

复方新诺明在花鲈体内的残留及消除规律*

方星星 李健** 王群 刘秀红

(中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

摘要 报道了 22 ℃ ± 3 ℃ 和 16 ℃ ± 2 ℃ 水温条件下花鲈 (*Lateolabrax japonicus*) 多次口服复方新诺明在肌肉、血液、肝脏、肾脏 4 种组织中的残留及消除规律。药物在花鲈肌肉、血液、肝脏、肾脏中的残留用二氯甲烷提取,反相高效液相色谱法检测药物浓度,最低检测限可达 0.01 μg/mL,平均回收率为 80%~90%。研究表明:两种温度下,复方新诺明在花鲈体内的残留和消除情况差异明显,药物的吸收率及其在组织中的消除速度受温度影响较大,较高温度下吸收率高(TMP)且消除速度较快。建议花鲈在 22 ℃ 和 16 ℃ 水温条件下口服复方新诺明的停药期应为 32 d 和 26 d。

关键词 复方新诺明,残留,消除规律,花鲈 (*Lateolabrax japonicus*)

中图分类号 948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)09-0016-05

磺胺类药物属广谱抗菌药,在其发现之初曾是治疗全身性感染的特效药。近些年来由于其品种多、性质稳定、价格便宜广泛应用于畜牧及水产养殖动物的疾病防治领域^[1]。但在使用过程中,磺胺类药物的毒副作用被逐渐发现,加上人们食品安全意识的不断加强,因此其药物残留问题已引起国内外的普遍重视。到目前为止国外相关研究较为深入,已报道了磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine SM₂)、磺胺-2,6-二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine SDM)、磺胺间甲氧嘧啶(sulphamonomethoxine SMM)等磺胺类药物在养殖鱼类如斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、鳗鲡(*Anguilla japonica*)体内的残留情况^[2-6],以及 SM₂ 的毒性如致癌性的报道等^[7];国内只有艾晓辉等报道了 SM₂ 在银鲫血液中的代谢情况^[1];朱秋华等报道了磺胺嘧啶(Sulfadiazine,SD)在甲鱼体内的残留情况^[8]。本文研究的复方新诺明(Sulfamethoxazole SMZ/Ti methoprin TMP=5/1)是中效磺胺类药物与磺胺增效剂的复方制剂,抗菌谱广,抗菌效果好,广泛地应用在国内水产上,国内外文献均较少涉及。国内仅王群研究了其在花鲈体内的代谢情况^[9],而有关残留方面的研究未见报道。本实验研究复方新诺明在不同温度下的残留、消除特点,确定合理的停药期,为加强渔药的残留监控等提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康花鲈(*Lateolabrax japonicus*),体质量约 200 g,饲养于中国水产科学研究院黄海水产研究所麦岛实验基地,实验期间水温分别为 22 ℃ ± 3 ℃ 和 16 ℃ ± 2 ℃,充气,流水,每日投喂新鲜杂鱼。

1.1.2 试验药品 复方新诺明标准品,纯度 ≥ 99.5%,中国兽药监察所生产;复方新诺明药片,0.48 g/片,山东新华制药股份公司生产,批号:000802。

