

磺胺二甲嘧啶在鲫鱼体内的药代动力学研究*

范能全

(重庆市药品检验所,重庆 401121)

摘要:为考察磺胺二甲嘧啶(SM2)在鲫鱼(*Carassius auratus*)体内的药代动力学过程,按 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给鲫鱼口服SM2后,用高效液相色谱(HPLC)法测定鲫鱼血液、肝脏和肌肉组织中的药物浓度,用MCPKP药代动力学软件处理药时数据。结果表明,SM2在鲫鱼体内的药代动力学最佳数学模型为一级速率吸收-一室开放模型,主要药代动力学参数中,吸收半衰期($T_{(1/2)ka}$)为0.782 h,半衰期($T_{(1/2)\alpha}$)为14.834 h,最高血药浓度(C_{max})为 $75.596\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,血药浓度-时间曲线下面积(AUC)为 $137.82\text{ mg}\cdot\text{h}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据SM2的药代动力学规律和抗菌药物的应用原则制定用药方案:口服 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的SM2,每日给药1次,5 d一个疗程为宜。本研究为水产养殖中确定合理的SM2用药方案提供了可靠的理论依据。

关键词:磺胺二甲嘧啶;鲫鱼;药代动力学;高效液相色谱

中图分类号:Q503.S948

文献标识码:A

文章编号:1672-6693(2010)03-0023-04

磺胺类药物(Sulfonamides, SAS)是具有对氨基苯磺酰胺结构的药物的总称,广泛应用于水产养殖中,是一种广谱的抑制菌药物,对鱼类多种革兰氏阴性菌和一些革兰氏阳性菌有较明显的抑菌作用,同时也能抑制某些真菌、衣原体等。该类药物在动物体内的作用和代谢时间较长,当蓄积浓度超过一定量时将损害动物体的生理机能,产生过敏、泌尿系统和造血系统功能紊乱等不良反应。此外,由于水产养殖中应用的磺胺类药物进入外界环境,可能随污水或地表径流,渗漏进入地下水或附近池塘,对水生生物可能产生毒性或在其体内富集,造成环境污染^[1]。

目前应用于水产养殖的磺胺类药物多达十几种,有关磺胺类药物在鱼体内的代谢规律及组织浓度已有一些研究报道^[1-2],本实验以最常用的磺胺类药物——磺胺二甲嘧啶(Sulfadimidine, SM2)的药物代谢动力学研究入手,采用高效液相色谱(HPLC)法测定鲫鱼(*Carassius auratus*)体内的药物浓度,探讨其在鲫鱼体内的药物动力学变化规律,旨在为该种药在水产养殖业中的应用提供技术参考,为今后深入研究水产药物的药物动力学理论提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

由西南大学生命科学学院水产基地提供健康无伤鲫鱼,其体重为 $(45\pm 1.5)\text{ g}$ 。实验前在水族箱中暂养5 d,箱中备有充氧装置,连续充氧,每日各换水2次,随后分组,每箱5尾,每日按鱼体重的2%投喂商业饲料。实验前24 h停止投喂饲料。实验期间水温维持在 $(27.5\pm 0.5)\text{ }^\circ\text{C}$,pH值为6.8~7.1。

1.2 实验方案与操作

将鲫鱼随机分为11组,每组5尾,分别编号、称重记录。其中第1组为空白对照,第2~11组按每千克鱼体重口服200 mg的剂量灌喂SM2,将鲫鱼放回水中,记录给药时间。快速斩断鲫鱼尾部取血作为实验样品,其中第2~11组分别在给药后0.5、1、2、4、8、16、24、36、48和72 h取血,每尾取血0.5 mL于离心管中,同时取3个平行样,分离出血清后置冰箱4℃保存备用;接着取肝脏、肌肉组织各约0.5 g作0℃冷冻处理。

将肝脏、肌肉组织解冻,各准确称取0.5 g,分别置于100 mL具塞三角瓶中,加入5%的高氯酸溶液20 mL,在漩涡混合器上混合1 min,于超声波清洗器上超声20 min,以 $7\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上

* 收稿日期 2009-10-10 修回日期 2009-10-16

资助项目:重庆市自然科学基金(No. CSTC2008BB1382)

