

# 甲基睾丸酮在尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 肌肉中的代谢和消除规律研究\*

祝璟琳 邹芝英 杨 弘 李大宇 肖 炜 卫程亮

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室 无锡 214081)

**提要** 在实验水温(28±2)℃条件下,以 60mg/kg 单剂量甲基睾丸酮对尼罗罗非鱼混饲口灌给药后,采用超高效液相色谱-串联质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定尼罗罗非鱼肌肉中的药物水平,研究甲基睾丸酮在尼罗罗非鱼肌肉中的代谢及消除规律。结果表明,肌肉中药物浓度时间数据符合一级吸收二室开放模型,主要药代动力学参数达峰时间  $T_{(peak)}$  为 3.04h,质量浓度  $C_{(max)}$  为 33.331ng/g,消除半衰期  $T_{(1/2)\beta}$  为 23.073h。肌肉中甲基睾丸酮浓度 24h 内呈指数型下降,具有较高的消除速率,其后消除得较缓慢,消除方程符合  $C = 46.18e^{-0.101t}$ 。29d 后罗非鱼肌肉中甲基睾丸酮水平在美国 FDA 的检测限 0.8ng/g 以下,给药 120d 后肌肉中检测不到甲基睾丸酮残留。

**关键词** 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS), 尼罗罗非鱼, 甲基睾丸酮, 代谢, 消除  
**中图分类号** S91

17 $\alpha$ -甲基睾丸酮(17 $\alpha$ -methyltestosterone, MT)又名甲睾酮、甲基睾酮、甲基睾丸素,是一种人工合成类固醇类药物,具有雄性化和蛋白同化双重作用。在水产养殖上对硬骨鱼具有鱼苗培育中性别控制和促生长的作用(李家乐等, 1997; Al-Ablani *et al.*, 1997; Pawlowski *et al.*, 2004; Kerstin *et al.*, 2006; Turan *et al.*, 2006)。由于雄性罗非鱼比雌性罗非鱼生长快,除了通过杂交获得雄性罗非鱼外,投喂甲基睾丸酮也是国内外育苗场培育全雄罗非鱼的手段之一。研究表明,甲基睾丸酮极小的残留量对人类都具有巨大的潜在危害,比如肝中毒和胎体中毒等(Vick *et al.*, 2001)。因此,欧盟 95/22/EC 规定禁止使用雄性激素药物。在美国甲基睾丸酮也不允许在食用鱼养殖上使用,但获准作为研究用动物新药申请(INAD, Investigational New Animal Drug Application)在罗非鱼苗种性转阶段应用,使用后最短休药期为 120d,并将在可食部分的残留检测作为食品和药物管理局(FDA, Food and Drug Administration)常规检测项目之一,其检测限是

0.8ng/g (Green *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2006)。我国 2001 年农业部实施的行业标准《无公害食品水产品中渔药残留限量》(NY5070-2001)和 2003 年农业部发布的 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》都规定在所有动物性食品的所有可食组织中不得检出甲基睾丸酮。

为了做好对甲基睾丸酮的监控,了解它在水产动物体内的代谢动力学参数和消除规律显得十分重要,但目前关于水产品中甲基睾丸酮代谢和消除规律的研究比较少,仅在银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*) (Fagerlund *et al.*, 1979)、莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*) (Johnstone *et al.*, 1983)、尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) (邹琴等, 2010)、奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*) (Goudie *et al.*, 1986)、大西洋鲑(*Atlantic salmon*) (Cravedi *et al.*, 1993)、虹鳟(*Salmo gairdnera*) (Johnstone *et al.*, 1983; Cravedi *et al.*, 1993)和大梭鱼(*Esox masquinongy*) (Rincharde *et al.*, 1999)上,大部分都是采用放射性同位素示踪的方法,

\* 现代农业产业技术体系建设专项资金, CARS-49 号; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目, 2009JBF04 号; 农业部农业科研杰出人才及其创新团队项目“现代农业人才支撑计划经费”资助。祝璟琳, 助理研究员, E-mail: zhuji@ffrc.cn

