

恩诺沙星及其代谢物在 1 日龄鸡体内的药动学研究

郑育基^{1,2}, 全家兴^{1,2}, 霍皓远^{1,2}, 沈佳晨^{1,2}, 卜仕金^{1,2*}

(1.扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 2.江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009)

摘要:研究不同剂量恩诺沙星(ENR)及代谢产物环丙沙星(CIP)在雏鸡体内药动学特征。240 只刚出壳黄羽肉鸡分 2 个剂量组, 20 mg/kg 和 40 mg/kg 皮下注射恩诺沙星, 高效液相色谱法测定药物浓度, 药时数据用 WinNolin8.0 软件处理非房室模型分析。结果表明, 增加剂量后恩诺沙星以下药动参数发生变化: 消除半衰期($t_{1/2}$)由 7.37 h 降至 6.53 h, 达峰时间(T_{max})由 8 h 降到 4 h, 最大血药浓度(C_{max})由 3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至 4.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 药时曲线下面积(AUC_{last})由 40.45 h \cdot $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增至 78.2 h \cdot $\mu\text{g}/\text{mL}$, 平均滞留时间(MRT_{last})由 8.6 h 增至 11.42 h; 消除率(CI)分别为 0.49 L/h/kg 和 0.5 L/h/kg, 表观分布容积($V_{z,obs}$)分别为 5.22 L/kg 和 4.77 L/kg。不同剂量恩诺沙星给药后都表现出分布迅速、广泛的特点, 代谢产物环丙沙星产生与消除迅速。

关键词: 高效液相色谱; 恩诺沙星; 鸡; 药动学

DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2019.11.011

中图分类号: S831.7

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2019)11-0059-04

自萘啶酸从 1962 年发现以来, 喹诺酮类药物已经发展到第 4 代^[1]。通过对基本结构进行不同的修饰, 药物的抗菌活力、抗菌谱和生物安全性得到很好的改善^[2-3], 在人医和兽医临床都有很广泛的应用^[4-5]。恩诺沙星是第 3 代喹诺酮药物中的动物专用抗生素, 敏感菌包括大肠埃希菌属、沙门菌属、嗜血杆菌属、铜绿假单胞菌和克雷伯菌等, 特别对支原体和衣原体也有效^[6-7]。

家禽养殖过程中常感染各种病原体, 如鸡白痢、鸡伤寒、鸡副伤寒和鸡支原体等对雏鸡危害严重^[8]。生产上常在疫苗或稀释液中添加抗生素来预防细菌感染^[9], 目前育雏期间批准用于雏鸡的唯一抗菌药物是头孢噻唑注射液种类单一。恩诺沙星配合马立克疫苗进行皮下注射给药具有良好的应用前景, 有望预防和治疗雏鸡细菌垂直感染。本试验通过前期的药动学研究为临床用药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验用动物 刚出壳的健康黄羽肉鸡购自江苏八达畜禽公司; 无药物添加饲料扬州振翔禽业有限公司产品, 无限量, 每日加料 2 次, 清粪 1 次, 每天 24 h 自由饮用干净的自来水。

1.1.2 药品 恩诺沙星与环丙沙星标准品, 纯度均

为 99.5%, 批号分别 H0081505 和 H0101310, 中国兽医药品监察所提供; 恩诺沙星注射液(100 mL: 20 g), 批号 201710002, 中升挑战生物科技公司产品。

1.1.3 试剂 乙腈和甲醇均为色谱纯, 美国天地有限公司产品; 85% 浓磷酸, 德国 CNW 公司产品; 氢氧化钠、三乙胺均为分析纯, 国药集团产品; 水为超纯水。

1.1.4 仪器 Waters 2695 高效液相色谱仪, 配 Waters2475 荧光检测器, 美国 Waters 公司产品; 色谱柱 Agilent HP-C18(4.6 \times 250 mm, 5 μm), 美国安捷伦公司产品; UPH-11-20T 纯水仪, 四川优普超纯科技有限公司产品; KQ-250B 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司产品; 氮吹仪, 美国 Organomation 公司产品; WH-3 漩涡混合器, 上海沪西分析仪器厂有效公司产品; BS124S 电子分析天平, 德国赛多利斯天平公司产品; 5810R 型高速冷冻离心机、移液枪, 德国 Eppendorf 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 给药与血样采集 240 只开食后体重约 50 g 雏鸡随机分成 2 个剂量组, 分别经一侧颈部皮下注射 1 mg/只或 2 mg/只(分别相当于 20 mg/kg 和 40 mg/kg 体重)。给药前采集空白血液(0 时), 2 组分别于 5 min、15 min、30 min、45 min 和 1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、12 h、16 h、24 h、36 h、48 h、4 d、8 d、12 d 和 15 d

