

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.06.11

泰地罗新注射液在藏鸡体内的药动学研究

蒲秀花¹, 赵森², 者永辉^{3*}

(1.青海省海西州德令海市尕斯库勒镇畜牧兽医工作站,青海海西州 817099;

2.青海省海西州动物疫病预防控制中心,青海海西州 817099;3.青海省西宁市畜牧兽医站,西宁 810000)

[收稿日期] 2019-04-09 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 06-0066-06 [中图分类号] S859.796

[摘要] 为研究泰地罗新注射液在藏鸡体内的药物动力学特征,了解其在藏鸡体内的吸收、分布、转化及排泄规律,试验选取藏鸡 12 羽,泰地罗新单剂量注射给药 (4 mg/kg.bw),不同时间点采集藏鸡血液,利用高效液相色谱法测定血浆中药物浓度。结果表明:注射给药后,泰地罗新在藏鸡体内的药-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 (1.727±0.237) h, C_{max} 为 (0.938±0.121) $\mu\text{g}/\text{mL}$, $t_{1/2}$ 为 (36.198±2.394) h, AUC 为 (55.564±3.675) $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$, V_d 为 (16.155±2.676) mL/kg,表明泰地罗新注射给药后在藏鸡体内吸收迅速,消除较为缓慢,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;藏鸡;药物动力学

Studies on Pharmacokinetics of Tildipirosin Injection in Tibetan Chicken

PU Xiu-hua¹, ZHAO Sen², ZHE Yong-hui^{3*}

(1. Animal Husbandry and Veterinary Workstation, Bohai Town, Delingha City, Haixi Prefecture, Qinghai Province, Hai Xi,

Qinghai 817099, China; 2. Center for Animal Disease Prevention and Control, Hai Xi, Qinghai 817099, China;

3. Xining Animal Husbandry and Veterinary Station, Qinghai Province, Xining 810000, China)

Corresponding author: ZHE Yong-hui, E-mail: 709957864@qq.com

Abstract: The aim of the study was to understand pharmacokinetics principle as well as the absorption, distribution, transformation and excretion of Tildipirosin Injection in Tibetan Chicken. The test selects 12 Tibetan Chickens with single dose of Tildipirosin Injection, collects blood at different time points and determines drug concentration in plasma by HPLC. The results show that vivo drug time curve of Tildipirosin in Tibetan Chicken corresponds with absorption three compartment open model after injection of Tilipirosin, with their main pharmacokinetics parameters: T_{max} was (0.457±0.143) h, C_{max} was (0.759±0.192) $\mu\text{g}/\text{mL}$, $t_{1/2}$ was (120.518±10.181) h, AUC was (22.224±2.641) $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$, V_d was (16.155±2.676) mL/kg. It can be included that Tildipirosin can be quickly absorbed but slowly eliminated in Tibetan Chickens, which can provide a certain guidance for research development and clinical rational use of new veterinary drug.

Key words: Tildipirosin; HPLC; Tibetan Chicken; pharmacokinetics

作者简介: 蒲秀花, 兽医师, 从事家畜疫病防治及流行病学调查工作。

通讯作者: 者永辉。E-mail: 709957864@qq.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],是一种广谱、高效的抗微生物药物,对引起畜禽呼吸道疾病的病原菌,如胸膜肺炎放线杆菌^[2]、多杀性巴氏杆菌^[3]、支气管败血波氏杆菌^[4]、副猪嗜血杆菌^[5]、溶血性曼海姆菌^[6]等具有特效,是治疗畜禽呼吸道疾病极为理想的药物^[7]。目前,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,未见其在藏鸡体内的药物动力学研究报道。为了解其在藏鸡体内的吸收、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,研究了其在藏鸡体内的药物动力学特征,为其新兽药研发和临床使用提供理论参考。

