

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00767

## 盐酸青藤碱在微针阵列作用下的透皮给药研究

李伟泽<sup>1\*</sup>, 闫菁华<sup>2</sup>, 赵 宁<sup>1</sup>, 刘少静<sup>1</sup>

1. 西安医学院药剂学教研室, 西安 710021

2. 西北大学生命科学学院中药学教研室, 西安 710069

**[摘要]** **目的** 探索盐酸青藤碱在微针阵列作用下的透皮给药规律与微针促进药物透皮吸收的机制。**方法** 高效液相色谱法测定青藤碱的含量, 裸鼠皮肤用微针阵列预刺处理, 采用水平双室扩散池法研究微针的针尖形状、刺入力、滞留时间以及阵列数对于盐酸青藤碱透皮给药的影响规律。将微针预刺处理的皮肤制备成切片, 并用显微镜观察皮肤的变化。**结果** 微针阵列预刺处理与被动扩散比较能显著提高盐酸青藤碱透皮给药的累积渗透量( $P < 0.01$ ), 但平顶微针比尖顶微针更能有效促进药物的透皮吸收; 药物的累积渗透量随着微针处理皮肤的刺入力的增加而增加, 但当刺入力超过 5.0 N 时, 药物的累积渗透量不再显著增加; 随着微针在皮肤中滞留时间的延长药物的累积渗透量不断增大, 当滞留时间超过 60 s 时药物的累积渗透量不再显著增加; 尽管药物的累积渗透量随着微针阵列数的增加而增加, 但是二者之间无正向线性关系。皮肤切片表明微针刺入皮肤后能够在皮肤上形成跨越角质层的微孔道。**结论** 微针可以在皮肤上形成微孔道而增强皮肤对药物的渗透性, 从而为盐酸青藤碱透皮给药系统提供一种新型、高效的透皮给药新技术, 具有广泛的应用前景。

**[关键词]** 盐酸青藤碱; 微针阵列; 皮肤给药

**[中图分类号]** R 943.43

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2011)07-0767-05

## Studies on transdermal delivery of sinomenine hydrochloride through mouse skin treated by microneedle arrays

LI Wei-ze<sup>1\*</sup>, YAN Jing-hua<sup>2</sup>, ZHAO Ning<sup>1</sup>, LIU Shao-jing<sup>1</sup>

1. Department of Pharmaceutics, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi, China

2. Department of Traditional Chinese Herbs, School of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, Shaanxi, China

**[Abstract]** **Objective** To study the characteristics and mechanism of transdermal delivery of sinomenine hydrochloride (SH) through mouse skin treated by solid silicon microneedle arrays. **Methods** The amount of SH was determined by HPLC system. Hairless rat skin was pretreated with microneedle arrays. The side-by-side diffusion cell method was used to investigate the effects of needlepoint shape, different insertion forces, retention time, and number of microneedles on transdermal SH delivery. Skin samples treated by microneedles were made into paraffin sections for histological examination and were viewed by brightfield microscopy. **Results** The skin pretreated with microneedle arrays had a remarkable enhancement of SH transport compared with passive diffusion group ( $P < 0.01$ ); the flat tipped microneedles were more effective than the sharp tipped microneedles in enhancing the skin permeability. The accumulation of SH increased with the enhancement of insertion force; however, when the insertion force exceeded 5.0 N, the accumulation of SH no longer increased. The skin permeability was enhanced with the increase of retention time; when the retention time exceeded 1.0 min, it no longer increased SH accumulation. Although skin permeability increased with the microneedle number, there was no linear correlation was found. Histological examination showed that microneedle piercing created micro-conduits in skin. **Conclusion** Microneedles can create conduits in rat skin and greatly increase the skin permeability of SH; microneedle arrays provide an efficient and promising technology for transdermal drug delivery of SH.

