

磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼体内的药物代谢动力学及休药期

鞠晶^{1,2} 王伟利¹ 姜兰¹ 肖贺^{1,2} 罗理¹ 邓玉婷¹ 谭爱萍¹

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所/农业部渔药创制重点实验室/广东省免疫技术重点实验室, 广州 510380;
2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要 在试验水温(28±2)℃条件下,按200 mg/kg的剂量对吉富罗非鱼单次药饵饲喂磺胺间甲氧嘧啶(SMM)后,采用HPLC法测定各组织中的药物浓度,研究SMM在罗非鱼体内的药代动力学及消除规律。结果显示,药物在各组织(血液、肌肉、肝脏和肾脏)中的最大峰质量浓度(质量分数) C_{max} 分别为22.66、7.13、45.50、22.77 μg/mL(μg/g);达峰时间 T_{max} 分别为7.52、7.02、1.00/8.00和2.00/10.00 h(T_{max1}/T_{max2});肝、肾组织中的药-时曲线有明显的双峰现象,并且第1个峰浓度高于第2个峰浓度,提示该药物在罗非鱼胃肠道中具有非齐性吸收现象;药物在各组织(血液、肌肉、肝脏和肾脏)的消除半衰期 $T_{1/2K}$ 分别为5.21、4.84、14.12、6.80 h,显示SMM在罗非鱼体内代谢较快,属于较为短效的磺胺类药物;并且在肌肉和血液中的消除快于肝脏、肾脏。在(28±2)℃温度条件下,按200 mg/kg的剂量对罗非鱼连续5 d药饵饲喂SMM,研究药物的消除规律;根据罗非鱼可食性组织肌肉的残留检测结果,参考中华人民共和国第235号公告中对动物源性食品中磺胺类药物总量的MRL规定,以0.1 mg/kg为残留限量,建议休药期不低于5 d。

关键词 罗非鱼;磺胺间甲氧嘧啶;药代动力学;休药期

中图分类号 S 948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0103-05

磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMM)又名磺胺-6-甲氧嘧啶,其作用强、毒性反应低;药物有效浓度维持时间的长短因动物种类的不同有所差异,SMM在人体中属于肠道易吸收的磺胺类药物且与血浆蛋白结合率较高,加之肾小管对其重吸收较多,有效血药浓度维持时间较长,属于长效磺胺类药物^[1-2]。SMM是我国无公害渔用药物使用准则允许使用的少数抗菌药物之一^[3],对水产养殖中的细菌性竖鳞病、弧菌病、烂鳃病、赤皮病等均有良好的防治效果,SMM的推荐使用剂量为200 mg/kg,在罗非鱼上连续使用4~6 d^[4]。由于渔药使用的特殊性,不能像畜禽养殖那样通过注射、灌喂等手段给药,只能通过饲料添加等方式让鱼类在摄食时摄入药物,不合理用药不仅无法保证药物的治疗效果,引起动物肝、肾等器官损伤^[5-8],还会给养殖环境造成污染,残留在水产品中的药物亦会造成食品安全问题。罗非鱼是我国一种重要的出口创汇水产养殖品种,目前国内外仍未见有关于磺胺间甲氧嘧啶在罗

非鱼体内药物代谢及消除规律的研究报道。本文拟通过研究磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼体内的药代动力学及残留规律,以期为其在罗非鱼生产上的科学合理使用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 试验动物。罗非鱼购自珠江水产研究所水产养殖基地,平均体质量为(150±10) g,健康无病。试验前在试验池内暂养2周,水温为(28±2)℃。饲喂不含任何药物的全价饲料。试验前对罗非鱼进行抽检,结果表明组织中均不含磺胺间甲氧嘧啶。

2) 药品与试剂。磺胺间甲氧嘧啶标准品,100 mg,纯度99%;购自上海安谱科学仪器有限公司;乙酸乙酯、乙腈、甲醇、正己烷均为色谱纯,购自DIMA公司;冰乙酸、盐酸、磷酸二氢钾等均为分析纯;荧光胺,纯度98%,购自aladin公司。

