

马瑞霞, 郭凡溪, 苗强强, 等. 恩诺沙星油混悬注射液在犬体内的药代动力学研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (2): 71-77.

MA R X, GUO F X, MIAO Q Q, et al. Pharmacokinetic study of enrofloxacin oil suspension injection in dogs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (2): 71-77.

恩诺沙星油混悬注射液在犬体内的药代动力学研究

马瑞霞, 郭凡溪, 苗强强, 王奕萌, 王紫晗, 曹迪, 李重阳, 张冯奕驰, 余祖功*

(南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 旨在考察犬单次皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后恩诺沙星及其代谢产物的药代动力学特征。6只成年健康比格犬以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量单次皮下注射给药, 分别于给药前、后不同时间点采血并分离血浆。血浆样品经乙腈沉淀蛋白和二氯甲烷液液萃取处理后, 应用高效液相色谱法检测, 外标法定量, 对恩诺沙星和环丙沙星血药浓度计算药动学参数。结果: 恩诺沙星和环丙沙星的达峰浓度 C_{max} 分别为 $(1.28 \pm 0.19) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(0.50 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 达峰时间 T_{max} 分别为 $(3.17 \pm 0.75) \text{ h}$ 和 $(4.83 \pm 1.33) \text{ h}$, 消除相的半衰期 $t_{1/2\lambda_z}$ 分别为 $(29.39 \pm 5.54) \text{ h}$ 和 $(21.61 \pm 11.79) \text{ h}$, 药时曲线下面积 AUC_{0-t} 分别为 $(31.96 \pm 5.38) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $(8.01 \pm 1.66) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$; 恩诺沙星+环丙沙星总浓度的 $C_{\text{max-Total}}$ 为 $(1.65 \pm 0.10) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-t-Total}$ 为 $(40.21 \pm 6.38) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-24 \text{ h-Total}}$ 为 $(40.21 \pm 6.38) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, $C_{\text{max-Total}}/\text{MIC}$ 为 $3.31 \sim 27.55$, $AUC_{0-24 \text{ h-Total}}/\text{MIC}$ 为 $45.80 \sim 381.65$, $AUC_{0-t-Total}/\text{MIC}$ 为 $80.41 \sim 670.10$, $t > \text{MIC}$ 最长可达 108 h。结论: 恩诺沙星油混悬注射液在犬体内消除半衰期较长, 长效作用明显, 可实现减少给药频次的目的。

关键词: 药动学; 恩诺沙星; 油混悬注射液; 比格犬

中图分类号: S859 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)02-0071-07

Pharmacokinetic study of enrofloxacin oil suspension injection in dogs

MA Ruixia, GUO Fanxi, MIAO Qiangqiang, WANG Yimeng, WANG Zihan, CAO Di,

LI Chongyang, ZHANG-FENG Yichi, YU Zugong*

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the pharmacokinetic characteristics of enrofloxacin and its metabolites after a single subcutaneous injection of enrofloxacin oil suspension in dogs. Six healthy adult Beagle dogs were administered with a single dose of $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ subcutaneously, with blood samples collected at various time points before and after the administration, and then plasma samples were separated from the dogs. The plasma samples were processed through acetonitrile protein precipitation and dichloromethane liquid-liquid extraction, and were then analyzed using high-performance liquid chromatography with external standard quantification. Finally, the pharmacokinetic parameters for enrofloxacin and ciprofloxacin were calculated. The results were as follows: The C_{max} for enrofloxacin and ciprofloxacin were $(1.28 \pm 0.19) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(0.50 \pm 0.11) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. T_{max} were $(3.17 \pm 0.75) \text{ h}$ and $(4.83 \pm 1.33) \text{ h}$, respectively. $t_{1/2\lambda_z}$ were $(29.39 \pm 5.54) \text{ h}$ and $(21.61 \pm 11.79) \text{ h}$, respectively. AUC_{0-t} were $(31.96 \pm 5.38) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $(8.01 \pm 1.66) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The total concentrations of enrofloxacin + ciprofloxacin had a $C_{\text{max-Total}}$ of $(1.65 \pm 0.10) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $AUC_{0-t-Total}$ of $(40.21 \pm 6.38) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, and $AUC_{0-24 \text{ h-Total}}$ of $(40.21 \pm 6.38) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The $C_{\text{max-Total}}/\text{MIC}$ ranged from 3.31 to 27.55, $AUC_{0-24 \text{ h-Total}}/\text{MIC}$ from 45.80 to 381.65, and $AUC_{0-t-Total}/\text{MIC}$ from 80.41 to 670.10, with $t > \text{MIC}$ lasting up to 108 hours. In conclusion, the enrofloxacin oil suspension had a long elimination half-life in dogs, demonstrating a prolonged effect and a potential to reduce the frequency of administration.

