

微针对白脉软膏经皮渗透性及应用安全性研究

肖五庆¹, 梁 军¹, 竺楹银¹, 刘凯列², 钟宛凌¹, 杨天姿¹, 席 钺¹, 胡晓红¹, 武慧超^{1*}, 杜守颖^{1*}

1. 北京中医药大学, 北京 102488

2. 西藏奇正藏药股份有限公司, 西藏 林芝 860000

摘 要: **目的** 为改善白脉软膏经皮渗透性, 采用微针技术进行促透, 考察其对白脉软膏经皮渗透性和应用安全性的影响, 以筛选安全、有效的微针应用条件。**方法** 以小鼠腹皮作为实验材料, 采用改良的 Franz 扩散池进行体外渗透性评价, 计算不同微针条件下白脉软膏 3 个主要成分甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的 24 h 累积经皮渗透量及稳态透皮速率, 评估促透性能; 采用光学相干断层扫描法 (optical coherence tomography, OCT) 记录微针处理后 0、10、20、30、40、50、60、90、120 min 时的微孔道深度, 进而对皮肤损伤及恢复程度进行量化评分, 作为安全性评价依据。综合体外渗透性、皮肤损伤及恢复程度为评分指标 (权重分别占 40%、30%、30%), 运用正交试验设计将微针长度、作用力度和作用时间作为考察因素进行条件优化, 筛选适宜的微针条件。**结果** 3 个因素对综合评分的影响大小为微针长度 > 作用时间 > 作用力度, 最终筛选出的微针条件为微针长度 250 μm 、作用力度 5 N、作用时间 5 min。**结论** 综合考虑了微针对白脉软膏体外渗透性、皮肤损伤及恢复程度的影响, 为白脉软膏及微针促透的临床合理安全应用提供理论参考。

关键词: 白脉软膏; 微针; 经皮渗透; 光学相干断层扫描法; 综合评价; 甘草酸铵; 甘松新酮; 姜黄素

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)06-1766-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.06.008

Study on percutaneous permeability and application safety of microneedles targeting Baimai Ointment

XIAO Wu-qing¹, LIANG Jun¹, ZHU Ying-yin¹, LIU Kai-lie², ZHONG Wan-ling¹, YANG Tian-zi¹, XI Cheng¹, HU Xiao-hong¹, WU Hui-chao¹, DU Shou-ying¹

1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Tibet Cheezheng Tibetan Medicine Co., Ltd., Linzhi 860000, China

Abstract: **Objective** In order to improve the percutaneous permeability of Baimai Ointment (BO), microneedle technology was used to promote penetration, and its effects on the percutaneous permeability and application safety of BO were investigated to screen safe and effective microneedle application conditions. **Methods** The abdominal skin of mice was used as experimental material, and the improved Franz diffusion cell was used to evaluate the permeability *in vitro*. The 24 h cumulative transdermal penetration amount and steady-state percutaneous penetration rate of ammonium glycyrrhizinate, nardosinone and curcumin, the three main components of BO under different microneedle conditions, were calculated to evaluate the penetration performance. Optical coherence tomography (OCT) was used to record the depth of micropores at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, and 120 min after microneedle treatment, and then the degree of skin damage and recovery was quantified as the basis for safety evaluation. The external permeability, skin damage and recovery degree of the complex were taken as the scoring indexes (the weights were 40%, 30% and 30%, respectively). The length, action intensity and action time of the microneedle were used as the investigation factors to optimize the conditions by orthogonal experimental design, and the appropriate microneedle conditions were screened. **Results** The results showed that the influence of three factors on the comprehensive score was microneedle length > action time > action intensity,

收稿日期: 2022-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82104545); 国家重点研发计划 (2019YFC1712403); 中央高校基本科研业务费专项资金资助 (2020-JYB-ZDGG-024)

作者简介: 肖五庆 (1999—), 女, 硕士研究生, 从事中药新剂型和新技术研究。E-mail: bucmxiaowuqing@163.com

*通信作者: 杜守颖, 博士, 教授, 主要从事中药新剂型新技术研究。Tel: (010)84738615 E-mail: dushouying@263.net

武慧超, 博士, 助理研究员, 主要从事民族药研究。Tel: (010)64286010 E-mail: wuhuichao1011@126.com

and the final microneedle condition was microneedle length 250 μm , action force 5 N, action time 5 min. **Conclusion** In this paper, the effects of microneedle on the permeability, skin damage and recovery of BO *in vitro* were comprehensively considered to provide theoretical reference for rational and safe clinical application of BO and microneedle penetration promotion.

Key words: Baimai Ointment; microneedle; percutaneous penetration; optical coherence tomography; comprehensive evaluation; ammonium glycyrrhizinate; nardosinone; curcumin

白脉软膏是藏医基于白脉理论创制的经典外用制剂, 400 年前《藏医临床札记》便有记载, 应用历史悠久^[1]。其处方由姜黄、肉豆蔻、干姜等 11 味药组成^[2], 常用于治疗神经系统疾病、肌肉骨骼系统损伤和感觉功能障碍等, 有良好的临床疗效^[3-4]。然而, 临床常需要辅以电磁波、红外照射、推拿针灸等手段以促进药物透皮吸收^[5-7], 导致了其临床疗效的参差不一。同时在本课题组前期对白脉软膏的体外渗透性研究中, 也发现其主要活性成分的经皮透过量较低^[8], 课题组先后研究了常用化学促透剂和超声技术对白脉软膏 3 种主要成分的促透作用^[9], 2 种方式均改善了白脉软膏的经皮吸收, 但是二者对不同性质的成分的促透性能有所区别, 超声对水溶性成分甘草酸铵的促透效果良好, 而脂溶性成分甘松新酮和姜黄素更适合采用 3% 丙二醇促透, 为兼顾水溶性和脂溶性成分, 需要寻找更合适的促透方式。

