

盐酸特比萘芬生物黏附性成膜凝胶的制备及其体外评价

倪睿^{1*}, 马晋隆^{1**}, 孙有丽¹, 黄乐乐¹, 屠永锐², 范新华²(¹ 药物制剂国家工程研究中心, 上海 200437; ² 常州四药制药有限公司, 常州 213004)

摘要 以盐酸特比萘芬为模型药物, 制备一种生物黏附性成膜凝胶, 测定其理化性质。其黏度为 $(13\,299 \pm 51)$ mPa·s, pH 为 3.50 ± 0.50 , 凝胶剪切黏度为 (196 ± 4) g/cm²; 膜固体剩余率为 $(50.74 \pm 2.81)\%$, 膜拉伸强度为 (1.17 ± 0.21) MPa, 膜断裂伸长率为 $(21.42 \pm 3.24)\%$ 。采用《中华人民共和国药典》(2010 年版) 桨碟法测定其体外释放度, 并绘制释放曲线, 结果表明, 药物在体外能够维持 10 h 的平稳释放; 以小香猪皮为透皮屏障, 采用改良的 Franz 扩散池法进行体外透皮释放研究, 结果表明, 药物不透过皮肤, 局部用药安全, 其中 $(93.05 \pm 5.66)\%$ 的药物滞留于皮肤表面, $(1.15 \pm 0.85)\%$ 进入皮肤内, 有利于浅表性皮肤真菌感染的治疗。

关键词 盐酸特比萘芬; 生物黏附性; 成膜凝胶; 体外释放; 透皮释放

中图分类号 R944 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2015)06-0671-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150606

Preparation and *in vitro* evaluation of a new terbinafine hydrochloride bioadhesive film-forming gelNI Rui^{1*}, MA Jinlong^{1**}, SUN Youli¹, HUANG Lele¹, TU Yongrui², FAN Xinhua²¹ National Pharmaceutical Engineering Research Center, Shanghai 200437; ² Changzhou Siyao Pharm, Changzhou 213004, China

Abstract The aim of this study was to conduct the preparation and pharmaceutical characterization of a new type of terbinafine hydrochloride bioadhesive film-forming gel. The viscosity of the gel of $(13\,299 \pm 51)$ mPa·s, pH of 3.50 ± 0.50 , and the shearing viscosity of (196 ± 4) g/cm² was found. This new gel turned out to be a layer of solid film on the application site in a very short time. The remaining solid ratio of the resulting film was estimated to be $(50.74 \pm 2.81)\%$; the tensile strength was (1.17 ± 0.21) MPa; and the breaking elongation was $(21.42 \pm 3.24)\%$. *In vitro* release behavior of terbinafine hydrochloride from the film was investigated according to the paddle over disk method in ChP2010. Terbinafine hydrochloride released continuously for 10 h from the film. Improved Franz type diffusion cells were used *in vitro* transdermal studies by the application of excised minipigs skins. No penetration of drug into the receptor medium across the skin existed and so it could imply the safety for local application. It was found that $(93.05 \pm 5.66)\%$ of drug stayed on the skin surface while $(1.15 \pm 0.85)\%$ entered into the skin, which was beneficial for the treatment of superficial skin fungal infection.

Key words terbinafine hydrochloride; bioadhesive; film-forming gels; *in vitro* release behavior; transdermal

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for R&D of Novel Drugs (No. 2012H09304004)

长期以来, 皮肤真菌感染引起的浅部真菌病严重影响患者的生活质量。盐酸特比萘芬 (terbinafine hydrochloride, TBNF-HCl) 是一种人工合成的烯丙胺类广谱抗真菌药物, 它能特异地干扰真菌固

醇的早期生物合成, 高选择性抑制真菌的角鲨烯环氧化酶, 使真菌细胞膜的形成过程中角鲨烯环氧化反应受阻, 从而达到杀灭或抑制真菌的作用。目前临床上常用的盐酸特比萘芬剂型有乳膏剂、凝胶

剂、软膏剂、搽剂、溶液剂、喷雾剂和散剂,其中最常用的是乳膏剂,如由诺华制药生产销售的兰美抒乳膏是一种含有1%盐酸特比萘芬的乳膏剂,临床上用于治疗真菌所致的手癣、足癣、体癣、股癣及花斑癣等。由于这些剂型大多为亲水性的剂型,当涂敷到皮肤患处后,制剂在患处滞留时间较短,而且很容易被袜子、衣裤等摩擦掉,影响了药物的疗效。

