

pH敏感型盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶的制备及其体外释放考察

张治强^a, 张 玮^b, 陈 光^a, 张 敏^a, 霍俊滨^a, 崔 磊^a, 楚皓文^a, 高 静^c (第二军医大学, a 研究生管理大队; b 长海医院; c 药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 研制具有缓释作用的 pH敏感型盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶。方法 以卡波普为凝胶基质,以羟丙甲基纤维素为增稠剂,以溶液的粘度、即型凝胶形成能力及盐酸左氧氟沙星含量为评价指标,确定制备处方和工艺,并以优选处方进行体外释放考察。结果 经实验,其优选处方为盐酸左氧氟沙星 0.1 g,羟丙甲基纤维素 E 50 LV 2.0 g,卡波普 9 400.3 g,磷酸氢二钠 0.35 g,磷酸二氢钠 0.45 g,氯化钠 0.50 g,尼泊金乙酯 0.03 g,加水共制成 100 ml。体外释放结果显示其释药平缓,具有较好的缓释特征。结论 优选处方工艺稳定,质量控制方法可靠,适用于 pH敏感型盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶的制备和评价。

[关键词] 盐酸左氧氟沙星; pH敏感; 眼用; 即型凝胶

[中图分类号] R94 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)02-0122-04

Preparation and in vitro release of pH-triggered levofloxacin hydrochloride in-situ forming gel for sustained ophthalmic delivery

ZHANG Zhi-qiang^a, ZHANG Wei^b, CHEN Guang^a, ZHANG Ming^a, HUO Jun-bin^a, CUI Lei^a, CHU Hao-wen^a, Gao Jing^c (Second Military Medical University, a College of graduate students; b Changhai Hospital; c School of Pharmacy, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To develop the pH-triggered levofloxacin hydrochloride *in-situ* forming eye gel. **Methods** The gel was formed capool as gel base and hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) as thickening agents, and was the formula evaluated according to the viscosity, the *in-situ* gelling capacity and the content of levofloxacin hydrochloride. **Results** The optimized formulation was made by dissolving levofloxacin hydrochloride 0.1 g, HPMC E50LV 2.0 g, carbopol 0.3 g, Na₂HPO₄ 0.35 g, NaH₂PO₄ 0.45 g, NaCl 0.50 g, and ethylparaben 0.03 g in 100 ml water. The gels showed good sustained release characteristics *in vitro*. **Conclusion** The optimized formulation has a good reproducibility and can be used for preparation of pH-triggered levofloxacin hydrochloride *in-situ* forming eye gel.

[Key words] Levofloxacin hydrochloride; pH-triggered; ophthalmic delivery; *in-situ* forming gel

盐酸左氧氟沙星 (levofloxacin hydrochloride) 为氧氟沙星的左旋活性本体,与氧氟沙星相比,盐酸左氧氟沙星具有水溶性高、活性强、毒副作用低以及临床疗效高等特点,对葡萄菌属、痤疮丙酸杆菌等引起的眼科感染症有良好的疗效^[1]。

目前临床常用的盐酸左氧氟沙星滴眼液,在使用后由于结膜囊泪液不停的分泌,使其在结膜囊内滞留时间很短,因此眼内生物利用度很低。利用卡波普等基质对 pH敏感的特性,将其制成 pH敏感的眼用即型凝胶 (*in-situ* forming eye gel),以液体形式滴入眼部,在眼部生理环境作用下,在给药部位发生相转化成凝胶^[2],从而延长药物在结膜囊滞留时间,可以提高药物在眼内生物利用度。

本研究以卡波普作为凝胶基质,以羟丙基甲基纤维素作为增稠剂,制备了 pH敏感的盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶,建立了高效液相色谱法测定凝胶中主药含量,进行了处方的设计优化,并考察了优选处方的体外释放。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 FA1004电子天平(上海天平仪器厂); Waters HPLC 色谱系统(515泵, 916二极管阵列检测器, Millennium 工作站, 美国 Waters 公司); Brookfield 粘度计(美国 Brookfield 工程实验室公司); RCZ-6B1 溶出度仪(上海黄海药检仪器有限公司)。

盐酸左氧氟沙星对照品(南阳普康集团衡育制药有限责任公司, 纯度 99.3%); 卡波普 940(诺誉化工); 羟丙基甲基纤维素(美多秀, 规格分别为 K4

[作者简介] 张治强 (1986-), 男, 本科。

[通讯作者] 高 静. Tel: (021) 81871293, E-mail: gjsmmu@126.com.

