

阿奇霉素在 SD 大鼠体内的毒代动力学研究

涂如霞, 郭延奎, 宋小仙, 吴书祎, 罗超利, 刘剑毅, 陈 慧*

重庆市中药研究院 重庆市药物安全评价中心, 重庆 400065

摘要:本研究通过阿奇霉素(AZM)1个月经口给药重复给药毒性试验,研究药物在SD大鼠体内的毒代动力学特征及其蓄积情况。采用大鼠灌胃给予AZM 300、120和50 mg/kg,连续给药30天,分别于首次、末次给药后在不同时间点采血,以罗红霉素为内标,应用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法测定大鼠血浆中AZM的含量,采用DAS3.0软件拟合毒代动力学参数。结果显示高、中和低剂量组SD大鼠首次给药后的平均药-时曲线下面积 AUC_{0-4} 值分别为176.67和35 mg·h/L;平均 $AUC_{0-\infty}$ 值分别为224.73和38 mg·h/L;平均 $t_{1/2z}$ 值分别为35、18和19 h;平均 C_{max} 值分别为11.7、5.6和2.8 mg/L;高、中和低剂量组SD大鼠末次给药后的平均 AUC_{0-4} 值分别为565.215和126 mg·h/L;平均 $AUC_{0-\infty}$ 值分别为1511.454和213 mg·h/L;平均 $t_{1/2z}$ 值分别为108、71和59 h;平均 C_{max} 值分别为14.2、7.9和6.1 mg/L。提示AZM在SD大鼠体内的毒代动力学呈现线性动力学特征,无性别差异,其毒性反应与药物蓄积有一定关系。

关键词:阿奇霉素;毒代动力学;LC-MS/MS

中图分类号:R969.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0159-05

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.023

Toxicokinetics of azithromycin in SD rats

TU Ru-xia, GUO Yan-lei, SONG Xiao-xian, WU Shu-yi, LUO Chao-li, LIU Jian-yi, CHEN Hui*

Chongqing Center for Drug Safety Evaluation, Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China

Abstract: In this study, the toxicity test of azithromycin (AZM) was repeated to study the toxicokinetic characteristics and accumulation of the drug in SD rats after 1 month oral administration. Rats were given 300, 120, and 50 mg/kg of AZM for 30 consecutive days. Blood was collected at different time points after the first and last doses. Roxithromycin was used as the internal standard. LC-MS/MS was used to determine the content of AZM in rat plasma, and DAS3.0 software was used to fit the toxicokinetic parameters. The results showed that the values of AUC_{0-4} of SD rats in the high, medium and low dose groups after the first administration were 176.67 and 35 mg·h/L; the values of average of $AUC_{0-\infty}$ were 224.73 and 38 mg·h/L; the values of average $t_{1/2z}$ were 35, 18, and 19 h, respectively; the average C_{max} values were 11.7, 5.6, and 2.8 mg/L, respectively; The average AUC_{0-4} values of SD rats in the high, medium and low dose groups after the last administration were 565.215 and 126 mg·h/L, respectively; the average $AUC_{0-\infty}$ values were 1511.454 and 213 mg·h/L, respectively; The average $t_{1/2z}$ values were 108, 71, and 59 h, respectively; the average C_{max} values were 14.2, 7.9, and 6.1 mg/L, respectively. It is suggested that the toxicokinetics of AZM in SD rats presents linear kinetic characteristics, and there is no gender difference. Its toxicity is related to drug accumulation.

