

文章编号: 1000-0615(2016)03-0512-08

DOI: 10.11964/jfc.20150309763

噁喹酸在凡纳滨对虾体内药动学和对弧菌的体外药效

王元¹, 殷桂芳^{1,2}, 符贵红¹, 周俊芳¹, 沈锦玉³, 房文红^{1*}

(1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

3. 浙江省淡水水产研究所, 浙江湖州 313001)

摘要: 采用高效液相色谱法, 研究了复方噁喹酸粉药饵投喂在凡纳滨对虾体内药动学和组织中消除规律, 同时检测了噁喹酸对对虾源弧菌的最小抑菌浓度(MIC), 建立了药动/药效(PK/PD)关系, 提出了用药方案和休药期建议。结果显示, 复方噁喹酸粉拌饵投喂给药, 噁喹酸给药剂量为30 mg/kg(体质量), 凡纳滨对虾血浆噁喹酸浓度—时间关系曲线均符合一级吸收二室开放动力学模型。血淋巴中噁喹酸达峰浓度(C_{max})、达峰时间(T_{max})、曲线下面积(AUC_{0-24})和消除半衰期($t_{1/2z}$)分别为14.70 mg/L、2 h、244.6 mg/(L·h)和18.56 h; 肌肉、肝胰腺和鳃的峰浓度(C_{max})分别为4.11、17.20和7.01 mg/kg, 消除半衰期($t_{1/2z}$)分别为10.71、12.31和16.75 h。噁喹酸对132株弧菌的MIC主要分布在0.15~1.25 μ g/mL, MIC₅₀和MIC₉₀分别为0.62和1.25 μ g/mL。PK/PD相互关系参数 C_{max}/MIC_{90} 和 AUC_{0-24}/MIC_{90} 分别为11.76和195.7。研究表明, 噁喹酸以30 mg/(kg体质量)剂量药饵给药, 凡纳滨对虾能很好地吸收噁喹酸, 可以有效地防治弧菌引起的细菌性疾病。

关键词: 凡纳滨对虾; 弧菌; 噁喹酸; 药动学; 体外药效

中图分类号: Q 935; S 945

文献标志码: A

噁喹酸(oxolinic acid, OA)是第二代喹诺酮类广谱杀菌药, 通过干扰细菌DNA螺旋酶来影响细菌染色体超螺旋而达到杀菌作用^[1], 广泛用于防治鱼类细菌性疾病^[2], 尤其是海水弧菌病^[3-4]。药动学是制定用药方案的基础, 有关噁喹酸在水产动物体内药动学研究在国外报道很多, 主要以冷水鱼类为主^[5-8], 且多为注射给药和口灌给药; 在对虾中, 仅Uno等报道了口灌给药下噁喹酸在日本对虾(*Penaeus japonicus*)^[9]和斑节对虾(*P. monodon*)^[10]体内的药动学。国内关于噁喹酸的药动学研究仅在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)^[11]和大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)^[12]等鱼类。噁喹酸是我国兽药典中允许使用的抗菌药物之一^[13], 但其用药方案和休药期十分笼统, 缺乏针对鱼虾蟹等不同种属水产动物的具体用药方案。有关噁喹

酸在水产动物体内药动学研究多是以噁喹酸原料药进行的, 其结果对指导复方噁喹酸粉制剂的合理使用并不合适。本实验采用复方噁喹酸粉制剂以投喂药饵的给药方式, 研究噁喹酸在对虾体内药动学、组织分布和消除规律; 弧菌是危害对虾养殖的重要细菌性病原之一^[4], 研究噁喹酸对分离自患病凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)弧菌的体外抗菌活性, 构建体内药动—体外药效联合作用关系, 为我国对虾养殖中噁喹酸用药方案的制定提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

用于体外药效实验的132株弧菌, 为本实验室分离自浙江、福建和海南等地沿海养殖发病

收稿日期: 2015-03-11 修回日期: 2015-05-25

资助项目: 公益性行业(农业)科研专项(201203085); 上海市科技兴农重点攻关项目[沪农科攻字(2014)第3-4号]; 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2013A0603)

通信作者: 房文红, E-mail: fwenhong@163.com

凡纳滨对虾, 分别为副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)71株、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)35株、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)12株和创伤弧菌(*V. vulnificus*)14株。

