

强力霉素壳聚糖纳米粒冻干粉的体内外释药特性

沈丹怡^{1,2}, 艾晓辉^{1*}, 刘永涛¹, 丁运敏¹, 余少梅^{1,3}, 索纹纹^{1,3}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 浙江省慈溪市水产技术推广中心, 浙江 慈溪 315300;

3. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 分别采用紫外分光光度法和超高效液相色谱法研究强力霉素原料药与强力霉素壳聚糖纳米粒冻干粉的体内外释药特性。结果表明: 强力霉素原料药在人工胃液、肠液和 pH7.4 磷酸缓冲液中的体外释放均可用零级动力学方程拟合, 释放较快, 在 1 h 内能完全溶出; 强力霉素壳聚糖纳米粒冻干粉具有显著的缓释特性, 在各介质中的体外释放均可用双相动力学方程拟合, 前期表现为快速释放, 后期为缓慢释放, 冻干粉在各介质中的释药速率从大到小依次为: pH2.0 人工胃液 > pH3.0 人工胃液 > pH4.0 人工胃液 > 人工肠液 > pH7.4 磷酸缓冲液。强力霉素原料药包裹成强力霉素壳聚糖纳米粒冻干粉后, 经 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 20 mg/kg 单剂量口灌, 在斑点叉尾鲟的药-时曲线由双峰变为单峰, 在血浆中的血药峰浓度 (C_{\max}) 减小, 峰值时间 (T_{\max}) 和消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$) 明显延长, 药-时曲线下面积 (AUC) 变大, 是一种理想的强力霉素新剂型。

关键词: 斑点叉尾鲟; 强力霉素; 纳米粒; 冻干粉; 体外释药; 药代动力学

中图分类号: S 948

文献标志码: A

强力霉素(doxycycline, DC)是四环素类广谱抗生素, 对多种革兰氏阳性菌、阴性菌、立克次氏体、螺旋体等均有效^[1]。DC 抗逆性差, 遇光、热、氧易降解变质^[2], 在水产动物体内的药物释放也不稳定, 有效血药浓度维持时间短, 药物峰浓度时可能超出最低中毒浓度, 对水产动物产生副作用, 低浓度又不能显效。DC 给药次数和频率大, 既增加了劳力物力, 又造成药物代谢缓慢, 产生耐药性, 引起肝肾毒性, 导致药物残留^[3]。壳聚糖纳米粒(chitosan nanoparticles, CS-NPs)可使药物有效隔绝空气中的光、热、氧, 提高药物在运输及施药过程中的稳定性。由于其粒径小, 表面积大, 与生物膜的黏着性高, 具有药物缓释和药物靶向能力^[4-5], 能维持有效的血药浓度, 延长半衰期, 降低药物浓度过高引起的毒副作用, 减少用药剂量和用药频率^[6], 可用较少的剂量达到较高的药效。目前对于

CS-NPs 在模拟释放介质及动物体内的药代动力学研究较多, 而在水产动物体内的释药特性研究鲜有报道。本实验以 DC 原料药为参比, 研究 DC-CS-NPs 冻干粉在人工胃液、肠液、pH7.4 磷酸缓冲液(PBS)的体外释药特性及其在斑点叉尾鲟体内的药代动力学研究, 可为 DC 新剂型的开发应用提供有用的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

斑点叉尾鲟(*Ictalurus punctatus*), 由中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场提供, 平均质量为 (167 ± 12) g, 健康无病。实验前在水族箱内暂养一周, 实验水温为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 为 7.5 ~ 8.0, 饲喂不加抗菌药物的斑点叉尾鲟全价配合饲料。实验前对斑点叉尾鲟进行抽检表明血液中含 DC。

收稿日期: 2011-11-19 修回日期: 2012-02-22
资助项目: 农业部公益性行业科研专项经费项目(201203085)
通讯作者: 艾晓辉, E-mail: aixh@yfi.ac.cn

1.2 试剂

DC 原料药(含量 $\geq 98\%$); DC 标准品(纯度 $\geq 99.0\%$); DC-CS-NPs 冻干粉(自制); 空白 CS-NPs 冻干粉(自制); 浓盐酸; 高氯酸; 氢氧化钠; 磷酸二氢钾; 磷酸二氢钠; 胃蛋白酶; 胰酶; 乙腈; 肝素钠; 所用试剂浓盐酸为优级纯, 乙腈为色谱纯, 其他试剂为分析纯。

1.3 仪器

UV2802PC 紫外分光光度计; ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪配 TUV 双通道紫外检测器及 Empower 2 色谱工作站; HITACHI 20PR-520 型自动高速冷冻离心机; Sigma 3k15 冷冻离心机; Mettler-TOLEDO AE-240 型精密电子天平; 调速混匀器; Startorius PB-10 酸度计; WIGGENS WH220 加热磁力搅拌器; Alpha-4LD-plus 冷冻干燥仪; AUCMA DW-86W150 超低温冰箱; 立式万用电炉。