生物黏附性成膜凝胶是一种应用于皮肤和口腔黏膜的局部给药新剂型。它采用具有生物黏附性和成膜性能的高分子材料为凝胶基质,与药物和其他辅料一起,溶于可挥发的溶媒中形成凝胶,该凝胶涂布于患处(如皮肤、口腔黏膜等)后,随着溶媒的挥发,很快在原位形成一层具有生物黏附性的疏水性固体薄膜,药物从膜内持续地释放至患处,同时膜还起到物理屏障作用,保护患处不受外界的感染和刺激,也不易被衣裤袜子等摩擦掉。该剂型能在局部持久释药和具有屏障保护作用的特点是目目前临床上使用的乳膏剂、凝胶剂等半固体制剂所不具备的^[1-4]。

本研究在本课题组开发的生物黏附性成膜凝胶局部给药系统技术平台上,研制了盐酸特比萘芬生物黏附性成膜凝胶,并对其理化性质,体外释放和透皮释放行为进行了考察。

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸特比萘芬(浙江东亚制药有限公司);羟丙基纤维素(美国亚什兰集团);单宁酸(云南博泽林化工有限公司);乙醇、乳酸、木糖醇、三乙醇胺(国药集团化学试剂有限公司);纯水(娃哈哈纯净水);盐酸特比萘芬对照品(中国食品药品检定研究院);甲醇为色谱纯,其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

Fisco-1L 成套反应系统(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);NDJ-8S 旋转式黏度计(上海精天电子仪器有限公司);FiveEasy 实验室 pH 计(瑞士梅特勒-托利多集团);RC806D 溶出试验仪(天津市天大天发科技有限公司);AGS-J 材料试验机(日本岛津公司);千分手式薄膜测厚仪(上海六菱仪器厂);Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);TK-24BL 型透皮扩散试验仪(上海锴凯科技贸易有限公司)。

1.3 动物

实验用小型巴马香猪,普通级,体重 5.8 kg,由上海甲干生物科技有限公司提供,许可证号码:SCXK(沪)2010-0028。

2 方法与结果

2.1 成膜凝胶的制备

①称取木糖醇 10 g 溶解于适量水中,备用;称取盐酸特比萘芬 10 g 溶解于适量乙醇中,备用;称取三乙醇胺 7 g 与适量乙醇混合均匀,备用。②酯化:称取适量乙醇加入搅拌器,然后加入乳酸 25 g 和单宁酸 50 g,搅拌使溶解;再慢慢加入羟丙基纤维素 30 g,边加边均质,使均匀分散,停止均质,再用搅拌器搅拌 2.5 h。③交联:向搅拌锅中加入木糖醇水溶液,搅拌 30 min。④向搅拌锅中加入盐酸特比萘芬乙醇溶液,搅拌 30 min。⑤向搅拌锅中加入三乙醇胺乙醇溶液,并补足乙醇的量至 1 000 g,搅拌 15 min,得均匀、澄明的黄色半固体凝胶。将凝胶均匀地涂敷在塑料片上,干燥后黏附在塑料片表面,形成一层光滑、平整、透明的固体薄膜,见图 1。



Figure 1 Appearance of the gel and the resulting film

2.2 成膜凝胶的理化性质

2.2.1 黏度 凝胶的黏度是反应其流变学性能的重要参数,照黏度测定法(《中华人民共和国药典》2010 年二部附录 VI G 第二法)测定本品动力黏度,结果见表 1。

2.2.2 pH 凝胶的 pH 会对凝胶体系的稳定性产生影响,因此必须合理的控制凝胶的 pH 范围。取本品 1.0 g 于 25 mL 烧杯中,加水 10 mL,搅拌,滤过,取续滤液,照 pH 测定法(《中华人民共和国药典》2010 年版二部附录 VI H)测定本品 pH,结果见表 1。实验结果表明,pH 在 3.0~4.0 范围内,成膜凝胶的物理性能较为稳定。

2.2.3 凝胶黏附力 按文献[5]报道的方法,采用类似的自制剪切黏度测定装置测定成膜凝胶的

剪切黏度,测定装置见图 2。两块玻璃板之间的凝胶厚度 0.5 mm,涂敷面积为 2.5 cm×5 cm,以 140 cm/min 的恒速拉动玻璃板,当两块玻璃板分离时以弹簧秤上的读数表示剪切黏度(单位:g/cm²)。

