

· 工艺研究 ·

温通膏方微针贴剂的体外释放与透皮性能研究

吴涵¹, 梁诗敏², 吴雪茹¹, 吴康郁¹(1. 广州中医药大学第三附属医院, 广东 广州 510378; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 考察温通膏方微针贴剂的体外释放和透皮特性。**方法** 采用高效液相色谱法测定温通膏方中补骨脂素和异补骨脂素的含量。①体外释放试验: 采用药物透皮扩散池, 配制不同浓度(10%、20%、30%、40%)的乙醇-生理盐水溶液作为接收液, 分别在1、2、4、8、12、24 h等6个时间点取样分析; 绘制累积释放率($Q/\%$)-时间(t/h)曲线, 根据释放规律选择 Higuchi 方程模型和一级动力学模型进行拟合分析。②体外透皮实验: 制备离体大鼠皮肤, 以20%乙醇-生理盐水作为接收液, 分别在1、2、4、8、12、24 h等6个时间点取样分析; 绘制累积透皮率($Q/\%$)-时间(t/h)曲线, 选择零级动力学模型、一级动力学模型和 Higuchi 方程模型对曲线进行拟合分析。**结果** 选择20%乙醇-生理盐水为最佳接收介质, 温通膏方微针贴剂中补骨脂素、异补骨脂素的24 h累积释放率分别为34.980%、30.623%; 温通膏方微针贴剂中补骨脂素、异补骨脂素的24 h累积透皮率均优于温通膏凝胶剂, 分别为8.546%、6.949%。**结论** 将温通膏方开发成微针贴剂, 能有效降低皮肤屏障作用, 增强药物吸收, 有助于提高临床疗效。

关键词: 温通膏方微针贴剂; 补骨脂素; 异补骨脂素; 体外释放; 透皮实验; 高效液相色谱法

中图分类号: R283.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0414-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.03.016

Research on the *in vitro* Release and Transdermal Properties of Wentong Gao Microneedle Patch

WU Han¹, LIANG Shimin², WU Xueru¹, WU Kangyu¹(1. The Third Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510378 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: **Objective** The *in vitro* release and transdermal properties of Wentong Gao microneedle patch were investigated. **Methods** The contents of psoralen and isopsoralen were determined by HPLC. ① *In vitro* release test: using drug transdermal diffusion pool, ethanol-physiological saline solutions with different concentrations (10%, 20%, 30%, 40%) were prepared as the receiving solution and respectively sampled at 6 time points including 1, 2, 4, 8, 12, and 24 h; the cumulative release rate($\%$)-time(h) curve was drawn, and Higuchi equation model and first-order dynamic model were selected for fitting according to the release rule. ② *In vitro* transdermal experiment: *in vitro* rat skin was prepared, and 20% ethanol-physiological saline solution was selected as the receiving solution and sampled at 6 time points including 1, 2, 4, 8, 12 and 24 h. The cumulative transmittance($\%$)-time(h) curve was drawn, and the zero-order dynamic model, first-order dynamic model and Higuchi equation model were selected for fitting analysis of the curve. **Results** 20% ethanol saline was chosen as the best receiving medium. The 24 h cumulative release rates of psoralen and isopsoralen in Wentong Gao microneedle patch respectively were 34.980% and 30.623%. The 24 h cumulative transmission rates of psoralen and isopsoralen in Wentong Gao microneedle patch were better than those in Wentong Gao normal gel, which were 8.546% and

收稿日期: 2020-07-29

作者简介: 吴涵, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药新药与制剂研究。Email: wuhanfree@163.com。通信作者: 吴雪茹, 主任中药师, 研究方向: 中药经皮给药制剂的研发。Email: wuxueru@163.com。

基金项目: 广州市海珠区科技计划项目(海科工商信计2018-95); 广东省中医药局科研项目(粤中医办函[2015]102号, 20183007, 20201169)。

6.949%, respectively. **Conclusion** The development of the *Wentong Gao* microneedle patch can effectively reduce the skin barrier effect, increase drug absorption, and improve clinical efficacy.

