

## 他克莫司温度敏感眼用凝胶的体外释放研究

张 晶<sup>1</sup>, 宋洪涛<sup>1</sup>, 杨丽霞<sup>2</sup>, 周 欣<sup>1</sup> (1 南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025; 2 南京军区福州总医院眼科中心, 福建 福州 350025)

[摘要] 目的 探讨各因素对他克莫司温度敏感眼用凝胶体外释放的影响。方法 采用无膜溶出模型, 考察释放面积、振荡频率对眼用凝胶溶蚀及药物释放的影响。结果 随着释放面积和振荡频率的增加, 凝胶溶蚀和药物释放增加。结论 药物释放主要取决于凝胶溶蚀。

[关键词] 他克莫司; 温度敏感眼用凝胶; 体外释放; 凝胶溶蚀; HPLC

[中图分类号] R 944 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2010)04-0267-04

## Study on the release *in vitro* of tacrolimus from the thermosensitive ophthalmic gel

ZHANG Jing<sup>1</sup>, SONG Hong-tao<sup>1</sup>, YANG Lixia<sup>2</sup>, ZHOU Xin<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China; 2. Center of Ophthalmology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To study the factors that influence the release of tacrolimus from the thermosensitive ophthalmic gel. **Methods** The norman bian model was introduced to observe the influence on the drug release and gel erosion for surface area and shaking frequency. **Results** The drug release and gel erosion were increased with the rise of surface area and shaking frequency. **Conclusion** The drug release mainly depends on the gel erosion.

[Key words] tacrolimus (FK506); thermosensitive ophthalmic gel; release *in vitro*; gel erosion; HPLC

他克莫司 (Tacrolimus, FK506) 是一种大环内酯类新型免疫抑制剂, 在治疗自身免疫性眼病、眼过敏性疾患, 以及角膜移植术后的免疫排斥反应均有良好的疗效<sup>[1]</sup>。由于他克莫司具有分子量大和不溶于水的理化特点, 使其局部应用时的眼内吸收差, 不能产生有效的眼内药物浓度。为了延长药物作用时间, 有报道将他克莫司制备成脂质体、纳米粒<sup>[2]</sup>及胶原膜<sup>[3]</sup>等。近年来采用高分子亲水性聚合物为基质的凝胶剂作为药物载体越来越受到医药界的重视。目前我国尚无上市的他克莫司眼用制剂。本研究探讨了他克莫司温度敏感眼用凝胶的体外释放特性, 为合理设计眼用凝胶制剂处方提供参考。

### 1 材料

Agilent 1100型高效液相色谱仪 (美国安捷伦公司); SHZ-88A型往复式水浴恒温振荡器 (太仓市实验设备厂); FA 1004型电子天平 (上海天平仪器厂)。

他克莫司原料药 (福建科瑞药业有限公司, 含量 99.3%, 批号: 071002); 他克莫司对照品 (福建科瑞药业有限公司, 含量 99.5%, 批号: 081103); 他克莫司温度敏感眼用凝胶 (南京军区福州总医院自制, 批号: 071103); 碳酸氢钠 (国药集团化学试剂有限公司); 氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司); 二水氯化钙 (国药集团化学试剂有限公司); 氯化钾 (国药集团化学试剂有限公司); 模拟人工泪液 (每升模拟泪液包括: 2.18 g 碳酸氢钠、6.78 g 氯化钠、0.084 g 二水氯化钙和 1.38 g 氯化钾); 乙腈为色谱纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 分析方法建立

**2.1.1 色谱条件的选择** 色谱柱: Agilent Zorbax SB-C<sub>8</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水 (55: 45, V/V); 检测波长: 215 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 50 °C; 进样量: 20 μL。

**2.1.2 溶液的制备** ①对照品溶液的制备: 取他克莫司对照品约 30.0 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加模拟人工泪液 10 mL 适量流动相超声, 使其溶解并用流动相稀释至刻度, 作为储备液。精密吸取储备液 5.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻

