

达氟沙星对施氏鲟的急性毒性及组织残留检测

卢彤岩^{1,2}, 杨雨辉², 徐连伟¹, 赵吉伟², 孙大江²

(1. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘要:将施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*, 体重 75 ~ 95 g) 暂养于室内玻璃水族箱内 7 d 后进行实验。所用达氟沙星 (Danofloxacin) 纯度为 99.5%。分别以剂量 800、1 040、1 352、1 757.60、2 284.88 和 2 970.34 mg/(kg 体重) 对施氏鲟进行口灌, 以 400、440、484、532.4、585.6 和 644.2 mg/(kg 体重) 进行腹腔注射达氟沙星水溶液, 给药后连续 10 d 观察实验鱼的行为及死亡情况。用改进的寇氏法计算得出施氏鲟腹腔注射达氟沙星的 LD₅₀ 为 429.47 mg/(kg 体重), LD₅₀ 的 95% 可信限为 425.22 ~ 433.66 mg/(kg 体重)。口灌达氟沙星 LD₅₀ 为 1 502.10 mg/(kg 体重), 95% 可信区间范围为 1 307.89 ~ 1 738.60 mg/(kg 体重)。对染毒死亡鱼及对照组实验鱼分别进行组织切片, 并分别进行光镜及电镜观察。光镜观察结果表明, 染毒死亡鱼的肝细胞的索状结构消失, 肝组织呈弥漫性坏死, 肝细胞肿胀, 有些肝细胞失去正常的多角形形状, 细胞核肿胀变形; 窦状隙变窄, 其中的红细胞形状也不同程度的发生了改变。染毒死亡鱼的肝细胞的超微结构显示, 肝细胞内充满脂滴, 肝细胞核萎缩、消失, 线粒体脊断裂, 线粒体破裂, 粗面内质网结构疏松有断裂, 滑面内质网数量明显减少, 溶酶体破裂。用高效液相色谱法测定以 10 mg/(kg 体重) 剂量连续 4 次口灌给药后, 达氟沙星在施氏鲟血浆、肝脏、肾脏、肌肉和鳃组织中的药物水平, 实验结果表明, 达氟沙星在施氏鲟全身组织均有分布, 用药第 9 天后达氟沙星在施氏鲟体内消除速度很快, 各组织药物水平均在最低检测限以下, 其中肌肉和鳃在第 6 天就可降到 0.005 μg/(g 组织) 以下, 肝脏和肾脏在第 9 天、血浆在第 7 天均检测不到, 检测发现肝脏、肾脏中的药物水平远远高于血浆、肌肉和鳃组织中的血药水平。建议肝脏和肾脏可作为达氟沙星的残留检测的指示组织。

关键词:达氟沙星; 施氏鲟; 急性毒性; 组织残留

中图分类号: Q959.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)06-0542-07

达氟沙星 (Danofloxacin) 是动物专用的第 3 代喹诺酮类药物, 已被广泛应用于兽医临床治疗鸡、牛、马等的全身性感染。国外已有关于该药应用于水产养殖上残留检测方法的报道^[1], 国内尚未见有关该药在水产养殖业应用的报道。本研究在进行达氟沙星在施氏鲟体内药物动力学研究的基础上, 建立了施氏鲟肝脏、肾脏、肌肉和鳃组织中达氟沙星的高效液相色谱 (HPLC) 检测方法, 并测定了连续给药后组织中达氟沙星的残留量, 旨在为确定施氏鲟 (*Acipenser schrenckii*) 使用达氟沙星的休药期提供科学依据。

有关达氟沙星毒理学方面的资料报道较少, 为了解该药的毒副作用, 进行了达氟沙星对施氏鲟的急性毒性实验。本实验测定口灌及腹腔注射达氟沙星水溶液的 LD₅₀, 并通过组织切片的光镜及电镜观

察以了解达氟沙星对施氏鲟的肝脏毒性, 从而为科学安全使用该药提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

施氏鲟体重 75 ~ 95 g, 暂养于室内玻璃水族箱中 7 d 后进行实验。实验水族箱有效水体积为 180 L, 实验期间以经过充分曝气的自来水作为水源, 实验期间水温在 (23 ± 1) °C, 持续以曝气的形式进行充氧。

