

УДК 615.031/0.34

Исследование фармакокинетики метронидазола в крови и слюне

К. Л. Хуршудян, А.С. Оганесян

*Экспертный центр Республики Армения ГНО,
Министерство юстиции
0036, Ереван, ул. В.Саргсяна, 3*

Ключевые слова: метронидазол, фармакокинетика, слюна

Слюна как матрица для определения уровня биологически активных соединений привлекает внимание исследователей уже более 80 лет. Определение в слюне содержания лизоцима, гормонов, иммуноглобулинов, микроэлементов уже давно используется для диагностики многих заболеваний, в том числе рака и СПИДа [14]. Последние 30 лет популярными стали также исследования фармакокинетики лекарств на основе регистрации их концентрации в слюне. Использование слюны вместо крови оказалось достаточно информативным и полезным при проведении мониторинга терапии некоторых лекарств и исследовании фармакокинетики у амбулаторных пациентов, особенно в детском и пожилом возрасте [1-3,13-15].

Основной предпосылкой для использования слюны в фармакокинетических исследованиях является наличие данных о том, что концентрация лекарства в слюне примерно равна его концентрации в крови, от которой зависит выраженность терапевтического и токсического действия препарата [4, 13]. Не менее важным является наличие стабильного соотношения концентраций в слюне и крови, причем желательно, чтобы это соотношение не зависело от возраста и пола пациентов [1,2,4]. В настоящее время рекомендуется использовать слюну для исследования фармакокинетики тех соединений, которые проникают в слюну и не связываются с каким-либо элементом слюны, не подвергаются разрушению ферментами слюны, и степень проникновения которых в слюну не зависит от рН слюны [4,13].

К препаратам данного класса принадлежит и метронидазол. Метронидазол характеризуется высокой растворимостью и проницаемостью, быстро и полностью всасывается в кровь из желудочно-кишечного тракта [7,9]. Величина рКа метронидазола составляет 2,44, это свидетельствует о том, что при физиологическом рН он может легко

проникать в слюну [4, 6]. Установлено, что концентрация метронидазола в слюне и крови в интервале 0-6 часов после его приема внутрь примерно одинакова [10,11,16]. Однако до настоящего времени не выявлен оптимальный график отбора проб слюны, который позволил бы использовать слюну для исследования биоэквивалентности метронидазола.

Учитывая то, что ранее нами был разработан и валидирован удобный метод определения метронидазола в слюне и плазме крови [5], представляет несомненный интерес исследование фармакокинетики метронидазола на основе регистрации его концентрации в слюне и крови с целью разработки оптимальной модели использования слюны для исследования фармакокинетики и биоэквивалентности метронидазола.

Цель настоящей работы – разработка оптимальной модели использования слюны для исследования фармакокинетики и биоэквивалентности метронидазола.

Материал и методы

В работе был использован зарегистрированный в Армении препарат «Клион» производства фирмы «Гедеон Рихтер А.О.» (Венгрия), содержащий 250 мг метронидазола. Исследование фармакокинетики метронидазола было проведено у 3 здоровых добровольцев женского пола, давших письменное информированное согласие на участие в эксперименте. Возраст добровольцев 31, 29 и 19 лет, индекс массы тела 19; 23,8 и 20 кг/м². Питание на протяжении исследования было стандартизировано. На проведение исследования было получено разрешение Этического комитета МЗ РА и Научного центра экспертизы лекарств и медицинских технологий МЗ РА.

Добровольцы принимали одну таблетку метронидазола утром, натощак, запивая ее 200 мл воды. Доза метронидазола составляла 250 мг. Слюну и кровь отбирали до приема (0 час) и через 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8 и 24 часа после приема препарата. Отобранную слюну (1-2 мл) фильтровали, полученные фильтраты содержались в холодильнике при температуре -20°C до момента проведения анализов. Кровь (6-8 мл) отбиралась в стандартные гепаринизированные пробирки на 10 мл из локтевой вены. Отобранный образец крови подвергался центрифугированию при 600g в течение 15 мин для отделения плазмы, и образцы плазмы помещались в холодильник, где содержались при температуре -20°C до момента проведения анализов.