**[Key words]** sinomenine hydrochloride; microneedle arrays; cutaneous administration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(7): 767-771]

Henry 等<sup>[1]</sup>于 1998 年首次将微针阵列(microneedle arrays)应用于透皮给药系统(TDDS)的研究, 之后

关于微针的制备与应用研究得到了飞速的发展。微针是一种将注射给药与透皮贴剂优点融合于一体的

**[收稿日期]** 2011-03-26

**[接受日期]** 2011-05-05

**[基金项目]** 西安医学院博士科研基金(2010Doc 01). Supported by the Doctoral Scientific Research Foundation of Xi'an Medical University (2010Doc 01).

**[作者简介]** 李伟泽, 博士.

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 029-86177546, E-mail: weizeli@126.com

崭新的透皮给药技术,近年来已广泛应用于各种类型的药物分子包括蛋白多肽类与载药纳米微粒的透皮给药研究<sup>[2-7]</sup>。国外有研究报道认为当微针针体的长度低于 300  $\mu\text{m}$  时,由于皮肤组织的固有弹性而不能有效刺入皮肤,其微针刺入皮肤均使用一定的机器设备快速垂直刺入<sup>[8-9]</sup>;也有研究指出只要微针针体的长度能够刺穿皮肤角质层,则微针的长度对于皮肤的渗透性将无显著性的影响<sup>[7,10]</sup>。

目前,国际上关于微针的研究中所使用的微针的长度一般为 300~1 000  $\mu\text{m}$  左右。皮肤角质层的厚度约为 10~40  $\mu\text{m}$ ,活性表皮的厚度约为 50~100  $\mu\text{m}$ 。因此,本研究设想长度为 100  $\mu\text{m}$  的实体硅微针只要在合适的刺入方式下刺入皮肤,就会促进药物的透皮吸收。中医在针灸过程中所使用的针灸针并不是做单一的垂直刺入动作,常伴随着“拧”、“转”、“晃”、“摇”等动作而利于针刺入皮肤并刺激经络穴位。本研究在使用微针阵列预处理皮肤时借鉴针灸的手法即用手按压微针并做“摇晃”动作,并以盐酸青藤碱(sinomenine hydrochloride, SH)为模型药物,考察微针阵列预处理皮肤后对青藤碱透皮给药的影响规律。

## 1 材料和方法

1.1 仪器和材料 盐酸青藤碱(纯度 99.7%,西安小草植物科技有限责任公司);青藤碱标准品(中国药品生物制品检定所);甲醇、乙二胺(色谱纯,西安化学试剂厂)。苏木精、伊红(上海生化试剂);伊文思蓝(Sigma,美国)。

HIC-10ASP 高效液相色谱仪(岛津;SPD-10A 检测器);YP-5001 电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);皮肤切片器(德国, Waldorf);显微镜(日本, Nikon)。双室扩散池(有效扩散面积  $A_e = 3.46 \text{ cm}^2$ , 容积  $V = 20.0 \text{ ml}$ )。微针阵列(长度 100  $\mu\text{m}$ , 阵列数 64、100 和 144, 针尖为尖顶与平顶, 单晶硅材料, 由西北工业大学制备)。HWY/Slc 裸鼠, 鼠龄 60 d, 购自第四军医大学实验动物中心。

### 1.2 盐酸青藤碱含量测定

1.2.1 色谱条件 色谱柱为 NUCLEOSIL  $C_{18}$  柱(5.0  $\mu\text{m}$ , 125 mm  $\times$  4.6 mm);流动相: 甲醇-(重蒸水-乙二胺 = 300 : 1) = 52 : 48(V/V);检测波长: 262 nm, 流速: 1.0 ml/min;进样量: 20  $\mu\text{l}$ 。

1.2.2 标准曲线的制备 精密称取青藤碱标准品适量, 加适量超纯水使溶解, 并用超纯水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 0.5、2.0、4.0、5.0、6.0 ml 分别置 50 ml 量瓶中, 加超纯水至刻度, 摇匀, 分别量取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪。以峰面积平均值  $A$  为纵坐标, 浓度  $C$  为横坐标, 进行线性回归。得到标准曲