M, E4M, E15LV, E50LV, 卡乐康包衣技术有限公司); 磷酸氢二钠 (中国医药集团上海化学试剂公司); 磷酸二氢钠 (中国医药集团上海化学试剂公司); 尼泊金乙酯 (中国医药集团上海化学试剂公司); 氢氧化钠 (中国医药集团上海化学试剂公司); 水为二次蒸馏水。

人工泪液:根据泪液的电解质组成,精密称取氯化钠 6.70 g,碳酸氢钠 2.00 g,二水合氯化钙 0.08 g,置 1 000 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀即得^[3]。

1.2 pH敏感型凝胶的制备 分别称取处方量羟丙甲基纤维素和卡波普,加适量水使其充分溶胀。配制磷酸盐缓冲液并加入到上述胶体溶液中,充分搅拌,得溶液 A。以适量水溶解尼泊金乙酯,加热使其溶解,并加入盐酸左氧氟沙星及氯化钠,得黄色澄清溶液 B。将溶液 B 缓慢倾入溶液 A 中,搅拌均匀,加 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 至 6.0,加水至 100 ml,过滤,即得。

1.3 含量测定方法的建立及方法学考察

1.3.1 色谱条件 Diamond ODS 色谱柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温为室温;流动相为 0.05 mol/L 枸橼酸溶液-乙腈 (79:21),使用三乙胺调节 pH 至 4.0,流速 1.2 ml/min;进样体积 10 μl;检测波长 293 nm。

1.3.2 标准曲线的绘制 精密称取经 105 °C 干燥至恒重的盐酸左氧氟沙星对照品适量,加 0.01 mol/L 稀盐酸溶解并定量稀释制成浓度为 25.0、50.0、100.0、150.0、200.0 μg/ml 的溶液,照 1.3.1 色谱条件分析,测定峰面积,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标作线性回归得标准曲线。

1.3.3 精密度实验 配制低、中、高 (80、100、120 μg/ml) 3 种浓度盐酸左氧氟沙星溶液,分别按 1.3.1 项下色谱条件分析,测其峰面积。1 d 内测定 5 次及每天测定 1 次,连续 5 d,计算日内与日间精密度。

1.3.4 回收率实验 称取盐酸左氧氟沙星对照品约 80、100、120 mg,分别按处方工艺配制溶液,调节 pH 值至 6,加水至 100 ml,精密量取该溶液 5 ml 置 50 ml 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试液。精密称取盐酸左旋氧氟沙星对照品 100 mg 置 100 ml 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取该溶液 5 ml 置 50 ml 容量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照液。照 1.3.1 项下的方法操作,记录其峰面积,计算盐酸左氧氟沙星的回收率。

1.4 即型凝胶胶凝能力的判定 首先要求在制

剂滴入 pH 7.4 的 3 ml 人工泪液后形成凝胶,不沉淀,不絮凝。而后将人工泪液轻轻晃动,要求已形成的凝胶可以快速溶解,以保证其滴入眼部可以随泪液流动分散,均匀涂布。

1.5 处方设计及制备 要保证滴眼液在体外能够分剂量准确,并具有较好的流动性,所设计的处方必须有较低的粘度。而要使滴眼液在生理 pH 范围内迅速胶凝,必须具有一定的胶凝能力。参考有关文献资料^[2],在预实验的基础上,我们考察了影响最为显著的胶凝剂——卡波普和增稠剂——羟丙甲基纤维素的不同规格和浓度对处方粘度和胶凝能力的影响 (表 1)。