通讯作者: 杨 弘, 研究员, E-mail: yangh@ffrc.cn

收稿日期: 2011-12-21, 收修改稿日期: 2012-02-25

研究甲基睾酮促使鱼苗性转后在其体内的代谢和消除情况。组织中的甲基睾酮残留量取决于给药史和药物代谢动力学参数, 而代谢动力学参数必须是在一定的环境条件下, 针对特定的种和一定的鱼体规格取得的(Vick *et al.*, 2001)。本实验以 50g 大小的尼罗罗非鱼鱼种为实验对象, 在水温(28±2)℃条件下, 以 60mg/kg 甲基睾酮单剂量混饲口灌给药后, 采用超高效液相色谱-串联质谱联用(UPLC-MS/MS)法测定尼罗罗非鱼肌肉中的残留水平, 研究甲基睾酮在尼罗罗非鱼肌肉中的代谢和消除规律, 对加强甲基睾酮管理和监控, 保证食品安全等均具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)埃及品系来自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心国家罗非鱼产业技术体系研发中心保种基地, 大小为(50±5)g, 健康无病, 在苗种阶段没有投喂任何雄性激素。实验前暂养两周, 水温用加热棒控制在(28±2)。

### 1.2 药品与试剂

甲基睾酮(MT)标准品购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 氘代甲基睾酮(MT-d3)标准品购于荷兰国家公共卫生与环境研究所(rivm), 甲基睾酮原粉(纯度>98.0%)购于杭州日月动物药品有限公司, 乙腈、乙酸乙酯、甲醇、正己烷、甲酸均为 Merck 公司色谱级产品, 氯化钠为分析纯。

### 1.3 实验仪器与设备

超高效液相色谱(ACQMITY UPLCTM): Waters 公司; 质谱仪(MALDI SYNAPT Q-TOF MS): Waters 公司; 12 位固相萃取装置, Si-SAX SPE 小柱(SamliQ, 3ml, 500mg)和 Florisil SPE 小柱(SamliQ, 6ml, 1000mg): Agilent 公司; 均质机: FLUKO 公司; Talboys 旋涡混合器: Troemner 公司; PTFE 针式过滤器(13mm, 0.2μm): Waters 公司; 12 位氮吹仪: 上海安谱科学仪器有限公司; 超声波清洗器: 上海之信仪器有限公司。

### 1.4 实验设计与采样

实验用鱼共分 17 组, 每组 8 尾, 另取 8 尾未给药尼罗罗非鱼作空白对照。采用少许 95% 乙醇溶解 300mg 甲基睾酮, 加入鳊鱼饲料 10g 左右, 搅拌成糊状, 加水体积定容至 100ml, 此糊状饲料中甲基睾酮含量为 3mg/ml, 药饵口灌给药剂量为 60mg/kg, 根据罗非鱼重量计算每条鱼的口灌量。将糊状药物饲

料用 2ml 注射器接硅胶软管从罗非鱼口中插入, 注意插入深度, 要求不漏饵, 无回吐者作为实验对象保留。给药前停饲 1 天, 于给药后 1h、5h、8h、12h、24h、2d、3d、4d、6d、10d、16d、22d、29d、45d、60d、90d 和 120d 后取鱼背部肌肉, 每个时间点取 5 尾鱼采样, 将样品放入-80℃冰箱用于实验分析。

### 1.5 样品前处理

称取鱼背肌 5.000g (精确到 0.01g), 剪碎后放入 50ml 的聚丙烯离心管中, 加入 0.5μg/ml 的 MT-d3 内标 100μl, 静置吸收 20min 后, 加 10ml 乙腈, 简短旋涡混合分散组织, 用均质机高速匀浆后置于旋涡混合器上旋涡 5min, 然后 15℃ 3800r/min (约 3000g)离心 5min 后, 将上清液(乙腈组分)转入 20ml 的玻璃离心管。重复抽提一次。合并的乙腈组分子于 50℃氮吹至 0.5ml。每一个样品加入 2ml NaCl 溶液(0.25g/ml), 然后加 5ml 100%乙酸乙酯液液分配两次。乙酸乙酯组分进行合并, 并用 2ml 水进行冲洗, 吸取上层乙酸乙酯于 50℃氮吹至干。加入 1ml 甲醇, 旋涡混合 15s, 超声波降解 5min 溶解残渣, 每个样品加入 1ml 水, 简短旋涡混合, 上固相萃取柱净化。

Si-SAX SPE 柱以 2ml 甲醇, 2ml 50%甲醇水溶液(50/50, V/V)活化平衡后。样品上柱后导入收集管。样品管用 2ml 50%的甲醇水溶液(50/50, V/V)漂洗后上柱, 漂洗液导入收集管, SPE 柱进行真空干燥。洗提液 50℃氮吹至 1.8ml。每个样品用 3ml 的正己烷液液分离 3 次, 旋涡, 静置, 取上清, 合并至收集管以进行下一步的净化。

