

文章编号:1000-0615(2009)04-0672-07

不同水温下强力霉素在斑点叉尾鲷体内的残留消除规律

丁俊仁¹, 汪开毓¹, 艾晓辉², 刘永涛², 袁科平², 袁丹宁³

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 雅安 625014;

2. 中国水产科学研究院长江水产研究所农业部淡水鱼类种质监督检验测试中心, 湖北 荆州 434000;

3. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要:研究不同水温(18 ± 1) °C和(28 ± 1) °C下,强力霉素在斑点叉尾鲷体内的残留消除规律。以20 mg/kg鱼体重连续口服斑点叉尾鲷5 d,于停药后第1、3、5、7、9、12、15、24、30、40天分别将斑点叉尾鲷处死后取肌肉(加皮)、肝脏、肾脏3种组织,采用高效液相色谱紫外检测法测定斑点叉尾鲷组织中强力霉素。结果表明,强力霉素在斑点叉尾鲷体内的消除速度与水温有密切关系,不同水温下相同组织,相同水温下不同组织中强力霉素的消除速率不同($P < 0.05$)。高水温时强力霉素在斑点叉尾鲷体内消除快,表明水温对斑点叉尾鲷体内的药物代谢有明显的影响,强力霉素残留的消除速度随水温降低而减慢;与其他组织相比,强力霉素在肝脏中的消除最慢。因此,若将肝脏作为强力霉素在斑点叉尾鲷体内残留的靶组织计算休药期,在(18 ± 1) °C和(28 ± 1) °C时,按欧盟和中国规定的动物组织中强力霉素在肝脏中最高残留限量300 µg/kg计算,从食品安全角度来分析,建议休药期分别为55 d和30 d。若按强力霉素在可食组织肌肉(加皮)中最高残留限量300 µg/kg计算休药期,建议休药期分别为22 d和19 d。本研究旨在不同水温条件下制定强力霉素在斑点叉尾鲷体内的残留限量和休药期提供理论依据。

关键词:斑点叉尾鲷;强力霉素;残留;消除规律

中图分类号:S 948;R 969.1

文献标识码:A

强力霉素(doxycycline, DOTC)又名多西环素、脱氧土霉素,是半合成的四环素类抗菌药,该药于1963年由Stophens等合成,1971年在我国开始投入生产,具有抗菌活性和组织穿透力强、体内分布广、生物利用度高、半衰期较长等优点,现广泛应用在兽医临床^[1-3]和水产上。目前,四环素类抗生素是我国畜禽饲养业中生产量和临床使用量最大的抗生素,盐酸多西环素是第二代四环素类抗生素,其抗菌活性较四环素提高了一倍,尤其在大肠杆菌、巴氏杆菌、支原体感染等水产疾病上效果显著。美国和日本仍在将其作为饲料药物添加剂^[4]。由于人体长期摄入含抗生素残留的水产品后,不断在体内蓄积,当达到一定量时,

就会对人体产生毒性作用。我国水产品出口也因抗菌素药物超标问题而多次遭到欧盟、美国、日本等国家“绿色壁垒”的抵制,给国家造成了巨大经济损失。因而在水产养殖中如何安全使用强力霉素是个重要问题。欧盟对强力霉素在牛、家禽、猪可食性组织(牛:肌肉、肝脏、肾脏;家禽和猪:肌肉、皮肤加脂肪、肝脏、肾脏)中的最高残留限量(maximum residue limit, MRL)均做了详细规定^[5],而在水产品中各组织未见规定。本实验首次对强力霉素在斑点叉尾鲷肌肉(加皮)、肝脏、肾脏组织中的消除规律作了研究,提供了强力霉素在斑点叉尾鲷组织中分布及消除资料,也为制定强力霉素在水产品中的最高残留限量及休药期

收稿日期:2008-07-15 修回日期:2009-01-05

资助项目:国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAK02A22);中国水产科学研究院专项资金项目(2007B003)

