

替硝唑果胶骨架型结肠定位缓释片在犬体内药动学研究

刘福强¹, 王艳萍¹, 赵楠¹, 王相阳³, 崔海珍² (1. 解放军第 208 医院, 吉林 长春 130062; 2. 延边大学药学院, 吉林 延吉 133000; 3. 天士力集团公司药物研究院, 天津 300142)

[摘要] 目的 研究替硝唑果胶骨架型结肠定位缓释片在犬体内药动学。方法 采用双周期交叉试验设计, 6 只健康 Beagle 犬分别服用受试制剂或参比制剂, 用 HPLC 法测定 Beagle 犬血浆中药物浓度。结果 受试、参比制剂在犬体内的血药浓度变化符合二室模型, 其主要药动学参数: T_{max} 分别为 (7.0 ± 0.92) 和 (2.0 ± 0.31) h; C_{max} 分别为 (66.97 ± 5.9) 和 (112.2 ± 7.4) μg/L; AUC_{0-t} 分别为 (1243.88 ± 25.67) 和 (1523.84 ± 27.89) mg·h/L; $AUC_{0-∞}$ 分别为 (1277.18 ± 30.58) 和 (1548.67 ± 20.89) mg·h/L, 受试制剂的相对生物利用度为 82.47%。结论 本法准确、灵敏, 适用于替硝唑果胶骨架型结肠定位缓释片的药动学研究。

[关键词] 替硝唑; 果胶; 骨架片; 结肠定位缓释片

[中图分类号] R945 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)05-0363-04

The pharmacokinetics study of tinidazole pectin matrices colon-specific sustained-release tablets in dogs

LIU Fu-qiang¹, WANG Yan-ping¹, ZHAO Nan¹, WANG Xiang-yang³, CUI Hai-zhen² (1. 208th Hospital of PLA, Changchun 130062, China; 2. School of pharmacy, Yanbian University, Yanji 133000, China; 3. Institute of Pharmaceutical Research, Tasi Group Tianjin 300142, China)

[Abstract] **Objective** To develop a method to study the pharmacokinetics of tinidazole pectin matrices colon-specific sustained-release tablets in dogs. **Methods** The plasma concentrations were determined by HPLC. Two period cross over self control trial was conducted to 6 Beagle dogs which were administered a single dose of the oral test tablets and reference tablets. **Results** The pharmacokinetics of two preparations fitted to two compartment model. The main pharmacokinetic parameters T_{max} were (7.0 ± 0.92) and (2.0 ± 0.31) h; C_{max} were (66.97 ± 5.9) and (112.2 ± 7.4) μg/L; AUC_{0-t} were (1243.88 ± 25.67) and (1523.84 ± 27.89) mg·h/L; $AUC_{0-∞}$ were (1277.18 ± 30.58) and (1548.67 ± 20.89) mg·h/L and test tablets showed a relative bioavailability of 82.47%. **Conclusion** The method was accurate and sensitive which was suitable for Tinidazole pectin matrices pharmacokinetics study.

[Key words] tinidazole pectin matrices tablets; colon-specific sustained-release tablets

替硝唑属硝基咪唑类化合物, 为抗滴虫和抗厌氧菌感染药物, 临床上主要用于治疗肠道内和肠道外阿米巴病及厌氧菌感染等, 常用剂型为口服和静注^[1]。本试验果胶骨架型结肠定位缓释片, 其制法, 取处方量辅料(果胶、HPMC和氯化钙)过 100 目筛与替硝唑混匀, 用氯化钙溶液做黏合剂, 湿法制粒, 60℃干燥压片。根据 pH 敏感机制在结肠释放, 可提高局部药物浓度, 并减轻在胃肠道上端吸收而引起的不良反应等。用高效液相色谱法测定替硝唑血药浓度, 研究健康 Beagle 犬体内替硝唑结肠定位缓释片给药后的药动学, 为今后临床合理用药提供依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-10AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); SPD-10AVP 紫外检测器(日本岛津公司); N2000 双通道色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所); CQX25-06 超声清洗器(上海必能信超声有限公司); XW-80A 涡旋混合器(上海医科大学仪器厂); TGL-16G 高速台式离心机(上海菲哈尔分析仪器有限公司)。

1.2 试药 替硝唑对照品(TNZ, 中国药品生物制品检定所, 批号: 100336-200402); 替硝唑原料药(TNZ, 印度 Arti Drugs Limited, 批号: TNZ1106070592); 甲硝唑对照品(中国生物制品检定所, 批号: 100336-200504); 替硝唑果胶骨架型结肠定位缓释片(实验室自制, 含量 0.50 g); 替硝唑片(东北制药集团公司沈阳第一制药厂, 批号: H21021712, 含量 0.50 g); 果胶(citrus pectin E40Q, 北京鼎国生物技术有限公司), 羟丙基甲基纤维素

[作者简介] 刘福强(1962), 男, 副主任药师。Tel: (0431) 86988148; E-mail: cclf@126.com.

