

# 抗菌新兽药“菌灭”在兔体内的动力学研究

李剑勇<sup>1,2</sup>, 唐峰<sup>3</sup>, 周绪正<sup>1,2</sup>, 张继瑜<sup>1,2</sup>, 牛建荣<sup>1,2</sup>, 魏小娟<sup>1,2</sup>, 杨亚军<sup>1,2</sup> (1. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州 730050; 2. 中国农业科学院新兽药工程重点实验室, 甘肃兰州 730050; 3. 辽宁医学院畜牧兽医学院, 辽宁锦州 121000)

**摘要** [目的] 研究“菌灭”在健康兔体内的药物动力学规律, 为该药的合理应用提供依据。[方法] 以苯甲酰环丙沙星为内标, 建立检测菌灭浓度的 HPLC 方法。给健康家兔分别静脉注射和肌肉注射菌灭, 按照所建立的 HPLC 方法检测注射后血浆菌灭浓度的变化, 选定最佳药代动力学模型。[结果] 所建立的 HPLC 条件: 流动相为 100 ml 60% (V/V) 的甲醇溶液 (pH 3.0); 流速 1.0 ml/min; 柱温: (25.0 ± 0.5) °C; 检测波长: 278 nm。静脉注射和肌肉注射的兔血样的血样药时数据分别符合一级吸收二室和一室开放模型, 其血样中主要药动学参数, 静脉注射:  $T_{1/2\alpha} = 0.07$  h,  $T_{1/2\beta} = 0.82$  h,  $AUC = 3.51$  mg/(L·h),  $CLB = 4.57$  L/(mg·h); 肌肉注射:  $T_{1/2\alpha} = 0.33$  h,  $T_{1/2\beta} = 0.33$  h,  $T_p = 0.6$  h,  $C_{max} = 2.55$  μg/ml,  $AUC = 4.87$  mg/(L·h), 生物利用度约为 110%。[结论] 菌灭经肌肉给药吸收快, 生物利用度高, 分布广泛, 消除快。

**关键词** 菌灭; HPLC; 代谢动力学; 兔

**中图分类号** S829.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)18-08507-03

## Pharmacokinetics of Junmie for Novel Antibacterial Medicine in Rabbit

LI Jian-yong et al (Lanzhou Institute of Animal and Veterinary Pharmaceutics Sciences, CAAS, Lanzhou, Gansu 730050)

**Abstract** [Objective] The paper presents the pharmacokinetics of Junmie in healthy rabbits and thus provides a basis for its rational application. [Method] HPLC method was developed to detect the concentration of Junmie with benzoyl ciprofloxacin as internal standard. After the healthy rabbits was respectively injected Junmie intravenously or intramuscularly, plasma concentration after injection was detected with the established HPLC method so as to determine the best pharmacokinetic model. [Result] The conditions of HPLC were as follows: mobile phase was 100 ml 60% (V/V) methanol solution (pH 3.0); flow rate was 1.0 ml/min; column temperature was (25.0 ± 0.5) °C; detection wavelength was 278 nm. The concentration-time data of the plasma, collected from intravenously and intramuscularly injected rabbits, was separately in line with the two compartments and one compartment open model with the first order absorption. The main pharmacokinetic parameters of the plasma sample (i. v.) were as below:  $T_{1/2\alpha} = 0.07$  h,  $T_{1/2\beta} = 0.82$  h,  $AUC = 3.51$  mg/(L·h),  $CLB = 4.57$  L/(mg·h); the plasma sample (i. m.):  $T_{1/2\alpha} = 0.33$  h,  $T_{1/2\beta} = 0.33$  h,  $T_p = 0.6$  h,  $C_{max} = 2.55$  μg/ml,  $AUC = 4.87$  mg/(L·h). The bioavailability was approximately 110%. [Conclusion] After intramuscular administration, Junmie is absorbed and eliminated quickly with high bioavailability and extensive distribution

