

# 不同温度下恩诺沙星在克氏原螯虾体内的药代动力学

王欢<sup>1,2</sup>, 许荔立<sup>1,2</sup>, 陈孝煊<sup>1,2,3</sup>, 袁军法<sup>1</sup>, 田丁<sup>1</sup>, 蒋飞<sup>2</sup>, 吴志新<sup>1,2,3</sup>

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070; 2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 武汉 430070;  
3. 水产养殖国家级实验教学示范中心(华中农业大学), 武汉 430070

**摘要** 在 18 °C 和 25 °C 2 种温度下, 对克氏原螯虾注射剂量为 20 μg/kg 的恩诺沙星药液, 分析恩诺沙星和环丙沙星在克氏原螯虾体内的药物动力学特征和残留规律。结果显示, 恩诺沙星及环丙沙星在血淋巴、肌肉、肝胰腺中回收率 80%~110%, 检测值日内变异系数均小于 5%, 日间变异系数均小于 6%, 检测限均在 0.01 μg/mL(μg/g) 以下。18 °C 时恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的  $T_{max}$  分别为 0.083 0、0.344 7、1.933 5 h, 25 °C 时恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的  $T_{max}$  分别为 0.083 0、0.263 4、1.165 8 h, 温度提高加快了克氏原螯虾中恩诺沙星的吸收。消除半衰期  $T_{1/2\beta}$  大小顺序为肝胰腺(55.740 3 h) > 肌肉(52.743 7 h) > 血浆(18.608 7 h)。以恩诺沙星和环丙沙星作为残留标志物, 25 °C 时恩诺沙星在肝胰腺的消除期为 311.47 h, 18 °C 时恩诺沙星在肝胰腺的消除期为 417.77 h, 根据本试验结果, 以国家标准 0.2 μg/g 为残留标准, 建议恩诺沙星休药期为 325 (°C · d)。

**关键词** 恩诺沙星; 环丙沙星; 克氏原螯虾(小龙虾); 药代动力学; 药物残留; 合理用药量; 休药期; 食品安全; 疾病防控

**中图分类号** S 945.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)01-0112-08

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)具有分布广泛、适应力强、繁殖力高等特点, 在我国部分湿地形成自然种群<sup>[1]</sup>, 是我国重要的淡水养殖品种之一。2018 年克氏原螯虾经济总产值已达 3 690 亿元, 养殖密度的提高以及养殖水体污染等原因, 导致克氏原螯虾疾病频发。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)等细菌性病原被认为是造成螯虾某养殖业经济损失的原因之一<sup>[2-4]</sup>。

恩诺沙星 enrofloxacin(ENR)作为人工合成的广谱抗菌药, 具有对细菌选择性高, 口服给药迅速, 生物利用度高, 半衰期较长, 血药浓度、毒副作用小等特点应用于兽医临床, 预防和治疗多种细菌和支原体感染, 在临床治疗中已成为很多感染性疾病的首选药物, 使用频率仅次于青霉素类<sup>[5]</sup>。

国内外学者采用不同的给药方式, 研究了恩诺沙星在水生动物中的药物动力学及残留特征, 如银鲫(*Carassius auratus gibelio*) (肌肉注射)<sup>[6]</sup>、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*) (静脉注射和口

灌)<sup>[7]</sup>、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*) (肌肉注射和口灌)<sup>[8]</sup>、大西洋马蹄蟹(*Limulus polyphemus*) (围心窦注射)<sup>[9]</sup>等。本研究分析了在 18 °C 和 25 °C 2 种温度下克氏原螯虾围心窦注射 20 μg/kg 的恩诺沙星后, 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)在虾体内的组织分布和药代动力学特征, 以期制定合理用药量和休药期提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与设备

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, Agilent Chemstation 色谱工作站, 美国 Agilent 公司; 全自动样品快速研磨仪, 上海净信实业发展有限公司; MTN-2800W 恒温水浴氮吹装置, 天津奥赛恩斯仪器有限公司; WH-2 微型漩涡混合仪, 上海沪西仪器分析厂。

### 1.2 药品与试剂

恩诺沙星标准品(纯度 99%)、环丙沙星标准品(纯度 98%), Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 色谱级

收稿日期: 2020-05-14

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1606000; 2019YFC1606002); 湖北省技术创新专项(2018ABA103)

王欢, E-mail: wanghuanry@163.com

通信作者: 吴志新, E-mail: wuzhixin@mail.hzau.edu.cn

乙腈和甲醇,美国 Tedia 公司;正己烷、乙腈、三乙胺等试剂为分析纯,购于国药化学试剂有限公司。恩诺沙星原粉(含量 99%),上虞京新药业有限公司。

恩诺沙星与环丙沙星标准储备液的配制:分别准确称取 0.01 g 恩诺沙星及环丙沙星标准品,分别用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液助溶,用超纯水定容至 100 mL,配置成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液。

恩诺沙星注射液的配制:称取 4 g 的恩诺沙星原药,用少量氢氧化钠溶液助溶,用超纯水定容至 100 mL,配置成 40 mg/mL 的标准储备液。

### 1.3 试验动物

试验所用克氏原螯虾来自湖北武汉克氏原螯虾某养殖基地,平均体质量(20.0 $\pm$ 2.0) g,暂养于消毒后的水族箱中,试验用水为经过曝气的自来水,分别控制水温在(18 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 和(25 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 。试验前停食 1 d,选择健康活泼的虾进行试验。

