

文章编号: 1674-5566(2018)06-0916-08

DOI:10.12024/jsou.20180102203

盐酸氯苯胍在异育银鲫体内的药代动力学研究

周宏正¹, 赵燕楠¹, 张祎桐¹, 孙皓¹, 童文涛¹, 吕利群^{1,2,3}

(1. 上海海洋大学 国家水生动物病原库, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 盐酸氯苯胍是防治鲫孢子虫病的常用药。为了给鲫养殖过程中的临床科学用药提供理论依据, 在水温为(25±1)℃时, 分别用 20、30 和 40 mg/kg 的剂量口服灌质量为(120±10)g 的异育银鲫, 利用高效液相色谱法测定 ROBH 在其肾脏、肝脏、血液、肌肉等 4 种组织的药时曲线。结果显示, 3 种剂量给药下, 异育银鲫各组织中的 ROBH 药时曲线均呈双峰现象。不同剂量的药物在异育银鲫血液中的达峰时间、血药质量浓度峰值、药时曲线下面积分别为: 20 mg/kg, $T_{max} = 2.3$ h, $C_{max} = 0.55$ mg/L, $AUC = 9.35$ [(mg/L)·h]; 30 mg/kg, $T_{max} = 2.1$ h, $C_{max} = 0.73$ mg/L, $AUC = 13.02$ [(mg/L)·h]; 40 mg/kg, $T_{max} = 2.2$ h, $C_{max} = 1.17$ mg/L, $AUC = 13.98$ [(mg/L)·h]。给药剂量相同时, ROBH 在异育银鲫各组织中的药时曲线下面积呈现肾脏、肝脏、血液、肌肉由大到小的排列顺序。清除速率显示, ROBH 在肌肉中清除最慢, 其次是血液。ROBH 在肾脏和肝脏中具有一定蓄积作用, 主要表现在药物含量高、MRT 值偏大。本实验条件下, ROBH 在异育银鲫体内的休药期不低于 9 d。但考虑到实际养殖情况和天气原因, 临床休药期可根据实际情况适当延长。本文系首次在大宗淡水鱼中报道 ROBH 的药代规律, 为包括鲫在内的大宗淡水鱼养殖科学用药提供一定的理论指导。

关键词: 异育银鲫; 盐酸氯苯胍; 药代动力学; 黏孢子虫

中图分类号: S 948 **文献标志码:** A

盐酸氯苯胍 (Robenidine Hydrochloride, ROBH) 化学名称为 1,3-双[(对氯苯叉)氨基]胍盐酸盐。ROBH 是一种高效的抗球虫药, 因其具有较好治疗效果, 且毒性小, 见效快, 适口性好, 在鸡、兔的急性、慢性球虫病治疗上使用较广泛。该药主要影响球虫 ATP, 从而干扰球虫蛋白质的代谢^[1]。近些年来, 随着集约化养殖规模加大, 寄生虫感染致病越来越频繁, 严重影响我国水产养殖产量^[2]。黏孢子虫病 (Myxosporidiosis) 在大宗淡水鱼中的爆发属于其中一种^[3]。光危害鲫 (*Carassius auratus*) 养殖的黏孢子虫 (Myxobolus) 就包括 4 种类型: 引起鲫喉孢子虫病的洪湖碘泡虫 (*M. honghuensis*)、引起鲫肤孢子虫病的武汉单极虫 (*Thelohanellus wuhanensis*)、引起鲫鳃孢子虫病的汪氏单极虫 (*Thelohanellus wangi*) 和引起鲫腹孢子虫病的吴李碘泡虫 (*M. wuli*)^[4-6]。ROBH 在 20 世纪 80 年代开发出来之后一直限于兽

用^[7], 后来才渐渐用于水产上, 主要拿来防治淡水鱼类的黏孢子虫病^[8]。据报道, 该药在临床上使用效果明显, 给我国淡水养殖减小了不少损失^[9-11]。临床上, 盐酸氯苯胍常用作一种内服药, 和一些外用药物 (敌百虫和硫酸铜合剂、中药孢子虫速杀等) 配合用可以达到去除体表和鳃上的孢子虫囊, 以及控制鱼体内孢子虫发育的目的^[12]。

但目前关于 ROBH 在淡水鱼体内的药代动力学研究欠缺, 只有关于药残监测方面的零星报道^[8,13-14], ROBH 在国外的报道也只表现在检测方法方面^[15-17]。异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 具有生长快、个体相对较大等特点, 且肉质鲜美, 已经成为我国重要的养殖品种, 在我国从南到北都有养殖。本试验以异育银鲫为研究对象, 利用具有简便、精密、准确的高效液相色谱法研究 ROBH 在该鱼体内的药代动力学, 旨在为大宗淡水鱼类养殖中科学合理使用该药提供理