通讯作者:汪开毓, E-mail:kywang@sicau.edu.cn

提供了理论基础。目前,国内外对有关四环素类药物的残留检测方法有微生物检定法、荧光分析法、气相色谱法、紫外分光光度法、高效液相色谱法、薄层色谱法和免疫色谱法等^[6],而在水产品上主要是用高效液相色谱紫外检测方法。目前,国内外对强力霉素在鱼体内的残留消除规律的研究未见报道,仅在羊、鸡、牛、马、猪等畜禽中进行过相关研究^[7-10]。本试验首次利用高效液相色谱法研究了不同水温下强力霉素在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)体内的残留消除规律,旨在为水产养殖业中制定该药的休药期提供理论依据,从而为水产品质量安全提供技术保障。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康斑点叉尾鲷,由中国水产科学研究院长江水产研究所窑湾试验场提供,平均体重为 (100 ± 6) g。实验前在 1 m^3 水族箱内暂养一周,每天换水一次,饲喂不加抗菌药物的斑点叉尾鲷全价配合饲料。试验用水为曝气 48 h 自来水,连续充氧,保持水中溶氧大于 8.0 mg/L ,pH 为 $7.5 \sim 8.0$ 。试验过程中停饲并用加热棒控制水温,低温组水温控制在 $(18 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$,高温组水温控制在 $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$ 。

1.2 药品及试剂

强力霉素原粉(纯度 $\geq 98.0\%$,为东北制药总厂生产);强力霉素标准品(纯度 $\geq 99.0\%$,购自德国 Dr. Eherestorfer 公司);化学试剂:乙腈(HPLC 级,上海国药集团产品),甲醇(HPLC 级,美国 Merck 公司产品),肝素钠(生物级,上海惠兴生化试剂有限公司),磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),草酸,高氯酸均为国产分析纯。

1.3 仪器与设备

高效液相色谱仪(Waters 515 泵,717 自动进样器,2487 双通道紫外检测器及 Empower 色谱工作站);自动高速冷冻离心机(日本 HITACHI 20PR-520 型);Mettler-TOLEDO AE-240 型精密电子天平(梅特勒-托利多公司);FS-1 高速匀浆机(华普达教学仪器有限公司);调速混匀器(上海康华生化仪器制造厂);恒温烘箱(上海浦东荣丰科学仪器有限公司);Sartorius PB-10

型酸度计(德国赛多利斯公司)。

1.4 试剂

$0.1 \text{ mol/L Na}_2\text{EDTA}$ -麦氏缓冲液,10% 高氯酸提取液。

1.5 试验设计与采样

DOTC 原粉用蒸馏水配成混悬液,口服灌胃给药,按 20 mg/kg 鱼体质量剂量给药,给药后保定 1 min ,然后将鱼单独放入一个水盆中观察 5 min ,将反胃回吐药的鱼弃去,无回吐的鱼放入水族箱中。给药前同批鱼采 1 次空白组织,每天给药 1 次,连续给药 5 d,于停药后 1、3、5、7、9、12、15、24、30、40 d 各取样一次,在每一时间点取肌肉+皮、肝脏、肾脏,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,避光保存,待测定。

每一时间点各取 5 尾鱼,作为 5 个平行样品分别处理测定。另取 5 尾未给药的鱼作空白对照。

1.6 样品预处理

肝脏、肾脏样品处理 将冷冻保存的肝脏、肾脏样品室温下自然解冻,各称取 0.5 g 于 5 mL 具塞离心管中,加入 2.5 mL 的 10% 高氯酸提取液置调速混匀器上涡旋振荡 2 min ,以 3000 r/min 离心 10 min ,吸出上清液于另一支 5 mL 具塞离心管中,经 $0.45 \mu\text{L}$ 滤头过滤置自动进样瓶中,HPLC 测定。

