

阿苯达唑-盐酸盐的制备、表征及口服生物利用度的评价

钟雪萍¹, 章勇¹, 郭宇斐¹, 胡春晖^{1, 2*}, 严海英^{1*}

1. 青海大学 医学部, 青海 西宁 810001

2. 三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

摘要: 目的 制备阿苯达唑 (ABZ) -盐酸 (HCl) 盐 (ABZ-HCl), 并对盐的固态性质、体外溶出行为、稳定性和生物利用度进行评价。方法 溶剂蒸发法制备结晶的 ABZ-HCl, 使用核磁共振氢谱 (¹H-NMR) 对制备的 ABZ-HCl 进行验证, 通过粉末 X 射线衍射 (PXRD)、动态水吸附 (DVS)、热重分析 (TGA) 和差示扫描量热法 (DSC) 进行固态性质的表征; 对药物盐进行表观溶解度和固有溶出速率 (IDR) 的测定以观察其在不同 pH 条件下溶解度和溶出速率; 进行了 ABZ-HCl 在强光照射 (4 500 ± 500 lx)、高湿 (92.5% ± 5% RH) 和高温条件 (50 ± 2) °C, 以及加速试验条件 (40 °C、75% ± 5% RH) 的稳定性研究; 评价 ABZ、ABZ-HCl (25 mg·kg⁻¹) 在大鼠体内的药动学行为差异。结果 通过 ¹H-NMR 证实了 ABZ-HCl 的形成; ABZ 和 ABZ-HCl 的 PXRD 图谱出现显著差异; DVS 实验结果表明, ABZ 原药的吸水性差, 在 90% 相对湿度 (RH) 时吸水量仅为 3.86%, 且吸附与解吸附曲线基本重合, 而 ABZ-HCl 在开始的 0~20% RH 范围内迅速吸收水分, 随后质量缓慢增加, 在 RH 达到 90% 时吸水量为 37.65%, 在解吸过程中, ABZ-HCl 的吸附曲线和解吸曲线不一致, 存在滞后现象; TGA 和 DSC 实验结果表明, 2 种物质均无吸附水, ABZ-HCl 较 ABZ 熔点降低; 体外溶出实验结果显示 ABZ-HCl 的表观溶解度和 IDR 分别为 ABZ 的 11.8、10.3 倍; ABZ-HCl 表现出良好的物理稳定性。体内药动学结果显示, 与 ig ABZ 原料相比, ABZ-HCl 的 AUC_{0~24h} 和 C_{max} 均显著提高, 分别提高了 8.8 和 6.9 倍。结论 所制备的 ABZ-HCl 可改善 ABZ 的溶解性能和口服生物利用度, 且具有良好的物理稳定性。

关键词: 阿苯达唑; 盐酸盐; 固体性质; 溶解度; 稳定性; 生物利用度

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 03-0557-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.03.013

Preparation, characterization and evaluation of oral bioavailability of albendazole hydrochloride

ZHONG Xueping¹, ZHANG Yong¹, GUO Yufei¹, HU Chunhui^{1, 2}, YAN Haiying¹

1. Medical College of Qinghai University, Xining 810001, China

2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Xining 810016, China

Abstract: Objective Albendazole (ABZ) hydrochloric acid (HCl) salt (ABZ-HCl) was prepared, and the solid state properties, dissolution behavior *in vitro*, stability and oral bioavailability of the salt were evaluated. **Method** Crystallized ABZ-HCl was prepared by solvent evaporation method, and the prepared ABZ-HCl was validated by ¹H-NMR. Solid state properties were characterized by powder X-ray diffraction (PXRD), dynamic water adsorption (DVS), thermogravimetric analysis (TGA), and differential scanning calorimetry (DSC). Measured the apparent solubility and intrinsic dissolution rate (IDR) of drug salts to observe their solubility and dissolution rate under different pH conditions. We conducted stability studies on ABZ-HCl under strong light irradiation (4500 ± 500 lx), high humidity (92.5% ± 5% RH), high temperature conditions (50 ± 2) °C, and accelerated test conditions (40 °C, 75% ± 5% RH). Evaluated the pharmacokinetic behavior differences of ABZ and ABZ-HCl (25 mg·kg⁻¹) in rats.. **Results** The formation of ABZ-HCl was confirmed by ¹H-NMR. There was a significant difference in the PXRD spectra between ABZ and ABZ-HCl. The DVS experimental results showed that the water absorption of ABZ raw material was poor, with a water absorption rate of only 3.86% at 90% relative humidity (RH), and the adsorption and desorption curves basically overlapped.

收稿日期: 2023-11-23

基金项目: 青海省基础科学研究计划项目 (2022-ZJ-748)

第一作者: 钟雪萍, 研究方向为物理药剂学。E-mail: zhongxueping2021@163.com

*通信作者: 胡春晖, 研究方向为物理药剂学。E-mail: chunhuihu@hotmail.com

严海英, 研究方向为天然药物中有效成分的研究。E-mail: 447182774@qq.com

However, ABZ-HCl quickly absorbed water in the initial 0-20% RH range, and then slowly increased in mass. When RH reached 90%, the water absorption rate was 37.65%. During the desorption process, the adsorption and desorption curves of ABZ-HCl were inconsistent, and there was a lag phenomenon. The results of TGA and DSC experiments showed that both substances had no adsorbed water, and the melting point of ABZ-HCl was lower than that of ABZ. The results of *in vitro* dissolution experiments showed that the apparent solubility and IDR of ABZ-HCl were 11.8 and 10.3 times higher than those of ABZ, respectively. ABZ-HCl exhibited good physical stability. The *in vivo* pharmacokinetic results showed that compared with the ig ABZ raw material, the AUC_{0-24h} and C_{max} of ABZ-HCl were significantly increased, by 8.8 and 6.9 times, respectively. **Conclusion** The prepared ABZ-HCl can improve the solubility and oral bioavailability of ABZ, and has good physical stability.

