

诺氟沙星在奥尼罗非鱼体内的药代动力学及残留研究

廖碧钗^{1,2}

(1. 福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002; 2. 福建省水产技术推广总站, 福建 福州 350003)

摘要: 在水温 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 条件下, 以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鱼体重的剂量给奥尼罗非鱼单次口服诺氟沙星, 高效液相色谱法测定血浆和肌肉组织中的药物浓度, 研究诺氟沙星在奥尼罗非鱼体内的代谢及消除规律。结果显示: 血药时间数据符合一级吸收二室开放模型, 半衰期 ($T_{1/2K_a}$ 、 $T_{1/2\alpha}$ 、 $T_{1/2\beta}$) 分别为 1.30、1.97、26.36 h, 最大血药浓度为 $0.546 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 达峰时间为 2.715 h, 药时曲线下面积 (AUC) 为 $14.491 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。选取肌肉组织作为残留检测的靶组织, 以 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为最高残留限量, 在本试验条件下, 建议休药期不低于 55 d。

关键词: 诺氟沙星; 奥尼罗非鱼; 药代动力学; 残留

中图分类号: S 859.84

文献标识码: A

Pharmacokinetics and Residues of Norfloxacin in Hybrid Tilapia

LIAO Bi-chai^{1,2}

(1. The Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou, Fujian 350002, China;

2. Fujian Fishery Technical Extension Center, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: In order to study the metabolism and elimination of norfloxacin (NFX) in hybrid tilapias (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*), single oral administration at dose of $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ had been investigated in healthy tilapia at $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$. The result demonstrated: Plasma concentration-time data of NFX were best fitted using a two-compartmental open model. Absorption, distribution and elimination half-life were 1.30, 1.97 and 26.36 hours, respectively. The maximal plasma concentration was $0.546 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, peaking at 2.715 hour. Area under the plasma drug concentration-time curve was $14.491 \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$. As an edible tissue, muscle was selected as target tissue in this experiment. The maximum residue limit (MRL) is $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ in muscle, the withdrawal time should not be less than 55 days under this experiment condition.

Key words: norfloxacin; hybrid tilapia; pharmacokinetics; residues

诺氟沙星 (norfloxacin, NFX) 是 20 世纪 70 年代日本最先合成的第三代喹诺酮类药物, 具有抗菌谱广、抗菌力强、体内分布广、安全性高、价格低廉、对革兰氏阳性菌和阴性菌在低浓度时即表现杀菌作用的优势^[1-2], 被广泛应用于动物和人类多种感染性疾病的治疗^[3-6], 在水产养殖中主要应用于鱼类细菌性疾病的防治^[7-10]。由于该药存在肝代谢干扰作用, 破坏和减少体内红细胞、白细胞等毒副效应^[11], 在食品动物中的残留将引起人类病原菌对其产生耐药性^[12]等危害, 因而在可食性动物组织中的残留问题已经日益引起人们的关注。近年来, 有关 NFX 在罗非鱼体内的药动学研究已有报道, 但其残留消除尚未见报道, 且同一种药物在

不同温度、不同给药方式下其药动及残留特征也有所差别^[12], 因此, 本试验模拟实际养殖条件, 研究了 NFX 在奥尼罗非鱼体内的药代动力学和残留状况, 分析不同地域下其药动学差别, 提出临床休药期建议, 为规范 NFX 在罗非鱼中临床合理应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康奥尼罗非鱼 (*Oreochromis aureus* × *O. niloticus*) 由福建省淡水水产研究所榕桥中试基地提供, 经抽查检测证实血浆和肌肉组织中均不含 NFX, 平均体重 $250 \pm 10 \text{ g}$, 试验前 3 d 停止投

收稿日期: 2011-01-14 初稿; 2011-06-03 修改稿

作者简介: 廖碧钗 (1982-), 女, 硕士, 主要从事水产病害防控和水产品质量安全研究 (E-mail: liaobichai@163.com)

基金项目: 福建省海洋与渔业厅重点项目 (2009 1-15); 国家现代农业产业技术体系建设项目 (CARS-49); 福建省种业创新与产业化工程项目 (2011FJZY); 公益性行业 (农业) 科研专项 (200803013)

饵,水温控制在 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, NFX 标准品(含量 99%, 批号: 60728) 购于美国 Sigma 公司; 乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器色谱条件

