

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.21.016

盐酸芦氟沙星膜剂含量测定及体外透皮效果研究

金伟华¹, 蒲志强¹, 陈 华¹, 于波涛^{1△}, 余志军²

(1. 中国人民解放军西部战区总医院药剂科, 四川 成都 610083; 2. 西南医科大学药学院, 四川 泸州 646000)

摘要:目的 建立测定盐酸芦氟沙星膜剂中盐酸芦氟沙星含量的高效液相色谱法,并考察其体外透皮效果。方法 以聚乙烯醇17-88制备膜剂。色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为枸橼酸溶液-乙腈(88:12, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为254 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL。以昆明种小鼠为模型进行体外透皮试验。结果 制备的盐酸芦氟沙星膜剂的溶化时限检查结果符合药典规定,在15 min内全部溶化。盐酸芦氟沙星质量浓度在0.015~0.150 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9$, $n=5$);检测限为0.000 23 mg/mL,定量限为0.000 78 mg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2.0%;平均回收率为101.13%,RSD为0.96% ($n=9$)。24 h体外透皮试验累积透过率为69.15%。结论 该膜剂制备工艺可行,含量测定方法准确可靠,体外透皮效果良好。

关键词: 盐酸芦氟沙星;膜剂;含量测定;体外透皮试验

中图分类号:R927.2;R978.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)21-0059-04

Content Determination of Rufloxacin Hydrochloride in Rufloxacin Hydrochloride Film and Its Transdermal Effect *in Vitro*

JIN Weihua¹, PU Zhiqiang¹, CHEN Hua¹, YU Botao¹, YU Zhijun²

(1. Department of Pharmacy, The General Hospital of Western Theater Command of Chinese People's Liberation Army, Chengdu, Sichuan, China 610083;

2. School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China 646000)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of rufloxacin hydrochloride in Rufloxacin Hydrochloride Film and to investigate its transdermal effect *in vitro*. **Methods** The film was prepared by polyvinyl alcohol 17-88. The chromatographic column was Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was citric acid solution-acetonitrile (88:12, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μL. *In vitro* transdermal test was carried out by using Kunming mice as the model. **Results** The result of the dissolution time limit test of the prepared Rufloxacin Hydrochloride Film was in accordance with the requirement of the Chinese Pharmacopoeia, and all prepared Rufloxacin Hydrochloride Film dissolved within 15 min. The mass concentration of rufloxacin hydrochloride showed a good linear relationship in the range of 0.015-0.150 mg/mL ($r=0.999\ 9$, $n=5$). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.000 23 mg/mL, and 0.000 78 mg/mL, respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%. The average recovery of rufloxacin hydrochloride was 101.13% with an RSD of 0.96% ($n=9$). The cumulative penetration rate of *in vitro* transdermal test within 24 h was 69.15%. **Conclusion** The preparation process of the film is feasible, the content determination method is accurate and reliable, and the transdermal effect *in vitro* is good.

Key words: rufloxacin hydrochloride; film; content determination; *in vitro* transdermal test

盐酸芦氟沙星是新型的第3代喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌谱广、口服吸收好、半衰期长、组织分布广等药动学特点,临床多用于敏感菌引起的泌尿道感染、下呼吸道感染等;同时具有免疫调节作用,可增强吞噬细胞的吞噬功能和吞噬活性^[1]。盐酸芦氟沙星尚无膜剂,且与同属氟喹诺酮类药物的诺氟沙星、左氧氟沙星作用类似,半衰期长,可减少给药频次,患者依从性好。目前,诺氟沙星、左氧氟沙星均有眼用制剂。本研究中制备了一种新型的盐酸芦氟沙星膜剂,用于局部创伤感染如敏感菌引起的口腔溃疡及皮肤和妇科感染等。现报道如下。

