

土霉素在牙鲆体内的药代动力学研究

纪荣兴,刘爱原,张春丽,邹文政

(集美大学 水产学院,福建省高校水产科学技术与食品安全重点实验室,福建 厦门 361021)

摘要:采用高效液相色谱法为定性、定量手段,研究土霉素在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体内的药代动力学过程,采用 DAS(Drug and Statistics)药代动力学程序对数据进行分析。结果表明,牙鲆单剂量口服土霉素后(200 mg/kg),血药经时过程符合二室模型,主要动力学参数如下:吸收半衰期($T_{(1/2)a}$)为 10.043 h,单剂量给药后牙鲆体内出现最高质量分数的时间(T_{max})为 4.000 h,单剂量给药后牙鲆体内最高血药质量分数(C_{max})为 0.54 mg/L,药时曲线下总面积(C_{AU0-72})为 17.15 (mg·h)/L,吸收速率常数(K_a)为 0.223,消除速率常数(k)为 0.476 h⁻¹。牙鲆肌肉中土霉素的经时过程符合一级吸收一室模型,主要动力学参数: $T_{(1/2)a}$ 为 74.893 h, T_{max} 为 4.000 h, C_{max} 为 3.58 mg/L, C_{AU0-72} 为 148.56 (mg·h)/L, K_a 为 0.731, k 为 2.991 h⁻¹。牙鲆肝脏中土霉素的经时过程符合一级吸收一室模型,主要动力学参数: $T_{(1/2)a}$ 为 31.376 h, T_{max} 为 4.000 h, C_{max} 为 13.78 mg/L, C_{AU0-72} 为 494.14 (mg·h)/L, K_a 为 0.876, k 为 4.940 h⁻¹。

关键词: 土霉素;牙鲆(*Paralichthys olivaceus*);药代动力学;高效液相色谱(HPLC)

中图分类号:S948

文献标识码:A

文章编号:1000-3096(2008)07-0037-04

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)肉质细嫩,味道鲜美,且高蛋白、低脂肪、含有多种维生素,因而深受广大消费者的欢迎。随着牙鲆养殖业的发展,牙鲆的疾病时有发生,细菌性疾病是牙鲆常见的主要疾病之一。土霉素(oxytetracycline)能够预防和治疗多种细菌性鱼病,且对鱼类毒性低,作为抗菌素疗效较为理想,价格也较便宜,养殖生产上很实用。但是土霉素容易产生耐药菌株及在食物中残留^[1],因此,许多国家对其实施监控。

本研究采用高效液相色谱法(HPLC),对养殖生产中常用的土霉素在牙鲆体内的药物代谢过程进行研究,以期掌握其药代学规律。研究结果将为合理用药提供科学依据,以利于指导生产用药,防止滥用药物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康牙鲆,平均体质量 25 g ± 1.5 g,购入后经检测表明牙鲆组织中无土霉素残留。试验前暂养于洁净、充气的水池内,水温为 25 ± 1。

土霉素原粉,纯度 97%。

1.2 试验仪器

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,包括真空脱气

机、四元梯度泵、自动进样器、二极管阵列检测器、ChemStation LC 3D A.09.03 化学工作站、Hypersil ODS 色谱柱(4.0 mm × 250 mm, 5 μm)、ODS-C₁₈ 小柱(Agilent Technologies)。

1.3 给药与采样

给药:试验前做好给药、解剖取样时间进程表。首先将牙鲆随机分为 11 组,每组 10 尾,分别编号、称质量记录。其中第 1 组为空白对照,第 2~11 组用注射器按每千克鱼体质量口服 200 mg 的剂量灌喂后,将牙鲆放回水中,记录给药时间,第 2~11 组分别在给药后 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72 h 解剖取样。

采样:快速斩断牙鲆尾部放血,用注射器收集血样于 5 mL 离心管中,同时取肌肉和肝脏样品,作冷冻处理。血样静置,分离出血清后置 4℃ 冰箱备用。

1.4 样品的处理

将样品解冻,准确称取肌肉 5.00 g 或肝脏 2.00 g,

收稿日期:2007-05-21;修回日期:2007-05-08

基金项目:福建省科学基金项目(B0440002)

作者简介:纪荣兴(1953-),男,福建厦门人,副教授,研究方向:水产动物病害防治研究,E-mail:rxji@jmu.edu.cn

匀质,置于 100 mL 具塞三角瓶中,加入 5% 的高氯酸溶液 20 mL,在旋涡混合器上混合 1 min,于超声波振荡机上振摇 20 min,以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于储液瓶中,再用 5% 的高氯酸溶液 10 mL 重复提取一次,提取液一并加入到贮液瓶中^[2]。

