



液质联用技术测定甲矾霉素及其在斑点叉尾鲷体内的药代动力学

杨秋红¹, 李司棋², 宋 恠³, 刘永涛^{1,3}, 董 靖¹,
杨移斌¹, 周 顺¹, 胥 宁¹, 艾晓辉^{1,3*}

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;

2. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

3. 中国水产科学研究院, 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141)

摘要: 实验建立了斑点叉尾鲷体内各组织中甲矾霉素的高效液相色谱—串联质谱法, 方法中甲矾霉素浓度在 5~100 ng/mL 范围内呈线性相关, 相关系数为 0.998, 平均回收率为 79.05%~95.58%, 相对标准偏差为 2.01%~9.36%, 血浆中甲矾霉素的定量限为 5.0 µg/L, 肌肉、皮肤、肾脏和肝脏中甲矾霉素的定量限为 5.0 µg/kg。实验在水温为 28 °C 条件下, 单次口灌 (按照每 kg 体质量口灌 17.5 mg 的剂量) 甲矾霉素, 并用高效液相色谱—串联质谱法测定各组织中的药物浓度, 采用 3p97 药代动力学软件处理药—时数据, 研究斑点叉尾鲷体内的药代动力学特征。结果显示, 甲矾霉素血浆药—时数据符合一级吸收二室模型, 血药达峰时间 (T_{peak}) 为 8.00 h, 血药浓度峰值 (C_{max}) 为 933.75 µg/L, 药时曲线下面积 AUC 为 12.10 mg/L, 消除半衰期 ($T_{1/2\beta}$) 为 69.32 h, 吸收半衰期 ($T_{1/2ka}$) 为 4.97 h。药代动力学结果表明, 甲矾霉素在斑点叉尾鲷体内呈二室模型分布, 以一级药代动力学方式消除。该方法简单可靠, 满足甲矾霉素的测定及药代动力学研究的要求。

关键词: 斑点叉尾鲷; 甲矾霉素; 药代动力学; 组织分布

中图分类号: R 969.1; S 942

文献标志码: A

甲矾霉素 (thiamphenicol, TAP) 别名为硫霉素、甲矾氯霉素。甲矾霉素为白色的结晶性粉末, 无臭味。其在水中微溶, 在无水乙醇中略溶, 在二甲基甲酰胺中易溶。甲矾霉素是氯霉素类的第二代抗菌药, 抗菌谱和抗菌的作用与氯霉素相似, 且具有广泛的抗微生物作用, 包括需氧革兰氏阴性菌及革兰氏阳性菌、厌氧菌、立克次体属、螺旋体和衣原体属^[1]。甲矾霉素能影响和抑制致病菌的生理代谢过程, 属于

抑菌剂, 具有较强的免疫抑制的作用。甲矾霉素用于治疗淡水鱼、鳖等由气单胞菌 (*Aeromonas*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 等引起的出血病、肠炎、烂鳃病、烂尾病、赤皮病和白头白嘴病等^[2]。其在水产养殖中对水生动物疾病能够起到非常显著的防治效果。

文献报道的甲矾霉素主要的检测方法有高效液相色谱法、液相色谱—三重四级杆质谱法、

收稿日期: 2019-07-30 修回日期: 2020-05-19

资助项目: 现代农业产业技术体系专项 (CARS-46)

第一作者: 杨秋红 (照片), 从事水产品质量安全研究, E-mail: qmini1986@163.com

通信作者: 艾晓辉, E-mail: aixh@yfi.ac.cn



微生物检测法等^[3], 研究对象主要集中在畜禽类如牛、羊、鸡、兔等^[4-9], 水产动物主要有鲤(*Cyprinus carpio*)^[10]、凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[2]、鲫(*Carassius auratus*)^[11-12]、红笛鲷(*Luthjanus sanguineus*)^[13]、眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[14]等。但是不同物种的药物消除差异较大, 所以针对药物开展特定实验对象的药代动力学十分必要。本实验建立了高效液相色谱—串联质谱法, 测定在口灌给药方式下甲砒霉素在斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)体内组织的药物浓度, 分析药物在组织中的分布和药代动力学规律, 为斑点叉尾鲷养殖过程中合理使用甲砒霉素提供依据。

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

甲砒霉素(TAP)标准品(纯度 $\geq 98.5\%$, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司), 氘代甲砒霉素(TAP-D3)标准品(纯度 $\geq 98\%$, 加拿大 TRC 公司), 甲砒霉素原药(纯度为 99%, 购自张家港恒盛化学有限公司), 甲醇、乙酸乙酯、正己烷、水(色谱纯, 美国 J.T. Baker 公司), 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 实验动物

