

文章编号: 1004-7999(2020)01-0063-06

DOI:10.13478/j.cnki.jasyu.2020.01.010

# 多西环素原粉与其络合制剂 单次给药大鼠的药代动力学比较研究

张 雪, 李 萍, 李钰颖, 马科哲, 宋厚辉\*, 金庆日\*

(浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室,  
浙江农林大学动物科技学院·动物医学院, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 试验研究了盐酸多西环素原粉和 50% 盐酸多西环素络合制剂在大鼠体内的药代动力学规律。选取 6 只健康大鼠, 随机分成 2 组, 分别以 25 mg/kg 灌服原粉和络合制剂, 用 UPLC/MS/MS 分析血浆中多西环素浓度并计算药动学参数。结果表明: 络合制剂的峰浓度略高于原粉 ( $2\ 032 \pm 322$  ng/mL vs  $1\ 745 \pm 328$  ng/mL), 表明大鼠吸收络合制剂的量大于原粉。还发现络合制剂的  $AUC_{all}$  ( $12\ 764 \pm 1\ 872$  h·ng/L) 和  $AUC_{inf}$  ( $18\ 806 \pm 4\ 405$  h·ng/L) 均大于原粉的  $AUC_{all}$  ( $9\ 764 \pm 1\ 047.2$  h·ng/L) 和  $AUC_{inf}$  ( $16\ 702 \pm 2\ 004.5$  h·ng/L), 表明络合制剂在大鼠体内到达全身血液循环的量大于原粉。

**关键词:** 多西环素络合制剂; 大鼠; 药代动力学; 超高效液相色谱-质谱联用仪

中图分类号: S859.7

文献标识码: A

## Comparative pharmacokinetic study of doxycycline and chelating agents with a single dose in rats

ZHANG Xue, LI Ping, LI Yuying, MA Kezhe, SONG Houhui\*, JIN Qingri\*

(Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy  
Animal Husbandry of Zhejiang Province, College of Animal Science and Technology · College of  
Veterinary Medicine, Hangzhou Zhejiang 311300, China)

**Abstract:** The pharmacokinetics of doxycycline hydrochloride powder and 50% doxycycline hydrochloride chelating agents in rats were studied. Six healthy rats were randomly divided into two groups and were administered 25 mg/kg of powder and chelating agents, respectively. The plasma concentration of doxycycline was analyzed by UPLC/MS/MS and pharmacokinetic parameters were calculated. The results showed that the peak concentration of chelating agents was slightly higher than that of powder ( $2\ 032 \pm 322$  ng/mL vs  $1\ 745 \pm 328$  ng/mL), indicating that the absorption rate of chelating agents was higher than that of powder. We also found that  $AUC_{all}$  ( $12\ 764 \pm 1\ 872$  h·ng/L) and  $AUC_{inf}$  ( $18\ 806 \pm 4\ 405$  h·ng/L) of the chelating agents were both greater than  $AUC_{all}$  ( $9\ 764 \pm 1\ 047.2$  h·ng/L) and  $AUC_{inf}$  ( $16\ 702 \pm 2\ 004.5$  h·ng/L) of the powder, indicating that the amount of chelating agents reaching the whole blood circulation in

收稿日期: 2019-02-20 基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0500300)、浙江省公益技术研究计划(LGN20C180001)和 2018 年浙江农林大学学生科研训练项目资助。

作者简介: 张雪(1999—), 女, 河南信阳人, 在读学士, 研究方向为兽药制剂研发和药代动力学。宋厚辉和金庆日为通信作者, E-mail: qingrijin@163.com

rats was greater than that of the powder.