浓缩净化:用移液枪取贮液瓶中样液或 1.5 mL 血清,慢慢滴入 C₁₈ 小柱的储液管中,将其用试管架起,等待样液缓慢通过 C₁₈ 小柱,待样液全部过滤后,用 3 mL 双蒸水洗柱,弃去全部流出液。再用 3 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液于注射瓶中。将收集于注射瓶中的洗脱液用氮气吹干,加 0.01 mol/L 的盐酸 1 mL 于注射瓶中,用 0.45 μm 的滤膜过滤到高效液相色谱仪的样品瓶中,进行液相色谱测定^[3],用外标法-峰面积定量分析。

1.5 样品的测定

样品中的土霉素采用高效液相色谱法测定。

色谱条件:流动相:乙腈-0.01 mol/L 磷酸二氢钠(pH2.6)(体积比为 26 : 74);流速:0.8 mL/min;柱温:37 °C;进样量:30 μL;检测波长 355 nm,带宽 10 nm;参考波长,360 nm,带宽 100 nm。

定量方法:采用外标法,化学工作站自动计算峰面积,并求出样品中土霉素的浓度。

定性方法:用保留时间对样品中的土霉素定性。

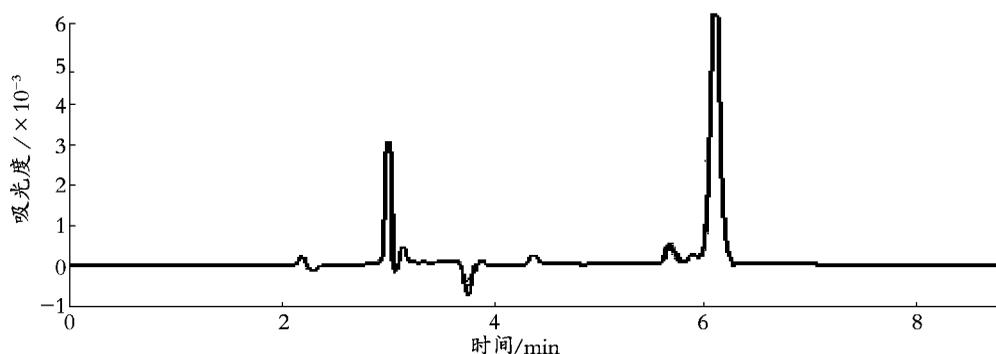


图 1 样品中土霉素的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms for oxytetracycline in pre-treated sample

2.2 精密度和回收率

由土霉素标准溶液的保留时间和峰面积的变异系数可以看出:在选择色谱条件下,标准溶液的保留时间和峰面积具有良好的重复性,见表 1 和表 2,

1.6 精密度与回收率

配制不同浓度水平的土霉素标准溶液,用于测定精密度^[4]。做不同次数差异测定:于 1 d 内分别进行 4 次重复进样测定;测出各浓度对保留时间和峰面积的相对标准偏差来测定方法的精密度。

1.7 数据处理和计算方法

采用 DAS 药代动力学程序,将试验结果在计算机上进行处理和统计分析,确定药物代谢动力学参数。

2 试验结果

2.1 土霉素的色谱行为

按照不同的比例配制流动相,比较标准溶液的测定结果。结果表明,乙腈与 0.01 mol/L 磷酸二氢钠(pH2.6)体积比为 26 : 74 时,土霉素能与杂质峰完全分开,基线较平稳,峰型较对称(图 1)。而 0.1 mol/L 和 0.01 mol/L 的磷酸二氢钠比较,面积响应值相差不多,但前者与溶剂峰距离较接近,易产生信号干扰,故本研究选择后者。在检测过程中,比较其他波长:210,260,285,370 nm 等。355 nm 时其它物质吸收干扰小,基线较平直,在所选色谱条件下,355 nm 为最佳。

尤其是保留时间变化差异相当小,如图 2。

在空白样品中分别加入质量浓度为 200 mg/L 的土霉素标准液 100 μL 和 50 μL,在加标准液 50 μL 的样品中加 50 μL 0.01 mol/L 的盐酸,减少杂质峰

影响,样品按上述方法处理,测定浓度,与所加标准液 100%回收浓度相比,测得回收率分别为 65.1%, 60.3%。

表 1 不同浓度的土霉素标准溶液保留时间的相对标准偏差

Tab. 1 Relative standard deviation of retention time for oxytetracycline at different dosages

