

氟苯尼考在牙鲆体内残留的消除规律

崔毅¹ 周明莹¹ 陈碧鹃¹ 田丽粉²

(¹农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室

中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²广东省惠州市博罗县农业科学研究所, 516100)

摘要 采用口服给药、不同时间点采样的方法研究了氟苯尼考在牙鲆体内的残留消除规律, 采用高效液相色谱法测定了氟苯尼考在牙鲆组织中的含量。结果表明: 1) 牙鲆连续 5 d 口服剂量为 50 mg/kg 的氟苯尼考后, 药物在各组织中的分布情况为血液 > 内脏团 > 肌肉, 随后各组织中氟苯尼考的浓度逐渐下降。6 d 后各个组织药物浓度趋于平稳, 而肝肾中的氟苯尼考浓度在 10 d 和 14 d 时有回升现象。2) $T_{1/2}$ 为 32.09~40.73 h, 说明口服氟苯尼考在牙鲆体内消除较快, 残留较少, 但肾脏和肝脏组织中残留较为明显。3) 探讨休药期的制定, 如果只考虑可食用组织, 且最大残留限量为 0.1 $\mu\text{g/g}$, 在本试验的养殖环境下推算, 牙鲆养殖过程中的平均温度为 16~18 $^{\circ}\text{C}$ 时, 休药期 ≥ 18 d。用温度与时间乘积表示则不低于 324 度·日。

关键词 氟苯尼考 高效液相色谱 牙鲆 消除半衰期 消除规律

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2012)05-0048-05

Elimination of florfenicol residue in *Paralichthys olivaceus* (T&S)

CUI Yi¹ ZHOU Ming-ying¹ CHEN Bi-juan¹ TIAN Li-fen²

(¹Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,

Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(² Agricultural Research Institute of Boluo of Huizhou, 516100)

ABSTRACT The elimination of florfenicol in *Paralichthys olivaceus* (T&S) was studied by oral administration. The concentrations of florfenicol in *P. olivaceus* (T&S) were determined by HPLC. The results showed that: 1) After oral administration at a dose of 50mg/kg for five consecutive days, the concentration of florfenicol in the tissues are ranked as: blood > visceral mass > muscle. The drug concentration in tissues stabilized after 6d, but florfenicol concentration in liver and kidney at 10d and 14d showed rebound phenomenon. 2) $T_{1/2}$ were 32.09~40.73h, which showed the faster elimination and the less residual amount of florfenicol in the body. However, residual concentrations in the kidney and liver were more obvious. 3) To explore the development of off-drug period, considering edible parts and MRL standard (0.1 $\mu\text{g/g}$), under the culture conditions of *P. olivaceus*: average temperature of 16~18 $^{\circ}\text{C}$, off-drug pe-

国家海洋局海洋环境评价专项[DOME(P)(MEA)-02、DOME(P)(MEA)-01-01]和中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022011002)共同资助

收稿日期: 2012-03-30; 接受日期: 2012-05-21

作者简介: 崔毅(1955-), 男, 研究员, 主要从事海洋生态环境研究。E-mail: cui@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85826332

riod ≥ 18 d, the product of temperature and time is no less than 324 degree \cdot days.

KEY WORDS Florfenicol High Performance Liquid Chromatography
Paralichthys olivaceus Half-life of elimination Elimination regularity

氟苯尼考(Florfenicol)为甲砒霉素的单氟衍生物,又称氟甲砒霉素,是美国先灵-葆雅(Schering-Plough)公司在1988年研制开发的氯霉素类动物专用药物,由于其结构中不含氯霉素中与抑制骨髓造血机能有关的-NO₂基团,大大降低了对动物和人体的毒性(邱银生等 1996;高俊岭等 2004;李秀波等 1999;廖昌荣等 2005;徐立文等 2005)。自20世纪90年代初上市以来,氟苯尼考以其广谱、高效、吸收迅速、分布广泛、安全、动物专用等特点,在国内外畜牧和水产养殖中迅速获得广泛应用(萧志梅 2000)。我国于2000年批准为国家二级新兽药(徐立文等 2005)。有关氟苯尼考在水产养殖动物体内的代谢动力学研究,国外较多,鱼类方面报道的有大西洋鲑鱼(Horsberg *et al.* 1996; Martinsen *et al.* 1993)、虹鳟(Pinault *et al.* 1997)、鳕鱼(Samuelsen *et al.* 2003)及鳗鲡(余培建等 2005),而有关北方地区广泛养殖的牙鲆鱼类未见相关报道。通过研究氟苯尼考在牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 体内的残留规律,为正确制定养殖生产用药方案,指导养殖用药和制定休药期提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

