

恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星 在牙鲆体内代谢消除规律

王洪艳^{1,2} 李兆新^{2*} 邢丽红² 唐锡招^{2,3}

(¹ 青岛工学院, 青岛 266300)

(² 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(³ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要 以 80 mg/kg 鱼体重对牙鲆单次口灌给药恩诺沙星, 给药后在不同的时间点取样, 用高效液相色谱荧光检测器检测, 研究恩诺沙星及其主要代谢产物环丙沙星在牙鲆体内的代谢消除规律。研究表明, 停药后 0.25 h, 肌肉中恩诺沙星残留量最低。各组织的消除半衰期依次为腮 > 肝脏 > 血液 > 肾脏 > 肌肉, 其中肌肉中恩诺沙星消除半衰期最低为 67.759 h, 消除最快, 停药后 12 d 检测不到恩诺沙星。停药后 0.25 h, 在牙鲆血液、肝脏、肾脏中均有环丙沙星残留, 残留量依次为肝脏 > 肾脏 > 血液, 肌肉和鳃中未检出环丙沙星。停药后 22 d 在血液、肝脏和肾脏 3 个组织中仍然能够检测出恩诺沙星, 但是停药 7 d 后这 3 个组织中均检测不出环丙沙星。结果显示, 恩诺沙星在牙鲆体内代谢速度较慢, 而且只是在一段时间内有脱乙基代谢为环丙沙星的反应发生, 但并不是在恩诺沙星消除的全过程都发生, 而且代谢物环丙沙星在牙鲆体内的消除速度要比恩诺沙星快。

关键词 恩诺沙星; 环丙沙星; 牙鲆; 代谢消除规律

中图分类号 S912 文献识别码 A 文章编号 1000-7075(2014)03-0044-06

Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in flounder *Paralichthys olivaceus*

WANG Hong-yan^{1,2} LI Zhao-xin^{2*} XING Li-hong² TANG Xi-zhao^{2,3}

(¹ Qingdao University of Technology, Qingdao 266300)

(² Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(³ College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

ABSTRACT In this study we investigated the pharmacokinetics and elimination of enrofloxacin (ENRO) and its metabolite ciprofloxacin (CIP) in *Paralichthys olivaceus*. After the oral administration of a single dose at 80 mg/kg · bw, the time courses of concentrations of ENRO and CIP in fish tissues were measured with high-performance liquid chromatography and a fluorescence detector. At 0.25 h, the muscle retained the lowest level of ENRO residues among five tissues (See below). The elimination half-life of ENRO in the five tissues was in the order: gills > liver > kidney > blood > muscle. ENRO in muscle was eliminated fastest and had the lowest elimination half-life of 67.759 h;

农业部财政专项“制定恩诺沙星在鱼组织中最大残留限量标准”和“鲆鲽鱼类磺胺药类代谢模式及种间评估”(2013A1002)课题共同资助

* 通讯作者。E-mail: lizx@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2013-08-23; 接受日期: 2013-10-22

作者简介: 王洪艳(1979-), 女, 讲师, 主要从事水产安全及检测技术研究。E-mail: hongyan4616@sina.com

hence in the 12th day after the drug withdrawal, ENRO in the muscle was no longer detectable. At 0.25 h, the concentration of CIP residues in different tissues was in the order: liver > kidney > blood, while CIP could not be detected in the muscle and gills at the same time. In blood, liver and kidney, ENRO was still detectable in the 22nd day after the drug withdrawal; whereas CIP could not be detected in these tissues since the 7th day. These results indicated that the metabolism and elimination of ENRO in *P. olivaceus* was relatively slow. We also found that the degradation of ENRO into CIP occurred only in a short period after the ENRO administration. Obviously the elimination of CIP in flounder was much faster than that of ENRO.

