

REFERENCES

- [1] YANG S, MA X B, ZHANG B. Optimized compatibility of anticancer monomers from Venenum Bufonis by uniform design [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2014, 23(17): 2077-2080.
- [2] YUN L W, YANG J. The role of pharmacokinetics in Beagle dogs for preclinical evaluation of extended-release formulations [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2015, 24(10): 1134-1140.
- [3] WANG Y, SONG X L, CHEN Y F, et al. Preparation of gentian total glycosides intragastric floating pellets and their characteristics of *in vitro* release [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2012, 43(9): 1751-1755.
- [4] WANG H Y, ZOU M J, HAN R, et al. Preparation of propafenone hydrochloride sustained release matrix pellets and release mechanism investigation [J]. Chin J Pharm(中国药剂学杂志), 2011, 9(1): 7-14.
- [5] HUANG Y P, LAI C H. Advances of sustained/controlled release pellets [J]. J Jiangxi Univ TCM(江西中医药大学学报), 2010, 22(2): 88-91.
- [6] QIN F H, HUANG X W, XIA X J, et al. Study on preparation of *Ginkgo biloba* extract and gross saponin from *Tribulus terrestris* sustained release pellets [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(2): 178-182.
- [7] CHEN Y H, WANG Q S, PING Q N, et al. Preparation of igitatimod solid dispersion via hot-melt extrusion and investigation of factors affecting dissolution profile [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2013, 48(17): 1464-1470.
- [8] HIGUCHI T. Mechanism of sustained-action medication, theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices [J]. J Pharm Sci, 1963(52): 115.
- [9] LI S G, LI L J, XIAO Z H, et al. Study on the formulation and technology of sinomenine hydrochloride enteric sustained-release pellets and release mechanism *in vitro* [J]. China Pharm(中国药房), 2013, 24(19): 1773-1776.
- [10] LIU X R, ZHANG Z Z, HE Z Y, et al. Preparation and *in vitro* release study of sustained-release coated pellets containing clarithromycin [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(2): 143-147.
- [11] 吕永丰, 练晓珊, 叶琳. X 射线粉末衍射法在中药分析中的应用[J]. 中国医药指南, 2013, 11(8): 298-299.

收稿日期: 2015-03-21

利拉萼酯喷雾剂的经皮渗透研究

何敏^{1,2}, 单瑞平³, 傅旭春⁴ (1.浙江大学药学院, 杭州 310058; 2.艾康生物技术(杭州)有限公司, 杭州 310013; 3.浙江万晟药业有限公司, 杭州 310013; 4.浙江大学城市学院药物研究所, 杭州 310015)

摘要: 目的 研究利拉萼酯喷雾剂的经皮渗透性。方法 采用改良 Franz 扩散池, 以小型猪皮肤为渗透屏障, 高效液相色谱法测定利拉萼酯含量。结果 利拉萼酯喷雾剂和乳膏剂的稳态透皮速率分别为 (0.017 ± 0.006) , $(0.014 \pm 0.003) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$; 利拉萼酯喷雾剂和乳膏剂的 24 h 累积渗透量分别为 (0.60 ± 0.23) , $(0.44 \pm 0.15) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$; 利拉萼酯喷雾剂和乳膏剂在皮肤中的药物残留量分别为 (8.2 ± 1.3) , $(7.7 \pm 1.6) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论 利拉萼酯喷雾剂的稳态透皮速率、24 h 累积渗透量、在皮肤中的药物残留量均稍大于利拉萼酯乳膏剂, 但 2 种剂型之间没有显著性差异。

关键词: 利拉萼酯; 喷雾剂; 乳膏剂; 经皮渗透

中图分类号: R944

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1106-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.019

