

doi: 10.3969/j.issn.1001-1994.2011.06.007

氟苯尼考在日本囊对虾体内的药代动力学研究

宋维彦^{1,2} 苏永全¹ 张曼¹ 潘滢¹ 曾凡荣¹ 游欣欣¹

(1 厦门大学海洋与环境学院, 厦门 361005; 2 日照职业技术学院水产学院, 日照 276826)

摘要: 为了给养殖日本囊对虾制定正确的用药方案、确定氟苯尼考的休药期提供科学依据,应用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)研究了氟苯尼考在日本囊对虾体内的药物代谢动力学。试验结果表明,在水温 23 ± 0.5 °C,盐度29.91的条件下,氟苯尼考在肝脏、肌肉和血淋巴的平均回收率为93.37%、91.79%、91.82%;试验数据经药代动力学软件3p97分析表明,日本囊对虾采用氟苯尼考单次腹部肌肉注射,其肌肉药一时数据符合二室模型,肝脏和血淋巴药一时数据符合一室模型。其中,氟苯尼考在肝脏、肌肉和血淋巴中的主要动力学参数分别为:浓度-时间曲线的曲线下面积AUC分别为10.31、50.77、14.33 ($\mu\text{g/g} \cdot \text{h}$);药物的峰值浓度 $C(\text{max})$ 分别为13.03、10.46、8.031 $\mu\text{g/g}$;药物浓度处于峰值时的时间 T_p 分别为0.2044、0.2298、0.6544 h;吸收半衰期分别为0.6771、0.4746、0.4193 h;消除半衰期分别为3.766、16.16、4.917 h。建议在 23 ± 0.5 °C的水温条件下,氟苯尼考对日本囊对虾的休药期不少于7 d。

关键词: 日本囊对虾; 氟苯尼考; 药代动力学

日本囊对虾(*Marsupenaeus japonicus*)隶属于对虾科,囊对虾属,是暖水性虾类,自然分布很广,在日本及我国沿海都有分布。因个体大、花纹艳丽、肉质细嫩鲜美、耐干运等特点而具有较高的商品价值,是我国沿海重要的养殖品种之一。随着日本囊对虾养殖业的发展和养殖环境的恶化,疾病频繁发生,给养殖业带来重大损失。而氟苯尼考是近年来防治对虾疾病的常用药物之一。氟苯尼考(Florfenicol, FF)是美国先灵葆雅(Schering-Plough)公司在上世纪80年代后期研制开发的新一代氯霉素类兽用合成抗生素,又称氟甲砜霉素。该药具有广谱、高效、吸收迅速、分布广泛、安全等特点,是一种能有效抑菌的氯霉素类广谱抗生素。它克服了对氯霉素易产生耐药性和造成再生障碍性贫血的问题,现已广泛应用于畜禽和水产动物的多种细菌性疾病的防治。药物的代谢动力学研究是临床设计合理给药方案、发挥药物最佳疗效和减少副作用的理论基础。本试验以养殖的日本

囊对虾为对象,采用一次性肌肉注射方法给药,研究氟苯尼考在日本囊对虾体内的代谢动力学特征和残留规律,旨在为养殖生产中正确制定虾病用药方案、确定氟苯尼考对日本囊对虾的休药期提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验对象

试验用日本囊对虾购自福建东山岛某养殖池塘,在室内水泥池养殖20余天,生长状态稳定,平均体长10.4 cm,平均体重12.55 g。水泥池规格为4 m×3 m×0.9 m,暂养期间投喂鲜牡蛎肉,每天换水1/3。

1.1.2 试验药物

注射所用的FF由成都乾坤动物药业有限公司生产,含量为0.3 g/mL,用生理盐水稀释。

收稿日期: 2011-03-28

作者简介: 宋维彦(1965—),男,副教授,厦门大学访问学者,主要从事水产养殖专业教学及虾蟹养殖技术研究。

基金项目: 山东省高等学校优秀青年教师国内访问学者项目和公益性行业(农业)科研专项(200803012)资助。

1.1.3 仪器、药品

岛津 SPD - M20A 高效液相色谱仪、WH - 1 微型漩涡混合仪、Sigmur - 3N30 低温高速离心机、电热恒温水浴锅、超声波清洗器、匀浆机、精密取液器、离心管、0.2 μm 过滤器、分析天平等。FF 标准样品(Dr. Enrenstorfer 公司生产)、乙腈、二氯甲烷、正己烷、四丁基溴化铵均为色谱纯;无水醋酸钠、无水硫酸钠、85% 的磷酸、冰醋酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、柠檬酸三钠均为分析纯;重蒸水等。

