

他克莫司胶囊在4种溶出介质中的体外溶出特性研究

马苗锐*,张莉,吴溢,周立明,张丽霞[#](华北制药集团新药研究开发有限责任公司/微生物药物国家工程研究中心/河北省工业微生物代谢工程技术研究中心,石家庄 050000)

中图分类号 R945 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3140-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.36

摘要 目的:研究自研他克莫司胶囊在4种溶出介质中的体外溶出特性,并与原研他克莫司胶囊进行比较。方法:采用桨法测定溶出度,转速为50 r/min,介质体积为900 ml。以原研他克莫司胶囊为参比制剂,自研他克莫司胶囊为受试制剂,分别以pH 1.0盐酸溶液、pH 4.5磷酸溶液、pH 6.8磷酸盐缓冲液和水为溶出介质(均含0.005%羟丙基纤维素);以高效液相色谱法测定他克莫司含量,并计算累积溶出度,绘制溶出曲线;采用相似因子(f_2)法对2种制剂溶出曲线的相似度进行评价。结果:在4种不同pH的溶出介质中,2种他克莫司胶囊溶出行为相似,90 min时溶出度均达到85%以上, f_2 均大于50。结论:自研他克莫司胶囊在4种溶出介质中均可以完全释放,与原研胶囊在不同溶出介质中体外溶出行为均相似。

关键词 他克莫司胶囊;溶出曲线;相似因子;原研;自研

Study on the *in vitro* Dissolution of Tacrolimus Capsules in 4 Kinds of Dissolution Mediums

MA Miao-rui, ZHANG Li, WU Mi, ZHOU Li-ming, ZHANG Li-xia (New Drug Research and Development Co., Ltd., North China Pharmaceutical Group Corporation/National Engineering Research Center of Microbial Medicine/Hebei Provincial Industry Microbial Metabolic Engineering and Technology Research Center, Shijiazhuang 050000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the *in vitro* dissolution features of self-prepared Tacrolimus capsules in 4 kinds of dissolution mediums, and compare it with original Tacrolimus capsules. METHODS: Paddle method was used to determine dissolution of the sample with media volume of 900 ml at the rotating speed of 50 r/min. With the reference preparation of original Tacrolimus capsules and test preparation of self-prepared Tacrolimus capsules, HPLC was adopted to determine the content of Tacrolimus in pH 1.0 hydrochloride acid, pH 4.5 phosphoric acid, pH 6.8 phosphate buffer solution and water (all containing 0.005% hydroxypropyl cellulose), calculate the cumulative dissolution and draw dissolution curves, then similarity factor (f_2) was used to evaluate the similarity of dissolution curves. RESULTS: In 4 kinds of dissolution mediums, the dissolutions of 2 kinds of Tacrolimus capsules were similar, the dissolution degrees were all reached 85% or more at 90 min, and the f_2 were all more than 50. CONCLUSIONS: Self-prepared Tacrolimus capsules can be completely released, and the *in vitro* dissolution behavior of self-prepared Tacrolimus capsules and original Tacrolimus capsules are similar in 4 kinds of dissolution mediums.

KEYWORDS Tacrolimus capsules; Dissolution curves; Similar factor; Original prepared; Self-prepared

他克莫司是一种具有强免疫抑制活性的大环内酯类抗生素,临床上应用于器官移植术后的排斥反应和自身免疫性疾病。与同类药物相比,他克莫司具有较强的免疫抑制作用和较低的不良反 应,在国内外已成为器官移植免疫抑制疗法的一线药物。他克莫司几乎不溶于水,水中的溶解度约为1~2 $\mu\text{g/ml}$ ^[1],平均口服生物利用度约为25%^[2],制剂中往往应用各种技术以提高其溶出度和生物利用度。

他克莫司胶囊首先由日本藤泽制药公司研发成功,商品名为普乐可复(Prograf),1995年在美国上市,1998年进入中国市场。他克莫司胶囊属于生物药剂学分类系统(BCS)中的第Ⅱ类药品,即低溶解性、高渗透性药品。药物的溶出直接影响