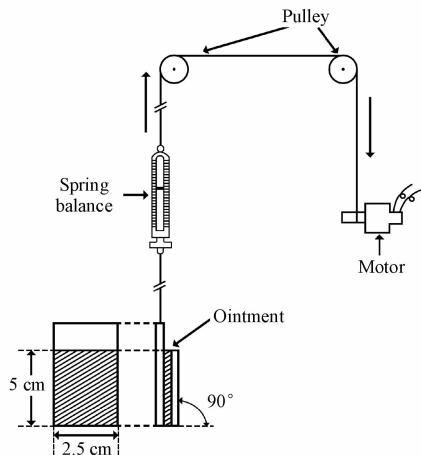


Figure 2 Self-made apparatus used to measure shearing viscosity

2.2.4 膜黏附时间与膜固体剩余率 取约 50 mm×50 mm 的正方形塑料片,称重 m_1 ,置平板玻璃上,上置直径 30 mm,厚 0.4 mm 的中空塑料模圈,将凝胶剂注入模圈内,用平板刮平,取走模圈,立即称重,记录塑料片与凝胶总重 m_2 ,置室温下自然干燥至乙醇基本挥发完,形成一层固体薄膜,制得供试品。

将供试品置于两层网碟中间,膜面朝上,照《中华人民共和国药典》2010 年版二部附录 X D 第三法(桨碟法),以水 900 mL 为介质,温度 32℃,转速 100 r/min,搅拌 10 h 后取出供试品。在水中浸泡 10 h 后,膜仍完整黏附在塑料片上,无卷曲剥离现象。将取出的供试品干燥(40℃,3 h)后,称重 m_3 。根据公式 1 计算膜的固体剩余率,结果见表 1。

$$\text{固体剩余率} = \frac{(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)}{m_0} \times 100\%$$

(1)

(注: m_0 为处方中固体含量)

2.2.5 膜拉伸强度和断裂伸长率 取约 40 mm×150 mm 的长方形塑料片,置平板玻璃上,上置 20 mm×120 mm,厚 0.6 mm 的中空塑料模圈,将凝胶剂注入模圈内,用平板刮平,取走模圈,置室温下自然干燥至乙醇基本挥发完,形成一层固体薄膜,将膜从塑料片上完整剥下,制得供试品。

设定材料试验机的参数,拉伸速度为 100 mm/min,拉力范围 0~40 N,有效测试距离为 50 mm,宽度 20 mm。用千分手式薄膜测厚仪在供试品有效测试区域内测定 3 处厚度,记录,取平均值作为膜厚度。用材料试验机测定膜拉伸强度和断裂伸长率^[6],结果见表 1。

Table 1 Physicochemical properties of terbinafine(TBNF-HCl) bioadhesive film-forming gel($\bar{x} \pm s, n=6$)

Physicochemical property	Results
Viscosity/(mPa·s)	13 299 ± 51
pH	3.50 ± 0.50
Shearing viscosity/(g/cm ²)	196 ± 4
Remaining solid rate/%	50.74 ± 2.81
Tensile strength/MPa	1.17 ± 0.21
Breaking elongation/%	21.42 ± 3.24

2.3 成膜凝胶体外释放试验

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Welch Ultimate XB-C₁₈(4.6 mm×150 mm,5 μm);流动相:甲醇-醋酸铵缓冲液(80:20)(醋酸铵缓冲液:取醋酸铵 1.15 g,加水 300 mL 溶解,加冰醋酸 1.0 mL);柱温:30℃;检测波长:224 nm;流速:1.0 mL/min。

2.3.2 测定法 取约 50 mm×50 mm 的正方形塑料片,称重,置平板玻璃上,上置直径 30 mm,厚 0.4 mm 中空塑料模圈,将凝胶剂注入模圈内,用平板刮平,取走模圈,立即称重,记录凝胶重量(约相当于盐酸特比萘芬 2 mg),置室温下自然干燥至乙醇基本挥发完,形成一层固体薄膜,制得供试品。

将供试品置于网碟内,照《中华人民共和国药典》2010 年版二部附录 XD 释放度测定法的第三法(桨碟法),以 0.5% SDS 水溶液 900 mL 为释放介质,温度 32℃,转速 100 r/min,分别于 1,2,3,4,5,6,7,8,10 h 各取样 2 mL,滤过,精密量取续滤液 100 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算释放度,绘制释放曲线,结果见图 3。实验结果表明,在 2 和 5 h 时,本品中盐酸特比萘芬释放量分别为 50% 和 70%,至 10 h 时释放趋于平稳,约为 85%,基本达到峰值。将体外释放曲线分别以零级动力学、一级动力学和 Higuchi 方程进行拟合,结果与一级方程最相似,表明本品中盐酸特比萘芬是随着时间的推移以扩散的方式逐步从凝胶膜内释放的。