1.1.3 化学药品和试剂 无水硫酸钠(A.R)、二氯甲烷(A.R)、冰醋酸(A.R)、正己烷(A.R)、乙腈(HPLC)。

1.1.4 实验仪器 Agilent1100 型高效液相色谱

* 农业部重点科研项目渔 95-B00-01-02 号和教育部海水养殖重点开放实验室 2002 11 号共同资助。

** 通讯作者。

第一作者:方星星,出生于 1977 年,硕士研究生,主要从事渔用药代谢动力学及残留研究。E-mail:fang304@163.com

收稿日期:2002-12-27;修回日期:2003-04-18

实验与技术

EXPERIMENT & TECHNOLOGY

谱仪、紫外吸收检测器、电子天平、冷冻离心机、漩涡振荡器、冰箱、氮气瓶、恒温水浴锅、匀浆机等。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制 准确称取 0.0100 g 磺胺甲噁唑(SMZ)和 0.0100 g 甲氧苄啶(TMP)标准品溶于 100 mL 流动相中,配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,再依次稀释成 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液,于冰箱中 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 样品的处理和色谱条件 准确称取 1 g 组织(肌肉、肝脏和肾脏)或吸取 1 mL 血液,加入少许无水硫酸钠,再加入 4 mL 二氯甲烷,16 000 r/min 匀浆 10 s,再用 4 mL 二氯甲烷清洗刀头,合并两次提取液,振荡 1 min,5 000 r/min 离心 10 min,吸取全部上清液,在 40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴下氮气吹干,残渣用 1 mL 流动相溶解,加入 1 mL 正己烷去脂肪,下层液过 0.22 μm 的微孔滤膜,过滤后的液体可进行高效液相色谱测定。色谱条件主要参照王群等的报道^[3]。

1.2.3 标准曲线的制备 将配制的浓度为 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品溶液分别加入 4 种空白组织中,按样品处理方法处理后进行 HPLC 测定,以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标做标准曲线,分别求出回归方程和相关系数。

1.2.4 回收率的测定 实验分 2 组,一组往空白组织中(肌肉、肝脏、肾脏和血液)按 5 个浓度梯度(0.05, 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)加入标准液,然后按样品处理方法处理;另一组将未加入标准液的空白组织亦

经相同处理,然后再加入标准液,按照公式进行计算:回收率(%) = (处理前加入标准液样品的测定值/处理后加入标准液样品的测定值) \times 100%。

1.2.5 给药及取样 将实验用花鲈随机分成 8 组,每组 8 尾。给药剂量为 150 mg/kg (SMZ/TMP = 5/1),连续 5 d 口服给药(将药物配成悬浊液,口灌)。并于给药后的 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32 d 取样(肌肉、血液、肝脏和肾脏),每一时间点取一组鱼。

1.2.6 方法精密度 取不同浓度(0.05, 0.1, 1, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) SMZ 和 TMP 标准液,加入空白组织中,按样品处理方法处理,制得的各浓度样品于 1 d 内分别重复进样 5 次和分 5 d 测定,计算各浓度水平响应值峰面积的变异系数和总平均变异系数,以此衡量定量方法的精密度。

2 结果

2.1 回收率与检测限

复方新诺明以 0.05 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5 个水平,分别测其在肌肉、血液、肝脏、肾脏中的回收率,结果见表 2。以引起三倍基线噪音的剂量为最低检测限,本法最低检测限为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。经测定 SMZ 和 TMP 在 0.01 ~ 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好,相关系数 r 分别为 0.9976 和 0.9956;日内精密密度为 1.68% \pm 0.07%,日间精密密度为 2.51% \pm 0.89%。

2.2 复方新诺明在花鲈组织中的残留量

将高效液相色谱测得的 SMZ 和 TMP 的峰面积

表 1 SMZ 和 TMP 在 4 种组织中的回收率

Tab.1 Recovery of SMZ and TMP in three tissues

浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SMZ 的回收率 (%)				TMP 的回收率 (%)			
	肌肉	血液	肝脏	肾脏	肌肉	血液	肝脏	肾脏
0.05	89.86	88.35	88.35	87.91	91.25	92.30	90.67	89.65
0.1	92.23	94.70	90.46	89.32	97.85	98.65	95.82	95.72
1	89.35	92.17	87.68	88.12	94.87	96.98	90.11	92.61
10	83.39	90.16	85.83	85.52	91.15	90.76	86.84	87.93
50	79.69	84.99	77.12	80.83	82.02	85.03	81.07	83.56