Key words: azithromycin; toxicokinetics; LC-MS/MS

阿奇霉素(azithromycin, AZM)是具有15元氮杂内酯环的半合成大环内酯类抗生素,用于各种社区获得性感染,包括呼吸道感染、泌尿生殖系统感染和皮肤及软组织感染^[1]。AZM药代动力学特点为

半衰期长,组织、体液中分布广、浓度高、维持时间长^[2]。有关AZM的药代动力学及生物利用度已有相关研究^[3-6],但AZM在大鼠体内的毒代动力学研究至今未见文献报道,本实验旨在研究AZM在SD大鼠体内的毒代动力学特征及其在体内的蓄积情况,为临床应用及不良反应监测等提供参考。

收稿日期:2020-05-15

接受日期:2020-06-17

基金项目:重庆市应用开发计划(cstc2014yykfC10002)

* 通信作者 Tel:86-23-89029135; E-mail:chenhui-520@126.com

1 材料

1.1 实验动物

SPF级健康SD大鼠70只,雌雄各半,体质量175.0~230.0 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 药品与试剂

阿奇霉素分散片(批号1151074,浙江亚太药业股份有限公司生产);阿奇霉素标准品(含量94.4%,批号130593-201303,中国食品药品检定研究院生产);罗红霉素标准品(含量94.7%,批号:130557-201103,中国食品药品检定研究院生产);甲醇(质谱纯,批号146503,美国Thermo Fisher公司);乙腈(质谱纯,批号155753,美国Thermo Fisher公司);洗针液甲醇(色谱纯,批号146503,美国Thermo Fisher公司);甲酸(质谱纯,批号156068,美国Thermo Fisher公司);水(质谱纯,批号L-12968,美国Thermo Fisher公司);醋酸铵(色谱纯,批号35Y1402KS,美国ACS公司);甲酸铵(质谱纯,批号P1143252,美国ACS公司);肝素钠注射液(批号51150113,天津生物化学制药有限公司生产)。

1.3 仪器

UPLC-30A/API4000液质联用仪(日本SHIMADZU公司/美国AB公司),配Analyst 1.6软件、MultiQuant 3.0定量分析软件(美国AB公司);DAS 3.0软件(上海中医药大学药物临床研究中心);XS105DU电子天平(梅特勒-托利多公司);Microfuge 22R离心机(美国Beckman Coulter公司)。

2 方法

2.1 分组及给药

检疫后动物随机区组法分为4组,分别为溶媒对照组、AZM高剂量、中剂量和低剂量组,AZM药物组各组均为20只,溶媒对照组10只,均雌雄各半。药物组连续30天灌胃给予AZM 300、120和50 mg/kg,溶媒对照组给予等体积的0.5% CMC-Na溶液。每周称量两次体重,根据体重变化调整给药量。

2.2 样品采集

AZM药物组:首次给药和末次给药的给药前、给药后0.5、1、1.5、2、3、4、8、12、24、48、72 h;溶媒对照组:首次给药和末次给药的给药前、给药后4 h。血液采集方式参考文献^[7]进行改进,采用采血针在大鼠颞浅静脉采血,采集约0.3 mL全血,加入肝素钠抗凝的EP管中,1 800 g离心10 min,分离血浆,-80 °C冰箱冷冻待测。

2.3 色谱条件及质谱条件

色谱条件:色谱柱:Inertsil ODS-3柱(2.1 mm×75 mm,3 μm,S/N 3LI50247,日本);流速:0.3 mL/min;柱温:30 °C;进样体积:2 μL;流动相:A相为5 mmol/L醋酸铵溶液,含0.1%甲酸;B相为甲醇;梯度洗脱程序:0.1 min时A:B为70:30,3 min时A:B为5:95,保持至4.5 min,4.6 min时A:B为70:30,6 min结束。

质谱条件:采用ESI-Positive-MRM模式。Gas1:55 Psi;Gas2:55 Psi;IS:5 500 V;TEM:600 °C;CAD:4 Psi;CUR:15 Psi。阿奇霉素定量离子对为749.5/158.1,DP:99,CE:60.9,CXP:30.0;定性离子对为749.5/591.5,DP:99,CE:42.4,CXP:30.0。罗红霉素定量离子对:749.5/158.1,CE:53.1,CXP:30.0;定性离子对为749.5/179.4,DP:79,CE:25.1,CXP:30.0。

