

文章编号:1005-8737(2001)03-0045-05

噁喹酸对水生生物细菌病的防治效果及残留研究

李健¹, 王群¹, 孙修涛¹, 马向东¹, 刘德月¹, 仝翔²;

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 山东金泰集团股份有限公司, 山东 济南 250100)

摘要:噁喹酸对养殖动物主要致病菌具有明显的抑制效果, 最小抑菌浓度(MIC) 3.8~5.6 $\mu\text{g/ml}$; 对中国对虾、黑鲷、鲈、鲤、罗非鱼、中华鳖等生物毒副作用不明显; 对浮游植物、大型溞、中国对虾和真鲷胚胎孵化的毒性也较低。临床试验表明, 药浴质量浓度 4 mg/L 治疗细菌病效果显著。用高效液相色谱法进行鲈药物代谢动力学和残留研究, 得到了药物代谢动力学模型, 建议休药期 15~20 d。

关键词:噁喹酸; 病害防治; 药物代谢; 残留

中图分类号: S948

文献标识码: A

噁喹酸(Oxolinic acid, OA)属第一代喹诺酮类药物, 对革兰氏阴性菌有强的抗菌效力, 为水产专用抗菌类药物, 国外对其药理及使用等进行了一些研究, 据报道主要用于预防和治疗鳊疮病和弧菌病、鲈类结节病、香鱼气单胞菌感染症、鳊鱼赤鳍病和红点病等^[1~5]。国内在海水鱼类育苗中有少量使用, 主要用于细菌病的预防, 但尚未见有关药效、毒理和残留等方面研究报道。作者 1999 年进行了噁喹酸在水产养殖中的应用试验, 探讨其在海水养殖领域的药效及安全性, 为药物合理使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物的配制

噁喹酸为山东金泰集团股份有限公司兽药厂提供的噁喹酸钠(噁喹酸含量 85%); 对照药物氯霉素(Chloramphenicol, CAP)为山东新华制药公司生产, 产品批号为 961044, 呋喃唑酮(Furazolidone, FZD)为济南金泰制药公司生产, 产品批号为 980502。

1.2 最小抑菌浓度测定

收稿日期: 2000-11-16

作者简介: 李健(1961-), 男, 研究员, 从事甲壳动物养殖和渔用药研究。

1.2.1 液体培养基的配制 海水菌株使用 2216E 培养基, 淡水菌株使用普通肉汤培养基。

1.2.2 试验菌液的制备 选择具代表性的致病菌株, 用接种环沾取纯化的试验菌株, 接种到上述培养基上, 28℃ 培养 18 h 后, 用灭菌生理盐水将菌液稀释至相当于 10^4 cfu/ml。

1.2.3 试验步骤 在 10 ml 试管无菌操作吸取待测药物稀释液进行逐管倍量稀释, 然后每管加稀释好的菌液 0.5 ml, 混匀后 28℃ 培养。24 h 后每管移取 1 ml 至无菌液体培养基内, 培养 24 h 后肉眼观察, 呈明显不混浊的试管所含最小的药物浓度为最小抑菌浓度(C_{min}), 记录结果。

1.3 急性毒性试验

采用半静水法药浴方式, 每组动物数量 10~50 尾, 试验水温 18.3~23.1℃, pH 淡水 7.0~7.1, 海水 8.0~8.2。每日更换 100% 试液, 或口服方式给药。实验中观察记录生物 24 h、48 h 死亡数。毒性试验结果用半数致死浓度(LC_{50})表示, 根据试验记录用移动平均角法求出。

1.4 对动物胚胎孵化的影响

将中国对虾(*Penaeus chinensis*)和真鲷(*Pagrus major*)受精卵移至 500 ml 烧杯内, 加入不同浓度药物, 记录幼体孵化率。试验水温 20.5℃, 海

水 pH 8.2, 每组受精卵数量 30 粒。

1.5 对浮游植物的影响

试验选用等鞭金藻(*Isochrysis galhana*)3012 在 500 ml 三角烧瓶内进行。消毒海水加入营养盐(N:P:Fe=20:1:0.1), 然后接种藻种备用。向藻液内加入不同浓度药物, 观察不同时间(共 144 h)单胞藻生长情况, 并用 722 型分光光度计测定藻液吸光值。以 48 h 藻液浓度能否恢复至试验开始浓度作为药物影响判定标准。