**Key words:** doxycycline chelating agents; rats; pharmacokinetics; UPLC/MS/MS

多西环素为四环素类半合成衍生物广谱抗生素,在碱性、强酸性环境下均不稳定,多西环素常以盐酸盐的形式制备,称盐酸多西环素(Doxycycline Hydrate)。多西环素主要作用位点是核糖体,通过与细菌核糖体 3S 小亚基结合,干扰氨基酰 tRNA 与 30S 小亚基结合,使氨基酰 tRNA 不能进入 mRNA 上的受位,从而抑制蛋白质合成时肽链的延长,使蛋白质合成受阻<sup>[1]</sup>。多西环素与天然四环素类药物(如土霉素、四环素)相比,多西环素具有抗菌活性和组织穿透力更强<sup>[2-3]</sup>、体内分布广<sup>[4-5]</sup>、生物利用度高、半衰期较长等优点,广泛应用于兽医临床<sup>[6-7]</sup>。在目前的临床应用中,普通盐酸多西环素制剂一般很难克服盐酸多西环素本身具有的几个突出缺陷,如易络合、不稳定、易耐药、低含量、性价比低等。浙江万方生物科技有限公司研制的 50% 盐酸多西环素络合制剂(以下简称络合制剂),成功克服了盐酸多西环素易与金属离子络合、水溶液中不稳定及耐药性等问题。相比普通的 10% 盐酸多西环素,络合制剂的多西环素含量大幅提高,络合制剂更加高效,临床使用相对量减少,价格优势明显,在临床应用中可实现低投入,高效率。但尚未有关于络合制剂在实验动物或靶动物上进行药理学试验的报道。因此,该试验将用常用的实验动物大鼠进行多西环素原粉和络合制剂的药物代谢动力学(药理学)试验,计算药理学参数,阐明多西环素原粉和络合制剂在大鼠体内的药理学规律,为其临床合理应用提供理论依据。该研究的顺利进行将营造良好的市场竞争环境,有利于盐酸多西环素药价市场化机制的形成,以供临床应用,迎合养殖市场需求。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

1) 仪器 电子分析天平(BSA124S,上海锡为科学仪器有限公司)、高速离心机(Eppendorf centrifuge 5418,广州雷得生物技术有限公司)、磁力搅拌器(85-2,杭州仪表电机有限公司)、超高效液相色谱-质谱联用仪(UPLC/MS/MS,美国沃特世公司)、Waters ACQUITY UPLC™ BEH C18 色谱柱(美国沃特世公司)、振荡混匀器(Vortexgenie2,妙生科技有限公司)、真空浓缩仪(德国艾本德公司)、超声

波清洗器(Biosafer SB-5200DT,南京赛飞生物科技有限公司)。

2) 试验动物 健康、体重相似的 SPF 大鼠 6 只,购自浙江省医学科学院实验动物中心。

3) 试剂 盐酸多西环素原粉和络合制剂由浙江惠嘉生物科技股份有限公司提供。肝素钠(Heparin sodium salt, 185 USP units/mg)、生理盐水、乙腈、甲酸、三氯乙酸购自生工生物工程(上海)股份有限公司,舒泰 50 购自法国维克公司。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 溶液的配制

##### 1) 流动相的制备

0.1% 甲酸(A):乙腈(B) = 95:5 (V/V)

##### 2) 多西环素标准溶液的制备

准确称取多西环素 100 mg,置于 5 mL 容量瓶,用流动相稀释至刻度,配制成浓度为 20 mg/mL 标准品储备液。用流动相进行梯度稀释,获得浓度为 100、250、5 000、1 000、2 500、5 000、10 000、20 000 ng/mL 的标准品溶液。

#### 1.2.2 灌服给药

健康大鼠 6 只,在温度和湿度恒定的试验动物房(浙江农林大学动物科技学院)适应饲养 1 周后,随机分为原粉组和制剂组。灌服给药前禁食 12 h 以上,不禁水。以 25 mg/kg 剂量,给其中 3 只灌服多西环素原粉溶液,另外 3 只灌服络合制剂溶液。大鼠的体重为(283±6) g。

#### 1.2.3 给药和采血方案

大鼠施行股静脉和股动脉手术。原粉组和制剂组以 25 mg/kg 剂量灌服原粉和络合制剂。分别在大鼠灌服给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10 h,通过股动脉采集血液,每次采集 0.22 mL 血液并通过股静脉补充相应体积的生理盐水。将采集好的全血置于肝素钠离心管中,以 8 000 r/min 离心 3 min,取血浆并保存于-80 °C 冰箱。

