

文章编号:1000-0615(2006)04-0515-05

## 肌注和口服氟苯尼考在中华鳖体内残留分析及药代动力学

朱丽敏<sup>1</sup>, 杨先乐<sup>2</sup>, 林启存<sup>1</sup>, 蔡丽娟<sup>1</sup>, 许宝青<sup>1</sup>, 张惠宏<sup>1</sup>

(1. 杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024; 2. 上海水产大学生物科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要** 研究不同给药条件下, 氟苯尼考在中华鳖体内的残留及药代动力学特征。健康中华鳖 160 只, 随机分为 2 组, 按  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量分别单次肌注或口服氟苯尼考, 高效液相色谱法测定中华鳖血浆和肌肉药物残留浓度, 利用 3P87 药代动力学软件分析数据。肌注和口服时均符合一室开放模型, 肌注给药的药代动力学方程  $C = 16.72(e^{-0.15t} - e^{-0.52t})$ , 主要药代动力学参数:  $AUC = 76.45 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 吸收半衰期 ( $T_{1/2Ka}$ ) = 1.31 h, 半衰期 ( $T_{1/2Ke}$ ) = 4.48 h, 最高血药浓度  $C_{\max} = 7.09 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 口服给药的药代动力学方程为  $C = 39.99(e^{-0.19t} - e^{-0.4t})$ , 主要药代动力学参数:  $AUC = 109.42 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 吸收半衰期 ( $T_{1/2Ka}$ ) = 1.73 h, 半衰期 ( $T_{1/2Ke}$ ) = 3.63 h, 最高血药浓度  $C_{\max} = 10.64 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验结果表明, 氟苯尼考口服情况下, 在中华鳖体内吸收快, 血药浓度高, 维持时间长, 生物利用度高, 药物在肌肉中消除缓慢。

**关键词** 氟苯尼考; 中华鳖; 药代动力学; 残留分析; 高效液相色谱法

中图分类号 S 948 文献标识码 A

## The residues and pharmacokinetics of florphenicol in *Trionyx sinensis* following intramuscular injection and oral administration

ZHU Li-min<sup>1</sup>, YANG Xian-le<sup>2</sup>, LIN Qi-cun<sup>1</sup>, CAI Li-juan<sup>1</sup>, XU Bao-qing<sup>1</sup>, ZHANG Hui-hong<sup>1</sup>

(1. Hangzhou Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310024, China;

2. Collge of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

**Abstracts:** To study the residues and pharmacokinetics of florphenicol in *Trionyx sinensis* with different treatments, one hundred and sixty healthy *T. sinensis* were selected and followed by a single dose of florphenicol ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) with intramuscular injection and oral administration respectively. Serial serum samples were obtained and assayed by reversed-phase HPLC, and the corresponding pharmacokinetic parameters were calculated with 3p87. A one-compartment open model best fits the data. The major pharmacokinetic parameters were as follows:  $AUC = 76.45 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $T_{1/2ka} = 1.31 \text{ h}$ ,  $T_{1/2ke} = 4.48 \text{ h}$ , and  $C_{\max} = 7.09 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in intramuscular injection group; while  $AUC = 109.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,  $T_{1/2ka} = 1.73 \text{ h}$ ,  $T_{1/2ke} = 3.63 \text{ h}$ , and  $C_{\max} = 10.64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  in oral administration one. It suggested that the assimilation of florphenicol was faster, the level of residue concentration was higher, the maintain time was longer, and the bioavailability was higher in oral administration group as compared to intramuscular injection. Florphenicol residue eliminated slowly in musculature.