Key words: albendazole; hydrochloride; solid state properties; solubility; stability; oral bioavailability

阿苯达唑(ABZ)是一种广谱苯并咪唑类抗寄生虫药,可广泛用于治疗棘球蚴、丝虫、绦虫和鞭虫等多种寄生虫感染^[1-3],于1982年首次批准作为驱虫药物用于人类^[4]。ABZ不仅是世界卫生组织(WHO)确定为治疗全身寄生虫感染的基本药物,同时更是包虫病临床治疗的首选药物。

根据生物药剂学分类系统(BCS),ABZ属于BCS II类药物,表现为低溶解度(25 °C时ABZ在水中溶解度为 $0.0228 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高渗透性($\log P$ 2.54)^[5]。由于ABZ特殊的理化性质,导致血药浓度低,其在人体内的口服生物利用度低于5%^[5],极大地限制了药物的应用和临床疗效。因此提高ABZ的溶解度对其临床应用非常重要,一些药剂学技术被用来尝试提高ABZ的水溶性,包括固体分散体^[6]、纳米晶体^[7]、脂质体^[8]、包合物^[9]和自乳化给药系统^[10]等。但由于载药效率较低、表面活性剂用量过多、制备工艺复杂、稳定性未知等原因,限制了药物制剂的进一步应用或工业化生产。

在制药工业中,使用合适的反离子形成盐被认为是解决化合物低溶解度问题的最理想的解决方案之一,同时,成盐也是一种简单、易于规模化且更具有经济效益的技术,是获得更高溶解度和溶出速率的有效方法。目前美国食品药品监督管理局(FDA)批准的所有活性药物成分(API)中约有一半都是盐的形式^[11]。然而,当原料药转化为盐时,药物相应的物理化学性质会受到影响,如温度、湿度或药物赋形剂会影响晶体的稳定性^[12],因此了解药物盐的固态特性和稳定性对于评价上市药物的功效和安全性至关重要。

本研究通过溶剂蒸发法制备了ABZ-盐酸(HCl)盐(ABZ-HCl),使用核磁共振氢谱(¹H-NMR)、粉末X射线衍射(PXRD)、动态水吸附(DVS)、热重分析(TGA)和差示扫描量热法(DSC)研究了ABZ-HCl的性质。通过表观溶解度实验研究了ABZ原型药物及其盐在水溶液和不

同pH中的溶解行为,并进行固有溶出速率(IDR)的测定以观察药物盐相较于原料药溶出速率的改善,同时在不同条件下对ABZ-HCl型进行了稳定性考察。此外,还对ABZ-HCl的体内药动学进行了研究,以探究其口服给药后生物利用度的改善情况。

1 材料

1.1 主要仪器

AVANCE NEO 600 核磁共振光谱仪;*-D-max2500PC 射线衍射仪(日本理学);动态蒸汽吸附分析仪(Surface Measurement Systems, UK);STA449 F3 同步热分析仪(德国耐驰仪器制造有限公司);Agilent 1260 Series 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司);DHG-9070A 恒温箱(上海一恒科技仪器有限公司);傅里叶变换超高分辨液质联用仪(Thermo Fisher, Dionex UltiMate 3000);N-1300 型 EYEL4 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司)。

1.2 主要试剂

ABZ 购自北京偶合科技有限公司,批号 C10080946,质量分数 98%,规格 A822534-5 g;HCl 购自上海麦克林生化科技股份有限公司;甲醇(分析级)、氯仿(分析级)均购自天津市大茂化学试剂厂。

1.3 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠,6~8 周龄,雌雄各半,雄鼠体质量分别为 203.3、199.5、200.6、198.0、202.7、203.6 g,雌鼠体质量分别为 189.5、192.1、188.9、192.7、193.8、187.9 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号 SCXK(京)2019-0010,伦理学审查批号 2019-81960641,饲养于青海省高原医学中心重点实验室。

2 方法

2.1 ABZ-HCl 的制备

称取等摩尔比的 ABZ 和 HCl,溶解于氯仿-甲醇(7:3)溶液中,室温下磁力搅拌 2 h,将制备的溶液

通过旋转蒸发在 50 °C、80 r·min⁻¹ 条件下旋转至溶剂蒸发,真空干燥过夜、研磨,得到 ABZ-HCl 粉末。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 精密称取 0.96 mg ABZ 至 10 mL 量瓶中,甲醇定容得质量浓度为 96.00 μg·mL⁻¹ 的溶液,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液备用。

2.2.2 供试品溶液的配制 取适量的 ABZ-HCl 至 10 mL 量瓶中,甲醇定容,ABZ 质量浓度为 101.00 μg·mL⁻¹,过 0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液备用。

2.3 色谱条件

使用高效液相色谱法(HPLC)测定药物浓度。色谱条件:流动相甲醇-水(80:20),十八烷基硅烷色谱柱(Diamonsil C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm)作为固定相,紫外波长 295 nm,体积流量 1 mL·min⁻¹,柱温箱温度 30 °C,进样量 20 μL。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性 取 ABZ 对照品溶液和 ABZ-HCl 供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样检测。

结果显示 ABZ 与 ABZ-HCl 的主峰保留时间一致,见图 1,表明该方法专属性良好。

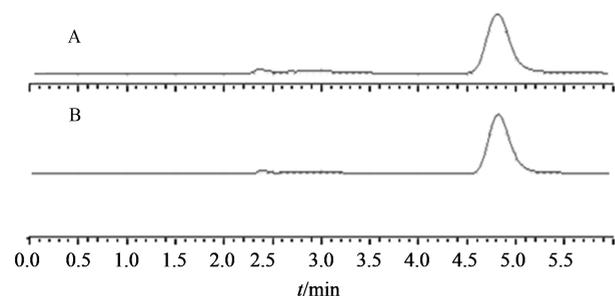


图1 ABZ(A)、ABZ-HCl(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of ABZ (A) and ABZ-HCl (B)