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,准确称取泰地罗新标准品 100 mg 溶于 50 mL 甲醇中,配制成 2.0 mg/mL 的泰地罗新标准品标准溶液,避光保存;泰地罗新注射液(批号:1303001,规格 50 mL)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 Thermo 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,5 μm);TG-16W 高速离心机:长沙湘仪离心机有限公司;万分之一电子天平,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 藏鸡 12 羽,体重(650±50) g,购于海西州藏鸡养殖户。自由饮水和采食,饲料为不含任何药物的全价商品日粮,饲养在试验鸡舍中,温度控制在(20±2)℃。在试验前观察饲喂 1 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(pH7.00)=(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,12 羽藏鸡以 4 mg/kg.bw 的剂量肌肉内给药。给药后分别于 0.0833、0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、24、48、72、96、120、144、192、240、288 和 336 h 于翼下静脉采血 2 mL,置于已添加肝素钠的聚丙烯离心管中,以 3000 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 0.5 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 次提取液取上清于 10.0 mL 尖底离心管中,45℃氮气吹干,再用 200 μL 流动相溶解,涡旋振荡 1 min,10000 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 0.5 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 0.5 mL,添加适量泰地罗新标准工作液,使其浓度分别为 2.50、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,泰地罗新出峰时间为 14.2 min,空白血浆和血浆中添加药物色谱图见图 1 和图 2。

根据标准曲线建立的方法,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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度范围内,具有良好的线性关系,回归方程为 $C = 0.0008A + 0.0174$,相关系数为 0.9999。

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、2.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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,经高效液相色谱分析检测、软件分析计算。藏鸡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。

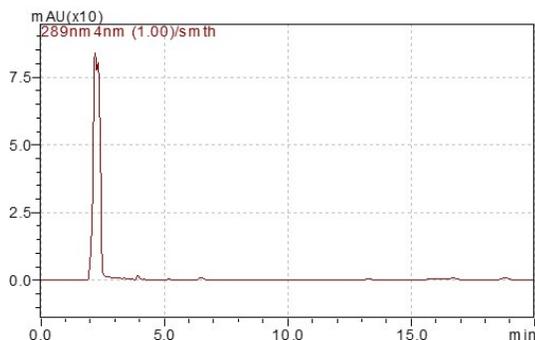


图 1 空白血浆对照色谱图

Fig 1 Chromatograms of control plasma

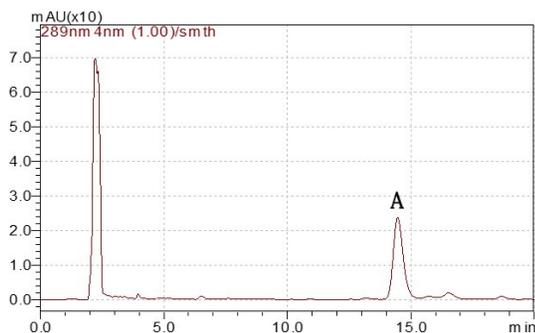


图 2 血浆 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 色谱图(A 为泰地罗新)

Fig 2 Chromatograms of Tildipirosin in Tibetan Chicken plasma (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

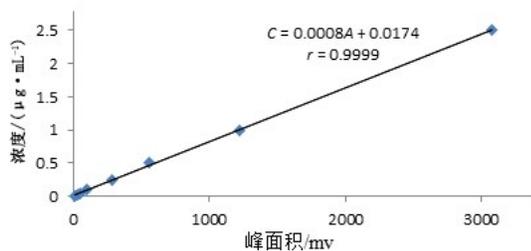


图 3 泰地罗新在血浆中的标准曲线

Fig 3 Standard curve of determination of Tildipirosin in pigs plasma

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 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	回收率/%	平均回收率 $\pm s$ /%	精密性(C.V./%)	
			日内	日间
0.10	91.34	90.62 \pm 3.54	3.56	6.54
	86.71		2.97	
	93.25		4.05	
	86.45		3.95	
	95.37		4.96	

续表

泰地罗新浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	平均回收率 $\pm s$ /%	精密性(C.V/%)	
			日内	日间
1.00	86.35	91.52 \pm 3.09	2.63	5.21
	93.15		3.96	
	93.78		4.37	
	89.64		2.94	
	94.68		3.84	
2.50	88.26	88.67 \pm 3.49	2.94	4.39
	83.46		2.53	
	86.79		3.69	
	91.35		4.82	
	93.48		3.74	

