

左旋奥硝唑及磷酸左奥硝唑酯二钠在大鼠体内药代动力学比较研究

肖亚楠, 孙建国*, 万萍, 王广基**

(中国药科大学江苏省药物代谢动力学重点实验室, 南京 210009)

摘要 采用手性色谱 LC-MS/MS 法同时检测左旋和右旋奥硝唑, 比较研究左旋奥硝唑[(S)-ONZ]及磷酸左奥硝唑酯二钠[(S)-ONZ-P]在大鼠体内的药代动力学差异, 并监测是否发生手性转化。结果表明, 大鼠单次 iv 给予 25, 50, 100 mg/kg (S)-ONZ 及等物质的量 (S)-ONZ-P 后, (S)-ONZ-P 在 SD 大鼠体内迅速转化为 (S)-ONZ, 平均转化时间介于 1.57~3.86 min。两组大鼠血浆中 (S)-ONZ 的 $t_{1/2}$ 分别为 2.04~2.31 h; 2.02~2.51 h; $AUC_{0-\infty}$ 与剂量间呈良好的线性关系, 呈线性动力学过程。(S)-ONZ, (S)-ONZ-P 在大鼠体内药代动力学行为无显著差异, 且二者均不转化生成 (R)-ONZ。

关键词 左旋奥硝唑; 磷酸左奥硝唑酯二钠; LC-MS/MS; 药代动力学

中图分类号 R969 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2014)05-0571-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20140512

Pharmacokinetics of (S)-ornidazole and (S)-ornidazole phosphate disodium in rats

XIAO Yanan, SUN Jianguo*, WAN Ping, WANG Guangji**

Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract The aims of this study were to conduct the comparative evaluation of pharmacokinetic of (S)-ornidazole [(S)-ONZ] and (S)-ornidazole phosphate disodium [(S)-ONZ-P] in rats, and to observe the potential chiral transformation to (R)-ornidazole [(R)-ONZ] using developed LC-MS/MS method. After single, intravenous administration of 25, 50, 100 mg/kg (S)-ONZ and (S)-ONZ-P [equal molarity to that of (S)-ONZ], it was found that there existed linearity between the calculated areas under the curve ($AUC_{0-\infty}$) and dose. And elimination half-time ($t_{1/2}$) of (S)-ONZ was calculated to be 2.04-2.31 h and 2.02-2.51 h, respectively. After iv dosing of (S)-ONZ-P, (S)-ONZ-P quickly transferred into (S)-ONZ with the average transformation time of around 1.57 to 3.86 min. No significant differences in pharmacokinetics between the two drugs were found in rats. There was no (R)-ONZ detected in the plasma using both (S)-ONZ and (S)-ONZ-P.

Key words (S)-ornidazole; (S)-ornidazole phosphate; LC-MS/MS; pharmacokinetics

This study was supported by the Jiangsu Provincial Promotion Foundation for the Key Lab of Drug Metabolism and Pharmacokinetics (No. BM2012012)

前药概念在 20 世纪 50 年代末期提出, 到 19 世纪末期前药概念已经被用于改善药物的不良性质^[1]。前药策略的基本目的是改善药物的不良性质(如水溶性及通透性低、生物利用度低、目标选

择性低、化学不稳定)等^[2-3]。

奥硝唑(ONZ)于 20 世纪 70 年代由 Roche 公司以商品名 Tiberal 推出, 是继甲硝唑、替硝唑后的第 3 代硝基咪唑衍生物, 临床用于毛滴虫、阿

* 收稿日期 2014-03-06 通信作者 * Tel:025-83271176 E-mail:jgsun_cpucn@yahoo.cn

** Tel:025-83271128 E-mail:guangjiwang@hotmail.com

基金项目 江苏省药代动力学重点实验室提升项目(No. BM2012012)