表 1 pH敏感型盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶处方设计

制剂编号	浓度 (% w/v)	
	羟丙甲基纤维素	卡波普
1	E4M 2.0	0.3
2	E4M 1.5	0.2
3	E4M 1.5	0.4
4	K4M 1.5	0.3
5	K4M 1.5	0.4
6	E15LV 2.0	0.3
7	E50LV 2.0	0.3
8	E50LV 2.0	0.4

表 1 处方中主药盐酸左氧氟沙星的含量均为 0.1%,其它成分为磷酸氢二钠 0.35%,磷酸二氢钠 0.45%,氯化钠 0.50%,尼泊金乙酯 0.03%。

1.6 体外释放度测定 按中国药典 2005 版释放度测定法 (附录 XD 第一法),以 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 100 ml 作为释放介质,转速 50 r/min,测定温度 (37 ± 1) °C。取盐酸左氧氟沙星即型凝胶 1 ml 置透析膜凹处,并将透析膜用溶出度杯的卡槽固定。将转篮置于释放液内,使释放液恰好淹没透析膜凹处,但低于卡槽。在 0、0.5、1、2、4、6、8 h 分别加溶液 1 ml,经 0.8 μm 微孔滤膜滤过,并即补充 37 °C 的 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 1 ml,取续滤液照 1.3 项下的方法进行含量测定。

2 结果

2.1 盐酸左氧氟沙星含量测定 HPLC 法的方法学考察结果

2.1.1 色谱图 在选定色谱条件下,盐酸左氧氟沙星 HPLC 图谱见图 1。由图可见,在此色谱条件下,盐酸左氧氟沙星的保留时间约为 5.4 min,空白辅料对其测定无干扰。

2.1.2 标准曲线 回归方程为 $A = 2.1538C \times 10^4$

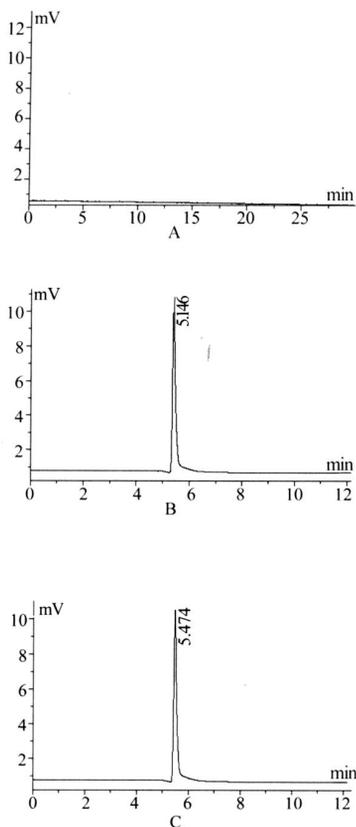


图 1 盐酸左氧氟沙星含量测定 HPLC 色谱图

A 空白辅料; B 盐酸左氧氟沙星对照品;
C 盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶

$- 5.084 \times 10^4$ ($r=0.9999$), 表明盐酸左氧氟沙星浓度在 $25 \sim 200 \mu\text{g/ml}$ 范围内, 浓度与峰面积具有良好的线性关系。

2.1.3 精密度与回收率 结果见表 2。在所选择的含量测定条件下, 方法的回收率在 $99.8\% \sim 100.1\%$ 之间, 表明辅料不干扰测定, 该方法可以满足盐酸左氧氟沙星含量测定的需要。日内日间精密度 RSD 均小于 1.5% , 表明样品稳定性和方法重现性满足分析要求。

表 2 盐酸左氧氟沙星高效液相测定方法回收率与精密度结果

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%) $n=3$	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
80	99.84 ± 0.21	0.68	1.31
100	100.08 ± 0.66	0.88	1.21
120	100.06 ± 0.34	0.82	1.07

