

雷公藤甲素双室可溶性微针的工艺研究及评价

陈欢欢^{1,2}, 宋信莉^{1,2*}, 汪云霞^{1,2}, 刘文³, 张永萍^{1,2}, 韩伟^{1,2}, 吴静澜^{1,2}, 刘兴德¹, 石佳楠^{1,2}, 杨小双^{1,2}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学药学院, 国家苗药工程技术研究中心, 贵州中药炮制与制剂工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州医科大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: 目的 研究雷公藤甲素双室可溶性微针制备工艺, 并进行质量评价及体外透皮性能的考察。方法 以硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)与羟丙基甲基纤维素(hydroxypropyl methylcellulose, HPMC)为针尖材料, 聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP) K30与聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA)为背衬材料。采用两步离心法制备双室载药微针, 单因素试验及Box-Behnken设计-响应面法, 优选针尖层、背衬层工艺参数。光学显微镜、电子扫描显微镜表征双室载药微针, 倒置荧光显微镜观察药物分布, HPLC法测定载药量, 大鼠体内外皮肤穿刺考察机械性能; 采用Franz扩散池考察其体外透皮性能。结果 双室载药微针的最优处方为40%乙醇-水溶液为药物溶剂; 针尖工艺参数: HPMC与CS的比例为1:4, 材料与溶剂的比例为1:1, 针尖药物总质量浓度为6 mg/mL; 背衬工艺参数: PVA与PVP K30的比例为1:2, 材料与溶剂的比例为1:2, 微针离心时间10 min, 背衬药物总质量浓度为0.5 mg/mL。制备的双室载药微针外观形态、机械性能良好; 针尖部位的药物主要分布于针尖尖端, 背衬药物有些许下渗至针尖2/3处; 每片含药量为(218.88±0.10) μg; 体外透皮实验表明, 72 h内雷公甲素累积透皮率达98%。结论 雷公藤甲素双室载药的设计, 增大载药量的同时还具有良好的缓释作用, 该设计可为中药微针的研究奠定实验基础。

关键词: 雷公藤甲素; 双室可溶性微针; Box-Behnken设计; 质量评价; 体外透皮性能; 硫酸软骨素; 羟丙基甲基纤维素; Box-Behnken设计-响应面法; 聚乙烯吡咯烷酮; 聚乙烯醇

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)09-2668-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.09.009

Study and evaluation of the technology of double-chamber soluble microneedle of triptolide

CHEN Huan-huan^{1,2}, SONG Xin-li^{1,2}, WANG Yun-xia^{1,2}, LIU Wen³, ZHANG Yong-ping^{1,2}, HAN Wei^{1,2}, WU Jing-lan^{1,2}, LIU Xing-de¹, SHI Jia-nan^{1,2}, YANG Xiao-shuang^{1,2}

1. Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Traditional Chinese Medicine Processing and Preparation Engineering Technology Research Center, National Miao Medicine Engineering Technology Research Center, School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

Abstract: Objective To study the preparation process of triptolide double-compartment dissolving microneedles, and to evaluate the quality and investigate the transdermal performance *in vitro*. **Methods** Chondroitin sulfate (CS) and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) were used as needle tip materials, and polyvinylpyrrolidone K30 (PVP K30) and polyvinyl alcohol (PVA) were used as backing materials. Two-step centrifugation method was used to prepare dual-chamber drug-loaded microneedles. Single factor

收稿日期: 2021-11-11

基金项目: 贵州省特色功能食品与中药制剂开发攻关大平台(黔教合KY字[2020]006); 贵州中医药大学药用高分子材料研究中心(贵中医党办发[2019]70号); 贵中医博士启动基金资助项目([2021]14号); 贵州省国内一流学科建设项目(GNYL[2017]008); 贵州省药物新剂型新工艺科技创新人才团队项目(黔科合平台人才[2017]5655)

作者简介: 陈欢欢(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新技术与新制剂研究。Tel: 18300859589 E-mail: 1416522157@qq.com

*通信作者: 宋信莉(1982—), 女, 硕士生导师, 教授, 主要从事中药新技术与新制剂研究开发。E-mail: 392347047@qq.com

experiment and Box-Behnken design response surface method were used to optimize the process parameters of tip layer and backing layer. The dual-chamber drug-loaded microneedles were characterized by optical microscope and electron scanning microscope. The drug distribution was observed by inverted fluorescence microscope. The drug loading was measured by HPLC. *In vitro* and *in vivo* skin puncture was used to investigate the mechanical properties. Franz diffusion cell was used to investigate its *in vitro* transdermal properties. **Results** The optimal formulation of dual-chamber drug-loaded microneedles was 40 % ethanol water solution as drug solvent. Needle tip process parameters was that the ratio of HPMC to CS was 1:4, the ratio of material to solvent was 1:1 and the needle tip drug concentration was 6 mg/mL. Backing process parameters is that the ratio of PVA to PVP K30 was 1:2, the ratio of material to solvent was 1:2, the microneedle centrifugation time was 10 min and the drug concentration of the backing drug was 0.5 mg/mL. The prepared dual-chamber drug-loaded microneedles have good appearance and mechanical properties. The drug at the needle tip was mainly distributed at the tip of the needle tip and the backing drug was slightly infiltrated to 2/3 of the needle tip. The drug content of each tablet was $(218.88 \pm 0.10) \mu\text{g}$. The *in vitro* transdermal experiment showed that the cumulative transdermal rate of ratiacin within 72 h reached 98%. **Conclusion** The double-chamber drug-loading design of triptolide can increase the drug-loading capacity and also has a good sustained-release effect, which can lay an experimental foundation for the research of traditional Chinese medicine microneedle.

