

网络出版时间:2012-07-18 10:33

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120718.1033.013.html>

阿维菌素在草鱼体内的药物代谢动力学研究

秦改晓¹, 徐文彦¹, 艾晓辉², 唐国盘¹, 崔锦¹, 李向辉¹, 袁科平²

(1 郑州牧业工程高等专科学校 畜牧工程系, 河南 郑州 450011; 2 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223)

[摘要] **【目的】**研究阿维菌素在草鱼体内的药物代谢动力学, 为实际生产中阿维菌素的使用提供理论指导。**【方法】**用初始质量浓度为 0.3 $\mu\text{g/L}$ 的阿维菌素水溶液药浴草鱼, 于给药后 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 216, 336, 528 和 576 h 采取血浆、肌肉+皮、肝脏、肾脏、鳃等样品, 采用高效液相色谱-荧光法测定阿维菌素在草鱼血浆中的质量浓度及在组织中的含量, 数据经 3P97 药动学软件分析。**【结果】**在 $(26.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 的水温条件下, 阿维菌素单剂量浸泡给药 0.3 $\mu\text{g/L}$, 血药经时过程符合二室开放式模型。主要药动学参数如下: 分布半衰期 ($T_{1/2\alpha}$) 34.2 h, 吸收半衰期 ($T_{1/2(k_a)}$) 15.61 h, 消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$) 163.22 h, 药时曲线下面积 (AUC) 2 486.02 ($\mu\text{g} \cdot \text{h}$)/L, 达峰时间 (T_{peak}) 40.75 h, 峰质量浓度 (C_{max}) 11.92 $\mu\text{g/L}$ 。药后 72 h 时草鱼肌肉、肝脏、肾脏和鳃中阿维菌素含量均达到最高值, 其中肝脏中的含量最高, 达到 17.8 $\mu\text{g/kg}$, 其后依次为肾脏 (12.1 $\mu\text{g/kg}$)、肌肉 (10.7 $\mu\text{g/kg}$) 和鳃组织 (5.2 $\mu\text{g/kg}$), 血浆中阿维菌素含量在 48 h 达到最高 (11.2 $\mu\text{g/L}$)。肝脏、肾脏和鳃组织中阿维菌素含量均呈“双峰”曲线, 前两者在 144 h 时都有第 2 次吸收高峰, 分别为 15.0 和 8.4 $\mu\text{g/kg}$ 。**【结论】**草鱼血浆及各组织中阿维菌素在给药后 24 d 未检出, 考虑到临床应用情况的复杂性及理论值与实测值之间的差距, 建议对草鱼单剂量 (0.3 $\mu\text{g/L}$) 药浴阿维菌素后的休药期为 24 d。

[关键词] 草鱼; 阿维菌素; 药物代谢动力学; 消除规律; 高效液相色谱

[中图分类号] S948

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)08-0013-08

Studies on pharmacokinetics of Avermectin in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

QIN Gai-xiao¹, XU Wen-yan¹, AI Xiao-hui², TANG Guo-pan¹,
CUI Jin¹, LI Xiang-hui¹, YUAN Ke-ping²

(1 Department of Animal Husbandry, Zhengzhou College of Animal Husbandry Engineering, Zhengzhou, He'nan 450011, China;

2 Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Wuhan, Hubei 430223, China)

Abstract: **【Objective】** The study was conducted to investigate the pharmacokinetic of avermectin in grass carp which would provide guide to correctly use avermectin. **【Method】** Bathing administration grass carp with initial concentration of 0.3 $\mu\text{g/L}$ avermectin solution, after administration 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 216, 336, 528 and 576 hours to take the plasma, muscle+skin, liver, kidney and gill samples, the concentration of avermectin in grass carp plasma and the content of tissues were determined by using the high performance liquid chromatography with fluorescence detector. Pharmacokinetic parameters were analyzed with the pharmacokinetic computer program 3P97. **【Result】** The grass carps were taken single-dose avermectin 0.3 $\mu\text{g/L}$ by bathing administration when the water temperature was at $(26.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$, the plasma concentration time data of avermectin could be described by a two-compartment open model.

* [收稿日期] 2012-01-13

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD03B04-04)

