

DOI:CNKI:61-1390/S.20111216.1123.013

网络出版时间:2011-12-16 11:23

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20111216.1123.013.html>

复方特比萘芬纳米乳的制备及其含量测定

刘梅雪, 欧阳五庆, 宋冰, 吴敬超, 芮弦

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】** 研制复方特比萘芬纳米乳, 并对其含量进行测定。 **【方法】** 以特比萘芬、丁香酚和红霉素为供试药物, 通过绘制伪三元相图筛选复方特比萘芬纳米乳处方, 利用透射电子显微镜(TEM)、Nicomp 388/Zeta PALS 激光粒度测定仪分别考察其形态和粒径, 采用染色法鉴别纳米乳的类型, 利用高效液相色谱法对其含量测定方法进行研究。 **【结果】** 复方特比萘芬纳米乳最佳配方中各组分的质量分数分别为: 特比萘芬 1.3%, 丁香酚 2.5%, 红霉素 1.3%, 吐温-80 24%, 无水乙醇 12%, 肉豆蔻酸异丙酯 2%, 蒸馏水 56.9%。透射电镜下, 复方特比萘芬纳米乳呈圆球形, 无粘连; 其平均粒径(Z-Average)为 11.9 nm, 多分散系数(PDI)为 0.06。另外还建立了精确测定复方特比萘芬纳米乳 3 种主药含量的高效液相色谱法。 **【结论】** 复方特比萘芬纳米乳制备工艺简单, 稳定性良好且质量可控, 有望应用于宠物临床。

【关键词】 特比萘芬; 丁香酚; 红霉素; 纳米乳; 含量测定; 高效液相色谱法

【中图分类号】 S859.5⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)01-0021-08

Preparation and content determination of compound terbinafine nanoemulsion

LIU Mei-xue, OUYANG Wu-qing, SONG Bing, WU Jing-chao, RUI Xian

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

Abstract: **【Objective】** The compound terbinafine nanoemulsion was prepared and its contents were determined. **【Method】** Taking terbinafine, eugenol, and erythromycin as tested medicines, the preparation of compound terbinafine nanoemulsion was optimized by studying the pseudoternary phase diagrams. Its shape and particle size distribution were detected by TEM and Nicomp 388/Zeta PALS Particle Sizing System and its type was identified by staining, the method of its determination was studied by HPLC. **【Result】** The optimum preparation was $w(\text{terbinafine})=1.3\%$, $w(\text{eugenol})=2.5\%$, $w(\text{erythromycin})=1.3\%$, $w(\text{Tween-80})=24\%$, $w(\text{ethanol})=12\%$, $w(\text{isopropyl myristate})=2\%$, $w(\text{distilled water})=56.9\%$. The compound terbinafine nanoemulsion was spherical and no adhesion, with a mean diameter of 11.9 nm and the polydispersity index (PDI) 0.06. The method of the three main component determination by HPLC was established. **【Conclusion】** The preparation procedure of compound terbinafine nanoemulsion is simple and the quality is under control. It is expected to be applicable to the veterinarian clinic.

Key words: terbinafine; eugenol; erythromycin; nanoemulsion; content determination; HPLC

特比萘芬是广谱抗真菌的新一代丙烯胺类药物, 为白色或类白色结晶性粉末, 难溶于水, 可溶于

* [收稿日期] 2011-06-07

[基金项目] 陕西省重大科技创新专项(K332020916)

[作者简介] 刘梅雪(1986—), 女, 黑龙江哈尔滨人, 在读硕士, 主要从事纳米药物学研究。E-mail: lmx1011@sina.com

[通信作者] 欧阳五庆(1960—), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事纳米药物学和细胞生物学研究。

E-mail: oywq506@sina.com

有机溶剂,具有杀菌和抑菌双重作用。特比萘芬对临床常见的真菌具有较强抑制作用,且体内无蓄积,副反应低^[1]。丁香酚是很多中草药如丁香、肉桂中的有效成分,几乎不溶于水,与乙醇、乙醚及油等可混溶,是一种良好的植物源药物,具有较强的抑制真菌、细菌和杀除螨虫等作用^[2-3]。红霉素属大环内酯类抗生素,为白色或类白色的结晶或粉末,微有引湿性,难溶于水,易溶于甲醇、乙醇等有机溶媒,不仅对革兰氏阳性菌有强大抗菌作用,而且对革兰氏阴性菌也有抑制作用。红霉素毒性低,但刺激性强,犬、猫内服可引起呕吐、腹痛、腹泻等症状。

纳米乳是由油相、水相、表面活性剂及助表面活性剂,以适当比例混合而成的一种透明或半透明、低黏度的动力学和热力学稳定体系,其粒径一般为1~100 nm^[4]。大量资料表明,纳米乳具有制备简单、安全性高、热力学稳定、缓释、靶向及提高药物生物利用度、增大难溶性药物溶解度、增强易水解药物稳定性等优点^[5-7]。

