

论文荟萃

磺胺甲基异噁唑在大菱鲆体内的代谢动力学研究

孙玉增 刘慧慧 秦华伟 张世娟 邢红艳 徐英江 高继庆

(山东省海洋水产研究所, 烟台 264006)

摘要 采用高效液相色谱法测定血浆、肌肉和肝脏中的磺胺甲基异噁唑含量, 通过3P97药动学软件对磺胺甲基异噁唑在大菱鲆体内的药代动力学规律进行了分析研究。研究表明, 在(11±1)℃水温条件下, 单次口服100 mg/kg磺胺甲基异噁唑(SMZ), SMZ在大菱鲆肌肉、肝脏和血浆中的代谢过程均符合一级吸收-室模型。大菱鲆肌肉、肝脏和血浆中药物浓度分别在给药后11.89、10.53和4.87 h达到最大值, C_{max} 分别为21.52、5.35和44.07 mg/kg, 给药后5、6 d和72 h含量低于最大残留限量(0.1 mg/kg), 18、24和10 d后SMZ未检出(<0.01 mg/kg)。

关键词 大菱鲆 磺胺甲基异噁唑 药物代谢动力学

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)06-0042-06

Pharmacokinetics of sulfamethoxazole in turbot after oral administration

SUN Yu-zeng LIU Hui-hui QIN Hua-wei ZHANG Shi-juan

XING Hong-yan XU Ying-jiang GAO Ji-qing

(Shandong Provincial Marine Fisheries Research Institute, Yantai 264006)

ABSTRACT The pharmacokinetics, tissue metabolism and elimination of sulfamethoxazole (SMZ) was investigated in turbot *Scophthalmus maximus* following a single oral dose of 100mg/kg at (11±1)°C. Plasma and tissue concentration of SMZ was determined by HPLC. The concentration-time curves of SMZ in the muscle, liver and plasma fitted well to a one-compartment open model with first-order absorption. After the oral administration, the time to reach maximum SMZ concentration in the muscle, liver and plasma was 11.89 h, 10.53 h and 4.87 h, and the maximum concentration of SMZ was 21.52 mg/kg, 5.35 mg/kg and 44.07 mg/kg, respectively. 5 d, 6 d and 72 h after the administration, the SMZ content in the muscle, liver and plasma were less than the MRL (0.1 mg/kg); and it was undetectable at 18d, 24d and 10d in these tissues, respectively.

KEY WORDS Turbot Sulfamethoxazole (SMZ) Pharmacokinetics

磺胺甲基异噁唑为磺胺类药物中抗菌强而且较常用的复方制剂, 由于该种药在结构上类似对氨基苯甲酸

山东省科技攻关项目(2007GG20005001)资助

收稿日期: 2009-01-07; 接受日期: 2009-04-20

作者简介: 孙玉增(1963-), 男, 副研究员, 主要从事水产品质量安全研究。E-mail: ssyyzeng@sohu.com, Tel: (0535)6117808

(PABA),可与PABA竞争性作用于细菌体内的二氢叶酸合成酶,从而阻止PABA作为原料合成细菌所需的叶酸,减少细菌合成嘌呤、胸腺嘧啶核苷和脱氧核糖核酸(DNA)的必需物质四氢叶酸,抑制细菌的生长繁殖,在水产养殖方面广泛应用于肠炎病、爱德华氏菌病等细菌性疾病的治疗。但磺胺甲基异噁唑可造成人的肾脏损害,引起结晶尿、血尿和蛋白尿,重者可发生尿少、尿闭甚至尿毒症(李端等 2003)。我国、欧盟和FAO/WHO规定,动物组织中SMZ最高残留限量为0.1 mg/kg。

