

· 研究论文 ·

渔用氟苯尼考缓释药丸的制备及性能测定

陈哲昕^a, 竺亚斌^{*a}, 徐鑫^a, 王国良^b

(宁波大学 a. 医学院, b. 生命科学与工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:以聚乳酸和淀粉(20:1,质量比)为载体基材,以抗生素氟苯尼考为载药对象,制备了具有缓释作用的渔用氟苯尼考聚乳酸药丸。采用电镜扫描、红外光谱、紫外-分光光度仪及高效液相色谱对该药丸的物理形貌、缓释性能及药理性质等进行了检测分析。结果表明:所制备药丸内具有均匀分布的多孔结构,孔与孔之间连通性良好,孔隙率为 $72.5\% \pm 1.2\%$;在海水中漂浮和浸没两种状态下,96 h后的释放值分别为 0.28 ± 0.02 和 0.42 ± 0.03 mg/L,缓释效果明显。在浙江宁波象山港大黄鱼养殖场,采用每条体重约500 g的大黄鱼进行了载体聚乳酸的毒性试验、药丸的缓释效果及氟苯尼考残留检测等实际应用探索,结果证明该药丸无明显毒副作用,在鱼体内具有缓释作用。

关键词:氟苯尼考;缓释药丸;聚乳酸;缓释性能

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2011.05.14

中图分类号:TQ450.68;S948

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2011)05-0519-06

Manufacture and characteristics of antibiotic florfenicol pill with slow-releasing property in fishery

CHEN Zhe-xin^a, ZHU Ya-bin^{*a}, XU Xin^a, WANG Guo-liang^b

(a. The Medical School, b. College of Life Science and Engineering, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang Province, China)

Abstract: A slow-releasing antibiotic pill was manufactured, in which polylactide acid (PLA) and starch(20:1, m/m) were used as substrate and florfenicol, a broad spectrum antibiotic in fishery, was used as a model of drug. The physical properties, drug release characteristics and biodegradability of the pills were tested using scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy, ultraviolet spectrometer, etc. The results showed that the drug carrier displayed a porous internal structure with good pore connectivity and high porosity ($72.5\% \pm 1.2\%$), which is beneficial for florfenicol to be distributed evenly inside the whole pill. The drug demonstrated slowly releasing property due to the degradation of substrates' i. e. (0.28 ± 0.02) or (0.42 ± 0.03) mg/L after pills floated on or immersed in sea water for 96 h. The experiments about drug-residue, toxicity of PLA and drug releasing pattern were performed in Xiangshan fishery, Ningbo, Zhejiang Province, using pseudosciaena crocea with weight of ~500 g as testing fish *In vivo*. The result showed that the pills prepared from our present protocol were suitable to be used in fishery cage culture with no obvious toxicity and controlled-releasing.

Key words: florfenicol; antibiotic pill; polylactic acid; slow-release property

收稿日期:2011-03-25;修回日期:2011-07-12.

作者简介:陈哲昕(1987-),男,湖南岳阳人,硕士研究生;*通讯作者(Author of correspondence);竺亚斌(1967-),女,浙江奉化人,博士,研究员,主要研究方向为生物材料与组织工程,电话:0574-87609592, E-mail: zhuyabin@nbu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30870645);浙江省杰出青年团队项目(R2101166);国家农业部公益性行业(农业)科研专项(200903029).

近年来,随着海水网箱养殖规模的不断扩大以及水环境趋于恶化,养殖鱼类病害频发,制约了水产养殖业的健康发展。目前对鱼类病害仍以药物防治为主^[1],而传统的口服给药方法存在药物易散失、用药计量不准、过量使用等诸多问题,不仅降低了药效,还会严重污染养殖水环境^[2-3]。但以可降解聚合物为载体投喂药物的技术目前在渔业中尚未见使用,也鲜见相关文献报道。

聚乳酸(PLA)是一种无毒、无刺激性的生物可降解高分子材料,已广泛应用于生物医学、工业、农业等领域^[4]。氟苯尼考(flornfenicol)是渔业养殖中推广使用的一种广谱抗菌药物,可防治敏感菌引起的细菌病害,对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌及支原体等均有抑制作用^[5],因其药效高、毒副作用小正逐渐取代副作用相对较大且残留量较大的氯霉素^[6-7],成为目前水产养殖中的主要抗生素品种之一。本研究以氟苯尼考为对象,将其载于由聚乳酸和淀粉构建的载体中制成具有缓释作用的颗粒状药丸,并就其在水中的释放特性以及在大黄鱼体内的降解特性、药物残留及载体的毒性进行了检测。结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 供试材料及主要仪器

