

克立硼罗软膏体外渗透率考察

宋金红^{1,2}, 孙国祥^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2. 北京元延医药科技股份有限公司, 北京 101102)

摘要 目的: 建立克立硼罗软膏体外透皮方法, 为克立硼罗软膏生物等效性提供参考依据。**方法:** 采用 HPLC 法测定克立硼罗软膏渗透量, 采用垂直式的 Franz 扩散池法研究软膏体外释放特性。采用 Thermo BDS Hypersil-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.1% 磷酸溶液-乙腈 (60 : 40) 为流动相, 流速 1.5 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。**结果:** 样品色谱图中克立硼罗峰形良好; 阴性样品色谱图中在克立硼罗位置未出峰, 不干扰测定; 克立硼罗质量浓度在 0.026~21.02 μg · mL⁻¹ 的范围内线性关系良好 ($r \geq 0.999$); 重复性 6 份试验中, 将自制品与参比制剂最大渗透速率 (J_{\max}) 的均值进行比较, 比值为 0.94; 同时对 J_{\max} 进行置信区间计算, 考察 90% 置信区间为 87.9%~102.0%; 各样品质量守恒百分比为 94.1%~101.1% ($n=12$); 对照品溶液室温放置 26 h, 峰面积的 RSD 为 0.44%, 自制品及参比制剂分别于室温、32 °C 水浴放置 26 h, 峰面积的 RSD 为 0.78%~1.1%, 说明溶液稳定性较好。对 3 批样品检测, 自制品和参比制剂的 J_{\max} 均值的比值均在 0.92~0.97 范围内, 同时对 J_{\max} 进行置信区间计算, 考察 90% 置信区间为 84.8%~100.7%。**结论:** 该方法操作简单、便捷, 方法选择性高, 专属性强, 准确度较高。

关键词: 克立硼罗; 软膏剂; Franz 扩散池法; 体外透皮; 渗透率; 皮内滞留量

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793 (2025) 01-156-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2021-0040

Investigation on the *in vitro* permeability of crisaborole ointment

SONG Jin-hong^{1,2}, SUN Guo-xiang^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University School of Pharmacy, Shenyang 110016, China;

2. Beijing Yuanyan Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Beijing 101102, China)

Abstract Objective: To establish an *in vitro* permeation method for crisaborole ointment and to provide a reference for the bioequivalence of crisaborole ointment. **Methods:** The HPLC method was used to determine the permeability of crisaborole ointment, and the vertical Franz diffusion pool method was used to study the release characteristics of the ointment *in vitro*. The chromatographic column was Thermo BDS Hypersil-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), with 0.1% phosphoric acid solution-acetonitrile (60 : 40) as the mobile phase, flow rate of 1.5 mL · min⁻¹, column temperature of 30 °C, detection wavelength of 254 nm, and injection volume of 10 μL. **Results:** The peak shape of crisaborole in the chromatogram of the test sample was good. There was no peak at the position of crisaborole in the negative sample chromatogram, which did not interfere with the determination. The linear

* 通信作者 Tel: 13940272571; E-mail: gxswmws@163.com

第一作者 Tel: 18101034067; E-mail: songjinhongmsy@126.com

relationship of crisaborole was good within the range of 0.026–21.02 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r \geq 0.999$). In six repeated experiments, the mean maximum transmittance (J_{max}) of the self-made product and the reference formulation were compared (odds ratio: 0.94). Simultaneously calculate the confidence interval for J_{max} , with a 90% confidence interval ranging from 87.9% to 102.0%. The mass conservation percentage of each sample was 94.1%–101.1% ($n=12$). The reference solution was left at room temperature for 26 h, with a peak area RSD of 0.44%. The self-made product and reference preparation were left in a water bath at room temperature and 32 °C for 26 h, with peak area RSD ranging from 0.78% to 1.1%, indicating good stability of the solution. For the three batches of samples tested, the ratio of the mean J_{max} values of the self-made product and the reference formulation was within the range of 0.92–0.97. Simultaneously calculate the confidence interval for J_{max} , with a 90% confidence interval ranging from 84.8%–100.7%. **Conclusion:** This method is simple and convenient to operate, with high selectivity, strong exclusivity and high accuracy.