Study on the Percutaneous Permeability of Liranaftate Spray

HE Min^{1,2}, SHAN Ruiping³, FU Xuchun⁴ (1.College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2.ACON Biotech(Hangzhou) Co., Ltd., Hangzhou 310013, China; 3.Zhejiang Wansheng Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310013, China; 4.Institute of Materia Medica, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the percutaneous permeability of liranaftate spray. **METHODS** The improved Franz diffusion cells and the skin of Bama miniature pig were used to investigate the percutaneous permeability of liranaftate. The content of liranaftate was determined by HPLC. **RESULTS** The steady penetration rate of spray and cream was (0.017 ± 0.006) , $(0.014 \pm 0.003) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$, respectively. The 24 h cumulative permeation quantity of spray and cream was (0.60 ± 0.23) , $(0.44 \pm 0.15) \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, respectively. The residue in skin of spray and cream was (8.2 ± 1.3) , $(7.7 \pm 1.6) \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$.

作者简介: 何敏, 女, 硕士, 工程师

Tel: (0571)87779339

E-mail: 619154425@qq.com

respectively. **CONCLUSION** Although liranaftate spray shows slightly higher steady penetration rate, 24 h cumulative permeation quantity, and residue than liranaftate cream, there is no significant difference of the steady penetration rate, 24 h cumulative permeation quantity and residue between liranaftate spray and liranaftate cream.

KEY WORDS: liranaftate; spray; cream; percutaneous penetration

利拉萘酯乳膏是由日本 ToshoLorporotion 公司和 Zenyako Kogyo 公司共同研制开发的外用局部抗真菌制剂, 主要用于治疗足癣、体癣和股癣, 其原理是通过抑制真菌细胞的角鲨烯环氧化反应和麦角固醇的合成而发挥抗真菌作用^[1]。据文献报道, 2%利拉萘酯乳膏对足癣、体股癣具有良好的疗效和安全性, 其疗效与 1%联苯卞唑乳膏相差不大^[2-4]。本实验研究利拉萘酯新剂型——利拉萘酯喷雾剂的经皮渗透性质, 为利拉萘酯喷雾剂的临床应用提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent); TK-12B 型透皮扩散试验仪(上海锆凯科技贸易有限公司); AL204 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Millipore RiOs and Elix 纯水仪、Milli-Q Bicel A10 超纯水仪均购自(美国 Millipore)。

1.2 试剂

利拉萘酯原料药(同时作为对照品, 山东良福制药有限公司, 批号: 100902, 纯度: 99.8%); 2%利拉萘酯喷雾剂(浙江万晟药业有限公司, 规格: 15 g : 0.3 g), 处方组成为利拉萘酯、微晶纤维素-羧甲纤维素钠、聚山梨酯 80 和羟苯乙酯; 2%利拉萘酯乳膏剂[(日本)全药工业株式会社, 批号: BNG02, 规格: 10 g : 0.2 g]; 乙腈、甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯; 有机微孔滤膜(上海兴亚净化材料厂, 0.22 μm)。

1.3 动物皮肤

普通级巴马猪, ♂, 体质量 14.5 kg, 实验动物质量合格证号: 0060888, 实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2010-0002, 上海妙迪生物科技有限公司。取腹部皮肤, 去除皮下组织及脂肪, 用生理盐水冲洗干净后切割成小片, 置于-80℃低温冰箱中保存备用。

2 方法与结果

2.1 体外经皮渗透试验

取冷冻贮藏的小型猪腹部皮肤, 放入生理盐水中自然解冻, 然后将其固定在扩散池(扩散池面

积 2.8 cm², 接受池最大容量为 7 mL)的供给池与接受池之间, 使皮肤表面层面向供给室。排尽气泡, 循环水保持(37±0.5)℃。利拉萘酯在水中几乎不溶, 为了增加溶解度, 接受池以 30%乙醇生理盐水作为接受介质, 加搅拌子以 300 r·min⁻¹ 搅拌。供给室加入利拉萘酯制剂样品约 1 g, 分别于 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 从接受池中取出 7 mL 接受液, 并同时补加等体积、等温的接受液。取出的样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液作为经皮渗透样品溶液。按下式计算第 *i* 次取样时的累积渗透量 *Q_i*:

$$Q_i = C_i V + \sum_{j=1}^{i-1} C_{j-1} \times V_j$$

式中 *V* 为接受室体积, *V_j* 为每次取样体积, *C_i* 为第 *i* 次取样时接收液中的药物浓度。以单位面积累积渗透量 *Q* 为纵坐标, 时间 *t* 为横坐标作图, 得药物渗透曲线并求得稳态透皮速率。

