

氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺在斑点叉尾鲶体内的残留消除规律

刘永涛, 艾晓辉, 杨红, 袁科平, 李荣

(中国水产科学研究院 长江水产研究所, 农业部淡水鱼类种质监督检验测试中心, 湖北 荆州 434000)

摘要: 研究不同水温 (18 ℃ 和 28 ℃) 下, 氟苯尼考 (Florfenicol, FF) 及其代谢物氟苯尼考胺 (Florfenicol Amine, FFA) 在斑点叉尾鲶体内的残留消除规律。以含氟苯尼考 4 g/kg 的饲料按 10 mg/kg 鱼体质量连续强饲斑点叉尾鲶 (*Ictalurus punctatus*) 3 d, 于停药后第 1 天、2 天、3 天、5 天、7 天、9 天分别将斑点叉尾鲶处死后取肌肉、肝脏、皮肤、肾脏 4 种组织。采用反相高效液相色谱紫外检测法测定斑点叉尾鲶组织中氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺。结果表明, 不同水温下相同组织, 相同水温下不同组织中氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的消除速率快慢不一 (差异显著 $P < 0.05$)。氟苯尼考和氟苯尼考胺之和作为标示残留物的指示值, 高温时标示残留物 (总量) 在斑点叉尾鲶体内消除的更快。与其他组织相比标示残留物 (总量) 在肾脏中的消除最慢, 因此, 建议将肾脏作为标示残留物 (总量) 在斑点叉尾鲶体内残留的靶组织。在 18 ℃ 和 28 ℃ 时, 若规定标示残留物 (总量) 在肾脏中以 300 $\mu\text{g/kg}$ 为最高残留限量 (maximum residue limit, MRL), 建议休药期分别为 234 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{d}$ 和 224 $^{\circ}\text{C} \cdot \text{d}$ 。本研究旨在为不同水温条件下制定该药的休药期提供理论依据。[中国水产科学, 2007, 14 (6): 1 010–1 016]

关键词: 氟苯尼考; 氟苯尼考胺; 代谢物; 斑点叉尾鲶; 标示残留物; 残留; 消除规律

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)06–1010–07

氟苯尼考 (Florfenicol, FF) 又称氟甲砜霉素, 是甲砜霉素的单氟衍生物。氟苯尼考以其广谱、高效、吸收迅速、分布广泛、安全等特点, 在国内外畜牧和水产动物养殖上迅速获得广泛应用。氟苯尼考不引起再生障碍性贫血, 已知的副作用主要为对哺乳动物具有胚胎毒性, 随着对该药毒理学的深入研究, 其他毒副作用可能进一步被发现^[1]。氟苯尼考胺 (Florfenicol Amine, FFA) 是氟苯尼考的主要代谢物。欧盟将动物性食品中的氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺之和作为标示残留物^[2], 中国以氟苯尼考的代谢物氟苯尼考胺作为标示残留物^[3]。两者均规定标示残留物在鱼类带皮肌肉中的最高残留限量 (MRL) 为 1 000 $\mu\text{g/kg}$ 。加拿大规定鲑科鱼类肌肉中氟苯尼考的最大残留限量为 0.8 $\mu\text{g/kg}$ ^[4]。美国 FDA 规定鲶肌肉中标示残留物氟苯尼考胺的最高残留限量为 1 000 $\mu\text{g/kg}$ ^[5]。目前, 国外同时检测鱼体中氟苯尼考及氟苯尼考胺的方法有高效液相色谱紫外法^[6]、液相色谱质谱法^[7]和气相色谱电子捕获法^[8]。国外对氟苯尼考及氟苯尼考胺在鱼体内的

残留消除规律的研究目前相对较少, 仅在大西洋鲑 (*Salmo salar*) 肌肉与肝脏组织^[9]和斑点叉尾鲶 (*Ictalurus punctatus*) 肌肉组织^[10]中进行过相关研究。国内仅见用高效液相色谱紫外法检测鱼肌肉中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留^[11]和用气相色谱法检测虾肉中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留^[12]的报道, 关于氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺在鱼体内的消除规律的报道尚未见。本研究采用同时检测氟苯尼考及氟苯尼考胺的高效液相色谱紫外法, 研究不同水温下氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺在斑点叉尾鲶体内的残留消除规律, 旨在为水产养殖业中制定该药的休药期提供理论依据, 从而为水产品质量安全提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 实验鱼

斑点叉尾鲶体质量 (128.40 $\pm$ 10.51) g, 由中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场提供, 运至实验室后, 用 2% 的食盐水消毒 10 min, 然后放

收稿日期: 2007–04–23; 修订日期: 2007–06–28.

