

Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $Ca^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87 : 2466

6 Mikkelsen EO, Thastrup O, Christensen SB. Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta. *Pharmacol Toxicol* 1988; 62 : 7

7 Low AM, Gaspar V, Kwan CY, Daniel EE, Thastrup O. Thapsigargin inhibits repletion of intracellular calcium store in vascular smooth muscle. *Physiologist* 1990; 33 : A119

8 Goeger DE, Riley RT, Dorner JW, Cole RJ. Cyclopiazonic acid inhibition of the  $Ca^{2+}$ -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 : 978

9 Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the  $Ca^{2+}$ -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1989; 264 : 17816

10 Guan YY, Kwan CY, Daniel EE. The effects of EGTA on vascular muscle contractility in  $Ca$ -free medium. *Can J Physiol Pharmacol* 1988; 66 : 1053

11 van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating  $[Ca^{2+}]_i$  in smooth muscle. *Annu Rev Physiol* 1989; 51 : 315

12 Karaki H, Kubota H, Urakawa N. Mobilization of stored calcium for phasic contraction induced by norepinephrine in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol* 1979; 56 : 237

13 Putney JW Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 1986; 7 : 1

中国药理学报 *Acta Pharmacologica Sinica* 1991 Jan; 12 (1) : 58-62

### 3-(N-哌啶甲基偶氮)甲基利福霉素 SV 在大鼠体内的处置<sup>1</sup>

刘 璐、王振钺、李 端、孙时良<sup>2</sup> (上海医科大学药学院药理教研室, 上海 200032, 中国)

Disposition of 3-(N-piperidinomethylarino)methyl-rifamycin SV (FCE 22250) in rats<sup>3</sup>

LIU Lu, WANG Zhen-Yue, LI Duan, SUN Shi-Liang<sup>2</sup> (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

**ABSTRACT** After rats being given ig FCE 22250 5, 10 and 25 mg · kg<sup>-1</sup>, the plasma peak times ( $T_{max}$ ) were 12-14 h, the max plasma concentrations ( $C_{max}$ ) were 3.0, 5.6 and 12  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  respectively, and the half-lives of elimination ( $T_{1/2}$ ) were 24-26 h. The apparent volumes of distribution of the three doses were about 1 L · kg<sup>-1</sup>, suggesting that FCE 22250 in blood and in tissue was balanced. Total body clearance rate of each of the three doses was 29 ml · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>. The ig absolute bioavailability ranged

from 69-84%. Its distribution in rats was follows: the highest in liver, next in lung and then in fat, kidney, intestine, spleen, lymphaticode, heart, muscle, testis, the lowest in brain. It was eliminated mainly via the bile with feces.

The human serum protein binding rate of FCE 22250 was 96.2%. It was shown that the rate was not correlated with drug concentration in serum under our experimental conditions.

**KEY WORDS** FCE 22250; rifamycins; pharmacokinetics; protein binding

**摘要** 大鼠 ig FCE 22250 5, 10, 25 mg · kg<sup>-1</sup> 后,  $T_{max}$  12-14 h;  $C_{max}$  分别为 3.0, 5.6, 12  $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $T_{1/2}$  24-26h. 组织中含量以肝最高, 依次为肺、脂肪、肾、肠、脾、淋巴结、心、肌肉、睾丸, 脑最低. Ig 绝对生物利用度 69-84%. 本品原形主要经胆汁由粪便排泄, 尿中排泄甚少. 血清蛋白结合率为 96.2%, 在本实验条件下蛋白结合率与药物浓度无关.

