

恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的消除规律研究

高爱欣^{1,2}, 李健², 王群², 战文斌¹

(1. 中国海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要:以 5 mg/L 恩诺沙星浸浴菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)24 h, 取血液、鳃、内脏团、足、闭壳肌 5 种组织, 反相高效液相色谱法测定其中的药物浓度。结果表明, 恩诺沙星按一级动力学过程从体内消除, 在 5 种组织中消除速率快慢不一, 其在菲律宾蛤仔血液、鳃、内脏团、足、闭壳肌中的消除曲线方程分别为 $c = 6.995e^{-0.0853t}$, $c = 2.7957e^{-0.1177t}$, $c = 1.539e^{-0.1013t}$, $c = 1.7015e^{-0.1535t}$, $c = 2.010e^{-0.1414t}$, 消除半衰期 $T_{1/2}$ 分别为 6.284, 5.889, 6.483, 4.516, 3.679 h。恩诺沙星在水产品中的最大残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在本实验条件下, 建议临床休药期不小于 2 d。

关键词: 菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*); 恩诺沙星; 消除

中图分类号: S948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2007)07-0032-05

氟喹诺酮类药物 (Fluoroquinolones, FQs) 属于第三代喹诺酮类化合物, 是一族人工合成的新型杀菌性抗菌药。氟喹诺酮类药物具有口服及肌注后吸收迅速、完全、消除半衰期较长、体内分布广泛、表观分布容积大等药动学特征^[1,2], 且以抗菌谱广、抗菌活性强、与其它抗菌药物无交叉耐药性、毒副作用小、有较长的抗菌后效应 (PAE) 等特点而广泛用于动物和人类多种感染性疾病的治疗^[3], 在水产动物细菌性疾病防治上也成为重点研究对象。与此同时, 此类药物在食品动物中的残留已经开始导致人类病原菌对其产生耐药性^[4], 且其毒副作用还会对人体产生直接危害, 因此其残留问题日益引起关注。恩诺沙星是 FQs 衍生物的一种, 主要通过抑制 DNA 回旋酶的活性, 影响 DNA 的解链、切割和重封合过程, 呈现抑菌和杀菌作用。目前对该药的药代动力学研究主要集中在虾类^[5]和冷水性鱼类 *Colossoma brachypomum*^[6]、大西洋鲑^[7,8]、虹鳟^[9]、鲈鱼^[10]上, 有关恩诺沙星在贝类体内的报道较少。由于近年来养殖贝类频发细菌性疾病, 为有效、迅速地进行防治并避免药物残留问题, 进行抗菌药物的药代动力学研究是十分必要的。通过研究, 可以建立药物在贝类体内的吸收、分布、消除及生物利用度等药代动力学资料, 据此制定合理的给药方案, 确立休药期, 为应用恩诺沙星防治养殖

贝类细菌性疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*), 购自青岛市南山市场, 壳长 3.2~4.5 cm, 体质量 8~15 g。暂养 5 d 后用以实验。暂养期间连续充气, 每日换水 1/2, 按时投喂等鞭金藻 (*Isochrysis galbana* Parke)0A-3011。水温 22 ± 1 , 盐度 31。

1.1.2 药品和试剂

恩诺沙星 (Enrofloxacin, EF) 标准品, 纯度 99.5%, 中国兽药监察所生产; 恩诺沙星原料药, 河南省大明实业有限公司动物药品厂生产; 二氯甲烷 (AR)、正己烷 (AR)、四丁基溴化铵 (AR)、磷酸 (AR)、乙腈 (HPLC)、甲醇 (HPLC) 等。

收稿日期: 2004-12-12; 修回日期: 2005-04-25

基金项目: 国家科技攻关计划资助项目 (2002BA906A39);

山东省科技发展计划资助项目 (2003-4-1)

作者简介: 高爱欣 (1979-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 主要从事渔用药物方面的研究; 李健, 通讯作者, 研究员, 电话: 0532-85830183, E-mail: lijian@ysfri.ac.cn

1.1.3 实验仪器

Agilent1100 型高效液相色谱仪、电子天平、漩涡混合器、高速台式离心机、数字式精密酸度计、旋转蒸发仪、组织匀浆机等。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

流动相：0.017 mol/L 的四丁基溴化铵：乙腈 = 88:12；流速：0.9 mL/min；进样量：20 μ L；荧光检测器：激发波长 278 nm，发射波长 440 nm；柱温：室温；色谱柱：ODS 柱，25 cm \times 4.6 mm。

