

对乙酰氨基酚琥珀酸酯在家兔体内的药代动力学研究

金超¹, 程妍^{2**}, 符华林^{1*}, 蒋公建³, 舒刚¹, 刘梦娇¹, 周建瑜¹, 戴玉娇⁴

(1.四川农业大学动物医学院药理学系, 四川 雅安 625014; 2.四川大学华西药学院, 四川 成都 610041; 3.重庆先锋动物药业有限公司, 重庆 万州 404100; 4.重庆市潼南县动物卫生监督所, 重庆 潼南 402660)

摘 要: 对乙酰氨基酚琥珀酸酯(AP-S)进入动物机体后能很快分解成对乙酰氨基酚(APAP)。为探明对乙酰氨基酚琥珀酸酯在家兔体内的药代动力学特征, 先建立检测 APAP 的高效液相色谱法(HPLC), 再将 6 只家兔分别单剂量肌肉注射对乙酰氨基酚琥珀酸酯, 采用建立的高效液相色谱法检测家兔体内对乙酰氨基酚的血药浓度; 用 DAS2.0 药代动力学软件计算药代动力学参数。结果显示, 给家兔单剂量注射对乙酰氨基酚琥珀酸酯后, 主要的药代动力学参数 C_{\max} 为 (95.44 ± 1.42) mg/L, t_{\max} 为 0.25 h, $AUC_{(0-\infty)}$ 为 (84.08 ± 7.02) mg/L·h。综合分析表明, 对乙酰氨基酚琥珀酸酯在动物体内可迅速转化为对乙酰氨基酚, 药物达峰时间短, 发挥药效快。

关 键 词: 家兔; 对乙酰氨基酚琥珀酸酯; 对乙酰氨基酚; 药代动力学; 高效液相色谱法

中图分类号: S859.7 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2014)04-0399-05

Pharmacokinetics characteristics of paracetamol succinate in rabbits

JIN Chao¹, CHENG Yan^{2**}, FU Hua-lin^{1*}, JIANG Gong-jian³, SHU Gang¹, LIU Meng-jiao¹, ZHOU Jian-yu¹, DAI Yu-jiao⁴

(1. Pharmacy Department, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Pioneers Animals Pharmaceutical Co. Ltd. of Chongqing, Wanzhou, Chongqing 404100, China; 4. Animal Health Supervision Institute of Chongqing Tongnan County, Tongnan, Chongqing 402660, China)

Abstract: Acetaminophen succinate (AP-S) can be quickly broken into acetaminophen (APAP) after administrating into animal body. In order to investigate acetaminophen kinetics of succinate in rabbits, HPLC assay for APAP content detection was established first, then single dose of AP-S was injected intramuscularly into 6 rabbits respectively. Drug concentration in serum was determined by the established HPLC, and the data was analysed by DAS 2.0 pharmacokinetic software to obtain the pharmacokinetic parameters. The results showed that the main pharmacokinetic parameters after intramuscular injection of acetaminophen succinate by a single dose in rabbits were as follows: C_{\max} is (95.44 ± 1.42) mg/L, t_{\max} is 0.25 h, $AUC_{(0-\infty)}$ is (84.08 ± 7.02) mg/(L·h). Comprehensive analysis showed that acetaminophen succinate in animal body can be quickly converted into acetaminophen, the drug peak time is short, thus, the drug efficacy is displayed quickly.

Key words: rabbit; paracetamol succinate; paracetamol; pharmacokinetic; high-performance liquid chromatography(HPLC)

对乙酰氨基酚(paracetamol, acetaminophen, apamid, APAP)又名扑热息痛, 为乙酰苯胺类解热镇痛药。美国、英国、日本等国的《药典》和《中国药典》均已收载此药, 是全世界应用最广泛的药物之一^[1]。该药现在主要应用的剂型是片剂和胶囊剂, 兽医临床多用注射剂。APAP 易溶于有机溶剂、微溶于水, 其注射剂常用聚乙二醇 400 和乙醇等有

机溶剂做溶媒, 但有机溶剂刺激性大且不利于吸收, 导致药物不能很好的发挥疗效。

前体药物(pro-drug)是指经过生物体内转化后才具有药理作用的化合物, 其本身没有生物活性或活性很低, 经过体内代谢后变为有活性的物质。最常见的有载体前药, 其在体内经酶促或非酶化学反应, 转变成原药而发挥作用^[2-5]。将药物制成前药

收稿日期: 2013-11-08

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848)