肌肉(加皮)样品处理 将冷冻保存的肌肉或肌肉(加皮)样品室温下自然解冻,置高速匀浆机中匀浆至组织呈糜状,放入小塑料袋中。准确称取 5 g 放入 50 mL 具塞离心管中,加入 20 mL pH 4.0 的 Na_2EDTA -麦氏缓冲液,置于振荡器上振荡 3 min ,以 5000 r/min 离心 10 min ;残渣中加入 15 mL pH 4.0 的 Na_2EDTA -麦氏缓冲液,重复提取一次,合并上清液。上清液用滤纸过滤后倒入另一支 50 mL 离心管中。用 5 mL 甲醇和 5 mL 蒸馏水活化 Oasis HLB 固相萃取柱,待上清液完全流出后,用 5 mL 20% 甲醇洗柱,弃去全部流出液,最后用 2 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液于 5 mL 离心管中,将洗脱液经 $0.45 \mu\text{L}$ 滤头过滤置自动进样瓶中,HPLC 测定。

1.7 HPLC 分析方法

色谱条件 色谱柱:Waters symmetry C18 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$);流动相:乙腈:甲醇: 0.01 mol/L 草酸溶液(2:1:7, V/V/V);流速:

0.7 mL/min;柱温:室温;紫外检测波长:350 nm;进样量:20 μL 。

标准工作曲线的制备与最低检测限(LOD) 空白组织[肌肉(加皮)、肝脏、肾脏]中加入 DOTC 已知标准液,使其药物浓度范围组织中为 0.05 ~ 10.00 $\mu\text{g/g}$ 。按样品处理方法处理,作 HPLC 分析,以测得的各平均峰面积 A 为横坐标,相应的质量浓度 C_i 为纵坐标绘制标准工作曲线,求出回归方程和相关系数。用空白组织制成低质量浓度药物的含药组织,经预处理后测定,将引起三倍基线噪音的药物的质量浓度定义为最低检测限。

回收率与精密度测定 回收率 = $C_r/C_0 \times 100\%$,其中 C_r 为用空白样品加入一定量的 DOTC 标准品,再按样品预处理方法进样后,测定的 DOTC 的质量浓度; C_0 为加入一定量的 DOTC 标准品,测得 DOTC 的质量浓度。在 4 种空白组织中分别添加 2 个浓度水平的 DOTC 标准液,使组织中质量浓度分别为 0.1 $\mu\text{g/g}$ 和 1 $\mu\text{g/g}$ 。每个浓度的样品,日内做 5 个重复,一周内重复做 5 次,计算日内及日间精密度。

组织中 DOTC 的定量 将 HPLC 测得的 5 种组织中各取样时间点的药物峰面积代入组织标准曲线回归方程,求得各组织中 DOTC 的质量浓度。

1.8 休药期(WDT)的确定

强力霉素按一级动力学过程从体内消除,即在消除后期服从指数消除: $C = C_0 e^{-kt}$,可以根据消除后期测定的组织药物浓度及规定的 MRL,计算各组织药物浓度降至规定水平(MRL)所需的时间(WDT):

$$WDT = \frac{\ln(C_0/MRL)}{K}$$

式中,WDT 为休药期,MRL 为最高残留限量($\mu\text{g/kg}$), C_0 为残留消除对数曲线的截距($\mu\text{g/kg}$), k 为残留消除曲线速率常数。

1.9 数据处理

药物动力学模型拟合及参数计算采用中国药理学学会数学专业委员会编制的 3P97 药动软件分析;标准曲线,药物经时曲线图,消除方程及休药期计算和回归图,采用 Microsoft Excel 2003,SPSS (13.0) 进行计算和绘制。消除方程采用 $C = C_0 e^{-kt}$, C 表示药物浓度, C_0 为残留消除对数曲线

的截距($\mu\text{g/kg}$), k 表示消除速率常数。

2 结果与分析

2.1 标准工作曲线及最低检测限(LOD)