### 1.4 试验方法

1) 色谱条件。色谱柱:Shodex Silica C18(250 mm $\times$ 4.6  $\mu\text{m}$ ,5  $\mu\text{m}$ ),流动相:0.05 mol/L 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 2.4)/乙腈=86/14(V/V);流速:1.0 mL/min;紫外线检测波长:278 nm;柱温:40  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

2) 给药与取样。正式给药前禁食 1 d,给药前采集空白血淋巴及组织样品检测是否有药物残留。用 100  $\mu\text{L}$  微量注射器将恩诺沙星药液注射到克氏原螯虾围心窦,剂量为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (约 10  $\mu\text{L}$ )。于 0.083、0.25、0.5、0.75、1、2、4、6、8、12、24、36、48、72、120 h 时间点采集血淋巴、肌肉、肝胰腺。每个时间点取 6 只螯虾。使用注射器从围心窦取血淋巴,并取肌肉、肝胰腺,样品保存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

3) 样品处理。冷冻保存的样品室温下自然解冻。吸取 0.5 mL 血淋巴于 10 mL 离心管中,加入 7 mL 的提取液(1 mol/L 盐酸:乙腈=4:500,V/V),旋涡混合 2 min,8 000 r/min 离心 10 min,将上清液置于 40  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴氮气吹干。准确加入 1 mL 流动相,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,滤液用高效液相色谱仪检测。取 1 g 组织(肌肉、肝胰腺)匀浆,加入 1 mL 氯化钠溶液(1 mol/L)和 1 mL PBS 缓冲液,涡旋振荡 2 min,加入 4 mL 酸化乙腈(1 mol/L 盐酸:乙腈=4:500,V/V),涡旋混合 2 min,4  $^{\circ}\text{C}$  条

件下 8 000 r/min 离心 10 min。提取上清液移入另一离心管中,残留物加 4 mL 酸化乙腈充分涡旋震荡 2 min,4  $^{\circ}\text{C}$  下 8 000 r/min 离心 10 min,提取上清液。合并上清液,取上清液于氮吹仪上 40  $^{\circ}\text{C}$  氮吹至干,用 1 mL 流动相溶解,2 mL 正己烷去脂,取下清液用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,滤液用高效液相色谱检测药物含量。因为肝胰腺中脂肪含量较多,增加一次去脂步骤。

4) 标准曲线。将标准工作液用超纯水分别稀释为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准稀释液,取 10  $\mu\text{L}$  进样检测进行分析。以药物峰面积为纵坐标(Y),标准质量浓度 C( $\mu\text{g}/\text{mL}$  或  $\mu\text{g}/\text{g}$ )为横坐标(X)做标准曲线,计算回归方程及相关系数。

5) 工作曲线。将克氏原螯虾中空白血淋巴或空白组织匀浆,加入已知浓度的标准溶液,制成含恩诺沙星和环丙沙星为 0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ( $\mu\text{g}/\text{g}$ )的血淋巴样品和组织样品。将各样品将按照本文“1.4”样品方法处理后,进行 HPLC 分析,求出工作曲线方程和相关系数。

6) 回收率、精密度和检测限。取空白血淋巴和组织,分别添加 100、10、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准溶液 100  $\mu\text{L}$ ,使各组织恩诺沙星、环丙沙星药物含量为 10、1、0.1  $\mu\text{g}$ ,将各样品处理后,每个质量浓度重复测定 3 次,连续测定 3 d,计算回收率和精密度。以引起 3 倍信噪比(S/N=3)的浓度为检测限。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱行为

恩诺沙星和环丙沙星出峰时间分别为 9.529、13.351 min,目标药物峰形明显尖锐,基线平稳(图 1)。本方法可以有效地分离恩诺沙星和环丙沙星,在样品中与其他色谱峰明显分离,无干扰峰(图 2~4)。

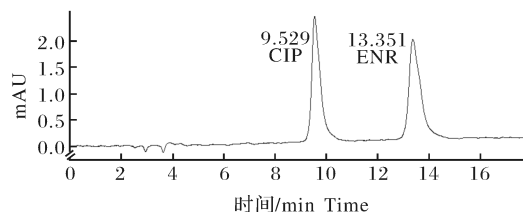


图 1 恩诺沙星(ENR)和环丙沙星(CIP)标准溶液色谱图

Fig.1 Chromatograms of enrofloxacin and ciprofloxacin standard solutions

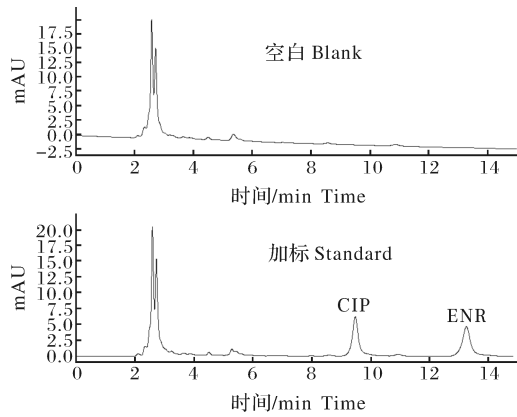


图 2 空白血淋巴色谱图与加标血淋巴色谱图  
Fig.2 Blank hemolymph chromatogram and spiked hemolymph chromatogram

