

doi:

五氯柳胺的残留与临床应用研究进展

白玉彬,邵莉萍,董 朕,张继瑜*

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,农业部兽药创制重点实验室,兰州 730050)

[收稿日期] 2017-08-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S

[摘 要] 综述了五氯柳胺的应用现状、临床药效学和在动物源性食品中的最高残留限量、休药期和残留检测方法,以期为我国开展五氯柳胺的开发应用和残留检测的研究与控制提供指导。

[关键词] 五氯柳胺;临床药效;残留检测

Research Progress on Residues and Application of Oxyclozanide

BAI Yu-bin, SHAO Li-ping, DONG Zhen, ZHANG Ji-yu

(Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Oxyclozanide is a chemical anti-parasite drug of salicylanilide, it can treat the disease of sheep infected with fasciola, and has a good treatment to against tapeworms and nematodes. This paper reviews the current application, clinical pharmacodynamics, and the maximum residue limit, withdrawal period and residue analysis method of oxyclozanide in animal-derived food to provide guidance for development and application, resistance detection of oxyclozanide.

Key words: oxyclozanide; clinical application; residue detection

五氯柳胺(Oxyclozanide)属于水杨苯酰胺类药物,别名氯羟柳胺、羟氯柳苯胺、羟氯扎胺等,是一种氧化磷酸化解偶联剂,可降低寄生虫体内三磷酸腺甙(ATP)的合成量,从而导致虫体因能量代谢紊乱而最终死亡。五氯柳胺不仅对牛、羊肝片吸虫有较好的驱虫效果,而且对绦虫、线虫也有活性,是一种广谱、低毒、低残留的化学合成药物。作为治疗肝片吸虫病的主要药物之一,五氯柳胺在国外得到了广泛的应用,但在我国还没有相关产品上市。开展五氯柳胺的残留检测研究,对于五氯柳胺的新药

研发、应用以及食品安全控制具有重要的意义。

1 五氯柳胺的应用现状

肝片吸虫病是一种世界性的疾病,在尼日利亚、巴基斯坦、中国、美国、伊朗等国家均有报道^[1]。在澳大利亚每年有大约四千万的羊和六百万的牛感染肝片吸虫^[2],仅仅养牛产业每年肝片吸虫病的防治费用就高达 2500 万美元^[3]。在孟加拉国,肝片吸虫病作为最主要的寄生虫病,黄牛的发病率为 60%,水牛的发病率为 99.99%,山羊为 12.29%,绵羊为 8.34%,每年给孟加拉国造成约 5411 万孟加

基金项目:国家科技支撑计划项目(2015BAD11B01-01)

作者简介:白玉彬,硕士,从事兽医药理学与毒理学研究。

通讯作者:张继瑜。E-mail: infzjy@sina.com

拉塔卡的损失。在埃及,粪便检查估计肝片吸虫病流行率为 12.70%^[4]。El-Shazly 等报道肝片吸虫对于牛、水牛、羊、山羊的感染率分别为 12.31%、9.73%、17.84%、5.40%^[5]。全世界每年因肝片吸虫所导致的损失超过 32 亿美元。除此之外,肝片吸虫还被认为是新兴的人类疾病。在 2006 年,世界卫生组织评估 240 万人感染肝片吸虫,1.8 亿人处于被感染的风险中^[6]。肝片吸虫病给畜牧业的发展以及人类健康带来了严重的影响,五氯柳胺作为治疗肝片吸虫病的主要药物之一,具有良好的效果。Rofe 和 Boray 报道,以 18.7 mg/kg.bw 剂量给药,在治疗牛成熟和未成熟吸虫方面,有效率可达到 99%~100%^[7]。Walley 报道,以 10 mg/kg.bw 剂量给药,在治疗羊成年吸虫方面,有效率为 71~85%,以 15 mg/kg.bw 剂量给药,有效率为 91%~97%,以 20 mg/kg.bw 剂量给药,有效率可达到 95%;以 10 mg/kg.bw 剂量给药,在治疗牛成年吸虫方面,有效率为 80%,以 15 mg/kg.bw 剂量给药,有效率可达到 92%^[8]。至今为止,国外已上市的产品有五氯柳胺片剂 OKZAN-F,口服混悬剂 ZANIL Fluke Drench (34 mg/mL Oral Suspension),以及复方制剂左旋咪唑和五氯柳胺复方片剂、五氯柳胺(3% W/V)和左旋咪唑(1.5% W/V)复方混悬剂等^[9]。五氯柳胺毒性低、残留少且未见产生耐药性的报道,作为治疗肝片吸虫病的主要药物之一,具有良好的市场应用前景。

