

抗菌药物在鱼、虾体内的残留及代谢动力学研究

Review on the residues and pharmacokinetics of antibacterial agents in fish and shrimp

徐维海, 朱校斌, 王新亭

(中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071)

中图分类号: S948

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2004)09-0062-04

随着人民生活水平的提高及水产品出口规模的扩大,我国水产养殖业发展非常迅速。但是在水产养殖中药物的滥用和非法使用问题严重,药物在水产品中大量积累,严重威胁消费者身体健康。伴随中国加入 WTO,欧盟、美国和日本等国家对中国水产品中抗菌药物的残留提出了更高要求,中国水产品出口在短时间内多次遭遇“绿色壁垒”。自 2002 年 1 月 25 日欧盟宣布对中国出口的动物源性食品实行禁运后,中国水产品出口受到了极大的损失。对水产品中抗菌药物的残留研究已经迫在眉睫,国外学者开展这方面的研究较早,也已经取得了一定的进展,国内这方面的研究较少。本文就水产养殖中各类常用的抗菌药物在鱼、虾体内的残留研究现状、药物代谢动力学及检测方法等进行综述,以期能够对中国水产养殖中药物的应用及相关研究起促进作用。

1 抗菌药物残留的研究方法

1.1 给药方式和取样

给药方式一般有注射、口灌、浸浴、喂药饵(将饲料与药物混合)等。注射法又分为血管注射、肌肉注射等。对于鱼类,一般是取血液、肝脏、肾脏、肠胃、肌肉等进行检测,虾类一般是检测血液、肠胃、肌肉等。取样时间间隔根据不同的生物特点而定。

1.2 检测方法

抗菌药物的检测方法,已经成熟应用的有以下几种:(1)微生物检测法;(2)分光光度检测法;(3)气相色谱法(GC);(4)高效液相色谱法(HPLC);(5)色谱-质谱联用法;(6)电泳分析法和免疫分析法等。其中 HPLC 法是目前最为常用的方法,测定范围

广,分离效果好,灵敏度高,易操作。

2 各类抗菌药物的检测方法、残留与代谢研究现状

自 1945 年磺胺类药物成功地应用于治疗鳙鱼疔疮病以来,抗菌药物在水产养殖中已被广泛应用,几乎可以用于所有水产养殖动物,包括鱼、虾、贝、蟹等。在淡水、半咸水、海水中都有使用。虽然使用方法有所不同,但使用的目的都是为了疾病的预防和治疗或作为饲料添加剂以促进生长。特别是随着大规模、集约化养殖的发展,抗菌药物的应用也越来越广泛。

2.1 氯霉素类

包括氯霉素和甲砒霉素。氯霉素对革兰阳性、阴性细菌均有抑制作用。但是氯霉素有严重的副作用,能引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病,欧盟、美国、日本和中国已经禁止在水产养殖中使用氯霉素。对氯霉素的残留研究主要集中于氯霉素的检测方法上。

1992 年 Nagata^[1]等用 HPLC 法测定了鱼肌肉中的氯霉素和甲砒霉素。检测波长为 270 nm,检出限量为 0.01 $\mu\text{g/g}$ 。2000 年 Pfenning 报道 GC 法同时测定对虾

收稿日期 2003-01-09,修回日期 2003-06-26

基金项目 国家 973 计划项目(K12000606A)

作者简介 徐维海(1978-),硕士研究生,主要从事环境化学与环保技术的研究,E-mail: xuweihai@ms.qdio.ac.cn;朱校斌,通讯作者

体内氯霉素和甲砒霉素的残留量。李兰生^[2]以投饵料的方式,用 HPLC 法检测了对虾组织和血淋巴中氯霉素的残留量,并进行了氯霉素在对虾体内的药动力学研究。

2.2 磺胺类

磺胺类药物是应用最早的一类人工合成抗菌药物,具有抗菌谱广、疗效强、方便安全等优点,对细菌性竖鳞病、弧菌病、肠炎等有良好的防治效果。主要包括磺胺嘧啶(SD)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺甲基嘧啶(SM₁)、磺胺二甲嘧啶(SM₂)等。其中研究最多的是 SDM 和 SMM,许多研究已经证实,SDM 与 SMM 在水产品血管内给药都适合二室模型,而口服适合一室模型。