作者简介:范能全,男,工程师,研究方向为药物分析及新药药理。

清液于贮液瓶中,再用5%的高氯酸溶液10 mL重复提取1次,提取液一并加入到贮液瓶中。然后分别将贮液瓶中的提取液和血清,慢慢滴入 C_{18} 小柱的贮液管中浓缩净化,待样品液缓慢通过 C_{18} 小柱后,用5 mL的纯化水洗柱,弃去流出液。再用5 mL甲醇洗脱,收集洗脱液于称量瓶中。将收集于称量瓶中的洗脱液用氮气吹干,再加 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸1 mL溶解,经 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后进行高效液相色谱测定^[3]。其中实验中主要仪器为Agilent1100型高效液相色谱仪(Agilent公司生产);Cloversil C_{18} 色谱柱($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$,粒度 $5 \mu\text{m}$);800B型台式离心机(上海安亭科学仪器厂生产);ZH-2 BLENDER型自动漩涡混合器;UV-2410紫外/可见分光光度计(日本岛津公司生产)。主要药品为SM2原料粉,纯度99.6%(西南合成制药股份有限公司生产);SM2对照品(批号100411-200501,中国药品生物制品检定所提供);色谱纯甲醇。

1.3 色谱条件和标准曲线制作

流动相乙酸:甲醇:水的体积比为2:38:60,流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;柱温为 $35 \text{ }^\circ\text{C}$;进样量为 $20 \mu\text{L}$,紫外检测波长为 265 nm ^[3]。采用外标法,化学工作站自动计算峰面积,并求出样品中SM2的浓度。

对照品标准曲线和血清标准曲线的制作分别参考文献[4]和[5]。精密度与回收率的制作参考文献[3]和[4]。

1.4 数据处理和计算方法

根据血液药物浓度-时间(C_i-T_i)数值,采用MCPKP药物动力学软件进行药物动力学分析和处理,自动选择最佳模型,并将其进行非线性最小二乘法拟合,计算出药物动力学参数^[6]。

2 结果

2.1 SM2的色谱条件分析

结果表明,在本研究的色谱条件下SM2能与杂质峰完全分开,基线较平稳,峰型较对称。在检测过程中,波长 265 nm 比其他波长吸收干扰小,基线较平直^[7]。精密度方面,由SM2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(表1、2)。

2.2 线性关系及回收率

SM2的质量浓度在 $0.5 \sim 40.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,具有

良好的线性关系,标准曲线方程为 $C = 3.61475 \times 10^{-2}A + 0.79734$ ($R^2 = 0.999$, $p < 0.01$)。其中 A 为峰面积, C 为质量浓度。3个不同质量浓度的SM2标准溶液的加样回收率结果见表3。

表1 不同浓度SM2标准溶液保留时间的相对标准偏差

Tab.1 Relative standard deviation of retention time for sulfadimidine at different concentration

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	5次进样的保留时间 /min					相对标准偏差 /%
0.5	7.14	7.14	7.15	7.13	7.14	0.11
2.0	7.14	7.13	7.13	7.15	7.14	0.10
6.0	7.14	7.15	7.14	7.14	7.13	0.12
10.0	7.14	7.14	7.15	7.15	7.16	0.10
40.0	7.15	7.16	7.16	7.14	7.16	0.12

表2 不同浓度SM2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 sulfadimidine at different concentration

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	5次进样的保留时间峰面积值					相对标准偏差 /%
0.5	12.51	12.69	12.31	12.86	12.44	1.72
2.0	31.39	32.47	32.29	33.21	32.75	2.08
6.0	123.48	122.11	126.03	121.45	120.54	1.74
10.0	251.44	254.84	252.37	255.72	250.33	0.90
40.0	1073.37	1092.71	1079.55	1085.72	1098.89	0.93

表3 不同浓度的SM2在肌肉、血液、肝脏中的回收率

Tab.3 The returns-ration of different concentration of sulfadimidine in muscle, blood and liver

浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%		
	肌肉	血液	肝脏
1.0	92.25 ± 1.42	95.44 ± 0.96	90.59 ± 0.85
4.0	89.43 ± 1.73	92.67 ± 1.05	86.32 ± 1.83
8.0	79.49 ± 2.11	85.44 ± 0.53	78.31 ± 2.61

