·药剂与工艺·

中华眼镜蛇神经毒素可溶性微针的制备、表征及其离体皮肤渗透研究

徐莹莹[1]，周珊珊[1#]，温　乐[1]，杨　柳[2]，裘茂良[3]，潘佳琳[1]，单钰君[1]，郑杭生[1*]

1. 浙江中医药大学药学院，浙江 杭州　311402
2. 浙江商业职业技术学院，浙江 杭州　310053
3. 杭州德肤修生物科技有限公司，浙江 杭州　310005

摘　要：目的　筛选多种常用的微针基质辅料，制备具有合适机械强度和柔韧性的载中华眼镜蛇神经毒素（neurotoxin，NT）可溶性微针（dissolvable microneedles，DMN）（DMN-NT），并对其进行体内外评价。**方法**　采用两步真空模板填充法制备不同材料构成的 DMN，并对其进行力学特性分析，通过重量法对其吸湿性进行考察，利用正置显微镜对其形态特征进行考察，筛选最佳基质材料后制备 DMN-NT，并对微针的载药量、机械性能、在体溶解、在体恢复、体外释放度、离体皮肤渗透与稳定性等进行评价。**结果**　针尖最佳基质材料为 20%聚乙烯吡咯烷酮 K90（PVP K90）和 20%透明质酸（相对分子质量为 10 000），背衬层最佳基质材料为 7.5%羟丙基甲基纤维素（HPMC，E5LV 型）和 15%聚乙烯醇（PVA-0588）。正置显微镜和体式显微镜下观察发现 DMN-NT 针体垂直，排列整齐；每片 DMN-NT 的载药量为（172.22±1.30）μg 或（17.38±0.57）μg；力学性能测试结果显示，DMN-NT 针尖受力可达（39.88±3.09）N，大于微针穿刺皮肤所需的破坏力 0.05 N，表明 DMN-NT 有较好的机械强度，亚甲基蓝染色实验结果表明微针具有较好的穿刺性；在体溶解实验结果显示，在 10 min 内 DMN-NT 大部分溶解；在体恢复实验结果为给药 30 min 后针孔痕迹几乎不见，表明 DMN-NT 的生物相容性好，安全性高；体外释放结果表明 DMN-NT 在 pH 值为 7.4 的 PBS 中 8 min 的累积释放率达（93.65±4.29）%；离体皮肤渗透结果显示，10 h 后微针的累积药物渗透百分率达到（97.99±2.80）%，而药物水溶液中药物几乎没有透过皮肤；DMN-NT 稳定性初步评价结果良好。**结论**　制备的 DMN 可以穿刺皮肤角质层，具有较好的溶解性和生物相容性，可以高效经皮递送大分子药物。

关键词：中华眼镜蛇；神经毒素；可溶性微针；机械性能；体外释放；经皮药物递送；离体皮肤渗透

中图分类号：R283.6　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2024)12 - 3966 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.005

Preparation and characterization of dissolvable microneedles of *Naja atra* neurotoxin and their *ex vivo* skin permeation

XU Yingying[1], ZHOU Shanshan[1], WEN Le[1], YANG Liu[2], QIU Maoliang[3], PAN Jialin[1], SHAN Yujun[1], ZHENG Hangsheng[1]

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China
2. Zhejiang Business College, Hangzhou 310053, China
3. Hangzhou 3DSKIN Biotechnology Co., Ltd., Hangzhou 310005, China

Abstract: Objective　To screen various commonly used microneedle matrix excipients and prepare dissolvable microneedles (DMN) with suitable mechanical strength and flexibility for delivering Chinese cobra (*Naja atra* Laurenti)-derived neurotoxin (NT). **Methods** The DMNs were prepared by using a two-step vacuum mold-filling method. Their morphological, mechanical and hygroscopic properties were characterized by upright microscope, texture analyzer and gravimetric method respectively to select the optimal matrix material. Then the DMN loaded with neurotoxin (DMN-NT) was prepared with the optimal matrix material, and the drug loading,

收稿日期：2024-03-20

基金项目：国家自然科学基金项目（82174096）；浙江省大学生创新训练项目（202310344055）

作者简介：徐莹莹（2003—），女，在读本科，研究方向为中药经皮吸收新剂型及其体内过程研究。Tel: 18758264107　E-mail: 2199200267@qq.com

#共同第一作者：周珊珊，硕士研究生，研究方向为中药经皮吸收新剂型及其体内过程研究。Tel: 15988741009　E-mail: 2957147632@qq.com

***通信作者：**郑杭生，副教授，硕士生导师，主要从事中药经皮吸收新剂型及其体内过程研究。Tel: (0571)61768157　E-mail: hs-zheng@163.com

mechanical properties, *in vivo* dissolving behavior, *in vivo* skin recovery, *in vitro* drug release, *ex vivo* transdermal permeation and stability of the DMN-NT were evaluated. **Results** The optimal matrix materials for the needle body were 20% of polyvinylpyrrolidone K90 (PVP K90) and 20% of hyaluronic acid (M_W 10 000), while the backing layer was composed of 7.5% of hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC, E5LV) and 15% of polyvinyl alcohol (PVA-0588). Under the upright microscope and the stereomicroscope, the DMN-NT needles were arranged neatly and vertically. Each DMN-NT patch had a drug loading of (172.22 ± 1.30) μg or (17.38 ± 0.57) μg. The mechanical properties evaluation results showed that the pressure applied to the DMN-NT needle tip could reach (39.88 ± 3.09) N, exceeding the force required (0.05 N) for microneedle to penetrate the skin, indicating good mechanical strength. The results of methylene blue staining experiments showed that the DMN-NT had desirable penetration property. In the *in vivo* dissolving experiment, most of the DMN-NT dissolved within 10 min. The *in vivo* recovery experiment showed that the trace in skin induced by DMN-NT were almost invisible 30 min after administration, indicating good biocompatibility and high safety. The *in vitro* release test results showed that the cumulative released percent of DMN-NT in PBS with pH 7.4 reached (93.65 ± 4.29)% in 8 min. The results of the *ex vivo* skin permeation test showed that the transdermal permeated percent of neurotoxin from the DMNs reached (97.99 ± 2.80)% after 10 h, while almost no drug permeated across the skin from the drug aqueous solution. The preliminary evaluation results of stability of the DMN-NT were acceptable. **Conclusion** The DMNs prepared in this study can penetrate the skin stratum corneum, have good dissolvability and biocompatibility, and can efficiently deliver macromolecular drugs transdermally.

