文章编号:1000-5404(2014)12-1295-04

论著

不同粒径的阳离子阿奇霉素泡囊体内生物等效性研究

钟 萌[1],孙 全[1],冯 悦[2],万胜利[1],张景勋[1] (400016 重庆,重庆医科大学药物高校工程研究中心[1];646000 四川 泸州,泸州医学院附属医院核医学科[2])

[摘要] **目的** 比较不同粒径的阳离子阿奇霉素囊泡及阿奇霉素(azithromycin,AM)原料药在大鼠体内的药代动力学参数,并计算其相对生物利用度。**方法** 大鼠单剂量口服小粒径、大粒径阿奇霉素囊泡及阿奇霉素原料药后,采用HPLC法测定药物浓度,并用DAS2.1.1软件计算药代动力学参数并以统计矩参数C_{max}、AUC_{0-t}和t_{max},通过双向单侧t检验和非参数检验判断3种制剂的生物等效性。**结果** 小粒径阿奇霉素泡囊(AMNSS)和大粒径阿奇霉素泡囊(AMNSL)以及原料药AM体内的C_{max}分别为18.73、9.2 mg/L和10.31 mg/L;t_{max}分别为6、4 h和2 h;AUC_{0-t}分别为371.79、160.41 mg·h/L和136.09 mg·h/L;$AUC_{0-\infty}$分别为454.92、263.16 mg·h/L和158.50 mg·h/L;小粒径阿奇霉素泡囊和大粒径阿奇霉素泡囊相对生物利用度为273.19%、117.87%;经方差分析、双向单侧t检验和非参数检验,小粒径阿奇霉素泡囊和阿奇霉素、小粒径阿奇霉素泡囊和大粒径阿奇霉素泡囊体内有统计学差异($P<0.05$)、而大粒径阿奇霉素泡囊和阿奇霉素体内无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 小粒径阿奇霉素泡囊和阿奇霉素、小粒径阿奇霉素泡囊和大粒径阿奇霉素泡囊体内生物不等效,而大粒径阿奇霉素泡囊和阿奇霉素体内生物等效。

[关键词] 阿奇霉素;囊泡;粒径;生物等效性
[中图法分类号] R944.9;R969.1;R978.1 [文献标志码] A

Bioequivalence of positive ion azithromycin niosomes in different particle sizes

Zhong Meng[1], Sun Quan[1], Feng Yue[2], Wan Shengli[1], Zhang Jingqing[1] ([1]Center of Medicine Engineering of Chongqing University, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Nuclear Medicine, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China)

[**Abstract**] **Objective** To compare the pharmacokinetic parameters and bioavailability of positive ion azithromycin niosomes and azithromycin solution in rats. **Methods** Drug concentrations in the plasma at different time points were determined by HPLC after single oral dose of small-particle-size azithromycin niosome (AMNSS), large-particle-size azithromycin niosome (AMNSL) and azithromycin solution (AM) in rats. The pharmacokinetic parameters were calculated by DAS 2.1.1. Statistical moment parameters were adopted to calculate the pharmacokinetic parameters including C_{max}, AUC_{0-t} and t_{max}. Analysis of nonparametric tests and two one-sided t-tests were used to evaluate the bioequivalence of the 3 formulations. **Results** The pharmacokinetic parameters of AMNSS, AMNSL and AM in plasma were: C_{max} 18.73, 9.2 and 10.31 mg/L, respectively; t_{max} 6, 4 and 2 h, respectively; AUC_{0-t} 371.79, 160.41 and 136.09 mg·h/L, respectively; and $AUC_{0-\infty}$ 454.92, 263.16 and 158.50 mg·h/L, respectively. AMNSS and AMNSL relative bioavailability F_{0-t} was 273.19% and 117.87%, respectively. The main pharmacokinetic parameters analyzed by variance, two side t-test and Wilcoxon rank sum test showed significant differences between AMNSS and AM, as well as AMNSS and AMNSL *in vivo* ($P<0.05$), but no significant difference between AMNSL and AM ($P>0.05$). **Conclusion** AMNSL and AM are bioequivalent, while AMNSS and AM are not, neither are AMNSS and AMNSL.