作者简介: 金超(1989—), 女, 四川蓬安人, 从事药物新剂型方面的研究, emilyjc@163.com; *通信作者, fuhl2005@sohu.com; **并列第一作者, yancheng@scu.edu.cn

可以改善药物的溶解性、减少药物不良反应、提高药物靶向性^[6]。APAP 较差的水溶性常常限制其制剂加工和临床应用,但其结构中含有活性基团,为此笔者根据前药设计思路,将 APAP 的 4 位酚羟基与琥珀酸酐酰化,制成对乙酰氨基酚的琥珀酸酯(AP-S)^[7]。新合成的 AP-S 水溶性良好,有利于其水溶性制剂研发,并且能够有效解决有机溶剂的刺激性等难题,以达到增加药物在动物机体内的吸收、提高生物利用度和药效的目的^[5]。

本试验前期研究发现,AP-S 进入动物机体后很快分解成 APAP,药物在体内以 APAP 的形式存在而发挥其疗效,因此,在研究 AP-S 家兔肌肉注射药代动力学时,可以 APAP 血药浓度的变化来反映 AP-S 的体内药代动力学特征。本研究先建立测定血液中 APAP 的浓度的 HPLC 法,并用此方法测定家兔单剂量肌肉注射 AP-S 后的 APAP 的血药浓度,旨在探明 AP-S 在家兔体内的药代动力学特征,为 AP-S 的临床应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试兔

6 只健康日本大耳家兔,体重(2.0±0.2) kg,购自四川农业大学实验动物中心。

1.1.2 主要药品与试剂

对乙酰氨基酚琥珀酸酯为实验室自制;对乙酰氨基酚购自四川成都科龙化工试剂厂,生产批号 20100421;琥珀酸酐购自天津瑞金特化学品有限公司;4-二甲氨基吡啶购自成都科龙化工试剂厂;色谱甲醇购自天津科密欧化学试剂有限公司;其他试剂均为国产,分析纯。

1.1.3 主要试验仪器

85-2 型恒温磁力搅拌器(杭州仪表电机有限公司);RE-2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);TB-Z 真空恒温干燥箱(天津药典标准仪器厂);岛津 LC-2010CHT 高效液相色谱系统(岛津国际贸易上海有限公司);LG16-3 高速冷冻离心机(美国科峻仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血浆中对乙酰氨基酚含量的测定

1) 测试条件。色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(4.6

mm×150 mm,5 μm);柱温为 20 ℃;流动相为甲醇 1%冰醋酸=12:88(v/v);流速为 1.0 mL/min;紫外检测波长为 244 nm;进样体积为 20 μL。

2) 血浆处理及 HPLC 分析。从耳缘静脉采集未经处理的家兔血液 1 mL,置于肝素化离心管中,5 000 r/min 离心 10 min,吸取待测上清 0.5 mL(空白血浆),加入甲醇 1 mL,涡旋混合 1 min 后 10 000 r/min 离心 5 min,取上清 1 mL,真空干燥,干燥物用 0.5 mL 甲醇复溶,涡旋混合,10 000 r/min 离心 10 min,上清液用一次性 0.45 μm 聚四氟乙烯微孔滤膜过滤,取 20 μL 进行 HPLC 分析^[8]。

3) 血浆标准曲线的制备。精密称取 0.1 g 干燥的对乙酰氨基酚,用注射用水溶解,配置成 1 000 μg/mL 的母液。将母液配制为 1.5、3.0、6.0、15、30、60、150、300、450 μg/mL 的对乙酰氨基酚标准药液,分别取 0.5 mL 家兔空白血浆与 0.5 mL 药液混合配成对乙酰氨基酚血浆样品后按上述的方法进行 HPLC 分析,记录色谱图及峰面积。以峰面积为纵坐标,以药物浓度为横坐标绘制标准曲线,经最小二乘法将峰面积对药物浓度进行回归分析,得对乙酰氨基酚血浆标准曲线方程^[9-10]。

4) 检测限与定量限的确定。按上述方法获得空白血浆,制成低浓度的乙酰氨基酚血浆样品,处理后进行 HPLC 测定。将引起 3 倍基线噪音的药物质量浓度定义为检测限;将引起 10 倍基线噪音的药物质量浓度定义为定量限^[10]。

5) 精密度试验。按上述方法配制低、中、高(分别为 0.5、10、150 μg/mL)3 种浓度的对乙酰氨基酚血浆样品各 3 份,24 h 内按血浆处理与色谱分析方法平行测定 5 次,计算日内精密度。连续测定 5 d,每天 1 次,计算日间精密度。