Samuelsen^[3]用 HPLC 法检测了大西洋鲑(*Atlantic Salmon*)血液和肌肉中残留的 SDM,以磷酸盐缓冲液和乙腈为流动相,流动相中加入了庚烷磺酸钠和三乙胺,检测波长 270 nm,血液和肌肉的回收率分别为 90.2%、86.5%。检测限分别为 15、30 ng/g。Hormazbal 同时检测鱼肉中磺胺嘧啶和甲氧苄氨嘧啶。方法准确、快速,回收率分别为 96%~99%、100%~105%。Uno 采用 HPLC 方法研究了虹鳟和黄尾鲷血清中及其代谢物残留的 SMM,取得了良好的效果。回收率分别为 96.6% 和 93.9%,98.0% 和 95.0%,灵敏度 0.02 AUFS。Uno 并且研究了 SMM 和 SDM 在虹鳟体内的药物代谢动力学。SMM 和 SDM 的吸收半衰期分别为 6.9、5.0 h,消除半衰期分别为 32.6、24.5 h。可以看出,SMM 的吸收和消除速度都比 SDM 慢,且组织中 SMM、SDM 最高浓度也有较大的差别:血浆中最高浓度分别为 39.6、36.1 mg/L,肝脏 22.6、38.6 $\mu\text{g/g}$,肾脏 21.7、33.6 $\mu\text{g/g}$,肌肉 20.6、17.3 $\mu\text{g/g}$,胆汁 85.8、352 mg/L,SDM 主要分布在胆汁中。Park^[4]报道了 SDM 和 OMR(Ormethoprim)在对虾体内的药物代谢动力学以及生物利用度,还做了剂量不同的 SDM (42 $\mu\text{g/g}$ 和 210 $\mu\text{g/g}$)的代谢曲线,剂量为 210 $\mu\text{g/g}$ 时血淋巴中 SDM 到达最高浓度(25.0 mg/L)所需的时间为 4 h,半衰期为 50 h。Samuelsen 报道了 Romet30 (SDM 和 OMP 合成的一种药物)在大西洋鲑体内的药物代谢动力学。连续喂药(剂量 25 $\mu\text{g/g}$)5 d,血浆、肌肉、肝脏、肾脏中最高含量分别为 14.30 mg/L、17.72、7.42、6.80 $\mu\text{g/g}$,消除半衰期分别为 20、19、62、45 h。由此可以看出,对于大西洋鲑,消除最慢的是肝脏。

国内磺胺类药物检测通常也采用 HPLC 法。艾晓

辉^[5]研究了 SM₂在银鲫体内的药动力学及组织残留规律。以 200 $\mu\text{g/g}$ 的剂量口服灌给药,水温 28.5℃,采用化学比色法测定了 SM₂在银鲫血浆、肌肉、肝脏等组织中浓度,SM₂在银鲫体内的药动力学最佳数学模型为一级吸收一级开放模型,其 $T_{1/2k_a}$ 为 0.665 h, $T_{1/2k}$ 为 12.961,最高药物浓度为 79.777 mg/L。

2.3 四环素类

主要包括四环素、土霉素、金霉素和去甲金霉素等。四环素类药物是一种碱性的光谱抗生素,抗菌谱广,用于治疗鱼类弧菌病、对虾瞎眼病、对虾菌血症以及气单胞菌引起的疾病等。其中研究最多的是土霉素(OTC)。目前四环素类药物的检测主要采用 HPLC 法和微生物法。