[作者简介] 秦改晓(1984—), 女, 河南安阳人, 硕士, 主要从事渔药药理及残留检测技术研究。E-mail: gaixiao543@163.com

[通信作者] 艾晓辉(1968—), 男, 湖北京山人, 研究员, 博士, 主要从事水产动物药理与残留检测技术研究。E-mail: aixh@yfi.ac.cn

The main pharmacokinetic parameters were as follows: The distribution half-life ($T_{1/2\alpha}$) was 34.2 h, the absorption half-life ($T_{1/2(ka)}$) 15.61 h, the elimination half-life ($T_{1/2\beta}$) 163.22 h, the area under the serum concentration-time curve (AUC) 2 486.02 ($\mu\text{g} \cdot \text{h}$)/L, the time-point of maximum plasma concentration of the drug (T_{peak}) and the maximum plasma concentration (C_{max}) calculated 40.75 h and 11.92 $\mu\text{g/L}$. The content of avermectin reached the highest value in grass carp muscle, liver, kidney and gill tissues 72 h after administration, and which was the highest valued 17.8 $\mu\text{g/kg}$ in the liver, followed by kidney (12.1 $\mu\text{g/kg}$), muscle (10.7 $\mu\text{g/kg}$) and gill (5.2 $\mu\text{g/kg}$), however the highest content of avermectin valued 11.2 $\mu\text{g/L}$ appeared at 48 h after administration. The content of avermectin in the liver, kidney and gill tissues showed a “Twin Peaks” curve, the former two in the 144 h had a second absorption peak, respectively 15.0 $\mu\text{g/kg}$ and 8.4 $\mu\text{g/kg}$. 【Conclusion】 The avermectin in grass carp plasma and others tissues were not detected after the administration of 24 d. Considering the complicity of avermectin in clinical applications, and difference between formula calculation and the fact, it was suggested WDT was 24 d after following single bathing administration at a dose of 0.3 $\mu\text{g/L}$.

Key words: grass carp; Avermectin; pharmacokinetic; elimination rules; HPLC

阿维菌素(Avermectin, AVM)是由放线菌产生的一种大环内酯类抗生素,是目前全球使用最广泛的抗寄生虫药^[1]。在水产养殖中,AVM多用于鱼、虾、鳖混养塘杀虫,能驱杀鱼类棘头虫、指环虫、三代虫等蠕虫,其作为渔药,直接投放到池塘,势必会对水生动物、藻类、蚤类等非靶标动物产生影响。近年来,有关AVM在猪、牛等动物体内的药动学和残留研究时有报道,但针对水生生物的研究较少。为科学合理地指导AVM在水产养殖中的应用并预防其污染,及时避免和减轻其对水产养殖安全造成的危害,研究AVM在水产动物体内的药动学和残留特征是急需解决的问题。本试验以草鱼为供试动物,采用药浴法给予AVM,测定了AVM在草鱼血浆、肌肉+皮、肝脏、肾脏及鳃中的分布和消除规律,以期为实际生产中AVM的使用提供科学的理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 健康草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*),由中国水产科学院长江水产研究所窑湾实验场提供,平均体质量为(200.0 ± 5.0) g。试验前草鱼在1 m³水族箱内暂养1周,每天换水1次,饲喂不加抗菌药物的草鱼全价配合饲料。试验用水为曝气48 h的自来水,连续充氧,保持水中溶解氧大于8.0 mg/L,试验水温为(26.0 ± 1.0) °C, pH为7.5~8.0。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂有AVM原粉(含量95%,河北威远生化公司),AVM标准品(含

量96.0%,德国Dr Ehrenstorfer公司),碱性氧化铝SPE柱(1.0 g, 3.0 mL,美国Waters公司),三氟乙酸酐(含量99%,美国Acros公司),N-甲基咪唑(含量99%,美国Johnson Matthey公司),乙腈、甲醇(色谱纯,美国Fisher Chemicals公司),无水硫酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

100 mg/L AVM标准储备液:准确称取AVM标准品0.010 g,用乙腈溶解,定容至100.0 mL, -20.0 °C避光保存。

AVM标准工作液:用移液器准确量取1.0 mL 100 mg/L AVM标准储备液,用乙腈稀释定容至100.0 mL, -20.0 °C避光保存。

衍生化试剂:A液.N-甲基咪唑与无水乙腈等体积混匀;B液.三氟乙酸酐与无水乙腈按1:2体积比混匀。A液和B液需现配现用。

主要仪器包括高效液相色谱仪(Waters 515泵、717自动进样器、2475荧光检测器及Empower色谱工作站)、RE-2000旋转蒸发仪(上海亚荣仪器有限公司)、20PR-520型自动高速冷冻离心机(日本HITACHI公司)、Mettler-TOLEDO AE-240型精密电子天平(梅特勒-托利多公司)、FS-1高速匀浆机(华普达教学仪器有限公司)、调速混匀器(上海康华生化仪器制造厂)、HGC-12氮吹仪(HENGGAO T&D公司)。

1.2 给药与取样

将120尾草鱼分置于盛有370.0 L水的6个水族箱中,每箱中放养20尾,用AVM进行药浴,其初始质量浓度为0.3 $\mu\text{g/L}$,另取5尾鱼作为空白对照组,不给药。于给药后的0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12,

24,48,72,96,144,216,336,528 和 576 h 随机从水族箱中取 5 尾鱼,自尾静脉采集血样 5~10 mL/尾,用 10 g/L 肝素钠抗凝,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液血浆,同时解剖分离出肌肉+皮、肝脏、肾脏、鳃等组织。每个样 5 个平行。将所采血浆、组织于 -20 ℃ 避光保存,待测。

1.3 样品处理

1.3.1 血浆 将冷冻保存的血浆于室温下自然解冻,摇匀后吸取 1.0 mL 于 5.0 mL 塑料离心管中,加入 2.0 mL 乙腈,置调速混匀器上涡旋振荡 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液于 10.0 mL 塑料离心管中,加入乙腈稀释到 8.0 mL (使乙腈和水的比例在 30% 以内),过 HLB 柱(先用 5.0 mL 乙腈活化,再用 5.0 mL 水活化),用 6.0 mL 体积分数 25% 乙腈冲洗杂质,用 4.0 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液于试管中,50 ℃ 下氮气吹干,向试管中加入 0.5 mL 无水乙腈,使试管壁上的 AVM 完全溶解,待衍生化。

