

奥拉西坦在大鼠和小鼠的药代动力学研究

刘昌孝*, 顾以保, 李全胜

(国家医药管理局天津药物研究院, 天津药物动力学与临床药理研究室, 天津 300193)

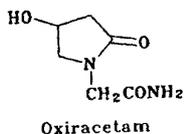
摘要 目的: 研究奥拉西坦(ORC)在大鼠和小鼠的药代动力学。方法: 采用 HPLC 法测定生物样品中 ORC 浓度, 在大鼠和小鼠进行其药代动力学、吸收、分布、排泄试验。结果: 大鼠灌胃给 ORC 100, 200 和 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后表明, 本品 po 吸收速率快, 达峰时间短, 药物自血清消除较快。小鼠 1 次 ig 给药 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后, 80% 以上药物在给药后 3 h 内由消化道消失; 药物吸收后能分布到各种组织脏器, 给药后 36 h 累计尿排泄原形药物量约为药物剂量的 80%; 蛋白结合率低, 平均结合率为 10.5%。结论: 奥拉西坦是一吸收快、消除快, 主要以原形药物由尿排泄, 蛋白结合率低的药物。

关键词 奥拉西坦; 药代动力学; 蛋白结合率

奥拉西坦 (oxiracetam, ORC) 是一新的环 GABA 类促智药, 化学名为 4-羟基-2-酮-1-吡咯酰胺 (4-hydroxy-2-oxo-1-pyrrolidine acetamide)。研究表明, 它能提高学习速度, 促进和增强记忆, 对脑功能障碍有一定的改善作用^[1,2], 它促进脑代谢, 对磷酸胆碱和磷酸乙酰醇胺的合成的促进作用强于吡拉西坦 (piracetam)^[3]。ORC 在动物的药代动力学研究报告至今未见公开发表, 仅在 Nicolaus 所写的一篇综述中提到一内部报告用¹⁴C 标记的奥拉西坦进行动物吸收、分布和排泄的结果, 认为它口服吸收良好, 能分布于所有脏器组织, 主要由尿以原型药物排泄^[1]。为了认识本品的动物药代动力学特点, 我们用 HPLC 方法在大鼠和小鼠进行了本项目研究。

材料和方 法

药品和试剂 奥拉西坦 由本院合成一室合成并提供, 其化学结构式为:



内标物 戊巴比妥, Serva 公司生产。甲醇分析纯, 天津化学试剂二厂产品。高氯酸: 分析

纯, 天津化学试剂二厂产品; 超纯水: 用 Millipore 超纯水器制备; 生物样品预处理柱: C₁₈ Bond Elut 小柱, 美国分析化学国际公司出品; 代谢笼: 意大利 Basile 公司出品; 蛋白结合透析器: 参考美国产品设计。

动物 Wistar 大鼠, 体重 150 ~ 200 g, ♀ ♂兼用, 由本院动物室繁殖和供应, 以禁食过夜的大鼠 ig 给药。

昆明种小鼠, 体重 18 ~ 22 g, ♀ ♂兼用, 由本院动物室繁殖和供应, 以禁食过夜的小鼠 ig 给药。

分析测试系统 日本 Shimadzu 公司 LC-6A 型高效液相色谱仪, 配以全自动 SIL-6A 进样器, CTO-6A 柱保温装置, SDP-6A 紫外检测器, CR3A 色谱数据处理系统, 各部分由 SCL-6A 系统控制器控制分析过程。色谱条件: 色谱柱 ODS 250 mm × 4.6 mm ID 不锈钢柱; 柱温: 55 °C; 流动相: 0.08 mol·L⁻¹ HClO₄-甲醇 30: 70; 流速: 0.5 ml·min⁻¹; UV 220 nm 检测; 灵敏度 0.04 AUFS。

生物样品测定处理程序 取血清或组织匀浆离心后的上清液或尿液 0.5 ml, 加甲醇 1.5 ml, 混合后 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 沉淀蛋白, 吸取上清液用 C₁₈ 预柱净化, 收集净化样品, 取 1.0 ml, 加入内标物戊巴比妥甲醇溶液 (含内标物 50 μg), 氮气挥干, 加流动相振荡溶解, 离心沉淀后取上清液转移至微量样品中, 进行 HPLC 全自动分析。以样品与内标物峰面积比计算血清中奥拉西坦的浓度。

药代动力学实验 实验设 100, 200 和 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个剂量组, 药物配成水溶液, 供大鼠 ig