#### 1.2.4 标准曲线样品的预处理

取 45 μL 大鼠空白血浆,置于 1.5 mL 离心管中,每管加 5 μL 标准溶液(终浓度分别为 10、25、50、100、250、500、1 000、2 000 ng/mL),涡旋振荡混匀,13 000 r/min 离心 10 min,加 200 μL 三氯乙酸(1 mol/L),涡旋振荡 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清 200 μL 至样品瓶,用 UPLC/MS/

MS 检测。以多西环素标准品的终浓度为横坐标,多西环素的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

### 1.2.5 血液样品预处理与检测

取 50  $\mu\text{L}$  大鼠血浆样品,置于 1.5 mL 离心管中,加 200  $\mu\text{L}$  三氯乙酸 (1 mol/L),涡旋震荡 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,取上清 200  $\mu\text{L}$  至样品瓶,用 UPLC/MS/MS 检测。

### 1.2.6 液相色谱条件

色谱柱 Waters ACQUITY UPLC™ BEH C18 Column (2.1  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),流动相 0.1% 甲酸 (A) : 乙腈 (B) = 95 : 5 (V/V)。梯度洗脱条件: 0~2 min 为 90% A, 3~4 min 为 30% A, 5~6 min 为 90% A。流速 0.3 mL/min,进样体积 10  $\mu\text{L}$ ,分析时长 9 min。

### 1.2.7 质谱分析条件

用电喷雾离子源 (ESI),正离子 (ES+) 模式进行扫描,多离子反应监测 (MRM) 模式下进行检测。多西环素母离子的质荷比 (m/z) 为 445.2,二级质谱

子离子的质荷比为 428.2 和 108.2,相应的碰撞电压分别为 25 和 20 eV<sup>[8]</sup>。其他参数的设置如下:脱溶剂温度 500  $^{\circ}\text{C}$ ,脱溶剂气流量 800 L/hr,锥孔电压 25 V,锥孔气流量 50 L/hr,毛细管电压 3.50 kV。

### 1.2.8 数据分析

用 Winnonlin 软件的非房室模型,计算各种药动学参数,如消除半衰期 ( $t_{1/2}$ )、达峰时间 ( $T_{\text{max}}$ )、达峰浓度 ( $C_{\text{max}}$ )、药-时曲线下面积 (AUC)、表观分布容积 ( $V_z$ )、体清除率 (CL) 和平均滞留时间 ( $\text{MRT}_{\text{last}}$ ) 等。

## 2 结果与分析

### 2.1 质谱分析

由图 1 可知,在正离子模式下,母离子经能量碰撞,碎裂成 2 个特征性子离子。质荷比为 445.2 的多西环素母离子碎裂成质荷比为 428.2 和 108.2 的子离子。