米巴、贾第虫及厌氧菌感染,预防克隆恩病等^[4-5]。抗微生物实验表明左旋奥硝唑[(*S*)-ONZ]较消旋体奥硝唑和右旋奥硝唑[(*R*)-ONZ]具有更好的抗菌活性,更优的药代动力学特性,较少的不良事件^[6]和更加稳定的特点,因而目前临床上使用的均为(*S*)-ONZ。但(*S*)-ONZ水溶性低,制成注射剂时需保持较低的pH,会对机体产生一定的刺激,而其前药磷酸酯可很好地解决溶解性问题^[7]。磷酸左奥硝唑酯二钠[(*S*)-ONZ-P]在体内可被磷酸酯酶迅速转化为(*S*)-ONZ发挥其药理作用。(*S*)-ONZ进入感染的微生物细胞后,在无氧、低氧条件下硝基被氧化还原酶还原,生成毒性代谢产物,破坏DNA的双螺旋结构,并抑制细胞DNA的合成与修复,从而使病原体与细胞死亡^[8-11]。

已报道的关于(*S*)-ONZ的药代动力学研究中,多数报道为(*S*)-ONZ或(*R*)-ONZ的药代动力学研究,尚未见磷酸酯化是否会对奥硝唑的药代动力学行为产生影响的研究。由于在SD大鼠体内(*S*)-ONZ-P迅速转化为(*S*)-ONZ,故可以(*S*)-ONZ的血浆浓度表征(*S*)-ONZ-P的药代动力学过程,本实验采用LC-MS/MS技术研究分别给予(*S*)-ONZ及等物质的量(*S*)-ONZ-P后在大鼠体内两者药代动力学行为差异,对前药(*S*)-ONZ-P进行评价^[12-13];并通过模型拟合来阐述(*S*)-ONZ-P向(*S*)-ONZ转化过程,为(*S*)-ONZ-P进一步研究及临床使用提供依据。

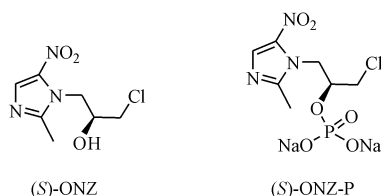


Figure 1 Chemical structure of (*S*)-ornidazole [(*S*)-ONZ] and (*S*)-ornidazole phosphate disodium [(*S*)-ONZ-P]

1 材料

1.1 试剂

(*S*)-ONZ(批号:111022),(*R*)-ONZ(批号:110305),(*S*)-ONZ-P(批号:20120741),塞克硝唑消旋体(内标,批号:121113)均由陕西合成药业有限公司提供。异丙醇、甲醇(色谱纯,美国 Merck

公司);甲酸(色谱纯,美国 Sigma 公司)。其余试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

高效液相色谱-四极杆串联质谱联用仪[Finnigan Surveyor 高效液相色谱系统、Thermo Finnigan TSQ Quantum Discovery max 质谱系统、电喷雾离子源(ESI)、Xcalibur1.2 工作站及 LCQuan 数据处理软件];Thermo 高速冷冻离心机;Milli-Q Gradient A1 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.3 动物

SD 大鼠,购自辽宁长生生物技术有限公司,许可证号:SCXK(辽)2010-0001,动物质量合格证编号:0007862。

2 方法

2.1 色谱条件及质谱参数

色谱柱:Phenomenex 手性直链淀粉色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),柱温:30 ℃;流动相:含 0.1% 甲酸的甲醇-异丙醇(90:10);流速:0.4 mL/min;进样量:5 μL。电喷雾离子源;选择反应监测(SRM);正离子扫描;监测离子对:左旋和右旋奥硝唑[*M* + *H*]⁺ *m/z* 220.1 → 128.0,塞克硝唑(内标)[*M* + *H*]⁺ *m/z* 186.1 → 128.0。

2.2 血浆处理方法

取大鼠血浆 50 μL,加入蛋白沉淀剂(100 ng/mL 塞克硝唑的甲醇溶液)500 μL,振荡 3 min,18 000 r/min 离心 2 次(5 min),转移上清液 80 μL 至进样瓶,5 μL 进样分析。部分血浆中(*S*)-ONZ 浓度高于定量上限,需适度稀释后进样分析。取空白血浆,按上述方法处理后作为稀释剂,稀释 20 倍进样分析。

