doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.11.06

泰地罗新注射液在藏香猪体内的药物动力学研究

赵 森[1],吴利军[2],邵志勇[2],杨文海[2],陈夏冰[2],陈 洁[2],金尔光[2],何 斌[2*]

(1.青海省海西州动物疫病预防控制中心,青海海西州 817099;2.武汉市农业科学院畜牧兽医研究所,武汉 430208)

[收稿日期] 2018-03-01 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2018) 11-0034-06 [中图分类号]S859.796

[摘 要] 为研究泰地罗新注射液在藏香猪体内的药物动力学特征,了解其在藏香猪体内的吸收、分布、转化及排泄规律,本试验选取 8 头藏香猪,泰地罗新单剂量注射给药(4 mg/kg.bw),不同时间点采集藏香猪血液,利用高效液相色谱法测定血浆中药物浓度。结果表明:泰地罗新注射给药后,泰地罗新在藏香猪体内的药-时曲线符合有吸收三室开放模型,其主要药动学参数:T_{max}为 0.457±0.143 h,C_{max}为 0.759±0.192 μg/mL,$t_{1/2}$为 120.518±10.181 h,AUC 为 22.224±2.641 μg·h/mL。泰地罗新注射给药后,在藏香猪体内吸收迅速,消除较为缓慢,此结论对新兽药的研发和临床合理使用具有一定的指导意义。

[关键词] 泰地罗新;高效液相色谱;藏香猪;药物动力学

Studies on Pharmacokinetics of Tildipirosin Injection in Tibetan Pig

ZHAO Sen[1], WU Li-jun[2], SHAO Zhi-yong[2], YANG Wen-hai[2],
CHEN Xia-bing[2], CHEN Jie[2], JIN Er-guang[2], HE Bin[2*]

(1. *Center for Animal Disease Prevention and Control , Haixi, Qinghai*, 817099, *China*;
2. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary*, *Wuhan Academy of Agricultural Sciences*, *Wuhan* 430208, *China*)

Corresponding author: *HE Bin*, *E-mail*: *hebin*8802@163.*com*

Abstract: The paper mainly aims at exploring characteristic of pharmacokinetics for tildipirosin injection, as well as its regulation of absorption, distribution, transformation and excretion of the tibetan pig, thus providing reference for research and development of new veterinary drug and clinical medication for tildipirosin injection. This study selects 8 tibetan pigs for single dose tildipirosin injection with blood collection at different time points, for determination of drug concentration in plasma by hplc. The results show that vivo drug time curve of tildipirosin in tibetan pig corresponds with absorption three compartment open model after injection of tilipirosin, with their main pharmacokinetics parameters: T_{max} 0.457 +0.143 h, C_{max} 0.759+0.192 g/mL, $t_{1/2}$ 120.518+10.181 h. AUC 22.224+2.641 μg·h/mL. It shows that tildipirosin, injected in tibetan pig, is quickly absorbed but slowly eliminated in tibetan pigs, thus playing a certain guidance role in research and development and clinical rational use of new veterinary drug.

