

VALORI FARMACOCINETICE REZULTATE DIN DETERMINAREA REZIDUURILOR DE ENROFLOXACIN SI CIPROFLOXACIN DIN CARNEA DE PASARE

ENROFLOXACINE AND CIPROFLOXACINE RESIDUES PHARMACOKINETIC VALUES DETERMINED IN POULTRY MEAT

Vasile Trifan,¹ Aurora Rotaru¹ Gheorghe Paraschiv¹, Nadejda Sidoruk²

¹CRIDA PHARM SRL Romania,² Insitutul de Control al Preparatelor Veterinare din Ucraina.

Cuvinte cheie: enrofloxacină, ciprofloxacină, reziduuri, farmacocinetică, broileri

Key words: enrofloxacin, ciprofloxacin, residues, pharmacokinetic, broilers

Abstract

Enrofloxacin and ciprofloxacin pharmacokinetic and residues from broiler's meat were investigated after 10 mg x kgbw⁻¹ Enroflox[®] (Crida Pharm) oral solution, administrations for five consecutive days.

Rezumat

Farmacocinetica si reziduurile de enrofloxacină si ciprofloxacină in organismul broilerilor au fost investigate dupa o administrare orala timp de 5 zile consecutiv a cate 10 mg/kg/ greutate vie, a medicamentului Enroflox 10% solutie orala, fabricat de către Crida Pharm. Menționăm că lucrarea a mai fost prezentată la Congresul International de Științe Agrare, Lvov, Ucraina, 2007.

Scop

Se propune investigarea prin HPLC a reziduurilor produsului Enroflox[®] (CridaPharm) soluție orală, la pui broiler

MATERIAL ȘI METODĂ

Determinările au fost efectuate pe loturi de pui broiler. După 5 zile in care puii au primit doza de 10 mg/kg/ greutate vie, au fost sacrificate câte zece păsări în ziua 1, a 3-a, a 5-a, a 7-a și a 8-a zi după tratamente.

Pregătirea probelor

Dupa sacrificare probele de muschi au fost congelate la -17°C si au constituit proba de lucru.

Metoda analitică

Instrumentele

- baie ultrasonică;
- agitator magnetic;
- balanță analitică;
- HPLC-GBS (cu pompa quaternara, detector UV, degazor, njector, Valco;
- centrifuga;
- HPLC Coloana Superspher 100 RP-18;

Reactivii uzuali

- apa distilata;
- acid clorhidric 2N Merck
- metanol pt. HPLC gradient quality (Sigma);

Reactivii pentru HPLC

- acid ortofosforic 85% (Merck);
- trietilamina;
- apa distilata;
- acetoniitril nanograde (Sigma);

Prepararea soluțiilor

acid clorhidric 0.01 N. Se aduc 5 ml acid clorhidric 2 N intr-un balon cotate de 1litru si se aduce la semn cu apa distilată; acid

clorhidric 0.0 2 N. Se aduc 100 ml acid clorhidric 2 N intr-un balon cotate de 1litru si se aduce la semn cu apa distilată; Se aduc 50 ml acid clorhidric 2 N intr-un balon cotate de 1litru si se aduce la semn cu apa distilată; Soluția 1 (acid clorhidric 0.2 N: acetoniitril) 2:1. Se aduc 500 ml acetoniitril peste 1 litru de acid clorhidric 0.2N; Soluția 2 (soluția 1: metanol) 1:2. Se aduc 500 ml. Soluția peste 1 litru Metanol;

Faza mobila

Se aduc 4.5 ml trietilamina si 830 ml apa intr-un vas. Se omogenizează bine si pH-ul se ajustază la 2.3 cu acid ortofosforic 85%.

Analiza

Faza de extracție

- Se cântăresc 0.5 g mușchi intr-un tub de centrifugă;
- Se adaugă 5 ml HCl 0.1 N
- Se omogenizează 1 minut la 200 r.p.m.
- Se centrifughează 15 minute;
- Se aduce supernatantul intr-un alt tub de centrifugă;
- Se repeta operația pentru depozit;
- Se reunesc extractele;
- Se centrifughează (extractul final 10 ml.)