质量浓度 (mg/L)	4 数进样的保留时间 (min)				相对标准偏差 (%)
0.5	6.353	6.376	6.20	6.20	1.52
1.0	6.364	6.350	6.236	6.236	1.11
2.0	6.354	6.357	6.218	6.218	1.26
3.0	6.351	6.359	6.218	6.218	1.26
4.0	6.359	6.353	6.225	6.225	1.20
5.0	6.355	6.352	6.227	6.227	1.16
10.0	6.339	6.340	6.218	6.218	1.11
20.0	6.320	6.321	6.202	6.202	1.09
30.0	6.312	6.311	6.196	6.196	1.06
40.0	6.301	6.302	6.188	6.188	1.05

表 2 不同浓度的土霉素标准溶液峰面积的相对标准偏差

Tab. 2 Relative standard deviation of area under the curve for oxytetracycline at different dosages

质量浓度 (mg/L)	4 数进样的峰面积值 (mA · s)					相对标准偏差 (%)
0.5	1.5	1.6	1.6	1.7	5.10	
1.0	3.1	3.5	3.9	3.7	9.62	
2.0	7.5	7.4	7.2	8.0	4.52	
3.0	11.6	11.7	11.8	11.6	0.82	
4.0	13.3	13.0	14.7	15.4	8.08	
5.0	18.8	19.0	19.8	19.2	2.25	
10.0	38.5	38.3	40.2	38.5	2.28	
20.0	89.6	89.4	86.9	91.5	2.11	
30.0	118.2	116.9	125.1	125.4	3.69	
40.0	153.7	152.9	165.0	165.8	4.39	

2.3 线性关系及检测限

土霉素的质量浓度在 0.5 ~ 40.0 mg/L,具有良好的线性关系,相关系数为 0.999 83,标准曲线回归方程为 $A = 3.676\ 322\ 2C - 0.369\ 089\ 7$, A 为峰面积, C 为质量浓度。该方法的最低检出限为 0.5 mg/L。

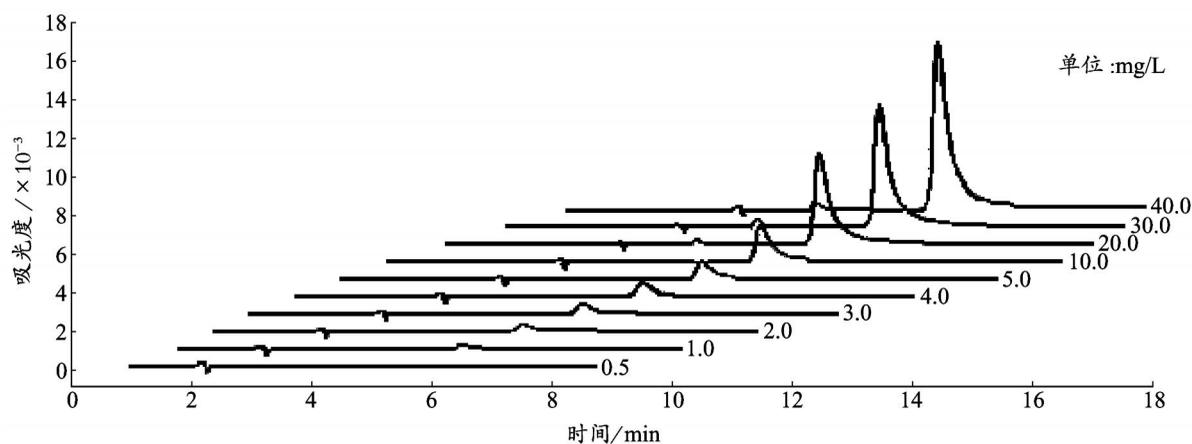


图 2 不同质量浓度土霉素保留时间色谱对比

Fig. 2 HPLC chromatograms for oxytetracycline at different dosages

2.4 土霉素在牙鲈体内的药动学

数据经 DAS 药代动力学程序处理,血液、肌肉、肝脏中药物的实测值见表 3;药代动力学各参数见表 4。

在样品预处理过程中,发现血液和肌肉的 0.5, 36 h 样品及肝脏 24 h 样品发生变质,处理后样液颜色仍与其它样液有较大差别,为避免损伤高效液相色谱仪,该时点样品未进行测定。

表 3 牙鲆口服土霉素后不同时间血液、肌肉、肝脏中土霉素的质量浓度

Tab.3 Concentrations of oxytetracycline in the blood, muscle and liver of *Paralichthys olivaceus* after oral administration

时间 (h)	质量浓度 (mg/L)		
	血液	肌肉	肝脏
0.5	-	-	10.52
1.0	0.48	1.79	11.91
2.0	0.50	1.81	11.77
4.0	0.54	3.58	13.78
8.0	0.51	2.85	10.52
16.0	0.45	2.30	10.19
24.0	0.31	2.28	-
36.0	-	-	6.63
48.0	0.20	1.98	4.56
72.0	0.19	2.77	2.03