其在体内的吸收和利用^[3],溶出度试验的深入研究和溶出曲线的精确、客观绘制,既可初步为体内生物利用度研究提供参考,也可以揭示各制剂工艺的差别和内在品质的优劣^[4]。故本研究以国外上市的原研他克莫司胶囊为参比制剂,考察了自研他克莫司胶囊在不同溶出介质中的溶出情况,并采用相似因子(f_2)法评价了其内在质量。

1 材料

1.1 仪器

2690型高效液相色谱(HPLC)仪、2487型紫外检测器(美国Waters公司);RC-806型溶出试验仪、CJL-3型沉降篮(天津市天大天发科技有限公司);TGL-20B型离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

原研他克莫司胶囊[阿斯泰来制药(中国)有限公司,批号:1D5579A,规格:每粒1 mg];自研他克莫司胶囊(华药集团新药

* 工程师,硕士。研究方向:药物制剂新技术。电话:0311-85992960。E-mail:miaorui225@sohu.com

[#] 通信作者:副高级工程师,硕士。研究方向:药物制剂新技术。电话:0311-85992960。E-mail:zlx486@sohu.com

研究开发有限责任公司,批号:130501,规格:每粒1 mg);他克莫司对照品(华药集团新药研究开发有限责任公司,批号:091229,纯度:99.8%);羟丙基纤维素(HPC,日本曹达株式会社);乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取他克莫司对照品10.14 mg,置于50 ml量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度;精密量取上述溶液0.7 ml,置于50 ml量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液20 ml,加入溶出介质50 ml,混匀,即得相应的对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 将自研他克莫司胶囊置于相应溶出介质中后,分别于0、15、30、45、60、90 min时取10 ml溶出液(同时补充相应同温新鲜介质10 ml),以离心半径为10 cm、3 000 r/min离心10 min,取上清液2.0 ml,加入溶出介质5.0 ml,混匀,即得相应的供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil C₁₈(150 mm×4.6 mm;5 μm);流动相:乙腈-甲醇-水-6%磷酸(46:18:36:0.1, V/V/V/V, pH约3.3),流速:1 ml/min;检测波长:210 nm;柱温:50 °C;进样量:400 μl;取对照品溶液[溶出介质为pH 4.5磷酸溶液(含0.005% HPC),简称B]和供试品溶液(溶出介质B,90 min时取样,按“2.1.2”项下方法制得)分别按上述色谱条件进样,记录色谱图。结果,理论板数按他克莫司峰计算不低于3 000,他克莫司与他克莫司异构体Ⅱ的分离度大于1.5,他克莫司峰拖尾因子小于1.5,表明该方法适用性较好。色谱见图1。

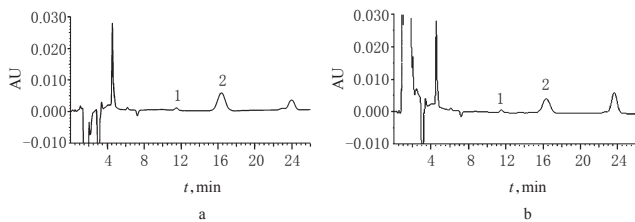


图1 高效液相色谱图

a.对照品溶液;b.供试品溶液;1.他克莫司异构体Ⅱ;2.他克莫司

Fig 1 HPLC chromatograms

a. reference solution; b. test solution; 1. tacrolimus isomer II; 2. tacrolimus

2.3 溶出介质及溶出度测定方法

溶出度测定按照2010年版《中国药典》(二部)附录XC第二法(浆法)进行。参考《美国药典》^[9],分别以pH 1.0盐酸溶液(含0.005% HPC,简称A)、B,pH 6.8磷酸盐缓冲液(含0.005% HPC,简称C)和水(含0.005% HPC,简称D)为溶出介质,体积为900 ml,温度为(37±0.5) °C,转速为50 r/min。以HPLC法为他克莫司含量的检测方法。

2.4 滤膜吸附考察

取自研他克莫司胶囊,按“2.3”项下方法,以B 900 ml为溶出介质,于90 min(释放完全)时取适量溶出液,分成2份,1份按“2.1.2”项下操作离心处理;另一份分别采用3 μm和0.45 μm混合纤维素酯滤膜滤过,弃去不同体积的初滤液,取续滤液测定溶出度随初滤体积的变化,结果见表1。初滤不同体积时不同孔径滤膜对他克莫司的吸附率(吸附率=|初滤一定体积的溶出度-离心溶出度|/离心溶出度×100%)见图2。