本研究将特比萘芬、丁香酚和红霉素进行组方,制备复方特比萘芬纳米乳,并建立复方特比萘芬纳米乳有效成分含量的测定方法,以期为临床提供一种综合性治疗宠物皮肤病的纳米复方药物,同时为其批量生产提供一种科学的有效成分含量测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要药品与试剂 特比萘芬,大连美仑生物技术有限公司;丁香酚,江西省吉安市恒诚香料油提炼厂;红霉素,广东省韶关市集琦药业有限公司;肉豆蔻酸异丙酯,浙江物美化学品有限公司;液体石蜡,无锡市健业试剂化工有限公司;橄榄油,江西省吉安盛大香料油有限公司;吐温-80,天津市恒星化学试剂制造有限公司;无水乙醇,西安三浦化学试剂有限公司。

1.1.2 主要仪器 JEM-1230 型透射电子显微镜,日本 JEOL 公司;Nicom 388/Zeta PALS 激光粒度测定仪,Zetasizer Nano ZS 型,英国 Malvern instrument 公司;DS224S 电子天平,德国 Sartorius 公司;TGL 16B 型台式高速离心机,湖南星科科学仪器有限公司;Waters 600E 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;UV-2450 紫外-可见分光光度计,日本岛津公司;AS-3120 超声仪,昆山超声仪器有限公司;pHS-3C 型实验室 pH 计,上海雷磁。

1.2 复方特比萘芬纳米乳配方的筛选

1.2.1 油相 本复方制剂中的 3 种主药均难溶于水,因此将 3 种主药溶于油脂中,根据不同油脂对 3 种主药的溶解度大小,选择溶解度较大的作为油相。油脂从肉豆蔻酸异丙酯(IPM)、液体石蜡(Paraffin oil)和橄榄油(Olive oil)中选择。

1.2.2 助表面活性剂 助表面活性剂能够降低油水间的界面张力、增加界面膜的流动性、调节表面活性剂的亲水亲油平衡(HLB)。本研究中所选用的油脂未能将药物完全溶解,助表面活性剂可作为辅助溶剂使药物完全溶解。预试验发现,无水乙醇对 3 种药物的溶解能力最佳,因此确定无水乙醇为助表面活性剂。

1.2.3 表面活性剂 本研究选用药剂学中常用的 3 种表面活性剂,即聚氧乙烯蓖麻油(EL-40)、聚氧乙烯氢化蓖麻油(RH-40)、吐温-80(Tween-80)用于试验。室温条件下,将上述 3 种表面活性剂与已确定的油相分别按质量比 9.8 : 0.2, 9.5 : 0.5, 9 : 1, 8.75 : 1.25, 8.5 : 1.5, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 4 : 6, 3 : 7, 2 : 8, 1 : 9 混匀,边搅拌边逐滴加入蒸馏水,直至形成透明、澄清的乳液。记录当体系由黏稠突然变稀时的临界点的滴水量,并计算体系中各成分的质量分数。分别以表面活性剂、油相、水相作为相图的 3 个顶点,利用 Origin Pro 7.5 软件绘制三元相图,根据乳区的大小确定表面活性剂^[8-9]。

1.2.4 表面活性剂与助表面活性剂质量比(K_m) 根据上述试验选定的油相、表面活性剂和助表面活性剂,通过绘制伪三元相图确定 K_m 值。室温下,将确定的表面活性剂与助表面活性剂按 K_m 值分别为 4 : 1, 3 : 1, 2 : 1 混匀,然后与确定的油相分别按质量比 9.8 : 0.2, 9.5 : 0.5, 9 : 1, 8.75 : 1.25, 8.5 : 1.5, 8 : 2, 7 : 3, 6 : 4, 5 : 5, 4 : 6, 3 : 7, 2 : 8, 1 : 9 混匀,边搅拌边逐滴加入蒸馏水,直至形成透明、澄清的乳液。记录当体系由黏稠突然变稀时的临界滴水量,计算体系中各成分的质量百分比。分别以表面活性剂/助表面活性剂、油相、水相作为相图的 3 个顶点绘制伪三元相图,根据乳区的大小确定 K_m 。

1.3 复方特比萘芬纳米乳的结构类型鉴别

采用染色法鉴别纳米乳的类型。将水溶性的亚甲基蓝和油溶性苏丹红分别滴加到同批次的纳米乳中,观察 2 种染色剂在纳米乳中扩散速度的快慢,判断其结构类型^[10]。

1.4 复方特比萘芬纳米乳的形态观察及粒径分布

取复方特比萘芬纳米乳适量,稀释 5 倍后分成

2份,1份滴加在覆盖碳膜的铜网上,用质量分数2.0%的磷钨酸负染30 s,自然挥干,在透射电镜下观察纳米乳的形态;另1份用激光粒度分析仪测定其平均粒径和分散系数。

1.5 复方特比萘芬纳米乳中有效成分含量测定方法的建立

采用HPLC测定复方特比萘芬纳米乳中的特比萘芬、丁香酚和红霉素含量。

1.5.1 特比萘芬含量 (1)色谱条件。色谱柱:Di-amonsil C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-0.05 mol/L 醋酸铵缓冲液溶液(V(甲醇):V(醋酸铵)=80:20);检测波长:282 nm;流速:1.2 mL/min;柱温:室温;进样量:10 μL。

