

阿莫西林在藏系羊体内的药物动力学研究

闫丽萍¹, 史权军¹, 何斌^{2*}

(1. 青海省湟中县动物卫生监督所, 青海湟中 811600; 2. 武汉市农业科学技术研究院畜牧兽医学研究所, 武汉 430208)

[收稿日期] 2016-03-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 06-0044-04 [中图分类号] S859.796

[摘要] 为研究阿莫西林在藏系羊体内的药物动力学特征, 了解阿莫西林在藏系羊体内的吸收、分布、转化及排泄规律, 以期为牧区兽医临床用药提供依据。本试验选取 8 只成年藏系羊, 阿莫西林口灌给药, 不同时间点采集藏系羊血液, 利用高效液相色谱法测定血浆中药物浓度。结果表明, 阿莫西林经藏系羊口灌给药 (15 mg/kg. B. W) 后, 其主要药动学参数为: $t_{1/2\alpha}$ 为 (0.773 ± 0.097) h, $t_{1/2ka}$ 为 (0.156 ± 0.021) h, $t_{1/2\beta}$ 为 (3.787 ± 0.973) h, AUC 为 (8.249 ± 1.023) $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, T_{max} 为 (0.497 ± 0.036) h, C_{max} 为 (2.667 ± 0.198) $\mu\text{g/mL}$ 。表明阿莫西林口灌给药后, 在成年藏系羊体内吸收迅速, 消除较快。

[关键词] 阿莫西林; 高效液相色谱; 藏系羊; 药物动力学

Studies on Pharmacokinetics of Amoxicillin in Tibetan Sheep

YAN Li - Ping¹, SHI Quan - Jun¹, HE Bin^{2*}

(1. Animal Health Supervision Institute, Huangzhong, Qinghai 811600, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Wuhan Academy of Agricultural Science and Technology, Wuhan 430208, China)

Abstract: The experiment mainly focuses on research of characteristic of pharmacokinetics of amoxicillin in Tibetan sheep, providing the basis for clinical veterinary drug. 8 adult Tibetan sheep are randomly selected with oral administration of amoxicillin, drug concentration testing in plasma by adopting high performance liquid chromatography. The main pharmacokinetic parameters after oral administration of amoxicillin are : $t_{1/2\alpha}$ are 0.773 ± 0.097 h, $t_{1/2ka}$ are 0.156 ± 0.021 h, $t_{1/2\beta}$ are 3.787 ± 0.973 h, AUC are 8.249 ± 1.023 $\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$, T_{max} are 0.497 ± 0.036 h, C_{max} are 2.667 ± 0.198 $\mu\text{g/mL}$. The result demonstrates that amoxicillin are absorbed quickly in Tibetan sheep by oral administration with rapid disappearance.

Key words: amoxicillin; HPLC; Tibetan sheep; pharmacokinetics

阿莫西林 (Amoxicillin) 又称羟氨苄青霉素, 人工半合成 β -内酰胺类抗菌药物, 为氨苄西林同系物。性质稳定、耐酸, 在胃酸中较稳定、吸收迅速、分布广泛, 被 WHO 推荐为首选口服抗生素; 同时其

有杀菌作用较强、副作用少、剂型多样、与其他药物联用方便和价格便宜等优点, 现已广泛用于兽医临床, 用于防治各种敏感菌所引起的家畜消化、呼吸、生殖系统以及全身感染性疾病^[1-3]。藏系羊

作者简介: 闫丽萍, 兽医师, 从事重大动物疫病防控、动物卫生监督以及动物传染病的发病原因、预防和控制研究。

通讯作者: 何斌。E-mail: 182403891@qq.com

(Tibetan sheep), 是我国古老的绵羊品种, 数量多, 分布广, 家畜中比重最大。主要分布在青藏高原, 青海是主要产区, 依其生态环境, 结合生产、经济特点, 可分为高原型、山谷型和欧拉型 3 类, 是中国三大粗毛绵羊品种之一。对高寒地区恶劣气候环境和粗放的饲养管理条件具有良好的适应能力, 是青藏高原重要畜种之一。目前, 尚未见阿莫西林在藏系羊体内的相关药物动力学研究。本文就阿莫西林在藏系羊体内的药物动力学进行了研究, 分析了其在藏系羊体内的药物动力学特征, 了解其在藏系羊体内的吸收、分布、转化及排泄规律, 旨在为家畜养殖合理用药提供理论指导, 对青海地区畜牧业中细菌性疾病的防控亦具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料 原料药品由山东鲁抗医药股份有限公司提供, 阿莫西林原料药, 批号: 20140812, 含量 99.0%; 阿莫西林对照品, 中国兽医药品监察所提供, 批号: 0504-7532, 含量 86.2%; 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。美国 Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 紫外检测器, Agilent ZORBAX SB 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 在总结相关参考文献^[4-6]的基础上, 经过长时间、多次试验, 确立阿莫西林的高效液相色谱检测条件为: 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长为 224 nm; 流动相为乙腈: 0.05 mol/L KH₂PO₄ (pH 2.5) = 5: 95; 流速 1.0 mL/min; 进样量 20 μL; 柱温 (30 ± 0.1) °C。