大菱鲆以其生长快、经济价值高等优点,在北方沿海尤其是山东半岛地区养殖十分广泛。但磺胺甲基异噁唑在鲆鲽类体内的代谢动力学研究鲜有报道,由于缺乏代谢动力学数据的指导,药物滥用现象时有发生,药物残留问题比较严重,给食品安全及消费者的健康带来威胁。本文首次探讨单次口服给药后SMZ在大菱鲆体内的代谢和消除规律,丰富了磺胺类药物的代谢研究资料,为SMZ在水产养殖中的合理用药及在大菱鲆体内的残留监控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

磺胺甲基异噁唑原粉(含量 $\geq 98\%$,批号20060711),由国邦药业提供;磺胺甲基异噁唑标准品(纯度99.0%,德国, Lot:60321)。

甲醇、乙腈,色谱纯(韩国,SK试剂公司);正己烷,色谱纯(天津科密欧化学试剂公司);无水硫酸钠、乙酸乙酯、乙酸,分析纯(天津市瑞金特化学品有限公司)。HLB固相萃取柱(Waters, 60mg,3cc)。

1.2 标准溶液配制

准确称取10mg磺胺甲基异噁唑标准品,用乙腈溶解并定容至100 ml,配成100 mg/L储备液,再用流动相配制1 mg/L标准工作液。

1.3 仪器和设备

高效液相色谱仪配紫外检测器(美国沃特斯公司 Waters 2695-2996),色谱柱为 Waters Sun fire-C18(5 μm ,150 mm \times 4.6 mm),超纯水仪(美国,Milli-Q),离心机(上海安亭科学仪器厂, TDL-40C)。

1.4 实验动物

实验用健康大菱鲆150条,体重 150 ± 20 g,由烟台泰华海珍品养殖有限公司提供,经抽检无SMZ残留,饲养于泰华海珍品养殖有限公司养殖场,试验期间水温(11 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。投喂颗粒饲料(经抽检无SMZ),试验前1 d停止投喂,给药后继续投喂,每日1次。实验期间大菱鲆无死亡。

1.5 给药

称取10.0 g SMZ原粉于1000 ml烧杯中,加水溶解,加热并搅拌,搅拌过程中加入淀粉,至淀粉溶液呈均匀的糊状。待淀粉药物溶液冷却后定容至1000 ml,加入少量食用色素,使淀粉药物溶液呈红色。药物浓度10 mg/ml,给药剂量100 mg/kg(按体重计算),口服给药。

1.6 样品采集

1.6.1 采样时间

在给药前及给药后第0.5 h、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、16 h、24 h、48 h、72 h、5 d、6 d、10 d、16 d、18 d和24 d采集样品,每一时间点取5尾鱼。

1.6.2 血浆样品采集

用网抄将鱼捞出,迅速用干布包住鱼体,拭干鱼尾上的水分,进行断尾采血,血浆样品接入5 ml刻度离心

管(离心管事先放入 0.1 ml 1% 肝素钠)至 3 ml。混合均匀后离心,取上层血浆,置于-20 °C 冰箱保存。

1.6.3 肌肉和肝脏样品采集

取鱼体双侧肌肉,去皮、骨,切成肉糜,装入密封袋;肝脏取出后整个放入研钵中,研碎后装入密封袋。置于-20 °C 冰箱保存。

1.7 样品处理

1.7.1 血浆和肌肉样品处理

样品解冻后,用移液器取血浆 1 ml(肌肉样品称取 2 g)于 50 ml 具塞离心管中,加入乙腈 10 ml,摇匀,超声提取 10 min;加入 5 g 无水 Na_2SO_4 ,震荡 1 min,4 000 r/min 离心 10 min。上清液转移到 100 ml 玻璃鸡心瓶中。残渣重复提取 1 次,合并两次提取液,50 °C 旋转蒸发至干。1 ml 流动相复溶后,加入 2 ml 正己烷脱脂 1~2 次,弃正己烷层,过 0.45 μm 水性针孔滤膜,注入液相小瓶待测。对于浓度超出标准曲线线性范围的样品,需稀释后重新进样。