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划“食品安全关键技术”重大项目 (2006BAK02A22); 中国水产科学研究院专项资金项目 (2007B003).

作者简介: 刘永涛 (1979–), 男, 硕士, 从事鱼药药理及残留检测技术研究. E-mail: movecloud@tom.com

通讯作者: 艾晓辉. Tel: 13707218911. E-mail: aixh@yfi.ac.cn

置于已清洗并用高锰酸钾消毒的水族箱(122 cm×80 cm×80 cm)中暂养1周,实验用水为经活性炭脱氯的自来水,水交换速率为20~25 L/h。采用连续充氧,保持水中溶氧大于8.0 mg/L,暂养期间按鱼体质量3%的日投喂量投喂斑点叉尾鮰鱼配合饲料(通威171)。每天9:00~10:00和16:00~17:00各投喂1次,每天换水1次,暂养结束后,选择无病无伤,规格均匀的鱼进行实验。实验期间停止饲喂并用加热棒控制水温,低温组水温控制在(18±1)℃,高温组水温控制在(28±1)℃。

1.2 试剂与溶液配制

氟苯尼考标准品(德国 Dr.Eherstorfer 公司,纯度99.0%);氟苯尼考胺标准品(sigma-aldrich 公司,纯度≥95%);氟苯尼考原料药(批号200504,含量99.0%)由武汉九州神农有限公司提供;乙腈(HPLC级),上海国药集团提供;丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯、十二烷基硫酸钠(SDS)、三乙胺、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸、正己烷均为国产分析纯。

1.2.1 磷酸缓冲液的配制 磷酸缓冲液(pH 7.0)配制:准确称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)71.6 g和磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)27.6 g,分别溶于1L蒸馏水中配成0.2 mol/L的溶液,然后按61:39的体积比混合即成。

1.2.2 乙腈-磷酸二氢钠溶液的配制 A液:0.01 mol/L的磷酸氢二钠溶液,用磷酸将溶液pH调至2.8,经抽滤装置抽滤倒入具塞玻璃瓶中置4℃冰箱中备用;B液:乙腈。用前A液与B液按体积比3:2混合均匀。

1.3 仪器与设备

高效液相色谱仪为美国 Waters 公司的 515 泵、717 自动进样器、2487 双通道紫外检测器;Empower 液相色谱工作站。自动高速冷冻离心机(日本 HITACHI 20PR-520 型);Mettler-TOLEDO AE-240 型精密电子天平(梅特勒-托利多公司);80-2B 型台式离心机,FS-1 高速匀浆机,调速混匀器(上海康华生化仪器制造厂),HGC-12 氮吹仪(HENGAO T&D 公司)。

1.4 色谱条件

色谱柱:Waters symmetry C_{18} 反相色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相:乙腈-磷酸二氢钠溶液(0.01 mol/L,含 0.005 mol/L SDS 和 0.1% 三乙胺),用磷酸调至 pH 4.5。流速:0.6 ml/min。柱温:室温。紫外检测波长 225 nm。进样量 20 μL 。

1.5 实验设计与方法

1.5.1 药饵制备、给药剂量及取样 将购买的斑点叉尾鮰饲料(通威 171)用粉碎机粉碎,将氟苯尼考掺入到粉碎后的饲料中重新制成氟苯尼考含量为 4 g/kg 的颗粒饲料;按 10 mg/kg 鱼体质量进行灌胃给药。先将投胃管装好加药饲料然后慢慢将投胃管插入鮰的胃内,将一根实心管子从投胃管内径将其中的药饵慢慢推到鮰的胃内。给药后保定 1 min,然后将鱼单独放入一个水盆中观察 5 min,将返胃回吐药饵的鱼弃去,无回吐的鱼放入水族箱中。给药前同批鱼采 1 次空白组织,每天给药 1 次,连续给药 3 d,于停药后 1、2、3、5、7、9 d 钝击头部致死,取皮、背脊两侧肌肉、肝脏、肾脏,置塑料密封袋中-20℃冰箱中保存,每个时间点取 5 尾。