收稿日期: 1997-11-16

基金项目: 国家“七·五”攻关项目(75-63-01-17)

* Tel: (022) 27381329, Fax: (022) 27387536, E-mail: LCX @ public.tpt.tj.cn

给药($10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$),于给药后不同时间采血,收集于试管内,离心分离出血清, $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存,每一时间点用 5 只大鼠,分别测定各鼠的血清药物浓度。

吸收、分布、排泄实验

(1) 口服吸收 小鼠 i_g 给奥拉西坦水溶液,剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (一般动物实验治疗剂量),于给药后 15, 30 min, 1, 3, 5, 7 h 处死动物,每时间点 5 只小鼠,取出自食道至直肠全部消化道,用蒸馏水冲洗净消化道外血迹后,转移到蒸馏水 25 ml 中,剪开全部消化道,在此蒸馏水中洗出内容物,取部分洗出液,离心分离出上清液,取上清液 0.5 ml,按拟定的分析测试程序,用 HPLC 测定消化道内未吸收的药量,每一时间点测试 5 只小鼠。

(2) 分布 小鼠 i_g 奥拉西坦水溶液,剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (一般动物实验治疗剂量),于给药后 1 h 处死动物,取出脑、心、肝、脾、肺、肾、胃、肠、肌肉、脂肪、睾丸或卵巢等组织脏器各 100 mg,分别加甲醇 2.0 ml 制成组织匀浆,然后离心沉淀,取上清液,按拟定的分析测试程序,用 HPLC 测定各组织的药物浓度,同时以不给药的正常动物的相应组织脏器制成匀浆作空白对照。各组织脏器分别取自 5 只动物进行测定。按同法进行给药后 3 和 7 h 各组织的药物分布试验。

(3) 排泄 小鼠 i_g 奥拉西坦水溶液,剂量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。小鼠于给药前放入有自动分离尿粪功能的代谢笼中,收集 2 h 正常空白尿和粪作对照,给药后收集 0~4, 4~8, 8~12, 12~24, 24~32, 32~36 h 的尿液,每次收集时,用少许蒸馏水滴洗收集漏斗,至总量 10 ml,取 0.5 ml,加甲醇 1.5 ml,振荡、离心,然后取离心上清液,依上述方法处理,用 HPLC 法测定尿中奥拉西坦含量。将各时间段收集的粪制成匀浆,用上法制备测定液,用 HPLC 法测定粪中奥拉西坦含量。

蛋白结合试验 平衡透析池装上经 pH 7.4 磷酸盐缓冲液处理过的透析膜。透析池一侧注入奥拉西坦及 1% 人血浆蛋白溶液 10 ml (用 pH 7.4 缓冲液配制),另一侧注入 pH 7.4 磷酸盐缓冲液 10 ml,然后将透析池于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 48 h,用 HPLC 法测定药物浓度。试验用 50, 100 和 $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 3 种浓度,每一浓度 3 个透析池。用加入到蛋白液中的药

物总量[$A(t)$]和总游离药物量[$A(f)$]由下式计算蛋白结合率 (plasma protein binding ratio, PPBR %)。

$$\text{PPBR} \% = \frac{A(t) - A(f)}{A(t)} \times 100 \%$$

式中 $A(t) = C_t \times V_1$, $A(f) = C_f \times (V_1 + V_2)$, C_t 为透析前蛋白液中的药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), C_f 为平衡时的游离药物浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), V_1 为透析池蛋白液一侧的容积 (10 ml), V_2 为透析池缓冲液一侧的容积 (10 ml)。

数据分析 所有试验数据的测定值均以均值和标准差表示 ($\bar{x} \pm s$)。血药浓度数据用 3P87 实用药代动力学计算程序在计算机上处理,获得各项药代动力学参数。

结 果

1 生物样品中奥拉西坦测定方法的认证

色谱图 在本文色谱条件下,奥拉西坦与内标能较好地分离 (图 1)。基线噪音小,符合实验要求,奥拉西坦保留时间 $RT = 3.7 \text{ min}$,内标保留时间 $RT = 5.3 \text{ min}$ 。

校正曲线 血清药物浓度在 1, 5, 25, 50, 100 及 $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 时,经依法处理样品,得浓度对峰面积比呈线性回归方程: $Y = 0.03097 + 0.00859X$ ($r = 0.9978$)。

