

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.009

硝酸益康唑微乳凝胶的制备及其体外释放研究*

丁乐¹, 杨人泽^{2△}, 李小兰¹, 肖人钟³, 欧阳文², 严金玲², 申音², 魏桂林²

(1. 江西省赣州市妇幼保健院, 江西 赣州 341000; 2. 赣南医学院第一附属医院, 江西 赣州 341000;
3. 江西昂泰制药有限公司, 江西 九江 332300)

摘要:目的 制备载药量高、黏附性好的硝酸益康唑微乳凝胶, 以提高其透皮渗透和相对生物利用度。方法 以表观溶解度评价硝酸益康唑在油、表面活性剂和助表面活性剂中的溶解度, 筛选微乳的组分。以油酸乙酯为油相、Tween 80 为表面活性剂、聚乙二醇 400(PEG 400)为助表面活性剂构建伪三元图。用卡波姆 940 制备微乳凝胶, 加入硝酸益康唑微乳搅拌形成微乳凝胶。评估该系统的药物负载效率和表征 pH、电导、黏度、粒度和药物含量。采用改良的 Franz 扩散池考察硝酸益康唑微乳凝胶的体外释放性能。结果 表面活性剂与助表面活性剂之比为 2:1 时, 形成的微乳区域最大, 微乳(F3)的球体尺寸为 29.88 nm; 加入凝胶中微乳(F3)黏度从 156.73 mPa·s 增至 13.6 Pa·s; 体外扩散试验表明, 微乳凝胶(FG3)的 12 h 累计渗透量为 (51.76±0.35)%, 显著高于硝酸益康唑普通凝胶的 (36.15±0.42)%; Draize 测试显示, 硝酸益康唑微乳凝胶对大鼠皮肤无刺激, 也无炎症迹象。结论 硝酸益康唑微乳凝胶比普通凝胶具有更好的应用性质和稳定性, 有望成为硝酸益康唑的新型给药制剂。

关键词:微乳; 凝胶; 硝酸益康唑; 经皮给药; 渗透率; 生物利用度

中图分类号: R969.1; R978.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)13-0035-04

Preparation of Econazole Nitrate Microemulsion Gels and Its Release *in Vitro* Characteristics

DING Le¹, YANG Renze², LI Xiaolan¹, XIAO Renzhong³, OUYANG Wen², YAN Jinling², SHEN Yin², WEI Guilin²

(1. Ganzhou Maternal and Child Health Care Hospital, Ganzhou, Jiangxi, China 341000; 2. The First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi, China 341000; 3. Jiangxi Angtai Pharmaceutical Co., Ltd., Jiujiang, Jiangxi, China 332300)

Abstract: Objective To prepare econazole nitrate microemulsion gels with high drug content and adhesiveness to improve transdermal penetration and relative bioavailability of econazole nitrate. **Methods** The solubility of econazole nitrate in oils, surfactants and cosurfactants was evaluated by saturation solubility to screen the components of microemulsion. The pseudoternary phase diagrams were constructed using ethyl oleate as the oil phase, Tween 80 as surfactant and PEG 400 as the co-surfactant. Optimized formulation systems were formulated into gel form by using poloxamer-940. The system was assessed for drug-loading efficiency and characterized for pH, conductance, viscosity, particle size, drug content. Its release profile was characterized *in vitro* using a modified Franz diffusion cell. **Results** The microemulsion area formed was the largest when the ratio of surfactant to cosurfactant was 2:1. The particle size of microemulsion(F3) was found to be 29.88 nm. The viscosity of microemulsion(F3) was found to be 156.73 mPa·s, but microemulsion gels was 13.6 Pa·s. *In vitro* diffusion study of drug showed increase in flux of microemulsion gels (51.76±0.35)% to that of simple econazole nitrate gel (36.15±0.42%). Draize test revealed absence of irritation and inflammation on rat skin. **Conclusion** Econazole nitrate microemulsion gels has better application properties and stability than its ordinary gel, and is expected to become a new drug delivery formulation of econazole nitrate.