氟苯尼考(flornfenicol,有效成分质量分数为50%,先灵葆雅动物保健公司美国工厂);聚乳酸(Mn 300 kD,宁波环球塑料制品有限公司);食用玉米淀粉(宁波鄞州);1,4-二氧六环(纯度 $\geq 99.5\%$)及*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF,纯度 $\geq 99.5\%$)(国药集团化学有限公司)。

BS200S-WE1 电子天平(德国 Sartorius 公司);DW-40L92 立式低温冰箱(青岛海尔公司);冻干机(美国 Labconco 公司);C-MAG HS7 磁力搅拌器(德国 IKA 公司);S-3400N 扫描电子显微镜(日本日立公司);Nicolet 6700 傅立叶红外光谱仪(美国 Nicolet 公司);TV-1901 双光束紫外-可见分光光度计(UV-Vis,北京普析通用仪器有限责任公司);LC-20ATprominence 高效液相色谱仪(HPLC,日本岛津公司)。

试验用鱼:浙江宁波市象山港大黄鱼网箱养殖基地养殖的大黄鱼 *Pseudosciaena crocea*,每条体重约 500 g;海水取自宁波象山港。

1.2 试验方法

1.2.1 药丸的制备 取 0.3 g 淀粉加入到 4 mL 水

中,在 80 ℃ 水浴中完全糊化后加入 36 mL 二氧六环,置磁力搅拌器上搅拌均匀;加入 6 g 聚乳酸,继续于 80 ℃ 水浴条件下搅拌 2 h 至完全溶解,制得载体溶液。同时将 6 g 氟苯尼考溶于 40 mL DMF 中,配制成氟苯尼考质量浓度为 0.15 g/mL 的溶液。取 2 mL 氟苯尼考溶液加入到载体溶液中,搅拌均匀后注入模具,30 ℃ 下静置 1 h,于 -40 ℃ 低温冰箱中再冷冻 1 h,最后于冷冻干燥机中干燥 24 h,即制得每个质量约为 0.1 g、直径约为 4.6 mm 的颗粒状药丸(图 1)。以不含氟苯尼考的载体药丸为空白对照。

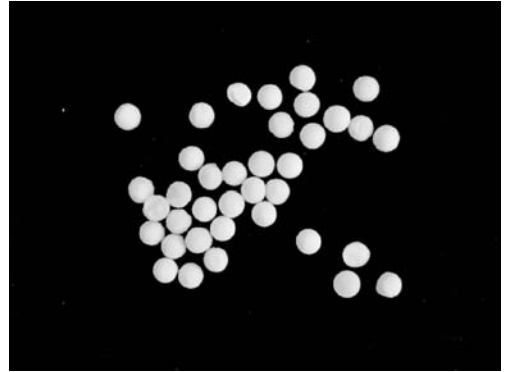


图 1 颗粒状药丸外观形貌图

Fig. 1 Overview of granular pills

1.2.2 药丸物理结构观测 将药丸用导电胶带固定于导电支架上,干燥后于真空(10^{-3} Pa)条件下喷金,通过扫描电子显微镜分别对药丸的横截面、纵切面及表面进行观察。

1.2.3 红外光谱测定 采用溴化钾压片法分别测定聚乳酸、氟苯尼考、淀粉和药丸样品的红外光谱图。

1.2.4 孔隙率测定 截取药丸的上表面(与空气接触面)、下表面(与容器接触面)及中间部分,分别称重;同时采用排水法测量其表观体积,取平均值,计算药丸的表观密度(表观密度 = 平均质量/平均体积)。由于药丸组成中绝大部分是聚乳酸,故假设以聚乳酸密度(1.0747 g/cm^3)作为药丸的真实密度,则:孔隙率/% = $(1 - \text{表观密度}/\text{聚乳酸密度}) \times 100$ 。

