

DOI:CNKI:61-1390/S.20120223.1721.009

网络出版时间:2012-02-23 17:21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120223.1721.009.html>

复方丙酸氯倍他索纳米乳的制备及安全性评价

兰莹, 欧阳五庆, 宋冠男, 孙江宏, 吴敬超

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】** 制备一种外用的水包油(O/W)型复方丙酸氯倍他索纳米乳, 用于治疗宠物由真菌和螨虫混合感染引起的皮肤病。**【方法】** 以丙酸氯倍他索(Clobetasol propionate, CP)、特比萘酚(Terbinafine)、双甲脒(Amitraz)为主要成分, 并从 5 种常用的油性物质和 3 种表面活性剂中筛选出适宜的油相和表面活性剂, 利用伪三元相图法筛选出纳米乳的最佳配方; 通过透射电子显微镜和粒度分析仪观察其粒径大小和分布, 通过加速离心试验、光稳定性和温度稳定性试验考察其品质, 通过皮肤急性毒性、刺激性和致敏性试验考察其安全性。**【结果】** 复方丙酸氯倍他索纳米乳的适宜配方(质量分数)为 23% 聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油、15.4% 乙酸乙酯、1% 特比萘酚、0.05% 双甲脒、0.05% 丙酸氯倍他索和 60.5% 蒸馏水。其乳滴平均粒径为 13.7 nm, 分布均匀, 品质稳定, 无毒无刺激性。**【结论】** 复方丙酸氯倍他索纳米乳是一种品质稳定、使用安全的治疗宠物皮肤病的外用药物。

【关键词】 纳米乳; 特比萘酚; 丙酸氯倍他索; 双甲脒; 毒性试验

【中图分类号】 S859.79⁺8

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)03-0029-05

Preparation and safety evaluation of compound Clobetasol propionate nanoemulsion

LAN Ying, OUYANG Wu-qing, SONG Guan-nan,

SUN Jiang-hong, WU Jing-chao

(College of Veterinary Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** This study prepared a external oil-water (O/W) type of compound Clobetasol propionate (CP) nanoemulsion which consist of Clobetasol propionate, Terbinafine and Amitraz. **【Method】** Pseudo-ternary phase diagram was used to determine the best formula. Stability test was used to evaluate its stability. Particle size and distribution were measured by particle size analyzer and transmission electron microscopy, toxicity test was used to evaluate its safety. **【Result】** Compound Clobetasol propionate (CP) nanoemulsion consists of 23% RH-40, 15.4% ethyl acetate, 1% Terbinafine, 0.05% Amitraz, 0.05% Clobetasol propionate, 60.5% distilled water. It has stable quality, the average particle size is 13.7 nm, emulsion droplets distribute uniform, non-toxic and non-stimulation. **【Conclusion】** Compound Clobetasol propionate (CP) nanoemulsion is an external drug with stable quality and safety in use.

Key words: nanoemulsion; Terbinafine; Clobetasol propionate; Amitraz; toxicity test

丙酸氯倍他索(Clobetasol propionate, CP)是一种外用皮质类固醇制剂, 适用于慢性湿疹、银屑病、

神经性皮炎等多种皮肤病。特比萘酚(Terbinafine)是烯丙胺类抗真菌药, 抗菌谱广, 适用于犬小孢子菌

* [收稿日期] 2011-10-12

[基金项目] 陕西省重大科技创新专项基金项目(K332020916)

[作者简介] 兰莹(1988—), 女(回族), 甘肃兰州人, 在读硕士, 主要从事新兽药研究。E-mail: lanying880120@163.com

[通信作者] 欧阳五庆(1960—), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 主要从事纳米药物研究。E-mail: oywq506@sina.com

等浅表真菌引起的皮癣。双甲脒(Amitraz)是有机氮的杀螨、杀虫剂系,可用于杀灭宠物体表的螨虫。

纳米乳是由表面活性剂、油、水组成的澄清、透明、粒径在 1~100 nm 的均相分散体系,具有稳定性好、缓释、靶向、生物利用度高、易吸收、粒径小、增溶增敏、分布均匀等优点^[1],其作为药物新剂型受到了广泛关注。国内外已有不少将各种药物制成口服制剂^[2]、注射液^[3]、透皮剂^[4]、滴眼液^[5]等制剂的报道,并且产生了良好的效果。

