

不同水温条件下恩诺沙星及其代谢物在俄罗斯鲟体内的代谢及消除规律

罗晶晶¹, 张秀珍¹, 宋 恂², 姜向阳¹, 来长青³, 刘传忠³, 孙玉增¹, 刘慧慧^{1*}

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 烟台 264006;
2. 中国水产科学研究院, 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141;
3. 泗水县虹鳟鱼良种场, 泗水 273206)

摘 要: **目的** 探究 12~15 °C 低水温及 18~21 °C 高水温条件下, 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的代谢及消除规律。**方法** 以 60 mg/(kg·bw) 剂量连续 5 d 对体重为 (750±50) g 的健康俄罗斯鲟灌服恩诺沙星, 并于停药后 1~140 d 内连续采集血浆、肌肉、肝脏、肾脏、皮肤及鳃样品, 经高效液相色谱-串联质谱法测定其中恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星含量, 研究连续 5 d 给药后恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在俄罗斯鲟体内的代谢及消除规律, 得出不同温度条件下的休药期。**结果** 在 2 种水温条件下, 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内各组织中的达峰时间 t_{max} 均为 1 d; 夏季达峰浓度 C_{max} 小于冬季 C_{max} ; 药浓度-时间曲线下总面积 AUC 随温度升高而增大; 药物自体内消除的清除率 $Cl_{z/f}$ 及消除半衰期 $T_{1/2z}$ 数据均表明, 随温度升高药物清除速度加快。恩诺沙星在俄罗斯鲟体内代谢产物为环丙沙星, 其消除趋势与恩诺沙星大致相同。**结论** 以皮肤和肌肉作为可食性组织, 以恩诺沙星和环丙沙星总量降至 0.1 mg/kg 为标准, 连续 5 d 以 60 mg/(kg·bw) 对俄罗斯鲟口灌恩诺沙星后, 建议冬季低温条件下休药期为 124.2 d, 夏季高温条件下休药期为 112.9 d。

关键词: 俄罗斯鲟; 恩诺沙星; 多次给药; 不同水温; 代谢

Metabolism and elimination of enrofloxacin and its metabolites in *Acipenser gueldenstaedtii* at different water temperature

LUO Jing-Jing¹, ZHANG Xiu-Zhen¹, SONG Yi², JIANG Xiang-Yang¹, LAI Chang-Qing³,
LIU Chuan-Zhong³, SUN Yu-Zeng¹, LIU Hui-Hui^{1*}

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006, China; 2. Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Control of Quality and Safety for Aquatic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China;
3. Rainbow Trout Breed Farm of Sishui County, Sishui 273206, China)

ABSTRACT: Objective To explore the pharmacokinetic and elimination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *Acipenser gueldenstaedtii* at the low water temperature of 12–15 °C and high water temperature of

基金项目: 山东省海洋与渔业科技创新计划项目(2017YY25)、现代农业产业技术体系项目(CARS-46)、山东省现代农业产业技术体系鱼类产业创新项目(SDAIT-12-08)

Fund: Supported by Shandong Marine Fisheries Science and Technology Innovation Project (2017YY25), China Agriculture Research System (CARS-46), and the Fish Innovation Team of Shandong Agriculture Research System (SDAIT-12-08)

***通讯作者:** 刘慧慧, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: liuhh615@163.com

***Corresponding author:** LIU Hui-Hui, Master, Associate Professor, Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006, China. E-mail: liuhh615@163.com

18–21 °C. **Methods** The 60 mg/(kg·bw) dosages were fed by oral administration for the healthy *Acipenser gueldenstaedtii* weighted (750±50) g for 5 consecutive days. Then the samples of plasma, muscle, liver, kidney, skin and gills were collected during the next 1~140 d, and the content of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin was determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS). The pharmacokinetic and elimination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *Acipenser gueldenstaedtii* were studied after 5 days of continuous administration, and the rest period under different temperature conditions was obtained. **Results** The $t_{\max}$ of enrofloxacin in *Acipenser gueldenstaedtii* at the different water temperatures was 1 d. The $C_{\max}$ in summer was lower than that in winter, and the AUC increased with the increase of temperature. Both the value of $Cl_{z/f}$ and $T_{1/2z}$ indicated that the drug clearance rate speeded up with the increase of temperature. The metabolite of enrofloxacin in sturgeon was ciprofloxacin, and the trend of ciprofloxacin was roughly as same as that of enrofloxacin. **Conclusion** Using skin and muscle as edible tissues, it needs not less than 124.2 d at low temperature in winter and 112.9 d at high temperature in summer before the total amount of enrofloxacin and ciprofloxacin less than 0.1 mg/kg when the enrofloxacin administered at the dose of 60 mg/(kg·bw) for 5 consecutive days to the healthy *Acipenser gueldenstaedtii*.

KEY WORDS: *Acipenser gueldenstaedtii*; enrofloxacin; multiple-dose; difference water temperature; metabolism

1 引言

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)是第一个专门用作兽药的氟喹诺酮类药物^[1,2]。其通过与细菌 DNA 回旋酶亚基 A 结合,抑制酶活性,影响 DNA 解链、切割与连接过程,实现抑菌和杀菌作用^[3]。应用早期,恩诺沙星抗菌谱广、作用强,毒副作用小,与其他抗菌药物无交叉耐药性^[4-5],代谢产物环丙沙星仍具抗菌活性^[6],是治疗细菌感染的常用药物;近年来,由于恩诺沙星使用频率高,导致致病菌敏感性降低,养殖户常采取加大剂量给药以弥补药效^[7]。目前恩诺沙星在水生动物体内的代谢及消除规律研究多采用水产养殖使用规范^[8]中恩诺沙星的推荐剂量开展,与目前养殖现状差异较大;且恩诺沙星具有亲脂性,易在生物体内累积,最终影响人类健康^[9]。

俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)在 1993 年由俄罗斯引入我国,是一种新的淡水名特品种,养殖环境及养殖过程的技术仍存在缺陷,这也将会使疾病大面积爆发^[10]。目前有恩诺沙星在杂交鲟(*Acipenser schrenckii* ♂ × *Huso dauricus* ♀)^[11]、俄罗斯鲟^[12]、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)^[13]体内的代谢研究,均为单次给药;但养殖过程中单次给药已很难对疾病进行控制,多采用多次给药。并且温度作为代谢控制因子,与鱼类代谢及消除速率密切相关^[14,15]。因此本研究根据目前恩诺沙星实际使用情况,在适宜俄罗斯鲟养殖水温的 2 个极值—即冬季和夏季水温下采用多次给药方式进行实验,探讨恩诺沙星在俄罗斯鲟各组织内的代谢及消除规律,以期指导合理、安全用药,并对冬季和夏季休药期给出建议。