6) 回收率试验。绝对回收率按血浆标准曲线的制备中的方法配制低、中、高(0.5、10、150 μg/mL)3 种浓度的对乙酰氨基酚血浆样品各 3 份,另用甲醇做溶剂配制相同浓度的对乙酰氨基酚样品各 3 份,按血浆处理的步骤操作并进行色谱分析,得低、中、高 3 种浓度的血浆样品的绝对回收率。

相对回收率按血浆标准曲线的制备中的方法配制低、中、高(0.5、10、150 μg/mL)3 种浓度的对乙酰氨基酚血浆样品各 3 份,按血浆处理的步骤操作并进行色谱分析,记录峰面积并代入标准曲线,计算所得浓度与真实血样浓度比较,得到低、中、高 3 种浓度的标准血浆样品的相对回收率。

药物稳定性考察。按血浆标准曲线的制备中的方法配制低、中、高(0.5、10、150 $\mu\text{g/mL}$) 3 种浓度的对乙酰氨基酚血浆样品,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下将各样品放置 0、24、48 和 72 h 后,按照上述测试的条件进行 HPLC 测定。

1.2.2 AP-S 的药代动力学分析

1) 药液的配制。精密称取定量的对乙酰氨基酚琥珀酸酯,溶解在 5%的碳酸氢钠溶液中,配制成 50 mg/mL 的药液,备用。

2) 给药与血样采集。供试兔在试验动物房中饲养 1 周后,禁食 12 h。按照 50 mg/kg 给供试家兔肌肉注射对乙酰氨基酚琥珀酸酯前药溶液。给药前每只兔取血液各 1 mL,分别置于肝素化试管中,给药 0.083、0.25、0.50、0.75、1、1.5、2、4、6、8 h 后,分别从耳缘静脉取血 1 mL,注入肝素化试管,5 000 r/min 离心 10 min,准确吸取上层血浆,存 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,备用^[11]。按照上述测试条件对血浆样品进行 HPLC 分析,根据标准曲线计算对乙酰氨基酚的血药浓度。

1.2.3 数据处理

采用 DAS2.0 药代动力学软件进行各种药代动力学模型拟合,计算各组数据的药代动力学参数及其标准偏差;血药浓度和相关的药代动力学参数用 SPSS17.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 方法学评价

2.1.1 方法专属性分析结果

由图 1、图 2 可知,在本试验色谱条件下,血浆峰与药物分离完全,血浆内源性杂质对测定结果

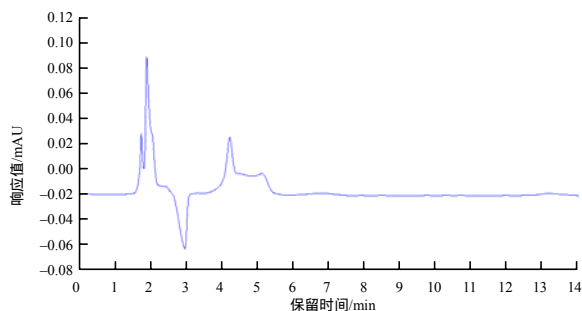


图 1 家兔空白血浆的 HPLC 分析结果

Fig.1 HPLC of the blank plasma of rabbit

无干扰,血浆中对乙酰氨基酚峰形良好,分离完全,蛋白峰干扰极小,对乙酰氨基酚的保留时间约为 7.8 min,表明本对乙酰氨基酚色谱检测方法有较高的专属性。

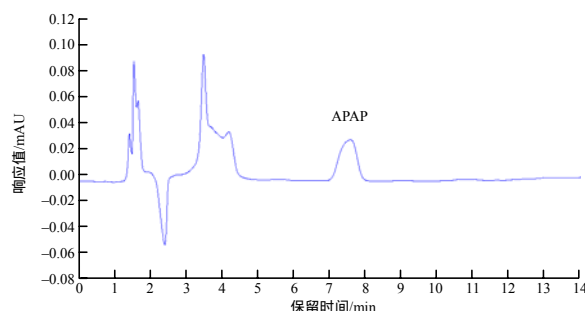


图 2 家兔空白血浆中加入 APAP 的色谱分析结果

Fig.2 HPLC of the blank plasma of rabbit with APAP

2.1.2 标准曲线、检测限和定量限

对乙酰氨基酚的血浆标准曲线见图 3。曲线方程为 $A=40\,471C-2\,278.8$, $R^2=0.999$, 其中, A 为峰面积, C 为药物浓度, R 为相关系数。从图 3 可知,在 0.75~150 $\mu\text{g/mL}$ 范围内标准曲线线性关系良好,检测限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 。

