

鰻魚經口投藥經四環黴素後之組織濃度

Tissue Levels of Oxytetracycline in Cultured Eels after Continuous Oral Administration

劉朝鑫·嚴俊毓

C. K. Liu and T. Y. Yen

Abstract

Oxytetracycline was given to the cultured eels (*Anguilla japonica*) at a rate of 200 mg/kg/day for a successive three days. The fish were kept in water at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ or $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Tissue levels of the drug were detected at regular interval for 120 hours. The peak level was found 12-24 hours following the final administration. The drug was still detectable in each tissue 120 hours following the final administration.

緒言

經四環黴素為常用於控制魚類細菌性疾病之抗生素^(1,2-5)。近年來雖然有關藥物在鰻魚組織內的殘留問題日漸受到重視，但是經四環黴素投藥於鰻魚後在組織中濃度之消長，可供參考之資料尚缺。本試驗之目的在於明瞭，經四環黴素連續經口投藥後，在鰻魚組織中濃度之消長；並探求不同的水溫對於經四環黴素在於鰻魚體內之吸收及排泄之影響。

材料與方法

1. 投藥方法

(1)鰻魚：使用 *Anguilla japonica*，體重約 150 g，自鰻池購回後，在魚缸中觀察 15 天後供試驗之用。

(2)投藥及分組：鰻魚以 MS-222 先施行麻醉後，用胃管給予經四環黴素 200 mg/kg，每天投藥 1 次，連續投藥 3 天。試驗鰻分成 2 組，一組置於水溫保持在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 之魚缸中，另一組置於水溫保持在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 之魚缸中。最後 1 次投藥後 4, 8, 12 小時，爾後，每隔 12 小時各組各取 5 尾鰻魚，殺死後取肝臟、腎臟、肌肉及血液，測定組織內之經四環黴素濃度。血液於分離血清後，與其他器官保存於 -20°C 之冰凍箱中，測定時取用。

2. 測定方法

主要依據前報⁽²⁾所描述之方法。

(1)試驗菌：*Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC11778。

(2)抗生素標準試劑：本試驗所使用之標準經四環黴素係由美國輝瑞大藥廠提供，含有力價 920 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

(3)培養基：使用抗生素培養基 1、5、8 及 11 (Antibiotic medium 1、5、8 及 11, Difco)。

(4)磷酸緩衝溶液：抗生素稀釋用或組織萃取用磷酸緩衝溶液，均使用 0.1 M 磷酸緩衝溶液，pH 4.5。其成分為取 Monobasic Potassium Phosphate 13.6 g，加蒸餾水至 1,000 ml。

(5)不銹鋼圓筒：使用外徑 8 mm，內徑 6 mm，高 10 mm 之不銹鋼圓筒。

(6)培養皿：使用直徑為 90 mm，高為 20 mm 之玻璃製培養皿。

(7)碎肉機：使用英製模擬胃 (Stomacher 80, Colworth)。

(8)試驗菌液之製備：將試驗菌培養於含 250 ml 8 號培養基之大平底瓶內，在 37°C 恆溫箱培養 18 小時後，置於室溫繼續培養 6 天，使之形成芽胞。用滅菌蒸餾水適當收集菌苔，使之均勻懸浮，在 3,000 rpm 遠心分離 30 分鐘，捨去上清液，加適當量的蒸餾水振盪後，在 65°C 加熱 20 分，24 小時後重複 1 次。在 1,000 rpm 遠心分離 5 分鐘後取上層液，加適量的蒸餾水製成芽胞懸浮液，芽胞數為 10^7 個/ml，即為試驗菌液，保存於 4°C 冰箱中，可供 2 個月使用。

(9)底層培養基之製作：將 8 號培養基溶解後注入每個培養皿各 10 ml，置於水平桌面上，使其自然凝固。

(10)種層之製作：將 8 號培養基溶解後，保持於 50°C 之水槽中加入適當的菌量，充分混合後吸取 4 ml 注入底層培養基之上層，使之均勻分佈及自然凝固而成。所謂適當的菌量，是在種層上各置 2 枚不銹鋼圓筒，注入經四環黴素修正濃度 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，在 30°C 培養 18 小時後，形成約 20 mm 之抑制圈，且輪廓明晰者。

(11)抗生素原液之製備：精確秤取經四環黴素 40 mg，用 0.01 N HCl 37 ml 溶解，使其力價為 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之原液，保存於 4°C 供一週之用。