2.4.2 线性范围 精密称取 0.96 mg ABZ 于 10 mL 量瓶中,甲醇定容得到质量浓度为 96.00 μg·mL⁻¹ 的储备液。将储备液分别用甲醇稀释 2、5、10、20、50、100、200 倍,得到质量浓度为 48.00、19.20、9.60、4.80、1.92、0.96、0.48 μg·mL⁻¹ 的溶液,按“2.3”项下色谱条件进样。以峰面积为纵坐标,ABZ 质量浓度为横坐标,得到回归方程 $Y=24.057 X-15.130$, $R^2=0.999 8$,线性范围为 0.48~96.00 μg·mL⁻¹。

2.4.3 精密度试验 选取低、中、高质量浓度(0.48、19.20、96.00 μg·mL⁻¹)的 ABZ 甲醇溶液,按“2.3”项下色谱条件进样,重复进样 6 次,连续测定 3 d,计算 ABZ 峰面积的 RSD,考察日内精密度和日间精密度。

日内精密度 RSD 为 0.78%、1.33%、1.52% ($n=6$); 日间精密度 RSD 分别为 0.94%、1.74%、0.39% ($n=6$),表明该方法精密度良好。

2.4.4 重复性试验 平行制备 6 份供试品溶液,按“2.3”项下色谱条件进样测定,记录 ABZ 的峰面积并计算 RSD。ABZ-HCl 中 ABZ 峰面积 RSD 为 1.65% ($n=6$),表明方法的重复性良好。

2.4.5 稳定性 平行制备 6 份供试品溶液,室温放置,于 0、1、3、6、12、24、48 h 取样,按“2.3”项下色谱条件进行测定,记录 ABZ 的峰面积并计算 RSD。ABZ 峰面积 RSD 为 1.13% ($n=6$),表明供试品溶液在 48 h 内保持稳定。

2.4.6 加样回收率 分别平行取 6 份供试品溶液与 ABZ 对照品混合,按“2.3”项下色谱条件进行测定,得到 ABZ 的含量后计算回收率。ABZ-HCl 中 ABZ 的加样回收率为 100.43%,RSD 为 1.59% ($n=6$),表明建立的方法符合实验要求。

2.5 ABZ-HCl 的表征

2.5.1 ¹H-NMR ¹H-NMR 光谱仪工作频率为 600 MHz。将固体样品完全溶解于氘代 DMSO 中,在 25 °C 下对制备好的样品进行分析。

为了确定所制备成功的样品粉末为 ABZ-HCl,采用 ¹H-NMR 得到纯药物和药物盐的 NMR 谱图。结果可得 ABZ 的各个质子峰归属情况如下:¹H-NMR (600 MHz, DMSO), δ 11.65 (s, 1H, NH), 7.13 (d, 1H, Ph-4H), 7.46 (d, 1H, Ph-3H), 7.45 (s, 1H, Ph-2H), 0.98 (d, 3H, CH₃), 3.77 (s, 3H, CH₃), 1.51 (d, 2H, CH₂), 2.90 (t, 2H, CH₂)。同时得到 ABZ-HCl 0.9 g,产率 87%。

ABZ-HCl 的各个质子峰归属情况如下:¹H-NMR (600 MHz, DMSO), δ 12.19 (s, 1H, NH), 7.13 (d, 1H, Ph-4H), 7.46 (d, 1H, Ph-3H), 7.45 (s, 1H, Ph-2H), 0.98 (d, 3H, CH₃), 3.79 (s, 3H, CH₃), 1.54 (d, 2H, CH₂), 2.93 (t, 2H, CH₂)。ABZ 结构中的酰胺质子是可能的相互作用位点,ABZ 在 11.65×10^{-6} 出现酰胺基峰,而 ABZ-HCl 的酰胺基峰在 12.19×10^{-6} 处,较 ABZ 偏移了 0.54×10^{-6} 。¹H-NMR 所得的结果验证了盐的形成。

2.5.2 PXRD PXRD 是建立新晶体形成的最常用技术^[14-15],可进一步证实由于 ABZ 和酸之间的反应而形成的新晶相,从而研究药物盐分子的晶体学性质。称取适量样品,采用 Cu-K α 靶测定 [$\lambda=0.154$ nm (1.54 Å)],扫描范围 $2\theta=5^\circ \sim 35^\circ$,扫描步长 0.01°,扫描速度 $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$,电压 40 kV,电流 200 mA。

图2-A显示纯ABZ在6.83°、11.76°、17.81°、29.91°(2 θ)处显示出尖锐的衍射峰,而ABZ-HCl特征衍射峰的主要2 θ 值为7.21°、10.73°和17.91°。ABZ和ABZ-HCl的PXRD图谱出现显著差异,说明与纯ABZ相比,所制备的盐以不同的结构结晶,即ABZ-HCl为新的结晶体。

2.5.3 DVS 所有样品的水吸附等温线在25℃下测定。在吸附试验之前,首先将所有样品在0相对湿度(RH)保持平衡以去除吸附水,然后以10% RH将RH从0% RH增加到90% RH,再从90% RH逐步解吸到10% RH。平衡标准是 $dm/dt < 0.002\% \cdot \text{min}^{-1}$ 持续10 min。

如图2-B所示,ABZ和ABZ-HCl随着湿度的增加而连续吸附水分,其中ABZ原药的吸水性差,在90% RH时吸水量仅为3.86%,且吸附与解吸曲线基本重合。而ABZ-HCl在开始的0~20% RH范围内迅速吸收水分,随后质量缓慢增加,在RH达到90%时吸水量为37.65%。在解吸过程中,ABZ-HCl的吸附曲线和解吸曲线不一致,存在滞后现象,即吸湿过程不可逆^[16]。导致迟滞现象的主要原因可以从物料的化学组成或微观结构2方面解释,在化学结构方面,由于分子中存在羟基等亲水性基团,在解吸附过程中水分子与羟基形成较强的分子间