2 材料与方法

2.1 样品来源

俄罗斯鲟取自山东泗水县虹鳟鱼良种场,体重为 (750±50) g,体表完整无外伤,健康状况良好。置于半径 2 m,水深 0.8 m 的养殖池中,养殖用水为流动的山泉水。在实验开始前暂养 3 d,每天按鱼体重 3%投喂鲟鱼专用饲料。经随机检测,实验用鱼、养殖用水及饲料中均不含氟喹诺酮类药物。

2.2 试剂及药品

盐酸恩诺沙星(纯度 98%,浙江国邦药业有限公司);恩诺沙星标准品(纯度 > 99.0%,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司);环丙沙星标准品(纯度 > 94.0%,德国 Dr.Ehrenstorfer 公司);氘代恩诺沙星标准品(纯度 > 97.9%,加拿大 TRC 公司);氘代环丙沙星标准品(纯度 > 98.0%,加拿大 TRC 公司);肝素钠注射液(1.25 万 IU,天津生物化学制药有限公司);无水硫酸钠(农残级,阿拉丁公司);乙腈、甲醇、正己烷(色谱纯,德国默克股份两合公司);甲酸(优级纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);水为自制超纯水。

2.3 实验仪器

TSQ Endura 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Thermo 公司);Milli-Q Gradient 超纯水仪(法国 Millipore 公司);TGL-10C 高速离心机(上海安亭科学仪器厂);KQ-600E 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);R-100 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司);GB303 分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2.4 药液配制

称取 45.918 g 盐酸恩诺沙星, 加入 800 mL 水溶解为混浊液, 再加入适量淀粉和少许红色食用色素, 用水定容配制成 1 L 恩诺沙星混悬液, 4 °C 避光保存。混悬液中恩诺沙星含量为 45 mg/mL, 添加红色食用色素作为回吐指示剂。

2.5 实验设计

本实验以 60 mg/(kg·bw)剂量进行口灌给药, 连续 5 d; 分别于冬季和夏季进行实验, 夏季水温(20±2) °C, 冬季水温(15±2) °C, 因实验周期较长, 实验期间通过投放冰水和利用加热棒对水温进行辅助调节; 给药方式为口灌: 用 2 mL 注射器连接软导管伸入俄罗斯鲟胃部, 给药后将鱼体静置 3~5 s 后放入观察水箱, 无回吐者用于试验。从第 5 d 给药后开始计时, 分别于给药后 1、3、5、7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140 d 等 20 个取样点进行取样, 采集实验鱼的肌肉、皮肤、肝脏、肾脏、鳃 5 种组织样品, 每个采样点取 6 尾鱼, 作为平行样本。置于封口袋中, -18 °C 保存, 待检。

血浆样品的取样: 5 mL 注射器事先用 1%肝素钠处理, 从尾静脉抽取血液, 每尾鱼不少于 3 mL, 收集于 5 mL 离心管内, 经 6000 r/min 离心 5 min, 取上层血浆, -18 °C 保存。

2.6 检测方法及色谱、质谱条件

2.6.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil GLOD(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL;

流动相: A 相: 甲醇, D 相: 水(含 0.1%甲酸); 流速: 0.25 mL/min, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序 Table 1 Gradient of the mobile phase		
时间/min	A 相/%	D 相/%
0	5	95
1	5	95
6	95	5
8	95	5
10	5	95
12	5	95

2.6.2 质谱条件

离子化模式: H-ESI, 正离子模式; 正离子电压: 3500 V; 负离子电压: 2500 V。

离子传输杆温度: 325 °C; 雾化温度: 300 °C; 鞘气(sheath gas): 40 Arb; 辅助气(aux gas): 10 Arb; 质谱扫描方式为: 选择反应检测扫描(selective reaction monitoring,

SRM), 扫描母离子、子离子和碰撞能量见表 2。

表 2 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量 Table 2 Parent and fragmentation combinations used for monitoring the selected reaction			
目标化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
恩诺沙星 (enrofloxacin)	360	245	25
		316*	18
环丙沙星 (ciprofloxacin)	332	245	22
		288*	17
恩诺沙星-D5 (enrofloxacin-D5)	365	321*	18
环丙沙星-D8 (ciprofloxacin-D8)	340	322*	20

注: *为定量碎片离子。

2.7 数据处理

采用液相色谱-串联质谱仪工作站 Xcalibur 进行标准曲线计算; 采用 DAS 2.0 中智能化分析进行药动学分析; 利用 Origin 8.0 绘制浓度-时间曲线; 采用休药期计算软件 WT1.4 计算理论休药期, 以对数线性回归曲线 95%置信区间的上限至药物最高残留限量(maximum residue limit, MRL)所需要的时间作为休药期^[16], 农业部 235 号公告-2002《动物性食品中兽药最高残留限量》规定, 恩诺沙星和环丙沙星在动物源性食品组织中的最高残留总量不得超过 0.1 mg/kg, 本次实验我们以此作为 MRL 进行休药期计算。

3 结果与分析

3.1 标准曲线、相关系数、方法检测限及回收率

本实验条件下, 恩诺沙星、环丙沙星检出限均为 2.0 μg/kg。恩诺沙星、环丙沙星在 0.10~1000 ng/mL 范围内线性良好, $r^2 > 0.999$ 。样品检测使用内标法定量, 方法平均回收率为 86.7%~101%。