实验所用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。选择健康、规格相近的斑点叉尾鲷 60 尾, 随机分成 20 组, 每组 3 尾, 另外选取数尾作为空白对照。平均体质量为 (86.74 ± 12.63) g, 实验在 $1.0 \text{ m} \times 0.6 \text{ m} \times 0.7 \text{ m}$ 的玻璃水族箱中进行, 水温调节至 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 实验前在室内暂养 1 周, 且每天早晚各喂食 1 次, 并记录水温, 喂药前 12 h 停止喂饲。

1.3 实验设计

称取 TAP 原药 0.175 g, 先用少量的甲醇溶解, 加饲料 10 g 左右, 用蒸馏水定容至 100 mL, 现配现用。以纯的 TAP(参考 2015 版中华人民共和国兽药典)(含量为 17.5 mg/kg 体质量)进行单次口灌, 灌药后选取无吐回的斑点叉尾鲷继续实验。给药后的 0.25、0.5、1、1.5、2、4、6、8、12、24、48、72、96、120、144 和 168 h 分别采集肌肉、皮肤、肝脏和肾脏, 并从尾静脉采集血浆, 用匀浆机和剪刀制成均匀样品, 放于 -20°C

的冰箱冷冻, 待处理。实验时间为 2017 年 8 月。

1.4 样品前处理

血浆的前处理 称取 1 mL 血浆于 10 mL 离心管中, 加入 50 μL 100 ng/mL 的 TAP-D3 内标, 加入 4 mL 2% 的氨化乙酸乙酯提取液, 涡旋振荡 30 s, 再加入 2 g 无水硫酸钠, 涡旋振荡 30 s, 采用 7 000 r/min, 离心 5 min, 转移提取液到另一 10 mL 离心管中, 重复提取 1 次, 合并提取液, 置于 45°C 氮吹仪上氮吹, 吹干后用 2 mL 甲醇: 水(2:8)溶解残渣, 涡旋振荡 30 s, 再加入 2 mL 正己烷, 涡旋振荡 30 s, 采用 7 000 r/min, 离心 5 min, 然后去除上层正己烷, 取下层液体过 0.22 μm 滤膜, 待分析。

肌肉、肝脏、肾脏和皮肤的前处理 称取 2 g 组织样品(不足 2 g 按照实际重量称取)于 15 mL 离心管中, 加入 50 μL 100 ng/mL 的 TAP-D3 内标, 加入 5 mL 2% 的氨化乙酸乙酯提取液, 涡旋振荡 30 s, 再加入 2 g 无水硫酸钠, 涡旋振荡 30 s, 采用 7 000 r/min, 离心 5 min, 转移提取液到另一 10 mL 离心管中, 重复提取一次, 合并提取液, 置于 45°C 氮吹仪上氮吹, 吹干后用 2 mL 甲醇: 水(2:8)溶解残渣, 涡旋振荡 30 s, 再加入 2 mL 正己烷, 涡旋振荡 30 s, 采用 7 000 r/min, 离心 5 min, 去除上层正己烷, 取下层液体过 0.22 μm 滤膜, 待分析。

1.5 实验仪器

高效液相色谱—串联质谱仪(TSQ Quantum Access Max, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、自动高速冷冻离心机(520 型, 日本 HI-TACHI 公司)、Mettler-TOLEDO 精密电子天平(AE-240 型, 瑞士梅特勒—托利多公司)、调速混匀器(HQ-60, 北京北方同正生物技术发展有限公司)、氮吹仪(HGC-12, HENGAOT&D 公司)。

1.6 色谱/质谱分析条件

色谱条件 色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm , 爱尔兰 Waters 公司); 流动相为甲醇: 水=25:75(V/V), 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 35°C , 进样量 20 μL 。

质谱条件 离子源为加热大气压电喷雾离子源(HESI); 离子化模式为负离子模式; 扫描方式为选择离子反应监测模式(SRM); 喷雾电压为 3 000 V; 蒸发气温度为 300°C ; 鞘气和辅

助气均为高纯氮气, 压力均为 5 bar; 碰撞气为高纯氩气, 1.5 m Torr; 离子传输毛细管温度: 320 °C; 一级质谱扫描 (Q1) 半峰宽为 0.7 u, 三级质谱扫描 (Q3) 半峰宽为 0.7 u。TAP 和 TAP-D3 的质谱参数如表 1 所示。

表 1 TAP 和 TAP-D3 的质谱参数

Tab. 1 Mass spectrometry parameters of TAP and TAP-D3

分析物 analyte	母离子/(m/z) parent ion	子离子/(m/z) product ion	碰撞能量/eV collision energy
TAP	354	184.9, 289.9	22, 14
TAP-D3	357	188	23

1.7 标准溶液配制

准确称取 TAP 和 TAP-D3 各 0.050 g, 用甲醇稀释, 用 100 mL 棕色容量瓶定容, 并于 -4 °C 低温避光储存, 有效期为 6 个月。将 TAP 和 TAP-D3 标准储备液用流动相依次稀释, 配制的 TAP 浓度分别为 5、10、20、50 和 100 ng/mL, TAP-D3 均为 5 ng/mL 的浓度梯度。

