

犬用盐酸特比萘芬喷雾剂处方筛选及含量测定研究

马军明, 杨柳, 杜守颖, 谭宁, 赵梦迪, 王承, 白洁*, 陆洋*

(北京中医药大学中药学院, 北京 100102)

[收稿日期] 2016-09-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0049-05 [中图分类号] S859.79

[摘要] 对犬用盐酸特比萘芬喷雾剂进行处方筛选并对盐酸特比萘芬进行含量测定。以喷雾剂成型性为指标优选出 2% 月桂氮卓酮(水溶性), 0.35 g/L 苯甲酸钠, 10% Kolliphor® HS 15 和适量高纯水制成水溶液。采用 HPLC 法测定该处方中有效成分盐酸特比萘芬的含量, 结果显示盐酸特比萘芬在 0.0201~0.4026 mg/mL 的浓度范围内线性关系良好, 回归方程为 $Y = 2.652 \times 10^7 X - 2.418 \times 10^4$ ($r = 0.9998$, $n = 6$), 平均回收率为 104.14%, RSD 为 1.23%。通过采用 HPLC 法测量有效成分盐酸特比萘芬的含量稳定, 所筛选的处方工艺可行, 制备方法简单方便。

[关键词] 盐酸特比萘芬; 喷雾剂; 处方筛选; 含量测定

Prescription – screening and Determined the Content of Hydrochloride Terbinafine Sprays for Dogs

MA Jun – ming, YANG Liu, DU Shou – ying, TAN Ning, ZHAO Meng – di, WANG Cheng, BAI Jie*, LU – Yang*

(School of Chinese Pharmacy Beijing University of TCM, Beijing 100102, China)

Abstract: The present experiment focused on the dogs with hydrochloride terbinafine sprays which the prescription was screening and the content of hydrochloride terbinafine was going to be determined. Forming the spray which was based on the index of its formability, the prescription were made up of laurocapram(water – soluble), sodium benzoate, 10% Kolliphor® HS 15 and purity water that formulated the aqueous solution. Then the active ingredient content of terbinafine hydrochloride was determined by HPLC. The content determination of hydrochloride terbinafine concentration in the range of 0.0201~0.4026 mg/mL had a good linear relationship, the regression equation was $Y = 2.652 \times 10^7 X - 2.418 \times 10^4$ ($r = 0.9998$, $n = 6$), the average rate of recovery was 104.14%, RSD was 1.23%. The active ingredient content of hydrochloride terbinafine was stable by HPLC. The screened prescription was feasible, and the formulation process of preparation was simple.

Key words: terbinafine hydrochloride; spray agent; prescription – screening; content determination

基金项目: 北京市科技新星计划资助(xx2015A048); 2015 年青年骨干教师专项(2015 – JYB – QNJSZX004)

作者简介: 马军明, 硕士研究生, 从事中药制剂新剂型与新技术研究。

通讯作者: 白洁, E – mail: baijie22811@163.com; 陆洋, E – mail: landocean28@163.com

犬类皮肤真菌病又称癣,是由皮肤真菌(小孢子菌属和毛癣菌属)侵入皮肤被毛和爪部,寄生或腐生于表皮,角质,被毛和爪部的角质蛋白组织中所引起的一种真菌性传染病^[1]。今年,犬类疾病遍布全国,尤其伴随着人们养宠物狗的数量增多,患病犬类的数量也越来越多,因此这类疾病对犬类和犬类主人造成极大压力和痛苦。盐酸特比萘芬(Terbinafine hydrochloride)是一个丙烯胺类药物,对于皮肤类、发和甲的致病性真菌均有广泛的抗真菌活性。该药的作用机制是高选择性抑制真菌角鲨烯环氧化酶,使真菌细胞膜形成过程中角鲨烯环氧化反应受阻,起到抑菌作用;该药抑制角鲨烯环氧化酶后,其前体角鲨烯在细胞内大量积聚,导致真菌细胞中毒死亡,起到杀菌作用^[2]。口服或局部使用本品,能有效治愈须发癣菌或大小孢子菌引起的动物实验性皮肤感染。本实验考虑到,近年来国内市场上,治疗动物的皮肤病类药物较少,故本实验进行了筛选处方制作盐酸特比萘芬喷雾剂的研究。