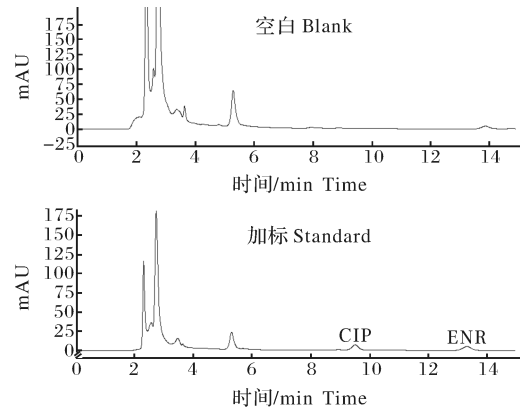


图 4 空白肝胰脏色谱图与加标肝胰脏色谱图  
Fig.4 Blank hepatopancreas chromatogram and spiked hepatopancreas chromatogram

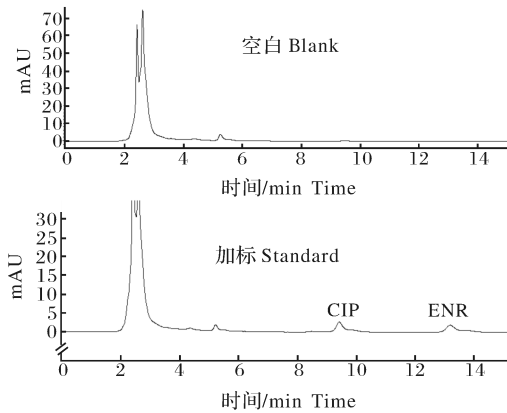


图 3 空白肌肉色谱图与加标肌肉色谱图  
Fig.3 Blank muscle chromatogram and spiked muscle chromatogram

2.2 分析方法验证

恩诺沙星和环丙沙星的标准曲线方程分别为  $Y=61.618X-2.6977$ ,  $Y=60.376X+0.1429$ , 相关系数  $R^2$  均大于 0.99。恩诺沙星及环丙沙星在  $0.01\sim 20\ \mu\text{g}/\text{mL}$  质量浓度范围内线性关系良好(表 1)。各组织中恩诺沙星和环丙沙星回收率均在  $80\%\sim 110\%$ , 说明回收率是在合理范围的(表 2)。检测值日内变异系数均小于  $5\%$ , 日间变异系数均小于  $6\%$ ; 检测限在  $0.003\sim 0.008\ \mu\text{g}/\text{mL}(\mu\text{g}/\text{g})$ , 均低于欧盟 ( $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$  或  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) 和日本 ( $0.01\ \mu\text{g}/\text{mL}$  或  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) 规定的最高残留限量, 表明本试验所用样品前处理和高效液相色谱检测方法具有较高的精确度。

表 1 恩诺沙星和环丙沙星的工作曲线方程和相关系数

Table 1 ENR and CIP work composition line sum correlation number

组织 Organization	分析物 Analyte	回归方程 Regression equation	相关系数 $R^2$ Correlation coefficient
血淋巴 Hemolymph	ENR	$Y=52.733X-1.487$	0.999 8
	CIP	$Y=53.323X-4.195$	0.999 1
肌肉 Muscle	ENR	$Y=66.322X-4.502$	0.998 5
	CIP	$Y=52.203X-5.015$	0.997 0
肝胰腺 Hepatopancreas	ENR	$Y=33.673X+12.715$	0.993 3
	CIP	$Y=42.084X+13.945$	0.996 4

注 Note: 1)ENR:恩诺沙星 Enrofloxacin; 2)CIP:环丙沙星 Ciprofloxacin.下同。The same as below.

表 2 恩诺沙星和环丙沙星的回收率、变异系数、检测限

Table 2 ENR and CIP-like recovery rate, variation number, limit of measurement

组织 Organization	回收率/% Recovery rate		精密密度 Precision				检测限/ $(\mu\text{g}/\text{g})$ Detection limit	
			日内变异系数/% Intra-day CV		日间变异系数/% Inter-day CV			
	ENR	CIP	ENR	CIP	ENR	CIP	ENR	CIP
血淋巴 Hemolymph	89.31	96.23	1.23	1.38	3.09	2.21	0.003	0.004
肌肉 Muscle	102.52	83.85	2.79	4.87	2.28	4.12	0.005	0.007
肝胰腺 Hepatopancreas	92.77	87.08	1.34	3.45	4.62	5.82	0.007	0.008

### 2.3 恩诺沙星和环丙沙星在克氏原螯虾体内的药时变化规律

注射给药后,恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴的药时曲线见图 5。由图 5 可见,恩诺沙星在 18℃和 25℃下在 0.083 0 h 达到峰值,分别为 20.185 4 μg/mL和 19.248 6 μg/mL,1~8 h 恩诺沙星药物质量浓度呈快速下降趋势,8~120 h 时药物质量浓度缓慢下降。18℃时环丙沙星在 2 h 达到第 1 个峰值(18℃为 0.0540 μg/mL),24 h 时会

出现第 2 个峰(0.0726 μg/mL)。

注射给药后,恩诺沙星在克氏原螯虾肌肉中的药时曲线见图 6。恩诺沙星在 25℃(0.026 3 h)比 18℃(0.344 7 h)更快达到峰值,随后出现缓慢下降,18℃时在 6 h 会出现第 2 个峰(9.848 5 μg/g)。18℃时,环丙沙星在 0.75 h 达到峰值(0.150 3 μg/g),在 8 h 时出现第 2 个峰(0.157 9 μg/g)。25℃时,环丙沙星在 0.25 h 达到峰值(0.733 9 μg/g),在 4 h 达到第 2 个峰,然后很快下降。

