

文章编号:(2007)05-0255-05

环孢素自微乳化半固体骨架型胶囊的含量测定及体外评价

王丽君, 王东凯, 宋 扬

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: **目的** 制备环孢素自微乳化半固体骨架胶囊, 并建立其含量测定及体外评价方法。**方法** 采用熔融法制备了环孢素自微乳化半固体骨架型胶囊, 用HPLC法测定了胶囊中药物的含量, 通过测定自乳化时间、乳化后乳剂粒径的大小及药物的体外溶出行为对自乳化释药系统进行体外评价。**结果** 自制环孢素自微乳化半固体骨架胶囊的含量为99.75%, 自制处方10 min内已基本乳化完全, 乳化后乳剂粒子大小在50 nm左右, 体外45 min溶出大于85%。**结论** 建立的方法适合含量测定及体外评价。

关键词: 药剂学; 含量测定; 体外评价; 高效液相色谱法; 半固体; 环孢素

中图分类号:R944.1

文献标志码:A

免疫抑制剂环孢菌素A(cyclosporine A, CsA)是一种从丝状真(tolypocladium inflatum)培养液中分离出的由11个氨基酸组成的环肽。该药发现于1969年, 1978年首次应用于临床。1983年美国FDA批准用于临床肾移植^[1]。环孢素口服吸收不规则、不完全, 且对不同个体的差异较大, 生物利用度约为30%^[2]。目前环孢素的制剂依照给药途径的不同可分为静脉输注用制剂、口服制剂、眼用制剂和皮肤用制剂等, 其中静脉输注和口服给药制剂有商品生产, 在口服商品中以诺华公司上市的软胶囊制剂“新山地明”应用更广泛, 然而软胶囊制剂贮存过程中发生液态醇类溶剂透过囊壳挥发, 加快囊壳明胶的交链固化反应使崩解时限不合格等问题, 如果内容物为固体或半固体则可以减轻或避免类似液体内容物对囊壳的影响, 另外也有将自乳化产品通过可在处方中加入固体吸附剂、采用喷雾干燥或冻干等除去水分制得固体自微乳, 但是这些技术的成本较高或固体吸附剂用量较大, 而半固体骨架技术工艺简单且所用辅料多为具有一定的HLB值可与自乳化很好结合。故作者在自微乳化的基础上结合半固体骨架技术制备了环孢素自乳化半固体骨架胶囊, 并建立了其含量测定方法和体外评价方法。

1 仪器与试药

高效液相色谱仪(岛津 LC—10AT 泵、SPD—10A 紫外检测器、TC—100 柱温箱、CKChrom 数据处理系统、7725i 进样阀, 日本 Shimadzu 公司), N2010 色谱工作站(杭州明通科技有限公司), RC 药物溶出仪(天津医疗电子仪器公司)。

Labrasol(法国 Gattefosse 公司), 中链三酸甘油酯(铁岭北亚药用油有限公司), 聚氧乙烯(35)蓖麻油(德国 BASF 公司), 泊洛沙姆(沈阳药科大学制药厂), 吐温—80(北京佳福晨康药用辅料有限公司), 聚氧乙烯 40 硬脂酸酯(南京金陵石化科技开发公司)。

收稿日期:2007-03-19

作者简介:王丽君(1981-), 女(民族), 辽宁绥中人, 硕士研究生, Tel.024-23986310; 王东凯(1962-), 男(民族), 副教授, 辽宁新民人, 主要从事药物新剂型与新技术的研究, Tel. 024-23986310, E-mail wangdkxy@yahoo.com。

2 方法与结果

2.1 环孢素自微乳化半固体骨架型胶囊的制备

将处方量的辅料在 60 ℃ 水浴中磁力搅拌使熔融, 加入处方量的药物搅拌使溶解, 将热融物适量灌入 1 号硬胶囊, 室温固化, 即得。

2.2 环孢素自微乳化半固体骨架型胶囊的含量测定

2.2.1 方法的建立

色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS C₁₈ (300 mm × 4.6 mm, 10 μm), 流动相: 乙腈-甲醇-水-异丙醇 (体积比为 900.0:450.0:50.0:0.5), 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 225 nm, 柱温: 70 ℃。

2.2.2 最大吸收波长的确定

精密称取环孢素 10 mg, 置于 100 mL 量瓶内, 加入甲醇溶解并稀释至刻度, 取 1.0 mL 至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。采用紫外可见分光光度法, 在 200–400 nm 波长内进行紫外扫描, 并取相应比例的辅料于 200–400 nm 波长内进行扫描。环孢素在 206 nm 波长处有最大吸收, 聚氧乙烯 (35) 蓖麻油在 206 nm 处有吸收, 而中链三酸甘油酯、Labrasol 在 206 nm 处均无明显吸收。参考文献[3], 作者选择 225 nm 为吸收波长, 采用 HPLC 法测定环孢素自微乳化半固体骨架胶囊的含量, 且所用辅料在该方法条件下均不干扰测定, 所以确定选择该液相条件进行本制剂的含量测定。