微针可以穿透角质层并留下微小孔道, 具有显著的促渗效果, 同时不会触及神经而不产生痛感, 近年来已被广泛用于各类药物的经皮给药, 尤其是大分子蛋白质^[10]、肽类^[11]、DNA^[12]等, 也见于中药成分的透皮给药^[13-14]。目前, 关于微针的研究也愈加广泛深入, 如几何形状、尺寸、材料、作用方式、作用皮肤等, 但是将促透效果与安全性结合的综合评价研究还较为匮乏。在临床中, 需要同时考虑微针使用的安全性问题, 不同参数的微针在皮肤形成的孔道不一, 而孔道的闭合是影响药物渗透和安全性的关键因素^[15]。光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 是测试微针刺入皮肤微孔参数最常用的技术手段之一, 利用生物组织内部光学反射特性的空间变化进行成像^[16], 由于不需要对组织进行处理破坏、允许实时原位成像、探测灵敏度高等优点, 也被称为“光学活检”^[17-18]。

本实验考察微针对白脉软膏的促透效果, 采用改良的 Franz 扩散池法研究白脉软膏主要成分的体外渗透性, 通过 OCT 系统观察微孔道变化, 结合皮肤的损伤及恢复程度进行综合评价, 基于正交试验对微针长度、作用力度及作用时间进行优选, 以筛

选最适宜的微针促透条件, 为白脉软膏及微针促透的临床合理安全应用提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, TCC-3000SD 型检测器, 四元低压梯度泵, 柱温箱, 自动进样器, 赛默飞世尔科技有限公司, Chromeleon 7 型色谱工作站; TK-121 型药物透皮扩散试验仪, 配套改良 Franz 扩散池, $R=1.0\text{ cm}$, $S=3.14\text{ cm}^2$, $V=20\text{ mL}$, 天津市正通科技有限公司; 扫频 OCT (Swept-source OCT, SS-OCT) 系统, 北京理工大学自研; RE-539C 型雷瓦电动理发器, 上海雷瓦电器有限公司; DRS Dermaroller System 滚轮微针, 250、500、750 μm , 圆锥状金属针形, 针孔密度为 60 针/ cm^2 , 广州市名摩贸易有限公司。

1.2 材料

白脉软膏, 批号 170915, 西藏奇正藏药股份有限公司; 对照品甘草酸铵 (批号 110731-201720, 质量分数 93.0%)、甘松新酮 (批号 111832-201704, 质量分数 98.2%)、姜黄素 (批号 110823-201706, 质量分数 98.7%) 均购自中国食品药品检定研究院。乙腈、磷酸, 色谱纯, Fisher 公司; 纯净水, 娃哈哈集团有限公司; 聚乙二醇 400, 天津市福晨化学试剂厂, 分析纯; 氯化钠注射液, 石家庄四药有限公司; 其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

雄性昆明种 (KM) 小鼠, SPF 级, 体质量为 $(20\pm 2)\text{ g}$, 北京斯贝福生物技术有限公司提供, 合格证号 SCXK (京) 2016-0002, 所有动物实验遵循北京中医药大学动物实验伦理委员会关于实验动物管理和使用的规定, 动物实验伦理批准号为 BUCM-4-2019101701-4001。

2 方法与结果

2.1 微针处理及微孔道深度测定

2.1.1 离体皮肤的制备 以雄性 KM 小鼠的腹部皮肤作为透皮材料, 小鼠颈椎脱臼处死, 先后用电动剃毛器和脱毛膏脱毛。剪下腹部皮肤, 用浸湿生理盐水的棉球除去皮下组织和脂肪, 选取无破损的完

整皮肤,用生理盐水冲洗干净,封装于锡箔纸中, -20°C 冻存储用(1周内使用)。

2.1.2 微针处理方法 准备适当厚度的土豆切片(厚度均匀、切面平整),将小鼠离体皮肤置于切片之上,使皮肤里层与其充分贴合,将载有皮肤的土豆片置于电子天平上,用滚轮微针在皮肤的有效给药面积内反复滚动,滚动频率为 16 次/min。

2.1.3 微孔道深度测定方法 光学相干断层扫描系统常用来评价孔道的形成与闭合^[15],结构示意图见图 1。小鼠皮肤经微针处理后立即置于 OCT 系统下进行扫描,移动载物平台,找到微孔道,设置扫描光源中心波长为 1310 nm,纵向分辨率为 10 μm ,横向分辨率为 22 μm ,扫描范围 9.3 mm $\times$ 9.3 mm,扫描频率为 100 kHz,输出功率为 20 mW,分别于 0、10、20、30、40、50、60、90、120 min 进行拍照采集,测量微孔道深度。

