

替米考星明胶微球在兔体内的靶向性研究

远立国^{1,2}, 李成明³, 鲍杰⁴, 朱理想², 张秀英^{1*}

(1. 东北农业大学动物医学院, 哈尔滨 150030; 2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642;
3. 佳木斯市郊区畜牧局, 佳木斯 154004; 4. 北京市动物卫生监督所, 北京 100044)

摘要: 作者旨在研究替米考星明胶微球在兔体内的靶向性。采用高效液相色谱法测定肌内注射给药不同时间兔体各脏器组织的药物浓度, 利用 3p97 药动学软件无房室模型计算药时曲线下面积, 结果显示替米考星明胶微球肺脏的靶向效率较心脏、肌肉、肝脏和肾脏提高了 5.18 ± 0.13 、 3.11 ± 0.06 、 3.94 ± 0.06 和 3.74 ± 0.02 倍; 肺脏、心脏、肌肉、肝脏和肾脏的相对摄取率分别为 8.23 ± 0.04 、 1.59 ± 0.03 、 2.65 ± 0.04 、 2.09 ± 0.02 和 2.20 ± 0.01 ; 肺脏、心脏、肌肉、肝脏和肾脏的峰浓度比分别为 2.22 ± 0.04 、 0.42 ± 0.02 、 0.46 ± 0.01 、 0.61 ± 0.02 和 0.71 ± 0.02 。表明替米考星明胶微球具有良好的肺靶向性, 同时可以减轻替米考星的心脏毒性。

关键词: 替米考星; 明胶微球; 靶向性

中图分类号: S859.796; S859.5

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)07-1097-04

Study on Targeting of Tilmicosin Gelatine Microsphere in Rabbits

YUAN Li-guo^{1,2}, LI Cheng-ming³, BAO Jie⁴, ZHU Li-xiang², ZHANG Xiu-ying^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 3. Jiamusi Suburban Husbandry Bureau, Jiamusi 154004, China; 4. Beijing Animal Sanitary Control Station, Beijing 100044, China)

Abstract: The purpose of this study was to evaluate tilmicosin gelatine microsphere targeting. The timed tilmicosin concentrations of organs from tilmicosin gelatine microsphere and injection administered rabbits were detected with high performance liquid chromatography, and the area under curve was calculated with no compartment model by 3p97, a software of pharmacokinetics. Targeting parameters of tilmicosin gelatine microsphere were analysed. Compared with tilmicosin injection, lung targeting efficiency to heart's, muscle's, liver's and kidney's was elevated by 5.18 ± 0.13 , 3.11 ± 0.06 , 3.94 ± 0.06 , 3.74 ± 0.02 times, respectively. Relative intake rate of lung, heart, muscle, liver and kidney was 8.23 ± 0.04 , 1.59 ± 0.03 , 2.65 ± 0.04 , 2.09 ± 0.02 and 2.20 ± 0.01 . The ratio of peak concentration of lung, heart, muscle, liver and kidney was 2.22 ± 0.04 , 0.42 ± 0.02 , 0.46 ± 0.01 , 0.61 ± 0.02 and 0.71 ± 0.02 , respectively. It was concluded that tilmicosin gelatine microsphere had better lung targeting and alleviated the tilmicosin-induced cardiotoxicity.

Key words: tilmicosin; gelatine microsphere; targeting

替米考星是大环内酯类动物专用抗生素, 已先后被许多国家批准用于治疗畜禽敏感菌引起的感染

性疾病, 如霉形体病^[1]、乳房炎^[2]等, 尤其是对传染性胸膜肺炎放线杆菌 (APP)^[3-4]、多杀性巴氏杆菌

收稿日期: 2008-08-11

基金项目: 黑龙江省重点攻关项目 (GA06BZ02-3)

作者简介: 远立国 (1973-), 男, 黑龙江密山人, 兽医师, 博士, 华南农业大学兽医学院从事博士后研究, 主要从事兽医药理学及新兽药新制剂研发

* 通讯作者: 张秀英 (1963-), E-mail: zxy0451@hotmail.com

(PM)^[5]等引起的呼吸系统疾病具有显著疗效。但替米考星具有一定刺激性,有时会引起过敏反应,更严重的是其对心脏的毒性。过快、过大剂量静脉或肌肉注射替米考星时,可引起负性心力,导致动物死亡^[6-7]。鉴于上述不良反应,替米考星主要采取内服和皮下注射方式给药,尤其对猪慎用注射给药,导致其在兽医临床上推广应用受到限制。作者比较研究了替米考星明胶微球和替米考星注射液在兔体内的靶向性,为改变替米考星给药途径,拓宽其应用范围,延长其使用寿命提供科学依据,并为替米考星明胶微球在猪体内的药动药效学研究提供试验支撑。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