2.4 样品处理

采用内标法,以罗红霉素为内标物,精密吸取50 μL血浆样品于1.5 mL EP管中,精密加入1 000 ng/mL罗红霉素标准液10 μL,涡旋混匀30 s后加入甲醇600 μL,涡旋混匀1 min,12 000 rpm离心10 min,取上清150 μL于进样瓶中,2 μL进样分析。

2.5 统计学分析

采用DAS 3.0软件对血浆浓度数据进行拟合,计算毒代动力学参数和进行统计分析,达峰浓度 C_{max} 、达峰时间 T_{max} 为实测值,药时曲线下面积AUC为非房室模型参数即统计矩参数。

3 结果

3.1 方法学验证

采用甲醇沉淀蛋白,以罗红霉素为内标物,LC-MS/MS法测定SD大鼠血浆中AZM浓度,血浆中内源性物质对AZM及罗红霉素的分析无明显影响,此方法的特异性良好,见图1、图2;其检测限为9.478 ng/mL(以S/N>3计),定量下限为47.39 ng/mL;AZM标准曲线在0.047 39~47.39 μg/mL浓度范围内线性良好,重复三次后典型回归方程为 $y = 0.364 97 x + 0.122 13, r = 0.999 4$ 。

低、中和高浓度样品(0.094 78、0.947 8、37.912 μg/mL)方法回收率范围94.9%~104.2%,检测精密度(RSD)分别为9.52%、4.25%、2.08%,方法准确度良好;批内、批间RSD在3.45%~13.82%之间,检测精密度良好,见表1。

稳定性考察均按平行5组进行($n = 5$)。血浆

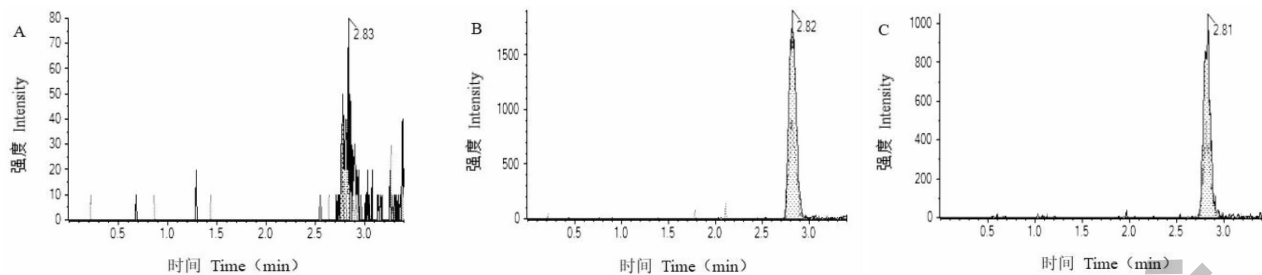


图1 大鼠血浆中阿奇霉素的 LC-MS/MS 图谱

Fig. 1 LC-MS / MS map of azithromycin in rat plasma

注:A:空白血浆;B:阿奇霉素标准品;C:阿奇霉素含药血浆。Note:A;Blank plasma;B;Azithromycin standard;C;Azithromycin containing plasma.

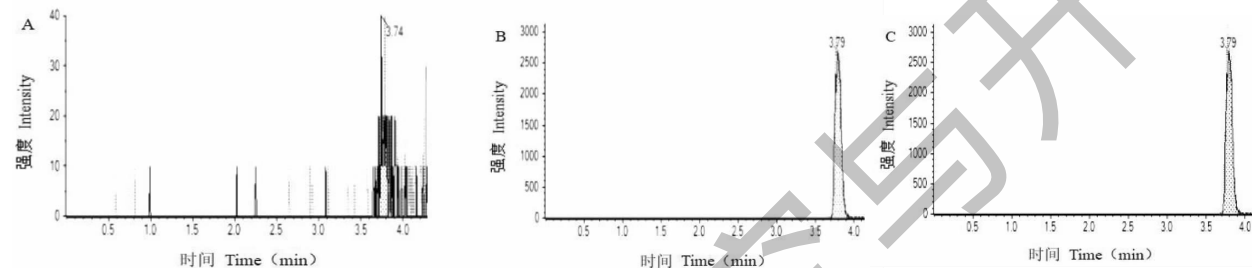


图2 大鼠血浆中罗红霉素的 LC-MS/MS 图谱

Fig. 2 LC-MS / MS map of roxithromycin in rat plasma

注:A:空白血浆;B:罗红霉素标准品;C:罗红霉素含药血浆。Note:A;Blank plasma;B;Roxithromycin standard;C;Roxithromycin containing plasma.

