

# 建立测定兔眼角膜中盐酸特比萘芬含量的甲醇浸提-HPLC法

朱玲<sup>1\*</sup>, 邵彦江<sup>1</sup>, 周天洋<sup>2</sup>, 严迪恒<sup>1</sup>, 张亚琦<sup>1</sup>, 张韵涵<sup>1</sup>, 祝文影<sup>1</sup>(1. 郑州大学药学院, 郑州 450001; 2. 河南省眼科学研究所/河南省立眼科医院, 郑州 450003)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)07-0924-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.07.18

**摘要** 目的: 建立测定兔眼角膜中盐酸特比萘芬含量的方法。方法: 取日本大耳白兔 18 只, 随机分为 6 组, 每组 3 只, 双眼给予 0.2% 盐酸特比萘芬滴眼液 50  $\mu$ l。分别于给药后 15、30、60、120、240、480 min 时处死兔, 剖取角膜, 加入甲醇, 充氮气, 密封冷藏静置浸泡 24 h 后, 涡旋, 离心, 取上清液采用高效液相色谱法测定其中盐酸特比萘芬的含量。色谱柱为 Waters X-Bridge C<sub>18</sub>, 流动相为甲醇-水(92:8), 流速为 0.7 ml/min, 检测波长为 224 nm, 柱温为 40  $^{\circ}$ C, 进样量为 20  $\mu$ l。结果: 在兔眼角膜醇浸提液中盐酸特比萘芬检测质量浓度在 0.007 64~0.382  $\mu$ g/ml( $r=0.999 8, n=6$ ) 范围内与峰面积呈良好的线性关系; 方法回收率为 99.6% (RSD=4.5%,  $n=3$ ), 提取回收率为 98.5%~103.2% (RSD=6.8%~11.0%,  $n=3$ ); 日内 RSD 为 4.1% ( $n=5$ ), 日间 RSD 为 4.5% ( $n=5$ )。给药 480 min 后仍可测得盐酸特比萘芬, 其质量浓度为 (0.102  $\pm$  0.043 3)  $\mu$ g/ml。结论: 本方法专属性强、准确度高, 可用于兔眼角膜中盐酸特比萘芬的含量测定。

**关键词** 盐酸特比萘芬; 兔; 角膜; 甲醇浸提; 高效液相色谱法

## Establishment of Methanol Extraction Technology-HPLC for Content Determination of Terbinafine Hydrochloride in Rabbits Cornea

ZHU Ling<sup>1</sup>, SHAO Yan-jiang<sup>1</sup>, ZHOU Tian-yang<sup>2</sup>, YAN Di-heng<sup>1</sup>, ZHANG Ya-qi<sup>1</sup>, ZHANG Yun-han<sup>1</sup>, ZHU Wen-ying<sup>1</sup>(1. Pharmacy College of Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Henan Provincial Eye Institute, Henan Eye Hospital, Zhengzhou 450003, China; )

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of terbinafine hydrochloride (TH) in rabbit cornea. METHODS: 18 Japanese white rabbits were randomly divided into 6 groups with 3 rabbits in each group. The eyes were treated with 0.2% TH eye drops 50  $\mu$ l. The rabbits were sacrificed 15, 30, 60, 120, 240 and 480 min after medication. The corneas were collected and immersed in methanol for 24 h with the protection of nitrogen, and then vortex centrifuged. HPLC was used to determine the content of TH in supernatant. The determination was performed on Waters X-Bridge C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of methanol-water (92:8) at the flow rate of 0.7 ml/min. The detection wavelength was set at 224 nm, and column temperature was 40  $^{\circ}$ C with injection volume of 10  $\mu$ l. RESULTS: The linear range of TH were 0.007 64-0.382  $\mu$ g/ml ( $r=0.999 8, n=6$ ). Method recovery was 99.6% (RSD=4.5%,  $n=3$ ), and extraction recovery was 98.5%-103.2% (RSD=6.8%-11.0%,  $n=3$ ). RSDs of intra-day and inter-day were 4.1% and 4.5% ( $n=5$ ). It can be measured by TH after administration of 480 min, the mass concentration of TH was (0.102  $\pm$  0.043 3)  $\mu$ g/ml. CONCLUSIONS: The method is specific and accurate, and can be used for the content determination of TH in rabbit cornea.