KEY WORDS Enrofloxacin; Ciprofloxacin; Flounder; Pharmacokinetics

恩诺沙星(Enrofloxacin)又名乙基环丙氟哌酸、乙基环丙沙星,是喹诺酮类(Quinolones)药物。恩诺沙星具有很好的抗菌效果,邱银生等(1993)研究表明,恩诺沙星对水产养殖中的气单胞菌属、弧菌属、耶尔森氏菌属、巴斯德氏菌属等致病菌有很好的疗效。恩诺沙星代谢物环丙沙星(Ciprofloxacin)仍然具有抗菌活性,所以恩诺沙星被广泛应用。本研究是将环丙沙星作为恩诺沙星的代谢产物进行研究。但是长期或者不正当使用恩诺沙星会带来残留超标和细菌耐药性增强等问题,给我国食品安全和进出口贸易带来较大影响。

牙鲆 *Paralichthys olivaceus* 是我国的主要海水养殖鲆鲽鱼类品种(臧坤等 2013)。关于恩诺沙星在水产动物体内代谢规律的研究已有很多,方星星等(2004)、徐维海等(2004)分别研究了恩诺沙星在对虾和罗非鱼体内的代谢规律,但是,尚没有关于恩诺沙星在牙鲆体内代谢规律的研究。报道恩诺沙星在水产品中的限量值都是以恩诺沙星和环丙沙星的总量计算,所以对环丙沙星在动物体内的代谢规律需进行研究。

本研究以牙鲆为试验对象,采用口灌给药方式,研究牙鲆口服恩诺沙星后体内原药及代谢产物的代谢规律,控制恩诺沙星及其代谢产物在牙鲆体内残留,为养殖水产提供用药参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验用鱼

健康牙鲆选自辽宁省旅顺市太平洋海珍品养殖基地,平均体重约 100 g。试验前驯养 14 d,投喂不含任何药物的饲料。

1.1.2 药品和试剂

乙腈和甲醇均为色谱纯,Sigma-Aldrich 公司生产;正己烷、冰醋酸、三乙胺以及 85% 磷酸为分析纯,上海化学试剂公司;恩诺沙星、环丙沙星标准品购于北京陆桥技术有限责任公司,纯度 $\geq 98\%$ 。

1.1.3 仪器与设备

BP221S 型电子分析天平:精度 0.0001 g,西德赛多利斯公司。组织匀浆机 IKA-T18basic:德国 IKA 公司。漩涡混合器:德国 IKA 仪器公司。KQ-600DE 型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司。Milli Q 超纯水:密理博公司。离心机:最高转速 4000 r/min,飞鸽牌 TDL-40B。旋转蒸发器 Laborota 4000:德国 Heidolph 公司。Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配荧光检测器。

1.2 方 法

1.2.1 投药方法

试验前先用少量淀粉糊将恩诺沙星制成乳化液,随机选取健康的牙鲆,用 1 ml 的一次性针管(弃针头)抽取适量体积药液(80 mg/kg 鱼体重),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(口服过程中回吐的弃去)。

1.2.2 取样方法

空白组于给药前采样并分离其血液、鳃、肌肉、肝脏、肾脏组织,置于 -20°C 冰箱中冷冻保存,以待分析。

试验组分别在给药后的0.25 h - 22 d的20个时间点进行取样,每时间点随机取3尾牙鲆,分别置于 -20°C 冰箱中冷冻保存,以待分析。

1.2.3 溶液配制

环丙沙星与恩诺沙星标准储备液的配制:分别准确称取0.0050 g环丙沙星、恩诺沙星标准品置于50 ml容量瓶中,用0.1 mol/L盐酸溶解并用水定容到50 ml,即为100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