替米考星标准品(批号:5082X),美国 Sigma-Aldrich 集团产品;替米考星原料药(纯度 75.0%),浙江海正药业有限公司产品;替米考星明胶微球,东北农业大学药理教研室自制;替米考星注射液(商品名 Micotil[®]),美国礼来动物保健品公司产品。乙腈,甲醇,四氢呋喃,二正丁胺(色谱纯),购自美国 Fisherchemicals 公司;乙酸铵(化学纯),购自北京市医药采购供应站;磷酸二氢钾,85%磷酸(分析纯),天津市东天正精细化工试剂厂产品。

1.2 主要仪器

高效液相色谱仪(型号:Waters2695),系统控制仪(型号:Alliance 系统),光敏二极管阵列检测器(型号:Waters2996),化学工作站(型号:Empower II),美国 Waters 公司;色谱柱(型号:C18 250 mm × 4.6 mm 粒径 10 μm),中国科学院大连化物所;固相萃取柱(型号:SPE-C18-E 100 mg/1 mL),广州菲罗门科学仪器公司。

1.3 替米考星明胶微球的制备

明胶 0.40 g 加入 4 mL 去离子水,在 50 °C 温水浴完全溶胀,将替米考星 0.40 g 溶于含明胶溶液中混匀。将其缓慢滴入盛有 0.75 mL Span80(2.5%) 和 30 mL 液体石蜡的 80 mL 搅拌瓶中,在相同温度水浴中,以 900 r · min⁻¹ 的速度搅拌均匀,乳化 15 min 至乳白色。然后迅速冰浴,冷却至 5 °C 以下,以细流状注入 3 mL 戊二醛(25%) 后交联固化 30 min。用 30 mL 异丙醇脱水 10 min,抽滤。最后用异丙醇、乙醚洗涤多次,真空干燥 24 h,临床使用时用生理盐水即时配制。

1.4 实验动物的分组与给药

选用 105 只大耳白家兔(雌 52 只,雄 53 只),体质量(2.00 ± 0.11)kg,购于哈尔滨汉方实验动物养殖所。舍饲不含抗菌药物的全价日粮,自由饮水,7 d 后称重编号。随机取 3 只作为空白组,按体质量腿部肌肉注射 1 mL · kg⁻¹ 生理盐水;其余动物随机分成替米考星微球组和替米考星注射液组,每组各 51 只,逐只单一剂量腿部肌肉注射,给药剂量为 10 mg · kg⁻¹(以替米考星计算)。

1.5 样品的采集与前处理

分别在给药后的第 0.25、0.50、0.75、1.00、2.00、4.00、8.00、12.00、24.00、36.00、48.00、72.00、96.00、144.00、192.00、240.00 和 288.00 小时,空气栓塞致死家兔,迅速取肺脏、心脏、肝脏、肾脏及后肢肌肉(避开给药部位),密封,避光, -20 °C 保存,待测,每个时间点 3 只。

将组织样品剪碎、匀浆,准确称取 5.0 g 匀浆液置于聚丙烯离心管中,加入乙腈,涡动 20 min,离心 10 min,取上清液;向组织凝块中分别加磷酸二氢钾缓冲液和乙腈重提,合并 2 次上清液离心 10 min,取上清液加水混匀,过 SPE 柱。流动相稀释定容至 1 mL,涡动 30 s,放置 15 min,0.22 μm 针孔式有机滤膜过滤,取 100 μL 进 HPLC 分析。

1.6 色谱条件

色谱柱:C18(10 μm,250 mm × 4.6 mm);流动相:乙腈、四氢呋喃、二正丁胺缓冲液和超纯水(体积比为 130 : 55 : 25 : 790);流速 1.0 mL · min⁻¹;进样量 20 μL;检测器为 Waters2996 Photodiode Array Detector;检测波长 287 nm。

1.7 数据处理

药时数据利用中国药理学会数学分会编制的 3p97 药代动力学程序软件处理,获得各组织峰浓度(C_p),采用无房室模型统计矩方法计算药时曲线下面积(AUC)。利用 SPSS11.5 统计软件比较靶向性参数之间的差异。

