克霉舒搽剂中水杨酸和盐酸特比萘芬兔体透皮吸收的药动学研究

罗世英[a]，钟志国[b]，王宗瑞[a]，陈华萍[b](广东医学院，a.药理教研室，b.附属医院，广东 湛江 524023)

摘要：目的 建立盐酸特比萘芬和水杨酸兔血浆浓度的高效液相色谱测定方法，研究家兔涂擦克霉舒搽剂后其主药盐酸特比萘芬和水杨酸在兔体透皮吸收的药动学。**方法** 12 只家兔背部去毛，随机分为单次给药高、中、低剂量组。给药前后按设定的时间耳静脉采血，采用 HPLC 测定盐酸特比萘芬和水杨酸的血浆浓度，利用 PKS1.0 软件计算主要药动学参数。**结果** 各给药组家兔血浆中均未测得盐酸特比萘芬；单次给药低、中、高剂量组，水杨酸的主要药动学参数如下：T_{max} 为(2.73±0.30)，(3.48±0.16)，(5.86±1.72)h，C_{max} 为(25.24±9.21)，(25.32±11.05)，(37.47±4.31)μg·mL^{-1}，$T_{1/2}$ 为(5.74±3.29)，(4.60±1.99)，(13.28±3.84)h。高剂量组的 T_{max}、C_{max}、$T_{1/2}$ 高于中、低剂量组(P<0.05)。**结论** 本实验建立的 HPLC 灵敏准确、简便易行，适合用于盐酸特比萘芬和水杨酸血浆样品的测定。克霉舒搽剂皮肤局部给药安全，盐酸特比萘芬几乎不进入到血浆中，水杨酸可小部分进入血浆中，动力学行为符合一室模型。

关键词：克霉舒搽剂；盐酸特比萘芬；水杨酸；透皮吸收；药代动力学；高效液相色谱法

中图分类号：R969.11　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2009)12-1003-05

Pharmacokinetics Study of Salicylic Acid and Terbinafine Hydrochloride in Kemeishu Liniment after Percutaneous Absorption in Rabbits

LUO Shiying[a], ZHONG Zhiguo[b], WANG Zongrui[a], CHEN Huapin[b] (*Guandong Medical College, a. Pharmacology Department, b.Affiliated Hospital, Zhanjian 524023, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish HPLC methods for determining salicylic acid and terbinafine hydrochloride in rabbits plasma, and to investigate the pharmacokinetics of salicylic acid and terbinafinie hydrochloride in Kemeishu liniment after percutaneous absorption in rabbits. **METHODS** 12 rabbits with their hair on the back removed were randomized divided into large single dose group, medium single dose group and low single dose group. Plasma samples were collected and quantitated by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated using PKS1.0 software. **RESULTS** Terbinafine hydrochloride were not determined in rabibits plasma.The main pharmacokinetics parameter of salicylic acid in low, medium and large single dose group were as follows: T_{max} (2.73±0.30), (3.48±0.16), (5.86±1.72)h, C_{max} (25.24±9.21), (25.32±11.05), (37.47±4.31)μg·mL^{-1}, $T_{1/2}$ (5.74±3.29), (4.60±1.99), (13.28±3.84)h. The T_{max}, C_{max}, $T_{1/2}$ in large single dose group were higher than that in medium and low single dose group (P<0.05). **CONCLUSION** The established methods are sensitive, fast and accurate, which were suitable for the determination of salicylic acid and terbinafine hydrochloride in plasma . Kemeishu liniment is safety spreding on skin, terbinafine hydrochloride seldomly can enter in the blood, salicylic acid partially enter in the blood, its pharmacokinetics fitted one-compartment model.

KEY WORDS: Kemeishu liniment; terbinafine hydrochloride; salicylic acid; percutaneous absorption; pharmacokinetics; HPLC