[基金项目] 福建省科技计划项目 (2008Y0058)。

[作者简介] 张 晶 (1982-), 女, 硕士。Tel (0591) 22859169, E-mail chz2009@hotmail.com。

[通讯作者] 宋洪涛。Tel (0591) 83712298, E-mail sohok@vip.sohu.com。

度, 摇匀, 即得。②供试品溶液的制备: 取他克莫司温度敏感眼用凝胶约 0.6 g 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加模拟人工泪液 20 mL 适量流动相超声, 使其溶解并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.1.3 线性关系的考察** 精密吸取他克莫司贮备液 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 mL 置 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。按上述色谱条件进行测定, 以峰面积 A 对浓度 C (μg/mL) 进行线性回归, 得标准曲线方程为  $A = 9.907C - 0.479$   $r = 0.9999$ 。结果表明他克莫司在 1.48~59.40 μg/mL 浓度范围内与峰面积呈良好的线性关系。

**2.1.4 稳定性试验** 取供试品溶液, 34 °C 恒温水浴中放置, 分别在 0.4、8、12、24、48 h 进样, 在上述色谱条件进行测定, 以峰面积计算, RE 均不大 0.98%, 表明样品溶液在 48 h 内稳定。

**2.1.5 精密度试验** ①仪器精密度: 取对照品溶液, 在上述色谱条件下, 重复进样 6 次, 计算他克莫司峰面积的 RSD 为 0.64%。②方法重复性: 分别同一批样品 6 份, 按“供试品溶液的制备”项下操作, 在上述色谱条件下进行测定, 计算他克莫司峰面积的 RSD 为 0.77%。

**2.1.6 回收率测定** 取已知含量的眼用凝胶样品 9 份, 每份约 0.3 g 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 分别加入不同量的他克莫司对照品溶液, 制备低、中、高不同浓度供试品溶液, 每一浓度 3 份, 按“溶液的制备”项下操作, 在上述色谱条件下进行测定, 计算回收率, 结果见表 1。

表 1 他克莫司敏感眼用凝胶回收率测定结果 (n = 9)

样品量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.500	1.188	2.682	99.5		
1.503	1.188	2.688	99.7		
1.502	1.188	2.670	99.9		
1.502	1.485	2.979	99.5		
1.501	1.485	2.982	99.7	99.8	0.28
1.501	1.485	2.983	99.8		
1.502	1.792	3.297	100.2		
1.500	1.792	3.282	100.0		
1.502	1.792	3.290	100.3		

**2.2 影响因素对凝胶溶蚀与药物释放的影响**

**2.2.1 他克莫司温度敏感眼用凝胶的制备** 将他克莫司、0.7% 羟丙基-β 环糊精、适量氯化钠、0.02% 苯扎溴铵溶于注射用水中, 将其置于冰箱中冷藏 10 min 左右, 边搅拌边缓缓加入 20% 泊洛沙姆 407 和 10% 泊洛沙姆 188, 继续搅拌使泊洛

沙姆颗粒均被水润湿, 然后将其放入 4 °C 的冰箱中保存 24 h 以上, 直至得到澄清、无团块、分散均匀的溶液。制成 0.05% 的他克莫司温度敏感眼用凝胶。

**2.2.2 凝胶溶蚀与药物释放的测定** 采用无膜溶出模型研究眼用凝胶的溶蚀动力学<sup>[4,5]</sup>。称一定重量的他克莫司温度敏感眼用凝胶制剂加入到预先已称重的圆柱形容器中, 保持液面平整, 将该容器置于 34.0 ± 0.5 °C 的恒温水浴振荡器中预热 20 min, 使聚合物溶液完全形成凝胶。加入提前预热的 34.0 °C 模拟人工泪液 2.4 mL 作为释放介质, 该步小心操作以避免破坏凝胶表面。在一定频率下恒温振荡 20 min, 立即倾出全部释放介质, 将容器外表面用滤纸拭干, 迅速称量并记录其重量, 然后重新放入恒温水浴振荡器中平衡 20 min, 如此反复操作。相邻时间点样品的重量差异为在此期间的凝胶溶蚀量。以凝胶累积溶蚀百分率对时间作图, 得到凝胶溶蚀曲线。每一实验重复 3 次, 结果取平均值。

于考察眼用凝胶溶蚀动力学的同时测定药物的释放。将溶蚀实验得到的释放介质样品用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 弃去初滤液, 取续滤液经流动相稀释后用 HPLC 法测定药物浓度。以药物累积释放百分率对时间作图, 得到药物释放曲线。