3.2 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的代谢及消除

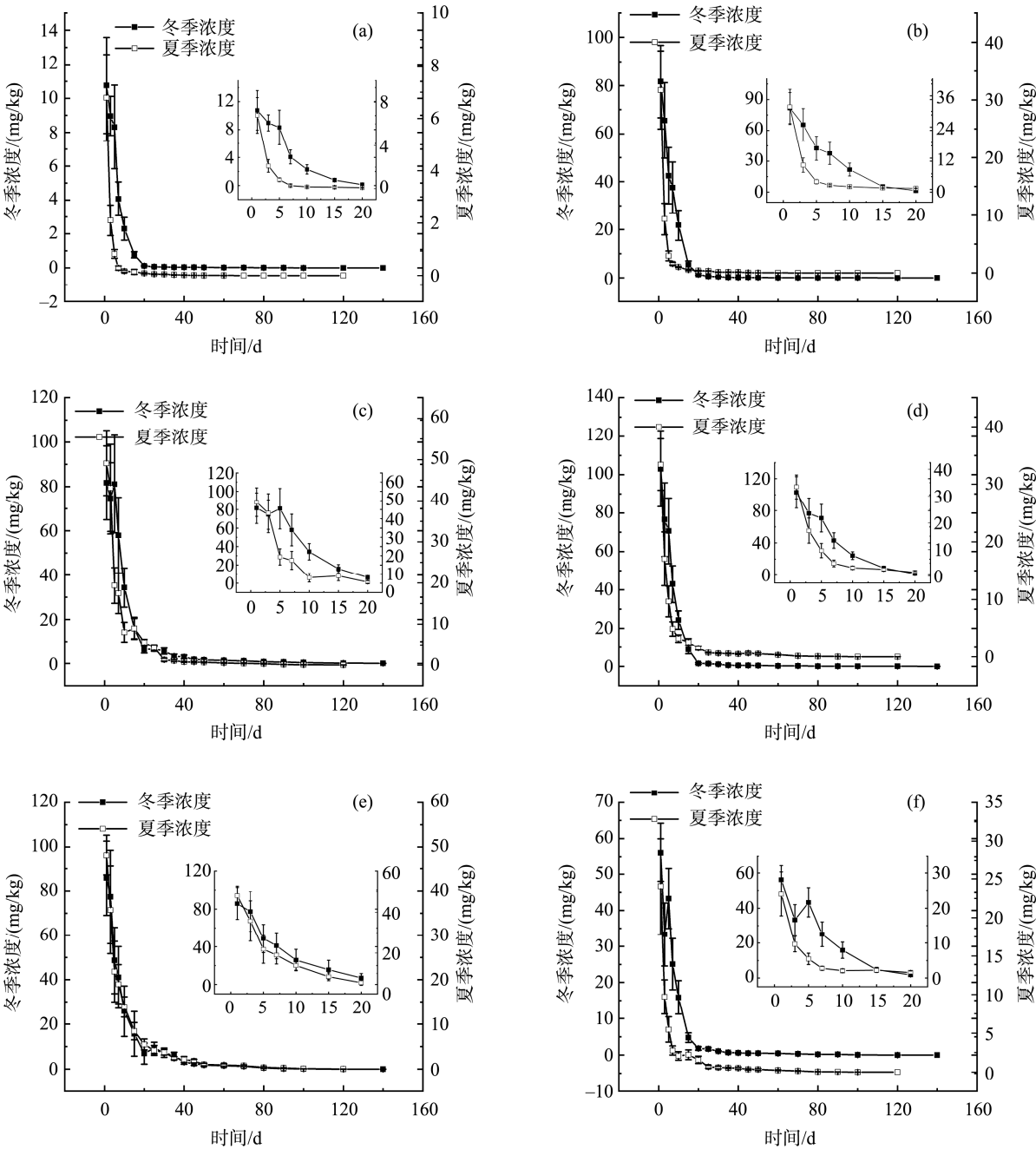
恩诺沙星在俄罗斯鲟体内药时曲线见图 1。从图中可以看出, 在冬季、夏季水温条件下, 各组织中恩诺沙星的达峰时间 t_{max} 均为 1 d, 之后呈迅速下降趋势, 给药后约 20 d 趋于平缓, 夏季趋于平缓的时间早于冬季, 但各组织之间有差异。不同组织中, 以肾脏中恩诺沙星含量最高, 血液最低; 通过对不同水温下药物残留浓度的比较: 冬季俄罗斯鲟体内恩诺沙星含量明显高于夏季。冬季水温条件下, 血液中药消除最快, 给药后 80 d 消除完全, 肌肉、鳃、皮肤 140 d 消除完全, 肾脏、肝脏消除最慢, 140 d 时

仍检出 70、30 $\mu\text{g/kg}$; 夏季水温条件下, 血液消除最快, 80 d 消除完全, 肌肉、鳃和皮肤 120 d 消除完全, 120 d 时肝脏和肾脏恩诺沙星检出浓度为 22 和 13 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.3 环丙沙星在俄罗斯鲟体内的代谢及消除

口灌恩诺沙星后, 俄罗斯鲟各组织中均有环丙沙星检出, 夏季体内环丙沙星含量较冬季高, 各组织内环丙沙星药时曲线如图 2 所示。夏季水温条件下, 各组织中 t_{max}

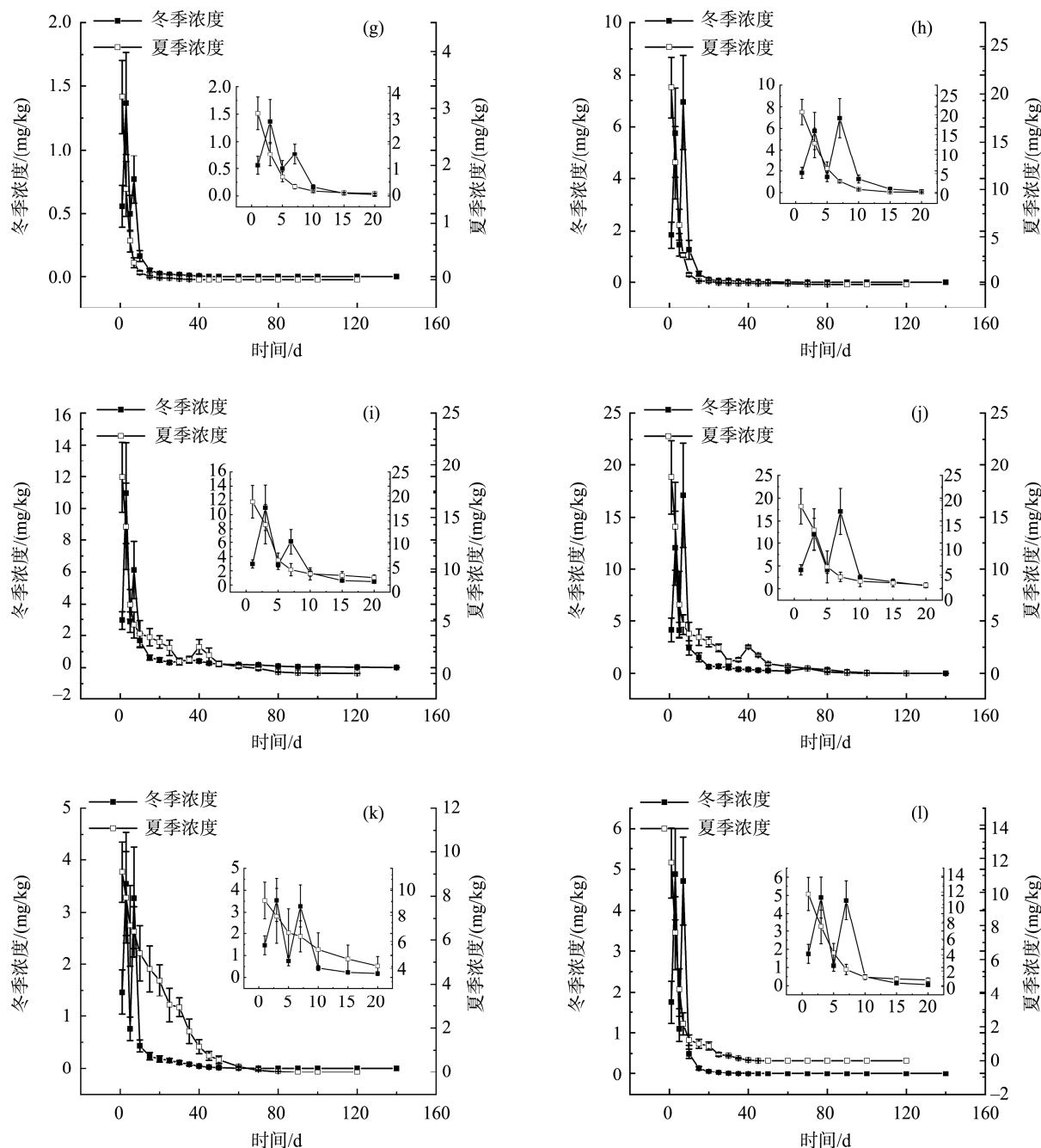
均为 1 d; 肾脏峰浓度 C_{max} 最大 25.29 mg/kg , 血液 C_{max} 最小为 3.20 mg/kg ; 血液、鳃中环丙沙星分别在给药后 40、50 d 消除完全, 肝脏和肾脏在给药后 120 d 仍有检出, 浓度分别为 10.8、9.39 $\mu\text{g/kg}$ 。冬季水温条件下, 血液、肝脏、皮肤、鳃中 t_{max} 为 3 d, 肌肉、肾脏中 t_{max} 为 7 d, 以肾脏峰浓度 C_{max} 最高 17.10 mg/kg , 肝脏次之 10.96 mg/kg , 肌肉 6.94 mg/kg , 鳃 4.88 mg/kg , 皮肤 3.54 mg/kg , 血液中最低