Keywords: pharmacokinetics; enrofloxacin; oil suspension injection; Beagle dogs

恩诺沙星又名乙基环丙沙星, 是动物专用的氟喹诺酮类广谱抗菌药物, 对革兰阴性菌如大肠杆菌、巴氏杆菌、胸膜肺炎放线杆菌等, 革兰阳性菌如金黄

色葡萄球菌及支原体等均表现较高的抗菌活性。恩诺沙星通过抑制细菌 DNA 回旋酶和拓扑异构酶 IV 干扰细菌 DNA 复制过程而发挥抗菌作用^[1]。恩诺沙星进入动物体内后分布广泛, 除了中枢神经系统外几乎所有组织的药物浓度均高于血浆, 在骨、滑液、皮肤肌肉等均可达到治疗浓度, 因此血浆浓度可作为预测恩诺沙星在组织中疗效的替代标志物。恩诺沙星口服

收稿日期: 2024-04-20; 修回日期: 2024-12-25

第一作者: 马瑞霞, 女, 硕士

* 通信作者: 余祖功, 教授, 研究方向为兽药新制剂研发、新兽药作用及药动学、新兽药注册, E-mail: yuzugong@njau.edu.cn。

或注射给药后, 10%~40%在体内会转化为环丙沙星^[2]。环丙沙星的抗菌活性与恩诺沙星一样或更高, 且与恩诺沙星有相加作用, 药动学研究中常同时监测恩诺沙星和环丙沙星的体内行为^[3-6]。

国内外已批准恩诺沙星片和恩诺沙星注射液用于宠物临床, 其中用于犬的适应症为治疗消化道、呼吸道、泌尿生殖道、皮肤、伤口感染及中耳炎等^[7]。恩诺沙星片的推荐给药方案为口服, $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日1次, 连用5~10 d^[8]。恩诺沙星注射液的推荐给药方案为肌内或皮下注射, $2.5 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1~2次/d, 直至临床症状消失, 最长用药期30 d^[9]。可见无论是片剂口服给药还是常规注射液注射给药一个疗程均须多次重复给药, 耗费人力物力, 还易致动物应激, 且临床实践中往往因疏忽或其他不便而难以完全按照规定方案给药, 影响药效发挥和疾病转归。因此研发给药频次低、持效时间长的缓释恩诺沙星制剂有重要的实际意义。本研究考察了自研的长效恩诺沙星油混悬注射液在犬体内的药动学行为, 评价其缓释长效作用。

1 材料与方法

1.1 主要药物、试剂与仪器

恩诺沙星对照品, 含量99.7%, 批号H0081907, 购于中国兽医药品监察所; 盐酸环丙沙星对照品, 含量99.8%, 批号H010310, 购于中国兽医药品监察所; 恩诺沙星油混悬注射液, 规格为10%, 实验室自制; 乙腈, 色谱级, 购于北京百灵威科技有限公司; 磷酸、二氯甲烷, 分析纯, 购于广东光华科技股份有限公司; 三乙胺, 分析纯, 购于上海麦克林生化科技股份有限公司; Waters e2695型高效液相色谱仪, 美国Waters公司。

1.2 实验动物

成年健康比格犬6只, 雌雄各半, 体重(10.85 ± 1.65) kg, 购自江苏亚东实验动物研究中心, 生产许可号: SCXK(苏)2016-0009。动物饲养于南京农业大学实验动物中心, 饲喂不含任何药物的实验犬维持饲料, 自由饮水, 在试验前至少14 d内不给予任何药物。所有动物试验均按照南京农业大学动物伦理委员会的指导方针进行, 动物福利与伦理批准号为NJAU.No20220922175。

1.3 主要溶液的制备

恩诺沙星储备液: 精确称量恩诺沙星对照品0.0125 g置于25 mL量瓶中, 加入适量流动相, 超声使溶解并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 制成 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。盐酸环丙沙星储备液: 精确称量盐酸环丙沙星对照品

0.0141 g置于25 mL量瓶, 加入适量流动相, 超声使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成环丙沙星浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 于 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下储存。

系列工作液: 将恩诺沙星储备液和盐酸环丙沙星储备液等比例混匀, 用流动相精密稀释成浓度均为 1.25 、 5 、 12.5 、 25 、 50 、 100 、 $150 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标曲混合工作液和浓度均为 1.25 、 2.5 、 75 、 $125 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列质控混合工作液, 于 $2 \sim 8 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.4 血浆样品检测色谱条件

固定相为十八烷基硅烷键合硅胶柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$), 流动相为 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸溶液: 乙腈($84:16$), 流速为 $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长为 278 nm , 进样量为 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 柱温为 $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.5 血浆样品预处理

取血浆样品 $500 \text{ } \mu\text{L}$, 加入 $50 \text{ } \mu\text{L}$ 磷酸, 涡旋1 min, 加入1 mL乙腈, 涡旋3 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 上清液移至5 mL离心管内, 加入1.5 mL二氯甲烷, 涡旋3 min, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min, 将上清液移至1.5 mL离心管中, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min后精确吸取 $20 \text{ } \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪。