1 仪器、试药与动物

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);PHS-3C

型精密pH计(上海康仪仪器有限公司);竖式改良的Franz扩散池(自制,有效扩散面积为2.5 cm²);ZB-ZE型智能崩解仪(天津市天大天发科技有限公司);85-2型恒温磁力搅拌器(金坛市城东新瑞仪器厂)。

1.2 试药

盐酸芦氟沙星对照品(美国Med Chem Express LLC公司,批号为19143,含量为99.60%);盐酸芦氟沙星膜剂(自制,批号分别为180328,180410,180411,180412,规格为每片2 mg);0.9%氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司,批号为K18030409);聚乙烯醇17-88(PVA17-88,成都市科隆化学品有限公司,批号为2017090801,含量≥98%);甘油(国药控股星鲨制药(厦门)有限公司,批号为20870101,含量≥95%);聚山梨

第一作者:金伟华,女,大学本科,副主任药师,研究方向为医院药学,(电话)028-86570836(电子信箱)jwh311@sina.com。

△通信作者:于波涛,男,博士,主任药师,研究方向为医院药学与药剂学,(电子信箱)yu-bo-tao@sohu.com。

酯-80(Tween-80,江西益普生药业有限公司,批号为20161002);乙腈为色谱纯,枸橼酸、无水硫酸钠均为分析纯,水为超纯水。

1.3 动物

雄性昆明种小鼠,体质量20~25 g,购于成都达硕实验动物公司,生产合格证SCXK(川)2015-030。置小白鼠饲养盆内和20~28℃的空调房间,保证空气流通,每天早晚喂食1次专用饲料,每天更换1次食用水,每周更换2次垫料,定期对所用器具进行消毒。

2 方法与结果

2.1 盐酸芦氟沙星膜剂制备^[2]

取PVA17-88 2 g,加入25 mL水中,充分膨胀后置85℃水浴加热,搅拌至完全溶解,加甘油0.4 mL和Tween-80 0.2 mL,加入盐酸芦氟沙星原料药2 g,搅拌均匀,静置,待气泡除尽,均匀涂抹在用少量液状石蜡润湿的光滑平整的玻璃板上,厚度为0.15 mm,于60℃干燥2 h,分割成1 cm×1 cm,即得盐酸芦氟沙星膜剂1 000片,每片含盐酸芦氟沙星2 mg,避光保存。

2.2 溶化时限考察

取2.1项下1 cm×1 cm膜剂6片,分别用两层筛孔内径为2 mm的不锈钢丝夹住,按2015年版《中国药典(四部)》通则0921崩解时限检查法片剂项下方法检查,结果均于15 min内全部溶化。

2.3 含量测定

2.3.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Eclipse XDB-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:枸橼酸溶液(枸橼酸8 g与无水硫酸钠6 g溶于1 L水中,用4.3%氢氧化钠试液^[3]调至pH 4.0)-乙腈(88:12, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。在此色谱条件下的高效液相色谱图见图1,结果表明阴性对照无干扰,专属性良好,理论板数按盐酸芦氟沙星峰计不低于3 000。

2.3.2 溶液制备

取盐酸芦氟沙星对照品1.5 mg,精密称定,置10 mL

容量瓶中,加流动相溶解并定容,制成质量浓度为0.150 mg/mL的对照品贮备液。取盐酸芦氟沙星药膜5片(相当于盐酸芦氟沙星10 mg),剪碎,精密称定,置10 mL容量瓶中,加蒸馏水适量,超声处理使膜溶解,用蒸馏水稀释至刻度,摇匀,精密量取1 mL,置10 mL容量瓶中,加流动相定容,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取不含盐酸芦氟沙星的空白膜剂5片,剪碎,按平均片重取适量,精密称定,同供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

