

• 专题报道 •

新型酮康唑喷膜的制备及其对湿疹和体癣豚鼠模型的疗效

易雪梅¹, 温海^{2*}, 吴建华², 张纯³, 王雯佳³, 钱方³

(1. 上海市皮肤病性病医院, 上海 200050; 2. 第二军医大学长征医院皮肤性病科, 上海 200003; 3. 长征医院制剂中心)

[摘要] **目的:** 制备新型酮康唑缓释喷膜, 观察其对湿疹和体癣豚鼠模型的疗效。 **方法:** 以壳聚糖盐酸盐为成膜辅料, 研制新型酮康唑喷膜, 采用 HPLC 法测定其含量。色谱条件: Waters Symttry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-磷酸二氢钾缓冲液 (4:1); 流速为 0.6 ml/min; 检测波长为 239 nm; 柱温为 (22±2)℃。建立新型酮康唑喷膜的质量控制标准。观察新型酮康唑喷膜对豚鼠湿疹和体癣模型的疗效, 以喷膜基质作对照, 并分别与地塞米松止痒霜和复方酮康唑霜的疗效相比较。 **结果:** 酮康唑和醋酸地塞米松的线性范围分别为 0.2~2.0 mg/ml 和 0.02~0.20 mg/ml; 回收率分别为 98.41% 和 97.84%; 两者日内 RSD 和日间 RSD 分别为 1.17% 和 1.26%、1.57% 和 1.40%。皮肤刺激性实验表明其对豚鼠皮肤无刺激。新型酮康唑喷膜对湿疹和体癣模型疗效分别与地塞米松止痒霜和复方酮康唑霜相当。 **结论:** 新型酮康唑喷膜制备工艺简单, 对湿疹和体癣模型疗效确切, 具备复方制剂的优势。

[关键词] 酮康唑; 地塞米松; 喷膜; 湿疹; 体癣

[中图分类号] R 978.5; R 756 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0146-04

Preparation of a novel ketoconazole spraying membrane and its effect on eczema and tinea corporis in guinea pigs

YI Xue-mei¹, WEN Hai^{2*}, WU Jian-hua², ZHANG Chun³, WANG Wen-ji³, QIAN Fang³ (1. Shanghai Skin Disease and Venereal Disease Hospital, Shanghai 200050, China; 2. Department of Dermatology and Venereology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003; 3. Pharmaceutical Center, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare a novel slow-releasing ketoconazole spraying membrane and to observe its effect on eczema and tinea corporis in guinea pigs. **Methods:** A novel ketoconazole spraying membrane was prepared with chitosan chlorhydrate as the membrane material. The contents of ketoconazole and desamethasone in the spraying membrane were assayed by HPLC. The separation was performed on Waters Symttry C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), with the mobile phase consisting methanol-potassium dihydrogen phosphate buffer (4:1), at a flow rate of 0.6 ml/min. The detection was carried out with a UV detector at 239 nm, at (22±2)℃. The quality criteria for the novel ketoconazole spraying membrane was established. The curative effect of the ketoconazole spraying membrane on eczema and tinea corporis was observed in guinea pigs and was compared with those of spraying membrane matrix, desamethasone antipruritics cream and compound ketoconazole cream. **Results:** The calibration curves of ketoconazole and desamethasone were linear between 0.2-2.0 mg·ml⁻¹ and 0.02-0.20 mg·ml⁻¹, respectively; the recoveries for ketoconazole and desamethasone were 98.41% and 97.84%, respectively. The intra-day and extra-day RSDs for ketoconazole were 1.17% and 1.26%, respectively, and for desamethasone were 1.57% and 1.40%, respectively. Stimulation test showed that the spraying membrane had no irritative effect on the skin of guinea pig. The novel ketoconazole spraying membrane had similar effect on eczema and tinea corporis as those of desamethasone antipruritics cream and compound ketoconazole cream. **Conclusion:** This novel ketoconazole spraying membrane is easy to prepare and has obvious therapeutic effects on eczema and tinea corporis in guinea pigs, making it favourable for containing combined agents.