表1 离心处理及初滤不同体积后自研他克莫司胶囊的溶出度

Tab 1 Dissolution of self-prepared Tacroimus capsules with centrifugal treatment and initial filtration of different volume

样品处理	初滤不同体积后的溶出度, %				
	6 ml	10 ml	30 ml	50 ml	100 ml
3 μm滤过	76.9	84.2	87.4	88.5	88.2
0.45 μm滤过	71.8	72.4	80.2	84.9	88.3
离心(未滤过)	88.2				

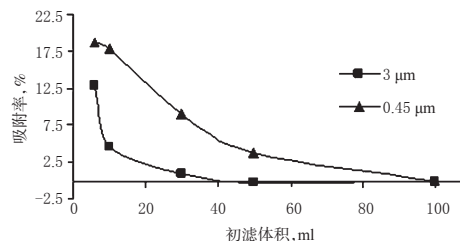


图2 不同滤膜对他克莫司的吸附率

Fig 2 Adsorbability rate of different filter membranes to tacroimus

上述结果表明,滤膜对他克莫司的吸附作用明显。初滤6 ml时,3 μm滤膜吸附率在12%左右,初滤50 ml达到吸附饱和;初滤6 ml时,0.45 μm小孔径滤膜吸附率高达20%左右,初滤100 ml达到吸附饱和。可见,达到饱和时需要初滤的初滤液体积较大,会引起累积溶出度的计算误差。为保证溶出数据的准确性,应先对溶出液进行离心操作,取上清液采用HPLC法测定他克莫司含量,计算累积溶出度并绘制溶出曲线。

2.5 稳定性试验

按照“2.1.1”项下方法,分别制备A、B、C、D 4种溶出介质的对照品溶液,于25 °C下放置6、8、10、12、18、24 h后,分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在4种溶出介质中峰面积的RSD分别为1.75%、1.42%、1.46%和1.57% (n=6),表明在25 °C条件下各对照品溶液在6~24 h内稳定。

取自研他克莫司胶囊,按“2.3”项下方法,分别以900 ml A、B、C、D为溶出介质,于90 min时取适量溶出液,按“2.1.2”项下方法制备4种溶出介质的供试品溶液,于25 °C下放置2、4、6、8、12、18、24 h后,分别按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,在4种溶出介质中峰面积RSD分别为1.78%、1.55%、1.22%和1.43% (n=7),表明在25 °C条件下供试品溶液在2~24 h内稳定。

2.6 重复性试验

取自研他克莫司胶囊1粒,按“2.3”项下方法,溶出介质为B 900 ml,于90 min时取适量溶出液,按“2.1.2”项下方法分别制备供试品溶液6份,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果,6份供试品溶液峰面积的RSD为0.67% (n=6),表明方法重复性良好。

2.7 线性关系考察

精密吸取对照品贮备液1.0、3.0、5.0、8.0、10.0 ml,分别加乙腈稀释至10.0 ml,精密加入溶出介质A 25 ml,摇匀,制备成他克莫司质量浓度为0.08、0.24、0.41、0.65、0.81 μg/ml的对照品溶液;同法制备其他3种溶出介质的对照品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样测定,分别以他克莫司的峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/ml)为横坐标进行线性回归,他克莫司在不同溶出介质中的回归方程见表2。结果表明,他克莫司质量浓

度在0.08~0.81 μg/ml范围内,在4种溶出介质中线性关系均良好。

表2 自研他克莫司胶囊在4种溶出介质中的回归方程

Tab 2 Regression equation of self-prepared Tacrolimus capsules in 4 kinds of dissolution mediums

溶出介质	线性回归方程	r
A	$y=3.317 \times 10^5 x + 3.394 \times 10^3$	0.999 5
B	$y=4.152 \times 10^5 x + 3.398 \times 10^3$	0.999 5
C	$y=3.785 \times 10^5 x + 2.987 \times 10^3$	0.999 7
D	$y=3.784 \times 10^5 x + 1.681 \times 10^3$	0.999 9

