

盐酸米诺环素软膏含量及释放度测定方法研究

陈桐楷*, 周 焘, 安穗伟, 蔡志华, 梁超峰[#](广州医药研究总院, 广州 510240)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0465-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.30

摘要 目的:测定盐酸米诺环素软膏的含量及体外释放度,探讨其释药机制。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Inertsil C8-3,流动相为0.2 mol/L醋酸铵-N,N-二甲基甲酰胺-四氢呋喃(600:398:2,内含0.01 mol/L 乙二胺四乙酸二钠),流速为1 ml/min,柱温为室温,检测波长为274 nm。采用自制药盒进行体外释放度研究,方法为桨法,释放介质为水500 ml,转速为100 r/min,温度为(37.0±0.5)℃,释放时间为1、4、8、12、24 h;对释药数据采用不同的模型进行拟合。结果:盐酸米诺环素检测质量浓度线性范围为0.05~1.90 mg/ml($r=0.9997$, $n=5$),平均回收率为100.1%,RSD=0.61%($n=9$)。制剂在1、4、8、12、24 h的体外释放度分别为11.03%、25.01%、36.14%、51.06%、64.62%,各拟合方程相关系数均相似且接近1,其中以按一级方程拟合的相关系数最大($r=0.9990$)。结论:建立的含量和体外释放度测定方法操作简便、快速、准确度高,能有效控制盐酸米诺环素软膏的质量;该制剂具有复合释药机制,但以一级释放机制更明显。

关键词 盐酸米诺环素软膏;高效液相色谱法;含量测定;体外释放度;桨法

Study on Content and Release Determination of Minocycline Hydrochloride Ointment

CHEN Tong-kai, ZHOU Tao, AN Sui-wei, CAI Zhi-hua, LIANG Chao-feng (Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou 510240)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the content and release rate *in vitro* of Minocycline hydrochloride ointment, and to discuss the mechanism of drug release. METHODS: HPLC method was adopted. The Inertsil C8-3 column was adopted with mobile phase consisted of 0.2 mol/L ammonium acetate-DMF-THF (600:398:2, including 0.01 mol/L EDTA-2Na) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 274 nm under room temperature. Self-made kit was used to determine release rate *in vitro*. Paddle method was adopted using 500 ml distilled water as medium at rotational speed of 100 r/min and the temperature of (37.0±0.5)℃. Release time of them were 1, 4, 8, 12 and 24 h, and the data of drug release was fitted with different models. RESULTS: The linear range of minocycline hydrochloride was 0.05-1.90 mg/ml ($r=0.9997$, $n=5$), with an average recovery of 100.1% (RSD=0.61%, $n=9$). The release rate *in vitro* of the preparation at 1, 4, 8, 12, 24 h was 11.03%, 25.01%, 36.14%, 51.06% and 64.62%, respectively, which showed that the related coefficient fitted by equations were similar and close to 1, among which that fitted by first-order equation was the greatest ($r=0.9990$). CONCLUSIONS: Established method is simple, rapid and accurate, and it is suitable for the quality control of minocycline hydrochloride and ointment. The ointment displays the extended-release function, and first-order release is more obvious.

KEY WORDS Minocycline hydrochloride ointment; HPLC; Content determination; Release rate *in vitro*; Paddle method

盐酸米诺环素,又名二甲胺四环素,是70年代初开发的半合成四环素类抗菌药物,其抗菌谱与四环素类相似但作用强度比其他四环素类更强^[1],并且对耐四环素金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌和链球菌均有很强的抗菌活性^[2]。盐酸米诺环素软膏(商品名为Perioclone[®],派丽奥[®])是美国辉瑞公司原研、授权日本Sunstar INC生产、具有专利保护的新型缓释给药系统。派丽奥[®]是以米诺环素聚合物微球制成的缓释软膏,用塑料针管注射器预装上市,临床使用时注入患者牙周袋;其独特的释药机制使其在牙周袋内缓慢释药,并长达1周保持局部较高浓度以发挥杀菌、抑菌作用。在日本进行的II期临床试验证明,其能显著降低G⁻细菌在牙周袋内的繁殖。更有研究学者证明该缓释软膏能降低牙周组织肽酶的活性,改善症状,疗

