

实心微针辅助酮洛芬贴片经皮给药的促透效果评价

陈朴, 方任华, 江昌照, 叶金翠*, 蒋秀梅* (浙江省神经精神疾病药物研究重点实验室, 杭州医学院, 杭州 310013)

摘要:目的 以药物酮洛芬为模型药物,研究并评价实心微针辅助透皮贴剂给药在体内、外的药物促透效果。方法 采用大鼠皮肤渗透实验,考察微针的长度、预处理压力、预处理时间以及针型对酮洛芬的体外促透效果的影响;并研究了大鼠在体皮肤经不同微针预处理后,酮洛芬贴片于大鼠背部皮肤给药的药代动力学特征,评价其体内促透效果。结果 离体皮肤渗透试验结果显示,经微针预处理后贴片的药物经皮渗透速率和渗透量显著提高($P < 0.05$),渗透时滞显著缩短($P < 0.05$),促透效果与微针预处理的压力、时间、微针长度与类型相关,在压力为1~7 N、时间1~5 min、针长200~300 μm 条件下,多次实验药物24 h的累积渗透量增加1.16~3.09倍,渗透时滞缩短0.20~2.50 h。根据大鼠体内药代动力学结果,当300 μm 滚轮微针预处理皮肤后 ρ_{max} (10.86 ± 0.80) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 AUC_{0-t} (108.10 ± 17.06) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 均显著大于对照组 ρ_{max} (0.42 ± 0.03) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 AUC_{0-t} (7.46 ± 0.98) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.05$),达峰时间(t_{max})亦显著快于对照组($P < 0.05$)。 ρ_{max} 和 AUC_{0-t} 分别提高25.9倍和14.5倍。结论 实心微针预处理皮肤可显著提高酮洛芬贴片经大鼠皮肤的体外渗透和在体皮肤吸收,在体促透效果更显著。

关键词:微针;酮洛芬;经皮给药;药代动力学;高效液相色谱法;液相色谱-四极杆飞行时间质谱

doi:10.11669/cpj.2024.12.009 中图分类号:R944 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)12-1135-07

Evaluation of Penetration Promoting Effect of Solid Microneedle-Assisted Ketoprofen Patches Percutaneous Drug Delivery

CHEN Pu, FANG Renhua, JIANG Changzhao, YE Jincui*, JIANG Xiumei* (1. Key Laboratory of Neuropsychiatric Drug Research of Zhejiang Province, Institute of Materia Medica, Hangzhou Medical College, Hangzhou, 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the penetration effect of solid microneedle *in vivo* and *in vitro*, the model drug ketoprofen was administered in the form of a patch. **METHODS** Using a rat skin penetration test, the effects of microneedle length, pre-treatment pressure, pre-treatment time, and types of needle on the penetration enhancement of ketoprofen *in vitro* were investigated. The pharmacokinetic characteristics of ketoprofen patches applied to the back of rats after different microneedle treatments were investigated, as well as the effect of the ketoprofen patch on promoting permeability *in vivo*. **RESULTS** *In vitro*, skin permeation tests revealed that after microneedle pretreatment, the permeation rate and permeation volume of the patch were significantly increased ($P < 0.05$) and the permeation time lag was significantly shortened ($P < 0.05$) after microneedle pretreatment, while the permeation promotion effect was related to the pressure, time, microneedle length and type of microneedle pretreatment. After microneedle pretreatment of the skin (pressure: 1-7 N, time: 1-5 min, microneedle length: 200 μm -300 μm), the cumulative permeation amount of the experimental drug for 24 hours increased by 1.16-3.09 times, and the permeation delay decreases by 0.20-2.50 h. As the results of *in vivo* pharmacokinetic in rats, ρ_{max} (10.86 ± 0.80) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and AUC_{0-t} (108.10 ± 17.06) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 300 μm roller microneedle pretreatment of the skin, which were significantly greater than the control ρ_{max} (0.42 ± 0.03) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and AUC_{0-t} (7.46 ± 0.98) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($P < 0.05$). ρ_{max} and AUC_{0-t} were increased by 25.9 times and 15 times. **CONCLUSION** Solid microneedle pretreatment of skin significantly improves *in vitro* penetration and *in vivo* skin absorption of ketoprofen patches through rat skin, with a more significant promotion effect *in vivo* penetration.

