

加米霉素注射液的生物利用度及药动学研究

王红霄 邓菲

(华北制药集团动物保健品有限责任公司, 石家庄 050041)

摘要: **目的** 了解加米霉素注射液在猪单剂量肌肉注射给药的药动学和生物利用度, 以指导合理用药, 降低耐药性。 **方法** 采用单剂量平行试验设计, 24 头健康二元猪随机分为 3 组, 分别于给药前和给药后第 5、8、10、15、30 和 45min, 以及 1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、96、120、144 和 168h 前腔静脉采血, 每次约 4mL, 置于肝素钠采血管中。对采集的不同时间点的血浆样品采用 UPLC-MS/MS 测定方法进行检测, 并对得到的血药浓度 - 时间数据经 WinNonlin 5.2 软件进行药动学参数分析, 计算生物利用度。 **结果** 加米霉素注射液单剂量静脉注射后, 其平均消除半衰期 ($T_{1/2\alpha}$) 为 (31.6±5.8)h, 表观分布容积 (V) 为 (41221.2±10335.5)mL/kg, 平均体清除率 (Cl) 为 (917.4±216.2)mL/(h·kg)。单剂量肌肉注射后, 其平均消除半衰期 ($T_{1/2\alpha}$) 为 (20.4±5.4)h, 达峰时间 (T_{max}) 与峰值浓度 (C_{max}) 分别为 (0.119±0.031)h 和 (1748.7±554.2)ng/mL, 表观分布容积 (V) 为 (30521.6±8531.6)mL/kg。与静脉注射比较, 加米霉素肌肉注射的绝对生物利用度为 89.00%; 与 Zactran 注射液肌肉注射比较, 加米霉素肌肉注射的相对生物利用度为 112.17%。 **结论** 加米霉素进入体内分布广泛, 清除缓慢, 半衰期较长, 肌肉注射给药吸收良好。

关键词: 加米霉素注射液; 猪; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R9, S859.79 **文献标志码:** A

Study on the bioavailability and pharmacokinetics of gamithromycin injection

Wang Hong-xiao and Deng Fei

(North China Pharmaceutical Group Animal Health Products Co., Ltd., Shijiazhuang 050041)

Abstract Objective To understand the pharmacokinetics and bioavailability of gamithromycin injection in single dose muscle infusion of swine. To guide rational drug use and reduce drug resistance. **Methods** Using single dose parallel test, 24 healthy binary hybrid-pigs were divided into 3 groups randomly. Blood samples of 4mL were collected from anterior vena cava each time before treatment, and 5, 8, 10, 15, 30, 45min, and 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 144 and 168h after injection, and placed in heparin sodium blood collection tubes. The plasma samples collected at different time points were tested by UPLC-MS/MS. The data of the plasma concentration versus time were analyzed by WinNonlin 5.2 software for pharmacokinetic parameters and for biological availability. **Results** After intravenous injection of a single dose of gamithromycin, the average elimination of half-life period ($T_{1/2\alpha}$) was (31.6±5.8)h, the apparent distribution volume (V) was (41221.2±10335.5)mL/kg, and the average clearance rate (Cl) was (917.4 ±216.2)mL/(h·kg). After the single dose of muscle injection, the average elimination of half-life period ($T_{1/2\alpha}$) was (20.4±5.4)h, the peak time (T_{max}) and peak concentration (C_{max}) were (0.119±0.031)h and (1748.7±554.2)ng/mL, and the apparent distribution volume (V) was (30521.6±8531.6)mL/kg. Compared to intravenous administration, the absolute bioavailability of gamithromycin muscle injection was 89.00%. Compared to the injection of muscle with Zactran, the relative bioavailability of gamithromycin muscle injection was 112.17%. **Conclusion** When gamithromycin administrated into the body, it was widely distributed, removed slowly, the half-life period was long, and the muscle injection was well absorbed.

