

土霉素在鳗鲡组织中残留的消除规律

李美同 郭文林 仲 锋

(中国兽药监察所, 北京 100081)

郑国兴 沈亚林 周 凯

王 蓓 姜金凤 朱鑫源

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

(上海兽药监察所, 201103)

摘 要 在 23~ 27℃ 水温中以每天 200mg/kg b. w. 剂量灌服土霉素五天, 测定鳗鲡组织中土霉素残留的消除规律。停药后每天剖取五条鱼的肉和肝, 用 4% 三氯乙酸- 0.02mol/L 磷酸氢二钠水溶液和三氯甲烷匀浆, 用石油醚除去脂肪。水层用固相萃取 C₁₈ 柱净化后, 用 HPLC 法在 360nm 下测定土霉素残留。色谱柱: ODS- 5 μ 250 × 4.0mm。流动相: 甲醇+ 乙腈+ 二甲基甲酰胺 + EDTA- 柠檬酸钠缓冲液= 1+ 1.2+ 0.42+ 1.9。停药 1 天鱼肉中土霉素含量达到 1.0mg/kg, 停药 7 天降低至 0.1mg/kg。

关键词 鳗鲡, 土霉素, 残留, 消除规律

土霉素(Oxytetracycline C₂₂H₂₄N₂O₉) 是广谱的人畜共用抗生素。近年来, 在水产养殖业用土霉素作鱼药添加到饲料中较为普遍, 因而鱼肉中土霉素残留对人的影响受到关注。现已明确土霉素易与钙结合, 从而影响牙齿和骨骼的发育[Booth 和 McDonald 1988]。我国农业部[1994]和世界粮农组织[FAO 1991]都规定土霉素的最高残留限量在鱼肉中为 0.1mg/kg, 鱼肝为 0.3mg/kg。土霉素在鱼组织中残留消除规律的研究仅限于虹鳟、鲑[Björklund 等 1990、1991]和鲈[FAO 1991]。用药量和途径及不同鱼种对药物的消除速度影响较大, 因而美国对鱼的停药期规定也相差较大。例如, 太平洋鲑以 250mg/kg/天的剂量连喂盐酸土霉素 4 天, 停药后 7 天, 才放宽限制, 而鲑和鲈以 55~ 83mg/kg/天的剂量连喂 10 天三甲铵单烷基土霉素, 要停药 21 天, 才可食用。本实验模拟我国一般养殖条件, 研究土霉素原型在鳗鲡组织中残留消除规律, 对于确定停药期来提高鳗鲡肉的质量, 保障人民健康, 促进鳗鲡出口有着重要意义。

1 材料和方法

1.1 仪器和设备

高效液相色谱仪: 日本岛津 LG-9A(包括 SLG-8A 泵和控制器, D-6AV 紫外检测器, G-R4A 数据处理器, Rheodyne7125 型进样阀(附 20 μL 环管), 液相色谱专用微量注射器 100 μL。

组织匀浆机: 日本 NISSEI AM 型, 附 30mL 容器。离心机 LD-4 型(4 000 转/分)附 50mL 玻璃离心管; 台式离心机(4000 转/分)附 10mL 玻璃离心管。扭力天平: 精确至 0.01g。

1.2 化学试剂

磷酸氢二钠(A. R) 3. 58g 溶于 500mL 水中, 配成 0. 02mol/L。三氯乙酸(A. R) 4. 0g 溶于 100mL 0. 02mol/L 磷酸氢二钠溶液为 4% 处理液, 临用前配。三氯甲烷(A. R)。石油醚(A. R)。无水甲醇(A. R) (北京化工厂)。乙腈(HPLC 专用) (上海脑研所)。二甲基甲酰胺(DMF)(A. R)。乙二胺四乙酸二钠(EDTA) (A. R) 4. 8g 溶于 500mL 水中, 配成 0. 026mol/L 溶液。柠檬酸(A. R) 26. 3g 溶于 500mL 水中, 配成 0. 25mol/L 溶液。柠檬酸钠(A. R) 11. 8g 溶于 200mL 水中, 配成 0. 2mol/L 溶液。土霉素标准品(中国兽药监察所 894 U/mg)。

1.3 鳗鲡和养殖

鳗鲡: 日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 于 9 月 20 日由上海闵华水产有限公司购入, 体重 200~ 300g, 在东海水产研究所水泥池中暂养 15 天, 不喂食。

养殖条件: 室内水泥池, 水温 23~ 27℃, 自来水曝气 3 天后使用, 日换水量为 25%, 并用气泵通气。每个 1m³ 的水池中养 25 条鱼。用药组和空白组分池养殖。