线:  $A = 1.56 \times 10^6 C - 6.2 \times 10^4$  ( $r = 0.9995$ ), 线性范围为 5~60  $\mu\text{g/ml}$ 。

1.2.3 方法学考察 稳定性试验: 在线性范围配制 35  $\mu\text{g/ml}$  标准品溶液, 分别于 0、1、3、7、10、15、24 h 取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪测定其峰面积, 峰面积的 RSD 为 0.82%, 表明稳定性良好。

精密度试验: 取浓度为 35  $\mu\text{g/ml}$  标准品溶液 20  $\mu\text{l}$ , 重复注入液相色谱仪 6 次测定其峰面积, 结果 RSD 为 0.74%, 表明在此色谱条件下精密度良好。

回收率试验: 取已知含量的接收液 0.5 ml, 分别加入标准品溶液 1.0、0.8、0.6 ml, 混合均匀后, 吸取 20  $\mu\text{l}$  样品按上述色谱条件测定, 结果青藤碱的平均回收率为 98.4%, RSD 为 0.43%。

### 1.3 体外透皮给药

1.3.1 微针预处理皮肤 健康合格裸鼠, 脱颈处死, 然后剥离腹部处皮肤, 小心剔除皮下脂肪等附属组织; 用蒸馏水冲洗干净, 平铺于洁净的置于电子天平上的泡沫聚苯乙烯支架上。微针处理皮肤的方法: 分别用尖顶和平顶微针(100 阵列), 在 7.0 N 的压力(力的大小根据电子天平的读数控制)下用手按压并做“摇晃”动作, 滞留于皮肤 60 s 后移走微针; 尖顶微针(100 阵列)在不同的刺入力(1.0、3.0、5.0 和 7.0 N)作用下用手按压并做“摇晃”动作, 滞留于皮肤 60 s 后移走微针; 尖顶微针(100 阵列)在 7.0 N 的压力下用手按压并做“摇晃”动作, 滞留于皮肤不同时间(0、30、60 和 90 s), 之后移走微针; 3 种不同阵列(64、100 和 144)的尖顶微针在 7.0 N 的压力下用手按压并做“摇晃”动作, 滞留于皮肤 60 s 后移走微针。

1.3.2 透皮给药 将微针处理后的裸鼠皮肤即刻夹于水平双室扩散池中间, 皮肤的角质面向供给池, 真皮面向接收池; 双室扩散池固定在调温恒控磁力搅拌器上, 并以恒定的速度搅拌接收液, 保持恒温在  $(32 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ; 在供给池中加入 0.4%(W/W)的青藤碱水溶液 15 ml 作为供给液, 在接收池中加入 15 ml 的双蒸水作为接收液。然后每隔 1.0 h 取接收液 0.5 ml, 并补加等量的新鲜接收液, 共取 8 个样, 重复 3 次。以不做任何处理的裸鼠皮肤进行的被动扩散为对照。样品经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 取 20  $\mu\text{l}$ , 注入液相色谱仪测定药物的含量。

1.3.3 累积渗透量的计算 累积渗透量( $\Delta M$ )计算公式:  $\Delta M = \sum CV/A_e$ , 其中  $V$  为接收液的体积(ml);  $C$  为接收液中的药物浓度( $\mu\text{g/ml}$ );  $A_e$  为扩散池的有效面积( $\text{cm}^2$ )。

