

文章编号:1001-5132(2009)04-0472-05

呋喃唑酮在凡纳滨对虾组织中代谢动力学研究

张海琪, 丁雪燕, 薛辉利, 姚高华

(浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310012)

摘要: 运用液相色谱-串联质谱法研究了呋喃唑酮药饵多次给药后在凡纳滨对虾体内的药物代谢动力学。研究表明: 呋喃唑酮代谢物在血淋巴、肝胰腺、肌肉组织中的代谢过程均符合二室模型, 其动力学方程分别为 $C_{\text{血液}} = 414.107 \times e^{-0.092t} + 124.451 \times e^{-0.005t}$, $C_{\text{肝胰腺}} = 1625.563 \times e^{-0.019t} + 125.700$, $C_{\text{肌肉}} = 120.434 \times e^{-0.019t} + 71.579 \times e^{-0.001t}$ 。凡纳滨对虾血淋巴和肝胰腺中呋喃唑酮代谢物浓度在4h达到高峰, 肌肉中药物浓度在2h达到最大值; 最高峰时血淋巴、肝胰腺和肌肉中药物浓度平均为 $570.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1948.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $210.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在血淋巴、肝胰腺和肌肉组织中呋喃唑酮代谢物浓度的吸收半衰期($t_{1/2\alpha}$)分别为 7.497 h、36.206 h 和 36.484 h, 消除半衰期($t_{1/2}$)分别为 132.525 h、1000479.217 h 和 505.637 h, 总表观分布容积(V_{1F})分别为 $55.775 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $17.16 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $161.574 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。说明给药后呋喃唑酮代谢物在凡纳滨对虾体内消除缓慢, 残留严重, 尤其以肝胰腺残留最为明显。

关键词: 凡纳滨对虾; 液相色谱-串联质谱; 呋喃唑酮; 代谢动力学

中图分类号: S948

文献标识码: A

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei* Boone)是浙江省优势水产养殖品种之一, 2007年养殖面积超 2.4×10^5 ha, 总产量超 1×10^6 t, 总产值近25亿元, 为浙江省渔业经济的发展做出了积极的贡献。由于2002年“虾仁氯霉素事件”后, 国外加强了对我国出口对虾的药残检测力度, 硝基呋喃类药物为主要监测指标。呋喃唑酮(Furazolidone)又名痢特灵, 是一种广谱抗菌药物, 能杀灭多种革兰氏阳性和阴性细菌, 并有促进鱼类生长发育的作用, 曾在水产养殖中得到广泛应用。由于呋喃唑酮对光敏感, 具有快速代谢的特点, 在动物体内原药的稳定性只有数小时, 而对通过 ^{14}C 标记的呋喃唑酮代谢

物的研究表明, 其代谢物3-氨基-2-唑烷基酮(AOZ)却是一种致癌作用较强的物质, 能够与组织蛋白紧密结合形成稳定的残留^[1]。鉴于健康原因, 世界各国都加强了对呋喃唑酮的检测管理。目前对水产动物药动学的研究, 大多针对原形药物, 较少涉及代谢产物, 尤其对那些水产品安全构成危害的代谢产物在体内的存在形式、消除速率及检测已逐渐成为药动学研究的重点。国内外已有呋喃唑酮在草鱼^[2-3]、罗非鱼^[4]等水产动物的药代及残留研究报告, 但未见有凡纳滨对虾的相关报道。

笔者运用液相色谱-串联质谱检测技术研究了呋喃唑酮药饵方式给药下在凡纳滨对虾体内的

代谢情况,旨在得出其在凡纳滨对虾体内的药代动力学以及残留消除规律,以便加强对渔药使用的管理和残留监控,为水产品安全及卫生等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

健康凡纳滨对虾,质量为7.5 g左右,200尾,由杭州下沙周宏水产养殖场提供,暂养于杭州下沙周宏水产养殖场室内水泥池中。试验期间水温为18~22℃,连续充气,每天换水2/3,人工投饲2次。试验前检测对虾各组织内不含呋喃唑酮及其代谢物。