饲料: 为东海水产研究所自配饲料。由鱼粉、淀粉、矿物质和维生素添加剂组成。

1.4 药物处理

药物: 土霉素(兽药级)为北京东北旺药厂生产。效价 916U/mg。

加药饲料的配制: 32g 饲料+ 4g 土霉素+ 134mL 水, 用玻璃棒搅拌成浆状, 浓度约为土霉素 25mg/mL。

给药方法: 将加药饲料浆液吸入 50mL 注射器, 注射器连接软橡胶管, 排净空气。将鱼从水池中取出, 从鱼口中插入软胶管 5cm 以上, 每条鱼灌入 1. 2mL 后放回水池。土霉素剂量约为 200mg/kg b. w。每天上午灌喂一次, 共给药五次。最后一次给药后, 立即开始剖解和测定, 定为停药 0 小时。空白组不给药, 只将空白饲料放于水面, 供自由采食。在停药 0, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168 和 216 小时, 分别取给药组 5 或 7 条鱼, 空白组一条鱼, 剪去尾部放血后, 取全部肝脏和鱼体背部肉, 立即进行残留量测定。

1.5 土霉素残留提取方法

在扭力天平上, 分别称取每条鱼的肉(去刺) 5. 00g 和全部肝脏样品, 加 4% 三氯乙酸- 磷酸氢二钠溶液 10. 00mL, 三氯甲烷 5. 00mL(肝加 3. 00mL), 在冰浴中以 13 000 转/分速度匀浆 3 分钟。移入离心管且以 4 000 转/分的离心速度离心 10 分钟, 取出上清液。再加 4% 三氯乙酸- 磷酸氢二钠溶液 10. 00mL(肉可加 5. 00mL) 于残渣中, 同前匀浆和离心, 合并两次上清液。用 1/4 体积石油醚提取去脂肪, 弃醚层后再离心, 取 1. 00mL 澄清样液吸附于固相萃取 C₁₈柱(100mg, 美国 Alltech 公司) 上, 水洗至中性并离心甩干, 加 0. 50mL 流动相(多加 1/5 体积 EDTA, 柠檬酸钠溶液和甲醇), 收集流出液, 进行高效液相色谱测定。

1.6 土霉素残留高效液相色谱测定条件

色谱柱: SGE-ODS-5 μm 250 × 4. 0mm ID。

检测波长: 360nm。

流动相: 甲醇+ 乙腈+ 二甲基甲酰胺+ 缓冲液= 1+ 1. 2+ 0. 42+ 1. 9(缓冲液 0. 026mol/L EDTA60mL, 0. 2mol/L 柠檬酸钠 12mL, 0. 25mol/L 柠檬酸 100mL 与重蒸馏水 810mL 混匀) 脱气处理。

流速: 0. 6mL/min。

进样体积: 20 μ L。

工作曲线: 用土霉素标准品溶解在甲醇中配制标准溶液, 用外标法根据峰面积、稀释倍数计算, 在土霉素浓度为 0. 03~ 1. 2 μ g/mL 范围内, 标准工作曲线的方程为 $Y= 2. 85X+ 0. 028$, 相关系数 $r= 0. 999 87$ 。样品中土霉素残留量 C 的计算公式为: $C(\text{mg/kg}) = XV_3V_1/V_2W$, 其中: V_1 为三氯乙酸处理液体积(mL); V_2 为固相萃取所用样品液体积(本实验用 1mL); V_3 为固相萃取洗脱液体积,(一般为 0. 5mL); W 为样品重(g)。

