

吲哚美辛包合物可溶性微针的制备及体内外特性研究

廖朗坤^a, 陈志伟^a, 胡巧红^a, 韩彬^b, 胡旭光^b, 邱玉琴^{a*} (广东药科大学, a.药学院, b.中药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 制备载有吲哚美辛包合物的可溶性微针, 考察其体外透皮性能并进行药动学特性研究。方法 采用溶液搅拌-冷冻干燥法制备吲哚美辛/羟丙基- β -环糊精包合物, 正交试验筛选最佳制备处方。通过两步法将包合物负载于可溶性微针, 用 Parafilm 模拟皮肤测试微针穿刺能力, 以改良 Franz 扩散池进行体外经皮释放实验。建立 HPLC 测定大鼠血浆中吲哚美辛的方法, 评价微针用于大鼠给药的药动学特征。结果 最佳处方制备的包合物包埋率为 56.84%, 载药量为 11.90%; 微针对第 3 层 Parafilm 的穿刺率为 92%; IDM-HP- β -CD 微针的初始体外经皮渗透速率和单位面积渗透量显著高于 IDM-HP- β -CD 溶液以及 IDM 饱和溶液; 药动学结果显示微针与市售贴片相比能快速达到较高血药浓度, 减少时滞。结论 包合物可溶性微针提高了药物溶解度和载药量, 快速释放并显著提高药物的生物利用度, 为吲哚美辛的临床应用开发了新的途径。

关键词: 吲哚美辛; 包合物; 可溶性微针; 经皮给药

中图分类号: R944 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)22-2689-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.22.001

引用本文: 廖朗坤, 陈志伟, 胡巧红, 等. 吲哚美辛包合物可溶性微针的制备及体内外特性研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(22): 2689-2696.

Study on Preparation and *in Vitro/in Vivo* Characterization of Dissolvable Microneedles Containing Inclusion Complex Loaded with Indomethacin

LIAO Langkun^a, CHEN Zhiwei^a, HU Qiaohong^a, HAN Bin^b, HU Xuguang^b, QIU Yuqin^{a*} (Guangdong Pharmaceutical University, a.School of Pharmacy, b.School of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To prepare dissolvable microneedles containing inclusion complex loaded with indomethacin, and then investigate the transdermal properties as well as pharmacokinetic properties. **METHODS** The indomethacin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusions was prepared by solution stirring and freeze drying. The preparation process was optimized by orthogonal experiment. Then the inclusion complex was loaded into the tips of microneedle by a two-step method, the piercing ability of microneedle was tested using Parafilm simulated skin, and the *in vitro* transdermal delivery experiment was carried out with modified Franz diffusion cells. The drug concentration in plasma was detected by HPLC, and the pharmacokinetic parameters in rats were evaluated. **RESULTS** The entrapment rate of the optimized prescription was 56.84%, while the drug loading was 11.90%, and the penetration rate in the third layer of Parafilm was 92%. The initial permeation rate and cumulative amount of IDM-HP- β -CD-microneedles group were higher than that of IDM-HP- β -CD solution and IDM solution. Pharmacokinetic results showed that compared with the commercially available patch, microneedles could quickly reach high drug concentration and reduce time delay. **CONCLUSION** The dissolvable microneedle containing inclusion complex improve the drug solubility and drug loading, and significantly improve the bioavailability of the drug. The overall results provide a potential method for the clinical application of indomethacin.

KEYWORDS: indomethacin; inclusion complex; dissolvable microneedles; transdermal drug delivery

微针具有微侵入、无痛、可自行给药、提高递送效率、使用方便等优点^[1], 虽然早在 1976 年这个概念就已经被 Garland 提出^[2], 但由于当时技术水平不足, 直到 1998 年微电子工业兴起^[3], 才

开始被研究。微针经皮给药能打破角质层屏障实现物理促渗, 具有经皮给药和注射给药的双重优势^[4], 近年来日益受到广大研究者的关注。

微针按载药方式可分为涂层微针、实心微针、

基金项目: 国家自然科学基金项目(31300763); 广东药科大学人才引进科研启动基金项目; 广东大学生科技创新培育专项资金项目(pdjh2019b0256)

作者简介: 廖朗坤, 男, 硕士 Tel: 13794636198 E-mail: liaolangkun@qq.com *通信作者: 邱玉琴, 女, 博士, 副研究员 Tel: (020)39352117 E-mail: qiuyq2001@163.com

空心微针和可溶性微针^[5],其中可溶性微针所受到的关注尤为显著。因为相比前 3 种微针,可溶性微针由生物相容性好、可生物降解的高分子材料制备而成,不会因针尖在皮肤内断裂而造成有害的残留,而且载药量大,价格低廉,易于制备^[6]。但是难溶性药物制备可溶性微针时,常需加入有机溶剂,可溶性高分子与有机溶剂存在相容性问题,且有机溶剂残留将对人体带来危害。

羟丙基-β-环糊精(hydroxypropyl-β- cyclodextrin, HP-β-CD)是 β-环糊精与环氧丙烷缩合而成的内疏水外亲水性衍生物^[7],具有安全、低毒、极易溶于水等特点。HP-β-CD 将疏水性药物包裹在分子腔内形成的包合物,可以提高药物的水溶性、稳定性和生物利用度^[8]。