2.3 大鼠体内药代动力学方案设计

(*S*)-ONZ 药代动力学研究剂量为 25, 50, 100 mg/kg, (*S*)-ONZ-P 为等物质的量给药(0.114, 0.228, 0.456 mmol/kg)。(*S*)-ONZ 给药溶液用乙醇-生理盐水(1:9)配制。(*S*)-ONZ-P 给药溶液用生理盐水配制。

36 只大鼠,随机等分为(*S*)-ONZ 组和(*S*)-ONZ-P 组,禁食 8 ~ 12 h 后,iv 给予(*S*)-ONZ 及等物质的量(*S*)-ONZ-P。分别于给药前即刻及给药后 2, 4, 10, 15, 30 min 以及 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 采集

血样约 200 μL 至预先用 EDTA 二钠抗凝的采血管中,冰盒保存,于 2 h 以内以 8 000 r/min 离心 5 min,转移上层血浆按“2.2.1”项下方法处理后进样分析,检测血浆中(S)-ONZ 的浓度。

2.4 数据分析

将所得的血药浓度-时间数据用 WinNonlin 6.1 的非房室模型及一房室(No Lag Time)分析进行估算。

3 结果

3.1 专属性考察

本实验条件下,使用手性直链淀粉色谱柱对(S)-ONZ、(R)-ONZ、塞克硝唑进行拆分。(S)-ONZ、(R)-ONZ 及塞克硝唑均有较大的色谱峰,血浆中杂质峰不干扰样品峰的测定,基线噪音小,(S)-ONZ/IS-I(塞克硝唑I)、(R)-ONZ/IS-II(塞克硝唑II)的保留时间分别为 5.15/5.20 min 和 7.00/7.65 min (图 2)。本法具有较高的专属性。

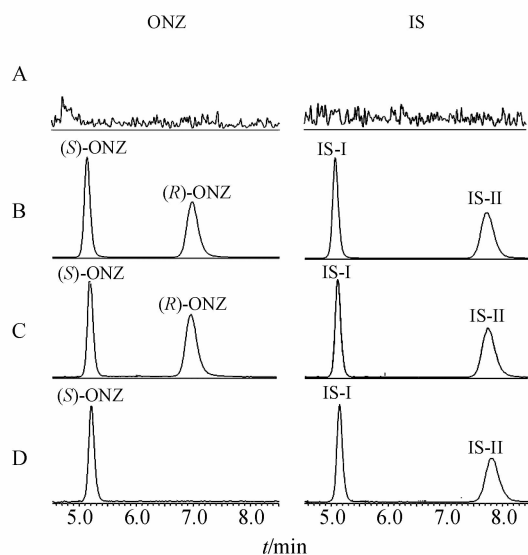


Figure 2 LC-MS/MS chromatograms of ONZ in rats
A: Blank plasma; B: (S)-ONZ, (R)-ONZ and secnidazole (IS) mixed standard solution; C: (S)-ONZ, (R)-ONZ, and IS in blank plasma; D: (S)-ONZ and IS from plasma sample after 10 min administration of 0.228 mmol/kg (S)-ONZ-P [equal molar amount with 50 mg/kg (S)-ONZ]

3.2 标准曲线的制备

取空白大鼠血浆 45 μL 若干份,依次分别加入(S)-ONZ 和(R)-ONZ 混合系列工作液 5 μL ,振荡 30 s,配制成(S)-ONZ 和(R)-ONZ 终浓度分别为 50, 100, 200, 500, 1 000, 2 000, 5 000,

10 000 ng/mL 的标准血浆样品,随后按“2.2”下方法处理,5 μL 进样分析,LC-MS/MS 分析血浆中(S)-ONZ 和(R)-ONZ 的浓度。以所测血浆样品中待测物质(S)-ONZ 和塞克硝唑I;(R)-ONZ 和塞克硝唑II的峰面积比值(y)为因变量,待测物质(S)-ONZ 和(R)-ONZ 的血浆终浓度为自变量(x),进行最小二乘法(权重系数为 $1/x$)回归运算,求得(S)-ONZ 和(R)-ONZ 在大鼠血浆中的直线回归方程分别为: $y = 0.0005x + 0.0082, R^2 = 0.9999$; $y = 0.0006x + 0.0037, R^2 = 0.9996$ 。