2.2 微针促透条件优选的正交试验设计

选取影响微针透皮效果及安全性的 3 个主要因

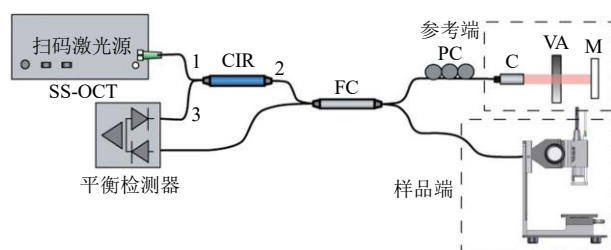


图 1 OCT 实验系统

Fig. 1 OCT experimental system

表 1 微针促透正交试验设计与结果

Table 1 Results of microneedle penetration orthogonal test

实验 序号	因素				得分			综合评分/ %
	A/ μm	B/N	C/min	D(误差)	渗透性评分	皮肤损伤程度评分	皮肤恢复程度评分	
S1	250 (1)	1 (1)	1 (1)	(1)	2.90	0.40	1.00	37.15
S2	250 (1)	3 (2)	3 (2)	(2)	4.69	0.60	1.00	41.90
S3	250 (1)	5 (3)	5 (3)	(3)	9.15	2.10	0.86	42.46
S4	500 (2)	1 (1)	3 (2)	(3)	4.84	1.20	0.92	35.73
S5	500 (2)	3 (2)	5 (3)	(1)	9.82	3.40	0.76	32.91
S6	500 (2)	5 (3)	1 (1)	(2)	7.17	2.60	0.92	34.14
S7	750 (3)	1 (1)	5 (3)	(2)	5.50	2.30	0.83	27.61
S8	750 (3)	3 (2)	1 (1)	(3)	5.50	1.70	0.71	28.30
S9	750 (3)	5 (3)	3 (2)	(1)	11.66	4.30	0.70	31.00
K ₁	121.51	100.49	99.59	101.06				
K ₂	102.78	103.11	108.63	103.65				
K ₃	86.91	107.60	102.98	106.49				
R	34.60	7.11	9.04	5.43				

素^[15],包括微针长度(A)、作用力度(B)及作用时间(C),每个因素设置 3 个水平,具体范围参考 Huang 等^[19]的实验,因素水平、实验设计与结果见表 1。改变微针长度、作用力度及作用时间,进行 3 因素 3 水平的 $L_9(3^4)$ 正交试验(压力 $F=mg$, m 即天平所显示的稳定读数,微针滚动时保持平衡,将天平示数控制在 $\pm 20\%$ 的误差内, $g=9.8\text{ N/kg}$),不进行微针处理的作为空白组。

2.3 甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的定量测定

2.3.1 对照品溶液的制备 取甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素对照品适量,精密称定,加甲醇制得含甘草酸铵 46.240 $\mu\text{g/mL}$ 、甘松新酮 3.704 $\mu\text{g/mL}$ 、姜黄素 3.280 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.3.2 白脉软膏接收液供试品溶液的制备 用改良的立式 Franz 扩散池,供给池半径为 1.0 cm,渗透面积为 3.14 cm^2 ,接收池容积为 20 mL。将干净完整的小鼠皮肤置于透皮扩散池的两室之间,使皮肤角质面向供给室,皮肤里层与接收液(根据课题组前期筛选结果^[2,8],选择 30%聚乙二醇-30%乙醇-40%生理盐水为接收液)保持紧密接触。准确称取白脉软膏 1 g 均匀涂布于皮肤表面,接收室加入 20 mL 接收液,恒温($37.0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$),搅拌速度 350 r/min,于透皮 24 h 取样 1 mL,以 24 h 的透皮接收液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,即得供试品溶液。

2.3.3 色谱条件 参照课题组前期建立的高效液相色谱法,对透皮液中的 3 个主要成分甘草酸铵、甘

松新酮、姜黄素进行定量^[2,8]。Waters Xselect® HSS T₃ C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈-0.1%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 22%乙腈; 10~15 min, 22%~50%乙腈; 15~35 min, 50%~55%乙腈; 35~40 min, 55%~71%乙腈; 40~50 min, 71%~95%乙腈; 50~55 min, 95%乙腈; 55~60 min, 95%~22%乙腈; 柱温 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长 237、254、430 nm, 进样体积 25 μL。色谱图见图 2。

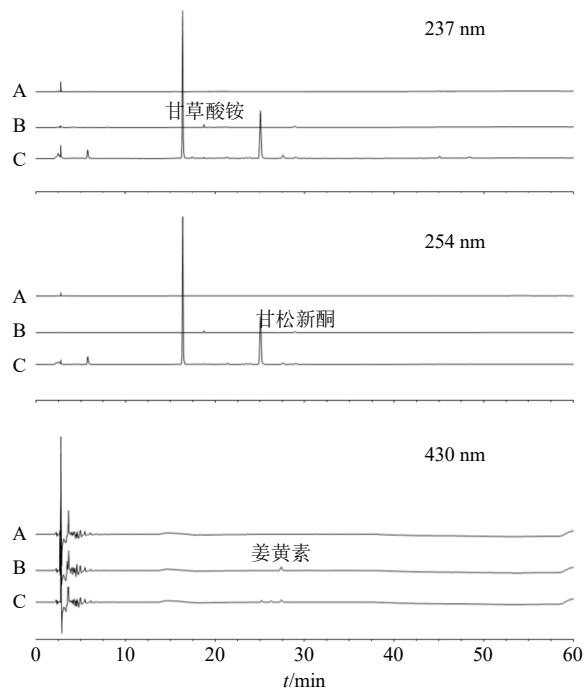


图 2 空白接收液 (A)、混合对照品溶液 (B)、白脉软膏接收液 (C) 在不同波长下的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of blank receiving solution (A), mixed reference solution (B) and BO receiving solution (C) at different wavelengths