KEY WORDS: microneedle; ketoprofen; transdermal drug delivery; pharmacokinetics; HPLC; LC-QTOF/MS

经皮给药系统研发的关键在于克服皮肤角质层的屏障作用^[1],改善药物的经皮渗透性能。微针阵列技术,通过穿刺角质层产生数百上千个微创通道,从

而促进药物的经皮吸收,提高药物的生物利用度,为经皮给药领域注入了新的活力^[2]。与其他物理促透方法相比较,微针对皮肤的作用相对可逆,且对皮肤

基金项目:浙江省自然科学基金联合基金项目资助(LHDMZ22H300013);浙江省基础公益研究计划项目资助(LTGD23H300001);浙江省医药卫生科技项目资助(2023560486);浙江省中医药科技计划项目资助(2022ZB222,2023ZL357,2023017686)

作者简介:陈朴,男,硕士研究生 研究方向:经皮给药制剂研发 * **通讯作者:**叶金翠,女,博士,研究员 研究方向:缓控释制剂技术与新药研发 Tel:(0571)88215481;蒋秀梅,女,本科,实验师 研究方向:缓控释制剂技术与新药研发 Tel:(0571)88215481

的损伤性较小。此外,微针穿刺皮肤角质层可以使大分子药物和亲水性药物也能通过皮肤迅速进入血液循环^[3],从而极大地拓展了经皮给药的药物范围^[4-7]。

酮洛芬(ketoprofen, KP)贴片主要用于缓解类风湿性关节炎、骨性关节炎、强直性脊柱炎、急性扭伤等不同病因引起的轻中度疼痛。传统的促渗技术虽然可以提高经皮吸收率,但时滞长起效慢,联合微针技术给药,则能缩短时滞、增加经皮渗透量,使得药物起效更快、药物渗透量大、疗效更好^[8-9]。

本实验使用实心微针作为皮肤的前处理工具,辅助 KP 贴片使用,评价大鼠皮肤经微针前处理后对药物经皮渗透的体内外促透效果。

1 仪器与试剂

Franz 透皮扩散池(Logen 公司, FDC-6T 型), 高效液相色谱仪(Agilent 公司, 1260 LC 型), LC-QT-OF/MS(Waters 公司, Synapt G2-UPLC 联用), 电子分析天平(Mettler Toledo 公司, XS205DU 型), 电子天平(Sartorius 公司, BSA224S 型), 宠物用电推剪(科德士公司, CP-8000 型), 电动剃须刀(飞科公司, FS620 型), 滚轮型微针(Clinical Resolution Laboratory 公司), 印章型微针(GENOSYS 公司), 漩涡混合器(IKA 公司, Vortex 3 型), 离心机(Eppendorf 公司)等。

KP 贴片(实验室自制, 剂量为 $0.36 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$), KP 对照品(批号:03908kov)、吡罗洛芬(批号:127F0834, Sigma 公司); 乙腈(批号:JA025530, Merck 公司); 乙酸(批号:12070463, Tedia 公司); 甲

醇(批号:1837107623, Merck 公司), 纯化水等, 雌性豚鼠(200 ~ 250 g)背部皮肤。

2 实验方法

2.1 贴片制备方法

称取原料药于烧杯中, 加入促透剂、聚丙烯酸酯压敏胶和适量乙酸乙酯, 涂布、80 °C 烘干、复合、裁切(含药量: $0.36 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-2}$)封装备用, 具体处方及工艺参见“一种右旋酮洛芬累积于皮下深层组织的骨架型透皮贴剂专利, 专利号为: ZL2009100”。

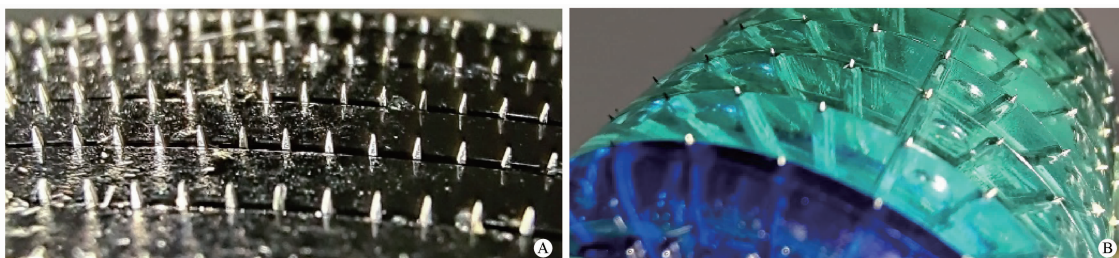
2.2 皮肤接收液中酮洛芬含量检测方法的建立和验证

利用高效液相色谱法(HPLC)测定皮肤接收液中 KP 的含量。色谱条件: 色谱柱: Shim-Pack CLC-C₁₈(6.0 mm × 150 mm, 5 μm), 进样量: 20 μL, 流动相: 甲醇: 1% 冰乙酸-水 = 70: 30, 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 37 °C, 检测波长: 258 nm。

根据 2020 年版《中国药典》要求, 分别针对专属性、线性范围、准确度、精密度和稳定性等进行了验证。

2.3 微针辅助酮洛芬贴片渗透体外实验方法

大鼠麻醉后用颈部脱臼法处死, 剃除背部毛发并分离背部皮肤, 去除皮下脂肪组织, 在生理盐水中洗净后用滤纸吸干备用。实验组采用微针预处理离体大鼠皮肤角质层, 微针针体垂直于皮肤表面施加一定压力, 持续作用一定时间后移除, 微针预处理皮肤的力量大小根据电子天平的读数控制^[10-11], 实验所用的实心微针(×10)见图 1。



A - 印章型微针; B - 滚轮型微针。

A - stamp type microneedles; B - roller type microneedles.

