

文章编号：(2009)04-0235-07

盐酸左氧氟沙星眼用制剂的制备及其兔眼泪液消除动力学

孙辉辉, 郭映君, 张文萍, 王彦, 何仲贵

(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要:目的 制备盐酸左氧氟沙星普通滴眼液和温度敏感型眼用原位凝胶, 并比较其在家兔眼内的泪液消除动力学。**方法** 用 RP-HPLC 法测定 6 只健康家兔以盐酸左氧氟沙星普通滴眼液和温度敏感型眼用凝胶单次给药后不同时间点的泪液中药物浓度, 计算药动学参数。**结果** 盐酸左氧氟沙星原位凝胶、普通自制和市售滴眼液的药物动力学参数分别为: ρ_{\max} 为(1249.54±190.45)、(859.82±103.20)和(925.77±138.42) mg·L⁻¹, AUC_{0-t} 为(42976.37±2429.49)、(14085.19±1635.84)和(15760.37±3143.25) mg·L⁻¹·min, MRT 为(83.70±8.29)、(28.53±2.18)和(26.85±1.83) min。**结论** 体温敏感眼用凝胶的泪液药物浓度-时间曲线下面积(AUC)为市售制剂的 2.73 倍, 平均滞留时间是市售制剂的 3.12 倍。自制滴眼液与市售制剂间无显著差异。说明温敏型凝胶可以延长药物在眼部滞留时间, 从而提高生物利用度。

关键词: 药剂学; 体温敏感凝胶; 消除动力学; 眼部生物利用度; 盐酸左氧氟沙星

中图分类号: R94; R969.1

文献标志码: A

原位凝胶 (*in situ gel*, ISG)是指以溶液状态给药后立即在用药部位发生相转变, 形成的非化学交联的半固体制剂, 具有分剂量准确、滞留时间长、有良好的控制释药和患者顺应性等优点。

本文作者设计的温敏型 ISG 以泊洛沙姆 (商品名为普朗尼克, 由聚氧乙烯 (polyethylene oxide, PEO) 单元和聚氧丙烯 (polypropylene oxide, PPO) 单元组成的 ABA 型嵌段共聚物) 为基质, 常温下为自由流动的液体, 当达到临界胶束温度时, 聚合物链上的疏水性 PPO 嵌段脱水, 泊洛沙姆分子在水溶液中聚集成以脱水 PPO 链为内核、以水化膨胀的 PEO 链为外壳的球状胶束, 由于胶束间的缠结和堆砌作用加剧而发生胶凝^[1]。本文作者以盐酸左氧氟沙星 (Levofloxacin hydrochloride, LVFX) 为模型药物设计了普通滴眼液和温敏型原位凝胶, 并重点考察了其在兔眼中泪液的消除动力学, 采用 RP-HPLC 法测定了单次滴眼后兔眼泪液中的药物浓度, 比较其药动学性质, 为进一步研究提供实验依据。

1 仪器与材料

HPLC 仪 (PU-2130、UV-2420, 日本 Hitachi 公司), Kromasil ODS-C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 200 mm, 5 μm, 美国 Phenomenex 科技发展有限公司), XW-80A 旋涡混合器 (上海精科实业有限公司), TGL-16G 型离心机 (上海安亭科学仪器厂), NDJ-8S 数显粘度计 (上海精密科学仪器有限公司)。

盐酸左氧氟沙星 (LVFX, 江西大地制药有限公司, 批号 060614-2), 海伦 (盐酸左氧氟沙星滴眼液, 山东博士伦福瑞达制药有限公司, 批号 080418021), 泊洛沙姆 188 ($M_r=8\ 400$, pH6.0 ~7.0, 美国 BASF 公司), 泊洛沙姆 407 ($M_r=12600$, pH6.0~7.4, 美国 BASF 公司), 透明质酸钠 ($M_r=2\times 10^5$, 山东福瑞达生物化工有限公司), 其他药品及试剂均为分析纯及色谱纯规格。