1.5.2 样品前处理 将冷冻保存的组织样室温下自然解冻。剪取适量的肌肉组织,置高速匀浆机中匀浆呈糜状,准确称取 1.0 g;鱼皮先剪碎,准确称取 1.0 g,肾脏取 0.5 g,肝脏 0.5 g,剪碎后分别放于 10 mL 的具塞离心管中,加入 1 mL 的 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液,置调速混匀器上涡旋振荡混匀 1 min,加入 3 mL 丙酮涡旋振荡混匀 1 min,以 10 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移到另一支 10 mL 离心管中,再加入 2 mL 二氯甲烷,涡旋振荡混匀 1 min,5 000 r/min 离心 5 min,弃去上层水相,置 50℃氮吹仪上吹干,用 1 mL 乙腈-磷酸二氢钠溶液溶解残渣,涡旋振荡混匀 1 min,加入 3 mL 正己烷涡旋振荡混匀 1 min,10 000 r/min 离心 10 min,弃去正己烷,重复去脂 1 遍,水相经 0.22 μm 滤头过滤置自动进样瓶,HPLC 测定。

1.5.3 标准工作曲线的制备及最低检测限(LOD)

在斑点叉尾鮰 4 种空白组织(肌肉、皮肤、肝脏、肾脏各 1 g)中加入已知浓度的标准溶液,制成含氟苯尼考和氟苯尼考胺质量分数分别为 0.05 $\mu\text{g/g}$ 、0.1 $\mu\text{g/g}$ 、0.25 $\mu\text{g/g}$ 、0.5 $\mu\text{g/g}$ 、1.0 $\mu\text{g/g}$ 、2.5 $\mu\text{g/g}$ 、5.0 $\mu\text{g/g}$ 、10.0 $\mu\text{g/g}$ 组织样品,分别以氟苯尼考和氟苯尼考胺的峰面积(A_i)为纵坐标,质量浓度(C)为横坐标绘制标准工作曲线,求出回归方程和相关系数。按上述的色谱条件测定加标样品,以 3 倍信噪比(3S/N)计算氟苯尼考及氟苯尼考胺在血浆、肌肉、皮肤、肝脏、肾脏组织中的最低检测限。

1.5.4 回收率及方法精密度测定 在斑点叉尾鮰空白肌肉、皮肤、肝脏、肾脏组织样品中分别添加 5 个水平的 FF 和 FFA 混合标准溶液,使样品质量分

数分别为 0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg, 每个质量浓度做 3 个平行, 并设 1 个空白对照, 按样品前处理过程处理后测定回收率。在 4 种空白组织中分别添加 2 个浓度水平的 FF 和 FFA 混合标准溶液, 使质量浓度分别为 0.1 μg/g、1.0 μg/g。每个浓度的样品, 日内做 5 个重复, 1 周内重复做 5 次, 计算日内及日间精密度。

1.6 数据处理

消除方程拟合采用 SPSS(13.0), 休药期计算和回归图采用 Excel 2003, 消除方程采用 $C = C_0e^{-kt}$ 。C 表示药物质量分数 (μg/kg), C_0 为残留消除对数曲线的截距 (μg/kg), k 表示消除速率常数。根据休药期 (WDT) 计算各组织药物浓度降至最高残留限量 (MRL) 所需的时间:

$$WDT = \frac{\ln(C_0/MRL)}{k}$$

其中 WDT 为休药期, MRL 为最高残留限量 (μg/kg), C_0 为残留消除对数曲线的截距 (μg/kg), k 为残留消除曲线速率常数 [13]。

2 结果与分析

2.1 标准工作曲线及最低检测限 (LOD)

4 种组织中氟苯尼考和氟苯尼考胺标准工作曲线方程及相关系数如下, 肌肉中 FF: $A_{i\text{肌肉}} = 77\,764C_{\text{肌肉}} - 1\,908.2, r = 0.998\,4$, FFA: $A_{i\text{肌肉}} = 79\,617C_{\text{肌肉}} + 4\,059.8, r = 0.999\,3$; 肝脏中 FF: $A_{i\text{肝脏}} = 76\,475C_{\text{肝脏}}$

