

经皮给药制剂体外经皮渗透试验技术规范专家共识探讨

世界中医药学会联合会经皮给药专业委员会

摘要: 体外经皮渗透试验是评价经皮给药制剂的重要试验之一, 试验结果对制剂的处方筛选、仿制药和参比制剂的一致性评价具有重要参考价值。该试验操作复杂, 影响因素多, 操作不当, 可能会导致不同试验的结果无法比较, 影响此类制剂的质量、有效性及安全性的评价。为此, 亟需规范经皮给药制剂体外经皮渗透试验的操作。基于国际要求和国内实际, 世界中医药学会联合会经皮给药专业委员会组织专家对形成经皮给药制剂体外经皮渗透试验技术规范进行多次研讨, 形成初步共识, 供业界同行及监管部门参考。

关键词: 体外经皮渗透试验; 经皮给药制剂; 处方筛选; 一致性评价; 专家共识

中图分类号: R943

文献标志码: C

文章编号: 1007-7693(2022)08-1128-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.08.019

引用本文: 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, 39(8): 1128-1132.

Discussion of Professional Consensus on the Technical Practice of the *in Vitro* Permeation Test for Topical and Transdermal Preparations

The Transdermal Drug Administration Committee of the World Federation of Chinese Medicine Societies

ABSTRACT: *In vitro* permeation test (IVPT) is one of the important tests for evaluating topical and transdermal preparations. The test results are critical to the prescription screening and consistency evaluation of generic drugs and reference products. The operations of IVPT are complicated and there are many influencing factors, which make unreliable results as well as affect the evaluation of quality, effectiveness and safety for topical and transdermal preparations. Therefore, it is necessary to standardize the IVPT method. Based on the international and domestic progress of this field, the Transdermal Drug Administration Committee of the World Federation of Chinese Medicine Societies organized the experts to discuss and finally formed this consensus for the reference of industry colleagues and supervision departments.

KEYWORDS: *in vitro* permeation test; topical and transdermal preparations; prescription screening; consistency evaluation; professional consensus

1 体外经皮渗透试验(*in vitro* permeation test, IVPT)的应用范围和基本原理

IVPT 模拟经皮给药制剂(包括皮肤局部外用制剂和透皮吸收制剂)在生理条件下的经皮渗透过程, 为评价制剂的安全性和有效性提供参考和保证^[1-3]。IVPT 主要是采用人或动物的离体皮肤及合适的分析方法, 动态监测给药后特定时间内透过皮肤的药量和渗透速率, 从而考察药物及其制剂的体外经皮渗透行为。

IVPT 主要基于被动扩散原理, 遵循菲克扩散定律。体外经皮释放试验一般使用 Higuchi 方程绘制累积药物释放量与时间平方根的函数来确定, 但是对于遵循菲克定律的 IVPT, 则是直接将累积释放量作为时间的函数绘制。

2 研究设计

为了将偏倚的风险降至最低, 研究方案应根据国际人用药品注册技术协调会(International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) E8 指定的盲法和随机化方法。在研究设计时重点考虑以下具体因素:

2.1 离体皮肤的准备

2.1.1 皮肤的选择 美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)推荐使用离体人类皮肤进行试验^[4-6]。欧洲药品管理局(European Medicines Agency, EMA)在 2014 年颁布的《Guideline on Quality of Transdermal Patches》中明确规定评价透皮贴剂应使用成人躯干(胸部、

腹部或背部)或临床应用部位的皮肤,但也指出在无法获得人类皮肤的情况下可用猪、豚鼠或其他啮齿类动物的皮肤代替。特别需要指出的是,EMA在2018年颁布的《Draft Guideline on Quality and Equivalence of Topical Products》中对于发挥局部作用的皮肤科制剂,仅推荐使用离体人类皮肤^[7-8]。日本医药食品局(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, PMDA)则规定可以使用离体大鼠、小鼠或猪的皮肤进行试验^[9-10]。中国国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)则规定可以采用人体、动物皮肤,大多采用大鼠、小鼠或猪的皮肤。