2.4 成膜凝胶体外透皮释放试验及药物皮肤滞留量的测定^[7]

2.4.1 离体皮肤的制备 取新鲜的小型香猪皮

肤,除去表面的毛发和皮肤内侧的脂肪和肌肉组织后,用生理盐水清洗,沥干,剪成 $2\text{ cm} \times 2\text{ cm}$ 大小,备用。

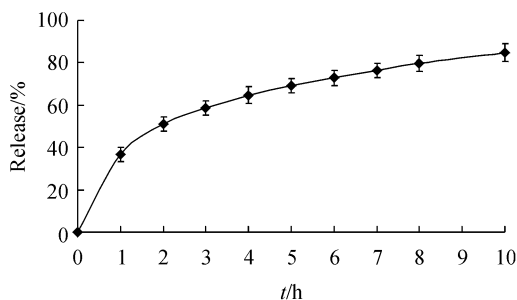


Figure 3 Release profiles of TBNF-HCl bioadhesive film-forming gel ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.4.2 供试品皮肤的制备 将制备好的离体皮肤角质层向上,上置直径 14 mm ,厚 0.6 mm 的模圈,将凝胶约 0.1 g 注入模圈内,用平板刮平,移除模圈,立即称重,置室温下自然干燥至乙醇基本挥发完,皮肤表面形成一层固体薄膜,即得供试品皮肤。

2.4.3 体外透皮释放试验 将供试品皮肤的真皮层面向接收池平铺在接受池的杯口表面,上置供给池,用不锈钢夹子夹紧,从取样口加入生理盐水(约 18 mL),并使液面与真皮层完全接触,置于透皮扩散试验仪水浴中(温度 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$),磁力搅拌(转速 200 r/min),分别于 $1, 2, 4, 6, 8, 10\text{ h}$ 各取样 2 mL (同时补充等体积的接收介质),按“2.3.1”项下的色谱条件,精密量取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。

2.4.4 皮肤表面滞留量测定 透皮释放试验结束后,取下供试品皮肤,角质层向上,置于干净滤纸上,用浸泡过甲醇的单头棉签反复擦拭供试品皮肤的给药部位,剪取棉签头置于烧杯中,加适量甲醇超声 30 min 后,转移至 25 mL 量瓶中,重复 3 次,用 80% 甲醇水溶液定容,超声 30 min ,滤过,精密量取续滤液 $20\text{ }\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算盐酸特比萘芬皮肤表面滞留量。

2.4.5 皮肤内滞留量测定^[8] 取经棉签擦拭后的供试品皮肤,用生理盐水冲洗表面,滤纸吸干后,剪碎置于烧杯中,加适量甲醇超声 30 min 后,转移至 50 mL 量瓶中,重复 3 次,用 80% 甲醇水溶液定容,滤过,精密量取续滤液 $100\text{ }\mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算盐酸特比萘芬皮肤内滞留量,平行测定 6 份。

试验结果显示:接受液中未检出药物,表明药物不透过皮肤进入机体内或透过皮肤的量低于最低检测限无法检出,局部用药安全。有 $(93.05 \pm 5.66)\%$ 的药物滞留于皮肤表面, $(1.15 \pm 0.85)\%$ 进入皮肤内,这有利于浅表性皮肤真菌感染的治疗。此外,经过持续 10 h 的透皮释放试验,膜仍完整的黏附于小香猪皮肚表面,再次证明成膜凝胶具有良好的成膜性和生物黏附性。

3 讨论

3.1 生物黏附性成膜凝胶

由本课题组开发的生物黏附性成膜凝胶是一种应用于皮肤和口腔黏膜的局部给药新剂型。与一般的生物黏附性外用制剂不同,本剂型虽然采用水溶性的生物黏附材料——羟丙基纤维素(HPC),但对 HPC 进行了结构上的修饰,首先利用有机羧酸作为酯化剂与亲水性的 HPC 侧链上的羟基进行酯化反应,使 HPC 亲水性降低,疏水性增强,而 HPC 主链上的羟基由于空间位阻未参与酯化,仍处于游离状态,保持了 HPC 的成膜性和生物生物黏附性。其次在凝胶中添加多羟基化合物作为交联剂,交联剂上的羟基可与 HPC 酯化产物或酯化不完全的 HPC 上的羟基通过氢键交联,使膜的内部结合力更大,膜结构更稳定,所形成的膜具有更好的柔韧性。经酯化交联(图 4)后制备成的凝胶在给药部位所形成的固体薄膜的成膜性和黏附力更好,疏水性更强,柔韧性更好,维持时间更长。