作用力阻碍了水分子解吸附;在微观结构方面,ABZ-HCl可能在干燥过程中可能形成“墨水瓶”效应^[17],即进入到“墨水瓶”内部的水分很难通过瓶颈(微孔)发生解吸附,因此表现为在吸湿等温线中解吸附曲线位于吸附曲线上方。

2.5.4 TGA 在铝盘中称量5~10 mg样品,在同步热分析仪中进行分析。温度范围为30~250℃,加热速率 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$,氮气流量 $50 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

曲线如图2-C所示,TGA可测定化合物的失水率和降解温度^[18],结果显示,ABZ和ABZ-HCl在100℃之前均无失重现象,说明2种物质均无吸附水存在。

2.5.5 DSC 采用天平称量5~10 mg样品,装入铝盘中,在同步热分析仪中进行分析,从30℃开始以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至250℃。

纯ABZ和ABZ-HCl在TGA中失重分别发生在192.3℃和163.4℃左右,二者在图2-D中分别于190.5℃和162.1℃左右出现显示出特征性的吸热峰,说明ABZ和ABZ-HCl在熔融的同时也发生了降解。盐的熔点较低可能是酸与药物结合后可以打破药物本身的分子间作用力,从而降低晶格能,导致药物分子在与溶解介质接触时易解离,从而导致盐的溶解性能更好^[19-20]。

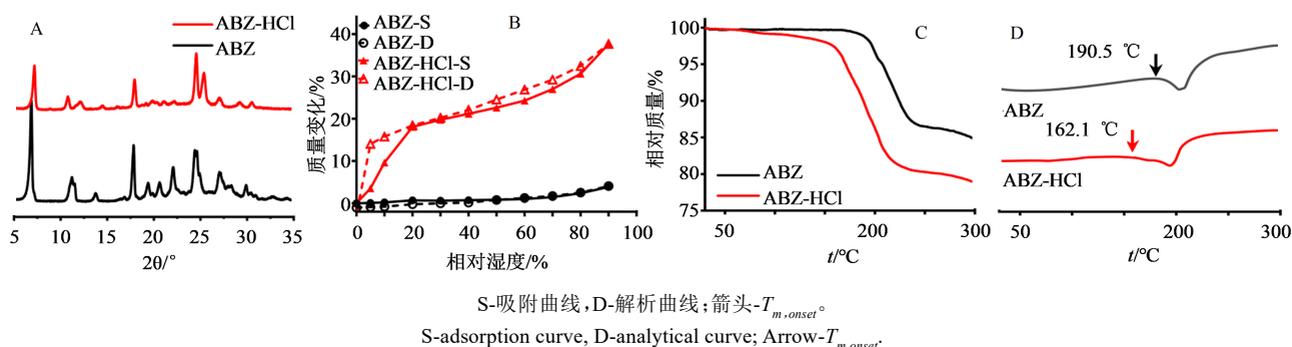


图2 ABZ、ABZ-HCl的PXRD图谱(A)、DVS图(B)、TGA图(C)和DSC图(D)

Fig. 2 PXRD pattern (A), DVS (B), TGA (C), and DSC (D) curves of ABZ and ABZ-HCl

2.6 表观溶解度

为了比较ABZ和ABZ-HCl的表观溶解度,取30 mg的固体样品添加在含有10 mL HCl缓冲液(pH=2.0)、磷酸盐缓冲液(pH=6.8)、磷酸盐缓冲液(pH=7.4)和蒸馏水的试管中,在受控温度(37 ± 1)℃下以 $100 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振动溶液。分别在0.5、1.0、4.0、12.0、24.0、48.0 h的时间间隔取样,离心得到上清液,用甲醇稀释一定倍数后采用HPLC测定药物浓度。

通过对给定原料药进行晶体结构修饰的最终

目标是提高其基本的理化性质,如溶解度和溶出速率,因为它们会直接影响药物的生物利用度^[21]。在37℃下评价盐的表观溶解度,图3分别为ABZ和ABZ-HCl在pH 2.0、6.8、7.4缓冲液和蒸馏水溶液中获得的动态溶解图。

溶解度数据表明,2种固体形式在12 h时均基本达到平衡。ABZ-HCl在不同pH条件下的溶解度均明显高于ABZ,在pH 2.0、6.5、7.4缓冲液和蒸馏水中,ABZ-HCl的溶解度约为ABZ的2 100、1 160、1 425和6 625倍。ABZ-HCl在所有介质中的溶解

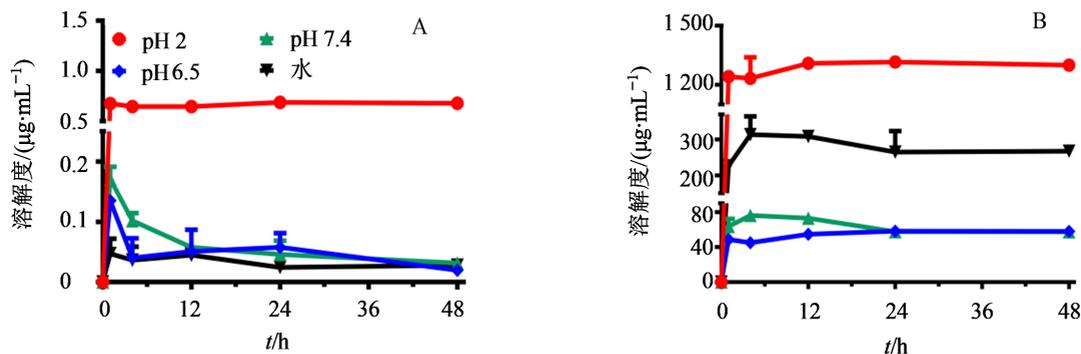


图3 ABZ(A)和ABZ-HCl(B)在不同pH条件下的表观溶解度图谱

Fig. 3 Apparent solubility of ABZ (A) and ABZ-HCl (B) under different pH conditions