采用“样品的前处理”部分前处理方法处理空白血浆、肌肉、肝脏、肾脏和皮肤样品, 制备得到空白基质溶液, 用空白基质溶液稀释 TAP 和 TAP-D3 标准储备液, 分别配制浓度为 5、10、20、50 和 100 ng/mL 的基质匹配标准溶液。

1.8 回收率、精密度和检出限

在斑点叉尾鲷空白组织中分别加入 5、50 和 100 µg/kg 的 TAP 和 TAP-D3, 浓度均为 5 ng/mL, 放置至少 30 min, 每个样品同时做 7 个平行。按照“样品的前处理”部分进行样品前处理, 并测定各个组织中的 TAP 的含量, 采用内标法计算平均回收率和相对标准偏差。根据 7 个空白样品基线噪声的平均值和 S/N=3、S/N=10 分别计算方法的检出限和定量限。

1.9 数据分析

标准曲线、药时曲线采用 Microsoft Excel 2017 软件进行处理和绘制, 药动学数据计算采用 3p97 药代动力学程序软件进行处理。

2 结果

2.1 标准曲线、检出限及定量限

以 TAP 和 TAP-D3 的峰面积比值为纵坐标,

以 TAP 的质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 求出回归方程和相关系数。在 5~100 ng/mL 范围内, TAP 线性方程: $Y=0.169\ 2X+0.028\ 2$, 相关系数 $R^2=0.998\ 0$ 。本实验条件下, 血浆中 TAP 最低检测限为 2.0 µg/L, 最低定量限为 5.0 µg/L; 肌肉、肝脏、肾脏和皮肤中 TAP 最低检测限为 2.0 µg/kg, 最低定量限为 5.0 µg/kg。

2.2 准确度和精密度

组织中低、中、高 3 个质量浓度加标水平的 TAP 平均回收率为 79.05%~90.66%, 相对标准偏差为 2.01%~9.36%, 日内变异系数和日间变异系数均 ≤15%, 分析方法满足要求 (表 2)。

2.3 基质效应

对上述基质匹配标准溶液进行测定后, 绘制基质匹配标准工作曲线 (表 3)。用基质匹配标准曲线与溶剂标准曲线的斜率之比 (M) 对基质效应进行评价, 其比值越接近 1, 说明基质效应越小, 反之亦然。结果显示, M 值为 0.860~0.959, 说明基质效应较小, 因此, 浓度计算可直接用标准曲线定量。

2.4 TAP 在斑点叉尾鲷血浆中的主要药动学参数

水温为 28 °C 条件下, 单剂量口灌 (按照每 kg 体质量口灌 17.5 mg 的剂量) TAP 在斑点叉尾鲷体内的药代动力学特征, 血浆中药时曲线见图 1。经过药动学软件 3p97 进行药动学模型拟合和计算, 结果表明, TAP 在斑点叉尾鲷体内的药—时数据符合一级吸收二室模型, 药—时规律分别符合理论方程 $C_{\text{血浆}}=1\ 278.6e^{-0.177t}+1\ 202.8e^{-0.032t}$, 其主要药动学参数见表 4。

2.5 TAP 在斑点叉尾鲷其他组织中的药-时特征

斑点叉尾鲷按照 17.5 mg/kg 体质量的剂量口灌给药后, 肌肉、皮肤、肝脏和肾脏中的药时数据见图 2。TAP 在肌肉、皮肤、肝脏和肾脏中的药物浓度均呈现先升高后降低的趋势, 其中肝脏和肾脏均在 0.5 h 出现第 1 个峰, 此时的药物浓度分别为 1 117.79 和 3 695.51 µg/kg, 皮肤和肌肉中都在 1 h 出现第 1 个峰, 药物浓度分别为 3 306.89 和 431.99 µg/kg。而肝脏、肾脏和肌肉在 4 h 均出现第 2 个峰, 药物浓度分别为 1 301.34、10 502.16 和 1 155.71 µg/kg, 皮肤在 8 h 出现第 2 个峰, 浓度为 6 763.91 µg/kg。168 h TAP 在皮肤

表 2 斑点叉尾鲷组织样品中 TAP 回收率、相对标准偏差和精密度 (n=7)

Tab. 2 Recovery, RSD, and precision of TAP in *I. punctatus* tissue samples

组织 tissue	添加浓度/(μg/kg) spiked concentration	回收率/% recovery	相对标准偏差/% RSD	日内精密度/% intra-day precisions	日间精密度/% inter-day precisions
肌肉 muscle	5	79.05	3.71	2.13	1.52
	50	90.39	2.01	1.84	3.79
	100	86.64	7.27	2.76	1.33
肝脏 liver	5	82.34	9.36	2.36	1.92
	50	86.98	5.58	1.55	3.66
	100	90.41	4.02	2.56	2.43
肾脏 kidney	5	90.28	3.67	4.32	3.29
	50	89.73	6.49	3.73	2.65
	100	85.42	2.89	2.67	3.23
皮肤 skin	5	83.65	5.83	1.15	2.42
	50	89.23	2.69	3.22	2.41
	100	88.99	6.35	2.59	1.53
血浆 plasma	5	81.76	6.41	2.64	1.38
	50	88.62	5.31	3.19	2.67
	100	90.66	2.73	2.22	1.84

