

HPLC 测定他克莫司软膏体外透皮吸收

肖学成, 熊驰, 彭秀菊, 张磊(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

摘要: 目的 建立规格为 0.03% 的他克莫司软膏体外透皮接收液中药物的 HPLC 测定方法, 研究 0.03% 他克莫司软膏的体外透皮量。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-磷酸(700:300:1); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 215 nm。体外透皮实验采用改良的 Franz 直立式扩散池, 透皮屏障采用实验用离体乳猪皮。将自制软膏与市售软膏的透皮结果进行对比分析, 分别在设定的不同时间点取样测定透皮接收液中他克莫司的浓度, 计算累积透皮量。结果 他克莫司的标准曲线方程为 $A=16\,310.263C+3\,629.783$ ($r=0.999\,97$), 线性范围为 2.088~20.88 μg·mL⁻¹,

作者简介: 肖学成, 男, 博士, 教授 Tel: 13707143401 E-mail: xiaoxcen@sina.com

平均回收率为 99.10%。累积透皮量与时间呈良好的线性关系, 自制软膏与市售软膏的透皮结果无显著性差异。结论 该检测方法操作简便, 快速准确, 是考察他克莫司软膏体外透皮性能的理想方法。

关键词: 他克莫司; 软膏; 透皮吸收; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)07-0839-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.017

Determination of Percutaneous Absorption of Tacrolimus Ointment by HPLC

XIAO Xuecheng, XIONG Chi, PENG Xiuju, ZHANG Lei(College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for quantitative determination of tacrolimus *in vitro* percutaneous solution, and investigate the ability of percutaneous penetration of 0.03% Tacrolimus ointment. **METHODS** Diamonsil C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used as the fixed phase and a mixture of acetonitrile, purified water and phosphoric acid(700 : 300 : 1) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was at 215 nm. Improved Franz type diffusion cells were used *in vitro* permeation studies and excised mini pigs skins *in vitro* were used as transdermal barrier. The concentration of tacrolimus in the receptor solution was determined by HPLC to investigate its cumulative permeation quantities at different time respectively and compared with that of the commercial ointment. **RESULTS** The regression equation of Tacrolimus ointment was linear in the range of 2.088–20.88 μg·mL⁻¹($A=16\ 310.263C+3\ 629.783$, $r=0.999\ 97$). The average recovery was 99.10%. A good linear relationship existed between the cumulative penetration quantities and the time. There was no significant difference in the permeation quantities between the self-made and commercial ointment. **CONCLUSION** The method is simple, rapid, and accurate. It is a good method to evaluate the characteristic of permeation for Tacrolimus ointment.

KEY WORDS: tacrolimus; ointment; percutaneous absorption; HPLC

他克莫司, 又名 FK506, 是一种具有免疫活性的大环内酯类抗菌药物, 有很强的免疫抑制作用, 通过抑制早期淋巴细胞相关基因的表达, 从而抑制 T 淋巴细胞的免疫活性^[1]。他克莫司在皮肤科的主要应用有特异性皮炎、掌、跖部湿疹、溢脂性皮炎、慢性光化性皮炎、银屑病、白癜风、大疱性疾病、斑秃及其他头皮皮肤病、酒渣鼻、肉芽肿性疾病、坏疽性脓皮病的伤口愈合、皮肤型红斑狼疮和结缔组织疾病、继发性皮肤瘙痒症及其他皮肤病^[2-3]。本研究建立了高效液相色谱法测定 0.03% 他克莫司软膏体外透皮吸收量, 结果表明该方法能使样品得到较好分离, 排除辅料及其他干扰, 方法操作简便, 快速准确, 可用于产品的质量控制和体外透皮量检测, 为临床使用提供了实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AUW220D 分析天平(日本岛津); HH 型恒温电热水浴器(巩义市英峪予华仪器厂); HJ-4A 型数显恒温多头磁力搅拌器(金坛市岸头中旺实验仪器厂); 改良的 Franz 直立式扩散池(自制); KNAUER 高效液相色谱仪(德国诺尔公司)。

1.2 试样

市售 0.03% 他克莫司软膏(日本 Astellas Toyama Co., Ltd. Toyama Plant, 批号: 029720); 0.03% 他克莫司软膏(武汉诺安药业有限公司, 批号: 20120701, 20120702, 20120703); 他克莫司对照品(国药集团川抗制药有限公司, 批号: 110201, 纯度: 99.7%); 0.9% 氯化钠水溶液(即生理盐水, 氯化钠, 台山市新宁制药有限公司); 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙腈(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司); 磷酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.3 动物

实验用小型乳猪(巴马香猪), 购自重庆宗申医达生物技术研发有限公司, 健康, ♀, 9 周, 体重 7.2 kg, 许可证号: SYXK(渝)2010-0001。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水-磷酸(700 : 300 : 1); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 215 nm; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品储备液的制备 精密称取他克莫司对照品 10.44 mg, 至 100 mL 量瓶中, 加生理盐水-无水乙醇(50:50)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得浓度为 $104.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品储备液。