“s”代表标准差

“s”Standard deviation

表 2 藏鸡肌内注射泰地罗新 (4 mg/kg.bw) 后各时间点的血药浓度 (n=12)

Tab 2 Plasma concentration vs time after a single 4 mg/kg.bw im Tildipirosin Injection in Tibetan Chicken (n=12)

时间/h	泰地罗新平均血药浓度 $\pm s$ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	时间/h	泰地罗新平均血药浓度 $\pm s$ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0.083	0.489 \pm 0.114	48	0.334 \pm 0.063
0.25	0.638 \pm 0.169	72	0.224 \pm 0.041
0.5	0.764 \pm 0.213	96	0.167 \pm 0.035
1	0.851 \pm 0.246	120	0.124 \pm 0.023
2	0.942 \pm 0.197	144	0.088 \pm 0.029
4	0.854 \pm 0.123	192	0.062 \pm 0.018
6	0.734 \pm 0.134	240	0.048 \pm 0.013
8	0.694 \pm 0.121	288	0.031 \pm 0.021
10	0.571 \pm 0.104	336	0.028 \pm 0.021
24	0.415 \pm 0.082	/	/

“s”代表标准差

“s”Standard deviation

表 3 肌内注射泰地罗新 4 mg/kg.bw 在藏鸡体内的药动学参数 (n=12)

Tab 3 Pharmacokinetic parameters of Tildipirosin (4 mg/kg.bw) in Tibetan Chicken (n=12)

参数	单位	数值	参数	单位	数值
A	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.446 \pm 0.095	$t_{1/2\alpha}$	h	26.961 \pm 2.647
α	h^{-1}	0.175 \pm 0.056	$t_{1/2\beta}$	h	93.329 \pm 8.574
B	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.372 \pm 0.026	$t_{1/2\pi}$	h	3.965 \pm 1.051
β	h^{-1}	0.026 \pm 0.013	AUC	$\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$	55.564 \pm 3.675
C	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.290 \pm 0.062	T_{\max}	h	1.727 \pm 0.237
π	h^{-1}	0.007 \pm 0.001	C_{\max}	$\mu\text{g}/\text{mL}$	0.938 \pm 0.121
$T_{1/2}$	h	36.198 \pm 2.394	V_d	mL/kg	16.155 \pm 2.676

由表 1、2 可见,泰地罗新肌肉注射后,在藏鸡体内吸收迅速,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 $C = 0.4461e^{-0.1748t} + 0.3721e^{-0.0257t} + 0.2903e^{-0.0074t} - 1.1086e^{-2.0134t}$ 。

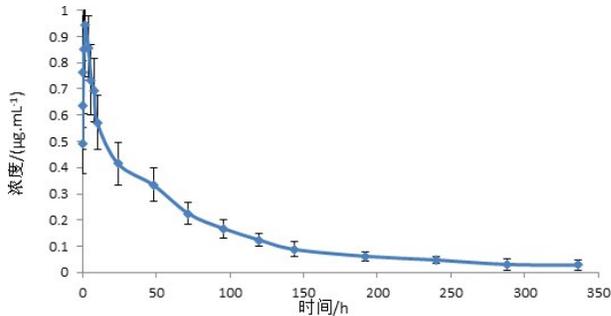


图 4 泰地罗新肌肉 4 mg/kg.bw 给药的血药浓度-时间曲线
Fig 4 Changing curve of Tildipirosin plasma concentration vs time after a single 4 mg/kg.bw im Tildipirosin Injection in Tibetan Chicken

3 讨论与结论

藏鸡是至今世界上在高海拔生活历史较为悠久的原始地方小型鸡种,其体型轻小、胸腿肌肉发达、极耐粗饲、抗病力强,肉质鲜嫩、风味独特,营养丰富,药用价值极高,对高原恶劣的气候和低氧环境有良好的适应能力,是藏区养鸡业发展极其重要的品种资源^[8-9]。研究泰地罗新在藏鸡体内的药动力学特征,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。