收稿日期: 2018-01-12 修回日期: 2018-04-24

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-45-19)

作者简介: 周宏正 (1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生动物疾病和药物防控。E-mail: zuhgzg@126.com

通信作者: 吕利群, E-mail: lqlv@shou.edu.cn

论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康异育银鲫 120 尾,购于上海市浦东新区果园某养殖场,体质量(120 ± 10) g,暂养于水族箱内,采用全天曝气水,溶氧充足。试验水温(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。确认无药物使用情况用于实验,实验前停食一周。

1.2 实验试剂

ROBH 标准品:纯度 $\geq 99.0\%$,购自德国 Dr 公司;ROBH 原料药由山西争跃化工有限公司提供,纯度 $\geq 98\%$;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯)、甲酸(分析纯)购自国药集团化学试剂有限公司;磷酸二氢钾(分析纯)购自阿拉丁;无水硫酸钠(分析纯)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.3 实验仪器

LC-100 高效液相色谱仪(带 UV 检测器):上海伍丰科学仪器有限公司;WH-861 漩涡振荡器:太仓华利达设备有限公司;TDL-8M 台式大容量冷冻离心机:上海卢湘仪器有限公司;低温保藏箱:Haier;超声波清洗机:广州邦洁电子有限公司;组织匀浆仪:Sigma;电子分析天平:上海海康仪器有限公司;氮吹仪:上海本昂科学仪器有限公司。

1.4 ROBH 标准溶液的配制

用分析天平准确称取 0.01 g,用甲醇定溶于 100 mL 容量瓶中,配成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ROBH 标准溶液,保存于 -20°C 冰箱中备用。

1.5 标准曲线的建立

准确量取 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ROBH 标准溶液,用甲醇分别稀释成 1、0.5、0.2、0.1、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品。将样品用 0.22 μm 的有机系微孔滤膜过滤,然后进行 HPLC 检测。以质量浓度为横轴(x 轴),以峰面积为纵轴(y 轴)作回归方程。

1.6 色谱条件

ROBH 的 HPLC 分析参考曾勇^[18]的方法,并作适当调整。流动相:V(乙腈):V(0.05 mol/L 的磷酸二氢钾) = 6:4;色谱柱:C18 分析柱(150 mm \times 4.6 mm,5 μm);进样量:20 μL ;波长:353 nm;柱温:室温;流速:1.0 mL/min。

1.7 给药及样品的采集与保存

将 120 尾异育银鲫分成 3 组,将配制好的 20、30、40 mg/kg 鱼体质量剂量的 ROBH 口灌入异育银鲫前肠。口灌后将鱼体直立片刻,无回吐的鱼用于实验。在给药后 0.25、0.5、1、2、3、4、6、8、10、12、24 h 自鱼尾静脉取血,按照 1:10 的体积比例加入 2% 的草酸钾抗凝剂,混匀。并迅速采取鱼肾脏、肝脏和肌肉,将所取样品放置 -80°C 冰箱中保存。

1.8 样品前处理

处理方法参照汤菊芬等^[19]:血浆和各组织在室温下自然解冻,取血液 1 mL,肌肉 1.0 g、肝 2.0 g、肾脏 0.2 g,用组织匀浆仪捣碎,分别于 15 mL 离心管中,依次加入 5 mL 甲醇(含体积分数 1% 甲酸)、4 g 无水硫酸钠,涡旋振荡至充分混匀,超声 15 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,吸取上层清液后,残渣重复上述操作 1 次,合并上清液,在 40°C 水浴中用氮气吹干。用 5 mL 甲醇溶解残渣,涡旋振荡,超声 15 min,以 4 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 有机系微孔滤膜过滤,滤液待上机检测。

1.9 回收率及精密度的

回收率:取空白鱼肌肉等组织 0.9 g 及血液 0.9 mL,分别加入 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ROBH 溶液 100 μL ,使其理论浓度达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,按照 1.8 进行处理,每个浓度样品测 3 次,取其平均值为实测浓度。

精密度:同一样品在一天内不同时间测 3 次,连续测 3 d,计算血液和各组织中 ROBH 的日内和日间平均变异系数,以判断该方法的精密度。

1.10 数据处理

经 HPLC 测出的数据用 Excel 绘制出标准曲线及药物浓度与时间曲线,用 Kinetic 4.4 药代动力学软件计算药代动力学参数。

2 结果

2.1 ROBH 标准工作曲线

ROBH 标准工作曲线回归方程为: $y = 179.35x - 3.9238$ ($R^2 = 0.997$),在 0.05 ~ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,ROBH 的峰面积与其质量浓度呈较好的线性关系(图 1)。以 2 倍基线噪音的药量