Key words Gamithromycin; Porcine; Pharmacokinetic; Bioavailability

收稿日期: 2017-10-23

作者简介: 王红霄, 女, 生于 1985 年, 学士, 工程师, 主要从事新药的研究与技术开发, E-mail: 529204630@qq.com

近年来,动物源食品的安全因涉及动物与人的健康、安全用药及公共卫生,从而备受人们关注。随着猪场养殖规模的改变以及药物应用的泛滥,很多抗生素产生了耐药菌,以至于食品动物的用药安全问题日益成为社会亟待解决的问题。加米霉素(gamithromycin),分子式为 $C_{40}H_{76}N_2O_{12}$,属氮杂内酯类抗生素(图1),是由法国Merial公司研发的最新动物专用大环内酯类半合成抗生素^[1]。作为第二代大环内酯类抗生素的代表药物之一,其具有抗菌谱广、抗菌活性强、动物专用、单次给药、吸收迅速、生物利用度高、低残留、安全高效等优点,在国外已被用于预防和治疗非泌乳牛、猪的呼吸系统疾病^[1-4]。2008年,EMA(The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)规定了加米霉素在牛脂肪、肝脏、肾脏中的最大残留限量(MRL);2014年,EMA增加了加米霉素在猪肌肉、皮肤+脂肪、肝脏、肾脏中的MRL;2016年,EMA又增加了加米霉素在除牛以外的所有反刍动物肌肉、脂肪、肝脏、肾脏中的MRL。目前已有商品名为Zactran的注射液(规格:150mg/mL)在欧洲国家批准上市销售。其作为一种明确可以使用的兽用抗生素,在畜禽养殖生产中具有非常广阔的应用前景。

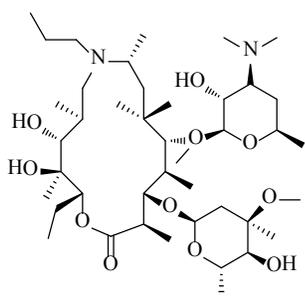


图1 加米霉素分结构式

Fig. 1 Structural formula of gamithromycin

加米霉素为动物专用的大环内酯类药物,国内外有关其在猪体内药动学及生物利用度资料较少。为更好监测受试药物在猪体内的药动学规律,本试验建立了血浆中加米霉素UPLC-MS/MS测定方法,能够满足测定要求。样品测定灵敏度较高,血浆基质对样品测定无影响。

1 试验材料与方法

1.1 药品与试剂

加米霉素对照品:含量 $\geq 99\%$,购自加拿大TRC公司,CAS:145435-72-9。加米霉素-D5对照品:含量 $\geq 94\%$,购自加拿大TRC公司,CAS:145435-72-9。

1.2 仪器与设备

液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源,Waters公司;电子分析天平:BS-210S型,北京赛多利斯天平有限公司;低温高速离心机:3K30型,德国Sigma公司;微型漩涡混合仪:WH-3型,上海沪西分析仪器厂;氮吹仪:DC12H型,上海安谱科学仪器有限公司;可调微量移液器:20~200 μ L、100~1000 μ L规格,德国Eppendorf公司。海尔冰箱:BCD-237F型,海尔集团股份有限公司。

1.3 样品的制备与保存

采集的血液,立即放入加有肝素钠的离心管中,混匀后,以4000r/min离心10min,取上层液体于一干净的离心管中,备用。-20 $^{\circ}$ C以下保存样品。

1.4 测定步骤^[1]

1.4.1 样品前处理

取200 μ L血浆,加入内标(加米霉素-D5)标准工作液50 μ L,涡动20s,加入800 μ L乙腈,涡动2min,4 $^{\circ}$ C下以5000r/min离心10min,取上清,残渣用500 μ L乙腈再提取1次,合并两次提取液于40 $^{\circ}$ C氮气吹干。用1mL 0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸溶液(1:4, V/V)溶解残渣,涡动2min,过0.22 μ m滤膜,供UPLC-MS/MS检测。

1.4.2 液相色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈ Column (50mm \times 2.1mm, 1.7 μ m);流动相:A:0.1%甲酸乙腈,B:0.1%甲酸溶液,梯度洗脱程序见表1;流速:0.35mL/min;进样量:5 μ L;柱温:30 $^{\circ}$ C。

1.4.3 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描(ESI+);检测方式:多反应监测(MRM);电离电压:3.0kV;离子源温度:150 $^{\circ}$ C;雾化温度:350 $^{\circ}$ C;锥孔气流速:50L/h;雾化气流速:700L/h;定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞能量见表2。

1.5 试验动物分组、给药及样品采集

加米霉素注射液,含量:150mg/mL;规格:50mL/瓶;批号:GMM03-1-GMM2;有效期:2年;由华北制药集团动物保健品有限责任公司提供;推荐用药方法:单次肌肉注射,6mg/kg·B·W。

预试验采用平行试验设计。5头健康二元猪随机分为两组,给药前称重,试验前12h及给药后4h禁食,其中的3头按6mg/kg·B·W剂量单次肌肉注射加米霉素注射液,另2头按6mg/kg·B·W剂量单次静脉注射加米霉素注射液。分别于给药前(0h)和给药后