**Key words:** florphenicol; *Trionyx Sinensis*; pharmacokinetics; residues; HPLC

氟苯尼考 (florphenicol) 是一种合成的新型专用兽药, 为氯霉素和甲砒霉素的替代产品, 具有较高的抗菌活性, 抑制细菌蛋白质合成, 适用于由链

球菌、巴氏杆菌、弧菌及其它革兰氏阴性菌引起的鱼病, 该药使用后不产生再生障碍性贫血, 在水产动物疾病防治上有着广阔的应用前景。本研究旨

收稿日期 2005-10-28

资助项目 杭州市财政专项资助项目(2003164)

作者简介 朱丽敏 (1963 - ), 女, 浙江遂昌人, 高级工程师, 主要从事水生生物病害防治研究。Tel: 0571 - 87310844, E-mail: zhulimin

@mail.hz.zj.cn

在探讨氟苯尼考在中华鳖体内的药代动力学特征和药物残留消除规律,为指导临床科学合理用药提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

氟苯尼考原料药(含量 99%,浙江海翔医药化工有限公司),氟苯尼考标准品(99.76%, Schering-Plough 公司);氯霉素标准品(99.9%, Sigma 公司);乙腈(色谱纯, Sigma 公司);乙酸乙酯(分析纯,上海五联化工厂公司);正己烷(色谱纯,上海化学试剂研究所)。

### 1.2 实验仪器

Varian 高效液相色谱仪, Prostar330 二极管阵列紫外检测器, 色谱工作条件: 紫外检测波长 223 nm, 流动相乙腈-水(27/135:73/365, v/v), 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 反相色谱柱 ODS-C18(5 μm) 4.6 mm × 250 mm 进样量为 20 μL。氮吹仪 N-EVAPTM112, 0.45 μm 微孔滤膜等。

### 1.3 实验动物

中华鳖(*Trionyx sinensis*)采用水族箱模拟生态控温培育, 水族箱外围挂黑布, 箱内挂网片, 实验期间充气增氧, 水温控制在(30 ± 1) °C。中华鳖由平均规格每只(4.5 ± 0.5) g 培养到每只(100 ± 10) g 后进入正式实验。

### 1.4 给药方法和样品采集

取实验条件下饲养的健康中华鳖 160 只, 体重(100 ± 10) g, 随机分组, 每组 80 只, 分养于 2 只缸, 以 30 mg·kg<sup>-1</sup> 剂量分别一次性肌注、口灌给药, 分别给药后在 5、15、30、60、120、240、360、480、600、1440 min 各点采集血液、肌肉, 每一时间点采集 4 只鳖, 断头取血 5~6 mL, 置于含肝素的离心管, 以 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 吸取上层血浆于塑料离心管中, 备用; 采集的组织样置于密封塑料袋, 于 -20 °C 冰箱保存。

### 1.5 样品前处理

血浆样品: 取 2.00 mL 血浆于 10 mL 离心管中, 加入 4.00 μg 氯霉素(100 μg·mL<sup>-1</sup>) 作为内标, 加 2 mL 磷酸缓冲液后振荡 5 min, 再加入 8 mL 乙酸乙酯振荡 25 min, 静置 10 min 后吸取上层乙酸乙酯层于干净离心管中, 同法重复提取一次, 合并提取液, 氮气吹干。加 2 mL 流动相, 涡合混匀。吸取 5 mL 溶解物于离心管 3 000 r·min 离

心 15 min, 吸取上清液经过滤后待上机。

肌肉样品: 称取 5.00 g 肌肉等样品于 50 mL 离心管中, 加入 4.00 μg 氯霉素(100 μg·mL<sup>-1</sup>) 作为内标, 并加 5 mL PBS(pH = 7.0) 振荡 5 min, 加入 20 mL 乙酸乙酯振荡 30 min(1 800 r·min<sup>-1</sup>) 离心 10 min, 吸上层于离心管, 重复提取一次合并提取液, 氮气吹干, 加入 2 mL 正己烷和 3 mL 流动相振荡溶解后, 离心弃去正己烷, 重复 3 次, 留下层液体过滤小瓶中待上机测定。

### 1.6 标准曲线的制备

氟苯尼考精制原药用流动相溶解配制成 100 μg·mL<sup>-1</sup> 标准储备液, 临用前用流动相稀释成 2.5 μg·mL<sup>-1</sup>。称取 6 份空白样品(肌肉或血浆) 分别加入 2.5 μg·mL<sup>-1</sup> 标准溶液 100 μg, 400 μL, 800 μL, 2 mL, 4 mL 和 4 μg 氯霉素内标物。然后按照“1.5”方法进行提取和测定。