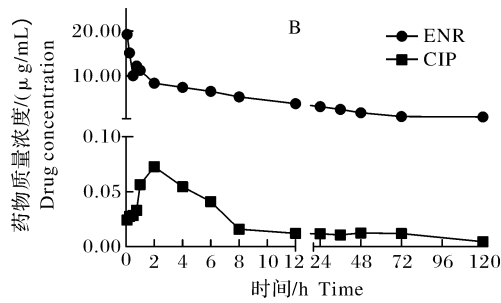
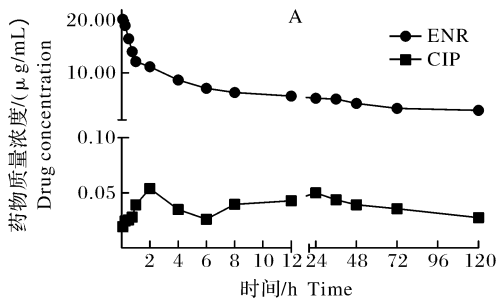


图 5 18℃(A)和 25℃(B)下单次注射后 ENR 和 CIP 在血淋巴中的药-时曲线(n=6)

Fig.5 Time-lapse curves of ENR and CIP in hemolymph after a single injection at 18℃ (A) and 25℃ (B) (n=6)

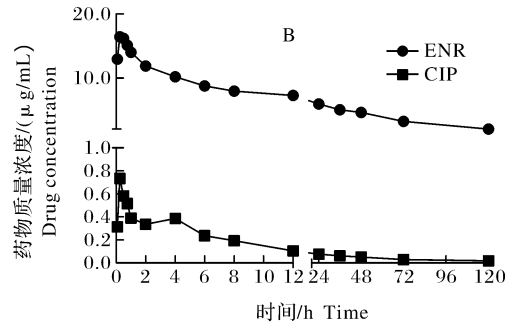
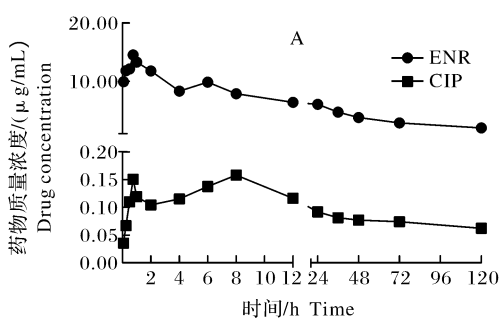


图 6 18℃(A)和 25℃(B)下单次注射后 ENR 和 CIP 在肌肉中的药-时曲线(n=6)

Fig.6 Time-lapse curves of ENR and CIP in muscle after a single injection at 18℃ (A) and 25℃ (B) (n=6)

单次注射给药后,恩诺沙星在克氏原螯虾肝胰腺中的药时曲线见图 7。18℃时,恩诺沙星质

量浓度在 0~1 h 时间段快速上升,4 h 达到峰值,4~8 h 出现快速下降;25℃时,恩诺沙星质量浓度

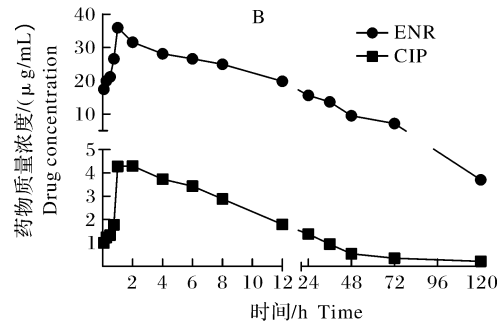
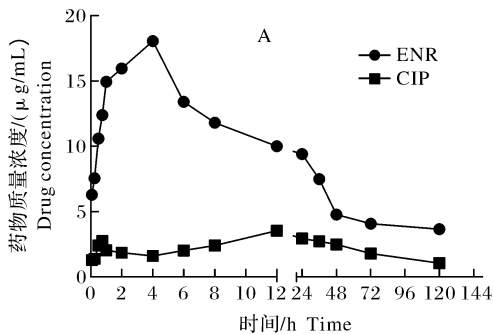


图 7 18℃(A)和 25℃(B)下单次注射后 ENR 和 CIP 在肝胰腺中的药-时曲线(n=6)

Fig.7 Time-lapse curves of ENR and CIP in Hepatopancreas after a single injection at 18℃ (A) and 25℃ (B) (n=6)

在 1 h 达到峰值。18 °C 下环丙沙星分别在 0.75、4 h 达到峰值; 25 °C 时, 环丙沙星浓度在 2 h 达到峰值。

## 2.4 药代动力学特征

恩诺沙星在克氏原螯虾体内的药时数据用 PK2.0 软件和 Graphpad Prism5 软件进行拟合分

析, 结果显示, 恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴中的药时数据符合二室开放模型, 恩诺沙星在克氏原螯虾肌肉和肝胰腺中的药时数据符合一级吸收二室开放模型, 其动力学参数见表 3。环丙沙星在克氏原螯虾体内的药时数据为非房室模型, 其主要动力学参数见表 4。