为最低检测限,得知在检测环境下,ROBH 的最低检测限为 20 ng/mL。

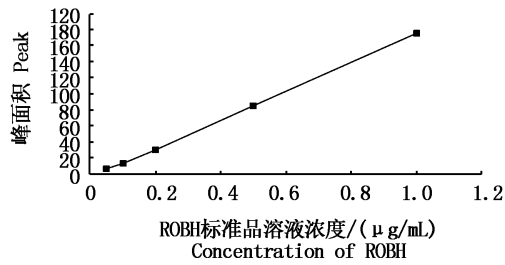


图1 ROBH 标准品工作曲线

Fig.1 Standard curve of ROBH in HPLC assay

2.2 回收率和精密度

如表1所示,在实验用鱼空白血液、肌肉、肾脏和肝脏中分别加入 100 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 的 ROBH 标准溶液时,肌肉中的加标回收率为 89.31% ~ 104.17%,血液中的加标回收率为 92.43% ~ 108.65%,肾脏中加标回收率为 87.63% ~ 91.89%,肝脏中加标回收率为 89.51% ~ 95.67%。血液、肌肉、肾脏和肝脏的日内变异系数分别为 3.76% ~ 4.61%、3.47% ~ 4.38%、3.94% ~ 4.61% 和 4.18% ~ 4.57%,日间变异系数为 2.73% ~ 7.62%。表明用此方法处理样品可以得到较高的回收率,重复性良好。

表1 异育银鲫血液、肌肉、肾脏和肝脏中 ROBH 的回收率和变异系数

Tab.1 Recovery and Variation Coefficients of ROBH in blood, muscle, kidney and liver of Crucian Carp

组织 Tissue	质量浓度 /($\mu\text{g/mL}$) Mass concentration	回收率 /% Recovery	日内变异 系数 /% Intra-day coefficient of variation	日间变异 系数 /% Intr-day coefficient of variation
血液 Blood	1	92.43	3.76	3.51
	10	97.61	4.61	3.12
	100	108.65	4.27	5.37
肌肉 Muscle	1	89.31	3.47	4.16
	10	94.56	3.69	5.53
	100	104.17	4.38	7.62
肾脏 Kidney	1	87.63	4.14	4.51
	10	90.14	4.61	4.67
	100	91.89	3.94	5.73
肝脏 Liver	1	89.51	4.23	5.14
	10	91.47	4.18	4.46
	100	95.67	4.57	5.74

2.3 ROBH 在异育银鲫体内的药代动力学参数

图2显示,该药口灌异育银鲫后各组织中的药-时曲线均呈现双峰现象。其中,图2a为ROBH在异育银鲫血液中的药-时曲线,双峰出现的时间和峰浓度分别是:20 mg/kg 为 2.3 和 10 h,其中 $T_{\max} = 2.2$ h, $C_{\max} = 0.554$ mg/L, $T_{10} = 0.436$ mg/L;30 mg/kg 为 2.1 和 10 h,其中 $T_{\max} = 2.1$ h, $C_{\max} = 0.734$ mg/L, $T_{10} = 0.510$ mg/L;40 mg/kg 为 2.2 和 10 h,其中 $T_{\max} = 2.2$ h, $C_{\max} = 1.172$ mg/L, $T_{10} = 0.739$ mg/L。

图2b为ROBH在异育银鲫肌肉中的药-时曲线。到达2 h左右出现第一个峰,其中 20 mg/kg、30 mg/kg 和 40 mg/kg 第一次出峰时间分别为 2.0 h、1.9 h 和 2.0 h;相对应的峰浓度分别为 $C_{\max} = 0.137$ mg/kg、 $C_{\max} = 0.168$ mg/kg 和 $C_{\max} = 0.21$ mg/kg。在第二次出峰的时间均为 10 h,相对应的药量为 20 mg/kg 是 0.067 mg/kg、30 mg/kg 药量是 0.105 mg/kg、40 mg/kg 的药量是 0.163 mg/kg。肌肉中的含量相对于其他组织而言明显偏低。

图2c和图2d是ROBH在异育银鲫肾脏和肝脏中的药时曲线。ROBH在此两种组织中也呈双峰现象。但在肾脏中,第二次出峰时间有所提前。其中,肾脏中各剂量出峰的时间和峰浓度分别是:20 mg/kg 是 2.0 和 8.0 h, $T_{\max} = 2.0$ h, $C_{\max} = 1.489$ mg/kg, 30 mg/kg 是 2.1 和 8.0 h, $T_{\max} = 2.1$ h, $C_{\max} = 1.849$ mg/kg, 40 mg/kg 是 2.1 和 8.0 h, $T_{\max} = 2.1$ h, $C_{\max} = 2.283$ mg/kg;肝脏中的含量有所增加,同时第二次出峰时间在 10 h 左右。其中各剂量出峰时间和峰浓度分别为 20 mg/kg 是 1.5 和 10 h, $T_{\max} = 1.5$ h, $C_{\max} = 1.509$ mg/kg, 30 mg/kg 是 1.5 和 10 h, $T_{\max} = 1.5$ h, $C_{\max} = 2.016$ mg/kg, 40 mg/kg 是 1.4 和 10 h, $T_{\max} = 1.4$ h, $C_{\max} = 2.750$ mg/kg。