犬、猫宠物皮肤病是兽医临床上常见的疾病之一,杨选蒙^[6]报道,宠物患螨虫和真菌混合感染的皮肤病占整个皮肤病的 80%~90%。患病宠物皮肤剧烈瘙痒,被毛脱落,皮肤表面出现红斑、结节、水泡等,严重影响宠物外观,尤其是观赏型宠物,对于工作犬则会影响到日常工作。本研究将难溶于水的丙酸氯倍他索、特比萘酚、双甲脒 3 种药物复方,制成复方丙酸氯倍他索纳米乳,用于治疗宠物由真菌和螨虫混合感染引起的皮肤病,其较一般软膏和洗剂使用方便。复方丙酸氯倍他索纳米乳以纳米乳为载体,不仅提高了 3 种有效成分的溶解度,而且具备纳米乳特有的优点,为兽医临床治疗宠物皮肤病提供了可靠依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及主要仪器与试剂

试验动物有大耳白兔、Waster 大鼠和豚鼠,均购自第四军医大学动物中心。

主要仪器有 JEM1230 透射电镜(日本日立电子公司)、BS214S 电子天平(德国 Satorius 公司)、TGL-16B 台式高速冷冻离心机(湖南新星科学仪器公司)、Nicomp388/ZetaPALS 激光粒度测定仪(Particle Sizing System, USA)。

主要试剂有特比萘酚、双甲脒(湖北恒硕化工有限公司,批号 100629、102734),丙酸氯倍他索(武汉华怡达科技有限公司,批号 990230),肉豆蔻酸异丙酯(IPM,上海高维实业有限公司,批号 GB/T 17958-2009),聚氧乙烯 40 氢化蓖麻油(RH-40)、聚氧乙烯蓖麻油 40(Cremophor EL-40)(德国 BASF 公司,批号 20091106),聚山梨酯 80(Tween-80)、乙酸乙酯(天津博迪化工股份有限公司,批号 GB/T 12589-2007、GB/T 13257-2007),菜籽油、V_E 油、霍霍巴油(吉安恒诚香料有限公司,批号 20100115、20100324、20100630)。

1.2 油相的选择

油相在 IPM、霍霍巴油、菜籽油、乙酸乙酯、V_E 油等常见的油中选择。通常,油相分子体积越小溶解能力越强,而油相分子碳氢链过长不易形成纳米乳。充分考虑 3 种有效成分的溶解度,可选择 1 种或几种油混合作为油相。

1.3 表面活性剂的选择

表面活性剂在低毒的非离子型表面活性剂 Tween-80、RH-40 和 EL-40 中选择。将溶有药物的油分别与 3 种表面活性剂按照 1:9~9:1 的质量比混匀,在室温下用磁力搅拌器搅拌,逐滴滴加蒸馏水至临界点,观察体系的变化,并记录用去水的量。选择液体外观澄清透明、通过高速离心后纳米乳稳定不分层、通过透射电子显微镜观察和激光粒度仪测定粒径分布均匀、乳滴粒径在 1~100 nm 的配比,记录表面活性剂、油相、水相的质量比,并以三者作为伪三元相图的 3 个顶点,通过 origin 8.0 软件绘制伪三元相图,确定纳米乳的形成区域。

1.4 复方丙酸氯倍他索纳米乳类型的鉴别

将制备好的复方丙酸氯倍他索纳米乳分装在 2 个安瓿瓶中,再将油性染料苏丹红和水溶性燃料亚甲蓝分别滴入瓶中,静置 0.5 h,观察 2 种染料的扩散速度,若红色快于蓝色则为油包水(W/O)型,反之则为水包油(O/W)型。