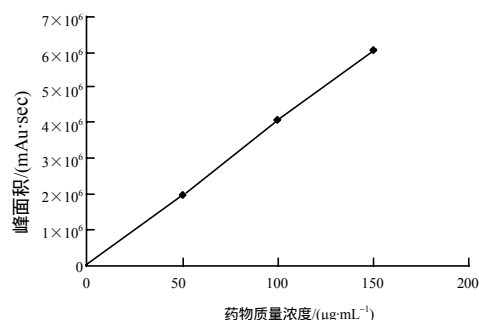


图 3 对乙酰氨基酚的血浆标准曲线

Fig.3 Standard curve of paracetamol

2.1.3 精密度与回收率试验结果

血浆中 3 种不同浓度对乙酰氨基酚的检测精密度和回收率见表 1。不同浓度对乙酰氨基酚的绝对回收率均大于 75%,药物提取率均较高,说明血浆样品处理方法能使对乙酰氨基酚很好的从血浆中分离;精密度和回收率的相对标准偏差(RSD)值均小于 5%,符合生物供试品分析的要求,证明本试验所采用的测定方法和血浆样品处理方法可靠,可用于家兔血浆中对乙酰氨基酚的含量测定。

表 1 对乙酰氨基酚血药浓度的精密度和回收率

| Table 1 Precision and recovery test of paracetamol in rabbit plasma | | | | | | | | |
|---|---|------|---|------|------------------|------|------------------|------|
| 样品质量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 日内测量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | RSD | 日间测量浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | RSD | 绝对回收率/% | RSD | 相对回收率/% | RSD |
| 0.5 | 0.51 \pm 0.01 | 1.96 | 0.52 \pm 0.02 | 3.84 | 75.21 \pm 2.57 | 3.41 | 95.21 \pm 3.86 | 2.34 |
| 10 | 9.99 \pm 0.10 | 1.00 | 10.17 \pm 0.13 | 1.28 | 77.23 \pm 1.21 | 1.57 | 98.76 \pm 2.10 | 2.13 |
| 150 | 150.54 \pm 2.17 | 1.44 | 149.40 \pm 2.39 | 1.60 | 79.57 \pm 1.59 | 2.01 | 99.20 \pm 1.54 | 1.55 |

2.1.4 稳定性试验结果

由表 2 可知, 3 个浓度的乙酰氨基酚血浆样品分别在 7℃ 低温处 24、48、72 h 后, 用 HPLC 检测到的浓度与初始浓度差异较小, 说明不同浓度的对乙酰氨基酚在血浆中的稳定性很好, 表明冰冻放置血浆样品较为稳定。

表 2 对乙酰氨基酚血浆样品稳定性试验结果

| Table 2 Stability of paracetamol in rabbit plasma $\mu\text{g}/\text{mL}$ | | | |
|---|------------|------|--------|
| 样品初始 质量浓度 | 7℃ 处理后检测浓度 | | |
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 0.5 | 0.49 | 0.47 | 0.47 |
| 10.0 | 9.98 | 9.99 | 149.40 |
| 150.0 | 150.05 | 9.95 | 149.23 |

2.2 AP-S 在家兔体内的药代动力学特征

由图 4 可知, AP-S 进入家兔体内后转换成 APAP, 且血浆中 APAP 峰形良好, 分离完全, 蛋白峰干扰极小, 与空白血浆中添加 APAP 的 HPLC 分析结果一致, 证明建立的本方法可用于 AP-S 的药代动力学分析。

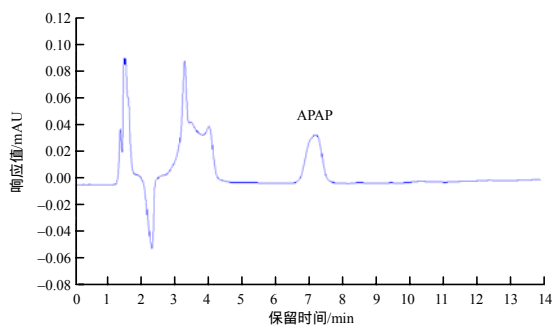


图 4 注射 AP-S 30 min 后血浆样品 HPLC 图谱

Fig.4 HPLC of AP-S at minute 30 post-injection

家兔肌肉注射 AP-S 后, 不同时间血药浓度的药时曲线见图 5。从图 5 可知, AP-S 在体内很快转换成 APAP, 其达峰时间为 0.25 h, 证明 APAP 制备成水溶性的 AP-S 后, 药物吸收迅速, 能够更快的发挥 APAP 的药效。