1.7.2 肝脏样品处理

肝脏样品 2 g,用乙酸乙酯提取,提取过程同血浆、肌肉样品,将两次提取液转入另一 50 ml 具塞离心管中,加 5 ml 正己烷脱脂 1~2 次后,加入 5 ml 水将提取液稀释,过固相萃取柱。HLB 固相萃取柱事先用 6 ml 甲醇、6 ml 水活化,将稀释过的提取液分次转移到柱子里,控制流速 1~2 s 1 滴,用 3 ml 水和 3 ml 5% 甲醇洗涤柱子,最后用 5 ml 甲醇洗脱,用 10 ml 刻度试管接收洗脱液,40 °C 水浴条件下 N_2 吹干。1 ml 流动相复溶后,过 0.45 μm 水性针孔滤膜,注入液相小瓶待测。对于浓度超出标准曲线线性范围的样品,需稀释后重新进样。

1.8 药物残留分析

采用 Waters 2695-2996 高效液相色谱仪对经上述处理完成的样品进行检测。色谱条件为: Waters Sun fire-C18 液相色谱柱(150 mm \times 4.6 mm,5 μm);柱温:40 °C;流动相:2% 乙酸:乙腈=85:15 (v/v);流速:0.8 ml/min;紫外检测器检测波长:287 nm;进样量:20 μl 。

1.9 检测方法测试

1.9.1 标准曲线绘制

取适量标准工作液添加到空白组织中,制成 0.01、0.025、0.05、0.1、0.25 和 0.5 mg/kg 6 个浓度的标准添加样品,每个浓度 5 个平行,按照上述前处理方法和色谱条件进行检测,以各药物的峰面积 Y 对药物浓度 X (mg/kg)进行线性回归分析。

1.9.2 检测限的测定

取 5 份空白组织样品,按上述样品前处理方法进行处理,得到空白样品色谱图,将 3 倍信噪比($S/N=3$)作为检出限。

1.9.3 准确度和精密度的测定

取空白血浆及组织样品,添加一定量的标准工作液,使血浆及组织中药物浓度为 0.025、0.1 和 0.5 mg/kg,涡动 1 min,静置 15 min。样品经处理后进行 HPLC 检测,每个浓度进行 3 个批次、每批 5 个平行,计算回收率、批内变异系数和批间变异系数。

1.9.4 数据处理及分析

采用 3P97 药动力学软件进行药代动力学模型拟合及参数计算。

2 结果

2.1 标准曲线、方法灵敏度、准确度和精密度

在 0.01~0.5 mg/L 浓度范围内,SMZ 线性良好,线性回归方程为 $y=1.393 1x-9.085 2\times 10^{-3}$,相关系

数(R^2)=0.999 9。

取5个空白样品噪声值的平均值,以信噪比为3计,得到本方法的检出限为0.01 mg/kg;肌肉、血浆和肝脏中药物的平均回收率(%)分别为 $97.5 \pm 2.2\%$ 、 $75.4 \pm 0.7\%$ 和 $83.6 \pm 2.6\%$;批间、批内变异系数分别小于12.9%和8.7%。

2.2 口灌给药后 SMZ 在大菱鲆体内动力学特性

大菱鲆口灌 SMZ 后,血浆中、肌肉和肝脏中 SMZ 药时曲线见图 1 所示。

血浆:在给药后 0.5~4 h,血浆中药物浓度上升非常迅速,药物浓度由 1.73 mg/L 上升到 42.65 mg/L,并于给药后 4.87 h 达到最大值 44.07 mg/L,之后药物浓度开始下降,给药后 48 h,药物浓度降至 0.57 mg/L,给药后 72 h,药物浓度为 0.041 mg/L,10 d 后未检出(<0.01 mg/L)。