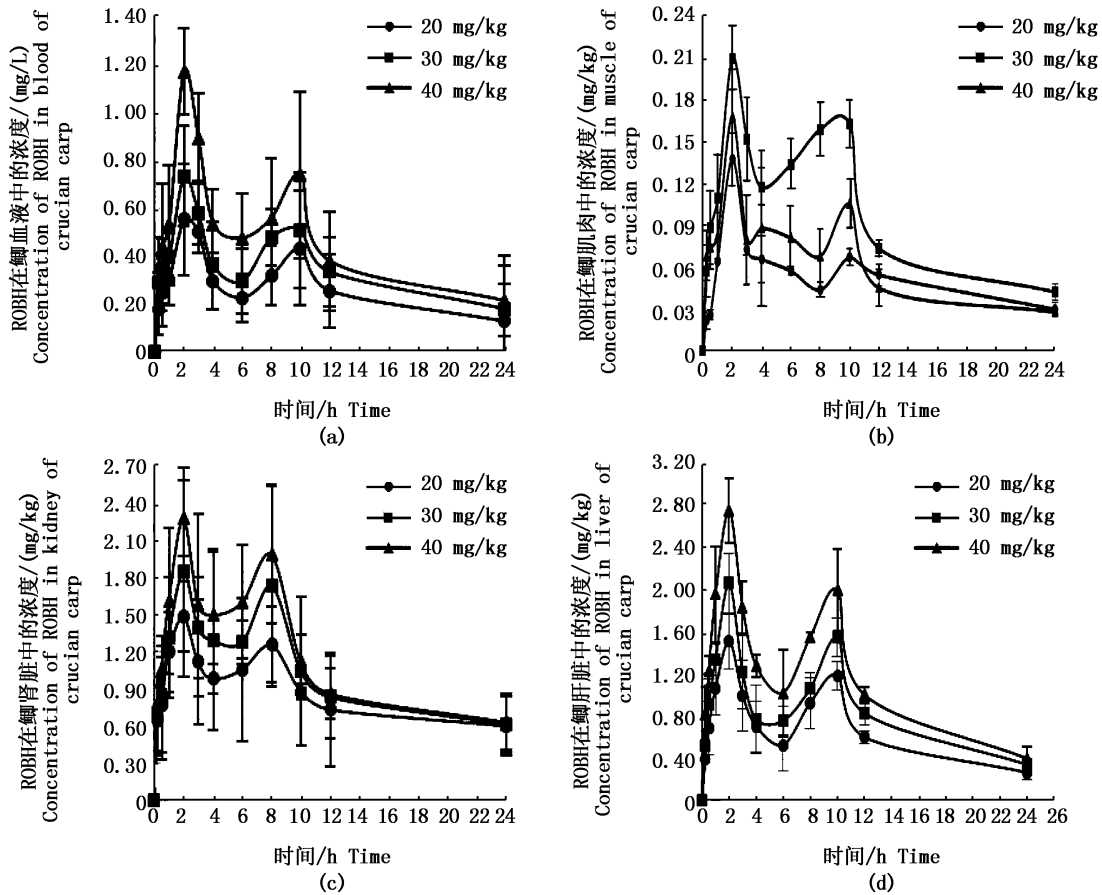


图2 不同 ROBH 口服剂量在异育银鲫各组织内的药-时曲线

Fig.2 ROBH concentration-time curves in different tissues of crucian carp at different oral administration doses

表2 不同 ROBH 口服剂量在异育银鲫各组织内的药代动力学参数

Tab.2 ROBH pharmacokinetic parameters in different tissues of crucian carp at different oral administration doses