1.2.5 药丸在鱼体外的释放性能测定 设自然漂浮和完全浸没在海水中两组分别进行检测。

A. 漂浮组:将药丸(每个 0.1 g)放入 100 mL 的试管中,加入 50 mL 海水,稍作振荡,密封。分别于 2、4、8、12、24、48 及 96 h 时,从试管中取出海水,采用分光光度计和 HPLC 对海水中的氟苯尼考释放量

进行测定。试验重复7次。

B. 浸没组:将放入药丸的试管密封后抽真空,然后放进空气,如此反复几次,直至药丸完全浸没于海水中。其余同漂浮组处理。

HPLC 检测条件:柱温 30 °C;流动相为乙腈-水(27:73, 体积比);流速 0.5 mL/min;检测波长 266 nm;进样量 20 μ L。

1.2.6 药丸在鱼体内的释放及毒副作用 于2010年夏天在浙江宁波市象山港大黄鱼网箱养殖基地测试了该药丸的实际应用情况,包括药物在鱼体内的释放效应、所用载体对大黄鱼的毒性以及鱼血液样本中药物残留量的检测等。

1.2.6.1 喂药及取样 氟苯尼考每天的推荐用药量为 10 mg/kg bw,所制备药丸每粒含氟苯尼考有效成分约 5 mg。将 66 条供试黄鱼平均分为 11 组,口服喂药,每条、每天喂 1 粒。分别于喂药后 0、8、16、24、72、96、120、144、168、240 和 336 h 各时间点进行解剖并取得血液、肌肉和肝脏样本。在解剖取样过程中,在鱼胃中发现了未完全消化的药物颗粒,采用扫描电子显微镜对这些残存的药物颗粒进行了微观形貌检测。

1.2.6.2 药物残留量检测 用蒸馏水将氟苯尼考标准品分别配成 1、4、20、50 及 100 μ g/mL 5 个质量浓度梯度,以乙腈-水(27:73, 体积比)为流动相,在流速 1 mL/min、柱温 40 °C 条件下进行 HPLC 检测,绘制标准曲线。将 5 mL 血液样本和 5 mL 乙酸乙酯加入到 10 mL 离心管中,于 6 000 r/min 下振荡提取 10 min,取上清液,于 45 °C 下减压压缩至恒重;加入 1 mL 流动相及 2 mL 正己烷溶解残留物,待完全溶解后,以 6 000 r/min 的速度离心 10 min;除去上层有机相,下层清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析,于 40 °C 下分别测定 8 ~ 336 h 内各时间点血液样品中氟苯尼考的峰面积,根据峰面积计算氟苯尼考的残留浓度。

1.2.6.3 毒性试验 所制备药丸的载体主要为聚乳酸,含少量淀粉,因此毒性试验主要针对聚乳酸进行。将 50 和 100 倍于正常用药剂量(即每天每条鱼 0.5 和 1 g)的聚乳酸分别灌喂入 2 组共 12 条鱼体内,另设 6 条空白对照(正常喂食),观察 10 d,检测聚乳酸对大黄鱼的毒性。

2 结果与分析

2.1 药丸的结构及性能表征

图 2 是未载药时载体的电镜扫描微观结构图。

从图 2b 和 2c 中可以看出,其孔径尺寸约在 5 ~ 50 μ m 范围内,孔分布均匀,孔与孔之间相互连通,纵切面和横截面孔结构无明显区别。计算表明,其具有较高的孔隙率(72.5% \pm 1.2%)。这些结构特点有利于药物的流通和释放。在药丸制备过程中,载体上表面和下表面分别与空气或玻璃容器接触,从而形成了一层相对致密少孔的表面层(如图 2a、2d 所示),其可能在短期内对于药物的释放有阻止作用。