1.2 试验器材

呋喃唑酮和呋喃唑酮的代谢物AOZ及其同位素内标AOZ-D₄购自北京陆桥公司(Sigma公司产品),纯度均大于98%。用甲醇溶解,并且配制0.5 g·L⁻¹标准储备液,放置于-14℃冰箱暗处保存,根据需要稀释成100 ng·mL⁻¹的标准工作液和内标工作液,放置在4℃的冰箱暗处保存备用。甲醇、乙酸乙酯均为色谱纯;磷酸氢二钾、二甲亚砷、乙酸、盐酸、氢氧化钠均为优级纯,正己烷为分析纯。2-硝基苯甲醛(2-NBA)购自Sigma公司,纯度大于99%。

API3000型液相色谱(串联四极杆质谱仪),配有Agilent1100型液相色谱仪、自动进样器、电喷雾离子源;电子天平;高速冷冻离心机;涡旋混匀器;数显恒温水浴器;均质器;吹氮浓缩仪;pH计。

1.3 研究方法

1.3.1 给药及生物样品采集

按每千克饲料中添加2%呋喃唑酮药粉的比例

配置药饵。每天按剂量30 mg·kg⁻¹投喂药饵,连续喂药5 d后于0.5 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、168 h、10 d、15 d、20 d取样,每次随机抽取对虾样本10尾,采集血淋巴、肝胰腺和肌肉样品,分别置于0.2%肝素钠处理过的离心管中,保存于-18℃冰箱中,同时取未投喂药饵的样品作为对照。

1.3.2 样品前处理

称取组织样品5 g于试管中,加入100 μL内标AOZ-D₄工作溶液,然后向离心管中加入20 mL 0.2 mol·L⁻¹盐酸溶液和0.5 mL 0.05 mol·L⁻¹ 2-NBA衍生剂,涡旋混合1 min,置于37℃恒温箱中保持16 h以上。将上述衍生溶液取出放置至室温,加入1 mL 0.5 mol·L⁻¹磷酸氢二钾溶液,调节溶液pH在7.0~7.4之间,每管加入6 mL乙酸乙酯涡旋混合1 min后,于4 000 r·min⁻¹离心10 min,取乙酸乙酯层于玻璃离心管中,再用6 mL乙酸乙酯重复提取1次,合并提取液。45℃水浴氮吹仪中用氮气吹干,残留物用1 mL流动相(乙腈与0.4%乙酸溶液体积比为10:90)溶解,然后用2 mL饱和正己烷去脂,4 000 r·min⁻¹离心,下层溶液经0.2 μm滤膜过滤后待测定。

1.3.3 色谱与质谱条件

色谱柱为Zorbax XDBC₁₈柱,进样量为40 μL,柱温为35℃,流动相A相为乙腈,流动相B相为0.4%乙酸水溶液。质谱条件包括:离子化模式为+ESI,质谱分辨率为单位分辨率,电喷雾电压(IS)为+5 500 V,辅助气流速(AUX)为7 L·min⁻¹,离子源温度(TEM)为475℃,去簇电压(DP)为50 V,聚焦电压(FP)为350 V,其他条件见表1,内标法定量。

1.4 代谢动力学数据分析

代谢动力学数据应用DAS药物动力学软件进行分析。

表1 呋喃唑酮代谢物的部分质谱参数

名称	定性离子对/(m·z ⁻¹)	定量离子对/(m·z ⁻¹)	采集时间/ms	碰撞能量/V	保留时间/min	相对丰度比/%
AOZ	236/104; 236/134	236/134	50; 50	32; 19	5.26	37.2±1.9
AOZ-D ₄	240/134	240/134	50	19	2.15	

注:相对丰度比指非定量离子对的峰面积与定量离子对的峰面积之比。

2 结果与分析

2.1 凡纳滨对虾体内呋喃唑酮代谢物的浓度变化

AOZ 在凡纳滨对虾体内的药物浓度变化见表 2。由表 2 可见, 投喂药饵后, 凡纳滨对虾血淋巴中 AOZ 药物浓度变化呈现双峰现象, 即从 0.5 h 的 $457.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 上升到 4 h 的 $570.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 而后开始下降至 24 h 的 $147.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 48 h 又升至 $264.7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 以后一直下降至 20 d 的 $9.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。肝胰腺中 AOZ 药物浓度最高, 投喂后 0.5 h 检测到 $1874.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 4 h 时呈现最高浓度 $1948.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 而后开始下降, 至 20 d 仍能检测到 $104.4 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。肌肉中的 AOZ 浓度在 0.5 h 检测到 $194.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后, 在 2 h 时检测到最高浓度为 $210.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 然后逐渐下降, 至 20 d 仍能检测到 $37.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。20 d 时各组织中仍能检测到 AOZ, 说明在连续给药饵条件下, 呋喃唑酮代谢物在凡纳滨对虾体内的残留时间较长。