2 结果和讨论

不同停药时间鳗鲡组织中土霉素残留量如表 1 和图 1 所示。

表 1 停药后土霉素在鳗鲡组织中残留量

Table 1 Levels of OTC residues in tissues of eels after withdrawal		(mg/kg)											
停药时间(小时)		0	6	12	24	48	72	120	120*	168	168*	216	216*
鱼 肉 中 土 霉 素 残 留 量	1	0. 81	0. 43	1. 05	1. 42	0. 48	0. 52	0. 25					0. 13
	2	0. 42	0. 32	1. 16	1. 29	0. 55	0. 36	0. 33		0. 13			0. 13
	3	0. 52	0. 84	0. 76	1. 32	0. 36	0. 60	0. 13	0. 43	0. 15	0. 23		0. 16
	4	0. 59	0. 65	0. 54	0. 63	0. 49	0. 50	0. 25	0. 41	0. 08	0. 14		0. 10
	5	0. 39	1. 27	0. 87	0. 41	0. 48	0. 63		0. 28	0. 11	0. 22		0. 15
	平均值	0. 55	0. 70	0. 88	1. 02	0. 47	0. 52		0. 30		0. 15		0. 13
	空白值	0	0. 01	0. 01	0. 03	0. 03	0. 03		0. 08		0. 04		0. 05
	实际值	0. 6	0. 7	0. 9	1. 0	0. 4	0. 5		0. 2		0. 1		< 0. 1
鱼 肝 中 土 霉 素 残 留 量	1	9. 00	4. 85	16. 25	24. 77	8. 32	8. 55	2. 56					0. 76
	2	6. 29	4. 67	21. 10	25. 38	8. 40	5. 75	2. 50		1. 32			0. 83
	3	8. 62	15. 59	16. 20	22. 37	6. 17	9. 37	2. 44	3. 58	1. 61	2. 09	1. 29	
	4	9. 64	8. 04	6. 94	12. 98	7. 07	7. 69	2. 46	2. 85	0. 92	1. 29		0. 82
	5	2. 83	10. 56	6. 56	6. 46	5. 68	7. 69		1. 87	0. 76	1. 97		1. 30
	平均值	7. 28	8. 74	13. 32	18. 39	7. 13	7. 81		2. 61		1. 41		1. 00
	空白值	0	0. 03	0. 03	0. 03	0. 03	0. 09		0. 27		0. 36		0. 36
	实际值	7. 3	8. 7	13. 3	18. 4	7. 1	7. 7		2. 3		1. 1		0. 6

注: * 指 120 小时不喂饲料鱼的残留量, 均略高于喂料的鱼。

药物在鱼体内的残留量, 一般随药物剂量的增高而增加, 而消除速度随水温的降低而减慢 [Bjorklund 等 1990]。我国人工养鳗的实际生产中, 水温 25~ 28 $^{\circ}$ C, 土霉素使用剂量为 50~ 100mg/kg b. w., 给药 5~ 7 天。而本实验水温略低(23~ 27 $^{\circ}$ C), 土霉素剂量 200mg/kg b. w./天, 给药 5 天, 高于生产用量 2 倍左右。根据表 1 中 120 小时以后有* 记号的数值看出, 停药时间相同时, 给鳗鲡喂饲料, 药物消除略快, 因而土霉素的残留略低些。本实验中, 除给鱼灌服含药饲料外, 几乎不喂料。因而测得的消除规律, 会比实际生产条件下的消除规律慢。我们认为根据本实验测得的消除规律决定停药期, 可确保鱼肉中土霉素残留量低于最高限量。

从表 1 和图 1 看, 停用土霉素 168 小时后, 鳗鲡肉中土霉素平均残留量降至我国农业部 [1994] 和 FAO [1991] 规定的最高残留限量 0. 1mg/kg, 已可供人食用, 但鱼肝中残留量较高。停药 9 天时, 不论喂料或不喂料的鳗鲡肉中的土霉素含量均低于 0. 1mg/kg, 肝中土霉素含量

为 0.6mg/kg, 略高于规定残留限量。出口鳗鲡要活体包装运输, 运输期间不喂料; 人们食用鳗鲡时, 肝和内脏都弃去, 只吃鳗鲡肉, 因此对于经口服用土霉素剂量在 200mg/kg b. w. 以下时, 鳗鲡的停药期定为 7~9 天, 供人食用是安全的。

鳗鲡为产卵降河性鱼类, 它在淡水中生长, 然后洄游到海水中繁殖。在生理上, 尤其是关于水的排泄方面, 不同于淡水鱼和海水鱼。本实验虽是在淡水中养殖鳗鲡, 但可溶于水的土霉素消除速度, 鳗鲡比鲤鱼慢, 而比海水鱼快, 因而停药期比鲤鱼长, 比海水鱼(如鲑)短。

由表 1 和图 1 可以看出, 停药 0 小时测得值, 实际是前 4 天给药的残留累积值。12 小时为正在下降的此累积值与第五天喂的药到达肝脏正在上升浓度之和。24 小时后, 鳗鲡肉和肝中的土霉素残留量呈现下降趋势。72 小时时肝脏中土霉素的含量略有增加, 说明再吸收的存在。这与田中二良[1982]介绍的相似, 他们测定的是盐酸土霉素一次给药后在鲈鱼体内的吸收、排泄曲线。由于鱼的品种和药物

不同, 吸收和排泄的速度与鳗鲡也不同, 但土霉素在肝脏中浓度有二次升高的规律是相同的。土霉素在鲈鱼肝脏中浓度下降 6 小时后, 在 12 小时又略有升高, 到 24 小时后再下降直至消除[田中二良 1982]。本实验测定的是多次给药吸收和排泄的累积值, 即消除规律, 但仍能看到最后一次(即第五天)给予鳗鲡的土霉素的吸收和排泄规律。因而与鲈鱼一次给药的吸收、排泄规律相似。在鲤组织的消除过程中也有类似的反复, 都证明再吸收作用的存在。

参 考 文 献

田中二良. 1982. 水产药详解. 北京: 农业出版社. 127~150.