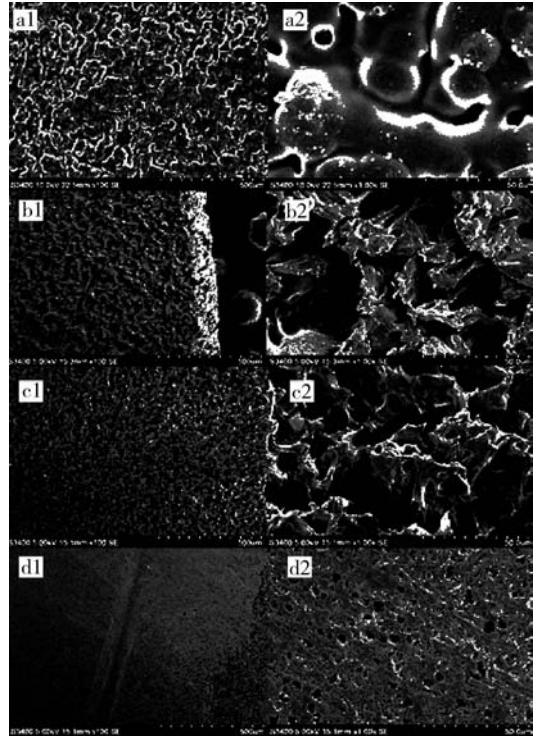


图 2 药丸载体的扫描电镜图

Fig. 2 SEM images of drug carrier

1, $\times 100$; 2, $\times 1 000$ 。

a、b、c、d 分别指载体的上表面(与空气接触)、纵切、横切和下表面(与容器接触)。载体中聚乳酸和淀粉的质量比为 20:1,于 80 °C 下溶解且在 30 °C 下静置 1 h 后冷冻干燥。

a. Surface (contact with air); b. Cross-section; c. Medium; d. Surface (contact with the container). The carrier was prepared from PLA and starch with ratio of 20:1 (W:W). They were firstly dissolved in 1,4-dioxane at 80 °C and then stood at 30 °C for 1 h followed by drying in frozen dryer.

图 3 是氟苯尼考载药药丸的电镜扫描图,从中可看出,药丸内部结构均匀,其孔径大小约为 10 ~ 50 μ m,且孔与孔之间相互连通,纵切面和横截面无显著差异,且与图 2 中 b1、b2、c1、c2 所示相近,也即药丸的多孔结构并未因加入氟苯尼考而发生明显变化。

图4分别为淀粉(a)、氟苯尼考(b)、聚乳酸(c)和药丸(d)的红外光谱图。从特征峰看,药丸(曲线d)基本保留了a、b和c中各曲线的特征峰,其中在 738 cm^{-1} (烷基醇的-OH)、 $1\ 759\text{ cm}^{-1}$ (亚甲基C-H)、 $2\ 944\text{ cm}^{-1}$ 和 $2\ 995\text{ cm}^{-1}$ (酰胺键)等处的峰值均较各自成分的相应峰值有所加强,推测是由于其峰位叠加的结果。表明载体和药物等各成分之间只是简单的共混,并未发生化学反应,这对保护氟苯尼考的药效是有利的。

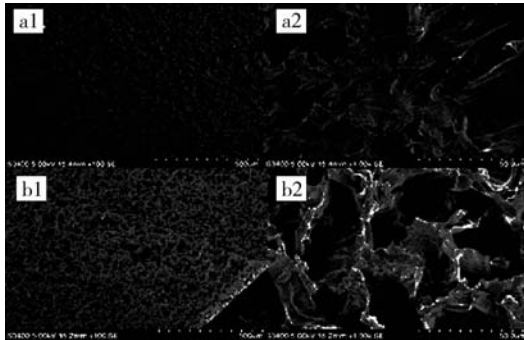


图3 载药药丸的扫描电镜图

Fig. 3 SEM images of the antibiotic pills

1, $\times 100$; 2, $\times 1\ 000$ 。

a、b分别指药丸的纵切、横截面。

a. Cross-section; b. Medium.

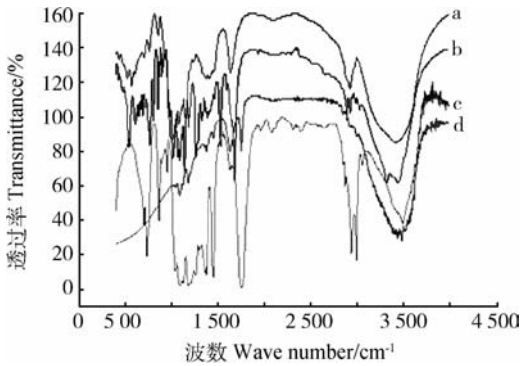


图4 红外光谱图

Fig. 4 Infrared spectra

a. 淀粉; b. 氟苯尼考; c. 聚乳酸; d. 药丸。

a. Starch; b. Florfenicol; c. PLA; d. Pills.

