

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00080

微针对熊果苷皮肤给药的促渗作用研究

张 玮¹, 高 静², 张 敏¹, 王晓宇¹, 丁雪鹰², 武 鑫¹, 侯雪梅¹, 高 申^{1*}

1. 第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433

2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 考察微针对熊果苷皮肤给药的促渗作用, 并与化学促渗剂氮酮进行比较。**方法** 采用深反应离子刻蚀技术制备星形硅微针。制备熊果苷水凝胶剂, 采用 Franz 扩散池法, 将人体腹部皮肤置于扩散池间, 分 3 组: 微针实验组供给室加入熊果苷水凝胶, 皮肤采用微针作用; 氮酮对照组供给室分别加入含有 1%、3%、5% 氮酮的熊果苷水凝胶, 皮肤无微针作用; 空白对照组供给室加入无氮酮熊果苷水凝胶, 皮肤无微针作用。分别在 1、3、6、12、24、36、48 h 等时间点取样, 以 HPLC 法测定接收池、皮肤表皮层和真皮层中的熊果苷含量, 液相条件: C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇: 1×10⁻³ mol/ml 盐酸(5:95); 柱温 25℃; 流速 1 ml/min; 检测波长 282 nm。求算熊果苷的累积透过量(Q_r)、稳态透皮速率(J_s)及皮肤累积滞留量(Q_s)。**结果** 星形硅微针可以刺穿人体皮肤角质层。HPLC 标准曲线方程 C=0.000 2A-0.182 9 (r=0.999 9), 线性范围 0.4~50 μg/ml、日内精密度和日间精密度的分别为 2.4% 和 2.74%, 回收率均大于 90%。微针作用组的熊果苷累计透过量、稳态透皮速率和表皮累积滞留量均高于 5% 氮酮组(P<0.01)。**结论** 微针作用皮肤后可显著增加熊果苷皮肤渗透量。

[关键词] 微针; 熊果苷; 氮酮; 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)01-0080-04

Microneedle technique in promoting transdermal delivery of arbutin

ZHANG Wei¹, GAO Jing², ZHANG Min¹, WANG Xiao-yu¹, DING Xue-ying², WU Xin¹, HOU Xue-mei¹, GAO Shen^{1*}

1. Department of Pharmaceutics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To study the promoting effects of microneedle arrays on transdermal delivery of arbutin by comparing with the effect of chemical penetration enhancer azone. **Methods** The microneedles were fabricated with single-crystal Si as starting material using a series of photolithography, thin-film deposition, and reactive ion etching techniques. Franz-cells were used in the transdermal delivery experiment with human abdominal skin. The study was divided into the following 3 groups: the microneedle group (arbutin hydrogel without penetration enhancer, and the skin was treated with microneedle arrays); the control group (arbutin hydrogels containing 1%, 3%, and 5% azone (W/V), and the skin received no microneedle treatment); and blank control group (arbutin hydrogel without azone, and the skin received no microneedle treatment). Arbutin levels in the receptor solution, epidermis and dermis were determined by HPLC at 1, 3, 6, 12, 24, 36 and 48 h. The analyses were performed with a C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), at room temperature, mobile phase methanol: 1×10⁻³ mol/ml HCl solution (V/V, 5:95), flow rate 1 ml/min, and detective wavelength 282 nm. The accumulative penetration amount (Q_r), steady-state flux (J_s) and the accumulative deposition amount (Q_s) were calculated. **Results** The microneedles could pass the human skin. The standard curve was: C=0.000 2A-0.182 9 (r=0.999 9), 0.4-50 μg/ml. The RSD values of intraday and interday precisions were 2.4% and 2.74%, respectively; and the recovery was higher than 90%. The values of Q_r, J_s, and Q_s in the microneedle group were significantly higher than those in the 5% azone group (P<0.01). **Conclusion** Microneedles can greatly promote the skin permeability and deposition of arbutin.

[Key words] microneedles; arbutin; azone; cutaneous administration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(1): 80-83]

[收稿日期] 2010-07-05 **[接受日期]** 2010-11-25**[基金项目]** 国家自然科学基金(81000689), 上海市自然科学基金(10ZR1437300), “重大新药创制”科技重大专项(2008ZXJ09010-001). Supported by National Natural Science Foundation of China (81000689), Natural Science Foundation of Shanghai Municipal Government (10ZR1437300) and Special Project for “Major New Drug Innovation” (2008ZXJ09010-001).**[作者简介]** 张 玮, 博士生. E-mail: jydzw1981@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873715, E-mail: liullk@126.com