用于药动学实验的凡纳滨对虾为东海水产研究所海南琼海研究中心室内池养殖, 挑选规格均匀的用于实验, 对虾平均体长(9.0±0.5) cm, 实验前暂养一周; 暂养和实验用水为盐度33的自然海水, 保持24 h充气, 平均水温为(30±1) °C。暂养期间投喂不含噁喹酸的人工配制的对虾全价饲料, 实验期间对虾成活率为100%。

1.2 药品和试剂

噁喹酸标准品(纯度≥98.0%)购于德国Dr.Ehrenstorfer公司, 噁喹酸原粉(纯度≥98.0%)购于潍坊三江医药集团。复方噁喹酸粉^[13]: 7.5 g噁喹酸加2.5 g维生素C混合均匀, 然后再加90 g淀粉充分混匀。甲醇、乙腈和正己烷均为HPLC级, 德国Merk公司产品; 四丁基溴化铵和磷酸均为分析纯, 购自国药集团上海化学试剂公司。营养肉汤和M-H细菌培养基购自青岛海博生物技术有限公司。

1.3 仪器和设备

高效液相色谱仪(Waters 2695, 美国); 色谱柱为AglientZorbax SB-C₁₈ (4.6×150 mm, 5 μm); 荧光检测器(Waters 2475, 美国); 超纯水仪(Millipore Milli-Q Advantage, 美国); 均质器(Bertinpreccellys 240, 法国); 生化培养箱(Sanyo MIR-254, 日本); 微量移液器(Eppendorf, 德国); 电子分析天平(Mettler 204, 瑞士); 高速冷冻离心机(Hitachi CF16R II, 日本); 旋转蒸发器(亚荣RE-52A, 中国上海); 0.22 μm微孔滤膜(Rephile, 中国上海)等。

1.4 最小抑菌浓度的测定

最小抑菌浓度(MIC)采用试管二倍稀释法进行测定^[15], 药物为噁喹酸原粉。

1.5 给药和取样

给药剂量为30 mg/(kg体质量), 配制含0.6%噁喹酸的人工配合饲料, 按0.5%对虾体质量投喂药饵。投喂后15 min药饵全部吃完, 分别在药饵吃完后30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、1 d、2 d、3 d、5 d、7 d、10 d、15 d和20 d采集血淋巴、肝胰腺、肌肉和鳃等样品, 置于-80

°C冰箱保存备用。每个采样点采集12尾对虾, 2尾合并为一个样品, 每个时间点共6个样品。对虾样品采集参照李国烈等^[16]方法。

1.6 样品处理

血淋巴样品 取出样品置室温融解后, 1 000 r/min离心5 min, 取0.2 mL上清于1.5 mL离心管中, 加入等体积乙腈, 涡旋振荡2 min后, 12 000 r/min离心5 min, 取上清液经微孔滤膜过滤, 滤液用于HPLC分析。

肌肉、肝胰腺和鳃样品 样品室温解冻后, 取适量样品于均质器中均质; 然后称取均质样品(肌肉1.00 g、肝胰腺和鳃各0.50 g)于10 mL离心管中, 加入1 mL PBS(0.1 mol/L, pH7.4), 旋涡振荡器上振荡2 min, 加入5 mL乙腈, 继续振荡5 min, 于10 000 r/min转速离心5 min, 收集上清液; 残渣再重复提取两次, 合并3次上清液于100 mL具塞茄形蒸发瓶中, 于45 °C、真空度0.075 MPa下旋蒸至干; 加入1 mL流动相和1 mL正己烷, 盖上塞子置超声波清洗仪超声15 min, 瓶底残留物完全溶解, 将混合液体转移至2 mL离心管中, 12 000 r/min离心5 min, 用1 mL注射器吸取下层液体, 经微孔滤膜过滤, 滤液用于HPLC分析。考虑到对虾鳃较小, 遂将2个样品合并在一起处理, 因此鳃组织在每个时间点只有3个平行。

1.7 色谱条件

流动相为乙腈和0.01 mol/L四丁基溴化铵(磷酸调节pH为2.75); 柱温40 °C, 样品温度25 °C; 进样量10 μL, 流速1.0 mL/min; 荧光检测器波长Ex=265 nm、Em=380 nm。

血浆和肌肉的流动相比比例为乙腈: 0.01 mol/L四丁基溴化铵(pH 2.75)=30: 70(V/V), 肝胰腺和鳃的流动相比比例为18: 82(V/V)。