表 2 呋喃唑酮代谢物在肌肉、血液和肝胰腺中的浓度

时间/h	血液/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	肝胰腺/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	肌肉/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
0.5	457.3±67.2	1874.3±159.3	194.0±21.5
1	489.3±39.7	1928.9±125.4	183.0±17.0
2	548.3±8.2	1905.1±232.4	210.0±17.6
4	570.6±34.8	1948.6±200.7	186.0±18.6
8	290.6±24.7	1410.7±189.0	178.0±23.1
12	239.3±32.8	1308.3±170.1	172.0±18.6
24	147.2±15.8	995.8±169.3	123.0±12.3
48	264.7±39.2	643.5±32.5	115.0±7.4
72	101.5±15.2	605.6±24.8	100.0±9.2
120	62.4±6.3	252.7±37.9	70.8±7.8
240	53.7±5.4	208.1±20.2	46.6±7.0
360	46.9±3.7	139.3±17.5	46.0±10.2
480	9.0±1.2	104.4±21.4	37.2±5.9

2.2 呋喃唑酮代谢物在凡纳滨对虾组织中的药代动力学方程及参数

呋喃唑酮经投喂药饵进入体内后, 在凡纳滨对虾各种组织中的代谢过程是不同的。经 DAS 分析, 主要药代动力学参数见表 3。AOZ 在血淋巴、肝胰脏和肌肉中的分布符合二室开放模型, 药物

运转过程可以用以下方程表示:

$$C_{\text{血液}}=414.107 \times e^{-0.092t}+124.451 \times e^{-0.005t},$$

$$C_{\text{肌肉}}=120.434 \times e^{-0.019t}+71.579 \times e^{-0.001t},$$

$$C_{\text{肝胰腺}}=1625.563 \times e^{-0.019t}+125.700.$$

表 3 呋喃唑酮在凡纳滨对虾各组织中的药代动力学参数

参数	单位	血液	肝胰腺	肌肉
<i>A</i>	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	414.107	1625.563	120.434
α	h^{-1}	0.092	0.019	0.019
<i>B</i>	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	124.451	125.700	71.579
β	h^{-1}	0.005	0	0.001
<i>K</i>	h^{-1}	36.800	0.138	0.054
<i>Ka</i>	h^{-1}	56.981	10.221	0.376
$t_{1/2\alpha}$	h	7.497	36.206	36.484
$t_{1/2}$	h	132.525	1000479.217	505.637
$t_{1/2Ka}$	h	0.012	0.068	1.842
$V_{1/F}$	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	55.775	17.160	161.574
CL/F	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	0.846	0.149	0.572
$AUC(0\sim t)$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	35185.883	154616.075	31673.650
$AUC(0\sim\infty)$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$	69325.745	196955.099	52448.636
<i>K10</i>	h^{-1}	0.015	0.009	0.004
<i>K12</i>	h^{-1}	0.057	0.009	0.009
<i>K21</i>	h^{-1}	0.025	0.001	0.008
T_{max}	h	4	4	2
C_{max}	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	570.6	1948.6	210.0

注: *A* 为分布相的零时截距; α 为分布速度常数; *B* 为消除相的零时截距; β 为消除速度常数; *K* 为吸收速度常数; *Ka* 为吸收速度常数; $t_{1/2\alpha}$ 为分布半衰期; $t_{1/2\beta}$ 为消除半衰期; $t_{1/2Ka}$ 为吸收半衰期; $V_{1/F}$ 为表观分布容积; CL/F 为体内总清除率; $AUC(0\sim t)$ 为 0~*t* 时的药时曲线下总面积; $AUC(0\sim\infty)$ 为 0~ ∞ 的药时曲线下总面积; *K10* 为描述药物从中央室消除的一级速率常数; *K12* 为由中央室到浅外室的一级转运速率常数; *K21* 为药物由浅外室到中央室的一级转运速率常数; T_{max} 为达峰时间; C_{max} 为峰浓度。

3 讨论

3.1 呋喃唑酮在凡纳滨对虾体内的代谢动力学特征

呋喃唑酮以 $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量对凡纳滨对虾进行药饵给药后, 各组织中的呋喃唑酮代谢物的浓度迅速上升, 并且能够在一段较长时间内维持较高的浓度。血淋巴和肝胰腺中 AOZ 药物最大浓度出现在 4 h, 肌肉中药物浓度在 2 h 时达到最大值;

血淋巴、肝胰腺和肌肉中最大药物浓度大小顺序为:
 $C_{\text{肝胰腺}} > C_{\text{血淋巴}} > C_{\text{肌肉}}$, 这一点与草鱼相似^[2-3].