收稿日期: 2018-11-22

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-41)

作者简介: 郑育基(1992-), 男, 广东潮州人, 硕士研究生, 主要从事兽医药理学及毒理学研究。* 通讯作者

各时间点心脏采血 1.5 mL,每个时间点扑杀 6 只雏鸡,采集 6 份血样分装于抗凝管中。3 000 r/min 离心 10 min 分离出血浆,于-20℃冻存,待测。

1.2.2 样品处理 准确吸取 0.2 mL 新鲜或冻融的血浆样品于 1.5 mL 刻度离心管中涡旋 1 min 混匀后静置 10 min,加入 1 mL 乙腈,涡旋振荡 3 min,12 000 r/min 离心 10 min。上清液移至 10 mL 刻度离心管中,40℃氮吹至干流动相(初始比例)溶解,涡旋振荡 1 min,2 000 r/min 离心 1 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,供 HPLC 分析。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:Agilent HP-C18(4.6×250 mm,5 μm);流速:0.8 mL/min;柱温:35℃;进样量:10 μL;流动相:0.05 mol/L 磷酸三乙胺(PH=3.0),乙腈(82:18,V/V);荧光检测器:激发波长 278 nm、发射波长 450 nm。

1.2.4 标准溶液配制及标准曲线的绘制 准确吸取混合标准工作液流动相稀释,分别制得 0.05、0.5、1、4、6、10 mg/L 混合标准溶液系列浓度。乙腈抽提,氮气吹干流动相复溶,过 0.22 μm 有机滤膜上机检测。

1.2.5 检测限、定量限回收率和精密度 空白鸡血浆中加入适量的标准溶液,制得 0.005、0.01、0.05、

0.1mg/L 添加浓度,振荡混匀,每个浓度重复 6 次。取信噪比 $S/N \geq 3$ 时样品的最低浓度为检测限(LOD),以信噪比达到 $S/N \geq 10$ 时样品的最低浓度为最低定量限(LOQ)。LOD 和 LOQ 分别为 0.01 mg/L 和 0.05 mg/L。恩诺沙星和环丙沙星回收率在 87.26%~106.36%,日内精密度与日间精密度的变异系数小于 8.97%。

1.2.6 数据处理 Win Nolin 8.0.软件处理血浆中恩诺沙星及其代谢物环丙沙星的药时数据,采用非房室模型分别计算各个药动学参数。

2 结果

2.1 恩诺沙星、环丙沙星的线性方程

恩诺沙星与环丙沙星色谱峰面积(S)分别与其药物浓度(C)作线性回归,绘制标准曲线,求得各自的标准曲线的回归方程和相关系数,药物在 0.05 mg/L~10 mg/L 浓度范围内,色谱峰有良好的线性关系(表 1)。

2.2 恩诺沙星、环丙沙星在雏鸡体内血药浓度

恩诺沙星在雏鸡体内可部分代谢为环丙沙星并维持一定浓度,恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星的实测药物浓度见表 2,药时曲线见图 1。

表 1 恩诺沙星、环丙沙星标准曲线回归方程和线性范围

Table 1 Linear regression equation and linear range of ENR and CIP

药物 Drugs	线性范围/(mg·L ⁻¹) Linear range	标准曲线回归方程 Linear regression equation	相关系数 Correlation coefficient
ENR	0.05~10	$y = 192\ 513\ 270.7x - 112\ 679.8$	0.999
CIP	0.05~10	$y = 89\ 631\ 925.1x + 36\ 913\ 113.7$	0.999

表 2 血浆中恩诺沙星和环丙沙星浓度($\bar{x} \pm SD, n=6$)

Table 2 Concentrations of ENR and CIP in plasma ($\bar{x} \pm SD, n=6$)

时间/h Time	20 mg/kg		40 mg/kg	
	ENR/(μg·mL ⁻¹)	CIP/(μg·mL ⁻¹)	ENR/(μg·mL ⁻¹)	CIP/(μg·mL ⁻¹)
0.083	1.45±0.25	0	4.14±0.73	0
0.25	1.93±0.45	0	3.66±0.31	0
0.5	1.87±0.33	0	3.15±0.63	0.06±0.07
0.75	1.98±0.33	0	2.67±0.37	0
1	1.54±0.71	0	3.25±0.53	0.07±0.02
2	2.37±0.24	0.06±0.02	3.45±0.6	0.1±0.02
3	2.92±0.42	0.13±0.03	4.27±0.65	0.17±0.04
4	3.51±0.47	0.29±0.04	4.92±0.42	0.22±0.06
6	3.19±0.27	0.41±0.58	4.29±0.34	0.31±0.04
8	3.75±0.49	0.46±0.09	3.85±0.31	0.34±0.05
12	0.91±0.45	0.14±0.01	3.4±0.27	0.54±0.07
16	0.42±0.12	0.08±0.01	2.02±0.36	0.29±0.09
24	0.27±0.05	ND	0.96±0.54	0.11±0.08
36	0.06±0.02	ND	0.2±0.05	ND
48	ND	ND	ND	ND

注:ND 为不可测得。

Note:ND means can't be detected.