(2)方法专属性试验。分别取已配制好的特比萘芬对照品溶液(100 μg/mL)、复方特比萘芬纳米乳供试液和空白纳米乳供试液,过滤后超声脱气,按1.5.1(1)的色谱条件进样测定。

(3)标准曲线的建立。用流动相稀释特比萘芬对照品溶液,精密配制质量浓度分别为10,15,20,25,30 μg/mL的特比萘芬对照品系列溶液,按1.5.1(1)的色谱条件进样测定,以对照品药物质量浓度(x)对色谱峰面积(y)进行线性回归。

(4)回收率试验。精密量取特比萘芬对照品溶液适量,置10 mL容量瓶中,加入空白纳米乳定容至刻度,用流动相配制成质量浓度分别为20,25,30 μg/mL的待测溶液,按1.5.1(1)的色谱条件进行测定,每个质量浓度重复进样3次,将测定的峰面积值代入标准曲线方程,计算出实测质量浓度,然后计算其回收率、平均回收率和相对标准偏差(RSD)。

(5)进样重复性和精密度试验。①重复性。选取回收率试验中的1个待测样品,按1.5.1(1)的色谱条件连续进样5次,计算平均峰面积和RSD。②精密度。精密吸取1.5.1(3)中配制的10,20,30 μg/mL的特比萘芬对照品溶液,按1.5.1(1)的色谱条件进行测定,记录峰面积并计算峰面积的RSD。日内精密度试验于1 d内的不同时间点进行测定,分5次完成;日间精密度试验每天测定1次,在5 d内完成。

1.5.2 丁香酚含量 (1)色谱条件。色谱柱:Di-amonsil C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(V(甲醇):V(水)=59:41);检测波长:282 nm;流速:1.0 mL/min;柱温:室温;进样量:10 μL。

(2)方法专属性试验。分别取丁香酚对照品溶

液、复方特比萘芬纳米乳供试液和空白纳米乳供试液,过滤后超声脱气,按1.5.2(1)的色谱条件进样测定。

(3)标准曲线的建立。用流动相稀释丁香酚对照品溶液,精密配制质量浓度分别为20,40,60,80和100 μg/mL的丁香酚对照品系列溶液,按1.5.2(1)的色谱条件进样测定,以对照品药物质量浓度(x)对色谱峰面积(y)进行线性回归。

(4)回收率试验。精密量取丁香酚对照品溶液适量,置10 mL容量瓶中,加入空白纳米乳定容至刻度,用流动相配制成质量浓度分别为20,25,30 μg/mL的待测溶液,按1.5.2(1)的色谱条件进行测定,每个质量浓度重复进样3次,将测定的峰面积值代入标准曲线方程,计算出实测质量浓度,然后计算其回收率、平均回收率和RSD。

(5)进样重复性和精密度试验。①重复性。选取回收率试验中的1个待测样品,按1.5.2(1)的色谱条件重复进样5次,计算平均峰面积和峰面积的RSD。②精密度。精密吸取1.5.2(3)中配制的20,60,100 μg/mL的丁香酚对照品溶液,按1.5.2(1)的色谱条件进行测定,记录峰面积并计算峰面积的RSD。

1.5.3 红霉素含量 (1)色谱条件。色谱柱:Di-amonsil C18柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.1 mol/L 磷酸二氢铵(三乙胺调pH为6.4)-乙腈(V(磷酸二氢铵):V(乙腈)=65:35);检测波长:215 nm;流速为1.0 mL/min;柱温:30℃;进样量:10 μL。

(2)方法专属性试验。分别取红霉素对照品溶液、复方特比萘芬纳米乳供试液和空白纳米乳供试液,过滤后超声脱气,按1.5.3(1)的色谱条件进样测定。

(3)标准曲线的建立。用流动相稀释红霉素对照品溶液,精密配制质量浓度分别为2.4,3.2,4.8,5.6,6.4 mg/mL的红霉素对照品系列溶液,按1.5.3(1)的色谱条件进样测定,以对照品药物质量浓度(x)对色谱峰面积(y)进行线性回归。

(4)回收率试验。精密量取红霉素对照品溶液适量,置10 mL容量瓶中,加入空白纳米乳定容至刻度,用流动相配制成质量浓度分别为3.0,3.5,4.0 mg/mL的待测溶液,按1.5.3(1)的色谱条件进行测定,每个质量浓度重复进样3次,将测定的峰面积值代入标准曲线方程,计算出实测质量浓度,然后计算其回收率、平均回收率和RSD。

(5)进样重复性和精密度试验。①重复性。选取回收率试验中的 1 个待测样品,进行重复性试验。②精密度。精密吸取 1.5.3(3)中配制的 2.4,4.8,6.4 mg/mL 的红霉素对照品溶液,按 1.5.3(1)的色谱条件进行测定,记录峰面积并计算峰面积的 RSD。