2.2 处方筛选结果 按照表 1 中的各处方配制制剂, 测定盐酸左氧氟沙星含量、溶液粘度, 并考察各处方的胶凝能力, 考察结果见表 3。

表 3 不同盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶处方的质量考察结果

制剂编号	盐酸左氧氟沙星含量 (占标示量百分比)	凝胶形成能力	粘度 ($\text{mPa} \cdot \text{s}$) (20 r/min)
1	98.60	+++	2879.5
2	99.21	-	380.9
3	98.89	+	1873.0
4	97.32	+	3010.4
5	97.09	+++	3216.1
6	99.04	-	340.3
7	98.45	+	821.2
8	98.53	++	971.1

注: -, 未形成凝胶; +, 数分钟内形成凝胶, 并可迅速溶解; ++, 迅速形成凝胶, 并保持数小时; +++, 迅速形成凝胶, 并保持至 1 d。

由表 3 可见, 按处方 1 至 8 制备的样品中, 盐酸左氧氟沙星的含量均符合药典规定, 但就即型凝胶形成能力来看, 处方 2 因为卡波普的浓度过低而无法形成凝胶, 处方 6 因为所用羟丙甲基纤维素的分子量过低, 增稠作用不明显, 也未能在人工泪液中形成凝胶。

处方 1、5、8 胶凝能力强, 但形成的凝胶不能快速溶解, 难以保证其给药后可以随泪液流动分散。

处方 3、4、7 胶凝能力适宜, 可形成凝胶, 并可在轻轻振荡后快速分散。考虑到处方 7 所制备的盐酸左氧氟沙星粘度较低, 溶液流动性好, 因此以其作为最佳处方。

2.3 体外释放度测定结果 体外累积释放曲线见图 2。由测定结果可知, 由处方 7 所制得的盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶在 4.5 h 释药达到约 80%, 8.0 h 可释放至约 94%, 释药平缓, 具有较好的缓释特性。

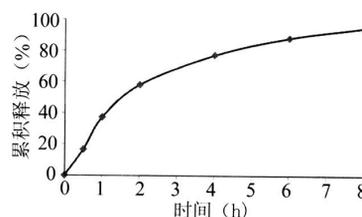


图 2 盐酸左氧氟沙星眼用即型凝胶体外释放结果 ($n=3$)

3 讨论

盐酸左氧氟沙星的普通滴眼液使用后由于结膜囊泪液的分泌及排除, 使其在结膜囊内滞留时间很短, 因此眼内生物利用度低。其眼膏、凝胶等剂型虽能延长滞留时间, 但眼膏造成视力模糊, 凝胶因粘度过大使分剂量不准确。卡波普是一种丙烯酸树脂, 在酸性条件下, 溶解于水形成易流动的溶液, 随 pH 值的升高, 溶液黏度急剧增加, 溶液发生相变, 转化成凝胶状态^[4-5], 使得药物的释放延迟。但若处方中仅用卡波普作为主要基质, 使用量大, 溶液呈酸性,

使用时会造成眼部刺激,因此我们在处方中加入了羟丙甲基纤维素作为增稠剂,与胶凝剂卡波普共同作为主要基质,通过考察不同浓度的配比,得到了优选处方。本文研制的盐酸左氧氟沙星即型凝胶,以液体形式滴入眼部后,在眼部 pH 环境作用下,在眼部给药部位发生相变形成凝胶,延长药物在结膜囊滞留时间,提高药物在眼内生物利用度,使药效得到更充分的发挥。

【参考文献】

[1] 陈 樱,甘晓萍.左氧氟沙星治疗细菌性角膜炎的疗效[J].

中国医药杂志,2001,10(3):216

- [2] Wilson CG, Zhu YP, Frier M, *et al* Ocular contact time of a carbomer gel (Gel Tears) in humans [J]. *Br J Ophthalmol*, 1998, 82(10): 1131.
- [3] Yoshiki O, Murat D, Kazuo T, *et al* Laboratory findings in tear fluid analysis [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 369(1): 17.
- [4] 宁黎丽. 眼用即型凝胶特点及研发过程中需关注的问题 [J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(13): 988.
- [5] 郑俊民. *药用辅料手册* [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005, 107.