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验

(1) 口灌给药组 药液配制采用“低比稀释法”, 最小剂量组为 800 mg/(kg 体重), 按体积比 1:1.3 等比级数递增。实验鱼随机分为 7 组, 对照组设 5

收稿日期: 2004-03-04; 修订日期: 2004-06-07。

基金项目: 科技部“十五”攻关计划 (2001BA505B0506); 黑龙江省自然科学基金项目 (C0322)。

作者简介: 卢彤岩 (1967 年-), 女, 副研究员, 博士生, 从事鱼类病害研究。

通讯作者: 孙大江. Tel: 0451-84861321. E-mail: sunjiang0451@sohu.com

尾,根据体重口灌相应剂量的生理盐水,实验组每组各10尾施氏鲟,用配制好的达氟沙星水溶液进行口灌给药,给药体积为0.2 mL/(100 g 体重)。

(2)腹腔注射组 药液配制采用“低比稀释法”,最小剂量组为400 mg/(kg 体重),按体积比1:1.1等比级数递增。实验分组同1.2.1(1)。用配制好的达氟沙星水溶液进行腹腔注射,注射药液体积为

0.2 mL/(100 g 体重)。

(3)实验观察与结果计算 急性毒性实验各组施氏鲟均于给药后连续观察10 d,详细记录实验鱼中毒症状、死亡时间及死亡数,用改进的寇氏法^[3]分别计算口灌及腹腔注射的LD₅₀及LD₅₀的95%可信区间范围。见表1、表2。

表1 施氏鲟腹腔注射达氟沙星LD₅₀测定结果

Table 1 Results of acute toxicity test of danofloxacin by abdominal cavity injection in *A. schrenkii*

组别 Group (n = 7)	剂量 Dose		样品数/ind Sample number	死亡数/ind Dead number	死亡率 p Mortality	存活率 q Survival rate	pq
	mg/kg	lg D					
1	400.0	2.602 1	10	2	0.2	0.8	0.16
2	440.0	2.643 5	10	3	0.3	0.7	0.21
3	484.0	2.684 8	10	3	0.3	0.7	0.21
4	532.4	2.726 2	10	7	0.7	0.3	0.21
5	585.6	2.767 6	10	8	0.8	0.2	0.16
6	644.2	2.809 0	10	9	0.9	0.1	0.09
$i = 0.041 4$					$\sum p = 3.2$		

表2 施氏鲟口灌达氟沙星LD₅₀测定结果

Table 2 Results of acute toxicity test of danofloxacin by oral administration in *A. schrenkii*

组别 Group (n = 7)	剂量 Dose		样品数/ind Sample number	死亡数/ind Dead number	死亡率 p Mortality	存活率 q Survival rate	pq
	mg/kg	lg D					
1	800.00	2.903 1	10	0	0	1	0
2	1 040.00	3.017 0	10	2	0.20	0.80	0.16
3	1 352.00	3.131 0	10	5	0.50	0.50	0.25
4	1 757.60	3.244 9	10	6	0.60	0.40	0.24
5	2 284.88	3.358 9	10	8	0.80	0.20	0.16
6	2 970.34	3.472 8	10	10	1	0	0
$i = 0.113 9$					$\sum p = 3.1$		

(4)组织切片及电镜切片制备 给药后连续观察实验鱼的行为,对各剂量组染毒死亡鱼立即进行解剖,同时对对照组进行解剖,采取肝脏组织,分别进行组织切片,并分别进行光镜及电镜观察。光镜切片肝组织用 Bouin 氏液固定,石蜡包埋切片,HE 染色,进行组织切片,切片厚度为5 μm,显微镜观察并照相。超微结构切片所用肝组织用2.5%戊二醛固定,乙醇脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀及柠檬酸铅染色,透射电镜观察并照相。