1.5 复方丙酸氯倍他索纳米乳的品质检测

1.5.1 加速离心试验 取复方丙酸氯倍他索纳米乳适量于离心管中,以 5 000 r/min 的转速离心 25 min 后观察纳米乳的外观。

1.5.2 光稳定性试验 取复方丙酸氯倍他索纳米乳适量于安瓿瓶中,于强日光下室温放置 10 d,分别于放置 1,3,5,10 d 时取样观察其外观。

1.5.3 温度稳定性试验 取复方丙酸氯倍他索纳米乳适量分装于安瓿瓶中,分别置于 3,25,60 ℃ 条件下考察 30 d,每隔 5 d 取样观察其外观。

1.5.4 粒径分布 用激光粒度测定仪测定复方丙酸氯倍他索纳米乳的粒径大小,通过透射电子显微镜观察其形态。

1.6 复方丙酸氯倍他索纳米乳的安全性评价

1.6.1 皮肤急性毒性试验 取 Waster 大鼠 30 只,给药前 24 h 用脱毛剂将背部脊柱两侧毛脱去,每侧约 40 cm² 破损皮肤脱毛后消毒,用针头划“#”字,以渗血为度。试验分为完整皮肤、破损皮肤和对照 3 组,每组 10 只。完整皮肤和破损皮肤组涂复方丙酸氯倍他索纳米乳、对照组涂空白纳米乳各 2 g/kg,

固定 24 h,去除受试物,观察动物皮肤局部及全身中毒表现和死亡情况,连续观察 7 d^[7]。

1.6.2 皮肤刺激性试验 取大耳白兔 20 只,分为完整皮肤和破损皮肤 2 组,每组 10 只。采用同体对照,即两侧分别涂复方丙酸氯倍他索纳米乳和空白纳米乳各 1 g,固定 6 h 后去除受试药物,并于去除后 1,24,48 和 72 h 肉眼观察并记录皮肤变化,对皮肤刺激强度进行评价^[7]。同法每只动物再涂相应受试物 1 次/日、1 g/次,连续 7 d。在每次去除药物后 1,24,48 和 72 h 肉眼观察并记录有无红斑和水肿等情况,并进行刺激强度评价^[7]。

1.6.3 皮肤过敏试验 取健康豚鼠 30 只,分为复方丙酸氯倍他索纳米乳、空白纳米乳和阳性对照 3 组,每组 10 只。将 2,4-二硝基氯代苯配制成质量分数为 1%致敏浓度和 0.1%激发浓度作为阳性致敏物。涂受试物 0.1 g 于豚鼠左侧脱毛区,阳性对照

组涂质量分数为 1%致敏浓度的 2,4-二硝基氯代苯,右侧涂生理盐水作为对照。固定 6 h 后除去受试物,于第 7 天和第 14 天同法重复 1 次。再于末次给药后 14 天同法重复 1 次,此次阳性对照组改涂质量分数为 0.1%激发浓度的 2,4-二硝基氯代苯,固定 6 h 后除去受试物立即观察有无红斑、水肿、水泡和痂皮形成,然后于 24,48 和 72 h 再次观察,按皮肤过敏反应评分表评分^[7]。

2 结果与分析

2.1 复方丙酸氯倍他索纳米乳配方的确定

特比萘酚在 IPM 和乙酸乙酯中均有较高溶解度,溶解度 $\geq 45\%$,双甲脒在乙酸乙酯中的溶解度($\geq 20\%$)高于 IPM($\leq 15\%$),丙酸氯倍他索在乙酸乙酯中的溶解度也高于 IPM,且乙酸乙酯碳链最短,因此选择乙酸乙酯为复方丙酸氯倍他索的油相。