Keywords: crisaborole; ointment; franz diffusion pool method; *in vitro* transdermal penetration; permeability; intradermal retention

克立硼罗是一种磷酸二酯酶 4 (PDE4) 抑制剂,可以减少特应性皮炎病理生理学中涉及的各种炎症细胞因子的产生,有效渗透皮肤屏障,实现局部给药。这种抑制剂导致细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 水平增高,用于治疗真菌感染,具体用于治疗甲癣或皮肤真菌感染。在保证患者舒适度的同时,具有可以长期应用以及用于特殊部位的优势。美国 FDA 批准其用于局部治疗 2 岁及以上患者轻度至中度特应性皮炎,为儿童提供了一款安全有效的药物,打破了外用非激素类抗炎领域没有新产品的现状,具有划时代的意义^[1-3]。

克立硼罗软膏属于外用药物制剂,该类制剂的质量测试分为 2 类:一类是评估产品质量属性的测试;另一类是评估产品性能的测试,包括体外释放试验 (*in vitro* release test, IVRT) 和体外透皮试验 (*in vitro* permeation test, IVPT)。IVPT 可用于表征外用药物制剂活性成分达到作用部位的速度和程度,可通过 IVPT 的等效性,证明生物利用度的速率和程度无显著差异,用于支持生物等效性论证或代替临床治疗等效性试验^[4-13]。

本实验采用垂直式的 Franz 扩散池法,建立该制剂的体外透皮测定方法,并对方法进行验证^[14-15],为克立硼罗软膏质量研究提供依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与装置

LC-2030C Plus 高效液相色谱仪(岛津公司);

LabSolutions 色谱工作站(岛津公司); MS105DU 十万分之一电子天平(梅特勒-托利多有限公司); RYJ-12B 药物透皮扩散试验仪(Franz 扩散池,上海黄海药检仪器有限公司); HW-SY21-KP4 型水浴锅(北京市长风仪器表公司); SHZ-C 水浴恒温振荡器(上海跃进医疗器械有限公司); 数控超声波清洗器(费尔德科学仪器有限公司)。

1.2 试验样品

克立硼罗对照品(北京元延医药科技股份有限公司生产,含量 99.9%,批号 220511); 克立硼罗软膏(北京元延医药科技股份有限公司生产,批号 220801、221101、221102、221103、230101、230102、230103); 克立硼罗软膏(Pharmacia and Upjohn Company LLC,批号 FD5696)。

1.3 试验试剂

水(屈臣氏); 磷酸(天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20230407); 乙腈(MREDA 公司,批号 D211128); 无水乙醇(FEPURE 公司,批号 191025); 0.9% 氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号 2304033202); 聚四氟乙烯膜(津腾微孔滤膜有限公司,0.45 μm); 吐温 80(药用级,麦克林化学试剂有限公司,批号 C15064851)。

1.4 试验皮肤

巴马小型猪皮肤(泰州泰和生物科技有限公司); 巴马小型猪皮肤(北京和邦兴业科学仪器有限公司); 小型巴马香猪皮肤(北京德默高科医药技术有限公司)。

2 方法与结果

2.1 IVPT 分析方法的建立

2.1.1 色谱条件^[16-17] 采用 Thermo BDS Hypersil-C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱,以 0.1% 磷酸溶液 - 乙腈 (60 : 40) 为流动相,流速 1.5 mL · min⁻¹,柱温 30 °C,检测波长 254 nm,进样量 10 μL。

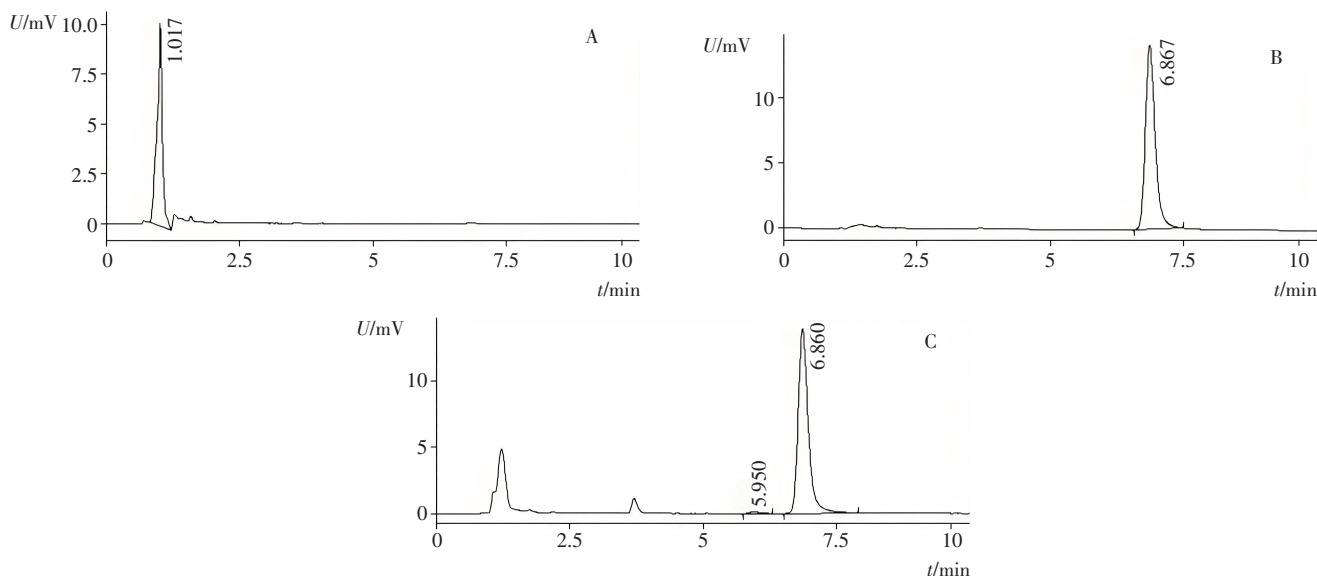
2.1.2 试验参数 装置为垂直式的 Franz 扩散池,以 1% 吐温 80 溶液为接收液,接收液温度 32 °C ± 1.0 °C,转速 300 r · min⁻¹,取样体积 8 mL,透皮扩散面积 2.2 cm²,上药量 0.3 g,皮肤为巴马香猪皮肤。