Keywords: *Wentong Gao* microneedle patch; psoralen; isopsoralen; the *in vitro* release; transdermal properties; high performance liquid chromatography (HPLC)

对于中药经皮给药制剂来说,影响药物吸收的主要因素为皮肤角质层的阻滞作用,而微针是一种新型的物理辅助经皮给药技术,能够直接穿透皮肤角质层,形成孔道输送药物分子,从而增强药物吸收^[1]。聚合物微针成本低廉,有较好的生物相容性和可降解性,制备成中药微针贴剂,能够通过微针技术来提高中药经皮贴剂的药物渗透率,从而提高临床疗效。

温通膏方为本院名老中医经验方,具有强肾壮腰、祛寒逐湿、温经通络、活血镇痛等功效,常用于肾虚腰痛、腰膝酸软、手足痿痹、风湿肿痛、肩颈痹痛、跌打损伤、膝关节骨性关节炎、骨折创伤中后期的肿胀疼痛等病症^[2]。为提高温通膏方的临床疗效,利用现代制剂技术将其制备为微针贴剂^[3]。温通膏方主要由补骨脂、当归、独活、蛇床子等药味组成,其中补骨脂为方剂的主要药味,其化学成分补骨脂素和异补骨脂素的含量为重要的质量控制指标^[4]。故本研究拟以补骨脂素和异补骨脂素为质量标准,考察温通膏方微针贴剂的体外释放和透皮特性。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 SD 大鼠, SPF 级, 体质量(200±20)g, 雌雄兼用, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物生产许可证号: SCXK(粤)2018-0002。

1.2 药物及试剂 温通膏方微针贴剂(Microneedle Patch, MNP; 批号: 20190101)、温通膏凝胶剂(普通水性凝胶剂, Normal Gel, NG; 批号: 20181001), 均由广州中医药大学第三附属医院提供。补骨脂素对照品(批号: 110739-201617)、异补骨脂素对照品(批号: 110739-201614), 均购自中国食品药品检定研究院; 色谱纯级的乙腈、甲醇, 德国默克公司; 分析纯级的无水乙醇、氯化钠, 天津市大茂化学试剂厂; 水为超纯水。

1.3 仪器 LC-20AT 型液相色谱仪、SPD-20A 检测器、SIL-20A 自动进样器、CTO-10AS 柱温箱, 日本岛津公司; TPY-2 型药物透皮扩散试验仪, 上海黄海药检仪器有限公司; METTLER AE200 型电子分析

天平, 瑞士梅特勒托利多公司; 优普系列超纯水器, 四川优普超纯科技有限公司。

1.4 补骨脂素、异补骨脂素含量测定 本课题组前期对温通膏进行了大量研究, 已建立补骨脂素和异补骨脂素的高效液相色谱(HPLC)含量测定方法^[4], 该方法准确可靠, 专属性好, 精密度和重复性好, 24 h 内稳定性好。为配合体外释放和透皮试验的数据分析, 本研究拟重新考察低浓度范围的线性关系。

精密称取补骨脂素和异补骨脂素对照品各 10 mg, 加甲醇定容至 100 mL, 制备成补骨脂素和异补骨脂素的浓度分别为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品母液; 再精密量取母液 0.01、0.10、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 配制成不同浓度稀释液; 以高效液相色谱法测定其浓度, 绘制标准曲线。

1.5 体外释放实验

1.5.1 实验方法^[5-6] 采用药物透皮扩散池进行实验, 在接收池中加入接收液, 于接收液的上方先加 1 层薄膜, 并以针刺多孔, 然后固定好温通膏方微针贴剂, 确保无气泡产生, 且微针针体层刚好接触接收液。调节搅拌子的转速为 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 水温设置为接近人体温度的 37 $^{\circ}\text{C}$ 。记录实验开始的时间, 分别在 1、2、4、8、12、24 h 等 6 个时间点取样, 用注射针头将接收池中的所有液体取出, 补充接收液于接收池中, 置于药物扩散仪器中继续释放。

1.5.2 供试品溶液制备 将取出的所有接收液置于蒸发皿中, 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸干, 加甲醇定容至 1 mL 容量瓶, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得。