Florisil SPE 柱以 4ml 乙酸乙酯, 4ml 正己烷活化平衡后。合并的正己烷提取液装载上柱, 以低于 2 滴/s 流通过柱。样品管用 2ml 乙酸乙酯/正己烷(10/90, V/V)冲洗后上柱, 弃废液。用两份的 4ml 乙酸乙酯/正己烷(60/40, V/V)洗脱液洗柱子, 柱子不能进行真空干燥, 洗脱物导入 12ml 收集管, 然后于 50℃氮吹至干。每个收集管加入 1ml 甲醇, 旋涡混合 15s, 再次于 50℃氮吹至干。残渣加入 500 μl 40%的甲醇水溶液(40/60, V/V), 简短旋涡混合, 超声 5min, 再次进行旋涡混合。过 0.2 μm 滤膜后, 供 UPLC-MS/MS 测定用。

### 1.6 UPLC-MS/MS 分析条件

(1) 色谱条件 色谱柱: BEH C18 分析柱(2.1×100mm, 1.7μm); 流动相: A: 含 0.1%甲酸的甲醇溶液(V/V); B: 含 0.1%甲酸的水溶液(V/V); 柱温: 45℃; 进样量: 5μl。运行时间 10min, 梯度洗脱程序为 40%

A(0.0min) 100% A(7.0min) 100% A(8min) 40% A(8.5min), 流速 0.3ml/min。

(2) 质谱条件 离子化模式: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式; 采集方式: 选择离子监测; 毛细管电压: 3.5kV; 锥孔电压: 30V; 离子源温度: 100℃; 脱溶剂气温度: 250℃; 脱溶剂气的流速: 500L/h; 辅助气流速: 50L/h; 检测器电压: 1700V; 碰撞能量: 20eV; 扫描时间: 1.0s。定量离子: 甲基睾酮为  $m/z$  303, 氘代甲基睾酮为  $m/z$  306。

### 1.7 线性关系和检测限

准确取 5.000g 罗非鱼肌肉空白样品剪碎后移至 50ml 聚丙烯离心管, 依次加入系列浓度的甲基睾酮标准液, 制得 0.2、0.4、1、10、60ng/g 的加标样品, 每个样品加入 0.5 $\mu$ g/ml 的 MT-d3 内标 100 $\mu$ l, 放置 20min, 使加标样品充分渗透, 按照方法 1.5 处理。以添加水平为横坐标、外标与内标峰面积比值为纵坐标, 求得回归方程和相关系数  $R^2$ 。依据特征离子色谱峰信噪比, 以 3 倍信噪比为检测限, 以 10 倍信噪比为定量限。

### 1.8 回收率和精密度

在 5.000g 罗非鱼肌肉空白样品分别添加相当于 1ng/g、10ng/g 和 60ng/g 水平的甲基睾酮标准液和 0.5 $\mu$ g/ml 的 MT-d3 内标 100 $\mu$ l, 加标后, 放置 20min, 使标样充分渗透, 每个水平加标 5 个样品, 测定 5 次, 按照方法 1.5 处理。以添加水平为横坐标、外标与内标峰面积比值为纵坐标, 计算回收率和精密度。

### 1.9 数据处理

采用中国药理学学会数学药理委员会编制的 3P97 实用药代动力学计算程序软件进行曲线拟合, 采用 Marquardt 法对一、二、三房室分别以权重、 $1/C$ 、 $1/C^2$  等 3 种情况进行计算。根据残差平方和 WSS 与 AIC 值(赤池信息判据最小原则, Akaike's Information Criterion)最小判断最适药代动力学模型。药物在肌肉中的浓度曲线图采用 Microsoft Excel 2003 软件绘制, 药物消除曲线采用 Origin 8.5 软件进行拟合, 消除方程采用  $C = C_0 e^{-kt}$ 。C 表示药物质量分数(ng/g),  $C_0$  为残留消除对数曲线的截距(ng/g),  $k$  表示消除速率常数,  $t$

表示给药后时间(h)。

## 2 结果与分析

### 2.1 线性关系与检测限

甲基睾酮标准曲线制备采用内标法定量, 标准曲线为  $y = 0.14x + 0.0914$  [ $y$  为外标与内标峰面积比值,  $x$  为甲基睾酮浓度(ng/g)], 相关系数  $R^2 = 0.996$ 。依据特征离子色谱峰信噪比,  $R_{SN} = 3$  为方法检出限,  $R_{SN} = 10$  为方法定量限, 测得检出限为 0.4ng/g, 定量限为 1ng/g。