1.2.2 标准曲线的制备

准确称取 0.01g 恩诺沙星标准品，溶于 100 mL 0.03 mol/L NaOH，配成 100 mg/L 的母液，再依次用流动相稀释成 20, 10, 5, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.02, 0.01 mg/L 的标准溶液，进行 HPLC 测定。以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标做标准曲线，分别求出回归方程和相关系数。

1.2.3 回收率与精密度的测定

实验分 2 组，一组往空白组织(内脏团、鳃、足、闭壳肌、血液)中按 5 个质量浓度梯度(0.05, 0.1, 1, 10, 50 mg/L)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%。

取不同质量浓度(0.05, 0.10, 1, 10, 50 mg/L)恩诺沙星标准液，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。

1.2.4 给药及取样

以 5mg/L 恩诺沙星浸浴菲律宾蛤仔 24 h 后，冲洗干净，移入天然海水中正常饲养，分别于停药后的 0.17, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 h 时取样。每一时间点取 8 只蛤仔。从闭壳肌抽取血液，迅速解剖取其内脏团、鳃、足、闭壳肌。另取空白组织作对照。全部样品-20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

1.2.5 样品处理

称取 1 g 组织或吸取 1 mL 血液，先加入 1 mL pH 为 7.5 的缓冲盐溶液，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 2~3 min，静置 15 min，然后 5 000 r/min 离心 10 min，吸取全部上清液，在 40 $^{\circ}$ 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 μ m 微孔滤膜，过滤后的液体可进行高效液相色谱测定。

2 结果

2.1 标准曲线与线性范围、最低检测限

以测得的恩诺沙星平均峰面积 A_i 对每个浓度 c_i 作回归，在 0.05~50 mg/L 的质量浓度范围内标准曲线方程及相关系数分别为： $c_i = 0.0007A_i - 0.0427$ ， $r = 0.999$ 。采用荧光检测器，本实验条件下，最低检测限为 0.005 mg/L。

2.2 回收率与精密度

恩诺沙星以 0.05~50 mg/L 5 个水平，测得回收率为 82.7%~94.8%，测得日内精密度为 2.85%，日间精密度为 3.51%。

2.3 菲律宾蛤仔体内的药物消除

不同取样时间菲律宾蛤仔各组织中恩诺沙星质量比如表 1 所示，恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的消除曲线见图 1。对所得的药物质量比-时间数据进行非线性最小二乘回归分析法处理得到 5 种组织中药物质量比(c)与时间(t)关系的消除曲线方程及相关参数见表 2。

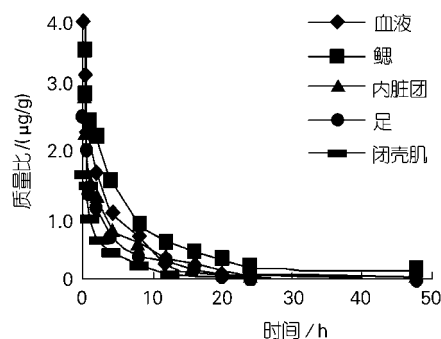


图 1 以 5 mg/L 恩诺沙星浸浴 24 h 后各组织内的消除曲线
Fig.1 Elimination curve of enrofloxacin in plasma and tissues after bath treatment of 5 mg/L for 24 h

表 1 恩诺沙星 5 mg/L 浸浴菲律宾蛤仔 24 h 后各组织中药物浓度 ($X \pm SD$)

Tab.1 Concentrations (mean \pm SD) of enrofloxacin in plasma and tissues after bath treatment of 5 mg/L for 24 h