$-3\,535.4, r = 0.999\,1$, FFA: $A_{i\text{肝脏}} = 90\,704C_{\text{肝脏}} + 1\,884.8, r = 0.999\,4$; 肾脏中 FF: $A_{i\text{肾脏}} = 76\,581C_{\text{肾脏}} + 773.29, r = 0.998\,4$, FFA: $A_{i\text{肾脏}} = 88\,623C_{\text{肾脏}} - 10\,845, r = 0.998\,0$; 皮肤中 FF: $A_{i\text{皮肤}} = 73\,690C_{\text{皮肤}} - 2\,316.8, r = 0.997\,9$, FFA: $A_{i\text{皮肤}} = 81\,851C_{\text{皮肤}} - 9\,453.5, r = 0.996\,2$ 。肌肉、肝脏、肾脏、皮肤中 FF 和 FFA 的最低检测限分别为 20 μg/kg 和 15 μg/kg, 50 μg/kg 和 50 μg/kg, 50 μg/kg 和 50 μg/kg, 50 μg/kg 和 50 μg/kg。

2.2 回收率及方法精密度

4 种组织中 FF 平均回收率为 75.14% ~ 92.65%, FFA 平均回收率为 76.00% ~ 91.50%, 日内变异系数不大于 8.68%, 日间变异系数不大于 9.22%。

2.3 不同水温下 FF 和 FFA 在斑点叉尾鲴体内残留及消除

氟苯尼考在动物体内的主要代谢产物是氟苯尼考胺, 同时还有氟苯尼考醇、氟苯尼考草氨酸等代谢物, 这些代谢物有极低的抗菌活性, 对环境生物影响较小。目前, 欧盟以氟苯尼考和氟苯尼考胺作为残留检测的标示检出物 [1]。

2.3.1 不同水温下 FF 和 FFA 在斑点叉尾鲴组织中的残留 不同水温下斑点叉尾鲴经强饲含有氟苯尼考的饲料 3 d 后氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺在 4 种组织中的残留如表 1、表 2 所示。

表 1 18℃斑点叉尾鲴连续强饲氟苯尼考 3 d 后各组织中 FF 和 FFA 的残留量
Tab.1 FF and FFA levels in *I. punctatus* tissues after oral gavage administration at does of 10 mg/kg BW for 3 consecutive days at 18℃

时间/d Time	肌肉 Muscle		皮肤 Skin		肝脏 Liver		肾脏 Kindey	
	FF	FFA	FF	FFA	FF	FFA	FF	FFA
1	4.43±0.36	0.10±0.02	3.69±0.44	0.27±0.02	5.44±0.71	0.51±0.25	6.34±0.60	0.54±0.16
2	1.46±0.26	0.07±0.01	1.14±0.20	0.26±0.02	1.35±0.49	0.37±0.12	2.86±0.59	0.51±0.11
3	0.83±0.20	0.03±0.02	0.58±0.13	0.25±0.07	0.89±0.16	0.24±0.06	1.59±0.37	0.35±0.07
5	0.14±0.02	ND	0.29±0.04	0.24±0.03	0.18±0.01	0.10±0.03	0.90±0.34	0.26±0.07
7	ND	ND	0.21±0.06	0.20±0.06	ND	ND	0.89±0.12	0.24±0.01
9	ND	ND	0.15±0.04	ND	ND	ND	0.71±0.27	0.19±0.02

注: ND 表示未检测到。
Note: ND represents undetectable.

表2 28℃斑点叉尾鲶连续强饲氟苯尼考3 d后各组织中FF和FFA的残留量

Tab.2 FF and FFA levels in *I. punctatus* tissues after oral gavage administration

at doses of 10 mg/kg b w for 3 consecutive days at 28℃

 $n=5; \bar{X} \pm SD; \mu\text{g/g}$

时间/d	肌肉 Muscle		皮肤 Skin		肝脏 Liver		肾脏 Kindey	
Time	FF	FFA	FF	FFA	FF	FFA	FF	FFA
1	1.92±0.66	0.11±0.07	1.39±0.52	0.25±0.09	2.51±0.97	0.40±0.17	2.82±0.82	0.47±0.22
2	0.26±0.08	ND	0.54±0.09	0.19±0.03	0.60±0.20	0.27±0.09	1.36±0.28	0.30±0.04
3	0.08±0.02	ND	0.16±0.04	0.16±0.02	0.29±0.09	0.08±0.03	0.45±0.12	0.22±0.01
5	ND	ND	0.08±0.03	0.14±0.01	0.09±0.01	ND	0.29±0.09	0.19±0.02
7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.19±0.14	0.17±0.03
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.17±0.07	ND

注:ND表示未检测到。

Note: ND represents undetectable.