表 3 甲砒霉素在不同基质溶液中的回归方程、相关系数、线性范围和基质效应

Tab. 3 Regression equations, correlation coefficients, linear range and matrix effects of TAP in matrix-matched standard solutions

组织 tissue	线性范围/(μg/L) linear range	回归方程 regression equation	相关系数(R^2) correlation coefficient	基质效应/% matrix effect
血浆 plasma	5.0~100.0	$Y=0.145\ 6X+0.196\ 1$	0.997 7	86.0
肌肉 muscle	5.0~100.0	$Y=0.157\ 8X-0.038\ 8$	0.995 4	93.3
肝脏 liver	5.0~100.0	$Y=0.142\ 9X-0.859\ 7$	0.996 1	84.5
肾脏 kidney	5.0~100.0	$Y=0.162\ 2X+0.366\ 7$	0.997 2	95.9
皮肤 skin	5.0~100.0	$Y=0.158\ 1X-0.689\ 5$	0.997 8	93.4

中的含量最高, 药物浓度为 969.49 μg/kg, 血浆中 TAP 浓度最低, 为 22.94 μg/L。

3 讨论

3.1 灌喂剂量

本研究使用的灌喂剂量为 17.5 mg/kg, 该剂量严格参考 2017 年实施的水产行业标准 SC/T 1132—2016《渔药使用规范》(下文简称“渔药使用规范”), 该规范规定甲砒霉素粉(水产用)用于治疗淡水鱼、鳖等水产养殖动物的气单胞菌、假

单胞菌、弧菌等引起的细菌性败血症、肠炎、烂鳃等, 以本品计, 用药量为 350 mg/kg (TAP 5 g : 100 g), 据此计算单次口灌 TAP 浓度应为 17.5 mg/kg。

3.2 甲砒霉素在斑点叉尾鲷血浆中的药代动力学特征

水温为 28 °C 时, TAP 在斑点叉尾鲷血浆中呈现先升后降的趋势, 且呈现双峰现象。给药 0.25 h 后, TAP 的血药浓度为 763.70 μg/L, 并于 0.5 h 迅速达到第 1 个峰值, 浓度 ($C_{\max}$) 为 1 963.03

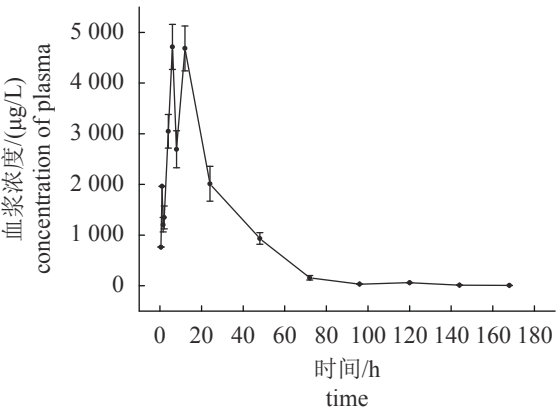


图 1 斑点叉尾鲷口灌甲砒霉素后
血浆中的药-时曲线

Fig. 1 Concentration-time curve of TAP in
plasma following single dose after oral administration

μg/L, 4 h 达到第 2 个峰值 4 712.83 μg/L。表 4 的数据说明 TAP 在斑点叉尾鲷体内吸收快, 达峰时间短, 峰值浓度高, 但消除速率也快, 72 h 后迅速下降到 33.85 μg/L。分布相半衰期 ($T_{1/2\alpha}$) 小于消除相半衰期 ($T_{1/2\beta}$), 说明 TAP 在斑点叉尾鲷体内分布较快, 主要以消除为主; K_{12} 大于 K_{21} , 表明 TAP 从中央室向周边室转运的速率大于从周边室向中央室转运的速率 (表 4)。综上所述, 口灌 TAP 后血浆的药代动力学特征均符合一级吸收二室模型, 其结果与该药在凡纳滨对虾^[2]、鲤^[15]、鲫^[11-12]、红笛鲷^[13]、眼斑拟石首鱼^[14]等动物的药代动力学研究结果一致, 但与陆生家兔^[7]、小牛^[6]、鸡^[16]等动物研究结果存在差异, 此差异可能是种属、给药方式、给药剂量和实