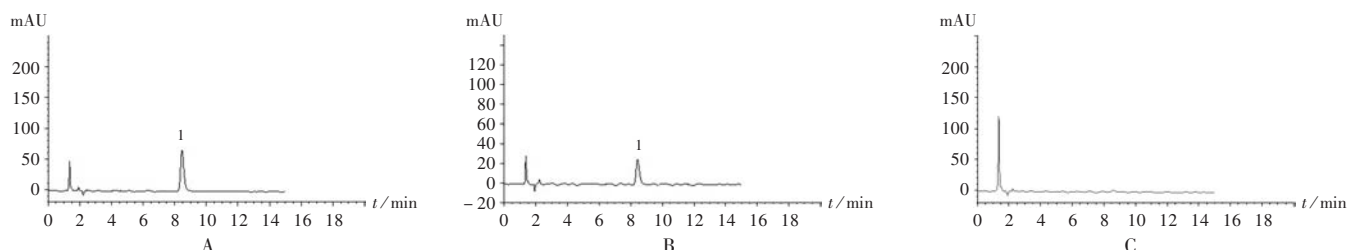
2.3.3 方法学考察

线性关系考察与检测限、定量限确定:精密量取2.3.2项下对照品贮备液(质量浓度为0.150 mg/mL)适量,加流动相分别稀释成质量浓度为0.120,0.090,0.060,0.030,0.015 mg/mL的对照品溶液。分别精密量取10 μL,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。以盐酸芦氟沙星的峰面积(*Y*)为纵坐标、进样质量浓度(*X*, mg/mL)为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 17\,103X + 11.45$ ($r = 0.999\,9$, $n = 5$)。结果表明,盐酸芦氟沙星质量浓度在0.015~0.150 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。以3倍信噪比(*S/N*)为检测限,以10倍*S/N*为定量限,基线噪声为0.061 47 mAU,经过计算,检测限为0.000 23 mg/mL,定量限为0.000 78 mg/mL。

精密度试验:精密吸取2.3.2项下对照品贮备液(质量浓度为0.150 mg/mL)10 μL,注入液相色谱仪,按2.3.1项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果盐酸芦氟沙星峰面积的*RSD*为1.54% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

重复性试验:取同一批(批号为180328)样品6份,精密称定,按2.3.2项下方法制备供试品溶液,按2.3.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸芦氟沙星含量的*RSD*为0.97% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取同一批(批号为180328)样品,精密



1. 盐酸芦氟沙星

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. rifloxacin hydrochloride

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

称定,按 2.3.2 项下方法制备供试品溶液,分别于 0,2,4,8,24 h 时按 2.3.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果盐酸芦氟沙星峰面积的 *RSD* 为 1.31% ($n=5$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品 9 份,依法制备供试品溶液,按盐酸芦氟沙星低、中、高质量浓度精密加入对照品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表 1。

表 1 盐酸芦氟沙星加样回收试验结果 ($n=9$)

Tab. 1 Results of the recovery test of rufloxacin hydrochloride ($n=9$)

取样量(mg)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	<i>RSD</i> (%)
14.38	102.08	75.00	179.18	102.80		
14.54	103.15	75.00	177.75	99.47		
14.44	102.52	75.00	178.22	100.93		
14.45	102.58	105.00	207.88	100.29		
14.34	101.81	105.00	208.71	101.81	101.13	0.96
14.41	102.25	105.00	208.55	101.24		
14.54	103.19	120.00	223.88	100.58		
14.42	102.38	120.00	224.18	101.50		
14.32	101.72	120.00	223.62	101.58		

2.3.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 180410,180411,180412)样品,依法制备供试品溶液,按 2.3.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。根据 2015 年版《中国药典(二部)》^[4]《中国人民解放军医疗制剂规范》^[5]中膜剂的标示量,拟订盐酸芦氟沙星膜剂的标示量为 90.0%~110.0%。结果每片膜剂平均含量为 (1.852 ± 0.027) mg,3 批样品中盐酸芦氟沙星的含量分别为标示量的 94.15%,93.15%,91.50%,*RSD* 分别为 1.34%,0.38%,1.09% ($n=3$)。

2.4 体外透皮试验

2.4.1 离体鼠皮制备^[6]