体外经皮渗透试验完成后, 取下皮肤, 用棉蘸乙醇擦洗皮肤表面 3 次, 用胶带剥离 1 次, 除去皮肤表面残留的药物。剪下渗透试验中与扩散池接触的部分, 称重, 剪成碎片, 用 8 mL 无水乙醇分 2 次提取(第 1 次 5 mL, 第 2 次 3 mL), 每次涡流旋转 30 min, 合并提取液, 并用少量乙醇冲洗皮肤碎片, 并入提取液, 定容至 10 mL, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 续滤液作为皮肤中残留量样品溶液。

2.2 利拉萘酯含量测定^[5]

2.2.1 色谱条件 色谱柱: 伊利特 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-醋酸钠缓冲液(pH 4.7)(85 : 15); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 30℃; 检测波长: 286 nm; 进样量: 100 μL(经皮渗透液含量测定)或 25 μL(皮肤残留量测定)。

2.2.2 对照品溶液的配制 以甲醇为溶剂配制利拉萘酯对照品溶液。

2.2.3 专属性试验 根据“2.2.1”项下色谱条件, 得利拉萘酯对照品、利拉萘酯经皮渗透试验接受液样品和利拉萘酯皮肤残留样品色谱图, 见图 1。

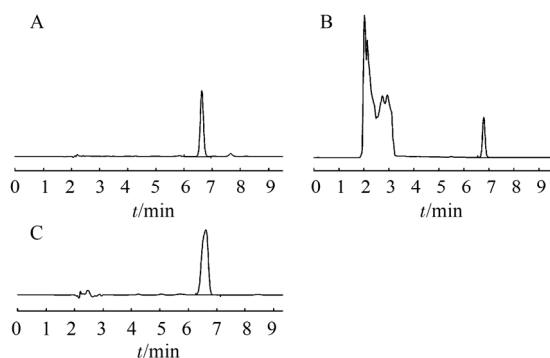


图1 高效液相色谱图

A-利拉萘酯对照品；B-利拉萘酯经皮渗透试验接受液样品；C-利拉萘酯皮肤残留样品。

Fig.1 HPLC chromatograms

A-liranaftate reference; B-sample of the receiver compartment; C-residue sample in skin.

2.2.4 线性关系考察 用甲醇配制得到 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 8.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 9 个不同浓度(C)的利拉萘酯对照品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件测定峰面积(A), 进样 100 μL , 得标准曲线方程: $A=462.34C+3.3223$ ($n=9$, $r=0.9999$), 结果表明, 利拉萘酯在 0.01~8.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.2.5 稳定性试验 取供试品溶液间隔一定时间测定峰面积, 结果表明供试品溶液(0.1117 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 在 78 h 内待测组分稳定, RSD 为 0.38%。

2.2.6 日内精密度和日间精密度 取高、中、低 (2.537, 0.1015, 0.0101 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 3 种浓度的利拉萘酯对照品溶液, 各自连续 5 次进样, 测日内精密度; 连续测定 3 d, 测日间精密度。日内精密度 RSD 分别为 0.66%, 0.46%, 2.49%, 日间精密度 RSD 分别为 0.83%, 1.21%, 2.17%。

2.2.7 加样回收率试验 剪取皮肤并称重(约 0.2 g), 剪细捣碎, 加入适量利拉萘酯对照品溶液(分别含利拉萘酯 2.537, 1.2685, 0.6342 μg)各 3 份, 按“2.1”项下方法制备皮肤中残留量样品溶液, 测定利拉萘酯含量, 计算得到回收率分别为 98.49%, 98.01%, 97.11%。

