己烯雌酚及代谢物在草鱼（*Ctenopharynodon idellus*）体内的组织分布及药物代谢动力学研究

徐英江[1]，孙岩[1]，任传博[2]，薛敬林[2]，刘慧慧[1]，田秀慧[1]，黄会[2]，宫向红[1]
（1. 山东省海洋资源与环境研究院，山东省海洋生态修复重点实验室，山东烟台 264006）
（2. 烟台山水海产有限公司，山东烟台 264006）

摘要：研究了口服灌药给药方式下，己烯雌酚及其主要代谢物双烯雌酚在草鱼（*Ctenopharynodon idellus*）体内的组织分布和药物代谢动力学。血浆、肌肉和肝脏中浓度-时间曲线符合一级吸收二室开放动力学模型。以 1.0 mg/kg b.w.为例，己烯雌酚峰值水平肝脏最高、肌肉次之、血浆最低，平均消除速率分别为 12.02 μg/(L·h)、1.33 μg/(kg·h)和 3.59 μg/(kg·h)，10 h、192 h 和 168 h 均降至检出限以下。代谢物双烯雌酚变化趋势与己烯雌酚相似，在血浆、肌肉和肝脏中 1 h、6 h 和 6 h 达到最大浓度值，8 h、168 h 和 144 h 降至检出限以下。采用 DAS2.0 计算有关药物代谢动力学参数。血浆、肌肉、肝脏的 AUC 相差较大，不同组织对己烯雌酚的蓄积能力有所差别；血浆、肌肉和肝脏的 CL/F 值较小，说明其在草鱼体内分布广，消除较快。建议其消除期分别定为 6 d、8 d 和 10 d。本研究所得的药时曲线可为草鱼己烯雌酚的消除净化提供数据支持。

关键词：己烯雌酚；双烯雌酚；草鱼；药物代谢动力学；超高效液相色谱-串联质谱法
文章篇号：1673-9078(2014)6-103-109

Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Diethylstilbestrol and Its Metabolite Dienestrol in *Ctenopharynodon idellus*

XU Ying-jiang[1], SUN Yan[1], REN Chuan-bo[2], XUE Jing-lin[2], LIU Hui-hui[1], TIAN Xiu-hui[1], HUANG Hui[2], GONG Xiang-hong[1]
(1.Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Shandong Provincial Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology, Yantai 264006, China) (2.Yantai Shanshui Seafood Co. Ltd, Yantai 264006, China)

Abstract: Diethylstilbestrol and its metabolite dienestrol in *Ctenopharynodon idellus* by oral administration were investigated in their tissue distribution and pharmacokinetics, and they were quantified by UPLC-MS. Diethylstilbestrol concentrations-versus-time was well described by a two-department open model with first-order absorption. For example, after single oral of 1.0 mg/kg (b.w.) diethylstilbestrol, the highest concentration of it was detected in liver, followed by muscle and plasma. The average elimination speed was 12.02 μg/(L·h), 1.33 μg/(kg·h) and 3.59 μg/(kg·h), respectively, for plasma, muscle and liver. No diethylstilbestrol was detected after oral administration of 10 h, 192 h and 168 h. The variation of dienestrol concentrations in plasma, muscle and liver of *Ctenopharynodon idellus* was similar to that of diethylstilbestrol, which was increased first and then decreased. Concentrations of dienestrol in plasma, muscle and liver reached the peak after oral administration of 1 h, 6 h and 6 h, and no detection after 8 h, 168 h and 144 h. The relevant pharmacokinetic parameters of diethylstilbestrol were calculated by using DAS 2.0. Taking the concentration of 1.0 mg/kg b.w. diethylstilbestrol as example, it was indicated that area under concentration-time curve (AUC) differed greatly and the tissues had different accumulation capability. The overall clearance rate was 1.434 L/(h·kg), 0.126 L/(h·kg) and 0.099 L/(h·kg), indicating diethylstilbestrol was widely distributed and fast eliminated in tissue. It was recommended the eliminated period should be 6 d, 8 d and 10 d. The concentrations versus time curve of diethylstilbestrol provided useful information for studying decontamination of *Ctenopharynodon idellus* that was contaminated by diethylstilbestrol.

Key words: diethylstilbestrol; dienestrol; *Ctenopharynodon idellus*; pharmacokinetics; ultra performance liquid chromatogram tandem mass spectrometry

收稿日期：2014-01-14
基金项目：烟台市科技发展计划资助项目(2012134)；水生动物营养与饲料泰山学者岗位资助项目(2007-2012)
作者简介：徐英江(1979-)，男，助理研究员，研究方向为食品质量与安全；通讯作者：宫向红(1968-)，女，研究员

己烯雌酚（Diethylstilbestrol，DES）和双烯雌酚（Dienestrol，DS）是人工合成的非甾体雌激素物质，双烯雌酚已经确证为己烯雌酚的代谢物[1~2]，两物质均具有化学结构简单、易通过化学合成获得和成本低的特点[3]。在水产养殖中，己烯雌酚主要作用是添加到鱼类的饲料中[4~6]，刺激鱼类正常代谢，促进鱼类体内氮停留增加，加快鱼体内氨基酸合成蛋白质的速度，最终起到促进鱼类生长的作用[7~8]。水产品中残留的己烯雌酚和双烯雌酚通过食物链进入人体后，会破坏人体的正常生理平衡[9~10]，其对人类的危害被逐渐发现，且已被证实是一种致癌物质，严重危害人和动物的健康[11~13]。美国和欧盟已禁止使用己烯雌酚。2002年，农业部第193号公告停止己烯雌酚在所有食用动物中使用；并在第235号公告中规定己烯雌酚在动物性食品中不得检出，但目前我国尚未制定己烯雌酚代谢物双烯雌酚的测定标准及限量要求。