本研究以难溶性药物吲哚美辛(indomethacin, IDM)为模型药,考察了 IDM-HP-β-CD 包合物的制备工艺、包合物可溶性微针的性能及体内外特征,为包合物可溶性微针的临床应用提供了实验依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-10A 型岛津高效液相色谱仪、UV-2550 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);MD200-2 型干式氮吹仪(上海沪析实业有限公司);TK-24BL 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(郑州生化仪器有限公司);FA2004B 型电子天平(上海精科天美科学仪器有限公司);Spectrum100 型傅里叶红外光谱仪(PerkinElmer precisely)等。

1.2 试剂与材料

IDM(上海麦克林生化科技有限公司,批号:C10279779;含量:99%);IDM 贴片(兴和株式会社,批号:J20160036);HP-β-CD(Ashland 公司,批号:A1506A0146);聚维酮 K30(polyvinyl pyrrolidone, PVP, 安徽山河药用辅料股份有限公司,批号:180109);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS, 北京 Solarbio 公司,批号:409L023);无水乙醇(天津富宇精细化工有限公司,批号:20190112);冰乙酸(天津富宇精细化工有限公司,批号:20180112);Parafilm M[®](Bemis Company, Inc.);乙腈、甲醇均购自 Dikma 公司;离体猪皮(已去毛,厚度 0.8~1 mm,临西县敬德农产品销售有限公司,批号:20190523)。

1.3 动物

SD 大鼠,SPF 级,♂,体质量(200±20)g,由南方医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(粤)2016-0041。

2 方法与结果

2.1 包合物的制备

2.1.1 包合物包埋率的测定 IDM 易溶于丙酮,而 HP-β-CD 不溶,可用丙酮洗去包合物表面残留的游离 IDM。称取一定量的包合物,加入丙酮,轻摇使丙酮与包合物充分接触,离心,吸弃上层丙酮,重复 3 次。最后挥干剩下的丙酮,加入无水乙醇溶解,稀释一定倍数,紫外可见分光光度计 319 nm 波长下测吸光度。计算 IDM 含量并根据下式计算包合物包埋率。包埋率($\%$)= $X_1/X_0 \times 100\%$;载药量($\%$)= $X_1/X_2 \times 100\%$;产率($\%$)= $X_2/X_3 \times 100\%$ 。其中, X_1 为包合物中 IDM 质量, X_0 为 IDM 投料量, X_2 为包合物的质量, X_3 为 IDM 和 HP-β-CD 投料总量。

2.1.2 正交试验优化处方 采用溶液搅拌-冷冻干燥法^[9]制备 IDM-HP-β-CD 包合物。分别用一定量的 PBS(pH 7.4)溶解 0.1 mmol IDM 和 0.1 mmol HP-β-CD。溶解后在搅拌下将 HP-β-CD 溶液缓慢逐滴加入到 IDM 溶液中,在设定温度条件下搅拌一定时间。制备完成后放至室温,0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液冻干,即得 IDM-HP-β-CD 包合物。前期摸索制备方法时得出, IDM-HP-β-CD 包合物的包埋率主要受反应温度(A, °C)、搅拌速度(B, r·min⁻¹)、反应时间(C, h)影响,考虑到包埋率是包合物质量控制最重要的评价指标,因此以包埋率(S_1)和产率(S_2)的加权求和值 $S(S=S_1 \times 0.7 + S_2 \times 0.3)$ 为综合评价指标^[10]设计正交试验,因素水平设置见表 1,正交结果见表 2,方差分析见表 3。

表 1 正交水平因素表

Tab. 1 Orthogonal factor-level table

水平	温度 A/°C	搅拌速度 B/r·min ⁻¹	反应时间 C/h
1	30	640	1
2	45	960	2.5
3	60	1 440	5

由直观分析结果可知,极差最大的 B 因素对制备工艺影响最大,各因素主次顺序是 B>C>A。由方差分析结果可知,各因素均无显著性差异,说明最佳制备工艺可由直观分析得出,所以最佳工艺是 A₃B₃C₃,即搅拌温度为 60 °C,搅拌速度 1 440 r·min⁻¹,搅拌 5 h。根据最佳制备工艺重复制

备3批,按“2.1.1”项下方法测得包埋率为56.84%,载药量为11.90%,产率为87.28%。

表2 正交试验结果
Tab. 2 Results of orthogonal test

编号	A	B	C	产率/%	包埋率/%	综合评分
1	30	640	1	76.10	35.39	47.60
2	30	960	2.5	80.59	35.78	49.22
3	30	1 440	5	75.43	39.43	50.23
4	45	640	2.5	78.91	39.96	51.65
5	45	960	5	79.26	41.87	53.09
6	45	1 440	1	76.10	48.01	56.44
7	60	640	5	83.09	48.28	58.72
8	60	960	1	80.59	40.28	52.37
9	60	1 440	2.5	81.51	40.66	52.92
K ₁	147.05	157.97	156.41			
K ₂	161.18	154.68	153.79			
K ₃	164.01	159.59	162.04			
R	16.96	4.91	8.25			