(HPMC, RT5Q RT15上海卡乐康包衣有限公司)乙腈为色谱纯,水为重蒸水,其他试剂均为分析纯。

1.3 动物 Beagle犬 6只,雌雄各半,体质量(10±2) kg由沈阳药科大学动物实验中心提供,实验前进行血常规、生化和心电指标检测。

2 方法与结果^[2-4]

2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent Tc-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水(30:70 v/v); 流速: 0.8 ml/min; 柱温: 30℃; 检测波长: 310 nm; 进样量: 20 μl。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品贮备液 精密称取干燥至恒重的替硝唑对照品 50 mg置 100 ml棕色容量瓶中,加甲醇适量溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 500 μg/ml 的对照品贮备液。

2.2.2 内标贮备液 精密称取干燥至恒重的甲硝唑对照品 20 mg置 100 ml棕色容量瓶中,加甲醇适量溶解并稀释至刻度,摇匀,得浓度为 40 μg/ml 的内标贮备液。

2.3 血浆样品的处理 精密吸取血浆 0.2 ml至 1.5 ml离心管中,精密加入内标溶液 50 μl(40 μg/ml),甲醇 500 μl涡旋混合振荡 3 min,于 10 000 r/min离心 15 min,取上清液 20 μl进样,作 HPLC 分析。

2.4 方法专属性考察 空白血浆、替硝唑对照品、内标、犬服药后血浆样品、犬服药后的血浆样品+内标、空白血浆+替硝唑+内标,按“2.3”项下方法处理,记录色谱图。结果显示:替硝唑、内标色谱峰分离完全,保留时间分别为 7.665 min 和 5.615 min,血浆内源性物质及药物代谢物不干扰样品的测定,表明本法有较高的专属性。结果见图 1。

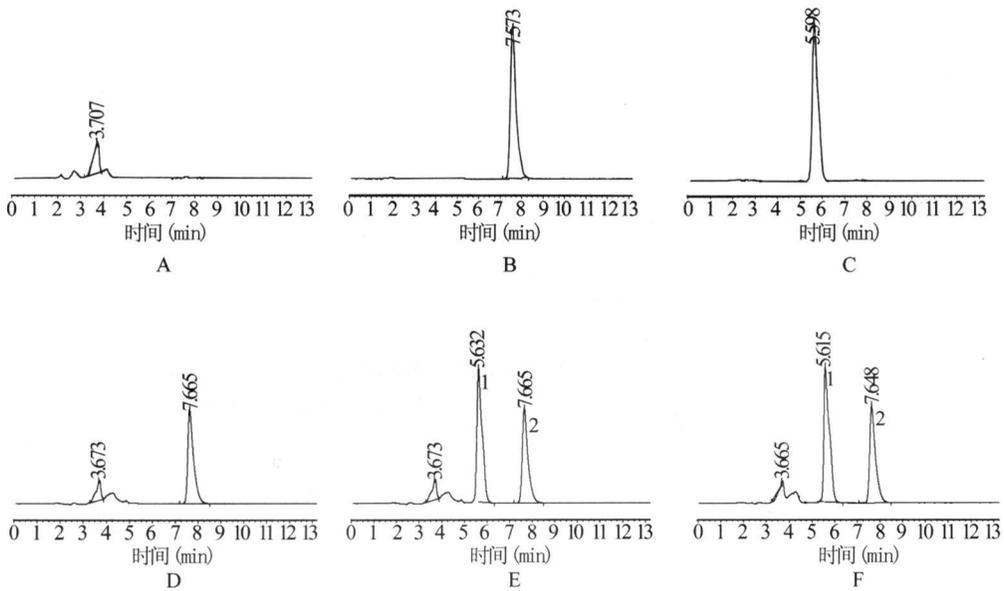


图 1 犬血浆中替硝唑(TNZ)的典型 HPLC 色谱图

A-犬空白血浆; B-替硝唑(TNZ)对照品; C-甲硝唑(内标)对照品;