时间 (h)	血液 (mg/L)	鳃 (μ g/g)	内脏团 (μ g/g)	足 (μ g/g)	闭壳肌 (μ g/g)
0.17	3.957 \pm 0.206	3.525 \pm 0.445	2.875 \pm 0.332	2.483 \pm 0.247	1.629 \pm 0.174
0.5	3.154 \pm 0.604	2.850 \pm 0.392	2.321 \pm 0.315	2.034 \pm 0.286	1.483 \pm 0.275
1	2.125 \pm 0.342	2.457 \pm 0.525	1.510 \pm 0.235	1.367 \pm 1.201	0.943 \pm 0.173
2	1.650 \pm 0.422	2.249 \pm 0.679	1.296 \pm 0.532	1.117 \pm 0.242	0.616 \pm 0.125
4	1.008 \pm 0.210	1.507 \pm 0.599	0.785 \pm 0.279	0.652 \pm 0.250	0.439 \pm 0.137
8	0.648 \pm 0.447	0.855 \pm 0.459	0.582 \pm 0.267	0.345 \pm 0.265	0.227 \pm 0.154
12	0.235 \pm 0.030	0.584 \pm 0.107	0.328 \pm 0.143	0.286 \pm 0.057	0.081 \pm 0.011
16	0.118 \pm 0.013	0.429 \pm 0.081	0.268 \pm 0.195	0.155 \pm 0.017	0.047 \pm 0.012
20	0.074 \pm 0.018	0.313 \pm 0.098	0.157 \pm 0.023	0.079 \pm 0.009	0.035 \pm 0.008
24	0.056 \pm 0.006	0.172 \pm 0.039	0.068 \pm 0.016	0.048 \pm 0.008	0.015 \pm 0.009
48	0.028 \pm 0.012	0.126 \pm 0.024	0.022 \pm 0.013	0.017 \pm 0.005	ND

注: ND为未检出

表 2 恩诺沙星 5 mg/L 浸浴 24 h 后各组织内的药物消除曲线方程及参数

Tab. 2 Equation of elimination curve and parameters of enrofloxacin in plasma and tissues after bath treatment of 5mg/L for 24h

组织	消除曲线方程	r^2	β (h^{-1})	$T_{1/2}$ (h)
血液	$c = 1.674e^{-0.1103t}$	0.823	0.110 3	6.284
鳃	$c = 2.796e^{-0.1177t}$	0.980	0.117 7	5.889
内脏团	$c = 1.539e^{-0.1013t}$	0.924	0.101 3	6.843
足	$c = 1.702e^{-0.1535t}$	0.969	0.153 5	4.516
闭壳肌	$c = 1.154e^{-0.1884t}$	0.973	0.188 4	3.679

3 讨论

3.1 恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的消除规律

本实验首次采用高效液相色谱法研究了恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的消除情况。

通过前期恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的累积实验发现,以恩诺沙星浸浴菲律宾蛤仔,各组织中药物含量随着时间的延长而增大,累积速率逐渐减小,24 h 左右达到最高,此后组织中的药物浓度维持一定时间的稳定,表明药物的摄入和排除达到动态平衡,因此在消除实验中确定药浴时间为 24 h。作者发现在将给药结束后的菲律宾蛤仔移入干净海水中 1 h 内各组织中药物浓度很快降低,此时其双壳仍处在闭合状态,由此表明各组织吸收的药物通过代谢途径减少。

从图 1 可以看到,菲律宾蛤仔体内的药物消除速度较快,恩诺沙星在 5 种组织中的消除速率常数为

0.069 5~0.141 4 h^{-1} , 内脏团和鳃中药物消除相对较慢,根据各组织中药物浓度和下降趋势可知:闭壳肌组织不是药物在菲律宾蛤仔体内的主要富集组织(器官)。

血药浓度迅速下降,尤其是在 1 h 内,这说明血淋巴内的药物迅速向体内的其它组织分布或消除,1 h 后下降速度明显减缓。出现这种现象,也许是因为药物对菲律宾蛤仔来说,是一种外来的刺激物,进入血淋巴循环后,由于机体的保护性机能,通过鳃等排泄器官将其排出体外或通过肾脏等器官将其降解,以减轻对机体的刺激,所以在 1 h 内血液浓度下降较快;随着时间的推移,一方面机体对其产生适应性,另一方面药物处于分布与消除过程,消除与降解速度减缓,因而血药浓度的下降速度减缓。

消除相半衰期 ($T_{1/2}$) 反映了药物在机体内的消除速度,是药动力学的一个重要参数。本实验中恩诺沙

星在菲律宾蛤仔血液中的消除半衰期 $T_{1/2}$ 为 6.284 h, 恩诺沙星在中国对虾血液中的消除半衰期 $T_{1/2}$ 为 7.03 h^[5], 在鲈鱼 (*Dicentrarchus labrax*) 中为 25.02 h^[10], 在大西洋鲑血液中为 34.2 h^[8]。恩诺沙星在鱼、虾体内消除较慢一方面可能是与它们所处的较低的环境温度有关, 另一方面可能是因为喹诺酮类药物与骨中的二价离子和皮肤中的黑色素有亲和性^[11], 这两种组织可作为鱼体内残留药物的储存组织, 并在停药后很长一段时间内慢慢释放到其他组织中^[12], 关于这一点已在大西洋鲑 (*Salmo salar*)^[12]、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)^[12] 及海鲷 (*Sparus aurata*)^[13] 等鱼体内得到类似结果。Martinsen 等^[8] 在比较了噻喹酸、氟甲喹、沙拉沙星、恩诺沙星 4 种喹诺酮类药物在大西洋鲑体内的药物代谢情况, 结果前 3 种药的消除半衰期均在 24 h 之内, 其中噻喹酸最易消除, $T_{1/2}$ 在 18 h 左右, 说明与同类药物相比, 恩诺沙星消除较慢。