表 2 22 $^{\circ}\text{C}$ 和 16 $^{\circ}\text{C}$ 水温下 SMZ 消除曲线方程及参数

Tab.2 Equation of elimination curve of SMZ at 22 $^{\circ}\text{C}$ and 16 $^{\circ}\text{C}$

组织	消除曲线方程		消除半衰期 $T_{1/2}$ (d)		相关系数 r^2	
			22 $^{\circ}\text{C}$	16 $^{\circ}\text{C}$	22 $^{\circ}\text{C}$	16 $^{\circ}\text{C}$
	22 $^{\circ}\text{C}$	16 $^{\circ}\text{C}$				
肌肉	$C = 32.563e^{-1.8717T}$	$C = 27.97e^{-0.9595T}$	0.37	0.72	0.967	0.947
血液	$C = 2.3664e^{-1.4707T}$	$C = 22.35e^{-0.7241T}$	0.47	0.95	0.953	0.929
肝脏	$C = 4.5421e^{-0.9931T}$	$C = 3.7066e^{-0.3604T}$	0.7	1.9	0.936	0.956
肾脏	$C = 7.1035e^{-1.4341T}$	$C = 4.0538e^{-0.6196T}$	0.48	1.1	0.978	0.973

C:浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$); T:时间(d)。

代入标准曲线的回归方程,可求得药物在各组织中的含量。图1,2,3,4为花鲈口服复方新诺明后各组织中药物的药-时曲线图。

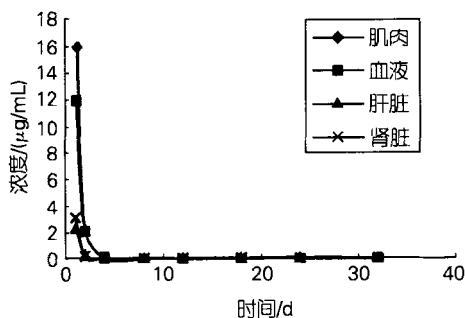


图1 22 °C水温下 SMZ 的药-时曲线
Fig.1 Elimination curve of SMZ at 22 °C

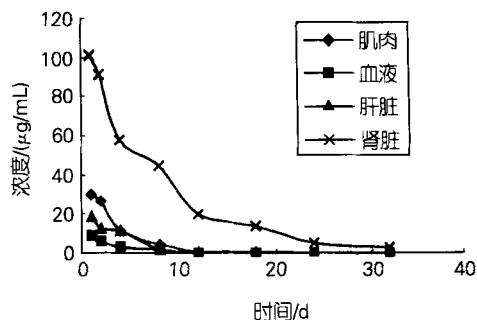


图2 22 °C水温下 TMP 的药-时曲线
Fig.2 Elimination curve of TMP at 22 °C

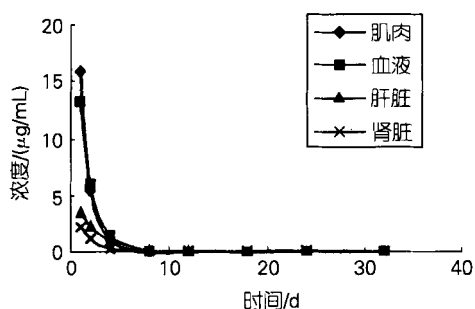


图3 16 °C水温下 SMZ 的药-时曲线
Fig.3 Elimination curve of SMZ at 16 °C

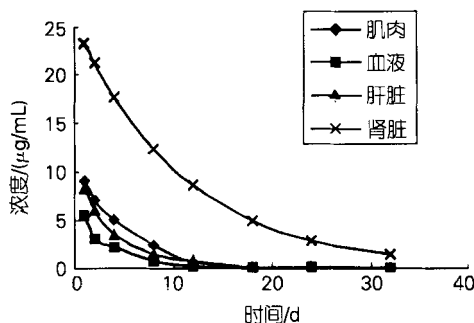


图4 16 °C水温下 TMP 的药-时曲线
Fig.4 Elimination curve of TMP at 16 °C

表3 22 °C和 16 °C水温下 TMP 消除曲线方程及参数

Tab.3 Equation of elimination curve of TMP at 22 °C and 16 °C

组织	消除曲线方程		消除半衰期 $T_{1/2}$ (d)		相关系数 r^2	
	22 °C	16 °C	22 °C	16 °C	22 °C	16 °C