环丙沙星与恩诺沙星标准工作液的配制:分别取环丙沙星、恩诺沙星标准储备液用水稀释成1 g/ml的标准工作液。

磷酸/三乙胺溶液配制:1000 ml水中加0.68 ml 85%的磷酸,用三乙胺调pH到3.0。

1%醋酸乙腈溶液:取10 ml冰醋酸,用乙腈定容到1000 ml。

1.2.4 色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,250 mm \times 4.6 mm;柱温: 35°C ;流动相:0.01 mol/L磷酸/三乙胺:乙腈=80:20(V/V);流速0.6 ml/min;进样量30 μl ;荧光检测器:激发波长280 nm、发射波长450 nm。

1.2.5 样品提取与纯化

准确称取2 g组织或吸取1 ml血液放入50 ml塑料离心管中,加入10 ml 1%醋酸乙腈溶液,高速均质3 min后,在另1个50 ml离心管中加入5 ml 1%醋酸乙腈溶液清洗均质机的刀头,然后合并提取液,放入超声波池中超声2 min,4000 r/min离心5 min,把上清液转移到另1个50 ml的离心管中,残渣再用10 ml 1%醋酸乙腈溶液重复提取1次,离心,合并提取液。向提取液中加入10 ml正己烷,涡旋、振荡使其混合充分,4000 r/min离心5 min后将下层液体转移到50 ml鸡心瓶中, 40°C 条件下蒸干。最后用1 ml乙腈溶解残渣,经0.45 μm 滤膜过滤后进入HPLC检测。

由于肝脏中脂肪含量多,所以在提取肝脏中药物时正己烷添加量增加,以便去除脂肪。

该条件下方法评价指标的各参数分别是线性范围为10 - 500 $\mu\text{g}/\text{L}$,恩诺沙星和环丙沙星的相关系数分别为0.9990、0.9995;各组织中的回收率均大于70%,相对标准偏差小于10%;检出限5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.2.6 数据处理方法

试验结果经DAS 1.0软件处理后得到药代学参数值。

2 结果

2.1 恩诺沙星在牙鲆体内的消除情况

牙鲆各组织中恩诺沙星的浓度-时间曲线见图1。从图1可以看出,各组织中恩诺沙星的浓度-时间曲线都出现多峰现象,但是总体是先快速上升后缓慢下降的。停药后0.25 h,经高效液相色谱检测可知,鳃中恩诺沙星含量最高,肌肉中最低。血液、肝脏、肾脏3个组织中药物达峰最快,均为0.5 h,肌肉中最慢,为6 h。给药第12天肌肉中未检出恩诺沙星,而其他组织中到第22天还能检测到恩诺沙星。从图1还可以发现,肌肉中药物浓度-时间曲线整体分布在其他4个组织下面,可见牙鲆口灌恩诺沙星后,各组织中肌肉中的恩诺沙星浓度是最低的,也是消除最快的。

采用统计矩原理推算的恩诺沙星在牙鲆体内的药动学参数见表1。5种组织中恩诺沙星半衰期 $t_{1/2z}$ 的顺序依次为鳃 > 肝脏 > 血液 > 肾脏 > 肌肉,其中肌肉中半衰期(67.759 h)最小。反映药物消除快慢的另1个参

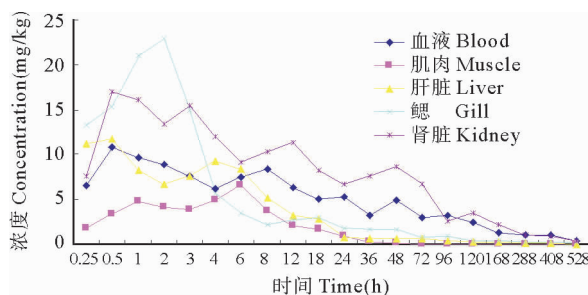


图1 口灌恩诺沙星后各组织中药物浓度-时间曲线

Fig. 1 Concentration-time course of ENRO in five tissues of flounder

数——药物平均滞留时间 $MRT(0 - \infty)$ 的大小顺序依次为腮 357.489 h、肝脏 250.400 h、血液 223.992 h、肾脏 161.408 h、肌肉 32.305 h,也体现了本研究中药物消除的快慢顺序。