表 1 UPLC 法梯度洗脱程序
Tab. 1 Gradient elution program of UPLC

t/min	流速/(mL/min)	A(0.1% 甲酸乙腈, %)	B(0.1% 甲酸溶液, %)
0	0.35	10	90
1.0	0.35	10	90
2.0	0.35	90	10
3.0	0.35	90	10
3.2	0.35	10	90
4.0	0.35	10	90

表 2 加米霉素和加米霉素-D5 内标的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

Tab. 2 Ganamycin and gammomycin-D5 internal standard qualitative, quantitative ion pair and cone voltage, collision energy

药物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
加米霉素	777.249>158.094	777.249>619.221	50	44
	777.249>619.221			34
加米霉素-D5	782.196>158.157	782.196>624.225	50	50
	782.196>624.225			32

第 5、10、15、30 和 45min, 以及 1、1.5、2、3、4、6、8、12、15、24、30、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144 和 168h 前腔静脉采血, 每次约 4mL, 置于肝素钠采血管中。采集血样经 4000r/min 离心 10min, 吸取上层血浆于聚丙烯管中, 标记后, 密封、避光, -20℃ 保存待测。

正式试验采用平行试验设计。24 头健康二元猪随机分为 3 组, 每组 8 头, 给药前称重, 试验前 12h 及给药后 4h 禁食, 一组按 6mg/kg·B·W 剂量单次肌

肉注射加米霉素注射液, 一组按 6mg/kg·B·W 剂量单次静脉注射加米霉素注射液, 另一组按 6mg/kg·B·W 剂量单次肌肉注射 Zactran 注射液。分别于给药前和给药后按上述时间点采血和制备血浆, 吸取上层血浆于聚丙烯管中, 标记后, 密封, 避光, -20℃ 保存待测。对采集的不同时间点的血浆样品采用 UPLC-MS/MS 测定方法进行检测, 并对得到的血药浓度-时间数据经 WinNonlin 5.2 软件进行药动力学参数分析, 计算生物利用度。

2 试验结果

猪通过静脉注射或肌肉注射给予加米霉素注射液以及肌肉注射对照药物 (Zactron 注射液) 后, 各时间点血浆中药动力学参数详见表 3, 药时曲线见图 2~4。

3 结论和讨论

本试验建立了血浆中加米霉素的 UPLC-MS/MS 测定方法, 方法灵敏度较高, 重现性良好, 能够满足测定要求 [3-6]。

加米霉素注射液单剂量静脉注射后, 其平均消除半衰期 ($T_{1/2\lambda_z}$) 为 (31.6±5.8)h, 平均药时曲线下面积 ($AUC_{0\rightarrow t}$) 为 (6578.4±2049.4)h·ng/mL, 平均滞留时间 ($MRT_{0\rightarrow t}$) 为 (23.4±5.5)h, 表观分布容积 (V) 为 (41221.2±10335.5)mL/kg, 平均体清除率 (Cl) 为 (917.4±216.2)mL/(h.kg)。

加米霉素注射液单剂量肌肉注射后, 其平均消除半衰期 ($T_{1/2\lambda_z}$) 为 (20.4±5.4)h, 达峰时间 (T_{max}) 与峰值浓度 (C_{max}) 分别为 (0.119±0.031)h 和 (1748.7±554.2)ng/mL,

表 3 不同剂型及给药方式的药动力学参数 (6mg/kg B.W. n=8)

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters of different dosage forms and modes of administration (6mg/kg B.W. n=8)

参数	单位	IM		IM (Zactran)		IV 组	
		平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
λ_z	1/h	0.036	0.011	0.029	0.007	0.023	0.005
$T_{1/2\lambda_z}$	h	20.4	5.4	24.7	4.9	31.6	5.8
T_{max}	h	0.119	0.031	0.325	0.347	-	-
C_{max}	ng/mL	1748.7	554.2	1064.5	160.8	-	-
$AUC_{0\rightarrow t}$	h·ng/mL	5854.7	2169.7	5219.6	1858.7	6578.4	2049.4
$AUC_{0\rightarrow\infty}$	h·ng/mL	6067.4	2162.3	5449.9	1866.9	6953.6	2057.6
$AUC_{\%Extrap_obs}$	%	3.85	2.02	4.88	2.34	5.72	2.20
V	mL/kg	30521.6	8531.6	44475.8	17829.9	41221.2	10335.5
Cl	mL/h/kg	1078.5	295.9	1365.0	969.2	917.4	216.2
$MRT_{0\rightarrow t}$	h	17.1	2.5	17.9	3.1	23.4	5.5
$MRT_{0\rightarrow\infty}$	h	20.8	3.2	23.1	2.7	31.4	8.3
F	%	89.00	-	-	-	-	-