注: 图(a)~(f)分别为血液、肌肉、肝脏、肾脏、皮肤、鳃组织, 右上角为停药后 0~20 d 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的浓度—时间曲线。
图 1 在冬季、夏季水温条件下, 口灌给药后恩诺沙星在俄罗斯鲟各组织内的浓度—时间曲线
Fig.1 Concentrations-time course curve of enrofloxacin in tissues of *Acipenser gueldenstaedtii* in winter and summer water temperature conditions.

1.37 mg/kg, 鳃和血液中环丙沙星在给药后 35 和 45 d 消除完全, 给药后 140 d, 肾脏中环丙沙星消除完全, 肝脏中仍有检出, 浓度为 12 $\mu\text{g/kg}$ 。环丙沙星在肝脏和肾脏中浓度最高, 是因为肝脏中与药物代谢的酶较多, 而肾脏在循环系统中承担重要作用, 会对药物有蓄积作用, 从而导致肝脏与肾脏中药物浓度更高^[6]。值得注意的是, 冬季各组织中环丙沙星含量大约在给药后 7 d 均出现一个小的上升, 即双峰现象, 随后又继续迅速下降。单次口服恩诺沙星, 欧洲鳗^[17]、红水虎^[18]以及大口黑鲈体内恩诺沙星存在

多峰现象, 双峰形成原因是肝肠循环; 在对日本鳗鲡多次给药时, 日本鳗鲡^[19]体内的恩诺沙星也呈现多峰现象。与造成单次给药后双峰现象的原因不同, 造成多次给药后双峰现象的原因可能是因为连续多次给药在维持体内药物浓度的基础上, 又使得浓度升高, 给药间隔时间越长, 波动幅度也越大^[20]。通过对比发现, 夏季水温条件下, 俄罗斯鲟体内环丙沙星浓度明显高于冬季, 且消除时间比冬季短。可见, 环丙沙星在俄罗斯鲟体内的代谢速度随温度升高而加快。



注: 图(g)~(l)分别为血液、肌肉、肝脏、肾脏、皮肤、鳃组织, 右上角为停药后 0~20 d 环丙沙星在俄罗斯鲟体内的浓度—时间曲线

图2 在冬季、夏季水温条件下, 口服给药后环丙沙星在俄罗斯鲟各组织内的浓度—时间曲线

Fig.2 Concentrations-time course curve of ciprofloxacin in tissues of *Acipenser gueldenstaedtii* in winter and summer water temperature conditions.

3.4 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的药物代谢动力学

冬季(12~15 ℃)、夏季(18~21 ℃)水温条件下,以 60 mg/(kg·bw)剂量连续 5 d 对健康俄罗斯鲟口灌给予恩诺沙星,之后连续 140 d 不间断采样,并对俄罗斯鲟体内各组织中恩诺沙星和及代谢产物环丙沙星含量进行测定,采用 DAS 2.0 药代动力学软件对各组织中恩诺沙星浓度

进行分析,得出恩诺沙星在血液、肌肉和鳃组织中,冬季药时数据符合一室模型,夏季药时数据符合二室模型;在肝脏、肾脏和皮肤组织中,冬季夏季 2 个水温中均符合一室模型。此次分析数据秉持准确度高、误差小的原则,采用统计矩参数进行分析比较^[6],药代动力学参数如表 1 所示。

表 1 在冬季、夏季水温条件下,恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的药物代谢动力学参数
Table 1 Pharmacokinetic parameters of enrofloxacin in *Acipenser gueldenstaedtii* after multiple administration in winter and summer water temperature conditions.