1.2.2 血浆样品处理 准确吸取血浆 0.5 mL, 加入 1.5 mL 乙腈沉淀蛋白, 涡旋振荡 1 min, 3000 r/min 离心 10 min; 取上清液于 10 mL 离心管中, 再加入 3 mL 二氯甲烷, 涡旋振荡 1 min, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液 20 μL 进样分析^[7-9], 记录色谱图。

1.2.3 血浆标准曲线的建立 向 9 支 5 mL 聚丙烯离心管中各加入 0.5 mL 空白血浆, 留一支作空白对照, 然后依次加入阿莫西林对照品标准工作液, 便得到药物浓度依次为 0.01、0.05、0.10、0.50、

1.00、2.50、5.00、10.00 μg/mL 的血浆样品。分别按照阿莫西林血浆样品处理方法处理后, 进样分析。以测得的阿莫西林的峰面积 (A) 为横坐标, 药物浓度 (C) 为纵坐标, 建立标准曲线, 求得阿莫西林的回归方程为 $C = 0.0284A + 0.0167$, $r = 0.9997$ 。

1.2.4 方法学验证 取空白血浆 0.5 mL, 添加适量阿莫西林标准工作液, 使其浓度分别为 10.00、1.00、0.10 μg/mL, 按照血浆样品的处理方法处理, 并进行 HPLC 检测, 每个浓度设置 5 个平行, 测定结果为日内变异系数在 5% 以内; 重复检测 5 d, 测定结果为日间变异系数在 10% 以内。阿莫西林的萃取回收率为血浆 94.56% ~ 96.84%; LOD、LOQ 分别为 0.01、0.04 μg/mL。

1.2.5 药物动力学试验设计 试验用藏系羊购于养殖场, 13 月龄, 雌雄各 4 只, 试验前将 8 只藏系羊适应饲喂 7 d, 给药前禁食 12 h, 按照《中华人民共和国兽药典》2010 版中阿莫西林的推荐使用剂量, 本试验以 15 mg/kg B. W 的剂量口灌给药。

口灌给药后, 分别于 0.083、0.167、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12 h 颈静脉采血 5 mL 左右, 置于已添加肝素钠的聚丙烯离心管中, 以 2000 r/min 离心 15 min, 取上清液于 -20 °C 冷冻保存, 待测定。

1.2.6 数据处理及统计分析 方法学验证考察数据采用 SPSS 软件分析处理; 药-时曲线图和消除动态图采用 Excel 软件绘制; 药物动力学模型拟合及参数计算均采用 3P97 药动学软件分析, 药物动力学参数可根据公式进行计算。

2 结果与分析

2.1 色谱行为 通过反复多次试验所建立的色谱条件, 基线平稳, 药物峰形对良好, 样品中阿莫西林在色谱条件下均能与杂质峰良好分离 (图 1、图 2)。结果表明, 本测定方法简便, 稳定, 检测效率高, 色谱峰良好。

2.2 药物动力学数据 按照试验设定方案进行给药和样品处理, 经高效液相色谱分析检测、软件分析计算。口灌阿莫西林各时间点药浓度见表 1, 药物动力学参数见表 2。

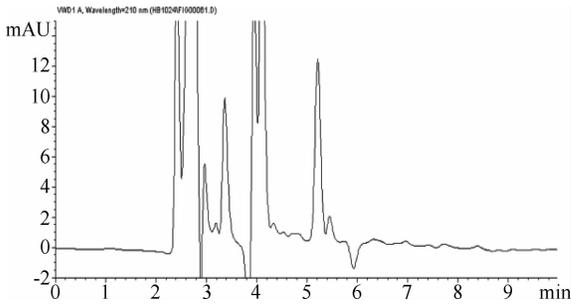


图1 空白血浆对照色谱图

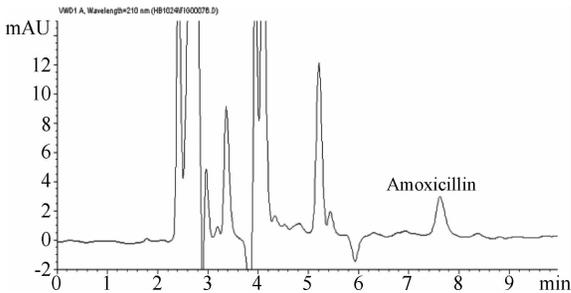


图2 血浆中添加阿莫西林色谱图(0.5 µg/mL)