图 1 实验所用的固体微针的外观

Fig. 1 Solid microneedles used in the experiment

将处理好的皮肤按角质层朝外方向固定于 Franz 扩散池口, 池口面积为 0.65 cm^2 , 敷贴 KP 贴片后进行体外皮肤渗透实验。每池加入 4 mL 的体积分数 40% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)400-

生理盐水(normal saline, NS)作为皮肤接收液, 恒温(32 ± 1) °C, 搅拌子转速为 $500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。在第 4、6、8、10、12 和 24 h 时取样 0.5 mL, 并同时补充等量空白接收液^[12]。

测定皮肤接收液样品中 KP 的含量,按照公式 1 计算各时间点单位面积累积渗透量($Q_n, \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$)。

$$Q_n = \{4\rho_n + \sum_{i=1}^{n-1} (0.5\rho_i)\} / 0.65 \quad \text{公式(1)}$$

其中, ρ_n 表示第 n 个取样时间点皮肤接收液的药物浓度; ρ_i 表示第 i ($i \leq n-1$) 个取样时间点透皮接收液的浓度。以 Q_n 对时间 (t, h) 作图,将所得曲线的直线部分进行线性回归,所得斜率为渗透速率 ($J, \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$),即单位时间内药物透过单位面积的渗透量,时滞为曲线的直线部分与 X 轴交点。

将微针预处理的实验组与未经微针预处理的对照组结果对比,进行组间 t 检验,以 $P < 0.05$ 为存在统计学显著性差异^[13]。

2.4 血浆中酮洛芬含量检测方法的建立和验证

色谱柱: Agilent zorbax SB-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm)。液相条件:用乙腈和 0.05% 乙酸水溶液进行梯度洗脱,0 ~ 4 min:30% ~ 90% 乙腈,4.0 ~ 4.1 min:90% ~ 30% 乙腈,4.1 ~ 6.0 min:30% 乙腈。柱温:30 °C,进样量:5 μL,流速:0.4 mL · min⁻¹。

质谱条件:电喷雾(ESI)离子源,正离子分辨率模式检测,毛细管电压:3.6 kV,样品锥孔电压:40 V,样品萃取电压:7.0 V,离子源温度:150 °C,脱溶剂气体温度:350 °C。喷雾气体:高纯氮气,碰撞气体:高纯氮气,反吹气体流速:10 L · h⁻¹,脱溶剂气体流速:800 L · h⁻¹。质谱扫描范围:100 ~ 600 Hz,扫描时间:0.2 s,校正曲线标准物质:甲酸钠,实时校正标准物质亮氨酸脑啡肽; $m/z = 556.2771 (+)$,采用提取离子检测方式检测,KP $[M + H]^+; m/z = 255.10$,内标(internal standard, IS) 吡唑洛芬

$[M + H]^+; m/z = 280.11$,提取窗口: ±0.02。

血浆样品室温下解冻,在振荡器涡旋 30 s,取 50 μL 加入 1.5 mL 离心管中,加入 5 μL 的内标工作液(2 μg · mL⁻¹)与 100 μL 含 0.1% 甲酸的乙腈,涡旋混合 1 min,以 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,取上清液 5 μL 进样分析。

根据 2020 年版《中国药典》要求,分别针对专属性、线性、灵敏度、基质效应、准确度、精密度和稳定性等进行了验证。

2.5 微针辅助酮洛芬贴片体内药动力学实验

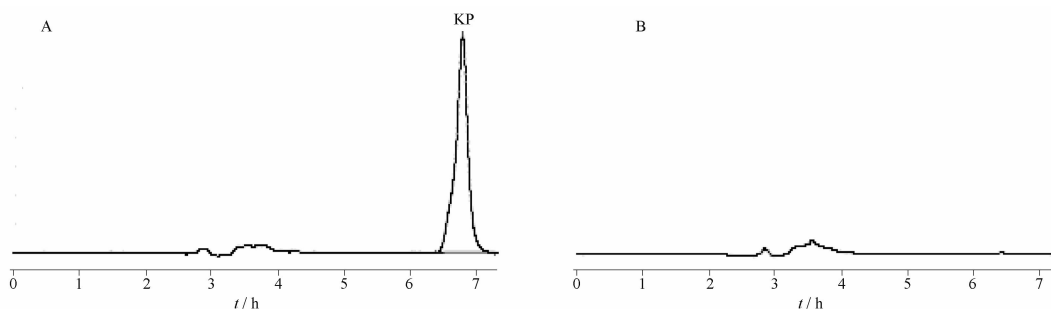
12 只雌性 SD 大鼠分为 4 组,第一组不经微针预处理作为对照组,第二组为 300 μm 滚轮型微针实验组,第三组为 200 μm 滚轮型微针实验组,第四组为 200 μm 印章型微针实验组。各组大鼠麻醉后用 5 N 的压力按压 3 min,然后在预处理部位敷贴 KP 贴片给药,给药剂量为 4 mg · kg⁻¹。