1.6 人工感染防治试验

感染动物为黑鲷(*Sparus macrocephalus*, 体重 60~100 g), 中国对虾(体长 3~4 cm), 鲤(*Cyprinus carpio*, 体重 150~200 g), 罗非鱼(*Tilapia nilotica*, 体重 15~17 g), 中华鳖(*Troionyx sinensis*, 体重 200~250 g)。试验水温为(24±2)℃, 分若干试验组和对照组, 使用 200 L 圆桶, 充气, 按常规方式养殖。感染方法采用创伤或腹腔注射感染法, 细菌浓度 10⁵ cfu/ml。海水菌株采用飘浮弧菌(*Vibrio natriegens*)1 594 株、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)1 614 株, 弧菌属(*Vibrio* spp)HYL-1 株, 淡水菌株采用耶尔森氏菌(*Yersinia*)SC-90-24 株、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas punctata*)58-20-9 株。将黑鲷和鲤剪去部分背鳍, 对虾剪去 1 对游泳足, 以菌液浸泡试验动物; 罗非鱼使用 1 ml 菌液腹腔注射感染; 中华鳖自然感染。感染后采用药物药浴、腹腔或肌肉注射给药等方式进行治疗, 记录病死鱼虾症状及不同时间死亡尾数。

1.7 药物代谢动力学与残留

1.7.1 试验设计 健康鲈取自青岛实验基地, 体重平均 191 g, 温度为(18±2)℃。鲈每组 7 尾口服灌胃法单次给药, 剂量为 40 mg/kg。给药后间隔不同时间断尾取血并解剖, 取肌肉、血液、肝脏、肾脏 4 种组织分析药物含量。根据血液中药物浓度-时间($C_t - T_t$)数值, 采用 MCPKP 药物动力学程序进行药物动力学分析和处理, 该程序可自动选择最佳模型, 并将其进行非线性最小二乘法拟合, 计算出药物动力学参数。

1.7.2 样品的处理 准确称取 1 g 鲈组织(肌肉、肝脏和肾脏)或 1 ml 血液, 加几滴二甲基亚砜, 加入 2 ml 提取液, 即乙腈:0.01 mol/L 草酸(pH 3.0)为 4:1(v/v), 16 000 r/min 匀浆 10 s, 再用 3 ml 提取液清洗刀头, 合并提取液, 振荡 1 min, 5 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液, 用 1/4 体积的正己烷去脂

肪, 下层液用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后可进样。

1.7.3 仪器和设备 Waters 600E 高效液相色谱仪(包括 Waters 600 型控制器和 WatersTM 600 型泵), WatersTM 474 型扫描荧光检测器和微机数据处理系统。色谱柱: Hypersil ODS 柱(3.9 mm×15 mm, 填料粒度 5 μm); 荧光检测: 激发波长为 327 nm, 发射波长为 369 nm; 流速: 2 ml/min; 柱温: 25℃。

1.7.4 流动相和标准溶液的配制 流动相: 乙腈、甲醇、0.01 mol/L 的草酸按 3:1:6(v/v/v)的比例配制; 标准溶液: 准确称取 20.0 mg 噻啉酸(日本进口标准品), 完全溶于 20 ml 二甲基亚砜, 再加入乙腈, 定容至 200 ml, 配制成 100 μg/ml 的母液, 再用 0.01 mol/L 的草酸依次稀释成所需浓度于冰箱中保存。

1.7.5 药物回收率和标准曲线 分别取空白组织 1 g(肌肉和肝脏)或 1 ml(血液), 1 组分别加入标准品 0.5、1.0、2.0 和 5.0 μg, 然后按照样品的处理程序进行处理; 2 组将未加入标准液的空白组织按照样品的处理程序进行处理, 然后再加入与 1 组相同标准品。按照公式进行计算: 回收率(%)=(处理前加入标准品样品的测定值/处理后加入标准品样品的测定值)×100。以 5.00、2.00、1.00、0.50、0.20、0.10、0.05、0.01 μg/ml 9 个水平的质量浓度 C_i 为因变量, 以各质量浓度的平均峰面积 A_i 为自变量, 作线性回归。

2 结果

2.1 噻啉酸的抑菌效果

噻啉酸对海水养殖动物主要致病菌溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、坎贝氏弧菌(*V. campbellii*)、副溶血弧菌等具有明显的抑制效果, 对淡水嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)也具有较明显的抑制效果。噻啉酸对 10 几种水生动物常见致病菌的最小抑菌质量浓度为 3.8~5.6 μg/ml, 对照药物呋喃唑酮为 4.0~4.2 μg/ml, 氯霉素为 1.0~2.0 μg/ml。