草鱼属鲤形目鲤科雅罗鱼亚科草鱼属，生长迅速，并且其饲料来源广，是中国淡水养殖的四大家鱼之一，是我国重要的食用鱼类，不仅营养丰富，而且经济价值高[14]。本文采用口服灌药法对常规养殖的草鱼给药，在已建立的超高效液相色谱-串联质谱法测定己烯雌酚和双烯雌酚的基础上，分析了己烯雌酚和代谢物双烯雌酚在草鱼血浆、肌肉和肝脏中的组织分布，并用软件计算己烯雌酚的药物代谢动力学参数，以期全面了解其在草鱼体内的残留、消除和药物动力学特征。本研究可为其他水生生物的药物代谢动力学提供参考，并为水产养殖提供科学用药依据，最终保障消费者的饮食安全和身体健康。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

甲醇、乙酸乙酯、正己烷、乙腈均为色谱纯，盐酸为优级纯，碳酸钠为分析纯，所用水为超纯水；己烯雌酚和双烯雌酚标准品（纯度 99.5%），内标 D_8-己烯雌酚（纯度 99.5%），购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司；低分子量肝素钠注射液（5000 IU），购自杭州九源基因工程有限公司。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱-串联质谱仪（TSQ Vantage），Thermo；超纯水仪（Milli-Q Gradient），Millipore；高速离心机（TGL-10C），上海安亭科学仪器厂；超声波清洗器（KQ-600E），昆山市超声仪器有限公司；旋转蒸发仪（Laborota 4001），Heidolph；氮吹仪（N-EVAP™112），Organomation Associates；微孔滤膜（0.22 μm），Millipore。

1.3 试验设计及采样程序

试验用草鱼，体重 30 g~40 g，试验前抽样检查无己烯雌酚及代谢物双烯雌酚，试验前暂养 3 d，每天换水 1 次，试验期间不喂食。挑选大小均匀、体质量正常个体进行试验。试验容器为长方形玻璃水槽（70 cm×40 cm×50 cm），连续充氧，保持水中溶解氧大于 5.0 mg/L，暂养期间草鱼存活率大于 95%。选择经过暂养的健康草鱼，随机分为 10 个组，每组约 80 尾。

准确称量一定量己烯雌酚，用冷却的淀粉乳浊液溶解定容，并加入少量食用色素，使淀粉乳浊液呈红色。每尾鱼根据体质量口服相应体积己烯雌酚，按照 0.1 mg/kg b.w.（体质量）、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.3 个浓度口服灌药，试验过程中，记录时间，并且做好标签。具体操作方法：1 mL 注射器上接约为 5 cm 左右软管，吸取适量己烯雌酚后，通到鱼的胃部，灌药后无红色液体吐出，即可作为试验用，否则弃之。每个浓度组在相同的试验条件下设置 3 个重复组。分别在口服灌药后的 0.1 h、0.25 h、 0.5 h、1 h、2 h、3 h、4 h、 6 h、8 h、10 h、12 h、16 h、20 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h、168 h、192 h 和 216 h 采样，试验过程中每天记录水温和草鱼的死亡情况。

血液样品采集：草鱼用抄网捞起，用干净纱布擦干鱼体，插入鳃下心脏取血，放入离心管中（离心管事先放入少量肝素钠），混合均匀后离心，取上层血浆，置于-18 ℃保存。肌肉和肝脏样品采集：去除草鱼内脏、皮和骨骼等，取肌肉，搅碎，装入密封袋；将整个肝脏取出，装入离心管。肌肉和肝脏均置于-18 ℃保存，测定前将其在室温条件下解冻。

1.4 样品前处理及净化

血液样品：取适量血液样品于离心管中，加3 mL 10%（*m*/*V*）碳酸钠溶液，20 mL乙酸乙酯，均质30 s，超声提取10 min，离心取上清液于梨形瓶中，残渣再加入10 mL乙酸乙酯，重复提取一次，合并上清液，于40 ℃旋转蒸发至近干，用1 mL甲醇溶解残留物，加9 mL水稀释，备用。肌肉和肝脏样品：称取适量样品于离心管中，加3 mL 10%（*m*/*V*）碳酸钠溶液，20 mL乙酸乙酯，均质30 s，超声提取10 min，离心取上清液于梨形瓶中，残渣再加入10 mL乙酸乙酯，重复提取一次，合并上清液，于40 ℃旋转蒸发至近干，用1 mL甲醇溶解残留物，加9 mL水稀释，备用。

依次用10 mL乙酸乙酯、10 mL甲醇和10 mL pH为3

的盐酸溶液活化HLB固相萃取小柱，取备用液过柱，控制流速不超过2 mL/min，用10 mL水-甲醇（9:1）淋洗小柱，将固相萃取柱抽干，用10 mL正己烷淋洗小柱，将固相萃取柱抽干，最后用5 mL乙酸乙酯洗脱，控制流速不超过2 mL/min。收集洗脱液，40 ℃水浴中氮吹至近干，流动相复溶过膜，待测。