Key words: microemulsion; gels; econazole nitrate; transdermal delivery; penetration; bioavailability

微乳促渗效果好、制备简单、热力学稳定, 作为抑菌抗炎药物的经皮给药载体应用广泛, 但微乳黏度低, 不易在皮肤表面附着, 临床应用受限^[1-2]。以凝胶为基质, 形成微乳凝胶, 可对液态微乳起到固化作用^[3], 且兼具微乳促渗和凝胶方便给药的优点。硝酸益康唑(ECN)为咪唑类广谱抗真菌药物, 对皮肤癣菌、酵母菌、双相型真菌、曲菌等均有杀菌和抑菌作用, 可干扰真菌细胞膜的生物合成, 临床广泛用于治疗念珠菌阴道炎、股癣、手足癣、花斑癣、念珠菌性皮炎等^[3]。硝酸益康唑易溶于甲醇, 微溶于氯仿和乙醇, 极微溶于水^[4], 极大地限制了其

应用。目前, 硝酸益康唑制剂主要有凝胶、乳膏和栓剂, 但存在黏附性较差、药物易流失、载体药物浓度低的问题, 导致其生物利用度较低。本研究中考察了硝酸益康唑微乳凝胶的溶解度、黏附性、载体药量等, 以评价其生物利用率, 提高药效, 延长药物作用时间。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

Agilent 1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); RCZ-6C3 型智能药物溶出度仪(上海黄海药检仪器有限公司); HWS-1 型数显恒温磁力搅拌器(杭州仪

*基金项目: 江西省自然科学基金[2015ZBAB205014]; 江西省科技计划项目[20152ACG70010]。

第一作者: 丁乐, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为临床药学及药剂学, (电子信箱) dlegzyy@sina.com。

△通信作者: 杨人泽, 男, 硕士研究生, 主任药师, 副教授, 研究方向为临床药学及药剂学, (电子信箱) yrz626@163.com。

表电机有限公司);XP26型电子分析天平(瑞士梅特勒公司,精度为百万分之一);NDJ-8S型数显旋转黏度计(上海精天电子仪器有限公司)。

1.2 试药

甲醇(色谱纯,德国默克公司);磷酸(分析纯,南京化学试剂股份有限公司);硝酸益康唑(浙江常青化工有限公司,纯度为98.6%);硝酸益康唑对照品(中国食品药品检定研究院);水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物

屏障环境昆明种小鼠,雌雄不限,体质量20~30g,由赣南医学院实验动物中心提供,许可证号为SYXK(赣)2018-0004。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-醋酸缓冲液(75:25, V/V, pH=4.3);柱温:30℃;流速:1 mL/min;检测波长:232 nm;进样量:10 μL。按硝酸益康唑峰计算,理论板数不小于5000。

2.1.2 微乳和微乳凝胶破乳

取1g微乳或微乳凝胶,精密称定,置10 mL容量瓶中,加5 mL甲醇,超声破乳,加甲醇定容。再取0.5 mL溶液置10 mL容量瓶中,加流动相定容,即得。

2.1.3 方法学考察

硝酸益康唑对照品、空白微乳、硝酸益康唑微乳按拟订色谱条件分别进样20 μL,记录色谱图,详见图1。硝酸益康唑与杂质峰分离良好,杂质峰对测定结果无干扰。依法制备质量浓度分别为1,2,4,6,8,10 μg/mL的对照品溶液,进样20 μL。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 34.624X - 2.1015$, $R = 0.9993$,结果表明硝酸益康唑质量浓度在1~10 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

2.2 表观溶解度测定

分别取2 mL选定的油、表面活性剂、助表面活性剂,分别置5 mL带塞小瓶中,再加入过量的硝酸益康

唑,涡旋混合。将小瓶置(37 ± 1.0)℃的摇床,保持48 h,以达到平衡。取出,以3000 r/min离心15 min,取上清液,加甲醇稀释,经0.45 μm微孔滤膜滤过,采用高效液相色谱(HPLC)法测定硝酸益康唑含量,计算其在不同溶剂中的溶解度^[4]。结果见表1。根据测定结果选择表观溶解度最高的油酸乙酯为油相,Tween 80为表面活性剂,聚乙二醇400(PEG 400)为助表面活性剂。