Key words: *Naja atra* Laurenti; neurotoxin; dissolvable microneedle; mechanical properties; *in vitro* release; transdermal drug delivery; *ex vivo* skin permeation

现代医学研究表明，蛇毒镇痛效果确切，而且无胃肠道不良反应，无耐受性和成瘾性。眼镜蛇神经毒素（neurotoxin，NT）结构见图 1，是从眼镜蛇科眼镜蛇属动物中华眼镜蛇 *Naja atra* Laurenti 毒液中分离的短链神经毒素，等电点（pI）为 8.8，含 60～62 个氨基酸与 4 对二硫键，结构与理化性质相对稳定，为水溶性大分子，具有高效、给药剂量小等特点和显著的非阿片依赖性的镇痛作用[1-2]。目前，已有科博肽注射液用于慢性疼痛及晚期癌症疼痛等疼痛的治疗[3]，但是，注射给药后，注射部位常产生炎症反应，且安全性较低，因此有必要开发一种新的给药途径。

经皮给药（transdermal drug delivery，TDD）是指通过皮肤，以固定剂量和可调节速率递送药物产生局部或全身治疗作用的途径。TDD 具有控释效果，可以避免因吸收过快，产生血药浓度过高而引起不良反应，可显著地提高患者的顺应性和可接受性[4-5]。然而，只有中等亲脂性的小分子（＜500）才能自由渗透皮肤，而大分子药物通常会受到角质层（stratum corneum，SC）屏障的阻碍，生物利用度很低[6]。

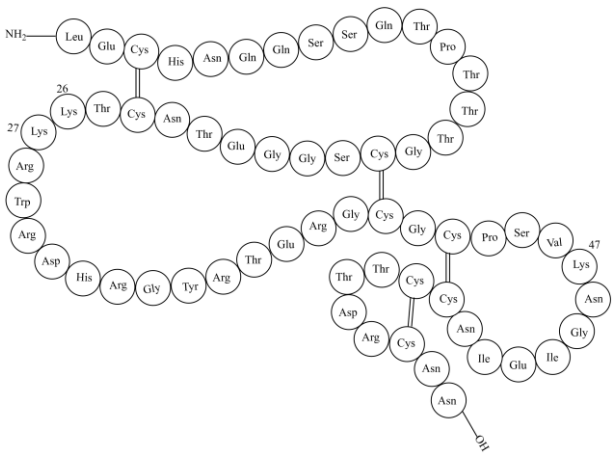


图 1 神经毒素分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of neurotoxin

目前，研究人员已经开发了各种技术用于 TDD，但其开发仍处于早期阶段，存在着方法的安全性、给药装置的实用性、患者的适应性等需解决的问题[7]。微针（microneedles，MNs）是指长度为 50～2 000 μm 的针状结构[8]。微针给药具有安全、无痛、能轻易克服 SC 屏障的优势。

可溶性微针（dissolvable microneedles，DMN）是微针的一种，由水溶性高分子材料制备而成，具有递送效率高、安全性好、生物相容性好等优势[9-10]。课题组[11]先前研究制备了含神经毒素的 DMN（DMN-NT），但是，研究中尚未对多种常用微针基质材料进行筛选以及对微针在皮肤穿刺力学性能方面进行研究，并且尚未对 DMN-NT 离体皮肤渗透动力学与机制进行探讨，故本实验对 DMN-NT 进行进一步研究，筛选多种常见的韧性和脆性聚合物材料，制备 DMN-NT，并对微针的形态特征、机械强度、载药量、在体溶解、在体恢复、体外释药、离体皮肤渗透及初步稳定性等进行研究，以期为大分子药物经皮给药新制剂的开发和应用提供更多的基础数据与参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试药

Agilent 1200 型高效液相色谱仪，安捷伦科技有限公司；PDMS 微针模具，圆锥形针体，模板面积为 1 cm^2，针长 600 μm，阵列 10×10，浙江台州微芯医药科技有限公司；CP225D 型电子天平，德国 Sartorius 公司；DZF-6020 型真空干燥箱，上海精宏实验设备有限公司；Axio Scope A1 型正置荧光显微镜、Stemi 508 型体视显微镜，德国蔡司公司；TT-8 型药物透皮吸收仪，天津市正通科技有限公司；ZD-85 型恒温气浴振荡器，上海力辰邦西仪器科技有限公司；PALL 型超纯水仪，美国 PALL 公司；Universal TA 型质构仪，上海腾拔仪器科技有限公司；KQ-250DV 型数控超声波清洗器，中国昆山市超声仪器有限公司。

神经毒素，质量分数＞97%，批号 221201，云南龙凤谷生物药业有限公司；磷酸盐缓冲液（PBS）速溶颗粒，pH 7.4，批号 20220804，国药集团化学试剂有限公司；透明质酸，质量分数 99%，相对分子质量 10 000，批号 RH424530，上海易恩化学技术有限公司；聚乙烯醇 0588 型（PVA-0588，批号 S27283）、聚乙烯吡咯烷酮 K90（PVP K90，批号 S23HS195870），上海源叶生物科技有限公司；羧甲基壳聚糖（CMC，取代度≥80%，批号 C10115346）、硫酸软骨素（CS，批号 C11082605）、聚乙烯吡咯烷酮 K16-18（PVP K16-18，批号 C12055025）、三氟乙酸（HPLC 级，批号 C15533210，质量分数≥99.5%）、亚甲基蓝（批号 M859248，质量分数≥98.0%），上海麦克林生化科技有限公司；羟丙甲基纤维素（HPMC），E5LV 型，批号 PDR536291，上海卡乐康包衣技术有限公司；超纯水由 PALL 超纯水仪净化得到，其他试剂均为分析纯。

1.2 动物

Wistar 大鼠，雌性，体质量 200～250 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，合格证号：SCXK（沪）2017-0005。所有动物实验遵循浙江中医药大学动物实验研究中心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 神经毒素含量测定方法的建立

参考文献方法[8]，采用 HPLC 法进行神经毒素的含量测定。

2.1.1 色谱条件 色谱柱为飞诺美 Aeris Peptide XB-C_{18} 柱（150 mm×4.6 mm，3.6 μm）；流动相为 0.1%三氟乙酸水溶液（A）-0.1%三氟乙酸乙腈溶液（B）；梯度洗脱：0～5 min，10%～27% B；5～8 min，27%～10% B；8～11 min，10% B；体积流量 0.9 mL/min；检测波长 200 nm；进样量 10 μL；柱温 30 ℃。

2.1.2 对照品储备液的配制 精密称取神经毒素对照品 5.01 mg，置于 25 mL 量瓶中，加入少量 pH 值为 7.4 的 PBS，使溶解，继续加入 PBS 稀释至刻度，摇匀，即得对照品储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取 DMN-NT，加入 PBS 溶解，稀释，配制成质量浓度约为 50 μg/mL 溶液，经 0.45 μm 的微孔滤膜滤过，即得供试品溶液。

2.1.4 专属性试验 分别取空白 DMN 与 DMN-NT，按“2.1.1”项下制备供试品溶液，另取 NT 对照品储备液，分别按“2.1.1”项下条件进样测定。结果见图 2，神经毒素峰形良好，基质材料对药物测定无干扰，方法专属性良好。

