

酮康唑微囊在兔体内的药动学研究

Pharmacokinetics of oral ketoconazole microcapsule in rabbits

任志红, 孟 慧 (解放军第 85 医院药剂科, 上海 200052)

[摘要] **目的:** 研究酮康唑微囊在兔体内的药动学特征。**方法:** 以复凝聚法制备酮康唑微囊, 采用紫外分光光度法直接测定微囊中酮康唑含量。采用 HPLC 法测定兔血浆中酮康唑浓度, 其条件为: 以乙腈直接沉淀血浆蛋白, 色谱柱为配有 Waters 保护柱的 sunfire C18(150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为甲醇: 磷酸盐缓冲液(80:20), 流速 1.0 ml·min⁻¹; 检测波长 235 nm; 进样 20 μl; 柱温(35±1)°C; 外标法峰面积定量。**结果:** 血浆中酮康唑浓度分别在 20~400 ng·ml⁻¹ 和 400~4 000 ng·ml⁻¹ 范围内, 浓度与峰面积之间有良好的线性关系, 线性相关系数 r^2 分别为 0.998 4 和 0.999 7; 口服酮康唑微囊后, 24 h 内血浆中酮康唑浓度平稳, 酮康唑微囊的药动学特征符合一室模型, 主要药动学参数分别为: $t_{1/2}$ (4.62±0.05)h; t_{max} (2.0±1.03)h; c_{max} (2 154.52±43.07)ng·ml⁻¹; Ke (0.15±0)h⁻¹; $AUC_{0-∞}$ (16 075.38±98.50)ng·h·ml⁻¹。**结论:** 酮康唑微囊化后, 较之普通片及其原料药血药浓度更高, 作用时间更长, 生物利用度有显著提高。

[关键词] 酮康唑; 微囊; 药动学**[中图分类号]** R 969.1 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)07-0796-03

酮康唑(ketoconazole, KCZ)是咪唑类广谱抗真菌药, 对局部和全身真菌感染具有良好的治疗作用。实验已经证实, 采用复凝聚法制备 KCZ 微囊是可行的, 且质量控制方法简单, 可靠^[1]。KCZ 微囊体外抗真菌作用良好^[2], 与氟康唑片剂相当。本实验建立了 HPLC 检测兔血浆中 KCZ 含量的方法, 并探讨了 KCZ 微囊口服在兔体内的药动学过程。

1 仪器和试剂

1.1 试剂 酮康唑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 0294-9801), 酮康唑原料药(南京第二制药厂, 批号 000603), 胰蛋白酶(吉泰科技有限公司进口分装, 活性比例 1:250), 明胶、阿拉伯胶、0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液、37% 甲醛溶液等均符合药用标准; 酮康唑微囊(自制, 批号 041223), 酮康唑片剂(商品名: 里素劳, 西安杨森制药, 批号 011108990), 甲醇为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 UV-2201 紫外分光光度计(日本岛津), PHS-3C 精密酸度计(厦门第二分析仪器厂), GS12 型电子恒温搅拌器(上海医械专机厂), 分析天平(湖南湘仪天平仪器厂), Olympus-BX50 显微镜。WATERS2695-2696 高效液相色谱仪(美国 WATERS 公司), TG328B 分析天平(中国湖南湘仪厂), 电子恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.3 动物 家兔, 雌雄各半, 体质量(2.0±0.5) kg, 第二军医大学实验动物中心。

2 方法和结果

2.1 KCZ 微囊的制备 明胶、阿拉伯胶分别用适量蒸馏水溶胀 5 h, 制成溶胶; 在阿拉伯胶溶胶中加入处方量的酮康唑粉末混合研匀, 制成阿拉伯胶酮康唑混悬液, 其粒径为(2.97±0.18) μm, $n=280$ 。55°C 水浴条件下, 将明胶溶胶与阿拉伯胶混悬液混匀, 滴加 0.1 mol 盐酸溶液, 边加边搅拌, pH 调至 4.1~4.2, 显微镜下观察成囊情况, 加入 30°C 蒸馏