Количественное определение метронидазола в слюне и крови проводили по следующим схемам.

Схема анализа образцов слюны. К 0,2 мл слюны добавлялось

0,1 мл метанола и метилстеарата (внутренний стандарт, 100 мкг/мл) в метаноле. После перемешивания к смеси добавлялось 2,0 мл метанола, смесь интенсивно встряхивалась в течение 1 мин, центрифугировалась при 600g в течение 5 мин для осаждения белков. Безбелковый супернатант отделялся и упаривался досуха на ротаторном испарителе при температуре 50°C, остаток растворялся в 100 мкл уксусного ангидрида и выдерживался при температуре 70°C в течение 20 мин, после чего из полученной смеси отбирали 2 мкл и вводили в хроматограф. Хроматографическое определение метронидазола проводилось на приборе Кристалл 2000М, производства фирмы «Хроматек» (Россия) в следующих условиях: колонка – кварцевая капиллярная – DB-5 (30 м x 0,25 мм x 0,25 мм), детектор – пламенно-ионизационный, газ-носитель – азот, скорость потока – 40 мл/мин, деление потока – 1:20, температура испарителя – 250°C, температура детектора – 280°C, температура колонки менялась от 100 до 280°C со скоростью 10°C/мин, объем вводимой пробы составлял 1 мкл, время анализа – 20 минут.

Схема анализа образцов плазмы крови. К 0,5 мл плазмы крови добавлялось 0,4 мл метанола и метилстеарата (внутренний стандарт, 100 мкг/мл) в метаноле. Смесь перемешивалась и центрифугировалась при 2000g в течение 5 мин для освобождения от белков. Полученный безбелковый супернатант анализировали методом, описанным для слюны.

Степень извлечения метронидазола составляла 97,5%, точность метода - $97 \pm 2\%$, систематическая погрешность метода не более 3%. Предел обнаружения метронидазола в слюне составлял 0,2 мкг/мл. Метод сохранял линейность в диапазоне концентрации метронидазола от 0,2 до 20 мкг/мл. Специфичность, повторяемость и воспроизводимость метода характеризовались коэффициентом вариации менее 5%, что соответствует валидационным требованиям для методов определения препаратов в биожидкостях.

Расчет фармакокинетических параметров исследуемых препаратов был проведен с помощью известной фармакокинетической программы Kinetica 4.4.1 (Termo Corporation, 2004). Определялись следующие фармакокинетические параметры: $C_{\max}$ – максимальная концентрация препарата (мкг/мл); $t_{\max}$ – время достижения максимальной концентрации (час); AUC_{0-t} – площадь под фармакокинетической кривой в диапазоне от 0 до последней экспериментальной точки на кривой (мкг · час/мл); $AUC_{0-\infty}$ – общая площадь под фармакокинетической кривой $= AUC_{0-t} + C_t / K_{el}$, где C_t – последняя зарегистрированная концентрация (мкг · час/мл); $t_{1/2}$ – период полувыведения (час).

Статистический анализ был выполнен при помощи компьютерной программы Statistic for Windows, version 6.0. Все статистические рас-

четы проводились для 95% доверительного интервала. Все полученные результаты анализировались методами описательной статистики, с расчетом значений среднего, стандартного отклонения и коэффициента вариации.

Результаты и обсуждение

В результате фармакокинетических исследований было установлено, что максимальная концентрация метронидазола в слюне и плазме крови достигается через 1 час после введения исследуемых препаратов и составляет $13,3 \pm 0,9$ и $13,2 \pm 0,7$ мкг/мл соответственно. Сразу после достижения максимума, уровень метронидазола в плазме крови экспоненциально уменьшается и через 24 часа концентрация метронидазола в плазме крови примерно одинакова в обеих биожидкостях и составляет примерно 0,5 мкг/мл (рисунок).