[**Key words**] azithromycin; niosomes; particle size; bioequivalence

Corresponding author: Zhang Jingqing, E-mail: zjqrae01@163.com

阿奇霉素(azithromycin,AM)是新一代氮杂内酯类抗生素,临床上主要对各种革兰阴性细菌、厌氧菌及其他病原体如支原体、衣原体有很强的活性,主要用于

[通信作者] 张景勋,E-mail: zjqrae01@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140116.1054.002.html(2014-01-16)

呼吸道、皮肤和软组织感染[1]。但是其口服治疗往往伴有胃肠道的各种良反应,如腹部绞痛、腹泻、恶心、腹痛、呕吐[2]以及导致心脏活动异常或有潜在性致命心律不齐和容易诱发耐药性等缺点。泡囊(niosomes, NS)是由非离子表面活性剂组成,用于药物递送的泡囊可以持续释放药物以及改变药代动力学,具有很高的潜在应用价值[3]。本研究采用高效液相色谱法测定大鼠口服不同粒径阿奇霉素囊泡及阿奇霉素原料药后的血药浓度,并对其在体内的药动学参数进行比较,进行生物等效性评价[4-5]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 安捷伦1100型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);分析电子天秤(瑞士Mettler Toledo仪器公司);CX-250型超声波清洗器(北京医疗设备二厂);GL-88B旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);KA-1000型台式离心机(上海安亭科学仪器厂);DZF-1型真空干燥箱(上海跃进医疗器械厂)。

1.1.2 试药 阿奇霉素(批号:20101126,上海现代制药股份有限公司);胆固醇(广州天马精细化工厂);吐温-80(上海申宇医药化工有限公司);十八胺(上海南翔试剂有限公司);甘露醇(成都市科龙化工试剂厂);羧甲基纤维素钠(成都市科龙化工试剂厂);甲醇、乙腈、异丙醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

1.1.3 实验动物 SD大鼠9只,雌雄各半,体质量(230±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 小粒径阿奇霉素泡囊(AMNSS)的制备 采用薄膜分散法制备[6],将AM、十八胺、胆固醇、吐温加入圆底烧瓶中,再加入适量氯仿溶解,减压蒸发至瓶内壁上形成一层薄膜,加入磷酸缓冲液和玻珠若干,水浴常压下搅拌分散混悬,使薄膜溶胀水合,得到混悬液于4 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 大粒径阿奇霉素泡囊(AMNSL)的制备 采用旋转薄膜蒸发-冻融法制备[7],将AM、十八胺、胆固醇、吐温加入圆底烧瓶中,再加入适量氯仿溶解,减压蒸发至瓶内壁上形成均匀透明一层薄膜,加入含5%甘露醇的磷酸缓冲液和玻珠若干,继续在水浴常压下搅拌分散混悬,使薄膜溶胀水合,得到乳白色的混悬液,将该液体置于-20 ℃冰箱冷冻过夜后,取出,室温下完全融化,重复冻融2次即得,于4 ℃冰箱保存备用。

1.2.3 两种阿奇霉素泡囊粒径分布及Zeta电位 取适量制备得到的AMNSS和AMNSL,蒸馏水稀释一定倍数后,用激光粒径测定仪测定其Zeta电位。

1.2.4 给药方案及样品采集 用单剂量给药方案,给药剂量为每只大鼠200 mg/kg(以AM计)。SD大鼠9只,分为3组。第1组按200 mg/kg的剂量灌胃口服AMNSS,第2组给予等剂量AMNSL,第3组给予等剂量0.2% CMCNa的AM溶液。给药前禁食12 h(不禁水),分别于给药后5、15、30 min,1、2、4、6、8、12、24、48、72h乙醚麻醉大鼠后采用眼底取血的方法采集血样,至肝素浸润过的离心管中,6 000 r/min离心10 min后吸取上层血浆,-20℃保存,待测。1周后第1组按照200 mg/kg的剂量灌胃口服AMNSL,第2组给予等剂量AMNSS,第3组给予等剂量0.2% CMCNa的AM溶液。按同样操作方法采集血样并保存待测。

1.2.5 色谱条件 伊利特C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温40 ℃;流动相为乙腈:异丙醇:0.004 mol/L的磷酸氢二钠=60:15:25(体积比),流速为1 mL/min;检测波长为210 nm,进样量100 μL。

1.2.6 血浆样品的处理方法[8] 取空白血浆于5 mL的具塞离心管中,加入内标罗红霉素(20 μg/mL) 10 μL,涡旋30 s,加入0.2 mol/L的氢氧化钠溶液80 μL涡旋振荡1 min混匀,再加入乙醚2 mL,涡旋5 min。待萃取完毕后3 000 r/min离心10 min,提取乙醚层,40 ℃真空干燥,加甲醇200 μL,复溶涡旋2 min,12 000 r/min离心10 min,取上清液40 μL进样分析。