1.4 体外透皮给药机制 将微针处理后的裸鼠皮肤进行固定、脱水、染色、包埋与切片等处理, 用显微镜观察微针刺入皮肤后在皮肤上形成的刺痕。

志愿者手臂皮肤用 70% 医用乙醇擦洗消毒, 将尖顶微针(100 阵列)用手在普通压力下刺入手臂皮肤并做“摇晃”动作按压微针, 滞留于皮肤 60 s 后移走微针; 在处理部位涂布适量的 0.4% (W/W) 伊文思蓝, 30 min 后用蒸馏水将皮肤表面冲洗干净, 用摄像机记录皮肤表面的变化。本实验得到西安医学院伦理委员会的批准。

1.5 统计学处理 实验结果运用 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 两两之间的比较用  $t$  检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 针尖形状对盐酸青藤碱累积渗透量的影响

由图 1 可知, 平顶微针和尖顶微针预处理皮肤后, 与被动扩散比较均能促进青藤碱的累积渗透量。8.0 h 时, 平顶微针组、尖顶微针组与被动扩散组比较均极大地促进了药物的透皮吸收( $P < 0.01$ ); 其中平顶微针处理后透过皮肤的药物累积渗透量是尖顶微针的 1.43 倍, 表明平顶微针能够更加有效地破坏皮肤角质层障碍而提高皮肤对水溶性药物青藤碱的渗透性。本研究所用的尖顶微针和平顶微针如图 2 所示。

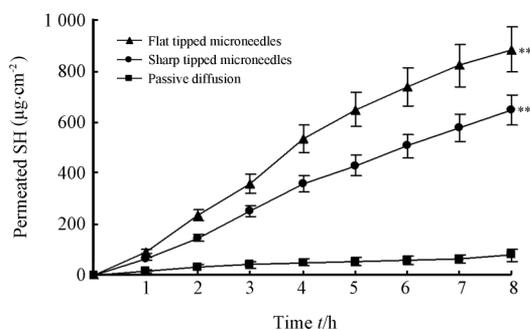


图 1 不同针尖形状的微针处理皮肤后 SH 的累积渗透量

Fig 1 Accumulation of SH after skin pretreated by flat tipped and sharp tipped microneedles

SH: Sinomenine hydrochloride. \*\*  $P < 0.01$  vs passive diffusion group;  $n = 3, \bar{x} \pm s$

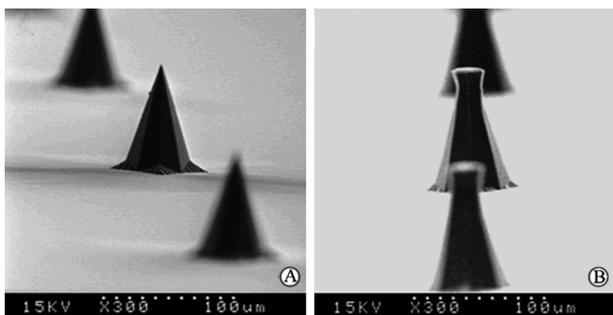


图 2 尖顶微针(A)和平顶微针(B)的扫描电镜图

Fig 2 Scanning electronic microscopy images of sharp tipped(A) and flat tipped(B) microneedles

2.2 刺入力对盐酸青藤碱累积渗透量的影响 由图 3 可知, 药物的累积渗透量随着微针预处理皮肤的刺入力的增加而增加, 特别是刺入力由 1.0 N 增加到 5.0 N 时, 累积渗透量增加明显; 表明微针用手按压后能够刺入皮肤, 且微针对于皮肤角质层障碍的破坏程度随着刺入力的增加而增大。8.0 h 时, 刺入力为 7.0 N 的微针预处理皮肤组的药物累积渗透量是刺入力为 5.0 N 的 1.09 倍, 二者之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 表明通过皮肤的药物累积渗透量并不会随着刺入力的增加而一直显著增大; 实验结果显示, 对于青藤碱的体外透皮给药, 当微针的刺入力超过 5.0 N 时, 随着刺入力的增加青藤碱的累积渗透量不再显著增加。本实验用电子天平测得普通人手指按压力为 6~10 N, 因此, 手指在普通压力下按压微针即可将其刺入皮肤。

