

HPLC 法研究磺胺类药物在水产动物体内的代谢和残留

EXPLORATORY PHARMACOKINETICS AND RESIDUES OF SIX SULFO-NAMIDE IN AQUATIC ANIMAL BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

王 群¹ 马向东² 李绍伟³

(1 青岛海洋大学水产学院 266003)

(2 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071)

(3 山东省昌邑市海洋与水产局 261300)

目前国外获准用于防治水产动物疾病的药物有十几种,常使用的有磺胺嘧啶、磺胺-2,6-二甲氧嘧啶、磺胺异噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺脒、甲氧苄氨嘧啶等。关于该类药物的药效学、代谢动力学及临床疗效方面的研究内容国内外已有不少报道,但国内在水产养殖方面的报道还不多,且主要偏重于药效和临床应用。随着世界经济一体化的发展,为保障食用者的健康,国际贸易对水产养殖产品安全卫生质量的要求越来越高,FAO、欧美等要求对水产养殖全过程实行质量管理,提高产品质量卫生水平,我国也将全面落实以 HACCP 等为核心的科学质量管理规范。渔用药物的安全问题近期将受到普遍关注。

1 磺胺类药物在组织中的测定方法

1.1 磺胺间甲氧嘧啶 (Sulphamonomethoxine, SMM)

Uno 1997 年报道了虹鳟和黄尾鲷血清中磺胺间甲氧嘧啶 (SMM) 的 HPLC 检测方法^[1], 色谱条件: HISEPTM shielded hydrophobic phase 柱, 流动相为 0.05 mol/L 柠檬酸: 0.2 mol/L 磷酸氢二钠: 乙腈 (70:15:15 V/V), 流速为 1.0 ml/min, 紫外检测, 波长 265 nm, 灵敏度 0.02 AUFS。虹鳟和黄尾鲷血浆中的磺胺间甲氧嘧啶 (SMM) 及其代谢物 (AC-SMM) 的回收率分别为 96.6 % 和 93.9 %, 98.0 % 和 95.0 %。

Ueno 报道了用 HPLC 法研究 SMM 在养殖鳗鲡体内的药物代谢动力学和生物利用度 (Bioavailability)^[2], 制样过程: 组织匀浆, 用丙酮萃取药物, 在收集的丙酮中加入正丙醇浓缩到一定体积,

转移到分液漏斗中, 再加入丙酮、正己烷和 3 % 的氯化钠混合液, 摇匀、静置, 弃去有机层, 再用正己烷处理二次, 水层转移到另一分液漏斗中, 加入氯仿, 收集有机层并浓缩到一定体积, 过 Sep-Pak Alumina B 柱, 用 70 % 乙腈洗脱, 洗脱液蒸干, 用 30 % 已腈溶解后进样, 进样量 20 μ l。色谱条件: YMC-PacK C18 柱, 流动相为 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=2.5): 乙腈 (65:35 V/V), 流速 0.5 ml/min, 紫外检测, 波长 265 nm。磺胺间甲氧嘧啶 (SMM) 的生物利用度是 24.0 %, 乙酰化程度为 3.1 %, 最低检测限 0.05 μ g/ml。

1.2 磺胺-2,6-二甲氧嘧啶 (Sulfadimethoxine, SDM)

Kleinow 1992 年报道了 SDM 在虹鳟体内的分布、代谢、生物利用度和药物代谢动力学。制样过程: 取血浆和尿液作为样品, 用 0.01 mol/L 盐酸酸化, 漩涡振荡, 用乙酸乙酯萃取药物, 取乙酸乙酯层过无水硫酸钠柱。对于组织样, 用 0.01 mol/L 盐酸搅匀, 用正己烷和乙酸乙酯充分提取。

Zheng 1994 年报道了用 HPLC 法检测大麻哈鱼 (Chinook Salmon) 体内的 SDM 及其乙酰化代谢物 AC-SDM。制样过程: 称取一定量组织, 加入内标磺胺异噻唑 (Sulfisoxazole, SIZ) 和 0.5 mol/L 羟基四丁铵 TBAH (Tetrabutylammonium hydroxide) 及 (pH=10) 的碳酸钠和碳酸氢钠混合液及 1 mol/L 的氢氧化钠混合, 用二氯甲烷萃取药物, 并加入无水硫酸钠漩涡混合, 取有机层用氮气在 40 $^{\circ}$ C 水浴中吹干, 残渣用流动相溶解, 用超滤膜过滤后进样。色谱条件: 离子