1.2.7 标准曲线的制备 分别精密称取阿奇霉素10.0 mg和内标罗红霉素10.0 mg,甲醇溶解并定容于100 mL棕色容量瓶中,得100 μg/mL的AM工作液和100 μg/mL的内标工作液。分别取空白血浆,加入不同浓度的AM标准溶液配制成系列浓度的血浆样品,照1.2.6项下方法操作后,得到标准曲线,并测定日内精密度、日间精密度、萃取回收率。

1.3 统计学分析

采用DAS 2.1.1药动学程序计算药代动力学参数,进行方差分析、双向单侧t检验和非参数检验分析,评价生物等效性。

2 结果

2.1 粒径的测定

测得AMNSS的粒径为907.4 nm,Zeta电位为14.6 mV;AMNSL的粒径为5.87 μm,Zeta电位为12.5 mV。

2.2 血浆中药浓度的测定

药物和内标在该色谱条件下保留时间分别是6.4 min和9.1 min,能达到有效的分离且峰形良好,血浆中内源性物质在该色谱条件下对药物的测定无干扰,表明该方法能够用于AM血药浓度的测定(图1)。

2.3 标准曲线的建立

以AM和内标峰面积之比(Y)对AM浓度(X)进行线性回归,得血浆标准曲线方程:$Y=19.26X-52.69$,$r=0.9993$,$n=3$,线性范围1.0~50.0 μg/mL,定量限500 ng/mL,AM在线性范围内与和内标的峰面积比呈良好的线性关系。

2.4 回收率、萃取率与精密度

在空白大鼠血浆中加入适量AM工作液,使AM浓度分别为30、15、1 μg/mL,同时直接测定相应浓度的AM溶液,高、中、低3个浓度的溶液中AM的回收率分别为98.12%、97.23%、96.41%。内标的回收率分别为100.40%、96.20%、108.30%。将血浆样品中AM峰面积与直接相应浓度AM溶液的峰面积进行比较,测得萃取回收率分别为89.45%、82.77%、79.11%,回收率较高,说明采用该方法处理AM血浆样品合适。高、中、低3个浓度的血浆样品的溶液的日内精密度RSD分别为2.45%、2.59%、3.10%,日间精密度RSD分别为2.77%、2.54%、3.66%,日内和日间精密度均良好,符合方法学要求。

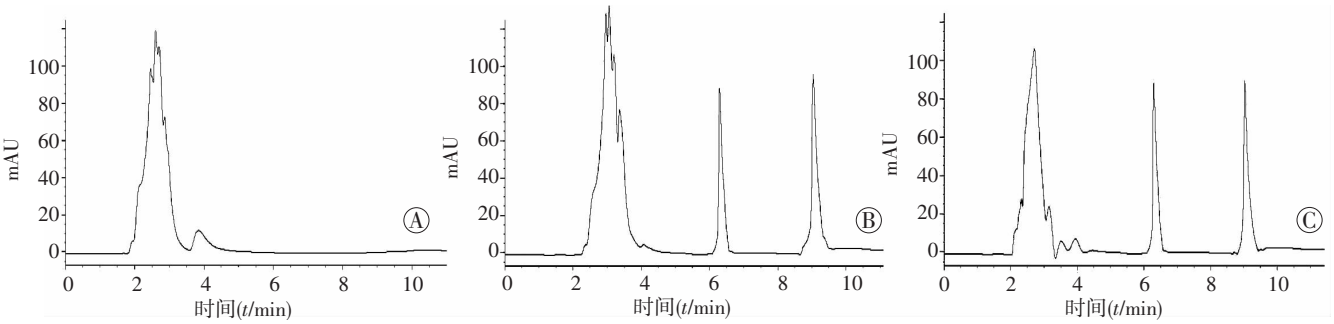


图 1　空白血浆(A)、空白血浆加 AM 和内标溶液(B)、血浆样品(C)的 HPLC 色谱分析

2.5　药代动力学参数及等效性评价

药-时曲线以及药动学参数见图 2、表 1。AMNSS 和 AMNSL 的相对生物利用度 $F_{0\text{-}t}$ 为 273.19%、117.87%，$F_{0\text{-}\infty}$ 为 287.02%、166.03%。