Rogstad^[6]报道了给虹鳟喂药(OTC)2周后,其血浆、肌肉、肝脏中药物浓度仍然为 0.64 mg/L、1.94、12.0 $\mu\text{g/g}$,血浆中 OTC 的消除半衰期为 11.6 d。Carignan 采用 HPLC 法测定了 OTC 在鲑鱼肌肉中的残留。提取液为含 1/10 二氯甲烷的 1%偏磷酸,检测波长为 355 nm,检测限 0.05 $\mu\text{g/g}$ 。四环素类药物易与二价或三价阳离子结合,结合后的药物不易穿过细胞脂膜,所以消除速度很慢。Bjorklund^[7]采用 HPLC 技术研究了 5、10、16℃下 OTC 在虹鳟血液、肌肉、肝脏中残留规律。结果表明,药物吸收比排泄相对较快,达到最高药物浓度的时间分别为 24、12、1 h。由此可见,药物排泄与温度密切相关。消除半衰期分别为 8.9、6.1、4.8 d,预测的停药期为 27~135 d。Bjorklund 测定了 5 个渔场底质和鱼体中 OTC 及 OA 的残留,并对两个养殖场的野生鱼及底质进行测定。研究结果表明,13 d 后,OTC 在野生鱼体内还有残留,OTC 在污浊缺氧的底质中残留时间较长。Mohny^[8]研究了在幼给虾连续投喂(剂量 1 500 $\mu\text{g/g}$)14 d 后 OTC 的残留规律。第 4 天到第 14 天,对虾尾部肌肉中 OTC 的残留量在 3.3~5.2 $\mu\text{g/g}$ 之间。Julie^[9]研究了水再循环体系中 OTC 的残留规律。在循环水体中,对鳗鱼连续喂药 10 d,肌肉中 OTC 含量平均为 1.8 mg/g,21 d 后小于 0.2 mg/g。水体经生物滤池过滤,10 d 后 OTC 含量降低到 0.5 mg/g,21 d 后未检出。

国内对 OTC 残留研究主要集中于检测方法的研究上。祝仕清、徐冬梅等分别采用高效毛细管电泳法和 HPLC 法分离四环素、土霉素等四环素类药物。李美同^[10]研究了土霉素在鳗鲡组织中的残留规律。在 23~27℃水温中灌服 OTC(剂量为 200 $\mu\text{g/g}$)5 d,流动

相: 甲醇 + 乙腈 + 二甲基甲酰胺 + EDTA - 柠檬酸缓冲液 = 1 + 1.2 + 0.42 + 1.9; 检测波长: 360 nm。研究表明, 停药一天鱼肉中 OTC 含量达到 $1.0 \mu\text{g/g}$, 168 h 后降低至 $0.1 \mu\text{g/g}$, 鱼肝中残留量较高, 停药 9d 后, 仍残留 $0.6 \mu\text{g/g}$ 。王群研究了土霉素在黑鲷体内的药物代谢动力学。黑鲷一次口服剂量为 $75 \mu\text{g/g}$ 的 OTC, 0.5 h 后在血液、肌肉、肝脏、肾脏中即可检出, 16 h 后浓度达到最高, 分别为 1.68 mg/L 、 1.68 、 2.52 、 $6.77 \mu\text{g/g}$, 分布半衰期和消除半衰期分别为 2.339、46.663 h。

2.4 硝基呋喃类

主要包括呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃妥因等。呋喃唑酮除了防治疾病, 还有促进鱼类生长发育的作用。但是呋喃唑酮有致癌作用, 欧盟、美国以及中国都把硝基呋喃类药物列为水产禁用药物。

固相萃取法从组织中分离和净化硝基呋喃类药物, 然后采用 HPLC 法检测是检测硝基呋喃类药物常用方法。Conneely^[11]采用固相萃取法检测了动物组织中呋喃唑酮及其代谢物 AOZ。色谱柱为 Waters 不锈钢 C_{18} 柱, 检测波长 275 nm, 流动相为乙腈: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾, $\text{pH} 7.4$, 流速 0.8 mL/min 。对虾肌肉中残留的呋喃唑酮和呋喃西林含量的检测也可采取 HPLC 法。色谱柱: 反相 C_{18} 柱, 检测波长 375 nm, 流动相为乙腈: 1% 乙酸。

国内畜禽类产品中呋喃唑酮的残留检测一般采用 HPLC 法。样品中呋喃唑酮的提取: 样品组织混匀后, 转入玻璃层析柱, 用正己烷冲洗, 真空泵抽气至干, 再用乙酸乙酯洗脱, 洗脱液减压浓缩至干后溶解, 过氧化铝小柱后, 用 HPLC 法测定。

2.5 喹诺酮类

喹诺酮类药物, 特别是第三代喹诺酮类药物(氟喹诺酮类)是抗菌药物的新生代, 有非常广阔的应用前景, 对链球菌和表皮葡萄球菌有抑菌和杀菌作用, 抗菌力强、体内分布广、低残留、安全性高、价格低廉, 且与第一、第二代相比, 抑菌和杀菌作用更加迅速、彻底。国外研究较多的主要是氟甲喹(FQ)和恶喹酸(OA), 国内对恩诺沙星已进行了研究。