D-犬灌服后的含药血浆样品; E-犬服药后的血浆样品+内标; F-空白血浆+内标+替硝唑

2.5 线性关系考察及最低定量限 精密量取对照品贮备液适量,加甲醇分别稀释制成含 0.5、1.0、5.0、12.5、25.0、50.0、125.0 μg/ml 的替硝唑血浆样品,按“2.3”项下方法操作。以替硝唑与内标峰面积比值(Y)对样品浓度(X)进行线性回归,得回归方程为: $Y = 0.0694X + 0.06087$ ($r = 0.9991$)。结果表明:血浆中替硝唑浓度在 0.05~125 μg/ml 范围内线性关系良好。以信噪比值(S/N) ≥ 3 确定的最低定量限为 0.035 μg/ml, $RSD = 3.5%$ ($n = 5$)。

2.6 精密度及方法回收率 配制 5.0、25.0

50.0 μg/ml 3 种浓度的替硝唑对照品溶液,按“2.3”项下方法操作,每一浓度平行操作 5 份,代入线性回归方程中计算浓度,以测得值与加入值的比例计算回收率。同时在日内及 3 日内重复 5 次测定其浓度,计算日内、日间精密度。结果见表 1。

2.7 提取回收率 将方法回收率实验中的低、中、高(5.25、50 μg/ml) 3 种浓度的血样按“2.3”项下方法处理和选择,将所得的峰面积与相应浓度替硝唑对照品溶液直接进样的峰面积相比,得提取回收率。结果,低、中、高浓度样品提取回收率分别为

92.85%、93.32%、94.68%，RSD 分别为 1.14%、1.44%、1.87%。

表 1 方法回收率及精密度

配制浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	回收率 (%)	RSD (%)	平均回收 率(%)	RSD%	
				日内 ($n=5$)	日间 ($n=5$)
5.0	98.99	2.41		2.37	2.23
25.0	98.35	2.13	98.76	1.91	2.37
50.0	98.93	2.31		2.76	1.07

2.8 样品稳定性考察 取空白血浆配制成替硝唑浓度为 5.0、25.0、50.0 $\mu\text{g/ml}$ 的样品,按“2.3”项下方法操作,分别在室温条件下 0、6、12、24、48、72 h,冻融条件下(反复冻融 3 次),进行 HPLC 测定,结果,样品浓度没有下降趋势,表明样品稳定性良好,低、中、高浓度的 RSD 值均 < 10%。

2.9 药动学研究 采用两制剂双周期自身交叉试验法,6 只健康 Beagle 犬,雌雄各半,随机分成两组,每组 3 只,试验前 14 d 未用任何药物,禁食 12 h 后,分别单剂量给予替硝唑结肠定位片 2 片(受试制剂,含替硝唑 1.0 g)和替硝唑普通片 2 片(参比制剂,含替硝唑 1.0 g),以 200 ml 温水送服,服药后 4 h 后统一进食,分别于给药前及给药后 0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、10、12、24、36、48、72 h 由前肢静脉取血 3 ml 置肝素化离心试管中,4 000 r/min 离心 15 min,分离血浆,置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中保存待测。两次给药间隔时间为一周,作为清洗期,一周后两组交换服用。

2.10 数据处理 本文采用 DAS2.0 软件(上海中医药大学研究所)进行处理,以 AIC 法判断所取房室模型,求出相关药动学参数,以普通片为参比制剂,计算结肠定位缓释片的相对生物利用度。

2.11 药动学参数 6 只 Beagle 犬随机交叉服用替硝唑果胶骨架型结肠定位缓释片受试制剂和参比制剂,分别测定其血药浓度,平均血药浓度-时间曲线见图 2,主要药动学参数见表 2。

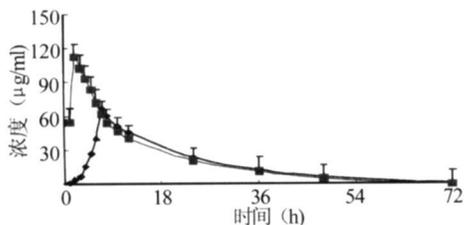


图 2 6 只健康 Beagle 犬单剂量口服替硝唑结肠定位缓释片受试制剂(T)和参比制剂(R)的平均血药浓度-时间曲线($\bar{x} \pm s, n=6$)