3) 实验仪器与设备。美国Waters公司高效液

收稿日期: 2014-01-25

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 广东省科技计划项目(2011B020307001)

鞠晶, 硕士研究生, 研究方向: 药物代谢动力学. E-mail: juxinting@126.com

通信作者: 姜兰, 研究员, 研究方向: 水产动物病害防治. E-mail: fanjianglan@hotmail.com

相色谱,配备2475荧光检测器;美国 Organomation Associate 公司氮吹浓缩仪;德国 Sigma 公司台式高速冷冻离心机;IKA 公司 IKA-MS3 型振荡器和 IKA-T18 型均质机;梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司分析天平。

1.2 方法

1) 试验鱼驯养。试验前罗非鱼暂养于室内大水泥池中,供氧充足。试验时,采用电热棒调节和控制水温为 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。试验期间自然光照,供氧充足,并及时清除残饵以及罗非鱼粪便。

2) 试验设计及采样。试验分为药物代谢实验和药物残留实验两部分,各部分实验用鱼均为10组,每组7尾,另取7尾罗非鱼饲以空白饲料作空白对照。药代部分按200 mg/kg 的剂量单次给药,于给药后1、2、4、6、8、10、16、24、48、72 h 分别采集血液、肌肉、肝脏和肾脏样品;药残部分按200 mg/kg 的剂量连续定时给药5 d,每天1次,于最后一次给药后8、24、32、48、72、96、120、168、216 h 分别采集肌肉样品;采集的样品均置于 -20°C 冰箱中保存。

3) 色谱条件。色谱柱: Thermo ODS-2 HYPERSIL 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm);激发波长为405 nm,发射波长为495 nm;流动相为乙腈和0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液(35:65, V:V),流速为1 mL/min;进样量:40 μL ;柱温: 35°C 。

4) 样品处理方法。① 血浆样品的处理方法:血浆1.0 mL,移至5 mL 离心管,加入3 mL 乙腈,振荡器振荡1 min,5 000 r/min 离心5 min,取上清液, 30°C 水浴下氮气吹干。用1.0 mL 浓度为0.1 mol/L 的盐酸溶解,加入3 mL 正己烷除脂,0.22 μm 针孔滤膜过滤后取样300 μL ,添加300 μL 0.1 mol/L 盐酸和400 μL 荧光胺, 18°C 衍生30 min 后上机检测。② 肌肉、肝脏、肾脏组织的处理方法:称取2 g 肌肉组织(1 g 肝脏组织或0.5 g 的肾脏组

织)分别置于50 mL 离心管,加入20 mL 乙酸乙酯,均质1 min,5 000 r/min 离心5 min,取上清液, 30°C 水浴下氮气吹干。用1.0 mL 浓度为0.1 mol/L 盐酸溶解,加入10 mL 正己烷除脂,0.22 μm 针孔滤膜过滤后取样300 μL ,添加300 μL 0.1 mol/L 盐酸和400 μL 荧光胺, 18°C 衍生30 min 后上机检测。

5) 回收率的确定。准确取1.0 mL 血浆或定量的组织样品(2 g 肌肉、1 g 肝脏或0.5 g 肾脏),分别添加标样制得0.01、0.1、1、10、50 mg/L(或mg/kg)的加标样品,每个质量浓度做4个重复。按照本文“1.2”中4)方法进行处理,测定方法的平均回收率及标准差。

6) 线性关系与检测限(LOD)和定量限(LOQ)的确定。准确取1.0 mL 血浆及定量的组织样品(2 g 肌肉、1 g 肝脏、0.5 g 肾脏)分别移至50 mL 离心管中,依次加入系列浓度的磺胺间甲氧嘧啶标准液,制得0.001、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、50 mg/L(或mg/kg)的加标样品($n=4$)。按照本文“1.2”中4)的方法处理,确定线性范围,制备工作曲线。以3倍信噪比为检测限,以10倍信噪比为定量限。

7) 数据处理及休药期的计算。使用软件 Win-Nonlin 处理检测数据;使用 Excel 绘制药时曲线图。各组织药物浓度降至规定水平所需时间采用休药期软件 WT1.4 计算。