2.4 不同微针条件对药物经皮渗透性的比较研究

本实验采用改良的 Franz 扩散池法, 将微针处理后小鼠皮肤置于扩散池的两室之间, 使皮肤角质层面向供给池, 向接收池加入 20 mL 接收液及磁力转子, 皮肤里层与接收液保持紧密接触。准确称取白脉软膏 1 g 均匀涂布于皮肤表面, 透皮扩散试验仪保持恒温 (37.0±0.5) ℃, 搅拌速度 350 r/min, 分别于 6、8、10、12、20、24 h 从接收池取样 1 mL, 同时补充同温度等体积新鲜接收液, 并排除气泡。取出的接收液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液, 用“2.1”项下方法测定 24 h 接收液中甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的含量, 计算各成分不同时间点的单位面积累积透过量 (Q_n) 和稳态透皮速

率 (J_s)。以待测成分不同时间点的 Q_n 为纵坐标, 取样时间 t 为横坐标绘制 Q_n - t 曲线, 取曲线的直线部分进行线性回归, 其斜率即为 J_s , 即药物渗透达到稳态后的透皮速率。 Q_n 、 Q_{EF} 和 ER 由公式计算。

$$Q_n = (VC_n + 1.0 \sum_{i=1}^{n-1} C_i) / S$$

$$Q_{EF} = Q_{i-24h} / Q_{0-24h}$$

$$ER = J_{si} / J_{s0}$$

Q_n 为第 n 次取样时接收液中待测成分的单位面积累积透过量, S 为有效扩散面积, V 为接收池中接收液总体积, C_n 为第 n 次取样时接收液中待测成分的质量浓度, C_i 为第 i 次取样时接收液中待测成分的质量浓度。 Q_{EF} 表示在 24 h 时促透组各成分的单位面积累积透过量与空白组的比值, 代表促透性能, Q_{i-24h} 、 Q_{0-24h} 分别为 24 h 促透组和空白组的单位面积累积透过量, ER 为促透倍数, J_{si} 为促透组的稳态透皮速率, J_{s0} 为空白组的稳态透皮速率

以待测成分不同时间点的累积透过量 Q_n 为纵坐标, 取样时间 t 为横坐标, 绘制 Q_n - t 曲线, 结果如图 3 所示。相对空白组, 小鼠皮肤经微针处理后, 对白脉软膏中甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的透皮吸收有明显的促进作用。

对白脉软膏中 3 种成分的透皮吸收动力学参数进行分析, 结果见表 2, 所有回归方程 r 值均大于 0.95, 可信度高。

小鼠皮肤经微针处理后, 对白脉软膏中 3 种成分的透皮吸收均有促进作用, 其综合促透效果明显优于空白组。值得注意的是, 微针处理对不同成分的促透程度也有所差别, 甘草酸铵组、姜黄素组的 ER 最高可达 15.70、16.12, 而微针处理对甘松新酮的促透性能偏低, 这与课题组前期采用超声促透的结果一致^[9], 这可能与甘松新酮的化学性质有关。Shen 等^[20]研究了物理化学性质对疏水性药物纳米混悬剂体外透皮吸收的影响, 发现 $\lg P$ 是影响透皮吸收的关键因素, $\lg P$ 接近 3 时体外透皮效果最好。本研究中, 甘松新酮相较甘草酸铵、姜黄素, 具有更高的脂溶性, 其 $\lg P$ 在 3 左右, 在不采用任何促透方式时, 其 Q_{24} 也达到了 19.417 μg/cm², 分别是甘草酸铵、姜黄素的 3.35、56.12 倍, 故而甘松新酮组的 ER 相对偏低。综上, 微针处理可以明显改善白脉软膏中各成分的透皮吸收。