2.2.2 对照品溶液的制备 吸取 5 mL 对照品储备液置于 50 mL 量瓶中, 加生理盐水-无水乙醇(50:50)溶解并稀释至刻度, 即为浓度为 $10.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.2.3 空白软膏基质的制备 按处方量制备成不含他克莫司的阴性样品适量, 作为空白软膏基质。

2.2.4 空白基质液的制备 取空白软膏基质 0.5 g, 将其均匀涂布于固定在 Franz 扩散池的猪皮上, 12 h 后取接收液适量, 用孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为空白基质液。

2.2.5 样品溶液的制备 取 0.03% 他克莫司软膏 0.5 g, 将其均匀涂布于固定在 Franz 扩散池的猪皮上, 12 h 后取接收液适量, 孔径为 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 取续滤液作为样品溶液。

2.3 专属性试验

分别取“2.2”项下中对照品溶液、空白基质液、样品溶液各 20 μL 进样, 记录色谱图, 结果表明在此色谱条件下, 空白基质不会对皮肤产生影响, 且空白基质在他克莫司主峰处无吸收峰, 故对他克莫司的含量测定无干扰。结果见图 1。

2.4 标准曲线的绘制

精密量取“2.2.1”项下对照品储备液各 2, 5, 3, 5, 3, 5 mL 分别至 100, 100, 50, 50, 25, 25 mL 的量瓶中, 加生理盐水-无水乙醇(50:50)稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度分别为 2.088, 5.22, 6.264, 10.44, 12.528, 20.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列标准溶液。按“2.1”项下色谱条件, 分别进样 20 μL , 以峰面积 A 为纵坐标、浓度 C 为横坐标, 得标准曲线方程为 $A=16\,310.263C+3\,629.783(r=0.999\,97)$, 表明他克莫司浓度在 2.088~20.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

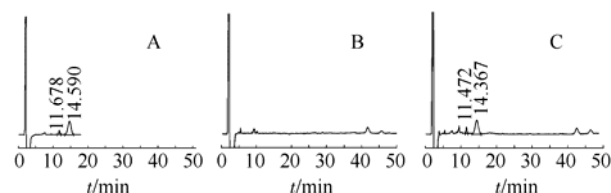


图 1 高效液相色谱图

A-对照品溶液; B-空白基质液; C-12 h 后接受液

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-reference solution; B-blank substrate solution; C-accept liquid after 12 h

2.5 精密度试验

精密量取“2.2”项下对照品储备液各 5 mL, 分别移至 100, 50 和 25 mL 量瓶中配制成 5.22, 10.44 和 20.88 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低、中、高 3 个浓度的他克莫司对照品溶液, 分别于 1 d 内每个浓度重复进样 5 针, 连续进样测定 6 d, 根据所得数据计算得到日内精密度 RSD 为 1.32%, 日间精密度 RSD 为 1.96%。

2.6 回收率实验

按“2.2.2”项下对照品溶液的配制方法, 配制浓度为 $10.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 2 份。按处方量制备出含他克莫司分别为 80%, 100%, 120% 的样品软膏, 制备成对应的供试品溶液。每个浓度制备 3 批供试品溶液, 每批供试品溶液 1 式 2 份。在每个浓度项下, 2 份对照品溶液及每份供试品各进样 2 次, 进样量 20 μL , 测定峰面积, 用外标法计算回收率, 结果为 80%, 100%, 120% 3 种浓度的回收率分别为 99.32%, 98.92% 和 99.07%, 平均回收率为 99.10%。

2.7 样品溶液稳定性

将 12 h 接收液于室温下存放 24 h, 分别于 0, 4, 6, 8, 12, 24 h 量取 20 μL 注入液相色谱仪, 计算峰面积的 RSD 为 1.47%, 表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 体外透皮实验

2.8.1 离体猪皮的制备 巴马香猪处死后立即剪取腹部皮肤, 仔细剥离皮下脂肪层和结缔组织, 用生理盐水冲洗干净, 置生理盐水中, 低温冰箱保存备用。实验前自然解冻, 并用生理盐水浸泡 30 min, 用滤纸吸干, 备用^[4]。每块皮肤随机分成 2 份, 1 份用市售软膏, 另 1 份用自制软膏, 以尽量消除动物皮肤不同所产生的误差。

2.8.2 透皮扩散装置 采用改进的 Franz 立体扩散装置, 接受递质体积为 14 mL, 有效释药面积为 4.7 cm^2 , $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温, 搅拌速度为 $300 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.8.3 实验步骤 取制备好的离体猪皮置于 Franz 立式扩散池的 2 个半池之间, 用夹子固定好。皮肤角质层朝上, 分别取 0.03% 他克莫司软膏 0.5 g 均匀涂布于皮肤上, 在接受池中加生理盐水-无水乙醇(50:50)14 mL, 以皮肤恰好与液面接触为好, 用磁力搅拌器不断搅拌接收液, 使药物自然释放, 保持 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 恒温水浴。分别于涂布后的 1, 2, 4, 6, 8, 12 h 各点取接收液 1 mL [取样后即向接受室内补充 1 mL 生理盐水-无水乙醇(50:50)]。