Agilent 1200 高效液相色谱仪; 可变波长紫外检测器; 色谱柱为 Nucleodur 100-5 C18 ($4.6 \times 250 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈: 磷酸盐缓冲液 ($\text{pH } 2.5$) (v/v) = 20 : 80; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长为 278 nm; 进样体积 $50 \mu\text{L}$; 室温。

1.3 标准贮备液的配制

准确称取 NFX 标准品 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中, 用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸 1 mL 溶解, 加水定容至刻度, 制成 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准贮备液, 4°C 保存备用。

1.4 给药方法及采样

试验用奥尼罗非鱼 150 尾, 称重后, 按 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鱼体重单次混饲口灌给药, 无回吐者保留试验。口灌后随机分组, 每组 5 尾, 于给药后 0.25、0.5、1、1.5、2、4、7、10、16、24、48、72、120、240、720 和 1 440 h 心脏采血, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心, 分离血浆; 割取背部肌肉组织, 做好标记; 试验前取空白样品作对照, 样品于 -20°C 保存。

1.5 样品处理

1.5.1 血浆样品处理 取 1.0 mL 血浆, 加 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH } 2.5$) 和 5 mL 乙腈旋涡混合 5 min, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中。残渣再加 5 mL 乙腈, 重复提取 1 次, 合并上清液。于 40°C 氮气流下吹干后加 1.0 mL 流动相溶解, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, HPLC 检测。

1.5.2 肌肉样品处理 取 2.0 g 匀浆肌肉组织, 加 1 mL 磷酸盐缓冲溶液 ($\text{pH } 2.5$) 和 10 mL 乙腈旋涡混合 5 min, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 取上清液, 残渣再加 10 mL 乙腈, 重复提取 1 次, 合并上清液。于 40°C 氮气流下吹干后加 2.0 mL 流动相溶解, 加 6 mL 饱和正己烷, 旋涡混合 2 min, $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 弃上层液, 下层液过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜, HPLC 检测。

1.6 建立标准曲线

将 NFX 标准贮备液配制成定容浓度分别为 0.000、0.010、0.025、0.050、0.100、0.250、0.500 和 $1.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 NFX 标准品溶液系列, 以 HPLC 法测定其峰面积, 并以其为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 作标准曲线, 求出回归方程和

相关系数; 同时在 1.0 mL 空白血浆和 2.0 g 空白匀浆肌肉样品中加入不同体积 NFX 标准贮备液, 制成含 NFX 0.000、0.010、0.0250、0.050、0.100、0.250、0.500 和 $1.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准品的溶液系列, 按 1.5 的方法对样品处理后测定其峰面积, 求出血浆和肌肉的标准工作曲线回归方程和相关系数。

1.7 回收率和精密度测定

取血浆和匀浆肌肉组织, 加入 NFX 标准贮备液适量, 制成 0.01、0.10 和 $1.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3 个浓度。按 1.5 的方法处理, 取 $50 \mu\text{L}$ 进行 HPLC 测定, 每个浓度重复测定 5 次, 记录峰面积, 计算其回收率。将上述样品每个浓度日内测定 5 次, 日间测 5 次, 计算样品中药物浓度的日内、日间精密度。

1.8 数据处理

采用 PKS 药动软件^[13] 进行模型拟合和参数计算; 消除方程、休药期计算采用 SPSS 统计软件计算。

1.9 休药期计算

根据试验结果, NFX 是按一级动力学过程从体内消除的, 即在消除后期服从指数消除: $C = C_0 e^{-ket}$, 根据消除后期测定的组织药物浓度及规定的最高残留限量 (MRL), 计算各组织药物浓度降至规定水平所需的时间 (WDT)^[14]:

$$WDT = \frac{\ln(C_0/MRL)}{K_e}$$

2 结果与分析

2.1 标准曲线

在本试验色谱条件下, 色谱图中基线走动平稳, 保留时间为 5.8 min 左右, 分离度好, 峰形对称 (图 1)。在 $0.01 \sim 1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 线性范围内, 测定 NFX 空白标准曲线为 $y = 275.67x - 2.061$ ($R^2 = 0.994$), 相同浓度范围其在血浆和肌肉中添加标准曲线分别为 $y = 283.78x - 2.845$ ($R^2 = 0.999$) 和 $y = 195.47x - 1.149$ ($R^2 = 0.9993$)。

2.2 回收率和精密度

以引起三倍基线噪音的药量为最低检测限, 得出本方法的最低检测限为 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由表 1 可见, 血浆平均回收率达 97% 以上, 平均变异系数低于 7.14%; 肌肉平均回收率达 72% 以上, 平均变异系数低于 8.18%。说明该方法回收率高、重复性好。