吸收半衰期、消除半衰期和平均消除速率是衡量药物在体内吸收和消除速度的尺度. 呋喃唑酮原药的消除半衰期很短, 具有很高的消除速率, 因此呋喃唑酮为水产养殖中的禁药, 但是目前仍然在广泛使用. 呋喃唑酮原药在罗非鱼肌肉中消除半衰期和平均消除速率分别为 9.34 h 和 $22.7 \mu\text{g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{h})^{-1}$, 呋喃唑酮原药在草鱼体内的消除半衰期为 7.403 8 h, 而呋喃唑酮代谢物在罗非鱼肌肉中的消除半衰期和平均消除速率分别为 38.2 h 和 $0.058 \mu\text{g}\cdot(\text{kg}\cdot\text{h})^{-1}$ ^[3-4]. 因此尽管呋喃唑酮在水生生物体内代谢很快, 但是其主要代谢产物却很难消除. 试验中呋喃唑酮代谢物在凡纳滨对虾血淋巴中的 $t_{1/2\alpha}$ 和 $t_{1/2\beta}$ 分别为 7.497 h 和 132.525 h, 远远高于呋喃唑酮原药在草鱼血液中的 1.256 5 h 和 7.403 8 h^[5], 这说明呋喃唑酮代谢物在凡纳滨对虾体内的吸收分布过程和消除速度是很慢的.

表观分布容积的大小可以表示药物的特性, 越小血药浓度越高, 药物与血蛋白结合程度越高. 本试验中呋喃唑酮代谢物在凡纳滨对虾血淋巴中的 $V_{1/F}$ 为 $55.775 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, 远高于磺胺间甲氧嘧啶在中国对虾^[6]体内的 $0.36 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及磺胺间二甲氧嘧啶在虾^[7]体内的 $1.319 \text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$, 说明呋喃唑酮与动物血蛋白结合力弱, 在体内血药浓度也较低.

3.2 呋喃唑酮在凡纳滨对虾各组织内的药动力学特征比较

肝胰腺是对虾消化系统的重要器官, 位于胃和中肠之间. 给药后 4 h 内肝胰腺药物浓度呈稳态水平, 并在 4 h 时达到最大($1948.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 随后开始下降. 血淋巴第 2 个高峰出现在给药后 48 h, 肝胰腺高药物浓度可能为第 2 个血峰的出现提供了药的来源. 肌肉中呋喃唑酮代谢物浓度最高峰出现在 2 h, 推测为连续投喂药饵 5 d 后的累积结果.

表 4 列出了凡纳滨对虾口服给药后 3 种组织中呋喃唑酮代谢物浓度的比值. 凡纳滨对虾药饵给

药后, 大量药物进入肝胰腺后停留在肝胰腺, 只有少量的药物进入血液循环和其他组织, 这与我们曾比较的一例凡纳滨对虾全虾、去头虾(不含肝胰腺)及肌肉样品的硝基呋喃类残留检测结果相一致. 试验中药饵给药肝胰腺中药物浓度最高, 与凡纳滨对虾口服诺氟沙星后表现出肝胰腺中药物浓度高出其他组织相一致^[8]. 由于肝胰腺中呋喃唑酮代谢物残留最高, 因此建议今后可将对虾肝胰腺列为监测对象. 同时, 为了保证对虾的质量安全, 在加工过程中去除肝胰腺至关重要.