### 2.2 回收率和精密度

从表 1 可以看出, 当添加水平在 1—60ng/g 时, 平均回收率为 71.06%—83.06%, 相对标准偏差为 7.4%—15.3%, 满足国内、外痕量残留分析对测定方法的要求。

### 2.3 甲基睾酮在尼罗罗非鱼肌肉中的分布与残留

尼罗罗非鱼经混饲口灌甲基睾酮后, 不同时间段肌肉中的药物残留量见表 2。从表 2 可以看出, 29d 后罗非鱼肌肉中甲基睾酮水平已经在美国 FDA 的检测限 0.8ng/g 以下, 120d 后甲基睾酮残留已经在本试验的检出限 0.4ng/g 以下。

### 2.4 甲基睾酮在尼罗罗非鱼肌肉中的药代动力学参数

根据药代动力学房室模型确定原则, 拟合度  $R^2$  值越大, AIC 值越小, 其模型拟合得越好。通过比较  $R^2$  和 AIC 值, 并参考 WSS 和拟合度(goodness of fit) 值可以看出, 肌肉中药物浓度与时间关系符合权重为  $1/C^2$  的一次吸收二室开放性模型, 药时曲线见图 1, 动力学方程为  $C = 66.228e^{-0.148t} + 1.049e^{-0.0003t} - 67.277e^{-0.63t}$ 。肌肉中的达峰时间  $T_{(peak)}$  分别为 3.04h。  $K_{21} < K_{12}$ , 说明药物从中央室进入外周室的速率比外周室回到中央室的速率大。消除半衰期  $T_{(1/2)}$  为 23.073h, 相关药代动力学参数见表 3。

### 2.5 甲基睾酮在尼罗罗非鱼肌肉中的消除规律

尼罗罗非鱼经混饲口灌 5h 后, 肌肉中的药物残留浓度随时间变化的规律见图 2。从图 2 可以看出, 肌

表 1 样品加标的平均回收率和相对标准偏差( $n=5$ )

Tab.1 Average recoveries and relative standard deviations of standard addition ( $n=5$ )

添加水平(ng/g)	实测值(ng/g)				平均回收率(%)	相对标准偏差(%)	
1	1.011	0.753	0.825	0.745	0.723	81.14	14.5
10	9.03	10.13	6.94	7.85	7.58	83.06	15.3
60	47.76	41.46	40.68	39.9	43.38	71.06	7.4

表 2 单剂量 60mg/kg (BW)混饲口灌甲基睾酮在罗非鱼肌肉中的残留

Tab.2 Concentration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in tilapia muscle after single oral administration mixed in diet at 60mg/kg (BW)

时间(h)	肌肉(ng/g)					平均值 $\pm$ 标准差(ng/g)
	1	2	3	4	5	
1	25.73	19.98	22.36	24.76	22.40	23.05 $\pm$ 2.26
5	28.01	25.19	27.83	23.45	28.52	26.60 $\pm$ 2.19
8	22.15	23.17	26.87	18.48	22.62	22.66 $\pm$ 2.99
12	14.45	12.26	11.86	13.67	14.53	13.35 $\pm$ 1.24
24	3.00	2.41	2.56	2.86	2.70	2.71 $\pm$ 0.23
48 (2d)	1.74	1.48	1.38	1.69	1.76	1.61 $\pm$ 0.17
72 (3d)	1.23	1.32	1.17	1.41	1.46	1.32 $\pm$ 0.12
96 (4d)	1.16	1.09	1.07	1.16	1.14	1.12 $\pm$ 0.04
144 (6d)	0.93	1.13	1.26	0.91	0.93	1.03 $\pm$ 0.16
240 (10d)	1.06	0.92	0.85	0.97	1.16	0.99 $\pm$ 0.12
384 (16d)	1.09	1.01	0.74	0.65	0.91	0.88 $\pm$ 0.18
528 (22d)	0.73	0.98	0.73	0.83	0.76	0.81 $\pm$ 0.10
696 (29d)	0.72	0.79	0.65	0.64	0.76	0.71 $\pm$ 0.06
1080 (45d)	0.72	0.66	0.65	0.76	0.51	0.66 $\pm$ 0.10
1440 (60d)	0.76	0.60	0.69	0.58	0.53	0.63 $\pm$ 0.09
2160 (90d)	0.64	0.59	0.59	0.55	0.65	0.60 $\pm$ 0.04
2880 (120d)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注: ND 表示未检测出