熊果苷(arbutin)是源于绿色植物的天然活性物质,能够有效抑制皮肤黑素细胞中的酪氨酸酶的活性,阻断黑色素的形成,从而减少皮肤色素沉积,祛除色斑和雀斑,而且对黑素细胞毒性低,是目前常用的安全、有效的美白祛斑剂之一^[1-2]。但由于皮肤角质层屏障作用及熊果苷强亲水性(logP值, -1.49),其皮肤渗透量低^[3],美白效果差,需要采用一定的促渗方法增加熊果苷的皮肤渗透量。目前美白制剂中多采用添加化学促渗剂的方法促进药物的经皮渗透,物理促渗的方法使用较少。微针透皮给药技术是在微电子机械系统加工技术与经皮促渗技术研究日益成熟的条件下发展起来的一种新型给药方式。微针阵列具有尺度小、强度高、可精确控制刺入位置与深度、无痛穿刺等优势^[4],可用于化学药物、蛋白、疫苗等的经皮给药^[5-6],具有极大的发展前景。氮酮(azone)是目前常用的化学促渗剂之一,对熊果苷具有很好的促透作用,因此本研究以氮酮作为对照促渗剂,与微针对熊果苷的促透作用进行比较。

作用于皮肤局部的药物不同于通过皮肤吸收而作用于全身系统的药物,其作用部位是皮层,因此给药后应采用皮肤累计滞留量作为促渗效果的评价指标。熊果苷作用的黑素细胞位于皮肤中的表皮基底层,熊果苷滞留于表皮层的量越多,其效果越好,因此本研究采用表皮层中熊果苷累计滞留量作为促渗效果的主要评价指标。

1 仪器和材料

XDY-1 荧光显微镜(日本, Olympus); VEJA5136 型扫描电镜(捷克, Tescan); TK-12D 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易公司); Hitachi 高效液相色谱仪(日本, Hitachi); Sartorius BS110S 型电子天平(北京赛多利斯天平有限公司); 熊果苷(北京贝丽莱斯生物化学有限公司); 甲醇(TEDIA 公司); NP700(美国国际特品公司); 甘油(国药集团化学试剂有限公司); 氮酮(北京耐确生化研究所)。

2 方法

2.1 熊果苷的方法学考察

2.1.1 色谱条件 色谱柱为迪马 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 1 × 10⁻³ mol/ml 盐酸(5: 95); 柱温 25℃; 流速 1 ml/min; 检测波长 282 nm; 进样量 20 μl。

2.1.2 标准曲线制备 精密称取 10 mg 熊果苷置 10 ml 容量瓶中, 加水超声溶解并定容作为储备液。加水稀释成浓度为 0.4、1、10、25、50 μg/ml 的系列标准品溶液。分别取熊果苷标准溶液 20 μl 进样分析, 每一

浓度重复测定 3 次, 取峰面积平均值。以熊果苷浓度 C 对峰面积 A 的平均值进行线性回归, 得到回归方程。

2.1.3 精密度考察 分别取 20 μl 高、中、低浓度(0.4、10、50 μg/ml)的熊果苷标准品溶液, 同 1 d 内重复测定 3 次, 统计各浓度测定数据的相对标准偏差(RSD), 即为日内精密度。分别取 20 μl 高、中、低浓度的熊果苷标准品溶液, 在不同天内重复测定, 连续测定 3 d, 统计各浓度测定数据的 RSD, 即为日间精密度。

2.1.4 提取回收率 将空白皮肤采用热板分离法分离表皮层和真皮层后, 剪碎, 加入 1 ml 高、中、低浓度的熊果苷标准品溶液, 匀浆, 超声提取 20 min 后, 高速离心(11 000 × g, 20 min), 上清液用 0.45 μm 孔径的滤膜滤过, HPLC 法测定含量。

2.1.5 样品测定 将接收液、表皮层和真皮层样品按照上述方法测定熊果苷的含量。以空白皮肤按上述方法制备样品后行 HPLC 测定, 作为空白对照。

2.2 熊果苷水凝胶制备 将 1 g NP700 分散于 5 g 甘油中, 搅拌 20 min, 将含药水溶液(熊果苷和适量的氮酮溶于 9 ml 水中)加入上述分散相中, 搅拌 20 min, 混合均匀后, 置于高速冷冻离心机中离心(2 800 × g, 10 min)去除气泡, 4℃ 冷藏备用。分别制备 4 种氮酮含量的水凝胶: 无氮酮、1%、3%、5%, 水凝胶中熊果苷含量均为 5%。