3.3 精密度、回收率、基质效应和稳定性

测定(S)-ONZ 和(R)-ONZ 的低、中、高 3 种质量浓度(50, 1 000, 10 000 ng/mL)血浆样本的批内、批间精密度、回收率、基质效应。(S)-ONZ 批内精密度(RSD,%)分别为 5.1、1.5、0.9;批间精密度(RSD,%)分别为 5.4、2.0、3.0;回收率分别为 93.4、106.4、93.0;基质效应 94.7%~97.7%。(R)-ONZ 批内精密度(RSD,%)分别为 3.7、1.7、2.1;批间精密度(RSD,%)分别为 4.3、5.3、6.7;回收率(%)分别为 96.9、101.7、91.2;基质效应 95.4%~101.5%。(S)-ONZ 和(R)-ONZ 精密度回收率良好,大鼠血浆中无明显基质效应。低、中、高 3 种质量浓度的(S)-ONZ 和(R)-ONZ 在大鼠血浆中室温(室内光照)放置 24 h、-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存 7 d、样品处理后进样盘(4 $^{\circ}\text{C}$)放置 24 h 均稳定(相对误差小于 15%)。20 倍稀释的相对误差小于 15%,提示该稀释方法可靠。

3.4 EDTA-2Na 对(S)-ONZ-P 的稳定作用

由于磷酸酯类前药易被磷酸酯酶转化为原药,因此需对体外抗凝剂对磷酸酯酶抑制作用进行考察,以保证血浆浓度测定的准确性。分别选用含 1.6, 2.4, 3.2, 4.8, 7.2 mg/mL EDTA-2Na 抗凝处理的空白大鼠血浆,制备终浓度为 10 000 ng/mL (29.10 $\mu\text{mol/L}$)的(S)-ONZ-P 血浆样本,室温放置 6 h 后测定血浆中(S)-ONZ 的生成量,计算(S)-ONZ-P 的转化率,并以此为纵坐标,对应的 EDTA-2Na 浓度为横坐标,即得(S)-ONZ-P 在 EDTA 抗凝血浆中的转化曲线(图 3)。随着 EDTA-2Na 用量的增加,(S)-ONZ-P 在大鼠血浆中的水解转化率逐渐减少,当 EDTA-2Na 为 7.2 mg/mL 时,(S)-ONZ-P 基本不发生转化(转化率趋近 1%)。因此,

在后续动物研究中,采用含 7.2 mg/mL EDTA-2Na 的血浆处理采血管。

3.5 (S)-ONZ-P、(S)-ONZ 在大鼠体内药代动力学
大鼠单次 iv 给予 25, 50, 100 mg/kg (S)-ONZ 和等物质的量 (S)-ONZ-P 后测得 (S)-ONZ 的经时血药浓度时间曲线见图 4, 大鼠血浆中未检测到 (R)-ONZ, WinNonlin 6.1 非房室模型计算主要药代动力学参数见表 1。结果显示, iv 给予 (S)-ONZ-P 和 (S)-ONZ 后 (S)-ONZ 在大鼠体内的药代动力学参数无显著差异。

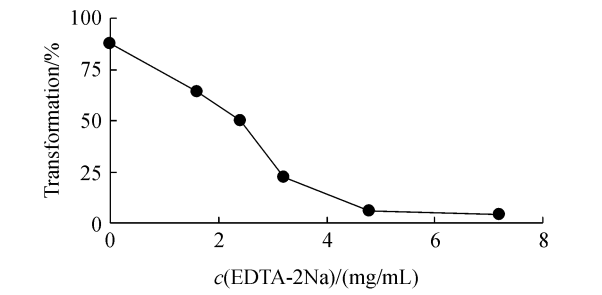


Figure 3 Conversion rate of (S)-ONZ-P in rats' plasma with different concentration of disodium EDTA