研究表明,单剂量肌肉注射泰地罗新(4 mg/kg.bw)后,在藏鸡体内的药-时曲线符合有吸收三室开放模型; T_{max} 为(1.727±0.237) h, C_{max} 为(0.938±0.121) µg/mL, $t_{1/2}$ 为(36.198±2.394) h,AUC为(55.564±3.675) µg·h/mL, V_d 为(16.155±2.676) mL/kg。Rose等^[10]报道,猪单剂量给泰地罗新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±2.989) µg·h/mL;Menge等^[11]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;郭美珍^[12]报道皮下注射泰地罗新在健康小

鼠血浆的 T_{max} 为 0.083 h, $t_{1/2}$ 为(14.123±1.758) h。由此可知,本研究结果与泰地罗新在猪、牛及小鼠体内的 T_{max} 有一定的差距,即在藏鸡体内达峰时间相对较长;在 C_{max} 方面与国内外相关报道基本相似;泰地罗新在藏鸡体内的 $t_{1/2}$ 为(36.198±2.394) h,较其在小鼠体内(14.123±1.758) h 长,较猪(106±15) h、牛 216 h 均较短;这可能与动物种类及高原环境有一定的关系。泰地罗新注射液在藏鸡体内达峰时间短,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。泰地罗新在藏鸡体内的半衰期约为 36 h 左右,说明其在藏鸡体内消除慢、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^[10,13]。因此,本研究将对泰地罗新的新兽药研发和临床使用提供重要参考。

参考文献:

- [1] Poehlsgaard J, Andersen N M, Warrass R, *et al.* Visualizing the 16-membered ring macrolides Tildipirosin and tilmicosin bound to their ribosomal site [J]. *Acs Chemical Biology*, 2012, 7(8): 1351-1355.
- [2] 李伟岭,杨芳,于振海,等.泰地罗新研究进展[J].*中国兽药杂志*, 2012, 46(10): 50-53.
Yang W L, Yang F, Yu Z H, *et al.* Progress of the studies on Tildipirosin [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2012, 46(10): 50-53.
- [3] EMA. Committee for Medicinal Products 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.
- [4] Watts J L, Sweeney M T. Antimicrobial resistance in bovine respiratory disease pathogens: measures, trends, and impact on efficacy [J]. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 2010, 26(1): 79-88.
- [5] Miyake T, Takita T, Hamada M, *et al.* 16-membered ring macrolide antibiotics and the treatment or prophylaxis of pasteurellosis of mammalian livestock or poultry using the same as an active ingredient: U.S. Patent 6,514,946 [P]. 2003-2-4.
- [6] Secretariat C G, Espinasse C, Alzieu J P F, *et al.* Palais du Pha-

- ro, Marseille 27–29 Nov. 2013 [J]. <http://www.buiatricsforum.com/Proc%20EBF2013.pdf>. 2013, 56(6): 73–78.
- [7] 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.
- [8] 刘 榜. 对藏鸡开发利用的思考[J]. 中国家禽, 2004, 26(18): 49–51.
- Liu B. Thoughts on the exploitation and utilization of Tibetan chickens[J]. China Poultry, 2004, 26(18): 49–51.
- [9] 周 兵, 陈仕毅, 张 删, 等. 藏鸡林地生态养殖技术[J]. 养禽与禽病防治, 2009, 1: 30–32.
- Zhou B, Chen S Y, Zhang S, et al. Tibetan chicken forest land ecological breeding technology[J]. Poultry Husbandry and Disease Control, 2009, 1: 30–32.
- [10] Rose M, Menge M, Bohland C, et al. Pharmacokinetics of Tildipirosin in porcine plasma, lung tissue, and bronchial fluid and effects of test conditions on in vitro activity against reference strains and field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2013, 36(2): 140–153.
- [11] Menge M, Rose M, Bohland C, et al. Pharmacokinetics of Tildipirosin in bovine plasma, lung tissue, and bronchial fluid (from live, nonanesthetized cattle) [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.
- [13] Watts J L, Sweeney M T. Antimicrobial resistance in bovine respiratory disease pathogens: measures, trends, and impact on efficacy [J]. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 2010, 26(1): 79–88.

(编辑:李文平)