**Key words** Junmie; HPLC; Pharmacokinetics; Rabbit

氟喹诺酮类化合物是广泛应用于临床的广谱、高效、低毒的抗感染药物, 也是新型抗菌药物的研究对象。但是, 由于其对革兰阳性菌、厌氧菌、支原体等活性相对较低, 一些品种还具有光毒性, 该类药物尚需进一步完善。对已有品种进行结构修饰是寻找新的氟喹诺酮类化合物的方法之一。据报道, 氟喹诺酮类抗菌药的 7 位取代基影响该类化合物的抗菌活性, 与药物对细菌细胞膜的渗透能力和对 DNA 的亲合力有关, 改变 7 位取代基有可能获得抗菌效果更理想的药物<sup>[1-2]</sup>。菌灭是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所新兽药工程研究室研制的一种喹诺酮类药物, 为环丙沙星 7 位哌嗪基团乙酰化产物。药效试验表明, 菌灭对小鼠腹泻具有非常好的疗效<sup>[3]</sup>。该试验对菌灭的体内动力学进行了研究, 以期为该药的合理应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 主要药品与仪器** 菌灭和苯甲酰环丙沙星均由中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所化药室合成, 熔点、薄层色谱及光谱数据证明为纯品, 纯度分别在 99.9% 和 99.5% 以上, 批号分别为 040308 和 040315。其他试剂均为分析纯。主要仪器为旋涡混合器(上海第一医学院仪器厂)、LXJ-II 型离心机(南京第一医疗器械厂)、离心过滤器(天津开发区富集色谱技术发展公司)、Waters 高效液相色谱系统(510 型泵、TM486 可变波长紫外检测器、800 色谱工作站、680 梯度

控制仪、P3800 打印机、7725i 进样阀)。色谱柱 Kromasil ODS-1(5 μm, 4.6 mm × 250.0 mm) 购自天津市聚航科技仪器有限公司。

**1.2 实验动物** 健康新西兰家兔 5 只, 3 雄 2 雌, 体重(2.0 ± 0.2) kg, 购自中牧股份兰州生物药厂, 给药前不禁食禁水。

**1.3 给药与采样** 每只兔分别从耳缘静脉和臀部肌肉给药, 菌灭给药量为 6 mg/kg 体重。至给药一半时开始计时, 并于给药后不同时间采取静脉血, 每次 0.6 ml, 肝素抗凝, 3 500 r/min 离心 10 min 后, 分离血浆, 于 -20 °C 保存。

## 1.4 反相 HPLC 检测菌灭浓度方法的建立

**1.4.1 菌灭浓度的检测。** 分别精确量取样品 0.2 ml, 加入终浓度为 20.0 μg/ml 的内标(苯甲酰环丙沙星), 旋涡振荡; 加入 0.8 ml 甲醇, 旋涡振荡 5 min 后, 4 000 r/min 离心 15 min; 用液氮气将上清吹干后, 用 400 μl 80% (V/V) 的甲醇溶液 (pH 8.0) 溶解残渣后, 离心过滤膜过滤; 取 200 μl 滤液进样, 反相 HPLC 检测菌灭浓度。色谱条件: 流动相为 100 ml 60% (V/V) 的甲醇溶液 (pH 3.0); 流速 1.0 ml/min; 柱温: (25.0 ± 0.5) °C; 检测波长: 278 nm。

**1.4.2 色谱行为分析。** 分别以空白血浆、空白血浆 + 20.0 μg/ml 内标、空白血浆 + 20.0 μg/ml 内标 + 10.0 μg/ml 菌灭、给药后的血浆 + 20.0 μg/ml 内标进样, 测定菌灭、苯甲酰环丙沙星的保留时间( $T_R$ )。

**1.4.3 灵敏度试验。** 分别用 0.2 ml 空白血浆配制菌灭浓度为 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μg/ml 的标准血样, 并分别加入内标。按“1.4.1”中所述方法测定菌灭的浓度, 以菌灭的浓度对菌灭与内标的峰面积比