Table 1 Main pharmacokinetic parameters of (S)-ONZ-P and (S)-ONZ in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Parameter	0.114 mmol/kg		0.228 mmol/kg		0.456 mmol/kg	
	(S)-ONZ-P	(S)-ONZ	(S)-ONZ-P	(S)-ONZ	(S)-ONZ-P	(S)-ONZ
$t_{1/2}/h$	2.14 ± 0.69	2.31 ± 0.80	2.02 ± 0.52	2.04 ± 0.51	2.51 ± 0.51	2.13 ± 0.55
$AUC_{0-\infty}/(mg \cdot h/L)$	114.16 ± 58.20	88.19 ± 26.70	150.77 ± 43.90	142.00 ± 40.23	445.04 ± 182.09	328.54 ± 102.61
MRT/h	3.49 ± 1.20	3.40 ± 0.83	3.17 ± 1.05	2.88 ± 0.78	4.14 ± 1.24	3.09 ± 0.69
$V/(L/kg)$	0.74 ± 0.17	0.95 ± 0.24	0.97 ± 0.09	1.05 ± 0.13	0.90 ± 0.28	1.01 ± 0.41
$CL/(L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$	0.28 ± 0.14	0.31 ± 0.10	0.35 ± 0.10	0.38 ± 0.11	0.26 ± 0.12	0.33 ± 0.10

3.6 (S)-ONZ-P 向 (S)-ONZ 的转化

将单次 iv (S)-ONZ-P 后大鼠体内实测 (S)-ONZ 的平均经时血浆药物浓度使用 WinNonlin 6.1 进行房室模型拟合, 模型选择口服一房室型 (No Lag Time), 权重系数选择 1/Y, 其中口服一房室模型中吸收速率常数 (K_{01}) 代表 (S)-ONZ 自其磷酸二钠盐中被酯酶水解释放至中央室 (血液室) 的转化速率常数, 本实验中将参数 K_{01} 的倒数 ($1/K_{01}$) 定义为 (S)-ONZ-P iv 给药后在大鼠体内转化成 (S)-ONZ 的转化时间。结果如表 2 所示, (S)-ONZ-P iv 给药后在大鼠体内迅速转化为 (S)-ONZ, 平均转化时间介于 1.57 ~ 3.86 min 之间, 这与相关文献报道基本一致^[14]。

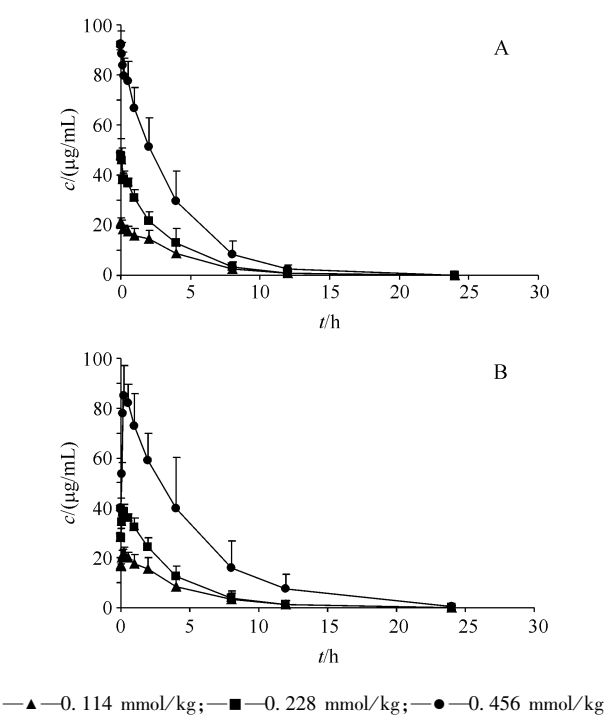


Figure 4 Mean concentration-time profiles of (S)-ONZ (A) and (S)-ONZ-P (B) after a single iv administration of different doses in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 $1/K_{01}$ of (S)-ONZ-P translate into (S)-ONZ after a single iv administration of different doses in rat ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Parameter	(S)-ONZ-P/(mmol/kg)		
	0.114	0.228	0.456
K_{01}/h^{-1}	38.21 ± 8.60	33.15 ± 2.53	15.54 ± 0.97
$(1/K_{01})/min$	1.57	1.81	3.86