研究方案应明确皮肤来源、皮肤区域的纳入或排除标准、切片或解剖的区域等。

猪皮一般选择1~3月龄的小型猪(如巴马小型猪)的腹部或背部皮肤,研究方案应包含猪的种族、年龄、皮肤厚度和解剖的区域等。

大鼠皮肤一般选择SD大鼠[♂, 体质量(200±20)g]的腹部皮肤,研究方案应包含大鼠的种族、年龄、体质量、皮肤的部位和皮肤的厚度等。

2.1.2 离体皮肤的处理和保存^[11-12] 离体皮肤的切割和储存以不改变皮肤屏障功能为前提,并需要在实验前进行检测确认。

2.1.2.1 离体人体皮肤的处理和保存 建议使用成人离体皮肤,可以是从小手术(如腹部整形和乳房缩小)、皮肤活检或捐献者(至少18岁男性和/或女性)身体中获得的健康、正常皮肤,必须排除纹身、皮肤病异常迹象或表现出明显浓密的末端毛发的皮肤。研究方案中除了必须明确选择皮肤切片的纳入或排除标准、皮肤的解剖区域外,保存条件和持续时间,以及取出后的冻融循环次数也应明确。

①人体皮肤准备:可以使用不同的皮肤准备技术,且应提供证据以证明皮肤准备技术和储存不会引入人工制品,也不会改变皮肤屏障功能。

②离体皮肤厚度:应标明所使用皮肤的厚度和分离技术。为了便于在扩散设备中安装此类皮肤样本,并减少变异性,通常将皮肤的厚度保持在250~500 μm。使用全层皮肤(通常是指去除所有结缔组织和皮下脂肪后的包括全部真皮层和表皮层的皮肤)可能会人为地延迟药物的渗透,除非另有理由,否则应避免使用。

③离体皮肤检查:实验前,需要检查并排除

异常皮肤,包括纹身、皮肤上有明显浓密的末端毛发,同时有任何疾病或有异常迹象如脱屑等的皮肤也不能使用。此外,皮肤在冷冻保存之前和解冻后以及实验后都要检查皮肤的完整性,并标明采用何种技术测试皮肤完整性及其验收标准。实验前后可能会提出不同的验收标准,这些验收标准在所有平行实验中都应该合理且一致。

④供体数量:试验时,应该选择来源于不同捐献者(供体)的皮肤。试验、对照和阴性对照制剂应该使用同一供体的皮肤,最好是每次重复使用相邻部位的皮肤。EMA要求使用人体皮肤的供体数量≥12个。

2.1.2.2 离体猪皮的处理和保存 猪执行安乐死后,用适当的脱毛设备如动物剃毛器,小心剃去猪毛,脱毛过程还需要注意,不得划伤或损伤皮肤角质层,也不能用烫水和化学试剂等可能损伤皮肤屏障的脱毛方法。使用手术刀将腹部、侧面及背部皮肤整块环切下来,也可以采用电动取皮机设置一定的厚度进行取皮。取皮后使用纯水或生理盐水冲洗皮肤外表面,并用镊子和刀片等小心刮去残留的皮下脂肪、毛细血管和其他组织,然后用纯水或生理盐水反复冲洗干净,低温保存(建议储存于-20℃或-80℃冰箱中),尽快使用。实验前取出解冻,使用前用生理盐水清洗。

2.1.2.3 离体鼠皮的处理和保存 选取SD大鼠,麻醉后安乐死,用适当的脱毛方式小心剃去鼠毛。后续处理同上述离体猪皮的处理和保存方法。

2.1.3 皮肤的完整性检查 离体皮肤各层是否完整,特别是角质屏障的完整性是获得可靠的IVPT实验数据的关键。因此试验前后均应进行皮肤完整性检查,常用的离体皮肤完整性测试方法主要有电阻/电导值、经皮水分散失值,也有研究表明可以采用氙水渗透值来表征皮肤完整性。不管采用哪种方法检查,均应证明所采用方法的试验参数和接受标准是合理的。

2.1.4 皮肤供体数和重复数 根据实际需要确认供体数和重复数。皮肤供体数是指人类皮肤捐献者或受试者的数量;重复数是指每个测试产品、比较产品和对照产品的最小实验次数。目前各国药监部门对皮肤供体数量要求不统一:EMA规定皮肤供体的数量≥12个,每个供体至少重复2次;而FDA没有规定供体数,认为研究者可以自己根据实际决定所需的皮肤捐赠人数,但要求来源于

每个供体的皮肤在每组试验中的重复次数 ≥ 4 次。实际操作中,如果重复6次,供体数最好12个;PDMA不要求供体数和重复数,但要求每个制剂试验次数 ≥ 6 次。一般认为可以根据预实验的结果确定,但一定要达到统计学要求。

2.2 温度和搅拌速度

仪器应确保在整个实验过程中温度控制一致,皮肤表面温度稳定在 $(32\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 。不同的仪器搅拌速度并不相同,控制搅拌或搅动的速度,使速度能维持界面漏槽条件。