1.6 复方特比萘芬纳米乳的稳定性考察

1.6.1 加速试验 将 3 批纳米乳密封于玻璃瓶内,于(30±2)℃、相对湿度(65±5)%条件下放置 6 个月,分别于 1,2,3,6 个月时取样,分析纳米乳的性状及含量变化。

1.6.2 长期试验 将 3 批纳米乳密封于棕色玻璃瓶内,于(25±2)℃、相对湿度(60±10)%条件下放置 12 个月,分别于 0,3,6,9 和 12 个月时取样,分析纳米乳的性状及含量变化,并参考药物有效期的统

计分析方法,计算复方特比萘芬纳米乳的有效期。

2 结果与分析

2.1 复方特比萘芬纳米乳配方的确定及制备

2.1.1 油相的确定 特比萘芬在肉豆蔻酸异丙酯、液体石蜡、橄榄油中的溶解度分别 0.5,0.1,0.2 g/mL;红霉素在其中的溶解度分别 0.05,0.01,0.01 g/mL;丁香酚在其中的溶解度分别 2.0,1.0,0.1 g/mL。为提高纳米乳载体对 3 种药物的载药量,确定油相为肉豆蔻酸异丙酯。

2.1.2 表面活性剂的确定 表面活性剂是纳米乳体系形成的关键物质,其能降低界面张力,形成界面吸附膜,促使纳米乳的形成。由图 1 可知,当以吐温-80 为表面活性剂时,形成的纳米乳区域最大,因此确定吐温-80 为表面活性剂。

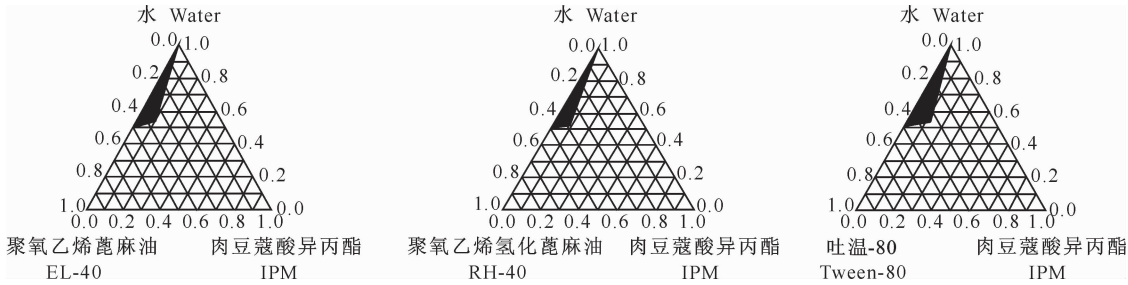


图 1 表面活性剂对复方特比萘芬纳米乳形成区域的影响
黑色部位为纳米乳区。图 2 同

Fig. 1 Effects of surfactant on the nanoemulsion formation
The black area is nanoemulsion region. The same as table 2

2.1.3 K_m 的确定 由图 2 可知,当 K_m 为 2 : 1 时所形成的纳米乳区域最大,因此将 K_m 确定为 2 : 1。

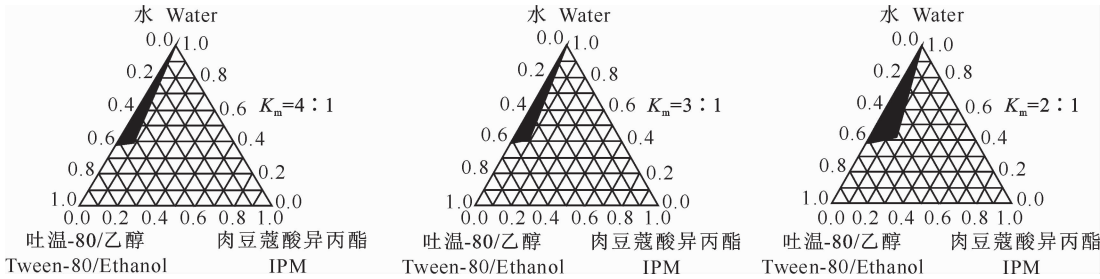


图 2 不同 K_m 值对复方特比萘芬纳米乳形成区域的影响
Fig. 2 Effects of K_m on nanoemulsion formation

2.1.4 复方特比萘芬纳米乳配方的确定 分析确定的复方特比萘芬纳米乳中各组分的质量分数分别为:特比萘芬 1.3%,丁香酚 2.5%,红霉素 1.3%,吐温-80 24%,无水乙醇 12%,肉豆蔻酸异丙酯 2%,蒸馏水 56.9%。