4 讨论

奥硝唑由于其水溶性差, 在制成注射剂时需保持较低 pH, 会对人体造成一定的刺激。(S)-ONZ-P 作为 (S)-ONZ 的磷酸酯前体化合物, 其利用磷酸基团的高负电性特点改善奥硝唑的脂水分配系数, 克服了 (S)-ONZ 本身水溶性差, 开发成注射剂时必须保持较低 pH 的缺点, 另一方面由于体内含有磷酸酯酶, 当磷酸酯前药进入体内, 可迅速被水解

成原药发挥药效,可极大地提高(S)-ONZ 临床用药的顺应性与产品的普适性。

目前未见关于磷酸酯化对(S)-ONZ 药代动力学影响的报道,本实验研究发现(S)-ONZ-P 和(S)-ONZ 在大鼠血浆内经时过程无显著差异。磷酸化是否会对(S)-ONZ 在各组织的分布、体内的排泄、代谢酶的诱导和抑制等方面产生影响还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] Huttunen KM, Raunio H, Rautio J. Prodrugs—from serendipity to rational design[J]. *Pharmacol Rev*, 2011, **63**(3):750–771.
- [2] Zawilska JB, Wojcieszak J, Olejniczak AB. Prodrugs; a challenge for the drug development[J]. *Pharmacol Rep*, 2013, **65**(1):1–14.
- [3] Stella VJ. Prodrugs: some thoughts and current issues[J]. *J Pharm Sci*, 2010, **99**(12):4 755–4 765.
- [4] Scott FI, Osterman MT. Medical management of Crohn disease[J]. *Clin Colon Rectal Surg*, 2013, **26**(2):67–74.
- [5] Papi C, Fasci SF, Margagnoni G, et al. Randomized controlled trials in prevention of postsurgical recurrence in Crohn's disease[J]. *Rev Recent Clin Trials*, 2012, **7**(4):307–413.
- [6] Chen K, Sun JH, Wang, ZQ, et al. Different mechanism between ornidazole enantiomers on central nervous system in mice[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2012, **43**(3):271–274.
- [7] Jana S, Mandlekar S, Marathe P. Prodrug design to improve pharmacokinetic and drug delivery properties: challenges to the discovery scientists[J]. *Curr Med Chem*, 2010, **17**(32):3 874–3 908.
- [8] Marat DM, Romari Am, Mariela N, et al. Biomarkers of genotoxicity and genomic instability in a non-human primate, *Cebus libidinosus* (Cebidae, Platyrrhini), exposed to nitroimidazole derivatives[J]. *Mutat Res*, 2011, **721**(1):108–113.
- [9] Menendez D, Rojas E, Herrera LA, et al. DNA breakage due to metronidazole treatment[J]. *Mutat Res*, 2001, **478**(1/2):153–158.
- [10] Muller J, Schildknecht P, Muller N. Metabolism of nitro drugs metronidazole and nitazoxanide in *Giardia lamblia*: characterization of a novel nitroreductase (GINR2)[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2013, **68**(8):1 781–1 789.
- [11] Lopez NMM, Palermo AM, Mudry MD, et al. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives[J]. *Toxicol In Vitro*, 2003, **17**(1):35–40.
- [12] Zhu YC, Sun JG, Peng Y, et al. Research on the pharmacokinetics of prodrug[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2012, (12):1 433–1 440.
- [13] Feng D, Sun JG, Zhu YC, et al. Pharmacokinetics of a novel anti-hypertension candidate ATPT in Beagle dogs[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2013, **44**(2):151–155.
- [14] Duan YB, Zhang SB, Liu S, et al. Study on pharmacokinetics methodology of S-(–)-ornidazole disodium phosphate[J]. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)* (东南大学学报 医学版), 2011, **30**(2):312–315.