表3 方差分析结果
Tab. 3 Results of variance analysis

方差来源	离差平方和	自由度	方差	F	P
A	55.034	2	27.517	2.261	>0.05
B	4.173	2	2.086	0.171	>0.05
C	11.847	2	5.924	0.487	>0.05
误差	24.335	2	12.168		

2.1.3 红外表征 分别将约1 mg的IDM、HP-β-CD、IDM与HP-β-CD的物理混合物以及IDM-HP-β-CD与0.1 g溴化钾研磨压片,进行红外光谱扫描。结果见图1。

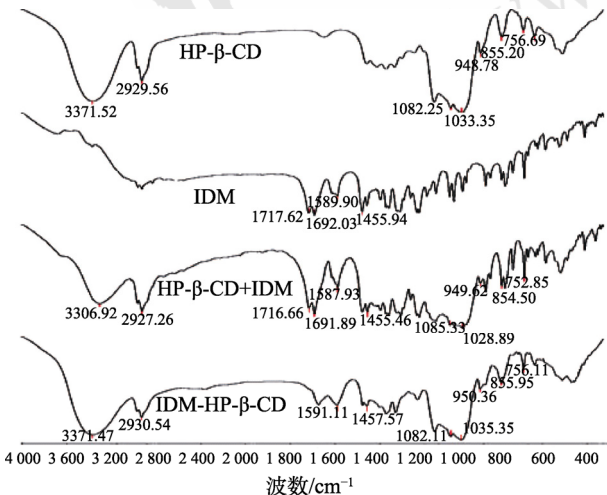


图1 IDM、HP-β-CD、IDM与HP-β-CD的物理混合物以及IDM-HP-β-CD的红外光谱
Fig. 1 IR spectroscopy of IDM, HP-β-CD, mixture of IDM and HP-β-CD, and IDM-HP-β-CD

IDM与HP-β-CD物理混合物的图谱分别是IDM和HP-β-CD图谱的叠加,而包合物则掩盖了大部分IDM的峰。而且IDM的C=O峰(1 692.03 cm⁻¹)向低波数位移到了1 591.11 cm⁻¹,说明C=O与HP-β-CD两端口的羟基生成了氢键^[9,11],证明成功制备了包合物。

2.1.4 差示扫描量热分析 氮气保护下分别精密称取一定量的IDM、HP-β-CD、IDM与HP-β-CD的物理混合物以及IDM-HP-β-CD到铝盘中进行分析。升温速度为10 °C·min⁻¹,加热范围为30~300 °C。

HP-β-CD在100 °C附近有一个较宽的吸热峰,可能与其脱水过程有关;而IDM在160 °C附近有一个尖锐的吸热峰,对应于IDM的熔点;物理混合物的图中明显可见上述2个峰,只是强度减弱;包合物中IDM吸热峰消失,意味着包合物的形成,表明非晶态固体包裹进环糊精腔中^[11]。结果见图2。

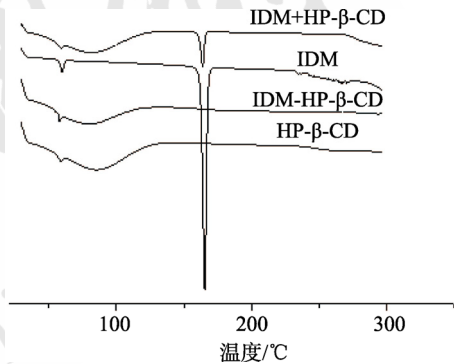


图2 IDM、HP-β-CD、IDM和HP-β-CD物理混合物以及IDM-HP-β-CD的DSC曲线图
Fig. 2 DSC thermograms for IDM, HP-β-CD, mixture of IDM and HP-β-CD, and IDM-HP-β-CD

2.2 微针制备

2.2.1 制备方法 称取一定量的包合物或IDM,分别加入1 mL 2.5% PVP水或醇溶液,涡旋混合,得到针尖溶液。背衬溶液为30% PVP醇或水溶液。采用两步法制备微针,将45 μL针尖溶液加到PDMS模具上,抽真空10 min,填充模具上的微孔,室温下干燥。针尖干燥后加上背衬溶液,抽真空10 min,融合针尖与背衬。室温下干燥箱内干燥,脱模即得。

2.2.2 微针形态表征 通过扫描电镜观察微针的形态,通过Image J测量微针的尺寸,结果见图3。由结果可知,微针阵列由20×20根微针组成,基座部分为1 cm×1 cm的正方形,微针为四棱锥型,

针高 504 μm , 底座宽 427 μm 。

2.2.3 微针含药量测定 取一片微针用无水乙醇溶解, 另取一片用手术刀片小心刮下针尖, 无水乙醇溶解, 紫外可见分光光度计 319 nm 波长下分别测吸光度, 计算微针及其针尖含药量, 计算结果见表 4。结果表明, IDM-HP- β -CD 微针针尖中的药物扩散到背衬中比 IDM 微针的多, 导致了微针针尖含药量以及利用率较低。