组织		血液		肌肉		肝脏		肾脏		皮肤		鳃	
水温		冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季	冬季	夏季
AUC(0-t)	mg/(L·h)	1838.3	471.303	13559.2	2168.1	23804.1	9805.59	17833.7	4216.71	21437.6	11148.2	10442.5	2926.88
AUC(0-∞)	mg/(L·h)	1840.66	472.483	13559.2	2171.09	23843.7	9809.12	17916.4	4223.34	21442.5	11157.1	10443.9	2928.37
T _{1/2z}	h	326.977	286.166	176.196	398.751	404.28	201.441	1042.95	348.097	278.879	243.399	146.582	156.112
T _{max}	h	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24	24
V _{z/f}	L/kg	15.38	52.439	1.125	15.902	1.468	1.778	5.04	7.136	1.126	1.889	1.215	4.616
CL _{z/f}	L/(h·kg)	0.033	0.127	0.004	0.028	0.003	0.006	0.003	0.014	0.003	0.005	0.006	0.02
C _{max}	mg/L	10.7555	6.78938	81.6546	31.726	81.6492	49.0894	102.968	33.4355	85.8118	48.1209	56.1162	24.0431

注: AUC 表示药浓度-时间曲线下总面积; T_{1/2z} 表示消除半衰期; V_{z/f} 表示表观分布容积; CL_{z/f} 表示药物自体内消除的清除率。

3.5 休药期

本研究利用 WT1.4 软件计算理论休药期,将各组织中药物的残留量降至 MRL 所需要的时间作为休药期^[20]。该软件是根据德国和兽医产品委员会(Committee for Veterinary Medicinal Products, CVMP)制定的统计方法来计算休药期的^[21]。利用该软件,根据实际情况输入数据,设置对应组织的 MRL,择其置信区间,即可计算出休药期^[22]。农业部 235 号公告-2002《动物性食品中兽药最高残留限量》规定,恩诺沙星和环丙沙星在动物源性食品组织中的最高残留总量不得超过 0.1 mg/kg。因此本研究以恩诺沙星和环丙沙星总量 MRL 为 0.1 mg/kg 进行休药期计算。

在水温为 12~15 ℃、18~21 ℃条件下,以 60 mg/(kg·bw)对俄罗斯鲟连续 5 d 进行口灌给药,利用休药期软件 WT 1.4 进行计算得到可食性组织(肌肉、皮肤)的休药期的分析结果见图 3。A 线为恩诺沙星和环丙沙星总量在俄罗斯鲟体内的拟合回归线, B 线为 95%的置信区间的上限,其与 MRL 线的交点为理论休药期^[18]。结果显示,在冬季水温下,恩诺沙星和环丙沙星总量在肌肉和皮肤中的理论休药期分别为 123.0、124.2 d;夏季水温下,其在肌肉与皮肤中的休药期为 70.0、112.9 d。

4 结论与讨论

冬、夏季水温条件下,俄罗斯鲟肝脏、肾脏、皮肤中

恩诺沙星药时数据符合一室模型;冬季,血液、肌肉、鳃中恩诺沙星药时数据符合一室模型,夏季符合二室模型,可见,水温是影响恩诺沙星在俄罗斯鲟体内代谢和消除的重要因素。使用口灌及肌注 2 种给药方式对褐鳟^[23]给予恩诺沙星,恩诺沙星在体内均符合二室模型;Stoffregen 等^[24]分别以 5 mg/kg 及 10 mg/kg 剂量对大西洋鲑给予恩诺沙星,结果发现均符合一级吸收二室模型。可见,相比较于给药方式及给药浓度,水温是影响恩诺沙星在水生动物体内代谢模型的更为重要的因素。

4.1 恩诺沙星俄罗斯鲟体内的吸收与分布规律

C_{max} 和 AUC 是反应药物在体内的吸收和分布程度的重要参数^[25]。水温为 12~15 ℃时, C_{max} 各组织中从大到小依次为肾脏>皮肤>肌肉>肝脏>鳃>血液,浓度分别为 102.968、85.8118、81.6546、81.6492、56.1162、10.7555 mg/kg,各组织中的 AUC 从大到小依次为肝脏>皮肤>肾脏>肌肉>鳃>血液,为 23843.7、21442.5、17916.4、13559.2、10443.9、1840.66 mg/(L·h);在水温为 18~21 ℃时,各组织中 C_{max} 从大到小依次为肝脏>皮肤>肾脏>肌肉>鳃>血液,浓度依次为 49.0894、48.1209、334.4355、31.726、24.0431、6.78 mg/kg,各组织中的 AUC 从大到小依次为皮肤>肝脏>肾脏>鳃>肌肉>血液,大小依次为 11157.1、9809.12、4223.34、2928.37、2171.09、472.483 mg/(L·h),对比发现,夏季水温高时,各组织中恩诺沙星 C_{max} 及 AUC 均

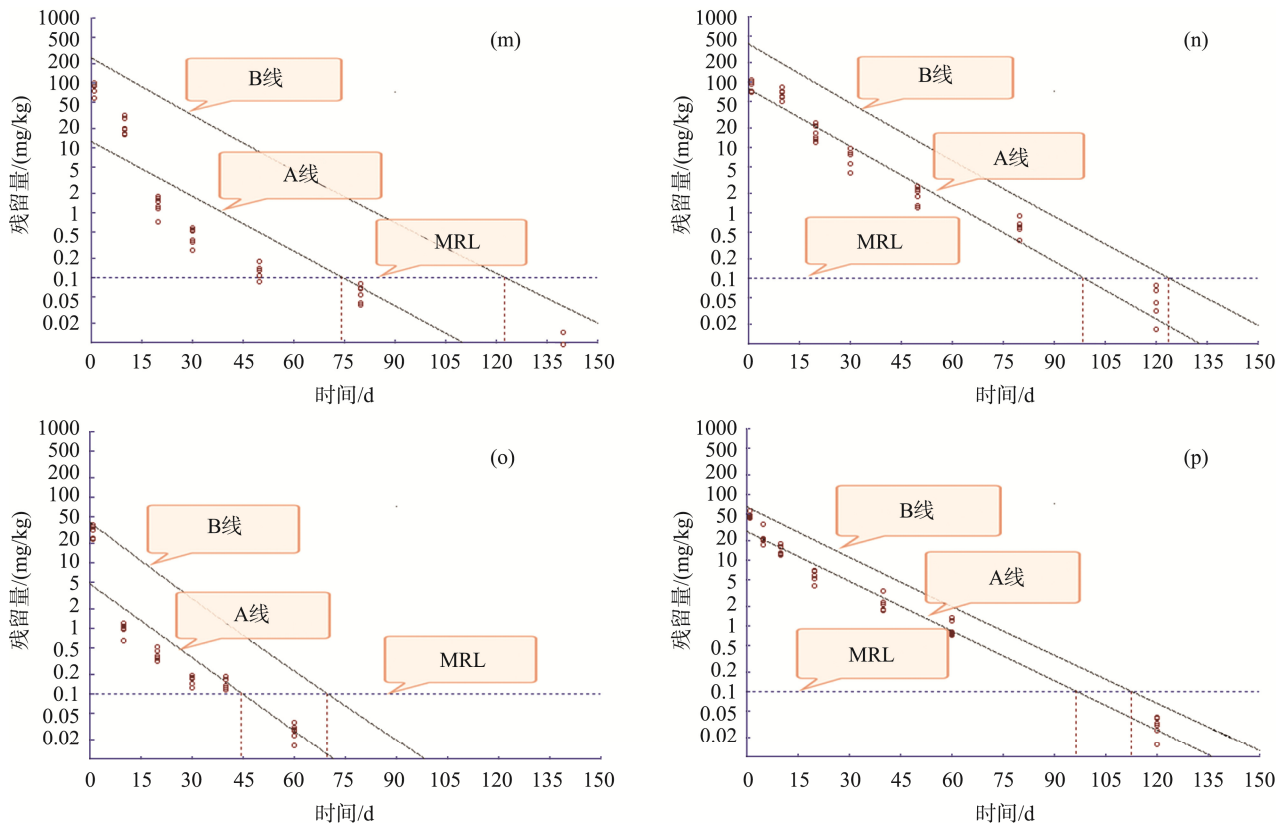
明显低于冬季水温低时。杨洪生等^[26]发现, 中华绒螯蟹 AUC 值与水温呈负相关, 水温越高 AUC 值越低。推测原因是, 在进入体内总药量相同的情况下, 水温低时, 由于恩诺沙星在体内代谢消除慢, 体内药量相对多, 吸收和分布更好, 因此 $C_{\max}$ 和 AUC 值高。 $(26\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 温度条件下, 以 $5\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 的剂量对红笛鲷^[27]进行口灌给药恩诺沙星, 肾脏中 AUC 值最高, 为 $64.296\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$; $(25\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 时, 以 $30\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 的剂量对大口黑鲈^[28]连续投喂恩诺沙星 5 d, 肌肉中 AUC 值最大, 为 $273.50\text{ mg}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $C_{\max}$ 最大为 $3.981\text{ mg}/\text{kg}$, 远低于本研究数据, 因此, 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的吸收和分布较红笛鲷和大口黑鲈好。

