

# HPLC方法研究土霉素在南美白对虾体内药物代谢及残留消除规律

郑重莺, 丁雪燕, 张海琪, 薛辉利, 柳 怡

(浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310012)

**摘 要:** 用高效液相色谱法研究南美白对虾口服土霉素药饵给药后, 在血液、肌肉和肝脏中的残留及消除规律。研究表明: 采用Agilent 1100型液相色谱仪可测定南美白对虾各组织中药物含量, 口服给药后0.5 h肝胰腺中土霉素浓度即达到峰值, 2h~12h之间肌肉、血液的浓度含量维持在一个较高的水平; 代谢到96h (4天) 时肌肉、血液、肝胰腺内土霉素含量已降低到检测限 ( $0.01\mu\text{g/g}$ ) 以下。本方法简便快速、检出限低、定量准确、精密度高。

**关键词:** 土霉素; HPLC; 药代动力学;

**中图分类号:** O657.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-8143 (2011) 05-0043-4

## Pharmacokinetics and Residues of Oxytetracycline in *Penaeus Vannamei* by HPLC

Zheng Chong-ying, Ding Xue-yan, Zhang Hai-qi, Xue Hui-li, Liu-yi

(Aquatic Product Quality Testing Center of Zhejiang Province, Zhejiang, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography vannamei after oral administration of oxytetracycline bait, blood, muscle and liver residue and elimination. The results show that: The Agilent 1100 High performance liquid chromatograph can be determined based *Penaeus* drug content of the tissue, the liver 0.5 h after oral administration of oxytetracycline concentration in the pancreas that peak, 2h ~ 12 h between the muscles, the blood concentration content remained at a high level; To 96h (4 days) when the muscles, blood, liver and pancreas oxytetracycline content has been reduced to the detection limit ( $0.01\mu\text{g/g}$ ) below. The method is simple, rapid, low detection limit, accurate, high precision.

**Keywords:** Oxytetracycline; HPLC; pharmacokinetics

土霉素 (Oxytetracycline, OTC) 属于广谱抗菌药物, 广泛地应用于水产养殖业中细菌性疾病的防治。各国在 90 年代以前都把土霉素作为一种重要的抗菌药物, 由于使用广泛, 人们已经注意到由它引起的副作用和其他潜在影响。据报道土霉素具有免疫抑制影响, 能导致肝损害, 长期使用会使细菌的抵抗力增强<sup>[1]</sup>。在水产动物上, 目前国内外已有报道土霉素在黑鲷 (*Sparus macrocephalus*)<sup>[2]</sup>、大鳞大马哈鱼 (*Oncorhynchus tshawytscha*)<sup>[3]</sup>、虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)<sup>[3]</sup>、香鱼 (*Plecoglossus altivelis*)<sup>[4]</sup>、鲤鱼 (*Cyprinus carpio* L.)<sup>[4]</sup> 等鱼类研究情况, 但在虾类中的研究尚未见报道。关于其它药物在对虾等甲壳类上的研究, 曾有诺氟沙星在斑节对虾<sup>[5]</sup>、磺胺

嘧啶 (SDM) 在南美白对虾<sup>[6]</sup>及盐酸环丙沙星 (禁用渔药) 在中华绒螯蟹<sup>[7]</sup>等药代动力学方面的报道, 本次试验用高效液相色谱法研究了土霉素在南美白对虾各组织中的代谢和消除情况, 为水产用药提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (配二极管阵列检测器), MILLIPORE 超纯水器, 梅特勒电子天平、离心机、恒温振荡器。

土霉素标准品, 纯度  $\geq 99.5\%$ , 中国兽药监察所

收稿日期 2011-5-4

作者简介 郑重莺 (1979~), 女, 工程师, 从事水产品质量安全检测工作。Email: zhengchong98@vip.sina.com

生产,三氯乙酸、磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸钠、柠檬酸钠、二甲基甲酰胺均为分析纯,乙腈、甲醇均为色谱纯,文中所用水均为超纯水。

配合饲料购自宁波天邦科技股份有限公司(原料经测定不含任何抗生素),按2%比例在空白饲料中添加土霉素,制成药饵。

## 1.2 方法

### 1.2.1 提取液、流动相和标准溶液的配制

1.2.1.1 提取液(4%三氯乙酸的磷酸氢二钠溶液):三氯乙酸4.0g溶于100ml 0.02mol/L磷酸氢二钠溶液,配制成4%的提取液(临用前配制)。

1.2.1.2 流动相:取0.026mol/L乙二胺四乙酸钠溶液60ml、0.2mol/L柠檬酸钠溶液12ml、0.25mol/L柠檬酸100ml与水810ml混匀配成缓冲液,再将甲醇、乙腈、二甲基甲酰胺、缓冲液按1.0:1.0:0.42:2.1(v/v)的比例配成流动相。