1.2.2 组织残留检测实验

(1)试剂与仪器 达氟沙星为河南郑州兽药厂生产,批号990415,纯度为99.5%。乙腈为国产HPLC试剂,四丁基氯化铵、甲醇、磷酸、柠檬酸等均

为国产分析纯试剂。

分析仪器为自动进样的 Waters 2695 型,配有474型荧光检测器的高效液相色谱分析仪,分离柱为 Waters C₁₈反相柱。

(2)实验鱼给药与采样 本实验采用连续口灌给药方式,给药剂量为10 mg/(kg 体重),给药体积为0.2 mL/(100 g 体重),每隔24 h给药1次,连续给药4次,分别于停药后的1~15 d,每间隔24 h于尾部取血并解剖,取肌肉、肝脏、肾脏、及鳃组织,保存于-20 ℃,备分析药物含量之用。

(3)达氟沙星标准曲线的制备 本实验采用外标法进行实验样品的测定,用流动相分别将达氟沙星标准品母液稀释成0.005、0.01、0.025、0.05、

0.1、0.25、0.5 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。以峰面积为横坐标, 药物浓度为纵坐标做标准曲线, 用最小二乘法求出回归方程和相关系数。

(4) 回收率的测定 将 0.1、1、10 $\mu\text{g/mL}$ 标准品分别加入 0.5 mL 的血浆或 0.5 g 的组织中(肝、肾、肌肉和鳃), 使其终质量浓度分别为 0.01、0.1 和 1 $\mu\text{g/mL}$, 按 1.2.6 方法进行处理后进行测定, 各浓度重复测定 5 次, 获得各浓度的峰面积, 再按标准曲线回归方程计算达氟沙星的浓度, 并与实验前加入量进行比较, 回收率等于实际测定量除以初始加入量。

(5) 色谱条件 流动相中乙腈相与水相体积比为 15:85, 每 1 000 mL 水相中含 12.4 mL 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠和 187.6 mL 0.1 mol/L 的柠檬酸; 每 1 000 mL 流动相中含 2.7 g 溴化四丁基铵, 流动相 pH 值为 3。柱温为 18 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积为 10 μL , 荧光激发波长和发射波长分别为 280 nm 和 450 nm, 流动相的流速为 0.8 mL/min。

(6) 样品处理

血浆样品处理: 取出血浆样品, 于室温下自然解冻摇匀后取出 0.5 mL 血浆待测。加入 0.5 mL 甲醇, 旋涡快速混匀器上混合 1 min, 于 4 000 r/min 转速离心 8 min。取全部上清液在 BF2000 氮气吹干仪 70 $^{\circ}\text{C}$ 下吹干, 再加入 0.5 mL 流动相混匀后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用于 HPLC 分析。

组织样品处理: 准确称取 0.5 g 组织(肝、肾、肌肉和鳃)剪碎加入高纯水 0.5 mL, 充分搅匀后, 加入 2 mL 甲醇, 以 18 000 r/min 速度匀浆 5 min, 再以 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取全部上清液置于另一试管中。沉淀再加入 0.5 mL 高纯水, 旋涡混匀 1 min 后, 再加入 2 mL 甲醇, 旋涡混匀 1 min, 以 4 000 r/min 离心 5 min, 吸取全部上清液与每一次吸出的上清液混合, 取全部混合后的上清液在 BF2000 氮气吹干仪 70 $^{\circ}\text{C}$ 下吹干, 再加入 0.5 mL 流动相混匀后经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后, 用于 HPLC 分析。

(7) 数据处理 采用外标实验方法, 通过标准曲线得出相应浓度, 并换算成每单位重量或体积的药物水平。

2 实验结果

2.1 急性毒性实验

2.1.1 腹腔注射 LD_{50} 施氏鲟腹腔注射达氟沙星后大部分实验鱼表现为活动明显减少, 30~40 min 最高剂量组开始出现身体弯曲现象, 部分严重者甚

至出现剧烈抽动和痉挛, 在 55 min 开始出现第 1 尾死亡鱼。

死亡高峰出现在注射后 12 h 左右, 在注射 33 h 后各组均没有实验鱼出现死亡, 72 h 后仍未死亡者, 异常症状逐渐消除, 活动及摄食慢慢恢复正常。

经计算得出施氏鲟腹腔注射达氟沙星的 LD_{50} 为 429.47 mg/(kg 体重), LD_{50} 的 95% 可信限为 425.22~433.66 mg/(kg 体重)。

