

克拉霉素黏附微球在低 pH 值溶液中的稳定性

孙明辉¹, 斯陆勤², 伍三兰², 庞宏², 杜光¹

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院药学部; 2. 药学院, 430030)

[摘要] 目的 考察克拉霉素在不同 pH 值条件下的稳定性及微球对药物的稳定作用。方法 使用乳化-溶剂挥发法制备克拉霉素生物黏附微球(Cla-Ec-Cb)。以高效液相色谱法测定 Cla-Ec-Cb 中克拉霉素及克拉霉素原料药在不同低 pH 值条件下稳定性。结果 克拉霉素原料药在 pH 值为 1, 2, 3 的盐酸溶液中的半衰期分别为 (5.93 ± 0.16) , (74.52 ± 3.23) , (869.58 ± 5.82) min; Cla-Ec-Cb 微球中克拉霉素能保持相对稳定。结论 克拉霉素在低 pH 值溶液中不稳定, 将其制备成黏附微球对克拉霉素具有一定的保护作用。

[关键词] 克拉霉素; 微球; 稳定性

[中图分类号] R978.15; R969.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2009)04-0443-03

Stability of Bioadhesive Microspheres Loading with Clarithromycin

SUN Ming-hui¹, SI Lu-qin², WU San-lan², PANG Hong², DU Guang¹ (1. Department of Pharmacy, Tongji Hospital Affiliated to the Tongji Medical College, 2. School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT Objective To study the stability of clarithromycin and clarithromycin entrapped in bioadhesive microspheres in low pH aqueous solutions. **Methods** The bioadhesive microspheres entrapping clarithromycin (Cla-Ec-Cb) were prepared using emulsification/evaporation method. The stability of clarithromycin and clarithromycin entrapped in microspheres in hydrochloric acid solution (pH = 1) was determined and compared by HPLC method. **Results** At pH 1.0, 2.0, 3.0, the degradation half-lives of clarithromycin were (5.93 ± 0.16) min, (74.52 ± 3.23) min, (869.58 ± 5.82) min, respectively. Clarithromycin entrapped in microspheres was much more stable. **Conclusion** Clarithromycin was unstable in low pH solution. Carbopol 934p and ethylcellulose showed a protecting effect for clarithromycin from being decomposed by low pH solution.

KEY WORDS Clarithromycin; Bioadhesive microspheres; Stability

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 作为人类消化性溃疡和慢性活动性胃炎的主要病因, 及与胃癌的密切联系已为国际医学界所确认^[1]。目前临床上多采用含铋制剂或(和)抑酸药(一般为 PPI 类药物)加上两种抗菌药物的三联、四联疗法根除 Hp, 然而 Hp 对抗菌药物产生耐药是导致根除失败的最主要原因^[2]。GRAHAM 等^[3]认为抗菌药物不能取得良好治疗效果的原因可能是抗菌药物在胃内停留时间太短, 在黏膜层不能达到有效的杀菌浓度所致。因此笔者制备克拉霉素生物黏附微球(Cla-Ec-Cb), 以期提高胃局部克拉霉素的浓度, 有利于根除 Hp。而且能够达到缓释目的, 减少给药次数, 降低治疗剂量, 缩短疗程, 提高患者的依从性。笔者建立高效液相色谱法测定克拉霉素含量, 并考察原料以及黏附微球制剂中克拉霉素在低 pH 值溶液中的稳定性, 为进一步研究克拉霉素黏附微球体内外溶出和黏附实验提供科学依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Dionex P680 高效液相色谱仪, UVD170U 紫外检测器; 智能集热式恒温磁力搅拌器(DF-101S, 河南予华仪器有限公司); 数显电动搅拌器(DW-3-90W, 河南巩义豫华仪器厂); 永磁直流电动机(ZD-90W, 北京京伟电器有限公司)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯; 克拉霉素标准品(中国药品生物制品检定所, 批号: 130356-200102, 规格: $972 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$); 克拉霉素(中美华东制药有限公司, 批号: 031210, 规格: $973 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$); 乙基纤维素(20CP, 批号: 20020916, 上海卡乐康公司); 卡波姆 934P(北京国人逸康科技有限公司); Span80(化学纯)。