2 结果与分析

2.1 线性关系与平均回收率、检测限及定量限

磺胺间甲氧嘧啶标准曲线制备采用外标法定量,在罗非鱼各组织中0.05~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (g)范围内线性关系良好,相关系数大于0.999,检测限及定量限满足国家残留限定检测标准。结果见表1。

表1 磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼各组织中的工作曲线、平均回收率、检测限及定量限¹⁾

Table 1 Calibration, average recovery, LOD and LOQ of SMM in tilapia

样品 Sample	标准曲线($n=4$) Calibration	线性范围 Range of linearity	相关系数(r^2) Relavent coefficient	平均回收率/% Average recovery $\bar{M} \pm \text{SD}$	检测限 LOD	定量限 LOQ
血浆 Plasma	$y=1.49\text{e}+005x-2.18\text{e}+002$	0.05~50.0 mg/mL	0.999	97.73 ± 1.71	0.02 mg/mL	0.05 mg/mL
肌肉 Muscle	$y=1.39\text{e}+005x-1.24\text{e}+003$	0.05~50.0 mg/kg	0.999	82.59 ± 0.56	0.02 mg/kg	0.05 mg/kg
肝脏 Liver	$y=2.44\text{e}+007x-8.96\text{e}+005$	0.05~50.0 mg/kg	0.999	74.42 ± 1.86	0.02 mg/kg	0.05 mg/kg
肾脏 Kidney	$y=2.03\text{e}+007x-7.53\text{e}+005$	0.05~50.0 mg/kg	0.999	42.33 ± 0.74	0.03 mg/kg	0.10 mg/kg

1) \bar{M} : 平均回收率;SD: 标准差 \bar{M} means average recovery; SD means standard deviation.

2.2 磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼体内的药-时曲线

按照 200 mg/kg 单剂量口灌给药后, SMM 广泛分布于各组织中, 肝脏和肾脏组织的药-时曲线出现双峰现象, 且第 1 个峰浓度高于第 2 个峰浓度, 而血液和肌肉组织的药时曲线未见双峰。肝脏达峰时间最早且峰浓度明显高于其他组织, 峰值之后药物浓度下降迅速, 推测 SMM 在罗非鱼肝脏中存在“首过消除”。磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼血液、肌肉、肝脏及肾脏的药-时曲线如图 1 所示。

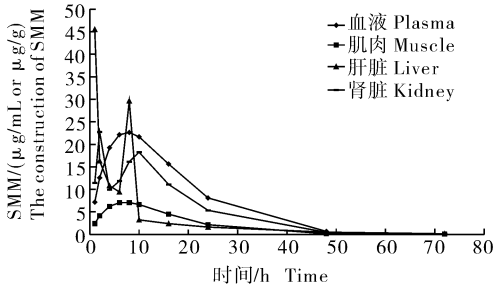


图 1 磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼血浆、肌肉、肝脏及肾脏中的药-时曲线

Fig. 1 The drug concentration-time curve of SMM in plasma, muscle, liver and kidney of tilapia

2.3 磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼体内药物代谢动力学参数

磺胺间甲氧嘧啶在肝脏和肾脏中均在 2 h 内出现第 1 个峰, 并且峰浓度大于该组织中出现的第 2 个峰浓度; 而血液和肌肉的药-时曲线未显示出双峰。SMM 在肝脏、肾脏中的第 1 次达峰时间分别为 1 h 和 2 h, 明显早于血液 ($T_{max} = 7.52$) 及肌肉组织 ($T_{max} = 7.02$); 在各组织中的最大浓度: 肝脏 > 肾脏 > 血液 > 肌肉; 在 4 种组织中的消除半衰期 $T_{1/2K_e}$ 分别为 14.12、6.80、5.21、4.84 h。可以看出, 药物在肝、肾组织中的最高浓度均高于血液和肌肉组织而消除则慢于后两者。磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼各组织中的药动学参数见表 2。