1.4 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉的体外释药特性

标准曲线的制备 配制 10、20、30、50、70 和 90 $\mu\text{g/mL}$ 的 DC 系列标准溶液, 分别测定 270 nm 处的吸光度(A), 以 A 对浓度(C , $\mu\text{g/mL}$)作线性回归计算, 绘制 DC 标准曲线, 求出相关系数。

释放介质的配制 不同 pH 人工胃液: 配制 pH 为 2.0、3.0、4.0 的稀盐酸, 加蒸馏水 800 mL 与胃蛋白酶 10 g, 再加蒸馏水稀释至 1 000 mL。人工肠液: 取 KH_2PO_4 6.8 g, 加蒸馏水 500 mL 使溶解, 用 0.4% NaOH 溶液调节 pH 至 6.8; 另取胰蛋白酶 10 g, 加蒸馏水适量使溶解, 将两液混合后, 加蒸馏水稀释至 1 000 mL。pH 7.4 PBS: 取 KH_2PO_4 1.36 g, 加 0.1 mol/L NaOH 溶液 79 mL, 加蒸馏水稀释至 200 mL。

体外释药特性 将透析袋用蒸馏水浸泡煮沸, 加入 4 mL 释放介质。称取 DC 原料药 3.1 mg 与 DC-CS-NPs 冻干粉 20 mg(DC 原料药与冻干粉的 DC 含量相等), 溶于释放介质。将透析袋两端扎紧后, 放入盛有 100 mL 25 同类释放介质的烧杯中, 保持磁力搅拌速度为 100 r/min, 分别于 0.083、0.167、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、16、24 h 取外液 1 mL, 同时补充等量同类释放介质, 维持释放介质体积不变。所取外液 4 下 13 000 r/min 离心 30 min, 取上清液适当稀释后, 以空白 CS-NPs 冻干粉为参比, 用紫外分光光度(UV)法于

270 nm 处测定每批次外液吸光度, 计算 DC 含量。每种释放介质平行测定 3 次, 取平均值, 绘制释放曲线, 并按以下公式计算释放度:

$$\text{释放度}(\%) = \frac{\text{透析外液累计强力霉素总量}}{\text{所投入强力霉素总量}} \times 100$$

释放模型拟合 分别用零级、一级、Higuchi、Weibull 和双相动力学方程对 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉体外释药的各时间点释放度 $Q(\%)$ 对时间 t 进行拟合, 拟合优度以 r 值进行判断。

1.5 体内血药浓度的测定及方法学考察

色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18(1.7 μm , 2.1 \times 50 mm)反相色谱柱; 流动相: A 相为 0.01 mol/L 磷酸二氢钠(含 10%乙腈), B 相为乙腈(体积比 4 : 1); 柱温: 45 ; 流速: 0.300 mL/min; 进样量: 5 μL ; 紫外检测方式采用单波长运行模式, 波长为 350 nm。

标准曲线的制备 取一定体积的标准混合液, 用流动相稀释成 DC 浓度为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液, 分别进样测定, 以 DC 峰面积(A , AU)对质量浓度(C , $\mu\text{g/mL}$)线性回归, 求出回归方程和相关系数。

工作曲线的制备与最低检测限测定 取空白血浆加入 DC 已知系列标准溶液使之成为相当于血浆浓度 0.01、0.05、0.10、2.50、0.50、1.00、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 的样品, 按照血浆样品处理方法处理, 作 UPLC 分析。以测得的各平均峰面积 Y 为因变量, 相应的质量浓度 X 为自变量绘制标准工作曲线, 求出回归方程和相关系数。

用空白血浆制成低质量浓度药物的含药组织, 经预处理后测定, 将引起三倍基线噪音的药物质量浓度定义为最低检测限。

回收率、精密度测定 实验分两组, 一组在空白血浆中分别添加 3 个浓度水平的 DC 标准液, 使血液中药浓度分别为 0.1、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$, 再按样品预处理方法处理后进样测定 DC 的质量浓度; 另一组为加入 3 个浓度组的 DC 标准品测得的质量浓度。每个浓度组做 5 个平行, 按以下公式计算回收率:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{加标样品测定值}}{\text{标准品测定值}} \times 100$$

每个浓度的样品, 日内做 5 个重复, 一周内重复做 5 次, 计算日内及日间精密度。

1.6 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉在斑点叉尾鲷体内的药代动力学

试验设计与采样 将 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉用蒸馏水配成混悬液, 按 20 mg/kg 剂量单次口服灌胃给药, 将无反胃回吐药的鱼用于实验。给药后 0.083、0.167、0.25、0.5、1、2、4、8、12、16、24、48、72、96、120、144、168 h 尾静脉取血, 用 1% 肝素钠抗凝。血液以 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 将血浆于 -20 保存, 直至样品处理。每一时间点各取 5 尾鱼作为 5 个平行组, 另取 5 尾鱼作为空白对照。