1.5 超高效液相色谱-串联质谱分析方法

色谱柱：Thermo C_{18}（1.9 μm, 2.1 mm i.d.×100 mm）；流动相：甲醇和水；流速：0.25 mL/min；进样量：10 μL；柱温：35 ℃。

电离方式：HESI-；离子传输管温度：350 ℃；气化温度：350 ℃；鞘气压力：40 arb；辅助气流量：10 arb；喷雾电压：3000 V。己烯雌酚监测离子对：267>222，267>251；双烯雌酚监测离子对：265>93，265>249；D_8-己烯雌酚监测离子对：275>259。

1.6 数据处理方法

每个时间点的测定值取重复组的平均值，采用DAS 2.0药物代谢动力学参数计算程序，在计算机上处理口服灌药后草鱼体内的己烯雌酚含量-时间数据，计算出有关药物代谢动力学参数。

2 结果与讨论

2.1 己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚的定量分析及回收率

配制质量浓度分别为5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL和200 ng/mL己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚的混标溶液，流动相定容，测定结果采用内标法定量，己烯雌酚标准曲线方程为y=0.00597028x-0.0101319，相关系数R^2=0.9975，W：Equal；双烯雌酚标准曲线方程为y=0.0129052x-0.00635208，相关系数R^2=0.9932，W：Equal，上述两公式中，x代表己烯雌酚或双烯雌酚的质量浓度，y代表己烯雌酚或双烯雌酚与内标物D_8-己烯雌酚的峰面积比值；需要注意的是，因己烯雌酚具有顺反结构，且其比例会因前处理条件和标准品放置时间而发生变化，且在本试验条件下，无法测定其比例，所以己烯雌酚与内标物D_8-己烯雌酚的峰面积均取顺反异构体的峰面积之和。在空白草鱼样品中添加己烯雌酚标准溶液，添加水平为0.5 μg/kg时，信噪比（S/N）大于10，表明己烯雌酚检测下限（LOD）可以达到0.5 μg/kg；在空白样品中添加双烯雌酚标准溶液，添加水平为1.0 μg/kg时，信噪比（S/N）大于10，表明双烯雌酚定量下限（LOQ）可以达到1.0 μg/kg。

以空白草鱼样品为基质，己烯雌酚在0.5 μg/kg、5.0 μg/kg和25.0 μg/kg 3个浓度水平，双烯雌酚在1.0 μg/kg、10.0 μg/kg和50.0 μg/kg 3个浓度水平分别进行方法回收率试验，每个浓度组平行测定6次，结果表明：己烯雌酚在上述3个浓度水平的平均回收率在85.0%~108%之间，批内相对标准偏差（RSD，n=6）在7.12%~8.65%之间；双烯雌酚在上述3个浓度水平的平均回收率在73.1%~80.2%之间，批内相对标准偏差（RSD，n=6）在5.02%~7.49%之间；本方法结果稳定可靠，可以用于草鱼实际样品的分析测定。

2.2 口服灌药后己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在草鱼血浆中的分布和消除

草鱼口服灌药相当于0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和10.0 mg/kg b.w.己烯雌酚后，血浆中己烯雌酚及代谢物双烯雌酚浓度-时间曲线如图1所示。自一次口服灌药后，草鱼血浆中己烯雌酚含量逐渐增大，上述3浓度均在第1 h、1 h和2 h达到最大值，最大值分别为14.6 μg/L、108.2 μg/L和1679 μg/L，相当于灌药浓度的0.146倍、0.108倍和0.168倍；随后草鱼血浆内己烯雌酚含量逐渐减少，上述3浓度分别在8 h、10 h和10 h降至检出限以下，均出现前期消除速率快、后期消除速率相对减缓的趋势，己烯雌酚平均消除速率分别2.09μg/(L·h)、12.02 μg/(L·h)和209.8 μg/(L·h)。代谢物双烯雌酚呈现与己烯雌酚相似的变化趋势，在给药后0.25 h检测出双烯雌酚，给药后第1 h、1 h和2 h达到最大浓度，最大浓度分别为3.45 μg/L、25.3 μg/L和274.5 μg/L，并在6 h、8 h和8h降至检出限以下，消除速率趋势与己烯雌酚一致，其平均消除速率分别0.69 μg/(L·h)、3.61 μg/(L·h)和45.75 μg/(L·h)；浓度越高，平均消除速率越大；双烯雌酚平均消除速率均小于相同条件下己烯雌酚的平均消除速率。

2.3 口服灌药后己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在草鱼肌肉中的分布和消除

草鱼口服灌药相当于0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和10.0 mg/kg b.w.己烯雌酚后，肌肉中己烯雌酚及代谢物双烯雌酚浓度-时间曲线如图2所示。

自一次口服灌药后，肌肉中己烯雌酚含量逐渐增大，上述3浓度均在第6小时达到最大浓度，最大浓度值分别为26.9 μg/kg、247.8 μg/kg和2228 μg/kg，相

当于灌药浓度的 0.269 倍、0.248 倍和 0.223 倍；随后草鱼体内己烯雌酚含量逐渐减少，上述 3 浓度分别在 72 h、192 h 和 216 h 降至检出限以下，均出现前期消除速率快、后期消除速率相对减缓的趋势。