灵敏度、回收率和精密度测定 按测定效应 3 倍噪音计算本法测定的最低检测量为 $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 血清。在 $1 \sim 150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 浓度范围内,回收率平均为 96.81%。以 5, 25 和 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 测定其日内、日间 RSD 均小于 10%,符合新药药代研究的浓度测定要求。

2 3 种剂量 i_g 给药的药代动力学

血清奥拉西坦 (ORC) 浓度 大鼠 i_g ORC 100, 200 和 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 种剂量后不同时间的血清药物浓度-时间 ($c-t$) 曲线见图 2。结果表明本品 i_g 吸收快,给药后 0.25 h (15 min) 即可测得一定量的药物。3 种剂量的不同浓度的数据比较可见在相同时间的药物浓度随剂量的增加而增加。 i_g 吸收的血清药物浓度的峰值时间也一致,测定峰值时间为 1.5 h。

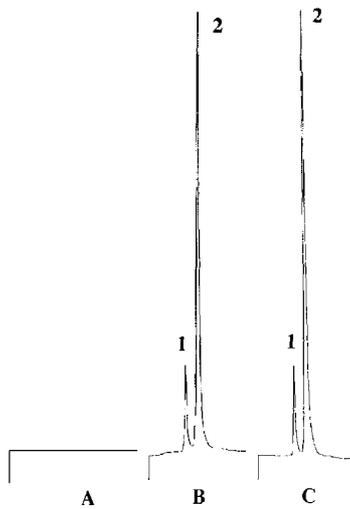


Fig 1 HPLC chromatogram of oxiracetam and internal standard (IS). A. Blank serum; B. Oxiracetam and IS in water; C. Oxiracetam and IS in serum. 1. Oxiracetam; 2. IS.

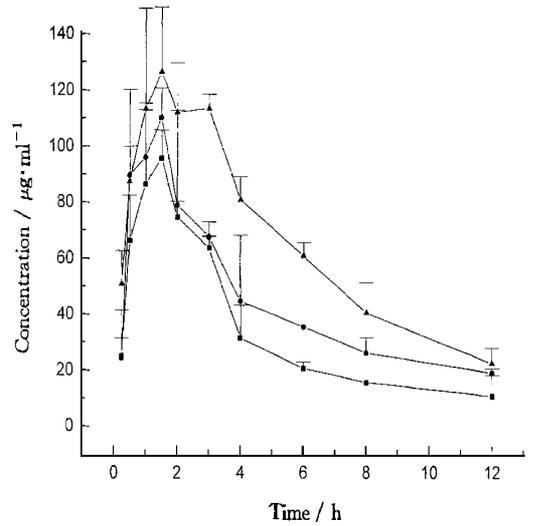


Fig 2 Concentration-time curve of oxiracetam in serum after single oral dose of the drug in rats ($n = 5$). \blacksquare — \blacksquare 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; \bullet — \bullet 200 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; \blacktriangle — \blacktriangle 400 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

药代动力学参数计算结果 $c-t$ 数据用中国药理学学会数学药理学会的 3P87 实用药代计算程序处理, 自动进行算法、模型、权重选择, 拟合的 $c-t$ 曲线符合口服给药一室模型, 选择最佳拟合条件进行 $c-t$ 曲线拟合, 在拟合 $c-t$ 曲线后自动给出一级和二级药代动力学参数(表 1)。本品大鼠 ig 给药吸收快, 吸收速率常数较大, K_a 在 2 h^{-1} 以上, 吸收相半衰期短, $T_{1/2ka}$ 小于 0.36 h , 达峰时间短, T_{peak} 在 1.41 h 之内, 消除半衰期 $T_{1/2ke}$ 为 $3\sim 4\text{ h}$ 。 V_d 值均小于 $2.7\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。 CL 值在 $0.45\sim 0.24\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。 $MRT(0-t)$ 在 4 h 左右。

药物自消化道的消失 小鼠 ig ORC $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 不同时间测定消化道内残留药量, 观察药物自消化道消失。从试验结果可见 ORC 在小鼠 ig 给药很快自胃肠道消失, 给药后 0.5 h 仅从消化道回收到给药量 40% 的药物, 3 h 约回收到 20% 的药物。

组织分布 小鼠 ig 给药奥拉西坦 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后 1 和 3 h 各组织的药物含量测定结果如表 2 所示。实验结果表明, 奥拉西坦能分布于所试验的组织脏器, 含药量由高到低依次为心、肝、肾、肌肉、脑、脾、肠、胃、睾丸、脂肪、肺、卵巢, 在相同时间, 药物在胆汁中的浓度均低于血清药物浓度。给药后 7 h 仅从血液和一些血流充足的组织测到药物外, 多数组织的浓度都低于测定灵敏度。