注: “-” 表示无数据

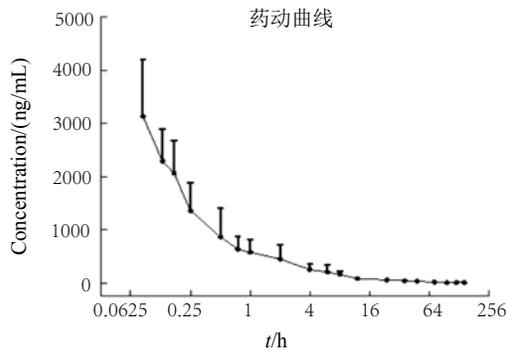


图2 猪静脉注射给予加米霉素注射液后时间-血药浓度曲线 ($n=8$)

Fig. 2 Time-blood concentration curve after administration of

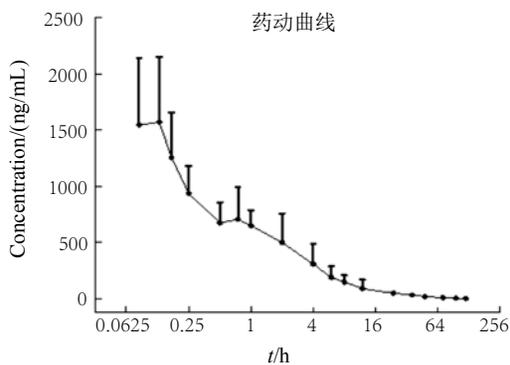


图3 猪肌肉注射给予加米霉素注射液后时间-血药浓度曲线 ($n=8$)

Fig. 3 pig muscle injection of ganamycin injection time-plasma

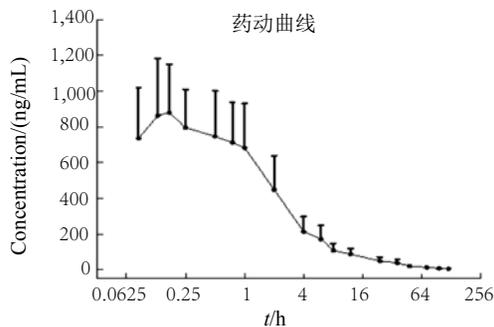


图4 猪肌肉注射给予 Zactran 注射液后时间-血药浓度曲线 ($n=8$)

Fig. 4 Time-serum concentration profile after intramuscular

平均药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow t}$) 为 $(5854.7 \pm 2162.3) \text{h} \cdot \text{ng}/\text{mL}$, 平均滞留时间 ($MRT_{0 \rightarrow t}$) 为 $(17.1 \pm 2.5) \text{h}$, 表观分布容积 (V) 为 $(30521.6 \pm 8531.6) \text{mL}/\text{kg}$, 平均体清除率 (Cl) 为 $(1078.5 \pm 295.9) \text{mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$ 。EMEA/2014 报道^[7], 加米霉素注射液以 $6 \text{mg}/\text{kg} \cdot \text{B} \cdot \text{W}$ 给猪肌肉注射后, 加米霉素被快速吸收, 其 $T_{1/2\alpha}$ 和 V 分别为 25h 和 $38 \text{L}/\text{kg}$, 与本文报道的基本一致。

Zactran 注射液单剂肌肉注射后, 其平均消除半衰期 ($T_{1/2\alpha}$) 为 $(24.7 \pm 4.9) \text{h}$, 达峰时间 (T_{\max}) 与峰值浓度

(C_{\max}) 分别为 $(0.325 \pm 0.347) \text{h}$ 和 $(1064.5 \pm 160.8) \text{ng}/\text{mL}$, 平均药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow t}$) 为 $(5219.6 \pm 1858.7) \text{h} \cdot \text{ng}/\text{mL}$, 平均滞留时间 ($MRT_{0 \rightarrow t}$) 为 $(17.9 \pm 3.1) \text{h}$, 表观分布容积 (V) 为 $(44475.8 \pm 17829.9) \text{mL}/\text{kg}$, 平均体清除率 (Cl) 为 $(1365.0 \pm 969.2) \text{mL}/(\text{h} \cdot \text{kg})$, 与 EMEA/2014 报道基本一致。