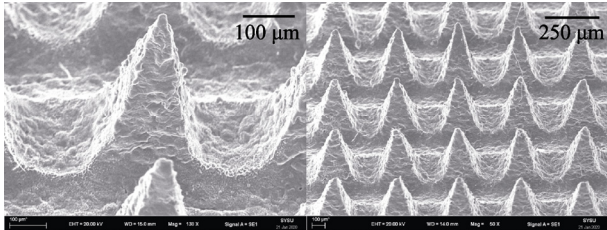


图 3 IDM-HP- β -CD 微针扫描电镜图

Fig. 3 Scanning electron microscopy images of IDM-HP- β -CD-microneedle

表 4 微针、针尖含药量

Tab. 4 Drug content in the microneedles and its tips

微针类别	微针含药量/ μg	RSD/%	针尖含药量/ μg	含药比/%	RSD/%
IDM 微针	737.52	8.10	428.30	58.07	2.29
IDM-HP- β -CD 微针	546.86	9.07	207.40	37.93	2.37

2.2.4 针尖差示扫描量热分析 按“2.1.4”项下方法条件, 进行 IDM、PVP、IDM 与 PVP 的物理混合物以及微针针尖的热分析。

IDM 在 160 $^{\circ}\text{C}$ 附近有明显的熔融吸热峰; 物理混合物在相的温度也出现吸热峰, 由于 IDM 含量少, 所以峰不明显; 微针针尖的 DSC 图跟 PVP 的几乎一样, IDM 的吸热峰消失, 说明 IDM 与 PVP 形成了固体分散体。结果见图 4。

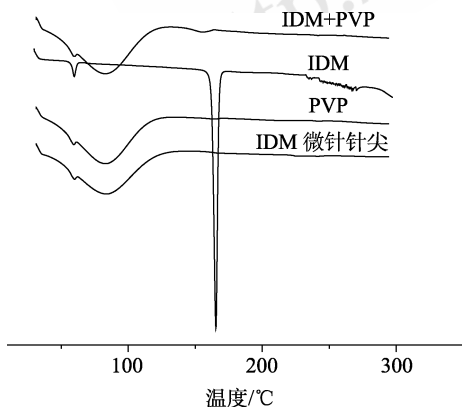


图 4 IDM、PVP、IDM 和 PVP 物理混合物以及 IDM 微针针尖的 DSC 曲线图

Fig. 4 DSC thermograms for IDM, PVP, mixture of IDM and PVP, and tips of IDM-microneedles

2.2.5 微针穿刺能力 参考文献^[12], 剪取 Parafilm(PF)面积比微针稍大, 重叠 6 层并压平。放上微针, 手指按压 1 min 取下, 分别撕下各层, 显微镜观察记录各层被刺穿的情况, 标记并计算第 1~4 层刺穿率的变化趋势。同时取一块去毛后的大鼠腹部皮肤, 滤纸吸干水后角质层朝上, 手指按压微针 1 min 后取下, 用 0.5% 台盼蓝溶液染色 40 min, 擦净后拍照观察皮肤穿刺情况。结果见图 5。结果表明微针对第 3 层的刺穿率为 92%, 微针基本上能刺穿 3 层 PF, IDM-HP- β -CD 微针比 IDM 微针稍强, 同时微针能刺穿大鼠角质层, 表明微针的皮肤穿刺能力合格。

2.3 体外释放试验

参考文献^[13-14], 进行 IDM 微针和 IDM-HP- β -CD 微针各 3 组的体外释放试验。将微针针尖侧向下放在 PF 上, 稍用力垂直向下压, 使微针刺穿 PF 但不会折断针尖, 折叠 PF 包裹密封微针。烧杯中加入 10 mL pH 7.4 的 PBS, 把密封好只露出针尖的微针小心投进烧杯里使其浮在接收液面, 37 $^{\circ}\text{C}$, 300 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下释放。分别在预设时间点(1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 21, 24, 26, 30, 36 h)从释放介质中取样 6 mL, 同时补充相同体积释放介质。取出的接收液用紫外可见分光光度计 319 nm 波长下测吸光度(标准曲线: $y=20.371x-0.013(r=0.999\ 8)$; 线性范围: 0.01~0.04 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; 检测限: 0.001 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 计算累积释放药量。以时间为横坐标, 累积释放百分率为纵坐标, 制作释放曲线见图 6。由结果可知 IDM 微针快速释放, 12 h 即释放完全; 而 IDM-HP- β -CD 微针则以一定的速度缓慢释放, 12 h 才释放了 50%, 32 h 才释放完全, 说明 IDM 被包合后具有一定的缓释作用。

2.4 体外经皮渗透试验

2.4.1 色谱条件 Diamonsil 反向 C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液-乙腈(30 : 70), 检测波长为 320 nm, 流速为 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为室温, 进样量为 20 μL 。

2.4.2 标准曲线 精密称取 10 mg IDM, 甲醇溶解稀释配成 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液。将母液用甲醇逐级稀释至 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按“2.4.1”项下色谱条件进样。以 IDM 的浓度 X 对峰面积 Y 进行线性回归, 求得回归方程 $Y=19\ 363X-1\ 646.3(r=0.999\ 9)$ 。结果表明, IDM 在 0.2~16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

