

阿苯达唑纳米微粉在大鼠体内的药动学研究^Δ

马运芳*, 王建华, 陈 迹#, 任洁如(新疆医科大学第一附属医院药学部, 乌鲁木齐 830011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4797-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.14

摘要 目的:研究阿苯达唑(ABZ)纳米化后在大鼠体内的药动学变化,为ABZ纳米制剂的进一步研发奠定基础。方法:将16只大鼠随机分为ABZ原料药组(ABZ原料药混悬液)与ABZ纳米微粉组(ABZ纳米微粉混悬液),每组8只,ig给药,剂量为63 mg/kg。各组大鼠于给药0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72 h后眼眶采血0.2~0.3 ml,以甲苯咪唑为内标,采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定各时间点药物血药浓度,并采用3p97药动学软件拟合药动学参数。结果:ABZ原料及纳米微粉在大鼠体内的药动学符合二室模型,ABZ原料药组、ABZ纳米微粉组大鼠的 c_{max} 分别为(3.20±1.41)、(6.11±0.74) μg/ml, t_{max} 分别为(3.42±0.91)、(3.15±0.27) h, $t_{1/2}$ 分别为(7.53±1.20)、(6.26±0.85) h, $AUC_{0-72 h}$ 分别为(49.90±15.50)、(78.36±8.78) μg·h/ml, $AUC_{0-∞}$ 分别为(52.30±10.10)、(80.27±8.26) μg·h/ml。与ABZ原料药组比较,ABZ纳米微粉组大鼠的 c_{max} 、 $AUC_{0-72 h}$ 、 $AUC_{0-∞}$ 均显著升高($P<0.05$)。结论:ABZ纳米化后在一定程度上提高了药物的吸收速率,增加了药物的吸收,提高了ABZ的口服生物利用度。

关键词 阿苯达唑;纳米微粉;药动学;大鼠

Pharmacokinetics Study of Albendazole Nano-powder in Rats

MA Yunfang, WANG Jianhua, CHEN Ji, REN Jieru (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the pharmacokinetic change of albendazole (ABZ) in rats after nanocrystallization, and to lay a foundation for further study of ABZ nano-preparation. METHODS: 16 rats were randomly divided into ABZ raw material (ABZ suspension) group and ABZ nano-powder (ABZ nano-powder suspension) group, with 8 rats in each group. They were given relevant medicine 63 mg/kg intragastrically. 0.2-0.3 ml blood samples were collected from orbital cavity 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 h after medication, respectively. Using mebendazole as internal standard, blood concentration of ABZ were determined by RP-HPLC, and pharmacokinetics parameters were calculated by using 3p97 software. RESULTS: The pharmacokinetics of ABZ raw material and ABZ nano-powder in rats were in line with two-compartment model. The main pharmacokinetic parameters of ABZ raw material group vs. ABZ nano-powder group were as follows as c_{max} (3.20±1.41) μg/ml vs. (6.11±0.74) μg/ml; t_{max} (3.42±0.91) h vs. (3.15±0.27) h; $AUC_{0-72 h}$ (49.90±15.50) μg·h/ml vs. (78.36±8.78) μg·h/ml; $AUC_{0-∞}$ (52.30±10.10) μg·h/ml vs. (80.27±8.26) μg·h/ml. Compared with ABZ raw material group, c_{max} , $AUC_{0-72 h}$ and $AUC_{0-∞}$ of ABZ nano-powder group were increased significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: The nanocrystallization of ABZ can enhance the absorbability rate and improve the absorption of drugs to some extent, and it also improves oral bioavailability of ABZ.

