

# HPLC法测定奥硝唑在犬体内的血药浓度及其药动学研究

陈瑶<sup>1\*</sup>, 龙恩武<sup>1#</sup>, 袁浩宇<sup>2</sup>, 季平<sup>2</sup>(1.四川省医学科学院/四川省人民医院药剂科, 成都 610072; 2.核工业四一六医院药剂科, 成都 610051)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3468-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.05

**摘要** 目的:测定犬体内奥硝唑的血药浓度,研究其药动学特征。方法:6只犬单剂量静脉注射奥硝唑50 mg/kg,于给药前及给药后0.083、0.17、0.33、0.66、1、1.5、2、3、4、6、8、10、24、48 h采集取血,乙腈沉淀蛋白,高效液相色谱法测定血药浓度,用DAS 2.0药动学程序计算药动学参数。色谱条件采用色谱柱为Hypersil BDS C<sub>18</sub>,流动相为乙腈-0.1%磷酸(18:82),流速为1.0 ml/min,柱温为40 ℃,检测波长为310 nm。结果:奥硝唑检测浓度的线性范围为0.32~64.0 μg/ml( $r=0.999 1$ ),检测限为0.16 μg/ml,平均回收率为90.53%( $n=9$ ),日内和日间RSD均<10%( $n=5$ );奥硝唑的主要药动学参数分别为 $c_{\max}$ (31.72±13.51) μg/ml, $t_{1/2\beta}$ (5.18±2.36) h,CL(0.17±0.07) L/(h·kg),AUC<sub>0-48 h</sub>(293.53±87.32) μg·h/ml。结论:奥硝唑在犬体内药动学符合二室模型,消除较慢,分布较广。

**关键词** 奥硝唑;Beagle犬;高效液相色谱法;药动学

## Study on Plasma Concentration and Pharmacokinetics of Ornidazole in Dogs by HPLC

CHEN Yao<sup>1</sup>, LONG En-wu<sup>1</sup>, YUAN Hao-yu<sup>2</sup>, JI Ping<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Sichuan Academy of Medical Sciences/Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; 2.Dept. of Pharmacy, Nuclear Industry 416 Hospital, Chengdu 610051, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method to detect the plasma concentration of ornidazole in Beagle dog, and to study pharmacokinetic characteristics of it. METHODS: 6 dogs received intravenous injection of ornidazole 50 mg/kg. The blood samples were collected before administration and 0.083, 0.17, 0.33, 0.66, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24 and 48 h after administration. The blood sample was precipitated with acetonitrile. The plasma concentration of ornidazole was determined by HPLC. The pharmacokinetic parameters were calculated with DAS 2.0 software. The determination was performed on Hypersil BDS C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.1% phosphonic acid (18:82) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 310 nm. RESULTS: The linear range of ornidazole was 0.32-64.0 μg/ml ( $r=0.999 1$ ) with an average recovery of 90.35% ( $n=9$ ). The limit of detection was 0.16 μg/ml, and RSDs of inter-day and intra-day were lower than 10% ( $n=5$ ). The main pharmacokinetic parameters of ornidazole were as follows:  $c_{\max}$  (31.72±13.51) μg/ml;  $t_{1/2\beta}$  (5.18±2.36) h; CL (0.17±0.07) L/(h·kg); AUC<sub>0-48 h</sub> (293.53±87.32) μg·h/ml. CONCLUSIONS: The pharmacokinetics of ornidazole in Beagle dog is up to two-compartment model, and it is distributed widely and eliminated slowly.

**KEY WORDS** Ornidazole; Beagle dogs; HPLC; Pharmacokinetics

奥硝唑(Ornidazole),化学名为1-(3-氯-2-羟丙基)-2-甲基-5-硝基咪唑,为第3代硝基咪唑类抗生素,可用于治疗由脆弱拟杆菌、狄氏拟杆菌、梭状芽胞杆菌、真杆菌、消化球菌和消化链球菌、幽门螺杆菌、牙龈类杆菌等敏感厌氧菌所引起的多种感染性疾病,还可用于治疗消化系统严重阿米巴虫病,如阿米巴痢疾、阿米巴肝脓肿等。其作用机制是通过分子的硝基在无氧环境中还原成氨基,或通过自由基的形成,使受体螺旋组织结构断裂,阻滞其转录复制而衰亡<sup>[1-3]</sup>。本文建立了灵敏的高效液相色谱(HPLC)法测定奥硝唑在Beagle犬体内的血药浓度,并对奥硝唑的药动学特征进行研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

2010C型HPLC仪(日本岛津公司);BS224S万分之一电

\* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:028-87393615。E-mail:xuyong19711028@163.com