2.4 磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼肌肉中的残留消除

根据测得的各时间点 SMM 在肌肉中的残留药量, 通过休药期软件 WT1.4 计算得出理论休药期, 单次给药时为 110 h; 连续给药时为 120 h。(28 ± 2) °C 条件下, 按照 200 mg/kg 的剂量单次和连续饲喂罗非鱼, SMM 在罗非鱼肌肉组织中的消除曲线见图 2。

表 2 罗非鱼单剂量饲喂磺胺间甲氧嘧啶 (200 mg/kg) 的药代动力学参数¹⁾

Table 2 Pharmacokinetics of SMM in tilapia following single oral administration of 200 mg/kg

参数 Parameter	血浆 Plasma	肌肉 Muscle	肝脏 Liver	肾脏 Kidney
T_{max1}/h	7.52	7.02	1.00	2.00
T_{max2}/h			8.00	10.00
C_{max1}	22.66 µg/mL	7.13 µg/g	45.50 µg/g	22.77 µg/g
$C_{max2}/(µg/g)$			29.62	18.24
AUC	463.57 (µg · h)/mL	135.95 (µg · h)/g	244.24 (µg · h)/g	369.04 (µg · h)/g
V-F/(L/kg)	3.25	10.27	16.47	5.31
CL-F/(L/h)	0.43	1.47	0.81	0.54
$T_{1/2K_e}/h$	5.21	4.84	14.12	6.80

1) C_{max} : 最大浓度; T_{max} : 出峰时间; AUC: 血药浓度时间曲线下面积; V-F: 表观分布容积; CL-F: 体内总清除率; $T_{1/2K_e}$: 消除半衰期
 C_{max} : Maximum concentration, T_{max} : Peak time, AUC: Area under the curve, V-F: Apparent volume of distribution; CL-F: Total body clearance; $T_{1/2K_e}$: Elimination half-life.

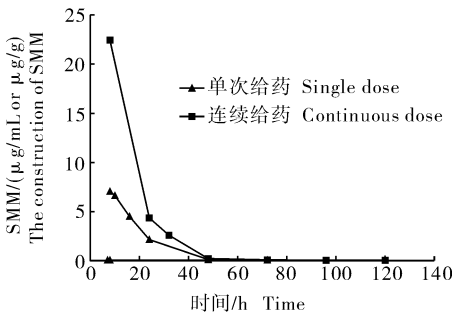


图 2 单次和连续给药后磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼肌肉中的消除曲线

Fig. 2 Elimination curve of SMM in muscle of tilapia after feeding by a single dose or continuously for five days

3 讨论

3.1 关于药物吸收的多峰现象

本研究发现, SMM 在罗非鱼肝脏和肾脏组织中出现明显的双峰现象, 并且第 1 个峰浓度高于第 2 个峰浓度。磺胺类药物的双峰现象曾有过不少研究报告, 袁科平等^[9]对磺胺甲噁唑在罗非鱼体内的药动学研究、林丽聰等^[10]对磺胺嘧啶在欧洲鳗鲡体内的药代动力学研究, 及艾晓辉等^[11]对磺胺二甲嘧啶在银鲫体内的药动学研究, 均发现有药物吸收的双峰现象; 而刘秀红等^[12]对氯霉素在牙鲈体内、李

美同等^[13]对土霉素在鳊体内、李爱华^[14]对氯霉素在草鱼和四倍体异育银鲫体内以及艾晓辉等^[15]对喹乙醇在鲤鱼体内的药动学研究中也都发现其他药物的吸收亦存在双峰现象。一般认为肠肝循环和多部位吸收是产生多峰现象最可能的机制^[16]；本研究中血浆、肌肉组织没有出现双峰现象，推测其原因可能与给药剂量有关，周怀梧^[16]曾提出，如果摄入的药量或者重吸收的药量足够大，药-时曲线便可出现多峰现象。而同样是磺胺类药物，在某些水产动物组织中亦未发现双峰现象，如艾晓辉等^[17]对磺胺甲恶唑在草鱼体内的药代学研究、张长坤等^[18]对磺胺二甲嘧啶在大菱鲆体内的药代学研究；这可能与药物的种类和动物种属差异有密切关系，此外采样点的设定和分析模型的选择对于双峰及多峰现象的出现亦有一定的影响。