Key words: tildipirosin; HPLC; tibetan pig; pharmacokinetics

作者简介:赵 森,兽医师,从事兽医临床、化验检验研究, E-mail:zhaosen0327@foxmail.com

通讯作者:何 斌。E-mail: hebin8802@163.com

泰地罗新(Tildipirosin,TIP)是一种新型大环内酯类半合成抗菌药,为泰乐菌素的衍生物,其注射液于 2011 年在欧洲被批准生产上市[1];它是一种广谱、高效的抗微生物药物[2],对引起畜禽呼吸道疾病的病原菌,如胸膜肺炎放线杆菌[3]、多杀性巴氏杆菌[4]、支气管败血波氏杆菌[5]、副猪嗜血杆菌[6]、溶血性曼海姆菌[7]等具有特效,是治疗畜禽呼吸道疾病极为理想的药物[8]。目前,在我国正处于新兽药研究阶段,有关其药物动力学的研究报道较少,且未见其在藏香猪体内的药物动力学研究报道,为了解其在藏香猪体内的吸收、分布、转化及排泄规律,本研究建立了泰地罗新高效液相色谱检测方法,研究了其在藏香猪体内的药物动力学特征,为其新兽药的研发和临床使用提供一定的参考。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　试验药品　泰地罗新标准品(批号:T440150,纯度 98.2%)购自美国加拿大 Trc 公司,泰地罗新注射液(批号:1303001,规格 50 mL)由山东齐鲁动物保健品有限公司提供。乙腈、甲醇:色谱级,购自美国 Themo 公司;甲酸、磷酸二氢钾:分析纯,购于国药集团。

1.1.2　试验仪器　美国 Agilent1200 型高效液相色谱仪,自动进样器、紫外检测器,Agilent ZORBAX SB-C18 柱(250 mm×4.6 mm,5μm);TG-16W 高速离心机:长沙湘仪离心机有限公司;电子天平:±0.0001 g,德国赛多利斯公司;XH-B 涡旋混合器:江苏康佳医疗器械有限公司;氮吹仪:N-EVAPTM111 型,美国路易公司。

1.1.3　试验动物　藏香猪,雌雄各半,8 头,体重:15.4±1.2 kg。购于海西州藏香猪养殖户。自由饮水和采食,饲料为不含任何药物的自配日粮,在试验前观察猪群 2 周,试验前 12 h 禁食,自由饮水,试验期间自由采食和饮水。

1.2　试验方法

1.2.1　色谱条件　经过多次试验,确立泰地罗新的高效液相色谱检测条件为:色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);检测波长为 289 nm;流动相为甲醇-乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH = 7.00) = (35 ∶ 30 ∶ 35);流速为 1.0 mL/min;进样量为 20 μL;柱温为(30±0.1)℃。

1.2.2　药物动力学试验设计　根据泰地罗新的推荐使用剂量,本试验 8 头藏香猪以 4 mg/kg.bw 的剂量剂肌内给药。给药后,分别于 0.083、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24、48、72、96、120、144、192、240、288、336、384 h 前腔静脉采血 5 mL,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 ℃冷冻保存,待测定。

1.2.3　血浆样品处理　准确吸取血浆 1.0 mL,分别加入 3.0 mL 乙腈提取 2 次,每次涡旋振荡 1 min,4000 r/min、4 ℃离心 10 min;合并 2 次,取上清液于 10.0 mL 尖底离心管中,45 ℃氮气吹干,再用 100 μL 流动相溶解,涡旋振荡 1 min,4000 r/min、4 ℃离心 10 min,取上清液即为待测样品。

1.2.4　血浆标准曲线的建立　向 8 支 10.0 mL 聚丙烯离心管中各加入 1.0 mL 空白血浆,留一支作空白对照,然后依次加入泰地罗新标准工作液,便得到药物浓度依次为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、2.50 μg/mL 的血浆样品。分别按照泰地罗新血浆样品处理方法处理后,进样分析。以测得泰地罗新的峰面积(A)为横坐标,药物浓度(C)为纵坐标,建立标准曲线,得出泰地罗新回归方程。

1.2.5　方法学验证　取空白血浆 1.0 mL,添加适量泰地罗新标准工作液,使其浓度分别为 2.00、1.00、0.10 μg/mL,按照血浆样品的处理方法处理,进行 HPLC 检测,每个浓度设置 5 个平行,测定日内变异系数;重复检测 5 d,测定日间变异系数;并计算其回收率。

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　方法专属性　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,泰地罗新在色

谱条件下均能与杂质峰良好分离。结果表明,本测定方法简便,杂质峰干扰小、分离度良好,泰地罗新保留时间为 14.2 min,空白血浆和血浆中添加药物色谱图如图 1、图 2。

