

水產藥物在海鱸體內藥物動力學研究(1)

涂堅^{*1}、張紹光²、張正芳³、黃淑敏¹、宋玟璟¹

郭鴻志²、楊嘉宏³、程健智¹、張惟茗¹

¹行政院農業委員會家畜衛生試驗所

²國立台灣大學獸醫學系

³行政院農業委員會水產試驗所生物技術組

摘要

本研究嘗試瞭解安默西林（40 mg/kg）與安比西林（20 mg/kg）在海鱸體內可能殘留的時間，協助評估現有停藥期是否適用。在本實驗中研究者以硬質胃管餵食建立新的投藥方法，使投藥劑量準確並明顯減少魚隻緊迫。對藥物分析而言，研究者改良其他研究者的分析方法、如縮短萃取時間、減少廢有機溶液的產生，並以變更酸鹼值的方式改善分析。對於上述二藥物的停藥期而言，雖然無法直接與現有動物用藥品殘留容許量標準資料比較，但由分析結果得知：安比西林與安默西林在肌肉中的殘留濃度，於投藥 48 小時後，均低至或接近行政院衛生署動物用藥殘留標準（ $0.01 \mu\text{g/mL}$ ），且兩者於血液中亦均低於最低訂量極限。

關鍵字：海鱸、安默西林、安比西林、停藥期

前言

海鱸為一種肉質甘美廣受國人與日人喜愛的新興魚類，又由於其生長快速，相關之繁殖及飼養方法均已研發完成，遂形成一具內外銷潛力的優勢產品，故見其產值逐年提高。細菌性及寄生蟲性疾病為海鱸養殖的主要病害，上述兩類疾病之防治均依靠藥物治療。然依照我國「水產動物用藥使用規範」之規定，可用於水產之藥品種類為 14 種，適用的水產動物種類為 26 種，其中並規定未列者不得使用。但觀養殖現況，此規範所列明顯不足，因此，造成多種現行或新興養殖魚類在藥物的使用上無所依循。再觀現場，當魚群遭受細菌性疾病侵害時，業者為避免經濟損失，仍需要使用藥物治療，但由於資訊不明或不

易取得，反而容易造成對象動物不明、用法用量不當、停藥期不足等情形，除了違反相關法規外，更易造成疾病的散播、消費者食品安全與公共衛生上的疑慮。為解決上述問題，研究臨床常用藥物於現行或新興飼養動物之藥物動力學，成為各國目前急需進行的工作之一（1, 5, 10, 11; 12, 18; 19, 21），我國相關的研究，除了可以建立藥物使用的資訊、提供藥物殘留檢驗方法外，相對更提升我國養殖漁業的產品品質，避免輸歐吳郭魚與輸日鰻魚藥物殘留之窘境再次發生，並且能夠正面回應監察院於 93 年 11 月 16 日對農政與衛生相關單位所作之糾正。因此，年度計畫以 β -內醯胺類中的安比西林與阿默西林為研究主題，以現場使用之投藥方法下進行研究，建立海鱸體內常用 β -lactam 類藥物動力學之模式。

*抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

材料與方法

標準品與試藥

安比西林 (ampicillin sodium, 100.0 %) 與安默西林 (amoxicillin trihydrate, 97.8 %)。分別購自 MP Biomedicals 與 Sigma-Aldrich 公司。三氟醋酸 (trifluoroacetic acid, TFA, Riedel-dehaën)、三氯醋酸 (trichloroacetic acid, TCA)、磷酸 (phosphate acid)、磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate)、乙醚 (diethyl ether)、單水檸檬酸 (citric acid monohydrate)、甲醛溶液 (formaldehyde solution, min. 37 % free from acid)、氯化鈉 (sodium chloride) 等均為試藥級。甲醇 (methanol)、乙腈 (acetonitrile) 均為液相層承級 (Merck Co., Inc.)。試驗中所用之水均為去離子之二次蒸餾水。

儀器及器具

微量天平 (precision balances)。電子天平 (balances)。氮氣吹乾裝置 (N₂ evaporator)。恆溫水浴槽 (refrigerated circulating bath)。離心機 (centrifuge)。超音波震盪器 (ultrasonic cleaner)。分液漏斗震盪器 (funnel shaker)。酸鹼度測定器 (pH meter)。過濾裝置 (filter): Millipore® all-glass filter holder for 47 mm filters。過濾膜 (filter membrane): Millipore® Durapore membrane filter, 0.45 μ m。針筒過濾膜 (syringe filter): Millipore® 13 mm Millex-HN filters, 0.45 μ m。可調式微量吸管 (pipetment)。玻璃吸管 (bulb pipette): 1 mark, Blaubrand® Class AS 1、2、3、4、5、10、20 及 25 mL。玻璃褐色定量瓶 (amber glass volumetric flasks): Blaubrand® Class A 10、20、50、100 及 2000 mL。固相萃取匣 (solid phase extract cartridge): Oasis® HLB 3 mL/60 mg Extraction cartridge 與 C₁₈ (Waters, USA)。