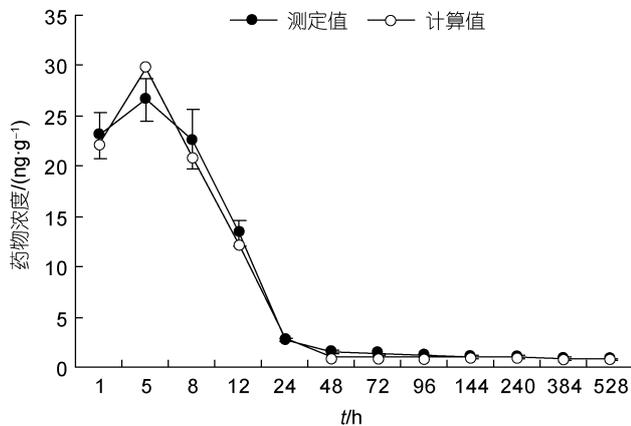


图 1 混饲口灌甲基睾酮后(60mg/kg)(BW)肌肉中的药时曲线

Fig.1 Concentration time curve of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle of tilapia after oral administration mixed in diet at 60mg/kg (BW)

肉中的甲基睾酮药物浓度在 24h 内呈指数型下降, 具有较快的消除速度, 之后消除速度减慢, 维持在一个较低的质量分数。数据经 Origin 8.5 软件统计处理得到肌肉中药物浓度(C)与时间(t)关系的消除曲线方程为  $C = 46.18e^{-0.101t}$  (C 的单位为 ng/g; t 的单位为 h), 相关指数  $R^2 = 0.95$ 。

表 3 单剂量 60mg/kg (BW)混饲口灌甲基睾酮在罗非鱼肌肉中的药代动力学参数

Tab.3 Pharmacokinetic parameters for 17 $\alpha$ -methyltestosterone in tilapia muscle after single oral administration mixed in diet at 60mg/kg (BW)

参数	单位	肌肉
A	ng/g	66.228
$\alpha$	1/h	0.148
B	ng/g	1.049
$\beta$	1/h	0.0003
K <sub>a</sub>	1/h	0.630
V/F <sub>(c)</sub>	(ng/g)/(ng/g)	0.580
T <sub>(1/2)</sub>	h	4.676
T <sub>(1/2)</sub>	h	23.073
K <sub>21</sub>	1/h	0.0033
K <sub>10</sub>	1/h	0.0135
K <sub>12</sub>	1/h	0.1317
AUC	(ng/g)*h	383.047
CL <sub>(s)</sub>	ng/g/h/(ng/g)	0.78
T <sub>(peak)</sub>	h	3.04
C <sub>(max)</sub>	ng/g	33.331
T <sub>(1/2)K<sub>a</sub></sub>	1/h	1.101
拟合优度值	—	0.161
AIC	—	-9.87
加权残差平方和(WSS)	—	0.311

注: A、B 为药时曲线对数图上曲线在横轴和纵轴上的截距;  $\alpha$ 、 $\beta$  分别为分布相、消除相的一级速率常数; K<sub>a</sub> 为一级吸收速率常数; V/F<sub>(c)</sub> 为表观分布容积; T<sub>(1/2) $\alpha$</sub> 、T<sub>(1/2) $\beta$</sub>  为总的吸收和消除半衰期; K<sub>21</sub> 由周边室向中央室转运的一级速率常数; K<sub>10</sub> 由中央室消除的一级速率常数; K<sub>12</sub> 由中央室向周边室转运的一级速率常数; AUC 为药-时曲线下面积; CL<sub>(s)</sub> 为总体清除率; T<sub>(peak)</sub> 为单剂量给药后出现最高药物质量浓度的时间; C<sub>(max)</sub> 为单剂量给药后的最高药物质量浓度; T<sub>(1/2)K<sub>a</sub></sub> 为药物在中央室的吸收半衰期