效可维持至用药后13周^[3-4]。常见治疗牙周病的治疗物(如可吸收性替硝唑明胶海绵)通常在给药一定时间后需要再次取出,这给患者带来了很大的不便;另外药物也很难达到牙周袋的底部,不利于根除深处的病菌。盐酸米诺环素软膏于牙周袋内给药后,部分药物螯合在局部硬组织上,然后缓慢地向周围组织释放,在局部长期形成高浓度状态而发挥长效抗菌作用^[5]。因此,派丽奥[®]被广泛应用于重度牙周炎、慢性牙周脓肿、冠周炎及牙周手术后感染等牙周疾病,且效果优于口服抗菌药物,能起到较好的局部治疗作用^[6]。国内外文献尚无有关本品的含量及释放度检测方法的相关报道。本试验采用高效液相色谱(HPLC)法测定盐酸米诺环素的含量,并用自制的试剂盒探讨盐酸米诺环素软膏的体外释放行为。

1 材料

P680A型HPLC仪(美国Dionex公司);UV-2450型紫外-可见分光光度计(日本岛津公司);BP110S型电子天平(德国Sartorius公司)。

盐酸米诺环素软膏(日本Sunstar INC公司,批号:1107011、

* 工程师,硕士。研究方向:药物缓控释制剂。电话:020-84489994

通信作者:高级工程师,硕士。研究方向:脉冲给药系统、口服固体缓控释制剂、制剂生物利用度及透黏膜吸收给药系统、多单元给药系统。电话:020-84489994

1110041、1204191,规格:10 mg:0.5 g);盐酸米诺环素对照品(上海瑞齐生物科技有限公司,批号:1SH802925,纯度:99.3%);*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃、醋酸铵、乙二胺四乙酸二钠、甲醇均为分析纯;水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 含量测定

2.1.1 色谱条件与系统适用性试验。色谱柱:Inertsil C8-3(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.2 mol/L醋酸铵-DMF-四氢呋喃(600:398:2,内含0.01 mol/L乙二胺四乙酸二钠,pH为6.90),流速:1 ml/min;柱温:室温;检测波长:274 nm;进样量:10 μl。

取盐酸米诺环素对照品约10 mg,置于25 ml量瓶中,加水5 ml使溶解后,置于沸水浴加热60 min,冷却,加水稀释至刻度,摇匀,取10 μl进样,记录色谱图。结果,米诺环素峰的理论板数高于3 000,拖尾因子为1.08,米诺环素峰与差向米诺环素峰(与主峰的相对保留时间约为0.8)的分离度>2.5。表明系统适用性试验结果符合要求。色谱详见图1。

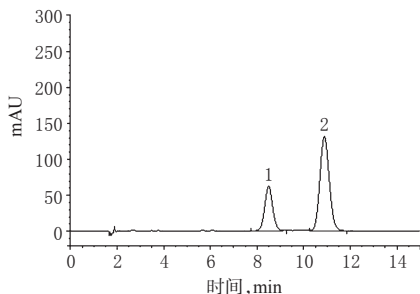


图1 系统适用性试验高效液相色谱图
1.差向米诺环素;2.米诺环素

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

1. epiminocycline; 2. minocycline

2.1.2 溶液的制备。(1)稀释液:DMF与甲醇(1:1, *V/V*)混合配制即得。(2)空白辅料溶液:精密称取空白软膏基质0.2 g,置于10 ml量瓶中,用稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。(3)对照品溶液:精密称取盐酸米诺环素对照品50.0 mg,置于25 ml量瓶中,用稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度约为2.004 mg/ml的贮备液。精密吸取贮备液5 ml,置于25 ml量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度为0.4 mg/ml的对照品溶液。(4)供试品溶液:精密称取内容物适量(约相当于盐酸米诺环素10 mg),置于25 ml量瓶中,加稀释液适量,超声(500 W, 40 min)至溶解,用稀释液稀释至刻度,摇匀,得到质量浓度约0.4 mg/ml的供试品溶液。

2.1.3 吸收波长的选择。取盐酸米诺环素质量浓度为0.02 mg/ml的对照品溶液,以相应稀释液为空白对照,在200~600 nm波长范围内扫描,结果分别在255、274、347 nm波长处有3个吸收峰。由于255、347 nm波长处辅料的干扰较大,故本次试验选择274 nm为检测波长。光谱见图2。

2.1.4 专属性试验。分别取空白辅料溶液、对照品溶液、供试品溶液进样检测,结果在该色谱条件下,辅料对盐酸米诺环素的含量测定并无干扰,详见图3。

2.1.5 线性关系考察。精密吸取对照品贮备液适量,用稀释液分别稀释成质量浓度为0.05、0.38、0.95、1.43、1.90 mg/ml的溶液。分别进样测定,记录色谱图。以对照品质量浓度(*c*)为