上述样品前处理和色谱条件下, 对虾血淋巴样品中噁喹酸检测限为0.02 μg/mL, 肌肉、肝胰腺和鳃检测限为0.01、0.02和0.02 μg/g; 血淋巴中噁喹酸回收率为86.0%~92.8%, 肌肉、肝胰腺和鳃的回收率分别为78.9%~85.5%、82.1%~86.7%、85.2%~90.8%; 血淋巴、肌肉、肝胰腺和鳃中噁喹酸日内和日间精密度均小于5%。

1.8 数据处理

凡纳滨对虾血药浓度—时间关系曲线方程采用房室模型进行拟合分析, 血淋巴、肌肉、肝

胰腺和鳃的药动学参数采用统计矩原理推算。模型的拟合和药动学参数的推算采用药物与统计软件(DAS 3.1)进行分析,曲线下面积 AUC_{0-24} 则根据实际测定值采用梯形法算得。

2 结果

2.1 药饵给药后噁喹酸在凡纳滨对虾体内药动学

凡纳滨对虾投喂添加复方噁喹酸粉的颗粒饲料,噁喹酸剂量为30 mg/kg,给药后对虾血药浓度迅速升高,2 h即到达峰浓度(C_{max} 为14.70 mg/L);随后开始下降,且速度较快,48 h后下降速度缓慢;120 h时血药浓度低于检测限(图1)。血药浓度—时间关系曲线比较适合采用一级吸收二室模型来描述,拟合的药动学方程:

$$C_t = 7.298e^{-0.075t} + 9.652e^{-0.037t} - 39.184e^{-2.607t},$$

$$R^2 = 0.999, AIC = -1.088.$$

药饵给药后,对虾组织中噁喹酸浓度变化趋势与血药相似(图2),但组织中噁喹酸峰浓度和达峰时间明显不同,肌肉、肝胰腺和鳃等组织中药物峰浓度分别为4.11、17.20和7.01 mg/kg,达峰时间分别为4、1和4 h;组织中噁喹酸消除较快,肌肉、肝胰腺和鳃在120 h低于或接近于检测限。

采用统计矩原理求得对虾血淋巴、肌肉、肝胰腺和鳃等组织药动学参数(表1),可以看出,各组织的曲线下面积(AUC)大小依次为血淋巴、

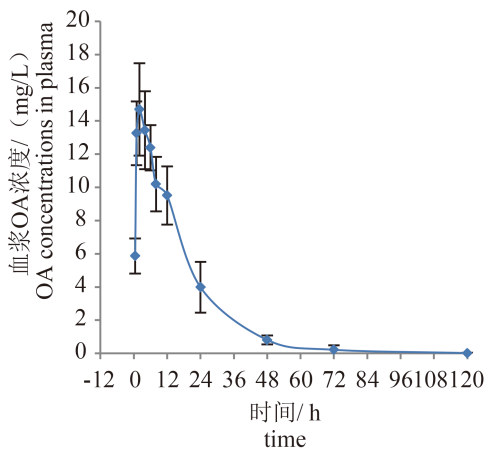


图1 药饵给药后凡纳滨对虾血淋巴噁喹酸浓度与时间关系曲线

Fig. 1 Profile of hemolymph oxolinic acid concentrations vs. time of Pacific white shrimp after oral dosing via feed

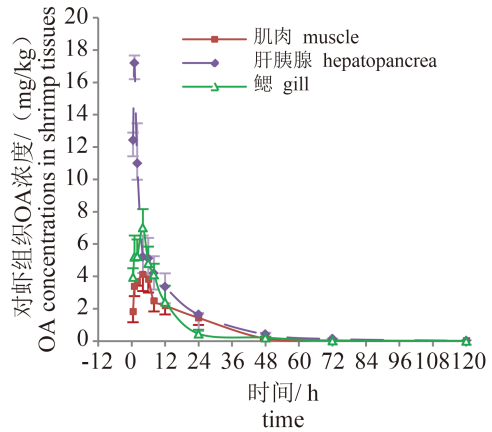


图2 药饵给药后凡纳滨对虾组织中噁喹酸浓度与时间关系曲线

Fig. 2 Profile of tissue oxolinic acid concentrations vs. time of Pacific white shrimp after oral dosing via feed