不同组织间的 $T_{1/2}$ 差异较大。恩诺沙星在菲律宾蛤仔鳃中的 $T_{1/2}$ (9.973 h) 要明显长于闭壳肌中的 $T_{1/2}$ (4.902), 而在中国对虾成体肌肉中 $T_{1/2}$ (约 19.7 h) 短于肝胰脏中 $T_{1/2}$ (约 52.7 h), 血液中 $T_{1/2}$ 则更短 (7.03 h)^[5]。在温度基本一致的条件下, 诺氟沙星在斑节对虾体内消除速度则要快得多, 血淋巴中 $T_{1/2}$ 为 0.612 h^[14]。中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 口灌诺氟沙星后, 血浆中的 $T_{1/2}$ 为 4.24 h^[15]。可见, 动物个体、种属、组织以及药物的差异, 均会影响药物的半衰期。

3.2 临床休药期确定

休药期是根据药物允许残留量及药物在食用组织中消除速度来确定的^[16], 绝大多数药物的体内吸收、分布和消除符合或近似一级动力学过程, 即消除曲线可拟合成指数方程式: $c_t = c_0 e^{-kt}$ 。恩诺沙星即是按一级动力学过程从体内消除的, 由此可推算消除至一定残留水平所需时间, 对确定临床休药期具有重要意义。中华人民共和国农业部发布《无公害食品 水产品中渔药残留限量》规定无公害水产品中恩诺沙星的最高残留限量 (MRL) 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 根据恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的指数消除规律和公式 $T = T_0 + 1/\beta \ln(c_0/c_f)$, T_0 、 c_0 分别为初始时间及浓度, c_f 为允许残留量, 计算得恩诺沙星在血液、鳃、内脏团、足、闭壳肌中残留降至 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平所需时间分别为 1.66, 1.51, 1.67, 1.07, 0.78 d。初步建议在 22 左右的水温下, 以 5 mg/kg 剂量连续药浴 24 h, 恩诺沙星在菲律宾蛤仔体内的临床休药期不小于 2 d。

因为 FQs 药物的主要代谢产物大多数具抗菌活性^[2], 故其标识残留物应为原形药及其主要代谢物, 临床休药期则应根据组织中原形药物及其活性代谢物的总残留浓度来确定, 以最大程度上减轻甚至消除残留药物对人体产生危害的隐患。例如, 恩诺沙星的代谢比较复杂, 主要经肾脏代谢成环丙沙星, 其他途径有恩诺沙星的 N-去炔、哌嗪环对位氮与葡萄糖醛酸结合, 或哌嗪环打开等。鸡静注及内服恩诺沙星后环丙沙星的消除较原药慢^[17], 奶山羊乳中环丙沙星浓度高于恩诺沙星浓度并维持更长的时间^[18]。在鸡体内, 诺氟沙星主要代谢为 N-乙基诺氟沙星、氧合诺氟沙星, 多次给药停药后 12 d 各取样组织中诺氟沙星的残留浓度均低于要求的最低残留限量 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$, 但其活性代谢物之一 N-乙基诺氟沙星在各组织中的残留浓度除肌肉外均大于 0.05 $\mu\text{g}/\text{g}$ ^[19]。因此应关注药物活性代谢物的残留消除动态, 这对于严格药物残留监控是必要的。

此外, 药物消除受许多因素影响, 其中水温影响是最大的。研究表明, 温度变化 1 $^{\circ}\text{C}$, 药物代谢速度变化 10%^[20], 而且给药剂量、给药方式、种属等因素不同都会产生一定影响, 所以临床休药期还要据具体养殖种类、实际养殖环境分别进行研究确定。

参考文献:

- 仲兆金. 喹诺酮类抗菌药的概况与展望[J]. 国外医药抗生素分册, 2001, 22(1): 1-4.
- 曾振灵, 冯淇辉. 氟喹诺酮类抗菌剂在畜禽体内的药物动力学研究进展[J]. 中国兽药杂志, 1994, 28(4): 52-56.
- 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.
- Sherri B T, Calvin C W, Jose E R, et al. Confirmation of fluoroquinolones in catfish muscle by electrospray liquid chromatography / mass spectrometry[J]. *JAOAC Int*, 1998, 81(3): 554-562.
- 方星星. 复方新诺明和恩诺沙星在两种水产动物体内的药物代谢动力学及残留研究[D]. 青岛海洋大学硕士论文, 2003.
- Lewbart G, Vaden S, Deen J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration [J]. *Vet Pharmacol Ther*, 1997, 20(2): 124-128.