高效液相層析儀係採用美商沃特斯公司

(Waters, USA), 配件包括: 除氣泡裝置: In-Line Degasser AF、移動相幫浦: 600E Controller Multisolvent Delivery System、樣品自動注射器: 717 Plus Autosampler、檢測器: 996 Photodiode Array Detector (PDA)、470 Fluorescence Detector (FD)、資料分析軟體: Millennium³² Version 3.2、保護管柱: μ Bondapak® Precolumn insert (C₁₈, 5 μ m)、分析管柱: SymmetryShield® column (RP₈, 5 μ m, I.D. 4.6 \times 250 mm)。

動物試驗

試驗用藥物(安默西林及安比西林)均於實驗前 30 分鐘以無菌的二次蒸餾水新鮮泡製, 確保藥效。本實驗中, 實驗魚之體重, 約在 100 \pm 20 克之間, 魚隻購入後即分別豢養在試驗環境水槽中適應一週後再行分組, 分組則是採隨機方式, 每個採樣時間點以 3 隻魚為原則, 另於 0 時間點採取空白魚隻 5 隻以為實驗對照組, 確認魚隻無任何與實驗相關之藥物殘留。魚隻于訂時投與所知濃度藥物後(安比西林 20 gm/kg 安默西林 40 mg/kg)及以 3 隻 1 組方式, 分別關在不同的飼養槽內, 飼養槽內之環境控制在水溫 20 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C, 並以泵浦打氣維持水中充氧程度。當採藥時間點到達時, 由 6 位實驗人員 2 人一組, 先行以 MS-222 鎮定, 再以 5 ml 針對實驗動物進行心臟採血, 採血量以愈多愈佳為原則, 採血完畢後, 以骨剪剪斷魚之頸椎, 進行安樂死, 再剪開魚腹小心並仔細採取所需器官(肝臟與腎臟), 然後再採取魚體側肌肉並仔細將魚皮剝除; 於每隻魚採樣完畢後, 所使用的刀剪等器具, 均經清洗後酒精消毒備用, 採樣盤中的墊紙, 則以每個樣本一張的原則每次更換, 降低交互污染的可能性。依上述採樣流程所得的樣本均分別標示, 儲存於夾鏈袋中, 然後立即冷凍至-70 度冰箱, 直到運送至本實驗室分析為止。血液樣本則以每分鐘 3500 轉(4 $^{\circ}$ C), 離心 20 分鐘後, 抽取上層血清, 亦分別標示儲存於-70 度冰箱, 直到分析為止。殘餘魚體則統一收集至標示有生物

危害性清潔袋中，冷凍於-20°C 冰櫃中，於實驗結束後，統一交由簽約的合格廠商焚化處理。針頭於抽血完畢後，均以高熱針頭銷毀器銷毀，另放置於固定尖銳物盒中統一銷毀，針管另集中於相關生物危害收集盒中，由合格簽約公司統一處理。

溶液配製

試驗中所需的：1 % 與 20 % 三氟醋酸 (TFA, v/v) 溶液、40 % 甲醇溶液 (v/v)、標準原液及工作溶液 (避光儲存於 4 °C 冷藏) 0.01 M 磷酸緩衝溶液 (pH = 2.5)、0.4 M 檸檬酸溶液 (0.4 M citric acid solution, w/v)、7 % 甲醛溶液 (7 % formaldehyde solution, v/v) 等均每日以標準超作程序新鮮配製配製為原則，若使用舊溶液則以不超過二日為原則。

魚肉萃取

去皮後將 5 g 肌肉置於 50 mL 離心管均質 (均質機：中等速度 20-30 秒；高速 2 分鐘)，加入 20 mL 0.01M 磷酸緩衝 (pH4.5)，再次均質 (10000 rpm, 90 秒)，然後離心 (4500 rpm, 10 分)。取上清液加入另一 50 mL 試管備用；然後將殘渣加入 20 mL 緩衝液，離心 (4500 rpm, 10 分) 後，合併兩次上清液 (約 40 mL)。將上輕液濾過玻璃纖維綿，再加入 1 mL 75% TCA 除去多餘蛋白質，振盪 30 秒，4500 rpm 離心 20 分，再次以玻璃纖維綿過濾 (共約 40 mL)。

淨化

取 C₁₈ solid - phase extraction cartridge (Waters, USA) 依序淨化檢體。先以 5 mL MeOH，加 2 mL 水，再加 2 mL 2%TAC，然後加入樣本液體 (以 2 mL/min 速度流出)，再加 2 mL 2%TAC (過盡至乾)，加 2 mL 水 (以上液體部分全部丟棄)，最後加 1.5 mL ACN，收集流出液到 15 mL 玻璃試管中。加 0.5 mL 水及 3 mL 乙醚，試管震盪 30 秒，離心 3 分鐘 (2000 rpm)，吸除上層液 (乙醚) 並保留下層液備用。