肝胰腺、鳃和肌肉,各组织中噁喹酸消除快慢($t_{1/2z}$)依次为肌肉、肝胰腺、鳃和血淋巴。

2.2 弧菌对噁喹酸的敏感性

噁喹酸对从患病对虾分离的132株弧菌的MIC值主要分布在0.15~1.25 $\mu\text{g/mL}$,仅有8株弧菌的MIC $\geq 5\mu\text{g/mL}$,由此可见噁喹酸对弧菌较为敏感,132株弧菌的MIC₅₀和MIC₉₀分别为0.62和1.25 $\mu\text{g/mL}$ (表2)。

2.3 药动/药效(PK/PD)相互关系

C_{max}/MIC_{90} 和 AUC_{0-24}/MIC_{90} 值是评价PK/PD关系的重要参数,能显示体内药物抗菌效果。本研究中,噁喹酸对35株哈维氏弧菌的 C_{max}/MIC_{90} 和 AUC_{0-24}/MIC_{90} 值均为最小(分别为5.88和97.8),对132株弧菌的两个PK/PD参数分别为11.76和195.7,显示其具有较好的抗菌效应(表3)。

3 讨论

3.1 噁喹酸在凡纳滨对虾体内药动学特征

采用房室模型拟合药时曲线关系,可推算得到较多的药动学参数,能很好地揭示药物在动物体内的动态变化规律。噁喹酸在水产动物体内药动学的报道较多,但在不同动物之间其房室模型差异较大。同为消化道给药(口灌或投喂药饵)下,大西洋鲑(*Salmo salar*)^[5]、大西洋鳕(*Gadus morhua*)^[6]、大西洋庸鲽(*Hippoglossus hippoglossus*)^[7]和欧洲鳗鲡^[11]的血浆药时曲线关系适合采用一

表 1 药饵给药后凡纳滨对虾各组织中噁喹酸药动学参数

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of oxolinic acid in Pacific white shrimp after oral dosing via feed

药动学参数 pharmacokinetic parameter		血淋巴 hemolymph	肌肉 muscle	肝胰腺 hepatopancreas	鳃 gill
C_{max}	mg/L/[mg/kg]	14.70±2.78	4.11±1.01	17.20±0.47	7.01±1.05
T_{max}	h	2	4	1	4
AUC_{0-24}	mg/(L·h)[mg/kg·h]	244.6	58.42	98.82	71.73
AUC_{0-120}	mg/(L·h)[mg/kg·h]	403.2	79.69	110.8	83.00
$AUC_{0-\infty}$	mg/(L·h)[mg/kg·h]	403.7	80.34	118.6	83.22
MRT_{0-120}	h	23.50	14.93	9.64	11.73
$MRT_{0-\infty}$	h	23.71	15.52	13.34	12.09
V_z	L/kg	1.991	-	-	-
$t_{1/2z}$	H	18.56	10.71	12.31	16.75
CL_z	L/(kg·h)[kg/(kg·h)]	0.074	0.373	0.253	0.360

注: C_{max} . 峰浓度; T_{max} . 达峰时间; AUC_{0-24} 、 AUC_{0-120} 和 $AUC_{0-\infty}$. 0~24 h、0~120 h和0~∞时间的曲线下面积; MRT_{0-120} 和 $MRT_{0-\infty}$. 0~120 h和0~∞时间的平均驻留时间; $t_{1/2z}$. 消除半衰期; V_z . 表观分布容积; CL_z . 总体清除率

Notes: C_{max} . peak concentration; T_{max} . time to reach peak concentration; AUC_{0-24} , AUC_{0-120} and $AUC_{0-\infty}$ -area under the concentration-time curve from zero to 24 h, from zero to 120 h and from zero to infinity, respectively; $t_{1/2z}$. elimination half-life; MRT_{0-120} , $MRT_{0-\infty}$. mean residue time from zero to 120 h and from zero to infinity, respectively; V_z . volume of distribution; CL_z . total body clearance

表 2 噁喹酸对对虾源弧菌的MIC值分布

Tab. 2 MIC distribution values of oxolinic acid on *Vibrios* from Pacific white shrimp