2.2 急性毒性试验结果

噻啉酸对中国对虾(体长 3~4 cm)、黑鲷(50~100 g)、鲈(30~70 g)、鲤(80~100 g)、罗非鱼(15 g)、中华鳖(250 g)等养殖生物毒副作用不明显, 对大型蚤毒性也较低。经过 48 h 243 mg/L 噻啉酸药浴, 结果黑鲷、鲈正常存活; 320 mg/L 药浴, 鲤、卤虫无节幼体正常存活; 160 mg/L 药浴, 中国对虾正常

存活。1 600 mg/kg 口服, 48 h 中华鳖正常存活; 6 400 mg/kg 口服, 48 h 罗非鱼正常存活。大型蚤的 24 h LC_{50} 为 107.42 mg/L, 48 h LC_{50} 为 94.09 mg/L。

对照药物呋喃唑酮对大型蚤的 24 h LC_{50} 为 194.26 mg/L, 48 h LC_{50} 为 140.61 mg/L; 对中国对虾的 48 h LC_{50} 为 6.31 mg/L。

氯霉素对大型蚤的 24 h LC_{50} 为 267.03 mg/L, 48 h LC_{50} 为 89.12 mg/L。但 81.0 mg/L 氯霉素药浴 48 h 中国对虾仍正常存活。

2.3 对动物胚胎孵化的影响

结果见表 1。噻啉酸对中国对虾卵子孵化的影响小于呋喃唑酮, 大于氯霉素。对真鲷卵子孵化的影响远小于呋喃唑酮及氯霉素。

2.4 对浮游植物的影响

噻啉酸药浴 (< 320 mg/L), 对等边金藻 3012 生长无明显影响。

表 1 噻啉酸对中国对虾和真鲷胚胎孵化的影响

Table 1 Effect of OA on the hatching of *Penaeus chinensis* and *Pagrus major*

实验动物 Experimental animal	半数孵化浓度 Median - hatching concentration		
	OA	FZD	CAP
中国对虾 <i>P. chinensis</i>	2.55	1.69	13.65
真鲷 <i>P. major</i>	344.43	9.64	164.10

2.5 人工感染防治试验结果

黑鲷、中国对虾、鲤、罗非鱼及中华鳖采用菌浴 (BA) 或腹腔注射感染 (SJ) 后 48~72 h, 阳性感染对照组开始出现典型症状, 死亡动物经肝脏分离细菌, 经镜检确认仍为感染菌株。噻啉酸等药物的治疗结果见表 2。

表 2 噻啉酸对养殖鱼虾疾病的治疗效果

Table 2 Therapeutic effects of OA on controlling diseases of fish and shrimp

试验分组 Group	存活率 Survival rate				
	黑鲷 <i>S. macrocephalus</i>	中国对虾 <i>P. chinensis</i>	鲤 <i>C. carpio</i>	罗非鱼 <i>T. nilotica</i>	中华鳖 <i>T. sinensis</i>
阴性对照组 Negative control	100	70	100	100	100
阳性感染组 (SJ 组) Positive infection (Group SJ, stomach injection)	0		0	0	
加噻啉酸 (OA) 4 mg/kg 腹腔给药	80		80		90
加氯霉素 (CAP) 4 mg/kg 腹腔给药	60		40	70	
加呋喃唑酮 (FZD) 4 mg/kg 腹腔给药	0		30	60	
阳性感染组 (BA 组) Positive infection (Group BA, bath)	0	15	40		0
加噻啉酸 (OA) 4 mg/L 药浴	80	70	100		
加氯霉素 (CAP) 4 mg/L 药浴	60	70	100		
加呋喃唑酮 (FZD) 4 mg/L 药浴	0	50	100		
4 mg/kg 肌肉注射给药 Intramuscular injection					100

2.6 药物代谢动力学与残留

2.6.1 标准曲线及线性范围 以噻啉酸平均峰面积 A_i 对每个浓度 C_i 作回归, 得回归直线方程: $C = 8.41395 \times 10^{-7} A - 0.014972$, 相关系数 $r = 0.9999$ (质量浓度范围在 0.01~0.2 $\mu\text{g/ml}$); $C = 1.07359 \times 10^{-6} A - 0.12042$, 相关系数 $r = 0.9997$ (质量浓度范围在 0.2~5 $\mu\text{g/ml}$)。