1.2 试验方法

1.2.1 给药

采用腹部肌肉注射的方法给 100 尾日本囊对虾注射氟苯尼考。注射前按设计浓度配制药液,每尾虾注射 100 μL ,注射剂量为 20 mg/kg。注射后将对虾放入培育池饲养。培育池规格 1 m^3 ,饲养用水为沙滤海水,水温 23 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

注射药物后,观察日本囊对虾的情况。在 18 h 内有 1 尾虾蜕皮,72 h 内有 3 尾虾蜕皮,其余的虾活动、摄食正常。

1.2.2 取样

取样时间:注射后在 0.13、0.25、0.5、1、2、3、4、6、12、24、48、72、96 h 时取样。每次取样 5 尾对虾。

取样部位:血淋巴、肝胰脏、腹部肌肉。血淋巴用 1 cm 注射器从胸血窦抽取,放入 2 cm 冻存管内保存。取样所用注射器和存放样品的冻存管用肝素钠溶液浸泡后晾干。所有样品取完后放 -70 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2.3 色谱条件

色谱柱型号:VP - ODS 150 L \times 4.6 C18;柱温:室温;进样量:20 μL ,流速:0.5 mL/min;检测波长 223 nm;流动相:乙腈:水 = 27:73(V/V)。

1.2.4 样品处理

肝胰脏、肌肉组织样处理:样品在室温下自然解冻,取样品 1.0 g 置于 20 mL 离心管中,加入 4 mL 乙酸乙酯,用高速分散器匀散,再用 4 mL 乙酸乙酯清洗刀头;合并提取液,于振荡器上振荡 30 s,5000 r/min 离心 10 min,取上清液置于另一玻璃离心管中。残渣中再加入 4 mL 乙酸乙酯,重复提取一次,合并上清液,37 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干,用 1 mL 流动相及 5 mL 正己烷溶解去脂,3 000 r/min

离心 10 min,收集下层提取液,以 0.2 μm 微孔滤膜过滤后用于分析。

血淋巴样品处理:血淋巴自然溶解后摇匀,准确吸取 1 mL 置于 10 mL 离心管中,加入 2.0 mL 乙酸乙酯,用高速分散器匀散,再用 2 mL 乙酸乙酯重复一次;合并提取液,于振荡器上振荡 30 s,4800 r/min 高速离心 20 min,吸取上层乙酸乙酯提取液至 10 mL 尖底离心管中。同法重复提取 1 次,合并 2 次提取液,37 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至干,用 1 mL 流动相及 5 mL 正己烷溶解去脂,3000 r/min 离心 10 min,收集下层提取液,以 0.2 μm 微孔滤膜过滤后用于分析。

1.2.5 标准曲线

取 FF 标准样品,配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 母液,再用母液配成 0.05、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液系列。作标准曲线,求出回归方程和相关系数。

1.2.6 回收率的测定

采用加样回收法,分别向空白组织加入 0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 个浓度梯度的 FF 标准液 1 mL,然后按样品处理程序进行处理。HPLC 测定后,按标准曲线计算样品中的药物回收量,按照以下公式进行计算:

回收率 = 样品实测浓度 / 样品的理论浓度 \times 100%。

2 结果

2.1 回收率的测定

对 5 种不同浓度的 FF 回收率的测定结果表明,FF 的回收率在 82.90% ~ 97.85%;平均回收率:肌肉为 91.79%,肝脏为 93.37%,血淋巴为 91.82%。详细结果见表 1。

表 1 FF 在日本囊对虾 3 种组织中的回收率

样品浓度 / ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.1	0.5	1.0	5.0	10.0
肌肉回收率 / %	85.86	90.04	97.85	90.10	95.08
肝脏回收率 / %	91.99	92.1	96.82	92.39	93.53
血淋巴回收率 / %	82.90	92.23	96.10	93.84	94.02

