

不同制剂方式对诺氟沙星在鳗鲡中药动学的影响

贾雪卿¹, 范红照¹, 湛嘉², 朱远芳¹, 黄利强¹, 林茂^{1*}

(1. 集美大学, 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建厦门 361021; 2. 宁波出入境检验检疫局, 浙江宁波 315010)

摘要 [目的] 研究不同制剂方式对药物在水产动物体内代谢动力学的影响。[方法] 用诺氟沙星粉(NP)、诺氟沙星盐酸小檗碱预混剂(NB)、烟酸诺氟沙星可溶性粉(NN)和乳酸诺氟沙星可溶性粉(NL)4种诺氟沙星制剂, 分别混饲口灌日本鳗鲡, 给药量均按30 mg/kg的诺氟沙星原粉计算, 再利用超高效液相色谱-质谱法测定诺氟沙星在血浆中的含量, 并进行药动学分析。[结果] 非房室模型药动学参数表明, NP、NB、NN和NL4种诺氟沙星制剂单次给药后均在3 h或4 h达峰, 达峰浓度(C_{max})相差较大, 分别为1.273、1.073、0.616和0.094 mg/L; 消除半衰期($T_{1/2}$)分别为15.267、24.887、33.041和25.891 h; NP的AUC最大, 为22.670 mg/(L·h), NP: NB: NN: NL = 100%: 99%: 63%: 13%。[结论] 药物的不同制剂方式对其在水产动物体内的吸收程度和生物利用度有较大的影响。

关键词 诺氟沙星; 日本鳗鲡; 药代动力学; 制剂方式

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)22-0075-03

Effects of Different Formulation Ways on Pharmacokinetics of Norfloxacin in *Anguilla japonica*

JIA Xue-qing¹, FAN Hong-zhao¹, ZHAN Jia², LIN Mao^{1*} et al (1. Engineering Research Center of the Modern Technology for Eel Industry, Ministry of Education, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021; 2. Ningbo Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Ningbo, Zhejiang 315010)

Abstract [Objective] To explore the influences of formulation ways on pharmacokinetics of drugs in aquatic animals. [Method] Four formulations (NP, NB, NN and NL) of norfloxacin (NFX) in *Anguilla japonica* were studied by a single oral dose of 30 mg/kg NFX. The content of NFX in plasma of eels was determined by UPLC-MS and computed by non-compartment model. [Result] Pharmacokinetics parameters of NP, NB, NN and NL showed that C_{max} were 1.273, 1.073, 0.616 and 0.094 mg/L after single drug administration 3 or 4 h; $T_{1/2}$ were 15.267, 24.887, 33.041 and 25.891 h respectively; AUC of NP was the maximum, being 22.670 mg/(L·h). NP: NB: NN: NL = 100%: 99%: 63%: 13%. [Conclusion] Different formulation ways of drugs had greater effects on the absorption and bioavailability of medicine in aquatic animals.

Key words Norfloxacin; *Anguilla japonica*; Pharmacokinetics; Sormulation ways

诺氟沙星(Norfloxacin, NFX)为氟喹诺酮类药物, 对大多数革兰氏阴性菌和部分革兰氏阳性菌均有良好的杀菌效果, 因此其应用较为广泛^[1]。关于NFX在水产动物中的药动学或残留消除规律有较多的研究报道, 涉及的水产动物包括草鱼、鲫、鲤、罗非鱼、大黄鱼、大菱鲆、海鲈、黑鲷、南美白对虾和淡水青虾等^[2-10]。2010年农业部发布的1435号公告曾将诺氟沙星作为水产用药列入第一批《兽药试行标准转正标准目录》, 包括诺氟沙星粉(Norfloxacin powder, NP)、诺氟沙星盐酸小檗碱预混剂(Norfloxacin and berberine hydrochloride premix, NB)、烟酸诺氟沙星可溶性粉(Norfloxacin nicotinic soluble powder, NN)和乳酸诺氟沙星可溶性粉(Norfloxacin lactate soluble powder, NL)等4种制剂^[11], 是制剂类型最多的水产药物。虽然诺氟沙星的各种制剂于2016年以后已被禁止在食品动物中使用^[12], 但诺氟沙星制剂类型多样, 因此研究不同制剂方式对水产动物中药物代谢动力学的影响具有重要的借鉴意义和参考价值。笔者比较了4种诺氟沙星制剂在日本鳗鲡体内的药代动力学规律, 旨在为通过改变制剂方式来提高水产药物的吸收程度和生物利用度提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验动物和药品 日本鳗鲡体质量为(480 ± 59) g, 试验前在室内循环养殖系统中暂养7 d, 养殖期间水温为