1.6 血浆样品检测方法学验证

1.6.1 专属性

取6只不同犬的空白血浆样品、空白血浆加恩诺沙星和环丙沙星对照品溶液、恩诺沙星油混悬注射液给药后的犬血浆样品, 按照1.5方法处理后进样检测。

1.6.2 标准曲线和线性范围

取空白血浆 $480 \text{ } \mu\text{L}$, 加入系列标曲混合工作液 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 制成浓度为 0.05 、 0.2 、 0.5 、 1 、 2 、 4 、 $6 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列标曲混合血浆样品, 按照1.5方法处理后进样检测。以恩诺沙星浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制恩诺沙星标准曲线。以环丙沙星浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制环丙沙星标准曲线。

1.6.3 准确度和精密度

取空白血浆 $480 \text{ } \mu\text{L}$, 加入系列质控混合工作液 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 制成浓度为 0.05 、 0.1 、 3 、 $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列质控混合血浆样品。每个浓度5个平行, 连续制备并测定3个分析批, 根据当日的标准曲线方程求得质控样品浓度, 计算准确度、批内($n=5$)及批间($n=15$)精密度。

1.6.4 稳定性

对低、高浓度的质控样品进行下述条件的稳定性考察: 预处理后样品自动进样室放置24 h稳定性,

血浆样品-20℃冻融1次稳定性, 血浆样品-20℃长期放置40d稳定性, 每个浓度3个平行。

1.7 药动学试验设计

6只成年健康比格犬以 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量颈部皮下注射自制恩诺沙星油混悬注射液。试验当天于给药前采集空白血液(0h), 给药后于0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、14、24、30、36、48、54、60、72、78、84、96、102和108h各时间点于犬的前肢头静脉采血3mL, $3\,954\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min分离血浆, 于-20℃冻存, 待测。

1.8 数据统计与分析

将测得的恩诺沙星和环丙沙星峰面积代入当天制得的标准曲线中, 分别进行计算得到各自的血药浓度。使用Winonlin软件8.1.0版本以非房室模型分析自制恩诺沙星油混悬注射液经犬皮下给药后恩诺沙星、环丙沙星、恩诺沙星+环丙沙星的血药浓度数据, 获得药动学参数。

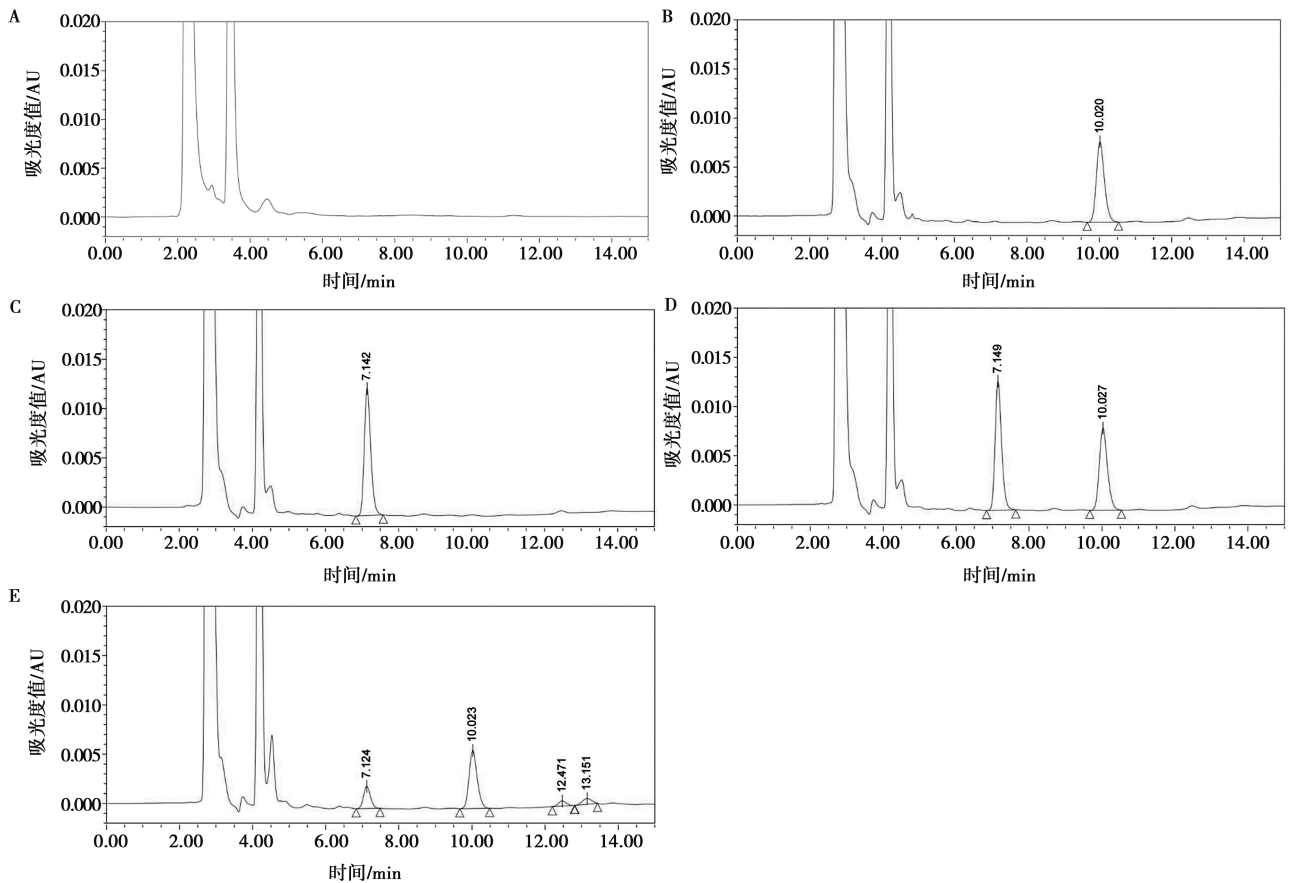
恩诺沙星为浓度时间双依赖型药物, 基于环丙沙星与恩诺沙星的抗菌活性有相加作用, 本文依据恩诺沙星、恩诺沙星+环丙沙星的血药浓度, 从浓度依赖方面计算恩诺沙星单独的药峰浓度(C_{\max}), 药时曲线下面积($AUC_{0-24\text{ h}}$ 、 AUC_{0-t}), 恩诺沙星+环丙沙星总的 $C_{\max\text{-Total}}$ 、 $AUC_{0-24\text{ h-Total}}$ 、 $AUC_{0-t\text{-Total}}$, 与敏感菌最低抑菌浓度(MIC)的比值; 从时间依赖方面, 分析在MIC之上的血药浓度持续时间即 $t>\text{MIC}$, 以评价自研的恩诺沙星油混悬注射液的长效缓释作用^[6,10-11]。