Received 1990 Jan 16 Accepted 1990 Sep 12

<sup>1</sup> Project supported by Sichuan Industrial Institute of Antibiotics

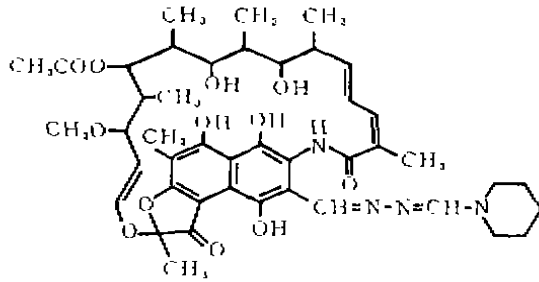
<sup>2</sup> Department of Instrumental Analysis Center, School of Pharmacy, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China

**关键词** FCE 22250; 利福霉素; 药物动力学; 蛋白结合

3-(N-哌啶甲基偶氮)甲基利福霉素 SV

(3-(*N*-piperidinomethylarino)methyl-rifamycin SV, [代号]FCE 22250), 是半合成利福霉素族衍生物, 该药抗菌谱广, 对多种细菌特别是分枝杆菌具有明显的抗菌活性, 其体外抗结核作用与利福平相似, MIC 为  $0.01\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 在体内则明显强于利福平, 且生物半衰期较利福平长<sup>(1,2)</sup>, 是一较有前途的抗结核新药。

国内外对 FCE 22250 文献报道甚少, 本文就其药代动力学特点及蛋白结合率进行了实验研究。



3-(*N*-piperidinomethylarino)methylrifamycin SV (FCE 22250)

**MATERIALS**

FCE 22250 由四川抗菌素工业研究所提供。批号 880313。利福喷丁(Rifapentine, 代号 DL 473), 由上海五洲制药厂提供。

甲醇、冰乙酸、二氯甲烷、正己烷、乙醚、无水乙醇均为 AR, 三乙胺为 CP, 二氯甲烷经重蒸馏。

高效液相色谱仪(YSB-2 平流泵)。不锈钢柱  $5 \times 150 \text{ mm}$ , 内装固定相 YWG  $C_{18}$   $10 \mu\text{m}$ 。配置 DZ-254 紫外检测器, CDMC-1CX 色谱数据处理机。

金黄色葡萄球菌 2603, 上海市药品检验所提供。

Wistar 大鼠,  $\delta$ ,  $232 \pm \text{SD } 24 \text{ g}$  本校动物部提供。每实验组 5 只, 给药前禁食 12 h。

人混合血清, 上海市中心血站提供。

**METHODS AND RESULTS**

**FCE 22250 在大鼠体内的药物动力学**

**1 FCE 22250 的高效液相色谱** 参照文献<sup>(3)</sup>建立的方法并作改进。选择利福霉素族中化学性质与溶解行为与 FCE 22250 相似的化合物 DL 473 ( $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )为内标, 流动相为甲醇:水:冰乙酸:三乙胺 = 74 : 26 : 0.117 : 0.248 (vol/vol), 流速为  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 。检测器波长 254 nm。内标物保留时间  $t_{\text{R}}=7.1 \text{ min}$ 。FCE 22250 保留时间  $t_{\text{R}}=9.4 \text{ min}$ 。

分别向含有血浆、组织、胆汁、粪、尿等样品管中加入系列浓度的 FCE 22250, 并向各管中加入内标 DL 473  $10 \mu\text{l}$ , 经提取后 HPLC 测定。以样品峰面积和内标峰面积的比值为 Y 轴, 对 FCE 22250 浓度(X 轴)作图, 制得标准曲线。求得其相关系数范围为  $r=0.9977-0.9992$ , 提取回收率为 54-108%, 及其变异系数(CV)为 9-12%。

**2 血药浓度及动力学参数** 大鼠随机分 4 组, 每组 5 只, ig FCE 22250 5, 10 和  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , iv  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  后分别于 1, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 h 尾静脉取血, 离心( $2000 \times g$ , 15 min), 取肝素抗凝血浆 0.5 ml, 加入内标 DL 473  $10 \mu\text{l}$ , 摇匀, 用二氯甲烷提取( $5 \text{ ml} \times 2$ ), 涡旋混合 60 s, 离心( $2000 \times g$ , 15 min), 合并二氯甲烷, 于  $45^\circ\text{C}$  水浴氮气流下挥去二氯甲烷, 残留物用无水乙醇(含抗坏血酸  $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ )  $100 \mu\text{l}$  溶解,  $10 \mu\text{l}$  进样测定。大鼠 iv 及 ig 给药血药浓度经时变化见 Fig 2。Iv 给药血药浓度在分布相迅速下降, 然后保持恒定(12-24 h), 24 h 后缓慢消除, 终末消除相为一级动力学过程,  $T_{1/2}$   $3.3 \text{ h}$ , 药时曲线下面积  $\text{AUC}_{0-\infty}$   $341 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。大鼠 ig 不同剂量的 FCE 22250 后, 其血药变化可用一室模型描述, 结果表明, 大鼠 ig FCE 22250 5, 10 和  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 血药浓度变化趋势相似,  $C_{\text{max}}$  分别为 3.0, 5.6 和  $12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ;  $T_{\text{max}}$  24-26h;  $T_{1/2}$  12-14h;