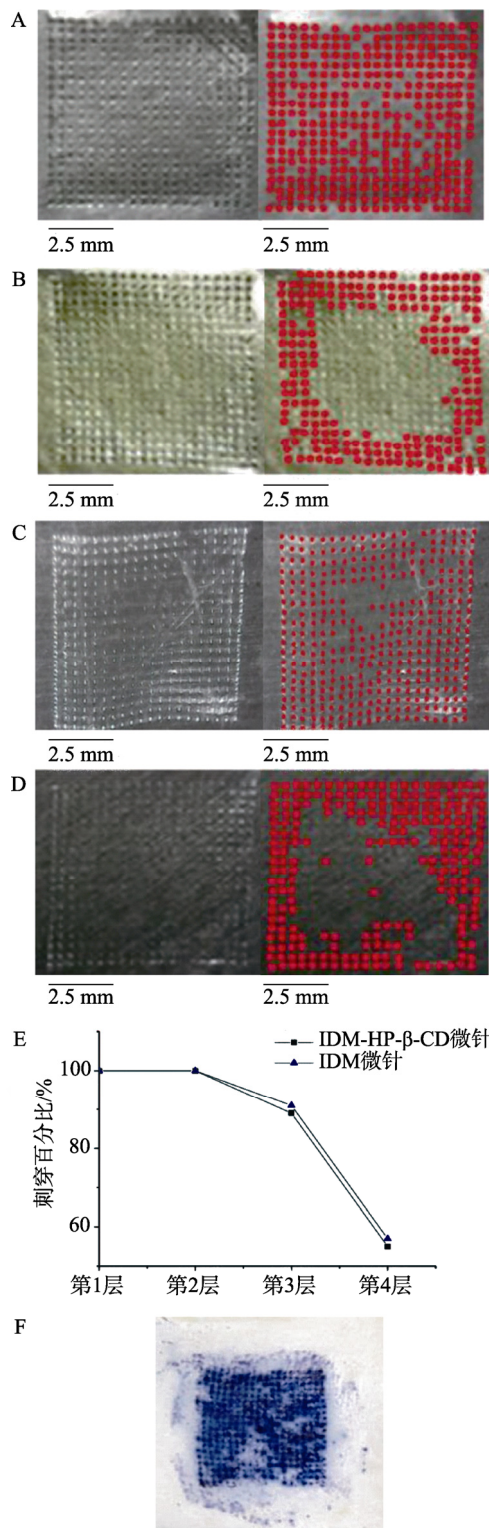


图5 刺穿情况及刺穿率变化

A-IDM 微针刺穿第3层; B-IDM 微针刺穿第4层; C-IDM-HP-β-CD 微针刺穿第3层; D-IDM-HP-β-CD 微针刺穿第4层; E-前4层刺穿率变化; F-微针皮肤穿刺后台盼蓝染色。

Fig. 5 Punctured status and changes of puncture rate

A-the third layer IDM-microneedle punctured; B-the fourth layer IDM-microneedle punctured; C-the third layer IDM-HP-β-CD-microneedle punctured; D-the fourth layer IDM-HP-β-CD-microneedle punctured; E-change of puncture rate in the first four layers; F-trypan blue staining after microneedle insertion.

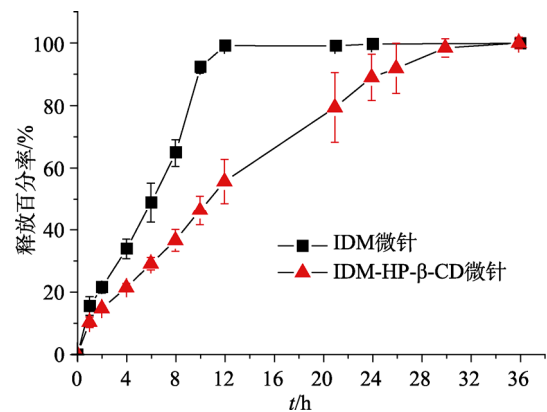


图6 2种微针体外释放曲线(n=3)

Fig. 6 Release profile of two kinds of microneedles(n=3)

2.4.3 透皮方法的建立 采用改良 Franz 扩散池法进行透皮实验。处理好的离体猪皮用 pH 7.4 PBS 冲洗 3 次, 按照比透皮杯面积稍大的规格剪取一小块, 用滤纸尽可能吸干水。微针针尖面向猪皮角质层面放置, 手指按压 1 min, 转移到带有搅拌子的接收池上, 角质层面向供给池, 固定。供给池顶部用胶带密封, 接收池加入 20%乙醇-pH 7.4 PBS 作为接收液^[15], 接收液应与猪皮充分接触, 接触面无气泡。透皮杯放置在透皮仪上, 设置温度为 37.0 °C, 转速为 100 r·min⁻¹, 分别在 2, 4, 8, 12, 21, 24 h 取出接收液, 同时补加相同体积接收液。按“2.4.1”项下色谱条件及“2.4.2”的标准曲线计算累积透过量(Q , $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)。以 Q 为纵坐标, 时间(t)为横坐标制作透皮释放曲线见图 7。对曲线的直线部分进行回归, 直线的斜率即为药物的稳态渗透速率 $J(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$ 。经皮渗透参数见表 5。结果显示, 与 IDM 饱和溶液的经皮渗透曲线相比, IDM-HP-β-CD 溶液($5.81\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)的经皮渗透具有明显的时滞, 初始时缓慢渗透, 渗透速率随时间慢慢变大; 而 IDM-HP-β-CD 微针则相反, 在初始时药物快速透过皮肤进入接收液, 而且在渗透实验的全过程渗透速率都比 IDM-HP-β-CD 溶液的大。说明微针给药能克服角质层的阻碍, 促进渗透。