[KEY WORDS] ketoconazole; desamethasone; spraying membrane; eczema; tinea corporis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 146-149]

湿疹皮炎和皮肤癣菌病为皮肤科常见病。部队基层官兵由于特殊的作训环境, 这两类疾病发病率高达 60% 左右。目前用于防治这两类疾病的药物剂型主要有软膏剂、洗剂、溶液剂等, 各剂型作用相对单一。本研究采用壳聚糖盐酸盐为成膜辅料, 研制一种集抗真菌、抗炎、抗过敏一体的长效缓释喷膜, 对其质量控制进行了研究, 并观察其对豚鼠湿疹

和体癣模型的疗效。

[基金项目] 全军医药科研“十五”规划课题 (01MA151)。Supported by grants from Project of the “Tenth Five-Year Plan” for Medical Science Research of PLA (01MA151).

[作者简介] 易雪梅, 硕士。

* Corresponding author. E-mail: wenhai98@sohu.com

1 材料

1.1 仪器和试剂 Waters 高效液相色谱仪; Waters 600 色谱泵, Waters 996PDA 紫外检测器, Millennium 32 色谱工作站(梅特勒-托利多公司); 超声振荡机(上海科学仪器厂); 超滤仪(上海科学仪器厂); 电子分析天平(梅特勒-托利多公司); 梅特勒 320 pH 计(梅特勒-托利多公司)。酮康唑(地奥集团成都药业股份有限公司, 批号: 030902); 醋酸地塞米松(天津天药药业股份有限公司, 批号: DAG030801); 壳聚糖盐酸盐(上海其胜生物材料技术研究所, 平均相对分子质量 100 000, 批号: 030308); 吐温-80、水溶性硅油、乙醇等均符合药用标准。酮康唑对照品、醋酸地塞米松对照品(中国药品生物制品检定所); 自制酮康唑喷膜(批号: 030818, 030822, 030824)。磷酸二氢钾和氢氧化钠(上海试剂四厂, 分析纯)、甲醇(上海复旦化学品厂永华试剂分厂, 色谱纯)。

1.2 动物 4~5 周龄健康豚鼠 55 只, 由第二军医大学实验动物中心提供, 合格证号: SYXK-(军) 2002-044。其中用于湿疹模型 25 只, 均为雌性, 体质量(232.4±33.0)g; 用于体癣模型 20 只, 雌雄各半, 体质量(212.4±18.7)g; 用于皮肤刺激性实验 10 只, 雌雄各半, 体质量(218.6±16.2)g。

2 方法和结果

2.1 新型酮康唑喷膜的制备

2.1.1 处方 酮康唑 10 g, 醋酸地塞米松 0.5 g, 壳聚糖盐酸盐 10 g, 吐温-80 10 g, 水溶性硅油 10 g, 60%乙醇加至 1 000 ml。

2.1.2 制备工艺^[1,2] 取处方量的壳聚糖盐酸盐加适量纯化水胀溶, 取处方量酮康唑、醋酸地塞米松加乙醇溶解, 再加入吐温-80, 将上述醇溶液缓慢加入水溶液中。最后加水溶性硅油, 搅匀, 分装于 60 ml 喷瓶, 密闭, 即得。

2.2 新型酮康唑喷膜质量标准

2.2.1 性状 本品为无色黏稠液体, 有乙醇味。

2.2.2 鉴别 酮康唑鉴别: 取样品 1 ml, 加 0.1 mol/L 盐酸溶液 10 ml, 在水浴上加热溶解, 放冷, 滤过, 滤液加碘化铋钾试液数滴, 即生成橙红色沉淀。醋酸地塞米松鉴别: 取样品 10 ml, 置烧杯中, 加无水乙醇 50 ml, 在水浴上加热溶解, 放冷, 滤过, 滤液加碱性酒石酸铜试液 1 ml, 即生成红色沉淀。3 批样品鉴别均呈阳性反应。

2.2.3 检查 应符合《中国药典(2000 年版)》二

部^[3]有关膜剂的一般规定, 将本品涂于干净玻璃板上, 应在 10 min 内干燥成膜, 膜应有一定抗撕裂强度, 微生物限度检查应符合规定。3 批样品均符合相关要求。

2.3 新型酮康唑喷膜含量测定及方法学考察^[3,4]

2.3.1 溶液配制 精密称取酮康唑和醋酸地塞米松对照品适量, 加乙醇分别配制酮康唑对照品溶液(1 mg/ml)和醋酸地塞米松对照品溶液(1 mg/ml)。另按 2.1.1 项下配制新型酮康唑喷膜样品和空白喷膜基质, 分别精密量取上述喷膜 4.0 ml, 置 50 ml 容量瓶中, 加乙醇适量, 超声振荡 10 min, 加乙醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜滤过, 配制酮康唑喷膜测定液和空白喷膜测定液。