将主要的药代动力学参数经 DAS 2.1.1 软件对 C_{max} 和 AUC 对数转化后进行方差分析，方差分析后进行双单侧检验及 90% 置信区间判断，结果表明：AMNSS 和 AM 的 C_{max} 和 AUC 在制剂间有显著性差异($P<0.05$)；AMNSS 经对数转换的 $AUC_{0\text{-}t}$ 和 $AUC_{0\text{-}\infty}$ 90% 置信区间为 AM 的 40.7% ~45.2% 和 44.5% ~60.0%，不在规定范围(80% ~125%)内；AMNSS 经对数转换的 C_{max} 90% 置信区间分别为 AM 的 54.3% ~58.3%，不在规定范围内(70% ~143%)；对 t_{max} 进行非参数检验，AMNSS 和 AM 有统计学差异($P<0.05$)。AMNSL 和 AM 的 C_{max} 和 AUC 在制剂间有显著性，但受试周期及受试个体无显著性差异($P>0.05$)；AMNSL 经对数转换的 $AUC_{0\text{-}t}$ 和 $AUC_{0\text{-}\infty}$ 90% 置信区间为 AM 的 76.8% ~89.2% 和 70.8% ~95.6%，不在规定范围(80% ~125%)内；AMNSL 经对数转换的 C_{max} 90% 置信区间分别为 AM 的 105.0% ~120.0%，在规定范围(70% ~143%)内；对 t_{max} 进行非参数检验，AMNSL 和 AM 无统计学差异($P>0.05$)。AMNSS 和 AMNSL 的 C_{max} 和 AUC 制剂间有显著性差异($P<0.05$)；AMNSS 经对数转换的 $AUC_{0\text{-}t}$ 和 $AUC_{0\text{-}\infty}$ 90% 置信区间为 AMNSL 的 186.4% ~200.0% 和 197.2% ~204.6%，不在规定范围(80% ~125%)内；AMNSS 经对数转换的 C_{max} 90% 置信区间分别为 AMNSL 的 187.3% ~212.2%，不在规定范围(70% ~143%)内；对 t_{max} 进行非参数检验，AMNSS 和 AMNSL 有统计学差异($P<0.05$)。统计结果显示，AMNSS 和 AM 在体内作用生物不等效；AMNSL 和 AM 体内作用生物等效；AMNSS 和 AMNSL 体内作用生物不等效。

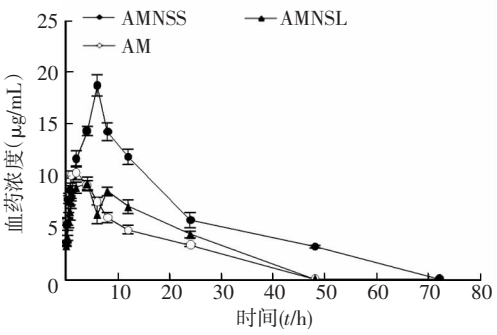


图 2　大鼠口服 AM、AMNSS 和 AMNSL 后血药浓度-时间曲线

表 1　AM、AMNSS 和 AMNSL 体内的统计矩参数比较($\bar{x}\pm s$)

制剂	C_{max}(mg/L)	t_{max}(h)	$t_{1/2z}$(h)	$AUC_{0\text{-}t}$ (mg·h/L)	$AUC_{0\text{-}\infty}$ (mg·h/L)
AM	10.31±0.40	2.00±0.52	12.14±4.36	136.09±5.51	158.50±30.28
AMNSS	18.73±1.03	6.00±0.01	13.05±3.57	371.79±3.41	454.92±27.53
AMNSL	9.20±0.60	4.00±1.03	16.82±0.97	160.41±7.24	263.16±16.41

3　讨论

本研究根据文献[9]建立了液液萃取结合 HPLC 法测定 AM 的血浆浓度，血浆中药物定量限为 500 ng/mL，能满足实验中 AM 血药浓度的测定要求，该方法简单、准确性高，灵敏度好，血浆内源性杂质无干扰，为 AM 的体内分析方法提供了参考。