取血时间为:给药前(0 h),给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、8、12、24、32、48 和 60 h,撤药时间为给药后 24 h。从大鼠尾静脉取血,每次取全血 400 μL,分离出血浆 200 μL, -20 °C 冰箱保存,用液相色谱-四极杆飞行时间质谱(LC-QTOF/MS)测定各组大鼠血浆中 KP 的浓度^[14-15]。

3 结果与分析

3.1 皮肤接收液中酮洛芬含量检测方法验证

3.1.1 专属性 按照“2.2”项下方法进行实验,未敷贴 KP 贴片的为空白皮肤接收液样品组,敷贴 KP 贴片的为 KP 皮肤接收液样品组,24 h 后取样,经 0.22 μm 滤膜过滤后进样,结果见图 2,皮肤和接收液对 KP 的检测无干扰,该检测方法专属性良好。



A - 酮洛芬(KP)皮肤接收液; B - 空白皮肤接收液。

A - KP skin receiving solution; B - blank skin receiving solution.

图 2 皮肤接收液样品的高效液相色谱(HPLC)色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of skin receiving solution

3.1.2 线性与范围 配制 99.980 0 μg · mL⁻¹ 的 KP 储备液,用体积分数 40% 聚乙二醇 400-生理盐水

溶液(PEG-NS)稀释至 49.940 0、24.970 0、12.480 0、6.242 0、3.121 0、1.561 0、0.780 3、0.390 2、0.195 1、

0.097 5、0.048 8、0.024 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液,进样后以峰面积(A)对其质量浓度(ρ)进行线性回归,回归方程为: $A = 47\ 989\rho - 450.22$ ($r=0.999\ 9$),表明该方法下皮肤接收液中 KP 在 0.024 4 ~ 99.980 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内峰面积与质量浓度线性关系良好。

采用信噪比法确定该方法下的定量限与检测限,定量限为 0.048 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N > 10$),检测限为 0.024 4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N > 3$)。

3.1.3 准确度 供试品溶液的制备:敷贴 KP 贴片的皮肤渗透实验中,在每个取样时间各取 0.5 mL 接收液样品,混合后作为供试品溶液。

进样测得供试品溶液峰面积,并代入线性曲线,得到其质量浓度为 4.20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,在供试品溶液中分别加入适量 KP 标准溶液,配制加入量分别为 5.04、4.20、3.36 μg 的高、中、低三个质量浓度的样品,测得加样回收率范围为 97.02% ~ 107.77%,相对标准偏差(RSD)范围为 1.72% ~ 2.04%,表明该方法准确度良好。

3.1.4 精密性 取供试品溶液,测定 KP 的峰面积,每隔 1 h 进样 6 次,测得日内精密性 RSD 为 1.17%;连续进样 3 d,每份样品测 6 次,3 d RSD 依次为 1.02%、1.27% 和 2.05%。结果表明,该方法精密性良好。

3.1.5 稳定性 将供试品溶液于室温下放置,分别于 0、4、6、8、10、24、48、72 和 96 h 取样 0.5 mL,进样后测定各时间点样品中 KP 的峰面积,RSD 为 2.21%,稳定性良好,表明供试液室温放置 96 h 可以满足该方法的检测要求。

3.2 微针辅助酮洛芬贴片离体皮肤渗透结果

3.2.1 作用压力 考察微针以不同作用压力处理对 KP 贴片的体外皮肤渗透的影响。将针长为 200 μm 印章型微针阵列以 1、3、5、7 N 的压力预处理准备好的大鼠离体皮肤 3 min,对照组未经微针预处理。各组皮肤渗透曲线见图 3,经 1、3、5 和 7 N 压力处理的 KP 渗透速率分别是对照组的 1.75、2.15、2.65 和 2.65 倍,24 h 累积渗透量分别是对照组的 1.16、1.45、1.68 和 1.73 倍,时滞分别比对照组缩短 0.88、0.82、1.14、1.14 h,其中 5 N 组和 7 N 组之间无显著性差异($P > 0.05$)。结果显示,KP 的累积渗透量及渗透速率随着微针预处理皮肤压力的增加而增加,作用力达到 5 N 时促透效果趋于平稳。该结果提示,针长为 200 μm 的微针预处理对药物经离体大鼠渗透促透作用是显著的,大致需要 5 N 的力能使微针完全穿透皮肤角质层。

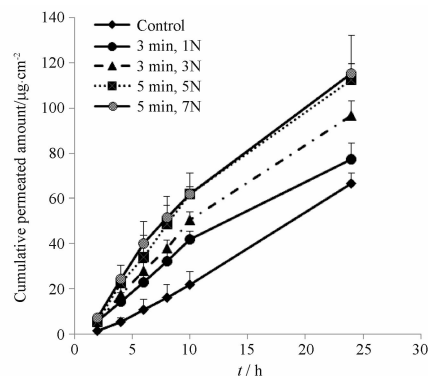


图3 微针不同预处理压力下 KP 贴片的离体皮肤药物累积渗透-时间曲线。 $n=5, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 *In vitro* permeation curves of KP patches after pretreated by microneedle with different pressures. $n=5, \bar{x} \pm s$