Tab 1 Pharmacokinetic parameters of oxiracetam in rats after single ig dose of the drug

Parameter	Dose/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		
	400	200	100
$A / \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	167.89	113.84	94.45
K_e / h^{-1}	0.17	0.18	0.22
K_a / h^{-1}	1.94	6.34	4.86
T_{lag} / h	0.04	0.21	0.18
$T_{1/2ka} / \text{h}$	0.36	0.11	0.14
$T_{1/2ke} / \text{h}$	4.05	3.75	3.18
T_{peak} / h	1.41	0.78	0.85
$C_{max} / \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	121.09	99.41	77.99
$AUC / \mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{ml}^{-1}$	894.11	589.70	414.44
$CL / F_s / \text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.45	0.33	0.24
$V_d / F_c / \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	2.61	1.81	1.11
MRT / h	4.48	4.31	3.38
VRT / h	9.65	10.41	5.78

尿和粪排泄 小鼠 ig ORC $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 收集不同时间区间的尿样, 测定药物浓度, 计算出排泄量, 累积排泄量及排泄率, 结果见表 3。从实验结果可见, ORC ig 吸收以后主要由尿排泄, 在一次用药后 24 h 内一半以上的药物由尿排泄, 36 h 内 80% 以上的药物由尿排泄。在各时间段粪中测不到原形药物。

蛋白结合率 蛋白结合率的测定结果见表 4。在 $50\sim 200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度范围内, ORC 的蛋白结合率均在 20% 以下, 平均结合率为 $(10.5\pm 4.1)\%$, 表明本品蛋白结合率极低。

Tab 2 Distribution of oxiracetam in mice after single ig dose of 100 mg·kg⁻¹ (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

Sample	Concentration/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	
	1 h	3 h
Heart	98.19 ± 32.19	37.72 ± 10.27
Lung	13.11 ± 6.64	3.87 ± 1.11
Liver	73.92 ± 19.96	29.91 ± 8.08
Kindeg	44.97 ± 9.36	40.78 ± 9.55
Stomach	25.48 ± 14.38	14.21 ± 4.66
Intestine	38.26 ± 21.78	23.49 ± 5.94
Spleen	39.21 ± 17.60	27.00 ± 7.94
Muscle	42.31 ± 9.32	5.78 ± 2.52
Fat	14.20 ± 10.05	ND
Brain	41.35 ± 28.24	22.53 ± 14.25
Ovary	6.48 ± 0.77	ND
Testis	24.35 ± 4.70	2.98 ± 1.17
Bile	19.79 ± 4.98	13.63 ± 5.39
Serum	30.94 ± 3.13	16.68 ± 6.21

ND: not determined.

Tab 3 Urine excretion of oxiracetam in mice after single ig dose of 100 mg·kg⁻¹ (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

Time / h	Amount excreted / μg	Cumulative amount / μg	Excretion / %*
0 ~ 2	210 ± 31	210 ± 31	10.5
2 ~ 4	88 ± 3	298 ± 33	14.9
4 ~ 8	230 ± 3	529 ± 33	26.4
8 ~ 12	336 ± 2	864 ± 35	43.2
12 ~ 24	313 ± 54	1178 ± 86	58.9
24 ~ 32	351 ± 2	1263 ± 224	63.2
32 ~ 36	203 ± 4	1556 ± 173	77.8

* Per cent excretion = (the cumulative amount/amount to drug given to mice) × 100%. 2 mg of drug was orally given to each mouse (20 g body weight).

Tab 4 Protein binding of oxiracetam at 50 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in plasma protein (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Dose / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Ct / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Cf / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Binding / %
50	20.7	17.2	
	22.1	11.6	14.2 ± 2.9
	21.6	13.6	
100	42.5	15.0	
	45.4	9.2	10.7 ± 3.8
	46.1	7.8	
200	94.1	5.9	
	92.3	7.7	6.6 ± 1.0
	93.9	6.1	
Mean value			10.5 ± 4.1

Ct: total drug concentration; Cf: free drug concentration.