Key words: triptolide; double-compartment dissolving microneedles; Box-Behnken design; quality evaluation; *in vitro* transdermal properties; chondroitin sulfate; hydroxypropyl methyl cellulose; Box-Behnken design response surface methodology; polyvinylpyrrolidone; polyvinyl alcohol

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是以多发性、对称性关节病变为主要表现的一种慢性、全身性的自身免疫性疾病^[1]。雷公藤具有祛风除湿、通络止痛等功效, 临床上多用于治疗类风湿性关节炎、紫癜性肾炎、湿疹等免疫性疾病, 在风湿免疫性疾病及肾脏病领域显现出独到的疗效^[2]。研究表明雷公藤抗 RA 的主要活性成分是雷公藤甲素 (triptolide, TP)、雷公藤红素等^[3]。其中, TP 能有效降低炎症因子的表达、炎性细胞的浸润、调节相关信号通路发挥抗炎及免疫抑制^[4-5], 从而表现出良好地抗 RA 作用。然而, TP 水溶性差, 体内消除快, 不良反应大, 长期服用对肾脏、生殖系统、肝脏等表现出不同程度的毒副作用^[6-7], 一定程度上限制其临床运用。因此, 研究 TP 经皮给药制剂具有一定意义。可溶性微针 (dissolving microneedles, DMNs) 可有效穿透皮肤角质层, 增大药物透过量及透过速率, 近年来已成为经皮给药热点研究方向^[8-10]。将 TP 与微针技术相融合的报道已不再陌生, 有学者报道使用滚轮微针、可溶性微针技术可增大 TP 的透过量^[11-12]。然而现阶段的 DMNs 仅针尖载药、载药量小, 难以达到临床起效剂量, 并且释药速度快, 难以实现传统经皮制剂长期缓慢释药的作用。

前期的研究发现, 针尖层与背衬层均载药的双室 DMNs (double-compartment DMNs, DC-DMNs) 较仅针尖载药的 DMNs 具有长期缓释作用^[13]。因此, 开发双室载药且具有长期缓释作用的 DMNs 可有效解决现阶段 DMNs 存在的关键技术问题。

为使制备出的双室 DMNs 针尖具有理想的机械强度, 背衬柔韧、平整, 选择复合材料作为针尖及背衬基质材料。目前常用的基质材料有硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS)、透明质酸、聚乙烯醇 (polyvinyl alcohol, PVA)、羧甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮 (polyvinylpyrrolidone, PVP)、羟丙基甲基纤维素 (hydroxypropyl methylcellulose, HPMC) 等^[14]。通过预实验摸索, 本研究选用 CS 与 HPMC 作为针尖基质材料, 聚乙烯醇与 PVP 作为背衬材料。通过单因素及 Box-Behnken 设计响应面法, 优选雷公藤甲素双室可溶性微针 (triptolide double-compartment dissolving microneedles, TP-DC-DMNs) 最佳工艺参数, 并对其表征及体外透皮研究, 为 TP 经皮制剂的研制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体质量 180~240 g, SPF 级, 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。所有动物实验遵循贵州中医药大学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。

1.2 药物与试剂

TP 对照品, 质量分数 99.3%, 北京中科质检生物技术有限公司, 批号 PCS-190910; CS, 江苏鑫瑞生物科技有限公司, 批号 20191028; HPMC, 合肥巴斯夫生物科技有限公司, 批号 BSF190719; PVA,

规格：超细粉，型号：医用中粘，上海臣启化工科技有限公司；PVP K30；尼罗红（质量分数 98%，批号 L2003064）、香豆素 6（质量分数 98%，批号 I2009081），阿拉丁试剂上海有限公司；氯化钠注射液（规格：0.9%，贵州科伦药业有限公司，批号 H20033939；无水乙醇（分析纯，批号 20210120）；乙腈（色谱纯，批号 20200616），国药集团化学试剂有限公司；磷酸，分析纯，萍乡市白狮化学试剂有限责任公司，批号 20181210。

1.3 仪器

TD5A-120 台式低速离心机，常州金坛良友仪器有限公司；KQ-500DE 数控超声波清洗器，昆山市超声仪器有限公司；AE/240 十万分之一电子天平，梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；SIPTOP 光学显微镜，宁波舜宇仪器有限公司；RYJ-12B 药物透皮扩散试验仪，上海黄海药检仪器有限公司；Agilent 1260 高效液相色谱仪，美国 Agilent 公司；PDMS 微针模具，圆锥形，针长 550 μm ，直径 300 μm ，针间距 700 μm ，阵列 20 \times 20，台州薇凯生物科技有限公司；CKX53 倒置荧光显微镜，日本 Olympus 公司。

2 方法与结果

2.1 DC-DMNs 基本制备工艺流程

基于前期预实验及文献研究，采用两步离心法制备双室可溶性微针^[15]。第 1 步：针体的制备。将 CS 与 HPMC 混合材料充分溶胀于水中（或含 TP 溶液中），置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 1 h，使其充分溶胀。取 500 μL 针体基质溶液浇筑在 PDMS 微针模具凹槽表面，4000 r/min 离心（离心半径 13.5 cm）10 min 使其完全填充后，药匙刮去针尖外多余的基质溶液，干燥器室温干燥 30 min；第 2 步：背衬层的制备。将微针模具取出，取过夜已充分溶胀的 PVA 与 PVP K30 背衬基质溶液（或含 TP 基质溶液）0.5 mL，相同条件下离心处理，去除基质溶液中的气泡，回收多余基质溶液，干燥器室温干燥 24 h。

2.2 TP 分析方法的建立

2.2.1 色谱条件 基于文献研究^[16]及结合实际情况，优选出色谱条件为 Agilent Zprbax SB-C₁₈（250 mm \times 4.68 mm，5 μm ）色谱柱；流动相为 0.2%磷酸水溶液-乙腈；等度洗脱：0~10 min，60%乙腈；体积流量 1 mL/min；柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ ；检测波长 220 nm；进样量 10 μL 。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取 TP 对照品