表1和表2结果表明,同一时间点,相同组织中,低温组(18℃)氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的残留量均比高温组(28℃)高,而且相差较大;同一时间点,相同水温下,氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的残留量在不同组织中也有较大差别。

2.3.2 不同水温下标示残留物(总量)在斑点叉尾鲶组织中残留消除规律 将氟苯尼考及氟苯尼考胺浓度之和作为动物性食品中氟苯尼考残留的标示残留物^[2],其残留量见表3和表4。数据经回归处理得到4种组织中标示残留物浓度(c)与时间(t)关系的消除曲线方程、相关系数(r^2)及消除半衰期($T_{1/2}$)见表5和表6。

表3和表4结果表明,同一时间点,低温组(18℃)氟苯尼考的标示残留物在相同组织或不同组织中的残留量均比高温组(28℃)高,而且相差较大;同一时间点,相同水温下,氟苯尼考的标示残留物的残留量在不同组织中也有较大差别。

表3 18℃氟苯尼考及氟苯尼考胺浓度之和

作为标示残留物在斑点叉尾鲶各组织中的残留量

Tab.3 The sum of FF and FFA levels as the marker residue in *I. punctatus* tissues at 18℃

时间/d	肌肉	皮肤	肝脏	肾脏
Time	Muscle	Skin	Liver	Kindey
1	4.53	3.96	5.95	6.88
2	1.53	1.40	1.72	3.37
3	1.03	0.83	1.13	1.94
5	0.16	0.53	0.28	1.16
7	ND	0.41	ND	1.13
9	ND	0.15	ND	0.90

注:ND表示未检测到。

Note: ND represents undetectable.

表4 28℃氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺浓度的和

作为标示残留物在斑点叉尾鲶各组织中的残留量

Tab.4 The sum of FF and FFA levels as the marker residue in *I. punctatus* tissues at 28℃

时间/d	肌肉	皮肤	肝脏	肾脏
Time	Muscle	Skin	Liver	Kindey
1	2.03	1.64	2.91	3.29
2	0.26	0.73	0.87	1.66
3	0.08	0.32	0.37	0.67
5	ND	0.22	0.09	0.48
7	ND	ND	ND	0.36
9	ND	ND	ND	0.17

注:ND表示未检测到。

Note: ND represents undetectable.

表5 18℃标示残留物在斑点叉尾鲶组织中的

消除曲线方程及参数

Tab.5 Equation of elimination curve and parameters of the marker residue in *I. punctatus* tissues after oral gavage administration for 3 successive days at 18℃

组织	方程	相关	消除半
Tissue	Equation	指数 r^2	衰期/h $T_{1/2}$
肌肉 Muscle	$C_{\text{肌肉}} = 9.564e^{-0.809t}$	0.984	20.558
皮肤 Skin	$C_{\text{皮肤}} = 3.467e^{-0.347t}$	0.914	47.931
肝脏 Liver	$C_{\text{肝脏}} = 9.905e^{-0.727t}$	0.971	22.878
肾脏 Kindey	$C_{\text{肾脏}} = 5.432e^{-0.229t}$	0.815	72.629

表 6 28 ℃ 标示残留物在斑点叉尾 组织中的
消除曲线方程及参数

Tab.6 Equation of elimination curve and parameters of
the marker residue in *I. punctatus* tissues after oral
gavage administration for 3 successive days at 28 ℃

组织 Tissue	方程 Equation	相关 指数 r^2	消除半 衰期/h $T_{1/2}$
肌肉 Muscle	$C_{肌肉} = 8.836e^{-1.617t}$	0.976	10.286
皮肤 Skin	$C_{皮肤} = 2.095e^{-0.494t}$	0.887	33.688
肝脏 Liver	$C_{肝脏} = 5.569e^{-0.849t}$	0.983	19.590
肾脏 Kindey	$C_{肾脏} = 3.060e^{-0.331t}$	0.909	50.248

2.4 色谱图

图 1 和图 2 是 18 ℃ 和 28 ℃ 斑点叉 经多次强
饲氟苯尼考后 1 d 时肌肉样品中氟苯尼考及其主
要代谢物氟苯尼考胺的液相色谱图,由色谱图可以
看出 28 ℃ 饲养组斑点叉 组织中氟苯尼考和氟
苯尼考胺的残留浓度要比 18 ℃ 低。本实验在检
测 组织中氟苯尼考胺的过程中发现其残留量较
低,与 Hørsberg 等^[9]报道的氟苯尼考胺在大西洋
鲑肌肉和肝脏中的残留相差较大。