表 3 恩诺沙星在克氏原螯虾体内的药代动力学参数

Table 3 Pharmacokinetic parameters of enrofloxacin in *Procambarus clarkii*

参数 Parameters	血淋巴 Hemolymph		肌肉 Muscle		肝胰腺 Hepatopancreas	
	18 °C	25 °C	18 °C	25 °C	18 °C	25 °C
$A/(\mu\text{g}/\text{mL})$	13.762 7	12.023 4	6.580 0	9.150 1	9.876 8	15.434 8
$\alpha/(1/\text{h})$	0.773 2	2.426 9	0.194 7	0.412 3	0.104 4	0.062 0
$B/(\mu\text{g}/\text{mL})$	7.121 0	8.945 3	7.184 8	8.453 3	9.135 3	16.882 9
$\beta/(1/\text{h})$	0.010 1	0.046 4	0.011 8	0.013 1	0.009 3	0.012 4
$K_a/(1/\text{h})$	—	—	14.681 2	16.860 1	1.893 2	4.114 8
$K_{10}/(1/\text{h})$	0.028 9	0.106 0	0.021 2	0.026 1	0.017 2	0.020 0
$K_{12}/(1/\text{h})$	0.484 1	1.305 3	0.077 4	0.192 1	0.040 2	0.015 9
$K_{21}/(1/\text{h})$	0.270 3	1.061 9	0.107 8	0.207 2	0.056 2	0.038 4
$T_{\max}/\text{h}$	0.083 0	0.083 0	0.344 7	0.263 4	1.933 5	1.165 8
$C_{\max}/(\mu\text{g}/\text{mL or } \mu\text{g}/\text{g})$	20.185 4	19.248 6	13.221 3	16.425 0	16.555 5	30.731 3
$T_{1/2\alpha}/\text{h}$	0.896 5	0.297 3	3.559 6	1.681 1	6.641 1	11.174 5
$T_{1/2\beta}/\text{h}$	68.552 7	18.608 7	58.914 4	52.743 7	74.622 1	55.740 3
$T_{1/2k_a}/\text{h}$	—	—	0.047 2	0.041 1	0.366 1	0.168 4
$AUC_{(0-t)}/((\mu\text{g} \cdot \text{h})/\text{mL})$	514.306 2	257.857 3	494.711 3	531.497 0	745.454 9	1 293.194 5
MRT/h	140.859 0	57.000 6	80.925 9	73.751 8	99.974 3	70.802 4
$V_z/(\text{L}/\text{kg})$	3.073 5	3.860 8	—	—	—	—
$CL/(\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg}))$	0.021 9	0.065 5	0.027 2	0.028 0	0.011 2	0.012 6

注:  $A$ : 分布相的零时截距;  $\alpha$ : 分布速率常数;  $B$ : 消除相的零时截距;  $\beta$ : 消除速率常数;  $K_a$ : 药物吸收速率常数;  $K_{10}$ : 药物在中央室的消除速率;  $K_{12}$ : 药物自中央室到周边室的一级转运速率;  $K_{21}$ : 药物自周边室到中央室的一级转运速率;  $T_{1/2\alpha}$ : 分布相半衰期;  $T_{1/2\beta}$ : 消除相半衰期;  $T_{1/2k_a}$ : 吸收相半衰期;  $V_z$ : 表观分布容积;  $CL$ : 总体清除率;  $AUC_{(0-t)}$ :  $0-t$  时的药时曲线下面积,  $T_{\max}$ : 最大达峰时间,  $C_{\max}$ : 药物最大达峰浓度; MRT: 药物在体内的平均保留时间。Note:  $A$ : Zero-time intercept of the distribution phase;  $\alpha$ : The distribution rate constant;  $B$ : The zero-time intercept of the elimination phase;  $\beta$ : The elimination rate constant;  $K_a$ : The rate of drug absorption rate;  $K_{12}$ : The first-order transport rate of the drug from the central chamber to the peripheral chamber;  $K_{21}$ : The first-order transport rate of the drug from the peripheral chamber to the central chamber;  $T_{1/2\alpha}$ : The distribution phase half-life;  $T_{1/2\beta}$ : Elimination phase half-life;  $T_{1/2k_a}$ : The absorption phase half-life;  $V_z$ : Apparent distribution volume;  $CL$ : Total clearance;  $AUC_{(0-t)}$ : Area under the drug-time curve when  $0-t$ ;  $T_{\max}$ : The maximum peak time;  $C_{\max}$ : The maximum peak concentration of the drug; MRT: The average retention time of the drug in the body.

表 4 环丙沙星在克氏原螯虾体内的药代动力学参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of ciprofloxacin in *Procambarus clarkii*

参数 Parameters	血淋巴 Hemolymph		肌肉 Muscle		肝胰腺 Hepatopancreas	
	18 °C	25 °C	18 °C	25 °C	18 °C	25 °C
$L_z/(1/\text{h})$	0.005 0	0.014 6	0.003 1	0.015 5	0.011 5	0.012 3
$T_{1/2z}/\text{h}$	137.349 2	47.503 5	227.232 4	44.773 1	60.103 4	56.324 8
$T_{\max}/\text{h}$	2	2	8	0.25	12	2
$C_{\max}/(\mu\text{g}/\text{mL or } \mu\text{g}/\text{g})$	0.054 0	0.072 6	0.157 9	0.733 9	3.548 9	4.301 6
$AUC_{(0-t)}/((\mu\text{g} \cdot \text{h})/\text{mL})$	4.454 2	1.542 5	9.843 9	8.019 2	251.388 2	103.035 8
MRT/h	199.413 7	67.740 4	319.259 0	52.064 4	91.024 6	54.975 4
$CL/(\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg}))$	2.023 7	10.741 2	0.660 8	2.152 6	0.058 3	0.166 0

注:  $L_z$ : 消除速率常数;  $T_{1/2z}$ : 消除半衰期。Note:  $L_z$ : The elimination rate constant;  $T_{1/2z}$ : Elimination phase half-life.