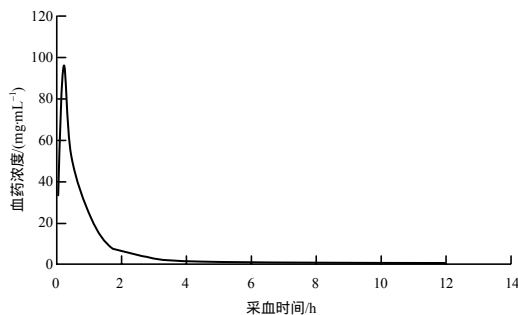


图 5 AP-S 的药时曲线

Fig.5 Concentration-time curve of AP-S

将给药后不同时间收集的血液的血药浓度经 DAS2.0 程序处理, 用二室模型估算药代动力学参数, 得到 AP-S 的药化动力学参数见表 3。家兔按 50 mg/kg 肌肉注射 AP-S 后, 其主要药化动力学参数 C_{\max} 为(95.44 \pm 1.42) mg/L, t_{\max} 为(0.25 \pm 0.006) h, $AUC_{(0-\infty)}$ 为(84.08 \pm 7.02) mg/L·h, 这与关皎^[12]等按 100 mg/kg 肌肉注射后的 t_{\max} (1.08 \pm 0.20) h 相比, AP-S 药物达峰时间明显提前, 药物发挥作用更加迅速。

表 3 AP-S 药代动力学参数

| Table 3 Pharmacokinetic parameters of AP-S | | | |
|---|-------------------|---|--------------------|
| 参数 | 参数值 | 参数 | 参数值 |
| $A/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | 105.18 \pm 5.64 | $AUC_{(0-\infty)}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h})$ | 84.08 \pm 7.020 |
| α/h^{-1} | 1.12 \pm 0.26 | K_{12}/h^{-1} | 0.42 \pm 0.060 |
| $B/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | 1.91 \pm 0.33 | K_{21}/h^{-1} | 0.28 \pm 0.010 |
| β/h^{-1} | 0.26 \pm 0.05 | K_a/h^{-1} | 19.16 \pm 1.210 |
| K/h^{-1} | 166.67 \pm 6.21 | $t_{1/2K_a}/\text{h}$ | 0.04 \pm 0.000 |
| $t_{1/2\alpha}/\text{h}$ | 0.73 \pm 0.05 | t_{\max}/h | 0.25 \pm 0.006 6 |
| $t_{1/2\beta}/\text{h}$ | 2.70 \pm 0.12 | $C_{\max}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ | 95.44 \pm 1.420 |
| $AUC_{(0-12)}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h})$ | 82.44 \pm 6.74 | | |

A 为分布相; α 为分布速度常数; B 为消除相; β 为消除速度常数; K 为总消除速率常数; $t_{1/2\alpha}$ 为分布半衰期; $t_{1/2\beta}$ 为消除半衰期; $t_{1/2K_a}$ 为吸收半衰期; K_{12} 为由中央室向周边室转运的一级速率常数; K_{21} 为由周边室向中央室转运的一级速率常数; K_a 为吸收速率常数; t_{\max} 为达峰时间; C_{\max} 为峰浓度; $AUC_{(0-12)}$ 为时间从 0 h 至 12 h 时药时曲线下面积; $AUC_{(0-\infty)}$ 为时间从 0 h 至无穷大时药时曲线下面积^[13]。

3 讨论

蛋白质分子凝聚从溶液中析出的现象称为蛋

白质沉淀(precipitation)^[14]。常用的蛋白质沉淀方法有盐析法与有机溶剂沉淀法,常用试剂分别为饱和硫酸铵与甲醇。由于硫酸铵为无机盐,且其中常含有少量重金属离子,在血浆处理后续过程中,加入的甲醇可能会导致残留在溶液中的硫酸铵析出,从而堵塞色谱柱,而有机溶剂沉淀法的分辨能力比盐析法更高,其中甲醇又有将药物从血浆中萃取出来的功能,故本试验选择甲醇作为蛋白质沉淀剂。本试验的结果表明,虽然甲醇会导致蛋白质变性,但并不影响试验结果。