1.3.2 肝脏、肾脏、鳃 将冷冻保存的肝脏、肾脏、鳃样品于室温下自然解冻,称取各样品 2.0 g 于 5.0 mL 塑料离心管中,加入 4.0 mL 乙腈,置调速混匀器上涡旋振荡 2 min,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,残留组织再用 4.0 mL 乙腈重复提取 1 次,合并 2 次提取所得上清液过碱性氧化铝 SPE 柱(用 10.0 mL 乙腈活化),直接收集滤液于试管中,50 ℃ 下氮气吹干,试管中加入 0.5 mL 无水乙腈,使试管壁上的 AVM 能完全溶解,待衍生化。

1.3.3 肌肉+皮样品 将冷冻保存的肌肉+皮样品于室温下自然解冻,置高速匀浆机中匀浆至组织呈糜状,准确称取样品 5.0 g,置于 50.0 mL 塑料离心管中,加入 15.0 mL 乙腈,充分混匀,加入 5.0 g 无水硫酸钠(于 640 ℃ 烘烤 2 h),中速振荡 3 min,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,残留组织再用 15.0 mL 乙腈重复提取 1 次,合并 2 次提取所得上清液于鸡心瓶中,48 ℃ 减压旋转蒸干,用 6.0 mL 乙腈分 2 次清洗鸡心瓶,洗液按每秒 1 滴的速度过碱性氧化铝 SPE 柱(预先用 10.0 mL 乙腈活化和平衡),收集滤液于试管中。50 ℃ 下氮气吹干,向试管中加入 0.5 mL 无水乙腈,使试管壁上的 AVM 完全溶解,待衍生化。

1.3.4 衍生化 在避光、室温环境条件下,向装有 0.5 mL 用乙腈溶解的待衍生化样品的试管中先加入 0.1 mL 衍生化试剂 A,混旋 30 s,再加入 0.15 mL 衍生化试剂 B (此时有大量白色雾气,需立即将

盖子盖紧),混旋 30 s,反应 30 min 后加入 0.25 mL 甲醇,再反应 45 min,反应液过孔径 0.25 μm 滤膜,收集滤液备用。

1.4 HPLC-FD 分析方法

1.4.1 色谱条件与试剂配制 色谱柱: Waters symmetry C₁₈, 4.6 mm×250 mm, 粒径 5 μm; 流动相: 乙腈-水(V(乙腈): V(水)=98:2), 流速 1.5 mL/min; 检测器: 荧光检测器; 检测波长: 激发波长 365 nm, 发射波长 475 nm; 进样量: 20 μL; 定量方法: 外标法(峰面积); 柱温: 25 ℃。其中的流动相(V(乙腈): V(水)=98:2)经溶剂过滤器(长 0.45 m)过滤并超声 20 min 后使用。

1.4.2 标准工作曲线的制备与最低检测限(LOD)

在草鱼空白对照血浆和组织(肌肉+皮、肝脏、肾脏、鳃)中分别添加不同量的 AVM 标准工作液,使 AVM 在血浆中的质量浓度分别为 5.0, 20.0 和 100.0 μg/L,在组织中的含量分别为 5.0, 20.0 和 100.0 μg/kg,按上述样品处理方法处理后进行 HPLC-FD 分析。以测得的平均峰面积 A 为横坐标(x),相应的 AVM 质量浓度或含量 C 为纵坐标(y),绘制标准工作曲线,求回归方程和相关系数。用空白组织制成低质量浓度药物的含药组织,经预处理后测定,将引起 3 倍基线噪音的药物质量浓度定义为最低检测限。

1.4.3 回收率的测定 在草鱼空白血浆和组织(肌肉+皮、肝脏、肾脏、鳃)中分别添加不同量的 AVM 标准工作液,使 AVM 在血浆中的质量浓度分别为 5.0, 20.0 和 100.0 μg/L,在组织中的含量分别为 5.0, 20.0 和 100.0 μg/kg,按照 1.3 节样品处理方法处理后测定 AVM 质量浓度或含量,每个质量浓度或含量水平做 5 个平行试验,按下式计算 AVM 加标回收率:

$$\text{回收率} = Cr/C_0 \times 100\%$$

式中: Cr 为用空白样品(血液或组织)加入一定量的 AVM 标准工作液,再按样品预处理方法进样后测定的 AVM 质量浓度或含量; C_0 为加标样品的理论 AVM 质量浓度或含量。

1.4.4 精密度的测定 在草鱼空白血浆和组织(肌肉+皮、肝脏、肾脏、鳃)中分别添加不同量的 AVM 标准工作液,使 AVM 在血浆中的质量浓度分别为 5.0, 20.0 和 100.0 μg/L,在组织中的含量分别为 5.0, 20.0 和 100.0 μg/kg,每处理样品 1 日内做 5 个重复,1 周内重复做 5 次,计算日内及日间的精密度。

1.5 样品的 HPLC-FD 分析

对上述样品进行 HPLC-FD 分析。将 HPLC-FD 测得的 5 种组织中各取样时间点的药物峰面积代入相应的标准曲线回归方程,求得 AVM 在血浆中的质量浓度及其在各组织中的含量。