[收稿日期] 2010-01-04

[修回日期] 2010-03-15

(上接第 113 页)



图 2 给予 TOE 0.5 mg 后典型心电图变化, 示三度房室传导阻滞

3 讨论

水母毒素属多肽类毒素,相对分子质量 10 ~ 600 kDa,其生物活性广泛,具有溶血毒性、心血管毒性、神经肌肉毒性、皮肤毒性以及抗氧化和杀虫活性等^[5]。由于水母毒素的疏水性和热不稳定性,且易黏附、易分解^[5],阻碍了对其分离纯化和生物活性的研究,使其研究进展明显滞后于蛇毒和蝎毒等其他常见生物毒素。1998年, Bloom 等^[6]建立了新的刺丝囊毒素提取方法,使得毒素活性的保持大为改善,水母毒素的研究报道才逐渐增多,其中心血管活性尤为受到关注。

本课题组前期在整体动物实验中发现,心脏毒性是水母毒素致死大鼠的主要原因^[7],并且在研究过程中记录到大鼠心律失常的现象,因此推测 TOE 具有诱导心脏心律失常的作用。为了进一步明确 TOE 对心脏传导系统的影响,进行了大鼠 Langendorff 离体心脏灌流试验,在排除神经及其他因素干扰的情况下分析 TOE 对大鼠心率和心律的影响。结果表明,TOE 显著减缓大鼠心率,并诱发大鼠离体心脏心律失常的发生。心律失常的程度随 TOE 剂量增加而加重,也随着作用时间的延长而加深。同时,我们发现大鼠离体心脏出现了多种形式的缓慢性心律失常,在 TOE 剂量较小时,出现多种冲动形成的异常,提示可能是由于电解质紊乱、儿茶酚胺增多等原因而导致的冲动形成异常^[8];当 TOE 剂量

达到 0.5 mg 时,离体心脏发生三度房室传导阻滞,此时心电图 QRS 波群正常,心率也较为稳定,故推测其阻滞部位可能位于希氏束及其近郊^[8]。

本研究的意义在于从离体器官水平上证实了 TOE 可以诱发心律失常,为阐明其心脏毒性的机理提供了新的依据。此外,由于 TOE 0.5 mg 能够诱发三度房室传导阻滞的发生,为临床上对水母毒素致死原因机理与治疗对策的研究提供了新的思路。

【参考文献】

- [1] Ramasamy S, Isbister GK, Seymour JE, *et al* Pharmacologically distinct cardiovascular effects of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) venom and a tentacle-only extract in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2005, 155(2): 219.
- [2] Xiao L, He Q, Guo Y, *et al* *Cyanea capillata* tentacle-only extract as a potential alternative of nematocyst venom: its cardiovascular toxicity and tolerance to isolation and purification procedures [J]. *Toxicol*, 2009, 53(1): 146.
- [3] Sanchez-Rodriguez J, Torrens E, Segura-Puertas L. Partial purification and characterization of a novel neurotoxin and three cytolytins from box jellyfish (*Carybdea marsupialis*) nematocyst venom [J]. *Arch Toxicol*, 2006, 80(3): 163.
- [4] Johnston KM, Macleod BA, Wakker MJA. Responses to ligation of a coronary artery in conscious rats and the actions of antiarrhythmics [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1983, 61(11): 1340.
- [5] 肖 良,张黎明.水母毒素的研究进展 [J]. *中国海洋药物杂志*, 2007, 26(6): 40.
- [6] Bloom DA, Bumett JW, Alderslade P. Partial purification of box jellyfish (*Chironex fleckeri*) nematocyst venom isolated at the beachside [J]. *Toxicol*, 1998, 36(8): 1075.
- [7] Xiao L, Liu GS, Wang QQ, *et al* The lethality of tentacle-only extract from jellyfish *Cyanea capillata* is primarily attributed to cardiotoxicity in anaesthetized SD rats [J]. *Toxicol*, 2010, 55(4): 838.
- [8] 叶任高,陆再英. *内科学* [M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 210.

[收稿日期] 2010-03-02

[修回日期] 2010-03-16