μg/mL

细菌种类 bacterial species	MIC值分布 MIC distribution values									MIC_{50}/MIC_{90}
	0.08	0.15	0.31	0.62	1.25	2.5	5	10	>10	
副溶血弧菌 (n=71) <i>V. parahaemolyticus</i>	0	6	26	25	10	1	0	1	2	0.62/1.25
哈维氏弧菌 (n=35) <i>V. harveyi</i>	0	1	8	17	3	3	1	0	2	0.62/2.5
溶藻弧菌 (n=12) <i>V. alginolyticus</i>	0	3	0	8	0	0	0	1	0	0.62/0.62
创伤弧菌 (n=14) <i>V. vulnificus</i>	1	1	8	3	0	0	0	0	1	0.31/0.62
合计 (n=132) total number of strains	1	11	42	53	13	4	1	2	5	0.62/1.25

表 3 对虾药动学和弧菌体外药效联合参数

Tab. 3 PK/PD parameters from pharmacokinetics of oxolinic acid in shrimp and *in vitro* efficacy on *Vibrios*

PK/PD参数 PK/PD parameters	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i> (n=71)	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i> (n=35)	溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i> (n=12)	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i> (n=14)	弧菌 <i>Vibrio</i> (n=132)
C_{max}/MIC_{90}	11.76	5.88	23.71	23.71	11.76
AUC_{0-24}/MIC_{90}	195.7	97.8	394.5	394.5	195.7

室模型描述, 大菱鲂^[12]适合采用二室模型, 而金头鲷(*Sparus aurata*)^[8]则不能用房室模型拟合, 日本对虾和斑节对虾在口灌给药下同样不适合采用房室模型描述。本研究中, 拟合相关系数($R^2=0.999$)和AIC值($AIC=-1.088$)显示, 噁喹酸药饵给药后凡纳滨对虾血药浓度与时间关系曲线

适合采用一级吸收二室开放模型描述。造成房室模型差异的原因很多, 例如动物种类和大小、水温、盐度、药物给予方式和房室的选择等, 但是难以推断是哪种因子决定了最佳模型的选择。尽管本研究采用二室模型能很好地描述血药浓度—时间曲线关系, 但还是采用了统

计矩原理推算药动学参数,因为它们不受房室选择的影响^[17]。

血药 C_{\max} 、 T_{\max} 和 AUC 是反映药物在体内吸收快慢和程度的重要参数^[17],同时也是评价体内药效的重要指标^[18]。与大西洋鲑、大西洋鳕、金头鲷等低温养殖鱼类相比,凡纳滨对虾药饵给药后的血药峰浓度明显高于低温养殖对虾 $[C_{\max}=4.20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $AUC=43.6\ \mu\text{g}/(\text{mL}\cdot\text{h})]$ ^[10],其血药达峰均快于日本对虾^[9]和斑节对虾^[10]。由此分析,水温很可能是影响噁喹酸在水产动物体内吸收的主要因素,低温冷水性鱼类吸收很少;其次,种属间差异亦影响噁喹酸的吸收。与其他抗菌药相比,同是药饵给药下,噁喹酸在凡纳滨对虾的血药浓度略高于盐酸沙拉沙星^[16],远高于诺氟沙星^[19],可见噁喹酸能被凡纳滨对虾很好且快速地吸收。

消除半衰期($t_{1/2\alpha}$)和平均驻留时间(MRT)是评价药物消除快慢的重要参数^[17]。尽管大西洋鳕和大西洋鲑都是低温养殖鱼类,但口灌给药后大西洋鳕血浆、肌肉和肝脏的 $t_{1/2\beta}$ 分别为82、58和82 h^[6],而大西洋鲑血浆、肌肉和肝脏噁喹酸 $t_{1/2\beta}$ 分别为18、20和10 h^[5]。在对虾属中噁喹酸消除速率同样存在差异,如凡纳滨对虾血淋巴中噁喹酸消除速率与斑节对虾($MRT=20.9\ \text{h}$, $t_{1/2\beta}=19.8\ \text{h}$)相近^[10],快于日本对虾($MRT=40.3\ \text{h}$, $t_{1/2\beta}=34.3\ \text{h}$)^[9]。由此可见,噁喹酸在不同动物体内的消除速率存在着种属差异,本研究中凡纳滨对虾血浆、肌肉和肝胰腺等组织均显示对噁喹酸具有较快的消除速率,这一结论在休药期计算中得到进一步证实。