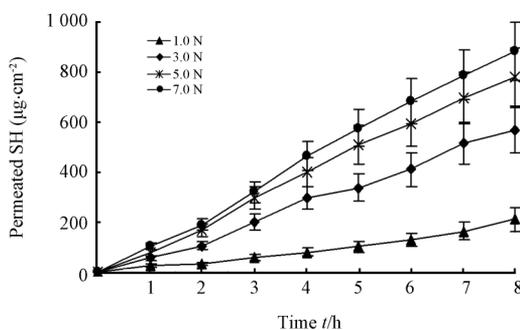


图 3 微针用不同刺入力处理皮肤后 SH 的累积渗透量

Fig 3 Accumulation of SH after skin pretreated by microneedles with different insertion forces

SH: Sinomenine hydrochloride.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.3 滞留时间对盐酸青藤碱累积渗透量的影响 由图 4 可知, 随着微针在皮肤中滞留时间的延长, 青藤碱透过皮肤的累积渗透量不断增加。8.0 h 时, 青藤碱透过微针预处理皮肤所用滞留时间为 90 s 的药物累积渗透量是滞留时间为 60 s 的 1.12 倍, 但二者之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 表明药物的累积渗透量并不会随着微针滞留于皮肤中的时间的延长而无限增大。

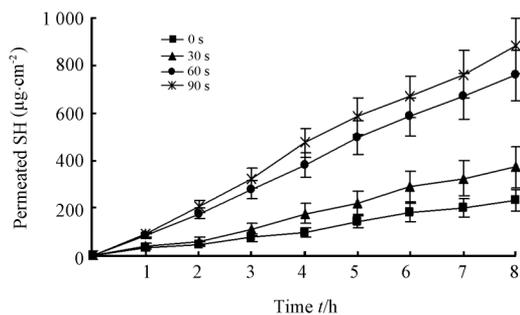


图 4 微针刺入皮肤滞留不同时间后 SH 的累积渗透量

Fig 4 Accumulation of SH after skin pretreated by microneedles for different time periods

SH: Sinomenine hydrochloride.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.4 阵列数对盐酸青藤碱累积渗透量的影响 由图5可知,不同阵列的微针处理皮肤后均能促进青藤碱的透皮吸收,且药物的累积渗透量随着阵列数的增加而增加。8.0 h时,阵列数为64、100和144的微针预处理皮肤后药物的累积渗透量的比值为1:1.51:1.95,3种微针的阵列数之比为1:1.56:2.25,结果表明药物的累积渗透量与微针阵列数之间并无线性关系。

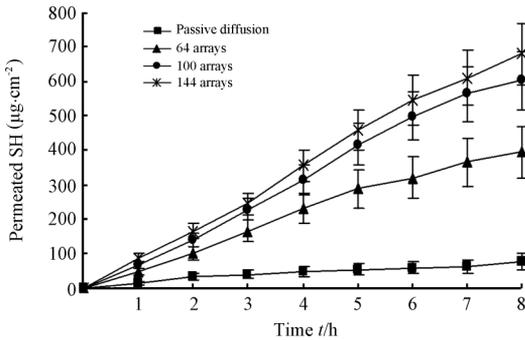


图5 不同阵列的微针处理皮肤后SH的累积渗透量  
 Fig 5 Accumulation of SH after skin pretreated by three super-short microneedle arrays  
 SH: Sinomenine hydrochloride. n=3,  $\bar{x} \pm s$

2.5 微针刺入皮肤后的刺痕 由图6A、6B可知,微针刺入皮肤后能够在皮肤上形成一定大小且断面(层)明显的跨越皮肤角质层的真实“微孔道”。图6C显示微针预处理志愿者手臂皮肤后涂伊文思蓝,在志愿者皮肤上形成了与微针阵列相对应的蓝色小点,但无出血现象,表明微针刺穿了皮肤角质层从而促进伊文思蓝通过皮肤上形成的“微孔道”进入皮肤;且在微针处理皮肤的过程无疼痛与不适。综上,微针促进药物透皮吸收的机制如图7所示。