(12)標準曲線之製作：在含底層及種層培養基之平皿培養基上，按 60° 圓心角放置 6 枚不銹鋼圓筒，各圓筒與圓心距離為 2.8 cm，將不相鄰之三枚圓筒注入修正濃度至筒口為度，另不相鄰之 3 枚圓筒則注入其餘 5 種標準稀釋液之任何一種，每一濃度做 3 個平皿培養基令為一組，計 5 組共 15 個培養皿，於 30°C 培養 18 小時後，倒置圓筒，反置平皿，用游標尺精細量取抑制圈直徑至 0.1 mm，計算每組 9 個修正濃度抑制圈直徑之平均值，及每一標準稀釋液 9 個抑制圈之平均值。次計算 5 組共 45 個修正濃度抑制圈之平均值，令為校正點 (Correction point)，用該值與各組 9 個修正濃度抑制圈平均值之差額，調整各標準稀釋液抑制圈直徑平均值。若校正點之值大於某組之修正濃度之平均值，將兩者差額加上該組之標準稀釋液抑制圈直徑平均值，即得各該稀釋液抑制圈之校正值；若小於某組修正濃度之平均值，則自該值標準稀釋液抑制圈平均值中減去差額，即得該標準抑制圈之校正值。取校正點及各濃度標準稀釋液校正值為橫軸，濃度為縱軸，在雙週期半對數方格紙上標位或依下式計算，即得代表各濃度之最適標準曲線。

$$L = \frac{3a+2b+c-e}{5} \quad H = \frac{3e+2d+c-a}{5}$$

上式中 L 、 H 各為計算後最低和最高濃度之抑制圈直徑， c 為 45 個修正濃度抑制圈之平均值 (即校正點)， a 、 b 、 d 及 e 為各標準稀釋液之校正值， a 與 e 為最低和最高濃度之校正值。

A. 在磷酸緩衝溶液內之標準曲線：用 pH 4.5 之磷酸緩衝溶液，將抗生素原液稀釋成濃度為 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.05 及 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 6 種標準稀釋液，其中 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為修正濃度，0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為最低反應濃度，0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為陰性反應濃度。

B. 在組織萃取液中之標準曲線：將自鯉魚池購回在實驗室魚缸飼養 15 天，確定無抗生素殘留之鯉魚殺死 10 尾，取肝臟、腎臟、及肌肉，將 10 尾之各組織混合，血液則分別放血，分離血清後混合。取各組織 10 g 加 39 ml pH 4.5 之磷酸緩衝溶液，再加 1 ml 所需濃度 50 倍之抗生素標準溶液，打碎 1 分鐘後，置於 4°C 冰箱萃取 45 分鐘，以 2000 rpm 遠心分離 10 分鐘，取上清液即得。所需濃度為 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 及 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，其中 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為修正濃度，0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為最低反應濃度，而 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 為陰性反應濃度。

C. 回收試驗：從 A、B 比較數個抗生素濃度之回收值，其平均值即為校正因子 (Corrector factor)

。由此值可直接從磷酸緩衝溶液標準曲線中求得欲測組織之抗生素含量。

(13)供測樣品之製備：每次殺死 5 尾鰻魚，將供測之組織取出混合，取 10 g 加 pH 4.5 之磷酸緩衝溶液 40 ml，打碎 1 分鐘後，在 4°C 之冰箱中萃取 45 分鐘，經 2,000 rpm 遠心分離 10 分鐘，取上清液置入不相鄰之 3 枚圓筒內，其餘 3 枚注入修正濃度 (0.4 μg/ml)，每一樣品做了 3 個平皿培養基，在 30°C 之恒溫箱培養 18 小時。

(14)供測樣品抗生素含量之計算：供測樣品中所含抗生素量之計算方法，是計算在 3 個平皿培養基中，修正濃度與樣品抑制圈直徑之平均值，若樣品之平均值大於修正濃度之平均值，則自標準曲線之修正濃度加上樣品濃度與修正濃度之差；反之，若樣品之平均值小於修正濃度之平均值，則自標準曲線上減去樣品濃度與修正濃度之差，然後在標準曲線中，由校正後樣品抑制圈之平均值讀出相對應之濃度，再乘以所稀釋倍數 5 倍，即得該樣品中抗生素之含量。