白色家兔 6 只, 雌雄各半, 体质量 2.0~3.0 kg, 沈阳药科大学实验动物中心提供, 实验动物合格证号 0001521, 许可证号 SCXK (辽) 2009-0002。实验前 24 h 自由进食, 饮水, 并进行眼部检查, 以确保无任何眼疾。

2 方法和结果

收稿日期: 2009-3-19

作者简介: 孙辉辉 (1984-), 女 (汉族), 河北石家庄人, 硕士, Tel.15942085824, E-mail sunhuihui2008@hotmail.com; 何仲贵 (1965-), 男 (汉族), 宁夏盐池人, 教授, 博士, 主要从事药物新剂型与新技术研究, Tel.024-23986321, E-mail:hezongui@gmail.com。

2.1 LVFX 普通滴眼液的制备

精密称取羟苯乙酯 0.030 g 于 80 mL 注射用水中，加热使溶解并加入盐酸左氧氟沙星 0.33 g、 NaH_2PO_4 0.5 g、氯化钠 0.60 g、透明质酸钠 0.1 g，完全溶解后，用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.0，搅拌均匀，加注射用水至 100 mL。用 0.22 μm 滤膜除菌过滤，测定 pH 值和含量合格后，无菌分装即得。

2.2 LVFX 温敏型原位凝胶 (Levofloxacin hydrochloride *in situ* gel, LVFX-ISG) 的制备

采用冷溶法^[2]制备凝胶溶液。将 20 g 泊洛沙姆 407、8 g 泊洛沙姆 188 以及 0.2 g 透明质酸钠混合均匀，于高速磁力搅拌下缓缓加入到 4 的 药物及其他添加剂的溶液中，使泊洛沙姆颗粒及透明质酸钠被水充分润湿，然后将其放至冰箱中保存 24 h 以上，直至聚合物完全溶解得到澄清溶液。

2.3 原位凝胶制剂性质的考察

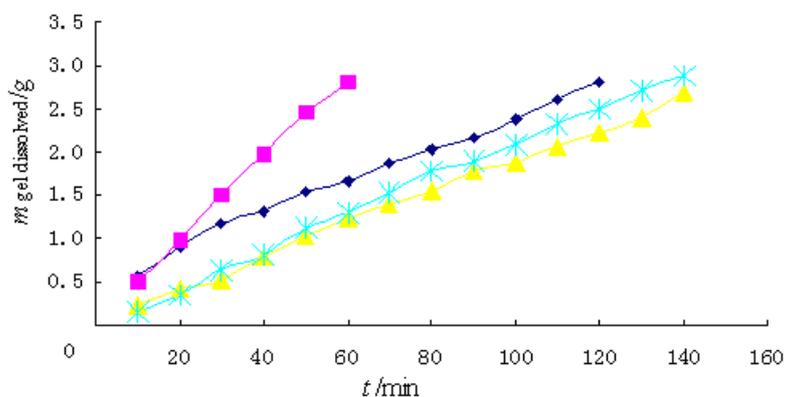
2.3.1 胶凝温度的考察

采用搅拌子法^[3]测定制剂的胶凝温度。在西林瓶中装入约 5 g 凝胶溶液和搅拌子，其中插入 0.1 精密温度计，磁力搅拌下缓慢升温，不断将西林瓶倾斜 90°，以溶液不发生流动时的温度为相转变温度。连续测定 3 次，结果取平均值。测得胶凝温度为 28.8。同时考察了凝胶溶液与模拟泪液 (simulated tear fluid, STF) 以质量比为 40:7 的比例混合后的胶凝温度，所测结果为 33.8。

2.3.2 凝胶溶蚀与药物释放的考察

采用无膜溶出模型^[4]研究模拟泪液 (STF) 稀释前后凝胶的体外释药。将约 3 g 凝胶溶液加入到预先称重的试管中，置于 35 的恒温水浴中预热 10 min，使其完全形成凝胶。加入 35 的模拟泪液 2 mL 作为释放介质，小心操作以避免破坏凝胶表面。经恒温振荡 10 min 后，立即倾倒全部释放介质，将试管外表面擦拭干，迅速称重并记录，然后再次将制剂于 35 预热 10 min，补充空白释放介质并继续振荡 10 min。如此反复操作，直至剩余凝胶不足 10%。相邻时间点质量差异即为凝胶溶蚀量。