参数 Parameters	血液 Blood			肌肉 Muscle			肾脏 Kidney			肝脏 Liver		
	20	30	40	20	30	40	20	30	40	20	30	40
T_{max}/h	2.3	2.1	2.2	2.0	1.9	2.0	2.0	2.1	2.1	1.5	1.5	1.4
$C_{max}/(mg/L)$	0.55	0.73	1.17	0.138	0.168	0.210	1.48	1.85	2.28	1.51	2.06	2.75
$AUC_{(0-1)}/[(mg/L) \cdot h]$	9.35	13.02	13.98	1.488	1.96	3.555	35.11	37.26	38.52	23.78	30.70	36.41
$AUC_{(0-\infty)}/[(mg/L) \cdot h]$	187.01	292.23	212.52	22.508	31.201	69.228	928.48	812.47	722.61	480.25	628.28	597.41
K_{el}/h^{-1}	0.05	0.07	0.07	0.14	0.09	0.09	0.05	0.06	0.07	0.05	0.05	0.06
MRT/h	19.4	20.1	19.5	14.3	15.4	18.7	20.9	21.1	21.2	19.7	20.0	19.9
V_d/L	41.416	50.481	41.536	0.197	0.235	0.210	14.934	17.052	18.858	16.891	19.885	17.740
$CL/[L/(h \cdot kg)]$	2.139	2.305	2.862	0.013	0.015	0.011	0.570	0.805	1.038	0.841	0.977	1.098

3 讨论

3.1 ROBH 在异育银鲫体内的分布与吸收特征

T_{max} 、 C_{max} 是反映药物在体内吸收速率的重要指标。药物在生物体内的吸收、分布与各组织的血流量,亲和力以及其他因素有关。药物分布的

初始阶段与血液的供应是否丰富有关,起始浓度可达很高,但随着时间的延长,药物在组织和器官的分布收到来自药物本身和组织亲和力的影响越来越大,从而形成药物的再分布过程^[20]。经过再分布后,因肝、肾中血液供应非常丰富,所以在肝脏和肾脏中达峰时间较快、浓度高。这与本

研究结果基本相符。在肝脏中,20、30 和 40 mg/kg 3 种剂量的达峰时间分别是 $T_{\max} = 1.5$ 、 1.5 和 1.4 h; 此时的药量分别是 $C_{\max} = 1.51$ 、 2.06 和 2.75 mg/kg; 而肾脏中 20 mg/kg、30 mg/kg 和 40 mg/kg 3 种剂量的达峰时间为 $T_{\max} = 2.0$ 、 2.1 和 2.1 h, 对应的药物含量分别是 $C_{\max} = 1.48$ 、 1.85 和 2.28 mg/kg, 除了达峰时间与其他组织基本相似之外, 最大药物含量却很高。这与彭晓章等^[20]的报道类似, 但与汤菊芬等^[19]的研究中肝脏药物含量不一致, 前者研究的是伊维菌素在鲫体内的药代动力学, 而后者研究的是盐酸氯苯胍在眼斑拟石首鱼体内的药代动力学与残留规律, 出现此情况的原因可能既与药物本身有关, 也与所研究的对象有关。同时, 图 2 显示, 3 种剂量的 ROBH 在异育银鲫各组织中呈现双峰现象, 这与汤菊芬等^[19]的报道一致。据 KROBOTH 等^[21]和 PENTIKÄINEN 等^[22]的报道, 目前口服药出现此现象的原因可能是由肝肠循环和非齐性吸收引起, 而且双峰时间间隔在 2 ~ 20 h 之间。另外, FENG 等^[23]报道口服药进入人体后, 要经过胃肠道两部分的吸收, 而生物体中不同部位的通透性以及同一种药物的吸收不同也会出现双峰现象, 但由于鲫的胃分化不明显, 不会因此产生 ROBH 吸收的双峰现象, 可以排除。

肝脏和肾脏的药时曲线总体相似, 但是这两种器官中该药的第二次出峰时间以及两个峰之间药物含量的变化不同。在肾脏中, 第二次出峰时间与肝脏甚至其他组织均不同, $T_{\max} = 8$ h。并在第一次出峰时间过后, 到第二次出峰之间, 3 种剂量的 ROBH 在肾脏的药量变化没有肝脏中变化大。肾脏中 3 种剂量的 ROBH 药量是 20 mg/kg, $C_3 = 1.119$ mg/kg、 $C_4 = 0.983$ mg/kg、 $C_6 = 1.059$ mg/kg; 30 mg/kg, $C_3 = 1.396$ mg/kg、 $C_4 = 1.292$ mg/kg、 $C_6 = 1.278$ mg/kg; 40 mg/kg, $C_3 = 1.582$ mg/kg、 $C_4 = 1.499$ mg/kg、 $C_6 = 1.604$ mg/kg, 以上变化均在 0.1 mg/kg 左右。肝脏中 3 种剂量的 ROBH 药量是 20 mg/kg, $C_3 = 0.996$ mg/kg、 $C_4 = 0.701$ mg/kg、 $C_6 = 0.526$ mg/kg、 $C_8 = 0.925$ mg/kg; 30 mg/kg, $C_3 = 1.218$ mg/kg、 $C_4 = 0.772$ mg/kg、 $C_6 = 0.758$ mg/kg、 $C_8 = 1.065$ mg/kg; 40 mg/kg, $C_3 = 1.827$ mg/kg、 $C_4 = 1.277$ mg/kg、 $C_6 = 1.022$ mg/kg、 $C_8 = 1.552$ mg/kg, 以上变化均超过 0.4 mg/kg, 而 40 mg/kg 的变化却在

