

[文章编号] 1007-7669(2012)06-0322-06

## 兔眼结膜中阿奇霉素的浓度测定及其药动学

狄 斌<sup>1</sup>, 孙晓阳<sup>1</sup>, 毛白杨<sup>2</sup>, 赵晓红<sup>2</sup>, 苏梦翔<sup>1</sup>, 王晓斌<sup>3</sup>

(1. 中国药科大学 药物分析教研室, 江苏 南京 210009; 2. 常州市亚邦医药研究所有限公司, 江苏 常州 213200; 3. 东南大学 实验动物中心, 江苏 南京 210009)

[关键词] 阿奇霉素; 眼结膜; 色谱法, 高压液相; 串联质谱法; 兔; 药动学; 滴眼液

[摘要] 目的 建立兔眼结膜中阿奇霉素的 LC-MS/MS 检测方法, 研究阿奇霉素滴眼液在兔眼结膜中的药动学特征。方法 184 只新西兰白兔进行单次以及多次给阿奇霉素滴眼液后, 于不同时间点取眼结膜样本匀浆处理后以沉淀法去除匀浆液中蛋白基质, 采用 LC-MS/MS 法测定兔眼结膜中的阿奇霉素。以克拉霉素为内标, 采用 Ultimate XB-Phenyl (100 mm × 3.0 mm, 3 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.01 mol·L<sup>-1</sup> 乙酸铵水溶液 (含 0.1% 乙酸) (75 : 25, V/V), 电喷雾离子源, 正离子 SRM 扫描分析, 内标和阿奇霉素离子对分别为:  $m/z$  748 →  $m/z$  590 和  $m/z$  749 →  $m/z$  591。结果 阿奇霉素结膜浓度在 10.128 ~ 8 102.4 μg·L<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好 ( $r = 0.9987$ ); 最低定量限为 10.128 μg·L<sup>-1</sup>; 批内和批间 RSD 均小于 10%; 方法准确度在 85% ~ 115% 之间。单次给药后参比制剂和受试制剂的药动学参数  $t_{max}$  分别为 2 h 和 2 h,  $\rho_{max}$  分别为 22.29 μg·g<sup>-1</sup> 和 21.80 μg·g<sup>-1</sup>,  $AUC_{1-192}$  分别为 528.0 μg·h·g<sup>-1</sup> 和 536.5 μg·h·g<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  分别为 25.5 h 和 24.1 h。多次给药后参比制剂和受试制剂的药动学参数  $t_{max}$  分别为 8 h 和 8 h,  $\rho_{max}$  分别为 53.10 μg·g<sup>-1</sup> 和 51.62 μg·g<sup>-1</sup>,  $AUC_{1-192}$  分别为 1 584.9 μg·h·g<sup>-1</sup> 和 1 379.4 μg·h·g<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  分别为 28.8 h 和 23.7 h。受试制剂和参比制剂药动学行为基本一致。结论 建立的检测方法简便、灵敏。多次给药后在兔眼结膜内存在蓄积现象。

[中图分类号] R969.1; R988.1 [文献标志码] A

## Determination and pharmacokinetics of azithromycin in rabbit conjunctiva

DI Bin<sup>1</sup>, SUN Xiao-yang<sup>1</sup>, MAO Bai-yang<sup>2</sup>, ZHAO Xiao-hong<sup>2</sup>, SU Meng-xiang<sup>1</sup>, WANG Xiao-bin<sup>3</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing JIANGSU 210009, China; 2. Changzhou Yabang Pharmacy Research Institute Co.Ltd, Changzhou JIANGSU 213200, China; 3. Laboratory Animal Center, Southeast University, Nanjing JIANGSU 210009, China)

[KEY WORDS] azithromycin; conjunctiva; chromatography, high pressure liquid; tandem mass spectrometry; rabbits; pharmacokinetics; eye drops

[ABSTRACT] AIM To establish a LC-MS/MS method for the determination of azithromycin in rabbit conjunctiva and to study the pharmacokinetics of azithromycin eye drops after single and multiple dose administration. METHODS Following a deproteinization procedure, the azithromycin concentrations in conjunctiva were determined by HPLC-MS/MS and the pharmacokinetics were evaluated in 184 New Zealand albino

[收稿日期] 2011-11-29 [接受日期] 2012-04-16

[作者简介] 狄 斌 (1973—), 男, 副教授, 硕士研究生导师, 从事药物分析与药代动力学研究, Phn: 86-25-8327-1269, E-mail: ddw888@vip.sina.com