2.3 血药浓度与药时曲线

给鲫鱼口灌SM2后,SM2在鲫鱼体内的药物动力学最佳数学模型为一级吸收-一级开放模型,其血药浓度(C)与时间(t)的关系可用方程式 $C = 59.2154(e^{-0.0683t} - e^{-1.0169t})$ 表示。鲫鱼口服SM2后不同时间血液、肌肉、肝脏中的药物浓度见表4。

2.4 SM2在鲫鱼体内的药物动力学

SM2在鲫鱼体内的药代动力学参数见表5。

3 讨论

水产养殖中常用的给药方式有口服、注射和药

浴等,其中口服给药最为常用。给药方式不同,药物在鱼体内的药代动力学规律有很大差异。由于年龄、健康状等差异,以及水溶现象,水产动物对药饵的采食量无法进行准确定量,因而难以确定给药剂量^[8]。本实验用无针头注射器直接将药物灌入鱼体,鲫鱼无回吐现象,保证了鲫鱼摄入准确的药量,避免了因采食差异对药代动力学研究造成的影响。

表4 不同时间中SM2在血液、肌肉、肝脏中的药物浓度

Tab.4 The concentrations of sulfadimidine in the blood, muscle and liver of crucian carp after oral administration

时间/h	血液/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	肌肉/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)	肝脏/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
0.5	38.53 ± 5.01	0.01 ± 0.01	48.73 ± 6.88
1	42.37 ± 4.84	10.38 ± 3.49	51.44 ± 8.32
2	48.76 ± 2.57	19.23 ± 7.58	42.63 ± 5.46
4	36.25 ± 4.14	23.71 ± 6.21	62.55 ± 7.35
8	58.24 ± 6.26	19.86 ± 4.82	577.84 ± 15.73
16	31.77 ± 1.38	24.37 ± 6.24	59.41 ± 6.72
24	33.28 ± 3.57	18.44 ± 2.76	37.52 ± 5.49
36	13.86 ± 1.19	16.82 ± 1.94	30.51 ± 2.07
48	9.24 ± 0.98	9.38 ± 1.25	19.37 ± 3.21
72	4.05 ± 0.42	3.23 ± 0.62	8.12 ± 1.82

表5 SM2在鲫鱼体内的药代动力学参数

Tab.5 Pharmacokinetics parameters of sulfadimidine in crucian carp

参数	数值	参数	数值
$D/(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	200	$T_{(1/2)K}/\text{h}$	14.834
$C_0/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	2.562	T_{max}/h	9.621
K_a/h^{-1}	1.283	$C_{\text{max}}/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	75.596
K/h^{-1}	0.0471	$AUC/(\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1})$	137.82
$T_{(1/2)Ka}/\text{h}$	0.782		

D :剂量; C_0 :初始药物浓度; K_a :表观一级吸收速率常数; K :药物自体内消除一级速率常数; $T_{(1/2)Ka}$:吸收半衰期; $T_{(1/2)K}$:半衰期; T_{max} :单剂量给药后出现最高血药浓度时间; C_{max} :最高血药浓度; AUC :血药浓度时间曲线下面积。

本实验数据经MCPKP药物动力学程序分析,表明鲫鱼口灌SM2后,血药经时过程符合一级速率吸收-一室开放模型。SM2在鲫鱼体内的吸收较慢,给药后1h血药浓度达到 $42.37 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,8h血药浓度达到峰值 $58.24 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,24h时浓度为 $33.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,吸收半衰期为0.782h,表明该药在鱼体内吸收迅速,血药浓度超过该药对常见细菌的最小抑菌浓度 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[7]。消除半衰期为14.834h,说明消除缓慢,在体内滞留时间长。在给药12h后,血药浓度仍远远大于该药临床上常见细菌的最小抑菌浓度,因此能够长时间维持有效血药浓度,达到治疗疾病的目的。本研究中的SM2的药