收稿日期: 1999-08-30; 修回日期: 1999-09-15

交换柱,流动相为乙腈:甲醇:0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH=2.5)(11:23.4:75 V/V),流速为1.0 ml/min,紫外检测,波长280 nm,灵敏度为0.01 AUFS。SDM 及其代谢物 AC-SDM 在肌肉中的回收率分别是78%和83%,在肝脏中的回收率分别是61%和72%,最低检测限:肌肉组织为 0.05×10^{-6} ,肝脏为 0.20×10^{-6} 。

Walker 1994 年报道了用 HPLC 法简单、快速、同时测定斑点叉尾鲟(Channel Catfish)肌肉和血浆中的 SDM 及其乙酰化代谢物 AC-SDM。制样过程:取样品,加入内标(SMX)和 C18,充分研磨并转移到一柱子内,用正己烷冲洗并弃去正己烷,用二氯甲烷洗脱,洗脱液于 35 °C 用氮气吹干,残渣用流动相溶解,离心,超滤膜过滤后进样。色谱条件:反相 ODS 柱,流动相为 0.017 mol/L 磷酸(pH=2.4):乙腈(71:29 和 73:27 V/V,分别用于测肌肉和血浆),流速为 0.4 ml/min,二极管阵列检测器,检测波长 265 nm,SDM 在肌肉中的回收率是 79%,在血浆中的回收率是 67%。

Milner 1994 年报道了斑点叉尾鲟口服 Romet30 后,其体内的 OMP 和 SDM 的残留情况。制样过程:取冷冻组织,加入 TBAH、碳酸钾-硼酸钾缓冲液(pH=10,0.05 mol/L)和 1 mol/L 的氢氧化钠,摇匀,加入二氯甲烷,匀浆样品,离心,弃去水层,有机层转移到聚丙烯试管中(内含 1.5 g 无水硫酸钠),摇匀,离心,收集样品以备进样。色谱条件:u Porasil silica 柱,流动相为氯仿:甲醇:重蒸水:浓缩氨水(2 000:56:4:1.2, V/V),紫外检测,波长 288 nm,流速为 2 ml/min。SDM 和 OMP 的回收率分别为 92%和 108%。

Park 1995 年报道了 SDM 和(Ormethoprim OMP)在对虾体内的生物利用度和药物代谢动力学^[3]。制样过程:取血淋巴,加入碳酸钾缓冲液(pH=10,0.05 mol/L)和 0.4 mol/L 的 TBAH,用二氯甲烷萃取,离心,弃去水层,有机层用于进样分析,进样量 400 μ l;对于肌肉组织,加入碳酸盐缓冲液、0.1 mol/L 氢氧化钠、0.4 mol/L 的 TBAH,匀浆,用二氯甲烷萃取,离心并弃去水层,有机层加入无水硫酸钠,摇匀,离心后进样,进样量 400 μ l。色谱条件:Waters 不锈钢 u Porasil 柱,流动相为氯仿:甲醇:水:氨水(500:14:1:0.3 V/V),流速为 2.0 ml/min。血淋巴中 SDM 和 OMP 的回收率分别为(81%~104%)和(87%~110%);组织中的回收率分别为(96%~115%)和(100%~107%)。

Samuelen 1997 年报道了 Romet30(用 SDM 和 OMP 合成的一种药物)在大西洋鲑(Atlantic Salmon)体内的药物代谢动力学^[4],用 HPLC 法检测。制样过程:血浆中加入内标磺胺甲基异恶唑(Sulphamethoxazole, SMX),用三氯甲烷提取,离心,上清液进样;肌肉、肝脏、肾脏组织加入溶液 A 和甲醇(80:20 V/V),匀浆,甲醇中含有内标(SMX),匀浆后液体转移到含有甲醇的离心管中,再离心后进样。色谱条件:ODS-Hypersil C18 柱,流动相为 75%的溶液 A 和 25%的溶液 B(溶液 A:溶解离子对试剂磺胺 1-庚酸钠盐到 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液中,用 5 mol/L 的磷酸调节 pH=2.8,溶液 B:乙腈中含有 0.1%三乙胺),紫外检测,波长 270 nm,流速为 1 ml/min。

1.3 磺胺嘧啶(Sulphadiazine, SDZ)