2.5 皮肤损伤程度及恢复程度评分研究

微针作用后, 皮肤会留下明显孔道, 采用 OCT 法观察 2 h 内的微孔道深度变化。本实验以 0 h 的

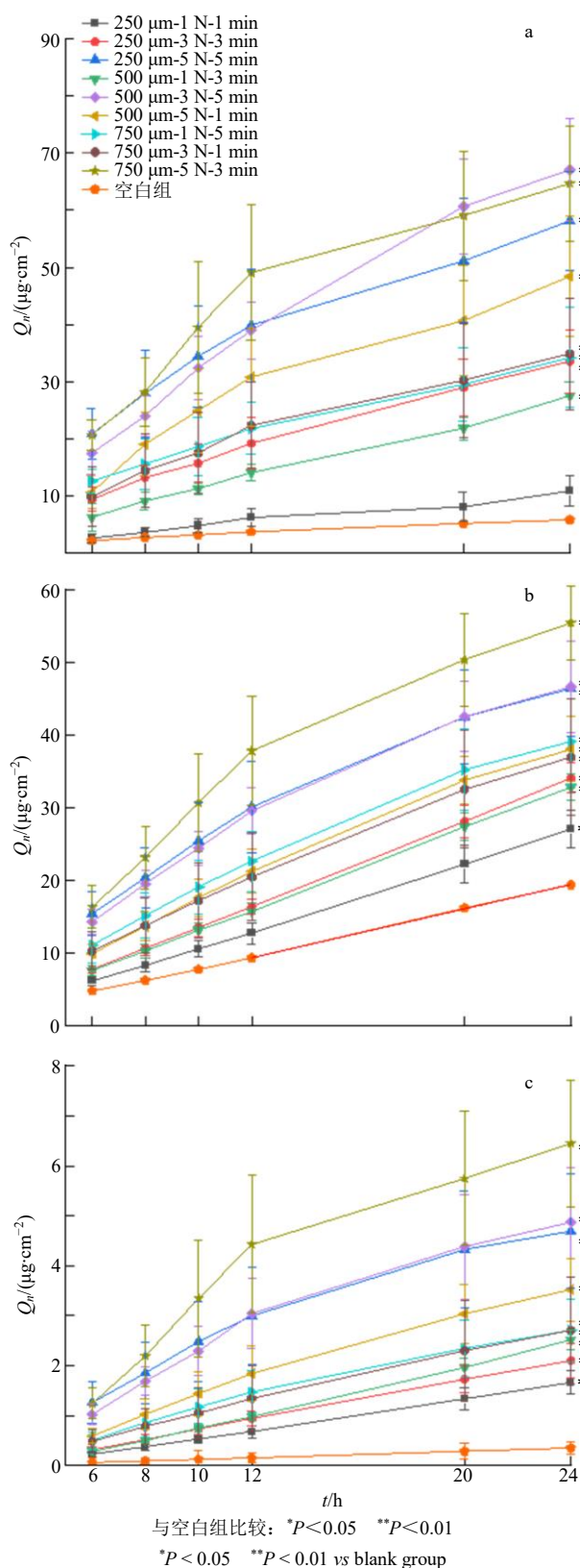


图 3 不同微针条件下白脉软膏中甘草酸铵 (a)、甘松新酮 (b)、姜黄素 (c) 24 h 内 Q_n - t 曲线 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Q_n - t of ammonium glycyrrhizinate (a), nardosinone (b) and curcumin (c) in BO within 24 h under different microneedle conditions ($\bar{x} \pm s, n=6$)

皮肤损伤程度及 2 h 的恢复程度评分作为安全性评价的依据, 其中皮肤损伤程度评分越高, 对皮肤损伤程度越大, 皮肤恢复程度评分越接近 1, 恢复情况越好。

皮肤损伤程度评分 = (0 h 实验组微孔道深度 - 0 h 空白组微孔道深度) / 0 h 空白组微孔道深度

皮肤恢复程度评分 = (0 h 实验组微孔道深度 - 2 h 实验组微孔道深度) / (0 h 实验组微孔道深度 - 0 h 空白组微孔道深度)

将不同长度微针置于 OCT 系统下进行扫描, 确定 1 mm 长度对应 213 像素 (图 4)。未进行微针处理的小鼠皮肤 OCT 扫描图像如图 5 所示, 基于像素计算小鼠腹部皮肤厚度约为 586.85 μm , 从图中可以清晰地观察到角质层、表皮层和部分真皮层, 且表面完整无破损。

正交试验组施加微针后 2 h 内的微孔道状态变化如图 6 所示, 结果显示, 在微针的作用下, 小鼠皮肤表面短时间内均会生成微孔道 (图中箭头所示)。不同微针作用条件下形成的微孔道的深度有所差异, 结合 OCT 扫描图可看到 30 min 后 S1、S2 2 组便无微孔道的痕迹, 而 S4~S9 组在微针处理 2 h 后仍存在明显的孔道。相较前 2 组, S4~S9 组所选用的微针长度更大, 即使降低作用力、缩短作用时间, 2 h 内皮肤也不能够完全恢复, 说明微针长度对皮肤状态影响较大。

以时间为横坐标, 微孔深度为纵坐标做图 (图 7)。微针作用后立即观察, 在 S9、S5 实验条件下, 皮肤表面形成的微孔道深度分别为 248.83、206.57 μm , 说明了作用力度及时间对皮肤的影响也较大。2 h 内各组均有不同程度的恢复, 微针作用后 30 min 内微孔道深度恢复速度较快, 在 90 min 后恢复变缓, 这也提示微针作用后应当及时给药, 以发挥微针最大的促透作用。

由于毛囊等附属器存在, 不施以任何微针处理的正常小鼠皮肤也不是完全平坦光滑的, 其正常深度保持在 40~50 μm , 故此次空白组测得的 46.95 μm 作为基准进行打分。随着微针长度增加、作用力增大、作用时间延长, 皮肤损伤程度评分越高, 其中 S9、S5 皮肤损伤程度评分最高, 且 2 h 后的皮肤恢复程度也偏低, 可见对皮肤造成了严重损伤, 短时间内不能恢复。

2.6 微针促透的综合性评价

实验选用 $L_9(3^4)$ 正交表, 结合渗透性指标、皮

表 2 不同微针条件下白脉软膏中 3 种成分的经皮渗透参数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Percutaneous penetration parameters of three components in BO under different microneedle conditions ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