2.1.5 线性关系考察 分别取不同体积的对照品储备液，用 pH 值为 7.4 的 PBS 稀释，得质量浓度分

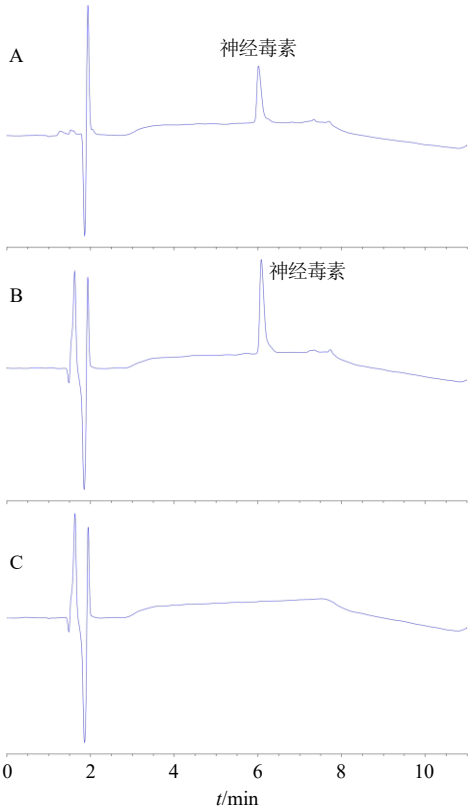


图 2 神经毒素对照品 (A)、DMN-NT (B) 和空白 DMN (C) 的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of neurotoxin chemical reference substance (A), DMN-NT (B) and blank DMN (C)

别为 200.40、150.30、100.20、75.15、50.10、25.05、20.04、15.03、10.02、5.01 μg/mL 的系列对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件分别进样，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 $Y=20.68X-68.13$，$r=0.999\,8$，结果表明，神经毒素在 5.01～200.40 μg/mL 线性关系良好。

2.1.6 精密度试验 分别取 150.30、50.10、15.03 μg/mL 高、中、低 3 个质量浓度的对照品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件 1 d 内分别测定 5 次，以考察日内精密度，分别 1 d 测定 1 次，连续测定 5 d，以考察日间精密度。结果表明，日内精密度的 RSD 值为 1.41%、0.57%、0.67%，日间精密度的 RSD 为 0.92%、1.40%、2.57%，表明该方法精密度良好。

2.1.7 重复性试验 取 DMN-NT 6 份，分别按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件进样测定，6 份样品测定结果分别为 51.26、50.54、51.41、49.08、49.76、50.68 μg/mL，平均值为（51.03±1.34）μg/mL，RSD 为 2.61%，说明该方法重复性良好。

2.1.8 稳定性试验 取 DMN-NT，按“2.1.3”项下制备供试品溶液，按“2.1.1”项下色谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样进样测定，供试品溶液测定结果为 50.88、50.79、51.34、51.80、50.43、49.17 μg/mL，平均值为（50.74±0.90）μg/mL，RSD 为 1.78%，说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.1.9 加样回收率试验 取已知含量的 DMN-NT 9 份，平均分成 3 组，各组中样品分别加入一定体积一定浓度的对照品溶液（使各组中对照品的加入量分别为样品含药量的 80%、100%、120%），按“2.1.3”项下制备供试品溶液，按“2.1.1”项下条件测定。试验结果为低、中、高 3 个加入量下回收率分别是（100.76±1.38）%、（99.93±1.69）%、（98.17±1.77）%，表明该方法准确度良好。

该色谱条件除用于 DMN-NT 中神经毒素含量测定外，亦可用于 DMN-NT 体外释放度与离体皮肤渗透试验样品中的神经毒素测定。

2.2 微针的制备

2.2.1 制备工艺与过程 采用两步真空模板填充法制备 DMN[12]。将药物溶于溶剂中，添加一定量的基质材料，搅拌均匀，低温静置得针体液；将背衬材料按一定浓度溶解得背衬液。第 1 步：将含药物的基质液注入模具针尖部分，在 25 ℃条件下，真空干燥箱（60 kPa）中保持 10 min，使药液填充到微针模具的针尖中，除去并收集模具表面多余的针体基质，室温下置于变色硅胶干燥器中干燥 1 h；第 2 步：填充背衬层基质，同“第 1 步”中条件干燥 18 h，然后用镊子小心脱模，即得微针。制得的微针贴片存储在干燥器中。

2.2.2 单一基质的筛选 对多种制备 DMN 的常用基质如聚乙烯醇（PVA-0588）、透明质酸、羧甲基壳聚糖（CMC）、羟丙基甲基纤维素（HPMC）、硫酸软骨素（CS）、聚乙烯吡咯烷酮 K16-18（PVP K16-18）、聚乙烯吡咯烷酮 K90（PVP K90）等进行筛选，筛选中的评价指标包括成形性、穿刺性能、吸湿致穿刺性能下降与柔韧性。

成形性的评价标准：针阵列完整性达到 100% 为 10 分，达到 80%为 5 分，低于 80%为 0 分。对穿刺性能的评价标准是：以 10 N 的压力将微针施用在 1 层铝箔纸（厚约 15 μm）上，在铝箔纸上能观察到不低于 80%的针孔阵列为 10 分，低于 80%为 5 分。

吸湿致穿刺性能下降的评价标准：将微针放置在高湿环境（装有饱和 NaCl 溶液的干燥器中（相对湿度 75%）12 h 后施用在 2 层铝箔纸（厚约 30 μm）上，在 2 层铝箔纸上同时能观察到 80%及以上针孔阵列的微针的吸湿致穿刺性能下降程度为 10 分，只能在 1 层铝箔纸上观察到部分阵列的微针的吸湿致穿刺性能下降程度为 5 分，在铝箔纸上基本观察不到针孔阵列的微针的吸湿致穿刺性能下降程度为 0 分。

柔韧性的评价标准：弯曲背衬层后，≤10%的针体断裂为 10 分，10%～30%的针体断裂为 5 分，≥30%的针体断裂为 0 分。

单一基质制备所得微针的物理性质评价结果如表 1 所示，单一基质材料制备的微针往往仅在某一方面具有优良的性能。脆性材料中 PVP K16-18 因为制备的微针太脆，在干燥后脱模时易碎，不宜作为制备微针的复合基质的候选材料；PVP K90、CS、透明质酸制备的 DMN 的成形性、机械强度较佳，适宜作为针尖基质；在 DMN-NT 制备的过程中，选择不同材料制作的背衬层会影响最终微针的柔韧性，韧性材料中 PVA、HPMC、CMC 制备的 DMN 的成形性、韧性较佳。因此，分别选择 PVP K90、透明质酸、CS 与 PVA、HPMC、CMC 作为针尖与背衬的复合基质的候选材料。

表 1　单一基质制备所得微针的物理性质评价结果

Table 1　Evaluation results of physical properties of microneedles prepared from a single matrix material