代动力学特征与其他磺胺类药物相似^[9],吸收迅速,达峰时间短,消除缓慢,说明这类药物维持有效血药浓度时间较持久,给药间隔时间长。磺胺类药物使用不当极易产生抗药性^[2]。当水温较低时,其残留物将在水中中和鱼的皮肤及组织内保存数月,对鱼有毒害作用^[10]。如果应用不当,会对养殖水域环境造成污染,影响鱼类生长,使水产品染有异味,质量严重受损,还会在鱼体组织中残留、蓄积,使鱼体致畸、致癌、致突变,更严重的是人类在摄取鱼体中残留药物后也会在体内蓄积,危及健康^[9]。

已有研究表明,磺胺类药物的有效血药浓度应保持在 $30 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度,有效血浓度可维持24h左右^[10]。因此,参照《渔业手册》上的相关规定,SM2治疗鱼类疾病可定为每日按 $200 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量灌喂1次,一个疗程连续灌喂5d即可^[11]。根据兽药残留限量规定磺胺类药物在鱼体组织中的最高残留量为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,SM2在本实验条件下的休药期不得低于30d。

参考文献:

- [1] 艾晓辉,刘长征,周运涛,等.不同水温和给药方式下磺胺甲噁唑在草鱼体内的药代动力学研究[J].水生生物学报,2005,29(2):210-214.
- [2] 徐维海,林黎明,朱校斌,等.水产品中14种磺胺类药物残留的HPLC法同时测定[J].分析测试学报,2004,23(5):122-124.
- [3] 李孟坡,张德云,彭之见,等.高效液相色谱法测定鱼肉中残留磺胺类药物[J].理化检验-化学分册,2006,42(8):611-613.
- [4] 林海丹,谢守新,冯德雄,等.动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取高效液相色谱法测定[J].分析测试学报,2003,22(1):94-96.
- [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.
- [6] 夏文江,成章瑞.MCPKP-药物动力学分析的一种微程序[J].中国药理学报,1988,9(2):188-192.
- [7] 欧阳立群.水产品中3种磺胺类药物残留的高效液相色谱测定方法[J].中国卫生检验杂志,2005,15(8):943-966.
- [8] 张祚新,张雅斌,刘艳辉,等.氧氟沙星在鲤鱼体内的药代动力学[J].中国兽医学报,2004,24(4):383-385.
- [9] 杨洁,夏虹,蒙锦亚,等.高效液相色谱法同时测定动物源性食品中5种磺胺及3种四环素族抗生素残留[J].分析测试技术与仪器,2006,12(3):151-154.
- [10] 蒋定国.畜禽肌肉、内脏及虾中磺胺二甲嘧啶残留量的检测技术研究[J].中国食品卫生杂志,2003,15(6):492-495.
- [11] 农业部渔药手册编撰委员会.渔药手册[M].北京:中国科学技术出版社,1998:195-196.

Animal Sciences

A Study of Pharmacokinetics Property of Sulfadimidine in Crucian Carp

FAN Neng-quan

(Chongqing Institute for Drug Control , Chongqing 401121 , China)

Abstract : In the using of high efficient liquid chromatography , the pharmacokinetics processes properties of Sulfadimidine is determined in a local fish , crucian carp , after oral administration. The experimental fish is fed with Sulfadimidine at a dose of 200 mg/kg. The concentrations of Sulfadimidine in the blood , liver , and muscle of the crucian carp are measured by the high efficient liquid chromatography. The data are conducted by the software of MCPKP and the parameters of the pharmacokinetics function are calculated. The results show that Sulfadimidine concentrations versus time conform to the open dynamic model of one compartment after a single meal administration. Absorption half-life ($T_{(1/2)Ka}$) is 0.782 h , elimination half-life ($T_{(1/2)K}$) is 14.834 h , and maximum concentration (C_{max}) is 75.596 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and area under concentration (AUC) is 137.82 ($\text{mg} \cdot \text{h}$)/L. According to the pharmacokinetics properties of SM2 the medicine ration is defined as 5 days SM2 oral conduction at the dose of 200 mg /kg/ day , which would be optimum. This study has observed the pharmacokinetics properties of Sulfadimidine in the crucian carp , which could supplies some basic data for medical ration in aquaculture.

Key words : sulfadimidine ; crucian carp ; pharmacokinetics ; HPLC

(责任编辑 方 兴)