度均显著高于ABZ,显示了相对于原料药的优势。

同时,当溶剂从酸性环境变为碱性环境时,可以发现2种形式的溶解度均减小。这种现象主要归因于ABZ是 $pK_a=9.51$ 的碱,随着pH值的减小,羧酸基团趋于去质子化,从而增加了分子的溶解度。

2.7 IDR

药物的固有溶出是指一定量的药物在一定介质中,单位面积和单位时间内药物溶出的质量,通常表示为IDR。IDR与溶解速率有关而非溶解平衡,它比溶解度更能反映药物的溶解性能,与体内溶出动力学的相关性更大^[22]。

称取样品粉末140 mg,使用小型手动压片机进行压片。压力10 MPa,时间持续120 s,将压好的药片用石蜡密封在注射器管中,只暴露一个表面于含20 mL溶解介质(37 °C、pH 2.0的HCl溶液和pH 7.4的PBS溶液)中,在磁力搅拌($n=3$)下每1分钟取0.30 mL溶液,共取6 min,取完后 $13\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min,用甲醇稀释一定倍数后在HPLC上测定药物浓度。

与原型ABZ相比,ABZ-HCl的溶出行为有所增加。如图4,ABZ和ABZ-HCl在pH 2缓冲液中的

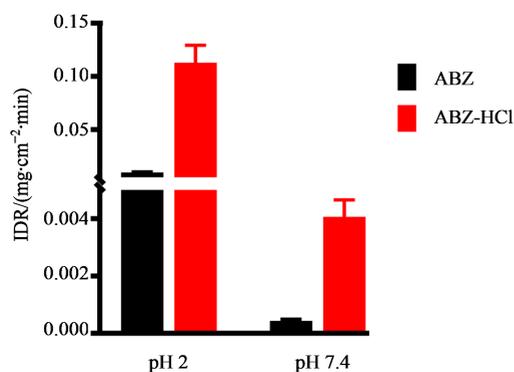


图4 ABZ和ABZ-HCl的固有溶出行为

Fig. 4 Intrinsic dissolution rate of ABZ and ABZ-HCl at pH 2 and pH 7.4

IDR分别为 $0.009\ 6$ 、 $0.112\ 8\ \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$,提高约11.8倍。ABZ和ABZ-HCl在pH 7.4缓冲液中的IDR分别为 $0.000\ 4$ 、 $0.004\ 1\ \text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$,提高约10.3倍。

在上述2种介质中ABZ-HCl的溶出效果均最好。盐的溶出效果更好可以归结于以下原因:(1)晶格能的改变:晶格能的改变或受如共聚体的溶解度的影响等。在DSC中发现盐的熔点较低,晶格的破坏导致药物分子在与溶出介质接触时更容易解离。(2)局部微环境pH值:局部微环境pH值对IDR有重要的影响,HCl的 pK_a 为 -7.00 ,使用适当的抗衡离子为盐提供最佳pH可提高药物的溶出速率,而HCl提供了更酸性的pH值^[23-24]。

2.8 固态稳定性

2.8.1 影响因素试验 根据《中国药典》进行影响因素试验和加速试验。影响因素试验包括高温试验、高湿试验和强光照射试验。高温试验设置温度为 $50\ ^\circ\text{C}$;高湿试验是将样品开口置于 $25\ ^\circ\text{C}$ 、92.5% RH(饱和硝酸钾溶液)的恒湿密闭容器中;强光照射试验是将样品开口放置于光照强度为 $(4\ 500\pm\ 500)\ \text{lx}$ 的条件下。分别于第0、5、10天取样,根据“2.5.2项”的PXRD分析和“2.7项”的IDRs分析考察样品的晶型和溶出行为是否有明显变化。

图5分别为ABZ和ABZ-HCl在不同条件不同时间下的PXRD图谱,从图中可以发现ABZ-HCl均比较稳定,在不同条件下放置一段时间后的特征衍射峰均无显著变化,且未发生转晶现象。

图6-A、B为第0、5、10天原料药和ABZ-HCl在不同条件下的IDRs图。与ABZ原料药在高温条件下放置10 d后IDR发生改变相比,ABZ-HCl在强光照射、高湿和高温条件下第5天和第10天的溶出速率与第0天相比均无统计学差异。说明在强光、高湿和高温条件下,ABZ-HCl的物理稳定性良好,依

旧保持着良好的溶出性能。

2.8.2 加速试验 将样品开口置于温度为40℃、RH为75%(饱和氯化钠溶液)条件下,于第0天、第3个月、第6个月取样,根据“2.5.2”项的PXR D分析考察样品是否发生变化。

ABZ和ABZ-HCl的PXR D结果分别如图7所示,发现ABZ-HCl在40℃、(75%±5%)RH下保存长达6个月的PXR D图谱均未发生改变,说明ABZ-HCl的物理稳定性良好,表现为稳定晶型。