表1 口灌恩诺沙星后牙鲆各组织中恩诺沙星药代动力学参数

Table 1 Pharmacokinetics parameters of ENRO in five tissues of flounder after single oral administration

药动学参数 Pharmacokinetics parameters	单位 Unit	血液 Blood	肌肉 Muscle	肝脏 Liver	鳃 Gill	肾 Kidney
$AUC(0 - 528\text{ h})$	mg/(L · kg)	875.956	84.138	84.806	351.001	1308.028
$AUC(0 - \infty)$	mg/(L · kg)	965.861	88.425	109.736	438.652	1390.719
$MRT(0 - 528\text{ h})$	h	168.241	19.082	251.938	126.397	128.012
$MRT(0 - \infty)$	h	223.992	32.305	250.400	357.489	161.408
$t_{1/2\alpha}$	h	157.989	67.759	211.732	324.541	133.965
T_{\max}	h	0.5	6	0.5	2	0.5
$V_{z/F}$	L/kg	18.883	88.460	222.739	85.410	11.120
$CL_{z/F}$	L/(h · kg)	0.083	0.905	0.729	0.182	0.058
C_{\max}	mg/L	10.882	6.546	11.775	22.886	17.074

AUC 为血药浓度-时间曲线下总面积; MRT 为平均滞留时间; T_{\max} 为单剂量给药后出现最高血药浓度的时间; C_{\max} 为单剂量给药后的最高血药浓度; $V_{z/F}$ 为总表观分布容积; $CL_{z/F}$ 为药物自体内消除的总清除率; $t_{1/2\alpha}$ 为药物消除半衰期

Notes: AUC : area under the curve; MRT : mean residence time; T_{\max} : peak time after single dose administration; C_{\max} : maximum plasma concentration; $V_{z/F}$: total apparent distribution volume; $CL_{z/F}$: total drug clearance; $t_{1/2\alpha}$: half-life of elimination

2.2 恩诺沙星代谢产物环丙沙星在牙鲆体内的消除情况

口灌恩诺沙星后牙鲆肝脏、肾脏、血液3个组织中均有环丙沙星检出,其中肝脏中环丙沙星含量最高。肌肉和鳃中未检出环丙沙星。环丙沙星在3个组织中的浓度-时间曲线见图2。从图2可以看出,曲线也存在多峰现象,整体呈下降趋势,但是下降比较平缓,肝脏中在8h后的下降幅度较大。肝脏的浓度-时间曲线整体在肾脏和血液上面,其次是肾脏,然后是血液。即血液中环丙沙星总体浓度是最低的。

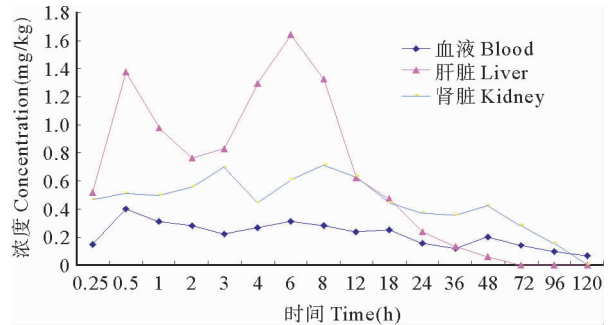


图2 口灌恩诺沙星后各组织中环丙沙星药物浓度-时间曲线

Fig.2 Concentration-time course of ciprofloxacin in tissues of flounder

采用统计矩原理推算的环丙沙星在牙鲆体内的药动学参数见表2。停药后0.25 h肝脏中环丙沙星残留为0.517 mg/kg,高于肾脏(0.468 mg/kg)和血液(0.146 mg/kg)保留。达峰浓度 C_{\max} 依次为血液0.402 mg/L、肝脏1.645 mg/L、肾0.713 mg/L。环丙沙星的半衰期 $t_{1/2\alpha}$ 依次为肾脏 > 血液 > 肝脏,而肝脏的达峰时间 T_{\max} 为6 h,比血液和肾脏长。