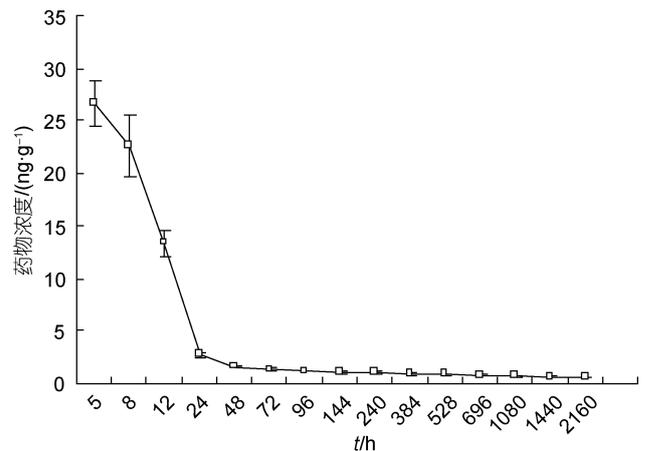


图 2 尼罗罗非鱼混饲口灌甲基睾酮(60mg/kg)后药物消除曲线

Fig.2 Elimination curve of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle of tilapia after oral administration mixed in diet at 60mg/kg (BW)

### 3 讨论

#### 3.1 给药方式和定量方法的选择

水产动物常用的给药方式主要包括:口灌、药浴、混饲、肌肉注射、静脉注射等。同一药物随剂型、给药途径的不同,生物利用度不同,因而生物效应也不同(Agui *et al.*, 2002)。静脉注射药效出现最快,其次是肌肉注射、口灌、混饲和药浴。药浴和混饲给药操作方便,但药浴方法无法计算每条鱼摄入的药物剂量,药代动力学研究较少采用。混饲方法存在着由于鱼摄食的个体差异,导致个体之间摄取药饵量不均匀等缺陷,肌肉注射和静脉注射给药则操作难度大。不同给药方式会导致药代动力学参数的显著差异(张雅斌等, 2000)。本试验选择采用混饲口灌给药的方式,减少个体间因摄食不均造成的误差,操作简单。

由于样品处理步骤较多(萃取、浓缩等),每步操作难以做到完全平行一致,并且色谱条件的微小变化也会影响药物的测定结果。因此,实验中采用内标法定量,选择与甲基睾酮结构性性质相近、且能与之完全分离的氘代同系物做内标物,可部分补偿待测组分在样品前处理时的损失,并且由于甲基睾酮与内标物是在同一检测条件下的响应值之比,这样就可以消除色谱条件的变化产生的误差,从而提高了分析结果的准确度和精密度。

#### 3.2 甲基睾酮在罗非鱼肌肉中的药代动力学特征

甲基睾酮以 60mg/kg 单剂量混饲口灌尼罗罗非鱼后,肌肉中药物浓度与时间关系符合一次吸收二室开放性模型,与其在莫桑比克罗非鱼,奥利亚罗非鱼和虹鳟中的房室模型结果一致,但其代谢动力学参数有较大的差别。药物的峰浓度( $C_{max}$ )和达峰时间( $T_{(peak)}$ )是衡量其在体内的吸收速度和程度的重要参数。Vick 等(2001)采用  $^{14}C$  标记的甲基睾酮 30mg/kg 投喂虹鳟,峰浓度为  $3.03 \mu\text{mol/L}$ ,达到峰浓度的时间为 8.80h。Fagerlund 等(1979)研究发现在银大马哈鱼中甲基睾酮第 1 次喂药后 2h 内,血浆和没有排泄功能的组织中放射能就达到了最大值。Rinchar 等(1999)采用口服甲基睾酮来诱导大梭鱼的雄性化,15mg/kg 处理 60d 后,血浆中甲基睾酮的浓度在喂药后 6—10h 达到最高值,随后浓度下降。本实验中 60mg/kg 单剂量混饲口灌后的  $C_{max}$  和  $T_{(peak)}$  分别为  $33.331\text{ng/g}$ 、3.04h,达峰时间比在虹鳟和大梭鱼中短,说明甲基睾酮在罗非鱼体内吸收较快。消除半衰期 $[T_{(1/2)}]$ 和总体清除率 $[CL_{(s)}]$ 是反应药物在体

内消除的主要参数。Vick 等(2001)采用  $^{14}C$  标记的甲基睾酮静脉注射虹鳟(2mg/kg 和 20mg/kg 剂量),整个身体的清除率为  $0.640\text{L/h/kg}$  和  $0.903\text{L/h/kg}$ ,分布的半衰期为 4.13h 和 8.23h,消除半衰期为 54.9h 和 58.6h,平均残留时间为 9.57h 和 22.7h。本实验中 60mg/kg 单剂量混饲口灌后的  $T_{(1/2)\beta}$  和  $CL_{(s)}$  分别为 23.073h、 $0.78\text{ng/g/h}/(\text{ng/g})$ ,消除速度比虹鳟中快。由此可见,同一药物在不同的动物体内代谢动力学存在动物种属差异性,说明动物的代谢类型和强度既有种间共性,又有种的特异性。有研究者认为这种差异可能是由于解剖学上的体积差异以及药物与血浆蛋白、组织结合的差异所致(Barron *et al.*, 1988),也有研究者认为与给药方式不同有关(张雅斌等, 2000; 朱丽敏等, 2006)。