**基金项目** 中国农业科学院科研基金项目(20041001)。

**作者简介** 李剑勇(1971 -), 男, 甘肃秦安人, 博士, 研究员, 从事新兽药的研究与开发。

**收稿日期** 2009-03-10

值进行线性回归分析。

**1.4.4 精密度的试验。**分别用0.2 ml空白血浆配制含菌灭0.5、5.0、50.0  $\mu\text{g/ml}$ 的标准血样,并分别加入内标,按所建立的HPLC法,测定日内、日间精密度。

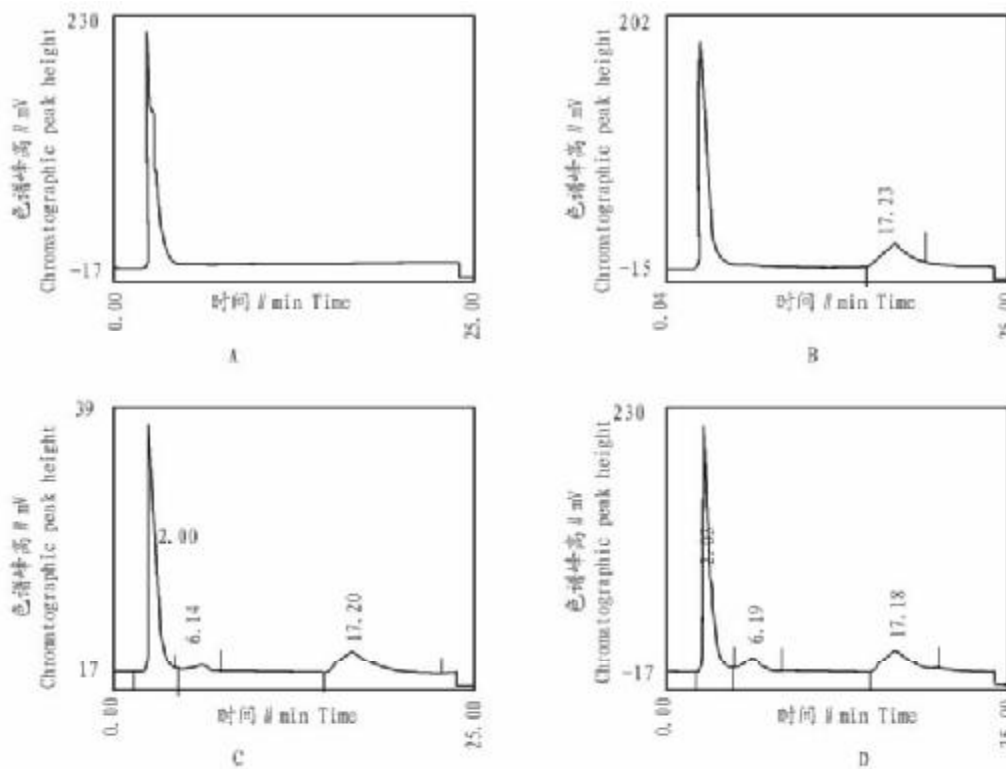
**1.4.5 回收率测定。**分别于0.2 ml空白血浆中加入菌灭0.5、5.0、50.0  $\mu\text{g/ml}$ 的标准血样,并分别加入内标。按所建立的HPLC法,连续测定3次,计算平均回收率。

**1.4.6 代谢物干扰试验。**分别在动物给药后的血浆和不给药组的血浆中加入菌灭和已知代谢物环丙沙星,确定菌灭的代谢物对原药是否有干扰作用。

**1.5 菌灭在猪体内的药物动力学** 按所建立的HPLC法,分别测定给药后15 min、30 min、1 h、1.5 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h血样中菌灭的浓度,建立菌灭在兔血浆中的浓度-时间曲线,选择最佳药物代谢动力学模型。按非线性最小二乘法用MCPKP药代动力学程序处理血药时程数据<sup>[4]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 色谱行为** 在“1.4”所述色谱条件下,空白血浆、空白血浆+内标、空白血浆+内标+菌灭、给药后的血浆+内标的色谱图见图1,菌灭、内标的保留时间( $T_R$ )分别为6.10~6.20 min和17.15~17.25 min。



注:A.空白血浆;B.空白血浆+内标;C.空白血浆+内标+菌灭;D.给药后的血浆+内标。

Note:A. Blank plasma; B. Blank plasma + internal standard; C. Blank plasma + internal standard + Junmie; D. Plasma collected administration + internal standard.