KEYWORDS Albendazole; Nano-powder; Pharmacokinetics; Rats

阿苯达唑(ABZ)为世界卫生组织(WHO)推荐的抗棘球蚴病(又称包虫病)的首选药^[1],难溶于水和多数有机溶剂^[2],生物利用度低^[3],这在一定程度上限制了ABZ抗包虫病的药效。针对ABZ的难溶性质,笔者前期采用纳米技术制得了ABZ纳米微粉^[4],使其溶解度显著提高,较ABZ原料药有更广阔的应用前景。但相关研究同时显示,当颗粒的大小进入纳米量级,其理化性质可能发生较大甚至根本性的改变^[5]。这些理化性质

的改变使得纳米药物呈现出与原料药及常规制剂不同的生物药剂学和药动学特点^[6]。纳米药物晶型的变化、分散团聚性能的改变、溶解度的增减都可能影响纳米药物在体内的药效学和药动学过程^[7]。基于此,笔者考察了ABZ原料药与ABZ纳米制剂在大鼠体内的药动学参数,为ABZ纳米制剂的进一步研发应用奠定基础。

1 材料

[10] Keembiyehetty C, Augustin R, Carayannopoulos MO, et al. Mouse glucose transporter 9 splice variants are expressed in adult liver and kidney and are up-regulated in diabetes[J]. *Mol Endocrinol*, 2006, 20(3):686.

[11] Anzai N, Kanai Y, Endou H, et al. New insights into re-

nal transport of urate[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2007, 19(2):151.

[12] Habu Y, Yano I, Takeuchi A, et al. Decreased activity of basolateral organic ion transports in hyperuricemic rat kidney: roles of organic ion transporters, rOAT1, rOAT3 and rOCT2[J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(6):1 107.

[13] 费曜,罗华丽,刘凡. 栀子对四氧嘧啶糖尿病小鼠糖代谢及肾功能的影响[J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(1):42.

(收稿日期:2016-06-13 修回日期:2016-09-18)

(编辑:刘明伟)

Δ 基金项目:新疆包虫病重点实验室项目(No.XJDX0202-2013-5)

* 主管药师,硕士。研究方向:药物新制剂与新剂型。电话:0991-4361602。E-mail:yunfang0816@163.com

通信作者:主任药师,硕士。研究方向:临床药理学、药物新剂型与新制剂。电话:0991-4361602。E-mail:chenji700318@163.com

1.1 仪器

LC-20AD 高效液相色谱(HPLC)仪,包括 LC Solution 色谱数据工作站、SPD-20A 紫外检测器(日本岛津公司);FD5-6P 冷冻干燥机(美国 SIM 公司);FJY 1002-UVF 基因研究型超纯水机(青岛富勒姆科技有限公司);ZEN3690 激光粒度分布仪(英国马尔文公司)

1.2 试剂

ABZ 原料药(广西桂林南药股份有限公司,批号:M-060605,纯度: $>99\%$);ABZ 纳米微粉(由新疆医科大学第一附属医院临床药理教研室自制);ABZ 对照品(批号:081M1540V)、阿苯达唑砒($ABZSO_2$)对照品(批号:SZBB229XV)均购自美国 Sigma 公司;阿苯达唑砒亚砒($ABZSO$)对照品(批号:5-ABY-166-1)、甲苯咪唑(MBZ)对照品(批号:4-XJZ-40-1)均购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司;阿苯达唑氨基砒($ABZSO_2-NH_2$)对照品(美国 Santa Cruz 公司,批号:sc-207278,纯度: $\geq 98\%$);甲醇、乙腈均为色谱纯;水为超纯水。

1.3 动物

Wistar 大鼠 16 只,♂ ♀ 各半,体质量(220 ± 20) g,来自新疆医科大学实验动物中心[许可证号:SCXK(新)2011-0004]。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)-pH 6.0 的磷酸盐溶液(B),梯度洗脱(程序见表 1);流速:1.2 ml/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;检测波长:295 nm;进样量:20 μ l。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0~12.3	10.0	90.0
12.4~14.0	50.1	49.9
14.1~15.0	66.9	33.1
15.1~30.0	60.0	40.0
30.1~35.0	71.0	29.0
35.1~40.0	10.0	90.0

2.2 血浆样品的处理

取大鼠血浆 300 μ l 至 10 ml 离心管中,依次加入质量浓度为 20.0 μ g/ml 内标 MBZ 溶液 15 μ l, pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液 1.5 ml 与乙酸乙酯溶液 2.4 ml, 涡旋振荡 2 min, 离心(离心半径为 10 cm, 10 000 r/min, 下同)10 min;于沉淀中再次加入 2.0 ml 乙酸乙酯溶液,离心 10 min 后取上清液,合并 2 次上清液;于 50 $^{\circ}$ C 水浴下用氮气吹干,残渣用甲醇复溶,复溶液离心 10 min 后取上清液进样测定。