表 4 凡纳滨对虾不同组织中呋喃唑酮代谢物浓度比值

时间/h	肝胰腺:血淋巴	肌肉:血淋巴	肝胰腺:肌肉
0.5	4.10	0.42	9.66
1	3.94	0.37	10.54
2	3.47	0.38	9.07
4	3.42	0.33	10.48
8	4.85	0.61	7.93
12	5.47	0.72	7.61
24	6.76	0.84	8.10
48	2.43	0.43	5.60
72	5.97	0.99	6.06
120	4.05	1.13	3.57
240	3.88	0.87	4.47
360	2.97	0.98	3.03
480	11.60	4.13	2.81

3.3 呋喃唑酮的安全性评价

呋喃唑酮的作用机制为抑制乙酰辅酶 A 活性, 从而干扰糖代谢, 使细菌代谢紊乱致死, 因此曾在水产养殖中得以广泛应用. 呋喃唑酮在水产品中代谢较快, 不容易检出, 但可以通过检测其主要代谢产物达到检测呋喃唑酮的目的. 在我们的试验中凡纳滨对虾肌肉中呋喃唑酮代谢物的 $t_{1/2\beta}$ 为 505.637 h, 时间比较长, 这可能与试验温度较低有关. 我们曾对凡纳滨对虾苗种中呋喃唑酮药物残留进行跟踪监测, 发现育苗期间有残留($48.2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 46 d 后该批苗种才监测不到有药物残留, 说明呋喃唑酮在凡纳滨对虾体内残留代谢缓慢. 为了保证食品卫生, 保障人们的身体健康,

应严格禁止使用呋喃唑酮。若育苗期间误用呋喃唑酮药物,建议其休药期至少大于45 d。

参考文献:

- [1] Angelini N M, Rampini O D, Mugica H. Liquid chromatographic determination of nitrofurans residues in bovine muscle tissues[J]. *Journal of AOAC International*, 1997, 80(3):481-485.
- [2] 罗玉双,艾晓辉,夏维福,等.单剂量口服呋喃唑酮在草鱼体内消除及组织残留研究[J].*湖北大学学报:自然科学版*, 2003, 25(4):346-349.
- [3] 罗玉双,艾晓辉,刘长征.多次口服呋喃唑酮在草鱼体内残留研究[J].*水产科学*, 2006, 25(2):75-78.
- [4] 徐维海,林黎明,朱校斌,等.HPLC/MS法对呋喃唑酮及其代谢物AOZ在罗非鱼体内残留研究[J].*上海水产大学学报*, 2005, 14(1):35-40.
- [5] 黄志勇,沈金灿,彭爱红,等.鲤鱼组织中氯霉素的代谢速率及其色谱-质谱的表征方法研究[J].*中国食品学报*, 2006, 6(5):72-76.
- [6] 李静云,李健,王群,等.磺胺间甲氧嘧啶在中国对虾体内的药代动力学研究[J].*海洋水产研究*, 2006, 27(4):6-11.
- [7] Park E, Lightner D, Milner N, et al. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the peacid shrimp, *Penaeus vannamei*[J]. *Aquaculture*, 1995, 130:113-128.
- [8] 房文红,杨先乐,周凯.诺氟沙星在凡纳滨对虾不同组织中处置和消除规律[J].*水产学报*, 2004, 28(增刊):19-24.

Pharmacokinetics of Furazolidone in Tissues from *Litopenaeus vannamei* Boone

ZHANG Hai-qi, DING Xue-yan, XUE Hui-li, YAO Gao-hua

(Zhejiang Fisheries Quality Testing Centre, Hangzhou 310012, China)

Abstract: The pharmacokinetics of furazolidone metabolite is analyzed in *Litopenaeus vannamei* Boone after multiple orally administration using HPLC-MS/MS method. The concentration time equations of furazolidone metabolite in blood, liver and muscle are set to be: $C_{\text{blood}}=414.107 \times e^{-0.092t}+124.451 \times e^{-0.005t}$, $C_{\text{liver pancreas}}=1625.563 \times e^{-0.019t}+125.700$, $C_{\text{muscle}}=120.434 \times e^{-0.019t}+71.579 \times e^{-0.001t}$, respectively. The maximum value of furazolidone metabolite of the plasma, liver and muscle is found to be $570.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $1948.6 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $210.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The absorption half-life is identified as being 7.497 h, 36.206 h and 36.484 h, respectively. The elimination half life turns out to be 132.525 h, 1000479.217 h and 505.637 h, respectively. And the apparent volume of distribution reads $55.775 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, $17.16 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$ and $161.574 \text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. The results show that the eliminating rate of AOZ is very low, with the residual amount in the body being significant.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; furazolidone; pharmacokinetics

CLC number: S948

Document code: A

(责任编辑 史小丽)