血浆样品处理 将冷冻保存的血浆室温下自然解冻, 摇匀后取 1.0 mL 置于 10 mL 具塞离心管中, 加入 1.0 mL 5% 高氯酸提取液, 置调速混匀器上涡旋振荡混匀 2 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一支 10 mL 具塞离心管中, 经 0.22 μL 滤头过滤, UPLC 测定。

数据处理 药物动力学模型拟合及参数计算采用中国药理学学会数学专业委员会编制的 3P97 药动软件分析。标准曲线、药物经时曲线图采用 Microsoft Excel 2003 计算绘制。

2 结果与分析

2.1 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉的体外释药特性

标准曲线 DC 在 10~90 μg/mL 范围内吸光度(A)与浓度(C, μg/mL)线性相关, DC 标准曲线为 $A=0.0281C-0.0132$, 相关系数 $r=0.9998$ 。

体外释药规律 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉在人工胃液、肠液和 pH 7.4 PBS 的释放曲线如图 1~图 3 所示。由图 1~图 3 可知, DC 原料药在人工胃液、肠液和 pH 7.4 PBS 释放较快, 1 h 内释放度已接近 100%, 均能完全溶出; DC 原料药在不同 pH 的人工胃液中, 释放曲线相近, 这是因为原料药没有被包裹, 不会受胃蛋白活性影响其释放度。

与 DC 原料药相比, DC-CS-NPs 冻干粉则表现出明显的缓释特性, 其在人工胃液、肠液和 pH7.4 PBS 的释放曲线分为突释和缓释两个阶段。纳米粒在 pH2.0、pH3.0、pH4.0 的人工胃液和人工肠液中的突释阶段 2 h 内, 释放率分别达 49.32%、45.29%、40.02%和 35.13%, 突释效应依次减弱; 纳米粒在 pH7.4 PBS 中 2h 的释放率仅为 24%, 突释效应最

弱。在缓释阶段 DC-CS-NPs 冻干粉中药物缓慢释放, 24 h 在 pH2.0、pH3.0、pH4.0 人工胃液的释放率分别为 91.11%、88.60%、85.36%, 在人工肠液和 pH7.4 PBS 的释放率分别为 78.12%和 72.91%, 最终还有部分 DC 未被释出。

DC-CS-NPs 冻干粉的体外释药速度与释放介质的酶活性和体系 pH 相关。DC-CS-NPs 冻干粉在各介质的释药速率从大到小依次为 pH2.0 人工胃液 > pH3.0 人工胃液 > pH4.0 人工胃液 > 人工肠液 > pH7.4 PBS。纳米粒在人工胃液的释药速率较人工肠液大, 这可能因为纳米粒在酸性介质中更易溶胀成为凝胶态, 使得药物渗透出来; 在 pH7.4 PBS 中由于没有酶类的作用, 药物释放较慢; 人工胃液在 pH2.0~4.0 范围内, 随着 pH 的增大, DC-CS-NPs 冻干粉释放度减小, 这是因为胃蛋白酶的最适 pH 为 2.0, 随着 pH 的增大, 胃蛋白酶的活性减小。

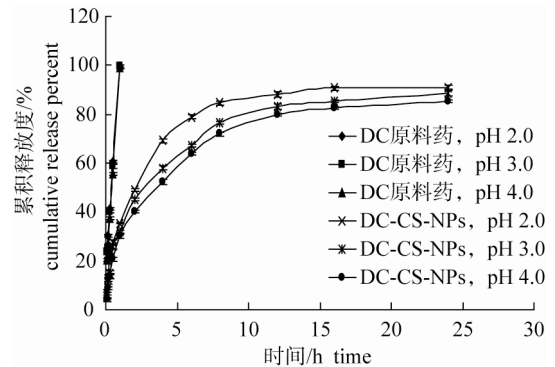


图 1 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉在人工胃液的体外释放曲线

Fig. 1 The accumulation release curves of DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder *in vitro* in artificial gastric juice

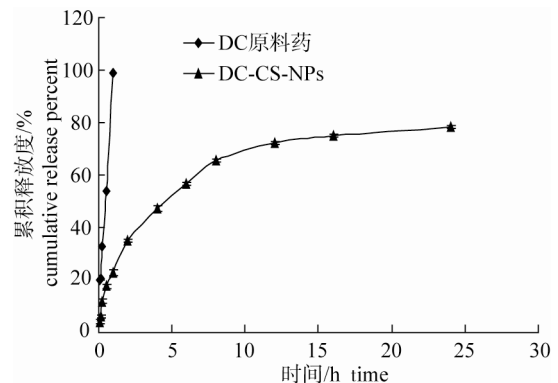


图 2 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉在人工肠液的体外释放曲线

Fig. 2 The accumulation release curves of DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder *in vitro* in artificial intestinal juice