[责任作者] 狄 斌

rabbits after single and multiple dose of azithromycin eye drops, respectively. Clarithromycin was taken as internal standard and the samples were eluted utilizing a mobile phase containing of 0.01 mol·L<sup>-1</sup> ammonium (containing 0.1% acetic acid) -acetate (25 : 75, V/V) and an Ultimate XB-Phenyl column (100 mm × 3.0 mm, 3 μm). ESI and SRM were used with positive ion scans and the mass transition pairs of  $m/z$  748→ $m/z$  590 and  $m/z$  749→ $m/z$  591 were used to detect internal standard and azithromycin. RESULTS The method demonstrated that good linearity ranged from 10.128 to 8 102.4 μg·L<sup>-1</sup> with  $r = 0.998 7$ ; the lower limit of quantification for azithromycin in conjunctiva tissues was 10.128 μg·L<sup>-1</sup>; the intra-and inter-batch precision (RSD) values were below 10% and the accuracy ranged from 85% to 115%. The main pharmacokinetics of standard formula-tion and test formulation after single administration were as follows:  $t_{\max}$  2 h versus 2 h;  $\rho_{\max}$  22.29 μg·g<sup>-1</sup> versus 21.80 μg·g<sup>-1</sup>; AUC<sub>1-192</sub> 528.0 μg·h·g<sup>-1</sup> versus 536.5 μg·h·g<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  25.5 h versus 24.1 h, respectively. The parameters after multiple administration were as follows:  $t_{\max}$  8 h versus 8 h;  $\rho_{\max}$  53.10 μg·g<sup>-1</sup> versus 51.62 μg·g<sup>-1</sup>; AUC<sub>1-192</sub> 1 584.9 μg·h·g<sup>-1</sup> versus 1 379.4 μg·h·g<sup>-1</sup>,  $t_{1/2}$  28.8 h versus 23.7 h, respectively. There was no significant difference of the pharmacokinetics characteristics between two formulations. CONCLUSION The method is convenient and sensitive. There is a gentle accumulation of azithromycin after multiple administrations.

阿奇霉素 (azithromycin) 可以用于各种社区获得性感染, 包括呼吸道感染、泌尿生殖系统感染和皮肤及软组织感染<sup>[4]</sup>。该药在组织中的半衰期长达 2 ~ 4 d<sup>[5,6]</sup>, 有利于维持足够的药物浓度来治疗各种感染。阿奇霉素滴眼液由缓释给药系统形成一个稳定的黏附基质, 用来和结膜保持接触。该系统可以通过摄取、释放和生物黏附, 在几个小时内将活性药物输送到眼球表面<sup>[7,8]</sup>。该药目前尚未在国内上市, 作者也未见国内报道其眼部药动学研究。国外文献报道多采用液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定阿奇霉素在结膜中的浓度<sup>[9-11]</sup>, 本研究在文献[10]报道方法的基础上进行了改进, 阿奇霉素出峰较报道方法略晚, 可以有效地减少极性物质引起的基质效应对测定结果的影响, 另外本研究选用的内标克拉霉素与阿奇霉素分子结构以及性质更相近并且其离子响应更加稳定。本研究选择健康新西兰白兔进行单次和多次给药的眼部药动学实验, 考察阿奇霉素滴眼液在家兔眼部结膜组织中的药动学特性, 为该药的临床应用提供依据。

#### 资料与方法

仪器 美国 Finnigan 公司 TSQ 型液相色谱-质谱-质谱联用仪, 配有在线真空脱气机、四元梯度泵、恒温自动进样器、柱温箱、电喷雾离子源 (ESI) 以及 Xcalibur 1.4 数据工作站; BS 21 S 十万分之一分析天平 (Sartorius 公司, 德国); XHF-1 高速分散器 (上海金达生化仪器厂); PL5242 超纯水制

备系统 (PALL 公司, 美国); TGL-16G 台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); CM-1000 高速振荡机 (东京理化器械株式会社, 日本)。

试药与试剂 阿奇霉素对照品 (购自中国药品生物制品检定所, 批号: 130593-200901); 克拉霉素对照品 (内标, 购自中国药品生物制品检定所, 批号: 130558-200501); 阿奇霉素滴眼液 (受试制剂, 江苏亚邦爱普森药业有限公司生产, 批号: 20101207, 规格: 5 mL: 50 mg; 阿奇霉素滴眼液 (参比制剂, AZASITE, 1%, Inspire Pharmaceuticals Inc, 批号: IN10E12B); 乙腈、甲醇 (色谱纯, 美国 ROE 公司); 乙酸、乙酸铵 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 超纯水 (实验室自制)。