2.3 药代动力学

奥尼罗非鱼以 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量单次口灌

NFX 后, 药物在血浆中的主要动力学参数如表 2 所示, 经房室模型分析, 其血药浓度时间数据符合一级吸收二室开放模型, 其药动学方程为: $C = 2.158e^{-0.535t} + 1.813e^{-0.351t} + 0.345e^{-0.026t}$ 。

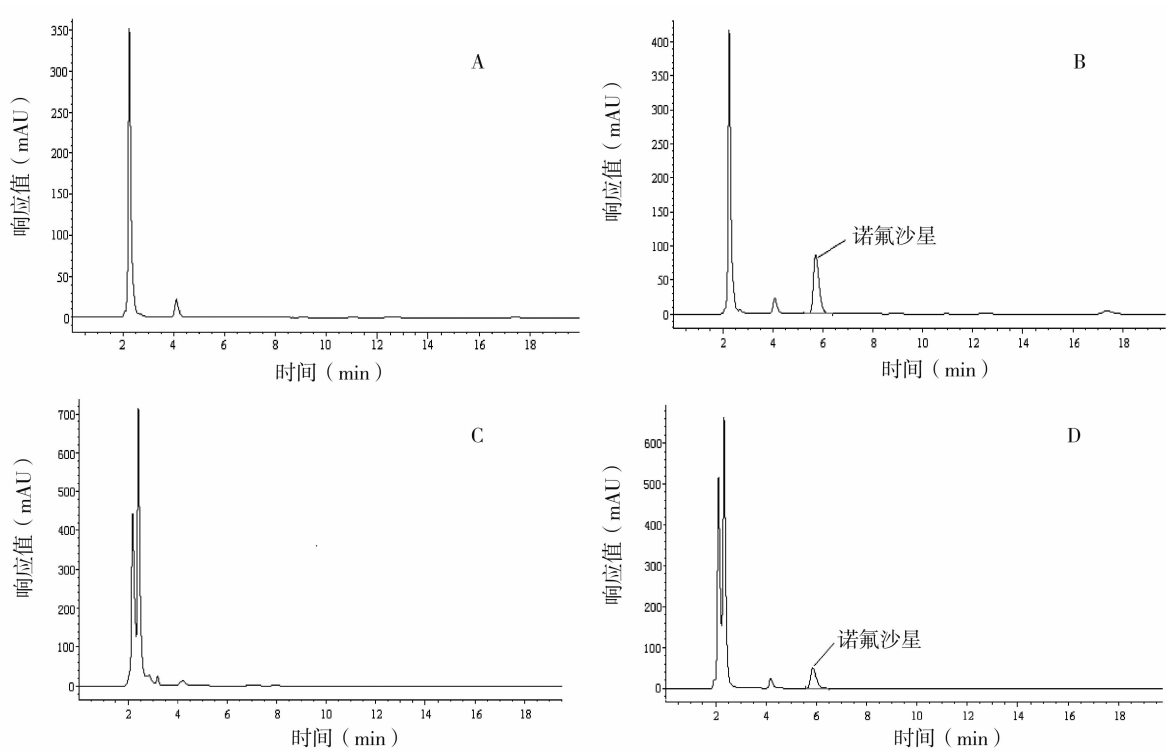


图 1 诺氟沙星在奥尼罗非鱼血浆和肌肉中的色谱图
Fig. 1 HPLC Chromatograms of NFX in plasma and muscle of hybrid tilapia
A. 空白血浆; B. 添加标准品后的血浆; C. 空白肌肉; D. 添加标准品后的肌肉

表 1 奥尼罗非鱼血浆和肌肉中诺氟沙星的回收率和精密度

Table 1 Recovery and precision of NFX in plasma and muscle of hybrid tilapia (n=5)

样 品	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)	样 品	浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (%)	日内精密度 (%)	日间精密度 (%)
血浆	0.01	104.3	5.95	7.14	肌肉	0.01	73.9	5.88	8.18
	0.10	97.4	1.56	1.96		0.10	73.2	1.32	3.17
	1.00	103.3	0.70	1.16		1.00	72.0	0.64	1.11