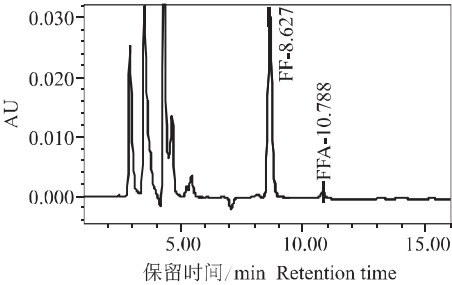


图 1 18 ℃ 连续 3 d 强饲氟苯尼考后 1 d 肌肉色谱图
Fig.1 Chromatogram of muscle FF and FFA at 1 day
after oral gavage administration of FF at 18 ℃

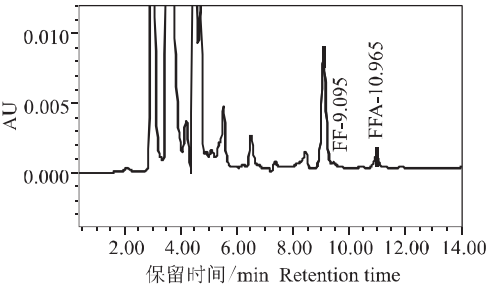


图 2 28 ℃ 连续 3 d 强饲氟苯尼考后 1 d 肌肉色谱图
Fig.2 Chromatogram of muscle FF and FFA at 1 day
after oral gavage administration of FF at 28 ℃

3 讨论

3.1 氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺在 鱼组织
中的分布规律

由表 1 和表 2 可以看出,氟苯尼考胺在 各组织
中的残留均较低,氟苯尼考和氟苯尼考胺在组织中的
分布规律相似,残留水平由高到低大致依次为肾脏、
肝脏、肌肉、皮肤,与余培建等^[14]报道的氟苯尼考在
欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 组织中的分布规律相
似,Hørsberg 等^[9]也报道大西洋鲑肝脏中的氟苯尼考
和氟苯尼考胺的残留要比肌肉中的高。本研究发
现,同一时间点组织中氟苯尼考和氟苯尼考胺的残
留在 18 ℃ 饲养水温下比 28 ℃ 要高。18 ℃ 时氟
苯尼考在肌肉中于 7 d 后检测不到,而 28 ℃ 时
氟苯尼考在肌肉中于第 5 天时已检测不到;18 ℃
时皮肤中的氟苯尼考 9 d 时仍可检测到,其残留
量为 $(0.15 \pm 0.04) \mu\text{g/g}$,而 28 ℃ 5 d 时其残
留量仅为 $(0.08 \pm 0.03) \mu\text{g/g}$,7 d 时已检测
不到。在 18 ℃ 和 28 ℃ 下 9 d 时均可在肾脏组
织检测到氟苯尼考,其残留量分别为 $(0.71 \pm 0.27) \mu\text{g/g}$
和 $(0.17 \pm 0.07) \mu\text{g/g}$ 。在 18 ℃ 下 9 d 时
氟苯尼考胺在肾脏中可被检测到其残留为
 $(0.19 \pm 0.02) \mu\text{g/g}$,而在 28 ℃ 下 9 d 时
氟苯尼考胺不能被检测到。28 ℃ 下肌肉中
氟苯尼考胺在 2 d 时已检测不到,18 ℃ 5 d
时肌肉中氟苯尼考胺才检测不到,这与 Hørsberg
等^[9]报道的 10 ℃ 下 20 d 时在大西洋鲑的肌肉
和肝脏中仍可以检测到氟苯尼考胺的结果相差
较大,而 Samuelsen 等^[15]报道在单剂量管饲口
服氟苯尼考大西洋鲑的血浆和组织中没有检测
到氟苯尼考胺。这种差异作者认为是由种属以
及水温差异造成的。