1 材料

- 1.1 仪器 LC-20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);BSA224S 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);KQ5200DA 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。
- 1.2 试剂与药品 盐酸特比萘芬原料药(济南明鑫制药股份样公司,批号 13125510);盐酸特比萘芬对照品(中国食品药品检定研究院,批号 100563-201402);纯净水(杭州娃哈哈集团);甲醇(Fisher,色谱纯);四氢呋喃(Fisher,色谱纯);磷酸(北京化工厂,色谱纯);甲基氢氧化铵(国药集团化学试剂有限公司);苯甲酸钠(北京市旭东化工厂);Kolliphor® HS 15(4832876E0 德国 BASF 公司);月桂氮卓酮(药用标准,湖北武汉远成科技发展有限公司)。
- 1.3 实验动物 中华大蟾蜍,雌雄兼用,30~40 g,由北京阎村新生蟾蜍养殖中心提供。

2 方法与结果

- 2.1 盐酸特比萘芬喷雾剂的处方筛选
- 2.1.1 根据药物在不同溶剂中的溶解性来筛选溶剂 取盐酸特比萘芬适量,分别溶于 100 mL 的

高纯水、PBS 缓冲液、30% PEG-200 溶液、30% PEG-400 溶液、5% Kolliphor® HS 15^[3] 溶液、10% Kolliphor® HS 15 溶液中,超声 15 min,以溶解性和溶液澄清度、颜色为观察指标,观察现象见表 1。

表 1 溶剂观察指标			
溶液	溶解性	是否澄清	颜色
高纯水	微溶	否	微黄色
PBS 缓冲液	微溶	否	微黄色
30% PEG-200	部分溶	否	微黄色
30% PEG-400	全溶	是	微黄色
5% Kolliphor® HS 15	部分溶	否	微黄色
10% Kolliphor® HS 15	全溶	是	微黄色

结果表明,30% PEG-400 溶液、10% Kolliphor® HS 15 溶液在溶解盐酸特比萘芬后,溶解性、澄清度以及颜色符合要求。初步筛选,以上两种溶液为喷雾剂的溶剂。

2.1.2 通过溶剂对黏膜刺激性研究进一步筛选溶剂 由于采用外用给药形式时,可能应用到由于真菌感染引起的破损皮肤,因此需要考察溶剂对破损皮肤的刺激性。皮肤破损后黏雾暴露,可以借鉴黏膜刺激性的研究方法,考察溶剂的刺激性。采用在体蟾蜍实验方法,选用文献公认有严重纤毛毒性的去氧胆酸钠作为阳性对照品,以生理盐水作为空白对照,分别评价 30% PEG-200、30% PEG-400、10% Kolliphor® HS 15 溶液的纤毛毒性,结果见图 1。

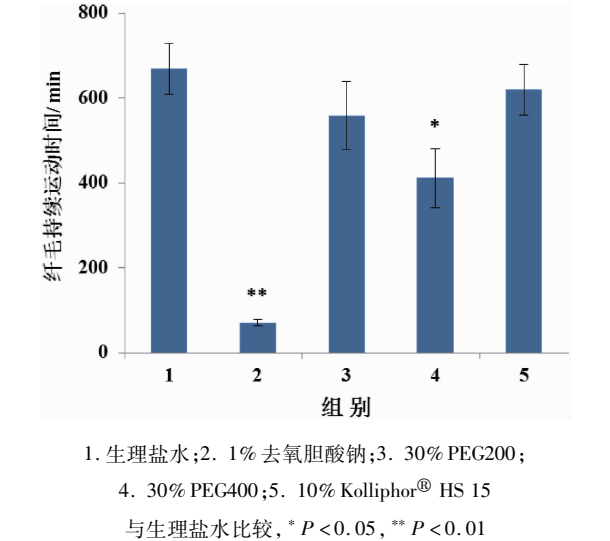


图 1 各给药组纤毛持续运动时间

结果表明,给予阳性药 1% 去氧胆酸钠组纤毛持续运动时间与生理盐水相比有显著性差异,说明

其对纤毛有很大毒性,与文献报道相符;给予30% PEG-200、10% Kolliphor® HS 15 的纤毛持续运动时间与生理盐水相比没有显著性差异,说明其对纤毛作用基本无影响,即无纤毛毒性;而30% PEG-400 药物的纤毛持续运动时间与生理盐水相比有差异,说明其对纤毛有一定的毒性,不能作为喷雾剂的溶剂。结合溶解度试验,由于盐酸特比萘芬在30% PEG-200 中难以达到有效的治疗浓度,因此选择10% Kolliphor® HS 15 为溶剂^[4]。