实验动物 选择 184 只成年健康新西兰白兔, 体重 2.0 ~ 2.5 kg, 均为雄兔, 无眼疾, 由南京安立默科技有限公司提供, 动物生产许可证: SCXK (苏) 2010-0002。本研究的动物饲养、给药以及生物样本的采集在东南大学实验动物中心进行 [动物使用许可证号: SYXK (苏) 2010-0004]。

#### 给药方案

1 单次给药 将 80 只新西兰白兔采用完全随机方法分为第 1 组和第 2 组, 每组各 40 只。再分别将第 1 组和第 2 组各 40 只动物随机分为 10 组, 每组 4 只 (8 只眼); 第 1 组给参比制剂 (R), 第 2 组给受试制剂 (T); 用微量进样针吸取 25 μL 药液注入眼内, 左右眼均给药, 给药后在规定的时点采集结膜样本。

2 多次给药 将 104 只新西兰白兔采用完全随机

方法分为第 组和第 组, 每组各 52 只, 再将每组内的 52 只动物随机分为 13 组 (3 组用于稳态试验, 10 组用于多次给药试验), 每组 4 只 (8 只眼); 第 组给参比制剂 (R), 第 组给受试制剂 (T); d 1 和 d 2 每日 2 次, 间隔 12 h, 剂量为  $25 \mu\text{L} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{眼}^{-1}$ , 左右眼均给药; d 3 ~ 7 每日 1 次, 左右眼均给药, 剂量为  $25 \mu\text{L} \cdot \text{次}^{-1} \cdot \text{眼}^{-1}$ 。d 5、d 6、d 7 各取 4 只考察稳态浓度, d 7 给完药后在规定的时点采集结膜样本。

结膜样本采集 于给药后的 1、2、4、8、12、24、48、72、120 和 192 h (10 个采样时间点, 每个时间点有 1 组即 4 只试验兔) 分别注射过量的戊巴比妥钠 (3%) 处死, 手术取兔眼上、下睑板结膜, 称重后加入 1 mL 生理盐水冰浴匀浆; 匀浆液立即放入  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  的冰箱密封保存待测。

色谱条件 色谱柱 Ultimate XB-Phenyl (100 mm  $\times$  3.0 mm, 3  $\mu\text{m}$ , 美国 Welch 公司); 柱温:  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 流动相: 乙腈-0.01 mol  $\cdot$  L $^{-1}$  乙酸铵水溶液 (含 0.1% 乙酸) (75 : 25, V/V); 流速: 0.4 mL  $\cdot$  min $^{-1}$ 。

质谱条件 离子化方式: 电喷雾离子源 (ESI); 扫描方式: 选择反应监测 (SRM); 离子极性: 正离子; 选择性反应检测离子: 阿奇霉素  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  749  $\rightarrow$   $m/z$  591, 内标克拉霉素  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  748  $\rightarrow$   $m/z$  590; 喷雾电压: 4 500 eV; 鞘气压力: 310.3 kPa; 离子清扫气压: 13.8 kPa; 辅助气压力: 34.5 kPa; 毛细管温度:  $350 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 源内诱导解离电压: 10 eV; 碰撞能量: 28 eV; 碰撞气压力: 0.20 Pa。

标准溶液的配制 精密称取阿奇霉素对照品 13.73 mg (相当于含阿奇霉素 12.66 mg), 置 25 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 506.4 mg  $\cdot$  L $^{-1}$  阿奇霉素溶液作为母液。以甲醇稀释配制成含有阿奇霉素分别为 50.64、101.28、253.2、506.4、2 532、10 128、32 409.6、40 512  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的对照品储备液。精密称取克拉霉素对照品 12.93 mg (相当于含克拉霉素 12.61 mg), 置 50 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成 252.2 mg  $\cdot$  L $^{-1}$  克拉霉素溶液作为母液, 以甲醇稀释制成浓度为 2 522  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的内标溶液。

样品处理 结膜匀浆液在室温下解冻, 精密取匀浆液 50  $\mu\text{L}$ , 置 2 mL 离心管中, 精密加入甲醇 10  $\mu\text{L}$  (方法学时替换为相应浓度的阿奇霉素对照品溶液) 和内标溶液 20  $\mu\text{L}$ , 旋涡 30 s, 加入乙腈 1 mL, 旋涡 3 min,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冷冻 10 min, 16 880  $\times$  g 高速离心 5 min, 取上清液 5  $\mu\text{L}$  进样分析。