2.1.2 口灌达氟沙星 LD_{50} 口灌给药在 3~4 h 最高剂量组实验鱼出现症状, 表现为游动异常, 有些鱼体出现弯曲, 在 9.5 h 出现第 1 尾死鱼, 死亡高峰出现在给药后 18~48 h 内, 88 h 后无实验鱼死亡, 剩余鱼逐渐恢复正常活动和摄食。

根据实验结果计算出口灌达氟沙星 LD_{50} 为 1 502.10 mg/(kg 体重), LD_{50} 的 95% 可信区间范围为 1 307.89~1 738.60 mg/(kg 体重)。

2.1.3 组织学变化

(1) 光学组织切片 健康对照组施氏鲟肝脏组织切片光学观察表明, 肝细胞排列成明显的索状结构。肝组织结构清晰, 肝细胞细胞膜界限清晰, 肝细胞呈多角形, 形状变化不大。每一细胞有一细胞核, 细胞核较圆, 多位于细胞的一侧, 偶见位于细胞的中央部位。细胞间的窦状隙明显, 其中充满红血球(图版 I-1)。

染毒鱼的肝脏组织切片光学观察则表现为肝细胞的索状结构消失。肝组织呈弥漫性坏死, 肝细胞肿胀, 有些肝细胞失去正常的多角形形状, 细胞核肿胀变形。有些肝细胞已经溶解变性, 窦状隙腔变窄, 其中的红细胞形状也不同程度发生了改变(图版 I-2)。

(2) 超微结构变化 健康对照组施氏鲟在电镜下可看到肝细胞排列成行, 细胞质中有许多排列成层的粗面内质网, 线粒体具有少量的脊和较多的基质颗粒, 毛细血管附近有少量的溶酶体(图版 I-3)。

染毒鱼肝脏透组织切片在射电镜观察到肝细胞内充满脂滴, 肝细胞核明显萎缩甚至消失(图版 I-4), 粗面内质网疏松并有断裂(图版 I-5), 滑面内质网数量明显减少, 溶酶体破裂(图版 I-6)。

2.2 口灌给药后达氟沙星在施氏鲟在各组织中的残留

2.2.1 回收率及变异系数 采用外标法得到的标准曲线为 $y = 6\,521.91 + 59\,617.810x$, $R = 0.9999$,

达氟沙星质量浓度在 $0.005 \sim 1.0 \mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好,当所测定的组织的药物水平大于线性范围的上限,则用流动相稀释后再进行测定,本方法的最低检测限为 $0.005 \mu\text{g/mL}$ 。

本方法中血浆、肝脏、肾脏、鳃和肌肉的高、中、低3个浓度的回收率均在80%以上,批内、批间、日内、日间变异系数均在10%以内,可满足达氟沙星药物残留检测的研究要求。

2.2.2 达氟沙星在施氏鲟体内各组织的药物水平

实验结果表明,达氟沙星在施氏鲟全身组织均有分布(表3)。用药第9天后达氟沙星在施氏鲟体内消除速度很快,各组织药物水平均在最低检测限以下。肌肉和鳃在第6天就可降到 $0.005 \mu\text{g/g}$ 以下,肝脏和肾脏在第9天、血浆在第7天均检测不到药物。

表3 施氏鲟多次口服给药后组织中达氟沙星残留量

Table 3 Danofloxacin levels in blood and tissues by oral administration

$\mu\text{g/g}, \bar{X} \pm \text{SE}$

时间/d Time	组织 Tissue				
	血浆 Plasm	鳃 Gill	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	肌肉 Muscle
1	0.399 ± 0.162	2.206 ± 0.955	5.876 ± 2.991	9.409 ± 3.315	1.480 ± 0.902
2	0.146 ± 0.030	1.160 ± 0.500	3.228 ± 0.645	4.760 ± 3.315	0.381 ± 0.158
3	0.118 ± 0.035	0.985 ± 0.395	2.103 ± 0.486	3.750 ± 0.909	0.305 ± 0.103
4	0.109 ± 0.023	0.381 ± 0.116	1.154 ± 0.156	3.217 ± 2.354	0.258 ± 0.086
5	0.100 ± 0.017	0.121 ± 0.005	0.874 ± 0.132	0.441 ± 0.274	0.245 ± 0.069
6	0.099 ± 0.017	ND	0.403 ± 0.067	0.134 ± 0.043	0.153 ± 0.033
7	ND		0.087 ± 0.063	0.028 ± 0.009	ND
8			0.016 ± 0.005	0.007 ± 0.002	
9			ND	ND	

ND:未检测到,给药剂量:10 mg/(kg 体重)。

ND: Not Detectable. Dose: 10 mg/kg BW.