3.2 成膜凝胶体外评价方法

3.2.1 凝胶黏附力的评价方法^[9-10] 确定生物黏附性材料的黏附性能,常用的方法是将黏附材料和目标生物组织分别固定在支持物上,将黏附材料与目标生物组织在一定的的外力作用下相互接触,并维持一定时间,使黏附作用发生,然后在一定的的外力作用下使黏附材料与目标生物组织从接触界面处分离,记录分离时的作用力,如黏附力或剥离力,作为评价黏附性能的指标。本研究根据文献报道,自制了凝胶黏附力的测定装置并建立方法,该方法操作简单,重复性好,为处方中 HPC 的筛选提供了一个重要指标。

3.2.2 凝胶膜疏水性能评价方法——膜固体剩余率法 凝胶膜的疏水性直接关系到膜在皮肤患处

维持时间的长短。膜的疏水性越强,越不易被自身汗液或外界水性液体溶解洗脱,可持续发挥保护患处和释放药物的作用。膜疏水性的强弱与 HPC 和有机酸酯化反应的程度有关,可用凝胶成膜后在水中放置一定时间后剩余的膜固体量来考察,即膜

固体剩余率作为评价指标。膜固体剩余率反映了 HPC 与酯化剂的酯化程度,膜固体剩余率越大,酯化程度越高,膜疏水性越强。膜固体剩余率测定简单,为处方中酯化剂的筛选提供了一个简便的方法。