Gentleman 1993 年报道了用 HPLC 法检测大鳞大麻哈鱼肌肉内的 SDM 和 TMP 浓度,采用沙丁胺醇(Salbutamol, SAL)和 p-甲苯磺酰(p-toluenesulphonamide, PTS)作为内标。制样过程:取绞碎组织,加入内标和标准液,用以腈作为萃取剂,匀浆,离心,37 °C 水浴中用氮气吹到 0.5 或 1 ml,再用蒸馏水调到 2 ml,振荡,离心,过 C18 Sep-Pak 固相萃取柱,用甲醇洗脱,洗脱液在 37 °C 水浴中用氮气吹干,然后用 0.5 ml 甲醇溶解,超滤膜过滤后进样。SDZ 的色谱条件:离子交换柱,流动相为甲醇:0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=2.5)(17:83 V/V),紫外检测,波长 280 nm,流速为 1.0 ml/min;TMP 的色谱条件:离子交换柱,流动相为乙腈:0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=2.5)(5:95 V/V),紫外检测,波长 224 nm,流速为 1.0 ml/min。SDM 和 TMP 的回收率分别为 63%和 42%,最低检测限是 0.1×10^{-6} 。

Gehring 1995 年报道了用柱后衍生化(Post column Derivatization)和荧光检测来测定 SDZ 在鲑鱼体内的含量,HPLC 法^[5]。制样过程:取组织,加入标准液结合 30 min,加入流动相,匀浆 1 min,用乙腈提取,将有机液放入分液漏斗中(内含蒸馏水和丙二醇),再加入二氯甲烷,摇匀后,收集二氯甲烷层,用旋转蒸发器于 65 °C 水浴上蒸到 2~3 ml,再加入 3 ml 二氯甲烷混合,取溶液过固相萃取柱,乙腈冲洗,用洗脱液洗脱,收集洗脱液以备进样。色谱条件:ODS 柱,流动相为乙腈:2%乙酸(10:90 V/V),扫描荧光检测器,流动相的流速为 1.0 ml/min,衍生化荧光胺溶剂的流速为 0.2 ml/min,衍生化反应器的温度为 70 °C。检测:放大系数, $\times 100$;激发波长,400 nm;发射波长 495 nm。

1.4 几种磺胺类(Sulfamethazine)药物的同时测定

Uno 1993 年报道了 HPLC 法研究 SMM 和 SDM 在虹鳟体内的药物代谢动力学。本文的制样过程与 Ueno 1998 年报道的一样^[2]。色谱条件:YMC-Pack C18A-303 prepacked 柱,柱温 20℃。流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH=2.5);乙腈(65:35 V/V)紫外检测,波长 265nm,流速 0.5ml/min,灵敏度 0.04AUFS。

Samuelsen 1997 年报道了用 HPLC 法研究四种磺胺类药物和一种抗菌增效剂在大西洋庸鲈(Atlantic halibut)体内的吸收、分布和代谢^[6]。四种磺胺类药物分别是 SDM,磺胺二甲噻啶(Sulphadimidine, SDD),磺胺甲基异恶唑(Sulphamethoxazole SMZ),磺胺胍(Sulphaguanidine SGD);抗菌增效剂为甲氧苄啶(Trimethoprim TMP)。磺胺噻啶(Sulphadiazine SDZ)作为 SGD,SMZ 和 SDM 的内标,SDM 作为 SDD 和 TMP 的内标。制样过程:取组织样,加入溶液 A:甲醇(80:20 V/V)后匀浆,甲醇中含有内标,匀浆液转移到一含有甲醇的聚丙烯离心管中,离心后进样。色谱条件:ODS 柱,TMP 和 SDM,SDD,SDZ 及其乙酰化代谢物的流动相为 75%A:25%B,SGD 及其乙酰化代谢物的流动相为 90%A:10%B(溶液 A:将 0.02 mol/L 的离子对试剂磺胺 1-庚烷钠盐溶于 0.025 mol/L 磷酸氢二钠缓冲液,用磷酸调节 pH=2.8;溶液 B:含 0.1%三乙胺的乙腈),紫外检测,波长 270 nm,流速 1.0 ml/min。