本研究通过方差分析、双单侧 t 检验和非参数检验得出了 AMNSS 和 AM 体内的吸收程度和速度不等效、AMNSS 和 AMNSL 体内的吸收程度和速度不等效、AMNSL 和 AM 体内的吸收程度和速度等效。主要原因首先从制剂泡囊或非离子型的表面活性剂泡囊是非离子型表面活性剂的混合烷基或二烷基酯的聚甘油醚类和胆固醇在含水介质中的水化形成的层状结构。在生命科学中，它具有组织相容性、细胞亲和性，能作为细胞膜最好的模拟体系。它的组成成分表面活性剂可以提高难溶性药物的溶解度，促进药物吸收，从而提高药物的生物利用度。从药-时曲线整体趋势可见，AMNSS 和 AM 以及 AMNSS 和 AMNSL 体内药动学过程不同，而 AMNSL 和 AM 体内药动学过程基本接近。其次，从药代动力学参数也可以知，与 AM 相比，AMNSS 的 AUC 的值增加 2.73(或 2.87)倍，而 AMNSL 的 AUC 的值增加 1.18(或 1.66)倍。虽然两者都提高了生物利用度，但是 AMNSS 提高的效果更明显，这是可能导致 AMNSS 和 AM 体内生物不等效，而 AMNSL 与 AM 体内生物等效的主要原因。

参考文献：

[1] Petropoulos A D, Kouvela E C, Starosta A L, *et al*. Time-resolved binding of azithromycin to Escherichia coli ribosomes [J]. J Mol Biol, 2009, 385(4): 1179 - 1192.

[2] Dunn C J, Barradell L B. Azithromycin. A review of its pharmacologi-

cal properties and use as 3-day therapy in respiratory tract infection [J]. Drug, 1996, 51(3): 483 - 505.
[3] Rajera R, Nagpal K, Singh S K, *et al*. Niosomes: a controlled and novel drug delivery system [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(7): 945 - 953.
[4] 吕昭云, 乔培香, 吕亚光, 等. 非洛地平缓释片在 Beagle 犬体内生物等效性研究[J]. 医学研究杂志, 2008, 37(10): 57 - 60.
[5] 梁涛, 刘梅, 陆群, 等. 环维黄杨星 D 控释片犬体内生物等效性研究[J]. 解放军药学学报, 2007, 23(5): 329 - 332.
[6] Ruckmani K, Sankar V. Formulation and optimization of Zidovudine niosomes [J]. AAPS PharmSciTech, 2010, 11(3): 1119 - 1127.
[7] Hinrichs W L, Mancenido F A, Sanders N N, *et al*. The choice of a suitable oligosaccharide to prevent aggregation of PEGylated nanoparticles during freeze thawing and freeze drying [J]. Int J Pharm, 2006, 311(1/2): 237 - 244.
[8] 王健松, 朱家壁, 吕瑞勤, 等. 肺靶向阿奇霉素脂质体的制备及其在小鼠体内的分布[J]. 药学学报, 2005, 40(3): 274 - 278.
[9] 李章万, 徐秀荣. 色谱分析中生物样品的前处理方法[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(1): 55 - 59.

(收稿:2013-10-21;修回:2013-12-17)
(编辑 张 维)

(上接1290页)

温再次上升。嘱其立即降温(酒精擦浴,电风扇散热)。至凌晨02:20拿到丹曲洛林,立即100 mg持续静脉滴注。体温逐渐下降至36.5 ℃,生命体征平稳。

患者于次日早晨已能唤醒,能完成指令性动作。上午试脱呼吸机,带管自主呼吸。下午拔出气管导管。第3天体温稳定在36.5 ℃,多巴酚丁胺已逐渐减量。已排气,肠鸣音正常,予拔出胃管,进流质饮食。1周后出ICU转入普通病房。1周后出院。

2 讨论

MH是一种罕见的常染色体显性遗传疾病[2]。有研究显示,中国人群MH易感者与白种人MH易感者具有相同的RYR1基因突变[3]。由于代谢增加致使大量产热和发生酸中毒,最后导致供能障碍并出现肌强直。该疾病直至20世纪60年代才被首次报道[4]。而易于诱发MH最常见的药物是氟烷和琥珀胆碱,此外异氟烷、地氟烷、七氟烷、利多卡因和甲哌卡因等也可诱发。以往该病多见于欧美人,近几年我国陆续有病例报道。