以凝胶累积溶蚀量对时间作图，得到凝胶经时溶蚀曲线，见图 1。将溶蚀实验得到的释放介质样品稀释、过滤后用高效液相色谱法测定，计算不同时间点药物累积释放量。以累积药物释放量对时间作图，得到药物经时释放曲线，见图 2。将凝胶累积溶蚀量和药物累积释放量分别对时间回归，呈良好的线性相关 ($r > 0.995$)，显示出零级动力学特征。本文作者考察了不加与加入质量分数为 0.2% 的透明质酸钠 (HA-Na) 的处方泪液稀释前后的的凝胶溶蚀与药物释放行为。



■ -HA-Na($w=0\%$, after diluted, $r=0.9985$); ◆ -HA-Na($w=0\%$, before diluted, $r=0.9958$); * -HA-Na($w=0.2\%$, after diluted, $r=0.9983$); ▲ -HA-Na($w=0.2\%$, before diluted, $r=0.9981$)

Fig.1 Gel dissolution profiles of LVFX-ISG before and after STF dilution ($n=3$)

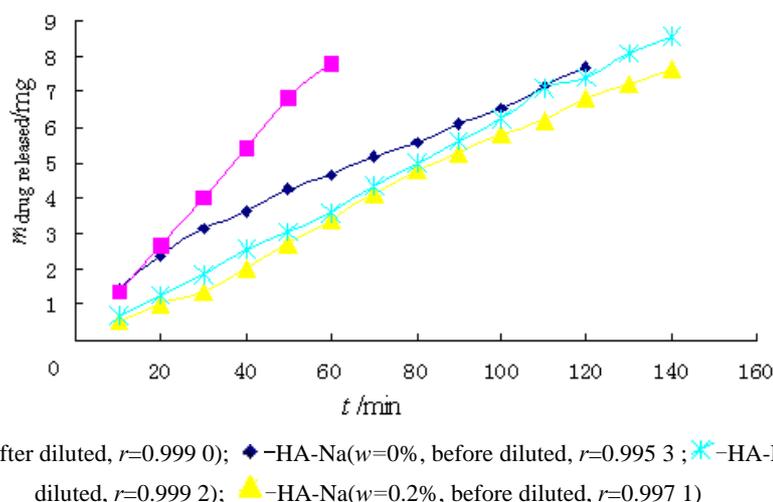


Fig.2 Drug release profiles of LVFX-ISG before and after STF dilution ($n=3$)

2.3.3 黏度的考察

将温敏凝胶加入数显旋转黏度计的测定容器中，调整零点，调节回流水浴锅的温度，以 $0.33\ \text{min}^{-1}$ 的速度升温，3号转子，转速 $30\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。测定模拟泪液稀释前后不同温度下凝胶的黏度。测定结果如图3所示。