2.1.3 对照品溶液的制备 称取克立硼罗对照品约 10 mg,精密称定,置 200 mL 量瓶中,加乙腈 - 水 (90 : 10) 溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中,加 1% 吐温 80 溶液稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.4 供试品溶液的制备 将直径约 25 mm 的巴马香猪皮肤夹在 Franz 扩散池的上下两室之间,角质层朝上,称取克立硼罗软膏约 300 mg,均匀涂于皮肤表面,试验参数同“2.1.2”项,分别于 2、4、6、8、10、12、24 h 取接收液 8 mL,采用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液。

2.1.5 阴性样品溶液的制备 按照处方比例配制不含克立硼罗的空白样品,称取约 0.3 g,按照“2.1.4”项下方法制备阴性样品溶液。

2.1.6 专属性试验 取对照品溶液、供试品溶液、阴性样品溶液各 10 μL,按“2.1.1”项下方法进样测定。结果表明,供试品色谱图中克立硼罗峰形良好,与相邻峰的分度均 > 1.5。阴性样品色谱图中在克立硼罗位置未出峰,不干扰测定,说明方法的专属性较好,见图 1。



A. 阴性样品 (negative sample) B. 对照品 (reference substance) C. 样品 (sample)

图 1 专属性试验色谱图

Fig. 1 Specificity test chromatograms

2.2 IVPT 测定方法的选择

2.2.1 接收液 IVPT 研究中所用接收介质的组成和 pH 应根据其与皮肤的兼容性以及药物在接受介质中的稳定性和溶解度进行确认,EMA、PMDA 要求应采用水或水性缓冲液作为接受介质^[6-8],因为克立硼罗水溶性差,故考虑添加温和的表面活性剂,所以筛选 0.9% 氯化钠溶液、pH 7.4 磷酸盐缓冲液、1% 吐温 80 溶液、10% 丙二醇溶液,考察各接受液的饱和溶解度,结果见表 1。

2.2.2 搅拌速度 考察 IVPT 方法改变转速,分别为 200、300、400 r · min⁻¹,其他试验参数同“2.1.2”项,采用“2.1.3”“2.1.4”项下方法制备的对照品溶液、供试品溶液,采用“2.1.1”项下条件测定峰面积,分别计算自制品和参比制剂的 J_{\max} ,分别将自制品和参比制剂的 J_{\max} 均值进行比较,比值均在 0.7~1.3 范围内;同时将 J_{\max} 进行置信区间计算,考察 90% 置信区间为 87.9%~118.7%,说明方法耐用性较好,结果见表 2 和图 2。

表 1 饱和溶解度

Tab. 1 Saturation solubility

接收液 (accept liquid)	饱和浓度 (saturated concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	漏槽浓度 (leakage concentration)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	是否符合漏槽条件 (leakage condition)
0.9% 氯化钠溶液 (0.9% sodium chloride solution)	10.16	22.50	否 (no)
pH7.4 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4 phosphate buffer solution)	51.65	22.50	否 (no)
10% 丙二醇溶液 (10% propylene glycol solution)	33.45	22.50	否 (no)
1% 吐温 80 溶液 (1% Tween 80 solution)	257.07	22.50	是 (yes)

表 2 不同转速、温度条件下的体外透皮结果

Tab. 2 Extracorporeal transdermal results under different speeds and temperature conditions