2.6.2 回收率的测定结果 噻啉酸在 0.1~5.0

$\mu\text{g/ml}$ 的范围内, 肌肉、血液和肝脏中的平均回收率分别为 $(95.43 \pm 3.05)\%$ 、 $(95.28 \pm 2.11)\%$ 和 $(91.06 \pm 2.42)\%$ 。

2.6.3 噻啉酸在组织中的含量 将高效液相色谱测得的噻啉酸的峰面积代入标准曲线所绘制的回归方程, 可求得药物在各组织中的含量。图 1 为鲈口服噻啉酸后各组织的药物含量。

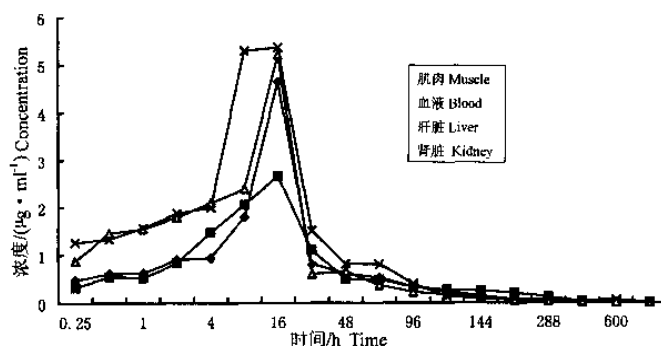


图1 鲈口服噻啉酸后4种组织中的药物含量

Fig.1 Contents of OA in 4 tissues of *Lateolabrax japonicus* by oral administration

2.6.4 药物代谢动力学模型及参数 噻啉酸在血液中的药物浓度-时间数据符合一室开放动力学模型,表3列出了药物代谢动力学参数。

表3 噻啉酸的药代动力学参数

Table 3 Pharmacokinetics parameters of OA

参数 Parameter	单位 Unit	噻啉酸 OA
D	mg/kg	40.000
C ₀	μg/ml	5.530
K _a	h ⁻¹	0.113
K	h ⁻¹	0.067
T _{1/2K_a}	h	6.143 45
T _{1/2K}	h	10.278
T _{max}	h	11.431
C _{max}	μg/ml	2.574
AUC	mg·h/L	82.015

注: D 为剂量 Dose; C₀ 为初始药物浓度 Initial drug concentration; K_a 为表观一级吸收速率常数 Index of primary apparent absorbing rate; K 为药物自体内消除一级速率常数 Index of primary eliminating rate; T_{1/2K_a} 为吸收半衰期 Absorption half-time; T_{1/2K} 为消除半衰期 Elimination half-time; T_{max} 为单剂量给药后出现最高血药浓度的时间 The time when the highest drug concentration occurs after single drug administration; C_{max} 为单剂量给药后的最高血药浓度 The Highest drug concentration for single drug administration; AUC 为给药时曲线下的总面积 The area of serum curve.

3 讨论

噻啉酸因具有广谱、高效、低毒等特点,已广泛应用于养殖业生产,用于预防和治疗多种细菌和支原体性疾病,药物使用途径可药浴、口服及注射。国外报道对养殖鱼类 LD₅₀ 一般 > 1 000 μg/ml, 香鱼 100 mg/kg 体重·d⁻¹, 连用 5 d 肝、肾脏有轻度病变, 鳗鱼 200 mg/L 质量浓度药浴 7 d 安全^[4]。据国外

研究 C_{min} 结果, 噻啉酸 0.09 μg/ml, 呋喃唑酮 6.25 μg/ml, 氯霉素 1.56 μg/ml, 与本试验比较后, 两者基本相同, 前者要低得多, 可能与药物含量有关。根据试验结果, 可以认为噻啉酸安全性较高, 在一定浓度条件下不会对养殖生物和环境造成影响, 建议药浴质量浓度 4 mg/L。国外报告噻啉酸治疗鱼类疾病时有效使用方法是口服 10~30 mg/(kg 体重·d), 连用 5~7 d^[1]。

本试验采用的残留检测方法灵敏度达到 0.01 μg/ml, 低于国外报道的 0.05 μg/ml, 对于残留的检测具有重要意义。鲈单次口服剂量为 40 mg/kg 的噻啉酸后, 0.25 h 后在 4 种组织中就可检测到药物的存在, 吸收速度较快。前期药物在肝脏和肾脏中的含量比在肌肉和血液含量高, 16 h 药物在各组织质量分数都达最大值, 分别为 4.625、2.644、5.212、5.368 μg/g。由于噻啉酸的 C_{min} 值多在 4 μg/ml, 认为口服剂量 40 mg/kg 的噻啉酸在 72 h 前组织中的含量能够抑制和杀灭病菌。