2.2 标准曲线

用反相高效液相色谱法(RP - HPLC)对 FF 进行检测,以测得的峰面积为纵坐标,相应的浓度为横坐标做回归方程,仪器处理程序自动求出标

准曲线方程和系数 R^2 为:

$$Y = 1.03697 \times 10^{-5} x - 0.020338$$

$$R^2 = 0.99973$$

在本试验色谱条件下,标准液的 HPLC 基线走动平稳。

2.3 注射后 FF 在日本囊对虾 3 种组织内的含量变化

以 20 mg/kg 剂量单次腹部肌肉注射 FF 后,FF 在日本囊对虾 3 种组织内含量变化的药-时曲线如图 1 所示。

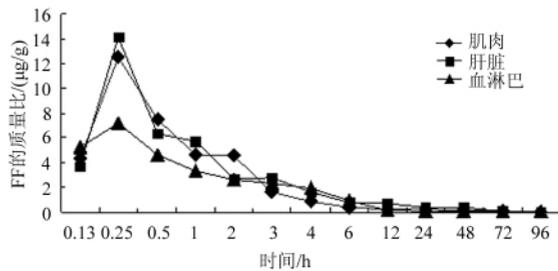


图 1 FF 在日本囊对虾 3 种组织内的含量变化

从图 1 可以看出,采用注射方式给药,FF 在日本囊对虾体内的吸收速度非常快,注射后 0.25 h,药物在 3 种组织中的浓度都已达到最高峰,然后迅速分解,1 h 后药物浓度在组织内就处在一个较低水平。

2.4 FF 在日本囊对虾 3 种组织中的代谢动力学方程及参数

使用药物动力学软件 3p97 对注射给药后所测得的浓度-时间数据进行处理,结果为经典的开放式模型。FF 在日本囊对虾 3 种组织中的动力学方程见表 2,动力学参数见表 3。

3 讨论

本试验采用肌肉注射给药方式,探讨 FF 在日本囊对虾体内的药物代谢动力学及在 3 种组织中的代谢特点。注射药物后观察试验动物,在 18 h 内有 1 尾虾蜕皮,72 h 内有 3 尾虾蜕皮,无死亡,其余活动、摄食正常。说明采用注射方式给药对日本囊对虾的生活、生长没有明显的负面影响,且以注射法给药进入试验动物体内的药物剂量准确,进入体内的时间基本一致,可以减少药物进入动物体内时间及剂量的差异对试验结果的影响。

3.1 氟苯尼考在日本囊对虾体内的药物代谢动力学特点

研究结果表明,用单次肌肉注射方式给药后,FF 在血淋巴和肝脏中的动力学方程药物时-量曲线关系符合开放一室模型;FF 在肌肉中的动力学方程为开放的二室模型。试验中不同组织的代谢适合不同的房室模型,这与肌注给药的中国明

表 2 FF 在日本囊对虾 3 种组织中的代谢动力学方程

组织	模型	方程	R
肝脏	一室模型	$C_{\text{肝脏}} = 23.16(e^{-1.84t} - e^{-10.24t})$	0.843
血淋巴	一室模型	$C_{\text{血淋巴}} = 138.9(e^{-1.41t} - e^{-1.65t})$	0.945
肌肉	二室模型	$C_{\text{肌肉}} = 10.90e^{-0.63t} + 1.47e^{-0.04t} - 12.37e^{-14.60t}$	0.841

注: C 为组织内药物浓度; t 为时间。

表 3 FF 在日本囊对虾 3 种组织中的代谢动力学参数

参数	FF		
	肝脏	肌肉	血淋巴
分布相的零时截距 A/(μg/g)	23.135	10.902	137.255
一级吸收速率常数 Ka/(1/h)	10.236	14.603	1.653
吸收半衰期 $t_{1/2}$ Ka /h	0.6771	0.4746	0.4193
半衰期 $t_{1/2}$ Ke /h	3.766	/	4.917
二室模型分布相的半衰期 $t_{1/2}\alpha$ /h	/	1.101	/
二室模型消除相的半衰期 $t_{1/2}\beta$ /h	/	16.16	/
药物浓度处于峰值时的时间 T (peak) /h	0.2044	0.2298	0.6544
药物的峰值浓度 C(max) /(μg/g)	13.03	10.46	8.030
浓度-时间曲线的曲线下面积 AUC /(μg/g) h	10.31	50.77	14.33