3.2 标示残留物 (氟苯尼考和氟苯尼考胺总量) 在
 组织中的残留特征

考虑到氟苯尼考在防治鱼类疾病时一般连续
且 3~5 d^[16],以及本实验采用强饲方式给药
的工作量及对鱼体的影响,本实验采用连续
给药 3 d 的实验方案。

采用 HPLC 法可在斑点叉尾 的肌肉、
皮肤、肝脏、肾脏组织中同时检测到氟苯尼
考及氟苯尼考胺(图 1、2)。在 18 ℃ 和 28 ℃
水温条件下标示残留物(氟苯尼考和氟苯尼
考胺总量)在斑点叉尾 组织中的残留由高
到低依次为肾脏、肝脏、肌肉、皮肤,消除
速率由快到慢依次为肌肉、肝脏、皮肤、
肾脏,可以看出标示残留物在肝脏、肾脏
中的浓度最高,这说明标示残留物在肝脏
代谢并在肾脏富集、排泄,与余

培建等^[14]报道的氟苯尼考在欧洲鳗鲡肾脏中残留最高,并在肾脏中富集和排泄的结论相似。从消除规律上看,18℃和28℃水温下标示残留物在肌肉中均消除最快,消除半衰期分别为20.558 h和10.268 h,而在肾脏中消除最慢,消除半衰期分别为47.931 h和33.688 h。由此可见肾脏是残留量最高消除最慢的组织,因此,可将肾脏作为氟苯尼考残留分析的靶组织。从两种水温条件下标示残留物在斑点叉尾鮰体内各组织中的残留及消除规律来看,同一采样时间时高温条件下标示残留物在各组织中的浓度明显低于低水温,说明消除速率比低水温时快。

3.3 休药期

欧盟对氟苯尼考的标示残留物在牛、羊、家禽、猪可食性组织(牛和羊:肌肉、肝脏肾脏;家禽和猪:肌肉、皮肤+脂肪、肝脏、肾脏)中的最高残留限量(MRL)均做了详细的规定,而在水产品中只对有鳍鱼类可食组织中自然比例的肌肉和皮肤中标示残留物的最高残留限量(MRL)作了规定^[2]。本实验对不同水温条件下斑点叉尾鮰肌肉、皮肤、肝脏、肾脏组织中标示残留物的消除规律作了研究,进一步丰富了氟苯尼考在有鳍鱼类各组织中分布及消除资料,也为制定最高残留限量及休药期提供了参考资料。根据欧盟规定:氟苯尼考在有鳍鱼类肌肉和皮肤组织及所有动物源性食品肝脏和肾脏组织中的MRL分别为1 000 µg/kg、1 000 µg/kg、2 000 µg/kg和300 µg/kg。本实验以此作为参考,通过WDT公式计算可知斑点叉尾鮰各组织的理论WDT为:18℃肌肉休药期为2.79 d、皮肤3.58 d、肝脏2.20 d、肾脏12.65 d;28℃肌肉休药期为1.35 d、皮肤1.50 d、肝脏1.21 d、肾脏7.02 d。通常将残留量高、消除最慢的组织看作残留分析的靶组织。实验结果表明,肾脏组织残留量高、消除最慢,因此,可将肾脏作为残留分析的靶组织,则18℃和28℃饲养条件下休药期可分别为234℃·d和224℃·d。

参考文献:

- [1] 徐力文,廖昌容,刘广锋.氟苯尼考用于水产养殖的安全性[J].中国水产科学,2005,12(4):512-518.
- [2] EU. Commission Regulation (EC) No. 508/1999 of 4 March 1999, amending Annexes I to IV to Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Communities, 1999.
- [3] 中华人民共和国农业部公告第235号《动物性食品中兽药最高残留限量》,2002.
- [4] Health Canada. Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada [Z]. <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/vet/mrl-lmr/mrl-lmr-versus-new-nouveau-e.html>.
- [5] FDA. Title 21-Food and Drugs, PART 556 Tolerances for residues of new animal drugs in food, Subpart B. 556.283-Florfenicol [Z]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfcr/CFRSearch.cfm?CFRpart=556.283>.
- [6] Hormazabal V, Steffenak I, Yndestad M. Simultaneous determination of residues of florfenicol and the metabolite florfenicol amine in fish tissues by high performance liquid chromatography [J]. Chromatogra, 1993, 616: 161-165.
- [7] Jeffery M R, Ross A P, Melissa C F, et al. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. AOAC Int, 2003, 86(3): 510-514.
- [8] Pfenning A P, Roybal J E, Rupp H S, et al. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine, and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection [J]. AOAC Int, 2000, 83(1): 26-30.
- [9] Horsberg T E, Hoff K A and Nordmo R. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in Atlantic salmon [J]. Aqu Anim Health, 1996, 8: 292-301.
- [10] Wziesinski C, Crouch L, Gaunt P, et al. Florfenicol residue depletion in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) [J]. Aquaculture, 2006, 253(1-4): 309-316.
- [11] 郭霞,张素霞,沈建忠,等.鱼肌肉中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留的高效液相色谱检测[J].中国兽医科学,2006,36(09): 743-747.
- [12] 孙丰云,张素霞,沈建忠,李建成.虾肉中氯霉素 甲矾霉素 氟苯尼考及氟苯尼考胺残留气相色谱-微电子捕获检测法[J].中国兽医杂志,2006,42(10): 66-67.
- [13] Riviere J E. Comparative Pharmacokinetics: Principle, Techniques, and Application [M]. Ames: Iowa State University Press, 1999: 308.
- [14] 余培建,翁祖桐,樊海平,等.氟苯尼考在欧洲鳗鲡体内的药物代谢动力学研究[J].福建水产,2005,4: 52-57.
- [15] 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.
- [16] 杨先乐,陆承平,战文斌,等.新编渔药手册[M].北京:中国农业出版社,2005: 189.