克霉舒搽剂是广东医学院研制的外用抗真菌复方制剂，含盐酸特比萘芬(terbinafine hydrochloride，TBFH)和水杨酸(salicylic acid，SA)两种主药，以氮酮、丙二醇为促渗剂的乙醇溶液，临床主要用于治疗皮肤真菌病和头部脂溢性皮炎。TBFH 是一种新型的丙烯胺类高效广谱抗真菌药[1]，局部外用可渗透到达皮肤角质层，与角质细胞结合储存起来达到一定浓度而杀灭真菌。SA 是经典的抗真菌和去角质药，并能促进某些药物进入和蓄积在角质层，提高其他抗真菌药在角质层的浓度，从而发挥抗真菌的协同作用[2]。由 TBFH 和 SA 组成的抗真菌复方制剂克霉舒，组方新颖，发挥了两药间抗真菌的协同作用，又改变了传统外用抗真菌复方制剂由抗真菌药伍用皮质激素易造成滥用皮质激素的错误用药，是一类很有开发前景的新型有效的抗真菌复方制剂。前期动物实验研究证明克霉舒搽剂局部外用有很好的抗皮肤真菌效果，且对皮肤无明显刺激性。为探讨克霉舒中 SA

基金项目：广东省高校自然科学研究项目(Z02047)；湛江市科技攻关计划项目(020005)

作者简介：罗世英，女，硕士，讲师　Tel: (0759)2388588　E-mail: luosy76@126.com

和 TBFH 能否穿透皮肤进入血液及体内药动学，本实验建立了高效液相色谱法，测定家兔血浆中 SA 和 TBFH 浓度，计算两者的药动学参数，为克霉舒搽剂的新药报批提供资料。

1 材料与方法

1.1 仪器与试药

高效液相色谱仪(HP 1100，美国 HP 公司)，配自动进样器、DAD 二级管阵列检测器。TGL-16C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)，80-2 型漩涡混合器(上海手术器械厂)，B550 电子分析天平(上海民桥精密科学仪器厂)，婴儿秤，超低温冰箱(TCL 公司)。

克霉舒(广东医学院药理教研室，批号：031117，规格 10 mL:100 mg TBFH、300 mg SA)，TBFH 对照品(齐鲁制药厂，批号：20020614s，纯度：99.8%)，SA(批号：100106-200303，纯度：100%)和卡马西平(Car，批号：0142-9503，纯度：100%)对照品(中国药品生物制品检定所)，25%氢氧化四乙基铵(上海永生试剂厂)，甲醇(色谱纯)，磷酸、乙酸、正己烷、乙醚为分析纯。

精密称取 TBFH、SA、Car 对照品适量，分别置于 100 mL 量瓶中，甲醇溶解稀释定容至刻度，得 TBFH 1 $g\cdot L^{-1}$、SA 0.4 $g\cdot L^{-1}$、Car 0.4 $g\cdot L^{-1}$ 储备液，4 ℃冰箱保存。临用前用甲醇稀释为所需浓度。

1.2 实验动物

新西兰家兔 12 只，体重(2.0±0.10)kg，♀♂各半，广东医学院实验动物中心提供，实验动物许可证号：SCXK(粤)2008-0002。

1.3 色谱条件

SA：ODS_2 Hypersil 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相为甲醇-水-乙酸(56∶43∶1)，检测波长 301 nm，流速为 1 $mL\cdot min^{-1}$。TBFH：ODS_2 Hypersil 色谱柱(4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相为甲醇-水-5%氢氧化四乙基铵(90∶10∶0.3)，磷酸调节 pH 至 5，检测波长 282 nm，流速 1.0 $mL\cdot min^{-1}$。

1.4 血浆样品处理

SA 血样品处理：取 0.2 mL 血浆置于 1.5 mL 离心管中，加 0.8 mL 甲醇，再加 0.4 $g\cdot L^{-1}$ 的内标溶液 Car 储备液 10 μL，2 000 $r\cdot min^{-1}$ 漩涡混合 30 s，4 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，取上清 20 μL 进样。TBFH 血样品处理：取 1 mL 血浆置于 10 mL 离心管中，加 0.5 $moL\cdot L^{-1}$ NaOH 溶液 50 μL，摇匀，再加入正己烷-乙醚(1∶2)混合有机溶剂 6 mL(分两次提取)，2 000 $r\cdot min^{-1}$ 漩涡混合 2 min，2 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 5 min，取上清置 10 mL 离心管中，氮气吹干，临进样前用 300 μL 甲醇溶解，取上清 30 μL 进样。