验条件等不同所致。

3.3 甲砒霉素在其他各组织中的药—时浓度特征

实验结果表明, 肾脏中 TAP 含量达峰时间短且峰值明显高于其他组织, TAP 在血管丰富、渗透性好的组织中吸收量较大^[17], 因此, 推测 TAP 在组织中分布速率与残留浓度和血流量有关。TAP 在斑点叉尾鲷各组织中的下降速率都较快, 其中肾脏中的消除速率快于其他组织, 这与潘明轩等^[18]的实验结果相似, 表明 TAP 在鲤体内肾脏中的消除速率常数最大。Ingebrigtsen^[19]在对影响渔药药效的实验中提出, 药物在鱼肾脏中的消除速率常数高于其他组织, 这可能与肾脏血液灌流量较大有关。皮肤和肌肉中的 TAP 第 2 达峰时间分别为 8 和 12 h, 较肝脏和肾脏晚, 这说明 TAP 在皮肤和肌肉中的吸收较慢, 根据随后的数据可见, 168 h 时, 皮肤中的 TAP 浓度为其他各组织中最高, 为 969.49 μg/kg, 且计算消除速率只有 54.18%, 说明 TAP 在皮肤中的消除也较慢。虽然肌肉中 TAP 浓度在 168 h 时较其他各组织低, 但是根据消除速率来计算, 皮肤最低, 肌肉次之。

3.4 方法的优越性

本研究是基于液相色谱—串联质谱法测定, 内标法定量。目前国标法中测定水产品中 TAP 的检测方法有农业农村部 958 号公告-13-2007 的气相色谱法, 但是此方法不仅前处理操作复杂, 而且对于基质较复杂的物质定性较难。之前有

表 4 甲砒霉素在斑点叉尾鲷血浆中的药代动力学参数

Tab. 4 Pharmacokinetic parameters of TAP in plasma following single dose after oral administration

参数 parameter	数值 values	参数 parameter	数值 values
分布相的零时截距/(μg/L) A	31 105.9	药物自周边室到中央室的一级转运速率/(1/h) K_{21}	0.011
分布速率常数/(1/h) α	0.149	药物自中央室的消除速率/(1/h) K_{10}	0.114
消除相的零时截距/(μg/L) B	55.5	药物自中央室到周边室的一级转运速率/(1/h) K_{12}	0.045
消除速率常数/(1/h) β	0.01	0~t 时的药时曲线下总面积/(mg/L)/h $AUC(0-t)$	74.014
药物吸收速率常数/(1/h) K_{α}	0.207	0~∞ 时的药时曲线下总面积/(mg/L)/h $AUC(0-\infty)$	76.527
相对表观分布容积/(L/kg) $V/F(c)$	2.008	药物自体内消除的总清除率/[L/(h·kg)] $C_{L/F}$	0.234
分布相半衰期/h $T_{1/2\alpha}$	4.641	达峰时间/h T_{peak}	4.00
消除相半衰期/h $T_{1/2\beta}$	69.315	峰浓度/(μg/L) C_{max}	4 712.83
吸收相半衰期/h $T_{1/2K\alpha}$	3.349		