## 3 讨论

### 3.1 恩诺沙星在克氏原螯虾体内的药代动力学特征

恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴中的药时数据符

合二室开放模型, 在肌肉和肝胰腺中的药时数据符合一级吸收二室开放模型, 这与恩诺沙星在三疣梭子蟹<sup>[10]</sup>、金鳊<sup>[11]</sup>、西伯利亚鲟<sup>[12]</sup>、中华绒螯蟹<sup>[13]</sup>中的结果相似。

本试验中, 在 18 °C 水温下, 恩诺沙星在克氏原

螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的  $T_{\max}$  分别为 0.083 0、0.344 7、1.933 5 h,  $C_{\max}$  分别为 20.185 4、13.221 3、16.555 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在 25  $^{\circ}\text{C}$  水温下, 恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的  $T_{\max}$  分别为 0.083 0、0.263 4、1.165 8 h,  $C_{\max}$  分别为 19.248 6、16.425 0、30.731 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 这说明温度较高时, 恩诺沙星在克氏原螯虾体内达峰时间快。与不同温度下恩诺沙星在中华绒螯蟹中的达峰时间快和达峰浓度的规律一致<sup>[13]</sup>。

18  $^{\circ}\text{C}$  水温下, 恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的  $T_{1/2\alpha}$  分别为 0.896 5、3.559 6、6.641 1 h,  $\text{AUC}_{(0-t)}$  分别为 514.306 2、494.711 3、745.454 9 ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}$ )/mL; 25  $^{\circ}\text{C}$  时  $T_{1/2\alpha}$  分别为 0.297 3、1.681 1、11.174 5 h,  $\text{AUC}_{(0-t)}$  分别为 257.857 3、531.497 0、1 293.194 5 ( $\mu\text{g} \cdot \text{h}$ )/mL。AUC 越大, 说明恩诺沙星在克氏原螯虾中分布越广泛, 可以更好地起到杀菌作用。温度较高时, 恩诺沙星在血淋巴、肌肉中的分布半衰期更短。在大菱鲆中, 温度同样促进了分布半衰期的减少<sup>[7]</sup>。

消除半衰期  $T_{1/2\beta}$  和清除率 CL 是药物在体内消除快慢的主要药动学参数<sup>[13]</sup>。18  $^{\circ}\text{C}$  时恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的  $T_{1/2\beta}$  分别为 68.552 7、58.914 4、74.622 1 h, 25  $^{\circ}\text{C}$  时分别为 18.608 7、52.743 7、55.740 3 h。18  $^{\circ}\text{C}$  恩诺沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的 CL 分别为 0.021 9、0.027 2、0.011 2 L/(h · kg), 25  $^{\circ}\text{C}$  时分别为 0.065 5、0.028 0、0.012 6 L/(h · kg), 温度提高, 血淋巴、肌肉、肝胰腺中的恩诺沙星消除加快, 这与有关的研究结果一致<sup>[14]</sup>。温度提高可以促进恩诺沙星在克氏原螯虾体内的分布和消除, 但由于生物种类、给药剂量、养殖环境的不同, 恩诺沙星代谢程度存在差异<sup>[15-17]</sup>, 与其他甲壳类动物<sup>[18]</sup>一样, 克氏原螯虾拥有开放性循环系统, 肝胰腺是药物吸收的主要器官, 因此肝胰腺中药物浓度高、消除半衰期较长。

### 3.2 环丙沙星在克氏原螯虾体内的药代动力学特征

研究表明, 恩诺沙星在水生动物体内大部分以原药形式存在, 有一部分去乙基代谢转化为环丙沙星<sup>[19]</sup>, 因此研究恩诺沙星的代谢产物环丙沙星在体内的药代动力学同样具有重要意义。在本试验中, 18  $^{\circ}\text{C}$  时环丙沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的消除斜率常数分别为 0.005 0、0.003 1、0.011 5 1/h, 在肝胰腺中消除最快, 其次是血淋巴、

肌肉。25  $^{\circ}\text{C}$  水温条件下环丙沙星在克氏原螯虾血淋巴、肌肉、肝胰腺中的消除斜率常数分别为 0.014 6、0.015 5、0.012 3 1/h, 在肌肉中消除最快, 其次是血淋巴、肝胰腺。温度较高时, 加快了各组织中环丙沙星的消除。除血淋巴外, 肌肉和肝胰腺中的达峰时间在 25  $^{\circ}\text{C}$  时(0.25 h、2 h)比 18  $^{\circ}\text{C}$  (8 h、12 h)快, 血淋巴、肌肉、肝胰腺在 25  $^{\circ}\text{C}$  时的清除率也比 18  $^{\circ}\text{C}$  快。试验中发现, 环丙沙星的浓度比恩诺沙星的浓度要低得多, 水温 18  $^{\circ}\text{C}$  和 25  $^{\circ}\text{C}$  下血淋巴中环丙沙星和恩诺沙星的 AUC 比值分别为 0.8% 和 0.5%, 这与大菱鲆(口灌)<sup>[7]</sup> 和鲫(注射和口灌)<sup>[16]</sup> 中的结果相似。肝胰腺中环丙沙星的比值要比血淋巴、肌肉中高, 这种现象也存在于中华绒螯蟹中<sup>[13]</sup>。药物主要代谢产物所占的比例在一定程度上体现动物对该药的代谢强度<sup>[20]</sup>, 且与水温成正比<sup>[17]</sup>。试验中环丙沙星呈不规则衰减的方式, 可能受恩诺沙星代谢的影响<sup>[21]</sup>。