药动学参数 对同一时间点下的实测数据求均值, 随后对所得均值构成的完整监测时间段 (1 h 至 192 h) 内的数据采用 DAS2.1.1 软件, 以非房室依赖型方法计算求得药动学主要参数。

## 结 果

专属性 在本研究所采用的色谱条件下, 阿奇霉素出峰时间在 3.2 min 左右, 内标克拉霉素出峰时间在 2.5 min 左右, 峰形良好, 阿奇霉素与内标分离良好, 空白结膜中内源性物质对两者的测定无干扰, 色谱图见图 1。

标准曲线及最低定量限 精密量取上述各浓度的阿奇霉素对照品储备液 10  $\mu\text{L}$ , 分别置 2 mL 离心管中, 加入空白结膜匀浆液 50  $\mu\text{L}$ , 混匀, 制成含阿奇霉素 10.128、20.256、50.64、101.28、506.4、2 025.6、6 481.92、8 102.4  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的模拟结膜匀浆液样本, 按“样品处理”项下的方法处理, 取 5  $\mu\text{L}$  进样。以阿奇霉素峰面积与内标峰面积的比值  $a$  ( $A_s/A_i$ ) (取 5 次测定结果的均值) 为横坐标, 以阿奇霉素的浓度  $\rho$  ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 为纵坐标进行线性权重回归, 得回归方程:  $\rho = 470.79a - 0.3707$ ,  $r = 0.9987$  ( $n = 8$ ), 权重系数为:  $w = 1 \cdot y^{-2}$ ; 线性范围: 10.128 ~ 8 102.4  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 最低定量限为 10.128  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

提取回收率 取空白结膜匀浆液 50  $\mu\text{L}$  置 2 mL 样品管中, 分别精密加入低、中、高 (101.28、2 532、32 409.6  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的阿奇霉素对照品储备液各 10  $\mu\text{L}$ , 分别制成低、中、高 (20.256、506.4、6 481.92  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 个浓度的样品各 5 份, 按“样品处理”项下自“精密加入内标溶液 20  $\mu\text{L}$ ”起操作, 处理样品, 得到样品溶液; 另取空白结膜匀浆液 50  $\mu\text{L}$ , 按“样品处理”项下“加入乙腈 1 mL”处理得到空白基质, 转移全部空白基质至另一 1.5 mL 离心管中, 再分别精密加入低、中、高 3 种阿奇霉素标准溶液 10  $\mu\text{L}$  和内标溶液 20  $\mu\text{L}$ , 旋涡 30 s, 制成低、中、高 3 个浓度的对照样品, 每个浓度 2 份。分别取各溶液 5  $\mu\text{L}$  进样。按下式计算: 绝对回收率 =  $R_i/R_s \times 100\%$ , 其中  $R_i$  为样品中阿奇霉素与内标的峰面积比值,  $R_s$  为对照溶液中阿奇霉素与内标的峰面积比值。阿奇霉素低、中、高 3 种浓度的绝对回收率 ( $n = 5$ ) 分别为 (89.1  $\pm$  3.3) %、(97.4  $\pm$  2.7) %、(95.3  $\pm$  1.1) %; 内标的提取回收率为 (86.7  $\pm$  3.2) %。样品以及