表1 硝酸益康唑在各溶剂中的表观溶解度(n=3)

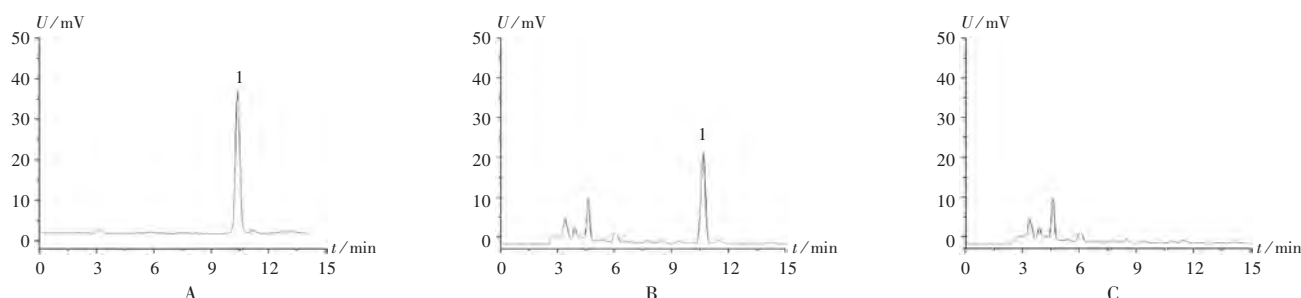
项目	溶剂	表观溶解度($\bar{X} \pm s$, mg/mL)
油相	油酸乙酯	25.45 ± 0.65
	苯甲醇	0.31 ± 0.11
	肉豆蔻酸异丙酯	0.87 ± 0.65
表面活性剂	Tween 20	7.59 ± 0.82
	Tween 80	32.89 ± 0.78
	Span 80	1.58 ± 1.06
助表面活性剂	异丙醇	1.05 ± 0.36
	PEG 400	3.70 ± 0.58
	丙二醇	0.92 ± 1.05

2.3 伪三元相图构建

当表面活性剂(Tween 80)/助表面活性剂(PEG 400)比值(K_m)分别为1.0,2.0,3.0时,分别将油相和混合乳化剂以1:9,2:8,3:7,4:6,5:5,6:4,7:3,8:2,9:1的质量比例混合成二元液,置圆底烧瓶中,以纯化水为水相在滴定管内逐滴滴入上述二元液,以体系由澄清变浑浊再变澄清时为滴定终点,记录所滴定的水相体积,绘制空白微乳伪三元相图^[5]。各 K_m 值下的伪三元图见图2。微乳区为灰色阴影部分。当 K_m 值由1.0增大至2.0时,微乳区域增大;但当 K_m 值由2.0逐渐增大时,微乳形成的区域缩小。故选择 K_m 为3:1。

2.4 表征^[2,6-7]