### 3.3 休药期

由于恩诺沙星在克氏原螯虾的肝胰腺中代谢较慢, 同时要不断转化为环丙沙星, 因此把肝胰腺作为药物残留的靶器官。在 2019 年发布的《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中, 规定的最大残留限量为 0.2  $\mu\text{g}/\text{g}$ (恩诺沙星+环丙沙星)<sup>[18]</sup>; 日本则规定恩诺沙星最高残留限量为 0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。以 0.2  $\mu\text{g}/\text{g}$  为残留标准, 利用软件 WT 1.4 计算出本试验中 25  $^{\circ}\text{C}$  水温时恩诺沙星在肝胰腺达到残留标准需要 311.470 0 h, 18  $^{\circ}\text{C}$  水温时恩诺沙星在肝胰腺达到残留标准为 417.770 0 h。以 0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$  为残留标准, 利用软件 WT 1.4 计算出本试验中 25  $^{\circ}\text{C}$  时恩诺沙星在肝胰腺达到残留标准为 490.640 0 h, 18  $^{\circ}\text{C}$  时恩诺沙星在肝胰腺达到残留标准为 680.580 0 h。制定休药期不仅要考虑残留量, 还要考虑水温等状况<sup>[22]</sup>。根据本试验结果, 按照国家标准 0.2  $\mu\text{g}/\text{g}$  为残留标准, 建议休药期为 325 ( $^{\circ}\text{C} \cdot \text{d}$ )。以日本 0.01  $\mu\text{g}/\text{g}$  为残留标准, 建议休药期为 511 ( $^{\circ}\text{C} \cdot \text{d}$ )。

### 参考文献 References

- [1] 兰江风, 代云佳, 林鑫. 养殖克氏原螯虾体内白斑综合征病毒的绝对定量分析[J]. 水产学报, 2016, 40(3): 318-325. LAN J F, DAI Y J, LIN L. Quantitative analysis of white spot syndrome virus in the tissues of cultured red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*) [J]. Journal of fisheries of China, 2016, 40(3): 318-325 (in Chinese with English abstract).

- [2] ROCCA G D, SALVO A D, MALVISI J, et al. The disposition of enrofloxacin in seabream (*Sparus aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration [J]. *Aquaculture*, 2004, 232(1/2/3/4): 53-62.
- [3] 张英豪, 顾泽茂, 兰江风. 虾应对感染的先天免疫反应研究进展 [J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(3): 119-130. ZHANG Y H, GU Z M, LAN J F. Recent advances in study of immune response of shrimp to pathogen infection; a review [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(3): 119-130 (in Chinese with English abstract).
- [4] JIRAVANICHPAISAL P, ROOS S, EDSMAN L, et al. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* [J]. *Journal of invertebrate pathology*, 2009, 101(1): 56-66.
- [5] ZHANG J B, WU G H, MENG Y, et al. Study on the pharmacokinetics of enrofloxacin in the Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*, after different administration regimes [J]. *Aquaculture research*, 2008, 39(11): 1210-1215.
- [6] FAN J, SHAN Q, WANG J, et al. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in healthy and *Aeromonas hydrophila*-infected crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Journal of veterinary pharmacology & therapeutics*, 2017, 40(5): 580-582.
- [7] LIANG J, JIAN L I, ZHAO F, et al. Pharmacokinetics and tissue behavior of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in turbot *Scophthalmus maximus* at two water temperatures [J]. *Chinese journal of oceanology and limnology*, 2012, 30(4): 644-653.
- [8] BOWSER P R, WOOSTER G A, STLEGER J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin (Bayer) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Journal of veterinary pharmacology & therapeutics*, 1992, 15(1): 62-71.
- [9] 周帅, 胡琳琳, 房文红, 等. 恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在拟穴青蟹体内的药代动力学 [J]. *水产学报*, 2011, 35(8): 1182-1190. ZHOU S, HU L L, FANG W H, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in mud crab (*Scylla paramamosain*) [J]. *Journal of fisheries of China*, 2011, 35(8): 1182-1190 (in Chinese with English abstract).
- [10] 余开, 赵青松, 陈寅儿, 等. 恩诺沙星在三疣梭子蟹主要组织中的代谢动力学 [J]. *生物学杂志*, 2011, 28(4): 25-29. YU K, ZHAO Q S, CHEN Y E, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in main tissues *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of biology*, 2011, 28(4): 25-29 (in Chinese with English abstract).
- [11] 司力娜, 陈琛, 李绍戊, 等. 恩诺沙星在金鲢和哲罗鲑鱼体内的药代动力学比较 [J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6): 390-392. SI L N, CHEN C, LI S W, et al. Comparison of the pharmacokinetics of enrofloxacin in golden trout and Jerome salmon [J]. *Jiangsu agricultural sciences*, 2011, 39(6): 390-392 (in Chinese).
- [12] 赵凤, 周洲, 刘永涛, 等. 恩诺沙星及其代谢物在西伯利亚鲟体内的药代动力学及消除规律 [J]. *西南农业学报*, 2017, 30(4): 957-961. ZHAO F, ZHOU Z, LIU Y T, et al. Pharmacokinetics and elimination of enrofloxacin and ciprofloxacin (enrofloxacin metabolite) in *Acipenser sibirica* [J]. *Southwest China journal of agricultural sciences*, 2017, 30(4): 957-961 (in Chinese with English abstract).
- [13] 张静波. 恩诺沙星在中华绒螯蟹体内的药物代谢动力学影响因素的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008. ZHANG J B. The effect on the pharmacokinetics of enrofloxacin in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Nanjing: Nanjing Agricultural University*, 2008 (in Chinese with English abstract).
- [14] HUANG Y Q, CHEN X X, WANG H, et al. Pharmacokinetics of florfenicol in blunt-snout bream (*Megalobrama amblycephala*) at two water temperatures with single-dose oral administration [J]. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 2019, 42(5): 564-571.
- [15] 潘明轩, 李兆新, 邢丽红, 等. 恩诺沙星及其代谢产物在南美白对虾体内药代动力学研究 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(6): 1261-1267. PAN M X, LI Z X, XING L H, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its residue ciprofloxacin in *Penaeus vannamei* [J]. *Journal of food safety and quality*, 2018, 9(6): 1261-1267 (in Chinese with English abstract).
- [16] SHAN Q, FAN J, WANG J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin after oral, intramuscular and bath administration in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Journal of veterinary pharmacology & therapeutics*, 2017, 41(1): 159-162.
- [17] 艾晓辉, 刘长征, 周运涛. 不同水温和给药方式下磺胺甲噁唑在草鱼体内的药代动力学研究 [J]. *水生生物学报*, 2005, 29(2): 99-103. AI X H, LIU C Z, ZHOU Y T. A study on pharmacokinetic of sulphamethoxazole in grass carp at different temperatures and administration regimes [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 2005, 29(2): 99-103 (in Chinese with English abstract).
- [18] 中华人民共和国农业农村部. GB 31650—2019: 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2019. Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the PRC. GB 31650—2019: National food safety standard maximum residue limits for veterinary drugs in foods [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2019 (in Chinese).
- [19] KIRBY A, LEWBART G A, HANCOCK-RONEMUS A, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in Atlantic horseshoe crabs (*Limulus polyphemus*) after single injection [J]. *Journal of veterinary pharmacology & therapeutics*, 2017, 41(2): 349-353.
- [20] 岳刚毅, 吴志新, 杨倩, 等. 氟苯尼考及氟苯尼考胺在克氏原螯虾体内药物代谢动力学 [J]. *水生生物学报*, 2011, 35(2): 307-312. YUE G Y, WU Z X, YANG Q, et al. Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite, florfenicol amine, in red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* [J]. *Acta hydrobiologica sinica*, 2011, 35(2): 307-312 (in Chinese with English abstract).
- [21] 赵海军, 欧安, 简纪常, 等. 恩诺沙星在凡纳滨对虾体内的代谢和残留消除规律 [J]. *广东海洋大学学报*, 2010, 30(6): 35-38. ZHAO H J, OU A, JIAN J C, et al. Elimination of enrofloxacin