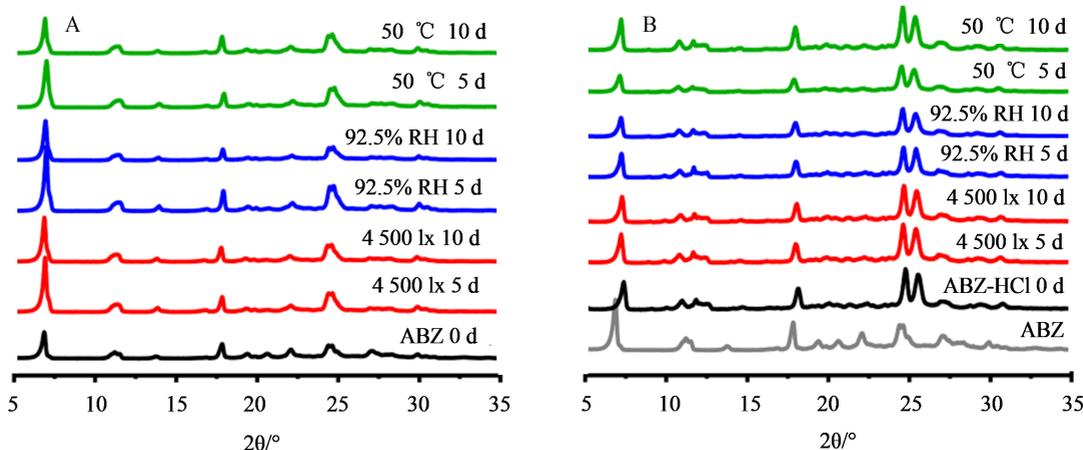
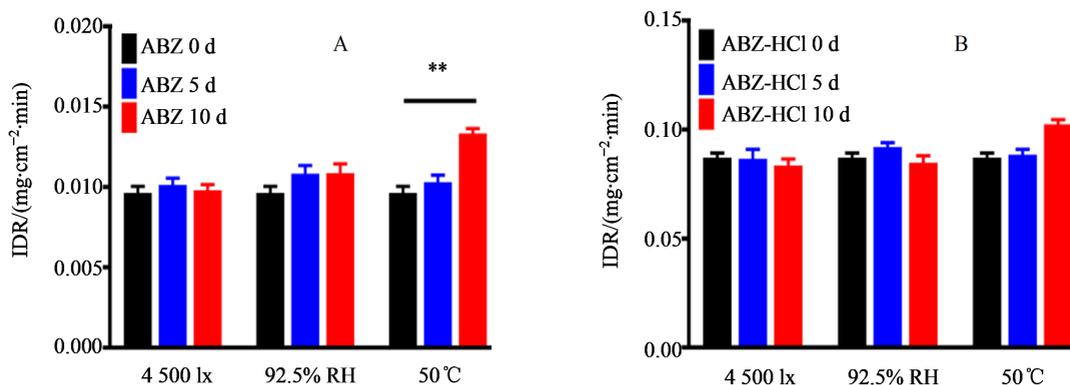


图5 ABZ(A)和ABZ-HCl(B)在不同条件下放置一段时间后的PXR D图

Fig. 5 Powder XRD patterns of ABZ (A) and ABZ-HCl (B) after being placed under different conditions for a period of time



与0 d相比: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs 0 d.

图6 ABZ(A)和ABZ-HCl(B)在不同条件下放置一段时间后的本征溶出速率

Fig. 6 Intrinsic dissolution rate graphs of ABZ (A) and ABZ-HCl (B) after being left under different conditions for a period of time

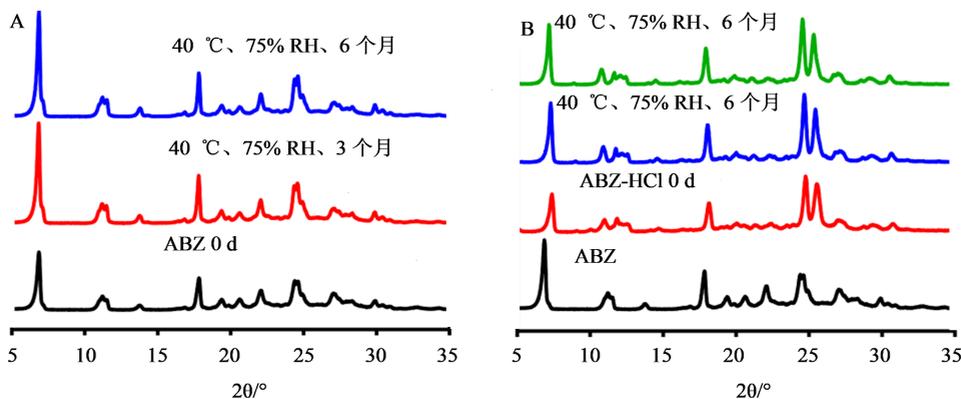


图7 ABZ(A)和ABZ-HCl(B)在加速试验条件下的PXR D图

Fig. 7 PXR D patterns of ABZ (A) and ABZ-HCl (B) under accelerated test conditions

2.9 大鼠体内药动学研究

给药前禁食1晚,按ABZ量 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量ig给药。在给药前1 d通过手术放置颈静脉导管进行血液采样。分别在给药后的0.25、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00、12.00、24.00 h取血 $200\sim 500\ \mu\text{L}$ 至预先制备好的抗凝离心管, $13\ 000\times g$ 离心10 min,取上层血浆,置于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 超低温冰箱保存。样品处理:样品血浆融化后,取 $100\ \mu\text{L}$,加入 $400\ \mu\text{L}$ 甲醇,涡旋振荡1 min, $13\ 000\times g$ 离心5 min后取上清 $300\ \mu\text{L}$,加入 $6\ \mu\text{L}\ 10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的甲苯咪唑内标溶液,涡旋振荡1 min后 $13\ 000\times g$ 离心5 min,取上清经微孔滤膜滤过后采用UPLC-HR-ESI-MS测定药物含量。

根据参考文献方法^[13],使用傅里叶变换超高分辨液质联用仪测定ABZ在血浆中的浓度,Accucore aQ UHPLC 色谱柱($150\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 2.6\ \mu\text{m}$);柱温(30 ± 1) $^\circ\text{C}$,样品盘温度(20.0 ± 0.5) $^\circ\text{C}$;流动相:0.1%甲酸溶液(A)-甲醇(B);梯度洗脱,洗脱程序:0~6 min、8%~40% B,6~8 min、40%~100% B,8~10 min、100% B,10~11 min、100%~8% B,11~13 min、8% B;体积流量 $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量 $1.0\ \mu\text{L}$ 。质谱条件:扫描模式选用Full MS,电喷雾离子源(ESI);载气采用高纯氮气(质量分数 $>99.9\%$),鞘气体积流量35个单位,辅气体积流量10个单位,吹扫气体积流量0个单位;喷雾电压3.0 kV;毛细管温度 $320\ ^\circ\text{C}$,离子透镜电压频率(S-lens RF level)为60,辅气热源温度 $350\ ^\circ\text{C}$;正离子扫描模式,质量扫描范围分别为 $m/z\ 150\sim 1\ 000$ 。