2 结果与分析

2.1 方法学验证

2.1.1 专属性

专属性试验色谱见图1。结果显示, 环丙沙星的保留时间约为7.1min, 恩诺沙星的保留时间约为10.0min, 二者之间互不干扰, 保留时间处均没有干扰峰, 与相邻杂质峰完全分离, 专属性良好。



A. 空白血浆样品; B. 空白血浆加 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 恩诺沙星标准溶液; C. 空白血浆加 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 环丙沙星标准溶液; D. 空白血浆加 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 恩诺沙星和环丙沙星标准混合溶液; E. 给药后1h的药动血浆样品。

图1 恩诺沙星专属性试验典型色谱

2.1.2 标准曲线和定量下限

由表1可见, 恩诺沙星和环丙沙星在 $0.05\sim 6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与各自峰面积的线性关系良好, $R^2>$

0.99 , 定量下限实测浓度与标示值的准确度偏差均在 $\pm 20\%$ 范围内, 其余浓度的准确度偏差均在 $\pm 15\%$ 以内。

表 1 恩诺沙星标准曲线回归方程及相关系数

分析物	批次	线性方程	R^2	定量下限准确度偏差	
				最高值绝对值	其他浓度准确度偏差最高值绝对值
恩诺沙星	1	$y = 130\ 665.6x - 2\ 062.493$	0.999 9	1.67	1.67
	2	$y = 132\ 214.3x - 1\ 033.723$	0.999 9	4.98	2.18
	3	$y = 130\ 560.8x - 1\ 228.683$	0.999 9	0.22	2.02
环丙沙星	1	$y = 160\ 258.7x - 2\ 792.889$	0.999 8	8.36	5.37
	2	$y = 161\ 860.2x - 1\ 705.050$	0.999 9	3.76	3.03
	3	$y = 159\ 174.3x - 2\ 384.411$	0.999 8	2.82	3.88

2.1.3 准确度和精密度

恩诺沙星和环丙沙星的准确度和精密度试验结果见表 2。结果显示,恩诺沙星和环丙沙星的定量下限准确度在标示值的 90.98%~114.30% 范围内,批内

及批间 RSD 在 1.06%~10.08% 范围内;低、中、高浓度的准确度在标示值的 88.01%~105.95% 范围内,批内及批间 RSD 在 0.71%~7.3% 范围内,表明该方法准确度高、精密度好。