#### 3.3 甲基睾酮在尼罗罗非鱼肌肉中的消除规律

甲基睾酮的残留量取决于处理组中甲基睾酮含量,鱼的大小,水体温度,给药方式,投喂量,饲料质量和消除速度。Johnstone 等(1983)采用不同水平的氘标记的甲基睾酮研究了橙色莫桑比克罗非鱼鱼苗和虹鳟鱼苗口服甲基睾酮后在其体内的消除。发现在停止投喂甲基睾酮的最初的 8—12h 内,甲基睾酮大量存在于内脏中,随后内脏和肌肉中的放射能很快下降,100h 后整个鱼体放射能还不到最初的 1%。Goudie 等(1986)研究表明停喂 12h 后总体放射量只有原来的 35%,并且 90%以上存在于内脏中,在 24h 之内就下降了 90%,21d 后只有原来的 1%。以上研究结果都表明甲基睾酮最初以指数级快速下降,然后以较慢的速度消除,甲基睾酮及其代谢物大量存在于内脏中。而国内邹琴等(2010)研究表明在停药后前 45d 里,甲基睾酮在体内迅速减少,其后的 46—115d 里甲基睾酮消解的较缓慢,115d 后基本无检出。本试验的结果表明在给药 5h 后甲基睾酮在肌肉中呈指数型下降,24h 内迅速减少了近 90%,其后消除得较缓慢,29d 后罗非鱼肌肉中甲基睾酮水平在美国 FDA 的检测限  $0.8\text{ng/g}$  以下,在给药 120d 后甲基睾酮残留已经在本试验的检出限  $0.4\text{ng/g}$  以下,消除曲线方程符合  $C = 46.18e^{-0.101t}$  [ $C$  为甲基睾酮在尼罗罗非鱼肌肉中的残留浓度( $\text{ng/g}$ );  $t$  为给药后的时间( $\text{h}$ )],与国内外报道的消除趋势基本一致。

国外研究表明,甲基睾酮残留主要存在于胆囊和肝脏,显示甲基睾酮可能通过肝胆途径进行代谢,随鳃和排泄物快速排出,在可食组织(肌肉)中残留量很低(Fagerlund *et al.*, 1979; Goudie *et al.*, 1986;

Gullu *et al*, 2007), 本试验的结果也印证了这一结论。罗非鱼养殖周期一般大于 FDA 规定的使用甲基睾酮处理后的最短休药期 120d, 而国外研究也表明只要遵循正确的休药期, 在罗非鱼苗种阶段使用甲基睾酮进行性别转换, 随着鱼体生长其残留量不断稀释降低, 人们食用符合上市规格的罗非鱼对人体健康没有不良影响(Goudie *et al*, 1986; Green *et al*, 2000; Chu *et al*, 2006)。在本试验条件下, 给药 120d 后在罗非鱼肌肉中也检测不到甲基睾酮残留。但因为甲基睾酮可提高饲料转化率从而促进鱼类的生长, 若达不到最短休药期或者养殖户在养成阶段使用甲基睾酮, 则会造成上市规格罗非鱼体内残留甲基睾酮的隐患, 而且甲基睾酮对环境释放的影响和效应还未有定论, 也应引起重视。今后应加强甲基睾酮管理和监控, 保证罗非鱼的食物安全, 实现罗非鱼产业的可持续发展。

