

# 左旋奧硝唑及磷酸左奧硝唑酯二鈉在大鼠體內 藥代動力學比較研究

肖亞楠, 孫建國\*, 万萍, 王廣基\*\*

(中國藥科大學江蘇省藥物代動力學重點實驗室, 南京 210009)

**摘要** 采用手性色譜 LC-MS/MS 法同時檢測左旋和右旋奧硝唑, 比較研究左旋奧硝唑 [(S)-ONZ] 及磷酸左奧硝唑酯二鈉 [(S)-ONZ-P] 在大鼠體內的藥代動力學差異, 并監測是否發生手性轉化。結果表明, 大鼠單次 iv 純予 25, 50, 100 mg/kg (S)-ONZ 及等摩爾量 (S)-ONZ-P 後, (S)-ONZ-P 在 SD 大鼠體內迅速轉化為 (S)-ONZ, 平均轉化時間介於 1.57 ~ 3.86 min。兩組大鼠血漿中 (S)-ONZ 的  $t_{1/2}$  分別為 2.04 ~ 2.31 h; 2.02 ~ 2.51 h;  $AUC_{0-\infty}$  與劑量間呈良好的線性關係, 呈線性動力學過程。 (S)-ONZ, (S)-ONZ-P 在大鼠體內藥代動力學行為無顯著差異, 且二者均不轉化為 (R)-ONZ。

**關鍵詞** 左旋奧硝唑; 磷酸左奧硝唑酯二鈉; LC-MS/MS; 藥代動力學

中圖分類號 R969 文獻標誌碼 A 文章編號 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).

前藥概念在 20 世紀 50 年代末期提出, 到 19 世紀末期前藥概念已經被用於改善藥物的不良性質<sup>[1]</sup>。前藥策略的基本目的是改善藥物的不良性質(如水溶性及通透性低、生物利用度低、目標選

擇性低、化學不穩定)等<sup>[2-3]</sup>。

奧硝唑(ONZ)於 20 世紀 70 年代由 Roche 公司以商品名 Tiberol 推出, 是繼甲硝唑、替硝唑後的第 3 代硝基咪唑衍生物, 臨床用於毛滴蟲、阿

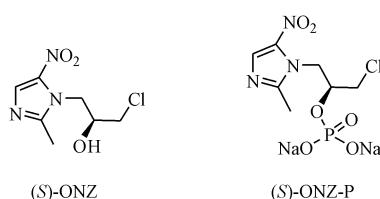
\* 收稿日期 2014-03-06 通信作者 \* Tel: 025-83271176 E-mail: jgsun\_cupcn@yahoo.cn

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

基金項目 江蘇省藥代動力學重點實驗室提升項目(No. BM2012012)

米巴、贾第虫及厌氧菌感染,预防克隆恩病等<sup>[4-5]</sup>。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<sup>[6]</sup>和更加稳定的特点,因而目前临幊上使用的均为(*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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8-11]</sup>。

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<sup>[12-13]</sup>;并通过模型拟合来阐述(*S*)-ONZ-P向(*S*)-ONZ转化过程,为(*S*)-ONZ-P进一步研究及临幊使用提供依据。



**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 °C;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[ $M + H$ ]<sup>+</sup> *m/z* 220.1→128.0,塞克硝唑(内标)[ $M + H$ ]<sup>+</sup> *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  $\mu\text{L}$  至预先用 EDTA 二钠抗凝的采血管中, 冰盒保存, 于 2 h 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。

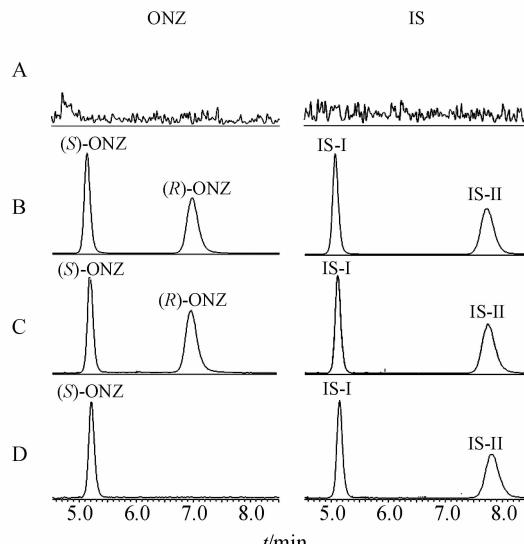


Figure 2 LC-MS/MS chromatograms of ONZ in rats

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  $\mu\text{L}$  若干份, 依次分别加入 (S)-ONZ 和 (R)-ONZ 混合系列工作液 5  $\mu\text{L}$ , 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  $\mu\text{L}$  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 °C 冻存 7 d, 样品处理后进样盘 (4 °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 给于 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。

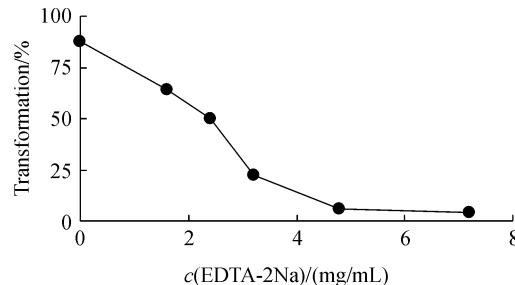


Figure 3 Conversion rate of (S)-ONZ-P in rats' plasma with different concentration of disodium EDTA

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

### 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<sup>[14]</sup>。

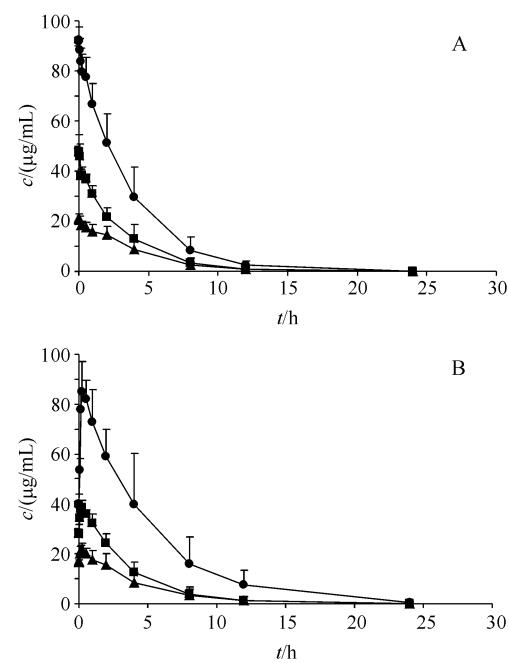


Figure 4 Mean concentration-time profiles of (S)-ONZ (A) and (S)-ONZ-P (B) after a single iv administration of different doses in rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

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
$K_{01}/h^{-1}$	$38.21 \pm 8.60$	$33.15 \pm 2.53$	$15.54 \pm 0.97$
$(1/K_{01})/\text{min}$	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, Rauio 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 (GLNR2) [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*-(–) oornifazol disodium phosphate [J]. *J Southeast Univ (Med Sci Ed)* (东南大学学报 医学版), 2011, **30**(2): 312–315.