条件 (condition)	批号 (batch number)	$J_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$						平均值 (average)	比值 (ratio)	90% 置信区间 (90% confidence interval)
		1	2	3	4	5	6			
200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	FD5696	0.98	0.96	1.12	1.01	1.10	1.05	1.04	0.95	90.1%~100.7%
	220801	0.99	0.96	0.96	0.96	0.95	1.10	0.99		
300 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	FD5696	1.13	0.92	0.89	0.98	0.94	1.05	0.99	0.94	87.9%~102.0%
	220801	0.90	0.98	0.91	0.87	0.97	0.94	0.93		
400 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$	FD5696	0.85	0.87	1.06	1.16	1.02	1.17	1.02	1.06	96.7%~118.7%
	220801	1.16	0.98	1.15	1.09	0.93	1.21	1.09		
31 $^{\circ}\text{C}$	FD5696	0.99	1.05	1.19	1.09	1.27	1.06	1.11	0.96	88.4%~104.8%
	220801	1.10	1.04	1.02	1.05	1.01	1.14	1.06		
32 $^{\circ}\text{C}$	FD5696	1.13	0.92	0.89	0.98	0.94	1.05	0.99	0.94	87.9%~102.0%
	220801	0.90	0.98	0.91	0.87	0.97	0.94	0.93		
33 $^{\circ}\text{C}$	FD5696	1.20	1.17	1.16	1.25	1.38	1.07	1.21	0.97	87.6%~107.8%
	220801	1.13	1.16	1.38	1.15	1.03	1.15	1.17		

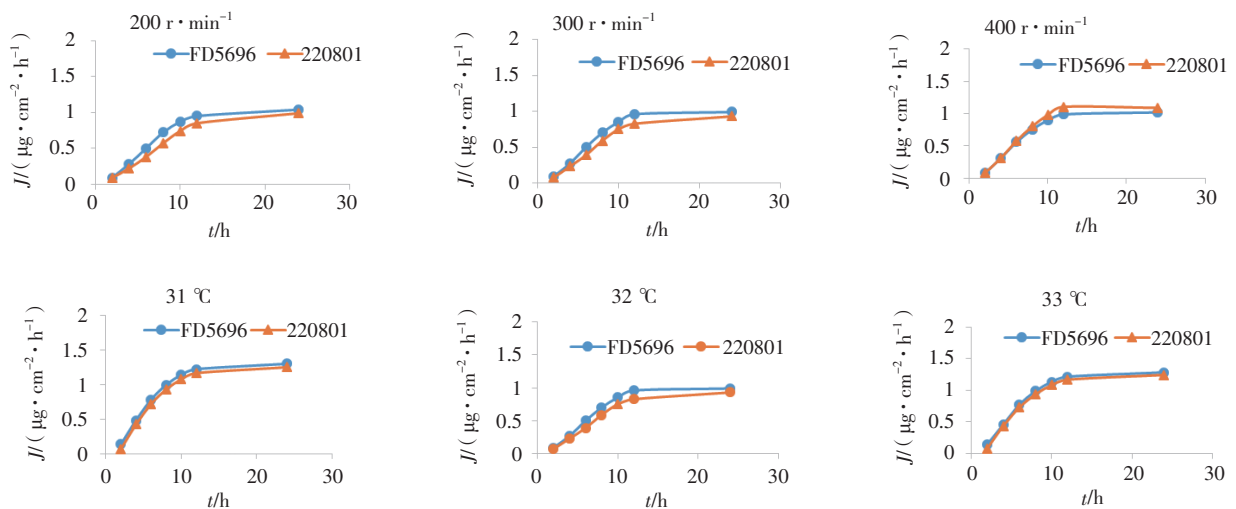


图 2 不同转速、温度条件下自制品和参比制剂渗透率曲线

Fig. 2 Permeability curves of self-made products and reference preparations at different speeds and temperatures

2.2.3 接收液温度 美国 FDA 和 EMA 均要求在整个研究过程中,每个皮肤切片表面的温度应保持在 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ [5-6,9-10]。故考察体外透皮方法接收液温度,分别为 31、32、33 $^{\circ}\text{C}$,其他试验参数同“2.1.2”项,采用“2.1.3”“2.1.4”项下方法制备的对照品溶液、供试品溶液,采用“2.1.1”项下条件测定峰面积,分别计算自制品和参比制剂的 J_{\max} ,分别将自制品和参比制剂的 J_{\max} 均值进行比较,比值均在 0.7~1.3 范围内;同时将 J_{\max} 进行置信区间计算,考察 90% 置信区间为 87.6%~107.8%,说明方法耐用性较好,结果见表 2 和图 2。