衍化步驟

衍化是依 Ang 等人 (1996) 的方法進行，其衍化步驟如下：取 1 mL 標準品或樣品溶液置於玻璃試管中，加入 0.4 mL 20 % 三氯醋酸溶液，震盪 15 秒；加入 0.4 mL 7 % 甲醛溶液，震盪 30 秒；於沸水中加熱 30 分鐘後，冷卻至室溫，再加入約 1 g 的氯化鈉充分混合；加入 3 mL 乙醚，震盪 1 分鐘，萃取衍化產物；經 700 g 離心 3 分鐘後，吸取乙醚移入另一試管；重複步驟 4、5，共三次，將各次收集的乙醚產物混合；置於 40 °C 水浴中，並以溫和氣流的氮氣吹至乾涸，再以 1 mL 移動相重新溶解產物。將回溶產物經 0.45 μ m 濾膜過濾後備用。

高效液相層析儀之檢測條件

移動相：0.01 M 磷酸二氫鉀緩衝液：乙 = 82 : 18 (v/v, pH 2.5)。流速：1 mL/min。螢光檢測器： λ_{ex} = 358 nm、 λ_{em} = 440 nm、Gain = 10、ATT = 128。樣品注入量：50 μ L。

資料分析

將量化資料輸入軟體 Pharsight WinNonlin 進行動力學分析。

結果與討論

人類飼養的經濟魚類，其投藥方法常以經口或浸泡為原則，除了是為了避免魚隻的緊迫、拒食而影響其正常的生理與生長以外，對現場實際日常操作而言，上述方法亦較為可行。以注射方式投藥除少數觀賞魚種外，更因易導致魚隻緊迫、拒食與降低免疫使病情更嚴重。於本實驗之預備試驗中，研究者初期嘗試將藥物與飼料混合或以軟質胃管投藥，經分析預備實驗魚隻血清、肌肉與肝腎樣本的結果發現，將藥物與飼料混合或以軟質胃管投藥，在上述所有樣本中所得的數據其變異性非常的大，明顯表示應是由於以飼料混合藥物投藥時，由於實驗族群過大，無法似部份陸生動物實驗，單獨將魚隻一一分開投藥，投藥時魚群搶食飼料，造成投藥不均所致；試驗者

亦曾經嘗試使用多種材質的軟管投藥，但在考量不傷及魚隻消化道於材質兩者間，常無法獲得平衡，並且軟管插入食道，由於魚隻的保定不當或掙扎，可能造成軟管彎曲而不自知，因而造成未能將藥物直接投至胃內的狀況。因此，實驗再現性極差，而無法分析。後經相互討論與試驗，研究者建立以硬質胃管方式投藥，改善其他研究者將藥物與飼料混合後，經口投予試驗的方法，此法明顯可降低藥物與飼料混合不均、標的藥物融於水中污染實驗水體與實驗魚隻、或實驗魚隻攝食量差異等的缺點。此法除達到快速均勻投藥的目的外，並且由於操作時間短暫，明顯減少魚隻緊迫，這可由投藥 2 小時後平等的例行性餵食，魚隻即會開始進食得知。

在前人研究中，雖有相似的試驗，但其所採用的液相層析方法在本試驗中，並無法達成如發表文獻所述 (2,3,4, 6, 8, 9)，經實驗者測試不同的固相萃取層析夾 (C18、C8 與 Oasis® HLB)，經比較發現 C18 固相萃取層析匣符合本實驗需求 (13, 14, 15)。對層析管柱而言，前人使用 C18 層析管柱，而本實驗使 SymmetryShield® 管柱，相對比較滯留時間與分析效率得知，本實驗所用的層析管柱明顯縮短檢測時間改善波型，除能節省溶劑達到經濟、環保效果外，亦能同時分離安比西林與安默西林二種藥物，此將有助於爾後發展多種藥物同時檢測與分離技術。對萃取的過程而言，前人均使用乙醚重複萃取 3 次 (15, 16)，而本實驗中以單一萃取取代，雖然單一乙醚萃取量略增，但總體而言有機溶液適用仍較其他作者為少且回收率亦可保持。

對移動相溶液酸鹼值的調整而言，綜觀其他作者所選用的移動相溶液酸鹼值多在 pH 4.5-6.5 之間 (2,6)，於本實驗中研究者以 pH 2.5 進行檢測。本實驗中藥物經衍生後，測其衍化產物，其主要目的是因為 β 內醯安類抗生素的紫外線吸光值約在 220 nm 左右，在如此低的波長之下，常會有明顯的干擾出現，這包含了魚肉

中的各種雜質、所使用或學溶劑的雜質、水中的雜質等。為解決此問題，在本實驗中，則採取前人研究衍生化的方式進行 (2,17)，雖會延長樣本製作的時間 (約 50 分鐘)，但對檢測的特異性而言，則會因檢測螢光而明顯提升。

水產動物藥物動力學資料原已較陸生動物為少，並且由於實驗時不易以陸生動物同一動物連續採血的模式進行，因此，在執行上更為困難。在本實驗中每一時間點的採樣，均為單獨魚隻，故分析各樣本時，會見到數據變異性較大的情形，這主要是因為樣品非來自同一隻魚，研究者於預備實驗時使用較大魚隻，以相似於陸生動物方式連續採血，惟因大型魚隻過於昂貴，又採血用導管使用在魚體上固定不易，容易鬆脫、且須限制魚隻活動範圍等不便，因此，研究者最後決定採用每一時間點採取單一魚隻各種樣本的方式，用來試驗與分析，此對於試驗過程而言較易控制，但亦可能由於魚之個體的差異使藥物動力學的變異性加大，至於對最終資料的可能影響，則需要爾後將兩種方式同時進行，互相對照評估，才可以清楚了解。