2.3 接收介质的选择

接收介质选择的依据是药物在接收介质中的溶解度和稳定性。

①接收介质对药物的溶解度应符合漏槽条件,即接收介质的体积为药物饱和溶液所需介质体积的3~10倍。

②一般选择生理盐水和pH 6.8~7.4的磷酸盐缓冲液为接收介质。在特殊情况下,可在介质中加入适量表面活性剂或有机溶剂以满足漏槽条件;取样时间较长的情况下,也可加入抗菌剂减缓皮肤膜的腐败。但加入的溶剂或抗菌剂都应保证在试验过程中不损害皮肤的渗透性和完整性,以及不干扰皮肤的特性和药物的检测为前提。

③接收介质在使用前需脱气。

④应确认接收液中药物在IVPT研究期间的稳定性以及分析前样品的储存稳定性。

2.4 取样时间点

在IVPT方法开发阶段,试验时长与取样时间点可根据目标化合物的性质及制剂处方的特性进行设置。采样时间点的数量应能涵盖整个吸收变化的过程,即能捕获最大吸收速率和随后的吸收速率下降这一变化过程,在这期间可以进行较为频繁的采样。FDA推荐至少设置8个取样点(不包括零点);而EMA推荐5个取样点(不包括零点)。根据皮肤细胞的活性,一般建议IVPT时长 ≤ 24 h。对于临床使用时间比较长的制剂,可以参考实际临床使用时间而定。如果研究持续时间 > 24 h,应保证在试验期间可以维持皮肤屏障功能和完整性。

2.5 给药剂量和给药方式

离体皮肤上给予的药物剂量包括有限剂量和无限剂量2种。上样量的不同可以影响透皮达到稳态后的累积透过量。新药研发中一般采用有限剂量,以模拟患者使用的典型剂量,如对于局部

给药制剂,FDA在阿昔洛韦软膏的指南中推荐的上样量为 $5\sim 15\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 软膏(特别注意,这里不是指主药的量,而是指软膏的量);EMA则规定可以根据产品特性说明(summary of product characteristic, SmPc),建议上样量为 $2\sim 15\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}$ 软膏^[5]。

上样时根据制剂产品的特性可以选择按重量和按体积2种方式进行。黏度高、流动性差的制剂产品可按重量方式定量上样;黏度低、流动性好的制剂产品可按体积方式定量上样^[13]。不管何种方式上样,均需保证产品均匀涂布在皮肤上,上样量的偏差控制在 $\pm 5\%$ 。上样后,依照药物情况和临床使用实际情况,Franz给药室的药物可以选择开放式或封闭式2种方法进行试验。一般情况选择开放系统(即给药室不覆盖任何材料);当药物具有挥发性或临床应用时制剂覆盖了保护层的,为保证试验的准确性和更贴近临床实际效果,可采用封闭系统进行试验。

2.6 给药分组程序

在研究方案和最终报告中应详细说明所采用的盲法程序和随机化方法的方案。试验品、对照品和阴性对照品的包装在外观上应该相似,以保持试验结果取样足够的盲目性。随机化方法应在方案中说明,并提供随机化时间表。

3 方法验证

3.1 环境控制

工作环境建议控制温度为 $(21\pm 2)^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 $(50\pm 20)\%$ 。研究期间需监测和报告实验室环境温度和湿度。

3.2 设备验证

IVPT的装置有垂直扩散池和流通式扩散池。垂直扩散池测定简便、重现好,是目前主流的方法;流通式扩散池使用合适的泵不断替换接收液,更好地模拟人体环境,适合溶解度很低的药物,还可以在线分析。2种装置均需要对设备的关键参数(扩散池的扩散面积和接收池容积、仪器的温控、取样精度和搅拌速度)进行校验和验证。

3.3 皮肤完整性验证

推荐使用电阻法、经皮水分散失法、氖水渗透等手段评估皮肤屏障的完整性^[14]。结合皮肤的种属、厚度和测量稳态时间加以验证。

3.4 接收液

验证药物在接收介质中的溶解度和稳定性。实验过程中接收介质中的药物浓度不得超过溶解

度的 30%。

3.5 取液和补液

各时间点收集的接收液的准确度和精确度应符合分析方法要求。对于使用垂直扩散池进行的 IVPT, 建议在每个时间点移除并替换整个接收池内液体体积, 以提供最佳的溶解度漏槽条件。对于使用流通式扩散池的 IVPT, 则需要通过预实验确定。