1.5 实验方案

12 只家兔随机分成单次给药高、中、低剂量组，每组 4 只。称重，背部去毛，棉签沾取克霉舒擦剂涂布在家兔背部去毛皮肤上，涂药面积 10×15 cm^2，涂药后家兔皮肤用保鲜膜包裹胶布固定。单次给药高、中、低剂量组按 6.0 $mL\cdot kg^{-1}$(TBFH 60 $mg\cdot kg^{-1}$，SA 180 $mg\cdot kg^{-1}$)、4.0 $mL\cdot kg^{-1}$(TBFH 40 $mg\cdot kg^{-1}$，SA 120 $mg\cdot kg^{-1}$)、2.67 $mL\cdot kg^{-1}$(TBFH 26.7 $mg\cdot kg^{-1}$，SA 80 $mg\cdot kg^{-1}$)剂量给药。给药后 0，0.5，1，2，3，4，6，8，12，24 h 耳静脉采血。实验过程中，家兔自行活动和进食。每次采血 2.5 mL 置 10 mL 涂布肝素的离心管中，3 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min，取上层血浆 0.2，1.0 mL 分别置 1.5 mL 离心管和 10 mL 离心管中，−20 ℃冰箱中保存。

1.6 数据处理和药代动力学参数计算

PKS 1.0 药代动力学程序处理拟合血药浓度经时过程，所测数据以均数加标准差($\bar{x}\pm s$)表示，用 SPSS 11.5 统计软件进行统计描述和分析。

2 结果

2.1 血浆中盐酸特比萘芬和水杨酸浓度测定方法评价

2.1.1 方法专属性和检测限 在“1.3”的色谱条件，SA 和 Car 的分离度良好，SA 的保留时间约为 5.91 min，在 SA 和 Car 出峰处未见杂质干扰峰，见图 1，

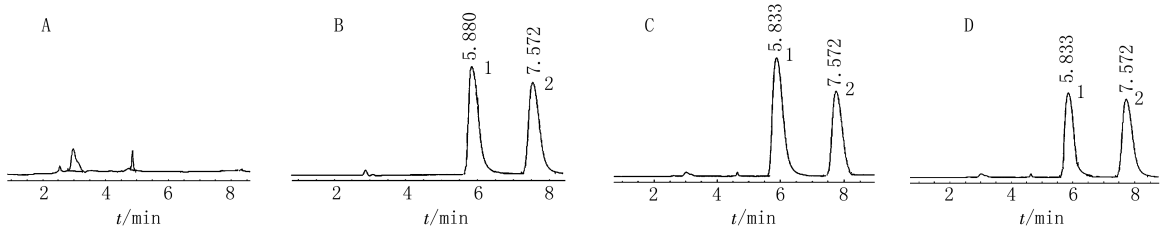

图 1 SA 色谱图

A−空白血浆；B−SA 与 Car 对照品(100 $\mu g\cdot mL^{-1}$)；C−SA 与 Car 加空白血浆(100 $\mu g\cdot mL^{-1}$)；D−低剂量组涂药 1 h 的血浆样品；1−SA；2−Car

Fig 1 Chromatograms of SA

A−blank plasma; B−standard of SA and Car (100 $\mu g\cdot mL^{-1}$); C−blank plasma spiked with SA and Car (100$\mu g\cdot mL^{-1}$); D−plasma sample of SA; 1−SA; 2−Car

SA 最低检测浓度 0.5 μg·mL^{-1}(当仪器响应信号强度与噪声强度之比为 3 时，确定此 SA 浓度为检测限)。TBFH 与杂质峰分离完全，且峰形较好，TBFH 的保留时间约为 8.76 min，见图 2，TBFH 最低检测浓度 0.05 μg·mL^{-1}(当仪器响应信号强度与噪声强度之比为 3 时，确定此 TBFH 浓度为检测限)。

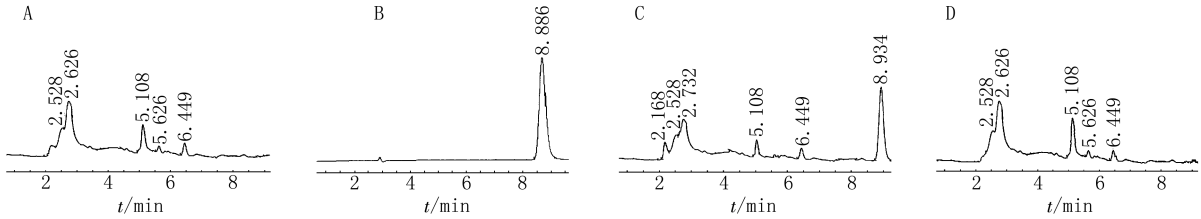

图 2 TBFH 色谱图

A-空白血浆；B-TBFH 对照品(5 μg·mL^{-1})；C-TBFH 加空白血浆(5 μg·mL^{-1})；D-高剂量组涂药 2 h 的血浆样品

Fig 2 Chromatograms of TBFH

A-blank plasma; B-standard of TBFH; C-blank plasma spiked with TBFH; D-plasma sample of BFH