—●— 定位片; —■— 普通片

表 2 单剂量口服替硝唑结肠定位缓释片与普通片的药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=6$)

参数	定位片	普通片
A (mg/L)	282.325 \pm 55.64	81.519 \pm 21.56
K _a (h^{-1})	0.348 \pm 0.06	1.090 \pm 0.31
t _{1/2α} (h)	3.450 \pm 0.21	1.315 \pm 0.15
α (h^{-1})	0.201 \pm 0.05	0.527 \pm 0.1
t _{1/2β} (h)	15.679 \pm 2.10	7.373 \pm 0.96
β (h^{-1})	0.044 \pm 0.1	0.094 \pm 0.05
t _{1/2z} (h)	12.858 \pm 0.67	12.354 \pm 0.42
T _{m ax} (h)	7.000 \pm 0.92	2.000 \pm 0.31
CL _{LZ} /F (L/h)	0.783 \pm 0.20	0.646 \pm 0.16
C _{m ax} (mg/L)	66.970 \pm 5.90	112.250 \pm 7.48
MRT _{0-t} (h)	20.310 \pm 0.52	15.180 \pm 0.4
AUC _{0-t} ($\text{mg} \cdot \text{h/L}$)	1243.883 \pm 25.67	1523.840 \pm 27.89
AUC _{0-∞} ($\text{mg} \cdot \text{h/L}$)	1277.176 \pm 30.58	1548.670 \pm 20.89

3 讨论

3.1 本试验建立的高效液相色谱法测定血浆中替硝唑血药浓度,采用沉淀法处理血浆后直接进样,操作简便,结果可靠,精密度和回收率好,内源性物质对替硝唑的测定无干扰,检测灵敏度完全能满足实验的要求。本试验曾选用甲醇-0.03 mol/L 醋酸铵水溶液(25:75)、乙腈-水流动相系统,结果发现用乙腈-水(30:70)为流动相时,分离较好,保留时间适当(约为 7.67 min),操作方便。

3.2 本定位片达峰时间为 (7 \pm 0.92) h,参比片为 (2 \pm 0.31) h,定位片体外释放度试验,5 h 只释放 28%。说明定位片在胃及小肠释放很少,而在到达结肠后持续释放,从而达到局部治疗目的。

3.3 本定位片达峰浓度为 (66.97 \pm 5.90) mg/L,参比片为 (112.25 \pm 7.48) mg/L,生物利用度仅为 82.47%。此点与达峰时间长的结论综合判断,说明在结肠,定位片开始大量释放,但吸收甚少,药物多停留于局部。正符合文献所期望的,定位片在结肠段局部药物浓度提高的同时,体内吸收少,血药浓度低^[5];也符合结肠吸收药物较少或没有吸收的结论^[6];也和有关结肠靶向给药 X 闪烁照相在结肠所见(8 h 在结肠开始释药)相一致^[7]。这些都说明本定位片达到局部释药的目的。

【参考文献】

- [1] 高淑香,田欣,刘纪玲.替硝唑的药理及临床应用[J].山东医药工业,2000,17(2):36.
- [2] 封宇飞,游扬,殷琦,等.替硝唑结肠定位肠溶片的人体药动学研究[J].中国新药杂志,2004,13(4):345.
- [3] 邱萍英,温颖关.HPLC法测定人血浆中替硝唑的浓度[J].海峡药学,2006,18(3):186.
- [4] 顾宜,蒋永培,赵德化.替硝唑和甲硝唑的人体药动学对比研究[J].中国药学杂志,2000,35(5):323.

溶解度增加,改进的配制法选择较高浓度的苯甲酸钠使哌喃西林充分溶解并形成稳定的溶液,使溶液充分混匀再加入氯化钠溶液中,可使药物溶解充分而不易析出沉淀。另外,不加苯甲酸钠的

该溶液的澄明度和有效期明显降低。可见,苯甲酸钠对本制剂的稳定性有显著影响。而氯化钠对溶液稳定性无影响,加入主要目的是调节本制剂的渗透压。

表 4 处方中不添加苯甲酸钠或氯化钠对哌喃西林溶液含量的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