基质材料	评分				材料特性	总分
	成形性	穿刺性能	吸湿致穿刺性能下降	柔韧性		
PVA	10	10	0	10	韧性	30
CMC	10	10	0	10	韧性	30
HPMC	5	10	10	5	韧性	30
CS	10	10	10	5	脆性	35
PVP K90	10	10	5	5	脆性	30
PVP K16-18	0	5	0	0	脆性	5
透明质酸	10	10	5	5	脆性	30

2.2.3　复合基质的筛选　韧性材料具有一定的柔韧性，但作为单一材料使用时会因为韧性过大而无法刺入皮肤；脆性材料具有一定的机械强度，但作为单一材料使用时容易断裂；2 种或 2 种以上的高分子材料混合而成的复合材料往往兼具 2 种高分子材料的性能。为了得到针体机械强度良好、背衬韧性较佳的 DMN，本研究将脆性材料和韧性材料相结合，筛选制备 DMN 的最佳复合基质。筛选中同样以“2.2.2”项下成形性、穿刺性能、吸湿致穿刺性能下降与柔韧性为评价指标。单一针体材料-单一背衬层材料复合制备所得微针的物理性质评价结果如表 2 所示。对比不同背衬层材料的各种针体微针发现，大部分基质制备的微针具有较好的成形性，但以透明质酸为针体材料、CMC 为背衬层材料制备的微针成形性较差，出现了易碎的情况。

表 2　单一针体材料-单一背衬层材料复合制备所得微针的物理性质评价结果

Table 2　Evaluation results of physical properties of microneedles prepared by complexing a single needle-body material with a single backing layer material

针体材料	背衬层材料	评分				总分
		成形性	穿刺性能	吸湿致穿刺性能下降	柔韧性	
PVP K90	PVA	10	5	0	10	25
PVP K90	CMC	10	10	0	5	25
PVP K90	HPMC	10	10	10	5	35
CS	PVA	10	10	5	10	35
CS	CMC	10	10	0	5	25
CS	HPMC	10	10	10	5	35
透明质酸	PVA	10	10	0	10	30
透明质酸	CMC	0	5	0	5	10
透明质酸	HPMC	10	10	10	5	35

穿刺性能评价结果中，大部分基质制备的微针穿刺性能较好，但以 PVP K90 为针体材料、PVA 为背衬层材料和以透明质酸为针体材料、CMC 为背衬层材料制备的微针穿刺性能较差。对吸湿致穿刺性能下降而言，当针体材料相同时，对比不同背衬层材料制备的微针可以发现，对该指标影响较大的因素是背衬层基质材料，但是，针体材料对该指标也有一定影响，如表 2 中所示，针体材料 CS 使以 PVA 为背衬层材料的微针的吸湿致穿刺性能下降程度有所改善。柔韧性结果显示背衬层基质材料对柔韧性影响较大，影响的趋势与单一基质相近。

微针理想的性能指标包括成形性好、穿刺性能优良、吸湿致穿刺性能下降小与柔韧性好。由表 2 结果可以看出，综合性能最好的是以 HPMC 为背衬层基质材料制备的微针，但其弯曲背衬层后，存在部分针体断裂的现象，故单一针体材料与单一背衬层材料复合基质制备的微针的性能指标有待进一步优化，因此，本实验对针体与背衬基质材料进行进一步复合考察。

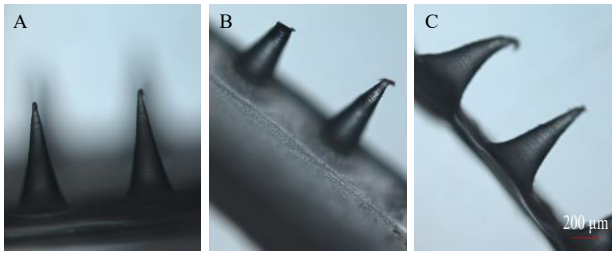
单一或混合针体材料与混合背衬层材料复合制备所得微针的物理性质评价结果如表 3 所示，对比 2 种背衬层的组合，以 7.5% HPMC 和 15% PVA 的复合背衬层具有较好的柔韧性，而 7.5% HPMC 和 5% CMC 的复合背衬层在穿刺性能试验中，存在施用时碎裂的情况，柔韧性较差，因此，选择 7.5% HPMC 和 15% PVA 作为最终制剂的背衬层。对比不同针体材料，以 20% PVP K90 和 20% 透明质酸、25% CS 和 20% PVP K90 以及以 25% CS 和 20% 透明质酸为混合针体材料制备的 3 种微针穿刺性能良好和吸湿致穿刺性能下降程度小。进一步地，对比这 3 种微针在显微镜下的针体形态，如图 3 所示，以 CS 和 PVP K90 以及以 CS 和透明质酸为针体材料制备的微针存在针体不垂直或针尖弯曲的现象，但以 PVP K90 和透明质酸为针体材料制备的微针针体垂直完整，故选用 PVP K90 和透明质酸作为微针的针体材料。

2.2.4　背衬基质配比的筛选　前期研究表明，柔韧性、吸湿致穿刺性能下降的主要影响因素是背衬层基质，因此，本实验通过固定针体基质材料 PVP K90 与透明质酸为 1∶1 的比例，考察背衬基质材料 PVA 与 HPMC 的比例以确定其最优配比。分别以 PVA 与

表 3 单一或混合针体材料与混合背衬层材料复合制备所得微针的物理性质评价结果

Table 3 Evaluation results of physical properties of microneedles prepared by complexing single or mixed needle-body materials with mixed backing layer materials

针体材料	背衬层材料	评分				总分
		成形性	穿刺性能	吸湿致穿刺性能下降	柔韧性	
40% PVP K90	7.5% HPMC＋15% PVA	10	5	5	10	30
40% PVP K90	7.5% HPMC＋5% CMC	10	10	0	5	25
30%透明质酸	7.5% HPMC＋15% PVA	10	10	5	10	35
30%透明质酸	7.5% HPMC＋5% CMC	10	10	0	5	25
50% CS	7.5% HPMC＋15% PVA	10	10	5	10	35
50% CS	7.5% HPMC＋5% CMC	10	10	5	5	30
20% PVP K90＋20%透明质酸	7.5% HPMC＋15% PVA	10	10	10	10	40
20% PVP K90＋20%透明质酸	7.5% HPMC＋5% CMC	10	10	5	5	30
25% CS＋20% PVP K90	7.5% HPMC＋15% PVA	10	10	10	10	40
25% CS＋20% PVP K90	7.5% HPMC＋5% CMC	10	10	0	5	25
25% CS＋20%透明质酸	7.5% HPMC＋15% PVA	10	10	10	10	40
25% CS＋20%透明质酸	7.5% HPMC＋5% CMC	10	10	5	5	30



A-PVP K90 和透明质酸的复合针体；B-CS 和 PVP K90 的复合针体；C-CS 和透明质酸的复合针体。

A-composite needle body of PVP K90 and hyaluronic acid; B-composite needle body of CS and PVP K90; C-composite needle body of CS and hyaluronic acid.