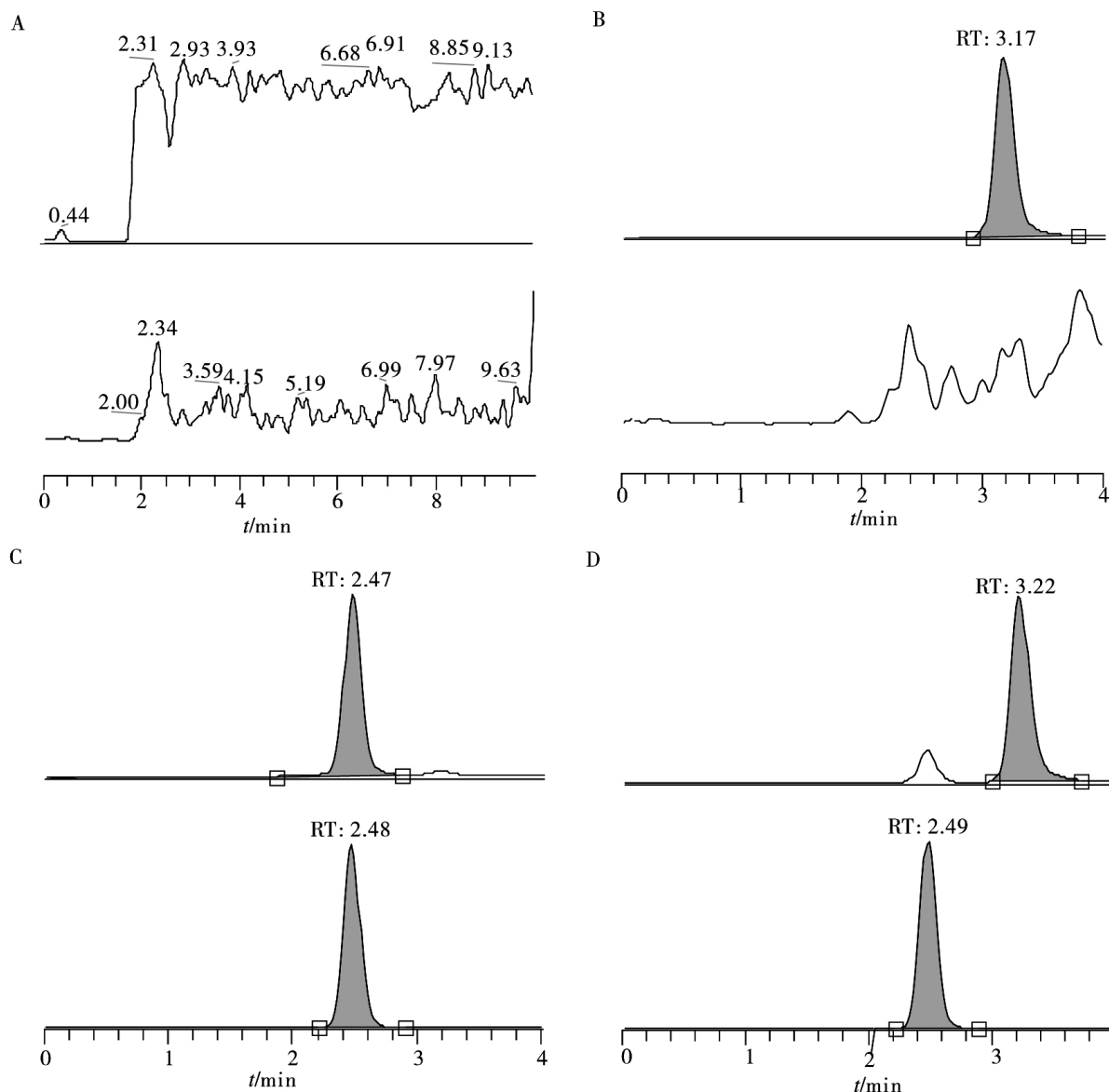


图1 结膜中阿奇霉素和克拉霉素(内标)的HPLC色谱图(上下通道分别监测:阿奇霉素  $[M+H]^+ m/z 749 \rightarrow m/z 591$ , 内标克拉霉素  $[M+H]^+ m/z 748 \rightarrow m/z 590$ ) A: 空白结膜, B: 空白结膜中加入阿奇霉素 ( $506.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), C: 空白结膜加入克拉霉素(内标, 由于阿奇霉素和克拉霉素分子质量仅相差1, 所以在阿奇霉素的离子通道也出现了克拉霉素的色谱峰), D: 受试制剂单次给药1h后的结膜样品 ( $1\ 000.7 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )

内标的回收率均大于85%, 回收率良好。

**准确度及精密度** 取空白结膜匀浆液  $50 \mu\text{L}$ , 置  $2 \text{ mL}$  塑料离心管中, 精密加入阿奇霉素对照品溶液(含阿奇霉素  $101.28$ 、 $2\ 532$ 、 $32\ 409.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $10 \mu\text{L}$ , 涡旋  $30 \text{ s}$  混匀, 配制成低、中、高3个浓度的模拟结膜匀浆液样本, 每个浓度5份, 按“样品处理方法”项下自“精密加入内标溶液  $20 \mu\text{L}$ ”起同法处理, 最后取各种溶液  $5 \mu\text{L}$  进样分析。由随行标准曲线求出各样品的浓度, 计算样品的准确度和精密度, 结果见表1。结果表明本方法的准确度和精密度均符合生物样品的分析要求。