图1 菌灭的色谱行为分析

Fig.1 Chromatogram of Junmie

## 2.2 反相HPLC检测菌灭浓度方法的建立

**2.2.1 灵敏度。**灵敏度试验结果表明,菌灭浓度具有良好的线性,所建立回归方程为 $y = 5.4380x + 0.349$  ( $R^2 = 0.9999, n = 11$ ),其线性范围为0.05~100.0  $\mu\text{g/ml}$ 。

**2.2.2 精密度。**按照所建立的反相HPLC法检测标准血样中菌灭的浓度。标准血样的日内和日间精密度分别为8.77%、4.79%、2.00%和12.97%、5.54%、3.78%,分别小于9%和13%。

**2.2.3 回收率。**通过HPLC法连续3次测定不同标准血样的菌灭浓度,计算得该方法的平均回收率为 $(101.7 \pm 6.3)\%$ 。

**2.2.4 干扰试验。**菌灭体内代谢物在血液中与菌灭和内标有较好的分离度,对测定无干扰。

**2.3 菌灭在猪体内的药物动力学** 由兔血浆中的菌灭浓度-时间曲线(图2)可见,静脉注射和肌肉注射的血样药时数据分别符合一级吸收二室和一室开放模型。将血浆浓度

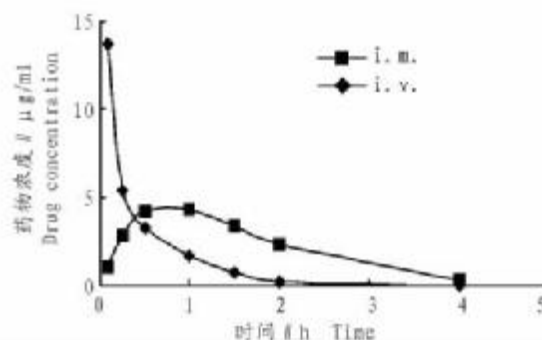


图2 兔血浆中的菌灭药时曲线

Fig.2 Plasma concentration-time curve of Junmie in rabbit

数据处理后,得各参数见表1。从表1可见,肌注菌灭的吸收半衰期短( $T_{1/2K_a} = 0.33$  h),说明菌灭经肌肉注射吸收快;0.60 h后,菌灭的血浆浓度达到高峰,峰值约为2.55  $\mu\text{g/ml}$ ;此后菌灭血浆浓度消除快,于4 h后无法用仪器检测。静脉

注射后菌灭消除较快( $T_{1/2\beta} = 0.82$  h),体内分布广。

表 1 兔血浆中的菌灭的药动学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of Junmie in plasma of rabbit

参数 Parameter	静脉注射 Intravenous injection	肌肉注射 Intramuscular injection
$C_0$ // mg/kg	18.03 ± 7.25	7.28 ± 3.22
$T_{1/2\alpha}$ // h		0.33 ± 0.16
$T_{1/2\alpha}$ // h	0.07 ± 0.02	
$T_{1/2\beta}$ // h	0.82 ± 0.26	
$T_{1/2\beta}$ // h		0.33 ± 0.27
$V_1$ // L/kg	0.64 ± 0.33	
$V_B$ // L/kg	7.36 ± 3.10	
CLB // L/(mg·h)	4.57 ± 2.63	
AUC // mg/(L·h)	3.51 ± 2.17	3.87 ± 2.33
$T_p$ // h		0.60 ± 0.29
$C_{max}$ // μg/ml		2.55 ± 2.17
生物利用率 // % Bioavailability	110	110

### 3 讨论

菌灭的提取是该试验的关键。按处理环丙沙星的办法<sup>[5-6]</sup>,加入硼砂缓冲液后,以二氯甲烷提取菌灭,再以流动相溶解测定浓度,始终未能检测到血浆中的菌灭,其主要原因是菌灭不含碱性基团。结合其分子结构上尚有羧基的特点,去除蛋白质后,再以碱性的溶剂系统溶解,测定结果令人较为满意。

内标的选择对于 HPLC 法检测药物浓度也很重要。苯

(上接第 8474 页)