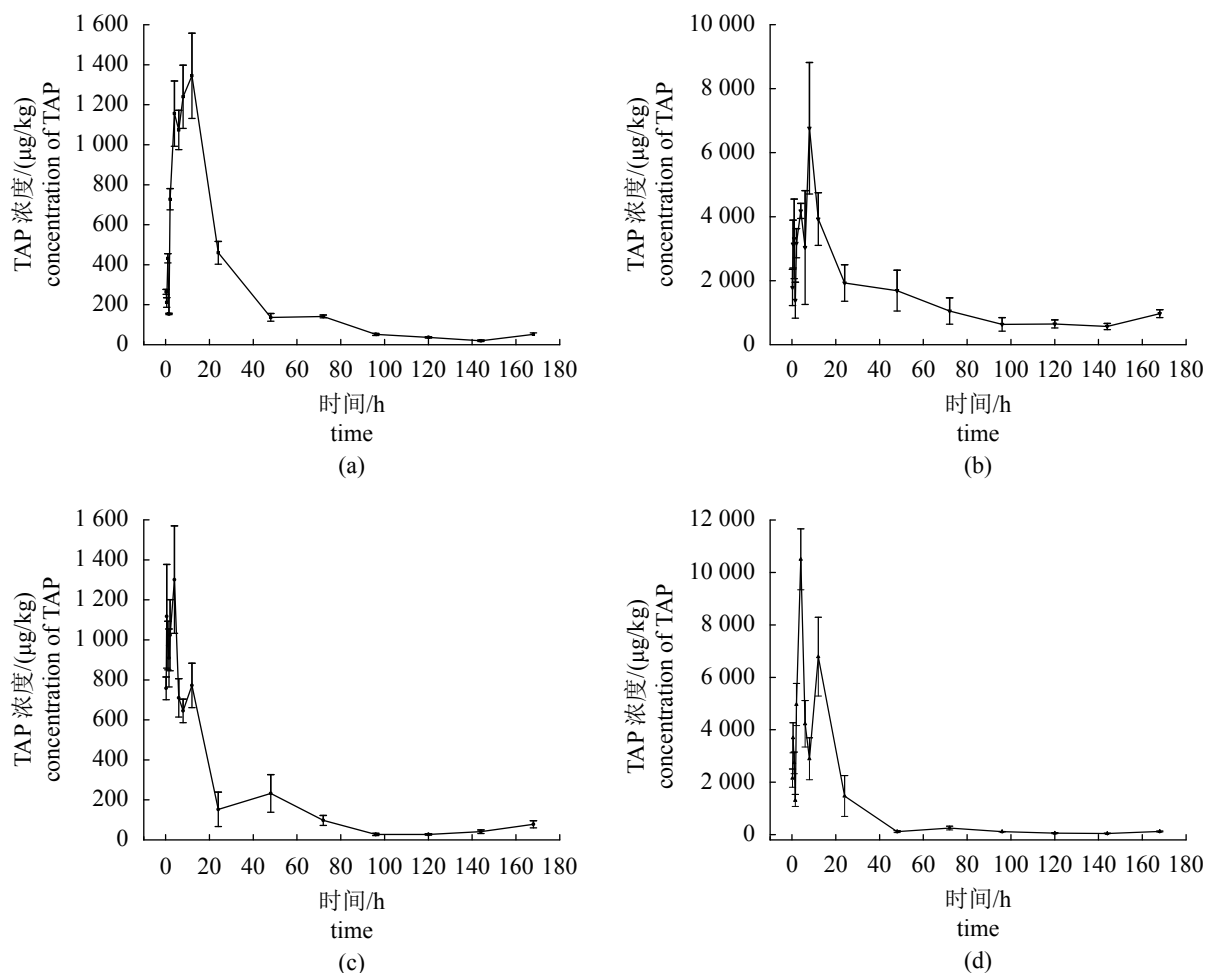


图2 斑点叉尾鲷口服甲砒霉素后在肌肉(a)、皮肤(b)、肝脏(c)和肾脏(d)中的药-时曲线

Fig. 2 Concentration-time curve of TAP in muscle (a), skin (b), liver (c) and kidney (d) following single dose after oral administration

文献报道高效液相色谱—串联质谱法检测鲫^[11]、鲤^[15]和虾^[20]等水产品中TAP的残留量,但是对于不同的基质,特别是含脂量较高的斑点叉尾鲷等鱼类,建立和优化方法有一定的必要。本法考察了甲醇-水和乙腈—水体系为流动相时的分离效果,结果表明,2种流动相均能将TAP与基质干扰峰分开。考虑到成本及环保等因素,最终选择甲醇—水作为流动相,其最优体积比为25:75。采用内标法,方法的前处理操作简单、回收率高、重复性好、灵敏度高,获得的峰形尖锐、对称,无杂质峰干扰,满足斑点叉尾鲷组织样品中TAP药物残留的高灵敏分析需要。

3.5 给药方案建议

TAP是浓度依赖性药物^[21],有研究指出AUC₂₄/MIC和C_{max}/MIC指标是浓度依赖性药物

制定临床给药方案的重要参数^[22]。血药浓度要比MIC高4~10倍才能在临床中产生疗效^[23],但也不能超过临床用药量。王晓洁等^[24]报道了TAP对致病性鳃弧菌最小抑菌浓度为0.8 μg/mL;冯永杰等^[25]报道了TAP对维氏气单胞菌(*A. veronii*)最小抑菌浓度为0.24 μg/mL,对弧菌最小抑菌浓度小于0.06 μg/mL。李梦影等^[26]研究了TAP对嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*, AH10)的体外抗菌效果,结果显示,TAP对AH10的最小抑菌浓度为1.0 μg/mL。本实验在28℃的水温下,以17.5 mg/kg体质量的剂量给斑点叉尾鲷口服TAP,经药代动力学软件3p97模拟,斑点叉尾鲷血浆中TAP的最高血药浓度为4 712.83 μg/L。对比药动学与药效学结果发现,按“渔药使用规范”推荐的TAP剂量(17.5 mg/kg鱼体质量)拌饵投喂给药,对所有的敏感菌引起的疾病都有疗效。因此,

在水产养殖生产上防治斑点叉尾鲷细菌性疾病时, 建议严格按照“渔药使用规范”用药, 做到精准用药, 且不滥用药。

参考文献 (References):