2.2.3 标准曲线的绘制

精密称取约环孢素 100 mg, 于 100 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 作为储备液。分别精密移取储备液 0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10 mL 于 100 mL 量瓶中, 再用甲醇定容至刻度, 即制得 1、5、10、25、50、100 mg·L⁻¹ 的溶液。在上述色谱条件下, 分别精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标进行线性回归, 绘制标准曲线, 得回归方程: $Y=1.31 \times 10^5 X + 1.03 \times 10^5$, $r=0.9997$ 。结果表明环孢素在 1~100 mg·L⁻¹ 内具有较好的线性关系, 见表 1。

Table 1 The relation of the concentration and the peak area

ρ (mg·L ⁻¹)	1	5	10	25	50	100
Peak area	1.45×10^5	7.00×10^5	1.39×10^6	3.47×10^6	6.80×10^6	1.31×10^7
Linear equation	$Y=1.31 \times 10^5 X + 1.03 \times 10^5$ $r=0.9997$					

2.2.4 回收率实验

精密称取处方量的辅料, 在 60 ℃ 水浴搅拌下熔融, 分别加入约为 20、25、30 mg 的环孢素, 继续搅拌使药物溶解在辅料中, 室温固化, 取固化物适量用甲醇溶解并稀释至药物质量浓度为 40、50、60 mg·L⁻¹, 在上述色谱条件下进行测定, 分别精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 计算各样品的回收率。每个质量浓度水平操作 3 次, 结果见表 2。

Table 2 Result of the recovery determination of CyA

$m_{\text{added}}/\text{mg}$	$m_{\text{found}}/\text{mg}$	Recovery/%	Mean /%	RSD/%
20.3	19.9	97.99		
20.4	20.1	98.30		
20.6	20.0	97.30		
25.3	24.9	98.34		
25.5	25.1	98.59	98.10	1.07
25.1	24.8	98.80		
30.1	29.9	99.36		
30.5	30.0	98.07		
30.6	29.9	96.43		

2.2.5 精密度试验

精密称取环孢素对照品适量, 用甲醇配制成 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的药物溶液, 照 HPLC 法在 225 nm 处测定, 计算精密度, 结果见表 3, 结果表明日内精密度良好。

Table 3 Precision of CyA

Sample	1	2	3	4	5	6	RSD/ %
Peak area	6.86×10^6	6.90×10^6	6.89×10^6	6.83×10^6	6.91×10^6	6.88×10^6	0.43

2.2.6 含量测定

取本品 10 粒, 剥去胶囊壳后精密称取适量 (约相当于环孢素 25 mg), 用甲醇配制成质量浓度为 $50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液, 作为待测液。

精密称取环孢素对照品 10 mg 置 200 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得对照溶液。分别精密量取 20 μL 待测液和对照液注入液相色谱仪, 记录峰面积, 用外标法计算含量为 99.75%。

3 制剂的体外评价

3.1 自乳化效率

自乳化效率指的是自乳化浓缩液自发形成微乳或分散相粒径均一的精细乳滴的能力。自乳化效率实验可以通过目测观察^[4]或用浊度变化来测量自乳化的平衡时间^[5], 通过评价自乳化的速率和分散后的粒径来评价自乳化的效率。

3.1.1 自乳化速率

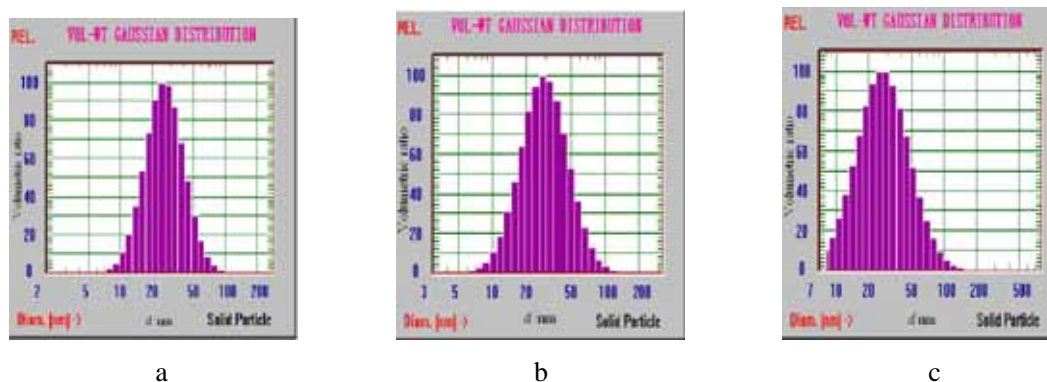
自乳化速率为自乳化浓缩液自发形成微乳或分散相粒径均一的精细乳滴的时间, 取本品约 0.6 g (相当于环孢素 25 mg) 分别于 100 倍量的水、 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl、pH 6.8 的磷酸缓冲液, 记录其完全乳化的时间, 结果见表 4。

Table 4 The efficiency of emulsifying

Solution	Water	0.1 mol·L ⁻¹ HCl	Buffer solution of pH6.8
<i>d</i> (particle size)/nm	31.7±12.17	29.8±13.96	30.5±12.85
<i>t</i> /min	1.5	1.2	1.3