Purificarea

Extractul final se purifică pe un cartuș (Oasis Waters HLB 60 mg. copolimer)

- se condiționează cartușul cu 2.5 ml metanol;
- se spală cu 2.5 ml apa;
- se trece omogenizatului prin cartuș cu un debit mai mare de 4 ml/minut;
- se spală cu 10 ml apa
- se usucă pentru 5 minute;
- Se eluează cu 2.5 ml metanol urmat de 2,5 ml isopropanol;
- Se evapora la sec, max. 30°C;
- Se re dizolvă cu 1ml apa la pH = 2.3 ajustat cu acid fosforic 85%
- Se agita 1 minut
- Se ultrasonează 3 minute
- Se filtrează pe 0.45μm

Cromatografia

Coloana: LicroCart 125-4 Superspher 100 RP-18;

Timp analiza : 10 minute;

Debitul: 1 ml/min.

Faza mobila (apa: trietilamina pH 2.3): acetoniitril 86.3:13.7

Lungimea de unda: 280 nm;
Domeniul de lucru: 4- 0.1 ppm (mg /kg țesut) ;

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Schema de sacrificare și valorile reziduurilor de enrofloxacin și ciprofloxacin din mușchi sunt prezentate în tabelul și figura nr.1.

Tabel 1

Valorile înregistrate pentru reziduurile de ciprofloxacină și enrofloxacină

Specificare (mg/kg greutate corporală)	Ziua sacrificării				
	1-a	3-a	5-a	7-a	8-a
Valori pentru: ciprofloxacină + enrofloxacină	2.296	0.623	0.074	0.058	0.033

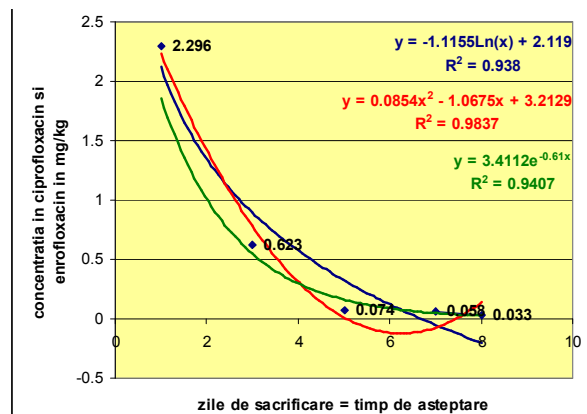


Figura 1. Valori de depleție a reziduurilor de ciprofloxacină și enrofloxacină din carnea de pasăre, tratate cu Enroflox 40% pulbere.

Cea mai bună reprezentare este ilustrată de o ecuație de tip exponențial, deducerea valorilor fiind efectuată cu ajutorul ecuației:

$$Y = 3,4112e^{-0.61X}$$

$$R^2 = 0,9407$$

$$R = 0,9698$$

Zilele sacrificării	Σ ciprofloxacin și enrofloxacin în mg/kg valori reale	Valori calculate conform ecuației*
1	2.296	1.871
2		1.027
3	0.623	0.563
4		0.309
5	0.036	0.169
6		0.932
7	0.058	0.051
8	0.033	0.028

Nota: *în continuare, valorile din coloana a 3-a vor fi corelate.

Zile de sacrificare	Timp (ore)	Cantitatea reziduurilor ramasa in corp Σ cipro+enro mg /kg	Cantitatea eliminata	Fractia eliminata
1	24	1.871	0	
2	48	1.027	0.844	0.45
3	72	0.563	0.464	0.45
4	120	0.309	0.254	0.45
5	144	0.169	0.14	0.45
6	168	0.093	0.076	0.45
7	192	0.051	0.042	0.45
8	216	0.028	0.023	0.45

Determinarea cantitatii de enrofloxacină și ciprofloxacină existenta in carne in ultima zi de tratament.

Raportul	Valoarea
2/1	0.548
3/2	0.548
4/3	0.548
5/4	0.547
6/5	0.550
7/6	0.548
	Medie =0.548

Aplicand valoarea mediei la valoarea din prima zi: $1,871/0,548=3,414$ mg enrofloxacin și ciprofloxacin/kg carne inaintea sacrificarii sau ziua zero. Nivelul de 3,414 mg/kgc., reprezinta cantitatea maxima de reziduuri $C_{max} = 3,414$ mg/kg.