2.3 皮肤的预处理 皮肤来源于女性腹部抽脂整形手术后的多余皮肤。将新鲜皮肤浸润在生理盐水中, 用手术刀去除真皮层下多余的残存脂肪, 然后将皮肤平铺在纱布上, 锡箔纸包裹, -20℃ 保存, 2 周内使用^[7]。

2.4 微针的制备及评价 采用深反应离子刻蚀技术^[8], 硅表面清洗氧化后甩涂光刻胶 6112D, 紫外曝光后显影出需刻蚀部分, 在 BOE 腐蚀液中去除暴露的二氧化硅层, 进而暴露出需要刻蚀掉的硅, 利用丙酮溶解硅片表面的光刻胶后, 放入 STS ICP 进行深反应离子刻蚀 DRIE, 刻蚀深度约 250 μm, 形成五角星形状微针, 微针长度为 200 μm。扫描电镜图下观察微针的结构。将星形硅微针阵列穿刺人体腹部皮肤后(15 N, 2 min), 立刻用亚甲基蓝染色, 显微镜下观察皮肤形态。

2.5 实验分组 微针实验组: 皮肤角质层向上置于平板上, 微针作用(15 N, 2 min), 给药为无氮酮熊果苷水凝胶; 氮酮对照组: 皮肤无微针作用, 含 1%、3%、5% 氮酮的熊果苷水凝胶; 空白对照组: 皮肤无微针作用, 无氮酮熊果苷水凝胶。

2.6 体外经皮渗透实验 采用 Franz 扩散池(S=0.5

cm², V=5 ml), 将皮肤固定于水平扩散池接口处, 使角质面向供给室。供给室内用注射器注入 0.3 g 熊果苷水凝胶, 使其平铺于皮肤上, 供给室用封口膜密封, 避免水分流失。接收室内注入 4.7 ml PBS (0.1 mmol/L, pH 7.4)。开动恒温水浴循环[(37±1)°C]和磁力加热搅拌器(300 转/min)开始计时, 分别在 1、3、6、12、24、36、48 h 取点, 拆除扩散池装置, 取适量接收液, 过滤, 进行 HPLC 测定。计算熊果苷累积透过量 $Q_r(\mu\text{g}/\text{cm}^{-2})$ 、稳态渗透速率常数 $J_s(\mu\text{g}/[\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}])$ 。单位面积透皮累积渗透量 Q_r 按下式计算: $Q_r = C_n V/A$, 式中 V 为扩散池体积, C_n 为第 n 次取样时接收液的浓度。以扩散平衡后的 Q_r 对渗透时间 t 进行线性回归, 所得直线斜率为药物的渗透速率 $J_s(\mu\text{g}/[\text{cm}^{-2} \cdot \text{h}])$, 即单位时间内药物透过单位面积的渗透量。

2.7 皮肤滞留量的测定

2.7.1 表皮层和真皮层的分离方法 拆除扩散池装置后, 用棉签蘸取 pH 7.4 的 PBS, 擦净皮肤表面残留药物制剂, 剪取给药部位皮肤, 采用热板分离法分离表皮层和真皮层: 将皮肤放置在浸于 50°C 恒温水中的干燥玻璃板上, 5 min 后将皮肤取出, 用镊子沿皮肤边缘刮下表皮层, 从而实现表皮层和真皮层

的分离^[7]。

2.7.2 皮肤滞留量的测定^[3] 将分离的表皮层和真皮层分别置于不同的离心管中, 剪碎, 加入 1 ml pH 7.4 的 PBS, 超声提取 30 min 后, 高速离心 (11 000×g, 20 min), 上清液用 0.45 μm 孔径的滤膜滤过, HPLC 法测定含量。

3 结果

3.1 熊果苷方法学实验

3.1.1 标准曲线 按熊果苷浓度 C 与峰面积 A 的平均值进行线性回归, 得回归方程: $C = 0.0002A - 0.1829$ ($r = 0.9999$), 线性范围 0.4~50 μg/ml。

3.1.2 精密度考察 经测定 0.4、10、50 μg/ml 熊果苷的峰面积, 计算得日内精密度 RSD 为 2.40%、日间精密度 RSD 为 2.74%, 均 < 3%, 符合样品测定要求。