农业部. 1994. 农(牧)字第 5 号. 动物性食品中兽药最高残留限量(试行).

Bjorklund H V, et al. 1990. Temperature-related absorption and excretion of oxytetracycline in *Rainbow trout*. *Aquaculture*, 84: 363~372.

Bjorklund H V et al. 1991. Residues of oxolinic acid and oxytetracycline in fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*, 97: 85~96.

Booth N H, McDonald L E. 1988. *Veterinary pharmacology and therapeutics* 6th ed 1170~1173. Iowa state university press/ames.

FAO. 1991. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Food and Nutrition Paper 41/3 FAO Rome. 97~119.

National Archives and Records Administration. 1992. Code of federal regulations(CFR) 21parts § 558. 450 U. S. Government Printing Office, Washington.

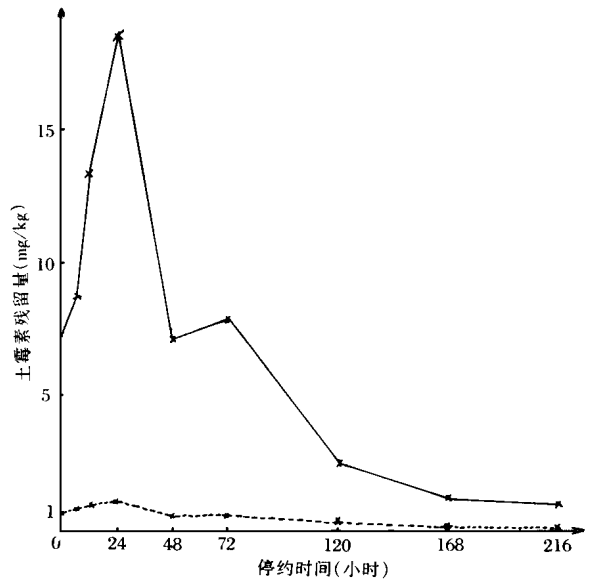


图 1 土霉素在鳗鲡组织中消除曲线

Fig. 1 Depletion curve of OTC from eels tissues

STUDIES ON THE DEPLETION OF *OXYTETRACYCLINE* RESIDUES ON EEL (*ANGUILLA JAPONICA*) TISSUES

LI Mei-Tong, GUO Wen-Lin, ZHONG Feng

(The Control Institute of Veterinary Bioproducts and Pharmaceuticals of China, Beijing 100081)

ZHENG Guo-Xing, SHEN Ya-Lin, ZHOU Kai

(East China Sea Fisheries Research Institute, CAFS, Shanghai 200090)

WANG Pei, JIANG Jin-Feng, ZHU Xi-Yuan

(The Control Institute of Veterinary Drug of Shanghai, 201103)

ABSTRACT Eels were kept in experimental tanks with aerated tapwater at temperatures of 23~ 27 °C. The weight per fish was 200~ 300g. The eels were fed medicated feed by syringe. The dosage of Oxytetracycline (OTC) was 200mg/kg b. w. per day for 5 days. Muscle and liver tissues were taken from five eels at hours 0, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168, 216 after the last dose with OTC. Tissues samples were homogenized with 4% trichloroacetic acid - 0.02mol/L Na₂HPO₄ aqueous solution and trichloromethane, fat was removed by petroleum ether. The aqueous layer was purified by a C₁₈ solid-phase extraction column. The OTC residues were determined by HPLC external standard method using a SGE- ODS- 5 μ 250 × 4.0mmID column with a mobile phase of methanol-acetonitrile-DMF-buffer (Na₂EDTA-citric acid-sodium citrate-water)= 1: 1.2: 0.42: 1.9 at UV detection wavelength of 360nm. The OTC level in eel muscle reached 1.0mg/kg at 24 hours and decreased to 0.1mg/kg at 168 hours (7 days) after withdrawal.

KEYWORDS *Anguilla japonica*, Oxytetracycline, Residue, Depletion