10.0 mg，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并定容，得到质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品储备液，再吸取 0.5 mL 储备液，定容于 10 mL 量瓶中，得到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取制备好的载药微针放入 25 mL 量瓶中，加一定量甲醇超声处理 1 h 后定容，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.2.4 空白微针供试品溶液的制备 取制备好的空白微针置于 25 mL 量瓶中，加一定量甲醇超声处理 1 h 后定容，经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，即得空白微针供试品溶液。

2.2.5 线性关系的考察 取 TP 对照品储备液，用甲醇稀释，配制质量浓度分别为 4、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列 TP 对照品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，以对照品质量浓度为横坐标（ X ），峰面积为纵坐标（ Y ）进行线性回归，得回归方程为 $Y=20.829 X-31.647$ ， $r=0.999 7$ ，表明 TP 在 4.00~100.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性关系良好。

2.2.6 精密度试验 取低、中、高质量浓度（4、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的 TP 对照品溶液，每个质量浓度同日内进样 5 次，连续进样 3 d，考察日内、日间精密度。计算得低、中、高质量浓度 TP 的日内 RSD 分别为 1.74%、1.38%、2.12%，日间 RSD 分别为 1.65%、0.91%、1.76%，日内、日间 RSD 均符合要求，方法精密度良好。

2.2.7 稳定性试验 取供试品溶液分别于 0、2、4、8、12、24 h 进样，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，测得 TP 峰面积的 RSD 为 0.6%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.8 重复性试验 取同一批 TP-DC-DMNs 6 份，按“2.2.3”项下方法平行制备供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱方法连续进样，记录峰面积，测得 TP 质量分数的 RSD 为 1.14%，说明重复性良好。

2.2.9 加样回收率试验 取 9 份空白微针，置于 25 mL 量瓶中，分别精密量取高、中、低质量浓度的对照品溶液（按照供试品溶液中 TP 含量的 80%、100%、120%配制而得），HPLC 测定 TP 含量，计算得平均加样回收率为 100.49%，RSD 为 1.25%，说明回收率较高。

2.2.10 专属性考察 将“2.2.2”项下制备的 3 种溶液（TP 对照品溶液、供试品溶液、空白微针供试品溶液）按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，结果如图 1 所示，在目标成分出峰处空白微针溶液色谱峰

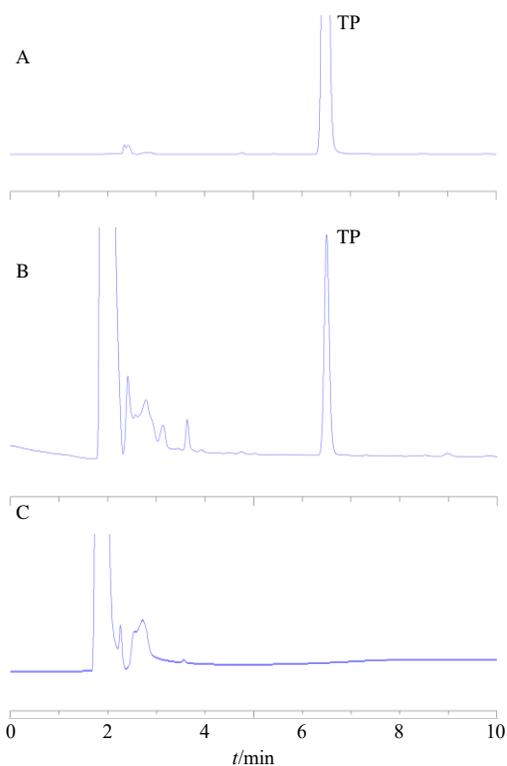


图1 TP对照品(A)、TP-DC-DMNs样品(B)和空白微针(C)的HPLC图

Fig. 1 HPLC of TP reference substance (A), TP-DC-DMNs sample (B), and blank microneedle (C)

无吸收,说明辅料对本测定无干扰,该方法具有良好的专属性。

2.3 单因素试验考察 TP-DC-DMNs 制备工艺

2.3.1 单因素评价指标 TP极性小,易溶于甲醇、无水乙醇、氯仿等溶剂,极难溶于水。然而,本研究选用的基质材料均为水溶性材料,为使制备出的基质溶液(或含药基质溶液)具有较好的流动性以利于浇筑微针模具,需要药物与材料同时具有较好的溶解性。此外,基于前期的研究^[13]及文献报道^[17],微针良好的外观形态及刺孔率是评价微针硬度、机械性能的重要指标。因此,本研究以药物的溶解情况、基质溶液的流动性、微针外观形态、刺孔率为评价指标,单因素法优选仅针尖载药针尖层工艺参数。刺孔率根据公式(刺孔率=皮肤上针孔数/微针阵列数)计算。具体评价标准见表1。

2.3.2 溶解药物溶剂的筛选为使药物与溶剂均具有较好的溶解性且满足实际运用,本研究采用乙醇-水溶液作为溶解药物的溶剂。以“2.3.1”项方法为评价指标,考察当以药物量为6 mg,基质比例为2:3、基质与溶剂比例为1:1时,最佳适宜体积分数的乙醇水溶液,结果见表2。由表2可知,含醇量为40%、80%时总评分最高,然而含醇量80%时,

表1 双室微针针尖工艺层评价标准

Table 1 Evaluation criteria for the process layer of the dual-chamber microneedle tip

评价指标	评价标准
药物溶解情况	完全溶解:溶液澄清透明(2分);混悬液状态(1分);未完全溶解:有药物颗粒存在(0分)
基质溶液流动性	好:具有一定流动性(1分);差:过稀影响微针成型或过干难以填充(0分)
微针外观形态	好:阵列整齐、针尖完好,背衬平整(1分);差:阵列不整齐、针尖缺损、背衬皱缩或卷曲(0分)
皮肤刺孔率	皮肤上针孔数与微针阵列数的比值>90%(3分);皮肤上针孔数与微针阵列数的比值80%~90%(2分);皮肤上针孔数与微针阵列数的比值70%~80%(1分);皮肤上针孔数与微针阵列数的比值<70%(0分)