結果及討論

將經四環黴素以 200 mg/kg 之劑量用胃管投與鰻魚，每天 1 次，連續投藥 3 天，投藥期間及投藥

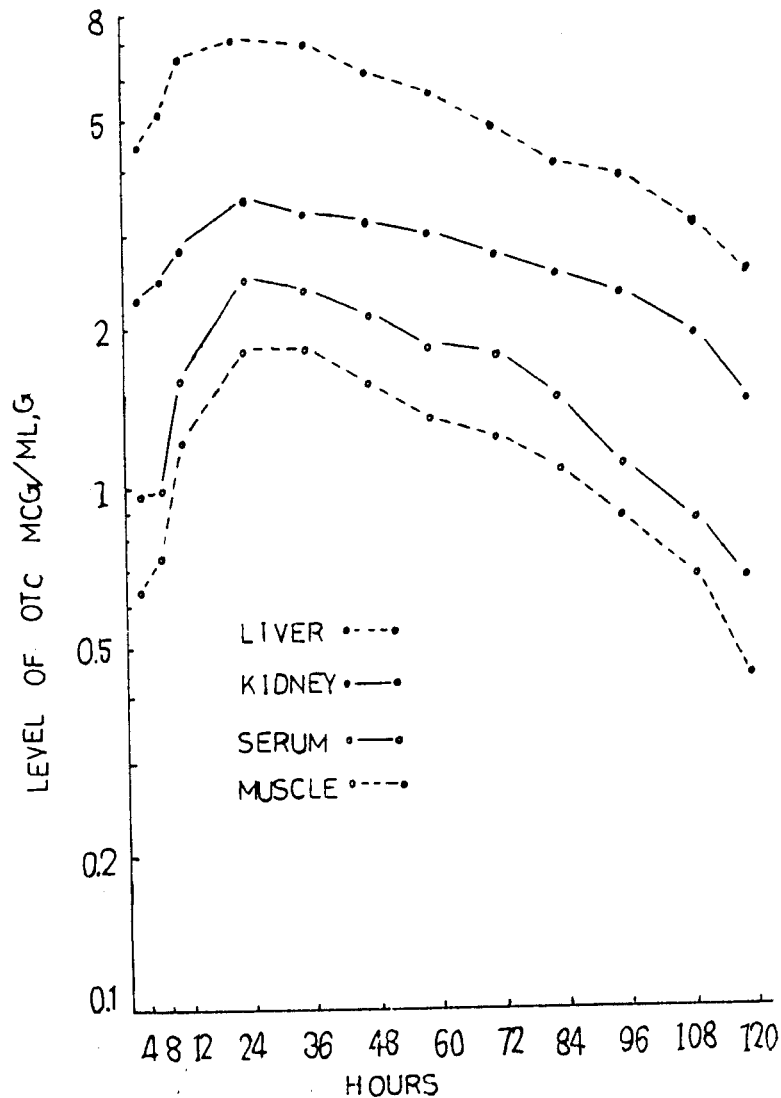


Fig. 1. Tissue levels of Oxytetracycline in eels after administration of 200 mg/kg/day for successive 3 days. The water temperature was $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

後將鰻魚飼養於水溫保持在 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 之魚缸中，測定經四環黴素在鰻魚組織內之分佈，其結果表示於圖 1。從圖 1 可知，經四環黴素在肝臟之分佈濃度最高，腎臟次之，血清又次之，而在肌肉中之分佈濃度最低。在最後投藥後 24 小時，血清、肌肉、腎臟及肝臟中的經四環黴素濃度會達到高峯，然後緩慢下降，在最後投藥後 120 小時，上述各組織中的濃度各為 0.70, 0.45, 1.50, 2.50 $\mu\text{g/ml, g}$ 。

以與上述同劑量及同法投藥後，將鰻魚飼養於水溫保持在 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 之魚缸中，測定經四環黴素在鰻魚組織中之分佈，其結果表示於圖 2。從圖 2 可知，經四環黴素在各組織中之濃度，與在水溫 20°C 時相同，即肝臟濃度最高，腎臟次之，血清又次之，而肌肉最低。高峯濃度則提早於 12 小時到達，在高峯前各組織中的濃度，一般而言比在水溫 20°C 者為高，但高峯後各組織中的濃度，則反比在水溫 20°C 者為低。換言之，經四環黴素在鰻魚體內之吸收，在水溫 30°C 時比在 20°C 時為快為大，而排泄亦有相似的傾向。在最後投藥後 24 小時，經四環黴素在血清、肌肉、腎臟及肝臟中的濃度，水溫 30°C 者各為 1.05, 0.85, 2.75 及 4.65 $\mu\text{g/ml, g}$ ；而水溫 20°C 者則各為 0.95, 0.65, 2.30 及 4.50 $\mu\text{g/ml, g}$ ，水溫 30°C 者較 20°C 者為高。但在最後投藥後 120 小時，水溫 30°C 者各為 0.25, 0.15, 1.20 及

