

喷昔洛韦缓释微球在 Beagle 犬体内的生物等效性研究

青海省西宁市第二人民医院(810003) 陈俊萍

青海大学医学院(810001) 李向阳

摘要 **目的:** 建立犬血浆中喷昔洛韦的高效液相色谱测定方法,并研究喷昔洛韦缓释微球在犬体内的药动学和生物利用度。**方法:** 12只犬随机分为两组,每组6只,分别口服给予喷昔洛韦缓释微球和普通片剂375mg后,采用高效液相色谱法检测血药浓度。**结果:** 喷昔洛韦缓释微球和普通片剂的达峰时间(T_{max})分别为(4.70 ± 0.82)h和(1.83 ± 0.27)h,达峰浓度(C_{max})分别为(2.62 ± 1.14) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和(4.50 ± 0.763) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,半衰期($T_{1/2}$)分别为(20.256 ± 0.436)h和(6.865 ± 0.607)h,曲线下面积(AUC_{0-8})为(25.34 ± 6.33) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和(26.77 ± 4.95) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。**结论:** 喷昔洛韦缓释微球具有明显的缓释特性。

关键词 喷昔洛韦缓释微球 药动学 生物等效 高效液相色谱法

中图分类号 R945

喷昔洛韦(penciclovir, PCV)是泛昔洛韦的内源性活性代谢产物,属于无环核苷类衍生物,具有抑制病毒DNA合成与复制,对多种病毒感染如单纯疱疹病毒I型和II型均有效^[1,2],此外该药还有减轻疱疹后神经疼痛症状、缩短病程及治疗重症病毒性脑膜炎等效果^[3~5]。

微丸可提高药物与胃肠道的接触面积,利于药物吸收,从而提高生物利用度,同时可以减少对胃肠道黏膜的刺激,使血药浓度平稳,这不但可以减少药物的不良反应,还可使患者服药更加方便。本文拟建立喷昔洛韦体内药物浓度含量分析的HPLC方法并探讨其在犬体内的药动学,为其推广与应用提供临床前药动学依据。

药品与试剂

1 药品 喷昔洛韦缓释微球(重庆华邦制药股份有限公司,125mg,批号20100711),喷昔洛韦片(重庆华邦制药股份有限公司,125mg,批号20080305);喷昔洛韦对照品(上海恒远生物科技有限公司提供,纯度 $\geq 98.0\%$,批号20090215);阿昔洛韦对照品(上海恒远生物科技有限公司提供,纯度 $\geq 98.0\%$,批号20100729);甲醇为色谱纯,冰醋酸为分析纯,实验用水为重蒸馏水。

2 实验仪器 Agilent 1200系列高效液相色谱仪,G1315B二级管阵列检测器,G1329A自动进样系统,G1316A色谱柱恒温箱,HP1090色谱工作站。

3 实验动物 Beagle犬 雌雄兼半,体重(15 ± 2)kg,由哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供,合格证编号:SCXK(黑)2006-010。

方法与结果

1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS₂ C₁₈分析柱(4.6mm $\times$ 250mm,5 μm);流动相: 甲醇-水(9:91)(冰醋酸调pH 6.5);流速: 1.0mL $\cdot$ min⁻¹;柱温25 $^{\circ}\text{C}$;检测波长272nm;进样量20 μL 。