表 4 土霉素在牙鲆体内的药代动力学参数

Tab.4 Pharmacokinetics parameters of oxytetracycline in *Paralichthys olivaceus*

实验部位	$T_{(1/2)\alpha}$ (h)	T_{max} (h)	C_{max} (mg/L)	C_{AU0-72} (mg·h)/L	K_a	k (h^{-1})
血液	10.043	4.000	0.54	17.145	0.223	0.476
肌肉	74.893	4.000	3.58	148.562	0.731	2.991
肝脏	31.376	4.000	13.78	494.136	0.876	4.940

3 讨论

3.1 牙鲆单剂量口服土霉素的药代动力学特征

本实验数据经 DAS 药代动力学程序分析,表明牙鲆口服土霉素后,血药经时过程符合二室模型。

土霉素在牙鲆体内的吸收较慢,给药后 1 h 血药质量浓度达到 0.48 mg/L,4 h 血药质量浓度达到峰值 0.54 mg/L,而直到 16 h 时,测得质量浓度为 0.45 mg/L,吸收半衰期为 10.043 h,说明血液中药浓度较高时维持时间长。这一点与四环素类药物的特性相吻合。

3.2 不同给药方式对药动学的影响

水产上常用的给药方式有口服、注射、药浴等,口服给药的方法最常用。但是,由于年龄、健康状况等方面的个体差异,以及环境的影响,水产动物对药饵的采食量无法进行准确定量,因而无法精密的确定给药剂量。本实验用注射器(无针头)直接将药物灌入胃中,鱼无回吐现象,保证了鱼摄入准确的药量,避免了因采食差异对药动学研究造成的影响。

不同的给药方式,药物在鱼体内的药代动力学规律有很大的差异。张雅斌^[5]等研究了不同给药方式下鲤鱼对诺氟沙星的药代动力学,结果表明:口服药物吸收程度最好,生物利用度较大;混饲灌服的生物利用度最小。因而土霉素以不同给药方式在牙鲆体内的药物代谢动力学规律有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 刘晴. 资料水生动物疫病防治工作迫在眉睫[J]. 中国水产, 2000, 8: 8-9.
- [2] GB/T 5009.116-2003, 畜、禽肉中土霉素、四环素、金霉素残留量的测定(高效液相色谱法)[S].
- [3] 陈毓芳. 肌肉组织中四环素类抗生素的固相萃取-液相色谱测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(3): 97-99.
- [4] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 49-74, 365-383.
- [5] 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, 24(6): 559-563.

(下转第 45 页)

Studies on pharmacokinetics of oxytetracycline in *Paralichthys olivaceus* in vitro

JI Rong-xing , LIU Ai-yuan , ZHANG Chun-li , ZOU Wen-zheng

(Fisheries College of Jimei University , Key Laboratory of Science and Technology for Aquaculture and Food Safety , Fujian , Xiamen 361021 , China)

Received : May , 21 , 2007

Key words : oxytetracycline ; *Paralichthys olivaceus* ; pharmacokinetics ; high performance liquid chromatography (HPLC)

Abstract : The pharmacokinetic of oxytetracycline in healthy *Paralichthys olivaceus* was studied by using the high performance liquid chromatography. Data were analyzed with the pharmacokinetic computer program DAS. The results showed that the plasma concentration time course of oxytetracycline can be described by a one-compartment open model with the first order absorption after oral administration (200 mg/kg). The main pharmacokinetic parameters were as follows: distribution half-life ($T_{(1/2)a}$) was 10.043 h, time to peak (T_{max}) was 4.000 h, peak concentration (C_{max}) was 0.54 mg/L, area under the concentration-time curve from 0 to 72h (C_{AU0-72}) was 17.15 (mg h/L), rate constant for distribution (K_a) was 0.223, and rate constant for elimination (k) was 0.476 h⁻¹. The kinetics process of oxytetracycline in muscle can be described by a one-compartment model with the first order absorption. Its theoretical equations were as follows: $T_{(1/2)a}$ was 74.893 h, T_{max} was 4.000 h, C_{max} was 3.58 mg/L, C_{AU0-72} was 148.56 (mg h/L), K_a was 0.731, k was 2.991 h⁻¹. The kinetics process of oxytetracycline in liver was found to be a one-compartment with the first order absorption. Its theoretical equations were as follows: $T_{(1/2)a}$ was 31.376 h, T_{max} was 4.000 h, C_{max} was 13.78 mg/L, C_{AU0-72} was 494.136 (mg h/L), K_a was 0.876, and k was 4.940 h⁻¹.

(本文编辑:刘珊珊)