**2.2.3 释放面积对凝胶溶蚀与药物释放的影响** 精密称取 2 g 凝胶分别置于截面面积为 2.40、3.80、6.15 cm<sup>2</sup> 的圆柱形容器中, 在 34.0 ± 0.5 °C 振荡频率为 100 r/min 的恒温水浴振荡器中, 依据“2.2.1”项下方法进行凝胶溶蚀和药物释放试验。

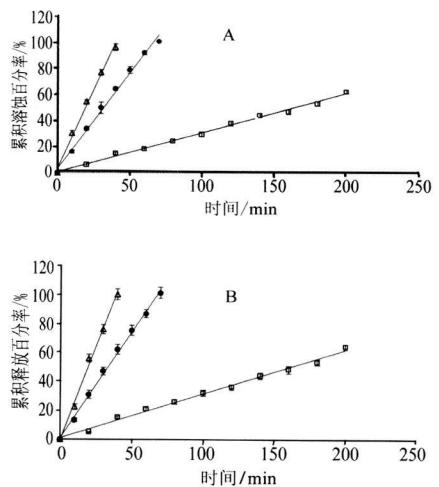


图 1 释放面积对凝胶溶蚀(A)和药物释放(B)的影响 (n = 3)

□ - 2.40 cm<sup>2</sup>; ● - 3.80 cm<sup>2</sup>; △ - 6.15 cm<sup>2</sup>

从图 1 中可见,随着释放面积的增加,凝胶溶蚀与药物释放速率显著增加。但无论凝胶溶蚀还是药物释放均以恒定的速率进行。将凝胶累积溶蚀百分率和药物累积释放百分率对时间回归,呈良好的线性相关 ( $r > 0.999$ ),显示出零级动力学特征,释放面积的改变不影响药物零级释放动力学特征。

为了更加直观地分析药物的释放机制,将上述实验的药物累积释放百分率对凝胶累积溶蚀百分率作图,其结果如图 2。经回归得到方程  $Y = 0.996X - 0.823$  ( $r = 0.996$ )其斜率接近于 1,表明在  $2.40 \sim 6.15 \text{ cm}^2$  内药物释放与凝胶溶蚀以相同的速率进行,而且凝胶溶蚀是决定药物释放的主要因素。

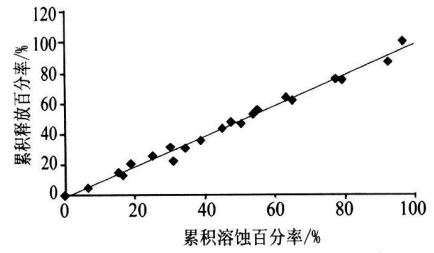


图 2 不同释放面积下药物释放与凝胶溶蚀相关性曲线

2.2.4 振荡频率对凝胶溶蚀与药物释放的影响  
精密称取 2 g 凝胶分别置于截面面积为  $3.80 \text{ cm}^2$  的圆柱形容器中,在  $34.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡频率为 50、100、150 r/min 的恒温水浴振荡器中,依据“2.2.1”项下方法进行凝胶溶蚀和药物释放试验。

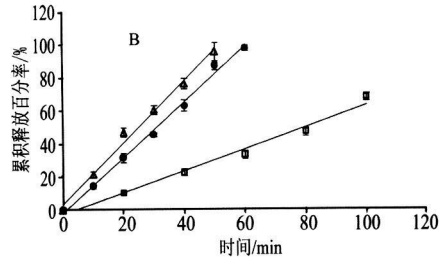
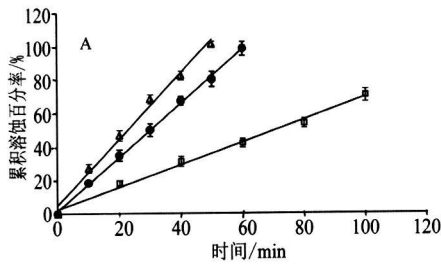


图 3 振荡频率对凝胶溶蚀 (A) 和药物释放 (B) 的影响 ( $n = 3$ )