1.6 数据处理

药物动力学模型拟合及参数计算采用中国药理学学会数学专业委员会编制的 3P97 药动软件分析;标准曲线、精密度采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS

(13.0)进行绘制和计算。

2 结果与分析

2.1 AVM 标准溶液及草鱼血浆、组织加标样品的 HPLC-FD 分析

AVM 标准品、空白组织加标样品色谱图见图 1。由图 1 可见,本试验所选用的分析条件可以较好地分离 AVM,无杂质峰干扰,分离度较好。

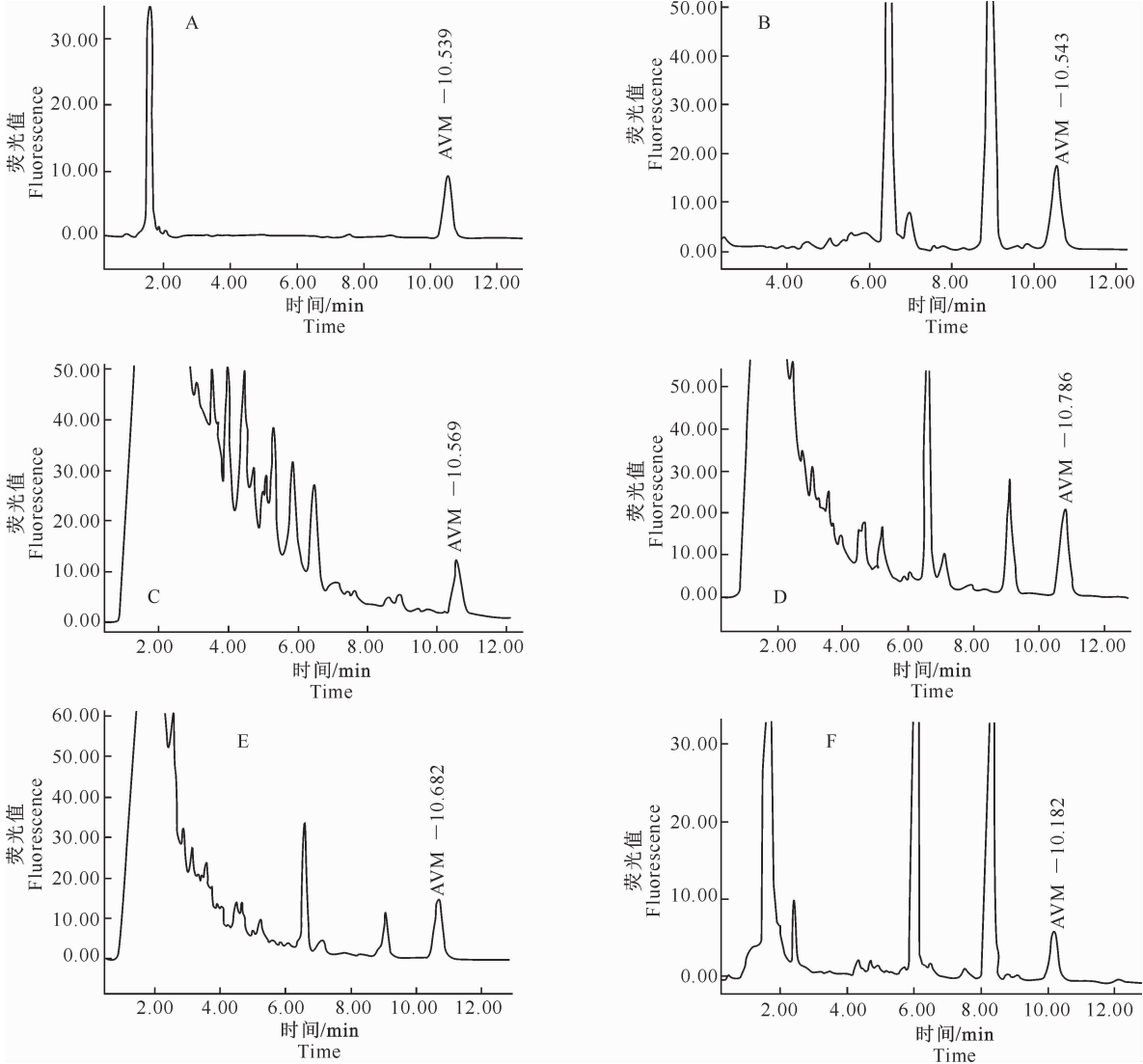


图 1 AVM 标准溶液及草鱼血浆、组织加标样品的 HPLC-FD 色谱图
A. 阿维菌素标准溶液;B. 血浆加标样品;C. 鳃加标样品;D. 肝脏加标样品;E. 肾脏加标样品;F. 肌肉+皮加标样品

Fig.1 Chromatogram of AVM standard solution and spiked Grass carp plasma, tissues samples using HPLC-FD determination
A. AVM standard solution;B. Spiked plasma sample;C. Spiked gill sample;
D. Spiked liver sample;E. Spiked kidney sample;F. Spiked muscle+skin sample

2.2 AVM 标准曲线与最低检测限

当 AVM 在草鱼血浆中的质量浓度为 5.0~

100.0 $\mu\text{g/L}$ 、在组织中的含量为 5.0~100.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,其质量浓度或含量与平均峰面积线性相关,各组