表 2 准确度与精密度试验结果

分析物	添加浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均准确度/%			批内 RSD /%			批间 RSD /%
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 1	批次 2	批次 3	
恩诺沙星	0.05	112.59	90.98	111.51	4.34	1.06	1.35	10.08
	0.1	101.88	88.01	102.24	2.90	1.47	1.30	7.30
	3	103.64	88.57	101.95	2.09	1.36	0.71	7.25
	5	101.82	91.67	105.95	1.32	2.29	2.90	6.57
环丙沙星	0.05	114.30	97.67	103.49	4.12	1.94	1.57	7.21
	0.1	105.90	96.27	96.35	2.63	0.79	3.07	5.20
	3	105.02	99.02	98.72	1.96	0.75	1.14	3.23
	5	105.47	101.50	103.83	3.14	1.74	2.95	2.89

2.1.4 稳定性

血浆中药物稳定性考察结果见表 3。结果显示,血浆中恩诺沙星和环丙沙星浓度的准确度均在标示浓

度的 85%~115% 内,且 RSD 小于 15%,表明恩诺沙星血浆样品在不同储存条件下稳定性良好。

表 3 稳定性试验结果

分析物	储存条件	添加浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均准确度/%	RSD /%
恩诺沙星	自动进样室放置 24 h	0.1	92.48±3.14	3.40
		5	104.39±1.59	1.52
	-20 °C 冻融 1 次	0.1	93.22±5.17	5.55
		5	103.63±1.04	1.00
	-20 °C 长期放置 40 d	0.1	90.68±2.24	2.47
		5	101.26±2.41	2.38
环丙沙星	自动进样室放置 24 h	0.1	98.42±3.15	3.20
		5	102.81±2.69	2.62
	-20 °C 冻融 1 次	0.1	99.00±4.92	4.97
		5	106.29±0.80	0.76
	-20 °C 长期放置 40 d	0.1	97.32±2.13	2.19
		5	104.25±3.99	3.83

2.2 血药浓度

6只受试犬以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后，体内恩诺沙星、环丙沙星及恩诺沙星+环丙沙星的平均血药浓度数据见表4，药时曲线见图2。直至给药后108 h，恩诺沙星平均血药浓度仍达 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表4 犬皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后恩诺沙星和环丙沙星的血药浓度 ($n=6$) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

时间/h	恩诺沙星	环丙沙星	恩诺沙星+环丙沙星
0	0	0	0
0.25	0.32 ± 0.04	0	0.35 ± 0.03
0.5	0.46 ± 0.06	0.14 ± 0.07	0.59 ± 0.11
1	0.52 ± 0.08	0.21 ± 0.09	0.73 ± 0.15
2	0.87 ± 0.38	0.29 ± 0.12	1.16 ± 0.31
3	1.13 ± 0.19	0.38 ± 0.14	1.50 ± 0.27
4	1.07 ± 0.11	0.44 ± 0.13	1.51 ± 0.18
6	0.95 ± 0.10	0.46 ± 0.13	1.41 ± 0.18
8	0.92 ± 0.09	0.35 ± 0.09	1.27 ± 0.12
10	0.84 ± 0.10	0.26 ± 0.08	1.10 ± 0.15
12	0.77 ± 0.22	0.21 ± 0.07	0.98 ± 0.23
14	0.62 ± 0.10	0.16 ± 0.04	0.78 ± 0.10
24	0.46 ± 0.14	0.13 ± 0.04	0.59 ± 0.15
30	0.37 ± 0.11	0.09 ± 0.02	0.46 ± 0.11
36	0.27 ± 0.07	0.08 ± 0.03	0.35 ± 0.08
48	0.20 ± 0.06	0.06 ± 0.03	0.26 ± 0.07
54	0.18 ± 0.06	0.05 ± 0.00	0.22 ± 0.07
60	0.17 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.06
72	0.15 ± 0.05	ND	0.15 ± 0.05
78	0.13 ± 0.05	ND	0.13 ± 0.05
84	0.11 ± 0.03	ND	0.11 ± 0.03
96	0.10 ± 0.04	ND	0.10 ± 0.04
102	0.09 ± 0.04	ND	0.09 ± 0.04
108	0.10 ± 0.03	ND	0.10 ± 0.03

注：浓度低于定量限并于 C_{max} 前采集的样品以零记，浓度低于定量限并于 C_{max} 后采集的样品以 ND 表示。

2.3 药动学参数

6只受试犬以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后，对体内恩诺沙星、环丙沙星及恩诺沙星+环丙沙星的血药浓度数据进行药动学参数分析，其消除相斜率 (λ_z)、消除相的半衰期 ($t_{1/2\lambda_z}$)、达峰时间 (T_{max})、达峰浓度 (C_{max})、药时曲线下面积 (AUC)、表观分布容积 (V_z/F)、消除率 (Cl/F)、平均滞留时间 (MRT) 结果见表5。犬皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后，体内恩诺沙星的 T_{max} 和 $t_{1/2\lambda_z}$