1.2.1.3 洗脱液:流动相多加入1/5体积的乙二胺四乙酸钠溶液,柠檬酸钠缓冲液和甲醇。

1.2.1.4 标准溶液:准确称取10.0mg土霉素标准品于100ml流动相中,配成100μg/ml储备液,用流动相依次稀释成10μg/ml、5μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.1μg/ml的标准中间液,于冰箱中4℃保存。

### 1.2.2 样品采集

以5d药饵投喂结束后的1h作为起始时间,从该时刻起按0.5h、1h、2h、4h、8h、24h、48h、72h、96h、120h、168h、10d、20d时间段,每次随机抽取对虾样本10尾,提取对虾的血液、肝胰腺、肌肉,于-18℃保存备用。为防止血液凝固,放置和提取血液的离心管和针筒均用0.2%肝素钠处理后使用。

### 1.2.3 样品的处理

样品的处理:准确称取1.0g组织(肌肉、肝胰腺)或准确吸取1ml血液样品,加入1ml三氯甲烷。

2ml提取液(1.2.2.1),16000r/min匀浆10s,再用2ml提取液清洗刀头,合并2次的提取液,振荡1min,5000r/min离心10min,取出全部上清液,用1/4体积的正己烷去脂肪,离心后取下层过固相萃取柱(SPE柱),再用2ml的水冲洗并吹干,加0.5ml的洗脱液(1.2.2.3)洗脱。收集流出液,进行HPLC测定。

### 1.2.4 仪器条件

色谱条件:ODS C<sub>18</sub>柱;柱温35℃;流速1.0ml/min;进样量20μl;紫外检测波长280nm;

流动相:甲醇、乙腈、N,N-二甲基甲酰胺、缓冲液=1.0:1.0:0.42:2.1(v/v)

### 1.2.5 回收率的确定

将3μg/ml、0.6μg/ml、0.3μg/ml土霉素标准液1ml加入空白样品1g(m),按样品处理方法(1.2.3)处理后,上机测定。每个浓度做5次重复。获得各样品的峰面积,再按标准曲线回归方程计算得土霉素的浓度值,并与原来加入量比较计算绝对回收率。

绝对回收率=(预处理后样品的药物峰面积/溶于流动相的药物峰面积)×100%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 线性范围和灵敏度

在10μg/ml、5μg/ml、2μg/ml、1μg/ml、0.5μg/ml、0.1μg/ml浓度范围内土霉素线性关系良好(相关系数r=0.99992)。该方法的最低检测限为0.01μg/g。

### 2.2 回收率的测定

土霉素以0.3μg/g、0.6μg/g、3μg/g 3个水平分别测其在肌肉、血液、肝胰腺中的回收,每个水平重复3次,求出各水平的平均回收率和3个水平的总平均回收率,如表1所示。

表1 土霉素在3种组织中的回收率

Table1 Recoveries of OTC in three tissues

| 浓度<br>(Concentration) | 肌肉<br>(muscle) | 血液<br>(Blood) | 肝胰腺<br>(Liver) |
|-----------------------|----------------|---------------|----------------|
| μg/g                  | %              | %             | %              |
| 0.3                   | 75.4±1.50      | 79.6±1.94     | 91.3±2.60      |
| 0.6                   | 87.7±1.12      | 83.1±2.12     | 88.5±4.80      |
| 3                     | 84.4±4.30      | 80.6±3.17     | 81.3±1.05      |
| 平均 Average            | 82.5           | 81.1          | 87.0           |

2.3 土霉素在组织中的浓度

肉、血液、肝胰腺样品内经 HPLC 检测所得平均药物浓度值；土霉素在肌肉、血液中药时曲线见图 1。

表 2 列出了南美白对虾喂药后，不同时间的肌

表2 OTC 在3种组织中的浓度

Table 2 Concentration of OTC in three tissues

| 时间<br>(Time) | 肌肉<br>(muscle) $\mu\text{g/g}$ | 血液<br>(Blood) $\mu\text{g/g}$ | 肝胰腺<br>(Liver) $\mu\text{g/g}$ |
|--------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0.5h         | 0.48 $\pm$ 0.01                | 0.48 $\pm$ 0.03               | 9.64 $\pm$ 0.10                |
| 1h           | 0.57 $\pm$ 0.01                | 1.26 $\pm$ 0.02               | 12.2 $\pm$ 0.01                |
| 2h           | 0.75 $\pm$ 0.02                | 1.73 $\pm$ 0.02               | 14.8 $\pm$ 0.50                |
| 4h           | 0.63 $\pm$ 0.01                | 1.51 $\pm$ 0.02               | 12.1 $\pm$ 0.10                |
| 8h           | 0.58 $\pm$ 0.00                | 1.07 $\pm$ 0.03               | 9.74 $\pm$ 0.02                |
| 12h          | 0.68 $\pm$ 0.01                | 0.56 $\pm$ 0.01               | 5.66 $\pm$ 0.20                |
| 24h          | 0.37 $\pm$ 0.00                | 0.34 $\pm$ 0.01               | 2.33 $\pm$ 0.20                |
| 48h          | 0.36 $\pm$ 0.01                | 0.35 $\pm$ 0.01               | N.D.                           |
| 72h          | 0.12 $\pm$ 0.01                | 0.12 $\pm$ 0.02               | N.D.                           |
| 96h          | N.D.                           | N.D.                          | N.D.                           |