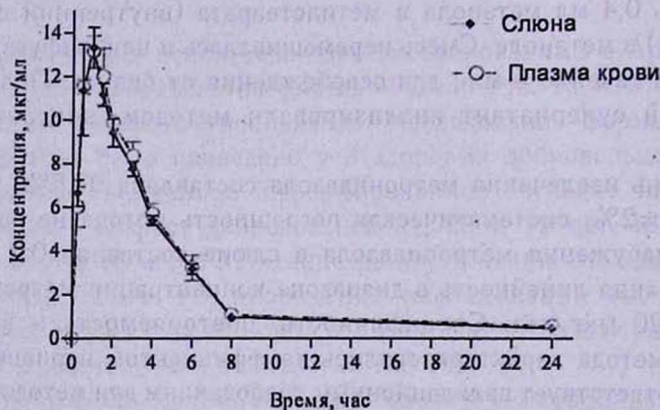


Рисунок. Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев

Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев показал, что в интервале 0,5-8 час соотношение концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев практически одинаково и составляет $0,93 \pm 0,02$, что близко к литературным данным $0,87-1,03$ [8-11,16]. В то же время через 24 часа величина соотношения слюна/кровь достоверно ниже, чем в интервале 0,5-8 часов и составляет $0,82 \pm 0,04$ (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительный анализ изменения концентрации метронидазола в слюне и крови добровольцев.

Время, часы	Концентрация метронидазола, мкг/мл		Соотношение слюна/кровь среднее
	слюна	кровь	
0,25	6,657±0,595	6,024±0,925	0,983±0,067
0,5	11,381±2,091	11,526±0,323	0,993±0,021
1	13,328±0,927	13,183±0,684	0,947±0,050
1,5	11,168±0,525	12,015±1,280	0,927±0,012
2	9,425±0,646	9,904±0,160	0,913±0,012
3	7,767±0,334	8,351±0,652	0,940±0,010
4	5,407±0,225	5,709±0,467	0,913±0,015
6	3,180±0,232	3,241±0,579	0,923±0,015
8	0,969±0,023	1,076±0,027	0,903±0,015
24	0,472±0,0205	0,565±0,032	0,817±0,035
Среднее			0,926±0,0251

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола, полученных при анализе изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0-8 часов и 0-24 часа после приема препарата, приведен в табл. 2 и 3.

Как видно из табл. 2 и 3 фармакокинетические параметры метронидазола, полученные после анализа изменения его концентрации в слюне и крови, примерно одинаковы. Вместе с тем необходимо отметить, что скорость выведения метронидазола из слюны несколько выше, чем из крови, независимо от продолжительности отбора проб. Однако при отборе проб в интервале 0-8 часов разница в величинах $t_{1/2}$ в слюне и крови несколько меньше и составляет $-0,056 \pm 0,11$, тогда как при использовании интервала 0-24 часа $-0,221 \pm 0,07$ (табл.2).

Таблица 2

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола, полученных после анализа изменения его концентрации в слюне и крови в интервале. 0-24 часа после приема препарата

Параметры	Средние значения		Средняя для разницы	t	P
	слюна	кровь			
C_{max} (мкг /мл)	13,33 ± 0,53	13,18 ± 0,39	0,145 ± 0,66	0,2	0,837
AUC_{0-1} (мкг · час/мл)	60,10 ± 0,8	63,73 ± 0,41	-3,63 ± 0,95	3,8	0,019
$AUC_{0-\infty}$ (мкг · час/мл)	63,37 ± 0,85	67,83 ± 0,33	-4,45 ± 0,91	4,9	0,0081
$t_{1/2}$ (час)	6,80 ± 0,021	7,03 ± 0,065	-0,221 ± 0,07	3,2	0,032

Таблица 3

Статистический анализ фармакокинетических параметров метронидазола, полученных после анализа изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0-8 часов после приема препарата