2.3 溶液的配制

2.3.1 混合对照品贮备液的制备 精密称取干燥至恒质量的 ABZ、ABZSO、ABZSO₂、ABZSO₂-NH₂ 对照品各约 2.0 mg, 加甲醇溶解、定容至 10 ml 量瓶中,制成质量浓度为 200 μ g/ml 的混合对照品贮备液,4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

2.3.2 内标贮备液的制备 精密称取干燥至恒质量的 MBZ 对照品 2.0 mg, 加甲醇溶解、定容至 10 ml 量瓶中,制成质量浓度为 200 μ g/ml 的溶液,再以甲醇稀释至 20 μ g/ml 作为内标贮备液,4 $^{\circ}$ C 保存,备用。

2.4 专属性考察

按“2.2”项下方法处理大鼠加药血浆、空白血浆和空白血浆+对照品,按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,理论板数以 ABZ、ABZSO、ABZSO₂、MBZ 计均大于 19 000,分离度均大于 1.5,色谱图见图 1。

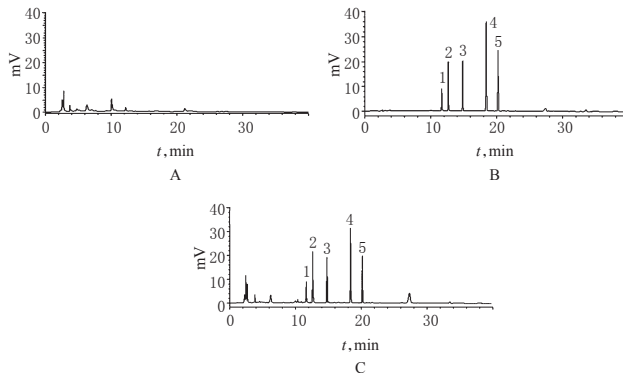


图 1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+对照品; C. 加药血浆; 1. ABZSO₂-NH₂; 2. ABZSO; 3. ABZSO₂; 4. MBZ; 5. ABZ

Fig 1 HPLC chromatogram

A. blank plasma; B. blank plasma+substance control; C. sample plasma; 1. ABZSO₂-NH₂; 2. ABZSO; 3. ABZSO₂; 4. MBZ; 5. ABZ

2.5 线性关系考察

取空白血浆 300 μ l, 分别精密加入不同体积的混合对照品贮备液, 配成质量浓度分别为 0.039、0.078、0.156、0.312、0.625、1.25、2.5、5、10、20 μ g/ml 的标准血浆样品, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。以对照品质量浓度(x , μ g/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归。结果, ABZSO、ABZSO₂、ABZ 的回归方程分别为 $y=0.076 6x+0.033 9$ ($r=0.999 6$)、 $y=0.062 4x+0.021 0$ ($r=0.999 7$)、 $y=0.058 1x+0.053 2$ ($r=0.999 7$)。ABZ、ABZSO、ABZSO₂ 质量浓度在 0.078~20 μ g/ml 范围内, 峰面积比与浓度线性关系良好。

2.6 检测限与定量下限

按 2015 年版《中国药典》(二部)^[3]中关于检测限与定量下限的要求, 分别将 ABZSO、ABZSO₂、ABZ 自标准曲线低浓度 0.078 μ g/ml 向下逐级稀释, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, ABZSO、ABZSO₂、ABZ 的检测限(信噪比为 3)依次为 5、10、2 μ g/ml, 定量下限(信噪比为 10)依次为 15、30、10 μ g/ml。

2.7 精密度试验

按“2.2”项下方法处理样品, 制备低、中、高(低浓度选取定量下限 2 倍以内, 高浓度在检测限 80% 以内, 中浓度为二者中间浓度)3 种质量浓度的质控样品各 5 份, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 结果表明仪器精密度良好, 详见表 2。

表 2 阿苯达唑及其代谢物的精密度及提取回收率试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Results of precision and recovery tests of ABZ and its metabolites ($\bar{x} \pm s, n=5$)