3 讨论

3.1 达氟沙星对施氏鲟的 LD_{50}

本实验得出施氏鲟腹腔注射达氟沙星的 LD_{50} 为 $429.47 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$, LD_{50} 的95%可信限为 $425.22 \sim 433.66 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$,口服达氟沙星 LD_{50} 为 $1502.10 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$,95%可信区间范围为 $1307.89 \sim 1738.60 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$ 。根据WHO公布的外来化合物急性毒性分级标准达氟沙星属于低毒物质。实验中发现,不同的给药途径实验鱼死亡的高峰时间及症状出现时间均有明显的不同;结果也表明,不同的给药方法对 LD_{50} 的结果影响较大。

有关喹诺酮类药物对鱼类的急性毒性实验的研究较少,已报道的有环丙沙星鳊鱼肌注 LD_{50} 为 $6490 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$,噻嗪酸对鲤鱼口服 LD_{50} 为 $4000 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$ 以上^[2]。本实验证明达氟沙星对鱼的毒性要大于同类药物环丙沙星和噻嗪酸。佟恒敏等^[3]的研究也表明达氟沙星对昆明小白鼠的口服、腹腔注射和静脉注射的 LD_{50} 分别为

2251.84 、 300.93 和 $52.02 \text{ mg}/(\text{kg 体重})$,与其他喹诺酮类药物相比 LD_{50} 值偏低,毒性偏大,在喹诺酮类抗菌药物中属毒性较大的一种药物,这与本实验的实验结果相一致。

3.2 达氟沙星对施氏鲟肝脏组织学及超微结构的影响

达氟沙星使施氏鲟的肝组织结构发生了明显的变化,表现在肝细胞的索状结构消失,细胞界限模糊,细胞形状发生改变、甚至溶解。已有实验表明,高浓度或长时间的喹诺酮类药物给药会导致肝细胞损伤,给雏鸡高浓度混饮或长时间混饲,易导致肝细胞变性或坏死,以环丙沙星尤为明显^[5]。

Channa 等^[4]在实验中发现,环丙沙星可严重损伤美洲白胎马胎儿的肝脏。通过对死亡施氏鲟的肝脏细胞的电镜观察表明,施氏鲟的肝脏细胞内的细胞器已受到不同程度的损伤,其中线粒体和内质网是受到影响最明显的细胞器,细胞核也部分萎缩甚至消失,细胞质内充满大量脂肪滴。这主要是由于细胞膜通透性的改变,使细胞的渗透压发生改变,导致

吸水肿胀,甚至破裂。细胞质中粗面内质网扩张呈囊泡状并出现脱颗粒现象,导致粗面内质网脂蛋白的合成减少,是肝细胞内出现泡状脂滴的原因之一。肝细胞内线粒体肿胀,基质稀疏,会减少细胞内脂肪酸的氧化分解,也会导致脂肪的积累。

3.3 达氟沙星在施氏鲟体内的残留

张秀英等^[5]实验表明,达氟沙星在鸡组织中的药物残留以肝脏、肾脏最高,均显著高于血浆中的药物残留,肌肉中的残留水平最低,这与本实验的结果相一致。血浆的有效浓度维持时间可达到5 d,与其他组织没有明显的差异。达氟沙星吸收进入施氏鲟体内后,在肝脏、肾脏和肌肉及鳃中均有分布,且均高于该药物的有效浓度,因而可作为良好的全身治疗药物使用。