### 参 考 文 献

- 朱丽敏, 杨先乐, 林启存等, 2006. 肌注和口服氟苯尼考在中华鳖体内残留分析及药代动力学. 水产学报, 30(4): 515—519
- 李家乐, 李思发, 1997. 甲基睾酮诱导吉富品系尼罗罗非鱼雄性化的研究. 水产学报, 21(增刊): 107—110
- 邹 琴, 陈培基, 李刘冬等, 2010. 甲基睾酮在罗非鱼苗种体内的消解规律. 水生生物学报, 34(2): 250—255
- 张雅斌, 张祚新, 郑 伟等, 2000. 不同给药方式下鲤对诺氟沙星的药代动力学研究. 水产学报, 24(6): 559—563
- Agui L, Guzman A, Yanez S *et al*, 2002. Voltammetric determination of chloramphenicol in milk at electrochemically activated carbon fibre microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*, 461(1): 65—73
- Al-Ablani S A, Phelps R P, 1997. Sex reversal in black crappie *Pomoxis nigromaculatus*: effect of oral administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on two age classes. *Aquaculture*, 158(1—2): 155—165
- Barron M G, Gedutis C, James M O, 1988. Pharmacokinetics of sulfadimethoxine in the lobster, *Homerus americanus*, following intrapericardial administration. *Xenobiotica*, 18(3): 269—277
- Chu P S, Lopez M, Serfling S *et al*, 2006. Determination of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle tissues of tilapia, rainbow trout, and salmon using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3193—3198
- Cravedi J P, Delous G, Debrauwer L *et al*, 1993. Biotransformation and branchial excretion of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in trout. *Drug Metabolism and Disposition*, 21: 377—385
- Fagerlund H M, Helen M D, 1979. Depletion of radioactivity from yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) after extended ingestion of anabolically effective doses of 17 $\alpha$ -methyltestosterone-1, 2-<sup>3</sup>H. *Aquaculture*, 18(4): 303—315
- Goudie C A, Shelton W L, Parker N C, 1986. Tissue distribution and elimination of radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated blue tilapia. *Aquaculture*, 58(34): 215—226
- Green B W, Teichert-Coddington D R, 2000. Human food safety and environmental assessment of the use of 17 $\alpha$ -methyltestosterone to produce male tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31(3): 337—357
- Gullu K, Guzel S, Ekici K *et al*, 2007. Residue analysis and effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on body composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Italian Journal of Food Science*, 3(19): 357—362
- Johnstone R, Macintosh D J, Wright R S, 1983. Elimination of orally administered 17 $\alpha$ -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) and *Salmo gairdneri* (rainbow trout) juveniles. *Aquaculture*, 35: 249—257
- Kerstin S, Maria P, Silvia Z *et al*, 2006. Permanent sex inversion in 1-year-old juveniles of the protogynous dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) using controlled-release 17 $\alpha$ -methyltestosterone implants. *Aquaculture*, 256: 443—456
- Pawlowski S, Sauer A, Shears J *et al*, 2004. Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17 $\alpha$ -methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic toxicology*, 68(3): 277—291
- Rinchar J, Dabrowski K, Abiadi M A *et al*, 1999. Uptake and depletion of plasma 17 $\alpha$ -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: Effect on plasma steroids and sex reversal. *Steroids*, 64(8): 518—525
- Turan F, Cek S, Atik E, 2006. Production of monosex male guppy, *Poecilia reticulata*, by 17 $\alpha$ -methyltestosterone. *Aquaculture Research*, 37(2): 200—203
- Vick A M, Hayton W L, 2001. Methyltestosterone pharmacokinetics and oral bioavailability in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 52(3/4): 177—188

## THE METABOLISM AND ELIMINATION OF 17 $\alpha$ -METHYLTESTOSTERONE IN MUSCLE OF NILE TILAPIA *OREOCHROMIS NILOTICUS*

ZHU Jing-Lin, ZOU Zhi-Ying, YANG Hong, LI Da-Yu, XIAO Wei, WEI Cheng-Liang

(Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, 214081)

**Abstract** In order to study the metabolism and elimination of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, single oral administration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone mixed in diet at 60mg/kg (BW) has been investigated in tilapia at (28 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C. The concentration of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle of tilapia were determined by Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The result demonstrated that concentration-time data of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle was conformed to two-compartmental open model with first order absorption. The major pharmacokinetic parameters were as follows:  $T_{(\text{peak})} = 3.04\text{h}$ ,  $C_{(\text{max})} = 33.331\text{ng/g}$ ,  $T_{(1/2)\beta} = 23.073\text{h}$ . 17 $\alpha$ -methyltestosterone was eliminated exponentially, decreasing by 90% within 24h after feeding. Then it eliminated slower relatively. The elimination curve of 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle of tilapia was conformed to  $C = 46.18e^{-0.101t}$ . After 29 days of feeding untreated diet, 17 $\alpha$ -methyltestosterone represented under 0.8ng/g of muscle, which is the detection limit of FDA (Food and Drug Administration). 17 $\alpha$ -methyltestosterone in muscle of tilapia could not detected 120d after cessation of 17 $\alpha$ -methyltestosterone treated by UPLC-MS/MS.

**Key words** Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), Nile tilapia *Oreochromis niloticus*, 17 $\alpha$ -methyltestosterone, Metabolism, Elimination