Florfenicol and its metabolite florfenicol amine residue depletion in *Ictalurus punctatus*

LIU Yong-tao, AI Xiao-hui, YANG Hong, YUAN Ke-ping, LI Rong

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Freshwater Fish Germplasm Quality Supervision and Testing Center, Jingzhou, 434000, China)

Abstract: Florfenicol, a broad spectrum antibiotic, is a fluorinated derivative of thiamphenicol and is also similar in structure to chloramphenicol. Florfenicol has equal or superior antibacterial activity compared to thiamphenicol and chloramphenicol and does not cause human aplastic anemia. Florfenicol is used exclusively in controlling bacteria infectious diseases in cultured fish. A residue depletion study was conducted of florfenicol (FF) and its metabolite florfenicol amine (FFA) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at 18 °C and 28 °C water temperature. After repeated oral administration at a dosage of 10 mg/kg body weight for 3 consecutive days, channel catfish (*Ictalurus punctatus*) were killed and the muscle, skin, liver, kidney tissues were collected after oral gavage 1, 2, 3, 5, 7, 9 d of oral gavage administration. Florfenicol (FF) and florfenicol amine (FFA) in tissues were determined by using reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with UV detection. The mobile phase was acetonitrile-sodium dihydrogen phosphate solution (0.01 mol/L, containing 0.005 mol/L SDS and 0.10% triethylamine) (2:3, V:V) and UV detection set at 225 nm. Analyte were extracted with acetone, Dichloromethane was added that made extracts demixed, Defatted with hexane and so on sample treating process. The standard curves were linear in the investigated ranges, 0.05~10.0 µg/g of both florfenicol and florfenicol amine in tissues. The correlation coefficient for florfenicol and florfenicol amine were both $r \geq 0.9962$. The recovery of florfenicol was from 75.14% to 92.65% and the recovery of florfenicol amine was from 76.00% to 91.50%. The within-day and day-to-day precision expressed by CV was less than 10% at two drug levels (0.1 and 1.0 µg/g). The detection limits for florfenicol and florfenicol amine in muscle, skin, liver, kidney were 20 and 15 µg/kg, 50 and 50 µg/kg, 50 and 50 µg/kg, 50 and 50 µg/kg respectively. The results showed that the elimination rate was markedly different in different water temperature and the same tissues or different water temperature and the same tissues. The sum of FF and FFA is taken marker residue. The depletion of the marker residue in channel catfish, *Ictalurus punctatus* is faster at higher water temperature. To compare with other tissues, the elimination of the marker residue in kidney was slowest, Kidney was the main reservoir of the marker residue in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). It is proposed that withdrawal time were 234 °C·d and 224 °C·d respectively at 18 °C and 28 °C, According to the maximum residue limit (MRL) of the marker residue of 300 µg/kg in kidney. The reliable theory basis to make dosage regimen and withdrawal time at different water temperature based on the study [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14 (6): 1 010 – 1 016]

Key words: florfenicol; florfenicol amine; metabolite; channel catfish; marker residue; residue; depletion

Corresponding author: AI Xiao-hui. E-mail: aixh@yfi.ac.cn