水(成囊体系体积的 2 倍), 搅拌至室温。冰水浴条件下加入适量 37% 甲醛溶液使其固化, 匀速搅拌 1 h, 滴加 20% 氢氧化钠溶液, 调 pH 至 8.0~9.0。静置分层, 弃去上清液, 抽滤、低温干燥, 即得。

2.2 KCZ 微囊的质量控制

2.2.1 性状 KCZ 微囊为白色或类白色粉末, 在显微镜下观察到的微囊形态为圆形和椭圆形。

2.2.2 粒径 在显微镜下测量酮康唑微囊的外切径, 转换不同的视野, 共观测计数 600 个微囊的粒径, 按公式 $D_v = (\sum n dt^3 / \sum n)^{1/3}$ (式中 n = 个数, dt = 体积径, 取每组段中值, <4 μm 组段取 4 μm) 计算得到制备的微囊平均体积径 $D_v = (6.82 \pm 2.41) \mu m$ 。

2.2.3 包封率 精密称取经低温干燥的酮康唑微囊约 0.2 g, 用 1.0% 的胰蛋白酶溶液 3.0 ml, 加蒸馏水 3.0 ml 进行消化。将盛有样品的培养皿置于 37°C 的恒温培养箱中 24 h, 以 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸做为溶媒, 在 50 ml 容量瓶中溶解、定容、滤过。取滤液作为供试品溶液, 精密量取 1 ml, 以 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸稀释至 10 ml。在 269 nm 波长处测定其光密度 D 值, 代入标准曲线回归方程 $D = 3.176 2 c_1 + 0.112 0$ ($r^2 = 0.999 8, n=7$, 线性范围 0.05~0.15 mg·ml⁻¹), 得浓度 c_1 , 按式 $c = [(c_1 \times 10 \times 50 / V) / M] \times 100\%$ 即得百分含量(式中 M 为称取微囊的质量, V 为所取溶液体积)。精密称取所得酮康唑微囊的质量, 然后从中精密称取约 0.5 g, 消化后进行含量测定, 按式 $S = c \times L / M_1 \times M$ (式中 c 为测得的浓度, L 为溶液体积, M_1 为称取微囊的质量, M 为该批微囊干燥后的总质量) 计算得平均相对包封率为(42.58±1.22)% ($n=6$)。

2.3 HPLC 检测兔血浆中 KCZ

2.3.1 色谱条件 Waters sunfire C18 色谱柱(150 mm×

4.6 mm, 5 μm), 柱温(35 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$; 流动相为甲醇: 磷酸盐缓冲液(pH 4.0)(80:20), 流速为 1.0 ml/min; 检测波长为 235 nm; 进样量 20 μl 。

2.3.2 血浆样品的处理 取血浆样品 1 ml 于一具塞试管中, 先加入乙腈 1 ml, 旋涡混合 30 s, 离心后再加入乙腈 1 ml, 旋涡混合 30 s 后离心(3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min), 上清液转入另一洁净试管中, 于 55 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中, 氮气流吹干, 加入流动相 1.0 ml 溶解, 取 20 μl 进样, 记录峰面积。