# 通信作者:副主任药师。研究方向:临床药学。电话:028-87393403。E-mail:dragon984169@126.com

子天平(德国赛多利斯公司);TGL-16B台式高速离心沉淀器(上海安亭科学仪器厂);XW-80型旋涡混合器(上海医科大学实验仪器厂)。

### 1.2 药品与试剂

奥硝唑原料药(湖北兴银河化工有限公司,批号:081001,纯度:99.0%);奥硝唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100608-200701,纯度:≥99%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为重蒸水。

### 1.3 动物

Beagle犬6只,普通级,♀♂各半,体质量8~10 kg,由广州市医药工业研究所提供,使用许可证号为SCXK(粤)2003-0007。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil BDS C<sub>18</sub>(200 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(18:82, V/V),流速:1.0 ml/min;检测波长:310 nm;柱温:40 ℃;进样量:20 μl。

## 2.2 血浆样品的测定

取血浆样品 0.2 ml, 加入乙腈 0.4 ml, 旋涡沉淀蛋白 1 min, 离心半径 8 cm、10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液进样 20  $\mu$ l, 记录色谱和峰面积, 以外标法按标准曲线方程计算血浆中奥硝唑的浓度。

## 2.3 专属性考察

取犬空白血浆、空白血浆+奥硝唑对照品、犬静脉注射奥硝唑 1 h 后的血浆样品, 处理后进样测定, 记录色谱。结果, 奥硝唑的保留时间约为 5.9 min, 血浆内源性物质及其他杂质不干扰样品的分离测定, 色谱图见图 1。

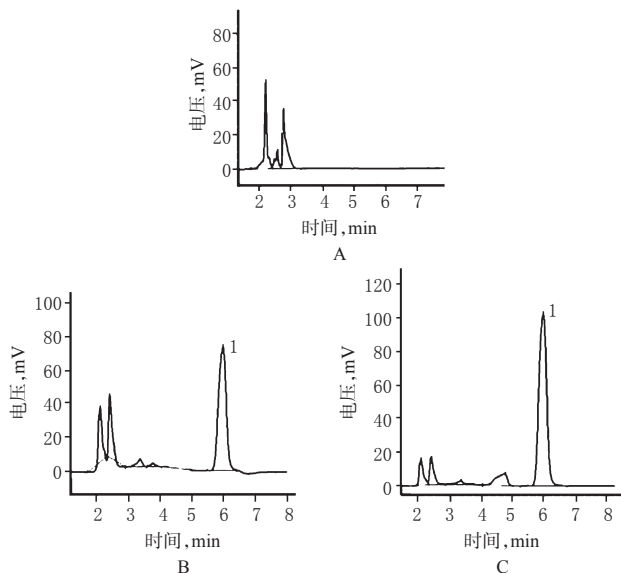


图1 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+对照品; C. 血浆样品; 1. 奥硝唑

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+substance control; C. plasma sample; 1. ornidazole

## 2.4 线性关系考察

取 0.2 ml 犬空白血浆, 加入不同质量浓度的奥硝唑对照品溶液, 使血浆中奥硝唑的质量浓度依次为 0.32、0.64、1.28、2.56、5.12、12.8、25.6、64.0  $\mu$ g/ml, 处理后进样测定, 记录色谱。以奥硝唑的质量浓度 ( $c$ ) 为横坐标、峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标, 用最小二乘法进行线性回归。得标准曲线方程为  $A=13\ 614c+2\ 671.8$  ( $r=0.999\ 1$ )。结果表明, 奥硝唑检测质量浓度的线性范围为 0.32~64.0  $\mu$ g/ml, 定量限为 0.32  $\mu$ g/ml, 检测限为 0.16  $\mu$ g/ml。

## 2.5 精密度试验

取 0.2 ml 犬空白血浆, 加入不同质量浓度的奥硝唑对照品溶液配制成低、中、高质量浓度 (0.32、12.8、25.6  $\mu$ g/ml) 的血浆样品, 照“2.2”项下方法分别在同一日内测定 5 次和每日 5 次连续测定 3 d, 考察日内、日间精密度。结果, 低、中、高质量浓度的血浆样品的日内 RSD 分别为 5.5%、4.9%、5.1% ( $n=5$ ), 日间 RSD 分别为 8.6%、5.7%、5.5% ( $n=5$ ), 表明日内、日间精密度良好。

## 2.6 提取回收率试验

取 0.2 ml 犬空白血浆, 加入不同质量浓度的奥硝唑对照品溶液配制成低、中、高质量浓度 (0.32、12.8、25.6  $\mu$ g/ml) 的血浆样品, 处理后进样测定, 记录峰面积 ( $A_t$ )。另取高、中、低已知质量浓度的奥硝唑对照品溶液, 不经处理直接进样, 记录峰面