Tab 1. Kinetics parameters of Ig FCE 22250 in rats.  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm SD$ .

Parameters	5 mg · kg <sup>-1</sup>	10 mg · kg <sup>-1</sup>	25 mg · kg <sup>-1</sup>
$C_{max}$ (μg · ml <sup>-1</sup> )	3.0 ± 1.5	5.6 ± 1.1	12 ± 4
$T_{max}$ (h)	14 ± 6	12 ± 4	14 ± 4
$K_s$ (h <sup>-1</sup> )	0.21 ± 0.16	0.24 ± 0.19	0.16 ± 0.07
$K$ (h <sup>-1</sup> )	0.027 ± 0.003	0.027 ± 0.005	0.029 ± 0.005
$T_{1/2}$ (h)	26 ± 3	26 ± 5	24 ± 4
$AUC_{0-\infty}$ (μg · h · ml <sup>-1</sup> )	142 ± 43	286 ± 28	589 ± 184
$V_d$ (L · kg <sup>-1</sup> )	1.06 ± 0.26	1.13 ± 0.26	1.09 ± 0.19
$Cl$ (ml · kg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup> )	29 ± 6	29.4 ± 1.5	29 ± 3

$T_{1/2}$  24-26 h; 表观分布容积  $V_d$  约为 1 L · kg<sup>-1</sup>, 提示该药在血液和组织中分布均匀; 总清除率  $Cl$  为 29.3 ml · kg<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>;  $AUC_{0-\infty}$  分别为 142, 286 和 589 μg · h · ml<sup>-1</sup>. 从动力学参数值 (Tab 1) 可以看出, 在 5-25 mg · kg<sup>-1</sup> 剂量范围内, FCE 22250 呈线性动力学过程. Ig 生物利用度为 69-84%.

3 组织分布 各时间点 5 只大鼠, ig FCE 22250 10 mg · kg<sup>-1</sup>, 于给药后 8 h 处死, 取心、肝、脾、肺、肾、脂肪、脑、肠、肌肉、睾丸和淋巴结; 于给药后 8, 24, 48, 72 h 取肝、肾和

肺. 取 1 g 组织, 加入 1/15 mol · L<sup>-1</sup> pH 7.2 磷酸缓冲液 4 ml, 制备匀浆, 离心 (11 000 × g, 15 min), 取上清液 2 ml, 加入内标 10 μl, 按上法提取测定. 给药后 8 h 各组织中药物含量见 Fig 2, 不同时间肝、肾和肺组织中药物含量见 Fig 3.

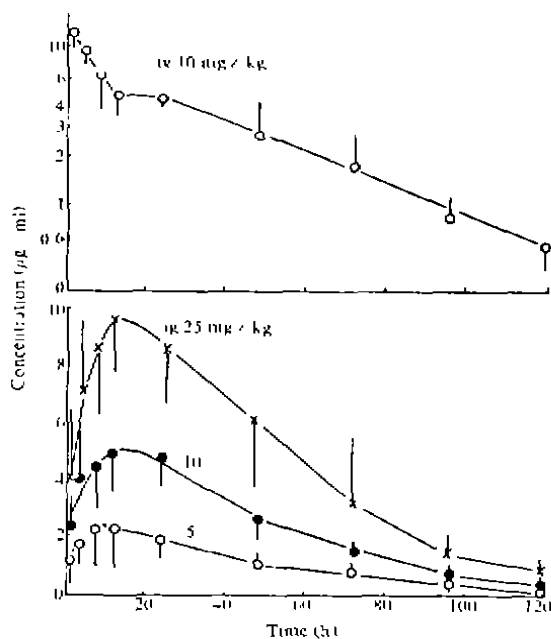


Fig 1. FCE 22250 levels in rat plasma,  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm SD$ .