表2 筛选数据表

编号	氮酮含量	苯甲酸钠/(g·L ⁻¹)	pH 值稳定性	促透效果
1	1%	0.25	差	差
2	1%	0.30	较好	差
3	1%	0.35	较好	差
4	2%	0.25	较好	较好
5	2%	0.30	较好	很好
6	2%	0.35	很好	很好
7	3%	0.25	较好	很好
8	3%	0.30	很好	很好
9	3%	0.35	较好	较好

2.3 处方与制备

2.3.1 处方 盐酸特比萘芬适量,2% 氮酮(水性),0.035% 苯甲酸钠,10% Kolliphor® HS 15,适量高纯水制成盐酸特比萘芬水溶液。

2.3.2 制备 取10 g Kolliphor® HS 15 于适量去离子水中,超声振荡使其溶解。向溶液中加入苯甲酸钠溶解后加入盐酸特比萘芬继续超声振荡溶解,最后在溶解中加入氮酮(水性),待溶解完全,放入干净的喷瓶中,即可。

2.3.3 性状 按照处方工艺制备的盐酸特比萘芬喷雾剂为微黄色透明溶液。

2.3.4 pH 值 分别取三批的盐酸特比萘芬喷雾剂样品,批号分别为20151101、20151102、20151103,各取两个样品测定pH 值,结果见表3,三批样品的pH 值均在3.6~4.1 之间,符合要求。

表3 测量三批样品的 pH 数据

样品	pH 值	平均值
20151101	3.95、3.91	3.93
20151102	3.87、3.95	3.91
20151103	3.98、3.90	3.94

2.1.2 处方中促透剂与防腐剂的筛选 按照未加促透剂与防腐剂的处方辅料比例配制盐酸特比萘芬喷雾剂溶液,以10% Kolliphor® HS 15 为溶剂,分别选择1%、2%、3% 浓度的氮酮^[5],0.25 g/L、0.3 g/L、0.35 g/L 的苯甲酸钠^[6] 配组,按照《中国药典》^[7]2015 版四部喷雾剂制备准则制备以及药用辅料常用量进行设计制备喷雾剂溶液,以药液pH 值稳定性和促透效果^[8] 为指标,结合生产成本考虑,初步筛选处方为6。结果见表2。

2.4 盐酸特比萘芬喷雾剂含量测定

2.4.1 色谱条件 参照文献^[9-10] 方法,色谱柱:Merck KGaA Hibar - C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm),以乙腈-四氢呋喃-四甲基氢氧化铵(60:20:20)为流动相,流速1 mL/min,检测波长280 nm,(取25% 四甲基氢氧化铵5.8 mL,加水800 mL,用0.7 mol/mL 磷酸溶液调pH 值至7.8,加水稀释至1000 mL)(60:20:20);流速:1.0 mL/min;柱温:室温,进样量20 μL。

2.4.2 对照品溶液的制备 按照所需浓度精密称取盐酸特比萘芬对照品,置50 mL 棕色容量瓶中,加甲醇溶解,定容至刻度,微孔滤膜滤过,取续滤液,作为对盐酸特比萘芬对照品溶液^[9]。

2.4.3 供试品溶液的制备 将不同批次样品,精密吸取0.25 mL 的样品(相当于盐酸特比萘酚约2.5 mg),置25 mL 棕色瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。

2.4.4 线性关系考察 按照2.4.2 项下对照品配制方法,配制浓度为0.4026 mg/mL 的盐酸特比萘酚对照品。精密取0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10 mL,置于10 mL 容量瓶中甲醇稀释至刻度线,配

制浓度分别为 0.0201、0.0403、0.0805、0.1610、0.2416、0.3221、0.4026 mg/mL 的对照品溶液。取不同浓度对照品溶液,按 2.4.1 项下色谱条件进样,以盐酸特比萘芬吸收峰面积为纵坐标(Y),进样浓度(X , mg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程 $Y = 2.652 \times 10^7 X - 2.418 \times 10^4$ ($r = 0.9998$, $n = 6$),表明盐酸特比萘芬在 0.0201 ~ 0.4026 mg/mL 的浓度范围内线性关系良好。

2.4.5 重复性考察 按照 2.4.3 项下方法,配制成浓度为 0.100 mg/mL 供试品溶液,6 份,按 2.4.1 项下色谱条件进样,计算盐酸特比萘芬含量平均值及 RSD 值。样品盐酸特比萘芬平均含量为 0.100 mg/mL, RSD 为 1.48%,表明样品重复性良好。