2.1.5 复方特比萘芬纳米乳的制备 室温下,依上述配方量将特比萘芬、丁香酚和红霉素溶于肉豆蔻

酸异丙酯中,然后加入无水乙醇使其全部溶解,再加入吐温-80 搅拌均匀,最后边搅拌边滴加配方量的蒸馏水,即可制备出复方特比萘芬纳米乳。

2.2 复方特比萘芬纳米乳的结构类型

按前文配方制备的复方特比萘芬纳米乳液为淡黄色液体,分别滴加亚甲基蓝和苏丹红后发现,亚甲基蓝在纳米乳中的扩散速度明显快于苏丹红,表明

所制备的纳米乳为水包油(O/W)型。

2.3 复方特比萘芬纳米乳的形态及粒径分布

在透射电镜下,复方特比萘芬纳米乳乳滴呈圆球形,分布均匀,无粘连,分散性良好(图 3)。复方

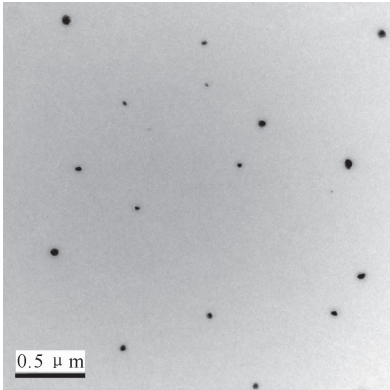


图 3 复方特比萘芬纳米乳的透射电镜观察(×50 000)

Fig. 3 Transmission electron micrograph of compound terbinafine nanoemulsion(×50 000)

2.4 复方特比萘芬纳米乳中有效成分含量的测定

2.4.1 特比萘芬含量 由图 5 可知,空白纳米乳对特比萘芬的样品测定无干扰,处方中其他成分对特比萘芬的测定也无干扰,说明本研究建立的测定方法专属性好。

通过线性回归求得特比萘芬的标准曲线方程为 $y=47\,557x-26\,313(R^2=0.997\,8)$,特比萘芬在 $10\sim30\,\mu\text{g/mL}$ 的检测质量浓度范围内线性关系良好。加样回收率试验结果表明,特比萘芬的平均回

特比萘芬纳米乳的平均粒径(Z-Average)为 $11.9\,\text{nm}$,多分散系数(PDI)为 0.06 ,其中粒径小于 $20\,\text{nm}$ 的乳滴占 95.3% ,可见其粒径分布范围较窄,粒径大小均一(图 4)。

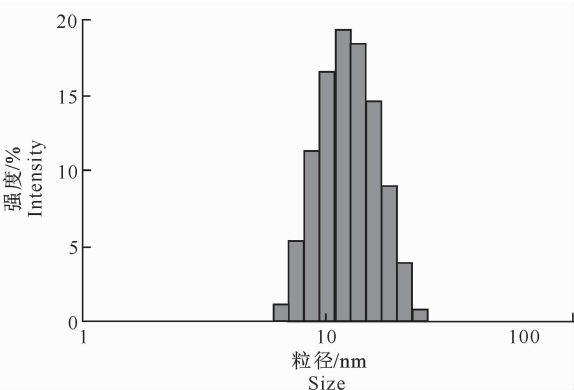


图 4 复方特比萘芬纳米乳的粒径分布

Fig. 4 Droplet size distribution of compound terbinafine nanoemulsion

收率为 $(98.80\pm1.55)\%$,RSD 为 1.57% ,表明测定方法的准确度高。进样重复性试验表明,平均峰面积为 $901\,595.7$,RSD 为 1.03% ;平均保留时间为 $16.320\,\text{min}$,RSD 为 0.56% ,表明该方法重复性良好。精密度试验表明,日内精密度的 RSD 为 2.00% ,日间精密度的 RSD 为 2.13% ,说明该方法精密度高。利用该方法测得复方特比萘芬纳米乳中特比萘芬的质量分数为 1.27% 。

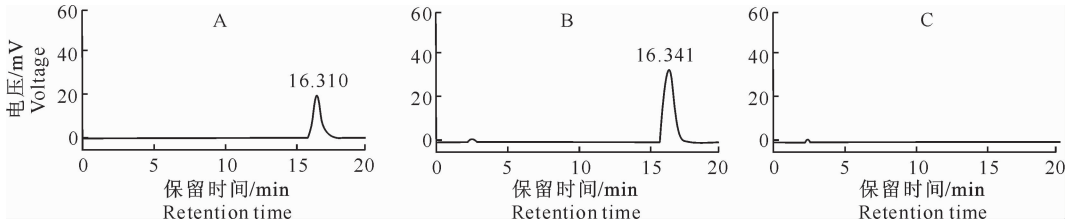


图 5 复方特比萘芬纳米乳中特比萘芬的色谱图

A. 特比萘芬对照品; B. 复方特比萘芬纳米乳; C. 空白纳米乳

Fig. 5 Chromatogram of terbinafine in compound terbinafine nanoemulsion

A. Terbinafine reference; B. Compound terbinafine nanoemulsion; C. Blank nanoemulsion

2.4.2 丁香酚含量 由图 6 可知,空白纳米乳对丁香酚的样品测定无干扰,复方特比萘芬纳米乳中其他成分对丁香酚的测定也无影响,说明该方法专属性好。

通过线性回归,求得丁香酚的标准曲线方程为 $y=14\,662x+2\,953.6(R^2=0.997\,1)$,丁香酚在 $20\sim100\,\mu\text{g/mL}$ 的检测质量浓度范围内线性关系良