3.1.2 粒径的测定

作者采用激光散射法测定了环孢素自微乳化半固体骨架胶囊在不同介质中的粒径和粒度分布(测定条件: 温度 25 °, 激光检测角度 90°, 用水稀释 10 倍), 结果见图 1。



a-H₂O ; b-0.1 mol·L⁻¹ HCl ; c-pH6.8 PBS

Fig.1 The particle size of the formulation in different solution

3.2 溶出度的测定

色谱条件同含量测定方法。

3.2.1 体外溶出度测定方法

取环孢素自微乳化半固体骨架胶囊, 精密称定置于溶出仪转篮中, 转篮转速为 $(50 \pm 1) \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 溶出杯中加溶出介质水 500 mL, 温度控制在 $(37 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 。分别在 5、15、30、45、60 min 时取样 3 mL, 过滤, 滤去初滤液, 取续滤液备用并补加相应介质; 取上述溶液照高效液相色谱法, 在 225 nm 波长处测定, 按标准曲线计算各溶出点的浓度, 并计算累计溶出百分率。以时间为横坐标, 累积溶出率为纵坐标绘制溶出曲线。结果见图 2。

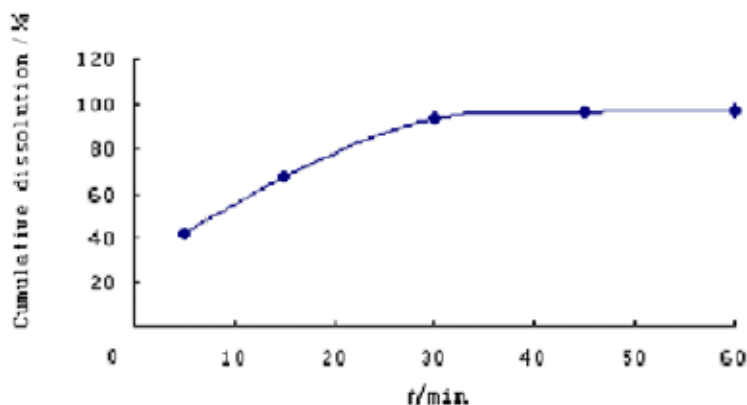


Fig.2 The curve of dissolution

3.2.2 胶囊壳的干扰实验

取空胶囊壳照溶出度测定方法进行试验, 在 225 nm 波长下测定, 结果表明空胶囊壳对溶出度的测定不产生干扰。

4 讨论

- a. 采用 HPLC 法测定环孢素自微乳化半固体骨架型胶囊的含量, 辅料及胶囊壳对测定不产生干扰。
- b. 对环孢素半固体骨架胶囊进行了体外评价, 本品在水、 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl、pH6.8的磷酸缓冲液中乳化时间分别为1.5、1.2、1.3 min, 乳化后粒径分别为31.7、29.8、30.5 nm, 结果可见无显著差异。
- c. 采用 HPLC 法测定环孢素半固体骨架胶囊的体外溶出度, 可用于环孢素半固体骨架胶囊的质量控制, 且在 45 min 时溶出大于 85%。

参考文献:

- [1] 刘阳,肖庚富.环孢菌素 A 的研究进展及应用[J]. 生物技术通报, 2006, 2: 21-24.
- [2] 孟晓梅,殷剑,张华等. 环孢素A在神经免疫疾病中的临床应用[J].中国神经免疫学和神经病学杂志, 2006, 13(1): 22-24.
- [3] 王建, 张传学.高效液相色谱法测定环孢素胶囊的含量[J].中国药事, 2001, 15(2): 112-113.
- [4] POUTON CW. Formulation of Self-emulsifying drug delivery systems[J].Advanced Drug Delivery Reviews, 1997, 25(4): 47-58.
- [5] GERSHANIK T, BENZENO S, BENITON S. Interaction of Self-emulsifying lipid drug delivery system with the everted rat intestinal mucosa as a function of droplet size and surface charge[J]. Pharm Res, 1998, 15(6): 863-869.

***In vitro* evaluation and quantification of cyclosporine self-microemulsifying hard capsules drug delivery system**

WANG Li-jun , WANG Dong-kai , Song Yang

(School of Pharmaceutics , Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Object To prepare the formulation of cyclosporine self-microemulsifying hard capsules drug delivery system , establish the methods for *in vitro* evaluation of cyclosporine self-microemulsifying hard capsules. **Methods** Fusion method was used to prepare the self-microemulsifying hard capsules of cyclosporine , the contents of cyclosporine in the samples was determined by HPLC, the time of self-emulsifying , particle size of emulsion and the dissolution of drug were determined. **Results** The content of the self-microemulsifying hard capsules of cyclosporine was 99.75%. The formulation could fully emulsify in 10 min and the particle size was about 50 nm. The release was 85% in 45 min.

Key words: pharmaceutics; content determination; *in vitro* evaluation; HPLC ; semi-solid; cyclosporine

(本篇责任编辑: 曹霞)