1.5.3 接收液浓度考察 为了模拟人体真实的生理环境, 采用生理盐水来作为接收介质。同时, 为了满足体外释放和透皮的漏槽条件, 分别配制不同浓度(10%、20%、30%、40%)的乙醇-生理盐水溶液。采用 HPLC 法测定在 1、2、4、8、12、24 h 等不同时间点的不同浓度接收液中的补骨脂素及异补骨脂素的含量, 考察温通膏方微针贴剂的体外释放特性, 并根据实验结果选择最佳接收液, 以此作为后续透皮实验的接收液。

1.6 体外透皮实验

1.6.1 离体大鼠皮肤的制备 取体质量均匀、合格的健康大鼠，雌雄兼用，采用颈椎脱臼法将其处死。将大鼠腹部的毛发全部剪干净，并剪掉皮下脂肪及肌肉组织，然后将其皮肤浸泡在生理盐水中，备用。

1.6.2 实验方法^[5-6] 将已处理好的离体大鼠皮肤的角质层朝上，置于水平板上；用温通膏方微针贴剂施以一定压力进行预处理后，保持微针贴剂与皮肤相贴合的状态，并一起固定在接收池上方；将 20%乙醇-生理盐水注入接收池，保证皮肤和接收液之间无气泡；按照“1.5.1”项下体外释放实验方法，分别在 1、2、4、8、12、24 h 等 6 个时间点取样，并按“1.5.2”项下方法制备供试品溶液用于检测分析。

1.6.3 实验分组 为更好地考察温通膏方微针贴剂(MNP)的透皮特性，因此，同时设计温通膏原剂型(温通膏凝胶剂，NG)的对比实验。将温通膏凝胶剂均匀涂抹在大鼠离体皮肤上，按“1.6.2”项下方法进行透皮实验及检测分析。

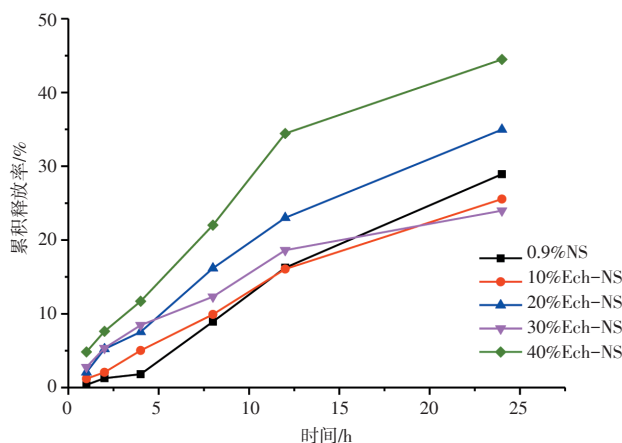
1.7 统计学处理方法 采用 Origin 9.1 软件进行统计分析，根据体外释放和透皮曲线规律，选择零级动力学模型、一级动力学模型及 Higuchi 方程模型作为数学模型^[7-8]，对曲线进行拟合分析。

2 结果

2.1 补骨脂素、异补骨脂素的线性关系 以补骨脂素、异补骨脂素混合对照品的浓度(X , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标，以相应的峰面积(Y)为纵坐标，绘制标准

曲线，得到回归方程分别为 $Y=75\ 406X-11\ 062$ ($r=0.999\ 5$)、 $Y=72\ 531X+10\ 618$ ($r=0.999\ 5$)。结果表明，补骨脂素、异补骨脂素在 $0.1\sim 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.2 不同接收液对补骨脂素体外释放的影响 根据不同接收液在各时间点的取样分析结果，绘制补骨脂素的累积释放率($Q/\%$)-时间(t/h)曲线，并进行曲线拟合分析，结果见图 1、表 1。结果显示，补骨脂素的累积释放率-时间曲线以一级动力学为数学模型的拟合度更高，说明其释放规律更符合一级动力学。不论是 Higuchi 方程模型还是一级动力学模型，20%乙醇-生理盐水作为补骨脂素的接收液，其相关系数和拟合度最高，说明其结果最符合释放规律，且 24 h 累积释放率也较为合适。