1.8 靶向性评价方法

以 AUC 和 C_p 为定量指标,各器官的相对摄取率(Re)、靶向效率(Te)和峰浓度比(C_e)3 个参数用来评价药物的靶向性。其中:Re = AUC_m/AUC_i; Te = AUC_{靶器官}/AUC_{非靶器官}; Ce = C_{p_m}/C_{p_i};式中 AUC_m 表示微球组药时曲线下面积,AUC_i 表示注射液组药时曲线下面积;AUC_{靶器官} 表示靶器官药时曲线下面积,AUC_{非靶器官} 表示非靶器官药时曲线下

面积; m 表示替米考星微球注射液, i 表示替米考星注射液。

2 结果与分析

各器官的组织样品经前处理后,采用高效液相色谱法^[8]测得的药时数据,经 3p97 处理获得各组织的峰浓度(C_p)见表 1,与替米考星注射液相比,替米考星微球在心脏、肌肉、肝脏和肾脏的峰浓度分别降低了 1.33、1.63、2.02 和 1.55 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,只有在肺脏的峰浓度增加了 9.06 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。预示替米考星制成微球后,可以改变其在各器官组织的分布。

表 1 替米考星微球与注射液的 C_e 值

Table 1 C_e value of tilmicosin microspheres and injection

组织 Tissue	$C_{p_m}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$C_{p_i}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	C_e
心脏 Heart	0.95±0.02	2.28±0.06	0.42±0.02
肌肉 Muscle	1.37±0.02	3.00±0.08	0.46±0.01
肝脏 Liver	3.18±0.11	5.20±0.29	0.61±0.02
肾脏 Kidney	3.86±0.04	5.41±0.12	0.71±0.02
肺脏 Lung	16.49±0.38	7.43±0.22	2.22±0.04

C_e . Ratio of peak concentration; m . Tilmicosin gelatine microsphere; i . Tilmicosin injection

用 3p97 中无房室模型统计矩程序计算出药时曲线下面积(AUC)列于表 2,与替米考星注射液相比,替米考星微球在心脏、肌肉、肝脏、肾脏和肺脏的 AUC 都相应增加。表明替米考星制成微球后,各器官组织对替米考星的相对摄取能力都增强。

表 2 替米考星微球与注射液的 Re 值

Table 2 Re value of tilmicosin microspheres and injection

组织 Tissue	$AUC_m/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	$AUC_i/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Re
心脏 Heart	68.72±0.53	43.26±0.85	1.59±0.03
肌肉 Muscle	109.01±0.79	41.13±0.66	2.65±0.04
肝脏 Liver	347.13±2.47	166.15±1.69	2.09±0.02
肾脏 Kidney	413.46±2.70	187.86±0.87	2.20±0.01
肺脏 Lung	1 645.69±6.25	199.88±1.04	8.23±0.04

Re . Relative uptake rate; m . Tilmicosin gelatine microsphere; i . Tilmicosin injection

表 3 的结果表明微球和注射液对肺脏都具有较高的选择性,微球制剂首先选择肺脏,随后依次为肾

脏、肝脏、肌肉和心脏,而注射液选择顺序为肺脏、肾脏、肝脏、心脏和肌肉。

表 3 替米考星微球与注射液的 Te 值

Table 3 Te value of tilmicosin microspheres and injection

组织 Tissue	Te_m	Te_i	Te_m/Te_i
心脏 Heart	23.95±0.15	4.62±0.10	5.18±0.13
肌肉 Muscle	15.10±0.07	4.86±0.10	3.11±0.06
肝脏 Liver	4.74±0.02	1.20±0.02	3.94±0.06
肾脏 Kidney	3.98±0.04	1.06±0.01	3.74±0.02

Te . Targeting efficiency; m . Tilmicosin gelatine microsphere; i . Tilmicosin injection

4 讨论

靶向给药系统是药物在靶组织释放后产生药效,此时血液循环中药物浓度大小已不能准确反映药物在靶组织中作用的强弱。但目前国际上还没有一个评价靶向性的统一标准,因而作者依据有关学者^[9]提出的脏器动力学观点,通过比较研究替米考星微球和替米考星注射液在各器官组织中靶向效率、相对摄取率和峰浓度比 3 个靶向性参数^[10],对替米考星微球的靶向特性进行评价。