3.2.2 作用时间 考察微针预处理时长对 KP 贴片的体外皮肤渗透的影响。将针长为 200 μm 印章型微针阵列以 5 N 的压力处理准备好的大鼠离体皮肤,分别按压 1、3 和 5 min,对照组未经微针处理。各组皮肤渗透曲线见图 4,经微针预处理 1、3 和 5 min 的 KP 渗透速率分别是对照组的 1.60、1.86 和 2.12 倍,24 h 时累积渗透量分别是对照组的 1.40、1.68 和 1.74 倍,时滞分别比对照组缩短 0.20、1.36 和 1.45 h,其中 3 min 组和 5 min 组没有显著性差异($P > 0.05$)。结果表明,药物的累积渗透量及渗透速率随着微针预处理皮肤时间的增加而增加,时滞随着时间的增加而缩短,超过 3 min 促透效果无明显改善,趋于稳定。微针预处理皮肤的时间对药物的渗透有显著影响,主要与微孔周围皮肤组织的弹性回缩程度有关,皮肤是一个弹性体,微针刺入皮肤后所形成的通路是暂时性的,微针刺入皮肤较长时间再移除,微孔周围皮肤弹性回缩减慢,孔洞维持时间长,药物透过量增大。若微针刺入皮肤作用时间较短就移除,则所形成的通路较快关闭,药物渗透速率减小。

3.2.3 微针长度 考察不同的微针长度对 KP 贴片的体外皮肤渗透的影响。分别将 200 和 300 μm 长度的滚轮型微针以 5 N 的压力预处理准备好的大鼠离体皮肤 3 min,对照组未经微针处理。各组皮肤渗透曲线见图 5,经 200 和 300 μm 微针预处理的 KP 渗透速率分别是对照组的 3.09 和 2.91 倍,24 h 累积渗透量分别是对照组的 2.43 和 2.33 倍,时滞分别比对照组缩短 2.15 和 2.50 h。与实验组对比,两种长度的滚轮型微针都能显著地提高 KP 的体外渗透速率和累积渗透量并缩短时滞($P < 0.05$),但是实验组间无显著性差异($P > 0.05$),结果表明,

200 μm 长度的实心微针足以刺穿离体大鼠皮肤角质层,对 KP 贴片起促透效果。

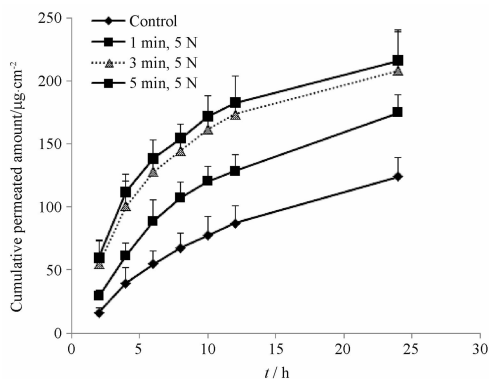


图4 微针不同预处理时间下 KP 贴片的离体皮肤药物累积渗透-时间曲线。 $n=5, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 *In vitro* permeation curves of KP patches after pretreated by microneedle in different durations. $n=5, \bar{x} \pm s$

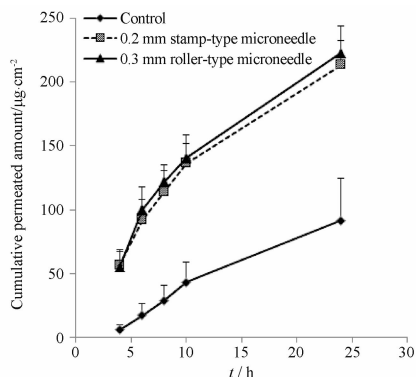


图5 不同长度微针预处理下 KP 贴片的离体皮肤药物累积渗透-时间曲线。 $n=5, \bar{x} \pm s$

Fig. 5 *In vitro* permeation curves of KP after pretreated by different lengths of microneedle. $n=5, \bar{x} \pm s$

3.2.4 微针种类 考察印章型和滚轮型实心微针对 KP 贴片体外皮肤渗透的影响。用针长都为 200 μm 的印章型微针和滚轮型微针分别处理准备好的大鼠离体皮肤,预处理时间为 3 min,压力为 5 N,对照组未经微针处理。各组皮肤渗透曲线见图 6,经印章型和滚轮型微针处理的 KP 渗透速率分别是对照组的 1.31 和 1.51 倍,24 h 累积渗透量分别是对照组的 1.36 和 1.79 倍,时滞分别比对照组缩短 1.23 和 1.56 h。与对照组相比,经微针预处理均能显著提高体外渗透速率及累积渗透量并缩短时滞 ($P < 0.05$)。滚轮型微针预处理的渗透速率和累积渗透量显著地大于印章型微针 ($P < 0.05$),时滞显著小于印章型微针 ($P < 0.05$)。结果表明,滚轮型微针促进 KP 贴片体外渗透效果显著优于印章型微针,