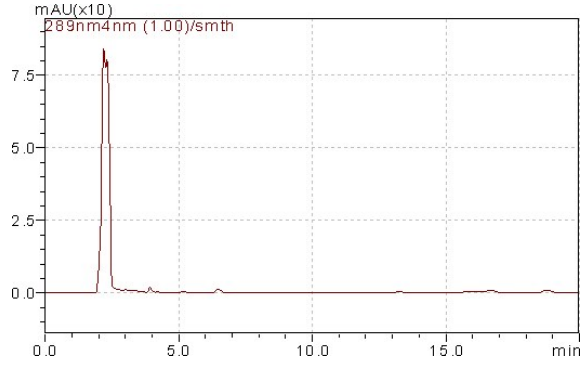

图 1　空白血浆对照色谱图

Fig 1　Chromatograms of control plasma

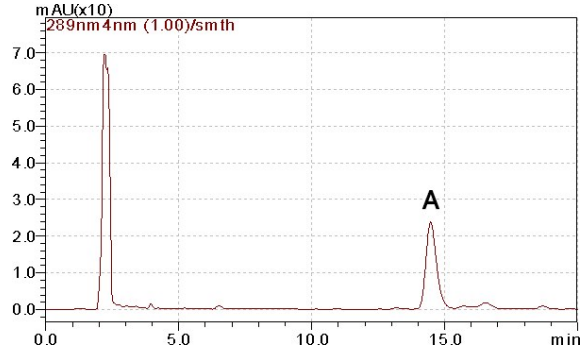

图 2　血浆 0.1μg/mL 色谱图(A 为泰地罗新)

Fig 2　Chromatograms of Tildipirosin in pigs plasma(0.1 μg/mL)

根据标准曲线建立方法,以测得泰地罗新的峰面积(A)为横坐标,药物浓度(C)为纵坐标,建立标准曲线如图 3。泰地罗新在 0.01~2.5 μg/mL 的浓度范围内,具有良好的线性关系,回归方程为 C = 0.0008A−0.0005,相关系数为 0.9998。

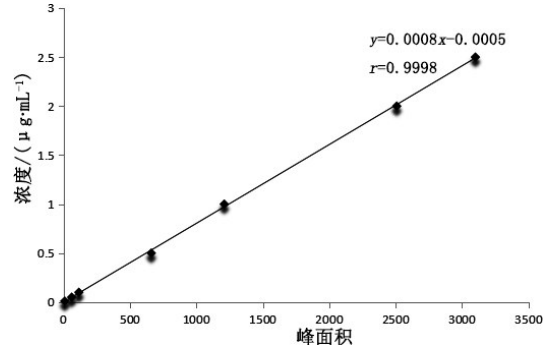

图 3　泰地罗新在血浆中的标准曲线

Fig 3　Standard curve of determination of Tildipirosin in pigs plasma

2.2　*方法学验证*　在空白血浆中添加泰地罗新标准工作液,使其浓度分别为 0.10、1.00、2.00 μg/mL,按血浆样品处理,HPLC 检测,每个浓度设置 5 个平行,测定日内变异系数在 5%以内;重复检测 5 d,测定日间变异系数在 10%以内;回收率为 89.19%~91.36%;检测限(LOD)、定量限(LOQ)分别为 0.01、0.05 μg/mL;具体数据如表 1。

2.3　*药物动力学数据*　按照试验设定方案进行给药和样品处理,高效液相色谱分析检测、软件分析计算。肌内注射泰地罗新各时间点药浓度见表 2,药物动力学参数见表 3。

表 1　泰地罗新在血浆中的方法学考察数据(n=5)

Tab 1　The result of method validation of Tildipirosin in plasma (n=5)

泰地罗新浓度/(μg·mL^{-1})	回收率/%	平均回收率 $\bar{x}\pm SD$/%	精密度(C.V.%)	
			日内	日间
0.10	97.62	91.36±5.13	2.88	5.61
	85.74		3.23	
	95.30		2.77	
	87.31		2.89	
	90.59		2.90	