靶向效率(Te)是从药物对器官的选择性角度评价靶向性。 $Te > 1$ 表示对靶器官具有选择性, Te 值愈大,选择性愈强。两种剂型 Te 的比值就是靶向性增强的倍数。虽然表 3 的数据显示替米考星注射液和微球对肺脏都具有选择性,但制成微球后的替米考星对肺脏的靶向性比对心脏、肌肉、肝脏和肾脏的选择性分别增强了 5.18±0.13、3.11±0.06、3.94±0.06 和 3.74±0.02 倍,表明替米考星微球对肺脏较对心脏更具有选择性($P < 0.05$)。这可能是因为明胶微球表面带较多的正电荷粒子,而带有正电荷的粒子较容易到达肺的缘故^[11]。

相对摄取率(Re)是从器官对药物的摄取能力方面考察靶向性。 $Re > 1$ 表示该器官对药物摄取能力增强, $Re < 1$ 表示摄取能力减弱, Re 愈大该器官摄取能力愈强。替米考星明胶微球属疏水性粒子,而疏水性粒子易于沉积在肺脏^[11],故肺脏的 Re 最大,表明肺脏摄取微球中替米考星能力最强($P < 0.01$)。心脏的 Re 最小,说明心脏摄取微球中替米考星能力最弱($P < 0.01$)。肌肉的 Re 为 2.65,较大,可能与给药途径为肌内注射有关。

峰浓度比(C_e)是从药物在器官中分布效果上

分析靶向性。 $C_e > 1$ 表示分布增加, $C_e < 1$ 表示分布减少, $C_e = 1$ 的绝对值愈大表明改变药物分布的效果愈明显。替米考星微球混悬液注射后, 与肺部的毛细血管网接触时, 直径 $7 \sim 30 \mu\text{m}$ 的将被肺部有效地截获^[11], 这是肺脏的峰浓度和 C_e 值明显增高的原因, 表明制成微球后的替米考星在肺脏分布显著增加 ($P < 0.01$), 同时相应地减少了在肾脏、肝脏、肌肉的分布, 尤其是心脏 ($P < 0.01$), 替米考星微球在心脏的峰浓度明显降低, 对减轻替米考星的心脏毒性具有重要意义。然而肌肉的分布较心脏稍高, 可能与微球在肌内注射以及在肌肉组织中缓慢释放有关。

试验验证了替米考星制成微球后, 增强了替米考星肺脏的选择性和摄取能力, 提高其在肺脏的分布; 相对降低了心脏的选择性和摄取能力, 减少了心脏的分布。表明替米考星微球在兔体内具有良好的肺靶向性, 同时可以减轻对心脏的毒性。

参考文献:

- [1] JORDAN F T W, HORROCKS B K. The minimum inhibitory concentration of tilmicosin and tylosin for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* and a comparison of their efficacy in the control of *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks [J]. *Avian Diseases*, 1996, 40: 326-334.
- [2] OWENS W E, NICKERSON S C, RAY C H. Efficacy of parenterally or intramammarily administered tilmicosin and ceftiofur against staphylococcus aureus mastitis during lactation [J]. *J Dairy sci*, 1999, 82 (3): 645-647.
- [3] FITTIPALDI N, KLOPFENSTEIN C, GOTT-SCHALK M, et al. Assessment of the efficacy of tilmicosin phosphate to eliminate *Actinobacillus pleuropneumoniae* from carrier pigs [J]. *Can J Vet Res*, 2005, 69(2): 146-150.
- [4] NERLAND E M, LEBLANC J M, FEDWICK J P, et al. Effects of oral administration of tilmicosin on pulmonary inflammation in piglets experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Am J Vet Res*, 2005, 66(1): 100-107.
- [5] BLACKALL P J, ASAKAWA T, GRAYDON R J, et al. In vitro-antibacterial properties of tilmicosin against Australian isolates of *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from pigs [J]. *Australian Veterinary Journal*, 1995, 72: 1, 35-36.
- [6] The European agency for the evaluation of medicinal products. Tilmicosin Summary Report [R]. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/Tilmicosin1.pdf>.
- [7] KART A, YAPAR K, KARAPEHLIVAN M, et al. The possible protective effect of L-carnitine on tilmicosin-induced cardiotoxicity in mice [J]. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2007, 54(3) 144-146.
- [8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [9] PAPIISOV M I, SAUELYEU V Y, SERGIENKO U B, et al. Magnetic drug targeting I in vivo kinetics of radio labelled magnetic drug carries [J]. *Int J Pharm*, 1987, 40: 201-206.
- [10] 朱盛山. 药物新剂型 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [11] 远立国. 替米考星肺靶向微球研制及其药动药效学 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2007.