好。加样回收率试验表明,丁香酚的平均回收率为 $(98.48\pm1.01)\%$,RSD 为 1.03% ,表明该测定方法的准确度高。5 次重复进样所得的平均峰面积为 $575\,945.6$,RSD 为 0.81% ;平均保留时间为 $8.788\,\text{min}$,RSD 为 2.36% ,表明该方法重复性良好。精密度试验表明,日内精密度的 RSD 为 1.38% ,日间精密度的 RSD 为 1.92% ,表明该方法的精密度高。

利用该方法测得复方特比萘芬纳米乳中丁香酚的质量分数为 2.5%。

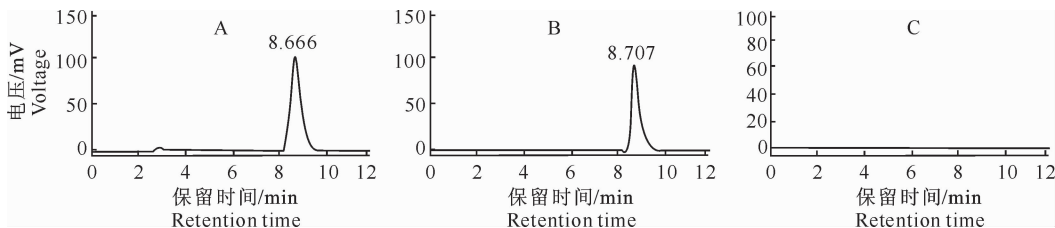


图 6 复方特比萘芬纳米乳中丁香酚的色谱图

A. 丁香酚对照品; B. 复方特比萘芬纳米乳; C. 空白纳米乳

Fig. 6 Chromatogram of eugenol in compound terbinafine nanoemulsion

A. Eugenol reference; B. Compound terbinafine nanoemulsion; C. Blank nanoemulsion

2.4.3 红霉素含量 由图 7 可知,空白纳米乳对红霉素的样品测定无干扰,复方特比萘芬纳米乳中其他成分对红霉素的测定也无干扰,说明该方法专属性好。

通过线性回归,求得红霉素的标准曲线方程为 $y=347\ 570x+229\ 750(R^2=0.998\ 2)$,红霉素在 2.4~6.4 mg/mL 的检测质量浓度范围内线性关系良好。加样回收率试验表明,红霉素的平均回收率

为 $(98.90\pm2.05)\%$,RSD 为 2.08%,表明该测定方法的准确度高。5 次重复进样的平均峰面积为 1 262 021,RSD 为 0.41%;平均保留时间为 7.109 min,RSD 为 0.59%,表明该方法重复性良好。精密密度试验表明,日内精密度的 RSD 为 1.12%,日间精密度的 RSD 为 1.67%,表明该方法的精密度高。利用该方法测得复方特比萘芬纳米乳中红霉素的质量分数为 1.26%。

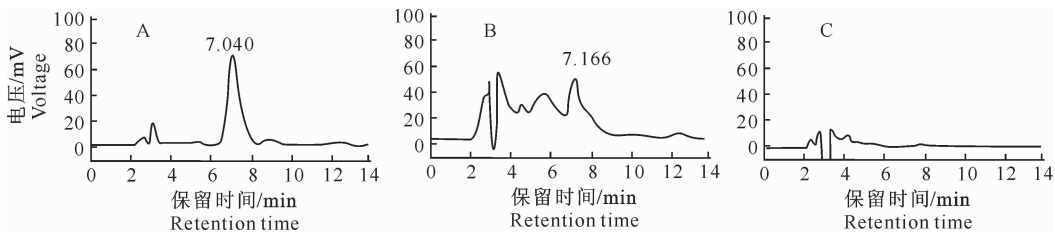


图 7 复方特比萘芬纳米乳中红霉素的色谱图

A. 红霉素对照品; B. 复方特比萘芬纳米乳; C. 空白纳米乳

Fig. 7 Chromatogram of erythromycin in compound terbinafine nanoemulsion

A. Erythromycin reference; B. Compound terbinafine nanoemulsion; C. Blank nanoemulsion

2.5 复方特比萘芬纳米乳的稳定性

2.5.1 加速试验 加速试验条件下,复方特比萘芬纳米乳的外观一直保持澄明均一,未见分层、絮凝、色变和破乳等现象。由表 1 可知,1,2,3 和 6 个月

时的特比萘芬、丁香酚和红霉素含量与试验开始时(0 月)相比,差异均不显著($P>0.05$),说明本研究制备的复方纳米乳稳定性较好。

表 1 复方特比萘芬纳米乳加速试验中药物有效成分的质量分数

Table 1 Results of accelerated test of compound terbinafine nanoemulsion

%

时间/月 Time	特比萘芬 Terbinafine	丁香酚 Eugenol	红霉素 Erythromycin	时间/月 Time	特比萘芬 Terbinafine	丁香酚 Eugenol	红霉素 Erythromycin
0	1.26±0.02	2.50±0.06	1.25±0.03	3	1.24±0.08	2.49±0.12	1.23±0.06
1	1.25±0.03	2.50±0.05	1.25±0.04	6	1.22±0.11	2.47±0.15	1.21±0.10
2	1.25±0.05	2.49±0.08	1.24±0.07				