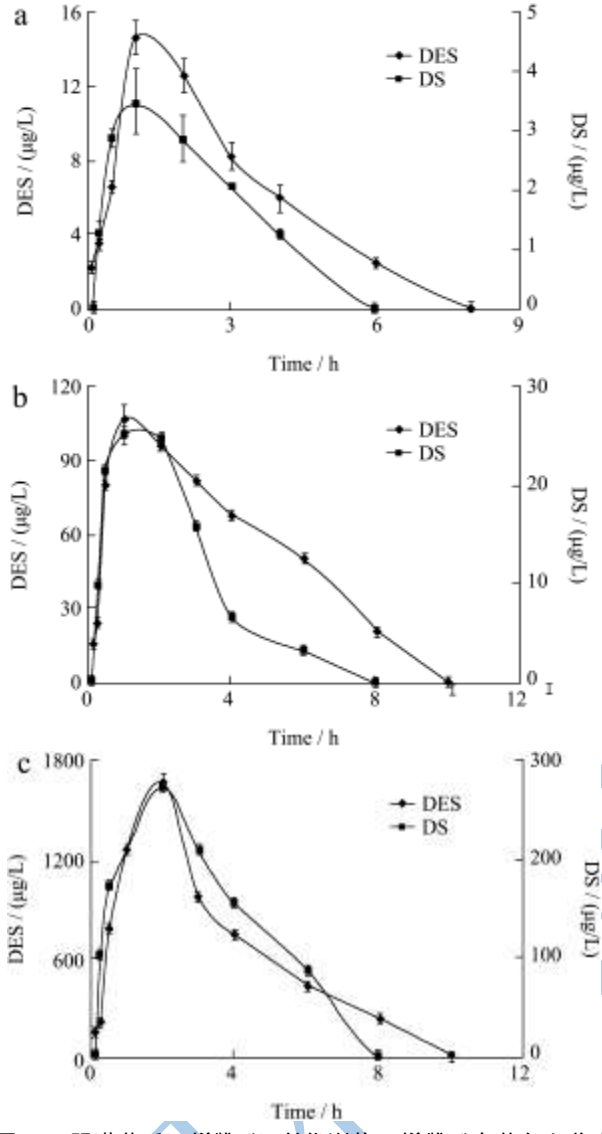


图 1 口服灌药后己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在草鱼血浆中的浓度-时间图

Fig.1 Content of diethylstilbestrol and its metabolite Dienestrol in plasma

注：a、b、c 依次为口服灌药 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w. 和 10.0 mg/kg b.w.。

至试验第 24 h，己烯雌酚已降至 1.52 μg/kg、30.8 μg/kg 和 359.6 μg/kg，仅为最高浓度的 5.65%、12.4% 和 16.1%，己烯雌酚平均消除速度分别 0.41 μg/(kg·h)、1.33μg/(kg·h)和 10.6 μg/(kg·h)。说明高浓度己烯雌酚平均消除速率明显大于低浓度；若浓度减少百分比相同的条件下，高浓度组所需时间更短。代谢物双烯雌酚呈现与己烯雌酚相似的变化趋势，分别在给药后 0.5 h、0.1 h 和 0.1 h 检测出双烯雌酚，给药后 6 h 达到最大浓度，最大浓度值分别为 3.51 μg/kg、16.9 μg/kg 和 154.8 μg/kg，并在 48 h、168 h 和 192 h 降至检出限以下，消除速率趋势与己烯雌酚一致，双烯雌酚平均消除速度分别 0.084 μg/(kg·h)、0.10 μg/(kg·h)和 0.83 μg/(kg·h)。