圖 1 至圖 6 所示為安比西林與安默西林兩種藥物以時間對藥物平均濃度作圖 (右上角的小圖為時間對藥物濃度半對數作圖)。由實驗數據計算得知，對安比西林而言 (表一)，血中藥物約在 1.2 小時的時候達到最高平均血中濃度，但也僅有 $10.8 \mu\text{g/mL}$ ，對肌肉、肝臟與腎臟而言，均在 1 小時 (或 1.3 小時) 達到最高平均血中濃度，其濃度分別約為 25、56 與 $31 \mu\text{g/mL}$ 。而血清與所有組織樣本中安比西林的濃度，在兩小時均已經降到約 $5 \mu\text{g/mL}$ 以下；在 36 小時後，組織臟器中，以腎臟中所殘留的平均藥量最高 ($0.486 \mu\text{g/mL}$)，肝臟次之 ($0.134 \mu\text{g/mL}$)，肌肉再次之 ($0.05 \mu\text{g/mL}$)，而血清中的藥品濃度在此時已經降低到最低檢測濃度以下。由上述實驗數據得知，安比西林經口服投予後，在血中快速上升，相對而言，亦快速下降，在 8 小時即降至 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 以下。其血液、肌

肉、肝臟與腎臟中的平均滯留時間分別為 2.5、7.9、3.9 與 2.5 小時。

對安默西林而言(表二)，藥物吸收的形式與安比西林相似，在血中快速上升(T_{max} 在血液、肌肉、肝臟與腎臟中分別為 1.8、1.8、1.2 與 1.4)，但清除較慢。對血液、肌肉、肝臟與腎臟而言最高平均血中濃度分別約為 61、84、67 與 5.4 $\mu\text{g/mL}$ 。除肝臟外，其他樣本中安默西林的濃度，在二十四小時均已經降到 1 $\mu\text{g/mL}$ 左右或以下；在 48 小時，組織或臟器中，以腎臟中所殘留的藥量最高(1.32 $\mu\text{g/mL}$)，肝臟次之(1.01 $\mu\text{g/mL}$)，肌肉中已無法測得(≤ 0.01 $\mu\text{g/mL}$)，而血清中的藥品濃度在此時已經降低到最低檢測濃度以下。其血液、肌肉、肝臟與腎臟中的平均滯留時間分別為 21.6、4.1、9.5 與 6.9 小時。由上述實驗數據得知，安默西林經口服投予後，其血液變化相似於安比西林，但其於魚體內殘存時間較安比西林為長。

由於一般藥物動力學的分析中並不包含藥物在肝臟與腎臟的藥量，因此，除特殊目的，多數研究者均未對此二臟器中的藥物濃度進行分析。本實驗中，研究者亦同時採取此二臟器進行分析，但是由於前述理由，如需要尋找這一部份的資料和已知血中或是肌肉濃度的關係時，則需要另外經過藥物動力學專家，對單一藥物與器官設定分析模式，計算資料數據間互動參數，方能更清楚解釋藥物在體內的真正分佈、代謝與排泄間的關係。由於本部份資料的分析涉及特殊藥物動力學模式的設計與專業模擬，如基於實際使用或實驗需要時，研究者將另外尋求國內外相關合作對象與編列相關模式模擬計畫經費執行。

致謝 本計畫(94 農科-13.2.5-衛-H4)進行期間中，有關實驗魚飼養、操作、採樣及資料分析承蒙水產試驗所生物技術組張正芳博士研究室及臺灣大學獸醫學系張紹光博士藥理研究室協助，在此一併致謝。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of ampicillin (single oral dose : 20 µg/mL)

Parameters	T _{1/2}	T _{max}	C _{max}	AUC _t	AUC _{inf}	V _d	Cl	AUMC	MRT
Serum	1.0±0.3	1.2±0.8	10.8±5.3	21.4±12.0	21.4±12	1771±1147	1116±494	53.6±28.7	2.5±0.1
Muscle	11.8±5.5	1.3±0.7	24.9±20.3	42.5±18.5	42.5±18.5	10601±9901	538±265	145±50.2	7.9±0.6
Liver	55.7±30.4	1.0±0	55.9±9.0	87.3±16.2	87.3±16.2	12383±2814	172±51	694±175	3.9±1.8
Kidney	40.1±7.6	1.0±0	30.5±8.9	45.7±4.5	45.7±4.5	21365±4019	370±37	302±31	2.5±0.1

T_{1/2}: 半生期 (小時)、T_{max}: 藥物達到血中最高濃度所需時間、C_{max}: 藥物在血中的最高濃度、AUC_t: 藥物在濃度時間曲線下面積(area under concentration-time curve, t: 0~48 h)、AUC_{inf}: 藥物在濃度時間曲線下面積(area under concentration-time curve, inf: 0~∞)、V_d: volume distribution、Cl: 清除率 clearance (L/kg body weight)、AUMC: 動態時間下之面積(Area under moment-time curve)、MRT: 平均殘留時間 (mean residue time)