分别为 $(3.17 \pm 0.75) \text{ h}$ 和 $(29.39 \pm 5.54) \text{ h}$ ，显示恩诺沙星油混悬注射液给犬皮下注射后释药缓慢；同时 C_{max} 为 $(1.28 \pm 0.19) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，低于常规制剂以相同剂量皮下注射给药后的 C_{max} ，显示恩诺沙星油混悬注射液给犬皮下注射后释药平稳，未发生突释情况，安全性更高。

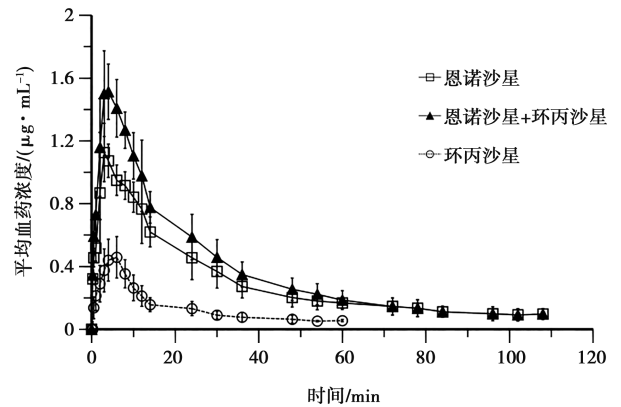


图2 犬皮下注射恩诺沙星油混悬液后恩诺沙星和环丙沙星平均血药浓度-时间曲线

2.4 药动学与 MIC 分析

以选择肠杆菌科和葡萄球菌科的 MIC90 及 MIC 折点 (敏感)，即 0.06 、 0.12 、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 三种代表性的 MIC 值，计算了恩诺沙星和环丙沙星的 C_{max} 、 AUC 、 $C_{\text{max-Total}}$ 和 AUC_{Total} 与 MIC 的比值，并列举 $t > \text{MIC}$ 值，从浓度依赖和时间依赖两方面进行恩诺沙星油混悬注射液的有效性评估，结果见表6。结果可见，对 0.06 和 $0.12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ， $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 、 $C_{\text{max-Total}}/\text{MIC}$ 在 $10.65 \sim 27.55$ 之间，满足大于 8 的要求； AUC/MIC 、 $AUC_{\text{Total}}/\text{MIC}$ 在 $143.20 \sim 670.10$ 之间，满足大于 100 的要求，在浓度依赖型方面显示有效； $t > \text{MIC}$ 分别为 108 和 78 h，在时间依赖方面长效时间长达 3~4 d，在时间依赖型方面显示长效。

3 讨论

生物样品分析方法的准确可靠、高效便捷对药动学研究意义重大。恩诺沙星血药浓度检测前处理方法多采用沉淀蛋白后氮气吹干的方法，但氮气吹干步骤耗时较长^[12-13]。李朋朋等^[14]放弃了氮气吹干步骤，在乙腈沉淀蛋白后经二氯甲烷液液萃取，取水层进行分析，效率大大提高，但该方法未验证环丙沙星的适用性。故本研究在该方法基础上优化了提取步骤并进行了方法学验证，结果显示，恩诺沙星和环丙沙星互不干扰且保留时间处无杂峰干扰，专属性良好；恩诺沙星和环丙沙星均在 $0.05 \sim 6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度范围内与峰面积线性良好 ($R^2 > 0.99$)，准确度和精密度高，

适用于同时分析犬血浆中恩诺沙星和环丙沙星浓度。

恩诺沙星常规制剂以口服或注射给药后,在犬体内的半衰期均较短,内服的半衰期为 3.7~5.8 h,静脉注射的半衰期为 2.4 h,肌肉注射的半衰期为 4~5 h^[15],如 Intorre 等^[16]报道了比格犬静脉注射恩诺沙星后,其 $t_{1/2\beta}$ 为 (2.74±0.25) h, Küng 等^[17]报道了健康比格犬静注和口服恩诺沙星后, $t_{1/2\beta}$ 分别为

3.7 h 和 2.4 h。本研究中,比格犬以 20 mg·kg⁻¹ 的剂量单次皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后,恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星的 $t_{1/2\alpha}$ 分别为 (29.39±5.54) h 和 (21.61±11.79) h,且直至给药后 108 h,恩诺沙星平均血药浓度仍达 0.1 μg·mL⁻¹,半衰期显著高于文献报道,血药浓度持续时间显著延长,缓释效果明显。