Redefinind curba, consideram ecuatia :

$$Y = 6.219e^{-0.6005X}$$

$$R^2 = 1.0$$

$$R = 1$$

Determinarea ratei constantei de eliminare

Zile de sacrificare	Timp (ore)	Reziduuri Σ cipro+enro mg/kg	Cantitate eliminata	Fractia eliminata
0	0	3.414	0	
1	24	1.871	1.543	0.45
2	48	1.027	0.844	0.45
3	72	0.563	0.464	0.45
4	120	0.309	0.254	0.45
5	144	0.169	0.14	0.45
6	168	0.093	0.076	0.45
7	192	0.051	0.042	0.45
8	216	0.028	0.023	0.45

Dupa cum se poate observa, exista o relatie lineara intre rata de eliminare și concentratia de reziduuri din carne. Atunci când cantitatea de medicament eliminata ramane constanta vorbim despre un proces de eliminare de ordinul întâi. In aceste conditii Kel reprezinta cantitatea de medicament eliminata pe unitatea de timp, in cazul nostru 24 de ore. Determinarea ($T^{1/2}$) prin metoda experimentală:

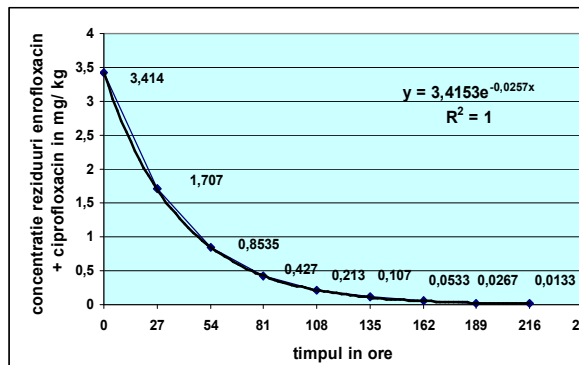
Zile de sacrificare	mg de En+Cy eliminate pe ora pentru 1 kg de carne	½ din valorile initiale	$T_{1/2}$
1	$1.543/24=0.0643$	$3.414/2=1.707$	$1.707/0.0643 =26.55$
2	$0.844/24=0.0351$	$1.871/2=0.936$	$0.936/0.0351 =26.65$
3	$0.464/24=0.0193$	$1.027/2=0.514$	$0.514/0.0193 =26.63$
4	$0.254/24=0.0106$	$0.563/2=0.282$	$0.282/0.0106 =26.60$
5	$0.140/24=0.0058$	$0.309/2=0.155$	$0.155/0.0058 =26.72$
6	$0.076/24=0.0031$	$0.169/2=0.085$	$0.085/0.0031 =27.41$
7	$0.042/24=0.0018$	$0.093/2=0.047$	$0.047/0.0018 =26.11$
8	$0.023/24=0.00096$	$0.051/2=0.026$	$0.026/0.00096=27.08$

Media lui $T^{1/2} = 26.71$ ore

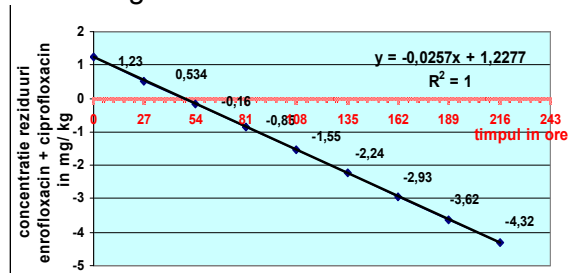
SD = 0.39

RSD = 1.46%

Concentratiile reprezentate in scara de ½ versus $T^{1/2} =27$ ore vor fi:



Valorile logaritmice vor fi:



Valoarea slopului: $dY/dX = [(1,23-0,543)/27] \times 24 = 0,61$

Avand in vedere ca $R = 1$ valorile vor fi identice pentru oricare dY/dX

$Kel = 0.61$

Efectuând determinările matematice pentru valorile $T_{1/2}$: $T_{1/2} = \ln 2 / Kel$, s-a obținut