2.2 释药性能

由于氟苯尼考不溶于水,实验中也发现其在水中的释放量不大,故分别采用了紫外-可见分光光度计以及高效液相色谱法对释放到海水中的药物浓度进行了检测。氟苯尼考在波长 $266\sim 272\text{ nm}$ 范围内有特征吸收峰,根据其紫外吸收与浓度关系标准曲线,可计算出药丸在海水中漂浮和完全浸没2种情况下释放出的氟苯尼考的浓度,以明确药丸的释药

性能及规律。图5a为药丸漂浮于海水中时氟苯尼考质量浓度与时间的关系曲线。可以看出,药物在 $0\sim 24\text{ h}$ 之间释放较平缓,而后有一个相对较快的释放过程,在 48 h 时释放量最高,为 $(0.28\pm 0.02)\text{ mg/L}$ 。图5b为药丸完全浸没于海水中时氟苯尼考的释放曲线。与图5a相比,图5b中药丸的释药量和释放速率均有所增加,在 $0\sim 48\text{ h}$ 之间释放相对平缓,48 h后有一个快速释放的过程,96 h时释药量达到最大,为 $(0.42\pm 0.03)\text{ mg/L}$ 。HPLC检测结果(图5c、5d)与UN-Vis结果基本一致,总体表现为浸没于海水中的药丸的释药浓度(图5d)高于漂浮于海水中的药丸(图5c),药物释放速率在48 h前相对平缓,之后出现快速释放的过程,至96 h时达到最大。

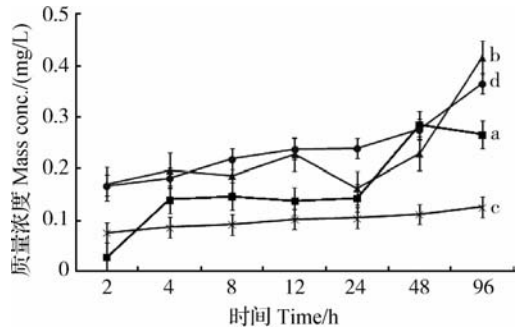


图5 UV-Vis和HPLC法测定的海水中氟苯尼考质量浓度随时间的变化曲线

Fig. 5 Florfenicol mass concentration released in sea water as a function of time by UV-Vis spectrophotometer and HPLC

注:a、b为UV-Vis法测定,c、d为HPLC法测定。

a和c:药丸漂浮在海水中;b和d:药丸浸没于海水中。

Note: It was determined by UV-Vis spectrophotometer (a, b) and HPLC (c, d), respectively, under room temperature.

a and c, Pills floated on sea water; b and d, Pills immersed completely in sea water.

从微观结构看,药丸表面有一层相对致密的表层(图2a、2d),其对于药物的释放具有阻止作用,因此在初期释药量很少。经海水浸泡后,药丸表面发生腐蚀或降解,促进了药物的释放,而且浸没在海水中的药丸较漂浮于水面上的更容易使药物释放出来。不过相对于药丸的总载药量(200 mg/L)而言,其释放出的药物量还是极少的,这有利于减少药物对养殖海域的污染。

2.3 药丸在大黄鱼体内的降解性、药物残留及载体的毒性

在采集大黄鱼血液样本的过程中,发现鱼体内

存有颗粒状的硬物(图 6a), 将其剖开, 发现有残留的药丸(图 6b 圆圈处)。取出残留药丸, 经洗涤、干燥后在扫描电子显微镜下观察其微观结构。图 7 为喂药 120 h 后鱼体内取出的残留药丸的电镜扫描图, 与图 3 相比, 药丸外观特征变化不大, 但其内部结构发生了一些变化——在孔壁上出现了许多大小不一的孔隙(图 7c、7d), 这可能是由于载体组分发生了降解所致。但降解速度较为缓慢, 对药物的释放不利。



图 6 喂药 120 h 后的鱼体解剖图

Fig. 6 The fish was anatomized after it was fed the drug pills for 120 h
a、b 中圆圈内分别为鱼胃和胃内的药丸。
Circles in a and b denoted the stomach and the pills got from the stomach.