3.1.3 提取回收率 经测定 0.4、10、50 μg/ml 熊果苷的提取回收率分别为 94.2%、95.6% 和 94.8%, 符合样品测定要求。

3.1.4 色谱图 由图 1 可知, 样品中熊果苷峰分离较好, 且空白皮肤对熊果苷含量测定没有影响。

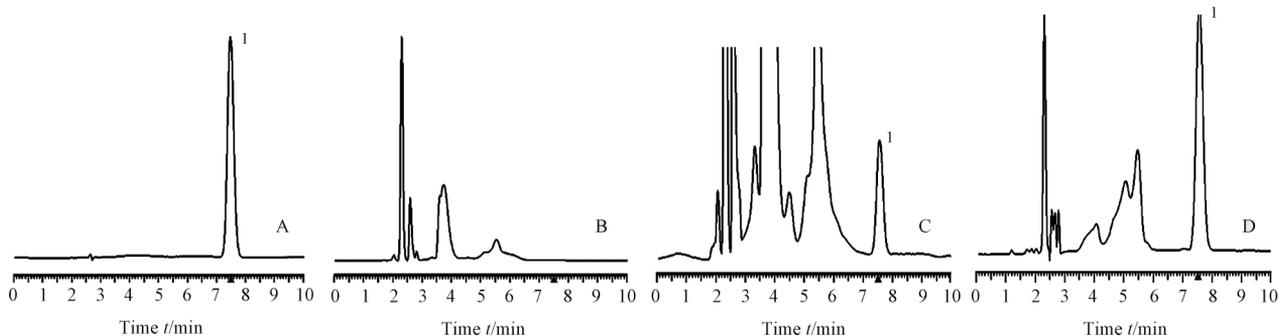


图 1 熊果苷 HPLC 图谱

Fig 1 Chromatograms of arbutin

A: Arbutin; B: Blank skin; C: Arbutin in the skin; D: Arbutin in the receptor solution. 1: Arbutin

3.2 微针制备及剪切力评价结果 从图 2 中可以看出, 0.5 cm×0.5 cm 面积上制成 10×10 微针阵列, 微针长度为 200 μm, 可以成功地穿刺人体皮肤, 没有折断现象, 在皮肤上可制造出微米级的孔洞。

3.3 熊果苷体外经皮实验

3.3.1 体外经皮渗透 由表 1 可知, 与空白对照组相比, 使用化学促渗剂氮酮后, 熊果苷的体外经皮透过量及经皮渗透速率(J_s)显著增加, 其中 5% 氮酮对熊果苷的促渗效果最好 ($P < 0.01$)。与空白对照组相比, 经微针作用后, 熊果苷的体外经皮透过量及经皮渗透速率增加 ($P < 0.01$); 且与 5% 氮酮组相比, 微针对熊果苷的促渗作用更强 ($P < 0.01$)。48 h

后, 与空白对照组相比, 使用 5% 氮酮后, 表皮层中熊果苷的累积滞留量 (EQs) 增加 ($P < 0.01$); 与 5% 氮酮组相比, 经微针作用后, 熊果苷的表皮累积滞留量增加 ($P < 0.01$)。

3.3.2 熊果苷体外经皮给药后的皮层分布 由图 3 可知, 在 12 h 内, 空白对照组真皮层中没有检测到熊果苷, 12 h 后熊果苷进入皮肤真皮层的量逐渐增加。在 5% 氮酮组中熊果苷表皮层含量和真皮层接近。在 3 h 内, 在微针实验组表皮层含量大于真皮层, 3 h 后渗透进入真皮层中的熊果苷量增加, 大于表皮层中的滞留量。

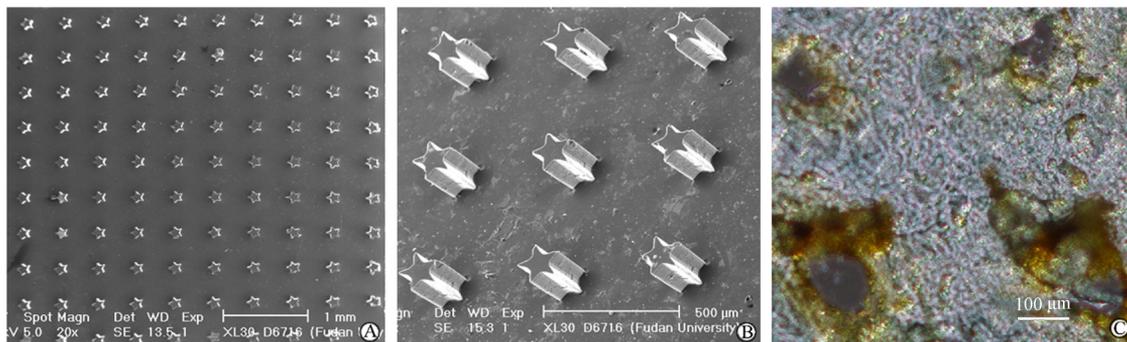


图 2 星形硅微针扫描电镜图及皮肤显微镜图

Fig 2 Scanning electron microscope (SEM) images of star silicon microneedles and microphotographs of pieced human skin with microneedles