**基质效应试验** 空白基质制备: 分别取来源于5

个不同个体的空白结膜匀浆液适量, 按20倍量体积加入乙腈, 涡旋  $3 \text{ min}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  冷冻  $10 \text{ min}$ ,  $16\ 880 \times g$  离心  $5 \text{ min}$ , 得空白基质。基质样品制备: 于  $2 \text{ mL}$  离心管中, 分别精密加入低、中、高浓度的阿奇霉素标准溶液  $10 \mu\text{L}$ , 内标溶液  $20 \mu\text{L}$ , 空白基质  $1 \text{ mL}$ , 旋涡  $3 \text{ min}$  制成低、中、高3个浓度的样品, 每个浓度5份, 即得。对照样品制备: 以流动相代替空白基质同法制备成对照样品, 每个浓度2份。基质样品的峰面积与对照样品的峰面积比即为基质效应。阿奇霉素低、中、高3个浓度的基质效应的平均值分别为  $(101.5 \pm 7.4)\%$ 、 $(99.7 \pm 1.3)\%$  和  $(99.4 \pm 2.2)\%$ ; 内标的基质效

表1 阿奇霉素的准确度及精密度  $n = 5, \bar{x} \pm s, \%$

模拟浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	准确度	批内RSD	批间RSD
20.26	108.7 ± 3.2	3.0	6.7
506.4	94.3 ± 1.3	1.4	1.1
6 481.92	100.9 ± 2.4	2.1	2.7

应平均值为 (101.2 ± 1.4) %。结果表明本试验条件下阿奇霉素和内标测定不受基质效应干扰。

稳定性考察 取3份空白结膜匀浆液(每份0.75 mL), 分别精密加入阿奇霉素标准溶液(含阿奇霉素101.28、2 532、32 409.6  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 150  $\mu\text{L}$ , 涡旋30 s混匀, 配制成含阿奇霉素分别为20.256、506.4、6 481.92  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低、中、高3个浓度的样品。精密吸取上述混合均匀的含药结膜匀浆液50  $\mu\text{L}$ 置2 mL离心管中备用, 每个浓度水平制备10份样品, 其中2份按“样品处理”项下自“精密加入内标溶液20  $\mu\text{L}$ ”起立即处理, 作为0 h样品; 2份在室温下放置5 h, 2份在一日内进行反复冻融3次试验, 2份于冰冻条件下保存20 d, 2份于冰冻条件下保存40 d, 上述样品均按“样品处理”项下自“精密加入内标溶液20  $\mu\text{L}$ ”起处理, 取上清液5  $\mu\text{L}$ 进样。由当日的随行标准曲线求出各样品的浓度, 与0 h的相应浓度的样品比较, 结果见表2。结果表明: 结膜样品在室温放置5 h, 冻融3次以及冰冻20 d的条件下稳定性良好。

表2 阿奇霉素结膜样品的稳定性  $n = 2$

加入浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	测得浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$			
	0 h	室温放置5 h后	冻融3次后	冰冻20 d后
20.26	21.49	21.61	22.06	19.5
506.40	522.93	539.20	548.69	479.64
6 481.92	6 622.83	6 787.06	6 750.67	7 011.16

单次及多次给药后药物在结膜组织中的药动学 80只新西兰白兔左右眼单次给予参比制剂(40只)和受试制剂(40只)后, 测得阿奇霉素平均结膜药物浓

表3 184只兔单次或多次给予1%阿奇霉素滴眼液25  $\mu\text{L}$ 后结膜组织中阿奇霉素浓度

$n = 8, \bar{x} \pm s$

时间/h	单次给药后药物浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$		多次给药后药物浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	
	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂
1	18.26 ± 14.00	18.92 ± 6.05 <sup>a</sup>	35.36 ± 12.75	33.37 ± 15.33 <sup>a</sup>
2	22.29 ± 9.36	21.80 ± 14.35 <sup>a</sup>	34.57 ± 15.52	33.39 ± 13.52 <sup>a</sup>
4	20.50 ± 5.63	21.13 ± 10.78 <sup>a</sup>	26.62 ± 12.46	30.17 ± 13.97 <sup>a</sup>
8	11.64 ± 5.92	10.90 ± 4.63 <sup>a</sup>	51.62 ± 18.02	53.10 ± 16.42 <sup>a</sup>
12	14.73 ± 8.08	7.77 ± 3.88 <sup>b</sup>	26.88 ± 13.86	32.69 ± 11.53 <sup>a</sup>
24	6.32 ± 3.47	9.26 ± 6.19 <sup>a</sup>	19.21 ± 9.96	13.29 ± 4.54 <sup>a</sup>
48	2.98 ± 1.78	3.12 ± 1.84 <sup>a</sup>	9.10 ± 4.26	11.70 ± 5.77 <sup>a</sup>
72	0.69 ± 0.28	0.81 ± 0.31 <sup>a</sup>	3.52 ± 1.78	6.77 ± 3.63 <sup>b</sup>
120	0.45 ± 0.20	0.53 ± 0.19 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.35	1.90 ± 1.00 <sup>b</sup>
192	0.37 ± 0.13	0.38 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.30	0.86 ± 0.41 <sup>a</sup>