Table 2 Pharmacokinetic parameters of amoxicillin (single oral dose : 40 µg/mL)

Parameters	T _{1/2}	T _{max}	C _{max}	AUC _t	AUC _{inf}	V _d	Cl	AUMC	MRT
Serum	34.1±9.9	1.8±2.0	61.9±36.2	224±165	231±164	46820±8997	973±121	1029±96	21.6±5.8
Muscle	15.1±6.8	1.8±2.0	84.0±35.4	318±128	352±162	13436±13584	533±323	816±534	4.1±0.5
Liver	14.5±5.5	1.2±0.8	67.2±27.3	195±126	197±126	5142±1698	275±160	3166±1768	9.5±2.2
Kidney	13.8±4.4	14±9.2	5.4±6.9	49.9±12.6	83±9.8	9074±1406	496±346	1341±626	6.9±1.8

T_{1/2}, T_{max}, MRT : hrs

C_{max} : µg/mL

AUC_t : hr × µg/mL

V_d : L/Kg

Cl : mL/hr/kg

AUMC : hr × hr × µg/mL

水產藥物在海鱸體內藥物動力學研究(1)

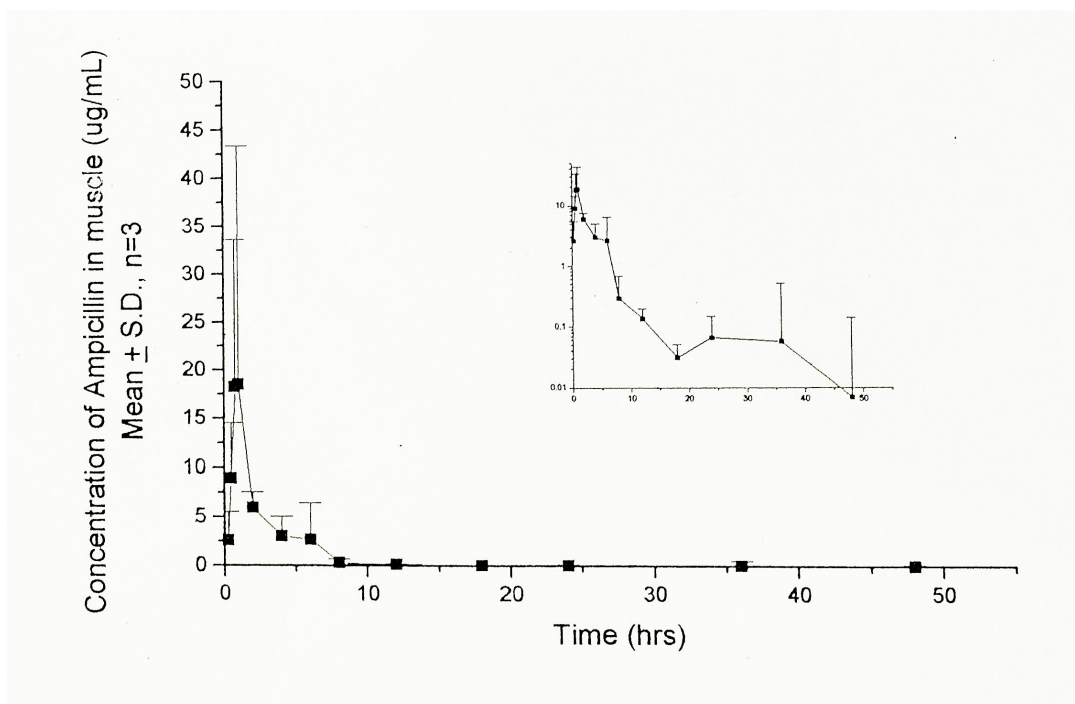


圖 1、時間對安比西林平均濃度(肌肉)。右上角為時間對藥物濃度半對數圖

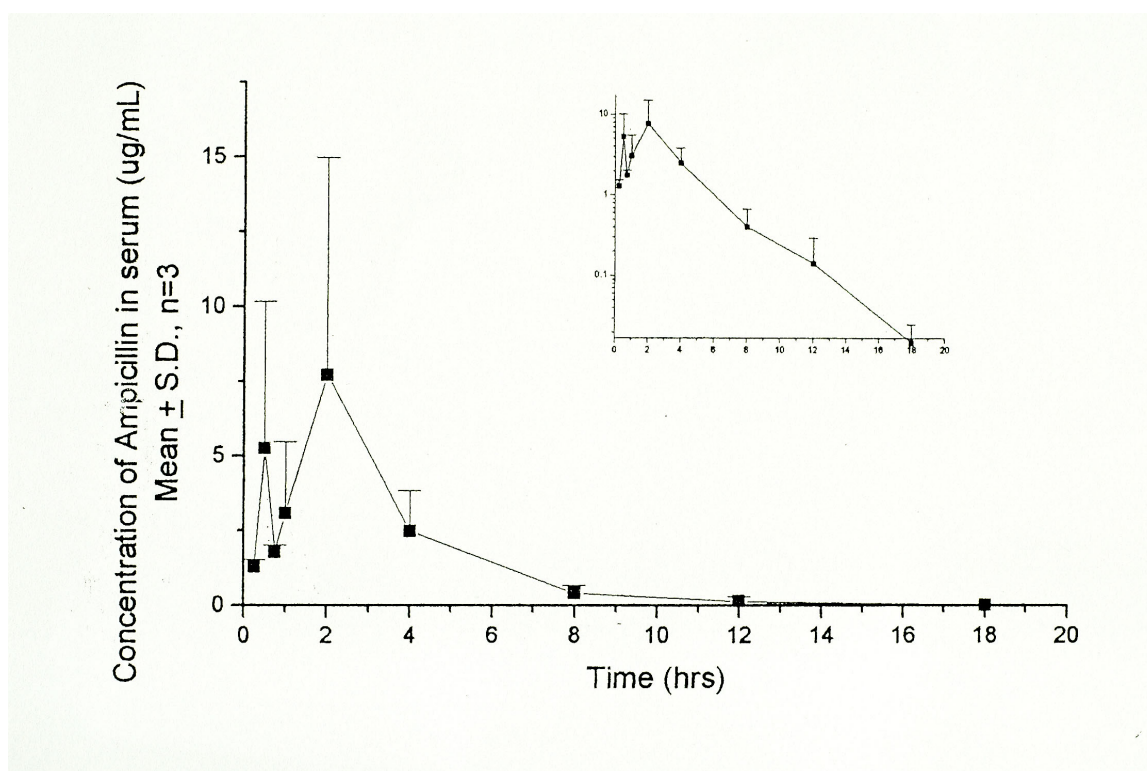


圖 2、時間對安比西林平均濃度(血清)。右上角為時間對藥物濃度半對數圖

Oral concentraton profile of fish; dosing:20 ug/kg

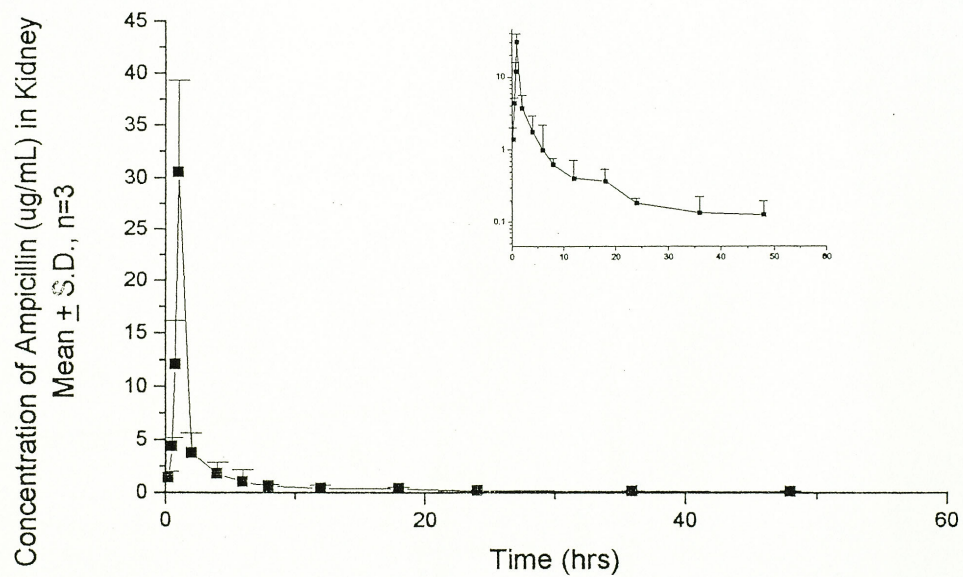


圖 3、時間對安比西林平均濃度(腎臟)。右上角為時間對藥物濃度半對數圖

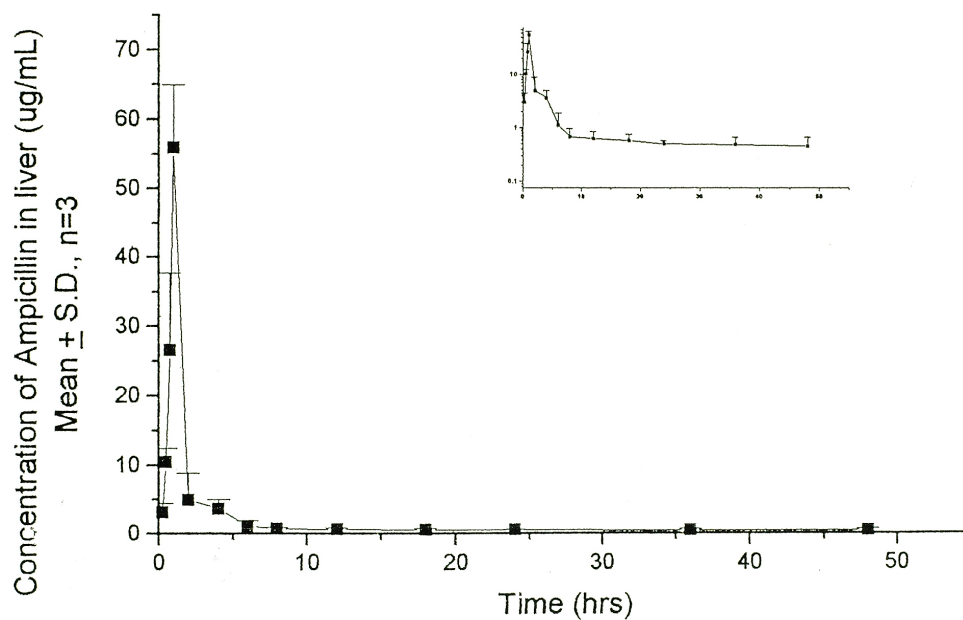


圖 4、時間對安比西林平均濃度(肝臟)。右上角為時間對藥物濃度半對數圖

Oral concentraton profile of fish; dosing: 40 ug/kg for Amoxcillin

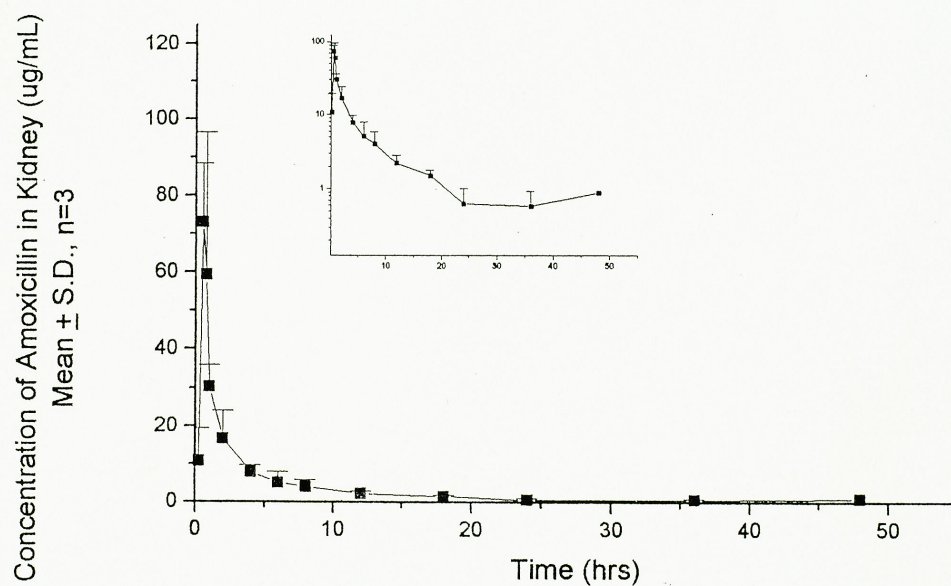


圖 5、時間對安默西林平均濃度(腎臟)。右上角為時間對藥物濃度半對數圖

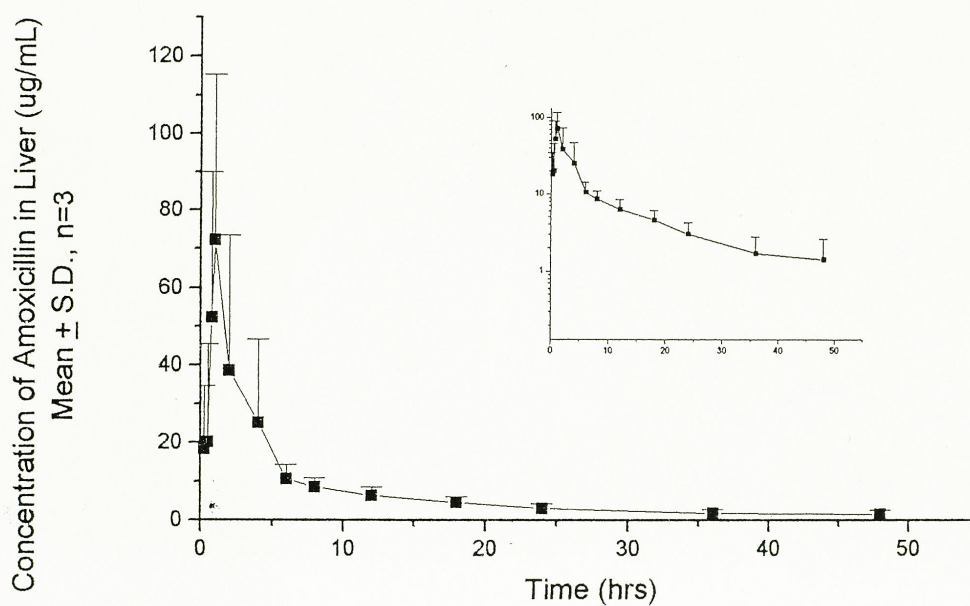


圖 6、時間對安默西林平均濃度(肝臟)。右上角為時間對藥物濃度半對數圖

參考文獻

- Alexopoulos E. Drug-induced acute interstitial nephritis. *Ren Fail* 20: 809-819, 1998.
- Ang CYW, Luo W, Hansen EB, Freeman JP, Thompson HC. Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissue by liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization. *J AOAC Int* 79: 389-395, 1996.