织中药物的标准曲线与相关系数见表 1。

表 1 AVM 在草鱼血浆和组织中的
标准工作曲线与相关系数($n=5$)

样品 Sample	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient
血浆 Plasma	$Y=1\ 299.6\ x-19.6$	0.999 9
肝脏 Liver	$Y=1\ 308.7\ x-828.9$	0.999 8
肌肉+皮 Muscle+Skin	$Y=1\ 378.0x-1\ 874.8$	0.999 7
肾脏 Kidney	$Y=1\ 376.7x-2\ 025.5$	0.999 5
鳃 Gill	$Y=1\ 377.4x-1\ 941.3$	0.999 6

表 2 AVM HPLC-FD 分析方法的加标回收率和精密度($n=5$)

AVM 加标量 AVM spiked quantity		平均回收率/% Mean recovery	精密度/% Precisions	
			日内 Inter-day	日间 Intra-day
血浆/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Plasma	5.0	83.45	5.65	6.71
	20.0	90.74	4.73	5.13
	100.0	85.62	3.10	5.28
肝脏/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Liver	5.0	78.91	6.42	7.91
	20.0	83.68	5.81	6.94
	100.0	82.35	5.18	7.13
肾脏/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Kidney	5.0	84.16	5.56	6.61
	20.0	80.71	2.24	5.96
	100.0	85.43	3.85	7.12
鳃/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Gill	5.0	78.59	4.83	7.56
	20.0	79.36	6.97	8.37
	100.0	80.87	5.50	6.54
肌肉+皮/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Muscle+skin	5.0	80.42	3.46	7.63
	20.0	82.76	5.57	6.65
	100.0	88.17	6.14	7.88

2.4 药浴后 AVM 在草鱼各组织中的分布及消除情况

按 AVM 初始质量浓度为 $0.3\ \mu\text{g/L}$,连续药浴

测定加标样品,按 3 倍的信噪比(3 S/N)计算, AVM 在草鱼血浆中的最低检出限为 $0.1\sim0.5\ \mu\text{g/L}$,在组织中的最低检出限为 $0.1\sim0.5\ \mu\text{g/kg}$ 。

2.3 AVM HPLC-FD 分析方法的加标回收率与精密度

由表 2 结果可以看出,在本试验的 HPLC-FD 分析条件下,草鱼血浆和各组织中添加 3 个水平的 AVM,其回收率在 $78.59\%\sim90.74\%$,各水平 AVM 回收率较稳定,符合残留检测要求;日内精密度的 $2.24\%\sim6.97\%$,日间精密度为 $5.13\%\sim8.37\%$,符合精密度的测定要求。

528 h 后,AVM 在草鱼的血浆、肌肉+皮、肝脏、肾脏、鳃中的分布见表 3,所得血浆中药物代谢动力学参数见表 4。

表 3 药浴后 AVM 在草鱼各组织中的质量浓度或含量

药浴后时间/h Time after bathing	血浆/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Plasma	肌肉+皮/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Muscle+skin	肝脏/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Liver	肾脏/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Kidney	鳃/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Gill
0.5	0.6 ± 0.02	0.3 ± 0.02	3.0 ± 0.02	2.2 ± 0.01	0.6 ± 0.08
1	1.0 ± 0.01	0.5 ± 0.04	4.2 ± 0.05	2.6 ± 0.03	1.0 ± 0.06
2	1.8 ± 0.02	0.8 ± 0.01	4.6 ± 0.07	3.0 ± 0.04	1.2 ± 0.06
3	2.0 ± 0.04	1.1 ± 0.05	5.0 ± 0.03	3.4 ± 0.02	1.6 ± 0.03
4	2.4 ± 0.05	1.5 ± 0.04	5.3 ± 0.01	4.0 ± 0.05	1.8 ± 0.06
6	3.4 ± 0.06	2.3 ± 0.05	5.5 ± 0.04	4.2 ± 0.02	2.0 ± 0.09
8	4.8 ± 0.05	3.1 ± 0.03	5.8 ± 0.01	4.6 ± 0.03	2.4 ± 0.05
10	6.0 ± 0.03	4.3 ± 0.01	6.3 ± 0.03	4.8 ± 0.06	2.6 ± 0.06
12	6.8 ± 0.01	5.2 ± 0.04	7.4 ± 0.05	5.2 ± 0.01	3.0 ± 0.04
24	9.4 ± 0.04	7.2 ± 0.06	9.7 ± 0.06	6.8 ± 0.08	4.1 ± 0.02
48	11.2 ± 0.02	9.5 ± 0.02	14.8 ± 0.02	8.9 ± 0.04	2.6 ± 0.03
72	9.7 ± 0.04	10.7 ± 0.02	17.8 ± 0.02	12.1 ± 0.05	5.2 ± 0.05
96	7.2 ± 0.05	8.9 ± 0.07	12.2 ± 0.01	7.2 ± 0.03	4.0 ± 0.01
144	5.2 ± 0.06	6.8 ± 0.04	15.0 ± 0.04	8.4 ± 0.07	3.0 ± 0.05

续表 3 Continued table 3

药浴后时间/h Time after bathing	血浆/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Plasma	肌肉+皮/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Muscle+skin	肝脏/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Liver	肾脏/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Kidney	鳃/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Gill
216	4.2 $\pm$ 0.03	3.2 $\pm$ 0.06	7.4 $\pm$ 0.05	2.6 $\pm$ 0.01	2.0 $\pm$ 0.04
336	1.8 $\pm$ 0.05	1.3 $\pm$ 0.02	2.1 $\pm$ 0.02	0.8 $\pm$ 0.03	1.2 $\pm$ 0.02
528	0.2 $\pm$ 0.01	ND	0.4 $\pm$ 0.03	ND	ND
576	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND. 未检出。
Note:ND. No detection.