从本实验结果看,达氟沙星在施氏鲟体内消除较快,在实验第9天各组织中的药物残留水平均低于最低检测限 $0.005 \mu\text{g}/(\text{kg} \text{ 体重})$,可食部分肌肉的含量在第7天使用本方法即检测不出药物的含量。国内外尚没有关于达氟沙星用于水产养殖的最高残留限量(maximum residue limit, MRL)的规定,仅在畜牧业中要求在牛肌肉中为 $0.2 \mu\text{g}/\text{g}$ 、脂肪中为 $0.1 \mu\text{g}/\text{g}$ 、肝脏中为 $0.4 \mu\text{g}/\text{g}$,当饮水剂量在 $500 \sim 100 \text{ mg}/\text{L}$,每日饮用2~3次时,推荐休药期为10 d^[17]。本实验结果表明,肝脏和肾脏比其他组织有着相对较高的含量和相对较长的半衰期。因此建议水产养殖动物的肝脏及肾脏可作为监测达氟沙星使用状况的指示组织。由于肝脏和肾脏为鱼类的不可食部分,在给药后第8天其含量已远远低于恩诺沙星规定的在水产品中的MRL,因此认为对于经口服达氟沙星剂量在 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \text{ 体重})$ 以下时,施氏鲟停药期定为9~10 d,供人食用是安全的。

参考文献:

- [1] Johnston L, Mackay L, Croft M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection[J]. J Chromatogr A, 2002, 982(1): 97-109.
- [2] 农业部《渔药手册》编撰委员会. 渔药手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998.
- [3] 佟恒敏, 刘远飞. 单诺沙星对昆明种小白鼠的急性毒性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001(1): 1-2.
- [4] Channa M A, Janjua M Z. Effects of ciprofloxacin on foetal hepatocytes[J]. J Pak Med Assoc, 2003, 53(10): 448-450.
- [5] 张秀英, 佟恒敏. 单诺沙星在雏鸡体内的组织动力学及残留[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(1): 72-74.
- [6] 日比谷. 東京大學魚類組織圖說—正常組織と病理組織[M]. 東京: 講談社, 1983.
- [7] 朱洪文. 组织学[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979.
- [8] Hodgson E, Mailman R B, Chambers J E. Dictionary of Toxicology[M]. London: Macmillan Press Ltd, 1998.
- [9] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [10] 李美同, 郭文林, 仲 修. 土霉素在鳊鱼组织中残留的消除规律[J]. 水产学报, 1998, 21(1): 39-43.
- [11] 汪开毓, 耿 毅, 叶仕根, 等. 鳊慢性唑乙醇中毒的病理学和组织残留[J]. 水产学报, 2003, 27(1): 75-82.
- [12] 李 健, 王 群, 孙修涛, 等. 噻唑酸对水生生物细菌病的防治效果及残留研究[J]. 中国水产科学, 2001, 8(3): 45-49.
- [13] 杨先乐, 刘至治, 横山雅仁. 盐酸环丙沙星在中华绒螯蟹体内药物代谢动力学研究[J]. 水生生物学报, 2003, 27(1): 18-22.
- [14] Martinsen B, Horsberg T E. Comparative single-dose pharmacokinetics of four quinolones, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, and enrofloxacin, in Atlantic salmon held in seawater at 10°C [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1995, 39(5): 1059-1064.
- [15] Ryuji Ueno, Yasushi Okada, Takuya Tatsuno. Pharmacokinetics and metabolism of miloxacin in cultured eel [J]. Aquaculture, 2001, 193: 11-24.
- [16] Shu-Peng H O, CHENG Chin-Fu, WANG Way-Shyan. Pharmacokinetic and depletion studies of sarafloxacin after oral administration to eel [J]. Vet Med Sci, 1999, 61(5): 459-463.
- [17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中华人民共和国对外贸易经济合作部 2002 年第 37 号公告.