2.8 方法回收率试验

分别精密称取他克莫司对照品6.00、8.06、10.14 mg,置于50 ml量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度;精密量取上述溶液0.7 ml,各3份,分别置于50 ml量瓶中,加乙腈溶解并定容至刻度;再精密量取上述溶液20 ml,加入含有自研他克莫司胶囊空白制剂的溶出介质A 50 ml,制备成低、中、高质量浓度(0.48、0.64、0.81 μg/ml)的供试品溶液。同法制备其他3种溶出介质的供试品溶液。25 °C放置6 h后,分别按“2.2”项下色谱条件进样,记录色谱图,将测得值代入“2.7”项下回归方程,计算方法回收率。结果显示,4种低、中、高质量浓度供试品溶液的平均回收率均在98%~102%范围内(RSD为0.7%~1.0%,n=3),表明在所选择的溶出条件及测定条件下,方法准确度较好。

2.9 定量限试验

精密量取对照品贮备液4.0 ml于量瓶中,加入含自研他克莫司胶囊空白制剂的溶出介质B 10 ml,混匀,用溶出介质与乙腈的混合溶液(5:2)稀释,按“2.2”项下色谱条件进样,记录色谱图,按信噪比为10计算,他克莫司定量限为12.8 ng。

2.10 溶出曲线的测定与评价

2.10.1 溶出曲线测定 按“2.1”项下方法制备对照品和供试品溶液,按“2.3”项下方法及条件测定溶出度,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并按外标法以峰面积计算0、15、30、45、60、90 min(若溶出度均达到85%以上,且差值在5%以内,试验可提前结束)时的溶出度并计算累积溶出度,绘制溶出曲线。2种制剂在4种溶出介质中的溶出曲线见图3。

2.10.2 溶出曲线评价 采用美国FDA有关口服固体药物利用度和生物等效性研究指南推荐使用的 f_2 法^[6-7],评价自研他克莫司胶囊的质量,计算公式^[8]如下:

$$f_2 = 50 \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{1/2} \times 100 \right\}$$

其中, R_t 为t时间内原研他克莫司胶囊平均累积溶出百分率; T_t 为t时间内自研他克莫司胶囊平均累积溶出百分率;n为取样点的个数(n为3~5,且R>85%的点不超过1个)。若 $50 \leq f_2 < 100$,则表示自研他克莫司胶囊与原研他克莫司胶囊溶出行为相似。选择15、30和60 min 3点进行计算,2种制剂在A、B、C、D 4种溶出介质中的溶出曲线的 f_2 分别为63.1、54.8、56.6、68.3,均大于50,说明自研他克莫司胶囊和原研他克莫司胶囊的体外溶出行为具有相似性。但自研他克莫司胶囊和原研他克莫司胶囊的体内生物利用度是否等效,有待进一步考察。

3 讨论

他克莫司难溶于水,故制备他克莫司对照品时需加入乙腈溶解;供试品溶液加入一定比例的乙腈,是为了保证供试品溶液和对照品溶液的溶剂组成一致,避免产生溶剂效应造成的测定误差。他克莫司有2个体内生物等效的互变异构体,在

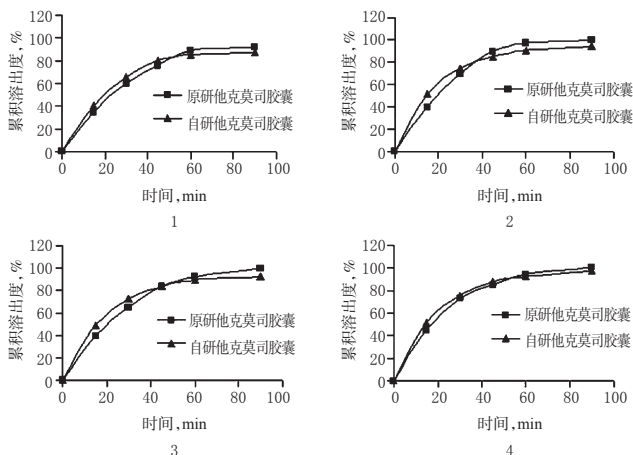


图3 自研和原研他克莫司胶囊在4种溶出介质中的溶出曲线(n=12)

1.溶出介质A;2.溶出介质B;3.溶出介质C;4.溶出介质D

Fig 3 Dissolution curves of self-prepared and original Tacrolimus capsules in 4 kinds of dissolution mediums (n=12)

1.dissolution medium A; 2.dissolution medium B; 3.dissolution medium C; 4.dissolution medium D