2 方法与结果

2.1 克拉霉素黏附微球的制备 称取适量乙基纤维素, 用丙酮充分溶胀后, 加入克拉霉素, 搅拌使其溶解(I 溶液); 另称取处方量的卡波姆超声分散于 I 溶液中, 之后滴加到含有 Span80 的液体石蜡中, 室温下 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 搅拌至有机溶剂挥干, 抽滤, 用石油醚洗涤即得微球, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 干燥 24 h, 过筛称重。

[收稿日期] 2008-04-20

[作者简介] 孙明辉(1977-), 男, 安徽涡阳人, 主管药师, 硕士, 从事医院药学及药物新剂型研究。电话: 027-63380180, E-mail: mhsun@tjh.tjmu.edu.cn。

所得微球外观呈白色,光滑圆整,分散性、流动性均较好,无聚集现象。平均粒径 833.25 μm,载药量和包封率分别为(13.85 ± 0.11)%和(96.11 ± 0.83)%。

2.2 高效液相色谱(HPLC)法测定克拉霉素含量的方法评价

2.2.1 色谱条件及系统适应性实验 Eurospher C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.067 mol · L⁻¹磷酸二氢钾溶液(55 : 45)(V : V);检测波长:210 nm;流速:1 mL · min⁻¹;进样量:20 μL;柱温:25 °C。在上述色谱条件下,克拉霉素与溶剂峰分离良好,出峰处基线平稳无任何干扰,保留时间为5 min。同时辅料对药物峰无干扰。克拉霉素色谱峰的理论塔板数 ≥ 2 500。最低检测限为 100 ng(S/N ≥ 3)。

2.2.2 线性关系考察 精密称取克拉霉素标准品加乙腈配制成 0.5 mg · mL⁻¹的母液。分别精密量取母液 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 6.0 mL, 置 10 mL 量瓶中,用流动相加至刻度,摇匀,配制 10, 20, 40, 60, 80, 100, 300 μg · mL⁻¹的溶液,进样 20 μL,记录色谱图及峰面积(A),并以 A 对浓度(C)进行线性回归,得标准曲线方程为 A = 0.015 7C - 0.002 5, r = 0.999 9。结果表明克拉霉素在 10 ~ 300 μg · mL⁻¹浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度实验 选择 25, 100, 300 μg · mL⁻¹为低、中、高 3 个浓度作日内和日间变异(n = 5),结果见表 1。

表 1 方法精密度实验结果

浓度	μg · mL ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$			
	日内		日间	
	测定值	RSD/%	测定值	RSD/%
25.15	24.95 ± 0.16	0.63	24.89 ± 0.23	0.91
100.60	102.43 ± 0.30	0.30	102.47 ± 0.62	0.61
301.80	302.24 ± 3.50	1.16	302.15 ± 4.65	1.54

2.2.4 回收率实验 分别称取处方量的辅料,用流动相溶解,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液加入适量克拉霉素标准品使其浓度分别为 25, 50, 100 μg · mL⁻¹,分别取 20 μL 进样,代入标准曲线方程求得浓度与实际浓度相比得到相对回收率。结果见表 2。

表 2 克拉霉素相对回收率实验结果

加入浓度/ (μg · mL ⁻¹)	实测浓度/ (μg · mL ⁻¹)	相对回收率/ %	RSD/ %
25	24.86 ± 0.31	99.44 ± 1.23	1.24
50	49.84 ± 0.30	99.68 ± 0.60	0.60
100	99.65 ± 0.34	99.65 ± 0.34	0.35