$T_{1/2} = 0,693/0,61 = 1,136 = 1 \text{ zi } 3 \text{ ore} = 26,26 \text{ ore}$

$T_{1/2} \exp./T_{1/2} \text{ mat.} = 26,71/26,26 = 101, 7\%$

CONCLUZII

Desi aceste modele sunt aplicate în general pentru determinarea constantelor pentru sânge, ele sunt perfect valabile și in cazul eliberării medicamentelor din tesuturi, după cum urmează:

1. $C_{\max} = 3.414 \text{ mg/kg}$, se poate afirma ca maximul de concentratie existent in carnea de pasare dupa 5 zile de tratament la o doza de $10 \text{ mg/kg/ greutate vie}$ este de 3.414 mg/kg . In aceeasi ordine de idei aceasta valoare reprezinta si concentratia pentru „stady state”.

2. Este cunoscut ca starea de „stady state” este atinsă după 4-5 cicluri de $T_{1/2}$. Astfel $27 \text{ ore} \times 4.5$ (ca sa luam media) = $121,5 \text{ ore} / 24 = 5,06 \text{ zile}$.

3. Tratamentul ectuat cu Enroflox 40% este recomandat in prospect a se realiza pe timpul a 5 zile.

4. $T_{1/2} = 26,71 \text{ ore}$. (Randall si Cooles (2006) raportează pentru enrofloxacină

(Baytril 10%) administrat in aceeasi doza timp de 5 zile un $T_{1/2} = 27,05$);

5. Practic din a 6-a zi carnea de pasare are un conținut total de ciprofloxacin enrofloxacină mai mică decât MRL (Minimum Residual Limit) impus de Normativele UE ($100 \mu\text{g/kg}$);

BIBLIOGRAFIE

1. Aliabadi, F. S., Landoni, M. F., Lees, P. (2003). Pharmacokinetics (PK), Pharmacodynamics (PD), and PK-PD Integration of Danofloxacin in Sheep Biological Fluids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, p. 626-635.
2. Anadón A, Bringas P, Martínez-Larrañaga MR, Díaz MJ (1994). Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. Bioavailability, pharmacokinetics and residues of chloramphenicol in the chicken. *J Vet Pharmacol Ther.* 17 (1) p. 52-8.
3. Anadón A, Martínez-Larrañaga M. R., Díaz M. J., Fernández-Cruz M. L., Martínez M. A., Frejo M.T., Martínez M, Iturbe J, Tafur M. (1999). Pharmacokinetic variables and tissue residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in healthy pigs. *Am J Vet Res*; 60 (11) p.1377-82.
4. Anadón A., Martínez-Larrañaga M. R., Díaz M. J., Martínez M. A., Frejo M. T., Martínez M., Tafur M., Castellano V. J. (2002). Pharmacokinetic characteristics and tissue residues for marbofloxacin and its metabolite N-desmethyl marbofloxacin in broiler chickens. *Am J Vet Res.* 63 (7) p. 927-33.
5. Crivineanu Maria, Bârtoiu A., Paraschiv G., Trifan V., Aurora Rotaru (2008). Depleția comparativă a reziduurilor de enrofloxacin și ciprofloxacin în ficatul și rinichii de pasăre. In press. *Lucr. Șt. Med. Vet. Timișoara.*
6. Randall L., Sue Cooles, Coldham N., Stapleton S., Laura Piddock, Woodward M. (2006). Modification of enrofloxacin treatment regimens for poultry experimentally infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to minimize selection of resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 50, No. 12. p. 4030-4037.
7. Perez, S., Solans, C., Bregante, M. A., Pinilla, I., Garcia, M. A., Honrubia, F. (2002). Pharmacokinetics and ocular penetration of grepafloxacin in albino and pigmented rabbits. *J Antimicrob Chemother* 50: 541-545.
8. McKellar Q., Gibson I., Ana Monteiro, Bregante M. (1999). Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 43, No. 8, p. 1988-1992.
9. Sarasola, P., Lees, P., AliAbadi, F. S., McKellar, Q. A., Donachie, W., Marr, K. A., Sunderland, S. J., Rowan, T.G. (2002). Pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles of danofloxacin administered by two dosing regimens in calves infected with *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, p. 3013-3019.
10. Soliman GA (2000). Tissue distribution and disposition kinetics of enrofloxacin in healthy and *E. coli* infected broilers. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 107(1) p. 2.