2.4.6 精密度考察 按照 2.4.2 项下方法,配制浓度为 0.100 mg/mL 的对照品溶液,按 2.4.1 项下

色谱条件进样,日内重复进样 6 次进行测定,记录峰面积,计算精密度。计算得峰面积的 RSD 为 0.13%,表明仪器精密度良好。

2.4.7 稳定性考察 按照 2.4.3 项下方法,配制成浓度为 0.100 mg/mL 供试品溶液,6 份,按 2.4.1 项下色谱条件分别于 0、2、4、8、10、12 h 进样检测,计算色谱图和峰面积。计算峰面积的 RSD 为 1.06%,表明供试品 12 h 内稳定性良好。

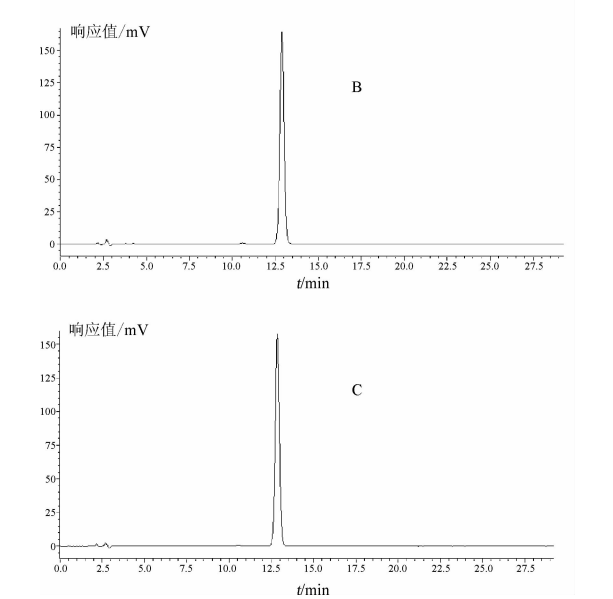
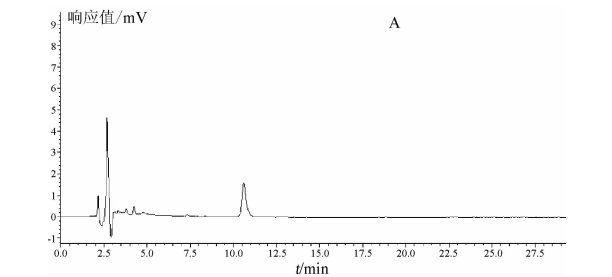
2.4.8 加样回收率实验 按照 2.4.2 项下方法,配制已知盐酸特比萘芬含量 0.25 mg/mL 的溶液,从中精密吸取 10 mL 共 6 份,加入到 50 mL 容量瓶中,再精密量取 0.25 mL 盐酸特比萘芬样品 6 份,分别加入容量瓶中,甲醇稀释到刻度,摇匀,制成加样回收液。按 2.4.1 项下色谱条件进样测定,计算回收率及 RSD 值,结果见表 4。

表 4 供试品加样回收率实验结果

编号	已知量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD /%
1	2.50	2.53	5.12	99.81	100.16	0.48
2	2.50	2.53	5.14	100.19		
3	2.50	2.53	5.15	100.39		
4	2.50	2.53	5.16	100.58		
5	2.50	2.53	5.10	99.42		
6	2.50	2.53	5.16	100.58		

2.4.9 色谱图 盐酸特比萘芬喷雾剂阴性对照溶液、对照品溶液及样品处理液的色谱图,见图 2,盐酸特比萘芬的保留时间为 12.5 min 左右,理论塔板数为 11788。阴性对照品为按照盐酸特比萘芬喷雾剂处方,不添加盐酸特比萘芬药物而制备。

2.4.10 样品含量测定 配制 3 批喷雾剂溶液,按照 2.4 项下方法制得盐酸特比萘芬供试品与对照品溶液;按 2.4.1 色谱方法测定,三批样品的含量分别 99.02%、99.03%、100.45%,均符合规定^[11]。



A: 阴性对照溶液; B: 对照品溶液; C: 样品处理液

图 2 盐酸特比萘芬喷雾剂色谱图

3 讨论与小结

本品是针对宠物犬类研究的一种药品,这从对动物的抗真菌类外用制剂药物来说是一个创新与突破。根据文献报道,盐酸特比萘芬剂型有很多,一般有乳膏剂、栓剂、凝胶、搽剂等,但这些都属于长效性的药物,对于宠物犬来说,这些剂型在给药方面会很困难。而采用喷雾给药,与其他剂型相比较,药物直接到达作用部位,给药时与给药部位无直接的机械摩擦,从而减少了对皮肤的损伤或刺激,具有使用方便,吸收快,喷雾均匀等优势^[12]。