2.3 克拉霉素在低 pH 值溶液中的稳定性考察

2.3.1 克拉霉素在 3 种盐酸溶液中稳定性实验 称取克拉霉素 500 mg,以丙酮 10 mL 溶解。①取 1 mL

药液加入到 pH 值 = 1 盐酸溶液 50 mL(37 °C 预热)中,置于 37 °C 水浴振荡放置,分别于 3, 6, 9, 12, 15, 18, 24, 27, 30 min 后取样 250 μL,加入适量 0.1 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液终止反应,并用流动相稀释至 1 mL,取 20 μL 进行 HPLC 测定。②取 1 mL 药液加入到 pH 值 = 2 的盐酸溶液 50 mL(37 °C 预热)中,分别于 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 min 取样,其他操作同上。③取 1 mL 药液加入到 pH 值 = 3 的盐酸溶液 50 mL(37 °C 预热)中,分别于 60, 120, 180, 240, 360, 480, 600 min 取样,其他操作同上。将峰面积代入标准曲线计算未降解克拉霉素的浓度,以 lnC 对时间作线性回归,得线性方程,求算克拉霉素在不同 pH 溶液中的半衰期,结果见表 3。

表 3 克拉霉素在不同 pH 溶液中的降解半衰期

pH 值	线性方程	R ²	$t_{1/2}/\text{min}$
1	lnC = -0.116 9t + 5.578 4	0.998 5	5.93 ± 0.16
2	lnC = -0.009 3t + 5.569 4	0.997 7	74.52 ± 3.23
3	lnC = -0.000 797t + 5.164 4	0.997 4	869.58 ± 5.82

2.3.2 Cla-Cb-Ec 微球中克拉霉素在 pH = 1 的盐酸溶液中释放前稳定性 分别称取 9 份 Cla-Cb-Ec 微球约 0.1 g,置于具塞刻度离心管中,随机分成 3 组,每组 3 份。各加入 pH 值 = 1 的盐酸溶液 10 mL 后,置于 37 °C 水浴振荡器中以 100 次 · min⁻¹速度振荡,分别于 1, 2, 6 h 各取出 3 份,弃去递质,离心管中微球用纯化水(3 次蒸馏)洗涤 2 次(每次 10 mL),弃去洗涤液,再加入纯化水 10 mL,放回振荡器中,37 °C 水浴条件下继续振荡至微球中剩余克拉霉素完全释放后,以 HPLC 法检测,用归一化法计算药物峰面积占总峰面积(包括药物峰、杂质峰、降解峰)比值。结果见表 4。

表 4 不同时间 Cla-Cb-Ec 样品中药物峰面积与总峰面积比值

振荡时间/h	药物峰面积占总峰面积比值/%
0	98.36 ± 1.80
1	85.93 ± 2.15
2	84.93 ± 2.31
6	85.79 ± 1.89

3 讨论

我国现行标准《中华人民共和国药典》(2005 年版)采用 HPLC 测定克拉霉素浓度,柱温为 45 °C,条件较为苛刻。本研究探讨用普通的 C₁₈ 柱,在室温条件下测定克拉霉素微球的含量,得到较好的分离效果,线性关系、准确度、精密度均达到测定要求。

克拉霉素为大环内酯类抗菌药物,文献[4]报道克拉霉素对酸稳定,但从本研究实验结果看,克拉霉素

在 pH = 1 的盐酸溶液中, 30 min 降解约 96%; 在 pH 值 = 2 条件下, 30 min 降解约 25%, 2 h 降解约 65%。空腹胃部 pH 值为 1 ~ 3, 低 pH 值时可能影响已释放的药物的稳定性, 对于生物黏附微球制剂, 由于要求其在胃内停留较长时间, 胃酸对药物的稳定性影响不能忽视。克拉霉素在 pH 值 = 3 条件下较稳定, 这为微球体外溶出实验提供了依据。

在 Cla-Cb-Ec 微球释放前实验中, 随着振荡时间的延长, 微球中克拉霉素不断溶出, 主峰面积逐渐下降, 但 1 h 后每种样品中主峰面积与总峰面积比值基本维持在约 85%, 提示微球中尚未释放至 pH 值 = 1 的盐酸溶液中的克拉霉素能基本保持其稳定性。因此可以推测 Ec 和 Cb 对克拉霉素具有一定的保护作用。

[DOI] 10.3870/yydb.2009.04.013

[参考文献]

- [1] WATANABE T, TADA M, NAGAI H, et al. *Helicobacter pylori* infection induces gastric cancer in mongolian gerbils [J]. *Gastroenterology*, 1998, 115(3):642-648.
- [2] KIM J M, KIM J S, JUNG H C, et al. Distribution of antibiotic MICs for *Helicobacter pylori* strains over a 16-year period in patients from seoul, South Korea [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(12):4843-4847.
- [3] GRAHAM D Y, BARSCH G M. The who's and when's of therapy for *Helicobacter pylori* [J]. *Am J Gastroenterol*, 1990, 85(12):1552-1555.
- [4] 于守汎. 克拉霉素的特点和临床应用[J]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(3):113-115.