V_z/f 是评价药物在体内分布范围大小和特性的一个重要参数^[29], $V_z/f > 1\text{ L}/\text{kg}$ 时, 说明药物组织内浓度非常高或是在某一特定部位蓄积^[30]。由表 1 可见, 冬季、夏季水温条件下, 各组织中恩诺沙星 V_z/f 值均超过 $1\text{ L}/\text{kg}$, 说明恩诺沙星在俄罗斯鲟各组织中分布广、浓度高; 各组织中夏季 V_z/f 值明显高于冬季, 说明水温高更利于恩诺沙星在组织内的结合与分布。鲤^[31]高温时 V_z/f 值远高于低水温时, 表明随着温度的升高, 恩诺沙星在鲤组织中的渗透能

力增强, 与本研究结论相同。对大口黑鲈^[20]连续投喂 5 d 恩诺沙星, 肝脏中 V_z/f 为 $2.9329\text{ L}/\text{kg}$, 表明恩诺沙星在水生动物体内的渗透性好、组织浓度高。

4.2 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的消除规律

$Cl_{z/f}$ 及消除半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 是评价药物在体内消除速率的重要参数^[32]。 $Cl_{z/f}$ 指单位时间内清除表观分布容积部分^[33]。冬季水温 $12\sim 15^{\circ}\text{C}$ 条件下, 血液中 $Cl_{z/f}$ 最大, 为 $0.026\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$, 肝脏、肾脏和皮肤最小, 为 $0.003\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$; 夏季水温 $18\sim 21^{\circ}\text{C}$ 条件下, 血液 $Cl_{z/f}$ 值最大, 为 $0.127\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$, 皮肤最小, 为 $0.005\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$ 。由此可见, 俄罗斯鲟血液中恩诺沙星消除速度最快, 皮肤、肝脏和肾脏消除速度较慢。不同温度条件下, 低温时各组织的 $Cl_{z/f}$ 值明显低于高温时, 表明温度高, 俄罗斯鲟各组织中恩诺沙星消除速度快。以 $15\text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{bw})$ 剂量对金鳟^[34]肌注恩诺沙星, 肝脏中 $Cl_{z/f}$ 值最大, 为 $1.9893\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$, 肾脏中最小, 为 $0.0606\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$; 以同样的浓度和方式对哲罗鲑鱼^[35]进行给药, 肝脏中的 $Cl_{z/f}$ 仅 $0.2496\text{ L}/(\text{h}\cdot\text{kg})$, 可见, 恩诺沙星在不同种类鱼体内消除速度有较大差异。



注: 图(m)、(n)为冬季肌肉、皮肤中的理论休药期; (o)、(p)为夏季肌肉、皮肤中的理论休药期;
A 线: 拟合回归线; B 线: 95%置信区间。

图 3 冬季、夏季水温条件下, 恩诺沙星在可食性组织中的理论休药期
Fig.3 Withdrawal time of enrofloxacin in edible tissues of *Acipenser gueldenstaedtii* in winter and summer water temperature conditions.

$T_{1/2z}$ 指恩诺沙星在体内消除一半时所耗费的时间^[36]。冬季水温条件下, 俄罗斯鲟各组织中的药代模型均为一室模型, $T_{1/2z}$ 从大到小依次为肾脏 > 肝脏 > 血液 > 皮肤 > 肌肉 > 鳃, $T_{1/2z}$ 依次为 1042.95、404.28、326.977、278.879、176.916、146.582 h。夏季水温条件下, 肌肉 > 肾脏 > 血液 > 皮肤 > 肝脏 > 鳃, 鳃 $T_{1/2z}$ 最小为 156.112 h, 肌肉中最大为 398.751 h。各组织中 $T_{1/2z}$ 值表明, 恩诺沙星在俄罗斯鲟肝脏、肾脏中消除半衰期较长, 尤其是肾脏; 鳃中消除半衰期小。鲤^[33]体内, 高温组 $T_{1/2z}$ 为 61.473 h, 远低于低温组 $T_{1/2z}$ (215.596 h)。可见, 温度可影响恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的消除半衰期, 温度升高, 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的消除加快。Björklund 等^[35]研究表明, 水温每升高 1 °C, 鱼类的代谢速率将提高 10%左右。马寅^[37]以 10 mg/(kg·bw) 剂量对大黄鱼口灌恩诺沙星, 得到恩诺沙星在大黄鱼皮肤中 $t_{1/2\beta}$ 最短, 为 16.299 h, 血清中最长, 为 29.274 h。赵凤等^[13]以 10 mg/(kg·bw) 剂量对西伯利亚鲟口灌恩诺沙星, 血液中 $t_{1/2\beta}$ 仅为 32.046 h, 肝脏中长达 354.987 h。刘慧慧等^[12]以 60 mg/(kg·bw) 剂量对俄罗斯鲟进行单次口灌恩诺沙星, 皮肤中 $t_{1/2}$ 最长为 394.431 h, 血液中最短为 126.9 h。可见, 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的消除速度相对较长, 并且给药频率也大大延长了恩诺沙星在体内的消除时间。