肌肉:给药后 0.5~6 h,肌肉中药物浓度迅速增长,6 h 后增长速度变缓,于给药后 11.89 h 达到最大值 21.52 mg/kg,之后药物浓度开始下降,给药后 72 h,药物浓度降至 2.1 mg/kg,5 d 后,药物浓度 0.097 mg/kg,低于最大残留限量(0.1 mg/kg),18 d 后未检出(<0.01 mg/kg)。

肝脏:给药后 10.53 h 肝脏中浓度达到最大值($C_{\max} = 5.35$ mg/kg),但数值明显低于肌肉中药物浓度,上升趋势也相对平缓。给药后 72 h,药物浓度降至 0.91 mg/kg,之后药物代谢非常缓慢,药物浓度低于最大残留限量(0.1 mg/kg)需要 6 d,24 d 后未检出(<0.01 mg/kg)。

2.3 SMZ 口灌给药后大菱鲆在血浆及不同组织中药物代谢动力学参数

应用 3P97 软件对所得的药物浓度-时间数据进行房室模型拟合,结果表明,大菱鲆口灌给药后,SMZ 在血浆、肌肉和肝脏中的代谢过程用一级吸收-室模型描述最为合适,拟合方程如下:血浆中药时曲线方程为: $Y = 110.4(e^{-0.1097t} - e^{-0.344t})$ (mg/kg),拟合度 $R^2 = 0.999$;肝脏中药时曲线方程为: $Y = 8.86(e^{-0.032t} - e^{-0.211t})$ (mg/kg),拟合度 $R^2 = 0.991$;肌肉中药时曲线方程为: $Y = 59.14(e^{-0.048t} - e^{-0.135t})$ (mg/kg),拟合度 $R^2 = 0.988$ 。表 1 为 3P97 软件拟合的药动力学参数。

3 讨论

3.1 SMZ 在大菱鲆体内的吸收和分布

口灌给药后,药物经胃肠道吸收首先进入血浆,

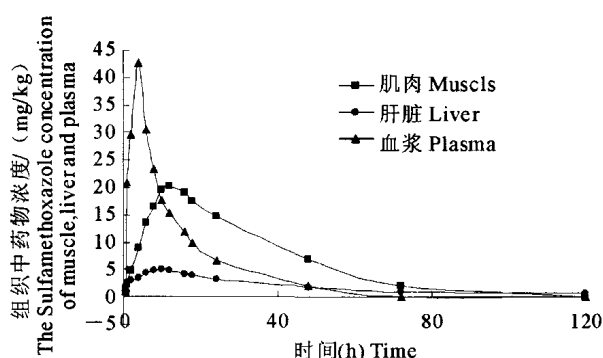


图 1 大菱鲆口灌给药 100 mg/kg 后 SMZ 在血浆、肝脏和肌肉中药时曲线 (10~12 °C)

Fig. 1 Sulfamethoxazole (SMZ) concentration and time profile of plasma, muscle and liver following a single oral administration at a dose of 100 mg/kg (10~12 °C)

表 1 口灌给药后 SMZ 在大菱鲆体内的药代动力学参数(10~12 °C)

Table 1 Pharmacokinetic parameters for SMZ following oral administration of SMZ to *Scophthatmus maximus* (10~12 °C)

药动力学参数 Pharmacokinetic parameter	血浆 Plasma	肌肉 Muscle	肝脏 Liver
A (mg/kg)	110.40	59.14	8.86
Ke (1/h)	0.1097	0.048	0.032
Ka (1/h)	0.344	0.135	0.211
Log t (h)	0.445	0.429	0.048
$T_{1/2\alpha}$ (h)	2.01	5.14	3.29
$T_{1/2\beta}$ (h)	6.32	14.44	21.57
T_{\max} (h)	4.87	11.89	10.53
C_{\max} (mg/kg)	44.07	21.52	5.35
AUC(mg/kg×h)	685.69	793.47	233.76
CL/F(mg/kg×h)	145	126	428
V/F	1.33	2.63	13.32