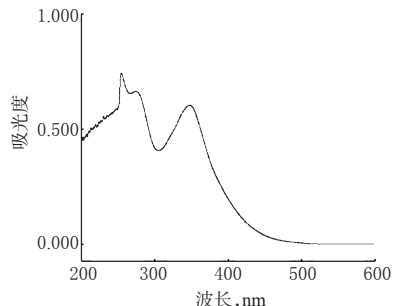


图2 盐酸米诺环素紫外吸收图谱

Fig 2 UV absorption spectra of minocycline hydrochloride

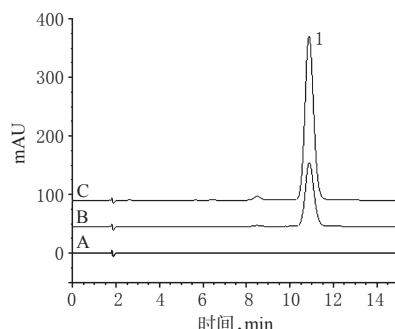


图3 专属性试验高效液相色谱图

A.空白辅料;B.对照品;C.供试品溶液;1.盐酸米诺环素

Fig 3 HPLC chromatograms of specificity test

A. blank excipients; B. substance control; C. test sample solution; 1. minocycline hydrochloride

横坐标,以峰面积(*A*)为纵坐标,绘制标准曲线,得到盐酸米诺环素的回归方程: $A=264.63c+2.737$ ($r=0.9997, n=5$)。结果表明,盐酸米诺环素检测质量浓度线性范围为0.05~1.90 mg/ml。

2.1.6 精密度试验。取供试品溶液,连续重复进样6次,记录峰面积。结果,峰面积的RSD=0.60% ($n=6$),表明仪器精密程度良好。

2.1.7 回收率测定。精密称取盐酸米诺环素对照品适量,按处方比例加入辅料,用稀释液配制成低、中、高不同质量浓度的供试品溶液。分别取供试品溶液和对照品溶液10 μl,每个浓度进样3次,计算盐酸米诺环素回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果($n=9$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
7.99	7.89	98.8		
8.01	8.00	99.9		
7.98	8.01	100.4		
10.05	10.04	99.9		
9.98	9.97	99.9	100.1	0.61
10.10	10.11	100.1		
12.07	12.15	100.7		
11.96	11.94	99.8		
12.03	12.16	101.1		

2.1.8 稳定性试验。取同一供试品溶液,分别于0.1、2.6、12、24 h进样,测定峰面积。结果,RSD=1.2% ($n=6$),表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.1.9 重复性试验。取同批样品,平行制备6份供试品溶液,分别进样;同时取对照品溶液,进样测定,按外标法计算含量。

结果,米诺环素的平均含量为101.5%,RSD=0.72%(n=6)。

2.1.10 样品含量测定。取3批盐酸米诺环素软膏(批号:1107011、1110041、1204191),分别制备为供试品溶液;另取对照品溶液进样检测。按外标法以峰面积计算样品中米诺环素的含量,结果分别为100.9%、100.7%、101.9%。

2.2 体外释放度测定及机制研究

由于目前《中国药典》尚无合适的试样盒用于缓释软膏的释放度测定,笔者采用自制试样盒以浆法测定软膏的释放度。试样盒的外直径为40.0 mm,内直径为30.0 mm,外高为5.0 mm,内高为0.5 mm。试验时,照释放度测定法[2010年版《中国药典》(二部)附录XC第二法]试验^[7]。取干净的试样盒,称质量,将约0.5 g的软膏均匀摊布在试样盒的内槽,精密称定,将该试样盒的试样面朝上,水平地沉入装有500 ml的溶出杯中,转速为100 r/min,温度为(37.0±0.5)℃,依法操作。分别于1、2、4、6、8、10、12、16、20、24 h时取溶出液5 ml,同时补充同体积同温的水,采用0.45 μm的滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液,进样检测。结果在1、4、8、12、24 h的体外释放度分别为11.03%、25.01%、36.14%、51.06%、64.62%。释放曲线见图4。

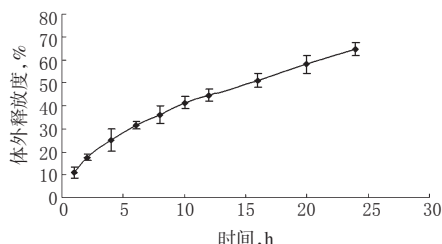


图4 盐酸米诺环素软膏释放曲线(n=6)

Fig 4 Release curves of Minocycline hydrochloride ointment (n=6)