将加米霉素注射液肌肉注射给药后药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow t \text{IM}}$) 与静脉注射后药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow t \text{IV}}$) 比较, 经公式 $F_{\text{IM}} = (\text{Dose}_{\text{IV}} / \text{Dose}_{\text{IM}}) \times (AUC_{0 \rightarrow t \text{IM}} / AUC_{0 \rightarrow t \text{IV}})$, 计算得到加米霉素肌肉注射的绝对生物利用度为 89.00% ; 将加米霉素注射液肌肉注射给药后药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow t \text{IM}}$) 与 Zactran 注射液肌肉注射后药时曲线下面积 ($AUC_{0 \rightarrow t \text{Zactran}}$) 比较, 经公式 $F_{\text{IM}} = (\text{Dose}_{\text{Zactran}} / \text{Dose}_{\text{IM}}) \times (AUC_{0 \rightarrow t \text{IM}} / AUC_{0 \rightarrow t \text{Zactran}})$, 计算得到加米霉素肌肉注射的相对生物利用度为 112.17% 。说明加米霉素注射液肌肉注射给药在体内分布广泛, 特别是在肺部分布浓度较高, 消除缓慢, 半衰期较长, 吸收良好。

EMEA/2008 报道^[8], 加米霉素具有抑菌和杀菌双重作用, 加米霉素对引起牛 BRD 的溶血曼海姆菌、多杀性巴氏杆菌、睡眠嗜组织菌的最低抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC_{90}) 分别为 0.5 、 1 及 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$, 相应的 MBC_{90} 分别为 1 、 2 及 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Wyns 报道^[9], 加米霉素对引起猪呼吸道疾病的支原体 (J 株) 和传染性胸膜肺炎 (ATCC27090 参考株) 的 MIC 值分别为 0.25 和 $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。在本试验中, 给猪单次注射加米霉素注射液, 在第 6h 后平均血药浓度即低于 $0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$, 如果仅从加米霉素血药浓度高低来预测其临床疗效可能会有失偏颇。这主要是因为大环内酯类药物在肺部组织具有靶向特异性, 肺部组织浓度显著高于血药浓度, Benchaoui 报道^[10], 给猪静脉注射或肌肉注射给予泰拉霉素, 测得的肺脏组织 / 血浆药物浓度比在 $24.9:1 \sim 181:1$ 之间; Huang 报道^[11], 肉牛以 $6 \text{mg}/\text{kg} \cdot \text{B} \cdot \text{W}$ 皮下注射给以加米霉素后, 测得的肺脏组织 / 血浆药物浓度比在 $247:1 \sim 410:1$ 之间。加米霉素同其他大环内酯类药物一样, 具有较长的抗菌后效应, 这也进一步支持了加米霉素具有的较好抗菌活性。因此尽管该类药物的血药浓度小于各种病原菌的 MIC , 但仍然观察到较好的临床疗效。综上所述, 加米霉素注射液对猪呼吸系统 BRD 的病原菌感染的疗效试验, 同时结合药动学资料, 最终有助于确定该制剂的合理的临床给药方案。

大环内酯抗生素多种耐药菌的迅速出现使第一代和第二代大环内酯类抗生素的应用受到了极大限

制, 故而第二代新型大环内酯类动物专用抗生素——加米霉素应运而生。

参考文献

- [1] Siegrid D B, Mathias D, Anneleen W, *et al.* Development and validation of a liquid chromatography-tandemmass spectrometry method for the quantitative determination of gamithromycin in animal plasma, lung tissue and pulmonary epithelial lining fluid[J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1398: 73-82.
- [2] 农业部兽药评审中心. 农业部兽药评审中心. 兽药注册资料汇编 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 8-15.
- [3] 化学药物制剂人体生物利用度和生物等效性研究技术指导原则 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 2-21.
- [4] 农业部公告第 1247 号. 兽用化学药物临床药代动力学试验指导原则 [S]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 18-27.
- [5] 赵永达, 刘帅帅, 焦晓军, 等. 泰拉霉素注射液在猪体内的药物动力学及生物利用度研究 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(4): 823-828.
- [6] European Commission (EC) (2002)[EB/OL]. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, as amended by Decision 2003/181/EC, vol. 4, pp. 8-36.
- [7] EMA, 2014. European public MRL assessment report (EPMAR): Gamithromycin (porcine)[EB/OL]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2015/02/WC500183124.pdf.
- [8] EMA, 2008. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Zactran: EPAR-Scientific Discussion[EB/OL]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/veterinary/000129/WC500068716.pdf.
- [9] Wyns H, Meyer E, Plessers E, *et al.* Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in pigs[J]. *Res Veter Sci*, 2014, 96(1): 160-163.
- [10] Benchaoui H A, Nowakowski M, Sherington J, *et al.* Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine[J]. *J Veterin Pharmacol Therapeut*, 2004, 27(4): 203-210.
- [11] Huang R A, Letendre L T, Banav N, *et al.* Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 2010, 33(3): 227-237.