试验于2009年5月在中国水产科学研究院黄海水产研究所农业部海洋渔业可持续发展重点实验室完成。牙鲆取自黄海水产研究所海阳试验基地,平均体重为 100 ± 3 g的健康牙鲆;试验前在 $560\text{mm} \times 390\text{mm} \times 330\text{mm}$ 水族箱中暂养14d,投喂不含任何药物的饲料,给药前停止投喂。水温控制在 18 ± 1 ℃,海水盐度为31,pH为6.70,并在试验期间每天换水1次,连续充气。

1.2 药品和试剂

氟立欣(10%水溶性氟苯尼考药粉,批号070301)由山东金太阳制药有限公司生产;化学试剂有乙酸乙酯、乙腈、甲醇、正己烷,均为色谱纯;实验用水为二次蒸馏水。磷酸盐缓冲溶液:分别称取8g K₂HPO₄和2g KH₂PO₄,用双蒸水溶解混合并定容至1000ml。

1.3 仪器设备

高效液相色谱仪(Agilent-1100系列),配有紫外检测器、自动进样器等;电子天平(PL203/01);FM200高剪切匀浆机(上海弗鲁克流体机械制造有限公司);GL-88B漩渦混合器(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司);3-18K高速台式离心机(德国SIGMA公司);RE-52A旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

1.4 给药和采样

试验前将氟立欣和生理盐水混合制成所需浓度的混合液。按50mg/kg剂量连续5d口灌给药,随机选取健康的牙鲆,用1ml的一次性针管(弃针头)抽取适量体积药液,小心插入其喉部,推入药液后拔出针管稍待片刻后放回池中,同时开始计时(口服过程中回吐的应弃去)。于停药后的1、2、4、6、8、10、12、14、18d各个采样时间点采血液、肌肉、肝肾组织。每个时间点取6尾鱼,作为6个平行样分别处理测定。全部样品在-20℃冰箱保存。

1.5 标准曲线绘制

分别取肌肉、内脏和血液空白样品按照样品前处理方法进行,得到各组织空白滤液。分别用空白滤液稀释100μg/ml标准储备液成10、5、2、1、0.5、0.2、0.1μg/ml等一系列质量浓度的标准工作液,液相色谱测定。根

据标准工作液峰面积和浓度绘制工作曲线,得出回归方程和相关系数。

1.6 回收率和精密度的测定

本研究采用加标回收法。回收率= $C_r / C_c \times 100\%$,其中 C_r 为用空白样品(血液或组织)加入一定量的氟苯尼考标准品,再按样品预处理方法进行制样后,测定氟苯尼考的质量浓度; C_c 为添加的质量浓度。

氟苯尼考标准品分别以 0.5、1、2 $\mu\text{g/ml}$ 共 3 个浓度水平添加入空白肌肉样品中,混匀,静置 2 h 以上,按照样品处理方法进行提取和测定,根据结果计算回收率。以上 3 个浓度的样品,于 1 d 内分别重复进样 5 次并连续 5 d 重复测定,计算肌肉组织中各浓度水平相应浓度的日内平均变异系数和日间平均变异系数,以此衡量定量方法的精密度。

1.7 样品前处理

血样处理:试样自然解冻后,准确称取 1 g 于 10 ml 离心管中,依次加入 2 g 无水 Na_2SO_4 和 2 ml 乙酸乙酯,涡旋振荡 5 min,10 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于鸡心瓶中,再向残渣中加入 2 ml 乙酸乙酯进行二次提取。合并上清液于鸡心瓶中,45 $^\circ\text{C}$ 旋转蒸发至干,以 2 ml 磷酸盐缓冲液溶解残留物。加入 2 ml 正己烷涡旋振荡 2 min,分层后弃去正己烷层,此操作重复一次。下层液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,滤液供 HPLC 分析。