### 1.7 回收率的测定

采用加标回收法。取氟苯尼考标准储备液 1、5、20 μL, 分别加入到 3 个不同体积的血浆、肌肉混匀后按样品前处理方法处理样品, HPLC 测定氟苯尼考浓度, 每个浓度重复 3 次。根据氟苯尼考标准曲线计算出组织样氟苯尼考实测浓度。

回收率(%) = 实际测定浓度/理论浓度值 × 100。

### 1.8 精密度测定

日内精密度: 在同日内的试验初、中、末, 分别取氟苯尼考标准储备液 5 μL, 加入中体积的组织中混匀后按 1.5 处理, 进样测定其血药和肌肉药物浓度, 每次重复 3 次, 记录氟苯尼考峰面积, 计算日内相对标准偏差(RSD)。日间精密度: 一周内重复测定 2 次, 每次重复 3 次, 计算日间相对标准偏差(RSD)。

### 1.9 数据处理

药代动力学模型拟合采用 3P87 软件处理数据, 采用 Marquardt 法对一、二、三房室分别以权重 1、1/C、1/C<sup>2</sup> 3 种情况进行拟合, 根据 WSS 和 AIC 值来判断最适合的药代动力学模型。

## 2 结果

### 2.1 氟苯尼考的色谱行为特征

氟苯尼考和氯霉素的色谱峰尖锐且对称, 血浆和肌肉中的杂质与药物和内标分离良好(图 1)。

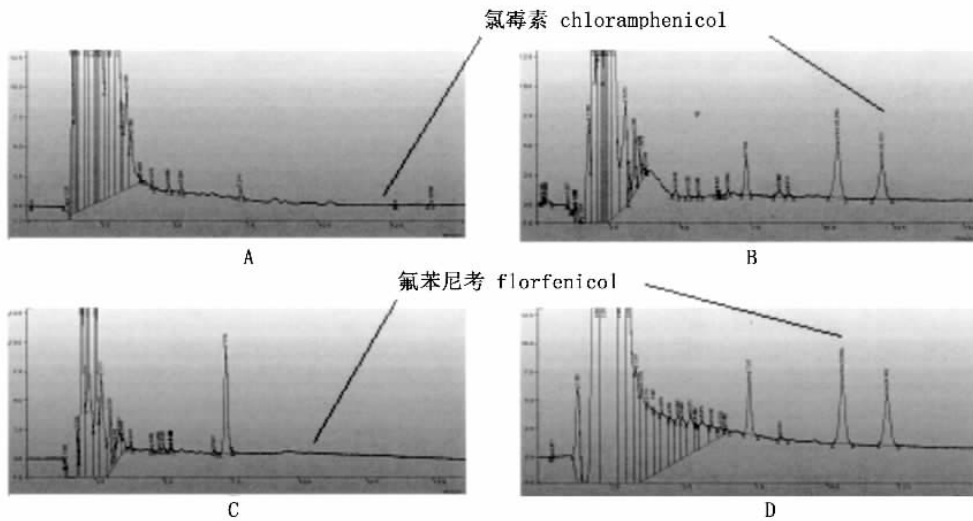


图 1 氟苯尼考色谱图

Fig.1 Chromatograms of florfenicol

A : 空白血浆色谱图 ; B : 血浆加氟苯尼考标准品色谱图 ; C : 空白肌肉色谱图 ; D : 肌肉加氟苯尼考标准品色谱图。

A : chromatogram of plasma control ; B : chromatogram of plasma treated with standard florfenicol ; C : chromatogram of musculature control ; D : chromatogram of musculature treated with florfenicol