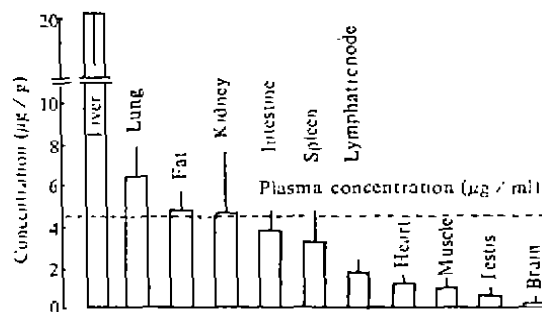
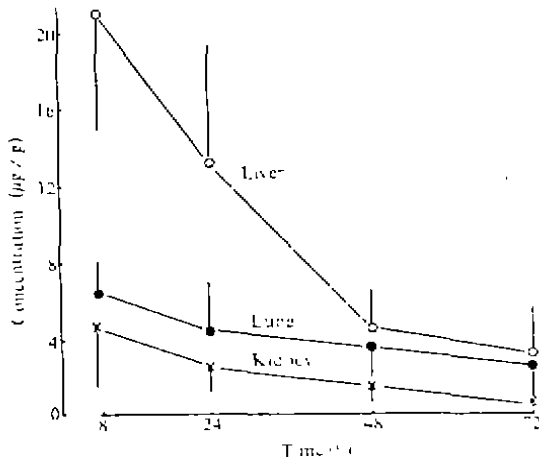


Fig 2. Tissue distribution of FCE 22250 8 h after ig 10 mg · kg<sup>-1</sup> in rats,  $n=5$ ,  $\bar{x} \pm SD$ .

4 胆汁中药物排泄 大鼠分 3 组, 每组 5 只, ip 氨基甲酸乙酯 1 g · kg<sup>-1</sup> 麻醉, 胆管插管, 尾 iv FCE 22250 5, 10 和 25 mg · kg<sup>-1</sup>. 分段收集各时间内的胆汁. 取胆汁 0.5 ml, 加入 pH 4.0 醋酸缓冲液 1 ml, 加入内标, 用乙醚: 正己烷 (85:15) 混和溶剂提取 (5 ml × 2), 离心, 45℃ 氮气流下蒸干, HPLC 测定, 结果见 Fig 4. 三组剂量 24 h 内累积排药量占给药量的 7.9 ± 1.1% (5 mg · kg<sup>-1</sup>), 8.0 ± 1.2% (10 mg · kg<sup>-1</sup>), 7.9 ± 2.2% (25 mg · kg<sup>-1</sup>).

5 粪、尿中药物排泄 大鼠 3 组, 每组 5



**Fig 3. Distribution of FCE 22250 in liver, lung and kidney 8-72 h after ig 10 mg · kg<sup>-1</sup> in rats, n=5,  $\bar{x} \pm$  SD.**

只, ig FCE 22250 5, 10 和 25 mg · kg<sup>-1</sup>, 分别置代谢笼中, 分段收集 120 h 内粪便和尿液. 取尿液 2 ml, 加入 HCl 1 mol · L<sup>-1</sup> 2 滴, 内标 10 µl, 按上述方法提取, HPLC 测定. 称取粪便 2 g, 加入 4 ml pH 4.0 醋酸缓冲液浸泡 24 h,

加入内标, 按上法提取测定. 结果见 Fig 4. FCE 22250 从尿中排泄很少, 120 h 累积排泄量占给药量的 1.2 ± 0.6% (5 mg · kg<sup>-1</sup>), 0.9 ± 0.2% (10 mg · kg<sup>-1</sup>), 1.1 ± 0.4% (25 mg · kg<sup>-1</sup>). 三组剂量间尿药排泄率差别无显著性, 该药主要经粪便排泄, 120 h 累积排药量占给药量的 15.3 ± 4.5% (5 mg · kg<sup>-1</sup>), 25.9 ± 1.5% (10 mg · kg<sup>-1</sup>) 和 40.8 ± 6.0% (25 mg · kg<sup>-1</sup>). 粪中药物排泄率随给药剂量增加而增加.