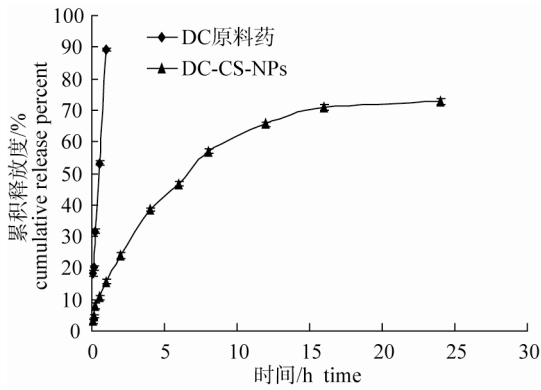


图 3 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉在 pH 7.4 PBS 的体外释放曲线

Fig. 3 The accumulation release curves of DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder *in vitro* in pH7.4 buffer phosphate

释放模型拟合 分别用零级、一级、Higuchi、Weibull 和双相动力学方程对 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉体外释药的各时间点进行拟合, 结果见表 1、表 2。根据拟合方程的相关系数 r 可知, DC 原料药在人工胃液、肠液和 pH 7.4 PBS 的体外释放均可用零级动力学方程拟合, 释放较快, 释放率与释放时间基本成正比, 且 DC 原料药在 1 h 内能完全释出。而 DC-CS-NPs 冻干粉的体外释放具有明显的缓释作用, 其在人工胃液、肠液和 pH7.4 PBS 的体外释放均可用双相动力学方程描述, 拟合情况较好。整个方程由冲击相和缓释相两相组成, 冲击相表明纳米粒释放初期的突释效应, 缓释相表示纳米粒在释放后期的缓释规律。

表 1 DC 原料药及 DC-CS-NPs 冻干粉在人工胃液的体外释药拟合结果
Tab. 1 The accumulation release simulation results of DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder *in vitro* in artificial gastric juice

数学模型 mathematical model	拟合模型及相关系数 fitted model and related coefficient		
	pH 2.0 人工胃液 pH 2.0 artificial gastric juice	pH 3.0 人工胃液 pH 3.0 artificial gastric juice	pH 4.0 人工胃液 pH 4.0 artificial gastric juice
	DC		
零级 zero order	$Q=0.9219t+0.1062, r=0.9839$	$Q=0.9213t+0.1049, r=0.9834$	$Q=0.9327t+0.0802, r=0.9893$
一级 first order	$\ln(1-Q)=-5.9823t+0.6454, r=0.9366$	$\ln(1-Q)=-5.2344t+0.5251, r=0.9421$	$\ln(1-Q)=-4.7624t+0.4838, r=0.9429$
higuchi	$Q=0.9840t^{1/2}-0.0628, r=0.9815$	$Q=0.9856t^{1/2}-0.0649, r=0.9833$	$Q=0.9839t^{1/2}-0.0851, r=0.9754$
weibull	$\ln\ln(1/(1-Q))=1.1986 \ln t+1.2304, r=0.9161$	$\ln\ln(1/(1-Q))=1.1800 \ln t+1.1688, r=0.9301$	$\ln\ln(1/(1-Q))=1.2082 \ln t+1.0865, r=0.9349$
DC-CS-NPs			
一级 first order	$\ln(1-Q)=-0.1127t-0.3884, r=0.9133$	$\ln(1-Q)=-0.097t-0.2877, r=0.9442$	$\ln(1-Q)=-0.0871t-0.2494, r=0.9425$
higuchi	$Q=0.2075t^{1/2}+0.1216, r=0.9415$	$Q=0.1995t^{1/2}+0.0883, r=0.9617$	$Q=0.1953t^{1/2}+0.0658, r=0.9680$
weibull	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.6264 \ln t-0.8125, r=0.9904$	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.6318 \ln t-1.0258, r=0.9925$	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.6519 \ln t-1.1847, r=0.9916$
双相动力学 biphasickinetics	$1-Q=0.2565e^{-0.0569t}+0.6815e^{-0.5196t}, r=0.9934$	$1-Q=0.6149e^{-0.0995t}+0.3704e^{-1.3704t}, r=0.9955$	$1-Q=0.3703e^{-1.0039t}+0.6113e^{-0.0813t}, r=0.9947$

表 2 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉在人工肠液、pH7.4 PBS 的体外释药拟合结果
Tab. 2 The accumulation release simulation results of DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder *in vitro* in artificial gastric juice and pH7.4 buffer phosphate