(28.0 ± 0.5) °C, pH为(7.04 ± 0.31)。试验前3 d停止喂食, 将不健康的日本鳗鲡去除。

诺氟沙星标准品以及各种制剂的具体信息见表1, 用标准品进行液相色谱比对, 可知各诺氟沙星制剂含量均合格。以诺氟沙星原粉的给药剂量30 mg/kg为标准, 计算各制剂的给药剂量。

1.2 给药和取样 试验采用单次混饲口灌给药, 在给药0.25、0.5、1、2、3、4、6、9、15、24、36和48 h后静脉取血, 各时间点分别取5尾。采集血液, 置于0.1 mg/L肝素钠润洗风干的离心管中, 振荡混匀后5 000 r/min离心10 min, 取上层血浆于-80 °C下保存。

1.3 样品处理与检测

1.3.1 前处理。取0.2 mL血浆置于10 mL试管中, 加入2 mL含0.1%甲酸的50%乙腈, 振荡30 s, 并超声波5 min, 再10 000 r/min离心5 min; 然后, 用100%乙腈二次提取沉淀; 合并2次提取所得上清液, 并加入2 mL正己烷析出脂类; 吸取250 μL提取液到新管中, 加入750 μL 20%的DMSO混合, 最后用一次性针头过滤器过滤到进样瓶中。

1.3.2 检测方法及条件。样品中的药物浓度采用超高效液相色谱-质谱联用仪(UPLC-MS)测定, 流动相A₂为含0.1%甲酸的水; 流动相B₂为含0.1%甲酸的甲醇。色谱柱温40 °C; 进样量10 μL; 去溶剂气温度450 °C; 去溶剂流速800 L/h; 锥孔流速50 L/h; 碰撞气体氩气为3.2 × 10⁻³ hPa; 采用流动相梯度洗脱。

1.4 分析方法验证

1.4.1 绘制标准曲线。在空白血浆中加入NFX, 使其浓度

基金项目 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 海洋经济创新发展区域示范项目(16PZY002SF18); 福建省自然科学基金项目(2014J01129)。

作者简介 贾雪卿(1991—), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向: 水产动物健康养殖。* 通讯作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事水产动物药物与药理学研究。

收稿日期 2017-05-31

分别为 0、0.02、0.20、2.00 和 20.00 $\mu\text{g/mL}$ ，各浓度设 3 个平行，混匀振荡 2 min 后，按“1.3”中方法处理，得到各浓度响应值，利用 Mass Lynx 4.0 绘制标准曲线，并计算相关系数。

1.4.2 测定精密度和回收率。在空白血浆中加入 NFX 标准品，使浓度分别为 0.02、0.20 和 2.00 $\mu\text{g/mL}$ ，混匀振荡 2 min 后按“1.3”中方法处理，检测并记录响应值。日内每隔 2 h

进行 1 次，共 6 次，计算各浓度对应响应值的日内变异系数。此外，隔天检测 1 次上述 3 种浓度对应的响应值，共 6 次，计算日间平均变异系数。上述样品的响应值根据标准曲线进行计算，得到实测浓度。按照以下公式计算回收率：回收率 = 实测浓度 / 理论浓度 $\times 100\%$ 。

表 1 诺氟沙星标准品和制剂及其剂量

Table 1 Norfloxacin standard, formulations and their doses

药品 Drugs	含量 Content//%	生产厂家 Manufacturer	生产批号 Production number	制剂剂量 Dose of formulations//mg/kg
诺氟沙星标准品 Standard of norfloxacin	99.6	中国药品生物制品检定所	130450	—
诺氟沙星粉 NP	10.0	北京渔经公司	201204001	300
诺氟沙星盐酸小檗碱预混剂 NB	9.0	北京渔经公司	20120409	333
烟酸诺氟沙星可溶性粉 NN	5.0	上海公谊兽药公司	111015	831
乳酸诺氟沙星可溶性粉 NL	5.0	永济瑞普动物药业	20120508	770