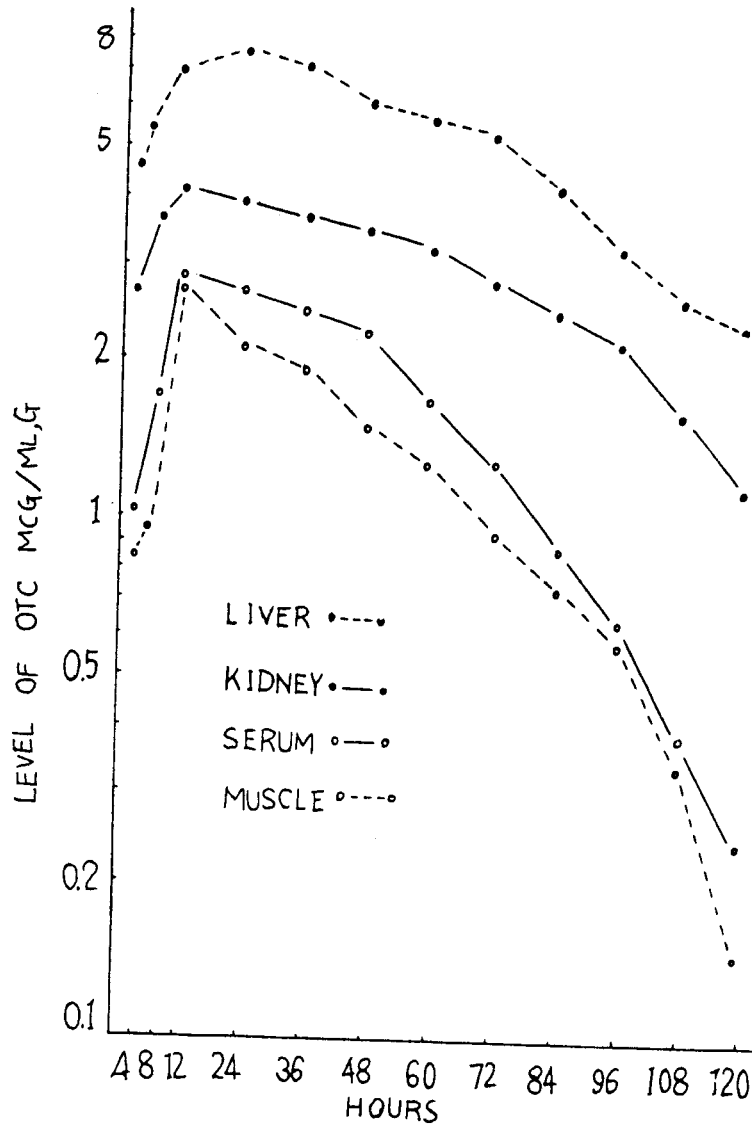


Fig. 2. Tissue levels of Oxytetracycline in eels after administration of 200 mg/kg/day for successive 3 days. The water temperature was $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.45 $\mu\text{g/ml}$, g, 比在水溫 20°C 者為低。

就各別的組織而論, 血清濃度在最後投藥後 4 小時, 在水溫 20°C 者為 0.95 $\mu\text{g/ml}$, 在水溫 30°C 者則略高, 為 1.05 $\mu\text{g/ml}$ 。爾後逐漸上升, 在水溫 20°C 者在最後投藥後 24 小時達到高峯, 其濃度為 2.50 $\mu\text{g/ml}$; 在水溫 30°C 之鰻魚則提早於最後投藥後 12 小時達到高峯, 其濃度為 2.95 $\mu\text{g/ml}$ 。爾後逐漸下降, 在最後投藥後 120 小時, 在水溫 20°C 者降為 0.70 $\mu\text{g/ml}$, 而在水溫 30°C 者, 降速較快, 降至 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 。