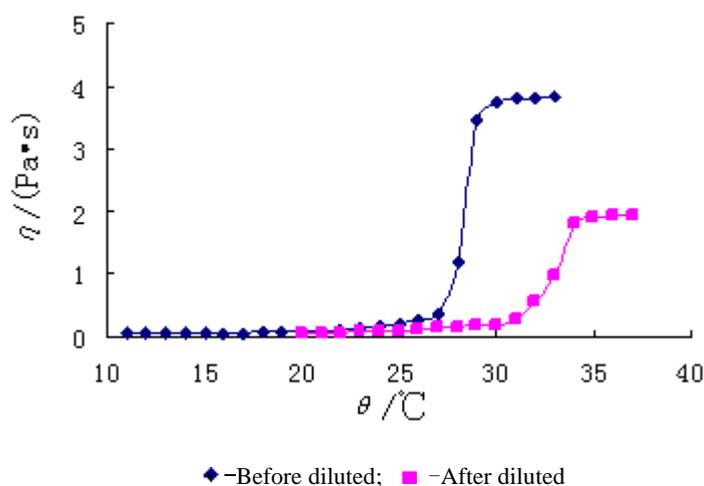


Fig.3 The change in viscosity of LVFX-ISG as a function of temperature

2.4 体内分析方法的确立和验证

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Kromasil ODS- C_{18} 色谱柱 ($4.6\ \text{mm}\times 200\ \text{mm}$, $5\ \mu\text{m}$)，流动相: $50\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的枸橼酸溶液 (用三乙胺调 pH 至 4.0) - 乙腈 (体积比为 81:19)，检测波长: $290\ \text{nm}$ ，流速: $1\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ，进样量: $20\ \mu\text{L}$ 。

2.4.2 泪液样品的处理

将直径 $8\ \text{mm}$ 的滤纸片置于 $1.5\ \text{mL}$ 离心管内，取样前，精密称其总质量。将滤纸片插入上眼睑，待完全润湿后，取出，精密称定润湿有泪液的滤纸片与离心管的总质量。通过滤纸片的增质量来确定取样量的多少。向离心管中加入内标溶液 [盐酸洛美沙星 (LMFX) 溶液 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，以流动相配制] $50\ \mu\text{L}$ ，加入流动相 $150\ \mu\text{L}$ ，涡旋 $5\ \text{min}$ ， $3\ 500\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $10\ \text{min}$ ，吸取上清液 $20.0\ \mu\text{L}$ 进样。

2.4.3 方法专属性考察

分别取空白泪液、加入一定浓度对照溶液的空白泪液及受试家兔滴药后的泪液，按“2.4.2”条处理，进样，结果见图4。由图可知，空白泪液中的内源性物质对样品测定无干扰。