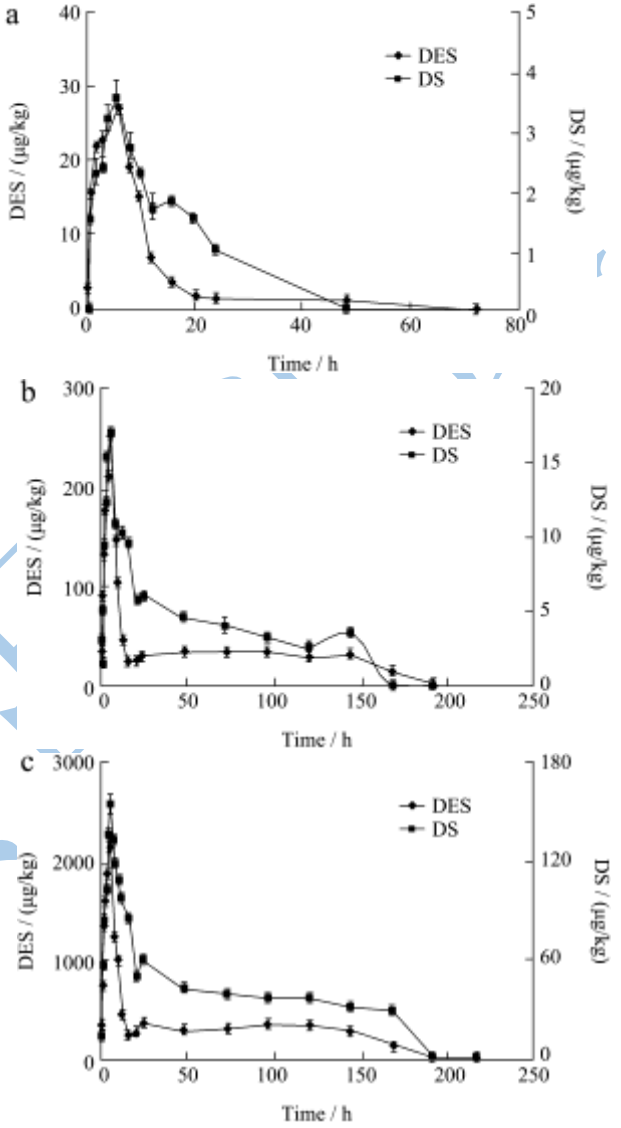


图 2 口服灌药后己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在草鱼肌肉中的浓度-时间图

Fig.2 Content of diethylstilbestrol and its metabolite Dienestrol in muscle

注：图 a、b、c 依次为口服灌药 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.。

类似血浆，己烯雌酚及代谢物双烯雌酚均出现先增高后降低的趋势。随着口服灌药浓度升高，己烯雌酚和双烯雌酚含量也逐渐上升。对于不同口服灌药浓度下的草鱼，肌肉的消除情况与血浆中趋势相似，且相比血浆中含量，相同消除时间后，肌肉中含量高于血浆含量。在相同灌药浓度下，己烯雌酚和双烯雌酚在肌肉中的平均消除速率均小于血浆，可能是由于易

于结合草鱼肌肉中的蛋白质，导致消除速率减慢。

2.4 口服灌药后己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在草鱼肝脏中的分布和消除

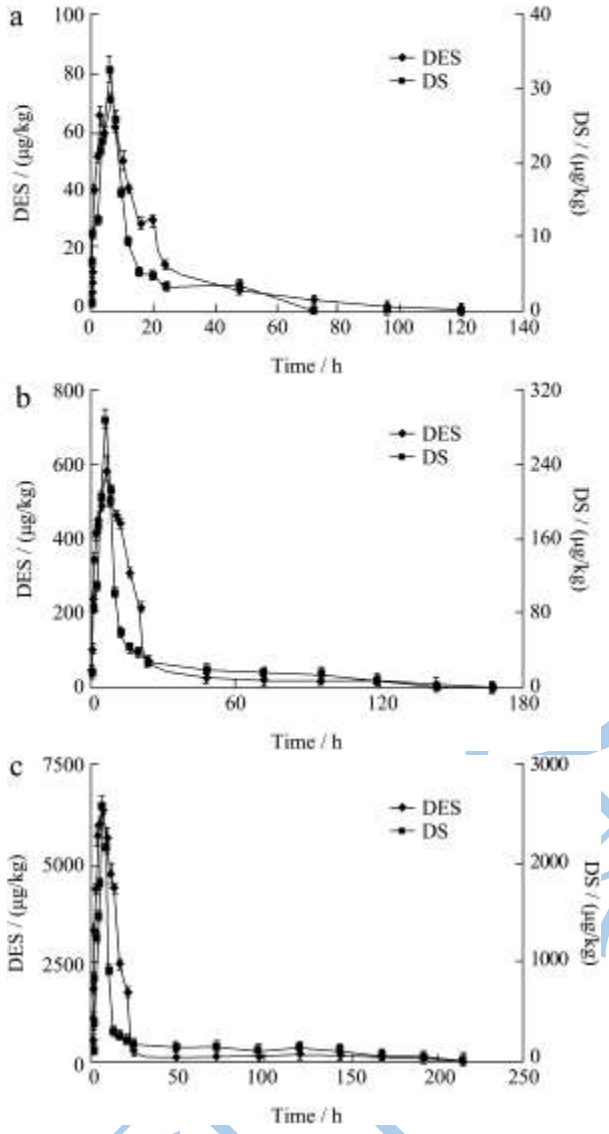


图 3 口服灌药后己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在草鱼肝脏中的浓度-时间图

Fig.3 Content of diethylstilbestrol and its metabolite Dienestrol in liver

注：图 a、b、c 依次为口服灌药 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w。

草鱼口服灌药相当于 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.己烯雌酚后，肝脏中己烯雌酚及代谢物双烯雌酚浓度-时间曲线如图 3 所示，相比较己烯雌酚在血浆及肌肉中的分布和消除，肝脏表现出明显的富集能力。自一次口服灌药后，肝脏中己烯雌酚含量逐渐增大，上述 3 浓度均在第 6 小时达到最大值，最大值分别为 72.1 μg/kg、582.2 μg/kg 和 6363 μg/kg，相对于灌药浓度的 0.721 倍、0.582 倍和 0.636 倍；随后草鱼体内己烯雌酚含量逐渐减少，上述 3 浓度分别在 120 h、168 h 和 216 h 降至检出限以下，均出现前期消除速率快、后期消除速率相对减缓的趋势；至试验第 24 h，己烯雌酚已降至 15.3 μg/kg、68.2 μg/kg 和 257.1 μg/kg，仅为最高浓度 21.2%、11.7%和 4.04%，己烯雌酚平均消除速度分别为 0.63μg/(kg·h)、3.59 μg/(kg·h)和 30.3 μg/(kg·h)。说明在肝脏中，高浓度己烯雌酚消除速率明显大于低浓度；若浓度减少百分比相同的条件下，高浓度组所需时间更短。代谢物双烯雌酚呈现与己烯雌酚相似的变化趋势，均在给药后 0.1 h 检测出双烯雌酚，给药后 6 h 达到最大浓度，最大浓度分别为 32.6 μg/kg、287.9 μg/kg 和 2523 μg/kg，并在 72 h、144 h 和 216 h 降至检出限以下，消除速率趋势与己烯雌酚一致，其平均消除速度分别 0.49 μg/(kg·h)、2.09 μg/(kg·h)和 12.0 μg/(kg·h)。