- [7] Stoffregen D A , Wooster G A, Bustos P S, *et al.* Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile Atlantic salmon[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1997, **20**(2): 111-123.
- [8] Martinsen B, Horsberg T E. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater at 10 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, **39** : 1 059-1 064.
- [9] Bowser P R , Wooster G A, Leger J, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1992, **15**(1): 62-71.
- [10] Intorre L, Cecchini S, Bertini S, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in the seabass (*Dicentrarchus labrax*) [J]. *Aquaculture*, 2000, **182** : 49-59.
- [11] Steffenak L, Hormazabal V , Yndestad M. Reservoir of quinolone residues in fish[J]. *Food Addit Contam*, 1991, **8**: 777-780.
- [12] Martinsen B, Horsberg T E, Ingebrigtsen K, *et al.* Disposition of ¹⁴C-sarofloxacin in Atlantic salmon *Salmo salar*, rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, *Gadus morhua* and turbot *Scophthalmus maximus*, as demonstrated by means of whole-body autoradiography and scintillation counting[J]. *J Fish Dis*, 1994, **18** : 37-44.
- [13] Malwisi J, Rocca G D, Anfossi P , *et al.* Tissue distribution and depletion of flumequine after in-feed administration in sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Aquaculture*, 1997, **157** : 197-204.
- [14] 王勇强, 赵增元, 李天宝, 等. 两种药物在对虾体内的动力学参数研究[J]. *海水养殖*, 1995, **49** (50): 1-3.
- [15] 陈文银, 印春华. 诺氟沙星在中华鳖体内的药代动力学研究[J]. *水产学报*, 1997, **21** (4): 434-436.
- [16] 邱银生, 朱式鸥, 郝玉萍, 等. 烟酸诺氟沙星在猪、鸡体内的组织残留研究[J]. *中国兽药杂志*, 1994, **28**(3): 10-12.
- [17] 胡功政, 冯淇辉. 恩诺沙星及其活性代谢物在鸡体内的药物动力学[J]. *中国兽医学报*, 1999, **19** (2): 171-174.
- [18] 刘涤洁, 冯淇辉, 陈杖榴. 恩诺沙星及其代谢产物在奶山羊的药动学及乳中药物浓度[J]. *中国兽医杂志*, 2003, **39** (2): 41-44.
- [19] Anadon A, Martinez-Larranaga M A, Velez C, *et al.* Pharmacokinetics of norfloxacin and its N-desethyl- and oxo-metabolites in broiler chickens[J]. *Am J Vet Res*, 1992, **53** (11) : 2 084-2 089.
- [20] Ingebrigtsen K. Factors affecting drug disposition in fish[J]. *Acta Vet Scand*, 1991, **87** : 44-56.

Study on elimination of enrofloxacin in *Ruditapes philippinarum*

GAO Ai-xin^{1,2}, LI Jian², WANG Qun², ZHAN Wen-bin¹

(1. Fishery College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China ; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Qingdao 266071, China)

Received: Dec., 12, 2004

Key words: *Ruditapes philippinarum*; enrofloxacin; elimination

Abstract: The present preclinical study was performed to investigate the excretion of enrofloxacin (EF) in *Ruditapes philippinarum* after bath treatment of 5 mg/L for 24 h. Plasma and tissue concentrations of EF were determined by HPLC. The equations of elimination curve of enrofloxacin in plasma, gill, visceral mass, foot and adductor muscle were $c = 6.995e^{-0.0853t}$, $c = 2.7957e^{-0.1177t}$, $c = 1.539e^{-0.1013t}$, $c = 1.7015e^{-0.1535t}$, $c = 2.010e^{-0.1414t}$, respectively. The elimination of half-lives ($T_{1/2}$) was 6.284, 5.889, 6.483, 4.516, 3.679 h, respectively.

(本文编辑:张培新)