2.3.3 特异性 标准品、空白血浆样品及用药后血浆的色谱图见图 1。在检测范围内无干扰物质, 本方法具有良好的特异性。

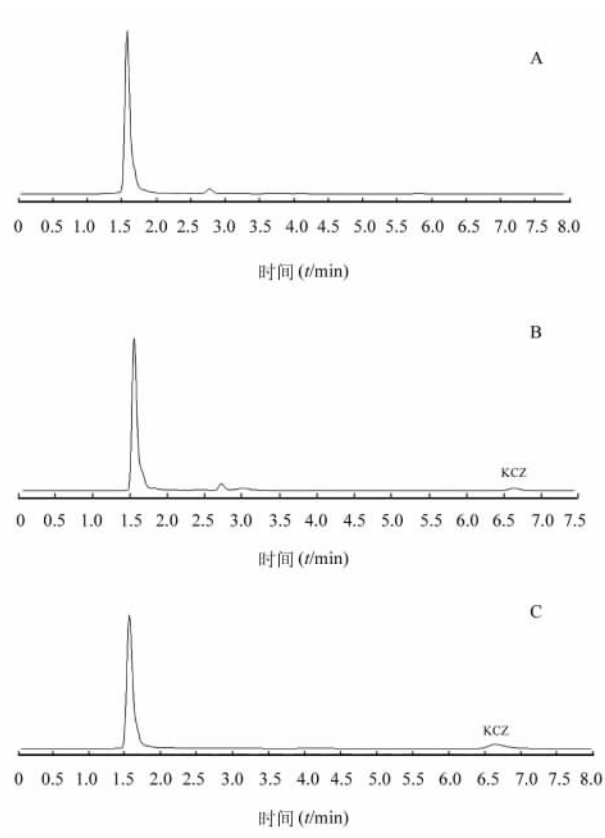


图 1 KCZ 在兔血浆中的色谱图

A: 空白血浆色谱图; B: 最低定量限(0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ KCZ); C: 02 号家兔口服 KCZ 微囊后 4 h

2.3.4 最低定量限 按信噪比 $S/n=3$ 计算, 本方法的最低定量限为 20 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.3.5 精密度和准确度 在空白兔血浆中加入不同量的 KCZ 配制成低、中、高(40, 600, 2 000 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) 不同浓度的标准血样, 按 2.3.2 项方法操作, 每一浓度制备并测定 5 个样品, 按上述分别测定日内、日间变异, 得到 $\text{RSD} < 10\%$ 。

2.3.6 标准曲线的绘制 取空白兔血浆 1 ml 共 10 份, 分别加入 KCZ 配制成 20, 40, 100, 200, 400, 600, 800, 1 000, 2 000 及 4 000 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的系列溶液, 按 2.3.2 方法进行测定, 记录峰面积 S , 然后以 S 对 KCZ 浓度 c 进行回归计算得标准曲线方程, 低浓度段(20~400 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) 为 $c=0.000\ 547\ 2S-0.015\ 27$ ($n=5, r^2=0.998\ 4$), 此为 $S < 8\ 000$ 时的工作曲线; 高浓度段(400~4 000 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) 为 $c=0.000\ 609\ 3S-0.066\ 83$ ($n=5, r^2=0.999\ 7$), 此为 $S > 8\ 000$ 时的工作曲线。可见 KCZ 在浓度 20~4 000 $\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 范围内线性良好。

2.3.7 兔体内 KCZ 血药浓度的测定^[3,4] 取家兔 15 只, 随机分为 3 组, 禁食 24 h 后, 一组口服自制的 KCZ 微囊 1.0 g (含 KCZ 100 mg), 一组口服市售的里素劳片粉 400 mg (含 KCZ 100 mg), 另一组口服 KCZ 原料药 100 mg, 分别于给药后 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 12, 24 h 抽取耳缘静脉血 1 ml, 于抗凝试管中, 按照 2.3.2 方法测定 KCZ 血药浓度, 结果见图 2。

数据经 DAS 软件计算, 3 种样品的结果均以一室模型为宜, 其药动学参数见表 1。经统计学检验, KCZ 微囊的 c_{max} 、 $t_{1/2}$ 、 K_e 及药时曲线下面积 AUC 与其他两个样品有显著性差异($P < 0.05$)。