2.2.4 皮肤 EMA 在 2018 年发布的《Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products》[6] 中仅推荐使用离体人类皮肤。PMDA 规定可以使用离体大鼠、小鼠或猪的皮肤进行试验 [7]。USP <1724> 中规定,除采用离体人类皮肤外,因猪的皮肤与人类皮肤具有相对相似的形态,可作为研究的次要选择。

猪由于在解剖学、生理学和代谢等方面与人类相似,被广泛应用于生物医学领域。大量文献表明 [18-19],猪皮肤的组成、渗透性及体内代谢与人体较为相似。因此,在外用制剂研究过程中,推荐采用猪的皮肤进行 IVPT 研究,常用的品种有巴马香猪、Landrace 猪、Gottingen 小型猪及 Yorkshire 猪等。

美国 FDA、EMA 与 PMDA 均要求在试验前需进行皮肤屏障完整性测试 [5-7]。可接受的屏障完整性测试方法包括经皮水分散失法 (TEWL)、电阻 / 电导值法。TEWL 通常是首选方法,不同于其他方法,TEWL 是在不受外部空气影响的条件下,测定水分通过皮肤屏障的量,相对快速和方便 [20-21]。

实验采用北京德默高科医药技术有限公司和北京和邦兴业科学仪器有限公司采购的皮肤,对同一批样品进行测定,对 J_{\max} 进行置信区间计算,考察 90% 置信区间均在 87.9%~102.0%,说明皮肤的适用性良好,皮肤各项检测指标见表 3,渗透率结果见表 4。

表 3 皮肤检测结果

Tab. 3 Skin test results

检验项目 (inspection item)	标准规定 (standard regulation)	来源 1 (source 1)	来源 2 (source 2)
月龄 (month-old)	1~3 月 (month)	1 月 (month)	1 月 (month)
性别 (gender)	♂、♀	♂	♀
部位 (position)	背部、腹部 (back and abdomen)	背部 (back)	腹部 (abdomen)
厚度 (thickness)/mm	0.3~1	0.3	0.8
电阻 (resistance)/MΩ	1.4~9.6	4.2	3.7
TEWL/($\text{cg} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$)	< 15	6.1	7.5

表 4 不同来源皮肤测定样品渗透率结果

Tab. 4 Measurement of sample permeability results of skin from different sources

来源 (source)	批号 (batch number)	$J_{\max}/(\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1})$						平均值 (average)	比值 (ratio)	90% 置信区间 (90% confidence interval)
		1	2	3	4	5	6			
来源 1 (source 1)	FD5696	1.13	0.92	0.89	0.98	0.94	1.05	0.99	0.94	87.9%~102.0%
	220801	0.90	0.98	0.91	0.87	0.97	0.94	0.93		
来源 2 (source 2)	FD5696	1.56	1.24	1.03	0.95	1.16	1.34	1.21	0.91	88.8%~93.9%
	220801	1.40	1.21	0.89	0.85	1.08	1.23	1.11		

2.3 方法学考察

2.3.1 选择性 按照处方工艺,配制不同浓度的软膏样品,分别含主药为 1%、2%、3%,考察不同浓度的受试制剂与参比制剂的渗透率,其他试验参数同“2.1.2”项,采用“2.1.3”“2.1.4”项下方法制备的对

照品溶液、供试品溶液,采用“2.1.1”项下条件测定峰面积,分别计算不同处方量样品 J_{\max} 的均值并进行比较,结果表明,不同处方量样品,渗透曲线不相似,说明方法具有选择性,灵敏度较高,数据见表 5 及图 3。

表 5 不同处方量样品考察选择性结果

Tab. 5 Selective results of different prescription samples

时间 (time)/h	$J_{max}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$			比值(ratio)	
	2%	1%	3%	1%/2%	3%/2%
	(lot No. 221102)	(lot No. 221101)	(lot No. 221103)		
2	0.095	0.041	0.182	0.43	1.9
4	0.294	0.126	0.529	0.43	1.8
6	0.526	0.293	0.901	0.56	1.7
8	0.754	0.353	1.278	0.47	1.7
10	0.914	0.395	1.51	0.43	1.7
12	0.976	0.424	1.626	0.43	1.7
16	1.089	0.48	1.809	0.44	1.7
20	1.175	0.515	1.954	0.44	1.7
22	1.18	0.511	2.008	0.43	1.7
24	1.178	0.514	2.012	0.44	1.7