成分	促透方法	Q_n - t 回归方程	r	$Q_{24}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2})$	$J_s/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$	Q_{EF}	ER
甘草酸铵	空白	$Q_n=0.177t+1.577$	0.999 4	5.796	0.177	1.000 0	1.00
	S1	$Q_n=0.423t+0.377$	0.984 7	10.849	0.423	1.871 8	2.39
	S2	$Q_n=1.320t+2.398$	0.997 5	33.562	1.320	5.790 5	7.46
	S3	$Q_n=1.942t+12.835$	0.982 6	58.163	1.942	10.035 0	10.97
	S4	$Q_n=1.138t-0.167$	0.998 0	27.521	1.138	4.748 3	6.43
	S5	$Q_n=2.779t+3.036$	0.993 2	67.076	2.779	11.572 8	15.70
	S6	$Q_n=1.912t+3.600$	0.976 4	48.435	1.912	8.356 6	10.80
	S7	$Q_n=1.164t+6.525$	0.995 7	34.178	1.164	5.896 8	6.58
	S8	$Q_n=1.328t+3.841$	0.987 8	34.900	1.328	6.021 4	7.50
甘松新酮	空白	$Q_n=0.843t-0.763$	0.999 9	19.417	0.843	1.000 0	1.00
	S1	$Q_n=1.166t-1.016$	0.999 8	27.108	1.166	1.396 1	1.38
	S2	$Q_n=1.463t-1.070$	0.999 9	34.129	1.463	1.757 7	1.74
	S3	$Q_n=1.704t+7.340$	0.989 3	46.436	1.704	2.391 5	2.02
	S4	$Q_n=1.411t-0.971$	0.999 9	32.838	1.411	1.691 2	1.67
	S5	$Q_n=1.782t+5.772$	0.990 0	46.680	1.782	2.404 1	2.11
	S6	$Q_n=1.572t+1.430$	0.996 6	38.056	1.572	1.959 9	1.86
	S7	$Q_n=1.565t+2.877$	0.995 5	39.140	1.565	2.015 8	1.86
	S8	$Q_n=1.491t+2.006$	0.998 2	36.985	1.491	1.904 8	1.77
姜黄素	空白	$Q_n=0.017t-0.050$	0.999 8	0.346	0.017	1.000 0	1.00
	S1	$Q_n=0.080t-0.268$	0.999 8	1.659	0.080	4.794 8	4.71
	S2	$Q_n=0.099t-0.270$	0.999 8	2.096	0.099	6.057 8	5.82
	S3	$Q_n=0.188t+0.431$	0.983 4	4.691	0.188	13.557 8	11.06
	S4	$Q_n=0.124t-0.492$	0.999 6	2.515	0.124	7.268 8	7.29
	S5	$Q_n=0.209t-0.090$	0.983 0	4.870	0.209	14.075 1	12.29
	S6	$Q_n=0.161t-0.244$	0.995 5	3.522	0.161	10.179 2	9.47
	S7	$Q_n=0.120t-0.094$	0.994 2	2.707	0.120	7.823 7	7.06
	S8	$Q_n=0.123t-0.202$	0.998 5	2.703	0.123	7.812 1	7.24
	S9	$Q_n=0.274t+0.250$	0.961 5	6.449	0.274	18.638 7	16.12

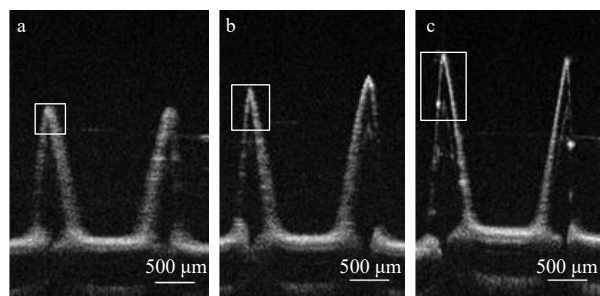


图 4 不同长度 250 μm (a)、500 μm (b)、750 μm (c) 滚轮微针的 OCT 图像 (标尺: 500 μm)

Fig. 4 OCT images of 250 μm (a), 500 μm (b) and 750 μm (c) roller microneedles with different lengths (scale: 500 μm)

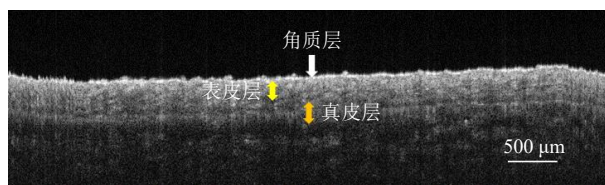


图 5 小鼠腹部皮肤 OCT 图 (标尺: 500 μm)

Fig. 5 OCT of mouse abdominal skin (scale: 500 μm)

肤损伤程度及皮肤恢复程度, 进行综合评分, 综合评分=渗透性评分/最高渗透性评分 $\times$ 0.4+恢复程度评分/最高恢复程度评分 $\times$ 0.3-损伤程度评分/最