表 4 AVM 在草鱼血浆中的药物代谢动力学参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of AVM in grass carp plasma

参数 Parameters	参数值 Values	参数 Parameters	参数值 Values
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	34.20	K_{21}/h^{-1}	0.011
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	163.22	K_{12}/h^{-1}	0.005 7
$T_{1/2(\text{ka})}/\text{h}$	15.61	T_{peak}/h	40.75
K_{10}/h^{-1}	0.007 9	$C_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	11.92
$\text{AUC}/(\mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1})$	2 486.02		

注: $T_{1/2\alpha}$. 分布半衰期; $T_{1/2\beta}$. 消除半衰期; $T_{1/2(\text{ka})}$. 吸收半衰期; K_{10} . 药物从中央室消除的一级速度常数;AUC. 药时曲线下面积; K_{21} . 药物从周边室向中央室转运的一级速度常数; K_{12} . 药物从中央室向周边室转运的一级速度常数; T_{peak} . 达峰时间; C_{max} . 峰质量浓度。
Note: $T_{1/2\alpha}$. Distribution half-life; $T_{1/2\beta}$. Elimination half-life; $T_{1/2(\text{ka})}$. Absorption half-life; K_{10} . A rate constant of drug elimination from the central compartment; AUC. The area under the serum concentration-time curve; K_{21} . A rate constant of drug from peripheral compartment to central compartment transporter; K_{12} . A rate constant of drug from central compartment to the peripheral compartment transporter; T_{peak} . Time to peak; C_{max} . The peak concentration.

从表 3 可以看出,将 AVM 按 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 用量对草鱼进行药浴后,随暴露时间的延长,草鱼各组织中 AVM 含量逐渐增加,到 72 h 时草鱼肌肉+皮、肝脏、肾脏和鳃中 AVM 含量均达到最高值,其中以肝脏中的含量最高,达到 17.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;其次为肾脏、肌肉+皮和鳃组织,分别为 12.1,10.7 和 5.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。血浆中 AVM 的质量浓度在药浴后 48 h 达到最高,为 11.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。肌肉+皮、肾脏和鳃中 AVM 在药浴后 528 h 不再检出,而血浆和肝脏中的 AVM 在药浴后 576 h 不再检出。

3 讨 论

3.1 给药方法

在制定某种药物的给药方案时,应主要考虑该药在生产中的安全性和在实际应用中的特性。由毒性试验得出,AVM 对鱼类的安全质量浓度为 0.25~0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[2]。本试验模拟实际生产情况,采取一次性给药、连续浸泡的方式,以考察此条件下 AVM 在鱼体内的药物代谢动力学和分布消除情况,为合理指导用药提供科学理论依据。

3.2 组织样品处理方法

由于 AVM 在水产养殖中用量很低,导致其在鱼体内的残留量也很低,同时鱼样品中含有众多的内源性成分,如蛋白质、类脂、脂肪酸等,有时还有一些潜在的干扰物存在,这使得样品的前处理更加复

杂和繁琐。本试验在参考国内外组织样品前处理方法的基础上,对提取、净化和浓缩等方法略微作了改进,使得制样方法具有提取方便、干扰峰少、回收率高等特点,其中草鱼肌肉+皮样品参照秦改晓等^[3]的方法进行处理。结果表明,草鱼各组织中添加 3 个水平的 AVM,其回收率在 78.59%~90.74%,各水平 AVM 回收率较稳定,符合残留检测要求。

3.3 AVM 在草鱼组织中的消除规律及残留分析

3.3.1 血 浆 在给药后 48 h 草鱼血浆中 AVM 质量浓度达到最大值 11.2 $\mu\text{g}/\text{L}$,给药后 528 h 血浆中 AVM 质量浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$,药后 576 h 未检出 AVM。与肌肉、肝脏、肾脏、鳃中相应数值进行比较可知,AVM 在草鱼血浆中吸收快,消除缓慢。

3.3.2 肌肉+皮 本试验结果表明,草鱼在初始质量浓度为 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ AVM 养殖水中连续药浴 576 h 后,其肌肉+皮中 AVM 含量在 72 h 达最大值 10.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,随后逐渐下降,给药后 528 h 时未检出。表明 AVM 在草鱼肌肉+皮中的蓄积能力不强,但消除较为缓慢。这与陈静^[4]以单次泼洒给药鲫鱼的结果基本一致。而邢丽红^[5]将鲈鱼在质量浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ AVM 海水中持续药浴 20 d 后,其肌肉中的 AVM 含量最高可达 7.74 $\mu\text{g}/\text{kg}$,停止给药后 40 d 时未检出。张启迪^[6]和 Vanden 等^[7]分别研究了 AVM 在鲟鱼、大鳍鳞鲃太阳鱼体内的生物富集与生物消除规律,证实 AVM 在这 2 种鱼体内的蓄积