### 2.2 氟苯尼考标准曲线和灵敏度

以测得氟苯尼考平均峰面积与氯霉素平均峰面积之比为纵坐标,对相应质量浓度作线性回归,并制作标准曲线(图2),得回归方程  $y = 0.78981x - 0.01513$ ,在  $0.25 \sim 15 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内具有很好的相关性 ( $P < 0.01$ ),按信噪比  $S/N = 3$  计算,最低检测浓度为  $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

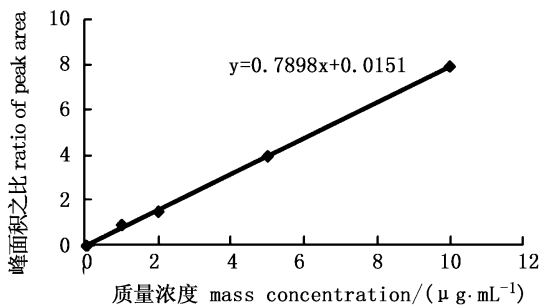


图 2 氟苯尼考标准曲线

Fig.2 Relationship between the ratio of the peak area of florfenicol to that of chloramphenicol and the concentration

### 2.3 回收率和精密度

本实验条件下氟苯尼考标准溶液在低、中、高 3 个浓度下平均回收率为  $89.9\% \pm 1.2\%$ ,测得日

内相对标准差 (RSD) 为  $2.51\% \pm 0.89\%$ ; 日间相对标准差为  $3.36\% \pm 0.91\%$ 。

### 2.4 一次性肌注和口服给药后氟苯尼考药代动力学特征

中华鳖肌注和口服氟苯尼考后,不同时间的血浆样品经色谱仪检测所得药物平均浓度及中华鳖口服氟苯尼考药后不同时间段肌肉内残留量见表 1,肌注氟苯尼考药时曲线见图 3,口服氟苯尼考药时曲线见图 4,用 3P87 软件处理药时数据所得药物动力学参数列于表 2。

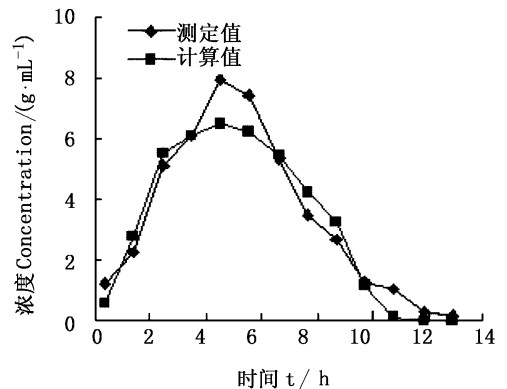


图 3 肌注氟苯尼考 ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 药时曲线

Fig.3 Concentration-time curve of florfenicol after intramuscular injection

表1 一次性肌注和口服给药后氟苯尼考药物浓度

Tab.1 Residue level of florphenicol in different tissues following a single dose of intramuscular injection and oral administration

时间(h) time	肌注 intramuscular injection		口服( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) oral administration	
	血浆( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) plasma		血浆 plasma	肌肉 muscle
0.083	1.23 ± 0.64		0.98 ± 0.71	1.30 ± 1.02
0.5	2.30 ± 1.06		3.75 ± 1.28	4.84 ± 1.79
1.5	5.16 ± 1.10		6.08 ± 1.60	7.89 ± 2.43
2	6.11 ± 0.11		8.75 ± 1.81	9.54 ± 2.67
3	8.02 ± 1.47		11.62 ± 2.45	13.04 ± 3.58
4	7.46 ± 0.32		12.91 ± 3.36	14.53 ± 3.94
6	5.35 ± 0.31		10.56 ± 2.35	11.52 ± 2.87
9	3.52 ± 1.05		7.29 ± 1.02	7.38 ± 2.39
12	2.71 ± 0.52		2.26 ± 0.34	5.39 ± 2.18
24	1.28 ± 0.37		1.03 ± 0.43	1.22 ± 1.05
48	1.05 ± 0.29		0.89 ± 0.23	1.01 ± 0.81
72	0.27 ± 0.20		0.098 ± 0.21	0.13 ± 0.12
96	0.17 ± 0.12		ND	0.1 ± 0.15
192	ND		ND	0.09 ± 0.04
264	ND		ND	0.07 ± 0.02