空白组织[肌肉(加皮)、肝脏、肾脏]中加入 DOTC 已知标准液,使其药物浓度范围组织中为 0.05 ~ 10.00 $\mu\text{g/g}$ 。4 种组织中强力霉素标准工作曲线方程及相关系数如下:

肌肉中 DOTC, $A_{i\text{肌肉(加皮)}} = 22773 C_{\text{肌肉(加皮)}} + 81.214, r = 0.9999$;

肝脏中 DOTC, $A_{i\text{肝脏}} = 17335 C_{\text{肝脏}} + 43.796, r = 0.9991$;

肾脏中 DOTC, $A_{i\text{肾脏}} = 26362 C_{\text{肾脏}} + 161.67, r = 0.9989$ 。肌肉(加皮)、肝脏、肾脏中 DOTC 的最低检测限分别为 10、20、20 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 回收率与精密度

本试验条件下,各组织中 5 个质量浓度水平的 DOTC 回收率为 75.13%~92.05%。测得日内精密度的(1.75% \pm 0.072%),日间精密度的(2.83% \pm 0.89%)。

2.3 不同水温下 DOTC 在斑点叉尾鲷体内残留及消除

不同水温下 DOTC 在斑点叉尾鲷体内残留浓度 不同水温下斑点叉尾鲷经口灌强力霉素后在各组织中的残留消除曲线图见图 1。停药后 1 d 和 3 d 时,高温条件斑点叉尾鲷肌肉加皮中 DOTC 浓度均略高于低温条件,但在随后的各采样点肌肉中 DOTC 含量高温条件下的浓度均略低于低温。而肝脏中 DOTC 在不同水温下相差较大,停药后 1 d 时,高温条件肝脏中 DOTC 含量高达(101.016 \pm 0.010) $\mu\text{g/g}$,比低温给药肝脏中 DOTC 浓度(49.588 \pm 2.565) $\mu\text{g/g}$ 高 2 倍左右,说明水温对强力霉素在斑点叉尾鲷体内的代谢有明显的影 响。而且同一时间点,相同水温下,强力霉素的残留量在不同组织中也有较大差别。在停药 1 d 后,药物在肝脏中的浓度最高[(101.016 \pm 0.010) $\mu\text{g/g}$ 和(49.588 \pm 2.565) $\mu\text{g/g}$],其次是肾脏[(6.200 \pm 0.034) $\mu\text{g/g}$ 和(1.738 \pm 0.076) $\mu\text{g/g}$],肌肉 + 皮中最低[(2.758 \pm 0.004) $\mu\text{g/g}$] 和(1.68 \pm 0.291) $\mu\text{g/g}$]。