批号	放置时间(月)				
	放置前	1	2	3	4
无苯甲酸钠					
091026	101.1±0.38	98.9±0.60	95.1±0.90	91.1±0.80	82.7±0.38
091102	100.6±0.70	98.2±0.21	94.3±0.35	90.1±0.61	81.5±0.55
091104	100.0±0.12	96.0±0.44	93.8±0.40	90.1±0.17	80.6±0.31
无氯化钠					
091028	100.9±0.61	99.4±0.46	96.6±0.67	94.8±0.60	91.0±0.55
091103	100.7±0.44	99.8±0.10	96.7±0.31	94.4±0.64	90.8±0.67
091105	100.7±0.46	99.7±0.17	96.6±0.74	94.3±0.70	90.7±0.53

哌喃西林溶液产生结晶与微粒或晶粒有直接关系^[2-6]。微孔滤膜可以过滤溶液中微量或肉眼看不见的晶核(构晶离子),从而减少了这些构晶离子作为晶核可能诱导哌喃西林溶液析出沉淀的机会。改进法中,洁消精处理后的输液瓶经过三道自来水和四道蒸馏水冲洗后,哌喃西林溶液经大输液生产终端微孔滤膜过滤后灌封。这样,不仅提高了生产效率,减少了污染机会,还提高了哌喃西林溶液的稳定性。

哌喃西林溶液临床常用于局部创伤和腔道冲洗,为确保药品质量,在实际配制工艺上宜采用灭菌制剂工艺,将哌喃西林溶液经 100℃流通蒸汽 30 min 灭菌,杀灭细菌增殖体和芽孢,防止霉菌生长^[7]。哌喃西林对光和热不稳定,受热时间长可使哌喃西林溶液的颜色变深,所以灭菌后及时冷却,尽可能减少溶液的受热时间,以提高溶液的稳定性。而且,在灭菌过程中,哌喃西林易分解致使浓度有所下降,在配制时应考虑哌喃西林原料的追加量。

有研究改进了哌喃西林溶液的配制方法,制得的哌喃西林溶液遮光放置 6 个月各项指标均符合有关规定^[8-9]。笔者亦尝试了其配制方法,遮光放置 3 个月结晶析出明显,含量不在合格范围,这可能与高原高寒和紫外线强烈等气候因素有关。而笔者改进

方法后配制的哌喃西林溶液稳定性较好,遮光放置 4 个月各项指标均符合有关规定。

可见,改进后配制的哌喃西林溶液稳定性较好,室温 8~16℃遮光密闭贮存条件下,有效期可暂定为 4 个月。

【参考文献】

- [1] 中国医院制剂规范·西药制剂[S]. 1995 19
- [2] 李志毅,詹先成,李琳丽,等. 光和热对哌喃西林水溶液稳定性的影响[J]. 药学学报, 2002, 37(2): 148.
- [3] 中国药典 2005 年版二部[S]. 2005 867.
- [4] 盛国荣. 苯甲酸钠对哌喃西林的助溶作用[J]. 中国医院药学杂志, 1997, 17(6): 264.
- [5] 郭随章. 增加哌喃西林溶解度方法的研究[J]. 西北药学杂志, 1999, 14(2): 67.
- [6] 许强,徐雪荣,陈辉. 澄明度对哌喃西林溶液稳定性的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(8): 756
- [7] 陆小燕,李庆欣,赵勤,等. 哌喃西林溶液的无菌检查方法验证[J]. 抗感染药学, 2009, 6(1): 29
- [8] 江建兵. 哌喃西林溶液处方和制备方法的改进及稳定性观察[J]. 实用药物与临床, 2008, 11(5): 319
- [9] 高黎黎,高玉松,魏贺梅,等. 哌喃西林溶液的制备及稳定性考察[J]. 实用药物与临床, 2009, 12(4): 259.

[收稿日期] 2010-05-20

[修回日期] 2010-06-12

(上接第 365 页)

- [5] 王建明,刘欣. 丁香提取物结肠定位包衣片在家兔体内的药物动力学研究[J]. 中医药信息, 2009, 26(5): 38.
- [6] 沈熊. 5-氟尿嘧啶口服结肠定位释药系统[D]. 上海: 复旦大学, 2004.

- [7] 程刚,肖云彩,吴寿荣,等. 新型茶碱口服结肠靶向给药系统的体内动力学[J]. 沈阳药科大学学报, 2003, 20(1): 3.

[收稿日期] 2010-04-26

[修回日期] 2010-06-18