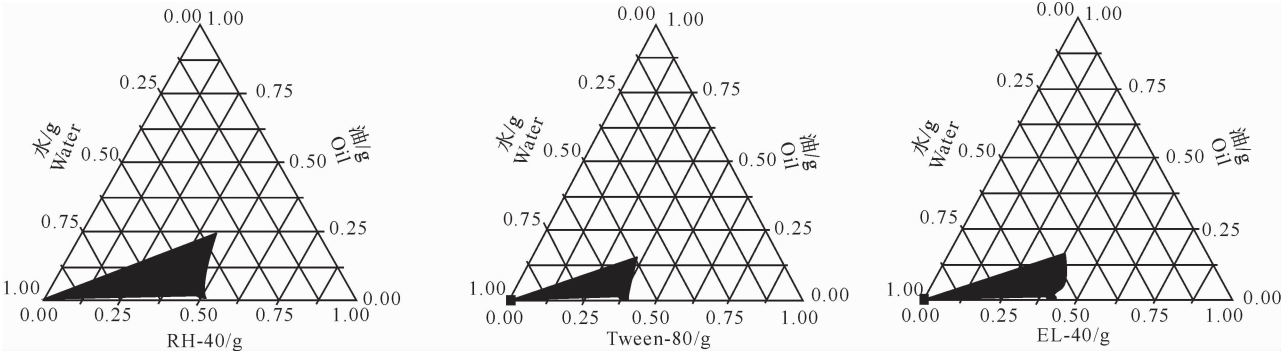


图 1 不同表面活性剂的伪三元相图

Fig.1 Different surfactant of pseudo-ternary phase diagram

由图 1 可以明显看出,以 RH-40 作为表面活性剂时形成的乳区面积最大,因此选择 RH-40 作为表面活性剂,且表面活性剂与油相的质量比为 6 : 4 时载药量最高。结合其他剂型中有效成分的含量,最终确定复方丙酸氯倍他索纳米乳的最佳配方(质量分数)为 RH-40 23%、乙酸乙酯 15.4%、特比萘酚 1%、双甲脒 0.05%、丙酸氯倍他索 0.05%。

滴有染料的纳米乳静置 0.5 h 后,红色染料有极少量扩散,大部分都浮在纳米乳表面,而蓝色染料

已扩散至接近瓶底,表明复方丙酸氯倍他索纳米乳是 O/W 型纳米乳。

2.2 复方丙酸氯倍他索纳米乳的品质检测

经光稳定性试验、加速离心试验、温度稳定性试验考察,复方丙酸氯倍他索纳米乳的外观仍然澄清透明,颜色无变化,无分层、破乳、析出等不稳定现象发生,表明复方丙酸氯倍他索纳米乳体系的稳定性良好。

表 1 复方丙酸氯倍他索纳米乳的粒径分布

Table 1 Particle size distribution of Compound CP nanoemulsion

粒径/nm Size	0~6.60	7.53	8.72	10.10	11.70	13.50	15.70	18.20	21.00	24.40	>24.40
分布率/% Mean intensity	0	0.3	4.6	11.4	17.7	20.8	19.6	14.7	8.2	2.6	0

如表 1 所示,复方丙酸氯倍他索纳米乳的平均粒径为 13.7 nm,粒径 7~9 nm 的纳米乳滴占

4.9%,粒径 10~19 nm 的占 84.2%,粒径 21~25 nm 的占 10.8%。图 2 显示,纳米乳乳滴呈大小不

一的球形,分布均匀。

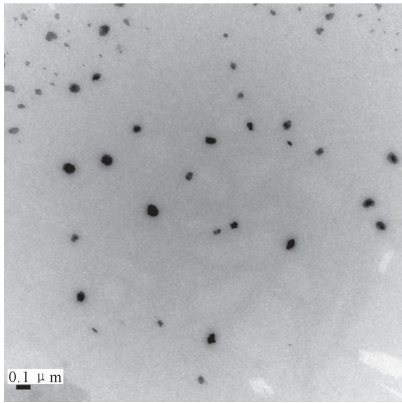


图 2 复方丙酸氯倍他索纳米乳的电镜照片
Fig. 2 The electron microscope of Compound CP nanoemulsion

2.3 复方丙酸氯倍他索纳米乳的安全性

2.3.1 急性毒性 大鼠除去受试物 7 d 内,呼吸、活动、觅食均正常,无异常反应。受试大鼠均无全身

中毒反应及死亡的情况发生,表明高剂量复方丙酸氯倍他索纳米乳外涂无急性毒性反应。

2.3.2 刺激性 经观察,破损皮肤组有 1 只大耳白兔于除去受试物 1 h 后皮肤略见红斑,但 24 h 后完全消退,72 h 后破损皮肤伤口完全愈合。其余动物未出现红斑或水肿现象。由表 2 可以看出,所有组别的反应平均分<0.5 分,表明受试物对正常皮肤及破损皮肤均无刺激性。单次给药对完整皮肤与破损皮肤刺激反应的平均值无明显差异。

表 3 显示,完整皮肤组皮肤刺激反应平均值均为 0,表明受试物对大耳白兔完整皮肤无刺激性。经观察发现,破损皮肤组于给药后第 4 天仅有 3 只白兔皮肤略见红斑,第 5 天和 6 天程度略有加重,于给药第 7 天后逐渐消退。给药后第 8 天完整及破损皮肤均未见红斑和水肿,破损皮肤组的伤口已逐渐愈合。根据评分标准,该试验的皮肤刺激指数<0.5,表明复方丙酸氯倍他索纳米乳多次给药对皮肤无刺激性。