图 3 正置显微镜下不同针体材料的微针的形态

Fig. 3 Morphology of microneedles with different needle-body materials under upright microscope

HPMC 配比为 1∶1、1∶2、2∶1，其他条件同“2.2.1”项下，制备 DMN-NT，通过重量法考察其吸湿性。吸湿性测定：取上述微针，放入装有饱和 NaCl 溶液的干燥器中（相对湿度为 75%），按公式计算吸湿率。

$$吸湿率=(m_2-m_1)/m_1$$

m_1 为微针放置前的初始质量，m_2 为放置 24 h 后的微针质量

结果表明，当 PVA 与 HPMC 配比为 1∶1、1∶2、2∶1 时，微针的吸湿性分别为（14.72±0.15）%、（14.44±2.00）%、（12.30±0.93）%。可见，当配比为 2∶1 时吸湿性最小，因此，选用 PVA 与 HPMC 配比为 2∶1 作为 DMN-NT 的背衬基质材料。

2.2.5 针体基质配比的筛选 前期研究表明不同基质材料混合可以提高 DMN-NT 的机械强度，因此本实验通过考察 PVP K90 与透明质酸的比例确定其最优配比。分别以 PVP K90 与透明质酸配比为 1∶4、2∶3、1∶1、4∶1，其他条件同“2.2.1”项下，制备 DMN-NT，检测其力学性能，同样对其吸湿性进行考察。

力学性能测试：微针需要有一定的机械强度，以确保其能够刺穿皮肤屏障而不断裂或弯曲。为了检测微针的机械强度，采用质构仪对 DMN-NT 的机械强度进行了评价。选择 P/20 柱形探头，设置测试速度为 0.05 mm/s，下压距为 0.5 mm，通过比较微针针尖在探头下压过程中所受的力与探头位移之间的关系来评估微针的力学性能，记录各个时间点的力与位移的变化，绘制成力-位移曲线，结果见图 4。随着探头的移动，DMN 所受的力逐渐变大，力-位移曲线并未出现中断或突然下降的情况，说明微针在受力过程中并未出现断裂。由图 4 可知，当位移压缩至 0.5 mm 时，以 PVP K90 与透明质酸配比为 1∶1 微针针尖所受的力可达（39.88±3.09）N，大于微针刺穿皮肤所需的破坏力即 0.05 N，表明微针有较好的力学性能，能顺利刺入皮肤。

吸湿性测定结果如下，以 PVP K90 与透明质酸配比为 1∶4、2∶3、1∶1、4∶1 的吸湿率分别是（16.50±1.01）%、（18.80±4.86）%、（12.30±0.93）%、（14.19±2.57）%，可见 1∶1 的吸湿性最低，2∶3 的吸湿性最高。综合考虑，以 PVP K90 与透明质酸

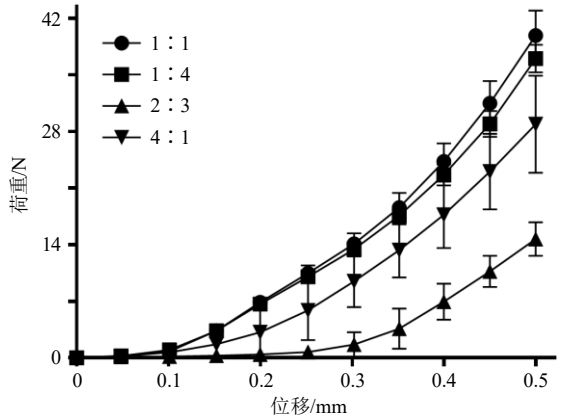


图 4　不同针体基质材料配比的 DMN 的力-位移曲线图（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4　Force-displacement curves of DMN with various ratios of needle body matrix material ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

配比为 1∶1 制备的 DMN 机械强度和吸湿性最优，因此，确定两者以 1∶1 配比作为 DMN-NT 的针体基质材料。

2.2.6　优选的处方工艺　根据上述处方筛选结果，确定如下最佳处方工艺：精密称取 200 mg（或 50 mg）神经毒素，置于烧杯中，加入超纯水，溶解，配成 40 mg/mL（或 10 mg/mL）的神经毒素水溶液，备用。按 1∶1 的比例分别精密称取 PVP K90 和透明质酸各 600 mg，置于烧杯中，加入 40 mg/mL（或 10 mg/mL）的神经毒素水溶液 3.0 mL，充分溶解并搅拌均匀，得 2 种质量浓度的含药基质液。

精密称取 PVA-0588 3 000 mg，置于烧杯中，加入 10 mL 超纯水溶胀 0.5 h 后，95 ℃下搅拌加热使其完全溶解，得 30% PVA 溶液，吸取适量 PVA 溶液加入 HPMC 粉末及适量超纯水，搅拌均匀，配制 PVA/HPMC 比例为 2∶1（质量比）的混合溶液，即得背衬层基质液。

第 1 步：将含药的基质液注入微针模具中，在 25 ℃条件下，真空干燥箱（60 kPa）中保持 10 min，使药液填充到微针模具的针尖中，除去并收集模具表面多余的针体基质，置于干燥器中干燥 1 h；第 2 步：填充背衬层基质，室温下置于变色硅胶干燥器中干燥固化 18 h，然后用镊子小心脱模，即得 DMN-NT，其制备流程示意图见图 5。制得的微针贴片贮藏于干燥器中。

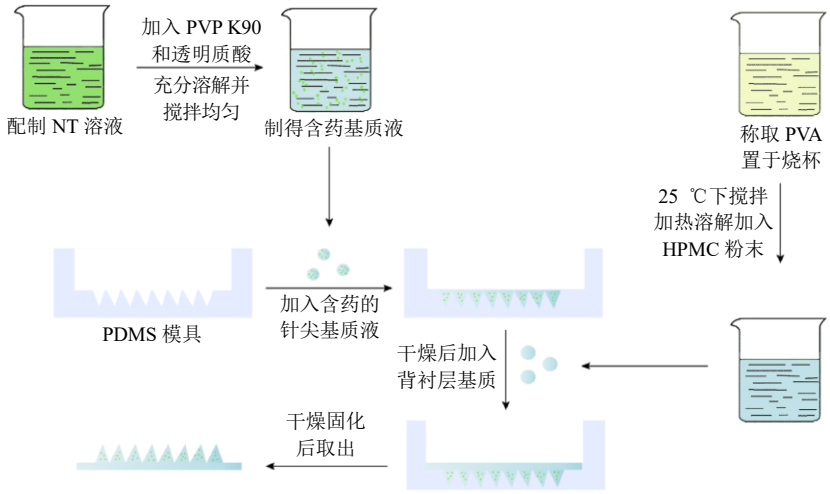


图 5　DMN-NT 制备的流程示意图

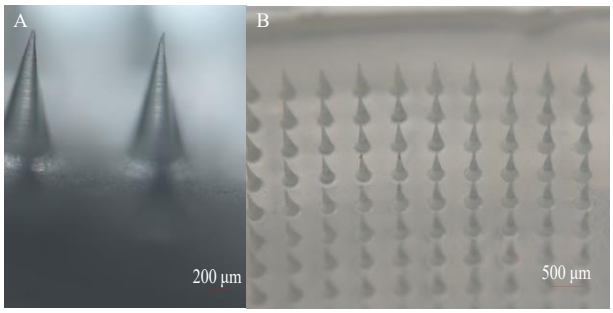
Fig. 5　Flow diagram of preparation of DMN-NT