### 2 虚拟筛选结果

以 TNF- $\alpha$  为靶标与粟米草中选定的化合物进行分子对

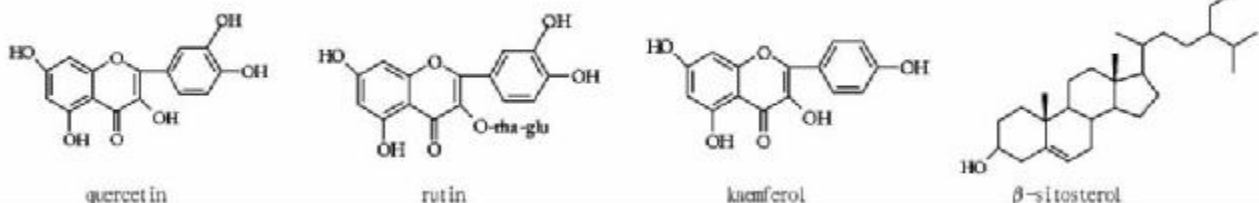


图 2 活性化合物的结构

Fig. 2 Structures of active compounds

### 3 讨论与结论

通过以上研究发现,粟米草中抑制 TNF- $\alpha$  炎症因子的活性化合物有 3 种为黄酮类化合物,而这些化合物已经为药理实验证实具有显著的抗炎作用;另一化合物  $\beta$ -sitosterol 也有实验证实它具有类似于氢化可的松和强的松等的较强抗炎作用,这证明分子对接技术具有很强的实用性和现实意义。笔者通过分子对接技术来研究粟米草中抑制 TNF- $\alpha$  活性成分,为探索粟米草抗心律失常的有效成分提供理论和实验基础,虽然只是从计算机模拟技术角度,但它具有很强的理论性和科学性,对药理活性筛选和预测具有很好的参考价值。该方法不仅可以弥补动物药理实验方法的缺陷,也减少了人力和物力的投入,更重要的是将先进的计算机筛选手段与传统的

甲酰环丙沙星与菌灭同属环丙沙星衍生物,理化性质相对比较接近,在 HPLC 柱中的分离度较大,且在测定药物浓度时无干扰物存在。因此,以苯甲酰环丙沙星作为内标比较理想。此外,内标的加入时机也影响检测的精确性,必须在血浆处理前而不是在测定前加入内标,这样可以减少样品提取分离过程引起的误差。

从该试验的结果看,菌灭经肌肉注射给药吸收快;菌灭的血浆浓度达峰时间短,消除快,药物吸收完全。此外,菌灭的腹泻造模实验表明该化合物作用较强、时间较久<sup>[3]</sup>,可能与其代谢产物环丙沙星的作用有关。因此,要确定菌灭的合理用药方案,必须进一步研究其代谢物的药动学。

### 参考文献

- [1] 贾学顺,王玉炉,何方淑,等. 1-乙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-7-(4-苯磺酰基-1-哌嗪)-3-噻啉羧酸的合成及抗菌作用[J]. 药理学,1993,28(6): 477-480.
- [2] 郭惠元,汤云,李卓荣,等. 吡啶酮类抗菌药物的研究[J]. 药理学,1987,22(5):373-376.
- [3] 周绪正,唐峰,张继瑜,等. 小鼠腹泻模型的制备及治疗试验[J]. 中兽医药杂志,2005 专辑:231.
- [4] 夏文江,成章瑞. MCPKP 药物动力学室分析的一种微机程序[J]. 中国药理学,1988(9):188-190.
- [5] 杨淑群,何海霞,周远大. 家兔静注环丙沙星后血液与眼组织分布及其药代动力学研究[J]. 中国抗生素杂志,2002,27(7):431-433.
- [6] BEHRENS B W, MARTELL J. Ciprofloxacin concentration in the rabbit aqueous humor and vitreous following intravenous and subconjunctival administration [J]. Infection,1988,16(1):54.

接,从中筛选到 quercetin、kaempferol、rutin、 $\beta$ -sitosterol 活性较好,其结构式见图 2。

中药研究结合起来,为中药研究新思路进行了有益的尝试与探索。

### 参考文献

- [1] 谢宗万. 全国中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:597.
- [2] 周凯璇,陈波,姚果原,等. 粟米草心脏药理作用的初步实验研究[J]. 九江医学,1989,6(1):7.
- [3] 姚果原,李丽,任卫琳,等. 粟米草提取物(MP876)抗心律失常作用实验研究[J]. 九江医学,1992,7(1):7.
- [4] 姚果原,卢琦华,张瑞雯,等. 粟米草提取物(MP876)的抗乌头碱及其对大鼠血浆和心肌 cAMP 的影响[J]. 中药药理与临床,1991(7):11-16.
- [5] 姚果原,卢琦华,张瑞雯,等. 粟米草抗大鼠心律失常作用及其对血浆和心肌 cAMP 的影响[J]. 九江医学,1989,4(2):12.
- [6] 李洪林,沈建华,罗小民,等. 虚拟筛选与新药发现[J]. 生命科学,2005(2):28-35.