3.6 接收液分析方法验证

采用何种分析方法测定接收介质中的药物含量, 主要取决于经皮渗透率和接收相中药物的浓度。如果药物浓度足够高, 可以使用 HPLC; 如果药物渗透性差, 无法达到 HPLC 的检测限, 则可以采用更灵敏的方法, 如质谱(LC-MS/MS)或放射性标记等。不管采用哪种方法, 其分析方法都应足够灵敏, 以定量不同时间点接收介质中的药物含量, 并需要对方法进行适当的验证。

3.7 区分性

采用合适的方法对 IVPT 的区分性进行评估, 区分性应包括灵敏度和选择性。FDA 推荐用 3 种制剂(高、中、低 3 种不同规格制剂, 或同一制剂 3 种不同上样量, 或同一制剂 3 种不同用药时长)评估方法的灵敏度, 由于皮肤的作用, 3 种不同制剂的 IVPT 结果不一定成比例显示差别, 但是呈现趋势需要与制剂保持一致; 用参比制剂和已知不同于参比制剂或设计为不同于参比制剂的第 3 种制剂来评估方法的选择性^[5]。EMA 推荐用低规格制剂(规格为试验制剂 50%的配方)和参比制剂来评估方法的灵敏度; 用参比制剂和已知不同于参比制剂或设计不同于参比制剂的第 3 种制剂来评估方法的选择性^[8]。PMDA 则没有相关规定。

对于有限上药量, 浓度梯度至少在 50%; 对于无限上药量, 特别是药物透皮吸收非常迅速的制剂, 建议将梯度加大一些(比如 3 倍量差异)。由于角质层是皮肤给药中的主要限速步骤, 如果药物透过角质层的速度过快, 药物释放速率的差异减少, 体外透皮试验对不同处方和制剂的区分性可能就不够明显。

3.8 皮内滞留量检测方法学验证

为了解活性物质在人体皮肤中的分布, 可以分别分析活性物质在不同皮肤层(如角质层和活性表皮加真皮层)中的滞留量, 实验时需要建立合适的定量分析方法进行考察, 并对方法进行全

面的方法学验证^[1-2]。可以采用胶带剥离法测定皮肤角质层中的药物量, 剥离角质后的皮肤则在组织粉碎后, 采用生物样品的分析方法进行测定。

3.9 回收率质量平衡或剂量损耗

EMA 推荐用药物的总回收率来评估质量平衡, 总回收率通过计算药物累积渗透量、药物皮内滞留量及表皮的药物残留量之和占上样量的比例获得。药物的总回收率应为 90%~110%, 如果试验有较大的变化应该进行充分验证和解释^[7-8]。

FDA 在阿昔洛韦软膏的指南中对 IVPT 与 IVRT 的回收率和剂量损耗的规定相同, 仅规定了接收液中阿昔洛韦的回收率, 它可表征为在整个透皮试验期间的每个 Franz 扩散池接收液中的药物累积渗透量, 也可以用阿昔洛韦渗透量占所使用剂量的百分比来表示, 并由此推算最小的剂量消耗, 这里不包括皮肤中残留的药物含量。

PMDA 则没有相关规定。

4 数据统计和处理

IVPT 多采用药物渗透速率和(或)药物渗透程度作为体外渗透参数来评估。药物渗透速率用单位面积渗透速率($Flux$ 或 J)来表示, 即单位面积药物透过皮肤的速率(单位为 $g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$); 药物渗透程度用单位面积药物累积渗透量(A)来表示, 即单位面积透过皮肤的累积药物量(单位为 $g \cdot cm^{-2}$)。

可利用适当的统计学方法(如 Grubbs 检验法)对可疑数据(离群值)进行取舍。

EMA、FDA 及 PMDA 的等效判定依据各不一致。可根据实际情况, 采用合适的方法对结果进行数理统计和处理。

4.1 EMA

除非另有科学合理的理由, 试验平均值与参比产品等效参数(J_{max})和(A_{total})平均值比值的 90% 置信区间应在接收区间(80.00%~125.00%)内。在低强度和有限扩散药物制品中观察到高变异性的情况下, 如果临床证明是合理的, 可以接收更宽的 90%可信区间限制, 最大为 69.84%~143.19%^[7-8]。试验产品和参比产品之间的滞后时间(T_g)应该是相同的(如果存在的话, 应在 $\pm 10\%$ 之内)。

应该确定实验过程中的药物质量平衡, 如提供累积透过皮肤的药物量(A_{total})、皮肤样品中保留的药物的总量(S_{total})和清洁或实验设备上保留的药物量(R_{total}), 以保证药物的总回收率为 90%~110%。如果偏差较大, 则应充分说明和解释。

