

[³H]甲硝唑氨基酸钙在小鼠体内的分布与代谢¹

郑秀龙、赵芳、孟祥顺、杨立锡、高建国 (第二军医大学放射医学研究室, 上海 200433, 中国)

Distribution and metabolism of calcium [³H]metronidazolamate in mice¹ZHENG Xiu-Long, ZHAO Fang, MENG Xiang-Shun, YANG Li-Xi, GAO Jian-Guo
(Department of Radiation Medicine, Second Military Medical College, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The blood radioactivity-time curve after iv calcium [³H]metronidazolamate in mice was to be a biexponential model. It was rapidly distributed in various tissues. The highest radioactivities were found in liver and kidney, followed by lung, blood, heart, spleen, and the lowest in brain and testes. Bile and bone marrow contained only a slight radioactivity. In 7 d the cumulative excretion of radioactivity was 52±17% of the iv dose in urine and 10.3±2.4% in feces. The measurement by TLC and liquid scintillation counting of urine taken at 24 h after iv calcium [³H]metronidazolamate to mice revealed that approximately 77% of the total radioactivity in urine was excreted as the drug in unchanged form and 7% as its hydrolysate, metronidazole. Calcium [³H]metronidazolamate remained at a high level in blood on account of its longer $T_{1/2\beta}$ (34 h) and 20% were bound to plasma protein, thus making it available for longterm fractional radiotherapy of tumors.

KEY WORDS metronidazole; tissue distribution; thin layer chromatograph; pharmacokinetics

Received 1988 Jun 14 Accepted 1989 Apr 18
¹ Project supported by the National Natural Science Foundation of China, No 3860868

摘要 小鼠 iv [³H]甲硝唑氨基酸钙后, 血药-时曲线呈二相指数函数关系, 符合开放型二室模型。各组织放射性分布以肝和肾最高, 依次为肺、血、心、脾、脑和睾丸较低, 胆和骨髓含微量。7 d 内由尿和粪排出分别为 52±17 和 10.3±2.4%。药后 24 h 尿经 TLC 分析结果表明约占总放射性的 77.6% 呈原形药排出。该药代谢较慢, 有利于肿瘤分次放疗。

关键词 甲硝唑; 组织分布; 薄层色谱法; 药动力学

甲硝唑氨酸(metronidazolamic acid, CM)为甲硝唑乙唑(灭滴灵)衍生物, 其钙盐(CM_{Ca})是我室于 1984 年合成的一种新型辐射增敏剂, 有亲肿瘤作用^(1,2)。经电子自旋共振研究(待发表资料)、体外细胞存活率、DNA 链断裂及整体荷 S₁₈₀ 肉瘤小鼠等试验结果, 均证明有较强的辐射增敏作用⁽³⁻⁷⁾。其毒副作用较小⁽⁸⁾, 临床肿瘤病人初步试用 81 人, 效果较好, 无明显毒副作用(待发表资料)。为能给临床提供合理用药参考, 本文进行了小鼠分布、排泄及代谢研究。

MATERIALS AND METHODS

昆明种成年♂小鼠 60 只, 体重 24.2±SD 1.3 g, 由尾单次 iv [³H]CM_{Ca} 5.3 MBq/kg。

[³H]CM_{Ca} 的制备与给药 [³H]CM_{Ca} 是由中科院上海原子核研究所标记室采用 PdO/BaSO₄ 催化 ³H₂O 置换法标记 CM, 经用甲醇除去不稳定 ³H 后, 放化纯度为 96.3%, 放化比

度为 1.96 TBq/mmol 提供使用(待发表资料)。[³H]CM 为真空抽干的钠盐, 实验时先用双蒸水溶解和加适量的 CM 载体, 再按 CM:Ca 摩尔浓度(2:1)加 CaCl₂ 制备成 [³H]CMCa。

生物样品制备和测定 各组织按同侧相同部位称 70-100 mg, 胆囊和左侧整个睾丸, 左侧股骨剪去两端, 用蒸馏水 0.2 ml 冲洗 5 次, 样品置液闪瓶内分别加甲酸(88%), H₂O₂(30%) 和辛醇 1 滴, 于 70℃ 水浴内消化脱色, 冷后加 9 ml 闪液 (PPO 6 g, POPOP 2 g, 二甲苯 1000 ml, Triton X-100 500 ml), 摇匀呈透明液, 放置过夜, 用 FJ-205 型液闪仪测量放射性强度, 所有样品均经内源法淬灭校正过。