肌肉、肝肾的处理:肌肉、肝肾,自然解冻后用高速分散机打成浆,准确称取 1 g,同“血样处理”方法处理,HPLC 进样检测。

1.8 色谱条件

色谱柱采用 ODS- C_{18} 柱(250 mm \times 4.6 mm,填料粒度 5 μm);流动相 $\text{CH}_3\text{CN} / \text{H}_2\text{O} = 30/70$ (V/V);柱温 35 $^\circ\text{C}$;流速 0.75 ml/min;进样量 20 μl ;检测器为紫外检测器;紫外检测波长为 224 nm。

1.9 统计分析

将浓度-时间数据用计算机 Origin 7.5 软件拟合,求出消除速率常数(k)和消除曲线方程;采用公式 $T_{1/2} = \ln 2/k$ 计算消除半衰期 $T_{1/2}$ 。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线

氟苯尼考在 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ ($n=5$)的浓度范围内线性关系良好,回归方程为 $C_{\text{肌}} = 3.1065A_i + 0.0039$, $r=0.9992$; $C_{\text{内脏}} = 4.9418A_i + 0.2817$, $r=0.9939$; $C_{\text{血}} = 3.1065A_i + 0.0039$, $r=0.9992$ 。将高于 3 倍基线噪音的药物浓度定义为最低检测限。本研究条件下,该方法最低检测限为 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 回收率与精密度

本研究条件下,各组织中以 0.2、0.5、1.0 mg/kg 3 个浓度水平的氟苯尼考回收率为 86.83%~103.30%。测得日内精密密度为 2.47% \pm 1.33%,日间精密密度为 2.55% \pm 1.62%。

2.3 牙鲆给药后药物残留及消除

牙鲆连续 5 d 口服氟苯尼考(50 mg/kg),停药后氟苯尼考在牙鲆体内各个组织的药-时变化趋势见图 1,所得的药-时数据经过回归处理得到各组织中药物的质量浓度(Y)与时间(t)关系的消除曲线方程及消除半衰期 $T_{1/2}$ (表 1)。

表 1 氟苯尼考消除曲线方程及消除参数

Table 1 Elimination equation and parameters of florfenicol

组织 Tissue	方程式 Equation	k	R^2	$T_{1/2}$ (h)
肌肉 Muscle	$Y=0.5806+17.6293e^{-0.51821t}$	0.5182	0.99308	32.09
肝肾 Liver and kidney	$Y=0.6058+4.7553e^{-0.40831t}$	0.4083	0.95548	40.73
血液 Blood	$Y=0.2095+7.7432e^{-0.40346t}$	0.4035	0.99131	41.23

注: k 为消除速率常数, $T_{1/2}$ 为消除半衰期, R^2 为相关系数

Note: k : Elimination rate constant; $T_{1/2}$: Elimination half-life; R^2 : Goodness of fit for the regression line

牙鲆连续给药 5 d,停药后第 1 天的各组织浓度最大,肌肉、血液、肝肾中氟苯尼考的浓度依次是 2.220、5.229、3.803 $\mu\text{g/g}$;随后各组织中氟苯尼考的浓度逐渐下降,第 6 天肌肉、血液、肝肾中氟苯尼考的浓度依次是 0.211、0.631、0.395 $\mu\text{g/g}$;6 天后各个组织药物浓度趋于平稳,而肝肾中的氟苯尼考浓度在 10 和 14 d 时有回升现象,其浓度分别为 0.924、1.101 $\mu\text{g/g}$ 。口灌给药第 18 天时肌肉、血液、肝肾中氟苯尼考的浓度依次为 0.040、0.132、0.257 $\mu\text{g/g}$ (图 1)。