**KEYWORDS** Terbinafine hydrochloride; Rabbits; Cornea; Methanol extraction; HPLC

盐酸特比萘芬(Terbinafine hydrochloride, TH)属于丙烯胺类抗真菌药, 主要通过抑制角鲨烯环氧化酶而发挥强大的抑菌和杀菌作用<sup>[1-2]</sup>。近年来的研究发现, TH对大部分眼部感染真菌有很高的敏感性, 其在真菌性角膜炎治疗中的研究和应用越来越广泛<sup>[3-6]</sup>。角膜组织中TH的吸收和分布是治疗真菌性角膜炎的关键, 但角膜组织中TH的测定方法<sup>[7-8]</sup>报道较少。此外, TH分子结构中含共轭键的烯基团容易被氧化, 在样品处理时应注意防止TH的氧化。因此, 笔者在文献的基础上对测定方法进行了改进和简化, 采用了更简单的具有保护性的处理方法, 且可检测角膜中更低浓度水平的TH。本方法特异性强、灵敏度高、重现性好, 可用于兔眼角膜中TH的含量测定, 现报道如下。

## 1 材料

\* 副教授, 硕士。研究方向: 体内药物分析。E-mail: zhuling1975@zzu.edu.cn

## 1.1 仪器

2695型高效液相色谱(HPLC)系统, 包括2695分离单元、2487检测器、Empower2色谱工作站(美国Waters公司); Mettler AB135-S型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司); LD5-2A型离心机(北京医用离心机厂, 离心半径: 15 cm)

## 1.2 药品与试剂

TH对照品(山东铂源药业有限公司, 批号: 130703TH, 纯度: 99.55%); 0.2% TH滴眼液(W/V, 蓖麻油溶液, 河南省眼科学研究所自制, 批号: 131201, 规格: 5 ml: 10 mg); 甲醇(HPLC级, 美国Tedia公司, 批号: 13075031); 其他试剂均为分析纯。

## 1.3 动物

日本大耳白兔 18 只, 健康无眼疾,  $\delta$ , 体质量 2.2~2.6 kg, 购自河南康达实验动物有限公司, 实验动物使用合格证号为 SCXK(豫)2011-0001, 动物房温度为 (25  $\pm$  2)  $^{\circ}$ C, 自由进食饮水。本研究动物实验经郑州大学生命科学伦理审查委员会和

河南省立眼科医院生命科学伦理审查委员会批准实施。

## 2 方法与结果

### 2.1 样品的处理

取兔眼角膜,剪碎,加入甲醇0.5 ml,充入氮气,封口膜密封,2~8 ℃避光冷藏24 h。取出冷藏样品,涡旋振荡1 min,以离心半径15 cm、3 500 r/min离心8 min,取上清液进行测定。

### 2.2 色谱条件

色谱柱: Waters X-Bridge C<sub>18</sub>(150 mm×3.0 mm, 3.5 μm); 流动相: 甲醇-水(92:8, V/V), 流速: 0.7 ml/min; 柱温: 40 ℃; 进样量: 20 μl; 检测波长: 224 nm。

### 2.3 专属性考察

在“2.2”项色谱条件下,按“2.1”项下方法进行处理测定,空白角膜浸提液、空白角膜浸提液+TH对照品(0.191 μg/ml)和给药后15 min角膜样品浸提液的色谱显示,TH的保留时间为2.46 min左右,TH峰形良好,空白角膜浸提液对测定无干扰。色谱图见图1。