能力也不强,但是 AVM 在鱼体内的残留浓度会随着给药剂量的增加而增大。

3.3.3 鳃 对草鱼药浴处理后,鳃组织中 AVM 的含量在 72 h 达最大值 $5.2 \mu\text{g}/\text{kg}$,在 24 h 时还有一次吸收高峰,药物含量为 $4.1 \mu\text{g}/\text{kg}$,给药后 528 h 未检出 AVM。本试验中,草鱼饲养于 AVM 水溶液中,由于 AVM 的相对分子质量很大(872),分子体积也很大($1.7 \text{ nm} \times 1.87 \text{ nm} \times 1.84 \text{ nm}$),大的分子质量和分子体积,产生了较大的立体屏障,阻止了 AVM 经鳃和肠道的吸收,限制了药物由分子膜的转运^[6],延缓了 AVM 在草鱼肝脏中的富集。

3.3.4 肝 脏 比较草鱼几种组织中 AVM 含量的观测值可知,草鱼肝脏中 AVM 的富集含量最高,在给药后 72 h 达最大值 $17.8 \mu\text{g}/\text{kg}$,这与邢丽红^[5]在鲈鱼上的研究结果一致,说明肝脏是草鱼体内最重要的 AVM 富集器官。药浴 144 h 时草鱼肝脏中的 AVM 含量出现第 2 次吸收高峰($15.0 \mu\text{g}/\text{kg}$),药后 576 h 未检出 AVM,可知脏脏是所有组织中 AVM 含量最高且消除最慢的,是 AVM 残留分析的靶组织。

3.3.5 肾 脏 鱼类肾脏主要有排泄、维持水盐平衡和调节渗透压等功能。本试验中草鱼肾脏中 AVM 含量在给药后 72 h 达最大值($12.1 \mu\text{g}/\text{kg}$),给药后 528 h 没有检出,其 AVM 吸收曲线与肝脏中的相似,在 144 h 都有第 2 次吸收高峰,但其 AVM 含量比肝脏中低得多。

本试验中,草鱼肝脏、肾脏和鳃组织中血药浓度-时间呈“双峰”曲线,难以用房室模型描述。关于药物吸收多峰现象及其机制的探讨多见于人体和哺乳动物上,水产动物上未见深入研究。此现象出现的原因多解释为肠肝其他循环(EHC)、胃肠循环、多部位吸收等,而 EHC 被认为是产生吸收多峰现象最可能的一种机制^[8-9]。同时由于药物随着血液向器官组织运送,血药浓度的再次升高也导致组织中再次出现吸收高峰。而且由于经胆汁排泄的药物或其代谢物只有部分被再吸收,所以如果存在肠肝循环,则第 2 峰的浓度要低于第 1 峰。由以上分析可推测,肠肝循环可能是导致 AVM 在草鱼肝脏、肾脏及鳃中含量出现“双峰”现象的原因。由肠肝循环等导致的药物再吸收的存在会延长药物在体内的作用时间,延缓消除,使药动学过程变得复杂,制定给药方案时应考虑这一点。

3.4 草鱼血浆中 AVM 的药动学参数

草鱼药浴 AVM 后,其血浆中的 AUC 为

$2486.02 (\mu\text{g} \cdot \text{h})/\text{L}$,低于海鲷血液中的 $10700 (\mu\text{g} \cdot \text{h})/\text{L}$ ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔注射)^[10]和鲈鱼血液中的 $4029.46 (\mu\text{g} \cdot \text{h})/\text{L}$ ($0.5 \mu\text{g}/\text{L}$ 药浴)^[5]。Lifschitz 等^[11]报道了哺乳动物牛皮下注射 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ AVM 后,其血液中 AVM 的 AUC 为 $244 (\text{ng} \cdot \text{d})/\text{mL}$,说明 AVM 在草鱼体内的药动学参数与哺乳动物相比有明显差异,而且与水生生物鱼类相比也有差异。有研究表明,给药方式也会影响 AVM 的富集和消除,如大西洋鲑鱼口服 Emamectin benzoate 后,血液 C_{max} 可达 $105 \mu\text{g}/\text{kg}$, $t_{1/2}$ 为 10.0 d ^[12];海鲷腹腔注射 IVM 后, C_{max} 为 $308.4 \mu\text{g}/\text{kg}$, $t_{1/2}$ 仅为 15.37 h ^[10];鲈鱼药浴 AVM 后,血浆 C_{max} 为 $19.10 \mu\text{g}/\text{kg}$, $t_{1/2}$ 为 10.7 d ^[5];而本试验中草鱼药浴 AVM 后,血浆 C_{max} 为 $11.92 \mu\text{g}/\text{L}$, $t_{1/2}$ 为 15.60 h 。同种药物在不同水生生物体内所表现出的药动学差异明显,这可能是由于不同水生生物解剖学上的体积差异以及药物与血浆蛋白、组织结合的能力差异所导致的^[13-14]。