2.3 体外经皮渗透试验结果

体外经皮渗透试验结果见表 1、图 2。

表1 体外经皮渗透试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.1 Results of percutaneous penetration test($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

药 品	稳态透皮速率/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	24 h 累积渗 透量/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$	皮肤中药物 残留量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
利拉萘酯喷雾剂	0.017 $\pm$ 0.006	0.60 $\pm$ 0.23	8.2 $\pm$ 1.3
利拉萘酯乳膏	0.014 $\pm$ 0.003	0.44 $\pm$ 0.15	7.7 $\pm$ 1.6

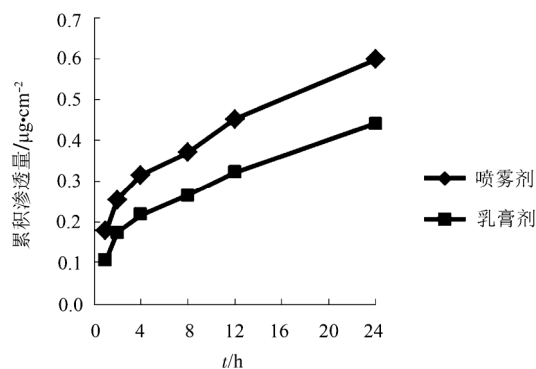


图2 利拉萘酯喷雾剂和利拉萘酯乳膏剂的经皮渗透曲线 ($n=6$)

Fig.2 The percutaneous permeation curves of liranaftate spray and liranaftate cream($n=6$)

3 讨论

经单因素方差分析, 利拉萘酯喷雾剂的稳态透皮速率、24 h 累积渗透量、在皮肤中的药物残留量均稍大于利拉萘酯乳膏剂, 但 2 种剂型之间没有显著性差异。

利拉萘酯是作用于皮肤表皮的局部抗真菌药, 其药效应与皮肤中的药物残留量有关。表 1 的试验结果显示利拉萘酯喷雾剂与利拉萘酯乳膏在皮肤中的药物残留量相差不大。本品以联苯卞唑乳膏为对照药治疗体股癣、足癣的临床疗效结果表明, 试验组和对照组的有效率分别为 94.38% 和 96.25%, 痊愈率分别为 46.25%和 45.38%, 2 组结果差异很小, 均无统计学意义。结合文献[6-7]报道的同样以联苯卞唑乳膏为对照药的利拉萘酯乳膏治疗体股癣、足癣的临床试验结果, 可以认为利拉萘酯喷雾剂与利拉萘酯乳膏治疗体股癣、足癣的临床疗效一致。

利拉萘酯的安全性及药物透过皮肤进入体循环的药物量有关。本试验结果表明, 利拉萘酯喷雾剂和乳膏剂的稳态透皮速率 $<0.02 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, 24 h 累积渗透量 $<1.0 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。使用本品的给药面积一般 $<2 \text{ cm}^2$, 每喷剂量约为 2.73 mg, 若假设利拉萘酯透过人体皮肤与小型猪皮肤相当, 则 24 h 累积渗透量 $<2.0 \mu\text{g}$ 。利拉萘酯乳膏的大鼠毒理实验资料^[7]显示, 以每只 40 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 经皮给药 4 周和 8 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 皮下给药 26 周, 均未见明显的不良反应。由此可见, 即使充分考虑不同皮肤之间、在体给药与离体模型之间以及不同剂型之间的差异, 也可以合理推断出本品的使用剂量是安全的。本品的临床试验结果也证实, 只有 1.89%受试者