数学模型 mathematical model	拟合模型及相关系数 fitted model and related coefficient	
	人工肠液 artificial intestinal juice	pH 7.4 PBS pH 7.4 buffer phosphate
	DC	
零级 zero order	$Q=0.9389t+0.0637, r=0.9929$	$Q=0.8500t+0.0706, r=0.9899$
一级 first order	$\ln(1-Q)=-4.5443t+0.4719, r=0.9425$	$\ln(1-Q)=-2.1964t+0.0995, r=0.9843$
Higuchi	$Q=0.9793t^{1/2}-0.0973, r=0.9680$	$Q=0.8975t^{1/2}-0.0804, r=0.9770$
Weibull	$\ln\ln(1/(1-Q))=1.2139 \ln t+1.0178, r=0.9292$	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.9959 \ln t+0.5583, r=0.9644$
DC-CS-NPs		
一级 first order	$\ln(1-Q)=-0.0691t-0.2101, r=0.9346$	$\ln(1-Q)=-0.0612t-0.1352, r=0.9513$
Higuchi	$Q=0.1805t^{1/2}+0.0461, r=0.9719$	$Q=0.1725t^{1/2}+0.0035, r=0.9841$
Weibull	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.6432 \ln t-1.3804, r=0.9924$	$\ln\ln(1/(1-Q))=0.6829 \ln t-1.7089, r=0.9971$
双相动力学 biphasickinetics	$1-Q=0.4199e^{-0.0304t}+0.5417e^{-0.3661t}, r=0.9954$	$1-Q=0.7159e^{-0.1712t}+0.2539e^{-0.0001t}, r=0.9981$

2.2 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉的体内药代动力学

色谱图 DC 标准品、加样标准色谱图如图 4、5 所示。由图谱可见，本实验所选用的分析条件能较好地分离 DC，无杂质峰干扰，分离度较好。

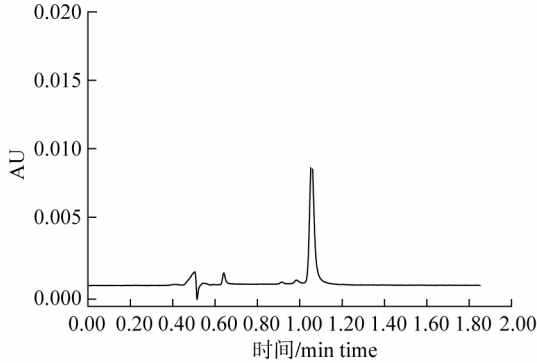


图 4 DC 标准溶液色谱图

Fig. 4 Chromatography of DC standard solution

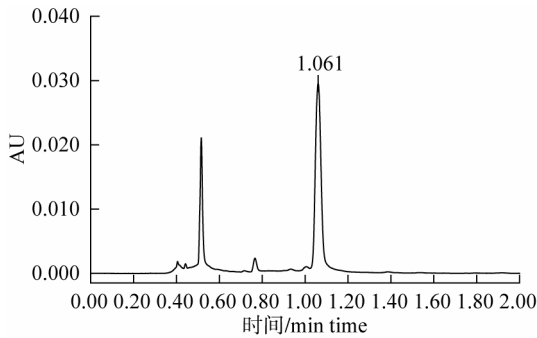


图 5 斑点叉尾鲷血浆加标样品色谱图

Fig. 5 Chromatography of spiked plasma sample in channel catfish

标准曲线 以含 DC 浓度为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00 μg/mL 标准溶液进样，得标准曲线。结果表明，DC 在 0.01~5.00 μg/mL 范围内峰面积(A, AU)与质量浓度(C, μg/mL)线性相关，标准曲线方程为 $A = 15314 C + 1343.9$, $r = 0.999 8$ 。

血浆工作曲线方程与最低检测限的测定 在空白血浆中加入 DC 已知标准溶液，在 0.01~5.0 μg/mL 范围内线性关系良好。斑点叉尾鲷血浆中 DC 的标准工作曲线为 $Y = 13779 X + 1284.9$, $r = 0.999 7$ 。样品中 DC 检测限为 3 μg/L。

回收率、精密度的测定 本试验条件下，测得血液中 3 个质量浓度水平的 DC 回收率为 (91.45±2.75)%，日内精密度的 (3.00±0.72)%，日间精密度的 (4.82±0.97)%。

DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉在斑点叉尾鲷体内的药动学 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻

干粉分别按 20 mg/kg 剂量单次口灌斑点叉尾鲷后，血液中的药物浓度随时间变化的规律如图 6 所示，药物在血液中的药动学参数如表 3 所示。口灌 DC 原料药后，药物在斑点叉尾鲷血浆中呈现明显的双峰现象，其血药浓度时间数据符合一级吸收二室开放模型，动力学方程为 $C = 2.1689 e^{-0.1227 t} + 1.2283 e^{-0.0160 t} - 3.3972 e^{-0.8719 t}$ ，血药达峰时间(T_{max})为 3.039 1 h，血药峰浓度(C_{max})为 2.423 9 μg/mL，其分布半衰期($T_{1/2\alpha}$)为 5.648 3 h，消除半衰期($T_{1/2\beta}$)为 43.413 1 h，药—时曲线下面积(AUC)为 90.708 4 μg·h/mL。DC-CS-NPs 冻干粉经消化道吸收进入血液，在斑点叉尾鲷体内血液中呈现单峰现象，经房室模型分析，DC-CS-NPs 冻干粉其血药浓度时间数据符合一级吸收二室开放模型，动力学方程为 $C = 6.1774 e^{-0.0884 t} + 1.1566 e^{-0.0146 t} - 7.3340 e^{-0.1673 t}$ ， T_{max} 为 9.554 5 h， C_{max} 为 2.178 6 μg/mL， $T_{1/2\alpha}$ 为 7.844 8 h， $T_{1/2\beta}$ 为 47.589 1 h，AUC 为 105.477 4 μg·h/mL。与 DC 原料药药代动力学参数相比，DC-CS-NPs 冻干粉的 T_{max} 明显延长， C_{max} 减小， $T_{1/2\beta}$ 延长，AUC 变大。DC-CS-NPs 冻干粉比原料药吸收缓慢，消除缓慢，具有一定的长效性。