3.5 AVM 临床休药期(WDT)的确定

目前,联合国粮农组织及美国、日本、中国农业部等都对 AVM 在牛、绵羊、猪和蔬菜中的残留限量做了详细规定,而在水产品中未见规定。本试验首次对 AVM 在草鱼血浆、肌肉+皮、肝脏、肾脏和鳃中的消除规律作了研究,获得了 AVM 在草鱼组织中的分布和消除资料,也为制定 AVM 在水产品中的最高残留限量及休药期提供了理论基础。

郭少忠等^[15]初步确定了 AVM 在日本鳗鲡上的停药期为 15 d。Sevatdal 等^[12]报道,鲑鱼口服 Emamectin benzoate 后,77 d 药物浓度才降至检测限以下。陈静^[4]建议 AVM 对鲫鱼的 WDT 为 19 d。邢丽红^[5]研究认为,AVM 在鲈鱼上的 WDT 为 40 d。本试验结合实际生产养殖情况,在 $(26.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ 条件下一次性给药,连续药浴,水体中 AVM 初始质量浓度为 $0.3 \mu\text{g}/\text{L}$,药浴 576 h 后,在草鱼血浆及各组织中均未检出 AVM,据此建议在该条件下,初步确定 AVM 的 WDT 为 24 d。同种药物在不同动物间的药动学差异比较明显,这种药动学在种属间的差异表明,将某种药物在一个动物中的试验结果应用于其他动物时应谨慎。

【参考文献】

- [1] 张启迪,丁双阳,邹明,等.鱼肌肉组织中阿维菌素残留的高效液相色谱法测定[J].中国兽医杂志,2008,44(8):88-89.
Zhang Q D,Ding S Y,Zou M,et al. Determination of avermectin in fish muscle tissue by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine,

- 2008,44(8):88-89. (in Chinese)
- [2] 中华人民共和国农业部. 兽药地方标准上升国家标准 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2007:135-137.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Local standards up to the national standards of veterinary medicine [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2007:135-137. (in Chinese)
- [3] 秦改晓, 袁科平, 艾晓辉. 高效液相色谱法测定水产品中阿维菌素的残留量 [J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(1):84-88.
Qin G X, Yuan K P, Ai X H. Determination of avermectin residues in aquatic products using HPLC with fluorescence detection [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2009, 28(1):84-88. (in Chinese)
- [4] 陈 静. 鲫鱼肌肉中阿维菌素类残留检测和消除规律研究 [D]. 重庆: 西南农业大学, 2008.
Chen J. Study on residue determination and elimination rules of avermectins in linnaeus muscle (*Carassius auratus*) [D]. Chongqing: Southwest Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [5] 邢丽红. 阿维菌素在鲈鱼组织中的富集消除规律研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
Xing L H. The accumulation and elimination rules of avermectin in *Lateolabrax japonicus* tissues [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008. (in Chinese)
- [6] 张启迪. 阿维菌素在鲟鱼体内生物富集与生物消除规律的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
Zhang Q D. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in Sturgeon (*A. schrenckii*) [D]. Beijing: China Agriculture University, 2003. (in Chinese)
- [7] Vanden Heuvel W J A, Forbis A D, Halley B A. Bioconcentration and depuration of avermectin B1a in the bluegill sunfish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, 15(12): 2263-2266.
- [8] Katharios P, Pavlidis M, Joan Iliopoulou G. Accumulation of ivermectin in the brain of sea bream, *Sparus aurata* after intraperitoneal administration [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2004, 17:9-12.
- [9] 周怀梧. 药物吸收多峰现象的动力学研究 [J]. 中国现代应用药学, 1989, 6(2):37-40.
Zhou H W. Multi-Peak Phenomena of drug absorption in molecular dynamics research [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 1989, 6(2):37-40. (in Chinese)
- [10] Katharios P, Iliopoulou G, Antimisari S. Pharmacokinetics of ivermectin in sea bream, *Sparus aurata* using a direct competitive ELISA [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2002, 26: 189-195.
- [11] Lifschitz A, Sallovitz J, Imperiale F. Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulation in calves [J]. Veterinary Parasitology, 2004, 119:247-257.
- [12] Sevatdal S, Magnusson A, Ingebrigteen K. Distribution of emamectin benzoate in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) [J]. J vet pharmacol Therap, 2005, 28:101-107.
- [13] 邱银生, 朱式欧, 郝玉萍, 等. 烟酸诺氟沙星在猪、鸡体内的组织残留研究 [J]. 中国兽医杂志, 1994, 28(3):10-12.
Qiu Y S, Zhu S O, Hao Y P, et al. Study on residues of norfloxacin nicotinate in pigs, chickens tissue [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 1994, 28(3):10-12. (in Chinese)
- [14] Hally B A, Nessel R J, Lu A Y H. Ivermectin and abamectin [J]. New York: Springer, 1989:162-200.
- [15] 郭少忠, 王少敦, 林延川. 阿维菌素在鳗鱼养殖中残留和停药期的初步研究 [J]. 海洋与渔业, 2007(1):18-19.
Guo S Z, Wang S D, Lin Y C. Preliminary study on residues and withdrawal period of avermectin in eel aquaculture [J]. Ocean and Fishery, 2007(1):18-19. (in Chinese)