血浆中药物浓度在给药后 4.87 h 达到最大值 C_{max} 44.07 mg/kg。通过血浆循环药物被运送到全身各组织中,肝脏和肌肉中药物浓度分别在 10.53 和 11.89 h 相继达到最大, C_{max} 分别为 5.35 和 21.52 mg/kg。与已有报道相比,大菱鲆血浆中 T_{max} 4.87 h 高于草鱼,草鱼在 18 °C 水温条件下口灌给予 100 mg/kg 剂量 SMZ 后 T_{max} 为 3.09 h,且 C_{max} 44.07 mg/kg 明显小于草鱼 C_{max} 152.67 mg/kg;肌肉中大菱鲆 T_{max} 11.89 h 大于草鱼 T_{max} 4.01 h,且 C_{max} 21.52 mg/kg 小于草鱼 C_{max} 57.22 mg/kg。可见,大菱鲆对 SMZ 的吸收与草鱼相比慢且药物浓度低。

肝脏中 C_{max} 5.35 mg/kg,仅为肌肉最大浓度的 1/4 和血浆中最大浓度的 1/8,在鲈鱼(王群等 2001)、草鱼(艾晓辉等 2005)和中华绒螯蟹(唐俊等 2006)的研究中有相似的发现,国内学者方星星等(2003),王群等(2001),国外 Samuelsen(1997),Uno 等(1993)认为磺胺类药物在一些水产动物体内尤其是在肝脏中易与乙酰辅酶 A 结合而被转化为没有活性的 N_4 -乙酰化产物,即乙酰化过程,导致肝脏中药物浓度较其他组织中浓度低。乙酰化是否是导致大菱鲆组织尤其是肝脏中 SMZ 浓度低的原因,有待于进一步研究。

3.2 SMZ 在大菱鲆体内的消除

根据血浆中药物消除相半衰期 $T_{1/2\beta}$ 的大小,可将磺胺类药物分为短效磺胺($T_{1/2\beta}$ 约 6 h),中效磺胺($T_{1/2\beta}$ 接近 12 h)和长效磺胺($T_{1/2\beta}$ 超过 24 h)。草鱼单次口灌给予 100 mg/kg SMZ 后,血浆中 $T_{1/2\beta}$ 为 8.19~13.31 h(18~28 °C), (16±1)°C 水温条件下,单次口灌给予鲈鱼 200 mg/kg SMZ 后,血浆中 $T_{1/2\beta}$ 为 38.299 h, (20±2)°C 水温条件下,连续 5 d 投喂含新诺明(有效成分为 SMZ)3.12% 的饲料,中国对虾血浆中 $T_{1/2\beta}$ 为 45.1 h,而大菱鲆血浆中 $T_{1/2\beta}$ 为 6.32 h,相对于以上水生动物,SMZ 在大菱鲆体内消除较快,属短效磺胺。

3.3 SMZ 在大菱鲆体内的应用评价和休药期

以 100 mg/kg 剂量对大菱鲆口灌给药,大菱鲆血浆、肌肉和肝脏中 C_{max} 明显大于 SMZ 对常见致病菌的最小抑菌浓度(MIC 0.4~1.6 mg/L)(王群等 2001),可以起到杀菌和抑菌作用,但对于磺胺类药物,FDA、欧盟和日本等相关国家或组织将其列为必须严格监控的药物,其中 FDA 和欧盟规定动物源食品中磺胺药的最大残留限量为 0.1 mg/kg;日本为不得检出。目前国内对动物源食品中磺胺类药物总量最高残留量规定为 0.1 mg/kg(NY5070-2002)。由于大菱鲆血浆、肌肉和肝脏中药物 $T_{1/2}$ 的差异,3 种组织中休药期分别为 72h、5d 和 6d。尽管肝脏未被明确为鱼类的可食组织,但根据我国的烹饪和饮食习惯,肝脏中药物会影响到整体食用安全,因此建议把肝脏作为残留监控的靶组织。《中华人民共和国水产行业标准·磺胺类药物水产养殖使用规范》推荐的 SMZ 使用剂量是每日 150~200 mg/kg,连用 5~7d,首次用量加倍。连续给药时,药物在体内蓄积,首先达到一个稳态,然后消除。另外,年龄、健康状况、水温和水质等条件均可影响药物的消除速率,因此,在现实生产中要根据药物使用情况和实际养殖条件灵活把握休药期。