积 ( $A_s$ )。以前后两种处理方法测得的峰面积之比 ( $A_t/A_s$ ) 计算提取回收率。结果, 平均提取回收率为 90.53%, RSD 为 3.2% ( $n=9$ )。

## 2.7 稳定性试验

取 0.2 ml 犬空白血浆, 加入不同质量浓度的奥硝唑对照品溶液配制成低、中、高质量浓度 (0.32、12.8、25.6  $\mu$ g/ml) 的血浆样品, 分别进行以下处理: 于室温放置 8 h、反复冻融 3 次、-20  $^{\circ}$ C 冰箱冷冻放置 20 d, 考察稳定性。结果, 低、中、高质量浓度的血浆样品于室温放置 8 h 测得的峰面积 RSD 分别为 3.9%、6.7%、5.8% ( $n=3$ ); 反复冻融 3 次测得的峰面积 RSD 分别为 2.1%、6.4%、8.7% ( $n=3$ ); 冷冻放置 20 d 测得的峰面积 RSD 分别为 4.7%、7.2%、8.1% ( $n=3$ )。

## 2.8 药动学实验

取 Beagle 犬 6 只,  $\text{♀}$   $\text{♂}$  各半, 服药前禁食 12 h, 次日晨静脉注射奥硝唑 50 mg/kg, 给药 4 h 后统一进食。于给药前及给药后 0.083、0.17、0.33、0.66、1、1.5、2、3、4、6、8、10、24、48 h 股静脉采血 0.2 ml, 分离血浆, -20  $^{\circ}$ C 冻存待测。取不同时间的血浆样品, 按“2.2”项下方法处理后进样测定, 记录峰面积, 绘制药-时曲线, 用 DAS 2.0 药动学程序计算药动学参数。结果表明, 奥硝唑的主要药动学参数分别为  $c_{\max}$ : (31.72  $\pm$  13.51)  $\mu$ g/ml,  $t_{1/2\alpha}$ : (0.12  $\pm$  0.03) h,  $t_{1/2\beta}$ : (5.18  $\pm$  2.36) h, VL: (1.41  $\pm$  0.78) L/kg, CL: (0.17  $\pm$  0.07) L/(h $\cdot$ kg),  $AUC_{0-48\text{h}}$ : (293.53  $\pm$  87.32)  $\mu$ g $\cdot$ h/ml,  $AUC_{0-\infty}$ : (299.24  $\pm$  69.84)  $\mu$ g $\cdot$ h/ml,  $MRT_{0-48\text{h}}$ : (8.039  $\pm$  4.11) h。奥硝唑在犬体内的药-时曲线见图 2。

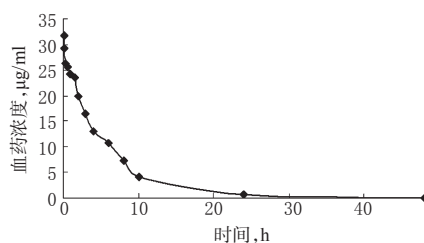


图2 奥硝唑在犬体内的药-时曲线

Fig 2 Plasma concentration-time curves of ornidazole in dogs

## 3 讨论

奥硝唑为第 3 代硝基咪唑类衍生物, 于 20 世纪 70 年代由瑞士 Roche 公司研发。与甲硝唑相比, 其疗效更高、疗程更短、体内分布更广。国内外已有奥硝唑的动物及人体血药浓度测定和药动学研究文献报道, 其中血药浓度的测定方法包括气相色谱法、放射性薄层和 HPLC 法, 血浆样品的处理方法有采用乙酸乙酯或氯仿等有机溶剂进行液液萃取, 还有采用 10% 三氯乙酸或甲醇直接沉淀蛋白等<sup>[4-6]</sup>。本文参照文献方法, 直接用乙腈沉淀蛋白, 采用外标法进行样品测定, 简化了试验步骤, 结果表明本方法灵敏度高、专属性强, 适用于奥硝唑的血药浓度测定。

奥硝唑临床最大剂量为 1.5 g/d, 根据人与犬的等效小剂量系数折算法换算, 犬的给药剂量为 50 mg/kg。参考相关文献<sup>[7-9]</sup>, 笔者确定采血时间点为给药前及给药后 0.083、0.17、0.33、0.66、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、6.0、8.0、10.0、24、48 h。研究表明, 奥硝唑在犬体内药动学符合二室模型, 消除较慢, 分布较广, 奥硝唑在不同种属动物体内过程差异较大<sup>[7-9]</sup>。

## 参考文献

# 布地奈德对哮喘模型大鼠气道炎症的缓解作用及其机制研究

王苑<sup>1\*</sup>, 王优<sup>2</sup>(1.广东医学院附属医院药学部, 广东湛江 524001; 2.广东医学院附属医院儿科, 广东湛江 524001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)37-3470-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.37.06