表2 溶剂筛选结果

Table 2 Solvent screening results

乙醇体积分数/%	评分		总分值
	TP溶解情况	基质溶液流动性	
10	0	1	1
20	0	1	1
30	0	1	1
40	1	1	2
50	1	0	1
60	1	0	1
70	1	0	1
80	2	0	2

基质液流动性差。最终选择40%乙醇水溶液作为溶解药物的溶剂。

2.3.3 针尖材料CS与HPMC比例的筛选分别以针尖材料CS与HPMC不同比例,按照“2.1”项方法,基质材料与溶剂比例为1:1,制备双室微针,按照“2.3.1”评价指标,筛选最佳针尖材料的比例。结果见表3。结果显示,2:3、4:1比例下的CS-HPMC总分值最高。但前者HPMC占比高,当取出使用后存放下次使用时发现,基质液的气味呈臭鸡蛋味,综合考虑选择CS-HPMC 4:1作为针尖材料比。

2.3.4 针尖材料(CS+HPMC)-溶剂(40%乙醇)

比例的筛选 分别以针尖材料-溶剂不同比例,按照“2.1”项方法,CS与HPMC比例4:1制备双室微针,按照“2.3.1”项评价指标,筛选最佳针尖材料与溶剂比例。结果见表4。根据总评分结果选择1:1为最佳针尖材料-溶剂比例。

表3 针尖材料CS与HPMC比例筛选结果

Table 3 Screening results of tip material ratio

CS-HPMC	评分			总分值
	基质溶液 流动性	微针外观 形态	皮肤刺 孔率	
1:1	0	/	/	0
1:2	1	0	1	2
1:3	1	0	1	2
2:1	0	/	/	0
2:3	1	1	3	5
3:1	0	/	/	0
3:2	0	/	/	0
4:1	1	1	3	5

“/”表示因基质溶液流动性差无法注模,无法继续后续实验,下表同
“/” indicates that injection molding cannot be performed due to poor matrix fluidity, and subsequent experiments cannot be continued, same as below

表4 针尖材料-溶剂比例筛选结果

Table 4 Screening results of tip material-solvent ratio

针尖材料- 溶剂	评分			总分值
	基质溶液 流动性	微针外观 形态	皮肤刺 孔率	
1:1	1	1	3	5
1:2	1	0	0	1
1:3	1	0	2	3
2:1	0	0	0	0
2:3	1	0	0	1
3:1	0	/	/	0
3:2	0	/	/	0

2.3.5 针尖载药质量浓度的筛选 根据前期研究及文献调研显示,随着所载药物量的增加,微针的机械强度会降低^[18]。因此,分别以针尖不同载药量,按照“2.1”项方法,CS与HPMC比例4:1,基质材料与溶剂比例为1:1制备双室微针,按照“2.3.1”项方法评价指标,筛选最佳针尖载药质量浓度,结果见表5。结果显示,当载药量为2、4、6 mg/mL时分值最高。但微针针尖载药量仅为微克级,为达到一定的药效,综合选择针尖载药6 mg/mL为最佳

药物质量浓度。

2.3.6 背衬材料PVA与PVP K30比例的筛选 固定针尖层参数,分别以背衬材料不同比例,按照“2.1”项方法,基质材料与溶剂比例为1:2,制备双室微针,按照“2.3.1”项方法评价指标,筛选最佳背衬材料的比例,结果见表6。根据总评分结果,选择1:2比例为背衬材料PVA-PVP K30最佳比例。

表5 针尖载药量筛选结果

Table 5 Screening results of needle tip drug loading

TP/ (mg·mL ⁻¹)	评分			总分值
	基质溶液 流动性	微针外观 形态	皮肤刺 孔率	
2	1	1	3	5
4	1	1	3	5
6	1	1	3	5
8	1	1	2	4
10	1	0	1	2
12	1	0	0	1

表6 背衬材料比例筛选结果

Table 6 Screening results of backing material ratio

PVA-PVP K30	评分			总分值
	基质溶液 流动性	微针外观 形态	皮肤刺 孔率	
1:1	1	0	1	2
1:2	1	1	3	5
1:3	1	1	2	4
2:1	1	0	1	2
2:3	1	1	2	4
3:1	0	/	/	0
3:2	0	/	/	0
4:1	0	/	/	0

2.3.7 背衬材料-溶剂比例的筛选 固定针尖层参数,分别以背衬材料-溶剂不同比例,按照“2.1”项方法,PVA-PVP K30比例为1:2,制备双室微针,按照“2.3.1”项评价指标,筛选最佳背衬材料-溶剂比例,结果见表7。根据总评分结果,选择1:2为最佳背衬材料-溶剂比例。

2.3.8 背衬载药质量浓度的筛选 固定针尖层参数,分别以背衬不同载药质量浓度,按照“2.1”项方法,PVA-PVP K30比例为1:2,基质材料与溶剂比例为1:2,制备双室微针,按照“2.3.1”项方法评价指标,筛选最佳背衬载药质量浓度,结果见表8。

表7 背衬材料-溶剂比例筛选结果

Table 7 Screening results of backing-solvent ratio

背衬材料- 溶剂	评分			总分值
	基质溶液	微针外观	皮肤刺	
	流动性	形态	孔率	
1:1	0	0	0	0
1:2	1	1	3	5
1:3	1	1	2	4
2:1	0	0	1	1
2:3	1	1	2	4
3:1	0	/	/	0
3:2	0	/	/	0