与参比制剂同时点浓度经  $t$  检验: <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$

度-时间曲线见图2。104只健康兔左右眼多次给药达稳态后阿奇霉素滴眼液参比制剂(52只)和受试制剂(52只)后, 测得阿奇霉素的平均结膜浓度-时间曲线见图3。对参比和受试制剂同一时间点的浓度数据进行两独立样本的  $t$  检验, 见表3。结果表明参比和受试制剂在单次给药后的10个采样时间点浓度中仅有1个采样点差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。多次给药达稳态后的10个采样时间点中有2个采样时间点差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。主要的药动学参数见表4。

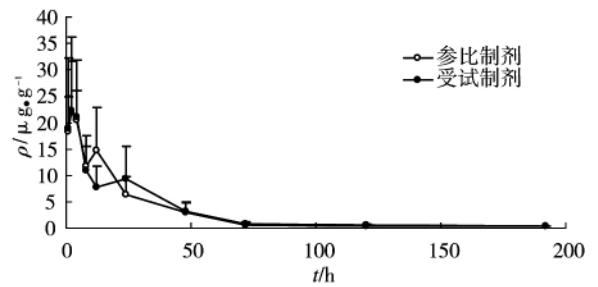


图2 单次给药25  $\mu\text{L}$ 后参比制剂和受试制剂结膜的平均药时曲线 ( $n = 40, \bar{x} \pm s$ )

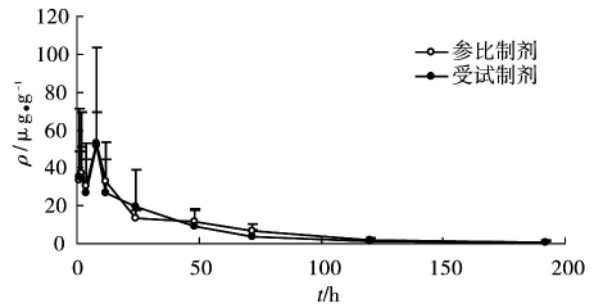


图3 多次给药25  $\mu\text{L}$ 后参比制剂和受试制剂结膜的平均药时曲线 ( $n = 52, \bar{x} \pm s$ )

### 讨 论

由于阿奇霉素结构中没有紫外吸收的发色基

表4 184只家兔单次或多次左右眼给予1%阿奇霉素滴眼液25 μL后结膜组织中的主要药动学参数  $n = 184$ 

参数	单次给药		多次给药	
	参比制剂	受试制剂	参比制剂	受试制剂
$t_{max}/h$	2.0	2.0	8.0	8.0
$\rho_{max}/\mu g \cdot g^{-1}$	22.29	21.80	53.10	51.62
$t_{1/2h}/h$	25.5	24.1	28.8	23.7
$AUC_{0-192}/\mu g \cdot h \cdot g^{-1}$	528.0	536.5	1 584.9	1 379.4
$AUC_{0-\infty}/\mu g \cdot h \cdot g^{-1}$	530.4	538.7	1 600.4	1 384.2
累积系数R	-	-	2.36	2.57

团,常用的HPLC-UV只能采用紫外末端吸收,最低定量限不能满足生物样本痕量分析的要求;国外文献报道了LC-MS/MS检测结膜中阿奇霉素的方法<sup>[10]</sup>,该方法选择C<sub>18</sub>色谱柱和罗红霉素为内标,本研究组前期研究发现,罗红霉素与阿奇霉素在C<sub>18</sub>色谱柱上保留行为差异较大,该研究利用高比例的有机相让罗红霉素和阿奇霉素在死时间出峰,会导致内源性物质干扰基线,影响低浓度点的定量。经过色谱条件摸索,本研究采用苯基柱和克拉霉素为内标,阿奇霉素保留时间在3.2 min左右,克拉霉素保留时间在2.5 min左右,使两者在色谱柱上都有合适的保留,避开了强极性的内源性基质的干扰,基线平稳。此外,克拉霉素与阿奇霉素结构非常近似,[M+H]<sup>+</sup>仅相差1个质荷比,所以选择克拉霉素为内标是比较恰当的。也正因为两者的质荷比仅相差1个单位,所以在阿奇霉素的SRM监测通道中也出现了克拉霉素的色谱峰,但可以通过色谱保留行为的差异使之分离,未影响阿奇霉素的定量。