粪、尿样品制备 粪在 80℃ 烘干恒重后, 加乙醇浸泡并研磨成粉末, 再烘至恒重, 精称 30 mg 进行消化。尿先在 80℃ 水浴上浓缩后, 取 0.1 ml 进行消化, 用液闪测量。粪、尿样品均用内源跟踪法进行淬灭校正。

[³H]CMCa 代谢产物的分离 小鼠 iv [³H]CMCa 后, 置代谢笼内, 收集前 4 h 和 4-24 h 尿, 经真空减压浓缩后, 将尿和 [³H]CMCa 注射液分别点样于已点过原药标准 CMCa 的荧光硅胶 GF₂₅₄ 板上, 经在苯:水(10:3)展开剂中扩展后, uv 光下测 CMCa 的 R_F 值, 并进行分段(5 mm)刮下作放射性液闪测定。

RESULTS

血药浓度 小鼠 iv 后, 经 5、10 及 20 min 由鼠尾端剪尾各取 20 μl 血, 30 min 后经不同时间摘眼球放血, 肝素抗凝, 取 0.1 或 0.2 ml 全血经甲酸、H₂O₂ 消化脱色后测放射性。血内放射性-时间曲线呈二相指数函数关系, 如图 1, 经电子计算机拟合, 结果符合开放型二室动力学模型, 其曲线方程为 $C(t) = 6.199 e^{-3.923t} + 0.216 e^{-0.020t}$ 。

全血经 750 × g 离心 5 min 分成血浆和血球后, 各取 0.1 ml 加甲酸等消化, 测放射性。结果血球内含放射性略高于血浆, 占全血的 55%。

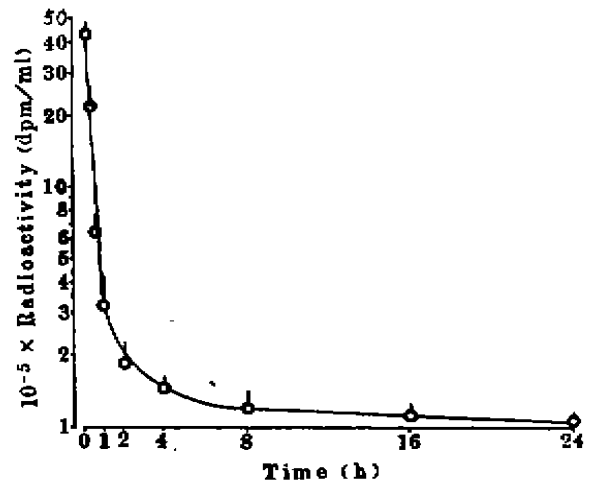


Fig 1. Radioactivity in blood after iv calcium [³H]metronidazolamate in mice 5.3 MBq/kg. n = 5, $\bar{x} \pm SD$.

组织分布 小鼠 iv [³H]CMCa 后, 组织中的放射性分布如图 2。药后 30 min 肝和肾内放射性含量最高, 依次是肺、血、心和脾, 脑和睾丸最低。胆囊和骨髓内只有微量。注后 1 h, 除肝稍下降外, 其它各组织放射性含量均明显下降, 1 d 后下降速率缓慢, 3 d 后各组织含量无明显差别, 7 d 已是痕量, 而胆囊和骨髓分别在药后 8 h 和 3 d 已测不出来。脑与血药浓度相比除药后 4-16 h 短间接近外, 其余时间脑内含药量均低于血。

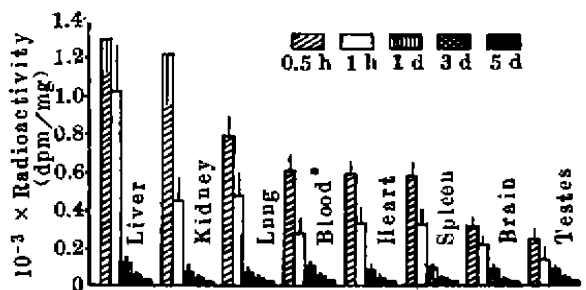


Fig 2. Distribution of radioactivity in mice after iv calcium [³H]metronidazolamate 5.3 MBq/kg. n = 5, $\bar{x} \pm SD$. *dpm/mg of blood was calculated from dpm/ml divided by average specific gravity of whole blood ($1.057 \text{ mg/ml} \times 10^3$).