这可能与滚轮型微针作用于皮肤时,滚动相较于印章,微针与皮肤的接触更为充分更好地发挥穿刺有关,因此在相同的作用力和作用时间上,对于离体皮肤的穿透效果更好。

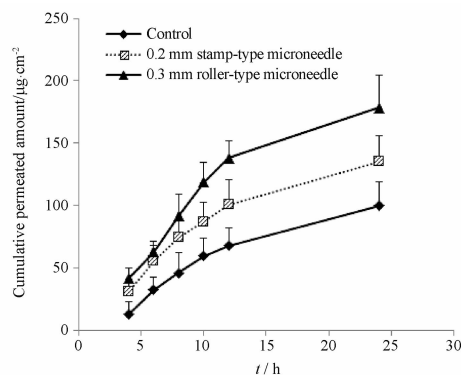


图6 不同种类微针预处理下 KP 贴片的离体皮肤药物累积渗透-时间曲线。 $n=5, \bar{x} \pm s$

Fig. 6 *In vitro* permeation curves of KP patches after pretreated by different kinds of microneedle. $n=5, \bar{x} \pm s$

3.3 血浆中酮洛芬含量检测方法的建立和验证

3.3.1 专属性 按血浆样品的处理方法,配制空白血浆 A(不加 KP 和 IS),加标样血浆 B(加 KP 和 IS)及样品血浆 C(仅加 IS)。按照“2.3”项下方法进行样检测,结果见图 7,在优化的色谱-质谱条件下未发现干扰峰,表明该方法具有良好的专属性,空白血浆中的内源性杂质不干扰样品测定。

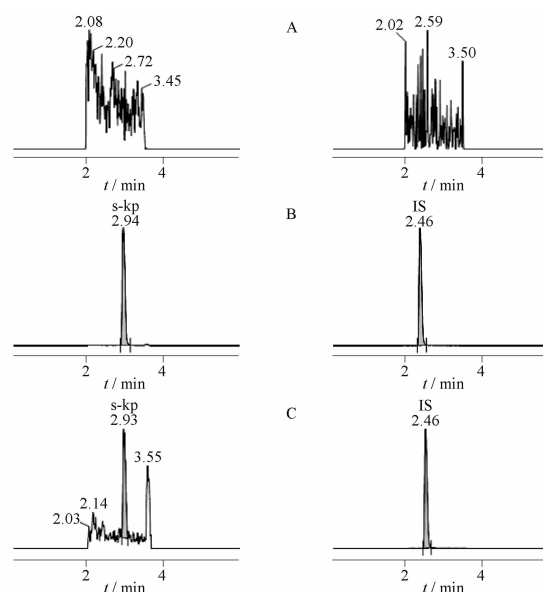


图7 空白血浆(A)、加标样血浆(B)和样品血浆(C)的提取离子流图

Fig. 7 The extracted ion chromatograms of blank plasma (A), spiked plasma (B), and sample plasma (C)

3.3.2 标准曲线及定量下限 取 KP 储备液和大鼠空白血浆,分别配制相当于 KP 质量浓度范围为 1~1 000 ng·mL⁻¹(1,2,10,50,200,800,1 000 ng·mL⁻¹)的血浆样品,按照“2.2”项下方法处理后按“2.1”项下方法进样分析。标准曲线考察每一浓度 2 样本分析,定量下限考察进行 5 样本分析,共考察三条标准曲线。以血浆中 KP(x ,ng·mL⁻¹)对 KP 与 IS 的峰面积比值(y)进行加权($1/x$)最小二乘回归,采用 Waters QuanLynx 软件计算,得到血浆中 KP 的标准曲线为: $y = 0.003\ 177\ 2x + 0.002\ 701$, $r = 0.998\ 5$ 。定量下限为 1 ng·mL⁻¹,RSD < 20%。结果表明,建立的分析方法用于大鼠血浆中 KP 的检测,线性良好,范围宽,灵敏度良好。

3.3.3 提取回收率及基质效应 在 50 μL 空白血浆中加入一定量 KP 和 IS,按“2.3”项下配制 800,200 和 2 ng·mL⁻¹质量浓度的 KP 样品,作为质量控制(quality control, QC)样品,每个样品各 6 份,取上清液进样分析,测得 KP 与 IS 响应值的比值记做 b;另取空白血浆 50 μL,按“2.3”项下血浆处理,取上清液加入与 QC 样品相同系列浓度的 KP 和 IS,每个浓度样品各 6 份,测得 KP 与 IS 响应值的比值记做 a;另以相应浓度的对照品和内标的溶液直接进样得到的峰面积比值记做 c,每个浓度样品各 6 份。提取回收率为 b 与 a 的比值,基质效应为 a 与 c 的比值。

该方法下的血浆中 KP 在高、中、低三个浓度的提取回收率在 89.3%~101.9%内,RSD < 15%,符合要求,该方法提取回收率良好;基质抑制效应在 85.3%~109.5%,RSD < 15%,符合要求,基质抑制效应对血浆 KP 的定量分析结果影响不大。