□ - 50 r/min ● - 100 r/min △ - 150 r/min

从图 3 中可见,加快振荡频率,可显著促进凝胶溶蚀和药物释放。但无论凝胶溶蚀还是药物释放均以恒定的速率进行。将凝胶累积溶蚀百分率和药物累积释放百分率对时间回归,呈良好的线性相关 ( $r > 0.999$ ),显示出零级动力学特征。

将上述实验的药物累积释放百分率对凝胶累积溶蚀百分率作图,其结果如图 4。经回归得到方程  $Y = 1.008X - 3.988$  ( $r = 0.992$ )其斜率接近于 1。相关性分析结果表明,在 50~150 r/min 条件下,药物释放与凝胶溶蚀以相同的速率进行,凝胶溶蚀仍是控制药物释放的主要因素。

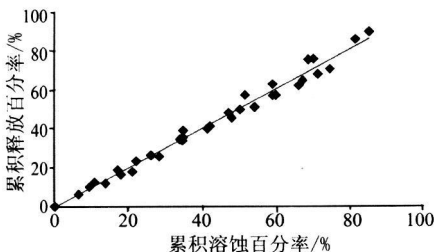


图 4 不同振荡频率下药物释放与凝胶溶蚀相关性曲线

研究凝胶滴眼剂的释放行为,过去多采用立式扩散池的方法<sup>[6]</sup>,将凝胶加入供给池中,以半透膜为隔离界面,于设定的时间点测定释放介质中的药物浓度;或采用类似片剂释放度的测定方法,将凝胶装入透析袋<sup>[7,8]</sup>,借助溶出仪研究药物的释放行为。而制备凝胶多采用的较高分子量的聚合物,在上述实验条件下,由于半透膜的截留作用,聚合物不能扩散进入到释放介质中,而药物受到浓度差的驱动,不断向周围满足漏槽条件的溶液扩散至释放完全。对于用作经皮药物传递系统的凝胶制剂,上述方法是研究其药物释放规律的理想实验模型,但却不适用于眼部给药的情况。结膜囊内充斥着不断更新的泪水,温度敏感眼用凝胶滴入眼中后,变成凝胶。水溶性凝胶在眼内将逐渐溶蚀并释放出其中的药物,因而可能存在完全不同的释药机制。本研究采用无膜溶出模型,较好地模拟体内环境以考察凝胶溶蚀及药物释放。

温度敏感眼用凝胶在眼内的作用过程受眨眼频率的影响,我们使用恒温振荡模拟眨眼的频率。随着振荡频率的增加,模拟人工泪液对凝胶表面的剪切速率增加,使凝胶表面边界层的厚度变薄,解缠结的胶束扩散进入释放介质的速度加快,致使凝胶溶蚀速率增大,药物的释放速率也随之增加。

### 3 讨论

【参考文献】

[1] 俞益丰,周文天. FK506缓释系统在角膜移植中的应用 [J]. 江西医学院学报, 2003, 43(3): 119.  
 [2] 费文雷,陈家祺,庞志清,等. FK506纳米粒制备及在兔眼组织中的分布 [J]. 眼科研究, 2004, 22(2): 164.  
 [3] 周文天,俞益丰,邓青,等. FK506胶原药膜抑制兔角膜移植的免疫排斥反应 [J]. 眼科新进展, 2004, 24(4): 254.  
 [4] 王玮,周建平,任逢晓. 双氯芬酸钠泊洛沙姆凝胶体外释放的影响因素研究 [J]. 中国新药杂志, 2007, 16(5): 1195.  
 [5] Felt O, Furrer P, Mayer M, *et al*. Topical use of chitosan in ophthalmology: tolerance assessment and evaluation of premea-

retention [J]. *Int J Pharm*, 1999, 180: 185.  
 [6] Utti A, Salmi L. Minimizing systemic absorption of topically administered ophthalmic drugs [J]. *Surv Ophthalmol* 1993; 37(6): 435.  
 [7] Srivithya B, Cardoza RM, Amin PD. Sustained ophthalmic delivery of ofloxacin from a pH triggered in situ gelling system [J]. *J Control Release* 2001, 73(2): 205.  
 [8] Lin HR, Sung KC. Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery [J]. *J Control Release* 2000, 69: 379.

