409.
- [13] Amodwala S, Kumar P, Thakkar H P. Statistically optimized fast dissolving microneedle transdermal patch of meloxicam: A patient friendly approach to manage arthritis [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 104: 114-123.
- [14] Jiruedee S, Luangweera W, Sookyu B, *et al.* Investigation of optimal silk film thickness in silk microneedle fabrication [J]. *Appl Mech Mater*, 2015, 752/753: 177-181.
- [15] Park Y H, Ha S K, Choi I, *et al.* Fabrication of degradable carboxymethyl cellulose (CMC) microneedle with laser writing and replica molding process for enhancement of transdermal drug delivery [J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2016, 21(1): 110-118.
- [16] Kim S, Lee J, Shayan F L, *et al.* Physicochemical study of ascorbic acid 2-glucoside loaded hyaluronic acid dissolving microneedles irradiated by electron beam and gamma ray [J]. *Carbohydr Polym*, 2018, 180: 297-303.
- [17] Sun W C, Inayathullah M, Manoukian M A, *et al.* Transdermal delivery of functional collagen via polyvinylpyrrolidone microneedles [J]. *Ann Biomed Eng*, 2015, 43(12): 2978-2990.
- [18] Justin R, Chen B Q. Multifunctional chitosan-magnetic graphene quantum dot nanocomposites for the release of therapeutics from detachable and non-detachable biodegradable microneedle arrays [J]. *Interface Focus*, 2018, 8(3): 20170055.
- [19] Xiang Z L, Yen S C, Xue N, *et al.* Ultra-thin flexible polyimide neural probe embedded in a dissolvable maltose-coated microneedle [J]. *J Micromech Microeng*, 2014, 24(6): 065015.
- [20] Fukushima K, Ise A, Morita H, *et al.* Two-layered dissolving microneedles for percutaneous delivery of peptide/protein drugs in rats [J]. *Pharm Res*, 2011, 28(1): 7-21.
- [21] Allen E A, O'Mahony C, Cronin M, *et al.* Dissolvable microneedle fabrication using piezoelectric dispensing technology [J]. *Int J Pharm*, 2016, 500(1/2): 1-10.
- [22] Garland M J, Caffarel-Salvador E, Migalska K, *et al.* Dissolving polymeric microneedle arrays for electrically assisted transdermal drug delivery [J]. *J Control Release*, 2012, 159(1): 52-59.
- [23] Feng R R, Fu R Z, Duan Z G, *et al.* Preparation of sponge-like macroporous PVA hydrogels via n-HA enhanced phase separation and their potential as wound dressing [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2018, 29(12): 1463-1481.
- [24] Liu J, Li Q, Su Y, *et al.* Characterization and swelling-deswelling properties of wheat straw cellulose based semi-IPNs hydrogel [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, 107: 232-240.
- [25] 窦学文. 用于胰岛素透皮给药的相转化水凝胶微针点阵的制备 [D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [26] 严琴英, 张正晗, 杨根生, 等. 一种装载药物的可溶性微针贴片及其制备方法: 中国, CN109701152A [P]. 2019-05-03.
- [27] Vassilieva E V, Kalluri H, McAllister D, *et al.* Improved immunogenicity of individual influenza vaccine components delivered with a novel dissolving microneedle patch stable at room temperature [J]. *Drug Deliv Transl Res*, 2015, 5(4): 360-371.
- [28] Sun H H, Zhang Y L, Chen P, *et al.* Synchronous fingerprint acquisition system based on total internal reflection and optical coherence tomography [J]. *IEEE Trans Instrum Meas*, 2020, 69(10): 8452-8465.
- [29] Kearney M C, Caffarel-Salvador E, Fallows S J, *et al.* Microneedle-mediated delivery of donepezil: Potential for improved treatment options in Alzheimer's disease [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 103: 43-50.

[责任编辑 郑礼胜]