表8 背衬载药量筛选结果

Table 8 Screening results of backing drug loading

TP/ (mg·mL ⁻¹)	评分			总分值
	基质溶液	微针外观	皮肤刺	
	流动性	形态	孔率	
0.25	1	1	2	4
0.50	1	1	3	5
1.00	1	1	2	4

根据总评分结果,选择0.5 mg/mL为最佳背衬载药质量浓度。

2.3.9 微针背衬离心时间的筛选 当使用不同材料作为载药微针针尖层和背衬层时,离心后背衬材料会往下渗透而影响针尖的机械强度,不同的离心时间可能会直接影响药物在微针中的分布。因此,考

察微针背衬层的离心时间尤为重要。

固定针尖层参数,分别以背衬不同离心时间,按照“2.1”项方法,PVA-PVP K30 比例为1:2,基质材料与溶剂比例为1:2,背衬载药质量浓度为0.5 mg/mL 制备双室微针,按照“2.3.1”项方法评价指标,筛选最佳背衬离心时间,结果见表9。根据总评分结果,及考虑到实际生产运用中效率问题,选择离心10 min 为最佳背衬离心时间。

表9 背衬离心时间筛选

Table 9 Backing centrifugation time screening

背衬离心 时间/min	评分		总分值
	微针外观形态	皮肤刺孔率	
5	0	0	0
10	1	3	4
15	1	3	4
20	1	2	3
25	1	2	3
30	1	2	3

2.4 Box-Behnken 设计-效应面法优化 TP-DC-DMNs 制备工艺

2.4.1 试验设计 根据单因素试验考察结果,以皮肤刺孔率(Y)为评价指标,选取3个影响程度较高的因素,即针尖药物质量浓度(X₁)、背衬材料-溶剂比例(X₂)、背衬离心时间(X₃),采用 Box- Behnken 设计-响应面法设计试验,因素水平、试验设计及响应值见表10。

表10 Box-Behnken 设计-响应面法设计试验的因素水平、试验设计及响应值

Table 10 Box-Behnken design response surface method is used to design the factor level, test design and response value of test

序号	X ₁ /(mg·mL ⁻¹)	X ₂	X ₃ /min	Y/%	序号	X ₁ /(mg·mL ⁻¹)	X ₂	X ₃ /min	Y/%	序号	X ₁ /(mg·mL ⁻¹)	X ₂	X ₃ /min	Y/%
1	4 (-1)	1:2 (0)	5 (-1)	74	7	4 (-1)	1:3 (-1)	10 (0)	80	13	8 (+1)	1:2 (0)	15 (+1)	80
2	4 (-1)	1:2 (0)	15 (+1)	90	8	6 (0)	1:3 (-1)	15 (+1)	86	14	6 (0)	1:3 (-1)	5 (-1)	72
3	8 (+1)	2:3 (+1)	10 (0)	85	9	6 (0)	1:2 (0)	10 (0)	95	15	6 (0)	1:2 (0)	10 (0)	94
4	8 (+1)	1:3 (-1)	10 (0)	78	10	8 (+1)	1:2 (0)	5 (-1)	70	16	6 (0)	1:2 (0)	10 (0)	97
5	6 (0)	1:2 (0)	10 (0)	92	11	6 (0)	2:3 (+1)	5 (-1)	72	17	4 (-1)	2:3 (+1)	10 (0)	90
6	6 (0)	2:3 (+1)	15 (+1)	90	12	6 (0)	1:2 (0)	10 (0)	98					

2.4.2 二次多元回归模型的建立与显著性分析 Box-Behnken 软件对试验结果进行拟合,得Y二次多元回归方程为 $Y=95.20-2.62 X_1+2.63 X_2+7.25 X_3-0.75 X_1X_2-1.50 X_1X_3+1.00 X_2X_3-6.73 X_1^2-5.23 X_2^2-9.97 X_3^2$, $R^2=0.9611$, $P=0.0004$, 失拟度 $F=0.2276>0.05$ 。从拟合度r、模型显著性P和模型失拟度F判断,建立的预测模型较为可靠,可

以采用此模型对 TP-DC-DMNs 的工艺进行预测和分析。Y 回归方程的方差分析见表11。结果发现Y模型项P均<0.01,说明回归方程的关系是极显著的。对于Y模型方程,X₁、X₂、X₃、X₁X₃、X₁X₂、X₂X₃、X₁²、X₂²、X₃²都是显著项,是Y的显著影响因素,交互影响因素3D图见图2。F检验结果见表11。对于刺孔率Y,模型中X₁、X₂、X₃和X₁²、X₂²、X₃²

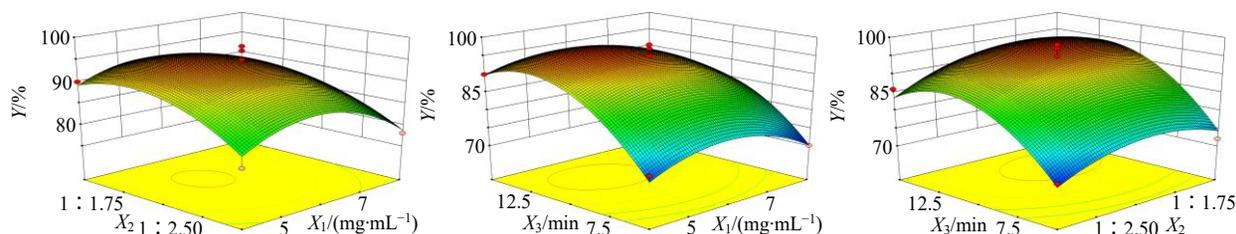


图2 工艺因素交互影响的响应面3D图

Fig. 2 3D diagram of response surface interaction

表11 响应面方差分析

Table 11 Response surface analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	F值	P值	方差来源	平方和	自由度	F值	P值	方差来源	平方和	自由度	F值	P值
模型	1 347.21	9	19.21	0.000 4	X_1X_2	2.25	1	0.29	0.607 7	X_2^2	114.95	1	14.75	0.006 4
X_1	55.13	1	7.07	0.032 5	X_1X_3	9.00	1	1.15	0.318 2	X_3^2	418.95	1	53.76	0.000 2
X_2	55.12	1	7.07	0.032 5	X_2X_3	4.00	1	0.51	0.496 9	残差	31.75	3	1.86	0.277 6
X_3	420.5	1	53.96	0.000 2	X_1^2	190.42	1	24.44	0.001 7					