表 5 犬皮下注射恩诺沙星油混悬注射液后恩诺沙星和环丙沙星的药动学参数

药动学参数	恩诺沙星	环丙沙星	恩诺沙星+环丙沙星
λ_z/h^{-1}	0.02±0.00	0.04±0.02	0.03±0.01
$t_{1/2\alpha}/h$	29.39±5.54	21.61±11.79	27.94±11.16
T_{max}/h	3.17±0.75	4.83±1.33	3.17±0.75
$C_{max}/(\mu g \cdot mL^{-1})$	1.28±0.19	0.50±0.11	1.65±0.10
$AUC_{0 \rightarrow t}/(\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	31.96±5.38	8.01±1.66	40.21±6.38
$AUC_{0 \rightarrow \infty}/(\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	35.59±6.10	9.65±1.85	43.84±7.55
$AUC_{0 \rightarrow 24 h}/(\mu g \cdot h \cdot mL^{-1})$	17.18±1.66	5.71±1.37	22.90±2.62
$V_z/F/(L \cdot kg^{-1})$	24.50±6.36	64.04±30.94	18.40±5.99
$Cl/F/(L \cdot h^{-1} \cdot kg^{-1})$	0.58±0.13	2.15±0.46	0.47±0.10
$MRT_{0 \rightarrow t}/h$	29.70±5.17	17.31±4.24	27.44±4.64
$MRT_{0 \rightarrow \infty}/h$	41.47±10.21	29.79±13.25	37.29±12.37

表 6 药动学参数与 MIC 的对比

项目	MIC/ $(\mu g \cdot mL^{-1})$	C_{max}/MIC	$AUC_{0-24 h}/MIC$	AUC_{0-t}/MIC	$t>MIC/h$
恩诺沙星	0.06	21.30	286.41	532.71	108
	0.12	10.65	143.20	266.35	78
	0.5	2.56	34.37	63.93	14
恩诺沙星+环丙沙星	0.06	27.55	381.65	670.10	108
	0.12	13.78	190.82	335.05	78
	0.5	3.31	45.80	80.41	24

恩诺沙星属于浓度和时间双依赖型抗菌药物,在浓度依赖型方面常以 C_{max}/MIC 比为 8~10 或 $AUC/MIC > 100$ 为最佳杀菌效果指标,时间依赖型方面多以高于 MIC 以上的血药浓度维持时间 $t > MIC$ 为持效指标^[18-19]。恩诺沙星对犬源多杀性巴氏杆菌、耶尔森菌、大肠杆菌等的 MIC 为 0.008~0.06 μg·mL⁻¹,对葡萄球菌的 MIC₉₀ 为 0.06~0.12 μg·mL⁻¹,对沙门菌 MIC₉₀ 小于 0.125 μg·mL⁻¹^[20-22]。CLSI 公布的动物源细菌抗菌药物敏感性试验纸片法与稀释法执行标准信息附录第二版中,恩诺沙星对犬源肠杆菌科细菌和葡萄球菌的 MIC 折点均为 ≤0.5 μg·mL⁻¹ (敏感),1~2 μg·mL⁻¹ (中介)和 ≥4 μg·mL⁻¹ (耐药)。环丙沙星具有与恩诺沙星相同,甚至更强的抗菌活性,且二者有相加作用,故诸多研究采用恩诺沙星+环丙沙星的浓度 $C_{max-Total}$ 和 AUC_{Total} 进行有效性评

价^[3-6]。Eshar 等^[23]和 Cole 等^[24]在犬注射恩诺沙星的药动学研究中,选择 0.5 μg·mL⁻¹ 的 MIC 值,对比 $C_{max-Total}/MIC$ 和 AUC_{Total}/MIC 来评估有效性。Rao 等^[25]选择 0.1 μg·mL⁻¹ 的 MIC 值,对比恩诺沙星与环丙沙星总浓度在 MIC 之上的持续时间即 $t > MIC$ 来进行恩诺沙星给药方案的选择。本研究选择 0.06、0.12、0.5 μg·mL⁻¹ 三种代表性的 MIC 值, C_{max} 、 AUC 、 $C_{max-Total}$ 和 AUC_{Total} 与 MIC 的比值,同时考察 $t > MIC$,从浓度依赖和时间依赖两方面进行评估,结果对于 MIC 值为 0.06 μg·mL⁻¹ 和 0.12 μg·mL⁻¹ 时, C_{max}/MIC 、 $C_{max-Total}/MIC$ 均大于 10, $AUC_{0-24 h}/MIC$ 、 AUC_{0-t}/MIC 、 $AUC_{0-24 h-Total}/MIC$ 、 $AUC_{0-t-Total}/MIC$ 均大于 143.20,在浓度依赖型方面满足有效性标准; $t > MIC$ 分别为 108 和 78 h,在时间依赖方面长效时间长达 3~4 d;均显示恩诺沙星油混悬注射液可以有

效、长效杀菌。MIC 值为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, $C_{\text{max}}/\text{MIC}$ 、 $C_{\text{max-Total}}/\text{MIC}$ 为 2.56 和 3.30, $AUC_{0-24\text{h}}/\text{MIC}$ 、 $AUC_{0-24\text{h-Total}}/\text{MIC}$ 为 34.37 和 45.80, AUC_{0-t}/MIC 和 $AUC_{0-t-Total}/\text{MIC}$ 为 63.92 和 80.42。也有报道 AUC/MIC 值在 30~50 之间恩诺沙星即可有效治愈细菌感染^[10-11]。

以上结果表明,恩诺沙星油混悬注射液以 $20 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量皮下注射对敏感菌有长效作用,因此可以研发相应的缓释制剂实现减少给药频次的目的。

参考文献:

[1] CORREIA S, POETA P, HEBRAUD M, et al. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? [J]. J Med Microbiol, 2017, 66 (5): 551-559.