表1 口灌阿莫西林(阿莫西林 15 mg/kg. B. W) 后各时间点的血药浓度(n=8)

时间/h	阿莫西林平均血药浓度 ± S. D.(µg/mL)
0.083	1.263 ± 0.138
0.167	1.734 ± 0.162
0.25	2.345 ± 0.210
0.5	3.532 ± 0.361
0.75	2.569 ± 0.319
1	1.984 ± 0.137
2	1.345 ± 0.138
4	0.563 ± 0.048
6	0.312 ± 0.031
8	0.237 ± 0.042
12	0.106 ± 0.023

注:“S. D.”代表标准差

表2 阿莫西林(15 mg/kg. B. W)在藏系羊体内的药动学参数(n=8)

参数	数值	参数	数值
$A/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	3.553 ± 0.845	$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.156 ± 0.021
α/h^{-1}	0.896 ± 0.074	K_{12}/h^{-1}	0.264 ± 0.023
$B/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	0.970 ± 0.095	$AUC/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1})$	8.249 ± 1.023
β/h^{-1}	0.183 ± 0.025	K_{21}/h^{-1}	0.359 ± 0.046
$t_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.773 ± 0.097	T_{max}/h	0.497 ± 0.036
$t_{1/2\beta}/\text{h}$	3.787 ± 0.973	$C_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	2.667 ± 0.198

由表1、表2可见,口灌阿莫西林后,在藏系羊体内吸收迅速,达峰时间快,达峰浓度较高,药-时曲线(图3)符合有吸收二室开放模型,其药-时方程为 $C = 3.5528 e^{-0.8962t} + 0.9699 e^{-0.1830t} - 4.5227 e^{-4.4524t}$ 。

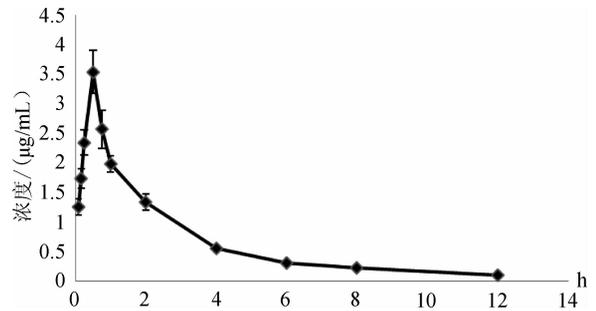


图3 阿莫西林口灌给药的血药浓度-时间曲线

3 讨论与小结

3.1 色谱条件的选择 本试验中,建立了阿莫西林的高效液相色谱检测方法,方法简单、快速。试验中选择 224 nm 作为检测波长,有效的提高了检测的灵敏度,使药物与杂质得到了有效分离。

阿莫西林,具有很多活性基团。在液相色谱检测时,药物中的阳离子易与色谱柱中游离的硅羟基经范德华力作用或发生离子反应,使阿莫西林和舒巴坦在色谱柱中被吸附,洗脱时间延长,导致色谱峰拖尾。在进行药物分析时,选择双峰端 C18 硅胶色谱柱或者选择洗脱能力较强的流动相均可以有效解决这个问题。C18 硅胶色谱柱是当前检测阿莫西林和舒巴坦常用的液相分析柱,本试验比较了 Agilent Extend - C18 和 Agilent ZORBAX SB - Aq 两种色谱分析柱的分析效果,也分别使用这两种色谱柱对阿莫西林进行色谱分析。结果发现 Extend - C18 色谱柱的色谱峰出现拖尾现象,色谱峰对称性不符合分析要求,在流动相中添加乙酸胺、三乙胺防等防拖尾试剂,也不能抑制其拖尾。进行分析总结,发现 Extend - C18 色谱柱主要用于偏碱性药物(pH 2~12)的分离,三乙胺主要抑制碱性药物的色谱峰拖尾。最后采用 ZORBAX SB - Aq 色谱柱,适用于酸性条件下(pH 1~7)酸性药物的分离,且适合高水相的流动相,可以走 100% 纯水,符合本试验流动相中 95% 的高水相的要求,色谱峰无拖尾现象,对称性达 0.9 以上,阿莫西林和舒巴坦的药物峰与杂质峰分离良好。