表5 药物及其制剂的透皮释放参数(n=4)

Tab. 5 Transdermal release parameters of drugs and their preparations(n=4)

类型	$J/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	$Q/\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
IDM 饱和溶液	2.18	51.64±8.94
IDM-HP-β-CD 微针	1.47	46.58±11.34
IDM-HP-β-CD 溶液	1.08	26.39±4.98

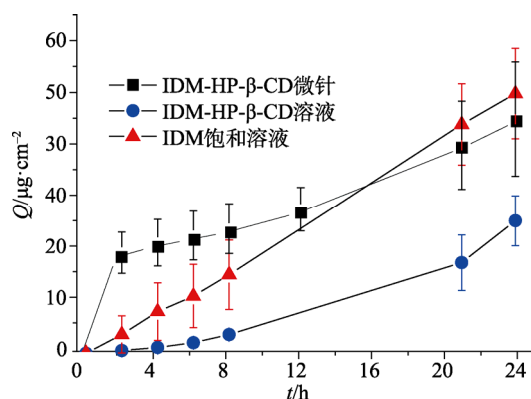


图7 药物及其制剂透皮释放曲线($n=4$)

Fig. 7 Transdermal release profile of drugs and their preparations($n=4$)

2.5 药动学研究

2.5.1 给药与取血 取SD大鼠15只,随机分成3组,剃除背部的毛,禁食继续饲养1 d。进行实验时,麻醉后分别给予“2.2.3”项下制备得到的IDM-HP- β -CD微针1片($547\text{ }\mu\text{g}$, 1 cm^2)市售或含IDM贴片(2 mg , 4 cm^2)。其中,微针给药时手指按压2 min帮助针尖穿过角质层进入真皮层,而市售贴片要与皮肤充分贴合。给药后用透气胶带绕大鼠1圈,防止撕咬。分别于给药后0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h从眼眶静脉丛取血0.5 mL, $8\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min得到血浆,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

2.5.2 血浆样品处理 精密吸取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 血浆样品加入 $20\text{ }\mu\text{L}$ $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 的尼泊金乙酯内标溶液,再加入1 mL乙酸乙酯,涡旋4 min。 $5\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min后,吸取上清液0.5 mL,氮气吹干,加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇涡旋1 min复溶,采用HPLC测定IDM的含量。

2.5.3 色谱条件 Diamonsil 反向 C_{18} 色谱柱($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$),流动相为 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸水溶液-乙腈(40:60),检测波长为320 nm,流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温为室温,进样量为 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.5.4 标准曲线 精密称取10 mg IDM,甲醇溶解稀释配成 $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液。母液中分别精密吸取25, 50, 100, 200, 400, 800, $1\text{ }600\text{ }\mu\text{L}$ 到10 mL量瓶中,甲醇稀释定容,得到一系列浓度标准溶液。2 mL的离心管中分别加入 $180\text{ }\mu\text{L}$ 空白血浆, $20\text{ }\mu\text{L}$ 上述标准液,以及 $20\text{ }\mu\text{L}$ 内标溶液,得到不同浓度的标准血浆样品,各浓度制备3份。标准血浆样品按“2.5.2”项下方法处理,采用HPLC记录IDM及内标峰面积。以IDM浓度 X 对IDM与内标峰面积之比 Y 进行线性回归,

求得回归方程为 $Y=0.096\text{ }9X+0.099\text{ }3(r=0.999\text{ }6)$ 。结果表明,血浆中IDM在 $1\sim 64\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 存在良好的线性关系。

2.5.5 专属性考察 取大鼠的空白血浆,给药后的血浆以及加标准液后的血浆,按“2.5.2”项下方法处理,按“2.5.3”项下条件进样,得到色谱图见图8。IDM与内标的色谱峰分离良好,血浆中的内源性物质对IDM和内标物无明显干扰,说明该方法专属性较好。