不同水温下 DOTC 在斑点叉尾鲷体内的消除规律 实验结果表明,强力霉素在斑点叉尾鲷体内残留的消除速度均较缓慢,且存在随水温

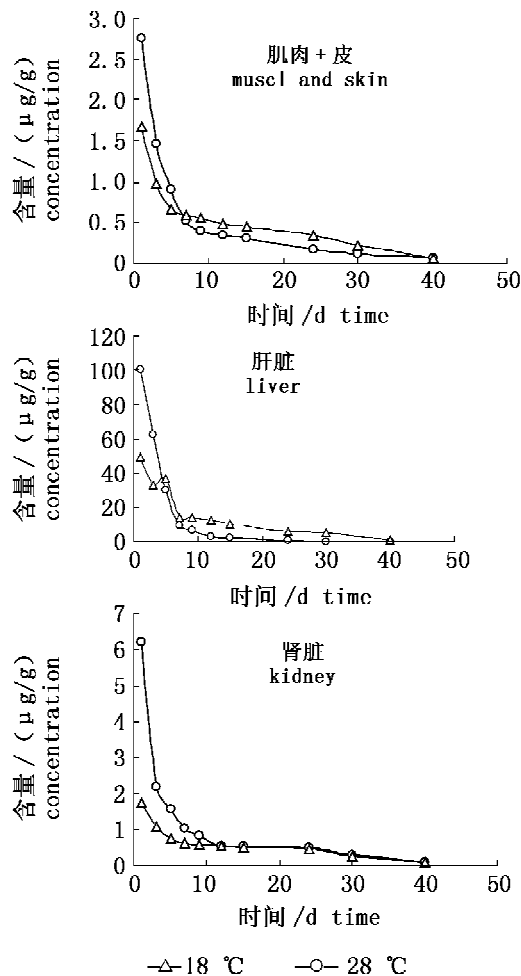


图1 不同水温下斑点叉尾鲷连续5 d口服20 mg/kg b·w DOTC,第5次给药后的药物在各组织中的消除曲线

Fig.1 Elimination curve of DOTC in channel catfish after continuous oral administration of 20 mg/kg b·w for five days at different temperatures

降低而减慢的现象。从表1和表2可以看出, DOTC在18℃下斑点叉尾鲷组织中的消除半衰期均比28℃长。在(28±1)℃水温条件下,肌肉

中的强力霉素残留至第40天浓度仅为(0.066±0.007) μg/g,肝脏和肾脏中的残留至第40天分别为(0.092±0.009) μg/g和(0.079±0.001) μg/g。而当水温降至(18±1)℃时,肌肉中的强力霉素残留至第40天还能检测到0.076 μg/g。

3 讨论

3.1 不同水温条件下 DOTC 在斑点叉尾鲷中的残留消除比较

由消除曲线可以看出 DOTC 在 18℃和 28℃水温条件下的消除速度均较慢,与徐维海等^[11]报道的四环素类抗菌药物在吉富罗非鱼体内的消除规律相似。主要原因之一为 DOTC 属于大环类抗菌药物,易与 Ca²⁺、Mg²⁺等2价或者3价离子络合^[12],在给斑点叉尾鲷口灌 DOTC 混悬液后, DOTC 将与鱼体内的阳离子结合,并且结合后的产物不容易穿过细胞脂膜,造成 DOTC 在鱼体内的消除速度减慢。DOTC 的消除半衰期在不同的对象体内也有差异,在恒温动物体内的消除速度较快,而在变温动物体内的消除速度则明显减缓。EI-Aty 等^[10]对山羊单次静脉注射 5 mg/kg 强力霉素时,药物在体内消除半衰期 4.62 h。Ole-Mapenay 等^[13]报道矮山羊肌肉注射 DOTC,消除半衰期为 24.51 h。与绵羊、山羊相比较, DOTC 在斑点叉尾鲷体内吸收较慢,消除半衰期明显延长。这似乎也揭示,物种的进化影响着 DOTC 的消除速度,由于较高等的动物有较发达的药物排泄系统和器官,也有着完善的药物消除机制,进入体内的药物可以通过肾脏进行主动消除,而使 DOTC 的消除速度明显加快;而较低等的水生动物则只能通过肾脏血管和鳃对药物进行被动消除^[14]。

表1 18℃下连续5 d口服20 mg/kg (b·w) DOTC 在斑点叉尾鲷中消除曲线方程及相关指数

Tab.1 The equation of elimination curve and correlation index in channel catfish after continuous oral administration of 20 mg/kg (b·w) for five days at 18℃

组织 tissue	方程 equation	相关指数 R ²	消除半衰期(h) T _{1/2}
肝脏 liver	$C = 3.7346 e^{-0.08837t}$	0.9270	21.342
肌肉(加皮) muscle and skin	$C = 0.3001 e^{-0.0681t}$	0.9297	20.234
肾脏 kidney	$C = 0.3192 e^{-0.2881t}$	0.9191	11.4758