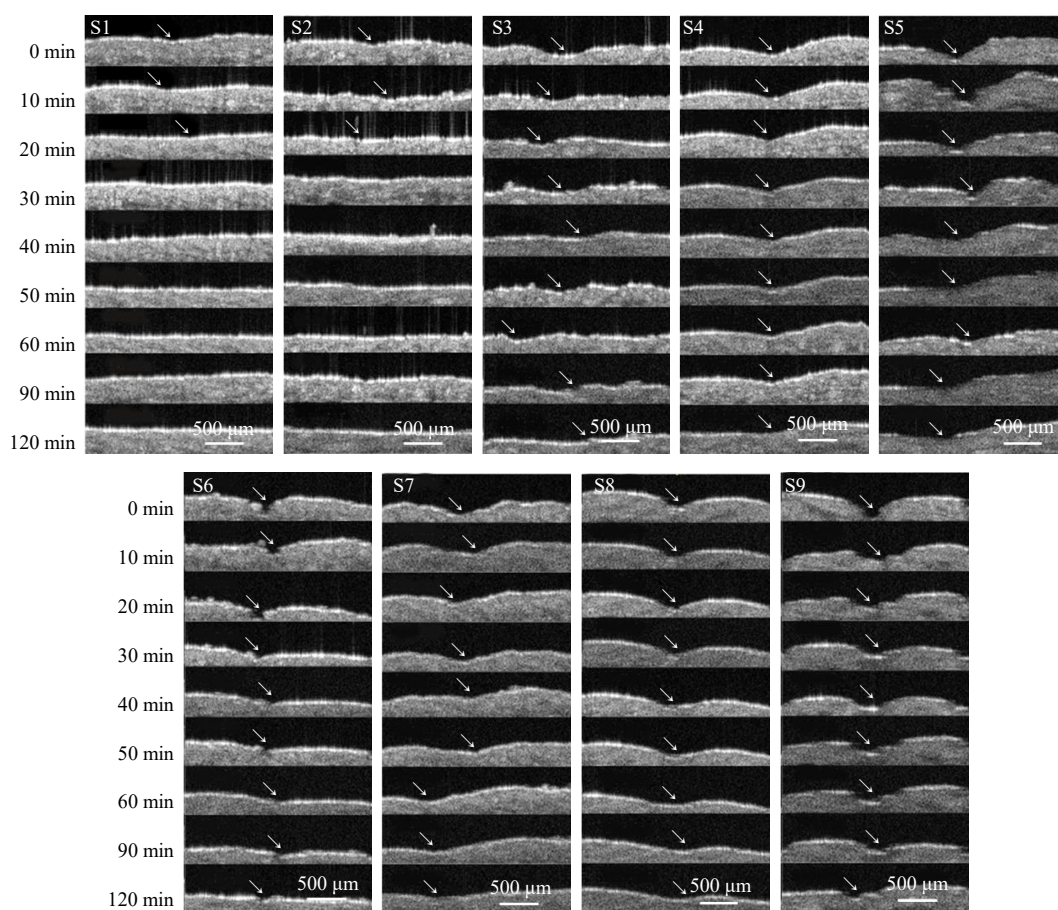


图 6 正交试验组施加微针后 2 h 内的微孔道变化过程

Fig. 6 Micropore track change process within 2 h after microneedle application in orthogonal test group

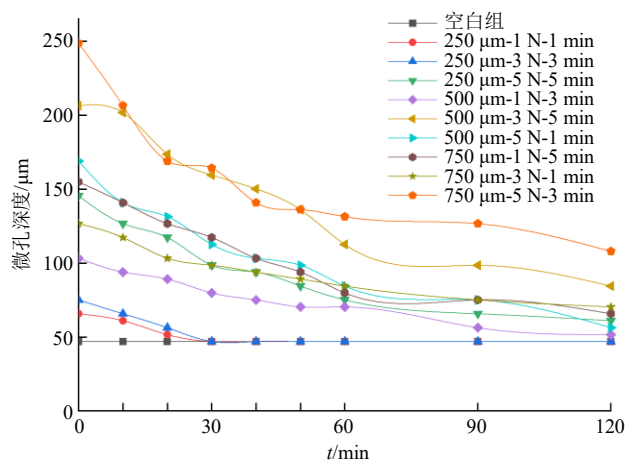


图 7 不同微针条件处理小鼠皮肤后微孔道随时间的变化过程

Fig. 7 Change process of micropores with time after treatment of mouse skin with different microneedle conditions

高损伤程度评分 $\times 0.3$ 。渗透性实验采用体外 Franz 扩散池法,考察不同微针条件对白脉软膏中 3 种成分甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的促透效果,由于

白脉软膏处方中姜黄的药材量最高,甘松和甘草药材量相当,设置 3 个指标甘草酸铵、甘松新酮、姜黄素的渗透性得分占比分别为 30%、30%、40%,渗透性评分=甘草酸铵 $Q_{EF} \times 0.3$ + 甘松新酮 $Q_{EF} \times 0.3$ + 姜黄素 $Q_{EF} \times 0.4$ 。同时以 OCT 实验系统观察微针作用皮肤的微孔道深度,评估皮肤的损伤程度和恢复程度,以渗透性、皮肤损伤及恢复程度评分作为综合指标,优选出更全面合理的微针促透条件,正交试验结果见表 1,方差分析结果见表 3。

从方差分析结果可知, A (微针长度)、B (作用力度)、C (作用时间) 3 因素对综合评分的影响大小为 $A > C > B$, 且 $A_1 > A_2 > A_3$, $C_2 > C_3 > C_1$, $B_3 > B_2 > B_1$, 其中 A 对综合评分的影响显著 ($P < 0.05$), 因素 B 和 C 未显示出统计学差异, 这可能是由于实验设计方案需要兼顾临床安全性, 设置的因素水平间距不大导致的作用力度及作用时间差异不显著。为了最大限度增加白脉软膏的经皮吸收, 提高疗效, B、C 2 因素采用最高水平组合, 同时也是正交表中综合评分 (42.46%) 最高的一组, 确定

表 3 方差分析结果
Table 3 Analysis of variance results

方差来源	III 型平方和	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	222.505	6	37.084	15.082	0.063
截距	10 760.604	1	10 760.604	4 376.344	0.000
A	199.981	2	99.991	40.666	0.024
B	8.620	2	4.310	1.753	0.363
C	13.904	2	6.952	2.827	0.261
误差	4.918	2	2.459		
总计	10 988.027	9			
校正的总计	227.422	8			

微针最佳促透条件为 A₁B₃C₃, 即微针长度 250 μm, 作用力度 5 N, 作用时间 5 min。

3 讨论

在本研究中, 微针能够显著改善白脉软膏的体外渗透性, 不同微针条件渗透性评分为 2.90~11.66 分。在课题组前期研究中^[8-9], 3%丙二醇为最佳化学促透条件, 渗透性评分为 2.414 分, 超声促透最佳条件为 1.0 W/cm²、5 min、1 MHz, 渗透性评分为 1.958 分。微针对 3 种不同极性成分的促透效果均明显优于 3%丙二醇和超声技术, 这证明了微针在促进药物经皮渗透方面的巨大优势。本实验采用 OCT 系统对微针的穿刺安全性进行了研究, 在该系统下, 能够清晰地看到微针的边缘、刺入深度和在皮肤上留下的微孔道, 可以通过测量孔道深度对皮肤损伤程度及皮肤恢复程度进行评分。应用微针 2 h 后, 微孔道的愈合速度变得极其缓慢, 这与 Huang 等^[19]的结果一致, 故以 2 h 内微孔道的参数变化作为评分依据。