- Arancibia A, Guttmann J, Gonzalez G, Gonzalez C. Absorption and disposition kinetics of amoxicillin in normal human subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 17: 199-202, 1980.
- Baggot JD. Bioavailability and disposition kinetics of amoxicillin in neonatal foals. *Equine Vet J* 20: 125-127, 1988.
- Batchelor FR, Doyle FP, Nayler JH, Rolinson GN. Synthesis of penicillin: 6-aminopenicillanic acid in penicillin fermentations. *Nature* 183: 257-258, 1959.
- Bruno F, Curini R, Corcia A, Nazzari M, Samperi R. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of beta-lactam antibiotics in bovine milk. *J Agric Food Chem* 49: 3463-70, 2001.
- Bundgaard H, Larsen C. Poperazinedione formation from reaction of ampicillin with carbohydrates and alcohols in aqueous solution. *Int J Pharm* 3: 1-11, 1979.
- Chen XY, Zhong D, Huang B, Cui J. Determination of cefaclor in human plasma by a sensitive and specific liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method. *J Chromatogr B* 784: 17-24, 2003.
- Craigmill AL, Pass MA, Wetzlich S. Comparative pharmacokinetics of amoxicillin administered intravenously to sheep and goats. *J Vet Pharmacol Therap* 15: 72-77, 1992.
- Dalhoff A, Keppe P, von Kobyletzki D. Studies on the pharmacokinetics of amoxicillin after intravenous, intramuscular and oral administration. (Abstract) *Arzneimittel forschung* 31: 1148-1157, 1981.
- Elsheikh HA, Taha AA, Khalafalla AE, Osman IA, Wasfi IA. Pharmacokinetics of amoxicillin trihydrate in desert sheep and Nubian goats. *Vet Res Commun* 23: 507-514, 1999.