2.1.2 线性关系 精密吸取已稀释的不同浓度 SA 对照品溶液，加入含 200 μL 家兔空白血浆的 1.5 mL 离心管中，制成 7 份浓度在 1～300 μg·mL^{-1} 内的不同浓度血浆样品，按“1.4”操作后依“1.3”测定，以血浆中 SA 的浓度对应各自的 SA 与 Car 峰面积比值进行线性回归，得 SA 的回归方程。精密吸取已稀释的不同浓度的 TBFH 对照品溶液，加入含 1 mL 家兔空白血浆的 10 mL 离心管中，制成 7 份浓度在 0.1～20 μg·mL^{-1} 内的不同浓度血浆样品，按“1.4”操作后依“1.3”测定，以血浆中 TBFH 的浓度对应峰面积进行线性回归，得 TBFH 性回归方程。回归方程见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equations and calibration range

药物	回归方程	r	线性范围/μg·mL^{-1}
SA	Y = 0.022 122+0.216 121 ρ	0.996	1～300
TBFH	Y = −329.20+113 824.56 ρ	0.991	0.1～20

2.1.3 精密度实验与方法回收率 在 200 μL 空白血浆中加入不同浓度的 SA 对照品溶液，配成浓度为 300，100，5 μg·mL^{-1} 的 3 组血浆样品各 10 份；在 1 mL 空白血浆中加入不同浓度的 TBFH 对照品溶液，配成浓度为 20，5，0.2 μg·mL^{-1} 的 3 组血浆样品各 10 份。按“1.4”处理后依“1.3”测定，第 1 天取不同浓度的 SA 和 TBFH 血样各测定 5 份，代入回归方程计算测定的浓度，求得 SA 和 TBFH 日内精密度(n=5)，然后每天测定 1 份，连续 5 d，代入回归方程计算测定的浓度，求得 SA 和 TBFH 求得日间精密度(n=5)。将日内精密度验中浓度为 300，100，5 μg·mL^{-1} 的 SA 血浆样品测得的浓度与实际浓度比较，求出高、中、低浓度 SA 的方法回收率(n=5)；将日内精密度实验中浓度为 20，5，0.2 μg·mL^{-1} 的 TBFH 血浆样品测得的浓度与实际浓度比较，求出高、中、低浓度 TBFH 的方法回收率(n=5)。结果见表 2。

表 2 血浆中水杨酸和盐酸特比萘芬的精密度及回收率(n=5，$\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Precision and recovery of SA and TBFH in plasma (n=5，$\bar{x} \pm s$)

药物	浓度/μg·mL^{-1}	日间精密度/%	日内精密度/%	方法回收率/%
SA	300	7.82	6.19	96.91±7.58
	100	4.03	3.02	96.18±3.88
	5	6.84	4.22	97.93±6.70
TBFH	20	7.24	4.72	92.83±6.72
	5	4.63	4.35	90.13±4.17
	0.2	8.53	5.64	86.21±7.35

2.1.4 样品提取回收率 配制浓度 300，100，5 μg·mL^{-1} 的 SA 标准血浆各 5 份，按“1.4”处理后依“1.3” 测定，记录 SA 峰面积。另配制含 SA 浓度分别 300，100，5 μg·mL^{-1} 的流动相溶液各 1 mL，直接进样 20 μL，记录 SA 峰面积。计算血浆样品和流动相样品中 SA 的峰面积百分比，得 SA 的提取回收率分别为 91.5.5%，94.2%，89.6%。配制浓度 20，5，0.2 μg·mL^{-1} 的 TBFH 标准血浆各 5 份，按“1.4”处理后依“1.3” 测定，记录 TBFH 峰面积。另配制含 TBFH 浓度 20，5，0.2 μg·mL^{-1} 的流动相溶液各 1 mL，直接进样 30 μL，记录 TBFH 峰面积。计算血浆样品和流动相样品中 TBFH 的峰面积百分比，得 TBFH 的提取回收率分别为 76.4%，70.6%，69.2%。

2.2 动力学参数

在本实验条件下，单次给药高、中、低剂量组家兔血浆中均检测到 SA，血浆样品色谱图见图 1。不同剂量组 SA 时–药浓度数据采用 PKS1.0 程序进行数据处理和曲线拟合，求得主要药动学参数，其