[2] 陈杖榴, 曾振灵. 兽医药理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.

[3] RIDDLE C, LEMONS C L, PAPICH M G, et al. Evaluation of ciprofloxacin as a representative of veterinary fluoroquinolones in susceptibility testing [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (4): 1636-1637.

[4] TERESA TEJEDOR M, MARTÍN J L, NAVIA M, et al. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections [J]. Vet Microbiol, 2003, 94 (4): 295-301.

[5] LAUTZENHISER S J, FIALKOWSKI J P, BJORLING D, et al. *In vitro* antibacterial activity of enrofloxacin and ciprofloxacin in combination against *Escherichia coli* and staphylococcal clinical isolates from dogs [J]. Res Vet Sci, 2001, 70 (3): 239-241.

[6] PIRRO F, SCHEER M, DE JONG A. Additive *in vitro* activity of enrofloxacin and its main metabolite ciprofloxacin [C]. Proceedings of the European Society of Veterinary Dermatology-European Congress of Veterinary Dermatology 14th Annual Congress, Pisa, 1997: 199.

[7] TROUCHON T, LEFEBVRE S. A review of enrofloxacin for veterinary use [J]. Open J Vet Med, 2016, 6 (2): 40-58.

[8] 中华人民共和国农业农村部. 农业农村部公告第 173 号 [EB/OL]. (2019-05-22). http://www.xmsyj.moa.gov.cn/zfw/201905/t20190522_6313857.htm.

[9] 沈建忠, 冯忠武, 曹兴元. 兽药手册 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2016.

[10] PAPICH M A, RIVIERE J E. Fluoroquinolone antimicrobial drugs [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2009 (1): 983-1010.

[11] DRUSANO G, LABRO M T, CARS O, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of fluoroquinolones [J]. Clin Microbiol Infect, 1998, 4: S27-S41.

[12] 冯万宇, 陈亮, 苗艳, 等. 恩诺沙星悬乳剂肌注给药在鸡体内的

药动学研究 [J]. 家禽科学, 2022 (5): 20-24.

[13] 孙红祥, 严新星. 长效恩诺沙星注射液体外释药实验及在山羊体内的药动学研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2004 (1): 111-114.

[14] 李朋朋, 周德刚, 付旭东, 等. 新晶型恩诺沙星注射液在猪体内的药物动力学研究 [J]. 2013, 49 (8): 81-83.

[15] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 一部 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2020: 272-276.

[16] INTORRE L, MENGOZZI G, MACCHERONI M, et al. Enrofloxacin-theophylline interaction: influence of enrofloxacin on theophylline steady-state pharmacokinetics in the beagle dog [J]. J Vet Pharmacol Ther, 1995, 18 (5): 352-356.

[17] KÜNG K, WANNER M. Pharmacokinetics of baytril (enrofloxacin) in dogs [J]. Schweizer Arch Tierheilkd, 1994, 136 (10): 329-334.

[18] DEMANUELLE T C, IHRKE P J, BRANDT C M, et al. Determination of skin concentrations of enrofloxacin in dogs with pyoderma [J]. Am J Vet Res, 1998, 59 (12): 1599-1604.

[19] BIDGOOD T L, PAPICH M G. Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2005, 28 (4): 329-341.

[20] BLONDEAU J M, BORSOS S, BLONDEAU L D, et al. *In vitro* killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat [J]. Vet Microbiol, 2012, 155: 284-290.

[21] BOOTHE D M, BOECKH A, SIMPSON R B, et al. Comparison of pharmacodynamic and pharmacokinetic indices of efficacy for 5 fluoroquinolones toward pathogens of dogs and cats [J]. J Vet Intern Med, 2006, 20 (6): 1297-1306.

[22] MITCHELL M A. Enrofloxacin [J]. J Exot Pet Med, 2006, 15 (1): 66-69.

[23] ESHAR D, WRIGHT L T, MCCULLOUGH C E, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin following single-dose subcutaneous injection in black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) [J]. Am J Vet Res, 2018, 79 (6): 658-663.

[24] COLE L K, PAPICH M G, KWOCKHA K W, et al. Plasma and ear tissue concentrations of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in dogs with chronic end-stage otitis externa after intravenous administration of enrofloxacin [J]. Vet Dermatol, 2009, 20 (1): 51-59.

[25] RAO G S, RAMESH S, AHMAD A H, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goats given enrofloxacin alone and in combination with probenecid [J]. Vet J, 2002, 163 (1): 85-93.