用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液进样测定, 按下列公式^[5]计算单位面积累积渗透量(Q):

$$Q_n = V_o \times q_n / V + \sum_{i=1}^{n-1} q_i$$

式中 V_o 为接收液总体积, V 为取样量, q_n 为第 n 次实测单位面积渗透量 q_n =样品峰面积 $\times$ 对照

表 1 2 处方药物单位面积累积渗透量

Tab. 1 Cumulative permeation in unit area of two formulations

项目	累积渗透量/ μg							
	1 h	2 h	3 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h
自制软膏	定量限以下, 未检出				9.910 5	16.178 5	21.408 8	28.026 6
市售软膏	定量限以下, 未检出				9.938 9	16.751 3	21.297 3	27.774 3

表 2 2 处方药物单位面积累积渗透量 Q 及透皮速率分析

Tab. 2 Analysis between cumulative permeation Q in unit area of two formulations and penetration rate

处方	回归曲线方程	相关系数 r	透皮速率/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$	12 h 累积渗透量/ $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$
自制软膏	$Q=2.785\ 7t-6.577\ 2$	0.976 7	2.785 7	28.026 6
市售软膏	$Q=2.778\ 1t-6.506\ 1$	0.976 4	2.778 1	27.774 3

自制软膏和市售软膏的平均累积渗透量的统计分析结果表明, 他克莫司的累积渗透量与渗透时间呈良好的线性关系, 且自制软膏与市售软膏的平均累积渗透量没有明显差异。结果见表 3。

表 3 2 处方平均累积渗透量的比较(方差分析表)

Tab. 3 Comparison of average cumulative permeation of two prescription drugs (analysis of variance table)

变异来源	离均差平方和 SS	自由度	均方 MS	F 值	P 值
组间	0.007	1	0.007	1.2×10^{-4}	0.992(>0.05)
组内	347.217	6	57.870		

3 讨论

由于他克莫司在水中几乎不溶, 而易溶于乙醇, 考虑到他克莫司的溶解性, 及皮肤的生理特性, 选用生理盐水-无水乙醇(50:50)为透皮接受介质。

体外方法最常用于皮肤穿透性研究, 体外皮肤对化合物和水的渗透试验显示人和猪的皮肤是相似的。在体外相同的条件下, 用猪皮肤预测人皮肤的通透性数据亦是相似的, 一些化合物体内皮肤穿透证明, 刚断奶的猪的背部皮肤与人的前臂皮肤最相近, 而小型猪的皮肤与人的皮肤穿透性特征最接近^[5]。所以本实验选用小型猪猪皮为模型进行透皮分析。

在体外皮肤渗透实验中, 动物皮肤中的蛋白

品浓度 $\times$ 接收液取样量/(对照品峰面积 $\times$ 释放面积), q_i 为第 n 次前每次测得的单位面积渗透量。

2.8.4 实验结果 各时间点药物单位面积累积渗透量见表 1。以单位面积累积渗透量对时间进行线性回归, 所得直线斜率即透皮速率, 结果见表 2。

质的脱落或溶解不仅会污染接受液而且本身可能会有紫外吸收, 在本研究中, 波长 215 nm 处没有任何干扰主药测定的物质存在, 因此, 笔者采用检测灵敏度较高的 HPLC 测定吸收液中的他克莫司的含量, 排除了干扰, 得到了基线分离, 保证了实验结果的准确。

本实验采用改进的 Franz 立体扩散装置考察他克莫司体外透皮量, 操作简便, 重复性好。为防止由于猪皮中蛋白质和脂质等大量生物大分子在接收液中溶出影响检测结果、污染色谱柱, 因此在进行 HPLC 检测之前必须对接收液进行过滤。

由测定结果可以看出, 自制软膏和市售软膏的相关系数、透皮速率及 12 h 累积渗透量均非常平行, 其结果是准确可信的。2 处方平均累积渗透量方差统计分析结果显示, 自制软膏与市售软膏的透皮平均累积渗透量无显著性差异, 即两者透皮现象基本一致, 表明两者的治疗效果相当。

REFERENCES

- [1] WU X J, ZHEN M. Progress of tacrolimus topical treatment of skin diseases [J]. Chin J Dermatol(中华皮肤科杂志), 2002, 35(6): 491-493.
- [2] MA Y, CHEN L J. Progress of Tacrolimus ointment in the application of dermatology [J]. Shanghai J Pharm(上海医药), 2010, 31(4): 159-163.
- [3] LAN S, YE D M, MO G Y. Investigation on the relationship between tacrolimus blood concentration and clinical efficacy in treatment of nephrotic syndrome patients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(8): 896-900.

[4] ZHANG Y, XU S B. The effect of different permeation receptors and various exercised animal skin on the percutaneous permeability of glimepiride *in vitro* [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni(中山大学学报: 自然科学版), 2004, 43(5): 86-90.

[5] LIU P S, ZHEN J R. The relevant information of using pig as transdermal experimental animal Model [J]. Foreign Med Sci(Sec Dermatol Venereol)(国外医学: 皮肤性病学分册), 2001, 27(4): 243-244.

收稿日期: 2013-09-02