2.3.2 色谱条件 色谱柱 Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-磷酸二氢钾缓冲液(4:1), pH 7.4; 检测波长: 239 nm; 流速: 0.6 ml/min; 柱温: (22±2)°C; 进样量: 20 μl。色谱图见图 1。辅料不干扰样品中主药酮康唑和醋酸地塞米松的含量的测定。

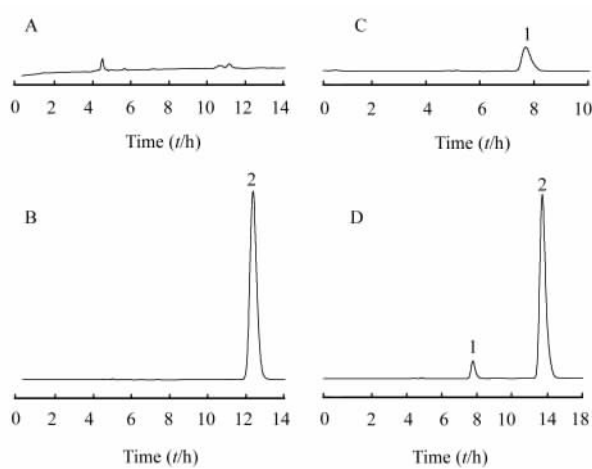


图 1 色谱图

Fig 1 Chromatogram picture

A: Sample matrix; B: Ketoconazole control; C: Desamethasone control; D: Sample; 1: Desamethasone; 2: Ketoconazole

2.3.3 标准曲线绘制 精密称取酮康唑和醋酸地塞米松对照品溶液适量, 加乙醇稀释成酮康唑浓度为 0.2、0.4、0.8、1.6 和 2.0 mg/ml 和醋酸地塞米松浓度为 0.02、0.04、0.08、0.16 和 0.20 mg/ml 的标准溶液, 进样按 2.3.2 项下条件。以峰面积(A)对浓度(c)求回归方程, 酮康唑: $A_1 = (5.984 \times 10^5) + (3.063 \times 10^7)c_1$, $r_1 = 0.9997$; 醋酸地塞米松: $A_2 = (1.947 \times 10^4) + (4.123 \times 10^7)c_2$, $r_2 = 0.9998$ 。酮

康唑和醋酸地塞米松的线性范围分别为 0.2~2.0 mg/ml和 0.02~0.20 mg/ml。

2.3.4 加样回收率实验 精密量取样品 4.0 ml,置 50 ml 容量瓶中,精密加入酮康唑和醋酸地塞米松对照品溶液适量,加乙醇超声处理 10 min,照 2.3.6 项下操作,每个浓度重复测定 3 次。计算酮康唑和醋酸地塞米松的回收率。酮康唑的平均回收率为 98.41%,RSD=2.29%(n=6);醋酸地塞米松的平均回收率为 97.84%,RSD=2.60%(n=6)。

2.3.5 重复性实验 精密量取样品 4.0 ml,按 2.3.6项下处理,每日测定 3 次,连续测定 3 d。计算酮康唑和醋酸地塞米松的日内 RSD、日间 RSD。两者日内 RSD 及日间 RSD 分别为 1.17%和 1.26%、1.57%和 1.40%(n=9)。

2.3.6 样品测定 按 2.3.1 项下方法制备样品测定液,按 2.3.2 项下测定 3 批样品,按外标法计算样品中酮康唑和醋酸地塞米松的含量,分别为标示量的 96.52%~97.26%和 95.90%~97.26%。

2.3.7 皮肤刺激性实验 豚鼠 10 只,分为完整皮肤组(n=5)和破损皮肤组(n=5),豚鼠双侧背部剃毛 4 cm×6 cm,破损组用砂纸摩擦皮肤至不渗血为度,将新型酮康唑喷膜涂抹于 2 组豚鼠左侧背部,喷膜基质涂抹于右侧。用纱布胶布固定,24 h 揭膜并用温水洗净残留喷膜,分别于 1、24、48、72 h 观察豚鼠背部有无红斑、水疱。结果显示,揭膜 1 h 豚鼠背部红斑,24 h 完全消退,无水疱糜烂等表现,新型酮康唑喷膜和喷膜基质对豚鼠皮肤均无刺激性。