3.2 关于凡纳滨对虾肝胰腺对噁喹酸的吸收

甲壳动物肝胰腺不仅具有代谢功能还具有吸收功能,经口摄入的化学药物和有机溶质等^[20],主要被肝胰腺吸收,其次是中肠^[21];Miyawaki等^[22]已证明蛋白银、乳酸铁和橄榄油等物质在克氏螯虾(*Procambarus clarkii*)肝胰腺进行主要吸收。本研究中,凡纳滨对虾摄食噁喹酸药饵后,其肝胰腺中药物浓度达峰时间快于血淋巴、肌肉和鳃组织,这一现象同样出现在凡纳滨对虾口服氟苯尼考和甲砒霉素的结果中^[23]。甲壳动物肝胰腺具有较强吸收作用的原因很可能与其消化系统的结构特征有关,例如对虾幽门胃和中肠前端包埋在肝胰腺中,肝胰腺和中肠同源均来自

内胚层,对虾肝胰腺上皮细胞有整齐而密集的微绒毛,这种上皮细胞具有消化和吸收功能^[24]。因此,过高的给药剂量将会导致对虾肝胰腺药物浓度过高而增加对肝胰腺的毒性危害,在甲壳动物给药时应避免过高给药剂量而引发对肝胰腺的毒性危害。

3.3 噁喹酸防治对虾弧菌病的有效性分析

结合血药浓度、作用时间和抗菌活性特征,依据PK/PD联合参数用于制定用药方案,对获得最佳临床疗效和指导合理用药有着重要意义^[25]。噁喹酸属于浓度依赖型药物,因此, C_{\max}/MIC 和 AUC_{0-24}/MIC 值是评价该类药物治疗的关键指标^[25]。一般认为 C_{\max}/MIC 之比为8~10时,临床有效率可达90%^[26];对于 AUC_{0-24}/MIC 比值,研究显示, AUC_{0-24}/MIC 为25时可以应对不严重的细菌性感染,而对于严重的感染,该比值需要大于等于100^[27], AUC_{0-24}/MIC 比值高于250,可很快清除体内感染的细菌^[28]。鉴于 AUC_{0-24}/MIC 比值在很大程度上不受给药间隔、药物种类、动物种类和感染部位的影响^[29],因此,研究者更多地采用 AUC_{0-24}/MIC 比值作为预测实际疗效的参数。

Bhavnani等^[30]认为,耐药菌株能提高 MIC_{90} 值,较大程度地影响PK/PD,从而影响药物治疗。本研究采用 MIC_{90} 来评价弧菌对噁喹酸的敏感性,哈维氏弧菌的 C_{\max}/MIC_{90} 和 AUC_{0-24}/MIC_{90} 比值明显低于其他种类弧菌。由于目前尚无噁喹酸对弧菌耐药折点的判别值,通过参考噁喹酸对气单胞菌的耐药折点(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)^[31],显示出本研究中的132株弧菌有8株为耐药菌株,其中35株哈维氏弧菌中有3株为耐药菌株,由此升高了 MIC_{90} 值从而影响了PK/PD参数。总体而言,一日一次以30 mg/(kg体重)剂量药饵给药,针对132株弧菌的 MIC_{90} ,其PK/PD参数 C_{\max}/MIC_{90} 和 AUC_{0-24}/MIC_{90} 比值均显示能满足噁喹酸的有效治疗要求。

参考文献:

- [1] Drlica K, Coughlin S. Inhibitors of DNA gyrase [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 1989, (44): 107-122.
- [2] 李健,王群,孙修涛,等. 噁喹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.