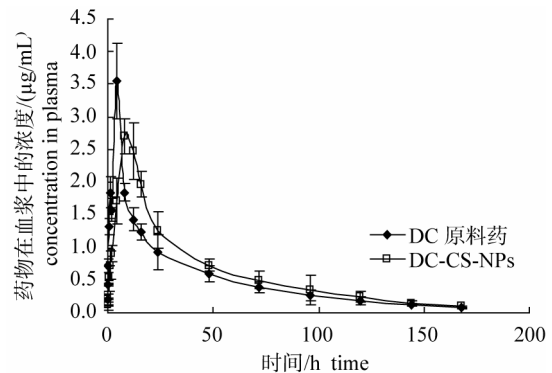


图 6 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉在斑点叉尾鲷血浆中的药—时曲线

Fig. 6 Concentration-time curve of DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder in the plasma of channel catfish

3 讨论

3.1 DC-CS-NPs 冻干粉的发展前景

现代水产养殖业日益趋向于规模化、集约化，渔药的使用为水产养殖业发展提供了有力的保障。然而目前我国渔药制剂技术发展滞后，部分药物如 DC 在水产上还是沿用兽药最传统的粉剂、注射剂等剂型，因此有必要研究出一种适用于水产养

表 3 20 mg/kg b-w 单次口服 DC 原料药和 DC-CS-NPs 冻干粉在斑点叉尾鮰血液的药代动力学参数
 Tab. 3 Pharmacokinetic parameters for DC raw material drug and DC-CS-NPs freeze-dried powder in channel catfish after a single oral administration at 20 mg/kg b-w

参数 parameters	单位 unit	DC 原料药参数值 parameters of DC raw material drug	DC-CS-NPs 冻干粉参数值 parameters of DC-CS-NPs freeze-dried powder
A	$\mu\text{g/mL}$	2.168 9	6.177 4
α	1/h	0.122 7	0.088 4
B	$\mu\text{g/mL}$	1.228 3	1.156 6
β	1/h	0.016 0	0.014 6
K_a	1/h	0.871 9	0.167 3
Lag time	h	0.000 9	0.005 5
V_d/F	L/kg	6.515 9	5.037 6
$T_{1/2\alpha}$	h	5.648 3	7.844 8
$T_{1/2\beta}$	h	43.413 1	47.589 1
$T_{1/2K_a}$	h	0.795 0	4.143 9
K_{21}	1/h	0.057 9	0.034 2
K_{10}	1/h	0.033 8	0.037 6
K_{12}	1/h	0.046 9	0.031 1
AUC	$\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$	90.708 4	105.477 4
CL_s	(mL/h)/kg	0.220 5	0.189 6
T_{\max}	h	3.039 1	9.554 5
C_{\max}	$\mu\text{g/mL}$	2.423 9	2.178 6

注: A , B 为药时曲线对数图上曲线在横轴和纵轴上的截距; α , β 分别为分布相、消除相的一级速率常数; K_{21} 由周边室向中央室转运的一级速率常数; K_{10} 由中央室消除的一级速率常数; K_{12} 由中央室向周边室转运的一级速率常数; AUC 药—时曲线下面积; Lag time 滞后时间; K_a 为一级吸收速率常数; $T_{1/2K_a}$ 为药物在中央室的吸收半衰期; $T_{1/2\alpha}$, $T_{1/2\beta}$ 分别为总的吸收和消除半衰期; T_{\max} 出现最高血药质量浓度的时间; C_{\max} 最高血药质量浓度。

Notes: A , B are drug concentration-time curve on logarithmic graph curve on the horizontal axis and vertical axis intercept; α , β are first-order rate constant for drug distribution phase and elimination phase; K_{21} is first-order rate constant for drug distribution from peripheral compartment to central compartment; K_{10} is first-order rate constant for drug elimination from central compartment; K_{12} is first-order rate constant for drug distribution from central compartment to peripheral compartment; AUC is area under concentration-time curve; K_a is first-order rate constant for drug absorption; $T_{1/2K_a}$ is absorption half-life in central compartment; $T_{1/2\alpha}$, $T_{1/2\beta}$ are the overall absorption half-life and Elimination half-life; T_{\max} is the time at highest peak of concentration; C_{\max} is the biggest concentration of the drug in blood.