Gehring 1997 年报道了用液相色谱通过柱后衍生化和荧光检测来检测鲑鱼组织中的 14 种磺胺类药物^[8]。这 14 种磺胺类药物分别是:磺胺(Sulfanilamide SN),SD,ST,磺胺吡啶(Sulfapyridine SP),SM1,SM2,磺胺甲噻二唑(Sulfamethizole),磺胺甲氧吡啶(Sulfamethoxypyridazine SMPZ),磺胺氯达嗪(Sulfachloropyridazine),SMM,磺胺多辛(Sulfadoxine),SMZ,SDM,磺胺喹啉(Sulfaquinoxoline)。制样过程与 Gehring 1995 年报道的一样^[5];色谱条件:C18 柱,扫描荧光检测,流动相的流速 1.0 ml/min;衍生化荧光胺的流速为 0.2 ml/min,梯度洗脱:100%流动相 A 到 100%流动相 B,洗脱 30 min。[流动相 A:乙腈:甲醇:2%乙酸(5:10:85 V/V);流动相 B:乙腈:甲醇:2%乙酸(25:10:65 V/V)],衍生化反应器的温度:70℃。检测:放大系数,×100,激发波长:400 nm;发射波长:495 nm。回收率约为 80%~90

%。

Jen 1998 年报道了用 HPLC 法同时检测猪废水中的 7 种磺胺类药物^[7]。这 7 种磺胺类药物分别是:磺胺噻啶(Sulfamerazine, SD),磺胺塞唑(Sulfathiazole ST),磺胺甲噻啶(Sulfamerazine SM1),磺胺二甲噻啶(Sulfamethazine SM2),磺胺酯酰胺(Sulfacetamide SA),SMZ,SMM。制样过程:取废水样(用乙酸调到 pH=6.6),放入分液漏斗中,加入烟酰胺和乙酸乙酯,摇动,静置,将乙酸乙酯层转移到烧瓶中,90℃水浴蒸到 0.5 ml,残留物用 0.01 mol/L 盐酸溶解,并用水定容后进样。色谱条件:反相 ODS 柱,流动相为 20%甲醇溶于 0.1 mol/L pH=6.6 的乙酸缓冲液,紫外检测,波长为 260 nm,流速 1.0 ml/min。这几种药物的回收率能达到 86%~99%。

2 磺胺类药物在组织中的代谢情况

2.1 磺胺间甲氧嘧啶(SMM)

Uno 1997 年报道了 SMM 在虹鳟和黄尾鲷体内的代谢情况^[1],按 100×10^{-6} 的剂量注射给药,药物在体内的代谢符合二室动力学模型。Ueno 1998 年以两种不同的给药途径研究 SMM 在鳗鲡体内的代谢^[2],注射给药剂量为 200×10^{-6} ,口服给药为 400×10^{-6} ,经研究表明,注射给药符合二室动力学模型;口服给药符合一室动力学模型。Uno 1993 年用口服方法研究 SMM 在虹鳟体内的代谢,给药量为 300×10^{-6} ,药物代谢符合一室动力学模型。SMM 在几种鱼体内的动力学参数见表 1。

2.2 磺胺-2,6-二甲氧嘧啶(SDM)

SDM 作为一种磺胺类药物,通常与 OMP 联合使用,起到抗菌增效作用。目前作为商品出售的 Romet-30(SDM:OMP 为 5:1)已被美国和加拿大允许应用于控制水产动物疾病,有关 SDM 和 OMP 的药物代谢,国外已有不少报道。Jame 和 Barron 1988 年,Barron 等 1988 年,Jame 和 Herbert 1988 年,Kleinow 等 1992 年研究 SDM 和 OMP 在龙虾体内的代谢情况;Squibb 等 1988 年,Plakas 1990 年报道了该药在斑点叉尾鲷体内的代谢;Kleinow 和 Lech 1988 年,Kleinow 1992 年,Droy 1989 年研究了鳟鱼体内该种药物的代谢情况。另外,Park 1995 年研究了对虾体内的 SDM 和 OMP 的代谢情况^[6],经研究表明两种药物的代谢都符合二室动力学模型。有关 OMP 和 SDM 的生物利用度、半衰期、稳态时的分布容积等代谢参数见表 2。

表 1 注射给药后,SMM 的药代动力学参数

鱼体	虹鳟	黄尾鲷	鳗鲡
水温(℃)	15.0±0.3	21.3±0.2	27
重量(g)	171±15	638±68	156
剂量($\times 10^{-6}$)	100	100	200
$C_0(\mu\text{g/ml})$	342	37	/
$A(\mu\text{g/ml})$	219	211	/
$B(\mu\text{g/ml})$	123	160	/
$\alpha(\text{h}^{-1})$	1.6	1.3	2.74
$\beta(\text{h}^{-1})$	0.02	0.01	0.008
$T_{1/2\alpha}(\text{h})$	0.4	0.5	0.25
$T_{1/2\beta}(\text{h})$	30.9	5.8	86.6
$K_{el}(\text{h}^{-1})$	0.060 8	0.247 2	0.025
$K_{12}(\text{h}^{-1})$	0.979	0.553	1.91
$K_{21}(\text{h}^{-1})$	0.593	0.635	0.82
$AUC(\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{h}))$	5 398	1 500	59 100
$Cl_B(\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{h}))$	18.5	66.7	3.38
$V_d(\text{L/kg})$	0.8	0.5	0.45
$V_c(\text{L/kg})$	0.3	0.3	0.14

