

恩诺沙星和环丙沙星在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)体内的残留和消除规律*

孙慧宇^{1①} 陈君义¹ 王云飞¹ 顾开朗²

(1. 徐州出入境检验检疫局 徐州 221006; 2. 徐州生物工程职业技术学院 徐州 221006)

摘要 通过研究恩诺沙星与环丙沙星在泥鳅体内的残留和消除规律,为水产养殖业提供合理的给药方案和休药期。试验前,从养殖场购买的泥鳅在试验水质条件下暂养7 d后,分成3组投放入不同水温的养殖系统中。以恩诺沙星与环丙沙星作为目标化合物,以拌料给药的方式,按20 mg/kg鱼体重的剂量每天投喂1次,连续投喂7 d后,对15、20、25℃3种水温条件下,目标化合物在泥鳅体内的残留和消除规律进行了研究。试验结果显示,恩诺沙星与环丙沙星均按一级动力学过程从泥鳅体内消除,且水温对喹诺酮类药物的代谢衰减消除速率有很大影响,在25、20、15℃水温条件下,泥鳅体内的恩诺沙星代谢至10.0 μg/kg以下分别需要25、32、50 d,环丙沙星则分别需要27、31、33 d。由于徐州及周边地区的泥鳅主要输往韩国,其对喹诺酮类药物的限量要求是不超过10 μg/kg,因此,在本试验条件下,建议合理的休药期应不少于32 d。

关键词 恩诺沙星; 环丙沙星; 泥鳅; 残留; 消除

中图分类号 S948 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2015)04-0128-04

喹诺酮类药物因其抗菌谱广、抗菌力强、作用迅速、毒副作用小、价格低廉等特点,被广泛应用于畜禽和水产养殖业,用于防治动物的细菌性疾病(陈辉等, 2003; 刘艳辉等, 2001)。由于缺乏相应的理论指导,为使用过程中普遍存在药物滥用的现象,从而使得喹诺酮类药物对畜禽和水产动物产生毒副作用,并且影响生态环境。目前,国内已有不少关于动物源性食品中喹诺酮类药物残留超标的报道(鹿文婷等, 2014; 张秋萍等, 2012a、b)。此外,欧盟、美国、加拿大、日本、澳大利亚等许多国家和地区已将其列为禁用或限用药物,我国于2002年颁布的《无公害食品渔用药物使用准则》(N5071-2002)中,也已明确将环丙沙星列为禁用药。目前,国内外已对恩诺沙星及环丙沙星在水产动物体内的药物动力学和残留情况进行了研究(李娜等, 2009; 张德云等, 2007; 郭海燕等, 2008; 高爱欣等, 2007; 简纪常等,

2005; Dario *et al*, 2004; Emmerson *et al*, 2003; Intorre *et al*, 2000),但有关恩诺沙星(ENR)及环丙沙星(CIP)在养殖活泥鳅体内的残留及消除规律尚未见报道。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是我国水产品出口的重要品种之一,每年的出口额达数千万美元。作为江苏地区出口的优势品种,泥鳅出口一直占据着韩国绝大部分市场份额。自我国加入WTO后,韩国等主要进口国对泥鳅体内的药物残留要求越来越高,输往韩国的养殖水产品中恩诺沙星与环丙沙星的限量曾一度要求均不得超过10 μg/kg,使泥鳅养殖产业和出口检测均面临巨大的挑战。因此,研究喹诺酮类药物在泥鳅体内的残留和消除特点,具有重要的经济效益和社会效益。本研究以泥鳅为受试对象,探索了恩诺沙星和环丙沙星在15、20、25℃的水体中在泥鳅体内的衰减消除规律,为水产养殖业提供相应的给药方案、确定合理的休药期,为食品安全监管提供科学支持。

* 徐州出入境检验检疫局科研计划项目(2013XZKJ01)资助

① 通讯作者: 孙慧宇, 工程师, E-mail: sunhuiyu_1984@126.com

收稿日期: 2014-06-24, 收修改稿日期: 2014-07-30

1 材料与方法

1.1 试验对象与养殖条件

试验用泥鳅于2013年9月购自江苏省徐州市睢宁某泥鳅养殖厂,平均体长为(15±1) cm,平均体重为(13±2) g。实验前在养殖系统内暂养7 d,试验用水为曝气水,持续充氧,保持水中溶氧>8.0 mg/L,保证水中的pH为7.5–8.5。暂养期间,养殖密度低于10尾/10 L,每天09:00–10:00虹吸排污并换水50%,16:00投喂饲料1次。饲喂不加抗菌药物的泥鳅配合饲料,日投喂量为泥鳅体重的1%。投药试验前经确认泥鳅无恩诺沙星和环丙沙星残留。