殖实际环境的新剂型药物, 以改善药物在使用时的弊端。根据水生动物的种类、特点和规格及药物的种类和性质等, 有针对性地开发渔药剂型刻不容缓。

DC 味苦, 抗逆性差, 释放不稳定。因施药环境的特殊性, 要求 DC 具有一定的稳定性。CS-NPs 是一种新型的药物缓释系统, 具有缓释药物、靶向输送、减少胃肠道刺激、增加药物吸收、提高药物稳定性等优点^[7]。将 DC 制成 DC-CS-NPs 冻干粉, 不仅能较好地保持用药时药物的稳定性, 便于药物在水环境中长期地发挥作用, 也有利于药物储存、运输及保存; 药物的包裹也能改善拌饲投喂时药物的适口性, 有很好的应用价值; 纳米粒有靶向性, 其较小的粒径有利于延长局部用药时药物的滞留时间, 增加药物与肠壁的接触时间, 加大接触面积, 延长药物作用时间, 直达病灶部位, 降低药物在其他正常组织的浓度; 纳米粒的缓释功能可减少药物用药次数和用药剂量, 降低耐药性, 减少

药物残留, 有广阔的发展前景。

3.2 DC-CS-NPs 冻干粉的体外释放

DC-CS-NPs 纳米粒中的 DC 被包裹在纳米粒内或吸附在纳米粒表面, 使得药物的释放速度具有选择性和可控性, 从而能较好地发挥药物的治疗效果。DC-CS-NPs 冻干粉在人工胃液、肠液和 pH7.4 PBS 的释药方式可分为突释和缓释两相: 释放初期为突释现象, 这是由吸附或镶嵌的纳米粒表面的 DC 快速释放所致, 此外冷冻干燥技术使纳米粒的水分固化成结晶态的冰, 体积增大, 纳米粒内部形成更大的孔道, 促进了药物的快速释放, 增大了纳米粒的突释量^[8], 突释有利于体内药物即刻到达有效的血药浓度。体外释药实验显示随着介质 pH 的增大, 纳米粒的突释效应减弱, 这可能因为游离的 DC 与纳米粒表面的电荷吸附作用加大, 使得突释量降低。而释放后期 DC-CS-NPs 冻干粉呈缓释模式, 此阶段以被包封的药物从纳米粒释放为主, 释药速率平缓, 释放均匀, 表现出良好的缓

释性能, 缓释有利于维持有效的血药浓度^[9]。体外释药试验显示在人工胃液、肠液和 pH7.4 PBS 还有部分 DC 未被释放, 但是由于鱼体内存在各种代谢酶和菌群, 可逐步分解代谢壳聚糖, 使药物最终完全释出^[10]。

3.3 DC-CS-NPs 冻干粉的体内药代动力学特征

DC 进入水产动物体内后经胆汁排入肠道会再次被吸收, 有显著的肝肠循环^[11], 因此 DC 在水产动物体内的药物释放表现为双峰现象, 再加上 DC 原料药一般每隔 24 小时给药一次, 连续给药 3~5 d, 多次给药后, 药物在鱼体内会出现多个波峰, 药效不稳定, 有效血药浓度维持时间短, 极易产生耐药性, 从而影响药物的实际治疗效果, 且重复给药易造成药物代谢缓慢, 导致药物残留, 严重影响无公害渔业的发展^[11]。有学者开始探讨 DC 新剂型的改造, 李四元等^[12]对自制的 DC 脂质体在家兔体内进行药物动力学试验, 一次静脉注射强力霉素脂质体制剂后, 发现其药—时曲线属一室开放模型, 药代动力学及组织分布发生明显变化, DC 脂质体在家兔体内的 $T_{1/2\beta}$ 为 7.606 h, 与 DC 原料药的 2.25 h 相比, 药物代谢速度显著减慢, 有效血药浓度时间明显延长。本研究自制的 DC-CS-NPs 冻干粉与 DC 原料药相比, T_{\max} 明显延长, C_{\max} 减小, $T_{1/2\beta}$ 延长, AUC 变大, 在体内的药物的释放由双峰变为单峰, 具有显著的缓释特性, 明显地改变了吸收峰谷的差异, 使吸收趋于平缓, 能维持药物在体内长时间的稳态血药浓度, 避免峰谷效应, 克服了传统药物服用后在体内血药浓度波动大、副作用大的缺点。体内释药特性实验显示 DC-CS-NPs 冻干粉血药达峰浓度较 DC 原料药低, 这也可间接表明 DC-CS-NPs 冻干粉具有被动靶向性, 进入生物体内后更易被脾等富含网状内皮系统的组织摄取, 优先分布于靶组织^[13-14], 从而使得血浆中的药物浓度降低。DC 对斑点叉尾鲷致病菌的最小抑菌浓度(MIC)为 0.10~1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[15-16]。若 DC 原料药按 20 mg/kg 剂量口灌给药, 则 16 h 药物浓度已小于 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。本研究中 DC 经包裹制成 DC-CS-NPs 冻干粉后, 体内药代动力学发生改变,