讨 论

奥拉西坦是一水溶性药物, 很难用有机溶剂从生物样品中提取分离出来供 HPLC 分析。国外文献报告测定其浓度的方法有 3 种: 放射性同位素¹⁴C 标记法^[1]; 柱前衍生化 HPLC 法^[4]; 柱切换法^[5]。在试验中我们考虑到国内工作条件, 建立了生物样品经甲醇沉淀蛋白, 固相萃取预柱分离内源性物质, 再用极性大的酸性流动相通过 C₁₈ 分析柱进行 HPLC 分离和定量的方法。此方法经过认证证明分析生物样品中的奥拉西坦, 具有前处理简单、分析灵敏度高、重现性好的特点。用本法试验的结果能反映药物在动物体内的变化。

本实验采用 100, 200 和 400 mg·kg⁻¹ ig 给药进行奥拉西坦在大鼠的药代动力学研究。研究结果表明本品的体内药代动力学过程属于一级一室动力学过程; 消除半衰期与剂量无关, C_{max} 和 AUC 随剂量增加而增加。根据药代动力学参数分析, 认为奥拉西坦有口服后自胃肠道消失迅速、自血液消除较快、分布容积较小等药代动力学特征。本品为水溶性化合物, 这些药代动力学特征可能与本品的这一物理性质有关。

奥拉西坦在小鼠吸收、分布、排泄试验证明本品口服吸收良好, 一次给药后 3 h, 给药剂量有 80% 从消化道中消失, 由于本品主要以原形药物形式由尿排泄, 能从尿中回收 80% 原形药物, 因此给药量的 80% 由消化道消失, 可以推测其消失量主要为药物被吸收入血液循环的药量, 而药物在消化道代谢和破坏的可能性并不明显。由于其水溶性好而能较快地分布到各组织脏器, 尤以血流充沛的心、肝、肾含药量高。本品口服后, 主要以原形药物的形式由尿排泄, 在 36 h 内约有给药量 80% 的原形药物由尿排泄。这一排泄特点与人体结果^[4]一致, 并不存在种属差异。

参 考 文 献

- 1 Nicolaus BJR. Chemistry and pharmacology of nootropics. *Drug Dev Res*, 1982, 2: 463
- 2 Soldatos CTM. CNS effects of ISF2522, a new nootropic (a phase I safety and CNS-B efficacy study with quantitative pharmac-ECG and pharmac-psychology study). *Curr Ther Res*, 1979, 26: 525
- 3 Trovarella G. Biochemical studies on the nootropic drug, oxiracetam in brain. *Clin Neuropharmacol*, 1986, 9(Suppl 3): S56

- 4 Perucca E. Pharmacokinetics of oxiracetam following intravenous and oral administration in healthy volunteers. *Eur J Drug Matab Pharmacokinet*, 1984, 3: 327
- 5 Lecaillon JB. Determination of oxiracetam in plasma and urine by column-switching high performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1989, 497: 223

PHARMACOKINETICS OF OXIRACETAM IN RATS AND MICE

Liu Changxiao(Liu CX) , Gu Yibao(Gu YB) and Li Quansheng(Li QS)

(*Tianjin Institute of Pharmaceutical Research ,
The State Pharmaceutical Administration of China , Tianjin 300193*)

ABSTRACT **AIM:** To study the pharmacokinetics, absorption, distribution and excretion of oxiracetam (ORC) in rats and mice. **METHODS:** The drug concentration was determined by using an HPLC system with pre-treatment column for biological samples. **RESULTS:** The concentration-time curves in rat serum showed an open one-compartment model after ig doses of 100, 200 and 400 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The half-life of absorption phase ($T_{1/2ka}$) and peak time (T_{peak}) were found to be 0.11 ~ 0.36 h and 0.79 ~ 1.41 h, respectively. The elimination half-life ($T_{1/2ke}$) and mean residence time (MRT) were 3.18 ~ 4.05 h and 3.38 ~ 4.18 h, respectively. The mouse test with ig dose of 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ showed that 80% of the administered dosage was eliminated from the gastro-intestinal tract 3 h after administration. One hour after dosing, ORC was widely distributed to various tissues and the tissue drug levels from high to low were heart, liver, kidney, brain, muscle, spleen, intestine, stomach, testis, fat, lungs and ovary. ORC was excreted by about 80% of the administered dosage from urine within a 36 h period. Plasma protein binding ratio of ORC was found to be 10.5% at the concentration range of 50 ~ 200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. **CONCLUSION:** ORC is well absorbed when given orally and rapidly eliminated via the urine. The protein binding was found to be low.

KEY WORDS oxiracetam; pharmacokinetics; plasma protein binding ratio