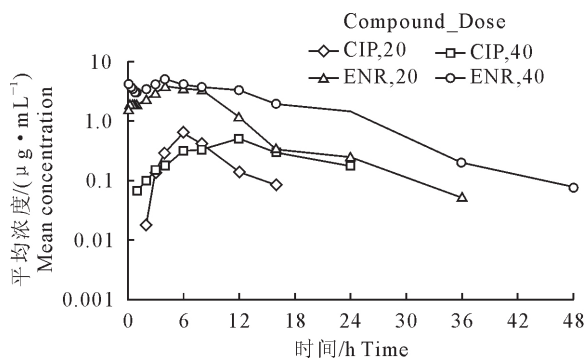


图1 皮下注射 20 mg/kg 和 40 mg/kg 恩诺沙星药时曲线图

Fig.1 Plasma concentration-time curves of ENR after subcutaneous injection (20 mg/kg and 40 mg/kg)

表3 雏鸡皮下给药后恩诺沙星、环丙沙星的药物动力学参数(单剂量皮下注射 20 mg/kg 和 40 mg/kg)

Table 3 Pharmacokinetics parameters of ENR and CIP in chicks following subcutaneous injection(20 mg/kg and 40 mg/kg)

药动学参数 Parameter	单位 Unit	ENR		CIP	
		20 mg/kg	40 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
$t_{1/2}$	h	7.37	6.53	4.23	5.29
T_{max}	h	8	4	8	12
C_{max}	mg/mL	3.75	4.92	0.46	0.54
AUC_{last}	$h \cdot \mu g/mL$	40.45	78.2	3.97	6.66
$AUCIN_{obs}$	$h \cdot \mu g/mL$	40.77	78.95	4.09	7.5
$V_{z_{obs}}$	L/kg	5.22	4.77	29.86	40.75
Cl_{obs}	L/h/kg	0.49	0.5	4.89	5.34
MRT_{last}	h	8.6	11.42	8.71	11.76

和高剂量恩诺沙星给药后 C_{max} 分别为 $3.75 \mu g/mL$ 和 $4.92 \mu g/mL$ 。美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)标准规定恩诺沙星对大多数敏感菌的临界点为 $1 \mu g/mL$, 12 h 低剂量组血药浓度为 $0.91 \mu g/mL$, 高剂量组在 24 h 时血药浓度为 $0.96 \mu g/mL$, 能较好发挥抗菌作用。另外恩诺沙星对革兰阳性菌和革兰阴性菌有呈浓度依赖性的抗菌药后效应(PAE), 药物浓度越大 PAE 时间越长^[13]。

健康雏鸡单剂量皮下注射恩诺沙星, 从表 2 中可以看出增加剂量后 T_{max} 由 8 h 降到 4 h, C_{max} 由 $3.75 \mu g/mL$ 增至 $4.92 \mu g/mL$, AUC_{last} 由 $40.45 h \cdot \mu g/mL$ 增至 $78.2 h \cdot \mu g/mL$, MRT_{last} 由 8.6 h 增至 11.42 h, 药物在不同剂量组雏鸡体内都表现出分布迅速的特点, 并维持较长时间有效浓度; $t_{1/2}$ 由 7.37h 降至 6.53 h, Cl 分别为 $0.49 L/h/kg$ 和 $0.5 L/h/kg$, $V_{z_{obs}}$ 分别为 $5.22 L/kg$ 和 $4.77 L/kg$, 表明药物分布广泛, 消除较慢。代谢产物环丙沙星产生与消除迅速。

综上所述, 低剂量与高剂量给药后恩诺沙星在雏鸡体内分布广泛消除较慢。药动学参数中 C_{max} 、 $V_{z_{obs}}$ 和 Cl_{obs} 差距不大, 表明在低剂量时也能达到较

2.3 恩诺沙星在雏鸡体内药动学参数

WinNolin 8.0. 软件处理血浆中恩诺沙星及环丙沙星的平均血药浓度药时数据, 采用非房室模型分别计算各剂量组药动学参数, 血浆恩诺沙星和环丙沙星的药物动力学参数见表 3。