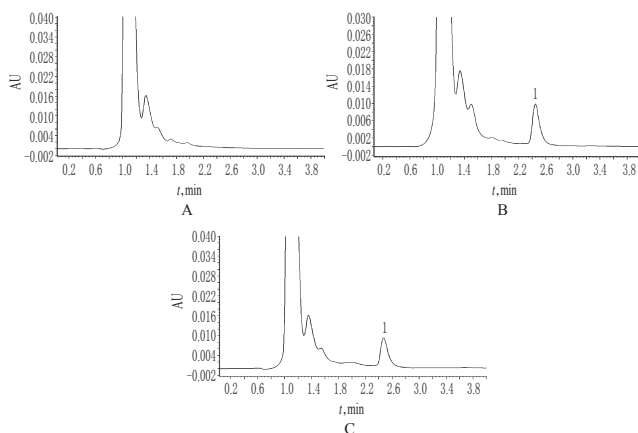


图1 高效液相色谱图

A. 空白角膜; B. 空白角膜+TH对对照品; C. 角膜样品; 1. TH

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank cornea; B. blank cornea+TH control; C. cornea sample; 1. TH

### 2.4 线性回归考察

精密称取低温真空干燥的TH对对照品0.011 98 g,置于50 ml量瓶中,加入甲醇至刻度,振摇溶解均匀,得质量浓度为239 μg/ml的TH贮备液。取上述贮备液适量,依次稀释制成质量浓度分别为3.82、1.91、0.764、0.382、0.153、0.076 4 μg/ml的标准液。精密吸取各标准液10 μl,置于试管中,加入空白角膜浸提液90 μl,混匀得质量浓度相当于0.382、0.191、0.076 4、0.038 2、0.015 3、0.007 64 μg/ml的工作液,进样测定,记录峰面积。以TH的质量浓度(*c*)为横坐标、TH的色谱峰面积(*A*)为纵坐标,进行线性回归分析。得TH的回归方程为 $c = A \times 2.551 \times 10^{-6} + 1.720 \times 10^{-4}$  ( $r = 0.999 8, n = 6$ )。结果表明,TH检测质量浓度的线性范围为0.007 64~0.382 μg/ml,检测限为0.002 55 μg/ml。

### 2.5 方法回收率与精密度试验

取质量浓度分别1.910、0.764、0.153 μg/ml的标准液各10 μl,分别加入空白角膜浸提液90 μl,制备成质量浓度分别相当于0.191 0、0.076 4、0.015 3 μg/ml的质控样品,进样测定,记录

峰面积。以实测值与理论值之比计算方法回收率。同日内测定5次考察日内精密度,连续测定5 d考察日间精密度。结果表明,平均方法回收率为99.6%,RSD为4.5% ( $n = 3$ );平均日内RSD为4.1% ( $n = 5$ ),平均日间RSD为4.5% ( $n = 5$ ),结果见表1。

表1 方法回收率与精密度试验结果

Tab 1 Results of method recovery and precision tests

加入量, μg/ml	方法回收率( $n=3$ )			精密度( $n=5$ )	
	测得值, %	平均值, %	RSD, %	日内RSD, %	日间RSD, %
0.015 3	98.7±6.7	99.6	4.5	5.5	6.8
0.076 4	99.9±3.8			3.1	3.8
0.191 0	100.3±3.0			3.7	3.0

### 2.6 提取回收率试验

取质量浓度分别1.910、0.764、0.153 μg/ml的标准液各10 μl,分别加入甲醇90 μl,混匀,加入剪碎的空白角膜约0.015 g,轻微振荡使角膜组织分散均匀,密封,参照“2.1”项下方法处理后制备提取回收率样品(ES),每个质量浓度平行制备3份。另取相应质量浓度的标准液各10 μl,加入甲醇90 μl,混匀,即得质量浓度分别相当于0.191 0、0.076 4、0.015 3 μg/ml的对照样品(EC),每个质量浓度平行制备3份。进样测定,记录峰面积(*A*),以 $A_{ES} \times 1.15 / A_{平均EC} \times 100\%$ 计算提取回收率。结果,平均提取回收率为101.02%,RSD为8.73% ( $n = 3$ ),见表2。