在诊断时还应该排除下列可能导致高代谢状态的原因:如恶性综合征、甲状腺功能亢进、嗜铬细胞瘤、感染、输血反应等。引起NMS的主要药物以抗精神病药最为常见,其他还有锂盐、卡马西平、抗抑郁剂等。该患者虽有高热、肌肉强直、心动过速、血压降低、CPK增高或肌红蛋白尿等临床表现。但他没有抗精神病药物的用药史,故排除。甲状腺危象,发热可达39 ℃以上,脉率达120 ~ 160/min。但该患者没有甲亢病史,血清T3、T4、FT3、FT4无异常,故排除。嗜铬细胞瘤,高血压为其特征性表现,可呈间歇性或持续性发作。典型的阵发性发作常表现为血压突然升高,可达200 ~ 300/130 ~ 180 mmHg,心动过速、心律失常。但该患者没有嗜铬细胞瘤病史,且血压变化表现为低血压,故不符。另外患者为择期手术,没有感染也没有输血,故排除感染行高热和输血反应。而且上述诊断都无法对突然发生的高碳酸血症做出合理的解释。

而MH以先天性疾病如特发性脊柱侧弯、斜视、上睑下垂、脐疝、腹股沟疝等多见。其主要临床表现为:突然发生的高碳酸血症,体温急剧升高,可达45 ~ 46 ℃,骨骼肌僵直,咬肌痉挛,心动过速,心律失常,呼吸急促,血压异常,大量出汗,肌酸激酶升高,意识改变,外周白细胞增高等。本病例以肌肉强直,血色发暗,心率和$P_{ET}CO_2$迅速升高,血压迅速下降为首发表现,随即出现T波增高,血钾升高,体温迅速升高,钠石灰罐异常发烫,最高温度为40.2 ℃。肌酸激酶(CK)甚至高达16 353 IU/L。病理活检示:(左小腿腓肠肌)组织慢性炎伴灶性肌纤维变性改变。且吸入麻醉药(七氟烷)为其触发因素。肌活检体外氟烷——咖啡因肌肉收缩试验对诊断MH易感性是唯一可靠的方法,现已广泛应用于怀疑对MH易感患者的检测,是诊断对MH易感性的金标准。然而在实际工作中,常常根据围术期的临床表现来判断,可以用1994年北美Larach等[5]提出的MH评分(clinical grading scale, CGS)为依据,评分根据围术期的各项指标累计积分,总分为6级以上即可诊断。本病例累计积分达111分,因此可以确诊为MH。

丹曲洛林(dantrolene)是目前治疗MH的唯一特异性药物。国外文献报道及时应用曲洛林其死亡率仍有2% ~ 3%[6]。本例患者早期抢救过程中并没使用丹曲洛林,直到10 h后才用到了丹曲洛林,但患者得以幸存,最主要的原因得益于发现早,及时终止了吸入麻醉药,并用高流量氧气进行过度通气,同时终止手术、立即降温处理。另外手术开始前就已健全的各项生命体征的监测为及早发现和及时抢救以及救治是否有效提供了有力的保障。

MH可再次复发,初次抢救成功并不意味着最终的成功。本例患者送入ICU后,体温曾再次上升至40 ℃。嘱其立即降温,并速用特效药丹曲洛林后才好转。

目前还不能通过基因检测的方法明确诊断;但是我们能够对确诊(通过骨骼肌收缩试验)的患者进行基因检测,寻找基因突变,如果在其亲属中发现相同的基因突变,则其亲属可以诊断为恶性高热易感者,对于易感者就可以制定合适的麻醉方案,避免MH的发生,从而降低MH的发生率和死亡率。另外丹曲洛林国内并不常备有,很多情况下可能面临无药可用。因此加强围术期监测,特别是$P_{ET}CO_2$和体温监测则成为成功救治MH的关键。

参考文献:

[1] 郭向阳, 罗爱伦. 恶性高热[J]. 中华麻醉学杂志, 2001, 21(10): 604 - 606.
[2] 杨天德. 恶性高热的分子生物学研究[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 1998, 19(2): 91 - 92.
[3] 王颖林, 郭向阳, 徐仲煌, 等. 中国人恶性高热家系蓝尼定受体-1基因的筛查[J]. 中华麻醉学杂志, 2008, 28(11): 1001 - 1003.
[4] Denborough M A, Lovell R R H. Anaesthetic deaths in a family[J]. Lancet, 1960, 276(7140): 45.
[5] Larach M G, Localio A R, Allen G C, *et al*. A clinical grading scale to predict malignant hyperthermia susceptibility [J]. Anesthesiology, 1994, 80(4): 771 - 779.
[6] Halsall P J. Malignant hyperpyrexia and a career in Anaesthesia[J]. Anaesthesia, 2002, 57(3): 312.

(收稿:2013-12-16;修回:2014-01-05)
(编辑 吴培红)