**摘要** 目的:研究布地奈德对哮喘模型大鼠气道炎症的缓解作用及其机制。方法:取大鼠随机分为正常对照组、模型组和低、中、高剂量布地奈德(0.25、1、2 mg/kg)组,每组10只,除正常对照组外其余各组大鼠以卵白蛋白(OVA)致敏激发法制备哮喘模型;布地奈德组于第14天开始雾化吸入OVA前30 min雾化吸入相应剂量的布地奈德溶液进行干预,每次10 min,每日2次,连续7 d。末次雾化24 h后尾静脉取血和支气管肺泡灌洗液(BALF),检测血清和BALF中嗜酸粒细胞(Eos)、白细胞介素4(IL-4)、免疫球蛋白E(IgE)及胸腺活化调节趋化因子(TARC)的水平。结果:与正常对照组比较,模型组和低剂量布地奈德组大鼠血清和BALF中Eos数量和IL-4、IgE和TARC的含量均明显增加( $P < 0.05$ ),中、高剂量布地奈德组间比较上述指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与模型组比较,中、高剂量布地奈德组大鼠血清和BALF中Eos数量和IL-4、IgE、TARC含量均明显降低( $P < 0.05$ ),低剂量布地奈德组上述指标差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:布地奈德能缓解哮喘模型大鼠的气道炎症,且与剂量呈正相关;其可能与降低TARC含量有关。

**关键词** 胸腺活化调节趋化因子;布地奈德;哮喘模型;大鼠;气道炎症;缓解作用;机制

## Remission Effects and Mechanism of Budesonide on Airway Inflammation in Asthmatic Rats

WANG Yuan<sup>1</sup>, WANG You<sup>2</sup>(1.Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524001, China; 2.Dept. of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Guangdong Zhanjiang 524001, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the remission effect and mechanism of budesonide on airway inflammation in asthmatic rats. METHODS: Rats were randomly divided into normal control group, model group and budesonide low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.25, 1, 2 mg/kg) with 10 rats in each group. The asthmatic model was established in those groups by the ovalbumin (OVA) provocation methods, except for normal control group. Budesonide group was given aerosol inhalation of budesonide solution for 10 min each time, twice a day for consecutive 7 days, 30 min before aerosol inhalation of OVA since the 14th day. Blood and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were collected 24 h after the last inhaling budesonide. The levels of eosinophilic granulocyte (Eos), IL-4, IgE and thymus and activation regulated chemokine (TARC) in serum and BALF were measured. RESULTS: Compared with normal control group, the number of Eos, the contents of IL-4, IgE and TARC in serum and BALF were increased significantly in model group and budesonide low-dose group ( $P < 0.05$ ); there was no statistical significance in above index of budesonide medium-dose and high-dose groups ( $P > 0.05$ ). Compared with model group, the number of Eos, the contents of IL-4, IgE and TARC in serum and BALF of budesonide medium-dose and high-dose groups were decreased significantly ( $P < 0.05$ ); there was no statistical significance in above index of budesonide low-dose group ( $P > 0.05$ ). CONCLUSIONS: Budesonide can relieve airway inflammation in asthmatic rats in dose-dependant manner, which may be associated with the decrease of TARC.

**KEY WORDS** Thymus and activation regulated chemokine; Budesonide; Asthmatic model; Rats; Airway inflammation; Remission effects; Mechanism

[1] 田怀平,王美纳.奥硝唑的药理作用及临床应用[J].中国药房,2003,14(1):50.

[2] 陈吉生,黎行山,叶茂清,等.复方奥硝唑栓的体外抗菌活性研究[J].中国药房,2006,17(24):1 854.

[3] 夏革清,王泽华.奥硝唑和甲硝唑栓治疗细菌性阴道病临床随机双盲对照研究[J].中国妇幼保健,2005,20(21):2 790.

[4] 蔡震.奥硝唑血药浓度的高效液相色谱法测定[J].现代医

\* 副主任药师。研究方向:医院制剂及临床药学。电话:0759-2387681。E-mail:88yingzi@163.com

药卫生,2008,24(5):655.

[5] 魏敏吉,李天云,赵彩云,等.奥硝唑片在健康人体的生物等效性[J].中国临床药理学杂志,2010,26(11):822.

[6] 李芹,王本杰,郭瑞晨.奥硝唑胶囊人体药代动力学及生物等效性研究[J].中国临床药理学杂志,2002,18(2):119.

[7] 陈燕,石涛,柳晓泉,等.左旋和右旋奥硝唑在大鼠体内的药代动力学[J].中国药科大学学报,2006,37(1):41.

[8] 郭威希,刘海涛,罗云,等.奥硝唑注射液兔体内药理学研究[J].广东药学院学报,2005,21(6):665.

(收稿日期:2013-03-14 修回日期:2013-05-03)