肌肉濃度在最後投藥後 4 小時, 在水溫 20°C 者為 0.65 $\mu\text{g/g}$, 水溫 30°C 者為 0.85 $\mu\text{g/g}$ 。爾後逐漸上升, 在水溫 20°C 者於最後投藥後 24 小時達到高峯 1.80 $\mu\text{g/g}$, 維持至 36 小時後逐漸降低; 在水溫 30°C 者則於 12 小時達到高峯 2.80 $\mu\text{g/g}$, 爾後逐漸降低。於最後投藥後 120 小時, 在水溫 20°C 者降至 0.45 $\mu\text{g/g}$, 在水溫 30°C 者則降至 0.15 $\mu\text{g/g}$ 。

臺灣之鰻池水溫雖因季節而異, 但大部份時間介於 20~30°C。從本試驗結果可知, 經四環黴素連續經口投藥, 在停藥後 120 小時即 5 天, 其在肌肉中之殘留濃度, 在水溫 20°C 時仍高達 0.45 $\mu\text{g/g}$, 而在水溫 30°C 時仍有 0.15 $\mu\text{g/g}$ 。因此在經口投藥經四環黴素於鰻魚後之停藥期, 至少在 6 天以上。至於正確的時間, 則尚待進一步之試驗。

腎臟濃度在最後投藥後 4 小時, 在水溫 20°C 之鰻魚為 2.30 $\mu\text{g/g}$, 水溫 30°C 者則為 2.75 $\mu\text{g/g}$ 。高峯在不同水溫的鰻魚均於最後投藥後 12 小時到達, 但 20°C 者之濃度為 3.50 $\mu\text{g/g}$, 而 30°C 者則為 4.10 $\mu\text{g/g}$ 。於最後投藥後 120 小時, 前者為 1.50 $\mu\text{g/g}$, 反比後者 1.20 $\mu\text{g/g}$ 為高。

肝臟濃度受溫度差異的影響, 較上述其他 3 種組織為小。在最後投藥後 4 小時之濃度, 水溫 20°C 者為 4.50 $\mu\text{g/g}$, 30°C 者為 4.65 $\mu\text{g/g}$ 。高峯均於最後投藥後 24 小時到達, 前者為 7.40 $\mu\text{g/g}$, 後者則為 7.60 $\mu\text{g/g}$ 。最後投藥後 120 小時, 前者為 2.60 $\mu\text{g/g}$, 後者則為 2.45 $\mu\text{g/g}$ 。

將經四環黴素連續經口投藥於鰻魚後, 血中濃度與各器官濃度之間, 均保持一定的關係。從圖 1 及圖 2 可知, 此種關係在水溫 20°C 時, 比在水溫 30°C 時更有規則。從本試驗結果可知, 肝臟/血清比及腎臟/血清比均大於 1, 而肌肉/血清比則小於 1。在高峯濃度時之比值, 在水溫 20°C 時, 肝臟/血清比為 $7.40/2.50=2.96$; 腎臟/血清比為 $3.50/2.50=1.40$ 肌肉/血清比為 $1.80/2.50=0.72$ 。在水溫 30°C 時, 肝臟/血清比為 $7.60/2.80=2.71$; 腎臟/血清比為 $4.10/2.95=1.39$; 肌肉/血清比為 $2.80/2.95=0.95$ 。

摘 要

將經四環黴素以 200 mg/kg/天之劑量投與鰻魚 (*Anguilla japonica*), 連續投藥 3 天後定期測定組織濃度。試驗期間鰻魚飼養於 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 及 $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 水溫中。最高濃度出現於最後投藥後 12~24 小時。連續測定至 120 小時為止, 各組織中濃度尚能測出。

參 考 文 獻

1. Irwin, W. H. (1959). Terramycin as a control for fin rot in fishes. *Progr. Fish Cult.*, 21: 89-90.
2. Liu, C. K. (1980). A study on the absorption distribution and elimination of neomycin sulfate in eels. CAPD Fisheries Series No. 3, Reports on Fish Disease Research III: 67-74.
3. Meyer, F. P. (1964). Field treatment of *Aeromonas liquefaciens* infections in golden shiners. *Progr. Fish Cult.*, 26: 33-35.
4. Snieszko, S. F., S. B. Friddle and P. J. Griffin (1951). Successful treatment of ulcer disease in brook trout with Terramycin. *Science* 113: 717-718.
5. Snieszko, S. F., P. F. Griffin and S. B. Friddle (1952). Antibiotic treatment of ulcer disease and furunculosis in trout. *Trans. 17th No. Amer. Wildlife Conf.*, 197-213.