Li J, Wang Q, Sun X T, et al. Application of oxolinic

- acid against bacterial diseases in aquatic species and the body residues [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2001, 8(3): 45–49(in Chinese).
- [3] Touraki M, Niopas I, Karagiannis V. Treatment of vibriosis in European sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax* L., with oxolinic acid administered by bath or through medicated nauplii of *Artemia franciscana* (Kellogg): efficacy and residual kinetics [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2012, 35(7): 513–522.
- [4] Samuelsen O B, Bergh O I. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for the treatment of vibriosis in cod (*Gadus morhua*) [J]. *Aquaculture*, 2004, 235(1): 27–35.
- [5] Samuelsen O B, Ervik A, Pursell L, *et al.* Single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater and in vitro antibacterial activity against *Aeromonassalmonicida* [J]. *Aquaculture*, 2000, 187(3): 213–224.
- [6] Samuelsen O B, Bergh O, Ervik A. A single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in cod, *Gadus morhua* L., held in sea water at 8° C and in vitro antibacterial activity of oxolinic acid against *Vibrio anguillarum* strains isolated from diseased cod [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2003, 26(6): 339–347.
- [7] Samuelsen O B, Ervik A. A single-dose pharmacokinetic study of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), held in sea water at 9 °C [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1999, 22(1): 13–23.
- [8] Rigos G, Tyrpenou A, Nengas I, *et al.* A pharmacokinetic study of flumequine in sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), after a single intravascular injection [J]. *Journal of fish diseases*, 2002, 25(2): 101–105.
- [9] Uno K. Pharmacokinetics of oxolinic acid and oxytetracycline in kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* [J]. *Aquaculture*, 2004, 230(1): 1–11.
- [10] Uno K, Aoki T, Kleechaya W, *et al.* Pharmacokinetics of oxytetracycline in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, and the effect of cooking on the residues [J]. *Aquaculture*, 2006, 254(1): 24–31.
- [11] 林丽聪, 樊海平, 廖碧钗, 等. 噁喹酸在欧洲鳎体内
的药代动力学及残留研究[J]. *淡水渔业*, 2012, 42(1): 24–29.
- Lin L C, Fan H P, Liao B C, *et al.* Pharmacokinetics and residues of oxolinic acid in *Anguilla anguilla* [J]. *Freshwater Fisheries*, 2012, 42(1): 24–29(in Chinese).
- [12] 孙爱荣, 李健, 常志强, 等. 噁喹酸在大菱鲆体内的药代动力学研究[J]. *中国海洋大学学报 (自然科学版)*, 2012, 42(3): 75–79.
- Sun A R, Li J, Chang Z Q, *et al.* Pharmacokinetics of oxolinic acid in Turbot (*Scophthalmus maximus*) after a single oral and intravenous administration [J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2012, 42(3): 75–79(in Chinese).
- [13] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 兽药使用指南. 化学药品卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010, 357.
- Chinese veterinary Pharmacopoeia Committee. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China Guide for Use of Veterinary Drug. Chemical Volume* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010: 357(in Chinese).
- [14] 陈健舜, 朱凝瑜, 孔蕾, 等. 凡纳滨对虾细菌性红体病原的分子特征与耐药性[J]. *水产学报*, 2012, 36(12): 1891–1900.
- Chen J S, Zhu N Y, Kong L, *et al.* Molecular characteristics and antimicrobial sensitivity of bacterial pathogen from the outbreak of *Litopenaeus vannamei* red-body disease [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2012, 36(12): 1891–1900(in Chinese).
- [15] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985.
- Dai Z Y. *Clinical antibacterial pharmacy* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1985(in Chinese).
- [16] 李国烈, 王元, 房文红, 等. 盐酸沙拉沙星在凡纳滨对虾体内药动学与生物利用度[J]. *南方水产科学*, 2014, 10(1): 50–57.
- Li G L, Wang Y, Fang W H, *et al.* Pharmacokinetics and bioavailability of sarafloxacin hydrochloride in *Litopenaeus vannamei* [J]. *South China Fisheries Science*, 2014, 10(1): 50–57(in Chinese).
- [17] 王广基, 刘晓东, 柳晓泉. 药物代谢动力学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- Wang G J, Liu X D, Liu X Q. *Pharmacokinetics* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005(in Chinese).