1.5 数据统计与分析 利用 Mass Lynx 4.0 软件处理液质联用仪测得的数据；药动力学参数使用 DAS 2.0 软件进行分析获得。

2 结果与分析

2.1 分析方法验证 在质谱检测条件下，诺氟沙星的 4 种子离子中，以 m/z 为 302.2 时的响应值最高，保留时间为 3.17 min(图 1)，后续研究中诺氟沙星的检测用该离子进行

定量。

鳗鲡血浆中 0.02、0.20 和 2.00 $\mu\text{g/mL}$ NFX 的日内变异系数为 4.25% ~ 6.33%，日间变异系数为 4.68% ~ 6.44%，平均相对回收率为 96.3%。检测结果表明，在 2.5 ~ 50.0 ng/mL 内 NFX 浓度与峰面积呈线性相关，最低检测限为 2.5 ng/mL。

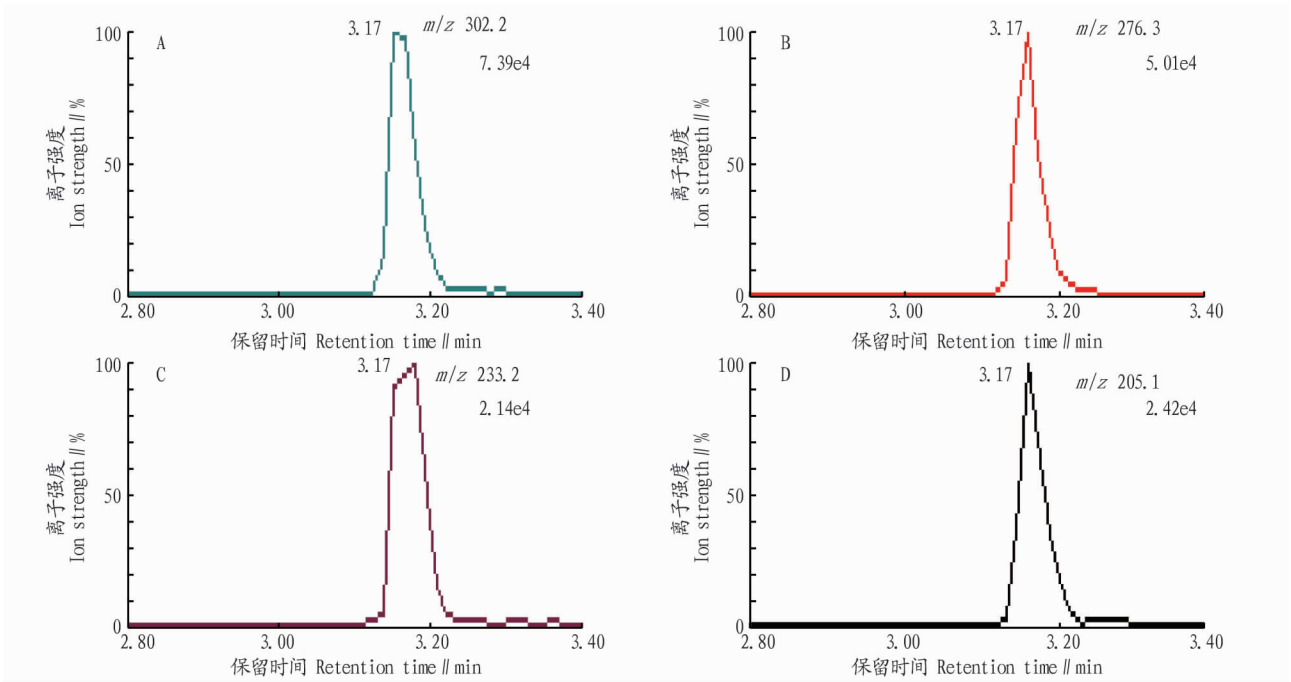


图 1 质谱检测中诺氟沙星 4 种子离子强度的比较

Fig.1 The ion strength comparison of four ions of norfloxacin in MS

2.2 药物 - 时间曲线与药动力学特征 诺氟沙星粉 (NP)、诺氟沙星盐酸小檗碱预混剂 (NB)、烟酸诺氟沙星可溶性粉 (NN) 和乳酸诺氟沙星可溶性粉 (NL) 等 4 种诺氟沙星制剂，按相当于诺氟沙星原粉 30 mg/kg 的剂量，单次混饲口灌日本鳗鲡后，采集血样数据，绘制药物 - 时间曲线。从图 2 可