表 2 复方丙酸氯倍他索纳米乳单次给药对大耳白兔皮肤刺激反应的平均值($n=10$)

Table 2 Average reaction value of Compound CP nanoemulsion single dosing of skin irritation test on rabbits ($n=10$)

组别 Group	受试物 Test substance	观察时间/h Observed time			
		1	24	48	72
完整皮肤 Intact skin	空白纳米乳 Blank nanoemulsion	0	0	0	0
	载药纳米乳 Compound CP nanoemulsion	0	0	0	0
破损皮肤 Damaged skin	空白纳米乳 Blank nanoemulsion	0.30	0	0	0
	载药纳米乳 Compound CP nanoemulsion	0.30	0	0	0

表 3 复方丙酸氯倍他索纳米乳多次给药对大耳白兔皮肤刺激反应的平均值($n=10$)

Table 3 SAverage reaction value of Compound CP nanoemulsion multiple dosing of skin irritation test on rabbits ($n=10$)

组别 Group	受试物 Test substance	观察时间/d Observed time									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
完整皮肤 Intact skin	空白纳米乳 Blank nanoemulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	载药纳米乳 Compound CP nanoemulsion	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
破损皮肤 Damaged skin	空白纳米乳 Blank nanoemulsion	0	0	0	0.27	0.55	0.55	0.27	0	0	0
	载药纳米乳 Compound CP nanoemulsion	0	0	0	0.31	0.59	0.59	0.31	0	0	0

2.3.3 致敏性 由表 4 可以看出,豚鼠皮肤对复方丙酸氯倍他索纳米乳和空白纳米乳无过敏反应,而

对致敏物有极强的过敏反应。

表 4 复方丙酸氯倍他索纳米乳对豚鼠皮肤的致敏性($n=10$)

Table 4 Average response of Compound CP nanoemulsion skin allergy test on guinea pigs ($n=10$)

受试物 Test substance	观察时间/h Observed time				致敏率/% Sensitization	致敏强度 Sensitization intensity
	6	24	48	72		
空白纳米乳 Blank nanoemulsion	0	0	0	0	0	无 None
载药纳米乳 Compound CP nanoemulsion	0	0	0	0	0	无 None
2,4-二硝基氯代苯 2,4-dinitro chloro benzene	1.0	3.1	2.3	1.0	100	极强 Strong

3 讨论

目前,特比萘酚、丙酸氯倍他索、双甲咪作为良好的抗菌杀螨药物受到广泛研究^[8-10],且已有很多

相应的剂型出现,但尚未发现将三者复方并制成兼具抗菌与杀螨功效的纳米乳剂的报道,这也是本研究的创新之处。O/W 型纳米乳制剂可有效提高难溶药物的溶解度^[11],在本研究中增强了 3 种有效成

分的溶解度。纳米乳与软膏、洗剂等已有外用剂型相比,具有粒径小、缓释、靶向等优势,可大大提高疗效。本研究通过一系列安全性和稳定性试验证实,其对供试动物外用安全且品质稳定。

表面活性剂的选择是制备纳米乳的重要步骤,本研究的目的是制备水包油(O/W)型纳米乳,因此应选择亲水-亲油平衡(HLB)值在8~18的乳化剂。因非离子表面活性剂具有受离子强度、无机盐、酸、碱影响小,本身毒性和刺激性小,能与大多数药物配伍的优势^[12],因此本研究中的表面活性剂选择常见的非离子型表面活性剂。对药物的安全性评价是必要的,因纳米乳中含有一定量的表面活性剂,对动物机体有不同程度的毒性或者副作用^[13],一般离子型表面活性剂毒性较大,非离子型表面活性剂毒性较小,制备纳米乳时表面活性剂用量一般在20%~30%^[12],高剂量可能对皮肤产生刺激。本研究制备的纳米乳无毒性、无刺激性的可能原因是,选用的非离子型表面活性剂RH-40的质量占整个体系的23%,油相乙酸乙酯的质量只占15.4%,因其毒性低,因此对皮肤的刺激性小,而有效成分丙酸氯倍他索、双甲脒、特比萘酚均参考其他剂型的规格确定其含量。