0.8 mg/kg 以上。此结果说明不同的器官和组织通透型不一样, 故分布和吸收的规律也不一样。

口灌后 20、30 和 40 mg/kg 的肌肉药量达峰时间分别为 $T_{\max} = 2.0$ 、 1.9 和 2.0 h, 在血液中药量达峰时间分别为 $T_{\max} = 2.3$ 、 2.1 和 2.2 h。图 2b 显示, 1 h 前药量升高很快, 在 0.5 h 左右稍微放缓, 有所停顿, 但是在 1 h 之后又开始快速升高, 到达 2 h 左右出现第一个峰, 这与血药含量规律很相似。同时, 肌肉中药量在第一次出峰之后快速下降, 此现象与血药含量变化较类似。但是 30 mg/kg 剂量的 ROBH 在 3 ~ 4 h 的过程中有所上升, 而 40 mg/kg 剂量的 ROBH 在 4 h 到第二次出峰期间一直保持药量在上升的趋势, 这与 20 mg/kg 剂量恰恰相反。血液中药量在第一次出峰时间结束后也是快速下降, 而到第二次出峰期间药量变化不大, 与肾脏中在相应期间的药量变化类似。到第二次出峰时, 肌肉中 20 mg/kg 和 30 mg/kg 剂量的药量出峰时间为 10 h, 但是 40 mg/kg 的 ROBH 在第二次出峰时间有所提前。最后在 10 h 之后, 3 种剂量的药物含量均在下降, 但是 20 mg/kg 剂量的下降较前两者缓慢, 但最终 20 mg/kg 和 30 mg/kg 剂量的药物含量在经过下降出现逆差后在 24 h 达到相似的浓度, 可能是由于药物在肌肉中分布速率较慢有关。血药含量在第二次达峰前到 24 h 未出现肌肉药量变化情况的类似现象。

AUC 和 V_d 是衡量药物在体内吸收和分布的主要 PK 参数。AUC 表现的是药时曲线下面积, 反应了药物在各组织中的相对量。3 种剂量按 $AUC_{(0-24)}$ 值由小到大排序均一样, 都是肌肉 < 血液 < 肝脏 < 肾脏。所以由此得知, ROBH 在异育银鲫各组织中的分布与给药剂量无关, 可能跟血液供应量是否丰富和组织器官有关。 V_d 是表现分布容积, 当体内药量一定时, 该值与血药浓度成反比。其所体现的规律是, 若 V_d 值小, 则血药浓度高, 说明该药大部分在血液中; 若 V_d 值大, 则血药浓度低, 说明该药大部分在组织中。按照 V_d 值的大小排序, 3 种剂量均是血液 > 肝脏 > 肾脏 > 肌肉。所以推测药物的 V_d 值可能与药物的理化性质和组织器官有关。

3.2 ROBH 在异育银鲫体内的清除及休药期

CL 表示的是总体清除率, MRT 表示的是平均滞留时间, 前者是反映药物在体内消除的主要

参数之一,后者则与药物的吸收和消除速率有关。表2中显示,3种剂量的ROBH在异育银鲫各组织中平均驻留时间肾脏>肝脏>血液>肌肉,表明该药在肾脏和肝脏中具有蓄积作用,这也证明了肝脏和肾脏是鱼类的主要解毒器官。清除数据显示,肌肉中清除最慢,这与汤菊芬等^[19]和班付国等^[24]的研究相符。

休药期的制定是为了保障食品的食用安全性。国家会规定某种药物的最大残留量(Maximum Residue Limits, MRT)标准和动物对药物的残留消除规律,休药期就是通过此标准和规律进行确定。2002年中国国家农业部颁布的235号公告^[25]中规定ROBH在动物性食品中MRT为100 μg/kg,欧盟^[26]和其他地区^[27]也有此规定,但我国和欧盟均未规定ROBH在水产品中的MRT。本研究以MRT为100 μg/kg来确定休药期,以最大剂量40 mg/kg药物进行计算,24 h时该剂量在肌肉中对应的药量为42.383 μg/kg,低于100 μg/kg。而且ROBH是按照一级动力学消除的,消除后期符合指数消除: $C = C_0 \times e^{-kt}$ 。通过计算得出休药期最少为9天。同时考虑到养殖户投喂情况和天气原因,以及皮肤中未检测,休药期可适当延长。

参考文献:

- [1] 李俊玲,刘学江,徐强,等. 饲料中盐酸氯苯胍的测定[J]. 饲料广角, 2003(15): 20-23.
LI J L, LIU X J, XU Q, et al. The determination of Robenidine HCl in feed[J]. Feed China, 2003(15): 20-23.
- [2] 王玉堂,陈昌福,吕永辉. 水产养殖动物致病菌耐药性检测数据实际作用[J]. 中国水产, 2013(10): 57-61.
WANG Y T, CHEN C F, LÜ Y H. The effect of antibiotic Resistance Test data of pathogenic bacteria in Aquaculture Animals[J]. China Fisheries, 2013(10): 57-61.
- [3] 竹攸汀. 异育银鲫皮肤粘孢子虫病的病原和组织病理研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012.
ZHU X T. Pathogen and histopathology studies of Myxosporean (Myxozoa: Myxosporea) infecting the skin of Allogynogenetic Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [4] 佚名. 黏孢子虫病[J]. 中国水产, 2011(9): 52-53.
ANON. Myxosporidiosis [J]. China Fisheries, 2011(9): 52-53.
- [5] 袁圣. 吴李碘泡虫病[J]. 海洋与渔业, 2015(10): 58-58.
YUAN S. Myxobolus wuli [J]. Ocean and Fishery, 2015(10): 58-58.
- [6] 汪氏单极虫--异育银鲫一粘孢子虫新种及其引发的鳃单极虫病[C]//中国动物学会原生动物学分会第十七次学术讨论会论文集, 2013.
Thelohanelius Wang-The new species and the gill thelohaneliasis caused by the new species of Crucian Carp [C]//The 17th Academic Symposium of the Zoological Society of Chinese Society of Zoology, 2013.
- [7] 范本伦. 氯苯胍: 一种新的高效球虫药[J]. 国外畜牧科技, 1979(3): 43-48.
FAN B L. Robenidine: a new highly effective coccidia drug [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 1979(3): 43-48.
- [8] 吴仕辉,陈昆慈,戴晓欣,等. 分散固相萃取/高效液相色谱法测定水产品中氯苯胍的残留量[J]. 分析测试学报, 2011, 30(12): 1356-1361.
WU S H, WANG K C, DAI X X, et al. Determination of robenidine in fishery products by high performance liquid chromatography with dispersive solid phase extraction [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2011, 30(12): 1356-1361.
- [9] 刘山乔,王高荣. 鲫鱼黏孢子虫病的诊断与防治[J]. 渔业致富指南, 2016(12): 52-53.
LIU S Q, WANG G R. Diagnosis and control of Myxosporidiosis of Carassius [J]. Fishery Guide to be Rich, 2016(12): 52-53.
- [10] 王晓平,陈秀丽,董文,等. 淡水鱼粘孢子虫病的病原分析及防治实例[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(2): 10-12.
WANG X P, CHEN X L, DONG W, et al. The pathogenic characteristics and the treatment of the *Myxosporidia* Disease [J]. Shandong Fisheries, 2010, 27(2): 10-12.
- [11] 章明,袁圣,冯刚. 一例异育银鲫粘孢子虫的治疗案例[J]. 渔业致富指南, 2013(14): 61.
ZHANG M, YUAN S, FENG G. A case of the treatment of *Myxospora* in Crucian Carp [J]. Fishery Guide to be Rich, 2013(14): 61.
- [12] 俞小先,戴俊,窦天明,等. 鲫鱼黏孢子虫病的主要特征、诊断方法与防治措施[J]. 水产养殖, 2009, 30(5): 35-36.
YU X X, DAI J, DOU T M, et al. Diagnostic methods, prevention measures and main characteristics of *Myxosporidiosis* of Carassius [J]. Journal of Aquaculture, 2009, 30(5): 35-36.
- [13] 汤菊芬,蔡佳,廖建萌,等. HP LC-MS/MS法同时测定水产品中的诺氟沙星、盐酸小檗碱、盐酸氯苯胍残留[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(8): 55-60.
TANG J F, CAI J, LIAO J M, et al. Determination of norfloxacin, berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride residues in aquatic products by high performance chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(8): 55-60.