采用 HPLC 检测了大黄鱼动脉血液中药物的残留情况。图 8a 为氟苯尼考标样的色谱图, 其特征峰出现在 9.6 min, 根据不同浓度氟苯尼考标样溶液

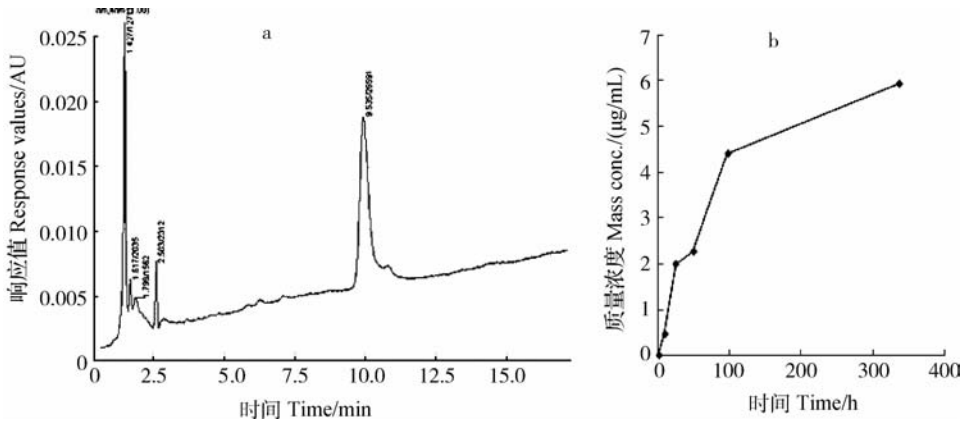


图 8 高效液相色谱法测定的氟苯尼考在大黄鱼动脉血样中的残留量

Fig. 8 Florfenicol residue in arterial blood of fish determined with HPLC

a. 氟苯尼考高效液相色谱图; b. 大黄鱼动脉血样中氟苯尼考含量随时间的变化曲线。

a. HPLC curve of florfenicol. b. Florfenicol residue (μg/mL) in *Pseudosciaena crocea* arterial blood as a function of time (h) after fed by the antibiotic pills.

分别采用 50 倍和 100 倍于正常用药剂量的聚乳酸灌喂 2 组共 12 条黄鱼, 7 d 后, 受试鱼全部存活, 且与对照组黄鱼的生活状况无差异, 表明本研究中所用基材聚乳酸对大黄鱼无毒副作用。

的峰面积, 绘制浓度与峰面积关系标准曲线, 根据标准曲线推算出血样中氟苯尼考的浓度(图 8b)。从图 8 中可看出, 大黄鱼动脉血中氟苯尼考的残留浓度随着时间的延长而升高, 至 336 h 时达到最大 (6 μg/mL)。鱼体内的药物残留并未遵循常规的从小到大再到小的规律, 可能是因为药物包埋在聚乳酸制成的载体中, 而载体的降解速度较慢, 从而导致药物在鱼体内的释放也较缓慢。

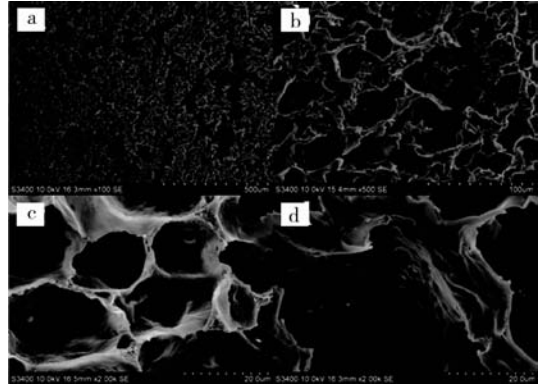


图 7 喂药 120 h 后从鱼体内取出的残余药丸的横截面扫描电镜图

Fig. 7 SEM images of the residual antibiotic pills in fish 120 h after feeding the drug
a ~ d 分别表示放大 100, 500 和 2 000 倍。

a ~ d with different magnification as 100, 500 and 2 000 times.

3 结论与讨论

以聚乳酸和淀粉(质量比 20:1)为载体, 以氟苯尼考为载药对象, 制备了在海水中具有缓释作用、适

合于网箱养殖应用的颗粒状药丸。该药丸孔隙率高,孔分布均匀,孔之间的连通性好,有利于药物在载体内的均匀分布;载药量在0~10%范围内可调,具有可降解性和良好的缓释效果,且对大黄鱼无毒副作用。药丸撒入海水中后,通常漂浮于海水表面,但考虑到药丸进入鱼体内后四周都被液体包围,因此分别对漂浮与浸没两种状态下的释放规律进行了研究。结果表明,浸没在海水中比漂浮于水面上更容易使药物释放出来,但其绝对释放量均极少,有利于减少药物对养殖海域的污染。