在溶剂筛选上,本研究选择黏膜刺激性低的10% Kolliphor® HS 15 作为有效成分的溶剂,与其他溶剂相比,其优势在于其生物相容性好、增溶能力强、稳定性高、粘度低,同时具有毒性低的特点。

经皮制剂通常需要加入促透剂促进有效成分透皮吸收。月桂氮卓酮(简称氮酮)是一种新型高效、无毒、无刺激性的透皮吸收促进剂,能改变皮肤角质层结构,促进药物吸收,对亲水性和疏水性成分均有较好的促渗作用,是目前国内外常用的渗透促进剂。研究表明,氮酮对于多数制剂的促进作用优于其他化学渗透剂,外用药物制剂中单用氮酮在1%~6%浓度时促渗作用较好;另外,氮酮对一些细菌、真菌也有抑制作用^[13]。

喷雾剂长时间放置会滋生细菌,需要加入防腐剂。苯甲酸钠是目前最常用的防腐剂,性质稳定、易溶解水,对多种细菌、霉菌及酵母菌都具有防腐作用。苯甲酸钠属于酸性防腐剂,在酸性条件下防腐效果较好,而盐酸特比萘芬喷雾剂 pH 值在3.7~4.1,所以本实验选用苯甲酸钠作为防腐剂,符合药典要求^[11]。

该制剂试应用于犬类真菌性疾病,我们对2只患有体癣的犬采用喷雾剂治疗4周,观察皮肤表面患病处明显改善有效率100%。治疗8周,观察皮肤患病处大部分好转。对于治疗犬的癣类疾病疗效差异,需要根据患病动物的病情而定。

盐酸特比萘芬喷雾剂的应用可降低治疗真菌性癣类疾病的痛苦,减轻人们对治疗宠物犬类疾病带来的生活压力。对治疗动物皮肤病,提供新路,而且本品都是采用较为廉价的药物辅料制成,从生产成本的角度考虑亦有重要意义。

参考文献:

- [1] 苏荣胜,陈义洲,石达友. 中药对犬类真菌性皮肤病的疗效观察[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014,06:90-91.
- [2] 谈鑫,潘炜华,邓淑文,等. 国产盐酸特比萘芬对皮肤癣菌的体外抗菌活性研究[J]. 中国真菌学杂志,2015,10(1): 22-24.
- [3] 祁星星,李畅,孙春萌,等. 一种以Kolliphor® HS 15为增溶剂的参麦注射液的稳定性和安全性研究[J]. 中国新药杂志,2014,23(21): 2536-2541.
- [4] 程艳珂,郭懿望,尚可心,等. 以溶解度与刺激性为指标筛选葛根素滴鼻液溶剂及增溶剂[J]. 中国药理学杂志,2014,39(22): 4335-4339.
- [5] 王利胜,赖宝林,吴阳,等. 氮酮对跌打活络微乳喷雾剂体外透皮吸收影响的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6): 26-29.
- [6] 胡春红,乔琳,古红梅,等. 常用食品防腐剂的抑菌效果[J]. 吉林农业科学,2013,38(1): 83-86.
- [7] 中国国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015版(四部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,通则0112.
- [8] 兰学山,王晓波,岳平,等. 氮酮对5-FU透皮吸收影响的研究[J]. 中国医院药学杂志,1989,7(9): 294-296.
- [9] 杨柳,董博宇,白洁,等. 犬用盐酸特比萘芬喷雾剂片剂矫味处方及含量测定研究[J]. 中国兽药杂志,2015,49(11): 45-48.
- [10] 寇婉青,俞娟,开伟华,等. 高效液相色谱法测定盐酸特比萘芬乳膏含量[J]. 安徽中医学院学报,2009,28(3): 54-55.
- [11] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典2010版(一部)[S]. 北京:中国农业出版社:附录111.
- [12] 潘晓娇. 促透剂对药物透过口腔粘膜吸收的影响[D]. 浙江大学药学院,2008.
- [13] 宛超,黄明亚. 月桂氮卓酮的促渗和抑菌作用研究抑菌[J]. 中国药房,2013,24(13): 1239-1240.

(编辑:李文平)