拟合曲线图见图 3，药动学参数见表 3。SA 透皮吸收后在家兔体内药动学行为符合一室开放模型，高剂量组 SA 的 T_{max} 后延，C_{max} 增大，AUC 增大，$T_{1/2}$ 延长，跟中、低剂量组比较差异有显著性(P<0.05)。在本实验条件下，各组家兔血浆中均未测得 TBFH，血浆样品色谱图见图 2。

表 3 单次给药后 SA 的主要药代参数(n=3，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of SA after a ingle dose(n=3，$\bar{x}\pm s$)

剂量组	T_{max} /h	C_{max} /μg·mL^{-1}	$T_{1/2}$ /h	$T_{1/2Ka}$ /h	AUC /μg·h·mL^{-1}	CL/F /L·h^{-1}
低剂量组	2.73±0.30	25.24± 9.21	5.74±3.29	1.65±1.43	296.80±159.23	0.42±0.17
中剂量组	3.48±0.16	25.32±11.05	4.60±1.99	2.01±0.14	284.47± 41.21	0.25±0.04
高剂量组	5.86±1.72$^{1)2)}$	37.47± 4.31$^{1)2)}$	13.28±3.84$^{1)2)}$	1.52±0.68	961.23±341.59	0.19±0.08

注：高剂量组与低剂量组比较，$^{1)}P$<0.05；高剂量组与中剂量组比较，$^{2)}P$<0.05

Note: Compared with low dose group, $^{1)}P$<0.05, compared with medium dose group, $^{2)}P$<0.05

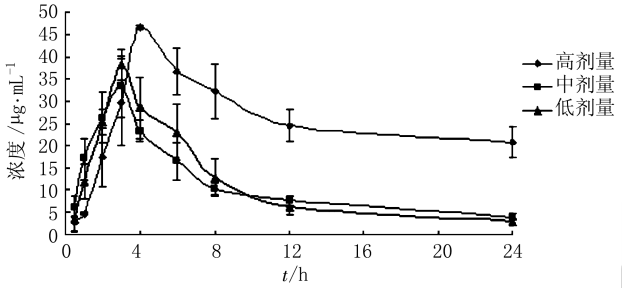

图 3 单剂量皮肤给药 SA 血药浓度-时间拟合曲线

Fig 3 Mean plama concentration-time curves of SA after a single dose

3 讨论

关于 SA 在生物样品中的分离和测定，报道较多，处理方法也较简单，近年来国内外大都采用 HPLC 进行生物样品中 SA 的测定[3]。本实验中，采用甲醇为蛋白沉淀剂进行血样的处理，方法步骤简便，重现性好，专属性强，提取回收率在 89%以上，方法相对回收率达 97.91%~96.15%，RSD 均小于 10%，符合生物样品的分析要求。

血浆中 TBFH 的测定方法国内外报道较少，大都采用 HPLC，碱化血浆后，采用有机溶剂萃取-反提取的方法进行血样预处理，步骤烦琐，药物提取损失率大[4-5]。笔者对以往文献报道的 TBFH 血样预处理方法进行了筛选、改进，曾分别用 0.5 moL·mL^{-1} NaOH 和 pH 9 的硼砂缓冲液碱化血浆后，再分别用正己烷、正己烷-乙醚混合有机溶剂、乙醚提取，再用 0.5 moL·mL^{-1} 的硫酸溶液-异丙醇(85∶15)混合液反提取。发现反提取后，虽然杂质峰减少，但 TBFH 的损失率大、灵敏度降低。0.5 moL·mL^{-1} NaOH 碱化血浆后，正己烷-乙醚提取后杂质峰相对较小，提取率较高，提取回收率在 69%~76%，且正己烷-乙醚挥发快，费时少。本实验 TBFH 的测定，方法回收率达 86.21%~92.83%，灵敏度较高，符合生物样品的分析要求。

文献报道[6-9]，TBFH 皮肤局部用药后，穿透角质层与皮肤角质细胞紧密结合并储存在角质层，在皮肤病灶局部发挥杀灭真菌的作用，很少脱离角质细胞进入血液，在血液中其浓度非常低，外用 TBFH 8 d 后，在血浆中测得 TBFH 的浓度为 ng·mL^{-1} 水平，至今尚未有确切证据说明 TBFH 长期使用有血浆蓄积作用。本实验中各组家兔血浆中均未检测到 TBFH，其血浆浓度小于 0.05 μg·mL^{-1}，说明 TBFH 几乎不透过皮肤进入到血液，连续使用无蓄积性，与文献相符。也说明克霉舒搽剂皮肤局部给药后，TBFH 对机体的全身毒性反应小，符合外用药的安全要求。