注 ND 未检出

Notes :ND means not detected

表2 一次性肌注和口服氟苯尼考后药代动力学参数

Tab.2 Pharmacokinetic parameters of florphenicol following a single dose of oral administration and intramuscular injection

参数 parameters	单位 unit	肌注 intramuscular injection		口服( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) oral administration	
		血浆( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) plasma		血浆 plasma	肌肉 muscle
A	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	16.72		39.99	27.81
Ke	$\text{h}^{-1}$	0.154		0.19	0.13
Ka	$\text{h}^{-1}$	0.52		0.4	0.47
$T_{1/2(Ka)}$	h	1.31		1.73	1.46
$T_{1/2(Ke)}$	h	4.48		3.63	5.28
$T(\text{peak})$	h	3.29		3.54	3.74
$C_{\text{max}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	7.09		10.63	12.33
AUC	$(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})\cdot\text{h}^{-1}$	76.45		109.42	153.41
Cl(s)	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.32		0.27	0.19
MRT	h	24.61		29.01	128.17

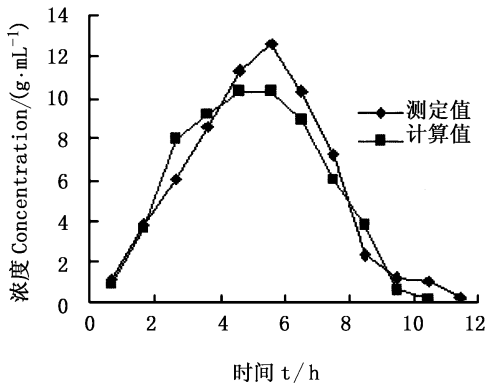
图4 口服氟苯尼考( $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )药时曲线

Fig4 Concentration-time curve of florphenicol after oral administration

### 3 讨论

#### 3.1 氟苯尼考在中华鳖体内的代谢特征

中华鳖在肌注和口服  $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  氟苯尼考药物后,药时数据均符合一级吸收-室开放模型,动力学方程分别为  $C = 16.72(e^{-0.15t} - e^{0.52t})$  和  $C = 39.99(e^{-0.19t} - e^{0.4t})$ ,两种给药方式其吸收半衰期( $T_{1/2Ka}$ )分别为 1.31 h 与 1.73 h,消除半衰期( $T_{1/2Ke}$ )分别为 4.48 h 与 3.63 h,二者差异似乎不明显,但最高血药浓度( $C_{\text{max}}$ )差异显著,分别为 7.09 与  $10.64\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,血药浓度时间曲线下面积(AUC)分别为 76.45 与  $109.42\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ,说明口服吸收较肌注吸收完全,AUC 值大,表示血浆组织内药物含量多;口服药物平均滞留时间

MRT 为 29.01 h 维持血药浓度时间也较长,上述结果提示理论上中华鳖的疾病防治口服氟苯尼考将优于肌肉注射。

口服试验中,氟苯尼考在中华鳖体内的消除半衰期( $T_{1/2Ke}$ )为 3.63 h,与大西洋鲑( $T_{1/2Ke}$ )的 12.2~14.7 h<sup>[1,2]</sup>和中国对虾( $T_{1/2Ke}$ )的 9.07 h<sup>[3]</sup>相比,氟苯尼考药物在中华鳖体内的消除速度较快,其差异可能来自于以下几方面(1)与水生动物种属差异有关<sup>[4,5]</sup>,分类地位高其降解排泄的途径多消除快<sup>[3]</sup>(2)与养殖水温有关,水生动物在适温范围内水温增高,体内各类酶活性增强、代谢加快。