对照品	质量浓度, μ g/ml	日内精密度 RSD, %	日间精密度 RSD, %	提取回收率, %	RSD, %
ABZSO	0.080	6.35	9.85	91.11 \pm 6.80	7.46
	1.280	5.19	7.88	88.67 \pm 4.85	5.47
	10.200	4.42	6.93	87.70 \pm 2.89	3.30
ABZSO ₂	0.080	6.59	12.74	90.65 \pm 7.54	8.32
	1.300	5.56	6.09	87.40 \pm 3.49	3.99
	10.300	4.33	5.61	86.58 \pm 2.26	2.61
ABZ	0.081	7.88	10.07	88.91 \pm 7.38	8.30
	1.310	6.83	7.31	88.08 \pm 3.46	3.93
	10.300	2.50	3.23	86.32 \pm 2.11	2.44

2.8 提取回收率

取大鼠空白血浆, 直接加入低、中、高 3 种质量浓度的 ABZSO、ABZSO₂、ABZ 对照品溶液, 按“2.2”项下操作, 处理后按“2.1”项下色谱条件进样测定, 计算提取回收率, 结果见表 2。

2.9 药动学研究

2.9.1 分组、给药与采血 将16只Wistar大鼠按体质量随机分为ABZ原料药组与ABZ纳米微粉组,每组8只。给药时称取ABZ原料与纳米微粉各13.00 mg,分别加生理盐水溶解并定容至10 ml,配制成混悬液。依据《药理学试验方法与技术》,依照ABZ人临床的给药剂量换算后的大鼠给药剂量63 mg/kg,ig给药。各组大鼠于给药后0.5、1、2、4、8、12、24、36、48、72 h于眼眶采血0.2~0.3 ml,按“2.2”项下方法处理,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。

2.9.2 两组大鼠药-时曲线与药动学参数 两组大鼠药-时曲线见图2。结果表明,两组大鼠药动学均符合二室模型。

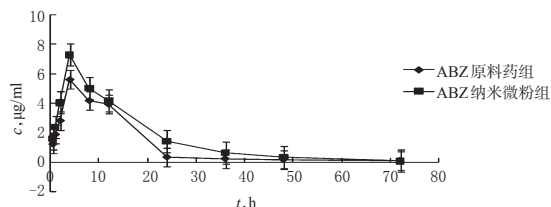


图2 两组大鼠药-时曲线($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig 2 Blood concentration-time curves of ABZ in rats of 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

采用3p97药动学软件对所得数据进行分析,选用PEMS Ver 2.1统计软件进行统计学检验。主要药动学参数测定结果见表3。

表3 两组大鼠主要药动学参数测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 3 Results of pharmacokinetic parameters of ABZ in rats of 2 groups ($\bar{x} \pm s, n=8$)

参数	ABZ原料药组	ABZ纳米微粉组
K_e, h^{-1}	0.32 ± 0.09	$0.58 \pm 0.0^*$
$AUC_{0-72h}, \mu g \cdot h/ml$	49.90 ± 15.50	$78.36 \pm 8.78^*$
$AUC_{0-\infty}, \mu g \cdot h/ml$	52.30 ± 10.10	$80.27 \pm 8.26^*$
CL, L/h	1.17 ± 0.45	1.63 ± 1.46
t_{max}, h	3.42 ± 0.91	3.15 ± 0.27
$c_{max}, \mu g/ml$	3.20 ± 1.41	$6.11 \pm 0.74^*$
MRT_{0-72h}, h	13.24 ± 0.48	12.99 ± 0.45
$MRT_{0-\infty}, h$	14.39 ± 0.36	13.27 ± 0.29
$t_{1/2}, h$	7.53 ± 1.20	6.26 ± 0.85

注:与ABZ原料药组比较,* $P < 0.05$

Note: vs. ABZ raw material group, * $P < 0.05$

由表3可知,与ABZ原料药组比较,ABZ纳米微粉组大鼠的 K_e 、 c_{max} 、 AUC_{0-72h} 、 $AUC_{0-\infty}$ 均显著升高($P < 0.05$)。