[收稿日期] 2009-12-27  
 [修回日期] 2010-04-15

(上接第 266 页)

表 2 牡丹皮乙醚超声萃取法得到的挥发油成分分析结果

编号	保留时间	分子式	相对分子量	化合物名称	SI
1	3.15	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116	1,3-Dioxolane, 2,4,5-trimethyl	693
▲ 2	9.98	C <sub>12</sub> H <sub>36</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	444	Cyclhexasiloxane, dodecamethyl	599
3	11.41	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	398	Hepanediamide, N,N'-dibenzoyloxy-	823
▲ 4	12.29	C <sub>14</sub> H <sub>42</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	518	Cyclheptasiloxane, tetradecamethyl	753
5	12.78	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	282	Hexadecane, 2,6,11,15-tetramethyl	769
▲ 6	16.22	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166	Ethanone, 1-(2-hydroxy-4-methoxyphenyl)-(paeonol)	765
7	16.85	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166	Ethanone, 1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-	778
▲ 8	17.36	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	224	9-Ethoxy-10-oxatricyclo[7.2.1.0(1,6)]dodecan-11-one	565
▲ 9	17.78	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166	Ethanone, 1-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-	724
10	18.27	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	166	2-(6-Dihydroxy-3-methylacetophenone	718
11	18.94	C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> NOSi	181	3-Trimethylsilyloxy-6-methylpyridine	626
12	19.35	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	178	Phenol, 2-ethoxy-4-(2-propenyl)-	706
13	20.12	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	175	Isoquinolin-6,7-diol, 1-methyl	755
14	20.35	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S	194	4H-1-Benzothienopyran-4-one, 2,3-dihydro-8-methyl, 1-oxide	738
15	20.51	C <sub>38</sub> H <sub>68</sub> O <sub>8</sub>	652	l-(+)-Ascorbic acid, 2,6-dihexadecanoate	689
16	20.98	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>3</sub>	276	7,9-Ditertbutyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	704
17	21.59	C <sub>52</sub> H <sub>72</sub> MgN <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	840	Bacteriorhophyll ester	610
18	21.97	C <sub>36</sub> H <sub>69</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>3</sub>	695	Glycine, N-[(3α,5α,7α,12α)-24-oxo-3,7,12-tris(trimethylsilyloxy)cholestan-24-yl]-, methyl ester	629
19	22.516	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	280	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-	709
20	26.39	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> OSi	254	11-Oxo-5,5-dimethyl-5-silol-1H-5,10-dihydrobenzo[b]pyrido[4,3-e]azepine	868

▲-两种提取方法共有成分

3 讨论

3.1 在考察提取溶剂时,曾比较了乙醚、正己烷、丙酮等不同溶剂,发现其中使用乙醚提取所得牡丹皮挥发油含量最高,成分最全面,且仅需一次即可充分提取。另外在提取过程中,向超声仪内加入一定量的冰块,以保持水温在 0℃左右,防止乙醚挥发。

3.2 用不同的方法提取牡丹皮挥发油的效果不一样,传统的水蒸气蒸馏操作所需时间较长,而且在水长时间共沸时,一些热敏物质易发生氧化、聚合等反应导致变性,此外,部分挥发性成分未能提取出来,导致挥发油收率较低。与之相比,乙醚超声萃取法极大地缩短了操作时间,且具有选择性高、溶剂消耗量少,成本低廉的优点,挥发油收率也明显提高,

适用于大规模推广应用。

【参考文献】

[1] 黄泰康.常用中药成分与药理手册 [M].北京:中国医药科技出版社,1998:1040~1045.  
 [2] 江苏新医学院.中药大辞典 [M].上海:上海科学技术出版社,1998:1127~1130.  
 [3] XU SJ, Yang L, Zeng X, *et al*. Characterization of compounds in the Chinese herbal drug *Murdarrpi* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Rapid Commun in Mass Spectrom*, 2006, 20: 3275  
 [4] 陈晓蕾,袁劲松.水蒸气蒸馏法提取挥发油后新收油工艺的探讨 [J].湖南中医学院学报,1999,19(3):13.

[收稿日期] 2009-12-31  
 [修回日期] 2010-04-05