3.2 药物的消除规律

磺胺类药物的消除速率与其血浆蛋白结合率关系密切，蛋白结合率高，半衰期相对长^[19]。对 SMM 的血浆蛋白结合率的研究发现，SMM 与人血浆蛋白结合率为 85%~90%^[20]，而在马、牛、猪等动物体内 SMM 血浆蛋白的结合率相对较低，分别仅为 40%、50%、45%^[8]。相应的，磺胺间甲氧嘧啶在人体内药物的半衰期为 36~48 h^[21]，为长效磺胺类药物；而在马、牛、猪体内分别为 5.7、3.1、5.1 h^[8]，则属于短效类磺胺药。本研究结果显示 SMM 在罗非鱼的血液中消除较快($T_{1/2Ke} = 5.2 \text{ h}$, 28 °C)，这与在黄尾鲮^[22]体内的消除速率接近($T_{1/2Ke} = 5.8 \text{ h}$, 21 °C)，比鳊^[23]($T_{1/2Ke} = 86.6 \text{ h}$, 27 °C)的消除要快。1997 年 Uno^[22]报道了 SMM 在黄尾鲮体内蛋白结合率很低，为(5.8±1.7)%，所以笔者推测血浆蛋白结合率低有可能是 SMM 在罗非鱼体内代谢较快的原因之一。本研究中，SMM 在罗非鱼血浆中消除较快，属于较为短效的磺胺类药物，建议应用 SMM 治疗罗非鱼全身性细菌感染疾病时，适当缩短给药间隔或提高给药剂量以维持其有效浓度。

3.3 磺胺间甲氧嘧啶在罗非鱼肌肉组织中的残留消除规律

欧盟、日本、美国及我国农业部 235 号公告对磺胺类药物在水产品中的最高残留限度的规定一致，均为 0.1 mg/kg。本试验结果显示，于(28±2) °C 条件下，以 200 mg/kg 的剂量单次给药后，SMM 在

罗非鱼肌肉中降低到 0.1 mg/kg 的理论时间约为 110 h；连续给药 5 d 后，SMM 降低到 0.1 mg/kg 的理论时间约为 120 h。这与张娟^[24]在不同条件下研究磺胺二甲氧嘧啶钠在鲮鱼体内的残留规律时的结果一致，她在(19±1) °C 条件下以 200 mg/kg 给鲮鱼单次和连续 5 d 灌喂磺胺二甲氧嘧啶钠，肌肉中休药期分别为 120 h 和 144 h。该结果显示，在多次给药情况下，药物降至残留限度的时间会较单次给药情况下延长，这可能与多次给药情况下药物在体内的蓄积有关。在本研究条件下，选取罗非鱼可食性肌肉组织作为残留监测靶组织，建议休药期不低于 5 d，同时考虑动物品种、健康状况、水温等条件对药物消除速率的影响，在不同条件下休药期应该做适度调整。

参 考 文 献

- [1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 227-231.
- [2] 杨宝峰. 药理学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 419-420.
- [3] 中华人民共和国农业部. 无公害食品 渔用药物使用准则-NY5071[S]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [4] 杨先乐. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2005: 197-198.
- [5] 吴莉萍, 吴俊伟, 宋小鸿. SMM 混悬注射液对靶动物的安全性试验研究[J]. 西南民族大学学报: 自然科学版, 2006, 32(5): 966-970.
- [6] 倪柏锋, 王勇, 吴康. 联磺注射液的急性毒性试验[J]. 浙江畜牧兽医, 2005(6): 27-28.
- [7] 伍莉, 罗永煌. 复方 SMM 缓释型注射液对大鼠的慢性毒性试验及病理组织学观察[J]. 中国兽医杂志 2007, 43(4): 63-64.
- [8] RAUWS A G. Plasma concentrations, plasma protein binding and residues of sulfamonomethoxinum in pigs, horse and cattle [J]. Vet Bull, 1976, 46(2): 143-146.
- [9] 袁科平, 艾晓辉. 磺胺甲噁唑在罗非鱼体内的药代动力学及组织浓度研究[J]. 水利渔业, 2008, 28(3): 25-27.
- [10] 林丽聪, 樊海平, 廖碧钗, 等. 磺胺嘧啶在欧洲鳊体内的药代动力学研究[J]. 检验检疫学刊, 2010(4): 14-17.
- [11] 艾晓辉, 陈正望. 磺胺二甲嘧啶在银鲫体内的药动学及组织残留研究[J]. 淡水渔业, 2001, 31(6): 52-54.
- [12] 刘秀红, 王群, 李健. 氯霉素在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律研究[J]. 集美大学学报, 2003, 8(4): 305-310.
- [13] 李美同, 郑国兴, 王蓓, 等. 土霉素在鳊组织中残留的消除规律[J]. 水产学报, 1997, 21(1): 39-43.
- [14] 李爱华. 氯霉素在草鱼和复合四倍体异育银鲫体内的比较药代动力学[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 372-374.