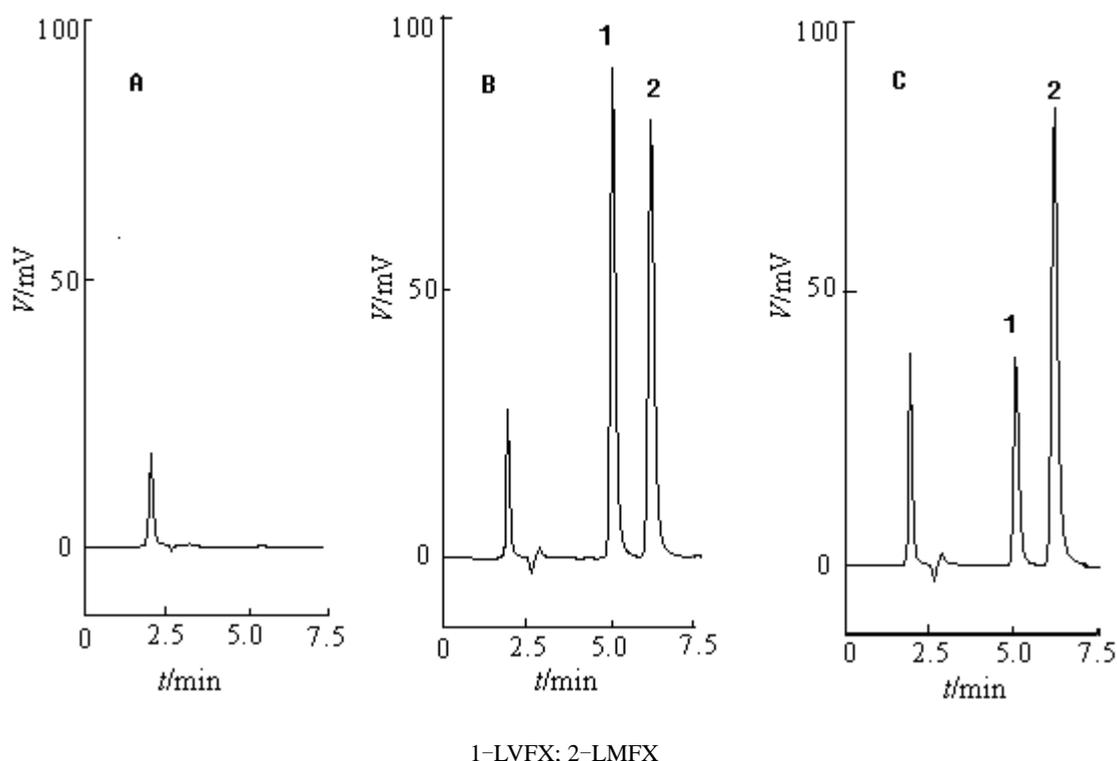


Fig.4 Chromatograms of blank tear(A), blank tear with LVFX(B) and tear sample(C)

2.4.4 标准曲线的绘制

取空白泪液，将以流动相配制的质量浓度分别为 0.5、1.0、5.0、50.0、125.0、200.0、500.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸左氧氟沙星系列标准溶液 50 μL 加入到滤纸上，加入内标 50 μL ，加入流动相 100 μL ，使得处理后样品中药物的浓度分别为 0.125、0.250、1.250、12.500、31.25、50.00、125.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ，涡旋 5 min，3 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min，吸取上清液 20.0 μL 进样。

以 LVFX 质量浓度为横坐标、LVFX 与内标物的峰面积比值为纵坐标，进行线性回归，得回归方程为 $A=0.0627\rho-0.0171$ ， $r=0.9997$ ，结果表明，LVFX 在 0.125~125.000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内与峰面积比呈良好线性关系。

2.4.5 提取回收率及精密度的考察

取空白泪液，分别加入质量浓度为 1、50、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐酸左氧氟沙星系列标准溶液，按“2.4.2”条下的方法制备低、中、高 3 个质量浓度的样品，每个浓度测定 6 个样品；并与相应浓度的未经处理的溶液比较，计算方法的提取回收率。各质量浓度样品，同一天内连续进样 6 次，计算日内精密度，分别连续 3 d 各进样 1 次，计算日间精密度。

结果见表 1，该方法中盐酸左氧氟沙星在 1、50、200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个质量浓度下的泪液样品提取回收率分别为 86.1%、96.4% 和 94.2%。内标盐酸洛美沙星的泪液样品提取回收率为 94.2%。由提取回收率，日内、日间精密度结果可以看出，该方法准确度和精密度良好，可用于盐酸左氧氟沙星泪液样品的测定。

Table 1 The extraction recovery and precision of levofloxacin and lomefloxacin in rabbit tears($n=6$)

Substance	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	Mean Recovery/%	Precision	
			Within-day RSD/%	Between-day RSD/%
LVFX	1	86.1	7.85	9.47
	50	96.4	7.37	7.22
	200	94.2	12.2	1.66
LMFX	50	94.2	6.95	5.00

2.5 泪液消除药动学

2.5.1 给药方案及样品采集

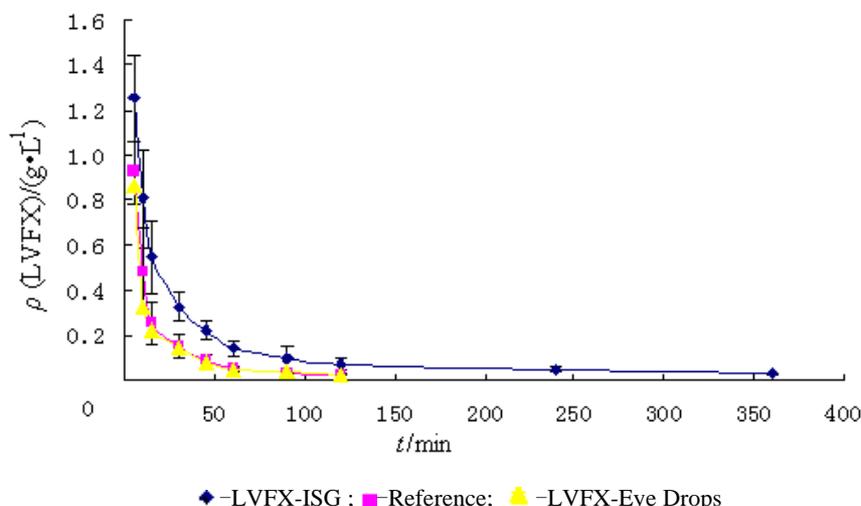
本文作者采用3制剂3周期二重 3×3 拉丁方实验设计,将6只家兔随机分为3组。用微量取样器分别给各组家兔左眼结膜囊内滴市售制剂(R , 海伦)、LVFX自制普通滴眼液(T_1)、LVFX温敏型原位凝胶(T_2)各 $50\mu\text{L}$,轻轻闭合眼睑约30s,分别于5、10、15、30、45、60、90、120、240、360min取样,48h后各组交叉给药。所有样品于 -20°C 保存,待分析。