随着己烯雌酚口服灌药浓度的升高，肝脏中己烯雌酚含量上升；这一点与血浆和肌肉中的变化趋势相同，而且在相同口服灌药浓度下，肝脏中含量是最大的。对于不同口服灌药浓度下的草鱼，经相同消除时间后，肝脏中己烯雌酚含量最高。相比较在血浆和肌肉中的分布和消除，在草鱼肝脏中主要表现在以下几个方面：（1）在相同口服灌药浓度时，相同取样时间下，肝脏内含量要远高于血浆和肌肉中含量；（2）在相同口服灌药浓度时，肝脏浓度最高值以相对于灌药浓度的倍数均高于血浆和肌肉，说明其富集能力远大于血浆和肌肉；（3）虽然肝脏中平均消除最大，但其降至检出限以下所需时间最长。

2.5 己烯雌酚在草鱼血浆、肌肉和肝脏中的药物代谢动力学参数

采用 DAS2.0 药物代谢动力学参数计算程序，处理口服灌药后草鱼血浆、肌肉和肝脏中己烯雌酚含量-时间数据，计算有关草鱼血浆、肌肉和肝脏的药物代谢动力学参数；取其中一组己烯雌酚浓度-时间数据，用对数图进行初步判断，可见 lgC 与 t 呈双指数函数特征，因此选择二室模型。结果如表 1 所示。

2.5.1 己烯雌酚的消除相对半衰期

$t_{1/2\beta}$（己烯雌酚的消除相对半衰期）指己烯雌酚浓度消除到一半所用的时间，描述草鱼对己烯雌酚的消除快慢、决定消除程度的重要指标。在血浆和肌肉中，随着口服灌药浓度的增大，$t_{1/2\beta}$ 值异常，可能与实验过程中取样时间点数、软件本身的设置程序或本实验室的分析测定条件有关，此结论有待进一步研究。

在肝脏中出现随灌药浓度增大，$t_{1/2\beta}$ 逐渐减小的趋势，在 1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.浓度组，$t_{1/2\beta}$ 相差不大。

表 1 己烯雌酚在草鱼血浆、肌肉和肝脏中的药物代谢动力学参数

Table 1 Pharmacokinetic parameters of diethylstilbestrol in plasma, muscle and liver of *Ctenopharynodon idellus*

组织	C_{DES} /(mg/kg)	$t_{1/2\alpha}$ /h	$t_{1/2\beta}$ /h	Ka /(1/h)	T_{lag} /h	AUC(0-t) /[μg/(kg·h)]	Cmax /(μg/kg)	Tmax /h	CL/F /[L/(h·kg)]
血浆	0.1	0.904	5326	0.983	0	46.025	14.6	1	1.832
	1.0	3.453	263923	3.068	0	514.9	108.2	1	1.434
	10.0	1.517	228040	1.588	0	6257.594	1679	1	1.358
肌肉	0.1	2.866	226.48	0.268	0	280.363	26.9	6	1.315
	1.0	2.555	779227	0.315	0	5897.241	247.8	6	0.126
	10.0	2.583	259922	0.317	0	56991.222	2228	6	0.163
肝脏	0.1	1.467	8.861	2.125	0	1299.991	72.1	6	0.077
	1.0	5.867	5.867	0.229	0	10103.653	582.2	6	0.099
	10.0	4.98	5.35	0.281	0	97938.616	6363	6	0.102

注：$t_{1/2\alpha}$：己烯雌酚的吸收相半衰期；$t_{1/2\beta}$：己烯雌酚的消除相半衰期；Ka：己烯雌酚一级吸收速率常数；T_{lag}：时滞；AUC：己烯雌酚浓度-时间曲线下面积；Cmax：口服灌药后，草鱼体内己烯雌酚含量最大值；Tmax：草鱼体内己烯雌酚含量达到最大值的时间；CL/F：草鱼体内己烯雌酚总体清除率。

2.5.2 己烯雌酚浓度-时间曲线下面积

AUC（己烯雌酚浓度-时间曲线下面积）指己烯雌酚进入草鱼体内药量的多少，是衡量己烯雌酚在草鱼体内各组织器官吸收量的重要参数。以口服灌药相当于 1.0 mg/kg b.w.己烯雌酚为例，血浆、肌肉和肝脏中 AUC 由高到低依次为：肝脏（10103.653 μg/(kg·h)）>肌肉（5897.214μg/(kg·h)）>血浆（514.9 μg/(L·h)）；数据显示血浆、肌肉和肝脏中 AUC 值相差很远，肝脏对己烯雌酚的吸收量约是肌肉吸收量的 2 倍和血浆吸收量的 20 倍，说明己烯雌酚的蓄积能力因组织的不同有较大差别。