表2 28℃下连续5 d口服20 mg/kg (b·w) DOTC在斑点叉尾鲷中消除曲线方程及相关指数

Tab.2 The equation of elimination curve and correlation index in channel catfish after continuous oral administration of 20 mg/kg (b·w) for five days at 28℃

组织 tissue	方程 equation	相关指数 R^2	消除半衰期(h) $T_{1/2}$
肝脏 liver	$C = 3.9815e^{-0.1743t}$	0.9408	14.575
肌肉(加皮) muscle and skin	$C = 0.3096e^{-0.088t}$	0.8823	17.998
肾脏 kidney	$C = 1.7756e^{-0.3752t}$	0.9147	7.486

水温是影响药物代谢的重要因素^[15]。在一般情况下,药物的吸收和消除速度随水温的增高而加快。Bjorklund等^[16]认为,通常水温每升高1℃,鱼类的代谢和消除速度将提高10%。Karara等^[17]研究温度对2-乙基己基邻苯二甲酸盐(DEHP)在红鲈(*Cyprnodon variegatlls*)体内药动学规律时也发现,在10、16、23、29和35℃等不同温度下,药物消除随温度升高呈线性上升,他认为温度升高诱导了鳃血流量的增加;艾晓辉等^[18]研究不同水温下SMZ在草鱼体内的消除规律发现,低温条件下,草鱼口服SMZ的分布半衰期 $T_{1/2\alpha}$ 、消除半衰期 $T_{1/2\beta}$ 、达峰时间 T_p 均显著长于28℃高温($P < 0.01$),其峰浓度 C_{max} 显著低于28℃。本文的研究结果与上述报道基本相同。本实验研究表明,DOTC在停药后的第1天,肝脏中浓度最高,肌肉(加皮)中浓度最低。18℃下DOTC在各组织中的残留浓度[肌肉(加皮)、肝脏、肾脏]明显比在28℃下的浓度低;且其消除速度也比28℃下慢得多,在第40天时,18℃下,肌肉(加皮)、肝脏、肾脏浓度依次为(0.076 ± 0.044)、(0.861 ± 0.221)、(0.083 ± 0.053) μg/mL,而28℃下,浓度依次仅为(0.066 ± 0.007)、(0.092 ± 0.009)、(0.079 ± 0.001) μg/mL。以上研究均表明,水环境的变化对水生动物药动学的规律影响很大,一般来说,在一定温度范围内,药物的代谢强度与水温成正比,水温越高,代谢速度加快。因此给药时水温是一个应予以考虑的重要因素,尤其是水温较低时停药期应予适当延长。

3.2 不同水温条件下强力霉素在斑点叉尾鲷组织中的分布规律比较

在不同水温下,强力霉素在各组织中的消除速度和残留浓度有明显的差异,18℃下DOTC在各组织中的残留浓度明显比在28℃下的浓度低,其消除速度也比28℃下慢得多(图1)。同时,DOTC在斑点叉尾鲷肝脏中的残留浓度明显高

于肾脏和肌肉加皮,消除较慢,残留时间也最长,肌肉(加皮)浓度最低,其与李雪梅等^[19]研究的同类药物土霉素残留在鲫鱼体内的消除规律相一致,说明肝脏是药物重要的吸收代谢器官。根据参考资料介绍^[20-21],本实验强力霉素是经口服进入斑点叉尾鲷体内的,经肝循环,由于DOTC的主要代谢场所是在肝脏,通过葡糖醛酸转移酶的作用进行葡糖醛酸化,DOTC会降低肝功能,使其在肝脏中消除速度缓慢,消除率降低;同时,从斑点叉尾鲷肝脏中的DOTC浓度较其他组织高的现象推测,已分布于其他组织中的DOTC又有部分经血液循环被转运到肝脏,一方面导致肝脏中DOTC积累,另一方面又由肝脏重新分配到其他组织中去,这样也使得DOTC在其他组织中的浓度下降缓慢。