- Escudero E, Vicente MS, Carceles CM. Pharmacokinetics of amoxicillin/clavulanic acid combination after intravenous and intramuscular administration to pigeons. *Res Vet Sci* 65: 77-81, 1998.
- Fagerquist CK, Lightfield AR, Lehotay SJ. Confirmatory and quantitative analysis of β -lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 77: 1473-1482, 2005.
- Fagerquist CK, Lightfield AR. Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 660-671, 2003.
- Furusawa N. Rapid liquid chromatographic determination of residual penicillin G in milk. *Fresenius J Anal Chem* 368: 624-626, 2000.
- Gamba V, Dusi G. Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feed using precolumn derivatization. *Analytica Chimica Acta* 483: 69-72, 2003.
- Kazuo I, Norio O, Mitsuru Y. Precolumn derivatization technique for high performance

- liquid chromatographic determination of penicillins with fluorescence detection. *J Chromatogr* 504: 359-367, 1990.
18. Soback S, Kurtz B, Ziv G. Pharmacokinetics of phenoxymethyl penicillin (penicillin V) in calves. *J Vet Pharmacol Ther* 10: 17-22, 1987.
 19. Spyker DA, Rugloski RJ, Vann RL, Brien WM. Pharmacokinetics of amoxicillin: dose dependence after intravenous, oral, and intramuscular administration. *Antimicrob Agents Chemother* 11: 132-141, 1977.
 20. Verdon E, Couëdor P. Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion pair reversed phase HPLC after precolumn derivatization. *J AOAC Int* 82: 1083-1095, 1999.