样品室温放置 6 h 后 RSD 在 3.07% ~ 7.24% 之间,血浆样品处理后样品盘放置 12 h 后 RSD 在 1.78% ~ 14.53% 之间,血浆样品冻融三次 RSD 在 4.63% ~ 6.55% 之间,血浆样品低温放置 (-80 °C) 82 天

RSD 在 0.92% ~ 7.48% 之间,AZM 血浆样品稳定性良好;内标样品室温放置后 12 h 后 RSD 在 8.12% ~ 10.56% 之间,内标样品稳定性良好。

表1 大鼠血浆中阿奇霉素的回收率与精密度

Table 1 Recovery and precision of azithromycin in rat plasma

浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 Rate of recovery ($n=5$) (%)	批内精密度 In batch precision ($n=5$) (%)	批间精密度 Inter batch precision ($n=15$) (%)
0.094 78	104.2	6.38	13.82
0.947 8	95.0	3.58	9.44
37.912	94.9	3.72	3.45

3.2 药-时曲线

AZM 高、中和低剂量组首次和末次给药后的药-时曲线见图3。首次给药、末次给药后 AZM 各剂量组约在 2 ~ 3 h 左右达峰,首次给药时除 300 mg/kg 剂量组外,120、50 mg/kg 剂量组 72 h 时血浆中 AZM 浓度已低于 C_{max} 的 10%。

3.3 毒代动力学参数

经 DAS Ver 3.0 软件处理,用统计距模型计算,主要动力学参数结果见表2;高、中和低剂量组 SD 大鼠首次给药后的平均 AUC_{0-1} 值分别为 176、67 和

35 mg · h/L;平均 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 值分别为 224、73 和 38 mg · h/L;平均 $t_{1/2z}$ 值分别为 35、18 和 19 h;平均 C_{max} 值分别为 11.7、5.6 和 2.8 mg/L;高、中和低剂量组 SD 大鼠末次给药后的平均 AUC_{0-1} 值分别为 565、215 和 126 mg · h/L;平均 $\text{AUC}_{0-\infty}$ 值分别为 151 1、454 和 213 mg · h/L;平均 $t_{1/2z}$ 值分别为 108、71 和 59 h;平均 C_{max} 值分别为 14.2、7.9 和 6.1 mg/L。

首次给药后及末次给药后 AZM 在雌性 SD 大鼠和雄性 SD 大鼠体内的系统暴露量比值 Ratio ($F_{-\text{AUC}}/M_{-\text{AUC}}$) 在 0.83 ~ 1.17 之间;AZM 各剂量组

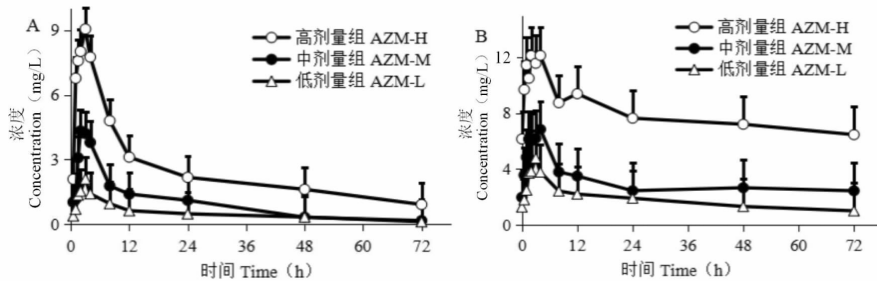


图3 大鼠灌胃阿奇霉素后血浆平均药-时曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Mean plasma drug time curve of rats after administration of azithromycin ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:A:首次给药;B:末次给药。Note:A:First dose;B:Last dose.