表现出轻微的局部不良反应,表明本品的安全性较高。

综上所述,利拉萘酯喷雾剂和乳膏均具有良好的经皮渗透特性。由于喷雾剂具有给药量精确、使用方便、患者依从性高的优点,利拉萘酯喷雾剂为患者增加了一种新的剂型选择。

REFERENCES

- [1] LUO R, GUO S, LIU X F. Clinical application of antifungal drug liranaftate [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2004, 13(12): 1411-1413.
- [2] TAO S J, WANG Y, GU J, et al. Liranaftate cream in treatment of tinea cruris and tinea corporis: a multicenter randomized double-blind vehicle-controlled clinical trial [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2007, 26(12): 881-884.
- [3] YAN H L, PENG Z H, YANG S, et al. Liranaftate cream in

the treatment of tinea cruris and tinea corporis: a randomized double-blind vehicle-controlled clinical trial [J]. Chin J Dermvenereol(中国皮肤性病杂志), 2006, 20(7): 411-413.

- [4] WANG Y, SHEN Y N, ZHU H M, et al. Liranaftate cream in the treatment of tinea cruris, tinea corporis and tinea pedis: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial [J]. Chin J Dermatol(中国皮肤科杂志), 2007, 40(8): 476-478.
- [5] ZHAO W J, WANG Z Q, DU H, et al. Establishment of transdermal release and content determination of the liranaftate ointment [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2010, 30(5): 391-393.
- [6] CHEN W J. Therapeutic Effect of liranaftate cream in the treatment of 40 cases of tinea manuum & pedis and tinea corporis & cruris [J]. South China J Dermato-Venereology(岭南药学杂志), 2010, 15(1): 12-14.
- [7] 全薬工業株式会社. 日本病院薬剤師会の IF 記載要領.ZEFNART® CREAM2%.SOLUTION 2% [EB/OL]. http://www.info.pmda.go.jp/go/interview/1/380101_2659712N1020_1_A01_1F.

收稿日期: 2015-04-16

UPLC-MS/MS 同时检测人尿液中 8 种苯二氮䓬类及 3 种非苯二氮䓬类镇静催眠药

董占军, 安静, 魏欣, 宋浩静, 白万军(河北省人民医院药学部, 石家庄 050051)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定人尿液中 8 种苯二氮䓬类及 3 种非苯二氮䓬类药物的浓度。方法 尿液样品采用二氯甲烷:正己烷:乙酸乙酯(5:4:1)进行萃取, Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)进行分离, 乙腈-0.1%氨水溶液为流动相进行梯度洗脱, 流速为 0.2 mL·min⁻¹, 通过电喷雾离子源, 多重反应监测正离子模式进行检测。结果 11 种被分析物在所测浓度范围内呈现良好的线性关系, 相关系数均>0.99, 除右佐匹克隆检测限为 0.5 ng·mL⁻¹, 其他物质检测限为 0.01~0.02 ng·mL⁻¹, 11 种被分析物的日内、日间 RSD 均<15.0%(n=5), 提取回收率为 68.8%~115.0%, 基质效应为 0.85~1.14。结论 该方法快速、灵敏、准确, 适用于同时检测人尿中 8 种苯二氮䓬类及 3 种非苯二氮䓬类药物浓度。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 镇静催眠药; 同时测定; 人尿液

中图分类号: R927.2; R971.3

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)09-1109-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.020

Simultaneous Determination of 8 Kinds of Benzodiazepines and 3 Kinds of Non-benzodiazepines in Human Urine by UPLC-MS/MS

DONG Zhanjun, AN Jing, WEI Xin, SONG Haojing, BAI Wanjun(Department of Pharmacy, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a rapid UPLC-MS/MS method for the determination of 8 kinds of benzodiazepines and 3 kinds of non-benzodiazepines in human urine. **METHODS** The urine samples were extracted with dichloromethane : n-hexane : acetoacetate(5 : 4 : 1). The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) using the mobile phase of acetonitrile-0.1% ammonium solution at a flow rate of 0.2 mL·min⁻¹ in gradient

基金项目: 河北省科技计划项目(14273002D)

作者简介: 董占军, 男, 硕士, 主任药师

Tel: (0311)86988604

E-mail: 13313213656@126.com