2.5.2 泪液消除药动学实验结果

受试制剂 T_1 、 T_2 及参比制剂 R 的主要药动力学参数见表2,泪液药物质量浓度-时间曲线见图5。采用DAS2.0.1版药动学程序对数据进行处理,求得泪液质量浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-t})及平均滞留时间(MRT)。

Table 2 Main pharmacokinetic parameters of LVFX in reference(R), eye drops(T_1),and *in situ* eye gel(T_2) in 6 rabbits

Parameter	R (marketed product)	T_1 (eye drop)	T_2 (<i>in situ</i> gel)
$\rho_{\text{max}}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	925.77 ± 138.42	859.82 ± 103.20	1249.54 ± 190.45
$\text{AUC}_{0-t}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min})$	15760.37 ± 3143.25	14085.19 ± 1635.84	42976.37 ± 2429.49
$T(\text{MRT})/\text{min}$	26.85 ± 1.83	28.53 ± 2.18	83.70 ± 8.29

**Fig.5** Concentration-time curve of LVFX in tear after topical administration of Reference, LVFX eye drops and LVFX-ISG to rabbits($n=6$)

2.5.3 药动学参数 t -检验

分别对市售滴眼液和自制滴眼液以及市售滴眼液和温敏型眼用凝胶的主要药动学参数进行双侧 t -检验, 结果表明, 市售滴眼液和自制滴眼液组间各主要药动学参数不存在显著差异 ($P > 0.05$); 市售滴眼液和温敏型眼用凝胶间各主要药动学参数存在显著差异 ($P < 0.05$), 且凝胶组的 AUC_{0-t} 及 MRT 明显高于对照组。体温敏感眼用凝胶的泪液药物质量浓度-时间曲线下面积(AUC)为市售制剂的 2.73 倍, 平均滞留时间为市售制剂的 3.12 倍。说明温敏型凝胶可以延长药物在眼部的滞留时间, 为药物的吸收提供储库, 从而提高生物利用度。

3 讨论

a. 文献[5]报道眼用制剂每滴的体积为 25~56 μL , 平均约为 40 μL , 而结膜囊内泪液体积为 7 μL 。原位凝胶滴入结膜囊后与泪液混合存在两种极端情况: 未经稀释即形成凝胶, 或者先与泪液稀释再形成凝胶。在体给药的情况必然介于二者之间, 因此, 制剂的处方必须考虑到泪液稀释的影响。因此, 本文作者考察了凝胶溶液被模拟泪液稀释前后的胶凝温度, 凝胶溶蚀和药物释放行为以及黏度等指标。

b. 稀释前后的胶凝温度可以保证制剂在室温条件下具有良好的流动性, 并且滴入眼部被泪液稀释后仍能形成凝胶。凝胶溶蚀和药物释放结果表明, 凝胶溶蚀是决定药物释放的主要因素, 处方中加入质量分数为 0.2% 的透明质酸钠可增强凝胶强度, 使泪液稀释前后凝胶溶蚀和药物释放的行为未发生明显改变。凝胶溶液的粘度随温度升高逐渐增加, 当达到相变温度时, 粘度急剧增加, 泪液稀释可以降低凝胶溶液的黏度, 但并不改变其黏度随温度变化的趋势。黏度随温度的变化曲线进一步验证了该处方的合理性。