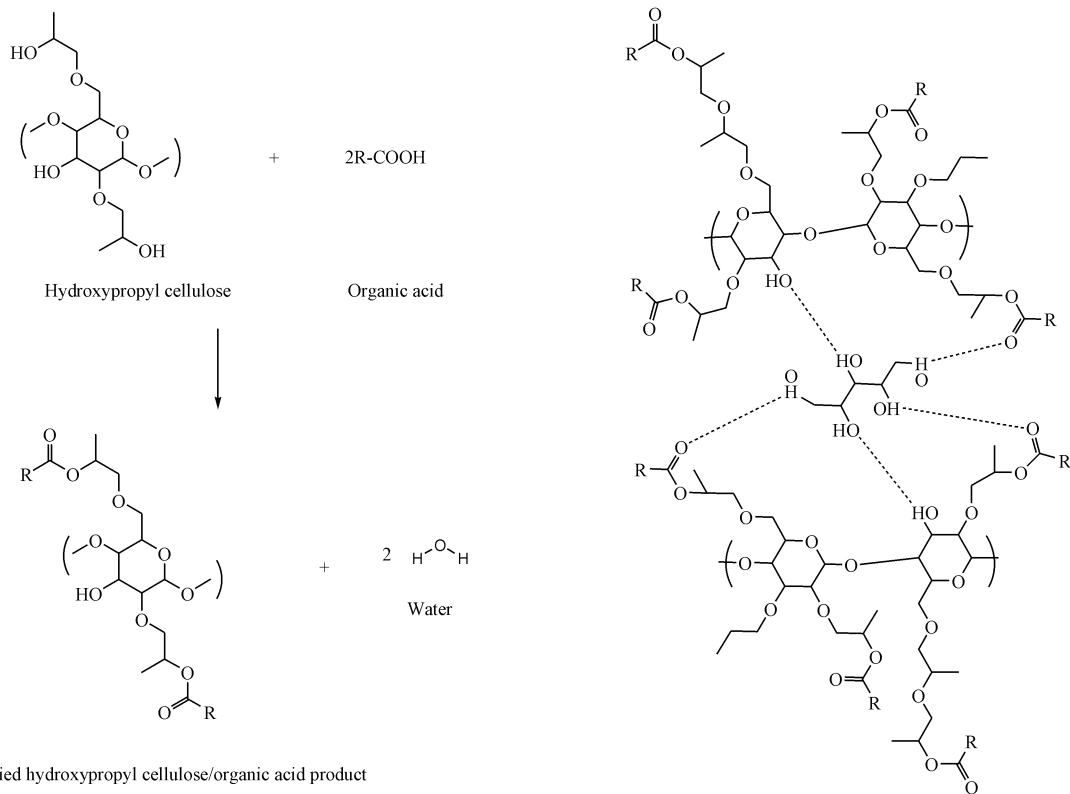


Figure 4 Mechanism of esterification and cross-linking reaction

3.2.3 凝胶膜柔韧性评价方法——膜拉伸强度和断裂伸长率 凝胶涂敷于皮肤患处所形成的膜,应具有良好的柔韧性,能随皮肤表面的运动而呈弹性伸缩,且不发生破裂。膜的柔韧性可通过膜的力学性质,即膜的拉伸强度和断裂伸长率来衡量,拉伸强度越大,断裂伸长率越高,膜柔韧性越好。通过对膜拉伸强度和断裂伸长率的测定,对方处方中的 HPC 和交联剂进行了筛选。

3.2.4 药物体外释放评价方法^[11-13] 迄今为止,在各国药典中,半固体局部用制剂如软膏、凝胶的体外释放还没有具体规定,但半固体局部用制剂体外释放的重要性日益明显,在制剂处方筛选中非常有用,可用于预测基质的释放行为,比较药物的释放速率;在产品质量控制方面也起着重要的作用,FDA 在其颁布的扩大规模或上市后变更(SUPAC)指导原则中指出,半固体局部用制剂在生产放大和

产品批生产后发生变更时须进行体外释放试验,以保证产品质量的一致性和等效性。

本成膜凝胶与常规的半固体局部用制剂不同,在使用前为凝胶状,当涂敷到给药部位后,迅速成膜,所成的膜才是药物的载体,药物要起效就要先从膜内释放出来,此时类似于贴剂,因此本研究采用了《中华人民共和国药典》2010 年版二部附录 XD 释放度测定法的第三法(桨碟法)来测定盐酸特比萘芬成膜凝胶的体外释放,为处方优化提供了依据。

参考文献

[1] Edwin P. Compositions and *in situ* methods for forming films on body tissue; US,005081158A[P]. 1992-01-14.
[2] Howard E. Topical film-forming compositions; US,005906814A [P]. 1996-10-22.
[3] Ma JL, Chen ZM, Ni M. Filming gel composition and its use; CN,

- 100500747[P]. 2009-06-17.
- [4] Ma JL, Chen ZM, Ni M. Application of saturated fatty polyol or alcoholic acid as cross-linking agent in filming gel composition: CN, 1887280A[P]. 2007-01-03.
- [5] Ishida M, Nambu N, Nagai T. Ointment-type oral mucosal dosage form of Carbopol containing prednisolone for treatment of aphtha[J]. *Chem Pharm Bull*, 1983, **31**(3):1010-1014.
- [6] Hu Y, Li DG, Xu L, *et al.* The preparation and properties of high strength transparent nano cellulose film[J]. *J Cellulose Sci Technol*(纤维素科学与技术), 2012, **20**(3):51-56.
- [7] Xiao XC, Chen F, Li D, *et al.* Determination of percutaneous absorption of adapalene from adapalene gel by HPLC[J]. *China Med Herald*(中国医药导报), 2012, **9**(33):120-122.
- [8] Cheng L, Wang BT. Percutaneous absorption and content determination of terbinafine hydrochloride cream[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2015, **35**(6):518-522.
- [9] Gao ZX, Jiang XH, Zhang CC, *et al.* Determination of *in vitro* adhesive force and its application in formulation of bioadhesive tablets[J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2006, **37**(9):606-609.
- [10] Su H, Lu Y, Wang YJ, *et al.* Study on optimum lidocaine hydrochloride gel formula and its property *in vitro*[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2010, **30**(7):547-551.
- [11] Guan YJ, Ding PT, Jiang JH. Studies on *in vitro* release method of the topical etofesalamide creams[J]. *Chin J Pharm*(中国药剂学杂志), 2006, **4**(4):147-151.
- [12] Kaur G, Singh D, Brar V. Bioadhesive okra polymer based buccal patches as platform for controlled drug delivery[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, **70**(9):408-419.
- [13] Li HB, Ding PT, Xu H, *et al.* Effect of composition and preparation procedure of sustained-release progesterone gel on its *in vitro* release rate and viscosity[J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2014, **13**(2):133-136.