2.5.2 长期试验 在长期试验条件下,复方特比萘芬纳米乳外观一直保持澄明均一,未见分层、絮凝、色变和破乳等现象。纳米乳放置 3,6,9,12 个月时,分别计算体系中特比萘芬、丁香酚和红霉素质量分数与各自 0 月份质量分数的比值,即为相对含量,结

果见图 8。由图 8 可知,随着放置时间的延长,3 种有效成分的相对含量逐渐降低。通过药物有效期统计推断方法计算可知,特比萘芬的有效期为 23.20 个月,丁香酚的有效期为 19.80 个月,红霉素的有效期为 22.52 个月。综合多种因素考虑,将复方特比

萘芬纳米乳的有效期定为 19 个月。

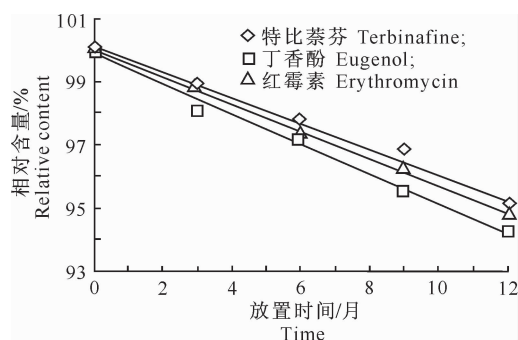


图 8 复方特比萘芬纳米乳长期试验中
药物有效成分相对含量的变化曲线

Fig. 8 Relative content-time curves of active ingredients
of compound terbinafine nanoemulsion
in long-term experiment

3 讨 论

本研究根据纳米乳的形成机理及特比萘芬、丁香酚和红霉素的物理性质,成功制备了复方特比萘芬纳米乳,克服了特比萘芬、丁香酚和红霉素水溶性差、物理性质不稳定等缺点,并提高了药物的生物利用度。

纳米乳通常由表面活性剂、助表面活性剂、油相、水相等组分在适当质量比下自发形成,纳米乳各组分的选择对纳米乳的形成至关重要。本研究通过滴定法绘制伪三元相图,对制备复方特比萘芬纳米乳的处方进行了优化筛选,确定了复方特比萘芬纳米乳的最佳配方,并对复方特比萘芬纳米乳的类型、外观性状、形态和粒径分布进行了评价。通过三元相图可知,当表面活性剂为吐温-80 时所形成的纳米乳区域最大,表示纳米乳体系更加稳定,因此确定以乳化能力强且安全性较高的吐温-80 作为本配方的表面活性剂。通过考察肉豆蔻酸异丙酯、液体石蜡和橄榄油 3 种油相对药物主要成分的溶解度发现,短链油肉豆蔻酸异丙酯对药物的溶解能力最佳,较易形成纳米乳^[11],为提高纳米乳载体对 3 种药物的载药量,确定油相为肉豆蔻酸异丙酯。在复方特比萘芬纳米乳中,3 种主要药物成分均增溶在纳米乳液滴中,减少了与外相接触的机会,因此药物的稳定性均有所提高。以吐温-80 为表面活性剂,无水乙醇为助表面活性剂,肉豆蔻酸异丙酯为油相,并利用伪三元相图优选配方,结果表明,当 K_m 值为 2 : 1, m (混合表面活性剂) : m (油相) = 9 : 1 时,所形成的纳米乳澄清透明,稳定性良好,在透射电镜下乳滴呈圆球形,分布均匀,无粘连,粒径分布范围狭窄,说

明用本研究制备的纳米乳符合人们对其性质的要求^[12-13]。

目前,已有关于特比萘芬、丁香酚和红霉素其他剂型高效液相色谱(HPLC)测定方法的报道^[14-16],但尚未见复方特比萘芬纳米乳中 3 种药物测定方法的研究。工业生产中对于一种药物新剂型都需要有一种准确、灵敏、可靠的定量分析方法,复方制剂的含量测定方法首选 HPLC 法。根据药典要求或样品对紫外光的吸收波长,一部分复方制剂可以建立利用 HPLC 同时测定 2~3 种主药成分的分析方法,另一部分复方制剂则建立的是分别测定主药各成分的 HPLC 分析方法。本研究中,特比萘芬与丁香酚的最大吸收波长均为 282 nm,红霉素的最大吸收波长为 215 nm。由于特比萘芬和丁香酚在 215 nm 及其附近波长的吸收较弱,红霉素在 282 nm 及其附近波长的吸收也较弱,通过多次调整检测波长和流动相,均未能建立同时测定复方特比萘芬纳米乳中特比萘芬、丁香酚和红霉素的 HPLC 分析方法,因此本研究分别建立了特比萘芬、丁香酚和红霉素含量测定的 HPLC 分析方法,并对各测定方法的专属性、线性、准确度和精密度进行了验证,结果显示,本研究所建立的 3 种测定方法均具有较高的准确度、精密度和良好线性,说明所建立的测定方法是准确可靠的。