注：NS：生理盐水；Ech-NS：乙醇-生理盐水

图 1 补骨脂素累积释放率-时间曲线

Figure 1 The cumulative release rate-time curve of psoralen

表 1 补骨脂素累积释放率-时间曲线拟合结果

Table 1 The fitting results of psoralen's cumulative release rate-time curve

数学模型	判断指标	0.9%NS	10%Ech-NS	20%Ech-NS	30%Ech-NS	40%Ech-NS
Higuchi 方程模型	拟合曲线	$Q=7.622\cdot t^{1/2}-10.231$	$Q=6.481\cdot t^{1/2}-6.889$	$Q=8.634\cdot t^{1/2}-7.622$	$Q=5.583\cdot t^{1/2}-2.609$	$Q=10.870\cdot t^{1/2}-7.425$
	相关系数 r	0.977 1	0.992 4	0.995 5	0.992 5	0.988 0
	拟合度 R^2	0.943 5	0.980 9	0.988 9	0.981 2	0.970 2
一级动力学模型	拟合曲线	$Q=-169.371\cdot(1-e^{-0.007t})$	$Q=55.240\cdot(1-e^{-0.026t})$	$Q=52.803\cdot(1-e^{-0.046t})$	$Q=27.244\cdot(1-e^{-0.089t})$	$Q=55.620\cdot(1-e^{-0.070t})$
	相关系数 r	0.988 8	0.997 2	0.998 3	0.993 8	0.993 3
	拟合度 R^2	0.972 1	0.992 9	0.995 7	0.984 5	0.983 4
24 h 累积释放率(Q)/%		28.925	25.558	34.980	23.981	44.482

注：NS：生理盐水；Ech-NS：乙醇-生理盐水

2.3 不同接收液对异补骨脂素在体外释放的影响

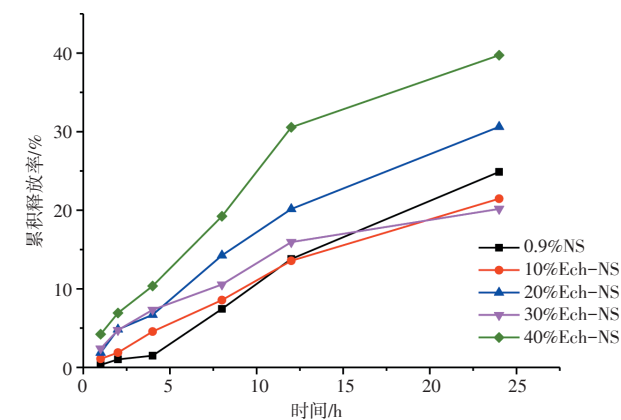
根据不同接受液在各时间点的取样分析结果，绘制异补骨脂素的累积释放率($Q/\%$)-时间(t/h)曲线，并进行曲线拟合分析，结果见图 2、表 2。结果显示，与补骨脂素一致，异补骨脂素的释放规律更符合一

级动力学，且 20%乙醇-生理盐水作为异补骨脂素的接收液，其相关系数和拟合度最高，24 h 累积释放率也较为合适。因此，选择 20%乙醇-生理盐水作为后续透皮实验的接收液。

2.4 体外透皮实验结果 根据温通膏方微针贴剂及温

通膏凝胶剂的体外透皮实验结果, 绘制补骨脂素、异补骨脂素的累积透过率($Q/\%$)-时间(t/h)曲线, 并进行曲线拟合分析, 结果见图 3、表 3。结果表明, 通过比较 2 种剂型的累积透过率-时间曲线拟合结