2.5.3 总体清除率

CL/F（总体清除率，单位时间内草鱼各组织能消除相当于多少容积血中所含的己烯雌酚）与 $t_{1/2\beta}$ 都是衡量己烯雌酚在草鱼各组织消除快慢的指标。以口服灌药相当于 1.0 mg/kg b.w.己烯雌酚为例，血浆、肌肉和肝脏的 CL/F 值依次为 1.434 L/(h·kg)、0.126 L/(h·kg)和 0.099 L/(h·kg)，在 0.1 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.浓度组 CL/F 值变化规律与 1.0 mg/kg b.w.一致。上述数值均较小，说明己烯雌酚在草鱼体内分布广，消除较快。己烯雌酚低的清除率有利于其药效在草鱼体内长时间维持。

2.5.4 己烯雌酚在不同部位的消除

当口服灌药后，草鱼血浆、肌肉和肝脏中己烯雌酚浓度逐渐增大，当达到 Cmax 后，其含量逐渐下降，在口服灌药的 3 个浓度条件下，血浆中己烯雌酚浓度分别在 8 h、10 h 和 10 h 后下降至检出限以下；肌肉中己烯雌酚浓度分别在 20 h、168 h 和 168 h 下降了 90%以上；肝脏中己烯雌酚浓度分别在 48 h、48 h 和 24 h 后下降了 90%以上；值得注意的是，上述数据表明口服灌药后，己烯雌酚在一定时间内可以消除绝大部分，所用时间短，说明所研究时间内平均消除速率较快，但并不代表其最终在体内完全消除所用时间越短；如在 1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.浓度组，己烯雌酚在肝脏中消除 90%比肌肉中所用时间短，但其浓度降至检出限以下比肌肉所用时间长。

2.5.5 代谢物的消除

双烯雌酚作为代谢物，部分相关吸收参数无法使用软件计算，因此本研究仅借鉴使用了消除试验部分的参数 CL/F，可表明双烯雌酚在草鱼体内消除速率的快慢，在 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.浓度组 CL/F 值变化规律一致。以口服灌药相当于 1.0 mg/kg b.w.己烯雌酚为例，血浆、肌肉和肝脏中 CL/F 值分别为 11.032 L/(h·kg)、0.915 L/(h·kg)和 0.193 L/(h·kg)，其值均大于相同条件下己烯雌酚值，说明相比较己烯雌酚，双烯雌酚消除更快。

2.6 己烯雌酚休药期的规定

己烯雌酚通过口服灌药方式进入草鱼体内，在血浆、肌肉和肝脏中的分布和消除能力均不相同，并且随口服灌药浓度的增大，己烯雌酚的蓄积量逐渐增加。草鱼肝脏，主要解毒器官。口服灌药后己烯雌酚渗透到血液中再经肝脏，大部分己烯雌酚被肝脏截留积蓄，因此在血浆、肌肉和肝脏三个组织中，肝脏己烯雌酚

最高值最大，富集能力最强，而且表现出最快的平均消除速度。当草鱼肝脏不能对己烯雌酚进行全部截留时，部分己烯雌酚通过血液循环而被草鱼其他肌肉组织蓄积。所以建议尽量不要食用草鱼肝脏。从饮食安全角度来讲，食用草鱼肌肉部分比食用草鱼整体更安全。

目前水产品残留限量标准对己烯雌酚残留限量做出了要求，规定己烯雌酚在水产品中不得检出。因己烯雌酚在草鱼肝脏内消除时间最长，因此将肝脏定为代谢靶组织。草鱼口服灌药相当于 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.己烯雌酚后，草鱼肝脏内己烯雌酚和双烯雌酚分别在 5 d、7 d 和 9 d 后均降至检出限以下，但并不代表其在草鱼体内已经完全消除。因此在本实验室条件下，其休药期可定为 6 d、8 d 和 10 d。但在实际养殖过程中，存在多次重复给药或投喂含己烯雌酚饲料的情况，投喂直至停药期满，草鱼起池为止。所以本实验室条件下得出的休药期比实际情况要短，综合考虑可将其休药期适当延长。值得注意的是，影响己烯雌酚在草鱼体内代谢的影响因素很多，但水温影响最大。在某特定温度范围内，水温升高，己烯雌酚代谢强度增强；水温降低，代谢强度减弱。水温升高 1 ℃，药物的代谢和消除速度一般提高 10%左右，因此在生产过程中，应根据实际情况和养殖习惯适当缩短或延长休药期。