3 讨论

3.1 数据处理方法

根据准确度高、相对误差和绝对误差最小的原则,决定采用非房室模型统计矩分析。而且本研究中药物浓度与时间曲线出现多峰现象,也适合采用客观性较强的非房室模型统计矩分析。

表 2 口灌恩诺沙星后牙鲆各组织中环丙沙星药代动力学参数

Table 2 Pharmacokinetics parameters of CIP in tissues of flounder after single oral administration of ENRO

药动学参数 Pharmacokinetics parameters	单位 Unit	血液 Blood	肝脏 Liver	肾 Kidney
$AUC(0-528\text{ h})$	mg/(L·kg)	18.330	22.318	35.612
$AUC(0-\infty)$	mg/(L·kg)	23.241	23.290	78.890
$MRT(0-528\text{ h})$	h	47.831	12.605	38.776
$MRT(0-\infty)$	h	75.884	14.723	107.786
$t_{1/2\alpha}$	h	48.343	10.821	120.392
T_{\max}	h	0.5	6	8
$V_{z/F}$	L/kg	240.119	53.637	176.169
$CL_{z/F}$	L/(h·kg)	3.442	3.435	1.014
C_{\max}	mg/L	0.402	1.645	0.713

3.2 恩诺沙星在牙鲆体内的代谢消除规律

药物的吸收与分布主要与血液流量有关,而肝脏和肾脏是血液流量比较大的组织,所以本研究中这两个组织药物达峰较快,而肌肉最慢。腮中药物达峰浓度最高为 11.775 mg/ml,肌肉中最低为 6.546 mg/ml。药物在肝脏中的表观分布容积 $V_{z/F}$ 最大,而且体内清除率和半衰期大于其他组织,说明恩诺沙星在牙鲆肝脏中与血红蛋白结合率高,消除比较慢。这与邱银生(1993)在研究喹诺酮类药物在动物体内残留时发现恩诺沙星在肝脏中残留比较严重的现象相符合。

本研究中恩诺沙星在牙鲆肌肉中的半衰期为 67.759 h,比此前徐维海等(2004)研究的吉富罗非鱼 15.61 h、胡功政等(1999)研究的鸡 9.14 h、Jun 等(2006)21.3 h 的半衰期长。

Rao 等(1999)研究表明,恩诺沙星在山羊体内的半衰期为 1.396 h。Kaartinen 等(1997)对马肌肉注射恩诺沙星后,发现恩诺沙星在马体内后的半衰期为 9.9 h。从这些结果看出,恩诺沙星在水产动物体内的半衰期比陆生动物长。这可能是由于水生动物主要是变温动物,而且多生活在温度比较低的水中,新陈代谢较慢,所以药物的消除也较慢。Martinsen 等(1995)比较了噁喹酸、氟甲喹、沙拉沙星、恩诺沙星 4 种喹诺酮类药物在大西洋鲑鱼体内的药物代谢情况,结果前 3 种药物的消除半衰期均在 24 h 之内,而恩诺沙星在大西洋鲑鱼体内的消除半衰期为 34h。可见与同类药物相比,恩诺沙星在牙鲆体内的消除较慢。

3.3 恩诺沙星代谢物成环丙沙星产生及消除情况

恩诺沙星有多种代谢途径,其中最主要的是在肝脏中脱去乙基代谢成为环丙沙星,但种间存在着差异。本研究结果表明,口服恩诺沙星后,牙鲆肝脏、肾脏、血液 3 个组织中均有环丙沙星检出,其中肝脏中环丙沙星含量最高。肌肉和鳃中未检出环丙沙星。Intone 等(2000)研究了恩诺沙星在鲑鱼体内的代谢规律,口服给药后肝脏和血浆中可以检测到环丙沙星,但是在肌肉和皮肤中无环丙沙星,与本研究结果相似。