以看出，NP、NB、NN 和 NL 给药后达峰时间 ($T_{\max}$) 为 3 ~ 4 h，但其达峰浓度 ($C_{\max}$) 相差较大，分别为 1.273、1.073、0.616 和 0.094 mg/L，这表明 NP 和 NB 有较好的吸收效果，而 NL 的吸收效果较差。

非房室模型计算结果表明，NP、NB、NN 和 NL 的药动学

参数也有较大的差异(表 2)。NL 的表观分布容积(V_d)最大,表明 NL 在组织中有较大分布,而血液中相对较少。NP 的清除率(CL)和消除半衰期($T_{1/2}$)最小,表明 NP 的消除速率最快。NP、NB、NN 和 NL 的药时曲线下面积(AUC)也有较大差异,NP 的 AUC 最大,为 22.670 mg/(L·h),NP: NB: NN: NL = 100%: 99%: 63%: 13%,这表明制剂方式对生物利用度有较大的影响。

3 讨论与结论

诺氟沙星粉(NP)、诺氟沙星盐酸小檗碱预混剂(NB)、烟酸诺氟沙星可溶性粉(NN)和乳酸诺氟沙星可溶性粉(NL)4 种诺氟沙星制剂在日本鳊鲈体内的吸收速度较为接近,除 NL 的达峰时间(T_{max})为 4 h,其余 3 种制剂在鳊鲈中的 T_{max} 均为 3 h。与诺氟沙星在草鱼(0.4 h)^[2]、鲫(1.13 h)^[3]、鲤

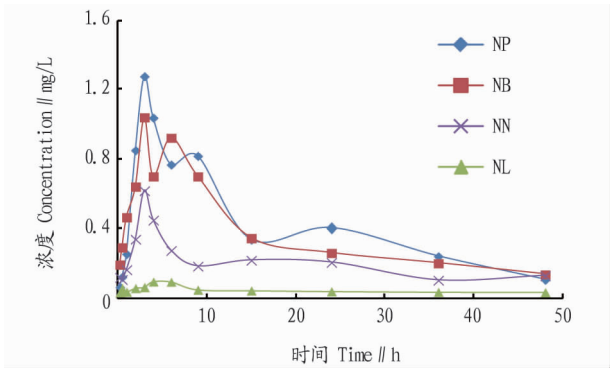


图 2 4 种诺氟沙星制剂在日本鳊鲈血浆中药时曲线的比较
Fig. 2 The time-concentration curve comparison of four norfloxacin formulations in the plasma of *A. japonica*

表 2 4 种诺氟沙星制剂在日本鳊鲈中的非房室药动学参数

诺角沙星制剂 Norfloxacin formulations	AUC _(0→∞) mg/(L·h)	MRT _(0→∞) h	$T_{1/2}$ h	V_d L/kg	CL L/(h·kg)	T_{max} h	C_{max} mg/L
NP	22.670	23.786	15.267	28.968	1.315	3	1.273
NB	22.476	30.694	24.887	47.934	1.335	3	1.037
NN	14.181	44.727	33.041	100.862	2.115	3	0.616
NL	3.043	38.962	25.891	368.275	9.857	4	0.094

(1.45 h)^[4]、罗非鱼(2.72 h)^[5]、大黄鱼(2.09 h)^[6]、大菱鲆(2 h)^[7]等动物相比, T_{max} 相对较长,吸收较慢。这 4 种制剂在鳊鲈体内的达峰浓度(C_{max})有较大的差异,NP、NB、NN、NL 的 C_{max} 分别为 1.273、1.073、0.616 和 0.094 mg/L,这表明 NP 和 NB 制剂在鳊鲈肠道内的吸收程度较高,而 NL 的吸收较差。诺氟沙星原料药在其他动物中的药动学研究表明,大菱鲆的吸收度最高,其 C_{max} 为 8.37 mg/L^[7],而草鱼(1.11 mg/L)^[2]和鲤(1.72 mg/L)^[4]也有较好吸收。诺氟沙星 4 种制剂的药时曲线下面积(AUC)也有较大差异,NP: NB: NN: NL = 100%: 99%: 63%: 13%,这表明不同制剂方式对生物利用度有较大影响,NP 和 NB 的生物利用度较高,而 NL 则较低。