表 2 诺氟沙星在奥尼罗非鱼血浆中的主要药动学参数

Table 2 Pharmacokinetics parameters of NFX in plasma of hybrid tilapia

参数	参数值	参数	参数值
$T_{1/2\alpha}$ (h)	1.97	$T_{1/2\beta}$ (h)	26.36
$T_{1/2k_{el}}$ (h)	1.30	CL/F ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$)	1.380
Vd/F ($\text{L} \cdot \text{kg}^{-1}$)	52.490	AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{mL}^{-1}$)	14.491
T_{\max} (h)	2.715	C_{\max} ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0.546
K_{12} (h^{-1})	0.173	K_{21} (h^{-1})	0.138
K_{10} (h^{-1})	0.067	MRT (h)	294.77

注: $T_{1/2\alpha}$ 为分布相半衰期; $T_{1/2\beta}$ 为消除相半衰期; $T_{1/2k_{el}}$ 为吸收相半衰期; CL/F 为清除率; Vd/F 为表观分布容积; AUC 为血药浓度—时间曲线下面积; T_{\max} 为达峰时间; C_{\max} 为峰浓度; K_{12} 为药物由中央室到周边室内的一级运转速率常数; K_{21} 为药物自周边室到中央室的一级运转速率; K_{10} 为药物由中央室到周边室的一级运转速率常数; MRT 为药物平均滞留时间。

2.4 药物消除规律

奥尼罗非鱼经口灌 NFX 2 h 后, 数据经 SPSS 统计处理得到血浆和肌肉组织中药物浓度 (C) 与时间 (t) 关系的消除曲线方程、相关指数 (R^2) 及消除半衰期 ($T_{1/2}$) 见表 3, 可知药物在血浆和肌肉中消除缓慢。

表 3 诺氟沙星在奥尼罗非鱼血浆和肌肉组织中的消除曲线方程及参数

Table 3 The equation of elimination curve and parameters of NFX in plasma and muscle tissue in hybrid tilapia

组织	方程	相关指数 R^2	消除半衰期 $T_{1/2}$ (h)
血浆	$C=0.189e^{-0.004t}$	0.782	36.95
肌肉	$C=0.444e^{-0.003t}$	0.947	239.16

2.5 休药期

日本肯定列表中未对 NFX 的 MRL 做具体的规定, 因此本试验中 NFX 在罗非鱼组织中的 MRL 以统一限值 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为标准。通过休药期公式计算, 可知肌肉组织的理论休药期为 54.50 d。因此在本试验条件下, 建议 NFX 在奥尼罗非鱼体内的休药期为 55 d 以上。

3 讨 论

国内外有关 NFX 样品的前处理方法相对成熟, 杨先乐等^[15]采用甲醇和 6% 高氯酸提取法从大黄鱼血浆和肌肉中提取 NFX。Anadon 等^[16-17]采用二氯甲烷萃取法从鸡和猪组织中提取 NFX, 张雅斌等^[18]用乙腈对鲤血浆进行抽提, 刘秀红等^[19]用 pH7.4 磷酸盐缓冲液和乙腈对牙鲈血浆和组织进行提取。本试验比较了甲醇、乙腈、磷酸盐缓冲液与乙腈、高氯酸和二氯甲烷对罗非鱼血浆和肌肉中 NFX 的提取效果, 发现在本试验条件下, 用甲醇、高氯酸和二氯甲烷提取的相对回收率均低于 50%, 单独只用乙腈提取的相对回收率也只有 65% 左右, 而用磷酸盐缓冲液先溶解样品后再加入乙腈来提取, 其样品回收率明显高于乙腈提取, 可能是磷酸盐缓冲液的加入促进了 NFX 的溶解, 从而提高了样品的回收率。

从本试验条件下得出的药动学参数可知药物在血浆中吸收迅速、分布快、消除相对较缓慢。这一趋势与鲤鱼、草鱼口灌 NFX 的研究结论相对一致^[18,20]。NFX 在奥尼罗非鱼体内吸收迅速, 血药浓度在 2 h 左右达到峰值; 药物在血浆和肌肉中分布较广泛, 但在同一采样时间点, 大部分肌肉组织

中的药物浓度显著高于血浆, 说明该药在体内广泛分布。与朱泽尧等^[21]研究相比, 发现该药在本试验中的 T_{\max} 和 $T_{1/2\beta}$ 与其研究结果相当, 说明不同地域、相同的给药方式对药动学参数的差异影响较小, 而 C_{\max} 和 AUC 与其研究结果差别较大, 这可能是由给药剂量不同造成的, 在养殖场中通常是采用多次给药的方式进行给药, 但在试验条件下多次给药容易造成鱼体损伤易死亡, 因此, 采用单次、加大剂量的给药方式。给药后肌肉中的药物浓度在 2 h 达到最高浓度后开始下降, 到 48 h 药物又达到一个峰值, 说明奥尼罗非鱼对 NFX 的吸收存在着再吸收, 使药物能继续发挥药效。药物在鱼体内的残留量, 一般随着药物给药剂量的增高而增加, 而消除速度随水温的降低而减慢^[22], 因此在临床给药上须根据养殖种属、水温、给药方式、养殖模式等慎重分析, 制定出合理的给药方案。