[1] Johnston L, Mackay L, Croft M. Determination of quinolones and

Acute toxicity of danofloxacin in Amur sturgeon and the body residue

LU Tong-yan^{1,2}, YANG Yu-hui², XU Lian-wei¹, ZHAO Ji-wei², SUN Da-jiang²

(1. Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 2. Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) were kept in experimental tanks at temperature of $(23 \pm 1) ^\circ\text{C}$. The body weight of fish was 75 – 95 g; 7 groups were designed, including control group. The fish were given danofloxacin by oral administration. The dosages of danofloxacin were 800, 1 040, 1 352, 1 757.60, 2 284.88 and 2 970.34 mg/(kg BW) by oral administration. Meanwhile, the dosages of dnaofloxacin were 400, 440, 484, 532.4, 585.6 and 644.2 mg/(kg BW) by abdominal cavity injection. After given danofloxacin, the fish were investigated in 10 days; the dead fish were sacrificed at once; the liver was taken into 70% alcohol and 2.5% glutaral, then observed under light and electron microscopy. The results showed that the LD_{50} (mediallethaldose) and 95% confidence of LD_{50} of dnaofloxacin in sturgeon by abdominal cavity injection were 429.47 mg/(kg BW) and 425.22 – 433.66 mg/(kg BW) respectively, and were 1 502.10 mg/(kg BW) and 1 307.89 – 1 738.60 mg/(kg BW) respectively by oral administration. The tissue section showed that the hepatic cell cord dissolved, and the hepatic cell cellular swelled and deformed. The cell nucleus of hepatic cell karyolysed. The sinusoid narrowed, the erythrocyte in them changed in shape. The ultrastructure of liver cell showed that the cells were filled with more lipid droplet; the mitochondrion break; rough endoplasmic reticulum occur with rarefaction and fragmentation; lysosome disrupted.

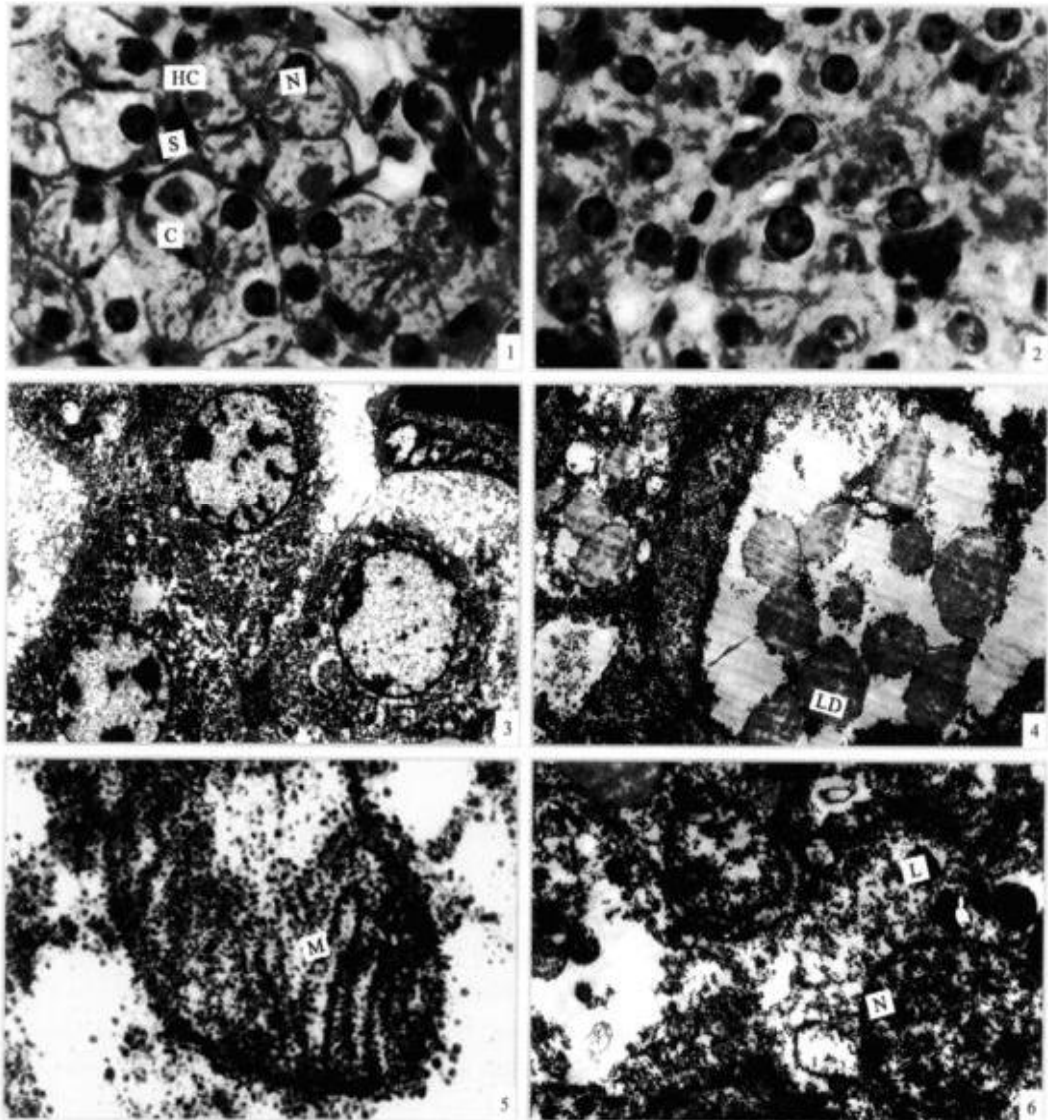
In the residue detection experiment, the dosage of danofloxacin was 10 mg/(kg BW) per day for 4 d. Serum, liver, kidney, muscle and gill were taken from five sturgeon at days 1 – 15 after the last oral administration with danofloxacin. Using a C_{18} column, the mobile phase consisted of Acetonitrile/tridistilled water (volume ratio 15:85). The fluorescence acceleration and emission wavelength were 280 nm and 450 nm. The protein was deprived with methyl alcohol. The precipitated mixture was shaken and then centrifuged, and the filtrate was evaporated dry with nitrogen fumes at $70 ^\circ\text{C}$. Within the range of 0.005 to $1.0 \mu\text{g/mL}$, danofloxacin had a good linearity. The lowest detectability was $0.005 \mu\text{g/mL}$ and the average recovery of danofloxacin was above 80%. The within-day and day-to-day precision expressed by RSD was less than 10% at three drug levels (0.005 – 0.1 and $1 \mu\text{g/mL}$). The result showed that danofloxacin distributed in serum, liver, kidney, gill and muscle. The danofloxacin can not be detected 9 d after last oral administration in liver and kidney, 7 d in serum, 6 d in gill and 7 d in muscle, meanwhile, the residues of danofloxacin in liver and kidney were higher than those in serum, gill and muscle. According to the result the liver and kidney can be used to detect the residue of danofloxacin, and it is safe to people when Amur sturgeon was given danofloxacin at dose of 10 mg/(kg BW) for 4 d by oral administration at temperature of $22 - 24 ^\circ\text{C}$.