3 讨论

恩诺沙星对大肠埃希菌、克雷伯杆菌、沙门菌、变形杆菌、绿脓杆菌、嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌、溶血性巴氏杆菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、化脓棒状杆菌等的最小抑菌浓度(MIC)在 $0.008 \mu g/mL \sim 0.750 \mu g/mL$ 范围内, 鸡滑液囊支原体 $0.5 \mu g/mL$ ^[10-12]。恩诺沙星属于浓度依赖性抗菌药, 低

好的抗菌效果, 同时考虑到高剂量可能对雏鸡可以产生不良影响, 建议使用 $20 mg/kg$ 剂量进行皮下注射给药。

参考文献:

- [1] 樊士勇, 周辛波. 关注无氟喹诺酮类药物进展[J]. 临床药物治疗杂志, 2017, 15(9): 91-92.
- [2] Kant R, Singh V, Nath G, et al. Design, synthesis and biological evaluation of ciprofloxacin tethered bis-1, 2, 3-triazole conjugates as potent antibacterial agents [J]. Eur J Med Chem, 2016, 124: 218-228.
- [3] Sedghizadeh P P, Sun S, Junka A F, et al. Design, synthesis, and antimicrobial evaluation of a novel bone-targeting bisphosphonate-ciprofloxacin conjugate for the treatment of osteomyelitis biofilms [J]. J Med Chem, 2017, 60(6): 2326-2343.
- [4] Hu Y Q, Zhang S, Xu Z, et al. 4-Quinolone hybrids and their antibacterial activities [J]. Eur J Med Chem, 2017, 141: 335-345.
- [5] 陈 勤. 氟喹诺酮类药物的禁忌证、不良反应及临床合理用药对策[J]. 医药信息, 2018, 31(19): 145-147.
- [6] 邵莉萍, 张继瑜, 马志勇, 等. 临床常用几种抗菌药物对 HPS 抗菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(33): 113-114.
- [7] 吴海坤, 方炳虎, 时书宁, 等. 恩诺沙星混悬液的研制及其在鸡组织中的残留研究[J]. 动物医学进展, 2010, 31(4): 47-52.
- [8] Wernicki A, Nowaczek A, Urban-Chmiel R, et al. Bacteriophage therapy to combat bacterial infections in poultry[J]. Virol J,

- 2017,14(1):179-181.
- [9] 薛乐全. 抗生素和室温存放时间对马立克疫苗蚀斑计数及免疫效果影响的研究[D]. 山东农业大学, 2010.
- [10] Li J, Hao H, Cheng G, et al. The effects of different enrofloxacin dosages on clinical efficacy and resistance development in chickens experimentally infected with *Salmonella typhimurium*[J]. *Sci Reports*, 2017, 7(1): 1-12.
- [11] 叶建美, 吴康, 吴洪丽, 等. 恩诺沙星抗菌效果及药代动力学研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(23): 5813-5816.
- [12] Kreizinger Z, Grözner D, Sulyok K M, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe[J]. *BMC Vet Res*, 2017, 13(1): 342.
- [13] 范晶晶. 恩诺沙星在鲫鱼体内的药理学及其体外抗菌后效应研究[D]. 上海海洋大学, 2017.

Pharmacokinetics of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in One-day-old Chicks

ZHENG Yu-ji^{1,2}, QUAN Jia-xing^{1,2}, HUO Hao-yuan^{1,2}, SHEN Jia-chen^{1,2}, BU Shi-jin^{1,2}

(1. *Veterinary Medicine College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225009, China*;

2. *Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu, 225009, China*)

Abstract: In order to study the pharmacokinetics of different doses of enrofloxacin and metabolites in chicks, 240 one-day-old chicks were randomly divided into two groups, 20 mg/kg group and 40 mg/kg group, and administrated enrofloxacin by subcutaneous injection. The drug concentration was determined by HPLC. The concentration-time data were processed using WinNolin software and analyzed by the non-compartmental model. The main pharmacokinetic parameters of 20 mg/kg group and 40 mg/kg group were as follows, respectively: $t_{1/2}$ decreased from 7.37 h to 6.53 h, T_{max} decreased from 8 h to 4 h, C_{max} increased from 3.75 $\mu\text{g/mL}$ to 4.92 $\mu\text{g/mL}$, AUC_{last} increased from 40.45 $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ to 78.2 $\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$, MRT_{last} increased from 8.6 h to 11.42 h, Cl was 0.49 L/h/kg and 0.5 L/h/kg, V_z was 5.22 L/kg and 4.77 L/kg. Different doses of enrofloxacin showed rapid and extensive distribution after administration. The metabolite ciprofloxacin was produced and eliminated rapidly.

Key words: HPLC; enrofloxacin; chick; pharmacokinetics