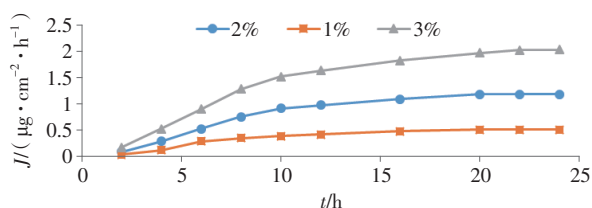


图 3 不同处方比例样品的渗透曲线
Fig. 3 Permeability curve of samples with different prescription proportions

表 6 重复性、中间精密度试验结果

Tab. 6 Repeatability and intermediate precision test results

试验(test)	批号 (batch number)	$J_{max}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$							比值(ratio)	90% 置信区 (90% confidence interval)
		1	2	3	4	5	6	平均值(average)		
重复性 (repeatability)	FD5696	1.13	0.92	0.89	0.98	0.94	1.05	0.99	0.94	87.9%~102.0%
	220801	0.90	0.98	0.91	0.87	0.97	0.94	0.93		
中间精密度 (intermediate precision)	FD5696	1.05	1.10	1.15	1.03	0.98	1.08	1.07	1.02	92.7%~104.6%
	220801	0.97	0.91	1.09	1.20	1.15	1.19	1.08		

2.3.4 质量守恒 将重复性项下试验后皮上剩余样品收集置 50 mL 离心管中,用棉签擦净皮肤表面,加入乙腈-水(90:10)20 mL,盖紧离心管,于 70 °C 水浴 20 min,取出离心管,趁溶液温热时立即涡旋至溶液混合均匀,放置至室温后,以 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,滤过,弃去初滤液,精密量取续滤液 3 mL 置 10 mL 量瓶中,加接收液稀释至刻度并混匀,得皮上剩余量样品溶液。将重复性项下试验后皮肤尽量剪碎,置于离心管中,加乙腈-水(90:10)25 mL,超声(频率 40 kHz、功率 600 W)20 min,过滤,取续滤液,得皮内滞留量样品溶液。依照“2.1.1”项色谱条件,分别精密量取上

2.3.2 线性和范围 采用“2.1.3”项下方法制备每 1 mL 约含克立硼罗 20 μg 的对照品储备液,分别精密量取该储备液 1、3、5、7 mL 置 20 mL 量瓶中,加接收液稀释至刻度,摇匀,作为线性 1 号~4 号溶液;精密量取该储备液 7 mL 置 10 mL 量瓶中,加接收液稀释至刻度,摇匀,作为 5 号溶液;量取对照品该储备液作为线性 6 号溶液。采用“2.1.1”项下条件测定峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制线性关系图。克立硼罗质量浓度在 0.026~21.02 μg·mL⁻¹ 范围内,线性方程为

$$Y=33\ 543.70X-661.99 \quad r=1.000$$

结果显示线性关系良好。

2.3.3 重复性及中间精密度 依照“2.1.2”项下试验参数进行试验,按“2.1.3”“2.1.4”项下方法制备对照品溶液、供试品溶液,按“2.1.1”项条件测定峰面积,采用不同仪器、不同人员、不同样品放置位置,分别计算自制品和参比制剂的 J_{max} ,分别将自制品和参比制剂的 J_{max} 均值进行比较,比值均在 0.94~1.02 范围内;同时将 J_{max} 进行置信区间计算,考察 90% 置信区间为 92.7%~104.6%,说明方法重复性良好,结果见表 6。

述各溶液 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。样品的质量守恒=(皮上剩余量+皮内滞留量+接收液总量)/上药量×100%,数据显示,各样品皮内滞留量较少,质量守恒百分比在 94.1%~101.1% 范围内,说明方法准确度较高,结果见表 7。

2.3.5 溶液稳定性 采用“2.1.3”项下方法制备的对照品溶液,分别取自制品软膏(批号 220801)、参比制剂软膏(批号 FD5696)各约 300 mg,置 50 mL 离心管中,加接收液 25 mL,加入表面积约 2.5 cm² 的猪皮,32 °C 水浴加热 30 min,超声(频率 40 kHz、功率 600 W)20 min,过滤,取续滤液 1 mL 置 50 mL 量瓶