肌肉	$C = 49.29e^{-0.3498 T}$	$C = 9.0424e^{-0.1987 T}$	1.98	3.48	0.976	0.978
血液	$C = 12.715e^{-0.3332 T}$	$C = 3.987e^{-0.1769 T}$	2.1	3.92	0.965	0.963
肝脏	$C = 29.583e^{-0.4385 T}$	$C = 7.6965e^{-0.2023 T}$	1.6	3.43	0.982	0.986
肾脏	$C = 109.25e^{-0.1254 T}$	$C = 25.4e^{-0.09 T}$	5.53	7.8	0.997	0.994

C与T的单位同表2。

3 讨论

3.1 复方新诺明在花鲈体内的残留

在 22 °C ± 3 °C 水温条件下,以 150 mg/kg 的剂量连续 5 d 口服给药,停药 1 d 后 SMZ 和 TMP 在肌肉、血液、肝脏、肾脏 4 种组织中的浓度分别为 15.9,

11.9, 2.3, 3.14 µg/mL 和 30.1, 8.47, 18.8, 100.9 µg/mL。比较两种药物残留浓度可以发现,除血液外 SMZ 在其他 3 种组织中的残留浓度都明显低于 TMP,而最初口服时的浓度前者是后者的 5 倍。造成这种结果的原因是:磺胺类药物被组织吸收后,在组织内有一个乙酰化的过程(即磺胺类药物与乙酰辅酶 A 结合

生成无效的乙酰化磺胺), 而 SMZ 又是这类药物中乙酰化率较高的。Samuelsen 等^[5]报道了 SDM, SMZ, SM₆, 磺胺胍(sulphaguanidine, SGD) 4 种磺胺类药物在大西洋鲱(*Hippoglossus hippoglossus* L) 肌肉内的乙酰化率分别为 93%, 89%, 11%, 9%; 以 200 mg/kg 浓度水浴 72 h 后测得以上 4 种药和 TMP 在肌肉内的最高浓度分别为 2.1, 6.1, 24.4, 32.6, 99 μg/mL。由此也可以得出 SMZ 在血液中浓度相对较高的原因可能是其在血液中的乙酰化率较低。再比较两种药在不同组织中残留浓度的差别: SMZ 在肌肉和血液中浓度较高, 该结果与王群等^[9]研究结果一致; 而 TMP 在肾脏中的浓度远高于其它 3 种组织中的浓度, 这可能与其主要通过肾脏排泄有关。Samuelsen 等^[10]报道, 目前国外常使用的一种磺胺增效剂为 TMP 类似物——甲氧嘧啶(ormethoprim OMP), 在 10 °C ± 0.5 °C 水温条件下以 5 mg/kg 的剂量连续 5 d 口服给药, 测得 OMP 在大西洋鲑血液和肾脏中的最高浓度之比分别为 1/92, 说明该类药易在肾组织中与 TMP 残留规律相似。

16 °C ± 2 °C 水温下, 停药 1 d 后 SMZ 和 TMP 在 4 种组织中的浓度分别为 15.9, 13.2, 3.6, 2.3 μg/mL 和 12.9, 5.6, 8.27, 23.2 μg/mL。与 22 °C ± 1 °C 时相比, SMZ 的残留浓度相差不大, 而 TMP 在组织中的浓度较低, 在肾脏中浓度差距尤为明显, 原因可能是低温条件下 TMP 的吸收率较低。Harry 等^[11]也曾指出土霉素(Oxytetracycline, OTC) 低温下的吸收率较低。