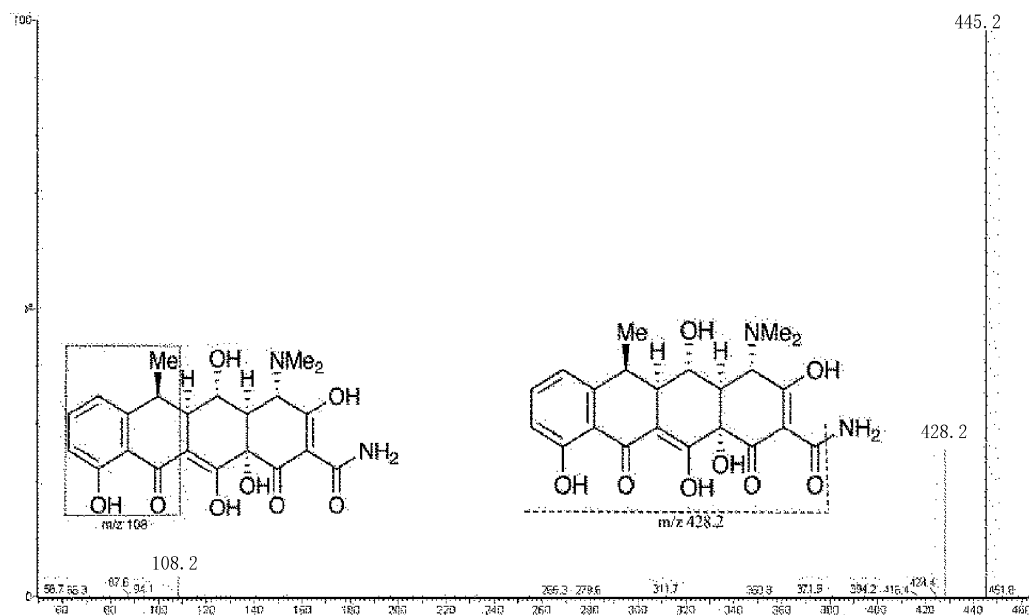


图 1 在正离子模式下获得的多西环素二级质谱图

Fig.1 MS<sup>2</sup> spectra of doxycycline obtained in positive ion model

### 2.2 多西环素血浆样品的标准曲线

多西环素标准溶液的浓度依次为 10、25、50、100、250、500、1 000、2 000 ng/mL。以多西环素标准溶液的终浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线 (图 2)。标准曲线回归方程为  $Y = 326 X + 15 019$ ,  $R^2 = 0.992 8$ 。

为检测 UPLC/MS/MS 分析方法的特异性,检测了大鼠空白血浆、多西环素标准溶液样品 (500 ng/mL) 和大鼠灌服络合制剂后 1.5 h 的血浆样品 (图 3a~c)。如图 3a 所示,大鼠空白血浆样品中没有明显的杂质峰,因此,此分析方法可应用于多西环素大鼠血浆样品的分析。如图 3b,c 所示,多西环素

的保留时间为 4.05 min,峰型对称,分离度好,无杂质峰干扰。

### 2.3 大鼠灌服多西环素原粉和络合制剂溶液后的血药浓度

将分析大鼠血浆样品所得到的多西环素峰面积,带入回归方程,计算血浆样品中多西环素的浓度。表 1 为大鼠灌服多西环素原粉和络合制剂后血药浓度的平均值和标准误差( $\text{ng/mL}$ ,  $\bar{x} \pm S.E.$ )。多西环素原粉的峰出现在 0.083 h,络合制剂的峰出现在 2 h,表明多西环素原粉在大鼠体内的吸收速度快于络合制剂(0.083 h vs 2 h)。但是络合制剂的峰浓度略高于多西环素原粉( $2\ 032 \pm 322 \text{ ng/mL}$  vs  $1\ 745 \pm 328 \text{ ng/mL}$ ),表明大鼠吸收络合制剂的量大于多西环素原粉。