- [14] 刘永涛,董靖,李乐,等. 超高效液相色谱法同时测定水产品中的盐酸氯苯胍及其代谢产物[J]. 分析试验室, 2017, 36(9): 1058-1061.
LIU Y T, DONG J, LI L, et al. Simultaneous determination of robenidine hydrochloride and its metabolites in aquatic products by UPLC [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2017, 36(9): 1058-1061.
- [15] YEOM H, YANG D H, SUH J H, et al. Determination of robenidine residues in chicken muscle by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. Archives of Pharmacal Research, 2013, 36(3): 359-365.
- [16] DOWLING G, O'KEEFE M, SMYTH M R. Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 539(1/2): 31-34.
- [17] OLEJNIK M, SZPRENGIER-JUSZKIEWICZ T, JEDZINIAK P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(46): 8141-8148.
- [18] 曾勇. 动物性食品中氯苯胍和左旋咪唑残留检测方法研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
ZENG Y. Development of methods for determination of robenidine and levamisole residues in animal derive food[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2008.
- [19] 汤菊芬,蔡佳,黄瑜,等. 盐酸氯苯胍在红笛鲷体内的药代动力学及残留消除规律[J]. 广东海洋大学学报, 2016, 36(6): 33-37.
TANG J F, CAI J, HUANG Y, et al. Pharmacokinetics and elimination regularity of robenidine hydrochloride residues in *Lutjanus sanguineus* [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2016, 36(6): 33-37.
- [20] 彭章晓,江敏,吴昊,等. 伊维菌素在鲢体内的药代动力学[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 422-428.
PENG Z X, JIANG M, WU H, et al. The pharmacokinetics of ivermectin in *Carassius auratus* [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 422-428.
- [21] KROBOTH P D, SMITH R B, RAULT R, et al. Effects of end-stage renal disease and aluminum hydroxide on temazepam kinetics [J]. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 1985, 37(4): 453-459.
- [22] PENTIKÄINEN P J, NEUVONEN P J, PENTTILÄ A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glipizide in healthy volunteers [J]. International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy, and Toxicology, 1983, 21(2): 98-107.
- [23] FENG J, XU W, TAO X, et al. Simultaneous determination of baicalin, baicalein, wogonin, berberine, palmatine and jatrorrhizine in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application in pharmacokinetic studies after oral administration of traditional Chinese medicinal preparations containing scutellaria - coptis herb couple [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 53(3): 591-598.
- [24] 班付国,吴宁鹏,李慧素,等. 氯苯胍在鸡组织中的残留消除规律研究[J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(11): 24-26.
BAN F G, WU N P, LI H S, et al. Depletion of robenidine residue in chicken tissues [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(11): 24-26.
- [25] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量[R]. 农业部公告 235 号. 北京: 农业部, 2002.
The ministry of agriculture of the People's Republic of China. Maximum residue limits of veterinary drugs in animal foods [R]. Announcement by the Ministry of Agriculture No. 235. Beijing: Ministry of Agriculture, 2002.
- [26] EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Scientific Opinion on safety and efficacy of Cycostat® 66G (robenidine hydrochloride) for rabbits for breeding and fattening [J]. EFSA Journal, 2011, 9(3). doi: 10.2903/j.efsa.2011.2102
- [27] FAO. Assuring food safety and quality: guidelines for strengthening national food control systems [M]. Geneva: Joint FAO/WHO Publication, 2003.

The Pharmacokinetics of Robenidine hydrochloride in Crucian Carp (*Carassius auratus gibelio*)

ZHOU Hongzheng¹, ZHAO Yannan¹, ZHANG Yitong¹, SUN Hao¹, TONG Wentao¹, LÜ Liqun^{1,2,3}

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Robenidine hydrochloride (ROBH) is widely applied in treatment of diseases caused by sporozoan in freshwater aquaculture. In order to provide theoretical guidance for clinical rational administration in the breeding of crucian carp, pharmacokinetics of ROBH in Crucian Carp with body weight of (120 ± 10) g was studied following oral administration of different doses (20 mg/kg, 30 mg/kg and 40 mg/kg) at water temperature of (25 ± 1) °C. After administration, concentration-time curves of ROBH in tested tissues of crucian carp exhibited a “two-peak” pattern. The peak time, the maximum concentration and the area under the concentration-time curve of three doses in blood were as follows: 20 mg/kg, $T_{\max} = 2.3$ h, $C_{\max} = 0.55$ μg/kg, $AUC = 9.35$ [(mg/L) · h]; 30 mg/kg, $T_{\max} = 2.1$ h, $C_{\max} = 0.73$ mg/kg, $AUC = 13.02$ [(mg/L) · h]; 40 mg/kg, $T_{\max} = 2.2$ h, $C_{\max} = 1.17$ mg/kg, $AUC = 13.98$ [(mg/L) · h]. Area under the concentration-time curve value from higher to lower in tested tissues were: kidney, liver, blood and muscle. The lowest rate of elimination was found in muscle, which was followed by blood. The fact that high ROBH concentration and long MRT were identified in kidney and liver suggested some kind of accumulative effect in both of these two tissues. According to the pharmacokinetics of ROBH in muscle, we suggest a withdrawal period of no less than 9 days in crucian carp. What's more, we suggest the withdrawal period can be adjusted properly because it might be influenced significantly by administration dose and temperature. This is the first pharmacokinetics report about ROBH in freshwater fish, which should be valuable in directing the application of ROBH for disease control.

Key words: Crucian Carp; Robenidine hydrochloride; Pharmacokinetic; Myxosporea