溶液中存在转化平衡^[9],因此供试品溶液需要放置2 h后进样,对照品溶液需要放置6 h后进样,以保证他克莫司及其异构体的转化达到平衡,进而保证测定的准确性。

他克莫司为大环内酯类化合物,溶出介质中加入适量的HPC,可以减少其在试验仪器表面的吸附影响,从而获得接近100%的方法回收率^[10]。由于制成胶囊时采用了固体分散技术,使原料药高度分散在水溶性载体中,比表面能变大,吸附能力增强;又由于自研他克莫司胶囊规格小,溶出液浓度低,使达到饱和时初滤液的体积较大,引起累积溶出度的计算误差,因此在测定溶出曲线时,建议采用离心处理。在溶出90 min时,他克莫司胶囊释放完全,溶出液中他克莫司浓度最高,但滤膜吸附仍不能通过初滤消除。在进行溶出度测定时,溶出液可以采用合适的滤膜过滤^[11],但需要充分考虑滤膜的吸附,通过增加初滤体积,使滤膜达到吸附饱和。

参考文献

- [1] Yamashita K, Nakate T, Okimoto K, et al. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus[J]. *Int J Pharm*, 2003, 267(1/2): 79.
- [2] Overhoff KA, McConville JT, Yang W, et al. Effect of stabilizer on the maximum degree and extent of supersaturation and oral absorption of tacrolimus made by ultra-rapid freezing[J]. *Pharm Res*, 2008, 25(1): 167.
- [3] 苗燕飞, 戈文兰, 陈国广, 等. 阿戈美拉汀片在4种溶出介质中的体外溶出研究[J]. *中国药房*, 2013, 24(29): 2760.
- [4] 陆步实, 孙磊, 周立新, 等. 多条溶出曲线评价缙沙坦氨氯地平片的质量[J]. *中国医院药学杂志*, 2012, 32(9): 704.
- [5] The United States Pharmacopeial Convention. *USP36*[S]. Washington: The United States Pharmacopeial Convention, 2013: 5257.
- [6] 谢沐风, 张启明, 陈洁, 等. 国外药政部门采用溶出曲线评价口服固体制剂内在品质情况简介[J]. *中国药事*, 2008, 22(3): 257.

连翘叶的化学成分、药理学与毒理学研究概况

梅雪^{1*}, 周安琴², 李静², 周春阳^{1#} (1. 川北医学院药学院, 四川南充 637000; 2. 川北医学院药学院2012级药学专业本科生, 四川南充 637000)

中图分类号 R284; R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)22-3143-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.22.37

摘要 目的: 为进一步研究连翘叶的化学成分、药理学与毒理学提供参考。方法: 以“连翘叶”“化学成分”“药理学”“毒理学”“*Forsythia suspensa leaves*”“Chemical composition”“Pharmacology”“Toxicology”等为关键词, 组合查询2006—2014年在PubMed、中国知网全文数据库、维普中文期刊数据库和万方数据库中有关连翘叶的化学成分、药理学与毒理学的文献并进行分析。结果与结论: 共查阅到有效文献47篇。连翘叶的化学成分包括苷类、黄酮类、多糖类、有机酸类等; 具有抗菌、保肝、抗氧化、抗衰老、保护心脏与骨骼肌、降血糖、抗疲劳、抗癌、抗内毒素、非特异性免疫、降脂等相关药理作用。急性毒性实验中其水提取物与醇提取物ig给药无明显毒性。分析连翘叶的研究概况有助于其进一步合理开发利用, 实现药材资源的有效使用。

关键词 连翘叶; 化学成分; 药理活性

连翘是中药临床常用传统药物之一, 又名黄花条、连壳、青翘、落翘、黄奇丹等。2010年版《中国药典》(一部) 收录的连翘为木犀科连翘属植物连翘的干燥果实, 果实初熟尚带绿色时采收的称为青翘, 果实熟透颜色发黄时采收的称为老翘。连翘有清热解毒、消肿散结的作用, 临床常用于痈疽、瘰疬、乳痈、丹毒、温病初起、温热入营、高热烦渴、神昏发斑、热淋涩痛等症的治疗^[1]。连翘开花期易受“倒春寒”的影响, 导致果实大量减产, 造成市场缺口, 而大量连翘叶却被丢弃。故近年来对连翘叶的研究广泛开展。笔者以“连翘叶”“化学成分”“药理学”“毒理学”“*Forsythia suspensa leaves*”“Chemical composition”“Pharmacology”“Toxicology”等为关键词, 组合查询2006—2014年在PubMed、中国知网全文数据库、维普中文期刊数据库和万方数据库中有关连翘叶的化学成分、药理学与毒理学的文献, 结果得到有效文献47篇, 现对其进行如下综述。