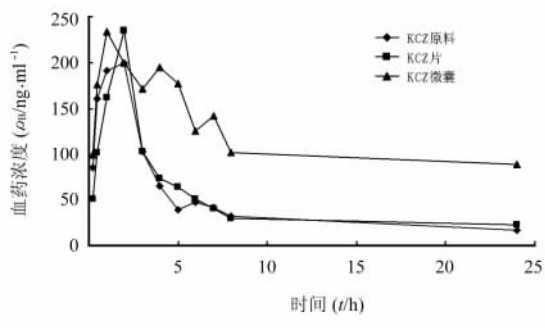


图 2 兔口服 KCZ 微囊、KCZ 片及 KCZ 原料药后血药浓度-时间曲线

$n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

以明胶、阿拉伯胶为囊材, 复凝聚法制备微囊, 是将药物微囊化的经典方法之一。将药物微囊化后, 具有掩盖药物的不良气味和口味、提高药物的稳定性、防止药物在胃内失活或减少对胃的刺激性、使液态药物固化便于贮存、减少复方药物的配伍变化、缓释或控释药物、使药物集中于靶区以及对生物活性物质进行包裹使用等特点, 是近年来受到广泛关注的制剂方法之一。本实验采用复凝聚法制备酮康唑微囊, 方法简单, 产品粒径均匀, 包封率较高。酮康唑微囊的含量测定实验表明, 用单波长紫外分光光度法测定其含量, 囊材及辅料基本无干扰, 方法简便, 数据准确, 重复性好。实验中发现, 成囊率和囊径的大小与水浴的温度和滴加盐酸时搅拌的速度有密切的关系, 在一定范围内前者与后者成反比。

本实验首次进行了 KCZ 微囊在兔体内的药动学研究。结果表明, 采用 HPLC 法测定血浆中 KCZ 的浓度方法简便, 检测灵敏度高, 药物与血浆中杂质具有较好的分离度, 能满足体内低浓度药物研究及药动学的需要。

在处理样品过程中, 乙腈分 2 次加入用以沉淀蛋白, 可避免样品的损失, 提高回收率, 而在 55 $^{\circ}\text{C}$ 水温中用氮气流吹干所需时间短, 有利于 KCZ 的稳定。

表 1 3种酮康唑制剂的药动学参数

(n=5, $\bar{x} \pm s$)

参数	微囊剂	片剂	原料药
t_{\max} (t/h)	2.0 \pm 1.03	2.0 \pm 1.52	0.5 \pm 0.67
c_{\max} ($\rho_B/\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	2154.52 \pm 43.07*	1 168.94 \pm 39.75	1 567.58 \pm 50.85
$t_{1/2}$ (t/h)	4.62 \pm 0.05*	2.52 \pm 0.34	2.28 \pm 0.04
Ke (h^{-1})	0.15 \pm 0.01*	0.28 \pm 0.04	0.30 \pm 0.01
$AUC_{0 \sim \tau}$ ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$)	15 585.35 \pm 113.72*	3 470.61 \pm 237.21	4 769.93 \pm 160.25
$AUC_{0 \sim \infty}$ ($\text{ng} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$)	16 075.38 \pm 98.50*	3 477.60 \pm 243.35	4 773.21 \pm 160.78

* $P < 0.05$ 与片剂和原料药比较

从 KCZ 微囊与其原料和片剂的口服给药后血药浓度-时间曲线可以看出,微囊较之于其他两种制剂血药浓度更高,药物利用度也较高,且能在兔体内保持更长时间的有效血药浓度,达到了延长作用时间的要求。

从 3 种制剂的药动学参数可以看出,健康兔口服 KCZ 微囊后, t_{\max} 与片剂相等,而 c_{\max} 、 $t_{1/2}$ 和 AUC 均明显增加 ($P < 0.05$),而 Ke 降低,说明该药进入兔体内后分布快,但消除较慢,在体内表现出一种较明显的缓释效果,可为临床用药提供依据,达到研制 KCZ 微囊的目的。

[参考文献]

[1] 尚北城,徐贵丽,张青,等. 酮康唑微囊的制备与含量测定

[J]. 广东药学院学报,2001,17:276-278.

[2] 尚北城,迟翠华,赵辉,等. 酮康唑微囊对部分真菌的抑菌实验[J]. 华西药理学杂志,2003,18:417-420.

[3] 陈绳林,张川,刘琦,等. 酮康唑及其栓剂在羊体内的药代动力学研究[J]. 第二军医大学学报,1998,19:367-371.

[4] 廖娟,杜青,张英. 吡啶美辛生物黏附微囊药物动力学及体内外相关性研究[J]. 河北医科大学学报,2005,26:33-35.

[收稿日期] 2005-12-24

[修回日期] 2006-03-17

[本文编辑] 尹茶