Horie^[12] HPLC 法检测了鱼组织中残留的美洛沙星(MLX)及其代谢物。鱼组织用 0.2% 磷酸与甲醇提取后, 经 C_{18} 柱净化。流动相为磷酸二氢钠: 乙腈, 流速 0.5 mL/min , 色谱柱 $\text{ODS}(15 \text{ cm} \times 4.6 \text{ mm})$, 药物浓

度为 $0.5 \mu\text{g/g}$ 时, MLX 及其代谢物的回收率分别为 $84.5\% \sim 87.9\%$ 和 $74.8\% \sim 77.6\%$, 最低检出限都为 $0.01 \mu\text{g/g}$ 。Steffenak^[13]同时检测了鱼组织中残留的 OA 和 FQ。鱼组织用乙腈和氨水提取后用水相萃取, 酸化后用三氯甲烷提取, 最后用流动相溶解稀释, 过滤后 HPLC 法测定。OA 和 FQ 的回收率分别为 $101\% \sim 104\%$ 、 $88\% \sim 94\%$, 最低检出限分别为 5 、 10 ng/g 。Hustvedt 以注射和口服 2 种方式研究了大西洋鳗鱼体内的 OA 的吸收、分布以及消除残留规律。注射剂量为 $20 \mu\text{g/g}$, 消除半衰期是 60.3 h , 1 h 内血浆中药物浓度达到最高, 生物利用度 47% ; 口服剂量为 $10 \mu\text{g/g}$, 生物利用度 25% , 达到最高浓度的时间是 3.9 h 。Hustvedt 还采取静脉注射的方式, 用 HPLC 法研究了 OA 在虹鳟体内的消除残留规律。在 8.5°C 的淡水和海水里, 分别给虹鳟注射 $10 \mu\text{g/g}$ 的 OA, 消除半衰期分别为 52.6 h 和 29.1 h 。由此可以看出, 海水中的消除速度要明显快于淡水中的。很多研究结果证明水温越高, 药物的吸收、分布、转化的速度就越快。Sohlberg 的研究也证明了这一点。 5 、 10 、 15°C 条件下血液达到最高浓度的时间分别为 6 、 4 、 1 d , 消除半衰期分别为 6.1 、 4.0 、 1.0 d 。肌肉组织中的 OA 停药期在 5 、 10 、 15°C 条件下分别为 140 、 60 、 28 d 。

研究表明, 注射的生物利用度要明显高于口服的。Samulesen^[14]报道了 FQ 在大比目鱼中残留规律和代谢动力学。采取给静脉注射和口服两种方式。注射后血液中的 FQ 的分配和消除半衰期分别为 0.8 h 和 43 h , 血液中最高浓度是 601 mg/L , 所需的时间是 10 h , 生物利用度为 69% , 口服仅为 31% 。在给大比目鱼注射水平为 $25 \mu\text{g/g}$ FQ 10 d 后, 残留水平仍然超过 0.25 mg/L , 为最低残留限量 (0.0626 mg/L) 的 4 倍。相应的口服为 5 d 。Malvisi^[15]研究了 FQ 在鲷科海鱼体内的分配和代谢残留规律。每天以 $12 \mu\text{g/g}$ 的剂量连续喂药 5 d , 24 h 后, 皮肤中药物含量达到最高, 为 $317 \text{ ng/g} \pm 102.6 \text{ ng/g}$, 此时组织中的药物含量为 $68.7 \text{ ng/g} \pm 49.6 \text{ ng/g}$ 。肌肉中 FQ 在 240 d 后未检出, 而皮肤中则需要更长时间。

张雅斌^[16]通过不同给药方式研究了鲤对诺氟沙星的药代动力学。以 $10 \mu\text{g/g}$ 的单剂量肌肉注射、口灌诺氟沙星的药时数据符合开放性二室模型, 以 $10 \mu\text{g/g}$ 的药物剂量单次混饲给药时数据符合开放性一室模型。研究结果表明, 不同的给药方式的药物