- [1] 姚宜林. 鸡蛋中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留检测方法及其消除规律的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2010.
Yao Y L. Studies on detection method and elimination of residues of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs of laying hens[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2010 (in Chinese).
- [2] 陈玉露. 甲砒霉素和氟甲砒霉素在凡纳滨对虾体内的药代动力学和对药酶影响的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
Chen Y L. Studies on pharmacokinetics and impact to drug metabolic enzyme of thiamphenicol and florfenicol in *Litopenaeus vannamei*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [3] 李兆新, 潘明轩, 邢丽红, 等. 水生动物中甲砒霉素的药理学作用及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(4): 1212-1219.
Li Z X, Pan M X, Xing L H, *et al.* Research progress on pharmacology and detection technology of thiamphenicol in aquatic animals[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(4): 1212-1219(in Chinese).
- [4] Al-Nazawi M H. Pharmacokinetics and tolerance of thiamphenicol in camels and sheep[J]. *International Journal of Pharmacology*, 2005, 1(1): 25-28.
- [5] Gamez A, Perez Y, Marti G, *et al.* Pharmacokinetics of thiamphenicol in veal calves[J]. *British Veterinary Journal*, 1992, 148(6): 535-539.
- [6] Mestorino N, Landoni M F, Alt M, *et al.* The pharmacokinetics of thiamphenicol in lactating cows[J]. *Veterinary Research Communications*, 1993, 17(4): 295-303.
- [7] 邢晓玲, 王姐姐, 袁小秋, 等. 甲砒霉素及HP- β -CD甲砒霉素在家兔体内的药代动力学比较研究[J]. 湖南农业科学, 2009(12): 11-14.
Xing X L, Wang D D, Yuan X Q, *et al.* The pharmacokinetic comparison between thiamphenicol and HP- β -CD thiamphenicol in rabbit[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009(12): 11-14(in Chinese).
- [8] 郭桂芳, 杨大伟, 李勇军, 等. 甲砒霉素在感染多杀性巴氏杆菌鸡体内的药物动力学[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(6): 815-817, 846.
Guo G F, Yang D W, Li Y J, *et al.* Pharmacokinetics of thiamphenicol in experimentally infected chickens with *Pasteurella multocida*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2010, 30(6): 815-817, 846(in Chinese).
- [9] Haritova A, Lashev L, Pashov D. Pharmacokinetics of thiamphenicol in pigs[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 25(6): 464-466.
- [10] Castells G, Intorre L, Bertini S, *et al.* Oral single-dose pharmacokinetics of thiamphenicol in the sea-bass (*Dicentrarchus labrax*)[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2000, 23(1): 53-54.
- [11] 杨洪波, 王荻, 卢彤岩. 甲砒霉素在鲈体内的药物代谢动力学研究[J]. 淡水渔业, 2013, 43(3): 72-76.
Yang H B, Wang D, Lu T Y. Pharmacokinetics of thiamphenicol in *Carassius auratus*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, 43(3): 72-76(in Chinese).
- [12] 李静. 不同温度下甲砒霉素在鲈体内的药物动力学及残留研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
Li J. Pharmacokinetics and residues of thiamphenicol in crucian carp at different temperatures[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [13] 秦青英, 汤菊芬, 黄郁葱, 等. 甲砒霉素在红笛鲷体内的组织分布和药代动力学研究[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(11): 31-36.
Qin Q Y, Tang J F, Huang Y C, *et al.* The distribution and pharmacokinetics of thiamphenicol in tissues of *Lutjanus sanguineus*[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(11): 31-36(in Chinese).
- [14] 黄郁葱, 汤菊芬, 秦青英, 等. 甲砒霉素在眼斑拟石首鱼体内的药代动力学研究[J]. 广东海洋大学学报, 2017, 37(1): 52-57.
Huang Y C, Tang J F, Qin Q Y, *et al.* Pharmacokinetics of thiamphenicol in *Sciaenops ocellatus*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2017, 37(1): 52-57(in Chinese).
- [15] 杨洪波, 王荻, 卢彤岩. 甲砒霉素在松浦镜鲤体内的药物代谢动力学研究[J]. 大连海洋大学学报, 2013, 28(3): 298-302.
Yang H B, Wang D, Lu T Y. Pharmacokinetics of thiamphenicol in Songpu common carp *Cyprinus carpio* L.[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2013, 28(3): 298-302.
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 28(3): 298-302(in Chinese).
- [16] 陈晓兰, 卜仕金. 甲砒霉素在鸡体内的药动学[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(7): 824-827.
- Chen X L, Pu S J. Pharmacokinetics of thiamphenicol in chickens[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2008, 28(7): 824-827(in Chinese).
- [17] 吴银宝, 汪植三, 廖新伟, 等. 恩诺沙星对小型模型水生生态系统中微生物的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(8): 2640-2645.
- Wu Y B, Wang Z S, Liao X D, *et al.* Effects of enrofloxacin on microorganisms in wetlands[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(8): 2640-2645(in Chinese).
- [18] 潘明轩, 李兆新, 邢丽红, 等. 甲砒霉素在鲤鱼中的药代动力学研究[J]. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 166-172.
- Pan M X, Li Z X, Xing L H, *et al.* Drug pharmacokinetic study of thiamphenicol in *Cyprinus carpio*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 166-172(in Chinese).
- [19] Ingebrigtsen K. Factors affecting drug disposition in fish[J]. Acta Veterinaria Scandinavica, 1991, 87: 44-56.
- [20] 彭涛, 李淑娟, 储晓刚, 等. 高效液相色谱/串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(4): 463-466.
- Peng T, Li S J, Chu X G, *et al.* Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in shrimp by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(4): 463-466(in Chinese).
- [21] 杨洪波, 王荻, 卢彤岩. 松浦镜鲤口灌甲砒霉素对嗜水气单胞菌的PK-PD模型分析[J]. 水产学杂志, 2013, 26(2): 49-54.
- Yang H B, Wang D, Lu T Y. Pharmacodynamic effect of thiamphenicol in serum of songpu mirror carp on *Aeromonas hydrophila* in vitro pharmacokinetic model[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2013, 26(2): 49-54(in Chinese).
- [22] 杨亚军, 李剑勇, 李冰. 药动学—药效学结合模型及其在兽用抗菌药物中的应用[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(1): 114-117, 121.
- Yang Y J, Li J Y, Li B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic models and its applications in veterinary antimicrobial drugs[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(1): 114-117, 121(in Chinese).
- [23] 黄守坚, 黎明涛, 陈汝筑. 负荷剂量设计[J]. 新医学, 2003, 34(10): 639-640.
- Huang S J, Li M T, Chen R Z. Loading dose design[J]. New Chinese Medicine, 2003, 34(10): 639-640(in Chinese).
- [24] 王晓洁, 安艳, 杨立红, 等. 常用抗菌渔药对致病性鳃弧菌作用效果比较[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版), 2008, 21(4): 291-294.
- Wang X J, An Y, Yang L H, *et al.* Comparison of inhibiting and bactericidal effects of seven kinds of antibiotic on *Vibrio anguillarum*[J]. Journal of Yantai University (Natural Science and Engineering Edition), 2008, 21(4): 291-294(in Chinese).
- [25] 冯永杰, 孙振丽, 宣引明, 等. 苏州市患病水生动物体内细菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 淡水渔业, 2019, 49(1): 75-80.
- Feng Y J, Sun Z L, Xuan Y M, *et al.* Isolation, identification and antimicrobial susceptibility test of bacteria from diseased aquatic animal collected in Suzhou City[J]. Freshwater Fisheries, 2019, 49(1): 75-80(in Chinese).
- [26] 李梦影, 喻飞, 张国亮, 等. 鲫细菌性疾病控制中甲砒霉素药代—药效动力学联合参数的研究[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(4): 587-593.
- Li M Y, Yu F, Zhang G L, *et al.* Integrated pharmacokinetics- pharmacodynamics parameters of thiamphenicol in crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(4): 587-593(in Chinese).