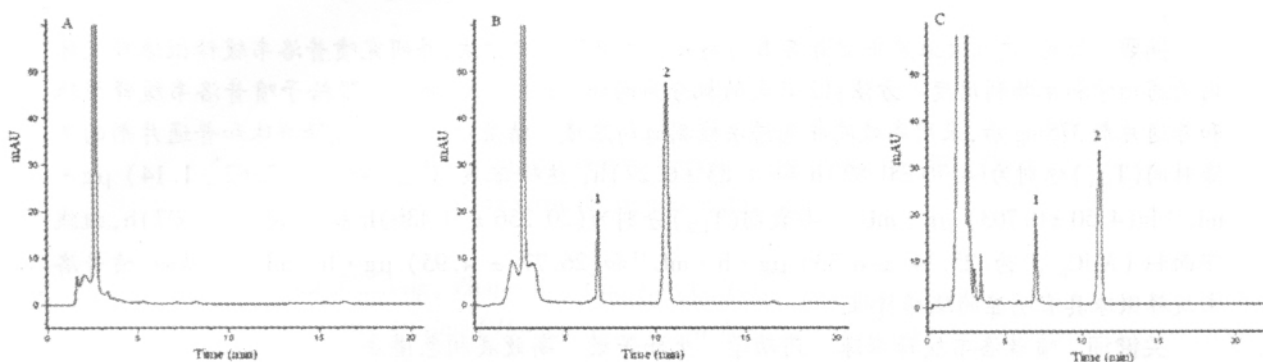
2 对照品溶液的配制

2.1 喷昔洛韦对照品溶液的制备 精密称取喷昔洛韦对照品10mg,置于100mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液适量,分别稀释定容至10mL容量瓶,配成浓度分别为10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.2 阿昔洛韦对照品溶液的制备 精密称取阿昔洛韦对照品10mg,置于100mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对

照品贮备液 4℃ 保存备用。

3 血浆样品处理 精密吸取离心后的血浆样品 100 μ L, 置具塞玻璃试管中, 定量加入 20 μ L 阿昔洛韦对照品溶液, 滴加 3.0mL 甲基叔丁基醚, 涡旋 30s, 12 000 r/min 离心 5min, 转移全部上清液于 40℃ N₂ 吹干, 残渣用 100 μ L 流动相复溶, 取 20 μ L 进 HPLC 分析。



A: 空白血浆; B: 空白血浆加入喷昔洛韦对照品和内标物阿昔洛韦;
C: 灌胃给予喷昔洛韦缓释微球 2h 后血浆样品; 其中 1 为阿昔洛韦 2 为喷昔洛韦。

图1 Beagle 犬血浆样品中喷昔洛韦色谱图

5 线性关系考察

精密吸取喷昔洛韦对照品溶液适量, 加入空白血浆 100 μ L, 配成喷昔洛韦质量浓度分别为 0.10 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 0.20 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 0.50 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 1.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 2.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 5.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 和 10.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的血浆样品, 按照上述操作处理后进行 HPLC 分析。以喷昔洛韦与阿昔洛韦的峰面积比值(y) 对喷昔洛韦质量浓度(x, μ g $\cdot$ mL⁻¹) 进行线性回归, 得回归方程为: $y = 0.000417x + 73.38$ ($r = 0.9992$)。血浆中喷昔洛韦在(0.10~10.00) μ g $\cdot$ mL⁻¹ 内线性关系良好。在此条件下以 $S_N = 3$ 计, 喷昔洛韦在血浆中的最低检测浓度为 0.05 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 最低定量浓度为 0.10 μ g $\cdot$ mL⁻¹。

6 精密度与准确性 取空白血浆配制喷昔洛韦浓度分别为 0.20 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 1.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 和 5.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的样品各 6 份, 按照上述操作处理并行 HPLC 分析。连续测定 3 天, 以喷昔洛韦的峰面积用当日的回归方程求算出质量浓度, 将结果进行统计分析求算日内日间精密度。结果表明: 该方法重现性良好, 相关结果见表 1。

7 提取回收率 取空白血浆配制喷昔洛韦质量浓度

4 方法专属性考察 空白血浆、空白血浆加入喷昔洛韦对照品及灌胃给予喷昔洛韦后的血浆样品, 按照上述操作, 进样分析, 色谱图如图 1 所示。结果喷昔洛韦和内标物阿昔洛韦的保留时间分别约为 12.0min 和 6.5min, 分离度大于 3, 峰形尖锐, 无拖尾现象。相应的理论塔板数 > 5 000, 血浆中的内源性物质不干扰体内喷昔洛韦的含量测定。

分别为 0.20 μ g $\cdot$ mL⁻¹, 1.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 和 5.00 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的系列血浆质控样本各 6 份, 按照上述操作并行 HPLC 分析, 记录喷昔洛韦面积为 A_1 ; 另取一定量的相同浓度的喷昔洛韦对照品贮备液各 6 份, 以同体积进样, 记录色谱图, 喷昔洛韦的峰面积为 A_2 , 以 $(A_1 / A_2) \times 100\%$ 计算提取回收率, 结果见表 2。

表1 日内日间精密度 ($n = 6$)

浓度 (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	日内精密度		日间精密度	
	平均值	相对标准偏差 (%)	平均值	相对标准偏差 (%)
0.20	0.19 $\pm$ 0.01	5.26	95.0	0.19 $\pm$ 0.01
1.00	0.98 $\pm$ 0.03	3.06	98.0	0.99 $\pm$ 0.04
5.00	4.97 $\pm$ 0.09	1.81	99.4	4.94 $\pm$ 0.27