4.2 FDA

采用等效参数($J_{\max}$)和(A_{total})判定:等效性的置信区间范围应为 80%~125%,但 FDA 对药物的总回收率未做具体要求^[3]。

4.3 PMDA

采用平均渗透率判定。平均渗透率是指药物渗透速率,是渗透曲线的斜率。

判定依据为在规定的试验时间或者药物经皮渗透速率达到平稳后的 1 个时间点,和该时间点对应的渗透速率的一半的渗透速率所对应的时间点,试验制剂与参比制剂的平均渗透率之比应在 0.7~1.3。PMDA 对药物的总回收率也未做具体要求。

起草专家组

指导专家:

梁秉文 世界中医药学会联合会经皮给药专委会
梁文权 浙江大学
刘淑芝 中国中医科学院
王 浩 药物制剂国家工程研究中心
顾 臻 浙江大学
方 亮 沈阳药科大学
吕慧侠 中国药科大学

执笔人:

汤秀珍 上海复耀医药科技有限公司

成员(按姓氏汉语拼音排序):

包旭宏 西藏奇正藏药股份有限公司
陈 军 南京中医药大学
程晓佳 南京华威医药科技集团有限公司
狄留庆 南京中医药大学
杜守颖 北京中医药大学
冯年平 上海中医药大学
高建青 浙江大学
葛庆华 药物制剂国家工程研究中心
桂双英 安徽中医药大学
郭晓迪 浙江华海药业股份有限公司
洪利娅 浙江省食品药品检验研究院
梁晓静 Logan Instruments Corp.
凌 飒 湖北省医药工业研究院
刘建平 中国药科大学
刘 强 南方医科大学
刘子修 江苏省中医院
陆晔辉 云南白药集团无锡药业有限公司

罗华菲 药物制剂国家工程研究中心
马晋隆 药物制剂国家工程研究中心
马云淑 云南中医药大学
倪 睿 药物制剂国家工程研究中心
彭丽华 浙江大学
石森林 浙江中医药大学
汪 平 河南羚锐制药股份有限公司
王建新 复旦大学
王利胜 广州中医药大学
魏舒畅 甘肃中医药大学
闻 萍 浙江华海药业股份有限公司
吴传斌 暨南大学
吴苏敏 江苏康倍得药业股份有限公司
武余波 药物制剂国家工程研究中心
徐月红 中山大学
叶金翠 杭州医学院
张延惠 桂林华润天和药业有限公司
张樱山 西藏奇正藏药股份有限公司
朱全刚 上海市皮肤病医院

利益冲突:

本文不存在任何利益冲突。

REFERENCES

- [1] 国家药品监督管理局药品审评中心. 皮肤外用化学仿制药研究技术指导原则(试行)[S]. 2021.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学仿制药透皮贴剂药学研究技术指导原则(试行)[S]. 2020.
- [3] FDA. Transdermal and Topical Delivery Systems-Product Development and Quality Considerations Guidance for Industry[S]. 2019.
- [4] FDA. Guidance for Industry Residual Drug in Transdermal and Related Drug Delivery Systems[S]. 2011.
- [5] FDA. Graft guidance on Acyclovir[S]. 2016.
- [6] USP42: General Chapters 1724: Semisolid drug products-performance tests[S]. 2019.
- [7] EMA. Guidance for Quality of Transdermal patch [S]. 2014.
- [8] EMA. Graft guideline on quality and equivalence of topical product[S]. 2018.
- [9] PMDA. 局所皮膚適用製剤の剤形追加のための生物学的同等性試験ガイドライン[S]. 2006.
- [10] PMDA. 局所皮膚適用製剤の剤形追加のための生物学的同等性試験ガイドライン Q&A[S]. 2006.
- [11] AHLSTROM L A, CROSS S E, MILLS P C. The effects of freezing skin on transdermal drug penetration kinetics [J]. J Pharmacol Therap, 2007(30): 456-463.
- [12] ANA M. Barbero and H. Frederick Frasch. Effect of frozen human epidermis storage duration and cryoprotectant on barrier function using two model compounds[J]. Skin Pharmacol Physiol. 2016, 29(1): 31-40.
- [13] 马欢, 赵静, 葛庆华, 等. 皮肤用制剂体外透皮试验概述及应用实例[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(8): 1010-1018.

收稿日期: 2022-02-23

(本文责编: 蔡珊珊)