Параметры	Средние значения		Средняя для разницы	t	P
	слюна	кровь			
$C_{\max}$ (мкг/мл)	$13,33 \pm 0,53$	$13,18 \pm 0,39$	$0,145 \pm 0,66$	0,2	0,837
AUC_{0-4} (мкг · час/мл)	$49,05 \pm 0,88$	$51,17 \pm 0,64$	$-2,12 \pm 1,09$	1,9	0,120
$AUC_{0-\infty}$ (мкг · час/мл)	$51,80 \pm 0,88$	$54,22 \pm 0,68$	$-2,42 \pm 1,11$	2	0,090
$t_{1/2}$ (час)	$6,970 \pm 0,098$	$7,026 \pm 0,065$	$-0,056 \pm 0,11$	0,4	0,660

Как видно из таблиц, после анализа изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0-24 часа в величинах основных фармакокинетических параметров метронидазола, за исключением $C_{\max}$, наблюдаются статистически достоверные различия.

Наиболее выраженные отличия отмечены для значения $AUC_{0-\infty}$ ($P=0,081$), которое является профилирующим фармакокинетическим параметром при исследованиях биоэквивалентности [11,12,16]. В то же время при анализе изменения его концентрации в слюне и крови в интервале 0-8 часов фармакокинетические параметры метронидазола статистически не отличаются (табл. 3).

Полученные результаты коррелируют с литературными данными. Так, в исследованиях М. Van Oosten et al. (1986) было обнаружено, что после приема внутрь 750 мг метронидазола, наибольшая разница в концентрациях метронидазола в слюне и крови регистрировалась через 24 час и составляла 15% (соотношение слюна/кровь 0,85), тогда как в интервале 0-12 часов она не превышала 10% [16].

Учитывая то, что при использовании интервала 0-8 часов величина интерполируемого участка фармакокинетической кривой препарата составляет примерно 6%, что удовлетворяет требованиям по изучению биоэквивалентности (>20%) [12,13], можно заключить, что использование данного интервала достаточно для получения достоверных результатов при исследовании биоэквивалентности и фармакокинетики метронидазола. Отбор проб на протяжении 24 часов, хотя и является более правильным при изучении фармакокинетики метронидазола с использованием крови, однако не представляется приемлемым для слюны, так как в этом случае концентрация в слюне не будет правильно отображать уровень метронидазола в крови.

Одной из причин изменения соотношений концентраций метронидазола в слюне и крови через 24 часа после приема, вероятно, может быть изменение скорости слюнообразования в течение ночи, как это наблюдалось в случае с фенитоином [8].

Таким образом, можно заключить, что оптимальной моделью

использования слюны для исследований фармакокинетики и биоэквивалентности метронидазола является изучение изменения концентрации препарата в слюне в интервале 0-8 часов, когда соотношение уровня в слюне и крови практически не изменяется.