表2 提取回收率实验 ($n = 6$)

浓度 (μ g $\cdot$ mL ⁻¹)	平均值	相对标准偏差 (%)
0.20	95.86 $\pm$ 3.71	3.87
1.00	100.01 $\pm$ 2.93	2.93
5.00	101.28 $\pm$ 3.79	3.74

8 稳定性实验

8.1 长期稳定性 于空白血浆中加入一定量的喷昔洛韦对照品贮备液,配制成 0.20 、 1.00 、 $5.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列血浆质控样本各 6 份,于 -20°C 分别冷冻 0、1、3、5、7、15、30 天后,取出待完全溶解后分析,记录喷昔洛韦峰面积,与 0 天相比求得标准血浆样本的偏差。结果见表 3。

8.2 反复冻融稳定性 于空白血浆中加入一定量的喷昔洛韦对照品贮备液,配制成 0.20 、 1.00 和 $5.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列血浆质控样本各 6 份,于 -20°C 冷冻 24h,取出待完全溶解后按照上述操作

处理并进行 HPLC 分析并记录喷昔洛韦峰面积。反复冻融 3 次,与未冻融前相比求得标准血浆样本的偏差。结果见表 3。

8.3 室温稳定性

于空白血浆中加入一定量的喷昔洛韦对照品贮备液,配制成 0.20 、 1.00 、 $5.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列血浆质控样本各 6 份,于室温分别放置 0、2、4、6、8、12、24 后按照上述操作并进行 HPLC 分析且记录喷昔洛韦峰面积,与 0h 相比求得标准血浆样本的偏差。结果见表 3。结果表明,喷昔洛韦在上述 3 种条件下均稳定。

表 3 稳定性实验结果 ($n=6$)

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	室温稳定性(20°C , 24 h)		长期稳定性(-20°C , 30 天)		冻融稳定性(-20°C , 24h)	
	平均值	相对标准偏差(%)	平均值	相对标准偏差(%)	平均值	相对标准偏差(%)
0.20	97.21 ± 4.34	4.46	96.27 ± 1.48	1.54	95.18 ± 4.55	4.78
1.00	94.68 ± 3.21	3.40	94.29 ± 2.85	3.02	92.96 ± 5.72	6.15
5.00	95.29 ± 2.17	2.28	94.76 ± 4.36	4.60	93.24 ± 6.17	6.62

9 药物代谢动力学研究 12 只 Beagle 犬雌雄兼半,体重 (15 ± 2) kg,随机分为两组,每组 6 只,给药前禁食 12 小时,自由饮水。实验组与对照组分别灌胃给予 375 mg 喷昔洛韦缓释微球和普通片剂,1 周后交叉给药。分别于给药后 0.5、1.0、1.5、2、3、4、5、6、8、10、12、24h 股静脉采血 0.3mL,置于肝素化离心试管中,5 000g 离心 10min,转移全部血浆,取 $100 \mu\text{L}$ 血浆按照上述操作处理并进行 HPLC 分析并记录喷昔洛韦峰面积。所得血药浓度-时间曲线数据采用 DAS 2.0 药动学软件计算参数。喷昔洛韦平均药时曲线见图 2,主要药动学参数见表 4。

表 4 喷昔洛韦缓释微球和普通片剂在 Beagle 犬体内的主要药动学参数 ($n=12$)

药动学参数	缓释微球平均值	普通片剂平均值
$C_{\max}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	2.62 ± 1.14	4.50 ± 0.763
$T_{\max}$ (h)	4.70 ± 0.82	1.83 ± 0.27
AUC_{0-24} ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	24.01 ± 6.84	26.12 ± 4.72
AUC_{0-8} ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	25.34 ± 6.33	26.77 ± 4.95
$T_{1/2}$ (h)	20.256 ± 0.436	6.865 ± 0.607

讨 论

生物样品中富含大量蛋白质,不适当的处理容易使分离效能下降,甚至造成色谱柱堵塞。液液萃取法是一种较为常见且经典的蛋白沉淀方法,因其具有蛋白沉淀率高,操作简便等优点而广泛用于生物样品体内药物浓度分析。实验初期曾采用二氯甲烷、乙酸乙酯、乙醚和氯仿作为萃取溶剂,结果发现蛋白提取回收率均较低,而采用甲基叔丁基醚作为蛋白沉淀剂时,喷昔洛韦的提取回收率超过 90%。