排泄 小鼠 5 只 iv [³H]CMCa 5.3 MBq/kg 后, 分别置代谢笼内, 于给药后 7 d 内, 每天分别收集尿和粪 1 次, 经消化后测定放射

性。药后7d,尿和粪内放射性累积排出量分别占注入量的 52 ± 18 和 $10.3 \pm 2.4\%$ 。药后1d排出量分别占尿和粪总排出量的 94 ± 5 和 $66 \pm 22\%$ 。7d由尿粪总排出量为剂量的 $62 \pm 19\%$ 。尚有小部分可能仍残留于机体和 $^3\text{H}_2\text{O}$ 气呼出体外。结果表明此药主要由尿排出,且极大部分在d1排出。

TLC层析 另取小鼠3只iv ^3H CMCa 5.3 MBq/kg后,分别收集4h前和4-24h尿。4h尿经层析分离后,测得在 $R_F = 0.15$ 处有一放射峰(峰I),与原标准药斑点位置和注射源的放射峰位基本一致(Fig 3),其放射性占尿总放射性的 $80 \pm 4\%$ ($n = 3$)。另在 $R_F = 0.5$ 处尚有一个不明显的小放射峰(峰II),峰位与甲硝羟乙唑相似,只占尿总放射量的5.6%。I与II峰放射量的比值,随排尿时间而略有下降。药后4h, I与II峰放射量之比约为13:1,药后4-24h,分别为 77.6 ± 3.7 和 $7.0 \pm 1.0\%$

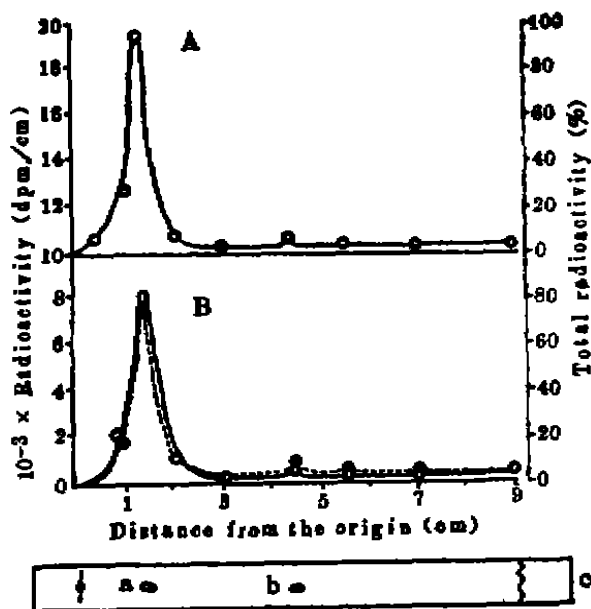


Fig 3. Silica GF TLC of mice urine in benzene: H_2O (10:3) segmental determination of calcium ^3H metronidazolamate in injection source (A) and in mice urine (B). (○) Urine initial 4 h and (●) 4-24 h urine after iv calcium ^3H metronidazolamate in mice. (C) Spots of standard CMCa (a) and metronidazole (b) on chromatogram.

($n = 3$), 两者比为11:1, 结果表明iv ^3H CMCa经体内代谢后,得到原形药及其少量水解产物与甲硝羟乙唑位点相似的两个组分。

^3H CMCa与血浆蛋白的结合 用平衡透析法.取肝素抗凝小鼠血浆2 ml,放入半透膜袋内,内加 ^3H CMCa 9.7 MBq,将袋的两端折叠并双道结扎后,平放于瓶内,袋外放0.2 mol/L的pH7.4磷酸缓冲液10 ml,使袋内外液面相平,盖紧瓶塞,在 37°C 恒温水浴内平衡透析24 h后,分别测定袋内、外的放射性,计算出药物与血浆蛋白的结合率,测得结果, ^3H CMCa与血浆蛋白的结合率为 $19.9 \pm 1.0\%$ ($n = 4$)。

DISCUSSION

小鼠iv ^3H CMCa后, $T_{1/2\alpha} = 10.8$ min,表明给药后进入中央室的药物很快分布到周边室到达效应器官。该药消除速度较缓慢($T_{1/2\beta} = 34$ h),这与 V_d 较高和该药与血浆蛋白部分结合有关。组织分布中,脑内含量很低,说明此药不能通过血脑屏障,与前文报道的 $\text{CM}^{99\text{m}}$ Tc在小鼠体内的分布相似⁽¹⁾。CMCa在小鼠与另组实验犬体内药物动力学(未刊出)均为二室开放模型,变化规律基本相似,但药物动力学参数在不同动物有差别。然该药在动物体内的代谢速率均较慢,致使血药浓度能在较长时期内维持一定水平,这对肿瘤分次放射治疗可能有利。至于该药在人体内的代谢速率有待研究解决。