高效液相色谱法同时测定 血浆和尿中阿普唑仑和硝西洋浓度

李 娜¹, 于晓菲², 段 旭¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院药剂科, 沈阳 110004; 2. 正大青春宝药业有限公司, 杭州 310023)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法测定血浆及尿中阿普唑仑、硝西洋浓度。方法 采用 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 以甲醇-水(60:40)为流动相, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长:254 nm。结果 硝西洋、阿普唑仑和内标物(地西洋)的出峰时间分别为 4.0, 5.1 和 8.6 min, 分离效果较好; 硝西洋、阿普唑仑质控 3 种浓度(4.0, 8.0, 16.0 μg · mL⁻¹) 日内和日间的 RSD, 血浆样品均 < 6.89%, 尿样均 < 5.80%, 血浆阿普唑仑和硝西洋回收率分别为 94.33% ~ 96.09% 和 95.12% ~ 97.89%, 尿液阿普唑仑和硝西洋回收率分别为 87.59% ~ 91.24% 和 88.92% ~ 93.65%, 血浆及尿样品线性范围为 2.0 ~ 32.0 μg · mL⁻¹。结论 该条件可对血浆和尿中阿普唑仑、硝西洋快速定量检测。

[关键词] 阿普唑仑; 硝西洋; 色谱法, 高效液相; 尿液; 血浆

[中图分类号] R971.3; R969.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2009)04-0445-02

阿普唑仑、硝西洋是苯并二氮杂口类镇静催眠药, 具有抗焦虑、镇静催眠和中枢性骨骼肌松弛作用^[1]。这类药物在临床上应用广泛, 在社会上滥用问题日益严重^[2]。我院以前没有相关的检测, 急诊中毒患者只是凭医生经验救治, 缺乏针对性, 不利于及时挽救患者生命。因此, 对中毒患者进行药物含量检测具有重要意义, 而且对于被麻醉的受害人和药物滥用者, 尿检比血检更易于接受。因此增加尿液检测。这些药物的液相色谱分析方法报道较多^[3-5], 但多用磷酸、三乙胺或乙腈^[6]做流动相, 分离效果不太理想。笔者从临床中毒患者快速诊断实际出发, 建立了用高效液相色谱(HPLC)法测定血浆及尿中阿普唑仑、硝西洋的方法。该方法操作简单、快速、准确, 为毒物分析结果的评价提供了科学有效的依据。

[收稿日期] 2008-02-10

[作者简介] 李 娜(1980-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 药师, 学士, 从事医院药学、药品检验工作。电话:024-83956764, E-mail: ligii1980@hotmail.com。

1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪, LD5-2A 型低速离心机, SZ-96 自动纯水蒸馏器, 地西洋对照品(内标物, 中国药品生物制品检定所, 批号:1225-200302), 硝西洋对照品(中国药品生物制品检定所, 批号:1217-200402), 阿普唑仑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号:1218-9702), 甲醇为色谱纯, 水为自制重蒸水, 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 阿普唑仑、硝西洋对照品溶液的制备 精密称取阿普唑仑、硝西洋对照品各 20 mg 加入甲醇溶解, 并稀释成 0.2 mg · mL⁻¹ 阿普唑仑、硝西洋对照品储备液, 于冰箱 4 °C 保存。临用时取阿普唑仑、硝西洋对照品储备液, 用甲醇稀释成 16 μg · mL⁻¹ 作为标准对照品。

2.2 地西洋对照品溶液的制备 精密称取地西洋 20 mg 加甲醇溶解至刻度得 0.2 mg · mL⁻¹ 地西洋对照品储备液, 于冰箱 4 °C 保存。临用时取地西洋对照品储备液, 用甲醇稀释成浓度为 8 μg · mL⁻¹ 的内标对照品溶液。