由于 APAP 微溶于水,其注射剂常用聚乙二醇 400、丙二醇、乙醇等有机溶剂做溶媒。但人体和动物机体是一个水性环境,有机溶剂溶解药物进入体内后存在刺激性大和不利于吸收的缺点,所以药物不能很好的发挥疗效。关皎^[12]等采用 50% 丙二醇水溶液溶解 APAP,研究其药化动力学特征,其达峰时间是(1.08±0.20) h,明显比本试验 AP-S 的达峰时间(0.25 h)长,证明有机溶剂能使药物的吸收减慢,不利于药效的发挥。

AP-S 是在 APAP 的结构上进行改造,添加了一个水性载体基团,添加的水性基团分子量较小,进入体内后载体在酶等物质的作用下很快与药物分离。本试验将 AP-S 溶解在水性溶液中,肌肉注射进入动物机体内后,AP-S 能够很快被吸收进入血液中,随着血液循环到达全身,发挥疗效。

药物动力学中隔室模型的划分具有相对性,对于同一药物,由于实验条件或者数据处理能力存在差异,会造成同一机体内试验结果的不同^[13]。关皎^[12]等的研究表明,对乙酰氨基酚在家兔体内的药化动力学符合单室模型。本试验结果表明二室模型能更好的描述 AP-S 在家兔体内的药化动力学特征。

王柳萍^[15]等在对乙酰氨基酚药化动力学研究进展中表明,采用 HPLC-UV 法测定对乙酰氨基酚血药浓度,方法简单快捷,具有较高的专属性。本试验结果表明,HPLC 能准确测定血浆中对乙酰氨基酚的浓度,灵敏度高,精密度与重现性良好,与用紫外分光光度法相比^[12],本研究建立的乙酰氨基酚高效液相色谱法测定的血药浓度的线性范围更广,检测限更低,检测的灵敏度更高。

参考文献:

- [1] 金慧萍,李中东,焦正.对乙酰氨基酚的不良反应与合理使用[J].药物不良反应杂志,2004,6(1):27-31.
- [2] Randolph R J, Vasilis A, Asma P, et al. Phytoestrogens as natural prodrugs in cancer prevention: Dietary flavonoids[J]. Phytochemistry Reviews, 2009, 8(2): 375-386.
- [3] Thatcher N J, Edwards R J, Lemoine N R, et al. The potential of acetaminophen as a prodrug in gene-directed enzyme prodrug therapy[J]. Cancer Gene Therapy, 2000, 7(4): 521-525.
- [4] 操锋,平其能,陈军.口服前药研究:机遇与挑战[J].药学学报,2008,43(4):343-349.
- [5] Fadl T, Omar F. Paracetamol (acetaminophen) esters of some non-steroidal anti-inflammatory carboxylic acids as mutual prodrugs with improved therapeutic index[J]. Inflammopharmacology, 1998, 6(2): 143-157.
- [6] 王淑月,王洪亮.前药原理与新药设计[J].河北工业科技,2003,20(1):54-57.
- [7] 金超,靳晓优,唐文,等.对乙酰氨基酚琥珀酸酯的合成及其表征分析[J].中国畜牧兽医,2012,39(3):220-223.
- [8] 高守红,范国荣,吴志明,等.对乙酰氨基酚缓释干混悬剂在家犬体内的药代动力学及相对生物利用度[J].第二军医大学学报,2004,25(9):1031-1032.
- [9] 邹玉珠,符华林,张伟,等.甲氧苄啶羟丙基-β-环糊精包合物的制备及在家兔体内的药代动力学研究[J].中国兽医科学,2010,40(12):1285-1290.
- [10] 符华林,张伟,陈静,等.氟苯尼考琥珀酸钠的制备及其在家兔体内的药代动力学特征[J].中国兽医科学,2011,41(6):636-640.
- [11] 陈小军,孙志良,崔建国,等.阿米卡星脂质体在家兔体内的药化动力学研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2005,31(1):73-75.
- [12] 关皎,王丹,郝乘仪,等.对乙酰氨基酚家兔体内药化动力学研究[J].吉林医药学院学报,2012,32(5):276-278.
- [13] 梁文权.生物药剂学与药物动力学[M].北京:人民卫生出版社,2009.
- [14] 王玉,张喆,陈西敬,等.高效液相色谱法测定对乙酰氨基酚的血药浓度及其生物利用度[J].中国临床药理学杂志,2002,11(2):97-99.
- [15] 王柳萍,杨斌.对乙酰氨基酚药化动力学研究进展[J].时珍国医国药,2011,22(2):469-470.

责任编辑:罗维

英文编辑:罗维