2.3　微针的质量评价

2.3.1　形态特征　将 DMN-NT 分别置于正置显微镜和体视显微镜下观察其不同角度的微针阵列及形态。结果见图 6，DMN-NT 排列整齐，针形完整，针体呈圆锥状，微针贴片为正方形，面积约为 1 cm^2（1.0 cm×1.0 cm）。

2.3.2　微针含药量测定　取 2 种药物含量的 DMN-NT，制备供试品溶液，按“2.1”项下条件进样测定，平行测定 3 份。结果可见，2 种含药量分别为（172.22±1.30）μg 和（17.38±0.57）μg，表明微针含药量均匀性良好。

2.3.3　穿刺性能试验　取雌性 Wistar 大鼠，ip 3%戊巴比妥钠，待大鼠麻醉后，先用剃毛器剃去大部分鼠毛，再用电动剃须刀剃去剩余鼠毛，通过 CO_2 窒息法处死，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，再用锡箔纸包裹后，放入−80 ℃冰箱，待用。使用时，从−80 ℃冰箱取出锡箔纸包裹的皮肤，小心打开，取出皮肤，放入生理盐水浸泡 30 min 后使用。



A-正置显微镜；B-体视显微镜。

A-upright microscope; B-stereomicroscope.

图 6　DMN-NT 的表观形态

Fig. 6　Appearance of DMN-NT

通过亚甲蓝染色测试评估微针的穿刺性能。将鼠皮用滤纸擦干后，置于干净台面上，用 10 N 的力将低剂量 DMN-NT 垂直按压于大鼠皮肤上，停留 10 min 之后取下 DMN-NT，用亚甲蓝溶液染色 5 min，然后用 PBS 缓冲液洗涤多余的溶液。通过高清手机观察并拍摄孔数，并用公式计算穿透效率。结果如图 7 所示，表明制备的微针可以有效地穿刺皮肤，穿透效率为 90%。

穿透效率＝染色孔数/针孔数

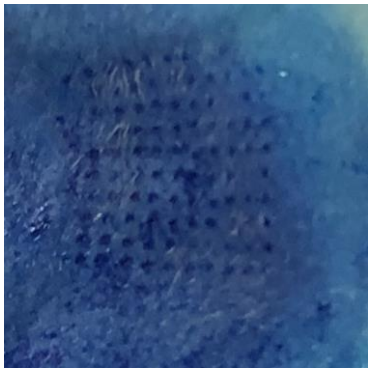
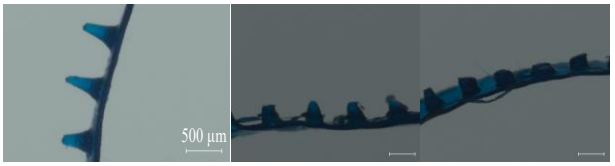


图 7　亚甲蓝染色的 DMN-NT 施用后 Wistar 大鼠皮肤

Fig. 7　Methylene blue stained Wistar rat skin after application of DMN-NT

2.3.4　在体溶解实验　取雌性 Wistar 大鼠，ip 3%戊巴比妥钠，待大鼠麻醉后，用剃毛刀剃除其背部大部分毛发，取适量脱毛膏涂抹于大鼠背部，4～5 min 后用刮板将其刮净，并用生理盐水清洗，用吸水纸擦干。大鼠角质层恢复 24 h 后，将大鼠麻醉并固定在固定板上。用 10 N 的力将低剂量 DMN-NT 垂直按压于大鼠皮肤上，在分别停留 5、10 min 之后取下 DMN-NT，立即在显微镜下观察其形态。结果如图 8 所示，给药前 DMN-NT 针形完整，给药 5 min 后可以明显观察到 DMN-NT 的针尖部分溶解，但近背衬部分的针体较多未溶解，而给药 10 min 后 DMN-NT 的针体大部分溶解。



给药前　　给药 5 min 后　　给药 10 min 后

图 8　DMN-NT 给药后的溶解情况

Fig. 8　Dissolving behaviour of DMN-NT after administration

2.3.5　在体恢复实验　同“2.3.4”项下方法操作，对雌性 Wistar 大鼠进行脱毛处理。大鼠角质层恢复 24 h 后，将大鼠麻醉并固定在固定板上。将低剂量的 DMN-NT 以 10 N 的压力垂直按压于大鼠皮肤上，10 min 后，取下微针，观察皮肤的恢复情况。每隔 15 min 对微针扎入的皮肤部位拍照，直至皮肤完全恢复，结果见图 9。由图可见，微针作用 10 min 后可以在皮肤表面看到明显的规则排列的微小针孔。在取下微针 15 min 后皮肤即呈明显恢复，针孔变得模糊；30 min 后，微针施用后的皮肤几乎观察不到针孔，证明角质层上的孔道已经闭合。因此，本研究制备的微针生物相容性好，对皮肤无明显损伤。



微针取下时　　微针取下后 15 min　　微针取下后 30 min

图 9　DMN-NT 施用后大鼠皮肤的恢复情况

Fig. 9　Recovery of rat skin after the administration of DMN-NT

2.3.6　体外释放度试验　将制得的高剂量 DMN-NT 置于 10 mL pH 值为 7.4 的磷酸缓冲盐溶液（PBS）中（37 ℃，转速为 60 r/min，ZD-85 恒温气浴振荡器），分别在 1、2、3、4、5、6、8、10、12 min，取样 0.8 mL 并立即补充相同体积的同温新鲜溶液。样品经 0.45 μm 微孔滤膜滤过，按“2.1”项下条件测定药物质量浓度，计算累积释放率，并绘制释放曲线，如图 10 所示。结果表明，DMN-NT 在 pH 值为 7.4 的 PBS 中 10 min 时累积释放率已达完全。

采用不同的模型对释放曲线进行拟合，以 t 表示释放时间，Y 表示 t 时刻的累积释放率，结果见表 4，可见按一级方程、Higuchi 方程与 Ritger-Peppas