图7为微针刺入皮肤的示意图,其中图7A是微针刺入皮肤之前的示意图,可见角质层(stratum corneum, SC)完整。图7B是微针与皮下针刺入皮肤的示意图,可见微针刺穿角质层进入活性表皮,但未到达真皮层;皮下针直接刺穿角质层与活性表皮,进入真皮层,刺伤真皮层中的神经和毛细血管。图7C显示微针在皮肤上形成了跨越皮肤角质层的孔道,未伤及神经和毛细血管,且刺入部位无出血;皮下针刺入皮肤后虽然能够在皮肤上形成孔道,但损伤了真皮层中的神经和毛细血管,在刺入部位有出血。

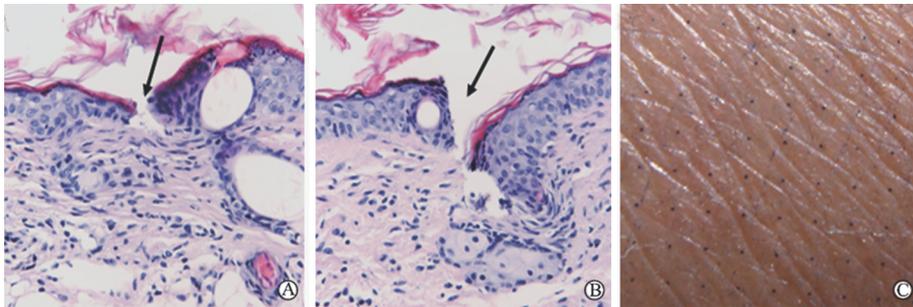


图6 微针处理裸鼠皮肤(A、B,箭头所示)与志愿者皮肤(C)后的变化  
 Fig 6 Histological sections of hairless rat skin(A, B, arrows) and skin surface of healthy volunteer(C) after microneedle treatment  
 Original magnification:  $\times 400$ (A, B);  $\times 4$ (C)

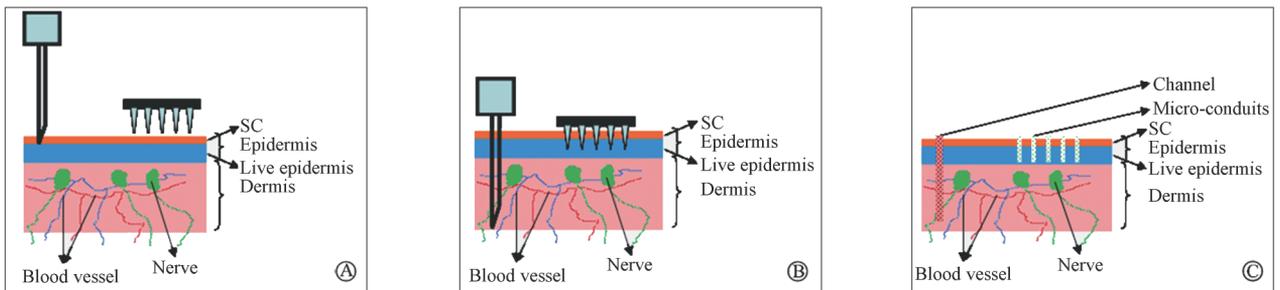


图7 微针作用机制示意图  
 Fig 7 Schematic diagram for creation of micro-conduits by microneedle piercing  
 SC: Stratum corneum