续表

泰地罗新浓度/(μg·mL^{-1})	回收率/%	平均回收率 $\bar{x}\pm SD$/%	精密度(C.V.%)	
			日内	日间
1.00	96.91	90.96±4.01	2.97	4.41
	90.16		2.94	
	89.04		2.44	
	86.24		1.84	
	92.46		2.52	
	84.06		2.34	
	85.64		1.32	
2.00	91.15	89.19±4.33	1.54	4.85
	94.73		2.93	
	90.38		3.53	

表 2　肌内注射泰地罗新 (4 mg/kg.bw)后各时间点的血药浓度(n=8)

Tab 2　Plasma concentration vs time after a single 4 mg/kg bwim Tildipirosin injection in pigs(n=8)

时间/h	泰地罗新平均血药浓度±S.D/(μg·mL^{-1})	时间/h	泰地罗新平均血药浓度±S.D/(μg·mL^{-1})
0.083	0.481±0.232	48	0.147±0.062
0.25	0.732±0.386	72	0.102±0.025
0.5	0.762±0.274	96	0.071±0.015
1	0.641±0.168	120	0.034±0.012
2	0.511±0.214	144	0.025±0.008
4	0.472±0.142	192	0.016±0.006
6	0.325±0.122	240	0.012±0.001
8	0.321±0.089	288	0.010±0.001
10	0.267±0.075	336	0.010±0.001
24	0.207±0.061	384	ND

“S.D.”代表标准差，“ND”表示未检出

S.D. Standard deviation, ND. not detectable

表 3　泰地罗新 4 mg/kg.bw 在藏香猪体内的药动学参数(n=8)

Tab 3　Pharmacokinetic parameters of Tildipirosin (4 mg/kg. bw) in Tibetan pigs (n=8)

参数	单位	数值	参数	单位	数值
A	μg/mL	0.566±0.141	$t_{1/2\alpha}$	h	33.566±2. 712
α	h^{-1}	0.475±0.127	$t_{1/2\beta}$	h	120.518±10.181
B	μg/mL	0.280±0.079	$t_{1/2\pi}$	h	1.459±0.271
β	h^{-1}	0.021±0.013	AUC	μg·h/mL	22.224±2.641
C	μg/mL	0.056±0.012	T_{max}	h	0.457±0.143
π	h^{-1}	0.006±0.002	C_{max}	μg/mL	0.759±0.192

由表 1、表 2 可见，泰地罗新肌内注射后，在藏香猪体内吸收迅速，达峰时间快，达峰浓度较高，消除半衰期较长，药-时曲线(图 4)符合有吸收三室开放模型，其药-时方程为 $C=0.5660e^{-0.4751t}+0.2800e^{-0.0207t}+0.0564e^{-0.0058t}-0.9024e^{-7.4500t}$。

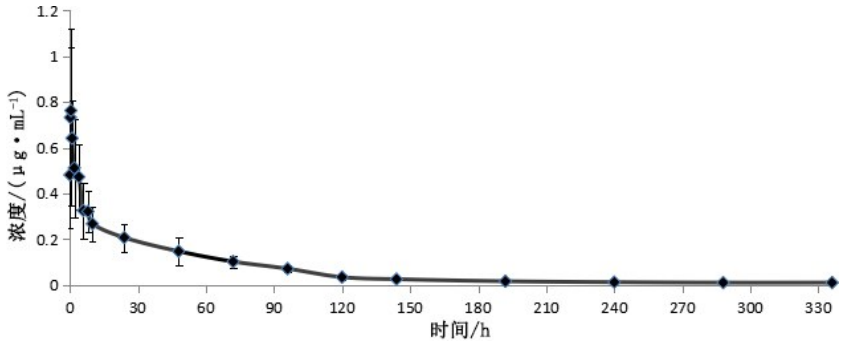

图 4　泰地罗新肌内 4 mg/kg bw 给药的血药浓度-时间曲线

Fig 4　Changing curve of Tildipirosin plasma concentration vs time after a single 4 mg/kg bwim Tildipirosin injection in Tibetan pigs