代谢动力学差异较显著,诺氟沙星吸收快,但消除速度慢。

2.6 其他

我国水产养殖中还经常用到中草药(如大黄,五倍子,穿心莲等)和复方制剂等作为抗菌药。处理水体经常用到孔雀石绿。国内外对中草药及复方制剂在水产品体内残留及检测研究,还鲜有报道。其应用也远没有其它抗菌药物广泛。

3 研究展望

尽管残留的抗菌药物对人体有严重危害,可是大规模、集约化、高密度的水产养殖却不可避免地要使用抗菌药物,在今后一段时间内还将大量的使用。目前最为关键的问题就是在改善养殖环境的同时,合理使用抗菌药物,并对水产品实行残留监控。这是目前解决抗菌药物残留问题最为有效和快速的途径,迫切需要药物残留和代谢以及药理学的数据。所以今后应重点研究药物作用机制、吸收、分布、转化和排泄规律以及药物对生态环境的影响,筛选高效、低残留药物,确定抗菌药物的停药期,合理使用药物,使水产品“绿色化”。

参考文献:

- [1] Ngata S. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography[J]. **Liquid chromatography**, 1992, **15**(12): 2 045 – 2 056.
- [2] 李兰生, 王勇强. 对虾体内氯霉素含量测定[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, **25**(3): 400 – 406.
- [3] Samuelsen O B. Simultaneous determination of Ormethoprim and Sulfadimethoxine in plasma and muscle of Atlantic Salmon (*Salmo – Salar*) [J]. **Journal of chromatography – biomedical applications**, 1994, **660**(2): 412 – 417.
- [4] Park E D, Donald V, Lightner, et al. Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. **Aquaculture**, 1995, **130**: 113 – 128.
- [5] 艾晓辉, 陈正望. 磺胺二甲嘧啶在银鲫体内的药动学及组织残留研究[J]. 淡水渔业, 2001, **31**(6): 52 – 54.
- [6] Rogstad A. Pharmacokinetics study of oxytetracycline in

fish[J]. **Aquaculture**, 1991, **96**: 219 – 226.

- [7] Bjorklund H V, Bylund G. Temperature – related absorption and excretion of oxytetracycline in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) [J]. **Aquaculture**, 1990, **84**(3/4): 363 – 372.
- [8] Mohny L L, Rodney R, Thomas A, et al. Residues of oxytetracycline in cultured juvenile blue shrimp, *penaeus stylirostris* (Cystacea: Decapod), fed medicated feed for 14 days[J]. **Aquaculture**, 1997, **149**: 193 – 202.
- [9] Julie B W, Graham B, Mary C C. Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system[J]. **Aquaculture**, 2002, **205**: 221 – 230.
- [10] 李美同, 郭文林, 郑国兴, 等. 土霉素在鳊组织中的残留消除规律[J]. 水产学报, 1997, **21**(1): 39 – 43.
- [11] Conneely A, Nugent A, O'keeffe M. Use of solid phase extraction for the isolation and clean – up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues[J]. **Analyst**, 2002, **127**(6): 705 – 709.
- [12] Horie M, Nakazawa H. Determination of miloxacin and its metabolite in fish by High – Performance Liquid – Chromatography with fluorescence and UV detection[J]. **Journal of liquid chromatography**, 1992, **15**(12): 2 057 – 2 070.
- [13] Steffenak I, Hormazabal V, Yndestad M. Rapid assay for the simultaneous determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish – tissues by High – Performance Liquid – Chromatography[J]. **Journal of liquid chromatography**, 1991, **14**(1): 61 – 70.
- [14] Samuelsen O B, Ervik A. Single dose pharmacokinetic study of flumequine after intravenous, intraperitoneal and oral administration to Atlantic halibut (*Hipoglossus hippoglossus*) held in seawater at 9°C [J]. **Aquaculture**, 1997, **158**: 215 – 227.
- [15] Malvisi J, Rocca G D, Anfossi P, et al. Tissue distribution and depletion of flumequine after in – feed administration in sea bream (*Sparus aurata*) [J]. **Aquaculture**, 1997, **157**: 197 – 204.
- [16] 张雅斌, 张祚新, 郑伟, 等. 不同给药方式下鲤对诺氟沙星的药代动力学研究[J]. 水产学报, 2000, **24**(6): 559 – 563.

(本文编辑 张培新)