表2 提取回收率试验结果( $n=3$ )

Tab 2 Results of extraction recovery tests( $n=3$ )

加入量, μg/ml	提取回收率, %	平均提取回收率, %	RSD, %
0.015 3	99.1	98.5	11.0
	109.1		
	87.4		
0.076 4	111.4	103.2	8.4
	104.1		
	94.2		
0.191 0	93.8	101.3	6.8
	107.5		
	102.6		

### 2.7 浸提效率的考察

取兔3只,双眼各给予0.2% TH滴眼液50 μl,30 min后处死,取角膜,按照“2.1”项下方法处理,分别于甲醇中浸泡24、48、72 h后各取样50 μl,以离心半径15 cm、3 500 r/min离心8 min,取上清液进样测定,结果见表3。

表3 浸提效率试验各样品浸泡不同时间的峰面积

Tab 3 Peak area of samples in extraction efficiency test at different time to macerate

样品	浸泡时间		
	24 h	48 h	72 h
1	61 887	59 876	62 178
2	48 595	47 689	48 795
3	40 777	41 667	41 001
4	79 220	80 317	69 032
5	37 521	36 889	37 654
6	41 432	43 679	43 118

对比各时间点样品测定的峰面积(配对*t*检验),评价浸提效率。24 h测定的峰面积与48 h比较 $P = 0.865$  ( $n = 6$ ),与72 h

比较  $P=0.510(n=6)$ , 即差异均无统计学意义, 表明样品经过甲醇浸泡 24 h, TH 即可提取完全。

## 2.8 稳定性考察

取“2.5”项下制备的质量浓度分别相当于 0.191 0、0.076 4、0.015 3  $\mu\text{g/ml}$  的质控样品, 2~8  $^{\circ}\text{C}$  下避光冷藏 4 周, 分别于 24、48、72 h 及 4 周取样, 进样测定, 每个质量浓度、每个时间点平行测定 3 份, 计算回收率。结果, 各时间点的回收率与 0 时比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05, n=3$ ), 见表 4。

表 4 稳定性试验结果 ( $n=3$ )

Tab 4 Results of stability tests ( $n=3$ )

加入量, $\mu\text{g/ml}$	0 h		24 h		48 h		72 h		4 周	
	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %	回收率, %	RSD, %
0.015 3	91.2	7.3	95.6	8.8	89.7	9.6	91.2	6.9	98.7	9.2
0.076 4	93.3	3.8	96.8	5.9	102.3	7.2	97.5	5.3	94.5	7.1
0.191 0	97.5	4.9	101.2	3.8	98.5	6.5	102.6	4.6	100.8	5.5

## 2.9 药动学实验

取兔 18 只, 随机分为 6 个时间组, 每组 3 只, 双眼各给予临床常用剂量 (50  $\mu\text{l}$ ) 的 0.2% TH 滴眼液, 分别于给药后 15、30、60、120、240、480 min 处死各时间组兔。生理盐水冲洗眼表 (每眼 10 ml), 蘸去水分, 剖取角膜, 再用生理盐水冲洗眼表 (每眼 5 ml), 滤纸吸去附着水分, 精密称质量 ( $m_{\text{角膜}}$ ), -70  $^{\circ}\text{C}$  冷冻保存备用。按“2.1”项下方法对角膜样品进行处理, 取上清液进样测定, 记录峰面积, 代入回归方程计算角膜浸提液中的药物浓度 ( $c_{\text{角膜浸提液}}$ ), 按照公式计算角膜样品中的药物浓度 ( $c_{\text{角膜}}$ ),  $c_{\text{角膜}} = c_{\text{角膜浸提液}} \times (0.5 + m_{\text{角膜}}) / m_{\text{角膜}}$ 。结果 0.2% TH 滴眼液滴眼给药 480 min 后兔眼角膜中仍可测得 TH, 见表 5。