Поступила 03.02.10

Արյան և թքի մեջ մետրոնիդազոլի դեղակինետիկայի հետազոտությունը

Բ.Լ.Խուրշուդյան, Ա.Ս.Հովհաննիսյան

Թքի մեջ և արյան շիճուկում մետրոնիդազոլի քանակության որոշման մեթոդի միջոցով, որը մշակվել է մեր կողմից, իրականացվել է մետրոնիդազոլի դեղակինետիկայի համեմատական հետազոտություն երեք առողջ կամավորների վրա՝ գրանցելով մետրոնիդազոլի կոնցենտրացիան թքի և արյան մեջ, մպատակ ունենալով մշակել թքի կիրառման օպտիմալ մոդել մետրոնիդազոլի դեղակինետիկայի և կենսահամարժեքության հետազոտության համար: Առողջ կամավորների թքի և արյան մեջ մետրոնիդազոլի կոնցենտրացիայի փոփոխության համեմատական վերլուծությունը ցույց տվեց, որ 0,5–8 ժամվա ընթացքում թքի և արյան մեջ մետրոնիդազոլի կոնցենտրացիայի հարաբերակցությունը գործնականորեն նույնն է և կազմում է $0,93 \pm 0,02$, որը մոտ է գրականության մեջ առկա տվյալներին: Միևնույն ժամանակ, 24 ժամ անց, թուր/արյուն հարաբերակցությունների արժեքը հավաստիորեն ավելի ցածր է, քան 0,5–8 ժամվա տիրույթում, և կազմում է $0,82 \pm 0,04$: Ամենացայտուն տարբերությունները նկատվել են AUC_{0-4} ($\lambda=0,081$) արժեքի համար, որը հանդիսանում է կենսահամարժեքության հետազոտությունների ժամանակ դեղակինետիկական պրոֆիլավորող պարամետր: Միաժամանակ, 0–8 ժամվա տիրույթում, թքի և արյան մեջ դրա կոնցենտրացիայի փոփոխման վերլուծության ընթացքում մետրոնիդազոլի դեղակինետիկական պարամետրերը վիճակագրորեն չեն տարբերվում:

Հաշվի առնելով, որ 0–8 ժամվա տիրույթը օգտագործելիս պատրաստուկի դեղակինետիկական կորի ինտերպոլացված գծամասի արժեքը կազմում է շուրջ 6 %, որը բավարարում է կենսահամարժեքության ուսումնասիրության պահանջներին ($>20\%$), կարելի է եզրակացնել, որ մետրոնիդազոլի կենսահամարժեքությունը և դեղակինետիկան հետազոտելիս, նշված տիրույթի օգտագործումը բավարար է արժանահավատ արդյունքներ ստանալու համար: Չնայած այն հանգամանքին, որ արյան օգտագործմամբ մետրոնիդազոլի դեղակինետիկան հետազոտելիս 24 ժամվա մոնիթորինգն ավելի ճիշտ է համարվում, այնուամենայնիվ այն ընդունելի չէ թքի համար, քանի որ այս դեպքում թքի մեջ կոնցենտրացիան ճիշտ կերպով չի արտացոլի արյան մեջ եղած մետրոնիդազոլի քանակը:

Այսպիսով, կարելի է եզրակացնել, որ մետրոնիդազոլի դեղակինետիկայի և կենսահամարժեքության հետազոտման համար թքի օգտագործման օպտիմալ մոդելը հանդիսանում է 0–8 ժամվա տիրույթում թքի մեջ մետրոնիդազոլի կոնցենտրացիայի փոփոխման ուսումնասիրությունը, երբ թքի և արյան մեջ քանակների հարաբերակցությունը գործնականում չի փոփոխվում:

The study of the pharmacokinetics of metronidazole in blood and saliva

K.L. Khurshudyan, A.S. Hovhannisyan

A comparative research of pharmacokinetics of metronidazole in 3 volunteers has been conducted on the basis of registration of its concentration in saliva and blood to evaluate the optimum pattern of use of saliva for research of pharmacokinetics and bioequivalence of metronidazole. The comparative analysis of the change of metronidazole concentration in saliva and blood of volunteers has shown, that in an interval 0,5-8 hour the ratio of concentration of metronidazole in saliva and blood is equal and constitutes $0,93 \pm 0,02$, that corresponds to the literary data. At the same time, at 24 hours it is lower than in an interval 0,5-8 hour and constitutes $0,82 \pm 0,04$. The most expressed differences are noted for AUC_{0-24} ($\bar{D}=0,081$) which is main pharmacokinetic parameter at researches of bioequivalence. At the same time in the interval of 0-8 hours pharmacokinetic parameters of metronidazole in saliva and blood statistically do not differ.