- [18] Wright D H, Brown G H, Peterson M L, *et al.* Application of fluoroquinolone pharmacodynamics [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46(5): 669–683.
- [19] 房文红, 郑国兴. 肌注和药饵给药下诺氟沙星在南美白对虾血淋巴中药代动力学[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(5): 541–546.
Fang W H, Zheng G X. Pharmacokinetics of norfloxacin in hemolymph from whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei* following intramuscle injection and oral administration [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(5): 541–546.
- [20] Loizzi R F, Peterson D R. Lipolytic sites in crayfish hepatopancreas and correlation with fine structure [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology: Part B*, 1971, 39(2): 227–236.
- [21] Verri T, Mandal A, Zilli L, *et al.* d-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas [J]. *Comparative Biochemistry & Physiology: Part A*, 2001, 130(3): 585.
- [22] Miyawaki M, Taketomi Y, Tsuruda T. Absorption of experimentally administered materials by the hepatopancreas cells of the crayfish, *Procambarus clarki* [J]. *Cell Biology International Reports*, 1984, 8(10): 873–877.
- [23] Fang W, Li G, Zhou S, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of thiamphenicol and florfenicol in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in Freshwater following oral administration [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2013, 25: 83–89.
- [24] 陈宽智, 鲍鹰, 何伟宏. 东方对虾消化系统解剖和组织学的研究[J]. *山东海洋学院学报*, 1988, 18(1): 43–53.
Chen K Z, Bao Y, He W H. Studies on the anatomy and histology of the digestive system of the *Penaeus orientalis* (Crustacea, Decapoda) [J]. *Journal of Shandong College of Oceanology*, 1988, 18(1): 43–53(in Chinese).
- [25] Zhanel G G. Influence of pharmacokinetic and pharmacodynamic principles on antibiotic selection [J]. *Current Infectious Disease Reports*, 2001, 3(1): 29–34.
- [26] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2008, .
Zeng S. *Drug Metabolism* [M]. Hangzhou: Zhejiang University Press, 2008(in Chinese).
- [27] Jacobs M R. Optimisation of antimicrobial therapy using pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2001, 7(11): 589–596.
- [28] Schentag J J, Meagher A K, Forrest A. Fluoroquinolone AUC break points and the link to bacterial killing rates part 2: human trials [J]. *Annals of Pharmacotherapy*, 2003, 37(10): 1478–1488.
- [29] Owens R C, Bhavnani S M, Ambrose P G. Assessment of pharmacokinetic–pharmacodynamic target attainment of gemifloxacin against *Streptococcus pneumoniae* [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2005, 51(1): 45–49.
- [30] Bhavnani S M, Ambrose P G, Jones R N. Pharmacodynamics in the evaluation of drug regimens [J]. *The Annals of Pharmacotherapy*, 2002, 36(3): 530–532.
- [31] Le Bris H E, Dhaouadi R, Naviner M, *et al.* Experimental approach on the selection and persistence of anti-microbial-resistant *Aeromonads* in faecal matter of rainbow trout during and after an oxolinic acid treatment [J]. *Aquaculture*, 2007, 273(4): 416–422.

Pharmacokinetics of oxolinic acid in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and *in vitro* antimicrobial activity on *Vibrios*

WANG Yuan¹, YIN Guifang^{1,2}, FU Guihong¹, ZHOU Junfang¹, SHEN Jinyu³, FANG Wenhong^{1*}

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China)

Abstract: The pharmacokinetics and tissue elimination of oxolinic acid (OA) in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, were investigated following oral administration via feed by HPLC method. The minimum inhibitory concentrations (MIC) of OA on the pathogenic *Vibrio* were detected. The Pharmacokinetics/pharmacodynamics (PK/PD) parameters were calculated, and dosage regime and withdrawal time were developed. The haemolymph OA concentration vs. time after oral administration via feed was best described by a two-compartment model with first absorption following a single dose of 30 mg/kg. The peak concentration (C_{max}), peak time (T_{max}), area under curve (AUC_{0-24}) and elimination half-life time ($t_{1/2z}$) for hemolymph were 14.70 mg/L, 2 h, 244.6 mg/L, and 18.56 h, respectively. Peak concentrations (C_{max}) in muscle, hepatopancreas and gill were 4.11 mg/kg, 17.20 mg/kg and 7.01 mg/kg, respectively; elimination half-life time ($t_{1/2z}$) were 10.71 h, 12.31 h and 16.75 h, respectively. The OA MICs of 132 *Vibrios* isolates varied mainly from 0.15 to 1.25 $\mu\text{g/mL}$ with MIC_{50} of 0.62 $\mu\text{g/mL}$ and MIC_{90} of 1.25 $\mu\text{g/mL}$. The ratios of C_{max}/MIC_{90} and AUC_{0-24}/MIC_{90} , which were two important indices for PK/PD relationship, were 11.76 and 195.7, respectively. The results showed that OA dosage of 30 mg/kg by medicated feed could effectively combat bacterial diseases caused by the *Vibrios*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; oxolinic acid; pharmacokinetics; *in vitro* pharmacodynamics; *Vibrios*

Corresponding author: FANG Wenhong. E-mail: fwenhong@163.com

Funding projects: National Special Research Fund for Non-Profit Sector (201203085); Key Project for Reviving Agriculture by Science and Technology (2014-3-4); Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes, Chinese Academy of Fishery Sciences (2013A0603)