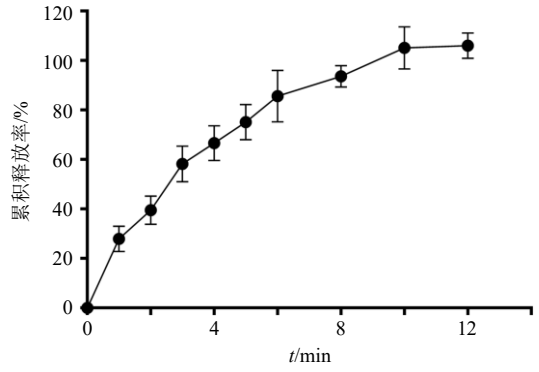


图 10　DMN-NT 体外释放曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 10　*In vitro* release curve of DMN-NT ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 4　体外释放曲线按不同模型拟合的结果

Table 4　Results of fitting *in vitro* release curve using various models

模型	方程	R^2
零级方程	$Y=9.846\ t+18.66$	0.912 7
一级方程	$Y=106.083\ (1-e^{-0.266\ 7\ t})$	0.993 8
Higuchi 方程	$Y=34.612\ t^{1/2}-3.369\ 2$	0.990 9
Ritger-Peppas 方程	$Y=28.310\ t^{0.592\ 9}$	0.986 9

方程拟合的 R^2 值分别为 0.993 8、0.990 9、0.986 9，均具有较好的相关性，其中，一级方程拟合的相关度最高，故制剂的体外药物释放更接近一级动力学。

2.3.7　离体皮肤渗透试验　向 Franz 扩散池的接收池内注入 5 mL pH 值为 7.4 的 PBS 作为接收液，在超声波清洗仪中超声 10 min 排出接收液中的空气。将制得的高剂量 DMN-NT 置于处理好的离体大鼠皮上并施加一定大小的力，1 min 后用医用胶带固定。将皮肤置于接收池上，皮肤角质层朝上，皮肤真皮侧朝向接收池，保证皮肤的有效扩散面积均与接收液相接触。固定好供给池和接收池后将扩散池置于恒温磁力搅拌器上，以 300 r/min 的转速模拟人体皮肤下的血液和组织液流动，温度保持在（32.0±0.5）℃恒温。分别于透皮 0、10、20、30 min 和 1、2、3、4、6、8、10、12 h 收集 0.5 mL 接收液作为样品，取样后随即补充等量的新鲜接收液。将收集的接收液样品以 0.45 μm 微孔滤膜滤过，按“2.1”项下色谱条件测定，按公式计算单位面积累积渗透药物量（Q_n），再按公式计算累积药物渗透百分率（Q_e）。

$$Q_n=(C_n\times5+\sum_{i=1}^{n-1}C_i\times5)/A$$

$$Q_e=AQ_n/W$$

A 为渗透有效皮肤面积（cm²），C_n 为第 n 个时间点接收池中药物浓度（μg/mL），C_i 为第 n 个时间点之前的某个时间点的药物浓度（μg/mL），W 为制剂中的含药量（μg）

以时间（t）为横坐标，分别以 Q_n、Q_e 为纵坐标作图，绘制 2 种渗透曲线（即 Q_n-t、Q_e-t 曲线）。实验中另设一组神经毒素溶液作为对照组。渗透曲线见图 11，结果表明，微针的离体皮肤渗透实验中，前期药物透皮速率较快，1 h 后神经毒素的 Q_e 已大于 50%，后期透皮速率逐渐趋缓，10 h 的 Q_n、Q_e 分别达到（265.41±7.58）μg/cm²、（97.99±2.80）%。然而，对于神经毒素溶液组，在接收液中始终未检测到药物。

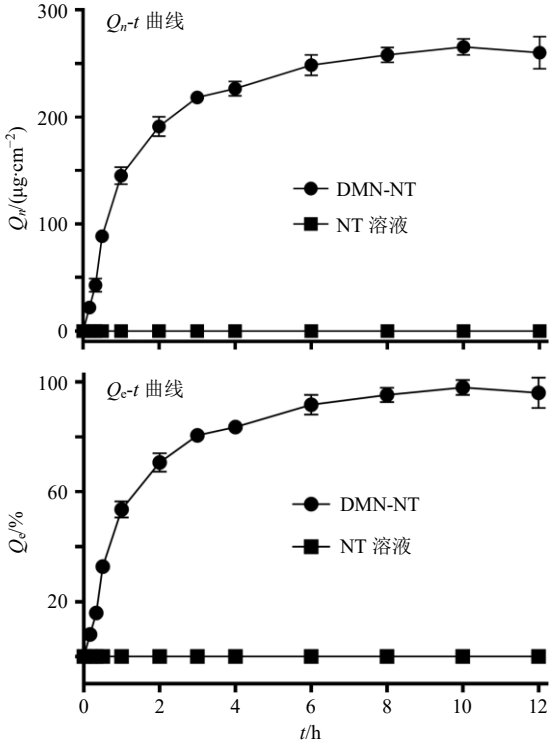


图 11　DMN-NT 离体皮肤渗透实验的 Q_n-t 曲线和 Q_e-t 曲线（$\bar{x} \pm s$，$n = 4$）

Fig. 11　Q_n-t curve and Q_e-t curve of DMN-NT *in vitro* skin penetration experiment ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

上述实验结果证明，DMN 能实现神经毒素经皮给药，并具有理想的药物透皮速率与药物利用率。分别采用 4 种模型对制剂离体皮肤渗透曲线进行拟合，结果见表 5。可见一级速率方程拟合的 R^2 值为 0.983 5，为 4 种拟合方程中最高的，因此 DMN-NT 的离体皮肤渗透最符合一级动力学过程。

2.3.8　微针的初步稳定性考察　将优化处方工艺制得的 DMN-NT 在室温下保干器中分别放置 1 周、2 周、1 个月，按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液，

表 5 DMN-NT 离体皮肤渗透曲线按不同模型拟合的结果

Table 5 Results of fitting *ex vivo* skin permeation curve of DMN-NT using various models

模型	方程	R^2
零级速率方程	Q_n＝24.616 t＋76.77	0.715 9
一级速率方程	Q_n＝259.966 (1－e$^{-0.566\,3\,t}$)	0.983 5
Higuchi 方程	Q_n＝91.241 $t^{1/2}$＋20.055	0.901 1
Ritger-Peppas 方程	Q_n＝96.588 $t^{0.573\,0}$	0.883 3

按“2.1.1”项下条件测定其药物含量，与 0 时间点的药物含量比较。结果表明，放置 1 周、2 周、1 个月后的药物含量分别为 0 时间点时的（99.50±0.96）%、（99.32±0.92）%、（98.81±0.81）%，随着放置时间变长，药物含量基本不变，证明 DMN-NT 稳定性良好。