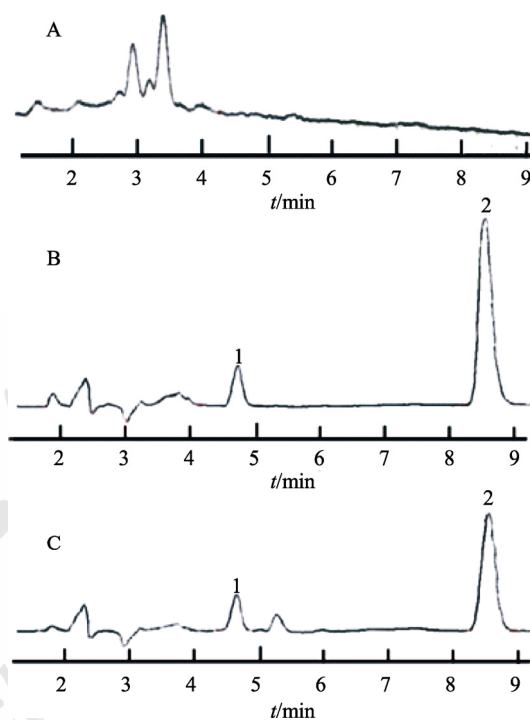


图8 高效液相色谱图

A-空白血浆; B-空白血浆+IDM+内标; C-样品血浆+内标; 1-内标; 2-IDM。

Fig. 8 HPLC chromatograms

A-blank plasma; B-blank plasma+IDM+ internal standard; C-sample plasma+internal standard; 1-internal standard; 2-IDM.

2.5.6 方法学考察 配制IDM浓度为2, 10, $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准血浆样品,按“2.5.2”项下方法处理,按“2.5.3”项下条件进样,每天进样5次,连续3 d,考察低、中、高浓度标准血浆样品的日内和日间精密度。结果显示,IDM低、中、高浓度标准血浆样品的日内精密度RSD分别为14.12%, 5.60%和1.54%($n=5$);日间精密度RSD分别为12.26%, 6.48%和6.13%($n=15$)。日内、日间精密度均 $<15\%$,符合生物样品测定要求。

配制IDM浓度为2, 10, $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准血浆样品,按“2.5.2”项下方法处理,按“2.5.3”项下条件进样,记录峰面积。相应浓度的IDM标

准液也按“2.5.3”项下条件进样，记录峰面积，两峰面积之比即为提取回收率。结果显示，提取回收率为 58.99%~63.95%，符合生物样品测定要求。

2.5.7 药动学结果 采用 DAS 2.0 计算药动学参数，结果见表 6，血药浓度-时间曲线见图 9。从药动学结果可知，IDM-HP-β-CD 微针与市售 IDM 贴片相比， $t_{\max}$ 、 $C_{\max}$ 、AUC 均有显著性差异($P<0.01$)。其中 $t_{\max}$ 由 12 h 提前至 0.5 h； $C_{\max}$ 由 $(1.91\pm0.60)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 提高到 $(4.49\pm1.21)\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ；考虑到 IDM-HP-β-CD 微针与市售贴剂的给药剂量不一样，可通过下式计算相对生物利用度 F 。

$$F = \frac{\text{AUC}_{\text{微针}} \times \text{Dose}_{\text{贴片}}}{\text{AUC}_{\text{贴片}} \times \text{Dose}_{\text{微针}}}$$

相对生物利用度为 4.19，说明 IDM-HP-β-CD 微针显著提高了生物利用度。IDM-HP-β-CD 微针血药浓度达到峰值后缓慢下降，且在 12~36 h 的 24 h 内血药浓度基本维持不变，说明 IDM 被包合后有一定的缓释作用。

表 6 IDM 贴片、IDM-HP-β-CD 微针大鼠给药后的药动学参数比较($n=5$)

Tab. 6 Comparison of pharmacokinetic parameters in rats after administration of IDM patch and IDM-HP-β-CD-microneedles($n=5$)

参数	IDM-HP-β-CD 微针	IDM 贴片
$t_{\max}/\text{h}$	0.5	12
$C_{\max}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	4.49 ± 1.21	1.91 ± 0.60
$\text{AUC}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	47.23 ± 11.29	41.23 ± 12.94

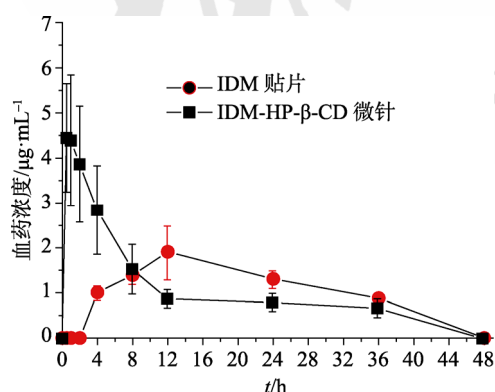


图 9 IDM 贴片、IDM-HP-β-CD 微针药时曲线($n=5$)

Fig. 9 Profiles of plasma concentration-time of IDM patch, IDM-HP-β-CD-microneedles($n=5$)

3 讨论

本实验在制备包合物时选择 pH 7.4 PBS 为反应体系^[9]，而不是通常所用的醇-水体系，是因为 IDM 在水中几乎不溶，在乙醇中略溶，IDM 在醇-水体系中会析出，导致包埋率偏低。将包合物进

一步载入微针，利用环糊精增加药物溶解度的性能，增加微针载药量，而且环糊精还能增强微针的机械强度^[16]。采用 PF 代替猪皮测试微针穿刺能力的实验已有文献报道^[12]。皮肤表皮的厚度是 300 μm，而 PF 一层的厚度约为 130 μm，微针对第 3 层 PF 的刺穿率为 92%，说明微针能穿过表皮到达真皮层。