Determination of thiamphenicol based on liquid chromatography-mass spectrometry and its pharmacokinetics and tissue distribution in *Ictalurus punctatus*

YANG Qihong¹, LI Siqu², SONG Yi³, LIU Yongtao^{1,3}, DONG Jing¹,
YANG Yibin¹, ZHOU Shun¹, XU Ning¹, AI Xiaohui^{1,3*}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

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

3. Key Laboratory of Control of Quality and Safety for Aquatic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China)

Abstract: High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry of thiamphenicol in various tissues of *Ictalurus punctatus* was established in this study. This method has a linear correlation in the concentration range of 5-100 ng/mL, with a correlation coefficient of 0.998. The average recovery was 79.05%-95.58%, and the relative standard deviation was between 2.01% and 9.36%. The quantitative limits of thiamphenicol were 5.0 µg/L in plasma, and 5.0 µg/kg in muscle, skin, kidney, and liver. The pharmacokinetics of thiamphenicol in *I. punctatus* was investigated after oral administration with a single dose of 17.5 mg/kg body weight at the water temperature of 28 °C. The concentration of thiamphenicol in each tissue was determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the data were processed by 3p97 pharmacokinetic software. The results showed that concentration-time data in plasma was described by a first-order absorption with two-compartment model. The T_{peak} was 8.00 h, the C_{max} was 933.75 µg/L, the AUC was 12.10 mg/L, the $T_{1/2\beta}$ was 69.32 h and the $T_{1/2\alpha}$ was 4.97 h. Pharmacokinetic results showed that thiamphenicol was distributed in a two-compartment model in the channel catfish, which was eliminated by first-order pharmacokinetics. The absorption, distribution and elimination of thiamphenicol in channel catfish were relatively fast. The study manifested that the mode of administration and precise administration dosing were also important in the control of channel catfish disease. The method is simple and reliable, and meets the requirements for the determination and pharmacokinetic study of thiamphenicol. The data are of great benefit for practical applications of thiamphenicol in channel catfish.

Key words: *Ictalurus punctatus*; thiamphenicol; pharmacokinetics; tissue distribution

Corresponding author: AI Xiaohui. E-mail: aixh@yfi.ac.cn

Funding projects: China Agriculture Research System (CARS-46)