表 7 质量守恒试验结果

Tab. 7 Quality conservation test results

序号 (serial number)	皮内滞留量 (intradermal retention)		皮上残留量 (residual amount on the skin)		透过量 (permeance) / μg	总量 (total) / μg	回收率 (recovery rate) / %	平均值 (average value) / %	RSD / %
	峰面积 (peak area)	滞留量 (retention amount) / μg	峰面积 (peak area)	残留量 (residual amount) / μg					
1	42 239	32.55	3 284 873	6 750.09	72.66	6 855.30	97.6	97.5	2.5
2	52 499	40.46	3 301 578	6 784.42	57.19	6 882.06	100.9		
3	33 574	25.87	3 054 789	6 277.29	57.84	6 361.00	95.3		
4	60 241	46.42	3 125 472	6 422.54	63.16	6 532.12	95.9		
5	70 584	54.39	3 456 914	7 103.62	59.87	7 217.88	95.2		
6	88 054	67.85	3 405 919	6 998.83	66.52	7 133.20	100.0		
7	65 289	50.31	3 095 478	6 360.90	52.84	6 464.05	99.3	98.5	2.4
8	90 474	69.72	3 386 471	6 958.86	57.97	7 086.55	98.7		
9	80 413	61.97	3 295 486	6 771.90	52.24	6 886.10	99.5		
10	65 498	50.47	3 245 821	6 669.84	51.50	6 771.82	94.1		
11	70 694	54.48	3 425 813	7 039.71	57.51	7 151.69	98.1		
12	99 043	76.32	3 265 741	6 710.78	77.15	6 864.25	101.1		

中,加接收液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。依照“2.1.1”项下条件,分别精密量取各溶液 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。分别考察各溶液室温及 32 °C 条件下的溶液稳定性,各供试品溶液 26 h 内,测定峰面积的 RSD 均在 0.44%~1.1%,说明溶液稳定性良好。结果见表 8。

表 8 溶液稳定性试验结果

Tab. 8 Solution stability test results

时间 (time) / h	峰面积 (peak area)				
	对照品 (reference substance)	样品 (sample)			
		lot No. 220801	lot No. FD5696	lot No. 220801	lot No. FD5696
	室温 (room temperature)	室温 (room temperature)		32 °C	
0	154 623	25 489	27 245	25 961	27 645
2	154 247	25 159	26 885	25 915	27 549
4	153 958	25 089	26 714	25 841	27 469
6	154 267	25 097	26 659	25 803	27 402
8	153 647	24 968	26 619	25 719	27 346
10	153 248	24 902	26 505	25 679	27 275
12	153 621	24 896	26 487	25 605	27 105
14	152 964	24 865	26 471	25 511	27 096
24	152 789	24 805	26 315	25 491	27 005
26	152 654	24 795	26 249	25 346	26 954
平均值 (average)	153 602	25 007	26 615	25 687	27 285
RSD / %	0.44	0.84	1.1	0.78	0.87

2.4 样品检测

分别取 3 批样品各 6 份,依照“2.1.2”项下试验参数进行试验,按“2.1.3”“2.1.4”项下方法制备对照品溶液、供试品溶液,按“2.1.1”项条件测定峰面积,分别计算自制品和参比制剂的 J_{max} ,分别将自制品和参比制剂的 J_{max} 均值进行比较,比值均在 0.92~0.97 范围内;同时分别对 J_{max} 进行置信区间计算,考察 90% 置信区间为 84.8%~100.7%,均在 EMA 要求的 80%~125% 范围内,结果见表 9。

3 讨论

IVPT 选择的接收液应不能影响皮肤屏障功能,不能添加有机溶剂,本品水溶性较差,经筛选,选用对皮肤影响较小的表面活性剂吐温 80,结果表明,方法专属性较好。

IVPT 结果受多种因素影响,本研究针对测定方法中的转速、接收液温度、仪器差异进行耐用性考察,结果表明,方法耐用较好;试验过程需要严格控制皮肤的质量,包括来源、处理方式和保存;减少了外界因素导致的数据差异,试验采用多个供体进行平行试验,采用统计学方法对体外透皮的一致性进行评估,结果显示,自制品与参比制剂渗透率基本一致,符合 EMA 要求^[6],可视为等效,本方法可作为克立硼罗软膏质量评价手段。

本研究开发的分析测定方法为高效液相色谱法,专属性强,方法学验证结果表明本法的精密度良好,重现性较好,准确度较高。

表 9 3 批样品体外渗透率测定结果

 Tab. 9 Measurement results of *in vitro* permeability of three batches of samples

批号 (lot No.)	$J_{max}/(\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1})$						平均值 (average)	比值 (ratio)	90% 置信区 (90% confidence interval)
	1	2	3	4	5	6			
FD5696	1.40	0.95	1.13	1.13	1.37	1.05	1.17	0.97	92.7%~100.7%
230101	1.39	0.93	1.16	1.15	1.22	0.94	1.13		
FD5696	1.30	1.02	1.24	1.28	1.44	1.15	1.24	0.92	84.8%~94.3%
230102	1.33	0.93	1.16	1.11	1.45	0.86	1.14		
FD5696	1.29	1.15	1.42	1.16	1.37	1.12	1.25	0.92	85.8%~95.0%
230103	1.17	1.29	1.29	0.98	1.23	0.98	1.15		