取雄性昆明种小鼠,6% Na₂S 溶液褪除背部毛,用生理盐水洗净皮肤,次日断颈处死,处死后立即剥离背部皮肤,去除皮下组织和脂肪等粘连物,用生理盐水清洗干净,放入生理盐水中于 4℃ 下短期保存。使用前检查鼠皮完整性,不得有破损。

2.4.2 体外透皮试验^[7-11]

采用改良的 Franz 扩散池,接收池的容量为 12.5 mL,有效扩散面积为 2.5 cm²,以生理盐水作为接收介质,恒温水浴加热,温度控制在 (37 ± 1) ℃^[8],接收池内加入磁力搅拌子,以 300 r/min 的速率恒速搅拌。

将处理好的小鼠皮肤固定在供给室和接收池间,角质层面向扩散池供给室一侧,向接收池中加满接收液,排除气泡,使接收液与皮肤充分接触,取盐酸芦氟沙星膜剂 1 片(含盐酸芦氟沙星 2 mg),平整铺于试验皮肤

上,开动磁力搅拌器,分别于 1,2,4,8,12,24 h 时取接收液 2 mL(同时加入同体积、同温度的空白接收液),采用高效液相色谱法测定接收液中盐酸芦氟沙星的含量,并计算累积透过量(Q_n)与累积透过率(P)。

$$Q_n = V_0 \times C_n + V \sum_{i=1}^{n-1} C_i$$

$$P = Q_n / \text{加样量} \times 100\%$$

式中, Q_n 为第 n 个取样点的累积透过量(mg), C_n 和 C_i 为第 i ($i \leq n-1$) 个取样点的盐酸芦氟沙星质量浓度(mg/mL), V_0 为接收液的体积(mL), V 为取样量(mL)。取 $V_0 = 12.5$ mL, $V = 2$ mL,结果 24 h 内 Q_n 为 1.383 0 mg,累积透过率为 69.15%,表明盐酸芦氟沙星膜剂体外透皮效果良好。

精密量取接收液 2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,滤过,取续滤液,作为供试品溶液。按 2.3.1 项下方法测定 3 次,记录峰面积,以盐酸芦氟沙星 Q_n (mg)对 t (h)作图,绘制体外透皮曲线。结果见图 2。

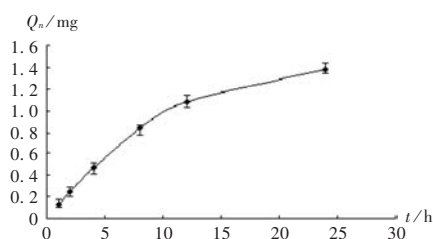


图 2 盐酸芦氟沙星膜剂体外累积渗透曲线 ($n=3$)

Fig. 2 *In vitro* cumulative permeation profile of Rufloxacin Hydrochloride Film ($n=3$)

3 讨论

3.1 成膜材料选择

制备膜剂的成膜材料有多种,PVA 和乙烯-醋酸乙烯共聚物(EVA)是最常用的成膜材料。EVA 为水不溶性高分子聚合物,PVA 的水溶性大,考虑到盐酸芦氟沙星在水中溶解度大,故选用 PVA17-88 作为盐酸芦氟沙星膜剂的成膜材料,其在成膜性能、膜的抗拉强度、柔韧性、吸湿性等方面均较好^[12]。

3.2 流动相选择

查阅文献发现,盐酸芦氟沙星含量测定方法多为紫外分光光度法和高效液相色谱法。本研究中参考原国家食品药品监督管理总局药品标准中盐酸芦氟沙星胶囊的高效液相色谱法测定条件,用枸橼酸溶液和乙腈作为流动相,经过多次调整流动相比比例,发现流动相为枸橼酸溶液-乙腈(88:12, V/V)时的色谱峰保留时间适宜,分离度较好。故最终选择枸橼酸溶液-乙腈(88:12, V/V)作为流动相。

3.3 试验结果评价

由于盐酸芦氟沙星水溶性较好,以生理盐水作为接