**FCE 22250 的血清蛋白结合率**

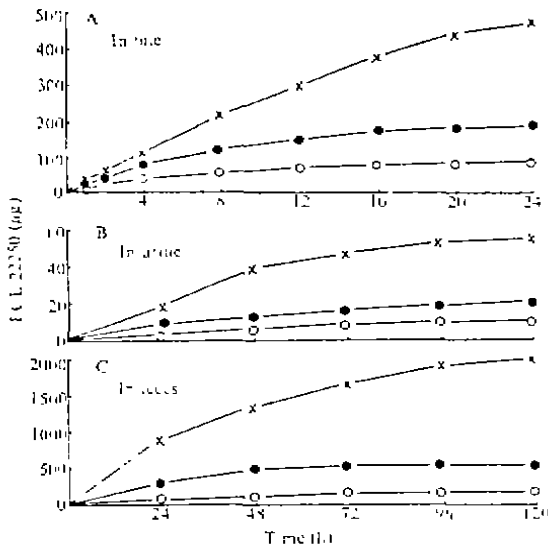
采用微生物杯碟法<sup>(4)</sup>, 所测浓度为药物的游离浓度, 药物蛋白结合率计算公式为<sup>(5)</sup>:

$$\text{结合率} = (\text{配制浓度} - \text{游离浓度}) / \text{配制浓度} \times 100\%$$

FCE 22250 在不同血清中的浓度为: (1) 药物在 pH 7.2 磷酸缓冲液中的浓度为 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 和 1.5 µg · ml<sup>-1</sup>. (2) 药物在混合人全血清及混合大鼠全血清中的浓度为 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 和 15.0 µg · ml<sup>-1</sup>. (3) 药物在 1/3 混合人血清(1 份血清加 2 份缓冲液)中的浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.5, 5.0 和 6.5 µg · ml<sup>-1</sup>.

血清中蛋白含量测定<sup>(6)</sup>, 人为 95.6 g · L<sup>-1</sup>, 大鼠为 84.7 g · L<sup>-1</sup>.

用微生物法测定以上各浓度抑菌圈, 以抑菌圈直径为横坐标, 配制浓度的对数为纵坐标半对数作图, 得四条相平行的在线, 见 Fig 5. 表明 FCE 22250 在实验浓度范围内的蛋白结合率与药物浓度无关, 但随血清中蛋白含量的减少而下降. 如果任意作与横坐标垂直的直线分别交于 C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> 四点(C 表示浓度)则 C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>, C<sub>1</sub>/C<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>/C<sub>4</sub> 均是不变的恒值, C<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>=0.161, C<sub>1</sub>/C<sub>3</sub>=0.099, C<sub>1</sub>/C<sub>4</sub>=0.038. 此比值是 FCE 22250 在不同血清中的游离率即 1-结合率, 则 FCE 22250 在 1/3 人血清中的蛋白结合率为 83.9%, 大鼠血清蛋白结合率为 90.1%, 人全血清蛋白结合率为 96.2%.



**Fig 4. Cumulative excretion of FCE 22250 after A) iv B) & C) ig 5 (○), 10 (●) and 25 (x) mg · kg<sup>-1</sup> in rats, n=5.**