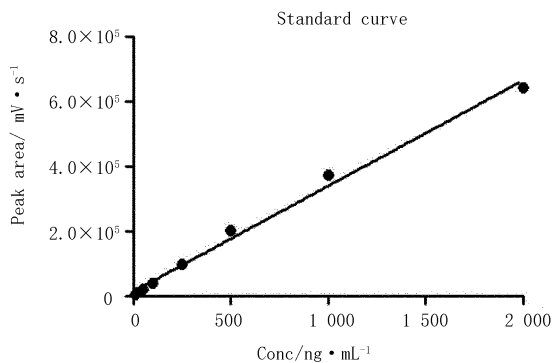
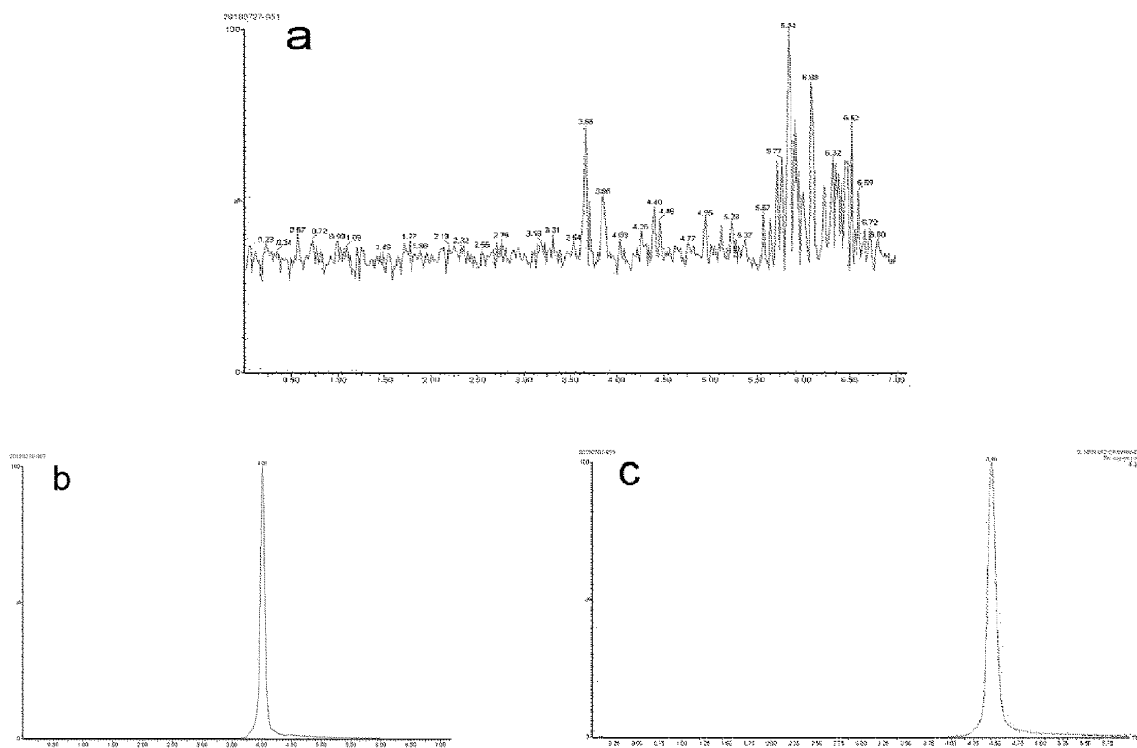


图 2 多西环素标准曲线

Fig.2 Standard curve of doxycycline



a 为大鼠空白血浆色谱图;b 为多西环素标准溶液(500 ng · mL<sup>-1</sup>)色谱图;c 为大鼠灌服络合制剂后 1.5 h 的色谱图

图 3 色谱图

Fig.3 Chromatogram

表 1 灌服盐酸多西环素原粉和络合制剂后的血药浓度

采血时间/h	原粉/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	络合制剂/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
0	0	0
0.083	1 745±328	1 028±658
0.167	1 463±226	1 305±492
0.25	1 402±233	1 188±408
0.5	1 308±191	1 319±460
1	1 443±238	1 590±416
2	1 291±129	2 032±322*
4	1 041±153	1 359±441
6	534±246	1 107±300
8	762±68	963±209
10	620±87	777±141

注: \*  $P < 0.05$ , 数据为  $\bar{x} \pm \text{S.E.}$ , 下同。

图 4 为大鼠灌服多西环素原粉和络合制剂后的药-时曲线。由表 1 和图 4 可知,除了给药后初始阶段(0.083~0.25 h)以外,大鼠灌服络合制剂后的血药浓度均高于多西环素原粉的血药浓度。其中,大鼠灌服络合制剂后 2 h 的血药浓度显著高于多西环素原粉(表 1)。如图 4 和表 2 所示,络合制剂的  $AUC_{\text{all}}$  和  $AUC_{\text{inf}}$  均大于多西环素原粉的  $AUC_{\text{all}}$  和  $AUC_{\text{inf}}$ , 表明络合制剂在大鼠体内到达全身血液循环的量大于多西环素原粉。

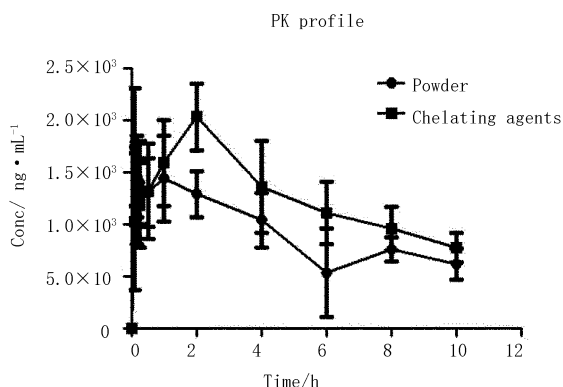


图 4 大鼠灌服多西环素原粉和络合制剂后的药-时曲线

Fig.4 PK profile of doxycycline powder and chelating agents after PO administration