Walker^[13]研究表明,氟喹诺酮类药物治疗细菌性疾病时是否能够起效取决于该剂量下的 C_{max} /MIC 能否达到 10,而刘艳辉等^[14]测得诺氟沙星对常见水产动物致病菌苏伯利产气单胞菌、点状产气单胞菌、荧光假单胞菌的 MIC 值分别为 0.02、0.04 和 0.04 μg/mL。对于大多数非耐药性细菌而言,诺氟沙星在体内的 C_{max} 须大于 0.4 μg/mL,才能产生一定范围的治疗窗。由此可见,诺氟沙星的乳酸盐制剂(NL)的治疗效果远不如 NP 和 NL。

该研究结果表明,不同制剂对药物在水产动物中的吸收程度和生物利用度有较大的影响。根据经典药动学和跨膜转运理论,药物在肠道中的吸收与药物的解离度和脂溶性有较大的相关性,水溶性的诺氟沙星烟酸盐或乳酸盐虽然溶解性好,对于配制注射剂是必需的,但口服时反而不利于肠道黏膜的吸收。因此,对于口服或其他用药途径,应当在药动学研究的基础上,进行针对性的制剂研发和选用,才能更有

效地吸收和利用药物。

参考文献

[1] SAMUELSEN O B. Pharmacokinetics of quinolones in fish; A review[J]. Aquaculture, 2006, 255: 55 – 75.

[2] 郭海燕,陈元坤,朱林,等. 诺氟沙星在草鱼体内的组织分布和药物动力学规律[J]. 水产科学,2009,28(1): 28 – 31.

[3] 汪文选. 不同温度下两种氟喹诺酮类药物在鲫鱼体内的药动学比较研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2010.

[4] 张雅斌,张祚新,郑伟,等. 不同给药方式下鲤对诺氟沙星的药代动力学研究[J]. 水产学报,2000,24(6): 559 – 563.

[5] 廖碧钗. 诺氟沙星在奥尼罗非鱼体内的药代动力学及残留研究[J]. 福建农业学报,2011,26(6): 930 – 934.

[6] 刘玉林,王翔凌,杨先乐,等. 诺氟沙星在大黄鱼体内的药代动力学及残留研究[J]. 水产学报,2007,31(5): 655 – 660.

[7] 曲晓荣,王印庚,李胜忠,等. 诺氟沙星在大菱鲆体内药代动力学及残留消除规律[J]. 海洋水产研究,2007,28(5): 24 – 29.

[8] WANG Q, LIU Q, LI J, et al. Tissue distribution and elimination of norfloxacin in Japanese sea perch (*Lateolabrus japonicus*) and black sea bream (*Sparus macrocephalus*) following multi-oral administration[J]. Aquaculture, 2008,278(1/2/3/4): 1 – 4.

[9] 房文红,郑国兴. 肌注和药饵给药下诺氟沙星在南美白对虾血淋巴中 药代动力学[J]. 水生生物学报,2006,30(5):541 – 546.

[10] 何平,尹文林,沈锦玉. 诺氟沙星在淡水青虾体内药物代谢动力学研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2008,27(2): 135 – 139.

[11] 中华人民共和国农业部兽医局. 农业部公告第 1435 号: 关于公布第一批兽药试行标准转正目录的公告[A/OL]. (2010 – 08 – 23) [2017 – 04 – 05]. http://www.moa.gov.cn/zwllm/tzgg/gg/201008/t20100823_1622639.htm.

[12] 中华人民共和国农业部办公厅. 农办医函[2015]37 号: 关于决定禁止在食品动物中使用洛美沙星等 4 种原料药的各种盐、脂及其各种制剂的公告[A/OL]. (2015 – 06 – 11) [2017 – 04 – 05]. http://www.moa.gov.cn/sjzz/syj/yzj/201506/t20150611_4699942.htm.

[13] WALKER R D. The use of fluoroquinolones for companion animal antimicrobial therapy[J]. Australian veterinary journal, 2000, 78(2): 84 – 90.

[14] 刘艳辉,祖岫杰,李改娟,等. 氟喹诺酮类药物对鱼类常见病原菌的抑菌试验[J]. 吉林水利,2012(10): 35 – 36.