4.3 休药期的制订

农业部 235 号公告-2002《动物性食品中兽药最高残留限量》规定, 恩诺沙星和环丙沙星在动物源性食品组织中的最高残留总量不得超过 0.1 mg/kg。本研究结果显示, 以 60mg/(kg·bw)连续 5 d 对俄罗斯鲟口灌恩诺沙星后, 以恩诺沙星和环丙沙星总量降至 0.1 mg/kg 以下为标准计算各组织中休药期, 在 12~15 °C 的低温条件下, 血液、肌肉、肝脏、肾脏、皮肤和鳃中休药期分别为 74.3、123.0、152.0、156.0、124.2、107.6 d; 18~21 °C 高温条件下, 休药期时间分别为 47.6、70.0、118.8、108.8、112.9、87.9 d。刘慧慧等^[12]在 12~15 °C 水温条件下, 以相同剂量对其进行单次给药, 各组织内药物含量降至限量下所需时间分别为 30、35、140、100、100、90 d。水温(20±1) °C 时, 对杂交鲟^[11]以 10 mg/kg 剂量进行单次口灌给药, 建议休药期不少于 20 d。可见, 恩诺沙星在俄罗斯鲟体内的休药期随温度升高明显降低, 连续给药及大剂量给药也大大延长了恩诺沙星在各组织内的休药期。通常皮肤、肌肉是鱼类的可食性组织, 因此, 以 60 mg/(kg·bw)连续 5 d 对俄罗斯鲟口灌恩诺沙星后, 建议冬季低温条件下休药期为 124.2 d, 夏季高温条件下休药期为 112.9 d。

参考文献

- [1] Rao GS, Ramesh S, Ahmad AH, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intramuscular administration of enrofloxacin in goats [J]. Vet Res Commun, 2001, 25(3): 197–204.
- [2] 潘明轩, 李兆新, 邢利红, 等. 恩诺沙星及其代谢产物在南美白对虾体内药代动力学研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(6): 1261–1268.
- [3] 叶建美, 吴康, 吴洪丽, 等. 恩诺沙星抗菌效果及药代动力学研究进展[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(23): 5813–5816.
- [4] 唐锡招, 李兆新, 邢利红, 等. 恩诺沙星代谢产物研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2015, 5(2): 65–73.
- [5] Tang XZ, Li ZX, Xing LH, et al. Research progress of the metabolites of enrofloxacin [J]. Chin Fish Qual Standard, 2015, 5(2): 65–73.
- [6] Liu CN, Lin H, Cao LM, et al. Anti-enrofloxacin antibody production by using enrofloxacin-screened HSA as an immunogen [J]. J Ocean Univ Chin, 2005, 4(3): 262–266.
- [7] 王洪艳, 李兆新, 邢利红, 等. 恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在牙鲆体内代谢消除规律[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 44–49.
- [8] Wang HY, Li ZX, Xing LH, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in flounder *Paralichthys solivaceus* [J]. Pro Fish Sci, 2014, 35(3): 44–49.
- [9] Martinez YN, Piñuel L, Castro GR, et al. Polyvinyl alcohol-pectin cryogel films for controlled release of enrofloxacin [J]. Appl Bio Bio, 2012, 167(5): 1421–1429.
- [10] SC/T 1083-2007 诺氟沙星、恩诺沙星水产养殖使用规范[S]. SC/T 1083-2007 Specifications for the application of norfloxacin and enrofloxacin in aquaculture [S].
- [11] Alimadadi A, Panahi HA, Taromi FA, et al. Polymer-grafted nanographite support obtained using iminodiacetic Acid/Allyl glycidyl ether: characterization and application in the extraction and determination of enrofloxacin in biological and pharmaceutical samples [J]. Chromatographia, 2016, 79(5-6): 293–301.
- [12] 杨移斌, 夏永涛, 曹海鹏, 等. 俄罗斯鲟嗜酸性卵甲藻病的诊断及防治方法[J]. 科学养鱼, 2013, (4): 56–57.
- [13] Yang YB, Xia YT, Cao HP, et al. The diagnosis of oodinirosis in *Acipenser gueldenstaedtii* and its diagnostic methods [J]. Sci Fish Far, 2013, (4): 56–57.
- [14] 郭娇娇, 潘红艳, 杨虎, 等. 恩诺沙星在杂交鲟体内的药物代谢动力学[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(4): 362–366.
- [15] Guo JJ, Pan HY, Yang H, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in sturgeon *Acipenser schrenckii* [J]. J Dalian Ocean Univ, 2011, 26(4): 362–366.
- [16] 刘慧慧, 罗晶晶, 宋铎, 等. 恩诺沙星及其代谢物在俄罗斯鲟多组织中的代谢及消除研究[J]. 食品质量安全检测学报, 2019, 10(14): 4645–4652.
- [17] Liu HH, Luo JJ, Song Y, et al. Metabolic and elimination rules of enoxacin and its metabolites in *Acipenser gueldenstaedtii* [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(14): 4645–4652.
- [18] 赵凤, 周洲, 李小艺, 等. 恩诺沙星及代谢物在西伯利亚鲟疾病模型内的药动学及残留消除规律[J]. 西南农业学报, 2017, 30(4): 957–961.
- [19] Zhao F, Zhou Z, Li XY, et al. Pharmacokinetics and elimination of enrofloxacin and ciprofloxacin (enrofloxacin metabolite) in *Acipenser baeri* [J]. South Chin J Agri Sci, 2017, 30(4): 957–961.
- [20] 宋超, 庄平, 章龙珍, 等. 不同温度对西伯利亚鲟幼鱼生长的影响[J]. 海洋渔业, 2014, 36(3): 239–246.
- [21] Song C, Zhuang P, Zhang LZ, et al. Influence of temperature on growth of juvenile Siberian sturgeon *Acipenser baeri* [J]. Mar Fish, 2014, 36(3): 239–246.