体外释放试验显示 IDM-HP-β-CD 微针比 IDM 微针释放慢，原因是 IDM 微针中 IDM 与 PVP 形成了固体分散体，加快了溶出。通过透皮实验考察 IDM-HP-β-CD 微针经皮渗透能力，结果显示，24 h 内 IDM 饱和溶液的渗透速率和累积渗透量均比包合物溶液及 IDM-HP-β-CD 微针大。原因是包合物分子量及体积较大，亲水性较强，难以进入皮肤^[17]。但由于微针打破了角质层障碍，所以 IDM-HP-β-CD 微针在经皮释放初始阶段的渗透速率比 IDM 饱和溶液大。以上说明将药物先制备成包合物，再载入微针能起到一定的缓释作用。

药动学研究发现，可溶性微针制剂可大大缩短达峰时间，在给药初始阶段达到快速释放的效果；而包合物则能在后续过程中维持一定的血药浓度，持续发挥药效。将包合物与可溶性微针结合，用于本研究的模型药 IDM，对急性肾衰竭多尿期、肾绞痛、急性关节炎等疾病^[18]有特殊优势，且能显著提高 IDM 的生物利用度。IDM-HP-β-CD 微针在提高难溶性药物载药量的同时避免使用有机溶剂，增加了工业生产的安全性，降低了成本和难度。后续将进一步改善 IDM-HP-β-CD 微针的制备方法，为 IDM-HP-β-CD 微针的批量化生产提供有价值的参考。

REFERENCES

- [1] CHU L Y, PRAUSNITZ M R. Separable arrowhead microneedles [J]. J Control Release, 2011, 149(3): 242-249.
- [2] GARLAND M J, MIGALSKA K, MAHMOOD T M T, et al. Microneedle arrays as medical devices for enhanced transdermal drug delivery [J]. Expert Rev Med Devices, 2011, 8(4): 459-482.
- [3] HENRY S, MCALLISTER D V, ALLEN M G, et al. Microfabricated microneedles: A novel approach to transdermal drug delivery [J]. J Pharm Sci, 1998, 87(8): 922-925.
- [4] ZHU Z, LUO H, LU W, et al. Rapidly dissolvable microneedle patches for transdermal delivery of exenatide [J]. Pharm Res, 2014, 31(12): 3348-3360.
- [5] YANG G Z, HE M L, ZHANG S H, et al. An acryl resin-based

- swellable microneedles for controlled release intradermal delivery of granisetron [J]. *Drug Dev Ind Pharm*, 2018, 44(5): 808-816.
- [6] HE M L, YANG G Z, ZHANG S H, et al. Dissolving microneedles loaded with etonogestrel microcrystal particles for intradermal sustained delivery [J]. *J Pharm Sci*, 2017, 107(4): 1037-1045.
- [7] SHI J M, HE Z G, XING N, et al. Evaluation of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as solubilizing/stabilizing agent for indomethacin [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2004, 39(5): 353-355.
- [8] HE Z G. The inclusion characteristic of Hydroxypropyl β -cyclodextrin and its effects on drug pharmacokinetics *in vivo* [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2003.
- [9] WANG F. Preparation and characteristics of liposomes encapsulating indomethacin-cyclodextrin inclusion complexes [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2003.
- [10] 索建政, 郅春鹏, 严文利, 等. 环糊精包合挥发油在祛风通络贴中的应用[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(22): 2810-2812.
- [11] HALIM MOHAMED M A, MAHMOUD A A. Formulation of indomethacin eye drops via complexation with cyclodextrins [J]. *Curr Eye Res*, 2011, 36(3): 208-216.
- [12] LARRAÑETA E, MOORE J, VICENTE-PÉREZ E M, et al. A proposed model membrane and test method for microneedle insertion studies [J]. *Int J Pharm*, 2014, 472(1/2): 65-73.
- [13] CHEN J M, HUANG W Y, HUANG Z Y, et al. Fabrication of tip-dissolving microneedles for transdermal drug delivery of meloxicam [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(3): 1141-1151.
- [14] FENG Y. Optimization of microneedles and application in the model drug [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2013.
- [15] 王晓丽, 周宋汇. 吲哚美辛理化性质的测定及研究 pH 对其经皮渗透活性的影响[J]. *中国现代药物应用*, 2012, 6(20): 117-119.
- [16] LIN S, QUAN G, HOU A, et al. Strategy for hypertrophic scar therapy: Improved delivery of triamcinolone acetonide using mechanically robust tip-concentrated dissolving microneedle array [J]. *J Control Release*, 2019(306): 69-82.
- [17] HUANG J, WANG X L, LUO J C, et al. Effect of several methods without penetration enhancer in transdermal permeation of flurbiprofen [J]. *J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报)*, 2010, 27(7): 516-519, 529.
- [18] 安宝杰. 吲哚美辛的不良反应观察[J]. *世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊)*, 2013, 13(36): 301-302.

收稿日期: 2019-10-14

(本文责编: 李艳芳)