3 结论

本试验采用草鱼作为试验对象，在口服灌药给药方式下，采用超高效液相色谱-串联质谱法分析测定己烯雌酚及其代谢物双烯雌酚在血浆、肌肉和肝脏中的分布和残留情况。当草鱼口服灌药相当于 0.1 mg/kg b.w.、1.0 mg/kg b.w.和 10.0 mg/kg b.w.己烯雌酚后，随着口服灌药浓度的升高，各组织中己烯雌酚含量逐渐增大，然后逐渐降低，并且在上述 3 个组织中，表现出相似的变化趋势。在相同口服灌药浓度和相同取样时间下，肝脏中浓度是最大的，其次是肌肉，血浆最小；并且肝脏浓度最高值以相对于灌药浓度的倍数均高于血浆和肌肉，说明其富集能力远大于血浆和肌肉；即使肝脏中平均消除速率最大，但其降至检出限以下所需时间仍是最长。取其中一组己烯雌酚浓度-时间数据，用对数图法确定选用二室模型，然后采用 DAS2.0 药物代谢动力学参数计算程序，计算有关草鱼血浆、肌肉和肝脏的药物代谢动力学参数。结果表明：己烯雌酚的蓄积能力因组织的不同有较大差别；己烯雌酚在草鱼体内分布广，消除较快。己烯雌酚低的清除率有利于其药效在草鱼体内长时间维持。己烯雌酚在一定时间内可以消除绝大部分，所用时间短，但并不代表其最终在体内完全消除所用时间越短。同时规定了在本实验室条件下己烯雌酚和双烯雌酚的休药期，但在生产过程中，应根据实际情况和养殖习惯适当缩短或延长休药期，不可对休药期搞一刀切，最终保障食用者身体健康。

参考文献

[1] 柳爱春,刘超,徐晓丹,等.水产品中己烯雌酚快速检测方法试验分析[J].现代农业科技,2009,15:353-354
LIU Ai-chun, LIU Chao, XU Xiao-dan, et al. Rapid detection test analysis of diethylstilbestrol in aquatic products [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2009, 15: 353-354

[2] Tokumoto T, Tokumoto M, Horiguchi R, et al. Diethylstilbestrol induces fish oocyte maturation [J]. Proceedings of the National Academy of the Sciences of the United States of America, 2004, 101(10): 3686-3690

[3] 林子俺,庞纪磊,黄慧,等.水产品中己烷雌酚、己烯雌酚与双烯雌酚残留的毛细管电泳测定[J].分析测试学报，2010,29(1):55-58
LIN Zi-an, PANG Ji-lei, HUANG Hui, et al. Determination of hexestrol, diethylstibestrol and dienestrol residues in aquatic product by capillary electrophoresis [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2010, 29(1): 55-58

[4] 吴翠琴.己烯雌酚和辛基酚对真鲷幼鱼的雌激素效应研究[J].水产科学,2008,27(12):611-614
WU Cui-qin. Estrogenic effects of diethylstilbestrol and octylphenolon juvenile genuine porgy pagrosomus major[J]. Fisheries Science, 2008, 27(12): 611-614

[5] 陈金雄.己烯雌酚的临床应用、毒负作用及其残留检测方法研究进展[J].福建畜牧兽医,2005,27(2):13-15
CHEN Jin-xiong. Clinical application, negative drug action and residue detection method of diethylstilbestrol [J]. Animal Husbandry and Veterinary of Fujian Province, 2005, 27(2): 13-15

[6] 丁雅韵,徐晓云,谢孟峡,等.动物组织中己烯雌酚残留的基体固相扩散-气相色谱-质谱分析方法研究[J].分析化学,2003,31(11):1356-1359
DING Ya-yun, XU Xiao-yun, XIE Meng-xia, et al. Matrix solid-Phase dispersion coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of trace residue of diethylstil boestrol in animal tissue [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2003, 31(11): 1356-1359

[7] Taiko O, Motohisa K. Formation of active oxygen species

from diethylstilbestrol, a synthetic estrogen, and its metabolite in the presence of RAW 264.7cells [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25(10): 1311-1314

[8] Jarosław K, Wojciech P, Tomasz B, et al. Effect of diethylstilbestrol (DES) and 17 β-estradiol (E2) on growth, survival and histological structure of the internal organs in juvenile European catfish *Silurusglani*(L.) [J]. Aquaculture International, 2014, 22(1): 53-62

[9] Hutchinson T H, Yokota H, Hagino S, et al. Development of fish tests for endocrine disruptors [J]. Pure and Applied Chemistry, 2003, 75(11-12): 2343-2353

[10] 钟雪萍,徐盈,梁勇,等.稀有鮈鲫生命早期的己烯雌酚暴露对生长发育与繁殖的影响[J].水生生物学报,2005,29(6): 667-672

ZHONG Xue-ping, XU Ying, LIANG Yong, et al. Effects of diethylstilbestrol exposure in early life stage on development and reproduction in rare minnow, *Gobiocyprisrarus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2005, 29(6): 667-672

[11] Yang L H, Lin L, WengS P, et al. Sexually disrupting effects of nonylphenol and diethylstilbestrol on malesilver carp (*Carassi usauratus*) in aquatic microcosms [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2008, 71: 400-411

[12] Hanso A, Pagona L, Dimitrios T. Breast cancer following diethylstilbestrol exposure in utero: insights from a tragedy [J]. European Journal of Epidemiology, 2012, 27(1): 1-3

[13] Zhang X, Li J H, Ma L, et al. Diethylstilbestrol impairs the morphology and function of mouse gubernaculum testis in culture [J]. Cell Biology and Toxicology, 2012, 28(6): 397-407

[14] 王发祥,王满生,刘永乐,等,改良壳聚糖涂膜技术对草鱼肉抑菌保鲜效果的研究[J].现代食品科技,2013,29(8):1816-1819

WANG Fa-xiang, WANG Man-sheng, LIU Yong-le, et al. An improved chitosan coating method for bacteriostasis and preservation of grass carp during refrigerated storage[J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1816-1819

现代食品科技