蓄积因子 Ratio (AUC_{Day30}/AUC_{Day1}) 在 2.86 ~ 3.92 之间,见表3。

高、中、低剂量组的剂量比为 6:2.4:1;高剂量组首次给药、末次给药的平均 AUC_{0-t} 值分别为低剂

量组的 5.04、4.48 倍,平均 C_{max} 值分别为低剂量组的 4.23、2.31 倍;中剂量组首次给药、末次给药的平均 AUC_{0-t} 值分别为低剂量组的 1.91、1.71 倍,平均 C_{max} 值分别为低剂量组的 2.02、1.29 倍,见图4。

表2 大鼠灌胃阿奇霉素后的毒代动力学参数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 toxicokinetic parameters of azithromycin after intragastric administration in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

参数 Parameter	首次给药 First dose			末次给药 Last dose		
	高剂量组 AZM-H	中剂量组 AZM-M	低剂量组 AZM-L	高剂量组 AZM-H	中剂量组 AZM-M	低剂量组 AZM-L
AUC_{0-t} (mg·h/L)	176 ± 19	67 ± 12	35 ± 13	565 ± 108	215 ± 26	126 ± 45
$AUC_{0-\infty}$ (mg·h/L)	224 ± 39	73 ± 18	38 ± 15	1 511 ± 681	454 ± 154	213 ± 113
$MRT_{0-\infty}$ (h)	45 ± 13	24 ± 10	27 ± 10	156 ± 85	102 ± 33	80 ± 55
$t_{1/2\alpha}$ (h)	35 ± 9	18 ± 10	19 ± 8	108 ± 61	71 ± 25	59 ± 39
t_{max} (h)	2.3 ± 0.9	2.6 ± 0.7	2.8 ± 0.9	2.5 ± 1.0	2.7 ± 1.0	2.6 ± 1.0
V_z (L/kg)	67 ± 11	42 ± 14	38 ± 11	30 ± 8	30 ± 6	20 ± 7
CL_z [L/(kg·h)]	1.37 ± 0.24	1.71 ± 0.37	1.56 ± 0.73	0.23 ± 0.09	0.28 ± 0.12	0.29 ± 0.14
C_{max} (mg/L)	11.7 ± 2.3	5.6 ± 1.9	2.8 ± 0.6	14.2 ± 2.7	7.9 ± 1.7	6.1 ± 2.1

表3 大鼠血浆中阿奇霉素系统暴露-性别比、蓄积指数表 ($n = 5$)

Table 3 Exposure sex ratio and accumulation index of azithromycin system in rat plasma ($n = 5$)

参数 Parameter	高剂量组 AZM-H		中剂量组 AZM-M		低剂量组 AZM-L	
	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male	雌性 Female	雄性 Male
AUC_{Day1}	173.1	178.7	72.0	61.7	31.8	38.1
AUC_{Day30}	522.9	607.8	205.9	224.6	124.5	127.8
Ratio (AUC_{Day30}/AUC_{Day1})	3.02	3.40	2.86	3.64	3.92	3.36
Ratio (F- AUC_{Day1} /M- AUC_{Day1})	0.97	1.17	0.83			
Ratio (F- AUC_{Day30} /M- AUC_{Day30})	0.86	0.92	0.97			