#### 2.4 药动学参数的计算

用 Winnonlin 软件中非房室模型,计算各种药动学参数,表 2 为大鼠灌服多西环素原粉和络合制剂后的药动学参数。其中,  $AUC_{\text{all}}$  指  $t_0$  到  $t_{10 \text{ h}}$  的药时曲线下面积,  $AUC_{\text{INF}}$  指  $t_0 - t_{\infty}$  的药时曲线下

面积,  $MRT_{\text{last}}$  为平均滞留时间。

表 2 多西环素原粉与络合制剂的药动学参数

药动学参数	多西环素原粉	多西环素络合制剂
$t_{1/2}/\text{h}$	7.8±0.7	5.2±1.7
$T_{\text{max}}/\text{h}$	0.083±0.0	2.0±0.0***
$C_{\text{max}}/\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	1 745±328	2 032±322
$AUC_{\text{all}}/\text{h} \cdot \text{ng}/\text{L}$	9 764±1047.2	12 764±1 872
$AUC_{\text{INF}}/\text{h} \cdot \text{ng}/\text{L}$	16 702±2004.5	18 806±4 405
$V_z/\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	1 537±167	1 385±361
$CL/\text{mL}/\text{h}/\text{kg}$	4.2±0.1	4.3±0.2
$MRT_{\text{last}}/\text{h}$	17 262±2 622	9 803±1 060

注: \*\*\*  $P < 0.001$ 。

由表 2 可知,大鼠灌服络合制剂后的  $T_{\text{max}}$  和  $C_{\text{max}}$  均大于多西环素原粉,  $AUC_{\text{all}}$  和  $AUC_{\text{inf}}$  也均大于多西环素原粉的  $AUC_{\text{all}}$  和  $AUC_{\text{inf}}$ 。大鼠灌服络合制剂和原粉后的  $V_z$  无显著性差异。络合制剂的  $t_{1/2}$  和  $MRT_{\text{last}}$  均小于多西环素原粉,表明络合制剂在体内的滞留时间短于多西环素原粉,因此,可判定络合制剂可缩短休药期。

### 3 讨论与结论

血浆、血清、尿液等生物样品在分析过程中,易发生待分析物质的损失和信号波动,尤其在质谱检测时,样品中的内、外源性物质会影响分析物的离子化,使质谱响应强度降低或增加,即产生基质效应。血浆样品中的磷脂、蛋白以及盐类属于内源性物质,其中磷脂对质谱结果影响最大,可在较大程度上抑制质谱响应且难以去除<sup>[9]</sup>。蛋白沉淀(Protein precipitation, PPT)是较简单快速的方法,常用的试剂包括有机溶剂、酸、盐和金属离子。有机溶剂是应用最广泛的蛋白沉淀剂,它能降低介电常数,促进蛋白间的静电作用,导致蛋白聚沉<sup>[10]</sup>。研究表明,常用的有机溶剂中,乙腈的沉淀效果最佳,与血浆比例为 4:1 时,蛋白沉淀率可高达 98.5%,且种属间无明显差异<sup>[11]</sup>。如果分析物是可电离的,流动相的 pH 值会对分离物的保留度、选择性和灵敏度产生显著影响<sup>[9]</sup>。传统的蛋白沉淀—离心技术简单易操作、成本低,但需要人工标记离心管、提取上清,存在操作耗时、难以实现高通量等缺点<sup>[12]</sup>。有研究指出,使用乙腈沉淀蛋白时会产生较强的离子抑制作用,影响质谱信号强度<sup>[9]</sup>。除此法之外,还有其他处理