对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)^[1] 血淋巴、肝脏、肌肉药血动力学模型均为二室模型, 以及肌注给药的欧洲鳗鲡血浆、肌肉、肝脏等组织的药代动力学模型均为一室模型不尽相同^[2], 其血淋巴药血动力学模型与绵羊^[3] 和鸡^[4] 的肌注给药血动力学模型均为一室模型相同。从 FF 的吸收半衰期看出, FF 在日本囊对虾组织内的吸收速度比较快, 注射药物后肝脏、肌肉和血淋巴的吸收半衰期分别是 0.6771、0.4746、0.4193 h; 吴先爱等^[5] 以 30 mg/kg 静脉注射 FF, FF 在肉鸡体内的吸收半衰期为 44.67 h; 李秀波等^[3] 以 20 mg/kg 静脉注射 FF, FF 在绵羊体内的吸收半衰期为 1.5 h, 说明 FF 在日本囊对虾体内的分布比在其他动物体内要快得多。药物吸收后在 3 种组织内不是平均分布, 注射药物后肝脏、肌肉和血淋巴中达到的最高血药质量比峰值分别为 13.03、10.46、8.030 $\mu\text{g/g}$; 从浓度-时间曲线下面积 AUC 看, 肌肉中最大为 50.77 ($\mu\text{g/g}$) /h, 肝脏中最小为 10.31 ($\mu\text{g/g}$) /h, 血淋巴中居中为 14.33 ($\mu\text{g/g}$) /h; FF 在日本囊对虾 3 种组织中的消除速度也不相同, 肝脏、肌肉和血淋巴的消除半衰期分别为 3.766、16.16、4.917 h; 肝脏的消除半衰期最短, 肌肉的消除半衰期最长, 不同组织表现出不同的消除半衰期。对中国明对虾^[1] 肌注 FF, 其血淋巴的消除相半衰期为 6.494 h; 采用口灌给药, FF 在欧洲鳗鲡的肝脏、肌肉和血浆中的消除半衰期分别为 11.83、18.84、27.94 h^[2], 说明 FF 在动物体内的消除半衰期与动物机体组织的生理特性有关。

3.2 氟苯尼考在日本囊对虾 3 种组织中的代谢特征

从试验数据可以看出, 日本囊对虾腹部肌肉注射氟苯尼考后吸收非常迅速, 给药 15 min 后, 在 3 种组织中的药物浓度都已达到峰值, 这与徐力文^[6] 用注射给药方式研究氟苯尼考在九孔鲍体内代谢的结果相似; 李静云^[1] 用血窦注射法和肌肉注射法研究氟苯尼考在中国对虾组织内的代谢结果, 采用血窦注射法 5 min 后就达到峰值, 采用肌肉注射法在 15 min 内保持很高的浓度。氟苯尼考在其他动物体内的吸收速度也都很快。Beret 等^[7] 研究氟苯尼考在大西洋鲑体内的代谢时, 肌注给药 3 h 后测得的血药浓度最高; 李秀波等^[3] 研究 FF 在绵羊体内的代谢、蒋红霞等^[8] 研

究 FF 在猪体内的代谢时, 血药浓度均在静注后 5 min 达到峰值。氟苯尼考在日本囊对虾体内的血药浓度达到峰值后, 只维持很短的时间即迅速下降, 以 20 mg/kg 的剂量注射, 4 h 后在肌肉中的药物质量浓度就已降至 1 $\mu\text{g/g}$ 以下, 6 h 后在肌肉、肝脏、血淋巴等 3 种组织中的药物质量浓度均已降至 1 $\mu\text{g/g}$ 以下, 这比中国明对虾以 15 mg/kg 的剂量注射 2 h 后血药浓度已降至 1 $\mu\text{g/mL}$ 以下要慢^[1], 但比绵羊和猪体内以 20 mg/kg 的剂量静注后则能维持血药浓度在 1 $\mu\text{g/mL}$ 以上可达 712 h 要快得多^[3,8]。其他药物在进入甲壳类动物体内后也存在血药浓度迅速达到峰值的现象^[9-10], 说明药物在甲壳类中的代谢速度比较快, 这可能与甲壳类动物的生存环境以及开放式循环系统有关。