1.2 仪器与试剂

API4000型液质联用仪(LC-MS/MS,美国AB公司,配ESI源)。

试验用恩诺沙星与环丙沙星购自浙江国邦药业有限公司(纯度≥98.5%);恩诺沙星与环丙沙星标准品购自Dr. Ehrenstorfer公司。乙腈、甲酸为色谱纯,正己烷、乙酸、异丙醇为分析纯,去离子水。

1.3 饲养与样品采集

恩诺沙星和环丙沙星分两批进行试验。每批试验设置3个对照组,分别控制温度为15、20、25℃。试验鱼需预先分别投喂含2‰恩诺沙星或2‰环丙沙星的药饵,给药方式为拌料给药,投喂量为鱼体重的1%,即按20 mg/kg鱼体重的剂量,每天投喂1次,

连续投喂7 d,然后投喂不含喹诺酮类药物的一般饵料。在最后一次投喂药饵后的3 h、6 h、12 h、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d、8 d、10 d、15 d、20 d、30 d、40 d、50 d,分别采集泥鳅肌肉组织样品(可食部分),置于-20℃冰箱中备用。每次采集泥鳅30尾,5尾为1组,共6个平行。

1.4 样品处理

称取5.00 g均匀样品于50 ml离心管中,加15 ml乙腈(含1%乙酸),涡旋1 min后超声提取5 min,3500 r/min离心5 min,收集上清液。重复上述提取步骤1次,合并上清液。加入15 ml正己烷,混合,离心,弃去正己烷层。将乙腈层转移入鸡心瓶中,加5 ml异丙醇,旋转蒸干。用流动相定容,过0.45 μm滤膜,待测定(陈君义等,2013)。

1.5 色谱与质谱条件

1.5.1 液相色谱参数 色谱柱为Eclipse XDB-C18 (Agilent, 150 mm×4.6 mm×5 μm),柱温为30℃,流速为600 μl/min,进样量为25 μl,流动相为水(含0.1%的甲酸, A)和乙腈(含0.1%的甲酸, B)。梯度洗脱程序:0–5.5 min, A相从87%线性降至10%,保持2 min; 7.5–7.6 min内 A相快速恢复至87%, 7.6–14 min, A相恒定为87%。

1.5.2 质谱参数 采用电喷雾离子源,通过正离子模式、5500 V电压、多反应监测(MRM)方式对恩诺沙星和环丙沙星进行测定。参数详见表1。

表1 恩诺沙星和环丙沙星的质谱参数

Tab.1 Mass spectrometric parameters of enrofloxacin and ciprofloxacin

化合物 Compounds	母离子 Precursor ion	子离子 Product ion	DP(V)	CE(V)	定量离子对 Quantitative ions
恩诺沙星 Enrofloxacin	360.1	342.1	79	30	360.1/316.2
		316.2	84	28	
环丙沙星 Ciprofloxacin	332.2	314.1	75	29	332.2/231.1
		231.1	70	48	

2 结果与讨论

2.1 标准工作曲线

试验采用外标法定量,用流动相配制1000、400、100、50、10、5 μg/L的混合标准溶液系列,以LC-MS/MS法分别测定峰面积,绘制标准曲线。该方法检出限为1.0 μg/L。

2.2 回收率及精密度试验

以阴性泥鳅样品作为测试样品,并向其中加入标

准溶液,放置40 min以上,使药物充分渗入样品中,分别制成含恩诺沙星/环丙沙星为5.0、10.0和20.0 μg/kg的样品。按1.4步骤处理样品后进行检测,所得浓度数值与标准溶液测定的浓度数值相比,即为回收率,每个浓度6个平行,结果见表2。

2.3 泥鳅体内的药物消除

试验显示,在3个温度条件下,随休药时间的延长,泥鳅体内恩诺沙星及环丙沙星的浓度均逐渐下降(图1、图2)。

表2 回收率和方法精密度测定

Tab.2 Determination of the recovery rate and RSD of the method

化合物 Compounds	5.0 µg/kg		10.0 µg/kg		20.0 µg/kg	
	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
恩诺沙星 Enrofloxacin	59.2–78.4	8.88	81.8–86.9	2.23	61.8–78.3	9.85
环丙沙星 Ciprofloxacin	62.0–73.2	6.53	90.6–105.8	5.19	75.4–88.9	7.32