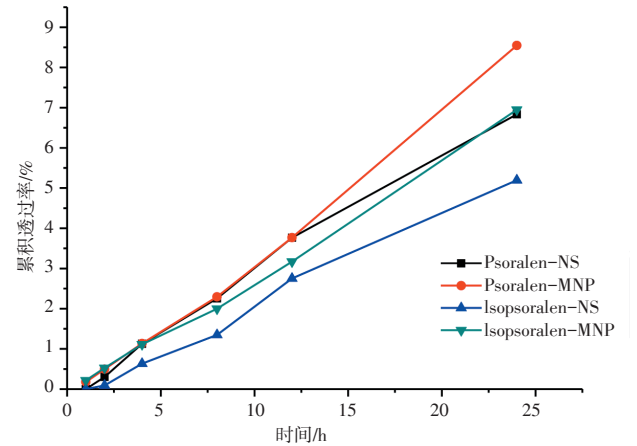
果, 温通膏方微针贴剂更符合一级动力学模型, 而温通膏凝胶剂更符合零级动力学模型; 温通膏方微针贴剂中补骨脂素和异补骨脂素的 24 h 累积透过率均大于温通膏凝胶剂。



注: NS: 生理盐水; Ech-NS: 乙醇-生理盐水

图 2 异补骨脂素累积释放率-时间曲线

Figure 2 The cumulative release rate - time curve of isopsoralen



注: Psoralen-NG: 补骨脂素-温通膏凝胶剂; Psoralen-MNP: 补骨脂素-温通膏方微针贴剂; Isopsoralen-NG: 异补骨脂素-温通膏凝胶剂; Isopsoralen-MNP: 异补骨脂素-温通膏方微针贴剂

图 3 补骨脂素、异补骨脂素的累积透过率-时间曲线

Figure 3 The cumulative skin permeability - time curve of psoralen and isopsoralen

表 2 异补骨脂素累积释放率-时间曲线拟合结果

Table 2 The fitting results of isopsoralen's cumulative release rate-time curve

数学模型	判断指标	0.9%NS	10%Ech-NS	20%Ech-NS	30%Ech-NS	40%Ech-NS
Higuchi 方程模型	拟合曲线	$Q=6.548t^{1/2}-8.869$	$Q=5.408t^{1/2}-5.540$	$Q=7.517t^{1/2}-7.622$	$Q=4.671t^{1/2}-1.959$	$Q=9.687t^{1/2}-6.691$
	相关系数 r	0.975 7	0.993 7	0.995 5	0.991 0	0.988 1
	拟合度 R^2	0.939 9	0.984 4	0.988 8	0.977 6	0.970 3
一级动力学模型	拟合曲线	$Q=-101.678(1-e^{-0.009t})$	$Q=41.992(1-e^{-0.030t})$	$Q=45.432(1-e^{-0.047t})$	$Q=22.525(1-e^{-0.094t})$	$Q=50.213(1-e^{-0.068t})$
	相关系数 r	0.988 9	0.997 9	0.998 2	0.992 7	0.993 0
	拟合度 R^2	0.972 4	0.994 8	0.995 5	0.981 8	0.982 6
24 h 累积释放率(Q)/%		24.888	21.474	30.623	20.169	39.730

注: NS: 生理盐水; Ech-NS: 乙醇-生理盐水

表 3 补骨脂素、异补骨脂素的累积透过率-时间曲线拟合结果

Table 3 The fitting results of cumulative skin permeability-time curve of psoralen and isopsoralen

数学模型	判断指标	Psoralen-NG	Psoralen-MNP	Isopsoralen-NG	Isopsoralen-MNP
零级动力学模型	拟合曲线	$Q=0.299t-0.158$	$Q=0.363t-0.350$	$Q=0.232t-0.299$	$Q=0.290t-0.137$
	相关系数 r	0.997 1	0.997 7	0.996 8	0.998 4
	拟合度 R^2	0.992 7	0.994 9	0.991 9	0.996 1
一级动力学模型	拟合曲线	$Q=95.234(1-e^{-0.003t})$	$Q=-11.813(1-e^{-0.023t})$	$Q=-13.101(1-e^{-0.014t})$	$Q=-17.244(1-e^{-0.014t})$
	相关系数 r	0.996 1	0.999 8	0.992 6	0.999 7
	拟合度 R^2	0.990 4	0.999 5	0.981 5	0.999 3
Higuchi 方程模型	拟合曲线	$Q=1.770t^{1/2}-2.225$	$Q=2.010t^{1/2}-2.726$	$Q=1.357t^{1/2}-1.861$	$Q=1.683t^{1/2}-2.049$
	相关系数 r	0.989 6	0.966 4	0.978 0	0.969 7
	拟合度 R^2	0.974 1	0.917 4	0.945 6	0.925 5
24 h 累积透过率(Q)/%		6.833	8.546	5.194	6.949