参 考 文 献

- 方星星,李健,王群,刘秀红. 2003. 复方新诺明在花鲈体内的残留及消除规律. 海洋科学, 27(9): 16~20
- 王群,孙修涛,刘德月,刘琪,李健. 2001. 复方新诺明在鲈鱼体内的药物代谢动力学研究. 海洋科学, 25(2): 35~38
- 艾晓辉,陈正望. 2001. 磺胺二甲嘧啶在银鲫体内的药理学及组织残留研究. 淡水渔业, 31(6): 52~54
- 艾晓辉,刘长征,周运涛. 2005. 不同水温和给药方式下磺胺甲唑在草鱼体内的药理学研究. 水生生物学报, 29(2): 210~214
- 李端,殷明. 2003. 药理学. 第五版. 北京:人民卫生出版社, 352
- 张培旗,李健,王群,刘淇,管斌. 2005. 磺胺甲基异恶唑在中国明对虾体内的残留和消除规律. 水产科学, 24(11): 17~20
- 唐俊,郑宗林,杨先乐,胡鲲,喻文娟. 2006. 磺胺甲基异恶唑在中华绒螯蟹体内的代谢和消除规律. 上海水产大学学报, 15(4): 448~455
- NY 5070-2002. 无公害食品. 水产品中渔药残留限量[S]
- Bent Samuelsen, O., Pursell, L., Smith, P., and Ervik, A. 1997. Multiple-dose pharmacokinetic study of Romet 30 in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and *in vitro* antibacterial activity against *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture, 152: 13~24
- Park, E. D., Lightner, D. V., Milner, N., Mayersohn, M., Park, D. L., Gifford, J. M., and Bell, T. A. 1995. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture, 130: 113~128

- Tourak, M., and Niopas, I. 1999. Kastritsis C. Bioaccumulation of trimethoprim, sulfmethoxazole and N-acetyl-sulfamethoxazole in *Artemia nauplii* and residual kinetics in seabass larvae after repeated oral dosing of medicated nauplii. *Aquaculture*, 175: 15~30
- Uno, K., Aoki, T., Ueno R., and Maeda, I. 1997. Pharmacokinetics and metabolism of sulphamonomethoxine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) following bolus intravascular administration. *Aquaculture*, 153(1): 1~8
- Uno, K., Aoki, T., and Ueno. R. 1993. Pharmacokinetics of sulphamonomethoxine and sulphadimethoxine following oral administration to cultured rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 115: 209~219

《渔业科学进展》编辑部 2010 年网上投稿启事

为充分利用网络资源,提高编辑办公和期刊出版效率,《渔业科学进展》编辑部将从 2010 年 1 月开始采用期刊网络化办公系统。该系统使投稿、审稿和编辑工作都在同一个网络平台上完成,可大大节省通讯时间,并规范编辑工作流程。同时,网络投稿将以更加友好的界面服务于广大作者,方便作者与编审之间的沟通,为您提供易查、易用、更加方面快捷的服务。

敬请作者访问黄海水产研究所网站(<http://www.ysfri.ac.cn>)右下角的“《渔业科学进展》期刊网上投稿系统”。投稿程序请参看“《渔业科学进展》网络化稿件处理系统作者使用指南”。

如有疑问,请致电 0532-85833580 陈严老师或 0532-85800117 王建坤老师咨询。也可发邮件到《渔业科学进展》编辑部咨询,E-mail: chenyan@ysfri.ac.cn。

《渔业科学进展》编辑部 2009 年 12 月 18 日