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,组间比

较采用单因素方差分析。重要的药动学参数使用DAS 2.0计算。

口服ABZ和ABZ-HCl后结果显示,盐酸盐增强了ABZ的吸收(在第24小时时在原料药组几乎检测不到ABZ的浓度),与体外溶出结果相对应。如图8和表1所示,ABZ和ABZ-HCl的 C_{max} 分别为(69.61 ± 51.71)、(478.96 ± 138.62) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,ABZ-HCl较ABZ提高了6.9倍。同时,将ABZ制备成盐后生物利用度也有明显提高,血浆浓度-时间曲线下面积(AUC)显著增加,ABZ-HCl的 $\text{AUC}_{0-24\ \text{h}}$ 为($3\ 089.28\pm 1\ 228.16$) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,是ABZ(352.44 ± 146.70) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 的8.8倍。表1列出了所有的药动学参数结果。这些结果表明,将ABZ制备成盐后,其溶解性得到改善,可以显著增加其口服生物利用度和吸收速率。

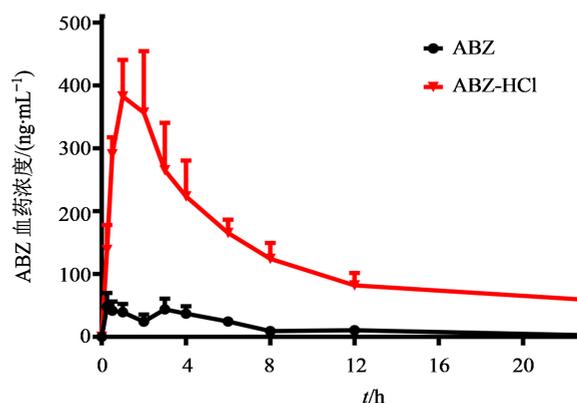


图8 ABZ在体内的药时曲线($\bar{x}\pm s, n=6$)
Fig. 8 Drug concentration-time curve of ABZ formulation *in vivo* ($\bar{x}\pm s, n=6$)

表1 ABZ和ABZ-HCl在大鼠体内的药动学参数($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Pharmacokinetics parameters of ABZ and ABZ-HCl *in vivo* ($\bar{x}\pm s, n=6$)

参数	单位	ABZ	ABZ-HCl
$\text{AUC}_{0-24\ \text{h}}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	352.44 ± 146.70	$3\ 089.28\pm 1\ 228.16$
$\text{AUC}_{0-\infty}$	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	374.31 ± 135.98	$5\ 371.96\pm 4\ 618.85$
C_{max}	$\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	69.61 ± 51.71	478.96 ± 138.62
t_{max}	h	2.54 ± 1.57	1.21 ± 0.68
$t_{1/2}$	h	5.98 ± 3.27	16.85 ± 23.17
CL_{ZF}	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	$73\ 576.20\pm 23\ 270.84$	$7\ 454.90\pm 4\ 568.17$
$\text{MRT}_{0-24\ \text{h}}$	h	7.07 ± 2.27	7.66 ± 2.08
$\text{MRT}_{0-\infty}$	h	9.19 ± 5.10	24.65 ± 33.76

3 讨论

本研究使用溶剂蒸发法成功制备了结晶的ABZ-HCl,并通过多种技术进行了广泛的表征,

提供了有关ABZ-HCl固体形式的详细数据。在 $^1\text{H-NMR}$ 结果中发现了特征峰的偏移,证实了盐的形成。PXRD、DVS和热分析(TGA、DSC)确定了

ABZ-HCl的结晶性质、吸水性和热力学性质,在DVS中导致ABZ-HCl迟滞现象的原因可能是在解吸附过程中水分子与羟基形成较强的分子间作用力阻碍了水分子解吸附,或是ABZ-HCl在干燥过程中可能形成了“墨水瓶”效应,水分很难通过微孔发生解吸附。将ABZ制备成盐后,其水溶性得到了改善,所制备的ABZ-HCl在不同pH条件下的表观溶解度和均高于ABZ,即ABZ-HCl提高了ABZ的溶解度和溶出速率。ABZ-HCl溶出效果较好的原因可能是酸与药物结合后可以打破药物本身的分子间作用力,从而降低晶格能,导致药物分子在与溶解介质接触时易解离,同时HCl提供了更酸性的pH值。ABZ-HCl在强光照射($4\ 500\pm 500\ \text{lux}$)、高湿($92.5\%\pm 5\%\ \text{RH}$)和高温条件($50\pm 2\ ^\circ\text{C}$)下10 d内保持稳定,在加速试验条件($40\ ^\circ\text{C}/75\%\pm 5\%\ \text{RH}$)下6个月保持稳定,表明药物盐稳定性良好。随着溶解性能的提高,ABZ-HCl表现出更好的口服生物利用度和药动学特性。

溶出过程中采用pH=2的HCl溶液作为释放介质,在ABZ-HCl的溶出过程中可能会产生同离子效应而抑制盐的溶出,也就是说实际上ABZ-HCl的溶出效果可能会更优。而在药动学的研究中发现,ABZ-HCl的 t_{\max} (1.21 ± 0.68) h明显小于ABZ的 t_{\max} (2.54 ± 1.57) h,这可能是由于盐酸盐在胃肠道的药物浓度显著增加,一方面增加了药物被动扩散的速率^[25],另一方面使外排蛋白饱和^[26],使得药物的达峰时间提前。