residues and its metabolism in *Penaeus vannamei*[J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2010, 30(6): 35-38 (in Chinese with English abstract).

[22] 杨秋红, 艾晓辉, 刘永涛, 等. 不同温度下恩诺沙星及其代谢物在斑点叉尾鲴各组织中的残留及消除规律比较[J]. 水生生物

学报, 2017, 41(4): 781-786. YANG Q H, AI X H, LIU Y T, et al. Studies on elimination dynamics of enrofloxacin residues and its metabolites *Channel actfish* at two different water temperatures[J]. Acta hydrobiologica sinica, 2017, 41(4): 781-786 (in Chinese with English abstract).

## Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Procambarus clarkii* at different temperatures

WANG Huan<sup>1,2</sup>, XU Lili<sup>1,2</sup>, CHEN Xiaoxuan<sup>1,2,3</sup>, YUAN Junfa<sup>1</sup>,  
TIAN Ding<sup>1</sup>, JIANG Fei<sup>2</sup>, WU Zhixin<sup>1,2,3</sup>

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Engineering Technology Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China;

3. National Demonstration Center for Experimental Aquaculture Education, Wuhan 430070, China

**Abstract** In this experiment, at 18 °C and 2 °C, enrofloxacin was injected at a dose of 20 μg/kg to study the pharmacokinetics characteristics and residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in *Procambarus clarkii*. The results showed that the recovery rates of enrofloxacin and ciprofloxacin in the hemolymph, muscle, hepatopancreas and pancreas were from 80% to 110%. The intra-day variation coefficients of the detection values were less than 5%, and the inter-day variation coefficients were less than 6%. The detection limits were all below 0.01 μg/mL (μg/g). The  $T_{max}$  of enrofloxacin in the hemolymph, muscle, hepatopancreas at 18 °C was 0.083 0 h, 0.344 7 h, and 1.933 5 h, respectively, and the  $T_{max}$  of ciprofloxacin was 0.083 0 h, 0.263 4 h, and 1.165 8 h, respectively. Increasing the temperature accelerated the absorption of enrofloxacin in *P. clacherii*. The order of elimination half-life  $T_{1/2\beta}$  was hepatopancreas (55.740 3 h) > muscle (52.743 7 h) > plasma (18.608 7 h). With enrofloxacin and ciprofloxacin as residual markers, the elimination period of enrofloxacin in the hepatopancreas and pancreas was 311.47 h at 25 °C, and the elimination period of enrofloxacin in hepatopancreas and pancreas was 417.77 h at 18 °C. It is recommended that the enrofloxacin withdrawal period is 325 (°C · d).

**Keywords** enrofloxacin; ciprofloxacin; *Procambarus clarkii* (crayfish); pharmacokinetics; drug residue; reasonable dosage; drug holiday; food safety; disease prevention and control

(责任编辑: 边书京)