- [15] 艾晓辉,陈正望,张春光,等. 唑乙醇在鲤体内的药物代谢动力学及组织浓度[J]. 水生生物学报,2003,27(3):273-277.
- [16] 周怀梧. 药物吸收多峰现象的动力学研究[J]. 现代应用药学,1989,6(2):37-40.
- [17] 艾晓辉,刘长征,周运涛. 不同水温和给药方式下磺胺甲恶唑在草鱼体内的药动学研究[J]. 水生生物学报,2005,29(2):210-214.
- [18] 张长坤,王茂剑,宫向红,等. 磺胺二甲嘧啶在大菱鲆体内的药代动力学研究[J]. 海洋湖沼通报,2010(2):86-90.
- [19] 王广基. 药物代谢动力学[M]. 北京:化学工业出版社,2005:16-18.
- [20] 姜纪荣. 我国人和动物的磺胺药物血浆蛋白结合率[J]. 药学通报,1981,16(12):1-2.
- [21] 杨藻宸. 医用药理学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,1998:884-892.
- [22] UNO K. Pharmacokinetics and metabolism of sulfamonomethoxine in sainbowtrout(*Oncorhynchus mykiss*) and yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) following bolus intravascular administration[J]. Aquaculture,1997,153:1-8.
- [23] UNO R. Pharmacokinetics and bioavailability of sulfamonomethoxine in cultured eel [J]. Fish Pathology,1998,33(4):297-301.
- [24] 张娟. 磺胺二甲嘧啶钠在斑点叉尾鲷体内毒性及代谢的研究[D]. 武汉:华中农业大学图书馆,2010.

Pharmacokinetics and withdrawal period of sulfamonomethoxine in tilapia

JU Jing^{1,2} WANG Wei-li¹ JIANG Lan¹ XIAO He^{1,2} LUO Li¹ DENG Yu-ting¹ TAN Ai-ping¹

1. Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences /
Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture /

Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract The pharmacokinetics and elimination of sulfamonomethoxine (SMM) were investigated after single oral administration (200 mg/kg) in GIFT tilapia (genetically improved farmed tilapia) at (28±2) °C. The concentration of SMM in tissues of tilapia was determined by HPLC. The results showed that the C_{max} were 22.66, 7.13, 45.50 and 22.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\mu\text{g}/\text{g}$), and the T_{max} were 7.52, 7.02, 1.00/8.00 and 2.00/10 h (T_{max1}/T_{max2}) in blood, muscle, liver and kidney, respectively. The bimodal phenomenon, as shown in concentration-time curve of liver and kidney, indicated that there was non-homogeneous absorption in the gastrointestinal tract of tilapia. The $T_{1/2K_e}$ of SMM in blood, muscle, liver and kidney were 5.21, 4.84, 14.12 and 6.80 h respectively, suggesting that SMM was short-acting sulfa drug in tilapia. The elimination speed was the fastest in muscle, followed by blood, kidney and liver. According to the Announcement No. 235 of People's Republic of China, the MRL in foodstuffs of animal is 0.1 mg/kg, and the withdrawal period should not be less 5 d under this experiment condition.

Key words tilapia; sulfamonomethoxine; pharmacokinetics; withdrawal period

(责任编辑:边书京)