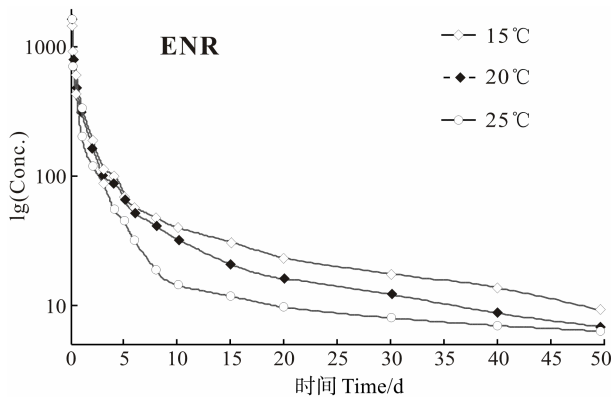


图1 不同温度条件下恩诺沙星在泥鳅体内的药-时曲线
Fig.1 The concentration of enrofloxacin in *M. anguillicaudatus* under different experimental conditions

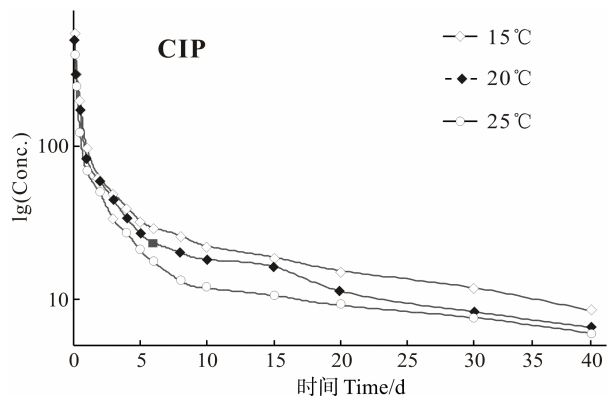


图2 不同温度条件下环丙沙星在泥鳅体内的药-时曲线
Fig.2 The concentration of ciprofloxacin in *M. anguillicaudatus* under different experimental conditions

从图1和图2可以看出,在代谢的前5 d,恩诺沙星与环丙沙星均保持较快的消除速率,从第5天起,3个温度条件下的代谢浓度均保持稳定下降,但下降速度缓慢。

2.4 休药期的确定

休药期是根据食用组织中药物允许残留量及药物的消除速度来确定的,绝大多数药物的体内吸收、分布、代谢和消除符合或近似一级动力学过程,目标物的消除曲线可拟合成指数方程 $C_t = C_i e^{-t}$ (式中, C_i 为初始浓度)。通过统计分析,本研究中恩诺沙星与

环丙沙星在泥鳅体内的消除也近似一级动力学过程,消除方程见表3。根据公式计算,在25、20、15°C水温条件下,泥鳅体内的恩诺沙星代谢至10.0 µg/kg以下分别需要25、32、50 d,环丙沙星分别需要27、31、33 d,说明水温对代谢衰减消除速率有很大影响。黄金田等(2011)、湛嘉等(2003)研究发现,25°C的水温环境更接近动物体内相关代谢酶的适温条件,因此药物消除更快。另外,在适宜温度范围内,泥鳅的生长速率、摄食量以及排泄量都会有所提高,从而加速其体内残留药物的代谢过程。

表3 目标化合物的消除曲线方程及参数

Tab.3 The equation and the parameters of elimination curves of enrofloxacin and ciprofloxacin

组别 Group	消除曲线方程 Equation of elimination curve	R^2	β (h^{-1})	$T_{1/2}$ (d)
ENR-15°C	$c = 2885.6 e^{-0.114 t}$	0.968	0.114	6.08
ENR-20°C	$c = 2583.1 e^{-0.174 t}$	0.959	0.174	3.98
ENR-25°C	$c = 1793.6 e^{-0.213 t}$	0.976	0.213	3.25
CIP-15°C	$c = 782.8 e^{-0.132 t}$	0.970	0.132	5.25
CIP-20°C	$c = 689.0 e^{-0.135 t}$	0.981	0.135	5.13
CIP-25°C	$c = 574.5 e^{-0.145 t}$	0.982	0.145	4.78

由于出口韩国养殖水产品中恩诺沙星与环丙沙星的限量均不得超过10.0 µg/kg,根据研究结果中恩诺沙星与环丙沙星在泥鳅体内的消除规律,建议在20°C左右的水温下,以20 mg/kg剂量连续饲喂7 d,恩诺沙星与环丙沙星在泥鳅体内的临床休药期应不小于32 d。

由于药物消除受许多因素影响,除水温之外,给药剂量、给药方式、光照条件、水质条件、种属等也会对消除速度产生一定的影响(Palominos *et al*, 2008; Nieto *et al*, 2008)。因此,临床休药期还要根据具体养殖种类、实际养殖环境分别进行研究确定。