3.3.4 准确度及精密度 配制 800,200 和 2 ng·mL⁻¹的 QC 样品,每个浓度样品各 5 份,取上清液进样分析,重复 3 d,随行配制标准曲线,计算样品浓度,结果表明,准确度均在标示值的 15%范围内,精密度 RSD < 15%。

3.3.5 稳定性 考察血浆样品室温放置于进样盘中 24 h 的稳定性。配制 800,200 和 2 ng·mL⁻¹的 QC 样品,每个浓度样品各 4 份,取上清液室温放置于进样盘中 0 和 24 h 后进样分析,血浆中 KP 的含量 RSD < 15%,表明该血浆样品在室温放置 24 h 内稳定。

考察血浆样品经历 3 个冻-融循环后的稳定性。配制 800,200 和 2 ng·mL⁻¹的 QC 样品,每个浓度样品各 5 份,在 -20 °C 放置使其经历 3 个冻-融循环后,取上清液进样分析,血浆中 KP 的含量 RSD < 15%,表明该血浆样品反复冻融 3 次能保持稳定。

3.3.6 稀释可靠度 取空白比格犬血浆 50 μL,准确加入高于最高定量浓度的样品各 5 份,并用空白血浆稀释样品,使得样品浓度在已经建立的标准曲线的最高定量浓度以下,取稀释后的样品按照“血浆样品预处理”项下处理,取上清液进样分析,测定血浆 S-KP 的含量,计算稀释样品的准确度和精密度。当样品稀释 15 倍和 4 倍时,其准确度和精密度分别为 9.4% 和 2.9%,在设定标准之内(<15%),符合要求。且本稀释倍数覆盖了试验样品的所有稀释倍数,满足试验需求。

3.4 微针辅助酮洛芬贴片体内渗透结果

测得各组大鼠血药浓度的经时变化曲线见图 8。利用药动力学软件 Kinetica 进行数据分析,以非房室模型方法计算 ρ_{\max} 、 t_{\max} 及 AUC 等药动力学参数,并进行组间 t 检验,以 $P < 0.05$ 为存在统计学显著性差异。各组药动力学参数结果见表 1,经微针预处理的大鼠的 ρ_{\max} 和 $AUC_{0-\infty}$ 均显著大于对照组($P < 0.05$),0.2 mm 滚轮组和 0.3 mm 滚轮组的药物达峰时间显著快于对照组($P < 0.05$)。结果表明,微针前处理大鼠皮肤能显著促进 KP 贴片的经皮吸收,其中 300 μm 滚轮型微针促透效果显著优于 200 μm 滚轮型微针($P < 0.05$),而离体皮肤渗透试验结果表明,滚轮型微针 200 μm 和 300 μm 两种针长之间对酮洛芬贴片体外渗透效果没有明显的差异。这可能是因为体皮肤生理活性优于离体大鼠皮肤,微针刺入后回缩反应能力比离体皮肤更强,从而针长度对药物皮肤渗透有影响。当针长都为 200 μm 的条件下,滚轮型微针的促透效果显著优于印章型微针($P < 0.05$),实验结果与体外实验结果一致。另外,微针预处理皮肤的促透效果,相比体外促透,在体促透效果更显著,这可能与在体皮肤具有活性能快速将透过皮肤的药物及时转运进入血液循环有关。

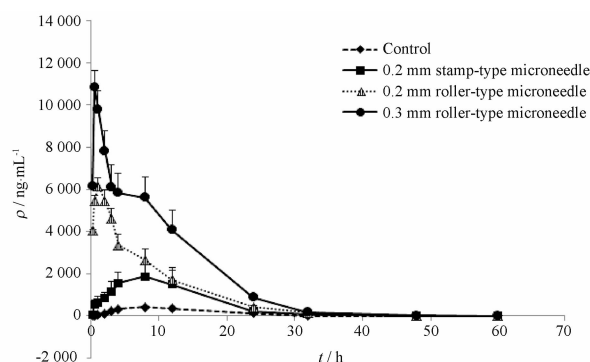


图 8 大鼠在不同微针条件预处理下敷贴 KP 贴片后的血药浓度-时间曲线。 $n = 3, \bar{x} \pm s$

Fig. 8 Plasma concentration-time curve of rats after applying KP patch assisted by different types of microneedle. $n = 3, \bar{x} \pm s$

表 1 各组大鼠的药动学参数。n=3, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Main pharmacokinetic parameters of rat groups. n=3, $\bar{x} \pm s$

Parameters	Control	0.3 mm roller-type microneedle	0.2 mm roller-type microneedle	0.2 mm stamp-type microneedle
t_{\max}/h	8.00 ± 0.00	0.50 ± 0.00	1.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00
$\rho_{\max}/\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.42 ± 0.03	10.86 ± 0.80	6.16 ± 0.39	1.86 ± 0.59
$t_{1/2}/h$	5.52 ± 0.36	5.36 ± 0.29	5.09 ± 0.75	5.08 ± 0.64
$\text{AUC}_{0 \rightarrow t}/\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$	7.46 ± 0.98	108.10 ± 17.06	56.60 ± 10.26	29.65 ± 11.58
MRT/h	12.59 ± 0.28	8.99 ± 0.11	8.41 ± 0.29	10.82 ± 0.20