Key words: danofloxacin; Amur sturgeon; acute toxicity; tissue residue

Corresponding author: SUN Da-jiang. E-mail: sundajiang0451@sohu.com

卢彤岩等:达氟沙星对施氏鲟的急性毒性及组织残留检测

LU Tong-yan et al: Acute toxicity of danofloxacin in Amur sturgeon and the body residue



图版 I 肝组织切片及肝细胞超微结构

- 1 对照组肝细胞,肝细胞索(HC)、肝细胞(C)、细胞核(N)、肝窦(S)。×1 500。
- 2 肝细胞索结构消失,肝细胞肿胀、变形。×1 500。
- 3 对照肝细胞。×2 500。
- 4 肝细胞细胞核溶解,细胞内有大量脂滴(LD)。×3 000。
- 5 线粒体嵴断裂,线粒体破裂(M)。×120 000。
- 6 细胞核(N),溶酶体破裂(L)。×5 000。

Plate I Liver tissue section and liver cell ultrastructure

- 1 Liver tissue section of a normal liver from a control Amur sturgeon: hepatic cell cord(HC), liver cell (C), cell nucleus (N), sinusoid(S). ×1 500.
- 2 Hepatic cell cord extinction and liver cell cellular swelling, deforming. ×1 500.
- 3 Ultrastructure of a normal hepatocyte from a control Amur sturgeon. ×2 500.
- 4 Liver cell nucleus karyolysis, many lipid droplet(LD) appearing in liver cells. ×3 000.
- 5 Mitochondria(M) of liver cell swelling with disintegration and lysis of cristae. ×120 000.
- 6 Nucleus swelling(N), lysosome disrupting (L). ×5 000.