为验证该药是否主要以原形药由尿排出,我们又将药后24h尿按同法在正丁醇:乙酸:水(2:1:1)内展开作TLC分析,结果与上述相似。在 $R_F = 0.51$ 处有个uv斑点和相应的大放射峰(峰I),并在 $R_F = 0.72$ 处也有个uv斑点及其相应的不明显小放射峰(峰II)。两峰之比略比在(苯:水)内展开分析高(未刊出)。结果再次肯定该药进入体内代谢后,主要以原形药排出。

比较CMCa与其原料药甲硝羟乙唑在鼠体内的代谢,可看到后者在组织内呈均匀分

布⁽⁹⁾，而不象前者有亲肿瘤作用⁽¹¹⁾，后者不与血浆蛋白结合并约有剂量的24%由胆汁排出亦与前者不同⁽⁹⁻¹¹⁾；且前者不象后者能通过血脑屏障，因而前者神经毒性较小。由本代谢试验也说明CM是一种神经毒副作用小的新型辐射增敏药。

感谢 药物动力学参数由本校电子计算机中心 张洪同志协助计算。

REFERENCES

- 1 Yang LX, Zheng XL, Gao JG, Zhu YU, Liu N. Synthesis of metronidazole derivative and its distribution in S180 bearing mice. *Acad J Second Milit Med Coll* 1986; 7 : 17
- 2 Zheng XL, Yang LX, Gao JG, Zhu YU, Zhao F, Liu N. The studies of synthesis of a new type tumor localizing radiosensitizer and its action. *J Radiat Res; Radiat Proc* 1986; 4(1) : 60
- 3 Yang LX, Zheng XL. Radiosensitization of hypoxic L7712 cells by metronidazole derivative (CM). *Ibid* 1987; 5(1) : 33
- 4 Meng XS, Zheng XL, Zhu YU, Zhao F, Gao JG. Observation and evaluation of radiosensitization effects of metronidazole derivative (CM) at different doses of γ -irradiation. *Ibid* 1987; 5(3); 10
- 5 Yang LX, Zheng XL. Study of the radiosensitizing effects of metronidazole derivative (CM) on DNA in L1772 cells. *Acta Biochim Biophys Sin* 1988; 20 : 212
- 6 Zheng XL, Yang LX, Meng XS. Study on the effects of a new radiosensitizer CM. In: Fielden EM, Fowler JE, Hendry JH, Scott D, eds. *Proceedings of 8th Int Congress of Radiat Res*. London: Taylor & Francis, 1987: 120-1
- 7 Zheng XL, Yang LX, Zhu YU, et al. A comparison of radiosensitizing effect on solid tumor in mice between metronidazole and its derivatives. *Acad J Second Milit Med Coll* 1986; 7 : 91
- 8 Yang RJ, Zhu SI, Zho F, Chang MW. Acute toxic response of metronidazole derivative in mice. *Ibid* 1988; 9 : 445
- 9 Asquith JG, Foster JL, Willson RL. Metronidazole (Flagyl), a radiosensitizer of hypoxic cells. *Br J Radiology* 1974; 47 : 474
- 10 Ralph ED, Clark JT, Libke RD, Luthy RP, Kirby WMM. Pharmacokinetics of metronidazole as determined by bioassay. *Antimicrob Agents Chemother* 1974; 6 : 691
- 11 Larusso NF, Lindmark DG, Müller M. Biliary and renal excretion, hepatic metabolism, and hepatic subcellular distribution of metronidazole in the rat. *Biochem Pharmacol* 1978; 27 : 2247

《中草药》杂志1990年征订启事

《中草药》杂志提供国内中草药最新科技成果；反映国内中草药生产技术革新；报道国内中草药学术活动及书刊出版简讯；交流国内外中草药应用经验。

《中草药》杂志报道迅速，内容包括：①中草药活性成分提取分离鉴定；②中草药制剂生产工艺、分析检验、机械设备；③中草药药理、临床；④药材；⑤中草药研究综述；⑥国外植物药研究等。

《中草药》杂志是医药科研人员、生产工人、工程技术人员、医药院校师生、药材部门从业人员的良师益友。《中草药》杂志为双月刊，每月25日出版，每册定价1.45元。由邮局公开发行。

本刊由国家医药管理局中草药情报中心站主办，由天津市邮政局发行，国内代号：6—77。敬希读者注意，并请届时到当地邮局订阅。国外代号M 221。国外读者可向中国国际图书贸易总公司预订。

编辑部地址：300193 天津市南开区鞍山西道，《中草药》杂志编辑部