**DISCUSSION**

由于胆汁、尿、粪便样品杂质多, 不宜用

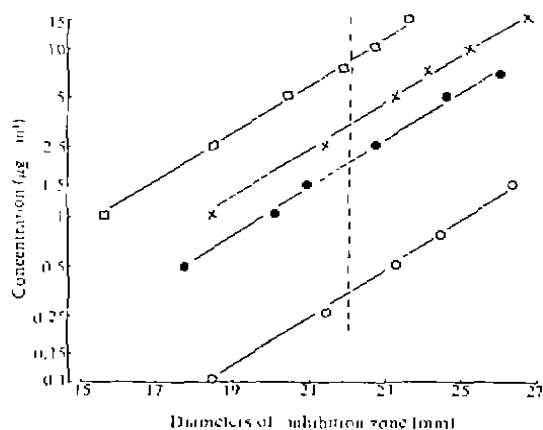


Fig 5. Standard curves of FCE 22250 in buffer (O), human serum + buffer (1+2 vol) (●), rat serum (x) and human serum (□).

二氯甲烷作提取溶剂,故改用乙醚:正己烷(85:15)混合溶剂,以用二氯甲烷提取的血浆标准曲线测得值对乙醚-正己烷提取的血浆标准曲线测得值作图,进行直线回归,方程斜率约为1,线性相关系数  $r=0.9997$ ,说明两种提取方法的数据是接近的。各生物样品提取回收率中,组织和粪中药物回收率偏低(54-64%),其它均可(104-108%)。CV%符合要求。

大鼠 ig FCE 22250 5, 10, 25 mg · kg<sup>-1</sup>, 血药浓度经时变化趋势相似,符合一级动力学过程。该药在体内作用维持时间长久,120 h 后仍能测到血浓度,显示了其长效性特点。

Iv 给药后的 12-24 h 有一“稳态”过程,可能与药物分布和药物肠肝循环有关。此现象与 Assandri 等<sup>(7)</sup>测定利福喷丁大鼠 iv 血药浓度变化趋势相似。本实验 FCE 22250 iv 给药消除半衰期 33 h,较 ig 长(24-26 h),原因尚不清楚。

FCE 22250 在组织中分布广泛,以肝组织含量最高,其次为肺、脂肪、肾、肠、脾、淋巴结、心、肌肉、睾丸,脑最低。在肺组织中

有较高含量,有利于肺结核的治疗。

用微生物法测得 FCE 22250 人血清蛋白结合率为 96.2%,其蛋白结合率在本实验条件下不受药物浓度的影响,但与血清中蛋白含量有关。考虑到用微生物方法测定药物蛋白结合率时,在形成抑菌圈之前,其游离药物不断扩散使结合药物不断解离,有可能使药物蛋白结合率的测定值偏低,因此该药在体内的蛋白结合率可能更高。

由于 FCE 22250 具有抗菌作用强,蛋白结合率高,生物利用度好,组织分布广,体内作用维持时间长久等特点,很有希望成为长效抗结核药物。

ACKNOWLEDGMENTS 力弘、王沛松、孔瑞雪、詹红、葛祥月、施晓等本院毕业生参加部分工作。刘德林副主任技师给予 HPLC 技术指导。

REFERENCE

- 1 Marsili L, Franceschi G, Ballabio M, et al. Novel rifamycins. IV. 3-aminomethylazino-methylrifamycins, a new class of rifamycins, endowed with remarkable antibacterial activity. *J Antibiot* 1984; 37 : 1209
- 2 Bruna CD, Ungheri D, Sebben G, Sanfilippo A. Laboratory evaluation of a new long acting 3-azinomethylrifamycin FCE 22250. *J Antibiot* 1985; 38 : 779
- 3 Yang XY, Wang JP, Zhu M, Li L. Pharmacokinetic studies on rifapentine. *Acta Acad Med Shanghai* 1990; 17 : 139
- 4 Duan LS, Liu SM, Zhang CY, Bi SW, Ou-Yang K. Pharmacokinetic studies of rifapentine. *Chin J Clin Pharmacol* 1988; 4 : 94
- 5 Wang F, Gu YM, Chang MF, et al. The serum protein binding of 37 antibiotics. *Chin J Antibiot* 1983; 8 : 86
- 6 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193 : 265
- 7 Assandri A, Ratti B, Cristina T. Pharmacokinetics of rifapentine, a new long lasting rifamycin, in the rat, the mouse and the rabbit. *J Antibiot* 1984; 37 : 1066