3.2 不同温度下复方新诺明在花鲈体内的消除规律

实验结果显示, 22 °C ± 3 °C 水温条件下, SMZ 和 TMP 在肌肉、血液、肝脏、肾脏 4 种组织中的 $T_{1/2}$ 分别为 0.37, 0.47, 0.7, 0.48 d 和 1.98, 2.1, 1.6, 5.53 d; 16 °C ± 2 °C 下分别为 0.72, 0.95, 1.9, 1.1 d 和 3.48, 3.92, 3.43, 7.8 d。对比两种药物在不同温度下的 $T_{1/2}$, 可看出 SMZ 和 TMP 在组织中的消除速度受温度影响明显, 较高温度下消除速度明显快于低温下。而且, 温度对 SMZ 的影响较大, 因为 16 °C ± 2 °C 下 SMZ 在 4 种组织中的 $T_{1/2}$ 比 22 °C ± 3 °C 下平均延长了 100% 以上, 而 TMP 则平均延长了 80% 左右。Harry 等^[11]也报道了在 5, 10, 16 °C 水温条件下, 以 75 mg/kg 剂量单次口服给药, 测得土霉素(Oxytetracycline OTC) 在虹鳟肌肉和血液中的 $T_{1/2}$ 分别为 8.9, 6.1, 4.8 d 和 8.8, 5.9, 5.1 d; 并推断水温每上升 1 °C, 药物消除速率可增加 10%。说明了环境温度对药物在鱼体内的消除速度确实有很大影响。

3.3 复方新诺明停药期的确定

根据中华人民共和国农业行业标准(NY5070-2002), SMZ 在水产品中最高残留限量为 0.1 μg/mL。花鲈肌肉作为可食性组织, 若以 0.1 μg/mL 残留标准, 则 SMZ 的停药期应为 6 d (22 °C ± 3 °C) 和 8 d (16 °C ± 2 °C)。我国对 TMP 的残留标准并无明确规定, 而其他国家对其残留量则有较严格的限制: 欧盟规定 TMP 的最大残留标准为 0.05 μg/mL^[5]。根据试验结果, TMP 在花鲈肌肉组织中浓度降至 0.05 μg/mL 所需时间分别为 30.2 d (22 °C ± 3 °C) 和 26.1 d (16 °C ± 2 °C)。综合两种药的残留情况, 建议花鲈在 22 °C 和 16 °C 水温条件下口服复方新诺明的停药期应为 32 d 和 26 d。从结果来看, 两种温度所对应的停药期似乎与温度越高药物消除速度越快的结论相悖。但事实上, 温度升高不光能加快药物的消除速率, 同时也会增大鱼体对药物的吸收率。在本实验中, TMP 的消除情况决定了停药期的长短, 而试验结果表明, TMP 吸收率受温度的影响比其消除速率所受的影响更大, 导致了较高温度下停药期较长。

近年来, 各国对磺胺类药物残留限制越来越严格, 美国 FDA 已规定磺胺嘧啶(SD) 在动物可食性组织中不得检出^[6], 磺胺二甲嘧啶的最高残留量必须小于 0.01 μg/mL^[12]。由于大部分磺胺药或复方制剂的停药期较长, 本实验得出花鲈在 22 °C 和 16 °C 水温条件下口服复方新诺明的停药期应为 32 d 和 26 d; Samuelsen 等报道 10 °C 水温下, 大西洋鲑口服 Romet³⁰ (SD/OMP = 5/1) 后的停药期为 54 d^[10]; 挪威官方规定 12 °C 以上大西洋鲑口服 Tribissen^R (SD/TMP = 5/1) 的停药期为 40 d^[5]。另外, 还有一些磺胺药有较大毒性, Joel 报道了 SM₆ 可导致人类的甲状腺癌^[7]。因此与其他抗菌药相比, 磺胺类药物的使用将越来越受到限制。建议严格限制磺胺类药物的使用, 由其他相对容易消除的药物如喹诺酮类等取代或使用中草药制剂等。