2.4 动物疗效观察

2.4.1 动物模型制备 参照 Fukuda 等^[5]方法,以 OVA 为抗原激发豚鼠皮肤变态反应制备湿疹模型。采用穿刺法^[6],豚鼠背部接种须癣毛癣菌(2×10⁵ CFU/ml)制备体癣模型。

2.4.2 分组与给药 湿疹模型 100 个,分为 A、B、C、D 4 组(n=25)。A 组给新型酮康唑喷膜,1 次/2 d;B 组给喷膜基质,1 次/2 d;C 组给地塞米松止痒霜(0.05%),2 次/d;D 组不给药。体癣模型 20 个,分为 A、B、C、D 4 组(n=5)。A 组给新型酮康唑喷膜,1 次/2 d;B 组给喷膜基质,1 次/2 d;C 组给复方酮康唑霜,2 次/d;D 组不给药。

2.4.3 观察指标 湿疹模型激发 48 h、治疗 1 周分别对红斑(0~4 分)、水肿(0~2 分)、抓痕(0~1 分)进行评分。体癣症状评分:接种第 11 天和治疗 2 周分别对丘疹(0~4 分)、水疱(0~2 分)、鳞屑(0~1 分)进行评分;治疗前涂片培养测阳性率;停药 2 周涂片培养测阴性率。

2.4.4 治疗结果 根据用药前后皮损评分比较,进行疗效判断。治愈:用药后皮损消退≥90%;显效:皮损消退≥70%;有效:皮损消退≥30%;无效:皮损消退<30%。结果显示,对于湿疹和体癣模型,新型酮康唑喷膜治疗组效果分别与地塞米松止痒霜和复方酮康唑霜组一致,明显优于基质治疗组和空白对照组(P<0.01,多样本率的 χ² 检验,表 1)。治疗前 A~D 各组真菌培养阳性率分别 80%、80%、100%和 80%,停药 2 周时,A 组与 C 组真菌培养阴性率均为 100%,而 B 组与 D 组阴性率分别为 45%和 50%,真菌涂片也得到类似的结果。

表 1 湿疹模型 1 周及体癣模型 2 周疗效

Tab 1 Therapeutic outcomes in eczema models after 1 week and in tinea corporis models after 2 weeks in all guinea pigs

Group	Eczema(N=25,n)					Tinea corporis(N=5,n)				
	Cured	Obviously effective	Effective	Ineffective	Effective rate(%)	Cured	Obviously effective	Effective	Ineffective	Effective rate(%)
A	9	8	2	6	76**	4	0	1	0	100**
B	0	2	6	17	32	0	0	2	3	40
C	10	7	1	7	72**	3	1	1	0	100**
D	0	1	5	19	24	0	0	1	4	20

** P<0.01 vs group B and D; A: Treated with ketoconazole spraying membrane; B: Treated with spraying membrane matrix; C: Treated with desamethasone antipruritic cream in eczema models and compound ketoconazole cream; D: Without drug treatment

3 讨论

壳聚糖是无脊椎甲壳类动物贝壳提取物,是一种高聚合作用的物质。壳聚糖盐酸盐为生物高分子材料,具有良好的成膜性,能促进体细胞对营养成分

和药物的吸收。本方选用 1%壳聚糖盐酸盐为成膜辅料,研制出的新型酮康唑喷膜性能稳定,成膜快,膜柔韧、弹性好。酮康唑具有易氧化变色的特性,配制中加热溶解,影响疗效和外观,加 1%吐温-80 起增溶作用,制备中不加热,使酮康唑稳定性好。

本实验采用 HPLC 法测定新型酮康唑喷膜中酮康唑和醋酸地塞米松的含量。采用乙醇作为溶剂,可充分溶解酮康唑和地塞米松,使提取完全。基质峰保留时间与主药成分峰保留时间完全分开,基质不干扰本品含量测定。酮康唑受流动相 pH 影响较大,选用甲醇-磷酸二氢钾缓冲液(4:1)为流动相,并调节 pH 7.4,使基线平稳,分离效果良好。该方法操作简便,精密度高,结果准确可靠。