4 讨论

借鉴相关文献中报道方法^[3-6],采用 LC-MS/MS

法对 AZM 进行测定过程中发现,液相等度洗脱条件下,AZM 峰型较宽,拖尾严重,并不能较好的完成测

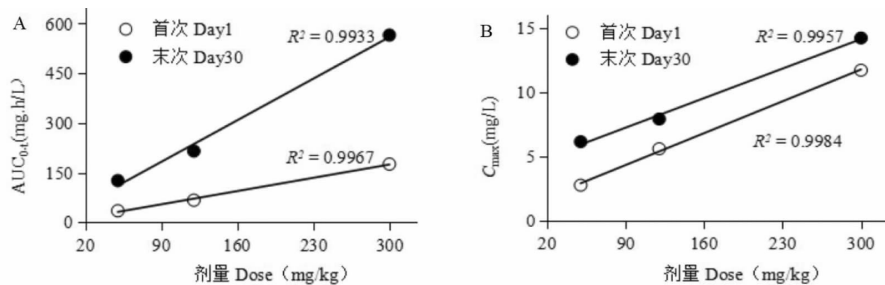


图4 毒代动力学主要参数-剂量关系图($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 main parameters dose relationship of toxicokinetics($\bar{x} \pm s, n = 10$)

注:A: AUC_(0-t); B: C_{max}。

定;采用乙腈作为流动相时,AZM 峰型较好,但是内标罗红霉素峰型拖尾严重,通过调整水相离子条件以及酸度均无法解决,最终选用甲醇作为有机相。样品处理条件采用有机试剂沉淀,分别比较甲醇及乙腈分别作为沉淀试剂时,甲醇沉淀效果更好,且溶剂效应较小;但是3倍及5倍甲醇体积沉淀蛋白时,AZM 出现较严重基质效应,通过比较最后选用12倍甲醇体积作为沉淀试剂,基质效应较小且检测精密密度良好,能充分满足检测灵敏度要求。

每天灌胃给与 AZM 1次,连续30天,在50~300 mg/kg 剂量范围内,首次和末次给药的平均 AUC₀₋₄值、平均 C_{max} 值与给药剂量呈线性关系;首次给药后及末次给药后 AZM 在雌性 SD 大鼠和雄性 SD 大鼠体内的系统暴露量未见明显差异;AZM 各剂量组蓄积因子 Ratio(AUC_{Day30}/AUC_{Day1}) 在2.86~3.92之间,表明 AZM 连续给药30天后在 SD 大鼠体内有一定蓄积。

在30天重复给药毒性试验中,AZM 300 mg/kg、120 mg/kg 剂量组大鼠出现不同程度的血液学、血液生化学部分指标异常;病理组织学结果提示,AZM 对大鼠肝脏、肾脏等脏器有一定毒性作用,且呈剂量相关性;AZM 分散片的无毒性反应剂量(NO-AEL)为50 mg/kg。综合上述结果,AMZ 在重复给药毒性试验中表现出的毒性反应与其在大鼠体内蓄积有一定关系。

参考文献

- Swainston HT, Kearn SJ. Azithromycin extended release: a review of its use in the treatment of acute bacterial sinusitis and community-acquired pneumonia in the US[J]. *Drugs*, 2007, 67: 773-792.
- Foulds G, Shepard RM, Johnson RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1990, 25(Suppl A): 73-82.
- Cai J, Qin YP, Feng SY, et al. Determination of azithromycin in human plasma by LC-MS/MS[J]. *Mod Prevent Med (现代预防医学)*, 2011, 38: 1104-1105.
- Hu X, Liu DR, Li XM, et al. Pharmacokinetics of azithromycin L-threonate in rats[J]. *J Nanchang Univ; Med Sci (南昌大学学报:医学版)*, 2013, 53(2): 17-20.
- Zheng H, Yang L, Wang L. Pharmacokinetics and relative bioavailability of azithromycin tablets in healthy Volunteers[J]. *Acta Med Univ Sci Technol Huazhong (华中科技大学学报:医学版)*, 2006, 35: 672-674.
- Wu T, Chen W, Chu JH, et al. Pharmacokinetics of azithromycin suspension, granules and capsules in healthy Chinese[J]. *Chin Remed Clin (中国药物与临床)*, 2012, 12: 706-707.
- Golde WT, Gollobin P, Rodriguez LL. A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet[J]. *Lab Animal*, 2005, 34(9): 39-43.