参考文献

- 1 艾晓辉, 陈正望. 磺胺二甲嘧啶在银鲟体内的药理学及组织残留研究. 淡水渔业, 2001, 31(6): 52-54
- 2 Kleinow K M, Beilfuss W L, Jarboe H H, et al. Pharmacokinetics, bioavailability, distribution, and metabolism of Sulfadimethoxine in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). J Fish Aquat ANAL Sci, 1992, 49: 1 070-1 077

- 3 Ryuji U. Pharmacokinetics and bioavailability of Sulfa - monomethoxine in cultured Eel. *Fish Pathology*, 1988, 33(4) : 297-301
- 4 Calvin C W, Steven A B. Extraction and enzyme immunoassay of Sulfadi methoxine residues in Channel Catfish(*Ictalurus punctatus*). *J AOAC Int*, 1994, 77: 1460-1466
- 5 Samuelsen O B, Lunestad B T, Jørgensen A, et al. Pharmacokinetics and efficacy studies on bath-administering potentiated Sulphonamides in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*. *Fish Dis*, 1997, 20: 287-290
- 6 Kazuaki U, Takaiko A, Ryuji U, et al. Pharmacokinetics and metabolism of Sulfa monomethoxine in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and yellowtail(*Seriola quinqueradiata*) following bolus intravascular administration. *Aquaculture*, 1997, 153: 1-8
- 7 Joel E H, Richard D L, Rose M N, et al. Liquid Chromatographic determination of Sulfa methazine in Feed. *J ASSOC OF ANAL CHEM*, 1988, 71(5) : 1054-1056
- 8 朱秋华,钱国英.3种药物在甲鱼体内的残留研究. *中国水产科学*, 2001, 8(3) :50-53
- 9 王群,孙修涛,刘德月,等.复方新诺明在鲈鱼体内的药物代谢动力学研究. *海洋科学*, 2001, 25:35-38
- 10 Samuelsen O B, Pursell L, Smith P, et al. Multiple-dose Pharmacokinetics study of Romet³⁰ in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and in vitro antibacterial activity against *Aeromonas*. *Aquaculture*, 1997, 152: 287-296
- 11 Harry B, Goran B. Temperature Related absorption and excretion of Oxytetracycline in Rainbow Trout (*Salmo gairdner* R.). *J Aquaculture*, 1990, 84: 363-372
- 12 Joseph U, Daniel P, Robert A B, et al. Quantitation of Sulfa methazine in pork tissue by Layer Chromatography. *J AOAC Int*, 1993, 77(2) : 335-341

RESIDUAL CHARACTERISTICS OF SULFAMETHOXAZOLE AND TRIMETHOPRIM IN *Lateolabrax japonicus* AT DIFFERENT WATER TEMPERATURE

FANG Xing Xing LI Jian WANG Qun LIU Xiurong

(*Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Qingdao, 266071*)

Received: Nov., 27, 2002

Key Word: Sulfa methoxazole (SMZ), Residues, Elimination, *Lateolabrax japonicus*

Abstract

This article firstly reports the residual characteristics of Sulfa methoxazole (SMZ) and Tri methoprim (TMP), which are many times taken orally, in *Lateolabrax japonicus* at different temperature. The medicine was distilled by methylene chloride from muscle, blood, liver and kidney. The concentrations of medicament were determined by High Performance Liquid Chromatography, the average recoveries were 80% ~ 90% and the limit of determination was 0.01 μg/ mL. The results indicated that the speed of elimination changed at different water temperature. The withholding period for *Lateolabrax japonicus* after oral administration at dose of 150 mg/ kg with mixture of SMZ and TMP (5: 1) for 5 consecutive days should be 26 day and 30 day at water temperature 22 °C and 16 °C.

(本文编辑:刘珊珊)