停药后 0.25 h,肝脏中环丙沙星残留量为 0.517 mg/kg,高于肾脏(0.468 mg/kg)和血液(0.146 mg/kg)中的残留。达峰浓度 C_{\max} 依次为血液 0.402 mg/L、肝脏 1.645 mg/L、肾 0.713 mg/L,方星星等(2006)对中国对虾肌注 10 mg/kg 恩诺沙星后肝胰脏中环丙沙星的 C_{\max} 为 0.183 $\mu\text{g}/\text{ml}$,高于其他组织。Intone 等(2000)对鲑鱼口服或药浴恩诺沙星后,血浆和肝脏中能够检测到少量的环丙沙星,而肌肉和皮肤中未检出。这些都说明肝脏是恩诺沙星的主要代谢部位。这可能是肝脏中含有与药物代谢相关的酶系较多的原因。另一个原因可能是肝脏对药物具有积聚作用,致使环丙沙星在肝脏中达到的峰浓度较血液中的高。

本研究中血液、肝脏和肾脏 3 个组织在 22 d 仍然能够检测出恩诺沙星,但是 7 d 后这 3 个组织中均未检

测出环丙沙星。徐维海等(2004)对中国对虾投喂含有恩诺沙星的药饵后,只在96 h以前在虾体内能够检测出环丙沙星,而在288 h仍能检出恩诺沙星。与本研究中恩诺沙星代谢为环丙沙星的情况相近。这说明恩诺沙星在牙鲆体内代谢速度较慢,而且只是在一段时间内有脱乙基的反应发生,但并不是在恩诺沙星消除的全过程都发生,而且代谢物环丙沙星在牙鲆体内的消除速度要比恩诺沙星快。

参 考 文 献

- 方星星,王群,李健. 2004. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在中国对虾体内的药代动力学. 水产学报, 28(Suppl):35-41
- 邱银生. 1993. 兽用喹诺酮类抗菌剂 Enrofloxacin 的研究概况. 中国兽药杂志, 27(3):52-55
- 吴皓,尹文林,邵健忠,项黎新. 2004. 环丙沙星在鳗鲡体内的药代动力学研究. 动物保健品, (6): 72-73
- 胡功政,冯淇辉. 1999. 恩诺沙星及其活性代谢物在鸡体内的药物动力学. 中国兽医学报, 19(2):171-174
- 徐维海,林黎明,朱校斌,王新亭,黄新苹,康兴伦. 2004. 恩诺沙星及其代谢产物在吉富罗非鱼、中国对虾体内的残留规律研究. 水产科学, 23(7): 5-8
- 臧坤,徐永江,柳学周. 2013. 两种养殖条件下牙鲆的血液生理生化指标比较分析. 渔业科学进展, 33(5):36-42
- Intone L, Cechini S, Bertini S and 3 others. 2000. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass. Aquaculture 182:49-59
- Kaartinen L, Pam S, Pyorola S. 1997. Pharmacokinetics of enrofloxacin in horses after single intravenous and intramuscular administration. Equine Vet J 29(5): 378-381
- Martinsen B, Horsberg TE. 1995. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10°C. Antimicrob Agents Chemother 39(5):1059-1064
- Rao GS. 1999. Pharmacokinetic studies of enrofloxacin in normal and febrile goats. [dissertation]. Izatnagar: Indian Veterinary Research Institute Deemed University

《渔业科学进展》动态

(1) DOI 注册 《渔业科学进展》已加入“中文 DOI”服务,获得出版机构会员资格。本刊可为2013年第6期以来已出版的论文注册 DOI。

(2) 版式改动 《渔业科学进展》的版式从2014年第4期开始,由现在的通栏改为双栏。

《渔业科学进展》编辑部

2014年6月20日