理论上纳米乳较其他剂型具有透皮性好、缓释、靶向等优点,但还需进行试验验证,因此复方丙酸氯倍他索纳米乳的透皮效果及临床药效还有待进一步研究。

4 结 论

本研究研制的复方丙酸氯倍他索是一种品质稳定、安全、粒径在1~25 nm的宠物外用药物,为宠物临床皮肤病的治疗提供了可靠依据。

[参考文献]

- [1] 刘丽芳,张阳德. 中药纳米乳的研究进展 [J]. 中医药导报, 2010,16(8):112.
Liu L F, Zhang Y D. Progress in medicine nanoemulsion [J]. Guiding Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, 2010,16(8):112. (in Chinese)
- [2] Kraeling M E, Ritschel W A. Development of a colonic release capsule dosage form and the absorption of insulin [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1992,14(3):199-209.
- [3] Lee M J, Lee M H, Shim C K. Inverse targeting of drug to reticuloendothelial System- rich organs by lipid microemulsion emulsified with poloxamer 388 [J]. Int J Pharm, 1995,113(2):175-187.
- [4] Babette B, Claudia V. The advantage of polymer addition to a

- non-ionic oil in water microemulsion for the dermal delivery of progesterone [J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008,349:269-273.
- [5] 徐岩,陈祖基,宋洁贞,等. 毛果芸香碱微乳滴眼剂及滴眼液在兔眼房水中的药代动力学研究 [J]. 中华眼科杂志, 1999,35(6):446-448.
Xu Y, Chen Z J, Song J Z, et al. Ocular pharmacokinetics of pilocarpine micron emulsion in rabbits [J]. Chinese Journal of Ophthalmology, 1999,35(6):446-448. (in Chinese)
 - [6] 杨选蒙. 犬猫螨虫和真菌混合感染的诊治 [J]. 农业新技术, 2002(3):32.
Yang X M. Diagnosis and treatment of mixed mites and fungal infections on dogs and cats [J]. New Agricultural Technologies, 2002(3):32. (in Chinese)
 - [7] 楼宜嘉. 药物毒理学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:170-177.
Lou Y J. Drug toxicology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005:170-177. (in Chinese)
 - [8] 谭方舒,杨崇艳,张宏. 特比萘芬与伊曲康唑治疗甲真菌病疗效的 Meta 分析 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010,24(11):989-991.
Tan F S, Yang C Y, Zhang H. Meta-analysis of the effective of Terbinafine versus Itraconazole in the treatment of Onychomycosis [J]. Chin J Derm Venereol, 2010,24(11):989-991. (in Chinese)
 - [9] 毕志刚,倪容之,秦万章. 复方丙酸氯倍他索软膏治疗寻常性银屑病临床疗效观察 [J]. 临床皮肤科杂志, 2004,33(5):310-312.
Bi Z G, Ni R Z, Qin W Z. Efficacy of clobetasol propionate compound ointment for the treatment of psoriasis vulgaris [J]. Journal of Clinical Dermatology, 2004,33(5):310-312. (in Chinese)
 - [10] 钱学智,徐巧琴. 小鼠鼠皮刺螨病的诊断与防治 [J]. 中国兽医寄生虫病, 2002,10(2):56-58.
Qian X Z, Xu Q L. Diagnosis and prevention of mouse skin puncture mite disease [J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2002,10(2):56-58. (in Chinese)
 - [11] 王晓黎,蒋雪涛,刘皋林,等. O/W 型微乳对水难溶性药物增溶作用的研究 [J]. 第二军医大学学报, 2002,23(1):84-86.
Wang X L, Jiang X T, Liu G L, et al. Comparison of drug incorporation into non-ionic micellar and O/W microemulsion systems [J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2002,23(1):84-86. (in Chinese)
 - [12] 张阳德. 纳米药理学 [M]. 北京:化工工业出版社, 2006:168-170.
Zhang Y D. Nano-pharmacology [M]. Beijing: Chemistry and Industry Press, 2006:168-170. (in Chinese)
 - [13] 沈熊,吴伟. 自乳化和自微乳化释药系统 [J]. 复旦大学学报:医学版, 2003,30(2):180-183.
Shen X, Wu W. Self-emulsifying and Self-micro-emulsifying drug delivery system [J]. Fudan Univ J: Med Sci, 2003,30(2):180-183. (in Chinese)