1 化学成分的提取与检测方法

连翘叶中化学成分丰富, 如连翘苷、连翘脂素、连翘酯苷A、连翘酯苷F、芦丁、槲皮素、异槲皮苷、绿原酸、(+)-表松脂素-4'-O-葡萄糖苷^[2]; 其他成分还有多种酚类化合物, 如金丝桃苷、连翘苷、牛蒡子苷等^[3-4]; 提取工艺方法包括乙醇提取法、超声辅助提取法等; 有效成分检测方法包括高效液相色谱(HPLC)法、比色法等。

1.1 苷类

杨建雄等^[5]从连翘叶片中提取出了苷类成分I和II, 通过

HPLC分析发现, 其中成分I富含连翘苷和连翘酯苷。有研究表明, 连翘叶中苷类成分含量高于果实中, 如李发荣等^[6]比较了连翘叶、青翘和老翘中连翘苷的含量, 发现连翘叶中连翘苷含量为果实的40倍。王进明等^[7]比较了连翘不同部位的连翘苷和连翘酯苷A的含量, 结果表明, 连翘苷含量在不同部位中叶子最高, 其次为果实、枝梗、果梗; 连翘酯苷A含量在不同部位中同样以叶中最高, 其次为果实、果梗、枝梗。关于苷类成分的含量测定, 禹玉洪等^[8]通过研究发现, 采用反相(RP)-HPLC法可以同时测定连翘叶中连翘苷和连翘酯苷的含量。姬雪礼等^[9]建立了同时测定连翘叶中连翘酯苷A和连翘苷含量的HPLC法。方法采用Agilent Zorbax SB-C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm)为色谱柱, 甲醇-0.1%磷酸溶液(32:68)为流动相, 检测波长为227 nm, 流速为1.0 ml/min, 进样量为10 μl, 柱温为30 ℃。连翘叶在不同采收期各苷类成分含量不同, 如张果等^[10]采用HPLC法测定不同采收期的连翘叶中连翘苷、连翘酯苷的含量。结果表明, 连翘苷以5月份含量最高, 连翘酯苷以6月份含量最高。杨棣华等^[11]对不同产地的连翘叶进行了测定, 结果连翘苷含量在2.144 8%~4.013 4%之间, 连翘酯苷A在2.963 1%~5.280 4%之间, 表明不同产地连翘叶中各苷类成分含量有明显差异。对于苷类成分的提取工艺, 齐建红^[12]比较了连翘叶不同提取物中连翘苷的含量, 结果显示甲醇提取物中的连翘苷含量最高。王杰等^[13]通过响应面法综合评价提取连翘叶中连翘苷的最优条件为80%乙醇, 料液比1:8, 90 ℃, 400

[7] 张启明, 谢沐风, 宁保明, 等. 采用多条溶出曲线评价口服固体制剂的内在质量[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(12): 946.

[8] 谢沐风. 溶出曲线相似性的评价方法[J]. 中国医药工业杂志, 2009, 40(4): 308.

* 助教, 硕士。研究方向: 药物新制剂、新剂型。电话: 0817-3300337。E-mail: 86121910@qq.com

通信作者: 教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 心血管药理学。电话: 0817-2713658。E-mail: 765551015@qq.com

[9] Namiki Y, Fujiwara A, Kihara N, et al. Determination of the immunosuppressive drug tacrolimus in its dosage forms by high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatographia*, 1995, 40(5/6): 253.

[10] 藤泽药品工业株式会社. 延释制剂: 中国, 99806415.7[P]. 2001-06-27.

[11] 周立明, 张莉, 赵晓娟, 等. 他克莫司微乳的制备和质量评价[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(24): 1 975.

(收稿日期: 2014-10-29 修回日期: 2014-12-09)

(编辑: 林 静)