技术,能有效减少药动力学实验中血浆样品的处理时间<sup>[13]</sup>。该试验用蛋白沉淀法进行大鼠血浆样品的预处理。

$T_{max}$ 是达峰时间,指达到峰浓度所需时间。 $C_{max}$ 是达峰浓度,指给药后达到的最高血药浓度。 $T_{max}$ 和 $C_{max}$ 均与灌服给药后药物在体内的吸收快慢和速率有关。AUC是药时曲线下面积,反映到达全身血液循环的药物总量。大鼠灌服络合制剂后的 $T_{max}$ 和 $C_{max}$ 均大于多西环素原粉, $AUC_{all}$ 和 $AUC_{inf}$ 也均大于多西环素原粉的 $AUC_{all}$ 和 $AUC_{inf}$ ,表明络合制剂在大鼠体内的吸收速率和吸收程度均大于盐酸多西环素原粉,由此可以推测络合制剂在大鼠体内的生物利用度也高于盐酸多西环素原粉。

大鼠灌服盐酸多西环素原粉和络合制剂后,均出现了“双峰现象”(图4)。这与多西环素在体内进入肝肠循环有关。经胆汁排泄到小肠的多西环素,再一次经过小肠和大肠时,又被重吸收,进入到血液循环,使多西环素的血药浓度升高,导致“双峰现象”<sup>[14-16]</sup>。

该试验用UPLC/MS/MS检测大鼠血浆中多西环素的浓度,通过药动力学研究阐明盐酸多西环素原粉和络合制剂在大鼠体内的ADME过程。试验结果表明,络合制剂比原粉具有更高的吸收和更短的滞留时间,临床应用可适当减少给药剂量或增加给药间隔时间,也可缩短休药期。该试验的研究结果将为络合制剂的临床应用提供理论依据,也将为同类药物的药动力学研究提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 李伟,杨阳.多西环素的药理学进展及临床应用概述[J].广东畜牧兽医科技,2009,34(06):3-5.
- [2] 廖治锋,段新华.兽用多西环素的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2015(9):76-78.
- [3] 贺生中,沈巍,桂淦,等.盐酸多西环素注射液在兔体内的药动力学试验[J].中国兽医杂志,2011,47(02):79-81.
- [4] 刘玉芹,董淑珍,杨彩然.兽医药理学教学探讨与实践[J].黑龙江畜牧兽医,2010(19):176-177.
- [5] 刘辉旺,刘义明.多西环素研究进展[J].兽医导刊,2008(1):27-29.
- [6] 何家康,祝万菊,周丽光,等.盐酸多西环素缓释注射液在猪体内的药物动力学[J].中国兽医学报,2008(2):175-180.
- [7] 陆莹梅,李建林,吕华林.多西环素药理学及新型制剂的研究进展[J].湖南畜牧兽医,2015(6):8-10.
- [8] Brum Junior L, Leal M G, De Toni Uchoa F, et al. Determination of quinine and doxycycline in rat plasma by LC-MS-MS; application to a pharmacokinetic study [J]. Chromatographia, 2011, 73(11-12): 1081-1088.
- [9] Chambers E, Wagrowski-Diehl D M, Lu Z, et al. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Science, 2007, 852(1-2): 22-34.
- [10] 郝少莉,仇农学.沉淀分离技术在蛋白质处理方面的应用[J].粮食与食品工业,2007(1):20-22.
- [11] Polson C, Sarkar P, Incedon B, et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 785(2): 263-275.
- [12] 包建民,张梦娜,马志爽,等.高通量蛋白质沉淀技术的开发及其在药物分析中的应用[J].分析试验室,2014,33(10):1117-1120.
- [13] 董金材,曾麟粼,王曦,等.生物样品前处理技术在药动力学研究中的应用进展[J].中药新药与临床药理,2018,29(1):110-117.
- [14] 黄耀凌,徐倩,胡海燕,等.盐酸多西环素注射液在猪体内药代动力学-药效学研究[J].中国兽药杂志,2014,48(6):52-57.
- [15] Yang F, Yang F, Wang G, et al. Pharmacokinetics of doxycycline after oral administration of single and multiple dose in broiler chickens [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2018, 41(6): 919-923.
- [16] Pal A, Matzneller P, Gautam A, et al. Target site pharmacokinetics of doxycycline for rosacea in healthy volunteers is independent of the food effect [J]. British Journal of Clinical Pharmacology, 2018, 84(11):2625-2633.