细菌性结膜感染包括衣原体引起的感染和普通菌引起的化脓感染。眼内高浓度的阿奇霉素对衣原体和普通感染菌引起的结膜均有效<sup>[12]</sup>,对衣原体MIC值普遍小于0.5 mg·L<sup>-1</sup>。对普通细菌感染所致的结膜炎,MIC<sub>90</sub>值往往小于4 mg·L<sup>-1</sup><sup>[7]</sup>。本实验中,单次滴注1%阿奇霉素滴眼液25 μL(参比制剂和受试制剂)后在结膜中的药物浓度可以维持在MIC<sub>90</sub>(4 mg·L<sup>-1</sup>)以上至少40 h。多次滴注(d1~2每日2次、d3~7每日1次)1%阿奇霉素滴眼液25 μL(参比制剂和受试制剂)后在结膜中的药物浓度与单次给药比较 $\rho_{max}$ 显著升高,有效浓度维持时间延长。另外,稳态实验数据表明多次给药的d5、d6和d7的结膜的谷浓度均在MIC<sub>90</sub>(4 mg·L<sup>-1</sup>)以上。参比制剂与受试制剂均能发挥良好的疗效。

由表4可以看出,单次给药和多次给药后参

比制剂和受试制剂在结膜组织中的主要药动学参数基本一致。但是需要注意的是,经多次给药后, $\rho_{max}$ 升高了2倍,AUC<sub>1-192</sub>升高约2~3倍,参比和受试制剂的累积系数R分别为2.36和2.57,说明药物在结膜中有一定的蓄积,维持在有效浓度以上的时间可以更持久,但也应考虑蓄积现象可能造成的用药安全隐患。

#### [参考文献]

- [1] 谢家政,章霞芝,涂雄文.阿奇霉素治疗呼吸道感染[J].中国新药与临床杂志,2000,19(3):175-177.
- [2] 段晓玲,魏青杨,孙秀丽,等.静脉滴注阿奇霉素治疗非淋菌性泌尿生殖道炎106例[J].中国新药与临床杂志,2003,22(6):328-330.
- [3] 刘海莉,杨华,李牧.阿奇霉素和左氧氟沙星治疗女性非淋菌性泌尿生殖道感染各45例比较[J].中国新药与临床杂志,2004,23(9):619-621.
- [4] 张平.莫匹罗星与阿奇霉素联合治疗新生儿金葡菌烫伤样皮肤综合征疗效观察[J].儿科药理学杂志,2004,10(1):51-52.
- [5] FOULDS G, SHEPARD RM, JOHNSON RB. The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues[J]. J Antimicrob Chemother, 1990, 25 (Suppl A): 73-82.
- [6] SHEPARD RM, FALKNER FC. Pharmacokinetics of azithromycin in rats and dogs[J]. J Antimicrob Chemother, 1990, 25(Suppl A): 49-60.
- [7] AMAR T, CAILLAUD T, ELENA PP. Ocular pharmacokinetic study following single and multiple azithromycin administrations in pigmented rabbits[J]. Curr Eye Res, 2008, 33(2): 149-158.
- [8] SI EC, CHEUNG PS, BOWMAN L, et al. Ocular pharmacokinetics of AzaSite Xtra ~2% azithromycin formulated in a DuraSite delivery system[J]. Curr Eye Res, 2009, 34(6): 485-491.
- [9] AKPEK EK, VITTITOW J, VERHOEVEN RS, et al. Ocular surface distribution and pharmacokinetics of a novel ophthalmic 1% azithromycin formulation[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2009, 25(5): 433-439.
- [10] SHEN Y, YIN C, SU M, et al. Rapid, sensitive and selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the quantification of topically applied azithromycin in rabbit conjunctiva tissues[J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(1): 99-104.
- [11] GAIL T, TERRENCE PO'BREIN. Conjunctival tissue pharmacokinetic properties of topical azithromycin 1% and moxifloxacin 0.5% ophthalmic solutions; a single-dose, randomized, open-label, active-controlled trial in healthy adult volunteers[J]. Clin Ther, 2008, 30(11): 2005-2014.
- [12] MARK BA, WARREN H, ARON MS, et al. Clinical cure of bacterial conjunctivitis with azithromycin 1%: vehicle-controlled, double-masked clinical trial[J]. Am J Ophthalmol, 2008, 145(6): 959-965.