 21. Wilson WD, SPENSLEY ms, Baggot JD, Hietala SK. Pharmacokinetics and estimated bioavailability of amoxicillin in mares after intravenous, intramuscular, and oral administration. *Am J Vet Res* 49:1688-1694, 1988.

The pharmacokinetics of aquatic antimicrobials in cobia (1)

Tu C^{*1}, Chang SK², Chang CF³, Huang SM¹, Song MJ¹

Kuo HJ², Yang GH³, Cherng JC¹, Chang WM¹

¹Animal Health Research Institute, Council of agriculture, Executive Yuan

²National Taiwan University, Department of Veterinary Medicine

³Fishery Research Institute, Biotechnology Division

Abstract The purpose of this study was to evaluate the possible residue time of amoxicillin and ampicillin in tissues of cobia *Rachycentron canadum* after a single oral dose and to help confirm withdrawal period of those drugs. The author used hard stomach tube for drug administration at each study. This method significantly increases the accuracy of drug administration and decreases the stress of experimental fish. The authors also modified other researches' analytic methods, such as decrease of extraction time, decrease of amount of waste organic solvent, and changes of pH in mobile phase. All mentioned improvements made the analysis more easily to operate than before. There is no maximum residue levels can be compared directly at present time. Our HPLC results indicated that the muscle and blood concentration for ampicillin and amoxicillin were lower than or close to 0.01µg/ml (maximal residue allowed for animal drugs by Department of Health) 48 hours after a single oral administration.

Key words: Cobia Rachycentron canadum, amoxicillin, ampicillin, withdrawal period