所制备药丸在大黄鱼体内的释放时间较长,释放速率较慢,这可能与聚乳酸在大黄鱼体内降解比较缓慢有关。聚乳酸的降解可分为水解^[8]和酶催化降解^[9-10]两种途径,但在酶存在的情况下,二者往往不能完全隔裂开,即在酶催化降解的同时也伴随水解反应的发生。碱性环境有利于聚乳酸的水解,因水解后的产物乳酸可与碱中和,从而促进反应的进一步进行。由于大黄鱼体内消化系统环境为偏酸性,因此不利于聚乳酸水解反应的发生;另一方面,大黄鱼属肉食性动物,其体内蛋白酶活力较高,而淀粉酶活力较低^[11],因此对淀粉的消化能力也较弱;最终导致以聚乳酸和淀粉为载体的抗菌药丸在大黄鱼体内降解缓慢,从而对药效成分的释放速率产生一定的影响。

本研究结果表明,运用可降解载体包埋如氟苯尼考等抗菌药物,并制作成在海水中释放量较少的药物颗粒,作为水域养殖的给药方式是可行的,有利于对水环境的保护。目前笔者正在尝试调整载体基材的性质,以研制出适合在大黄鱼体内使用的、具有合适降解性能的渔用口服药丸。

参考文献:

[1] HUANG Yan-ping(黄艳平), YANG Xian-le(杨先乐), ZHAN Jia(湛嘉), *et al.* 水产动物疾病控制的研究和进展[J]. *J*

Shanghai Fisheries Univ(上海水产大学学报), 2004, 13(1): 60-66.

- [2] YANG Xian-le(杨先乐), ZHENG Zong-lin(郑宗林). 我国渔药使用现状、存在的问题及对策[J]. *J Shanghai Fisheries Univ*(上海水产大学学报), 2007, 16(4): 374-380.
- [3] WANG Min-quan(王民权), FANG Wen-hong(房文红), YANG Xian-le(杨先乐). 我国渔药面临的困惑、对策及展望[J]. *Sci Fish Farming*(科学养鱼), 2006, 12(1): 1-2.
- [4] ZHONG W, GE J J, GU Z Y. Study on biodegradable polymer materials based on poly(lactic acid). I. Chain extending of low molecular weight poly(lactic acid) with methylenediphenyl diisocyanate[J]. *J Appl Polym Sci*, 1999, 74(10): 25-46.
- [5] CAO Hai-peng(曹海鹏), YAN Ming(闫明), YANG Xian-le(杨先乐). 氟苯尼考的体外抑菌作用及其对鲫抗嗜水气单胞菌感染的效果[J]. *Fishery Modernization*(渔业现代化), 2007, 34(4): 47-49.
- [6] JIANG DING-guo(蒋定国), YANG Da-jin(杨大进). 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况[J]. *Chin J Food Hygiene*(中国食品卫生杂志), 2002, 14(2): 44-47.
- [7] HU Ding-fei(胡顶飞), SHEN Jian-zhong(沈建忠). 氯霉素类抗生素的残留分析[J]. *Chin J Veterinary Drug*(中国兽药杂志), 2001, 35(5): 55-57.
- [8] PAN Meng-jie(潘梦洁), CHEN Yong-ming(陈永铭), CHEN Gan-lin(陈甘霖), *et al.* HP Pavilion 系列主机纸浆模塑包装及其试验研究[J]. *Packaging Engineering*(包装工程), 2006, 27(4): 38-40.
- [9] MUNILLA M R, SABORIDO R F. Digestive enzymes in marine species. I. Proteinase activities in gut from redfish (*Sebastes mentella*), Seabream (*Sparus aurata*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, 113b(2): 395-402.
- [10] YANG Hui-ping(杨惠萍), TONG Sheng-ying(童圣英), WANG Zi-chen(王子臣), *et al.* 国内外关于水产动物消化酶研究的概况[J]. *J Dalian Fisheries Univ*(大连水产学院学报), 1998, 13(3): 64-71.
- [11] LIU Yang(刘扬), ZHOU Xiao-qi(周小秋), YE Cheng-yuan(叶成远), *et al.* 鱼类消化酶活性的影响因素[J]. *Feed China*(饲料广角), 2004(18): 37-38.

(责任编辑:唐静)