均显著或极显著 ($P < 0.05$ 、 0.01)，其他不显著。
2.4.3 效应面优化、预测及验证 设置刺孔率最大值为200%，最小值为70%，得到优化后处方为 $X_1 = 5.49 \text{ mg/mL}$ ， $X_2 = 0.55$ ， $X_3 = 11.99 \text{ min}$ 。模型预测的刺孔率为97.38%。根据软件预测结果，再结合实验数据，确定TP-DC-DMNs的最佳处方为针尖药物质量浓度为6 mg/mL、背衬材料-溶剂比例为1:2、背衬离心时间为10 min。按上述优选出来的处方条件进行3次重复实验，结果3次实验的刺孔率分别为97%、94%、97%，平均值为96%，RSD为1.8%，与预测值相对误差为1.44%。

2.5 TP-DC-DMNs 表征

2.5.1 TP-DC-DMNs 机械强度考察

(1) 离体皮肤穿刺实验：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^[19]。使用前擦干水分，角质层侧朝上放置并固定在泡沫板上，将TP-DC-DMNs垂直作用2 min，随后立即用0.4%台盼蓝溶液染色，20 min

后用异丙醇洗去皮肤表面多余的染色剂，并用生理盐水清洗干净，观察皮肤表面染色小孔的情况。结果见图3。

(2) 在体皮肤穿刺实验：本研究主要涉及大鼠关节肌肉处皮肤和腹部皮肤。因此，分别考察TP-DC-DMNs对大鼠关节肌肉处皮肤和腹部皮肤的穿刺性能。分别用一定力度将TP-DC-DMNs垂直刺入大鼠光滑无毛关节肌肉处和腹部（实验前24 h采用动物脱毛机及脱毛膏进行脱毛处理），作用2 min后取下，采用智能手机拍照观察微针刺入皮肤的情况。皮肤穿刺结果如图3所示。结果表明，TP-DC-DMNs硬度合格，穿刺性能优良。

2.5.2 TP-DC-DMNs 的含药量测定 取同一批制备的6份TP-DC-DMNs分别置于25 mL量瓶中，加甲醇超声处理1 h并定容，经0.45 μm微孔滤膜滤过，按“2.2.1”项下色谱条件进样分析，计算每片TP-DC-DMNs的载药量。每片TP-DC-DMNs平均载TP $(218.88 \pm 0.10) \mu\text{g}$ 。

2.5.3 TP-DC-DMNs 形态特征 通过肉眼观察微针



图3 离体皮肤穿刺(×4.0, A)、在体大鼠腹部穿刺(×2.0, B)、在体大鼠关节肌肉处穿刺(×4.0, C)的照片图

Fig. 3 Photo map of *in vitro* skin puncture (× 4.0, A), *in vivo* rat abdomen puncture (× 2.0, B), *in vivo* rat joint muscle puncture (× 4.0, C)

阵列是否完好、背衬是否平整,光学显微镜及扫描电子显微镜观察其针体分布情况及外观形态,结果见图4。目视及显微镜下观察到的TP-DC-DMNs针尖完整无断裂,形态良好。

2.5.4 TP-DC-DMNs 药物分布观察 制备针尖载0.5 mg/mL 香豆素6,背衬载0.14 mg/mL 尼罗红,按照“2.1”项方法制备TP-DC-DMNs,于倒置荧光

显微镜下观察微针中药物的分布情况。结果如图5所示。针尖载香豆素6所产生的绿色荧光主要集中于针尖尖端,背衬载有的尼罗红在离心力的作用下下渗于2/3针尖处,与此处的绿色部分重叠镜下观察呈橙光。该结果初步说明本研究制备的TP-DC-DMNs,针尖载有的药物主要集中分布于针尖尖端,背衬载有的药物分布于针尖尖端外和背衬层。

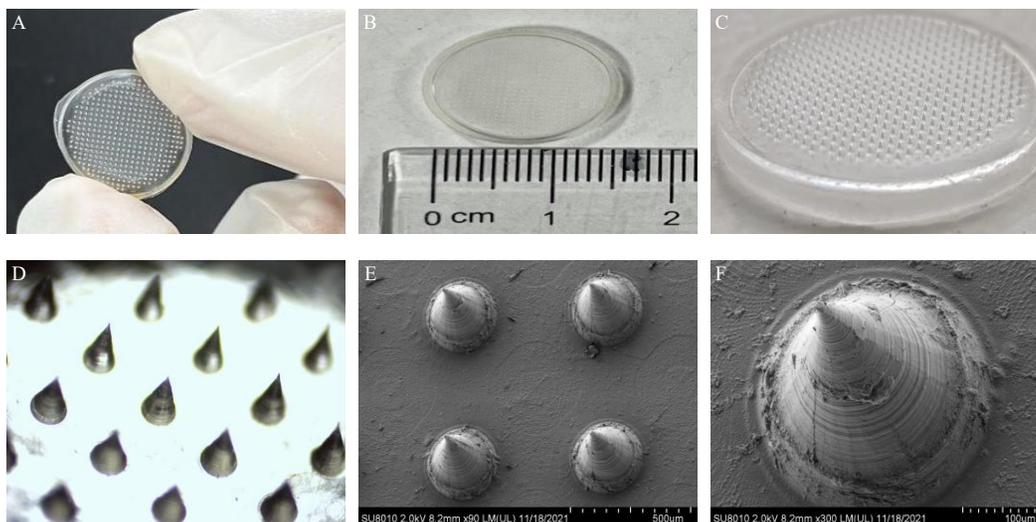


图4 目视TP-DC-DMNs外观形态(A~C)、光学显微镜下TP-DC-DMNs针尖外观形态(×40, D)、电子扫描显微镜下TP-DC-DMNs针尖外观形态(×90, E; ×300, F)