目前,防治湿疹皮炎和皮肤癣菌病的主要剂型有软膏剂、洗剂、溶液剂等,各剂型作用单一,对同时防治两类疾病存在一定缺陷。近年研究发现,湿疹与患者皮肤的微生物携带密切相关。Jones 等^[7]首次报道特应性皮炎(AD)与皮肤癣菌感染的关系,发现 AD 患者皮肤癣菌感染率高达 41%。而 Wilson 等^[8]发现,变态反应性疾病合并皮肤癣菌感染患者抗真菌治疗能改善变态反应性疾病的症状,提示湿疹可能也与某些细菌真菌相关。因此,本处方将酮康唑、醋酸地塞米松配伍制成喷膜,能同时起到抗真菌、抗炎、抗过敏止痒作用。药液短时间内形成一层薄膜,有促进水合作用和溶解角质作用,使药物透过角质层缓慢释放,更好地发挥治疗作用。

酮康唑为咪唑类广谱抗真菌药,对念珠菌属、糠秕马拉色菌、球孢子菌、组织胞浆菌、毛癣菌属、小孢子菌属和表皮癣菌属均有较好的抗菌活性,还有抗细菌作用。地塞米松为肾上腺皮质激素类药,具有抗炎、抗过敏作用,能抑制组胺释放,抑制炎症因子趋化,抑制变态反应。两者合用不仅具有抗炎、抗过敏、止痒作用,又有较强的抗真菌和细菌作用。本实验结果显示,新型酮康唑喷膜对豚鼠湿疹模型效果与地塞米松止痒霜效果相当,有效率分别为 76%和 72%,明显优于空白对照组和基质治疗组($P < 0.01$);对体癣模型疗效与复方酮康唑霜一致,有效率均达 100%,停药 2 周,真菌涂片、培养阴性率达

100%,其抗真菌效果明显优于空白对照组和基质治疗组($P < 0.01$)。新型酮康唑喷膜治疗湿疹和体癣均显示良好的活性,其原因可能是酮康唑与醋酸地塞米松有协同作用。抗真菌药物杀灭真菌,为湿疹的愈合创造了条件,而一定量的激素促进真菌孢子相向菌丝相转化,使抗真菌药物更好地杀灭真菌,体现了复方制剂的优势。且用药次数少,比较方便。因此,对于湿疹和体癣的治疗,应用复方制剂可能比单独应用相应药物治疗更合理。

本实验统计新型酮康唑喷膜和复方酮康唑霜对体癣模型的有效率均达 100%,可能与样本数较小有关,进一步扩大样本研究有助于计算其真正有效率。

[参考文献]

- [1] 于西全,左 晖,康鲁平. 复方酮康唑乳膏的制备及质量控制[J]. 海峡药学,2001,13:15-16.
- [2] 陈元成,邢莉清,张 海. 复方痤疮灵涂膜剂的制备与疗效观察[J]. 天津药学,2002,14:37-38.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会 编. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:化学工业出版社,2000. 附录 VD.
- [4] 邹恒琴,季爱民,赵素霞. HPLC 法同时测定肤康软膏中地塞米松和酮康唑的含量[J]. 药学情报通讯,1994,12:310-312.
- [5] Fukuda S, Midoro K, Kamei T, et al. Inhibition of allergic dermal inflammation by the novel imidazopyridazine derivative TAK-427 in a guinea pig experimental model of eczema[J]. J Pharmacol Exper Ther,2002,303:1283-1290.
- [6] 关洪全. 穿刺法所致体癣模型在抗真菌中药研究中的应用探讨[J]. 中国中医药信息杂志,2002,9:24-25.
- [7] Jones HE, Reinhardt JH, Rinaldi MG. A clinical, mycological, and immunological survey for dermatophytosis[J]. Arch Dermatol, 1973,108:61-65.
- [8] Wilson BB, Deuell B, Mills TA. Atopic dermatitis associated with dermatophyte infection and Trichophyton hypersensitivity[J]. Cutis,1993,51:191-192.

[收稿日期] 2005-09-09

[修回日期] 2005-12-05

[本文编辑] 尹 茶

我校郑秀龙、李兆申教授分获 2005 年度国家科技发明奖和国家科技进步奖

第四次全国科学技术大会暨 2005 年国家科技奖励大会已顺利召开。在本届国家科技奖励大会上,共有 314 个项目获得 5 个奖项不同级别的奖励。我校除吴孟超院士荣获 2005 年度国家最高科学技术奖外,还获得另外两项荣誉:海军医学系郑秀龙教授等的研究项目“肿瘤放疗增敏药:甘氨酸双唑钠”获 2005 年度国家科学技术发明二等奖;长海医院李兆申教授等的研究项目“胃、十二指肠镜微创技术的研究与应用”获 2005 年度国家科学技术进步二等奖。