### 3 讨论

由体外透皮给药实验可知,相同长度条件下,微针的针尖形状不同则对药物透皮吸收的促进作用不同,平顶微针较尖顶微针更能有效促进药物的透皮吸收,其原因可能是平顶微针由于横截面积大而能更大程度地破坏皮肤角质层障碍。药物的累积渗透量随着微针处理皮肤的刺入力的增加而增加,但当刺入力超过 5.0 N 时,药物的累积渗透量不再显著增加;表明只要刺入力能够将微针完全刺入皮肤,则刺入力的大小对于透皮给药的影响不再显著。随着微针在皮肤组织中滞留时间的不断延长,药物透过皮肤的累积渗透量不断增加;其原因可能是皮肤组织是一个弹性体,当微针刺入皮肤后,被微针针体挤压的皮肤就会发生变形,挤压时间不断延长则皮肤发生的可逆的弹性形变就会逐渐转变为不可逆的塑性形变,而塑性形变比弹性形变保持的时间长,因此,在皮肤中形成的“微孔道”的保留时间就长。不同阵列的微针处理皮肤后均能显著增加药物的透皮吸收,且药物的累积渗透量随着微针阵列数的增加而增加,但是药物的累积渗透量与微针阵列数之间无线性关系<sup>[3,10]</sup>;其原因可能是在相同条件下,微针阵列数的增加会影响微针刺入皮肤的性能。

微针刺入裸鼠皮肤与志愿者皮肤的研究结果表明,微针用手在普通压力下能够刺入皮肤,并在皮肤上形成一定大小的跨越皮肤角质层的“微孔道”;这些真实存在的孔道直接穿过皮肤角质层而成为药物分子透皮吸收的通道。微针针体较为短小,其刺入皮肤后未损伤真皮层中的神经与毛细血管;所以,刺入部位没有出血现象,使用过程也无疼痛和不适。

本研究还发现微针由于针体短小其强度大大增强,可以反复应用多次而不会发生针体断裂(显微镜下观察)。因此,微针阵列是一种新型、高效、安全的透皮给药新技术,具有广阔的应用前景。

### [参考文献]

- [1] Henry S, McAllister D V, Allen M G, Prausnitz M R. Microfabricated microneedles: a novel approach to transdermal drug delivery [J]. *J Pharm Sci*, 1998, 87: 922-925.
- [2] Harvinder S G, Mark R P. Coated microneedles for transdermal delivery [J]. *J Contr Rel*, 2007, 117: 227-237.
- [3] Xue M W, Hiroaki T, Kenji S. Effects of pretreatment of needle puncture and sandpaper abrasion on the *in vitro* skin permeation of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran [J]. *Int J Pharm*, 2006, 316: 102-108.
- [4] Yukako I, Eiji H, Atsushi S, Nobuyuki S, Kanji T. Feasibility of microneedles for percutaneous absorption of insulin [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2006, 29: 82-88.
- [5] Cormier M, Johnson B, Ameri M, Nyam K, Libiran L, Zhang D D, et al. Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system [J]. *J Contr Rel*, 2004, 97: 503-511.
- [6] McAllister D V. Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13755-13760.
- [7] Verbaan F J, Bal S M, van den Berg D J, Groenink W H H, Verpoorten H, Lüttge R, et al. Assembled microneedle arrays enhance the transport of compounds varying over a large range of molecular weight across human dermatomed skin [J]. *J Contr Rel*, 2007, 117: 238-245.
- [8] Martanto W, Moore J S, Couse T, Prausnitz M R. Mechanism of fluid infusion during microneedle insertion and retraction [J]. *J Contr Rel*, 2006, 112: 357-361.
- [9] Ito Y, Yoshimitsu J I, Shiroyama K, Sugioka N, Takada K. Self-dissolving microneedles for the percutaneous absorption of EPO in mice [J]. *J Drug Target*, 2006, 14: 255-261.
- [10] Verbaan F J, Bal S M, van den Berg D J, Dijkman J A, van Hecke M, Verpoorten H, et al. Improved piercing of microneedle arrays in dermatomed human skin by an impact insertion method [J]. *J Contr Rel*, 2008, 128: 80-88.

[本文编辑] 尹 茶