Fig. 4 Visual appearance of double-chamber soluble microneedles (A—C), double-chamber soluble microneedle tip appearance morphology under optical microscope (×40, D), double-chamber soluble microneedle tip appearance morphology under electron scanning microscope (×90, E; ×300, F)

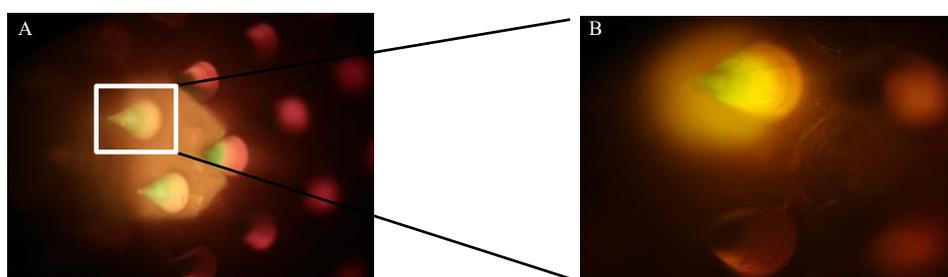


图5 倒置荧光显微镜下TP-DC-DMNs药物分布荧光图(×40, A; ×100, B)

Fig. 5 Fluorescence map of drug distribution under an inverted fluorescence microscope (×40, A; ×100, B)

2.6 TP-DC-DMNs 体外透皮渗透实验

采用改良的Franz扩散池,用离体大鼠皮肤进行体外透皮渗透实验。向立式透皮扩散仪(有效扩散面积为2.3 cm²,接收室容积为7 mL)内注入40%乙醇生理盐水作为接收液(为满足漏槽条件经前期预实验考察确定),同时超声排出接收室内多余的空气。将制得的TP-DC-DMNs(含TP约218.88 μg/片)施加一定的力度置于处理好的大鼠离体皮肤上2 min,用透气医用胶布将其固定。

处理完成后将皮肤置于接收室上,皮肤角质层朝上,皮肤组织朝向接收室,保证皮肤的有效扩散面积均与接收液的液面相接触,处理过程中须保证皮肤的完整性。增设1组仅针尖载药的TP组,即单室微针组(选择双室微针最终优化的工艺参数,按照“2.1”项下制备方法制备仅针尖载TP的单室微针,按照“2.3.5”项下筛选出的载药质量浓度为单室微针的载药质量浓度,实际含TP约75.42 μg/片),同时另设1组载药基质溶液组(吸取针尖基质

含药溶液 500 μL 、背衬含药基质溶液 0.5 mL, 保证药物含量同双室载药微针)。

以 300 r/min 的转速模拟人体皮肤下的血液和组织液内循环, 保持温度在 $(37 \pm 5)^\circ\text{C}$ 恒温。分别于透皮 0、0.5、1、2、4、6、8、12、24、36、48、72 h 取样 1 mL, 并补加等量等温的 40% 乙醇透皮接收液。按照“2.2.1”项下方法测定 TP 的含量, SPSS 20.0 软件进行数据处理, GraphPad Prism 8.0.2 绘制药物的累积释放曲线, 考察 TP-DC-DMNs 的体外释放特性。结果如图 6 所示。

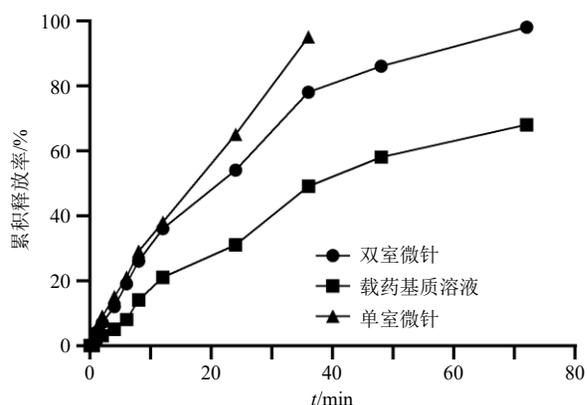


图 6 TP-DC-DMNs 累积释放曲线

Fig. 6 Cumulative release diagram of triptolide double-compartment soluble microneedles

TP-DC-DMNs 在 0~6 h 释放较为缓慢; 8~24 h 显著提高, 24~72 h 释放速率急剧提升, 72 h 药物的累积渗透率达到 98%。单室微针组 0~6 h 药物的释放同样缓慢, 8~24 h 的释放有所提升, 24 h 时累积渗透率达到 53%, 36 h 药物的渗透率达到 95%。载药基质溶液组 72 h 药物的累积渗透率仅达 68%。虽已有文献报道^[11], 雷公藤甲素单室微针已具备一定的缓释效果, 然而与背衬仍载药的双室微针组比较, 其缓释特性仍不及。微针作为可增大药物透皮吸收和速率的物理促渗技术, 与载药基质溶液组相比, 该技术一定程度上增加了 TP 的生物利用度。因此, 通过此实验可知, 双室微针不仅可改善药物的生物利用度, 且能达到更好的缓释效果。