c. 对于眼表疾病(如细菌性结膜炎), 泪液中药物质量浓度水平与靶组织中(如结膜)的有效药物浓度有极大的相关性。因此, 进行泪液分析与检测血药浓度水平对系统用药的作用是相当的。通过对比同一药物的不同剂型, 在泪液中药物的浓度及持续时间, 对分析哪种剂型可延长眼表滞留时间和改进药物吸收有提示作用^[6]。本文作者所采用的结膜囊内泪液取样方法参考 Schirmer 条带法^[7], 其优点是取样的滤纸片与眼部的接触面积较大, 无取样泪液不均匀等问题。

d. 凝胶滴眼后, AUC 和 MRT 显著增加, 分别为市售制剂的 2.73 和 3.12 倍, 这是由于凝胶在眼内发生相变, 黏度增加, 减少了结膜囊内泪液对药物的排泄, 从而延长了药物在角膜前表面的滞留时间, 大大改善了药物的生物利用度。

参考文献:

- [1] BOHORQUEZ M, KOCH C, TRYGSTAD T, et al. A study of the temperature-dependent micellization of Pluronic F127[J]. *J Colloid Interface Sci*, 1999, 216(1):34-40.
- [2] MANSOOR M AMIJI, PHUNG-KIM LAI, DINESH B, et al. Intratumoral administration of paclitaxel in an *in situ* gelling poloxamer 407 formulation[J]. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2002, 7(2), 195-202.
- [3] CHOI HG, JUNG JH, RYU JM, et al. Development of *in situ*-gelling and mucoadhesive acetaminophen liquid suppository[J]. *Int J Pharm*, 1998, 165(1): 33-44.
- [4] DESAI SD, BLANCHARD J. *In vitro* evaluation of pluronic F127-based controlled release ocular delivery systems for pilocarpine[J]. *J PharmSci*, 1998, 87(2):226-230.
- [5] LEDERER JR, HAROLD RE. Drop size of commercial glaucoma medications[J]. *Am J Ophthalmol*, 1986, 101: 691-694.
- [6] 李娅杰, 刘暄. 泪液中药物浓度检测的意义[J]. *中国临床药理学杂志*, 2006, 22(5): 397-398.
- [7] DING SL, CHEN CC, SALOME-KESSLAK R, et al. Precorneal sampling techniques for ophthalmic gels[J]. *J Ocular Pharmacol*, 1992, 8(2):151-159.

Preparation of levofloxacin hydrochloride ophthalmic preparations and their elimination kinetics in rabbit tears

SUN Hui-hui, GUO Ying-jun, ZHANG Wen-ping, WANG Yan, HE Zhong-gui

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

Abstract: Objective To prepare levofloxacin hydrochloride(LVFX) eye drops and thermosensitive *in situ* gel and compare their elimination kinetics in rabbit tears. **Methods** A single dose of LVFX eye drops and LVFX-ISG were given topically to 6 healthy rabbits. LVFX concentration in the tears at different sampling time was determined by RP-HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated. **Results** ρ_{\max} of LVFX-ISG, self-made and marketed eye drops were ($1\ 249.54 \pm 190.45$), (859.82 ± 103.20) and (925.77 ± 138.42) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, AUC_{0-t} were (42976.37 ± 2429.49), (14085.19 ± 1635.84) and (15760.37 ± 3143.25) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}$, MRT were (83.70 ± 8.29), (28.53 ± 2.18) and (26.85 ± 1.83) min, respectively. **Conclusions** There was no significant difference between the self-made and the marketed eye drops, while the AUC of *in situ* thermosensitive gel increased by 2.73 folds and MRT increased by 3.12 folds compared with the marketed eye drop. The LVFX-ISG had significantly improved bioavailability by prolonging drug resident time in eyes.

Key words: pharmaceuticals; *in situ* thermosensitive gel; elimination kinetics; ocular bioavailability; levofloxacin hydrochloride

(责任编辑 曹霞)