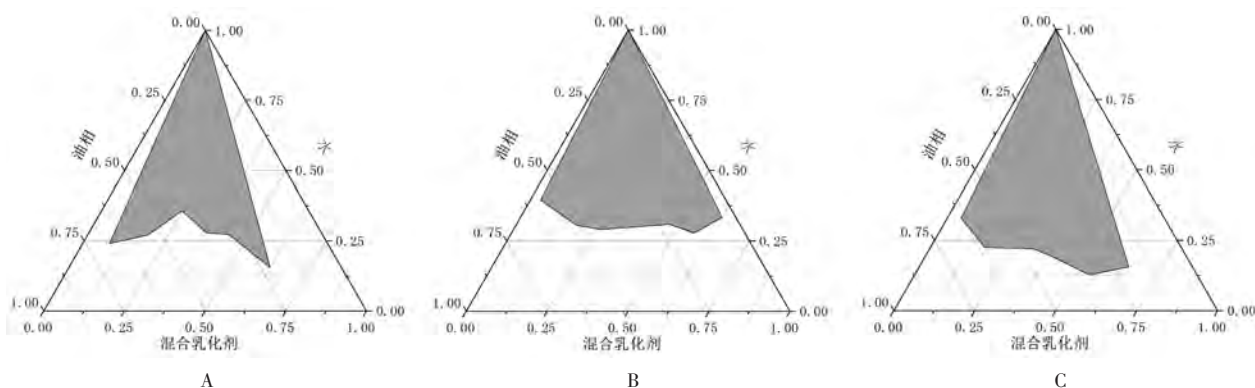
微乳制备:通过构建伪三元相图确定微乳区域。当Tween 80/PEG 400(m/m)为2:1时,伪三元相图有最高的微乳区域面积,因此选择表面活性剂与助表面活性剂质量比为2:1。制备含量为1%硝酸益康唑的100 g微乳,药物溶解度最低要求39.3 mL油,故按油相百分



1. 硝酸益康唑

A. 对照品溶液 B. 硝酸益康唑微乳 C. 空白微乳

图1 高效液相色谱图



A. $K_m = 1:1$ B. $K_m = 2:1$ C. $K_m = 3:1$

图2 Tween 80/PEG 400 不同比值的伪三元图

比大于40%设计微乳处方,详见表2。在油酸乙酯、表面活性剂和辅助表面活性剂混合物中加入质量比为1% (m/m)的硝酸益康唑,在恒温水浴(37℃)磁力搅拌下逐一滴加水形成微乳。

表2 混合乳化剂制备微乳处方($m/m, \%$)

组号	油相	混合乳化剂	水相
F1	50	20	30
F2	50	37.5	12.5
F3	56	10	34

微乳凝胶制备:取0.5%卡波姆940分散在水中,溶胀后,快速搅拌,并缓慢加入上述硝酸益康唑微乳。当微乳液加入水凝胶中时,体系黏度降低,继续搅拌15 min,即得半透明的硝酸益康唑微乳凝胶。

表征:微乳透光率评估用紫外分光光度计于620 nm波长处观察。采用2015年版《中国药典(四部)》中0982粒径和粒度分布测定法第三法(光散射法)测定粒径。参照2015年版《中国药典(四部)》测定pH及Zeta电位。结果,微乳的pH为6.5~6.8,所得制剂的pH均在皮肤的pH范围内(pH为4~7)。微乳粒径尺寸是关键参数,尺寸越小,为药物渗透提供的界面表面积就越大。粒径采用激光粒度仪测定,温度为37℃。微乳粒径分布范围较窄,呈正态分布,平均粒径均小于50 nm。采用NDJ-8S型数显旋转黏度计,(20±1)℃测定微乳和微乳凝胶的黏度,结果微乳(F3)黏度为156.73 mPa·s,微乳凝胶(FG3)黏度增加至13.6 Pa·s。详见表3。

稳定性:在(40±2)℃和相对湿度(75±5)%条件

表3 用于评价不同微乳的数据($n=3$)

项目	外观*	pH	电位 (mV)	药物含量百分比 ($\bar{X} \pm s, \%$)	透光百分比 (%)	粒径 (nm)	黏度 (mPa·s)
F1	+++	6.5	-7.25	92.79±0.17	98.69	34.75	188.56
F2	+++	6.8	-7.32	93.18±0.20	97.45	48.46	191.13
F3	+++	6.5	-7.46	95.28±0.67	99.13	29.88	156.73

注:*微乳标记为浊度(-),略微混浊(+),透明(++),清澈透明(+++)。

下,放置30 d。结果见表4,微乳凝胶无显著变化,无相分离或药物沉淀的迹象,表明优化硝酸益康唑微乳凝胶在室温下在30 d内稳定。

表4 微乳凝胶(FG3)30 d内稳定性试验结果($n=3$)