3.3 氟苯尼考的给药方案及安全性探讨

研究药物代谢的目的是为在生产中的实际应用提供依据, 是为了在水生动物的病害防治中获得较理想的防治效果。水产用药通常采用多次给药的方式以维持一定的血药水平, 多剂量给药一般是固定用药的剂量和间隔时间。日本囊对虾肌肉、血淋巴和肝脏是主要的发病部位, 如肌肉白浊病、肝胰脏白浊病、红腿病等。根据 FF 的药物动力学参数和代谢特点, 不同部位发病, 用药次数也不相同。肝脏发病建议采用 3~4 次/d 的给药方案, 最好是 1 次/6 h 或 1 次/8 h; 血淋巴一般不会表现出发病症状; 肌肉发病时建议采用 1~2 次/d 或 2~3 次/2 d 的给药方案。但是, 对虾发病时, 表现症状常常与发病部位不全一致, 或多部位同时出现症状, 这时应考虑综合因子。使用 FF 进行防治时, 建议每天给药 2 次, 连用 2~3 d。经 4~6 个剂量后, 药物在体内的累积量约达 95% 左右, 基本达到了稳定状态^[11]。若再继续多次用药, 则其药血浓度可能远远超过第一次用药的浓度, 因而发生副作用。

休药期是指动物从用药后到允许上市的一段时间。药物在机体组织中的残留限量是制定休药期的依据, 对不同药物的残留量要求不一样。欧盟和我国规定肉类中氟苯尼考的最大残留限量 (MRL) 为 0.1 $\mu\text{g/g}$, 而日本规定冻虾仁中氟苯尼考的最大残留限量为 0.1 $\mu\text{g/g}$ 。欧盟和日本是我国虾类的出口大国, 其药物残留限量即是我国

虾类药物残留的标准。FF 在日本囊对虾肝脏、肌肉和血淋巴等组织的浓度变化趋势相近,肌注 15 min 达峰值后迅速下降,在 24 h 内降解较快,但是 48 h 内在肌肉和肝脏组织中的含量都大于 0.1 $\mu\text{g/g}$,72 h 后才小于 0.1 $\mu\text{g/g}$ 。肌肉是对虾的主要可食部分,因此休药期要按照各组织中半衰期最长的组织含量的消除来确定。结合 FF 在肌肉中的消除规律,为确保食品安全系数更高一些,建议在 23 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下,FF 对日本囊对虾的休药期不少于 7 d。

参考文献

- [1] 李静云,王群,李健,等. 氟苯尼考在中国对虾组织内的代谢动力学及残留消除规律[J]. 水产学报,2004,28(12):63-68.
- [2] 余培建,翁祖桐,樊海平,等. 氟苯尼考在欧洲鳗鲡体内的药物代谢动力学的研究[J]. 福建水产,2005(4):52-57.
- [3] 李秀波,沈建忠,胡顶飞. 氟苯尼考静注及肌注在绵羊体内的药代动力学研究[J]. 畜牧兽医学报,2003,34(6):609-612.
- [4] 张旭,薛克友,王大菊,等. 氟苯尼考在鸡体内的药理学及其体内抗菌后效应研究[J]. 中国兽药杂志,2008,42(12):39-42.
- [5] 吴先爱,沈建忠,胡顶飞,等. 静注与内服氟苯尼考在大肠杆菌感染鸡体内的药代动力学[J]. 兽医学报,2002,22(6):609-611.
- [6] 徐力文,廖昌容,王瑞旋. 氟苯尼考在九孔鲍体内的药代动力学初步研究[J]. 台湾海峡,2006,25(2):216-220.
- [7] Ben M, Tor E H, Kanwal J V, et al. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11 $^{\circ}\text{C}$ [J]. Aquac, 1993, 112: 1-11.
- [8] 蒋红霞,冯洪辉,曾振灵,等. 氟甲砜霉素在猪体内的药代动力学[J]. 中国兽医学报,2001,21(1):86-89.
- [9] 杨先乐,刘至治,横山雅仁. 盐酸丙沙星在中华绒螯蟹体内药物代谢动力学研究[J]. 水生生物学报,2003,27(1):18-22.
- [10] 房文红,邵锦华,施兆鸿,等. 斑节对虾血淋巴中诺氟沙星含量测定及药代动力学[J]. 水生生物学报,2003,27(1):13-17.
- [11] 蔡明虹,谈恒山,李金恒. 药物半衰期与合理用药[J]. 中国医院药学杂志,2002,22(6):365-366.