- [15] 王跃斌, 孙忠, 余方平, 等. 温度对黑鳍棘鲷耗氧率与排氨率的影响[J]. 海洋渔业, 2007, 29(4): 375–379.
Wang YB, Sun YB, Fang FP, et al. Effects of temperature on oxygen consumption rate and ammonia excretion rate of *Acanthopagrus schlegelii* [J]. Mar Fish, 2007, 29(4): 375–379.
- [16] 范红照, 林茂, 鄢庆枇, 等. 诺氟沙星在日本鳗鲡体内的代谢动力学及残留消除规律[J]. 中国渔业质量与标准, 2016, 6(1): 22–28.
Fan HZ, Lin M, Yan QP, et al. Norfloxacin pharmacokinetics and the residue elimination in *Anguilla japonica* [J]. Chin Fish Qual Stand, 2016, 6(1): 22–28.
- [17] 房文红, 于慧娟, 蔡友琼, 等. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在欧洲鳗鲡体内的代谢动力学[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 622–629.
Fang WH, Yu HJ, Cai YQ, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in european eel (*Anguilla anguilla*) after a single oral gavage [J]. J Fish Sci China, 2007, 14(4): 622–629.
- [18] Lewbart G, Vaden S, Deen J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in the red paco (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration [J]. J Vet Phar Ther, 1997, 20(2): 124–128.
- [19] 张德云, 匡维华, 郑映钦. 恩诺沙星在日本鳗鲡体内残留消除规律研究[J]. 水产科学, 2007, 26(4): 210–213.
Zhang DY, Kuang WH, Zheng YQ. Studies on elimination of enrofloxacin residues and its metabolites in *Eel* tissues [J]. Fish Sci, 2007, 26(4): 210–213.
- [20] 周伟伟. 鸡组织中尼卡巴嗪残留的 HPLC 检测法及消除规律研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2007.
Zhou WW. Studies on the determination of nicarbazin residues by HPLC and its residue elimination in chicken tissues [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2007.
- [21] 栗柱, 宗海兵. 休药期计算软件 WT1.4 的使用[J]. 饲料广角, 2003, (18): 40–41.
Li Z, Zong HB. Application method of WT1.4 for withdrawal calculation software [J]. Feed China, 2003, (18): 40–41.
- [22] 赵晓. 鸡组织中沙咪珠残留标志物超高效液相色谱检测方法的建立及消除规律研究[D]. 上海: 中国农业科学院, 2017.
Zhao X. Establishment of a method to detect ethanamiluril residues by ultra performance liquid chromatography and its residue elimination study in chicken tissues [D]. Shanghai: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2017.
- [23] Koc F, Uney K, Atamanalp M, et al. Pharmacokinetic disposition of enrofloxacin in brown trout (*Salmo trutta fario*) after oral and intravenous administrations [J]. Aquaculture, 2009, 295(1–2): 142–144.
- [24] Stofregren DA, Wooster GA, Bustos PS, et al. Multiple route and dose pharmacokinetics of enrofloxacin in juvenile atlantic salmon [J]. J Vet Phar Ther, 1997, 20(2): 111–123.
- [25] 简纪常, 吴灶和, 陈刚. 恩诺沙星在眼斑拟石首鱼体内的药物代谢动力学[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(2): 195–197.
Jian JC, Wu ZH, Chen G. Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Sciaenops ocellatus* [J]. Chin J Vet Sci, 2005, 25(2): 195–197.
- [26] 杨洪生, 陈玲珍, 吴光红, 等. 水温对氟苯尼考在中华绒螯蟹体内的药物代谢动力学影响[J]. 福建水产, 2014, 36(5): 359–365.
Yang HS, Chen LZ, Wu GH, et al. Pharmacokinetics of florfenicol in the Chinese mitten-handed crab (*Eriocheirs sinensis*) at two water temperature [J]. J Fujian Fish, 2014, 36(5): 359–365.
- [27] 汤菊芬, 简纪常, 鲁义善, 等. 恩诺沙星在红笛鲷体内的药代动力学[J]. 广东海洋大学学报, 2012, 32(4): 28–33.
Tang JF, Jian JC, Lu YS, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Lutjanus sanguineus* [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2012, 32(4): 28–33.
- [28] 何欣, 王扬, 贝亦江. 恩诺沙星在大口黑鲈 (*Micropterus salmoides*) 体内代谢动力学研究[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(9): 1482–1488.
He X, Wang Y, Bei YJ. Pharmacokinetics of enrofloxacin in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. Act Agr Zhejiang, 2018, 30(9): 1482–1488.
- [29] 王瑞雪, 王荻, 李绍戎, 等. 氟苯尼考及氟苯尼考胺在西伯利亚鲟体内的药代动力学及组织分布[J]. 上海海洋大学学报, 2012, 21(4): 568–574.
Wang RX, Wang D, Li SW, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of florfenicol and florfenicol amine in *Acipenser baeri* [J]. J Shanghai Ocean Univ, 2012, 21(4): 568–574.
- [30] 操继跃, 卢笑丛. 兽医药物动力学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.
Cao JY, Lu XC. Veterinary pharmacokinetics [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005.
- [31] 李改娟, 刘艳辉, 戴欣, 等. 不同水温联合用药中恩诺沙星在鲤鱼体内的药代动力学及残留的影响[J]. 吉林农业大学学报, 2017, 39(4): 471–476.
Li GJ, Liu YH, Dai X, et al. Effects of combined drug administration at different water temperature on pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in carp [J]. J Jilin Agr Univ, 2017, 39(4): 471–476.
- [32] 周帅, 胡琳琳, 房文红, 等. 恩诺沙星及其代谢产物在拟穴青蟹体内的药代动力学[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1182–1190.
Zhou S, Hu LL, Fang WH, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. J Fish Chin, 2011, 35(8): 1182–1190.
- [33] 魏敏杰. 药物代谢动力学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016.
Wei MJ. Pharmacokinetics [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2016.
- [34] 司力娜, 陈琛, 李绍戎, 等. 恩诺沙星在金鲢和哲罗鲑鱼体内的药代动力学比较[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(6): 390–392.
Si LN, Chen C, Li SW, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Bidyanus bidyanus* and *Huchotaimein* [J]. Jiangsu Agr Sci, 2011, 39(6): 390–392.
- [35] Björklund H, Bylund G. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. Aquaculture, 1990, 84(3–4): 363–372.
- [36] 田秀慧, 薛敬林, 邓旭修, 等. 己烯雌酚及代谢物在鲫鱼体内的组织分布及药物代谢动力学[J]. 中国食品学报, 2015, 15(11): 178–185.
Tian XH, Xue JL, Deng XX, et al. Tissue distribution and pharmacokinetics of diethylstilbestrol and its metabolite dienestrol in *Carassius auratus* [J]. J Chin In Food Sci Tech, 2015, 15(11): 178–185.
- [37] 马寅. 氟苯尼考和恩诺沙星在大黄鱼体内的代谢动力学研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2012.
Ma Y. Pharmacokinetics of florfenicol and enrofloxacin in healthy and *Vibrio alginolyticus* infected *Pseudosciaenacrocea* [D]. Ningbo: Ningbo University, 2012.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

罗晶晶, 助理工程师, 主要研究方向为水产品质量与安全。

E-mail: 18253552283@163.com

刘慧慧, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量与安全。

E-mail: liuhh615@163.com