参考文献

- [1] 克立硼罗软膏说明书 [Z]. 2021
Instruction Manual for Crisaborole Ointment [Z]. 2021
- [2] EICHENFIELD LF, STEIN GL. Addressing the immunopathogenesis of atopic dermatitis; advances in topical and systemic treatment [J]. *Semin Cutan Med Surg*, 2017, 36 (2 Suppl 2): S45
- [3] PALLER AS, TOM WL, LEBWOHL MG, *et al.* Efficacy and safety of crisaborole ointment, a novel, nonsteroidal phosphodiesterase 4 (PDE 4) inhibitor for the topical treatment of atopic dermatitis (AD) in children and adults [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2016, 75(3): 494
- [4] USP-NF 2023. General Chapters 3: Topical and Transdermal Drug Products—product Quality Tests [S]. 2023
- [5] FDA. Draft Guidance on Acyclovir [S]. 2016
- [6] EMA. CHMP: Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products [S]. 2018
- [7] PMDA. Guideline on Biological Equivalence for Formulation Changes of Topical Products (Semisolid Products and Patches) [S]. 2010
- [8] PMDA. Guideline on Biological Equivalence for Formulation Changes of Topical Products (Semisolid Products and Patches): Questions and Answers [S]. 2010
- [9] FDA. Product-Specific Guidances for Generic Drug Development. Graft Guidance on Acyclovir [S]. 2016
- [10] FDA. Physicochemical and Structural (Q3) Characterization of Topical Drug Products Submitted in ANDAs [S]. 2022
- [11] 国家药品监督管理局药品审评中心. 皮肤化学品外用仿制药研究指导原则 [S]. 2021
Center for Drug Evaluation. Guiding Principles of Research on Generic Drugs for External use of Skin Chemical (Trial) [S]. 2021
- [12] 梁逸, 赵雅兰, 马雪儿, 等. 克立硼罗软膏体外释放特性研究 [J]. *海峡药学*, 2022, 34 (12): 64
LIANG Y, ZHAO YL, MA XE, *et al.* Study on release of crisaborole ointment *in vitro* [J]. *Strait Pharm J*, 2022, 34(12): 64
- [13] 潘宪伟, 苏梅, 刘新, 等. 外用药物制剂体外透皮试验技术要求概况 [J/OL]. *沈阳药科大学学报*, 2023 [2024-12-05]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2023.0401>
PAN XW, SU M, LIU X, *et al.* Overview of technical requirements for *in vitro* transdermal testing of topical drug preparations [J/OL]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2023 [2024-12-05]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2023.0401>
- [14] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 11, 480
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 11, 480
- [15] 江敏瑜, 闫丹, 陈娇, 等. 三七跌打软膏的制备及体外透皮特性研究 [J]. *中草药*, 2017, 48 (22): 4639
JIANG MY, YAN D, CHEN J, *et al.* Optimization for prescription of Sanqi traumatic ointment by Box-Behnken test design and research on its transdermal permeability *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(22): 4639
- [16] 高洋. 克立硼罗合成工艺及质量标准研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019
GAO Y. Research on the Synthesis Process and Quality Standards of Crisaborole [D]. Changchun: Jilin University, 2019
- [17] JX20200084 Registration Standards for crisaborole ointment [S]. 2002: 2
- [18] 世界中医药学会联合会经皮给药专业委员会. 经皮给药制剂体外经皮渗透试验技术规范专家共识探讨 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 38 (8): 1128
The Transdermal Drug Administration Committee of the World Federation of Chinese Medicine Societies. Discussion of professional consensus on the technical practice of the *in vitro* permeation test for topical and transdermal preparations [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 38(8): 1128
- [19] PRAÇA FSG, MEDINA WSG, ELOY JO, *et al.* Evaluation of critical parameters for *in vitro* skin permeation and penetration studies using animal skin models [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 111: 121
- [20] NICOLI S, PADULA C, AVERSA V, *et al.* Characterization of rabbit ear skin as a skin model for *in vitro* transdermal permeation experiments: histology, lipid composition and permeability [J]. *Skin Pharmacol Physiol*, 2008, 21(4): 218
- [21] MORIN M, RUNNSJ A, RUZGAS T, *et al.* Effects of storage conditions on permeability and electrical impedance properties of the skin barrier [J]. *Int J Pharm*, 2023, 637: 122891

(本文于 2024 年 12 月 5 日修改回)