2.4 氟苯尼考在牙鲆体内的消除情况

牙鲆连续 5 d 口服药物后,第 1 天肌肉、血液、肝肾中氟苯尼考的浓度依次是 2.220、5.229、3.803 $\mu\text{g/g}$,氟苯尼考在各组织中的分布情况为血液>内脏团>肌肉;随后各组织中氟苯尼考的浓度逐渐下降,第 6 天肌肉、血液、肝肾中氟苯尼考的浓度依次是 0.211、0.631、0.395 $\mu\text{g/g}$;6d 后各个组织药物浓度趋于平稳。而肝肾中的氟苯尼考浓度在 10 和 14d 时有回升现象(图 1)。肝肾 10 和 14 d 左右出现双峰。关于药物吸收多峰现象及其机制的探讨多见在人体和哺乳动物中的报道(Ezzet *et al.* 2001;陈淑娟等 2001),水产动物体内未见深入研究。口灌给药第 18 天时肌肉、血液、肝肾中氟苯尼考的浓度依次为 0.040、0.132、0.257 $\mu\text{g/g}$ 。肾脏和肝脏组织中残留较为明显,可能是因为氟苯尼考为肝脏代谢、经肾脏排泄。氟苯尼考在牙鲆体内分布较广,能迅速地分布到各组织中,但各组织器官药物浓度不同。给药后初期肌肉中的氟苯尼考浓度明显低于肝脏、肾脏和血液中的氟苯尼考浓度。最后肌肉和血液的药物浓度相近,而且氟苯尼考在肌肉和血液中残留消除情况相似,残留量相对较小,而消除均快于其他组织。这种现象是由不同组织中血液循环速度不同引起的,血液在肝脏、肾脏等组织中的循环速度较快,在肌肉等组织中循环速度较慢,因此药物分布至肌肉的速度也较慢(邓树海等 1992),但药物在肌肉和血液中的浓度下降较肝肾快。

表 1 显示拟合后的结果:以 50 mg/kg 剂量连续 5 d 口服给药后,氟苯尼考在牙鲆体内的消除半衰期($T_{1/2}$)为 32.09 ~ 41.23 h。有研究报道:牙鲆连续 5 d 口服剂量 40 mg/kg 的药氯霉素, $T_{1/2}$ 为 39.4 ~ 115.5 h(刘秀红等 2003),说明口服氯霉素在牙鲆体内消除相对缓慢;牙鲆单次口服给药 80 mg/kg 恩诺沙星与口服 40 mg/kg 恩诺沙星和 40 mg/kg 环丙沙星混合药物,两组试验中恩诺沙星在鱼体内各组织的 $T_{1/2}$ 平均值为 179.115 h。表明了氟苯尼考在牙鲆体内消除较其他抗菌类药物快。作为氯霉素类药物,氟苯尼考消除速率较氯霉素快,并且避免了氯霉素易产生耐药性。且易致再生障碍性贫血等缺点,使其成为了水产养殖中氯霉素的最新替代品。

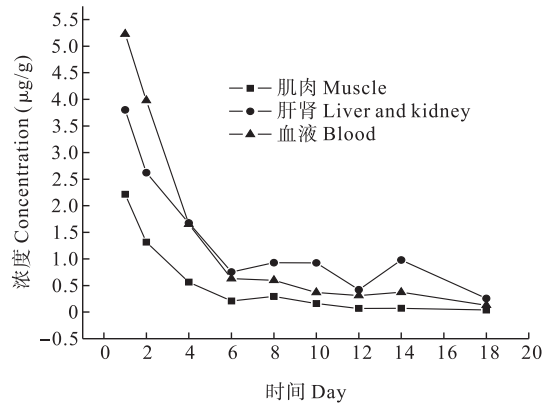


图 1 牙鲆连续 5 d 口服 50 mg/kg 氟苯尼考后各组织的药时曲线

Fig. 1 Concentration-time course of florfenicol in tissues after oral administration at a dose of 50mg/kg for five consecutive days