3 讨论

动物及人体药动学研究显示,ABZ口服最主要的代谢产物为ABZSO,其他代谢产物为ABZSO₂、ABZSO₂-NH₂及其他磺衍生物^[8];ABZ极少以原药形式排出体外,原药与其他磺衍生物在血中的浓度极低,且ABZSO₂-NH₂等其他代谢物的血药浓度变化很大^[9]。ABZSO是ABZ最主要的代谢物,体内试验同时证明其也是ABZ发挥抗棘球蚴病的主要活性成分^[10],因此,本试验以ABZSO作为药动学参数的检验评价标准^[11]。与ABZ原料药比较,ABZ纳米微粉最主要活性代谢物ABZSO的峰浓度增大,口服生物利用度提高,分析原因可能是纳米微粉粒径减小,比表面积增大,药物的溶出吸收速率加快,促进小肠上皮的吸收,从而提高了口服生物利用度;同时表面活性剂的使用,降低了表面张力,更好地促进药物通过胃肠壁的水化层被吸收,增加了生物利用度^[12],符合纳米药物药动学特点^[13]。

同时,与ABZ原料药组比较,ABZ纳米微粉组的大鼠药动

学参数 t_{max} 减小、CL增加,也符合纳米药物药动学特点(吸收迅速,达峰时间短,清除加快),但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),分析可能受到软件拟合偏倚、动物个体差异、试验误差等影响,后续仍需进一步验证。

研究资料显示,纳米物质的药动学特点与其自身的性质结构密切相关^[14]。其中,粒径的大小是纳米药物最关键的参数之一^[15-16]。本研究采用的纳米ABZ微粉粒径在370~500 nm之间,试验结果仅表明在此粒径范围内的ABZ微粉具有以上药动学特点。随着ABZ纳米化研究的进一步进行,其他粒径和制备方法所得的纳米ABZ微粉性质还需进一步研究证实。

参考文献

- [1] Mohamed AI, Fars KA. Enhancement of the dissolution of albendazole from pellets using MTR technique[J]. Saudi Pharm J, 2013, 21(2): 215.
- [2] 陈迹, 王建华. 阿苯达唑前体胶束在猪体内的药动学研究[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(5): 556.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 556-558.
- [4] 温浩, 陈迹, 王建华, 等. 纳米级ABZ微粉及其制备方法: 中国, ZL201010527042.2[P]. 2012-08-08.
- [5] Kadam RS, Bourne DW, Kompella UB. Nano-advantage in enhanced drug delivery with biodegradable nanoparticles: contribution of reduced clearance[J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(7): 1380.
- [6] 蔡艳. 纳米给药系统的药动学及毒理学研究进展[J]. 抗感染药学, 2010, 7(3): 167.
- [7] 陈玉祥. 纳米药物评价技术与方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 57-58.
- [8] Zimei W, Natalie J, Medlicott MR, et al. Development and optimization of a rapid HPLC method for analysis of ricobendazole and albendazole sulfone in sheep plasma[J]. J Pharm Biomed Analysis, 2005, 39(1/2): 225.
- [9] 马运芳, 陈迹, 王建华, 等. 阿苯达唑纳米微粉分散方法的研究[J]. 中国药房, 2013, 24(37): 3507.
- [10] 林海丹, 林峰, 张美金, 等. 高效液相色谱法同时测定动物组织中16种苯并咪唑类药物残留[J]. 分析检测, 2011, 32(2): 231.
- [11] 刘志亮, 徐光科, 裴香玲, 等. 阿苯达唑亚砷酸盐对照品候选物纯度检测方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(7): 13.
- [12] 魏丽红, 张永军, 陈卫军, 等. 阿苯达唑自微乳化释药系统大鼠体内药代动力学的研究[J]. 农垦医学, 2011, 33(2): 125.
- [13] 谭文超, 左金梁, 吴秀君. 纳米药物的药动学研究概况分析[J]. 实用药物与临床, 2014, 17(7): 906.
- [14] 王雯. 纳米颗粒的细胞毒性试验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2009: 11-12.
- [15] 郑国颖, 李茂静, 郝玉兰, 等. 不同粒径和形貌的纳米硫化镉对小鼠肝肾毒性的研究[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(6): 542.
- [16] 杨祥良, 徐辉壁, 廖明阳, 等. 纳米药物安全性[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 191-210.

(收稿日期: 2016-09-19 修回日期: 2016-10-01)

(编辑: 刘明伟)