### 3.2 氟苯尼考给药方案与安全性探讨

确定给药方案时重点考虑血药浓度和药物最小抑菌浓度(MIC)。氟苯尼考抗菌活性高抗菌谱广,对多数病原菌显示高度敏感,据郭闯<sup>[6]</sup>等报道 14 株患病水生动物气单胞菌属细菌对氟苯尼考高度敏感,廖昌容等<sup>[7]</sup>对 6 种海洋致病弧菌进行体外抗菌试验,得到氟苯尼考对溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、哈氏弧菌(*V. harveyi*)的 MIC 值为  $2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,对漂浮弧菌(*V. natriigen*)、沙蚕弧菌(*V. nereis*)、鲨鱼弧菌(*V. carchariae*)的 MIC 为  $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,国外报道<sup>[8]</sup>氟苯尼考对鳗弧菌的 MIC 为 0.2~0.8  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据一次性口服给药试验,检测结果显示 48h 内血药浓度保持在  $(0.89 \pm 0.23) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,能有效地杀灭病原菌,48 h 后,迅速降至  $(0.098 \pm 0.21) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,建议口服药剂量为 30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,给药的间隔期不应超过 2d,与实际应用相符。国内对氟苯尼考的药效和安全性研究尚未见相关报道。制定渔药休药期是为了保障动物食品的安全性,通常根据国家规定的最大残留限量(MRL)标准和动物对药物的残留消除规律来确定。欧盟规定鱼类肌肉中氟苯尼考最大残留限量(MRL)为  $1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[9]</sup>,而加拿大规定 MRL 0.8  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[10]</sup>,我国尚未对水产动物食品中氟苯尼

考制定最大残留限量标准,本试验中华鳖口服给药后肌肉中药物浓度经 3.74 h 达高峰,72 h 后肌肉内实测药物浓度已达欧盟残留限量  $1 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,若以此为标准,按本试验数据推算,中华鳖口服氟苯尼考的休药期为  $\geq 3 \text{d}$ ,鉴于中华鳖为变温动物,其代谢速率与水温有关,建议休药期以温度时间为标准单位,中华鳖口服氟苯尼考的休药期不低于  $90 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

### 参考文献:

- [1] Martinsen B, Horsberg T E, Varma K J, et al. Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon in seawater at 11 $^\circ\text{C}$ [J]. Aquaculture, 1993, 112: 1-11.
- [2] Horsberg T E, Hoff K A, Nordmo R. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic salmon [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1996, 8: 292-301.
- [3] 李静云,王群,李健,等.氟苯尼考在中国对虾组织内药物代谢动力学及残留消除规律[J].水产学报,2004,28(12):63-68.
- [4] Uno K, Aoki T, Ueno R. Pharmacokinetic study of oxytetracycline in cultured rainbow trout amago salmon and yellowtail[J]. Bull Jap Soc Sci Fish, 1992, 58(6):1151-1156.
- [5] 湛嘉,李佐卿,康继韬,等.影响水产动物药代动力学的因素[J].中国兽药杂志,2003,37(12):38-41.
- [6] 郭闯,朱国强,王永坤,等.14 株患病水生动物气单胞菌属细菌的分离鉴定与最佳治疗药物筛选试验[J].水产科学,2003,22(4):14-17.
- [7] 廖昌容,徐力文,陈毕生.氟苯尼考对六种海洋致病弧菌的体外抗菌活性研究[J].水产养殖,2005,26(4):1-4.
- [8] Samuelsen O B, Bergh O, Ervik A. Pharmacokinetics of florfenicol in cod *Gadus morhua* and *in vitro* antibacterial activity against *Vibrio anguillarum*[J]. Dis Aquat Organ 2003, 56: 127-133.
- [9] EMEA-E U. Committee for veterinary medicinal products: Florfenicol (extension to all food producing species), summary report(6)[Z]. London, UK. <http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/082202en.pdf>. January 2002.
- [10] HealthCanada. Maximum Residue Limits(MRLs) set by Canada [Z]. <http://www.hc-sc.gc.ca/vetdrugs-medsvet/mrl-e.html>. 2004.