注: Psoralen-NG: 补骨脂素-温通膏凝胶剂; Psoralen-MNP: 补骨脂素-温通膏方微针贴剂; Isopsoralen-NG: 异补骨脂素-温通膏凝胶剂; Isopsoralen-MNP: 异补骨脂素-温通膏方微针贴剂

3 讨论

为了真实模拟人体内的释放环境,通常选择生理盐水作为接收介质。但在实际实验中,当以生理盐水作为接收液时,其释放曲线拟合度很低,且释放曲线前期 1~4 h 有 1 段平缓期,之后累积释放率才逐渐增加。已知补骨脂素和异补骨脂素并非水溶性有效成分,因此推断在最开始阶段,以生理盐水作为接收介质并未达到药物释放的漏槽条件。而在其中加入乙醇后,前期 1~4 h 内的释放率明显增加,整体曲线的拟合度提高,综合比较后选择 20%乙醇-生理盐水作为最终的接收介质。

由于原剂型温通膏凝胶剂的基质亲水性很强,遇水后药物能够快速溶解分散在水中,无溶蚀释放过程,因此不与温通膏方微针贴剂做体外释放的对比实验。但通过考察两者的药物经皮渗透行为,可知温通膏凝胶剂的累积透过率-时间曲线符合零级动力学模型,说明其药物的渗透速率相对恒定,但其 24 h 累积透过率不高,说明皮肤屏障隔绝了大部分药物,只有少部分药物在皮肤内达成了吸收-渗透的相对平衡。而温通膏方微针贴剂的累积透过率-时间曲线则更符合负反应速率常数的一级动力学模型,说明随着药物释放量的增加,皮肤吸收的药物浓度增高,其渗透速率也随之加快,温通膏方微针贴剂的透过速率和累积透过量均优于温通膏凝胶剂。利用微针技术将温通膏方开发成微针贴剂,能有效降

低皮肤屏障作用,提高药物渗透率,增强药物吸收,有助于提高临床疗效。

综上所述,温通膏方微针贴剂能够在 24 h 内稳定持续释放药物,具有中药缓释贴剂的优点,同时又能有效提高药物皮肤渗透率,保持了微针给药的优势,是具有良好应用前景的新型制剂。

参考文献:

- [1] 张朵朵,吴艳丽,鞠大宏,等.微针在经皮给药领域中的应用研究进展[J].中华中医药杂志,2014,29(8):2559-2562.
- [2] 郭雪霞,吴雪茹,黄晓冰,等.温通膏治疗风寒湿证膝关节骨性关节炎的临床观察[J].中药材,2017,40(10):2466-2468.
- [3] 梁诗敏,吴涵,吴雪茹,等.速溶型聚合物微针贴片的制备及其性能研究[J].中药材,2019,42(3):623-626.
- [4] 吴涵,王凌,吴雪茹,等.多指标综合评价法优化温通膏的提取工艺[J].中药新药与临床药理,2016,5(26):716-719.
- [5] 袁伟彬,刘桂联,吴涵,等.温性经筋通贴膏体外释放和透皮特性的研究[J].中药新药与临床药理,2017,28(4):534-537.
- [6] 何群,黄海兵,郭建生,等.颈瘤康贴膏剂体外释放、透皮试验研究[J].中成药,2008,30(2):197-201.
- [7] 叶玉杰,李芳,任德全,等.Origin软件拟合制剂体外释药规律的应用[J].数理医药学杂志,2014,27(1):93-94.
- [8] 吕凤娇,徐小平.阿奇霉素纳米粒体外释放模型的拟合研究[J].计算机与应用化学,2010,27(7):915-918.

(编辑:邹元平)