3 结论

恩诺沙星和环丙沙星在泥鳅体内的消除近似为一级动力学过程,25°C水温下消除较快。考虑实际养

殖水温和施药因素, 建议休药期不少于 32 d。

参 考 文 献

- 刘艳辉, 张雅斌, 祖岫杰, 等. 第三代喹诺酮类药物及其在淡水鱼类病害防治中的应用. 河北渔业, 2001(3): 11-12
- 李娜, 李健, 王群. 恩诺沙星在养殖大菱鲆体内的残留及消除规律. 渔业科学进展, 2009, 30(2): 26-33
- 张秋萍, 王春民, 李建. 苏州市动物性食品中喹诺酮类抗生素的残留状况. 职业与健康, 2012a, 28(18): 2257-2258
- 张秋萍, 李建, 王春民. 苏州市水产品中喹诺酮类抗生素残留水平及安全性评价. 中国卫生检验杂志, 2012b, 22(10): 2417-2418, 2422
- 张德云, 匡维华, 郑映钦. 恩诺沙星在日本鳊体内残留消除规律研究. 水产科学, 2007, 26(4): 210-213
- 陈君义, 孙慧宇, 高翔, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定泥鳅中 6 种喹诺酮类药物残留. 食品科技, 2013, 38(3): 324-327
- 陈辉, 杨先乐. 渔用药无公害使用技术. 北京: 中国农业出版社, 2003, 151-158
- 高爱欣, 李健, 王群, 等. 恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的消除规律研究. 海洋科学, 2007, 31(7): 32-36
- 郭海燕, 马跃岗, 朱林, 等. 氟喹诺酮类药物在水产动物体内的药动学和残留规律. 水生态学杂志, 2008, 29(1): 34-41
- 黄金田, 丁涛, 郑浩, 等. 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内的衰减研究. 渔业科学进展, 2011, 32(2): 66-69
- 鹿文婷, 刘萍, 焦海涛, 等. 济南市售肉制品中喹诺酮类兽药残留调查. 中国公共卫生, 2014, 30(1): 122-124
- 湛嘉, 李佐卿, 康继韬, 等. 影响水产动物药代动力学的因素. 中国兽药杂志, 2003, 37(12): 38-41
- 简纪常, 吴灶和, 陈刚. 恩诺沙星在眼斑拟石首鱼体内的药物代谢动力学. 中国兽医学报, 2005, 25(2): 195-197
- Dario L, Laura F, Emilio G, *et al.* Long depletion time of enrofloxacin in rainbow trout. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(10): 3912-3917
- Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrob Chemother, 2003, 51(Z1): 13-20
- Intorre L, Cecchini S, Bertini S, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in the sea bass. Aquaculture, 2000, 182(1): 49-59
- Nieto J, Freer J, Contreras D, *et al.* Photo catalyzed degradation of flumequine by doped TiO₂ and simulated solar light. J Hazard Mater, 2008, 155(1-2): 45-50
- Palominos R, Freer J, Mondaca MA, *et al.* Evidence for hole participation during the photocatalytic oxidation of the antibiotic flumequine. J Photochem Photobiol A: Chem, 2008, 193(2-3): 139-145

(编辑 冯小花)

The Residues and Elimination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Loach *Misgurnus anguillicaudatus*

SUN Huiyu¹⊙, CHEN Junyi¹, WANG Yunfei¹, GU Kailang²

(1. Xuzhou Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, Xuzhou 221006;
2. Xuzhou Vocational College of Bioengineering, Xuzhou 221006)

Abstract In recent years, with the rigorous limits on drug residues in the loach *Misgurnus anguillicaudatus* from importing countries, the *M. anguillicaudatus* exporting enterprises and the export inspections are facing enormous challenges in drug use and control. The current study investigated the residues and elimination of enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) in *M. anguillicaudatus* to provide a reasonable dosing plan and withdrawal period for the aquaculture industry. The loach *M. anguillicaudatus* purchased from an aquaculture farm were fed 7 days to adapt the experimental water quality and then divided into three groups at different temperatures, and fed with enrofloxacin or ciprofloxacin at a dosage of 20 mg/kg per day for 7 consecutive days. Samples were collected at various time points to measure the contents of ENR and CIP by the high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The results showed that both the elimination of ENR and CIP were complied with the first-order kinetics, and the water temperature significantly affected the elimination rate of both drugs. At 25°C, 20°C and 15°C, it took 25, 32 and 50 days, respectively, for the enrofloxacin compound metabolized to less than 10.0 μg/kg in the body of *M. anguillicaudatus*. It took 27, 31 and 33 days for ciprofloxacin to metabolize to less than 10.0 μg/kg. Based on the South Korea limits of no more than 10 μg/kg for quinolones in *M. anguillicaudatus*, a withdrawal period of 32 days is recommended for the *M. anguillicaudatus* exporters by considering the actual culturing environments in Xuzhou and nearby area.

Key words Enrofloxacin; Ciprofloxacin; *Misgurnus anguillicaudatus*; Residue; Elimination

⊙ Corresponding author: SUN Huiyu, E-mail: sunhuiyu_1984@126.com