SA 具有破坏角质层的作用，能穿透角质层屏障少量进入血液。SA 是一室模型药物，能迅速分布到全身组织，$T_{1/2}$ 随剂量的增大而延长[10]。本实验克霉舒搽剂单剂量给药透皮吸收实验中，SA 透皮吸收少，吸收后在家兔体内的药代动力学行为符合一室开放模型，与文献相符[10]。高、中、低剂量组 SA 的 $T_{1/2ka}$ 经 t 检验，P>0.05，无显著性，提示克霉舒搽剂在本次实验给药剂量范围内，SA 的透皮吸收半衰期与剂量无关，是一级动力学吸收，与文献相符[10]。高、中、低剂量组的 T_{max}、C_{max}、$T_{1/2}$ 经 t 检验，高剂量组与低、中剂量组的参数差异有显著性(P<0.05)，提示随着克霉舒搽剂剂量增加到某一值时，SA 透皮吸收后在家兔体内 T_{max} 延后，C_{max} 增大，$T_{1/2}$ 延长；AUC 与剂量之间不成正比例增长，这些结果说明随着剂量增大达到一定值时 SA 出现零级动力学消除，与文献相符[10]。本实验中超大剂量(高剂量组)给予克霉素搽剂时，水杨酸出现零级动力学消除，随着浓度的下降转为一级动力学消除，故其 $T_{1/2}$ 比低、中剂组明显延长，本实验中为(13.28±3.84)h。本实验中低、中剂量克霉舒搽剂

皮肤局部给药后 SA 的 $T_{1/2}$ 约为 5 h，24 h 内在体内基本消除干净；且在本实验的后续试验即家兔蓄积实验中，采用高剂量每天皮肤给药，连续 7 d，发现 3 d 后 SA 在体内的峰谷浓度基本在同一水平，这些都说明 SA 在体内无蓄积，与文献相符[10]。克霉舒搽剂是皮肤外用制剂，给药方法为在皮肤患处涂擦，2 次·d^{-1}，给药剂量较小，根据人与家兔的换算系数换算，人的给药剂量相当于本实验中的低剂量，结合本实验的结果说明克霉舒搽剂给药后不会出现水杨酸血药浓度过高的现象。

本实验结果表明，克霉舒搽剂皮肤局部给药后，SA 和 TBFH 在体内浓度低，对机体的全身毒性反应小，符合外用药的安全要求。

REFERENCES

[1] ROBERTS D T. Oral terbinafine(lamisil) in the treatment of fungal infections of the skin [J]. Dermatology, 1997, 194(1): 39-37.

[2] LBWOHL M. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis [J]. Int J Dermatol, 1999, 8(1): 16-24.

[3] LI J, WANG J Z, ZHANG J, et al. RP-HPLC determination of the activity of aspirin esterase in human plasma [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2007, 27 (9):1382-1385.

[4] DENOUEL J. Determination of terbinafine and its desmethyl metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr B, 1995, 663(2): 353-361.

[5] CHEN T F, YU X Y, LIN S G, et al. Transdermic absorption of terbinafine liquor [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学), 2004, 9 (10) : 1472-1474.

[6] JENSEN J C. Pharmacokinetics of lamisil in human [J]. J Dermato Treat, 1990, 14(2): 1-15.

[7] CHEN R Z, YUAN C. Distribution of terbinafine in naiI of volunteers [J]. Chin J Clin Pharm (中国临床药学杂志), 1999, 8(2): 89-91.

[8] LIU W, LI R Y, CHEN Q, et al. Levels of terbinafine in nail samples during and after treatment of fingernail onychomycosis with terbinafine for 4 weeks [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 1999, 15 (6) : 435-439.

[9] JENSEN J C. Clinical pharmacokinetics of lamisil in humans [J]. J Dermatol Treat, 1990, 14(2):15-18.

[10] RUI Y C. Modern Pharmacology (现代药物学) [M]. Beijing: People's Military Surgeon Publishing House, 1999: 430.

收稿日期：2009-05-19

http://www.cjmr.com