本研究制备的复方特比萘芬纳米乳为水包油型,是澄清透明的淡黄色液体,乳滴平均粒径为 11.9 nm,呈圆球形,分布均匀。所建立的测定复方特比萘芬纳米乳 3 种有效成分的 HPLC 法准确可靠。复方特比萘芬纳米乳制备工艺简单,重复性良好,性质稳定,使用方便并质量可控,便于工业化生产,有望为宠物临床提供一种高效、安全的复方纳米药物。

[参考文献]

- [1] 安惠霞,斯拉普·艾白,古丽娜·达吾提,等. 特比萘芬的抗菌作用及机制的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(6): 479-483.
An H X, Silafu A B, Gulnar D W T, et al. The experimental study of terbinafine on antifungal activity and mechanism [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(6): 479-483. (in Chinese)
- [2] 章明美,杨小明,谢吉民,等. 15 种生药提取物抑制痤疮致病菌的活性筛选 [J]. 江苏大学学报, 2004, 14(3): 188-190.
Zhang M M, Yang X M, Xie J M, et al. Activity screening of 15 crude drug extracts on inhibition of *Propionibacterium acnes* [J]. Journal of Jiangsu University, 2004, 14(3): 188-190. (in Chinese)

- [3] 阮娜,宋晓平.丁香杀螨活性成分的追踪分离纯化与结构鉴定[J].中国农业学通报,2005,21(9):24-27.
Ruan N, Song X P. Tracing, isolation, purification and identification of compound with acaricidal activity in *Eugenia Caryophyllata* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(9):24-27. (in Chinese)
- [4] 李红磊,张忠义,马蕾蕾,等.丹参酮微乳的制备及大鼠在体肠吸收[J].中国中药杂志,2007,32(11):1024-1027.
Li H L, Zhang Z Y, Ma L L, et al. Preparation of tanshinone microemulsion and its absorption in rat intestine in situ [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2007, 32(11):1024-1027. (in Chinese)
- [5] 陆彬.药物新剂型与新技术[M].北京:人民卫生出版社,2005:74-76.
Lu B. New techniques and new dosage forms of drugs [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 74-76. (in Chinese)
- [6] Lee J M, Park K M, Lim S J, et al. Microemulsion formulation of clonixic acid; Solubility enhancement and pain reduction [J]. J Pharm Pharmacol, 2002, 54(1):43-49.
- [7] Lawrence M J, Rees G D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2000, 45(1):89-121.
- [8] 陆彬,张正全.用三角相图法研究药用微乳的形成条件[J].药学报,2001,36(1):58-62.
Lu B, Zhang Z Q. Application of triangular phase diagrams to investigate the formulation conditions of pharmaceutical microemulsions [J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2001, 36(1):58-62. (in Chinese)
- [9] 胡帅,欧阳五庆,杨雪峰.复方替米考星纳米乳的制备及其质量评价[J].精细化工,2009,26(8):800-803.
Hu S, Ouyang W Q, Yang X F. Preparation and quality evaluation of compound timicosion nanoemulsion [J]. Fine Chem I-cals, 2009, 26(8):800-803. (in Chinese)
- [10] 张阳德.纳米药理学[M].北京:化学工业出版社,2005:163-188.
Zhang Y D. Nano pharmaceuticals [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005:163-188. (in Chinese)
- [11] Warisnoicharoen W, Lansley A B, Lawrence M J. Non-ionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behaviour [J]. Int J Pharm, 2000, 198:7-27.
- [12] Bourrel M, Schechter R S. Microemulsions and related systems [M]. New York: Marcel Dekker, 1988:1-30.
- [13] 杨惊宇,严冬,罗杰英,等.新型药物剂型:微乳[J].中国医学工程,2005(4):378-381.
Yang J Y, Yan D, Luo J Y, et al. Drug delivery system: Microemulsion [J]. China Medical Engineering, 2005(4):378-381. (in Chinese)
- [14] 张锦.盐酸特比萘芬栓剂含量测定方法的研究[J].药物分析杂志,2008,28(10):1764-1766.
Zhang J. Study on quality specification of terbinafine hydrochloride suppositories [J]. Chin Pharm Anal, 2008, 28(10):1764-1766. (in Chinese)
- [15] 兰福珍,周永娣,陈琪. HPLC 法测定红霉素软膏含量[J].中国药事,2008,22(5):405-406.
Lan F Z, Zhou Y D, Chen Q. Discussion on the determination of erythromycin ointment by HPLC [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2008, 22(5):405-406. (in Chinese)
- [16] 刘刚,李勉珊,谢雅君,等.变换波长 HPLC 测定七味广枣丸中丁香酚、木香烯内酯和去氢木香内酯的含量[J].中国药杂志,2011,46(1):64-66.
Liu G, Li M S, Xie Y J, et al. Determination of eugenol, cost-unolide and dehydrocostuslact one in Qiwei Guangzao Pills by HPLC [J]. Chin Pharm J, 2011, 46(1):64-66. (in Chinese)