试验中用药 3 d 以后噻啉酸在鱼体内消除速度很快, 各组织中质量分数多在 0.5 μg/g 以下。肌肉和肝脏在 12 d 就可降低到 0.05 μg/g 以下, 血液在 21 d 可降低到 0.05 μg/g 以下, 肾脏在 25 d 可降低到 0.05 μg/g 以下, 30 d 后低于 0.01 μg/g。日本和韩国规定噻啉酸在鱼肉组织中的残留限量是 0.05 μg/ml。因此, 根据本实验结果建议养殖生产使用时休药期应为 15~20 d。噻啉酸属水产专用抗菌药物, 在日本、韩国及西方发达国家得到广泛应用, 而且也得到有关法律法规的允许, 与其他水产药物相比安全性及药效均较好, 且具有价格优势, 值得推广应用。

参考文献:

- [1] 田中二良. 水产药物详解[M]. 北京: 农业出版社, 1972. 249 - 257.
- [2] Endo T, Ogishima K, Hayasaka H, et al. Application of oxolinic acid a chemotherapeutic agent against infectious diseases in fishes II. Explanation of chemotherapeutic effects by whole body auto-bacteriography[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1973, 39(2): 173 - 177.
- [3] Austin B, Rayment J, Alderman D J, et al. Control of furunculosis by oxolinic acid[J]. Aquaculture, 1983, 31: 101 - 108.
- [4] Munns R K, Turnipseed S B, Pfennig A P, et al. Liquid chromatographic determination of flumequine, nalidixic acid, oxolinic acid, and piromidic acid residues in catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. Journal of AOAC International, 1998, 81(4): 825 - 838.
- [5] Gun J Z, Liao I C. Pharmacokinetics of oxolinic acid in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, after single oral administration at 24°C [J]. J Fish Soc Taiwan, 1994, 21(3): 263 - 272.

Application of oxolinic acid against bacterial diseases in aquatic species and the body residues

LI Jian¹, WANG Qun¹, SUN Xiu-tao¹, MA Xiang-dong¹, LIU De-yue¹, TONG Xiang²

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Jintai Group Stock Limited Company of Shandong, Jinan 250100, China)

Abstract: Three routs (oral, bath and injection) of administration were employed in some aquatic animals and plants to test the effect and elimination of oxolinic acid (OA). The results show that OA can inhibit the growth of some main seawater and freshwater pathogenic bacteria such as *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila*, and the minimum inhibiting concentration (C_{min}) was 3.8~5.6 $\mu\text{g/ml}$, and at concentration of 4 $\mu\text{g/ml}$ the effect on controlling the pathogenic bacteria was remarkable. The toxic side effect on *Penaeus chinensis*, *Sparus macrocephalus*, *Lateolabrax japonicus*, *Cyprinus carpio*, *Tilapia nilotica* and *Troionys sinensis* were not significant. Also, the toxic effects on phytoplankton, *Daphnia magna*, egg-hatching of *P. chinensis* and *pagrus major* were low. The clinical experiments showed obviously curing effect of OA on bacterial diseases in those living things at the concentration of 4 mg/L (bath medium). The pharmacokinetics results show that 15~20 d after medicine withdraws are needed to eliminate the drug residues in body. Meanwhile, a pharmacokinetics model and some parameters were obtained.

Key words: oxolinic acid; disease control; pharmacokinetics; residues

欢迎订阅 2002 年《水产学报》

《水产学报》是中国水产学会主办的水产科学性刊物。于 1964 年创刊。主要刊载渔业资源、水产养殖和增殖、水产捕捞、水产品保鲜与综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器以及水产基础研究等论文、简报和综述,并刊登学术动态和重要书刊的评价。

本刊为双月刊,大 16 开,国内外公开发行。每期单价:15.00 元。国内统一刊号:CN31-1283/S;国际标准刊号:ISSN1000-0615。国外发行 Q-387,国内邮发代号 4-297。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款到编辑部订阅。请保存订刊收据,本刊将向订户优惠提供《水产学报》创刊至 2001 年全文检索光盘。

编辑部地址:上海市军工路 334 号,上海水产大学 48 号信箱

邮政编码:200090 联系电话:(021)65710232 传真:(021)65680965

E-mail:scxuebao@online.sh.cn