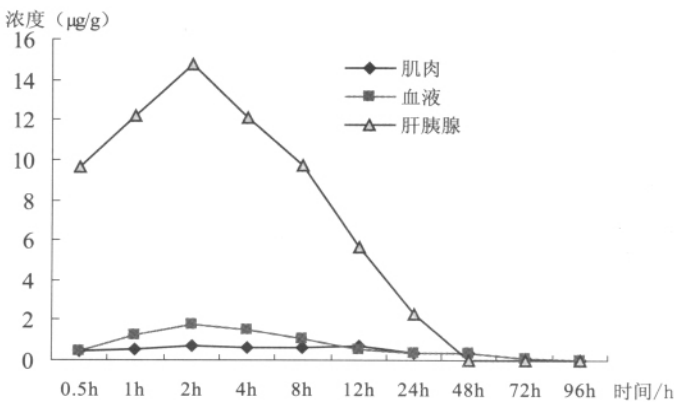


图1 南美白对虾体内药物浓度变化规律

2.4 土霉素在南美白对虾体内的变化情况

南美白对虾在口服土霉素后,0.5h后即可在肌肉、血液、肝胰腺中检测到药物的存在,浓度分别为0.48、0.48、14.8 $\mu\text{g/g}$ ,在2h后药物采样浓度达到最高,分别为0.75、1.73、14.8 $\mu\text{g/g}$ 。药物浓度在肌肉中最小,血液中稍大,但两者差别不大。药物由肝胰腺代谢后排出体外,在肝胰腺中药物浓度最大。在喂药后2小时~12小时之间肌肉、血液和肝胰腺中的浓度含量变化不大,均维持在一个比较高的水平上。药物在代谢到48h后,肝胰腺中未检出有土霉素,然而代谢到72h时,药物在肌肉和血液中仍然可以检出,分别为0.12、0.12 $\mu\text{g/g}$ ,说明土霉素在肌肉和血液中的代谢速度较为缓慢。

3 结论

本文所采用的 HPLC 测定南美白对虾肌肉、血液、肝胰腺中检测方法检出限为 0.01 $\mu\text{g/g}$ ,远低于《水产品中土霉素、四环素、金霉素残留量的测定》(SC/T3015-2002)方法中规定的土霉素 0.05 $\mu\text{g/g}$  的检出限。同时利用该检测方法进行了实际应用,测定了南美白对虾肌肉、血液、肝胰腺中药物浓度的变化规律,在给药量为 40mg/kg~60 mg/kg 的情况下,72h (3 天) 内肌肉、血液中的药物残留超过欧美和我国渔药安全使用残留限量 (0.1 $\mu\text{g/g}$ ),到 96h (4 天) 时已降低到残留限量以下。可以推断在较低温

度内土霉素在南美白对虾中的休药期为4天,比NY5071-2002《渔药使用准则》中规定的土霉素休药期要短得多。

## 参考文献

- [1] Elema M.O. et al. Bioavailability of Oxytetracycline from Medicated Feed Administered to Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Seawater. *Aquaculture*, 1996, 143:7~14.
- [2] 王群等. 土霉素在黑鲷体内的药物代谢动力学研究. *海洋水产研究*, 2001, 22 (1) : 6~11.
- [3] Abedini S. et al. Comparative Pharmacokinetics and Bioavailability of Oxytetracycline in Rainbow Trout and Chinook Salmon. *Aquaculture*, 1998, 168:23~32.
- [4] Uno K. Pharmacokinetics Study of Oxytetracycline in Healthy and Vibriosis—Infected Ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 1996, 143:33~42.
- [5] 房文红等. 斑节对虾血淋巴中诺氟沙星含量测定及药代动力学[J]. *水生生物学报*, 2003, 27 (1) : 13~17.
- [6] 李静云等. 磺胺间甲氧嘧啶在中国对虾体内的药代动力学研究. *海洋水产研究*, 2006, 27 (4) : 42~47.
- [7] 杨先乐, 刘至治, 横山雅仁. 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内药物代谢动力学研究 [J]. *水生生物学报*, 2003, 27 (1) : 18~22.
- [8] 李美同等. 土霉素在鳗鲡组织中残留的消除规律. *水产学报*, 1997, 21 (1) : 39~43.
- [9] 辛福言等. 高效液相色谱仪分析鲤鱼体内土霉素残留的研究. *海洋水产研究*, 1998, 17 (1) : 71~74.
- [10] 林春友等. 淡水养殖鱼类病原菌药敏实验. *水利渔业*, 2004, 24 (3) : 58~59.

## 《福建分析测试》承办国内外广告业务， 欢迎联系刊登

(广告经营许可证编号 3500004000002)

联系人 郭升平

E-mail: [gftot@163.com](mailto:gftot@163.com)

电话: (086591) 87830371 传真: (086591) 87816597