本研究所报道的盐不仅扩展了ABZ固体形态的多样性,为提高ABZ的口服生物利用度提供了有用的信息,而且为下一阶段药物制剂的开发提供了选择。为进一步优化纯API形式和扩大可用药物制剂的范围,盐类的设计、合成和表征都是必不可少的。同时这些发现可进一步指出研究寻找具有改善溶解性能、稳定性和口服生物利用度的ABZ的新固体形式的可能性,例如新盐、共晶或共晶盐等。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hu C H, Liu Z S, Liu C Y, et al. Enhanced oral bioavailability and anti-echinococcosis efficacy of albendazole achieved by optimizing the "spring" and "parachute" [J]. *Mol Pharm*, 2019, 16(12): 4978-4986.
- [2] Aydin Y, Ulas A B, Ince I, et al. Evaluation of albendazole efficiency and complications in patients with pulmonary hydatid cyst [J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2022, 34(2): 245-249.
- [3] Neumayr A, Schunk M, Theunissen C, et al. Efficacy and tolerability of quinacrine monotherapy and albendazole plus chloroquine combination therapy in nitroimidazole-refractory giardiasis: A TropNet study [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(8): 1517-1523.
- [4] Pene P, Mojon M, Garin J P, et al. Albendazole: A new broad spectrum anthelmintic. Double-blind multicenter clinical trial [J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1982, 31(2): 263-266.
- [5] Moro P, Schantz P M. Echinococcosis: A review [J]. *Int J Infect Dis*, 2009, 13(2): 125-133.
- [6] Suzuki K, Kawakami K, Fukiage M, et al. Relevance of liquid-liquid phase separation of supersaturated solution in oral absorption of albendazole from amorphous solid dispersions [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(2): 220.
- [7] Fateh R, Norouzi R, Mirzaei E, et al. In vitro evaluation of albendazole nanocrystals against *Echinococcus granulosus* protoscolices [J]. *Ann Parasitol*, 2021, 67(2): 203-212.
- [8] Castro-Alp 柳 zar J A, Pacheco J, Vargas R, et al. Development of novel microstructured lipid carriers for dissolution rate enhancement of albendazole [J]. *Int J Appl Pharm*, 2020, 12(6): 173-178.
- [9] Pacheco P A, Rodrigues L N C, Ferreira J F S, et al. Inclusion complex and nanoclusters of cyclodextrin to increase the solubility and efficacy of albendazole [J]. *Parasitol Res*, 2018, 117(3): 705-712.
- [10] Meena A K, Sharma K, Kandaswamy M, et al. Formulation development of an albendazole self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) with enhanced systemic exposure [J]. *Acta Pharm*, 2012, 62(4): 563-580.
- [11] Bharate S S. Recent developments in pharmaceutical salts: FDA approvals from 2015 to 2019 [J]. *Drug Discov Today*, 2021, 26(2): 384-398.
- [12] Elder D P, Holm R, Diego H L. Use of pharmaceutical salts and cocrystals to address the issue of poor solubility [J]. *Int J Pharm*, 2013, 453(1): 88-100.
- [13] 高瑞雪. 阿苯达唑-胆酸衍生物的设计及其增溶效果研究 [D]. 西宁: 青海大学, 2021.
- [14] Gao R X. Design of albendazole-cholic acid derivatives and their solubilization effects [D]. Xining: Qinghai University, 2021.
- [14] Saladi V N, Kammari B R, Mandad P R, et al. Novel pharmaceutical cocrystal of apalutamide, a nonsteroidal antiandrogen drug: Synthesis, crystal structure, dissolution, stress, and excipient compatibility [J]. *Cryst*

- Growth Des, 2022, 22(2): 1130-1142.
- [15] Ray S, Roy N, Barman B K, et al. Synthesis and characterization of an inclusion complex of dl-aminogluthimide with β -cyclodextrin and its innovative application in a biological system: Computational and experimental investigations [J]. ACS Omega, 2022, 7 (13): 11208-11216.
- [16] Al-Muhtaseb A H, McMinn W A M, Magee T R A. Water sorption isotherms of starch powders [J]. J Food Eng, 2004, 61(3): 297-307.
- [17] Buchmeiser M R. *Structure, Morphology, Physical Formats and Characterization of Polymer Supports* [M]. Polymeric Materials in Organic Synthesis and Catalysis, 2005: 1-52.
- [18] Ozawa T. Thermal analysis—Review and prospect [J]. Thermochim Acta, 2000, 355(1/2): 35-42.
- [19] Yao X, Kim S, Gui Y, et al. Amorphous drug-polymer salt with high stability under tropical conditions and fast dissolution: The challenging case of lumefantrine-PAA [J]. J Pharm Sci, 2021, 110(11): 3670-3677.
- [20] Gelmboldt V O, Anisimov V Y, Shyshkin I O, et al. Synthesis, crystal structures, properties and caries prevention efficiency of 2-, 3-, 4-carboxymethylpyridinium hexafluorosilicates [J]. J Fluor Chem, 2018, 205: 15-21.
- [21] Berry D J, Steed J W. Pharmaceutical cocrystals, salts and multicomponent systems; intermolecular interactions and property based design [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2017, 117: 3-24.
- [22] Yu L X, Carlin A S, Amidon G L, et al. Feasibility studies of utilizing disk intrinsic dissolution rate to classify drugs [J]. Int J Pharm, 2004, 270(1/2): 221-227.
- [23] Serajuddin A T M. Salt formation to improve drug solubility [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(7): 603-616.
- [24] Badawy S I, Hussain M A. Microenvironmental pH modulation in solid dosage forms [J]. J Pharm Sci, 2007, 96(5): 948-959.
- [25] Catalan-Figueroa J, García M A, Contreras P, et al. Poloxamer 188-coated ammonium methacrylate copolymer nanocarriers enhance loperamide permeability across pgp-expressing epithelia [J]. Mol Pharm, 2021, 18 (2): 743-750.
- [26] Smith B P, Vandenhende F R, DeSante K A, et al. Confidence interval criteria for assessment of dose proportionality [J]. Pharm Res, 2000, 17(10): 1278-1283.

[责任编辑 兰新新]