A,B: SEM images of star silicon microneedles. C: Microphotograph of the epidermis separated from the pieced skin stained by methylene blue

表 1 熊果苷皮肤透过参数

Tab 1 Permeation parameters of arbutin in different groups (n=5, $\bar{x} \pm s$)

Group	Qr/($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)	J _s /($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	EQ _s /($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)
Microneedles	54.31 ± 5.08**▲▲	1.16 ± 0.13**▲▲	5.86 ± 1.35**▲▲
1% azone	4.21 ± 1.06*	0.09 ± 0.02	1.08 ± 0.71
3% azone	10.04 ± 1.28**	0.22 ± 0.03**	1.39 ± 0.45**
5% azone	11.32 ± 2.07**	0.25 ± 0.03**	1.43 ± 0.32**
Control	2.85 ± 0.53	0.06 ± 0.01	0.95 ± 0.07

Qr: Accumulative penetration amount; J_s: Steady-state flux; EQ_s: Epidermal accumulative deposition amount. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group; ▲▲ P < 0.01 vs 5% azone group

入表皮层,从而提高药物的经皮渗透速率和经皮滞留量。同时皮肤角质层也是药物在皮肤中的“储库”,由于储库的存在,药物进入皮肤和接收液后达到平衡阶段存在“时滞”效应,由于微针穿透角质层,在表皮层制造了微孔,因此药物可以迅速穿过角质层,进入表皮层和真皮层。熊果苷经微针给药后在皮肤内滞留量的增加可以增强其作用于表皮层中黑色素细胞的药效;同时熊果苷经皮渗透量也明显增加,在后续实验中可以结合其他载体载药以降低进入体循环的药物量,如:脂质体或纳米粒。

[参考文献]

- [1] Sugimoto K, Nishimura T, Nomura K, Kuriki T. Inhibitory effects of alpha-arbutin on melanin synthesis in cultured human melanoma cells and a three-dimensional human skin model[J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 510-514.
- [2] Petit L, Pierard G E. Skin-lightening products revisited[J]. Int J Cosmet Sci, 2003, 25: 169-181.
- [3] Wen A H, Choi M K, Kim D D. Formulation of liposome for topical delivery of arbutin[J]. Arch Pharm Res, 2006, 29: 1187-1192.
- [4] Bal S M, Caussin J, Pavel S, Bouwstra J A. In vivo assessment of safety of microneedle arrays in human skin[J]. Eur J Pharm Sci, 2008, 35: 193-202.
- [5] Chabri F, Bouris K, Jones T, Barrow D, Hann A, Allender C, et al. Microfabricated silicon microneedles for nonviral cutaneous gene delivery[J]. Br J Dermatol, 2004, 150: 869-877.
- [6] Prausnitz M R. Microneedles for transdermal drug delivery[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2004, 56: 581-587.
- [7] Xie Y, Xu B, Gao Y. Controlled transdermal delivery of model drug compounds by MEMS microneedle array[J]. Nanomedicine, 2005, 1: 184-190.
- [8] Alves M P, Scarrone A L, Santos M, Pohlmann A R, Guterres S S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers[J]. Int J Pharm, 2007, 341: 215-220.

[本文编辑] 尹 茶

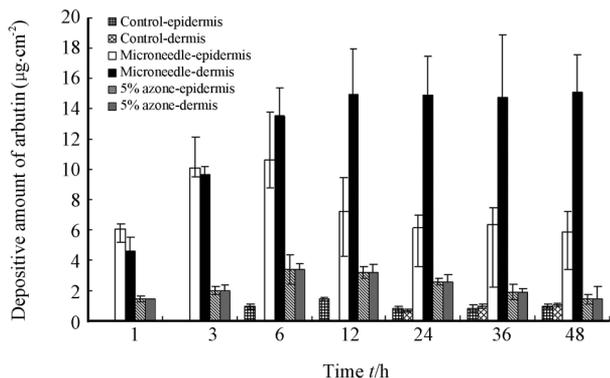


图 3 熊果苷的皮肤分布

Fig 3 Distribution of arbutin in the skin layers (n=5, $\bar{x} \pm s$)

4 讨论

药物经皮给药的主要屏障是角质层,各种化学促渗剂的主要作用部位是角质层,通过改变角质层的双分子层排列,促进药物的渗透。微针主要通过穿透皮肤角质层,在皮肤表皮层造成微米级孔洞,与传统化学促渗剂氮酮相比,药物更易穿透角质层进