参考文献:

- [1] VANCUTSEM P M, BABISH J G, SCWARD W S. The fluoroquinolones antimicrobial: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics; clinical use in domestic animals and toxicity [J]. Cornell Vet, 1990, 80 (2): 173-186.
- [2] 竺心影. 药理学: 第 3 版 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995: 310.
- [3] 康维明, 赵玉沛. 氟喹诺酮类抗菌药在外科系统感染预防及治疗中的合理应用[J]. 中国社区医师, 2006, 8(22): 23-24.
- [4] 邓国东, 杨桂香, 陈杖榴. 氟喹诺酮类药物在动物性食品中的残留检测研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2000, 34 (3): 53-58.
- [5] 王建元. 烟酸 NFX 治疗公牛生殖道绿脓杆菌感染 [J]. 国外兽医学——畜禽疾病, 1995, 3 (16): 41-43.
- [6] 李继昌, 鲁成武, 符春燕, 等. 氟喹诺酮类药物在禽病防治上的应用 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 1998, 10: 27.
- [7] 严雪芬, 王杏明, 张黎明. 团头鲂、鲫等鱼类暴发性疾病的药物防治研究 [C] // 鱼病学研究论文集: 第 2 集. 北京: 海洋出版社, 1995: 40-46.
- [8] 张雅斌, 王兆军. 养殖新技术 [M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1999: 134-137.
- [9] 汪开毓. 喹诺酮类抗菌鱼药的开发应用 [J]. 淡水渔业, 1997, 27 (2): 22-25.
- [10] 张雅斌, 张祚新, 郑伟, 等. NFX 在鱼类细菌性疾病中的应用研究 [J]. 大连水产学院学报, 2000, 2 (15): 79-85.
- [11] 姜礼燊, 朱伟. 在水产药物中孔雀石绿、呋喃唑酮、氟哌酸的残留毒性及其对策措施 [J]. 内陆水产, 2006, 2: 18.
- [12] 方星星, 李健, 王群, 等. 复方新诺明在花鲈体内的残留及消除规律 [J]. 海洋科学, 2003, 27 (9): 16-20.
- [13] 黄仁美. 氟苯尼考在哺乳猪体内药代动力学研究 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26 (10): 42-44.
- [14] 刘玉林, 王翔凌, 杨先乐, 等. 诺氟沙星在大黄鱼体内的药代动力学及残留研究 [J]. 水产学报, 2007, 31 (5):

655—660.

- [15] 杨先乐, 王民权, 杨勇, 等. NFX 在大黄鱼血浆和肌肉中的 RP-HPLC 检测方法 [J]. 水产学报, 2004, (28): 1—6.
- [16] ANADON A. Pharmacokinetics of norfloxacin and its N-degelhyl and oxo-metabolites in broiler chicken [J]. Am J Vetekes, 1992, 52 (11): 2084—2089.
- [17] ANADON A M. Pharmacokinetics and tissue residues of norfloxacin and its N-degelhyl and oxo-metabolites in healthy pig [J]. J Vet Pharmacol Therap, 1995, 18 (2): 220—225.
- [18] 张雅斌, 张祚新, 郑伟, 等. 不同给药方式下鲤对诺氟沙星的药代动力学研究[J]. 水产学报, 2000, 6(24): 559—563.
- [19] 刘秀红, 李健, 王群. 诺氟沙星在牙鲆体内的残留及消除规律研究 [J]. 海洋水产研究, 2003, 24 (4): 13—18.
- [20] 郭海燕, 陈元坤, 朱林, 等. 诺氟沙星在草鱼体内的组织分布和药物动力学规律[J]. 水产科学, 2009, 28(1): 28—31.
- [21] 朱泽尧, 张其中, 于相满, 等. 盐酸诺氟沙星在奥尼罗非鱼体内的药动学研究 [J]. 淡水渔业, 2008, 38 (1): 30—34.
- [22] BJORKLUMD H V, BYLUND G. Temperature related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout [J]. Aquaculture, 1990, 84: 363—372.

(责任编辑: 刘新永)