3.3 休药期

欧盟对强力霉素在牛、家禽、猪可食性组织(牛:肌肉、肝脏、肾脏;家禽和猪:肌肉、皮肤+脂肪、肝脏、肾脏)中的最高残留限量(MRL)均做了详细规定^[5],而在水产品中各组织未见规定。本实验首次对强力霉素在斑点叉尾鲷肌肉加皮、肝脏、肾脏组织中的消除规律作了研究,提供了强力霉素在斑点叉尾鲷组织中分布及消除资料,也为制定强力霉素在水产品中的最高残留限量及休药期提供了理论基础。通常将残留量高、消除最慢的组织看成是残留分析的靶组织,本实验结果表明,肝脏组织残留量最高、消除最慢,因此,将肝脏作为强力霉素残留分析的靶组织。欧盟规定,强力霉素在动物肝脏内最高残留限量为300 μg/kg,土霉素在水产品中肌肉加皮最高残留限量为300 μg/kg。本实验以此作为参考来计算WDT,通过计算可知:强力霉素在28℃肝脏中的理论WDT为29.53 d,18℃为55 d。但人们常常是去掉内脏,食用的是肌肉和皮,若根据肌肉加皮中的残留浓度来分析,休药期28℃为18.92 d,18℃

为 22 d。水温条件影响着 DOTC 的代谢和消除,故在实际养殖给药时,应适当考虑不同的水温条件来确定具体的休药期,以确保食用安全。

参考文献:

- [1] 刘同忠,张泽波. 盐酸多西环素防治疑似鸡传染性喉气管炎[J]. 畜禽业,1999,7(7):43-44.
- [2] 陈志华. 防治禽大肠杆菌病常用药物[J]. 中国家禽,2004,12(26):27-29.
- [3] 操继跃. 猪呼吸系统感染性疾病药物治疗[J]. 养殖与饲料,2005,(4):39-43.
- [4] 陈育枝,张元元,袁希平,等. 动物四环素类抗生素现状及前景[J]. 兽药与饲料添加剂,2006,11(3):16-17.
- [5] EU. Commission Regulation (EC) No. 508/1999 of 4 March 1999 amending Annexes I to IV to Council Regulation (EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin[S]. Official Journal of the European Communities, 1999.
- [6] 卢运战,祁克宗,朱良强. 四环素类药物残留检测方法研究进展[J]. 家禽科学,2006,10(6):36-39.
- [7] Sárközy G, Semjén G, Laczay P. Disposition of norfloxacin in broiler chickens and turkeys after different methods of oral administration [J]. The Veterinary Journal, 2004, 168: 312-316.
- [8] Riond J L, Tyczkowska K, Riviere J E. Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in calves with mature and immature rumen function [J]. American Journal of Veterinary Research, 1989,(50): 1329-1333.
- [9] 杨海峰,覃少华,王加才,等. 2种多西环素注射液在健康猪体内的药动学比较[J]. 华中农业大学学报,2007,26(1):76-79.
- [10] El-Katy A M A, Goudah A, Zhou H H. Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats [J]. Pharmacol Res, 2004, 49: 487-491.
- [11] 徐维海,林黎明,朱校斌,等. 四环素类抗菌药物在吉富罗非鱼体内的代谢动力学研究[J]. 水产科学,2004,3(3):1-3.
- [12] Mohney L L, Rodney R, Thomas A, et al. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp [J]. Aquaculture, 1997, 149: 193-202.
- [13] Ole-Mapenay I M, Mitema E S, Maitho T E. Aspects of the pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic East African dwarf goats by intramuscular injection [J]. Veterinary Research Communications, 1997, 21(6): 453-462.
- [14] Nouwsj F M, Grondel J L, Schutte A R, et al. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in carp, African catfish and rainbow trout [J]. Vetquart, 1988,(10): 211-216.
- [15] 邓树海,张秀珍,邹立家. 药物动力学与生物药剂学[M]. 天津:天津科技翻译出版公司,1992:436-479.
- [16] Bjorlund H V, Bylund G. Temperature-related absorption and excretion of oxyteracyline in Trout (*Salmo gairidneri* R) [J]. Aquaculture, 1990, 84: 363-372.
- [17] Karara A H, Hayton W L. A pharmacokinetic analysis of the effect of temperature on the accumulation of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in sheepshead minnow [J]. Aquatic Toxicology, 1989, 15: 27-36.
- [18] 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动学研究[J]. 水生生物学报,2005,29(2):210-214.
- [19] 李雪梅,张其中,祝顺琴,等. 土霉素残留在鲫鱼体内的消除规律[J]. 西南师范大学学报,2004,12: 1028-1031.
- [20] 杨先乐,湛嘉. 氯霉素在罗非鱼体内的代谢和消除规律[J]. 水生生物学报,2005,29(3):266-271.
- [21] 姜素椿,宋克. 最新广谱喹诺酮类抗微生物药[M]. 北京:人民军医出版社,1991.