表 5 各时间点兔眼角膜中 TH 的质量浓度 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Tab 5 The concentration of TH in rabbit cornea at different time ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

时间, min	角膜中 TH 的质量浓度, $\mu\text{g/ml}$
15	1.536 $\pm$ 0.367 0
30	1.089 $\pm$ 0.299 0
60	0.556 $\pm$ 0.137 0
120	0.229 $\pm$ 0.053 5
240	0.135 $\pm$ 0.036 6
480	0.102 $\pm$ 0.043 3

## 3 讨论

TH 在眼部的研究和应用多集中于治疗真菌性角膜炎, 而角膜中 TH 的药动学研究涉及很少, 仅少量文献<sup>[7-8]</sup>进行过简单的报道。其他研究者多以房水中 TH 浓度来评价其眼部药动学<sup>[4-6]</sup>, 这显然不能全面反映 TH 在眼部的吸收情况。笔者在文献的基础上对角膜中样品的处理方法进行了改进, 采用简单的甲醇静置浸泡法处理样品, 无需进行超声和加热处理; 同时在样品管内充入氮气, 防止 TH 在处理过程中氧化。经验证, 只需 0.5 ml 甲醇冷藏 (2~8  $^{\circ}\text{C}$ ) 静置浸提 24 h 即可完全提取兔

眼角膜中的 TH, 最大限度地保证了浸提液中的药物浓度水平; 如果甲醇量过少则会导致无法完全浸没角膜组织。在氮气的保护下, 浸提液中的 TH 在 4 周内稳定, 完全可满足测定的要求。值得注意的是, 甲醇浸提液也无需进行再次的处理, 离心后上清液即可直接进样分析, 干扰少、测定效率高、重现性好。

本研究建立的测定兔眼角膜中 TH 浓度的醇浸提-HPLC 方法专属性强、准确度高, 充分保证了测定方法的灵敏度和重现性, 能够方便准确地测定兔眼角膜中的 TH 浓度, 可用于 TH 兔眼角膜的药动学研究。

## 参考文献

- [1] Nowosielski M, Hoffman M, Wyrwicz LS, *et al.* Detailed mechanism of squalene epoxidase inhibition by terbinafine[J]. *J Chem Info Model*, 2011, 51(2): 455.
- [2] 逢晓云, 贡沁燕. 抗真菌新药: 特比萘芬[J]. 中国新药与临床杂志, 2000, 19(7): 1.
- [3] Li L, Wang ZQ, Li R, *et al.* In vitro evaluation of combination antifungal activity against fusarium species isolated from ocular tissues of keratomycosis patients[J]. *American Journal of Ophthalmology*, 2008, 146(5): 724.
- [4] Clode A, Davis J, Davidson G, *et al.* Aqueous humor and plasma concentrations of a compounded 0.2% solution of terbinafine following topical ocular administration to normal equine eyes[J]. *Vet Ophthalmol*, 2011, 14(1): 41.
- [5] Tayel SA, El-Nabarawi MA, Tadros MI, *et al.* Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits[J]. *Int J Pharm*, 2013, 443(1/2): 293.
- [6] Tayel SA, El-Nabarawi MA, Tadros MI, *et al.* Positively charged polymeric nanoparticle reservoirs of terbinafine hydrochloride: preclinical implications for controlled drug delivery in the aqueous humor of rabbits[J]. *AAPS PharmSciTech*, 2013, 14(2): 782.
- [7] Sun XG, Wang ZX, Wang ZQ, *et al.* Pharmacokinetics of terbinafine in the rabbit ocular tissues after topical administration[J]. *Ophthalmic Res*, 2007, 39(2): 81.
- [8] 孙旭光, 王智群, 李然, 等. 抗真菌药特比萘芬对兔眼药代动力学的实验研究[J]. 眼科, 2002, 11(4): 235.

(收稿日期: 2014-09-25 修回日期: 2014-11-10)

(编辑: 邹丽娟)