(上接第 301 页)

参考文献

- [1] 钱明明,宋杰,武斌,等. 中华鳖常见疾病的诊断及综合防治[J]. 动物医学进展,2009,30(4):103-107.
- [2] 祁保民,姚金水,卢惠明. 中华鳖白底板病病理形态学研究[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(2):248-250.
- [3] 陈晓凤,周常义,青新. 鳖白底板致病细菌的研究[J]. 水产学报,1997,21(3):309-315.
- [4] 颜素芬,姜永华. 鳖白底板病的显微和超微结构观察[J]. 集美大学学报(自然科学版),2002,7(2):113-118.
- [5] 陆宏达,金丽华. 鳖嗜水气单胞菌败血症的研究[J]. 水产学报,1996,20(3):224-234.
- [6] 吴惠仙,薛俊增. 中华鳖出血性肠道坏死病原及其药敏性[J]. 中国兽医学报,2004,24(4):343-345.
- [7] 方廖琼,陈昌琼,何成明. 中华鳖出血性肠炎病理组织学研究[J]. 淡水渔业,1998,28(2):7-8.
- [8] 陈晓凤,卢亚芳,周常义. 甲鱼“胃肠溃疡、出血病”病原的初步研究[J]. 集美大学学报(自然科学版),2000,5(3):30-34.
- [9] 赵万鹏,潘兹书,陈世锋,等. 中华鳖腮腺炎的病理组织学初步观察[J]. 信阳师范学院(自然科学版),1998,11(3):258-259.
- [10] 潘连德,孙玉华,刘其根. 温室养殖中华鳖非寄生性肝病的诊断[J]. 水产科技情报,1999,26(1):10-15.
- [11] 潘连德. 中华鳖非寄生性肝病组织病理研究[J]. 水产学报,1998a,22(2):129-135.
- [12] 叶巧真,何建国,翁少萍,等. 中华鳖白底板病和红底板病病毒及细菌的致病性[J]. 淡水渔业,1999,29(8):3-7.
- [13] 沈锦玉,潘晓艺,余旭平,等. 中华鳖白底板病原的分析[J]. 中国水产科学,2007,14(5):815-822.
- [14] 王鸿泰,何力,张俊. 饲料质量与中华鳖白底板病的关系[J]. 淡水渔业,2002,32(2):32-33.
- [15] 江为民,向静,肖光明. 中华鳖出血性肠炎病原及防治研究[J]. 内陆水产,2006(12):10-12.
- [16] 川崎义一. スッポン养殖讲座⑨[J]. 养殖,1987,4(5):65-69.
- [17] Johnson W M, Lior H. Cytotoxicity and suckling mouse reactivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from human sources [J]. Can. J. Microbiology, 1981(27):1019-1027.
- [18] Rossi O D, Amaral L A, Nader A, et al. Enterotoxigenicity of *Aeromonas* sp. strains isolated from different points in the cattle slaughtering processing line [J]. Arq Bras Med Vet Zoo, 2001, 53(5):589-594.
- [19] Santos J A, Gonzalez C J, Otero A, et al. Hemolytic activity and siderophore production in different *Aeromonas* species isolated from fish [J]. Appl Environ Microb, 1999, 65(12):5612-5614.
- [20] 杨先乐,周剑光,柯福恩,等. 中华鳖出血性肠道坏死症流行病学[J]. 中国水产科学,1998,5(2):73-78.
- [21] 陈天宗,文利新,丁小波. 鳖腮腺炎的研究进展及综合防治措施[J]. 湖南饲料,2007(5):42-44.