2.5 理论休药期的探讨

休药期是指动物从用药后到允许上市的一段时间,药物在组织中的残留限量是制定休药期的依据。制定渔药休药期是为了保障动物食品的安全性,通常根据国家规定的最大残留限量(MRL)标准和动物对药物的残留消除规律来确定。欧盟、加拿大和我国均以氟苯尼考和氟苯尼考胺为检出物,欧盟规定在有鳍肌肉中的残留限量为 $1.0\mu\text{g/g}$ 。加拿大对氟苯尼考及代谢物在鲑科鱼体内的残留限量是 $0.8\mu\text{g/g}$ (加拿大兽药残留 MRL 信息:www.hc-sc.gc.ca/english/index.html)。日本的规定较严格,规定在对鳗鱼类和家畜类的残留限量是 $0.2\mu\text{g/g}$,软体动物和甲壳类等残留限量为 $0.1\mu\text{g/g}$ 。我国规定在鱼类带皮肉中的残留限量为 $1.0\mu\text{g/g}$ (动物性食品中兽药最高残留限量,中华人民共和国农业部公告第235号,2002),与国外比稍嫌高,而最新的农业部无公害渔药残留标准未列出残留限量。故参考国外的残留限量,在本试验的情况下,若达到残留限量 $0.1\mu\text{g/g}$,停药12d后肌肉中氟苯尼考含量就可以达到要求。但是由于血液和肝肾中18d后仍然能检测出很高的氟苯尼考残留,另外考虑到本实验没有测定氟苯尼考代谢物氟苯尼考胺的情况,为了确保食品安全系数更高一些,因此建议牙鲆口服 50mg/kg 氟苯尼考后,并且在本试验的养殖环境下推算,牙鲆养殖过程中的平均温度为 $16\sim 18^{\circ}\text{C}$ 时,休药期 $\geq 18\text{d}$ 。用温度与时间乘积表示则不低于324度日。

参 考 文 献

- 中华人民共和国农业部公告第235号. 2002.《动物性食品中兽药最高残留限量》
- 邓树海,张秀珍,邹立家编著. 1992. 药物动力学与生物药剂学. 天津科技翻译出版公司. 436~479
- 加拿大兽药残留 MRL 信息:www.hc-sc.gc.ca/english/index.html
- 李秀波,石波,梁平. 1999. 新型广谱菌药-氟苯尼考. 中国兽药杂志, 26(3):50~52
- 陈淑娟,杨毅梅,刘奕明,张斌,庞雪冰,曾繁典. 2001. 蝙蝠葛碱大鼠体内药物动力学研究. 中国药理学通报, 17(2):225~229
- 刘秀红,王群,李健. 2003. 氯霉素在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律研究. 集美大学学报(自然科学版), 8(4):305~310
- 邱银生,吴佳. 1996. 兽用广谱抗菌药物氟甲砜霉素. 中国兽药杂志, 30(2):47~48
- 余培建,翁祖桐,樊海平,俞道进,陈星. 2005. 氟苯尼考在鳗鲡体内的药物代谢动力学研究. 福建水产, 25(4):52~57
- 高俊岭,高启平. 2004. 氟苯尼考在水产养殖中的应用. 中国水产, 3:52~53
- 徐立文,廖昌荣,刘广峰. 2005. 氟苯尼考用于水产养殖的安全性. 中国水产科学, 12(4):512~518
- 萧志梅. 2000. 氟苯尼考的临床应用及市场状况. 中国兽药杂志, 34(5):53~54
- 廖昌荣,徐立文,陈毕生. 2005. 氟苯尼考对六种海洋致病弧菌的体外抗菌活性研究. 水产养殖, 26(4):1~4
- Ezzet, F., Krishnaet, G., Wexler, D. B. *et al.* 2011. A population pharmacokinetic model that describes multiple peaks due to enterohepatic of ezetimibe. Clin. Therap. 23(6):871~885
- Horsberg, T. E., Hoff, K. A., and Nordmo, R. 1996. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic salmon. J. Aquat. Anim. Health, 8:292~301
- Martinsen, B. T., Horsberg, T. E., Varma, K. J. *et al.* 1993. Single dose pharmacokinetic study of florfenical in Atlantic salmon(*Salmo salar*) in sea-water at 11°C . Aquaculture, 112:1~11
- Pinault, L. P., Millot, L. K., and Sanders, P. J. 1997. Absolute oral bioavailability and residues of florfenicol in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Vet. Pharmacol. Therap. 20. SI:297~298
- Samuelsen, O. B., Bergh, ϕ ., and Ervik, A. 2003. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and in vitro antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*. Dis. Aquat. Organ, 56:127~133