测试时间	pH	粒径(nm)	药物含量($\bar{X} \pm s, \%$)
0 d	6.5	29.88	95.28±0.67
15 d	6.5	40.26	95.78±0.46
30 d	6.6	35.78	94.65±0.16

2.5 体外扩散试验

取20~25 g健康昆明种小鼠,试验前1 d用8%的 Na_2S 溶液去背毛。断颈处死,取背部皮肤,用蒸馏水和生理盐水冲洗,刮去皮下脂肪组织和粘连物,冷冻保存。使用改良Franz扩散池。将硝酸益康唑微乳1 mL、含有等量硝酸益康唑的微乳凝胶和硝酸益康唑普通凝胶分别置供给池中,渗透面积为0.85 cm²,扩散池中以30%甲醇生理盐水为接受液,接受池体积为5 mL。在接收室内加满扩散介质,水浴保温(37±1)℃,100 r/min搅拌,分别于1,2,3,4,5,6 h时抽取接收室内0.5 mL接收液,并迅速补充等体积接收液。将取得的样品注入高效液相色谱仪,测定硝酸益康唑的含量。

测定抽取样品中硝酸益康唑的浓度后,按下列公式计算单位面积(cm²)药物累积渗透量(Q)。

$$Q = [C_n \times V_0 + \sum_{i=1}^{n-1} C_i \times V] / A$$

其中, C_n 为第 n 个取样点质量浓度(mg/mL); V_0 为扩散池体积(mL); C_i 为第 i 个取样点质量浓度(mg/mL); V 为取样体积(mL); A 为扩散面积(cm²)。采用SPSS 13.0统计学软件计算药物累积经皮渗透量。体外皮肤渗透试验表明,与24 h结束时硝酸益康唑普通凝胶释放率[(62.59±0.26)%]相比,微乳凝胶的药物释放率更高[(86.79±0.17)%],详见图3。

2.6 皮肤刺激性测试

选择健康无皮肤伤的大鼠6只,分为两组,两侧去

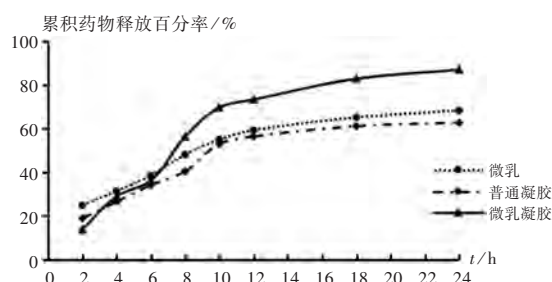


图3 硝酸益康唑微乳凝胶和普通凝胶通过大鼠皮肤累积渗透比较

毛1 cm²,取无损伤者3只,进行完整皮肤的刺激试验;取3只将脱毛区皮肤用75%乙醇消毒,用灭菌大头针将消毒皮肤划破,以渗血为度。采用同体左右侧自身对比的方法,按每只1 mL的剂量在脱毛区左侧涂搽受试药物,右侧涂搽蒸馏水作对照。用药后24,48,72 h时检查大鼠的刺激迹象。结果显示,治疗组在治疗部位没有显示任何皮肤过敏和炎症的迹象,无红斑形成,无水肿出现;破损皮肤组和完整皮肤组大鼠涂受试物皮肤均未见差异。优选的微乳凝胶均适用于局部应用。

3 讨论

外用制剂用于药物穿透皮肤或黏膜,在其应用部位产生局部效应。经皮给药系统的主要优点是能选择性地药物输送到特定部位,产生局部作用,其增加了生物半衰期短、治疗窗口窄药物临床应用的可能,并增加了药物作用持续时间^[8]。