小鼠腹皮角质层厚度在 50 μm 左右^[21-22], 相对空白组, 本实验中 S1、S2 所留下的孔道均小于 50 μm, 未穿透角质层, 且 30 min 后便完全闭合, 2 组对于 3 种主要成分的促透效果偏低, 说明微针只有穿透角质层才能达到理想的透皮效果。为了兼顾渗透效果和安全性, 本研究采用正交设计以渗透性、皮肤损伤及恢复程度进行综合评价, 结果显示微针长度是影响综合评分的关键因素。但是, 若仅以渗透性作为指标, 则微针长度对促透的贡献最低, 增加微针长度所带来的皮肤损伤更为明显。提示在应用微针时可先确定合适的微针长度, 再考虑改变作用力度、作用时间等因素进一步提高渗透量, 而非一味靠增加微针长度以提高渗透量。本实验对微针

长度、作用力度及时间进行了考察, 得到了 250 μm、5 N、5 min 这个最优条件, 但是考虑到微针参数及实验条件等的复杂性, 仍需进一步系统性探索研究影响渗透及安全性的关键因素及规律, 为微针的临床安全合理应用提供理论支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 范佳佳, 李鑫, 孙洪昊, 等. 基于藏族医学理论的白脉病内涵挖掘及白脉软膏组方用法分析 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(5): 1409-1414.
- [2] 梁军, 刘彩凤, 刘冬涵, 等. 藏药白脉软膏多成分定量、指纹图谱结合多元统计分析的质量控制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 356-363.
- [3] 张兴平, 许根荣, 徐善强, 等. 藏药白脉软膏治疗桡骨远端骨折后腕关节功能障碍的病例对照研究 [J]. 中国骨伤, 2014, 27(11): 920-924.
- [4] 王晏雯, 刘小利, 舒勤奋, 等. 白脉软膏联合卡马西平片治疗原发性三叉神经痛 40 例临床观察 [J]. 中医杂志, 2015, 56(10): 863-866.
- [5] 蒲娟, 黄希, 解东风. 白脉软膏联合针灸在颈椎病治疗中的效果观察 [J]. 西藏医药, 2019, 40(6): 138-139.
- [6] 尕日毛. 藏药白脉涂剂治疗坐骨神经痛的临床观察 [J]. 青海医药杂志, 2008, 38(9): 81.
- [7] 仁青东智, 李毛措, 卡着杰. 藏医霍尔美疗法治疗肩周炎 21 例临床疗效观察 [J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(1): 12-13.
- [8] 梁军, 武慧超, 杜守颖, 等. 白脉软膏主要成分体外经皮透过性的研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2486-2492.
- [9] 竺楹银, 梁军, 肖五庆, 等. 化学促透剂丙二醇及超声促透技术对白脉软膏经皮渗透性的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(24): 6607-6614.
- [10] 张娟娟, 朱全刚, 张立超. 微针经皮给药应用的新进展 [J]. 药学服务与研究, 2013, 13(5): 326-331.
- [11] 李光强, 吴丹丹, 满玉清, 等. 多肽透皮给药研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(19): 2084-2087.
- [12] Brand R M, Iversen P L. Transdermal delivery of antisense oligonucleotides [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 106: 255-269.
- [13] 胡晓歌, 杜建靓, 安娜, 等. 被动和主动促透技术在中药经皮给药领域的应用进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(3): 93-96.
- [14] 吴涵, 梁诗敏, 吴雪茹. 温通膏方复合微针贴剂的制备及其性能研究 [J]. 中药材, 2021, 44(1): 159-162.
- [15] 李蓉蓉, 王缘, 刘哲, 等. 微针应用后皮肤孔道形成与闭合的影响因素及评价方法 [J]. 药学报, 2021, 56(5): 1293-1300.

- [16] 陆冬筱, 房文汇, 李玉瑶, 等. 光学相干层析成像技术原理及研究进展 [J]. 中国光学, 2020, 13(5): 919-935.
- [17] 宋思雨, 李中梁, 高云华, 等. 用于微针经皮给药成像的扫频 OCT 系统 [J]. 中国激光, 2018, 45(8): 209-216.
- [18] 占浩慧, 黄颖聪, 马凤森. 微针穿刺性能评价方法研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1890-1895.
- [19] Huang J Y, Cui Y H, Yang Y L, *et al.* Optical coherence tomography and microdialysis for microneedle-mediated penetration enhancement study of paeoniflorin-loaded ethosomes [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2021, 34(4): 183-193.
- [20] Shen C Y, Li R S, Shen B D, *et al.* Influence of drug physicochemical characteristics on *in vitro* transdermal absorption of hydrophobic drug nanosuspensions [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2015, 41(12): 1997-2005.
- [21] 郑静南, 陈华兵, 张俊勇, 等. 不锈钢微针经皮给药的研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(11): 877-880.
- [22] 杨海菊, 黄嘉怡, 杨艳玲, 等. 正交实验结合 OCT 优选桂皮醛脂质体透皮的最佳微针条件 [J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(9): 738-743.

[责任编辑 郑礼胜]