Taking into account that at use of 0-8 hour interval the value of interpolated site of a pharmacokinetic curve of metronidazole constitutes approximately 6%, that fulfils conditions on the bioequivalence study ($>20\%$), it is possible to conclude that the use of the 0-8 hour interval is enough for receiving authentic results at research of bioequivalence and pharmacokinetics of metronidazole. Sampling during 24 hour is more correct for blood, though is not suitable for saliva, as in this case the concentration in saliva will not be correct to display the level of metronidazole in blood. Thus the optimum pattern of use of saliva for research of pharmacokinetics and bioequivalence of metronidazole is using saliva in the interval 0-8 hours, when the ratio of the level in saliva and blood actually is not changed.

Литература

1. Азатян С.М., Оганесян А.С. Габриелян Э.С. Оптимизация фармакотерапии некоторыми противоэпилептическими препаратами на основе изучения их фармакокинетики в слюне больных. Фармация. М., 1998, 6, с. 20-23.
2. Григорян С.В., Казарян А.В., Оганесян А.С. Суточные изменения фармакокинетики пропранолола в слюне больных с экстрасистолической аритмией. Научные труды и сообщения НИЗ РА. 1998, с. 110-114.

3. *Оганесян А.С.* Исследование возможности использования слюны для оптимизации фармакотерапии хинидина. Вестник МАНЭБ, 2004, т.9, 4, с.110-114.
4. *Холодов Л.Е., Яковлев В.П.* Клиническая фармакокинетика. М., 1985, с. 177-187.
5. *Хуршудян К.Л., Оганесян А.С., Мелконян М.А.* Разработка и валидация количественного определения метронидазола в слюне методом газовой хроматографии. Материалы 4-й Международной конференции "Современные аспекты реабилитации в медицине". Агверан, 22-24 сентября, 2009, с. 286-288.
6. *Emami J., Ghassami N., Hamishehkar H.A* Rapid and sensitive HPLC method for the analysis of metronidazole in human plasma: application to single dose pharmacokinetic and bioequivalence studies. DARU, 2006, 14, 1, p. 14-19.
7. *Jensen J.C., Gugler R.* Single and multiple-dose metronidazole kinetics. Clin.Pharm. Ther. 1983, 34, p. 481-487.
8. *Kamali F., Thomas S.H.* Effect of saliva flow rate on saliva phenytoin concentrations: implications for therapeutic monitoring. Eur. J. Clin. Pharmacol., 1994, 5, p. 565-567.
9. *Kaye C.M., Sankey M.G., Thomas L.A.* A rapid and specific semi-micro method involving high-pressure liquid chromatography for the assay of metronidazole in plasma, saliva, serum, urine and whole blood. Br. J. Clin. Pharmacol., 1980, v.9, p. 528-529.
10. *Mustofa A., Suryawati S., Santoso B.* Pharmacokinetics of metronidazole in saliva. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., 1991, v.29, p. 474-488.
11. *Pähkla E.R., Koppel T., Saag M., Pähkla R.* Metronidazole concentrations in plasma, saliva and periodontal pockets in patients with periodontitis. Journal of Clinical Periodontology, 2005, v. 32.2, p. 163-166.
12. *Ritschel W.A.* Handbook of Basic Pharmacokinetics. 5th Ed., Cincinnati, 1995, p. 130-135.
13. *Rockville M.D.* FDA guidance on statistical procedures for bioequivalence studies using a standard two-treatment crossover designs, Division of Bioequivalence, office of Generic Drugs, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration; 1992.
14. *Saliva as a Diagnostic fluid.* Ed. D.Malamud and L. Tabak, Annals of the NY Academy of sciences, v. 694, NY, 1993, 347 p.
15. *Ueda C.T., Beckmann P.J., Dzindizo B.S.* Relationship between saliva and serum quinidine concentration and suppression of ventricular premature beats. Ther. Drug Monitor., 1984, 6, p.43-49.
16. *Van Oosten M.A.C., Notten F.J.W., Mikx F.H.M.* Metronidazole Concentrations in Human Plasma, Saliva, and Gingival Crevice Fluid after a Single Dose. J. Dent. Res., 1986, 65, p.1420.