注: C_0 : 零时血浆药物浓度, A : 分布相的零时截距, B : 消除相的零时截距, α : 分布相斜率, β : 多室模型药物的表现一级消除速率常数, $T_{1/2\alpha}$: 药物的分布相半衰期, $T_{1/2\beta}$: 药物的消除相半衰期, k_{el} : 药物自中央室消除的一级消除速率常数, K_{12} : 药物自中央室到周边室的一级转运速率常数, K_{21} : 药物自周边室到中央室的一级转运速率常数, AUC : 血药浓度-时间曲线下总面积, Cl_B : 药物自体内消除的总清除率, V_d : 表现分布容积, V_c : 中央室的表观分布容积。

3 磺胺类药物研究的注意点

磺胺类药物作为一种广谱抗菌药, 已经成为医学

表 2 SMM 和 OMP 在几种养殖动物体内的药代动力学参数

药物	物种	$F(\%)$	$T_{1/2\alpha}(\text{h})$	$T_{1/2\beta}(\text{h})$	$V_{ss}(\text{ml/kg})$	参考文献
SMM	鳙鱼	34.64	0.6	17	422	Kleinow 等, 1988; Kleinow, 1992a
	鲢鱼	31.34	0.1	13	662	Squibb 等, 1988
	龙虾	55.46	2.0	77	1 369	James 等, 1988a; Barron 等, 1988
	对虾	30	3.2	9	1 319	Park 等, 1995
OMP	鳙鱼	87	0.5	17.5	4 854	Droy 等, 1989
	鲢鱼	52	/	/	5 503	Plakas 等, 1990
	龙虾	/	0.2	1.5	/	James 等, 1988b; Kleinow 等, 1992b
	对虾	32	0.5	17.8	34 382	Park 等, 1995

参考文献

1 Uno, K. *et al.*. *Aquaculture*, 1997, 153: 1~8
 2 Ueno, R.. *Fish Pathology*, 1998, 33: 297~301
 3 Park, E. D. *et al.*. *Aquaculture*, 1995, 130: 113~128
 4 Samuelsen, O. B. *et al.*. *Aquaculture*, 1997, 152: 13~24

和兽医学研究开发的热点, 开展该类药物的代谢和残留工作已经成为必须进行的一向重要工作, 根据现有的研究情况, 开展研究时应注意以下几点。

3.1 同一种磺胺类药物在不同养殖动物体内的代谢情况是不同的, 如 SMM 在不同鱼、虾体内的代谢情况有很大差别, 代谢参数见表 1。

3.2 据 Uno 等 1993 年报道, 不同种类的磺胺类药物的代谢情况是不同的, SDM 和 SMM 在虹鳟体内的代谢情况不同, 同样条件下, SMM 的吸收和消除都比 SDM 慢。

3.3 同一种药物, 不同的剂量、投喂次数和不同的给药途径都会有不同的代谢结果。

3.4 药物的最低检测限至少应达到该类药物允许残留量的标准以下, 高效液相色谱法的检测限较低, 约为 0.01×10^{-6} 到 0.05×10^{-6} , 能够满足绝大多数药物的残留标准, 建议作为检测药物残留的首选方法。

3.5 磺胺类药在组织中的残留比较大, 根据我国农业部 1998 年制定“兽药及其它化学物质在动物可食性组织中残留检测方法”, 磺胺类药物在可食性动物组织中的允许残留标准为 0.1×10^{-6} 到 0.3×10^{-6} 。Uno, K. 等 1993 年报道 SDM 和 SMM 的停药期约为 30 d 左右。所以养殖水产品使用磺胺类药物上市前应注意适当的停药期。

5 Gehring, T. A. *et al.*. *J. AOAC Int.*, 1995, 78: 1 161~1 164
 6 Samuelsen, O. B. *et al.*. *J. Fish Dis.*, 1997, 20: 287~296
 7 Jen, J. F. *et al.*. *J. Chromatogr.*, 1998, 793: 378~382
 8 Gehring, T. A. *et al.*. *J. AOAC Int.*, 1997, 80: 751~755