按 20 mg/kg 剂量口灌给药 24 h 药物浓度仍在 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之上, 延长了药物的作用时间。在临床应用上, 可减少 DC-CS-NPs 冻干粉的用药剂量和用药频率, 从而有效避免药物的滥用多用, 提高药效发挥。

参考文献:

- [1] 刘辉旺, 刘义明. 多西环素研究进展[J]. 兽医导刊, 2008, (125): 27-28.
- [2] 彭司勋. 药物化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1988: 334-335.
- [3] 熊喜华. 强力霉素脂质体的制备及药效学研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [4] 汤爱国, 张阳德. O-羧甲基乳糖酰化壳聚糖纳米粒-聚乳酸阿霉素纳米粒在大鼠体内的靶向性研究[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 16(13): 1941-1943.
- [5] 潘卫三. 新药制剂技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 116-127.
- [6] 陈关平, 操继跃. 兽药控/缓释剂的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(8): 40-42.
- [7] Jeong Y I, Cheon J B, Kim S H, *et al.* Clonazepam release from core-shell type nanoparticles *in vitro*[J]. Journal of Controlled Release, 1998, 51(2): 169-178.
- [8] 龙娜, 吕竹芬. 微球缓释系统的突释现象及其影响因素[J]. 中国药师, 2010, 13(3): 421-423.
- [9] Sharma D, Chelvi T P, Kaur J, *et al.* Novel taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulate taxol for drug delivery in cancer therapy[J]. Oncology Research, 1996, 8(7): 281-286.
- [10] 龚露昉, 胡鲲, 杨先乐. 恩诺沙星壳聚糖纳米粒的制备及其体外释药特性研究[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 321-326.
- [11] 丁昕颖, 李平, 丁得利. 动物性食品中药物残留的现状分析[J]. 中国禽业导刊, 2008(21): 32-33.
- [12] 李四元. 强力霉素脂质体的制备及药物代谢动力学研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [13] 张阳德. 纳米药理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 17-46.
- [14] Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis[J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 54(5): 631-651.
- [15] 袁科平. 网箱养殖斑点叉尾鲷暴发性细菌性疾病防治研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [16] 孟小亮, 陈昌福, 吴志新, 等. 嗜水气单胞菌对盐酸多西环素的耐药性获得与消失速率研究[J]. 长江大学学报: 自然科学版, 2009, 6(1): 42-44.

Release characteristics of doxycycline chitosan nanoparticles freeze-dried powder *in vitro* and *in vivo*

SHEN Dan-yi^{1,2}, AI Xiao-hui^{1*}, LIU Yong-tao¹, DING Yun-min¹, YU Shao-mei^{1,3}, SUO Wen-wen^{1,3}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Spreading Center of Technology in Aquatic Science of Cixi City in Zhejiang Province, Cixi 315300, China;

3. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: This paper is to study the release characteristics of doxycycline (DC) raw material drug and doxycycline chitosan nanoparticles (DC-CS-NPs) freeze-dried powder *in vitro* and *in vivo* by ultraviolet spectrophotometry and ultra performance liquid chromatography, respectively. Results showed that the release behaviors of DC raw material drug were simulated the most in the zero order dynamic equation in artificial gastric juice, artificial intestinal juice and pH 7.4 buffer phosphate. The release of DC raw material drug was fast which could completely dissolve in one hour; The DC-CS-NPs freeze-dried powder had a significant slow-release characteristic. The release behaviors were simulated the most in the biexponential equation. The drug released fast in the early stage while it released slowly later. The order of release speed of DC-CS-NPs freeze-dried powder from fast to slow was pH 2.0 artificial gastric juice, pH 3.0 artificial gastric juice, pH 4.0 artificial gastric juice, artificial intestinal juice and pH 7.4 buffer phosphate. When DC raw material drug became DC-CS-NPs freeze-dried powder, after a single oral administration at a dose of 20 mg/kg at (25±1) , the double-peak phenomenon of plasma in channel catfish was turned into single-peak, and the pharmacokinetic parameters of DC-CS-NPs freeze-dried powder were changed. Compared to DC raw material drug, the peak concentration (C_{max}) decreased. The peak time (T_{max}) and terminal elimination half-life ($T_{1/2\beta}$) prolonged. The area under concentration-time curve (AUC) was larger. The DC-CS-NPs freeze-dried powder will become an ideal DC new formulation.

Key words: *Ictalurus punctatus*; doxycycline; nanoparticles; freeze-dried powder; *in vitro* release; pharmacokinetics

Corresponding author: AI Xiao-hui. E-mail: aixh@yfi.ac.cn