Studies on elimination regularity of doxycycline residues in *Ictalurus punctatus* at different temperatures

DING Jun-ren¹, WANG Kai-yu¹, AI Xiao-hui²,
LIU Yong-tao², YUAN Ke-ping², YUAN Dan-ning³

- (1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;
2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Freshwater Fish Germplasm Quality Supervision and Testing Center, Jingzhou 434000, China;
3. College of Aquaculture, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Doxycycline (DOTC) is a tetracycline broad-spectrum antibiotic widely used for the treatment of systemic bacterial infections. The broad-spectrum antibiotic doxycycline (DOTC) has commonly been used in channel catfish aquaculture to prevent and treat bacterial diseases. In order to study the tissue distribution and elimination of doxycycline (DOTC) in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), continuous (for 5 days) oral administration (20 mg/kg body weight) of DOTC has been investigated in healthy channel catfish at $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ and $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ water temperature. This is first report on tissue distribution and residues of DOTC in channel catfish. After repeated oral administration for 5 consecutive days, channel catfish (*Ictalurus punctatus*) were killed and the muscle and skin, liver, kidney tissues were collected after 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 24, 30, 40 d of oral administration. Doxycycline (DOTC) in tissues was determined by using high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detection. The mobile phase was 0.01 mol/L oxalic acid: acetonitrile: methanol (70:20:10, V/V/V) and UV detection set at 350 nm. Analyte was extracted with McIlvaine buffer-EDTA extraction, whose pH was 4.0. DOTC was eluted from Oasis HLB column with 2 mL methanol. The standard curves were linear in the investigated ranges, 0.05–10.0 $\mu\text{g/g}$ of DOTC in tissues. The correlation coefficient for DOTC was both $r \geq 0.9964$. The recovery of DOTC was from 75.13% to 92.05%. The within-day and day-to-day precision expressed by CV was less than 10% at two drug levels (0.1 and 1.0 $\mu\text{g/g}$). The detection limit for DOTC in muscle and skin, liver, kidney was 10, 20 and 20 $\mu\text{g/kg}$ respectively. The results show that the depletion speed of DOTC in channel catfish closely relates with the water temperature. The elimination rate was markedly different at different water temperature in the same tissues. The depletion of DOTC residue in channel catfish was faster at high water temperature. To compare with other tissues, the elimination of DOTC residue in muscle and skin was other slowest, liver was the main reservoir of DOTC residue in channel catfish. The speed from fast to slow is muscle and skin, kidney, liver. It took liver as target tissue in this experiment. According to the maximum residue limit (MRL) of 300 $\mu\text{g/kg}$ in liver, the withdrawal period should not be less than 30 d and 55 d respectively at $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ and $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ water temperature. This study aims to provide a theoretical basis to make dosage regimen and withdrawal time at different water temperatures.

Key words: *Ictalurus punctatus*; doxycycline; residue; elimination regularity