为了更直观描述盐酸米诺环素软膏的体外释放模式,本试验根据上述体外释放度(Q)测定的结果,分别用不同的释放模型(零级方程、一级方程、Higuchi方程、Ritger-Peppas方程、Weibull方程)将Q与时间t进行线性拟合。结果各方程相关系数都相差不大且都较接近1,其中按一级方程拟合的相关系数最大(r=0.999 0)。这提示本品释药具有复合释药机制,相对而言一级动力学释放(即药物在单位时间内按比例释放)机制更明显,详见表2。

表2 不同释药模型的拟合方程和相关系数

Tab 2 Fitting equation and correlation coefficient of different drug release models

拟合模型	拟合方程	r
零级释放	$Q=0.216t+0.159 6$	0.987 7
一级释放	$\ln(1-Q)=-0.037 7t-0.129 4$	0.999 0
Higuchi	$Q=0.131 1t^{1/2}-0.007 4$	0.998 9
Ritger-Peppas	$\ln Q=0.494 \ln t-2.039 5$	0.997 9
Weibull	$\ln \ln \frac{1}{1-Q}=0.614 \ln t-2.031 3$	0.992 8

3 讨论

由于盐酸米诺环素易与金属离子络合,影响分离,在流动相中添加0.01 mol/L乙二胺四乙酸二钠能络合流动相中的金属离子从而屏蔽金属离子,使米诺环素与差向米诺环素更好地分离。在流动相中加入四氢呋喃作为改性剂,可增加流动相的极性,有利于提高流动相的分离能力。

本试验采用HPLC法测定盐酸米诺环素软膏中主药的含量,方法学验证表明,其精密性、稳定性、回收率和重复性均能满足定量分析的要求。该法方便快捷、灵敏度高、重复性好、准确可行,为相关制剂中盐酸米诺环素的含量测定提供了一种新方法。

盐酸米诺环素软膏主要是按一级动力学释放,药物在口腔的转运速度与口腔的药量或血药浓度成正比,药物缓慢而非恒速地被释放,药物的半衰期与剂量无关。该制剂是将其注入到牙周袋内,通过基质的水合作用,使制剂固定黏附于牙周袋内,与牙周袋内龈沟液接触,龈沟液会进入软膏中,从而与不溶的共聚物形成网状结构,起一定的储库作用;又通过基质的控释性能,保证了可在较长时间内释放活性成分,达到局部有效药物浓度的目的。

盐酸米诺环素软膏主要由高聚物包裹盐酸米诺环素制成微球而产生缓释效果,药物释放度是该药品高效、长效、低副作用的主要影响因素,必须要有释放度检测手段和标准用于指导制剂的研发生产以及临床用药。本文探讨了盐酸米诺环素软膏的含量及释放度测定方法,为软膏应用于牙周袋缓释给药与疗效的相关性提供了进一步的试验依据。

由于半固体制剂的缓释软膏是在全世界较新上市的新型给药系统,用于牙科更是少见,查阅相关公开文献均未检索到类似的释放度检测方法。考虑到释放度研究对药物新制剂的重要性,本研究以《中国药典》及世界上主流国家如美国、英国的药典记载的常用释放度测定装置[2010年版《中国药典》(二部)附录XC第二法]为基础,根据本缓释软膏具有一定黏附性、流动性的特点,改用特制的试样盒承载被测样品。本方法经方法学考察证明简单、易行、可靠,适用于软膏的释放度测定。

参考文献

- [1] 高燕霞,刘铁钢,刘长群.高效液相色谱法测定盐酸米诺环素的含量及有关物质[J].中国现代应用药学,2006,23(1):64.
- [2] 高燕霞,姜建国,杜增辉.HPLC测定盐酸米诺环素胶囊和片剂的含量及有关物质[J].华西药理学杂志,2005,20(6):531.
- [3] Hirasawa M, Ayashi K, Takada K. Measurement of peptidase activity and evaluation of effectiveness of administration of minocycline for treatment of dogs with periodontitis[J]. *Am J Vet Res*, 2000, 61(11):1 349.
- [4] Yoshihiro IO, Ohya T, Kawasa H, et al. The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes[J]. *J Periodontol*, 2001, 72(6):774.
- [5] 雷静.盐酸米诺环素缓释软膏治疗慢性牙周炎的临床观察[J].中国实用医药,2011,6(15):170.
- [6] 随丽娜,张爽,王软英.派丽奥与牙康棒局部缓释药物对轻、重度慢性牙周炎治疗的疗效观察[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2011,21(8):472.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录XC.

(收稿日期:2012-10-25 修回日期:2012-12-03)