3　讨论与结论

3.1　色谱条件　本研究建立了泰地罗新的高效液相色谱检测方法,与液质联用相比,本方法简单、快速、灵敏度较高。试验中选择 289 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。流动相选择上使用了乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸、甲醇-水,甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-盐溶液等多种流动相。试验中发现甲醇和水相混合时易产生气泡,影响系统压力,在加入一定比例的乙腈时,系统较稳定且洗脱能力有所增强;且在较高盐浓度时易在系统中形成结晶,影响系统稳定。经过多次试验,最终确定甲醇-乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液(pH=7.00)=(35∶30∶35)为最终流动相,泰地罗新与杂质较好的分离,色谱峰峰形对称性好。

3.2　样品处理　为保证血浆样品的提取回收率和检测的准确度与灵敏度,本研究采用了 3 倍血浆样品体积的乙腈 2 次提取,既充分沉淀血浆中的蛋白杂质,又有效的保证了样品提取回收率。提取液经氮气吹干,再用流动相溶解定容,对样品进行了 10 倍浓缩,有效的提高了检测方法的准确度和检测限,减少实验误差且保证数据更准确。

3.3　药动学特征　藏香猪是我国特有的一种古老畜种资源,是西藏原始的瘦肉型猪种。研究泰地罗新在藏香猪体内的药物动力学特征,对了解其在机体内的变化规律,指导临床合理科学的使用意义重大。本研究发现:单剂量肌内注射泰地罗新(4 mg/kg bw)后,在藏香猪体内的药-时曲线符合有吸收三室开放模型;T_{max}为 0.457±0.143 h,C_{max}为 0.759±0.192 μg/mL,$t_{1/2}$为 120.518±10.181 h,AUC 为 22.224±2.641 μg·h/mL。Rose[9] 等报道,猪单剂量给药 4 mg/kg bw, T_{max}为 0.38±0.14 h,C_{max}为 0.895±0.453 μg/mL, $t_{1/2}$为 106±15 h, AUC 为 11.012±2.989μg·h/mL;廖远军[10] 等报道,猪单剂量给药 4 mg/kg bw ,T_{max}为 0.389±0.18 h,C_{max}为 0.972±0.391 μg/mL,$t_{1/2}$为 124.45±42.06 h,AUC 为 15.75±5.19 μg·h/mL。与 Rose[9] 和廖远军[10] 等报道的结果相比较,其中 T_{max}、C_{max}基本一致,但 $t_{1/2}$与 Rose[9] 等报道相差较大,可能与地域和动物品种有关;而药时曲线下面积 AUC 要优于 Rose[9] 和廖远军[10] 等的报道。Menge[11] 等报道,给牛单剂量皮下注射 4 mg/kg bw 泰地罗新,T_{max}为 0.383 h,C_{max}为 0.7 μg/mL。$T_{1/2}$为 216 h,与 Menge[11] 等报道相比较,其中 T_{max}、C_{max}基本一致,但 $t_{1/2}$相差较大,可能与动物种属有关。郭美珍[12] 报道皮下注射泰地罗新在健康小鼠血浆、肺泡上皮细胞衬液和肺组织的 T_{max}分别为 0.083h、0.381±0.238 h 和 1.125±0.629 h;$t_{1/2}$分别为 14.123±1.758 h、49.494±8.028 h、33.663±2.802 h。与郭美珍[12] 报道相比,泰地罗新在藏香猪体内的 T_{max}与其在健康小鼠肺泡上皮细胞衬液中相近,较其在小鼠血浆中慢,比其在肺组织要快很多,但在 $t_{1/2}$较其在小鼠血浆、肺泡上皮细胞衬液和肺组织中均长很多,这可能是动