稳定性实验结果说明喷昔洛韦在血浆中具有较好的稳定性,但是血浆样品长期贮存容易滋生微生物,污染色谱柱进而影响药物的分离效率,因此血浆样品采集后应该尽快进行分析处理。

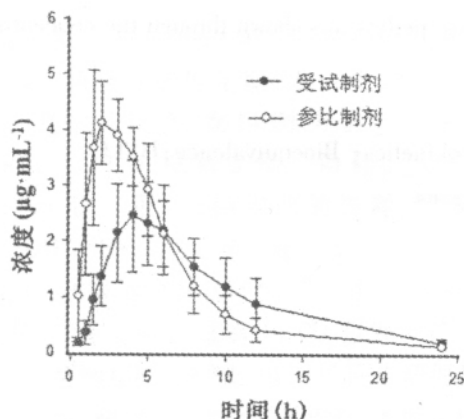


图 2 12 只 Beagle 犬单剂量口服 375mg 喷昔洛韦缓释微球和普通片剂后的平均血药浓度-时间曲线

良好的流动相体系对于药物的分析测定至关重要。实验初期,曾经采用甲醇-水、甲醇-三乙胺水溶液、甲醇-四氢呋喃水溶液、乙腈-水、乙腈-四氢呋喃水溶液等作为流动相体系,结果发现甲醇-水(9:91)(冰醋酸调 pH 6.5)对喷昔洛韦的分离效果好,峰形尖锐。

血药浓度-时间曲线结果说明,口服喷昔洛韦2种制剂在犬体内均符合二室消除模型。药动学参数经 t 检验分析,提示喷昔洛韦缓释微球与普通片剂相比,达峰时间(T_{max})明显延长($P < 0.01$),达峰浓度(C_{max})明显降低($P < 0.01$),半衰期($T_{1/2}$)显著延长($P < 0.01$)。结果表明,喷昔洛韦缓释微球在犬体内表现为明显的缓释特性,相对生物利用度约

为 94%,提示两种制剂生物等效。

参 考 文 献

- 1 张红. 喷昔洛韦临床应用新进展. 中国药业, 2009, 18(10): 81~82.
- 2 邓丽娟, 李桂玲, 丁维明, 等. 喷昔洛韦沿用温度敏感原位凝剂的制备及质量控制. 中国抗生素杂志, 2010, 35(6): 457~461.
- 3 冷玲颖, 蔡志强, 孙铁民. 核苷类抗病毒前药的研究进展. 中国药物化学杂志, 2008, 18(4): 310~315.
- 4 杨慧兰. 病毒性皮肤病学. 北京: 人民军医出版社, 2009, 159~166.
- 5 何俊英, 张楠, 卢丽敏等. 喷昔洛韦治疗重症病毒性脑炎7例临床分析. 临床荟萃, 2010, 25(12): 1082~1083.

Pharmacokinetics and Bioequivalence of Penciclovir Sustained-release Pellets in Beagle Dog

Chen Junping¹, Li Xiangyang²

1 The Second People's Hospital of Xining City (810003)

2 Qinghai University Medical School (810001)

Abstract Objective: To establish an RP-HPLC method to study the pharmacokinetics and bioequivalence of penciclovir sustained-release pellets in beagle dog. **Methods:** 12 beagle dogs were divided into 2 groups each 6 animals, group I was given 375mg penciclovir sustained-release pellets and the group II was administrated penciclovir tablets of 375mg. The plasma level of penciclovir was determined by HPLC. **Results:** The main pharmacokinetic parameters of penciclovir sustained-release pellets and tablets were T_{max} (4.70 ± 0.82) h and (1.83 ± 0.27) h, C_{max} (2.62 ± 1.14) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (4.50 ± 0.763) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $T_{1/2}$ (20.256 ± 0.436) h and (6.865 ± 0.607) h, AUC_{0-8} (25.34 ± 6.33) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and (26.77 ± 4.95) $\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. **Conclusions:** An obvious characteristic of sustained release of penciclovir sustained-release pellets was shown through the concentration-time curves in beagle dog.

Key words Penciclovir sustained-release pellets; Pharmacokinetics; Bioequivalence; HPLC