3 讨论

本研究旨在制备针尖与背衬均载药的 TP-DC-DMNs, 以增大微针载药量及提高缓释特性。基于文献研究和预实验, 本实验选择 CS-HPMC 作为双室微针的针尖材料, PVA-PVP K30 为背衬材料。为达到针尖具有足够的机械性能以穿透皮肤, 背衬具有一定的柔韧性确保背衬与皮肤贴合, 对以上材料制

备的 TP-DC-DMNs 进行了工艺研究及评价。采用两步离心法制备双室微针, 以微针的刺孔率作为单因素考察和响应面优化的重要指标, 最终确定双室微针的工艺参数。针尖层: 针尖材料比例 4:1、材料与溶剂比例 1:1、载药质量浓度 6 mg/mL; 背衬层: 背衬材料比例 1:2、材料与溶剂比例 1:2、载药质量浓度 0.5 mg/mL, 背衬离心时间 10 min。制备出的 TP-DC-DMNs 针形良好、机械强度佳, 针尖药物主要分布于针尖尖端, 背衬药物因离心力的作用有部分下渗至针尖。体外透皮研究表明, 双室载药微针不仅可促进药物的渗透, 还具有长期缓释的作用。

微针针尖可在皮肤的角质层上形成微米级(或纳米级)的通道使药物顺利通过^[20-21]增加药物的透过量 and 渗透速率。在 TP-DC-DMNs 体外透皮实验过程中, 双室微针组、单室微针组中药物的累积渗透率较载药基质溶液组更高, 说明将 TP 与微针技术结合, 其生物利用度得到提升。双室微针组与单室微针组相比较, 单室微针组 36 h 药物已基本完全释放, 双室微针组 72 h 药物才释放完全。产生此结果的原因可能与微针的载药量和材料的选择有关。单室微针仅针尖载药, 载药量小, 故较背衬也载药的双室微针先将药物释放完全。此外, 双室微针具有长期缓释作用与本研究选用的背衬材料具有极大的相关性。本实验选用的背衬材料 PVA 作为一种骨架型的水溶性高分子材料可将药物包裹, 当其接触皮肤间质液后发生溶胀再将包裹的药物释放, 从而达到缓释的作用。

本课题组开发的 TP-DC-DMNs 提高了 TP 的生物利用度, 降低了给药天数, 同时微针微创型的给药特点还增大了患者的依从性。此外, 双室微针的给药策略还为毒性药物和给药剂量大如中药复方药物的经皮设计提供了思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘丹凯, 王强, 魏振权, 等. 昆明山海棠-鸡血藤药对治疗类风湿关节炎作用机制的网络药理学研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(19): 2639-2644.
- [2] 康冰亚, 赵熙婷, 杨亚蕾, 等. 雷公藤的药理作用及临床应用 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(6): 102-106.
- [3] 白雪, 付瑞嘉, 乐世俊, 等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 265-275.
- [4] Fan D P, Guo Q Q, Shen J W, et al. The effect of triptolide in rheumatoid arthritis: From basic research towards clinical translation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): 376.

- [5] 黄宇, 马全鑫, 凌云. 雷公藤甲素抗肿瘤药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(2): 328-333.
- [6] 严银银, 张振强, 曾华辉, 等. 雷公藤甲素的不良反应及减毒研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(11): 139-143.
- [7] 王锋, 张超, 郑栓. 具有线粒体靶向性的雷公藤甲素 TPP-PEG-PCL 脂质体的制备及其促肝肿瘤细胞凋亡研究 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7473-7483.
- [8] 陈欢欢, 宋信莉, 汪云霞, 等. 可溶性微针在经皮给药系统中的研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 48(16): 115-116.
- [9] 韩珍, 曾锐, 周平, 等. 载胰岛素白及多糖可溶性微针柔性贴片的制备和初步评价 [J]. 中草药, 2021, 52(7): 1906-1913.
- [10] 林宇建, 赖建辉, 韩兵, 等. 基于微透析技术的丹参酮 II_A 微针皮肤局部药动学研究 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 126-133.
- [11] 陈鑫, 张永萍, 徐剑, 等. 雷公藤甲素自溶性微针的制备及体外经皮渗透性研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5278-5283.
- [12] Chen G, Hao B H, Ju D H, *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic study of triptolide-loaded liposome hydrogel patch under microneedles on rats with collagen-induced arthritis [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(6): 569-576.
- [13] 汪云霞, 宋信莉, 陈欢欢, 等. 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 [J]. 中国药房, 2020, 31(17): 2112-2118.
- [14] 王彦琦, 涂家生, 孙春萌. 可溶性聚合物微针用于药物经皮递送的研究进展 [J]. 中国药事, 2020, 34(6): 671-679.
- [15] 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.
- [16] 余雅婷, 朱卫丰, 陈丽华, 等. 雷公藤甲素微乳凝胶的制备及体外透皮性能考察 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(13): 1087-1091.
- [17] 姚明杰, 赵锋, 马银玲, 等. Box-Behnken 法优化快速溶解性微针的制备工艺 [J]. 中国药学杂志, 2019, 54(20): 1677-1684.
- [18] Zhu Z Z, Luo H F, Lu W D, *et al.* Rapidly dissolvable microneedle patches for transdermal delivery of exenatide [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(12): 3348-3360.
- [19] 严琴英, 文娇丽, 翁嘉绮, 等. 石杉碱甲水凝胶微针的制备及经皮传递研究 [J]. 中草药, 2021, 52(12): 3530-3537.
- [20] Cahill E M, Keaveney S, Stuetgen V, *et al.* Metallic microneedles with interconnected porosity: A scalable platform for biosensing and drug delivery [J]. *Acta Biomater*, 2018, 80: 401-411.
- [21] Chen W, Tian R, Xu C, *et al.* Microneedle-array patches loaded with dual mineralized protein/peptide particles for type 2 diabetes therapy [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1):137-143.

[责任编辑 郑礼胜]