4 讨论

本研究以实心微针作为皮肤的前处理工具,以贴片方式给药模型药物 KP,评价微针前处理对药物经皮渗透的影响。体外以离体皮肤渗透实验进行评价,建立并验证了皮肤接收液中 KP 的 HPLC 检测方法,结果表明,皮肤用不同的压力及时间预处理后能显著地提高药物的经皮渗透速率和渗透量,并且能明显缩短时滞。通过离体试验初步筛选出了固体微针前处理的条件,并证明滚轮型微针的促透作用要好于印章型微针。体内药动学试验建立了用于大鼠血浆中 KP 浓度检测的 LC-QTOF/MS 方法,准确、灵敏、高效,能满足检测需求。结果表明,微针预处理皮肤能显著地促进药物的在体皮肤吸收,微针预处理组的药物在体皮肤吸收效果要显著好于未用微针预处理的对照组。

由于皮肤角质层的屏障作用,大部分药物经皮渗透困难,渗透量小、时滞长,较难达到治疗效果。传统的促透技术如果联合微针技术给药,例如本研究的微针预处理皮肤联合药物贴片给药,则药物的经皮渗透显著增加,渗透时滞更短,解决传统透皮制剂经皮渗透速率较低、药物起效慢等问题,同时可拓展经皮给药的药物范围。本研究结果显示,微针预处理可以扩展酮洛芬贴片用于例如跌打损伤引起的局部急性疼痛。

REFERENCES

[1] HADGRAFT J. Skin deep[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2004, 58(2): 291-299.
 [2] LI J, LIU B, ZHOU Y Y, *et al.* Fabrication of a Ti porous microneedle array by metal injection molding for transdermal drug delivery[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): 1-15.
 [3] DONGHWI J, JOONHO S, DONG M S, *et al.* Magnesium microneedle patches for under-eye wrinkles [J]. *Dermatol Ther*, 2022, 35(9):e15732.

[4] YI Y, SHINOMIYA K, KOBAYASHI R, *et al.* A novel super-plastic dieless drawing using fracture phenomenon for fabrication of metal tubular microneedles [J]. *Cirp Ann-Manuf Technol*, 2022, 71(1):237-240.
 [5] JIANG D, JIANG Y X, WANG K L, *et al.* Binary ethosomes-based transdermal patches assisted by metal microneedles significantly improve the bioavailability of carvedilol[J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2022, 74(8):103498.
 [6] RADEYAH A, PRINA M, PARASKEVI K M, *et al.* Electrospinning/electrospraying coatings for metal microneedles: a design of experiments (DOE) and quality by design (QbD) approach[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2020, 156(15):20-39.
 [7] ZHAO X, COULMAN S A, HANNA S J, *et al.* Formulation of hydrophobic peptides for skin delivery via coated microneedles [J]. *J Controlled Release*, 2017, 265:2-13.
 [8] PAGANO C, LATTERINI L, DI M A, *et al.* Polymeric bioadhesive patch based on ketoprofen-hydroxycalcitriol hybrid for local treatments[J]. *Pharmaceutics*, 2020, 12(8):733.
 [9] AGANOVIC M I, BURNAZOVIC R L, KUSTURICA J, *et al.* Effects of topically applied diclofenac and ketoprofen on prostaglandin E2 and Stat3 sera levels and body temperature in two different acute inflammation models in rats[J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28(7):3816-3822.
 [10] BADRAN M M, KUNTSCHE J, FAHR A. Metallic microneedles with interconnected porosity: a scalable platform for biosensing and drug delivery[J]. *Acta Biomater*, 2018, 80(19):401-411
 [11] KIRKBY M, SABRI A B, SCURR D, *et al.* Microneedle-mediated permeation enhancement of chlorhexidine digluconate: mechanistic insights through imaging mass spectrometry [J]. *Pharm Res*, 2022, 39(8):1945-1958.
 [12] XIA X, GAO W Y, LIU X Y, *et al.* Effect of metallic arraymicroneedle pretreatment on ramosetron hydrochloride patches in transdermal drug delivery[J]. *Chin Pharm J(中国药理学杂志)*, 2019, 54(2):105-109.
 [13] KATAYAMA S, OTA M. Acute generalized exanthematous pustulosis due to a transdermal Ketoprofen patch[J]. *Contact Dermat*, 2022, 86(5):425-427.
 [14] XING J, ZHANG C, JIN D, *et al.* Enantioselective analysis of ketoprofen in human saliva by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with chiral derivatization [J]. *Microchem J*, 2018, 143: S0026265X18307562.
 [15] RAVURI H G, SATAKE N, BALMANN A, *et al.* Pharmacokinetic evaluation of a novel transdermal Ketoprofen formulation in healthy dogs[J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(3):646.

(收稿日期:2023-03-28)