3.2 流动相的选择 流动相的选用是综合国内外

所有相关方面的报道,综合分析反复试验而最终确定为乙腈与磷酸二氢钾溶液。甲醇和水相混合时易产生气泡,影响压力,且乙腈洗脱能力比甲醇强,所以选用乙腈作有机相。还发现使用的磷酸二氢钾浓度为 0.068 mol/L,其盐浓度太高,磷酸二氢钾易在色谱柱和管道中形成结晶,严重影响色谱柱的使用寿命和引起管道的堵塞。最后对此流动相进行了改进,发现磷酸二氢钾为 0.05 mol/L 时,色谱峰峰形对称性好,与干扰峰分离较好,这样既符合试验检测要求,又有效的延长色谱柱的使用寿命,同时还减少结晶盐对管道的影响。根据阿莫西林的理化性质,降低流动相的 pH 值,使其更加稳定, H^+ 的增加有效抑制了两种药物的电离,减少了其与色谱柱中游离硅羟基的作用,有效防止了色谱峰的拖尾,从而提高了检测的准确性和紧密度。当流动相中 pH 小于 3 时, H^+ 基本上全部抑制了硅羟基的解离。但并不是 pH 越低越好,当 pH 过低时,阿莫西林和舒巴坦稳定性降低,影响试验药物的检测,同时影响色谱柱的使用寿命。一般流动相 pH 值也不能低于 2。鉴于以上因素,本试验最终确定乙腈与 0.02 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相,用磷酸调 pH 至 2.5。

3.3 药动学特征 药物动力学主要是研究药物在机体内的变化规律,即药物进入机体、存在部位、如何转化以及消除规律的研究。对临床给药方案的拟定和新药设计具有重要的理论指导意义和使用价值。药物动力学属于基础性研究,主要是为临床应用服务,常用于药物给药剂量和给药方案的确定,提供药物在机体内的吸收、分布、转化和排泄的规律,以指导临床合理科学的用药。藏系羊是我国古老的绵羊品种,数量多,分布广,是青藏高原重要畜种之一,本文率先在藏系羊体内开展了阿莫西林的药动学研究,研究表明:阿莫西林口灌后,在藏系羊体内的药-时曲线符合有吸收二室开放模型,与曾振灵等^[10]报道的阿莫西林在猪体内的 $t_{1/2\beta}$ 为 3.28 h 相比较长一些,这可能是由于藏系羊属于复胃草食动物,复胃影响药物的吸收和代谢所致。与徐东^[11]报道的在鸡体内阿莫西林的 $t_{1/2\beta}$ 为 1.22 h 相比要长一些,这可能是由于两者种属不同,禽类的体温较高,代谢较快所致。而阿莫西林

在猪体内 T_{max} 为 0.53 h、在鸡体内 T_{max} 为 0.33 h,均与在藏系羊体内的 0.497 h 达峰时间相近,这说明阿莫西林在这些动物体内的吸收速度基本相近,藏系羊复胃对阿莫西林的吸收基本没有影响。阿莫西林的药动学数据表明,阿莫西林在藏系羊体内吸收迅速、达峰时间短,消除较快。

参考文献:

- [1] 朱芸. 头孢他啶联合阿莫西林克拉维酸钾治疗急性慢性阻塞性肺疾病临床观察[J]. 吉林医学, 2013, (3): 56.
- [2] 张雪芹. 奥美拉唑、阿莫西林、克拉霉素三联疗法治疗十二指肠溃疡的临床疗效[J]. 中国医学创新, 2013, (3): 20-21.
- [3] 张娟, 邹霜. 注射用阿莫西林钠氟氯西林钠与酚磺乙胺存在配伍禁忌[J]. 护理实践与研究, 2013, (1): 125.
- [4] 郭辉生. HPLC-FLD 检测鸡血浆、蛋和排泄物中阿莫西林和氨苄西林残留及其消除规律的研究[D]. 扬州:扬州大学, 2012.
- [5] Andraia Freitas, Sara Leston, Joo Rosa, *et al.* Multi-residue and multi-class determination of antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2014, 31(5): 817-826.
- [6] Kaizhou Xie, Min Zhao, Huisheng Guo, *et al.* Determination and depletion of amoxicillin residues in eggs[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2013, 30(4): 670.
- [7] 张小杰. 鸡组织中阿莫西林、氨苄西林残留的高效液相色谱荧光检测法及其消除规律的研究[D]. 扬州:扬州大学, 2013.
- [8] Chuangji Liu, Hai Wang, Yanbin Jiang, *et al.* Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(7): 533-540.
- [9] B. Lugoboni, T. Gazzotti, E. Zironi, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantitative determination of amoxicillin in bovine muscle[J]. Journal of Chromatography B, 2011, (21): 1980-1986.
- [10] 曾振灵, 龙潭. 阿莫西林钠在猪体内的生物利用度及药动学研究[J]. 畜牧兽医学报, 2002, (6): 594-597.
- [11] 徐东. 鸡蛋中阿莫西林和氨苄西林高效液相色谱荧光检测法及其残留消除规律的研究[D]. 扬州:扬州大学, 2011.

(编辑:侯向辉)