物种属差异的原因。

研究结果表明,泰地罗新注射液在藏香猪体内达峰时间短,在机体内转运速度快,这可能与泰地罗新本身脂溶性较高有关;EMA[4]研究发现,泰地罗新在猪体内绝大部分以原药的形式排出体外,这与其他大环内酯类药物的代谢类似。泰地罗新在藏香猪体内的半衰期约为 120 h 左右,说明其在动物体内消除慢、血浆清除率低,药效持久;与大环内酯类的其他药物相比,泰地罗新的给药方式和给药剂量有所不同[5],以单剂量肌肉注射给药就可以保持较长的药物浓度,不需要多次重复给药,对耐药性的控制和临床治疗效果的发挥具有较大的优势。泰地罗新注射液在藏香猪体内的药物动力学研究结果将对其新兽药研发和临床使用提供重要参考。

参考文献:

[1] Jacob P, Niels M A, Ralf W, *et al*. Visualizing the 16-Membered Ring Macrolides Tidipirosin and Tilmicosin Bound to Their Ribosomal Site [J]. ACS Chem. Biol., 2012, 7: 1351-1355.

[2] 李伟岭,杨 芳,于振梅,等. 泰地罗新研究进展[J].中国兽药杂志, 2012,46(10):50-53.
Li W L, Yang F, Yu Z M, *et al*. Progress of the Studies on Tildipirosi[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(10):50-53.

[3] Poehlsgaard J, Andersen N M, Warrass R, *et al*. Visualizing the 16-memberedring macrolides tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site[J]. ACSchemical biology, 2012,7(8):1351-1355.

[4] EMA. Committee for Medicinal Produccts for Veterinary Use (EMA/CVMP/91406/2011) [DB/OL].http://www.ema.europa.eu/docs/ en_GB/document_library/Summary_of_opinion_-_Initial_authorisation/veterinary/002009/WC500103295.pdf.

[5] Watts J L, Sweeney M T. Antimierobial resistance in bovine respiratory disease pathogens: measures, trends, an d impact on eficacy [J].Vet Clin North Am Food Anim Pract,2010,26(1): 79-88.

[6] Miyake T, Takita T, Hamada M, *et al*. 16-membered ring macrolide antibioticsand the treatment or prophylaxis of pasteurellosis of mammalian livestock orpoultry using the same as an active ingredient: U.S. Patent 6,514,946[P]. 2003-2-4.

[7] Secretariat C G, ESPINASSE C, ALZIEU J P F, *et al*. Palais du Pharo, Marseille27-29 Nov. 2013[J]. 2013.http://www. buiatricsforum.com/Proc%20EBF2013.pdf.

[8] EMA. CVMP assessment report Zuprevo (EMA/V/002009) [DB/OL]. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp? curl = pages /medicines/veterinary/medicines/002009/vet _ med _ 000242. jsp&mid = pages/medicines/medicines. jsp&mid = WC0b01ac058001fa1c.

[9] Rose M, Menge M, Bohland C,*et al*. Pharmacokinetics of tildipirosin in porcineplasma, lung tissue, and bronchial fluid and effects of test conditions on *in vitro* activity against reference strains and field isolates of *Actinobacilluspleuro pneumoniae*[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2013,36(2):140-153.

[10] 廖远军. 泰地罗新注射液在猪体内的药代动力学研究[D]. 长春:吉林大学.2015.
Liao Y J. Studies on Pharmacokinetics of Tildipirosin Injection in Pigs[D]. ChangChun:Jilin University.2015.

[11] Menge M, Rose M, Bohland C,*et al*. Pharmacokinetics of tildipirosin in bovineplasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, nonanesthetizedcattle)[J]. J Vet Pharmacol Ther,2012,35(6):550-559.

[12] 郭美珍. 泰地罗新在小鼠体内的药动药效学研究[D].广州:华南农业大学.2016.
Guo M Z. Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) of Tildipirosin in Mice[D].GuangZhou: South China Agricultural University.2016.

(编 辑:侯向辉)