3 讨论

基质材料的选择会影响微针的成形性、机械性能、吸湿性、柔韧性与释药性等，单一材料往往只能满足 DMN 个别方面的性能要求。本研究对常用聚合物材料进行初步筛选后，根据各材料不同的特性进一步进行复合筛选，以期通过各材料之间性能的互补制备综合性能优良的微针制剂。通过考察微针的成形性、穿刺性能、吸湿致穿刺性能下降和柔韧性，发现单一基质材料或单一针体基质材料与单一背衬层基质材料复合制备的微针存在吸湿致穿刺性能下降较大或者弯曲背衬层导致针体断裂的现象，故进而对两种针体基质材料混合后与两种背衬层基质材料混合后进行复合考察，最终以 20%透明质酸和 20% PVP K90 混合成针体基质材料，以 7.5% HPMC 和 15% PVA 混合成背衬层基质材料制备的复合微针，吸湿致穿刺性能下降较小，且具有良好的机械强度和较佳的柔韧性。

课题组前期在 DMN-NT 的研究中采用硫酸软骨素与 PVP K30（1∶1）作为针体基质材料，以羧甲基纤维素（CMC）为背衬层材料[11]，本研究采用的针体基质材料可以进一步提高针体的力学性能，同时，羧甲基纤维素钠皮下应用时会使动物产生炎症，多次应用导致组织纤维化，应注意含羧甲基纤维素钠的 DMN 长期使用的安全性，故本研究对背衬材料进行了调整。DMN 的基质选择中需要考虑针体材料的可溶性、释药特性、皮肤穿刺性、吸湿性、生物相容性、生物可降解性与安全性等方面，同时也要考虑背衬材料的柔韧性、与针体结合的相容性与黏结性等方面。

目前，研究中尝试应用的材料较多，其中又以天然材料与改性天然材料为主，少量生物相容性较好的合成高分子材料亦有应用。如 PVA 具有良好的黏性，被美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局批准用于局部、口服、阴道、透皮和眼科给药[13-14]，在微针制备中 PVA 与其他材料复合后用于背衬层能改善成品韧性，使成品不易碎裂；PVP 安全、无毒、无刺激性，但是极易引湿，单独用作微针材料时，吸湿会导致穿刺性能下降，且其平均相对分子质量超过 6×10^4 时，不能通过肾脏排泄，而在体内贮积。

本研究中考察了针体中 PVP K90 和透明质酸的配比，因为透明质酸分子链上含有大量的羟基，PVP K90 分子内存在酰胺键，所以两者本身均具有较大的吸湿性，而本研究中通过筛选两者配比，最终制得吸湿性较低的 DMN。可能原因是：PVP K90 与透明质酸两者配伍后的吸湿性除了与单独每个材料的吸湿性有关，同时也受两者分子间相互作用的影响，适当配比下，两者形成较多的分子间氢键，有利于降低微针的吸湿性。

皮肤作为人体的第一道保护屏障，其低渗透性严重限制了大分子药物的透过，只有中等亲脂性的小分子（＜500）药物才能通过角质层实现被动转运，因此，克服角质层屏障是提高药物经皮渗透效率的关键，也是实现高效经皮给药的关键。传统剂型（如贴剂、软膏剂、乳膏剂与凝胶剂等）的经皮给药制剂的药物经皮渗透速率往往较低，如果药物相对分子质量较大或水溶性较强时，药物透皮更加困难。同时，较低的皮肤渗透速率导致传统经皮制剂的药物利用率较低。本研究中制备的 DMN 能携带大分子、水溶性药物神经毒素穿透皮肤，透皮速率大，且药物的皮肤渗透百分率接近 100%。此外，对于药物皮肤渗透动力学，由于皮肤角质层恒定的药物储库作用，传统经皮给药制剂大多为零级动力学过程。然而，本研究制备的 DMN-NT 的吸收呈现明显的一级动力学（是指药物在某部位的转运速率与该部位的药物浓度或药量的一次方成正比）特征，这可能是由于微针突破了角质层屏障后，微针在水性的活性表皮与真皮中迅速溶解、释药，故后续皮肤渗透呈现药物浓度依赖性。

本研究以眼镜蛇神经毒素为模型药物，选用分别具有良好韧性和脆性的聚合物材料，采用真空模板填充法制备复合微针。制得的 DMN-NT 结构形态

良好，载药量稳定，体外释放和皮肤穿透效果良好。该微针作为神经毒素给药新剂型，能克服药物透皮给药的渗透屏障，提高递送效率，同时具备皮肤安全性好，生物相容性好等优势，为后续开发新型大分子药物经皮给药制剂提供新思路。但本研究对于制剂在活体上的药动学与药效研究尚未开展，后续有待完善。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 朱天新, 袁彩君, 李晓红. 科博肽与三种药物配伍使用的实验研究 [J]. 中国现代应用药学, 2007, 24(5): 415-418.

[2] Barber C M, Isbister G K, Hodgson W C. Alpha neurotoxins [J]. *Toxicon*, 2013, 66: 47-58.

[3] Cheng B C, Zhou X P, Zhu Q, *et al*. Cobratoxin inhibits pain-evoked discharge of neurons in thalamic parafascicular nucleus in rats: Involvement of cholinergic and serotonergic systems [J]. *Toxicon*, 2009, 54(3): 224-232.

[4] Matteis V, Rizzello L, Cascione M, *et al*. Green plasmonic nanoparticles and bio-inspired stimuli-responsive vesicles in cancer therapy application [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(6): 1083.

[5] Zhang X X, Fu X, Chen G P, *et al*. Versatile ice microneedles for transdermal delivery of diverse actives [J]. *Adv Sci*, 2021, 8(17): e2101210.

[6] Lopez RF, Seto JE, Blankschtein D, *et al*. Enhancing the transdermal delivery of rigid nanoparticles using the simultaneous application of ultrasound and sodium lauryl sulfate [J]. *Biomaterials*, 2011, 32(3): 933-41.

[7] Dvořáková K, Štěpánek P, Kroupová J, *et al*. *N*-alkylmorpholines: Potent dermal and transdermal skin permeation enhancers [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 14(1): 64.

[8] Lim D J, Kim H J. Microneedles in action: Microneedling and microneedles-assisted transdermal delivery [J]. *Polymers*, 2022, 14(8): 1608.

[9] Yu X Q, Zhao J, Fan D D. The progress in the application of dissolving microneedles in biomedicine [J]. *Polymers*, 2023, 15(20): 4059.

[10] Ita K. Dissolving microneedles for transdermal drug delivery: Advances and challenges [J]. *Biomed. Pharmacother*, 2017, 93:1116-1127.

[11] 夏爱晓, 姚文栋, 陈晓劼, 等. 中华眼镜蛇神经毒素可溶性微针的制备及体外经皮渗透性研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 625-630.

[12] Hu L L, Liao Z C, Hu Q Q, *et al*. Novel *Bletilla striata* polysaccharide microneedles: Fabrication, characterization, and *in vitro* transcutaneous drug delivery [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 117: 928-936.

[13] 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.

[14] Moore L E, Vucen S, Moore A C. Trends in drug- and vaccine-based dissolvable microneedle materials and methods of fabrication [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2022, 173: 54-72.

[责任编辑 郑礼胜]