微乳是由乳化剂、助乳化剂、油相和水相组成的光学上各向同性,热力学稳定的液-液分散体,粒径为5~200 nm。由于其独特的增溶性能,微乳作为潜在的药物输送系统引起了越来越多的关注,无论是作为局部应用的载体,还是作为难溶性活性药物成分(API)的生物利用度增强剂^[9]。微乳液具有热力学稳定、光学清晰、易于制备的优点,与无表面活性剂体系相比,具有较高的扩散和吸收速率^[10]。作为一种新型药物载体,微乳优势独特,热力学稳定,可过滤,易制备,保存方便,可提高水溶性差药物的生物利用度,透皮能力强^[11-12],疗效提高。

微乳凝胶(乳剂型凝胶)含有乳剂和凝胶基质,当局部应用黏膜给药时,药-时曲线下面积有很大提高^[13]。卡波姆为引湿性很强的粉末,不溶于水,能迅速溶胀,形成水性凝胶,是微乳凝胶的常用基质。

本研究中制备的1%硝酸益康唑微乳,性质稳定,显著增加了硝酸益康唑的溶解度。微乳中加入卡波姆940,可使微乳制备成凝胶后黏度增加^[2]。药物释放时需先从微乳内相扩散到外相,然后再从凝胶的网状结构中渗透出来,因此渗透速度会有所下降;也可能是由于卡波姆的加入使得微乳的结构发生转变,由内外两项转变为液晶结构或更高秩序的微结构。这与刘继勇等^[14]的研究结果一致。

因此,微乳凝胶提高了硝酸益康唑的溶解性、稳定性和透皮率,可进一步研究硝酸益康唑微乳凝胶的药效。

参考文献:

- [1] CHEN H, CHANG X, DU D, et al. Microemulsion - based hydrogel formulation of ibuprofen for topical delivery[J]. Int J Pharm, 2006,315(1):52-58.
- [2] VIDYA SABALE SV. Formulation and evaluation of microemulsion - based hydrogel for topical delivery[J]. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 2012,2(3):140-149.
- [3] SINTOV AC, SHAPIRO L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo[J]. Journal of Controlled Release, 2004,95(2):173-183.
- [4] DATE AA, PATRAVALE VB. Microemulsions: applications in transdermal and dermal delivery[J]. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2007,24(6):547-596.
- [5] PANAPISAL V, CHAROENSRI S, TANTITUVANONT A. Formulation of Microemulsion Systems for Dermal Delivery of Silymarin[J]. Aaps Pharmscitech, 2012,13(2):389-399.
- [6] RAZA K, NEGI P, TAKYAR S, et al. Novel dithranol phospholipid microemulsion for topical application: development, characterization and percutaneous absorption studies[J]. Journal of Microencapsulation, 2011,28(3):190-199.
- [7] LI W, CHEN H, HE Z, et al. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol nanoemulsions[J]. LWT - Food Science and Technology, 2015, 62(1):39-47.
- [8] 李超英. 中药透皮给药研究及其辅料的应用问题[C]//第二届全国药用新辅料与中药制剂新技术应用研讨会会议论文集汇编. 2005.
- [9] KAWAKAMI K, YOSHIKAWA T, HAYASHI T, et al. Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs: II. In vivo study[J]. Journal of controlled release: Official Journal of the Controlled Release Society, 2002,81(1-2):75-82.
- [10] LAWRENCE MJ, REES GD. Microemulsion - based media as novel drug delivery systems[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000,45(1):89-121.
- [11] 施昕磊,戴建峰,曹巧巧. 抗肿瘤药物微乳给药系统研究进展[J]. 中国药业, 2012,21(12):19-20.
- [12] 张春燕,王慧云. 奥美沙坦酯微乳的制备及其透皮吸收的研究[J]. 中国药业, 2010,19(14):26-27.
- [13] 张爱武,张友智. 卡维地洛鼻用微乳凝胶的制备及性质考察[J]. 中国药房, 2016,27(28):3992-3995.
- [14] 刘继勇,韩盈,杨明,等. 丹皮酚微乳凝胶剂的制备及体外透皮特性研究[J]. 中国中药杂志, 2009,34(21):2730-2733.

(收稿日期:2019-12-25)