2 五氯柳胺的临床药效学

国内外对五氯柳胺防治牛、羊等动物寄生虫病的研究试验有广泛的报道,研究证明五氯柳胺不仅对治疗肝片吸虫具有良好的疗效,而且还可以用于治疗蛔虫和绦虫感染。

蔡登棣报道,用五氯柳胺治疗黄牛肝片吸虫感染,以 30 mg/kg.bw 剂量给药,一周后剖检,胆管中发现虫体崩解物,无成活虫体。分别以 12 mg/kg.bw 和 20 mg/kg.bw 剂量治疗绵羊肝片吸虫感染,12 mg/kg.bw 组胆管中发现死虫体 20 条,活虫 6 条,而 20 mg/kg.bw 组胆管中无成活成虫,且发现有死亡的童虫^[10]。可见,五氯柳胺不仅对成虫具有杀灭

效果,同时对于童虫也同样有效。

Paraud 等用五氯柳胺治疗山羊杯殖多布尼吸虫(*Calicophoron daubneyi*)感染,在感染后第 10 天,用 22.5 mg/kg.bw 剂量的五氯柳胺治疗,虫体减少率 82%。在蠕虫感染 131 天之后,分别以 15 mg/kg.bw 和 22.5 mg/kg.bw 剂量的五氯柳胺进行治疗,蠕虫减少率分别达到 95.6%和 95.9%^[11]。由此可见五氯柳胺对于治疗山羊杯殖多布尼吸虫感染是非常有效的。

Mooney 等采用多种抗寄生虫药在治疗肝片吸虫感染羊的对比试验中,在第 0 天,分别给以三氯苯达唑、氯氰碘柳胺、五氯柳胺和硝碘酚腈,在感染后 7、14、21、56 天分别收集粪便样品。在治疗后第 56 天,由于耐药性的产生,三氯苯达唑组粪便中虫卵减少量明显低于 90%,而在治疗后第 14 天,氯氰碘柳胺组、五氯柳胺组和硝碘酚腈组粪便中虫卵数减少 100%^[12]。说明五氯柳胺对于治疗肝片吸虫具有良好的疗效。

Athar 等报道,使用五氯柳胺治疗肝片吸虫、大片吸虫等寄生虫感染,给药 14 天后,粪便中的寄生虫数量明显减少,水牛的治愈率达到 96.66%,肉牛的治愈率达到 95.64%,日产奶量分别增加 0.89、0.71 L,脂肪率分别增加 0.42%和 0.37%^[13]。从而可以推断出单一剂量的五氯柳胺对治疗牛肝片吸虫病有效。

Arias 等在治疗牛自然感染杯殖达布尼吸虫(*Calicophoron daubneyi*)中,分别采用阿苯达唑、奈托比胺、氯氰碘柳胺、五氯柳胺四种药物进行对比治疗。用 10 mg/kg.bw 剂量的阿苯达唑或用 20 mg/kg.bw 剂量的奈托比胺治疗之后,粪便中虫卵数减少 0~26%,且经过治疗之后有 11%~39%的牛精神表现沉郁。而以 15 mg/kg.bw 剂量五氯柳胺或者 10 mg/kg.bw 剂量的氯氰碘柳胺治疗后,粪便中虫卵数减少 97%~99%^[14]。

Rodrigo Sanabria 等用五氯柳胺治疗前后盘吸虫自然感染绵羊,实验组在第 0 天口服 20 mg/kg.bw 剂量的五氯柳胺,72 h 时第二次给药,对照组不给药,在第 0 天、3 天、5 天采集粪便样品。第 5 天

时粪便中虫卵减少率 99.5%, 同时用高效液相色谱法对血清及胃肠道中五氯柳胺浓度进行检测, 测得血清中五氯柳胺浓度最高为 $20.7 \pm 11.5 \mu\text{g/mL}$, 小肠液中浓度为 $6.00 \pm 4.50 \mu\text{g/mL}$ 。在瘤胃和腹腔液中测得的五氯柳胺浓度非常低为 0.05 和 $0.02 \mu\text{g/mL}$ ^[15]。研究表明口服五氯柳胺对成熟的前后盘吸虫有很好的治疗效果。

EMA 等报道, 以 15 mg/kg.bw 剂量的五氯柳胺单次给药时, 对牛的中枢神经系统以及肠道结构有不良的影响, 表现为精神沉郁、腹泻和厌食, 当剂量大于 50 mg/kg 时, 出现动物死亡。而以 20 mg/kg.bw 剂量的五氯柳胺给药时时, 绵羊未表现出明显的不良反应^[16]。在动物吸虫病的药物防治中, 由于三氯苯达唑、阿苯达唑、氯氰碘柳胺和硝碘酚脒等化学治疗药长期使用, 寄生虫均产生了抗药性^[17-19], 而至今为止, 对于五氯柳胺的耐药性国内外还未见报道。

3 五氯柳胺的残留检测研究进展

3.1 最高残留限量 (MRL) 欧洲药品管理局、澳大利亚以及食品法典委员会均制订了牛羊组织中五氯柳胺的最大残留限量, 限量值分别为肌肉 $20 \mu\text{g/kg}$ 、脂肪 $20 \mu\text{g/kg}$ 、肝 $500 \mu\text{g/kg}$ 、肾 $100 \mu\text{g/kg}$ 。欧盟规定五氯柳胺在牛奶中的最高残留限量为 $10 \mu\text{g/kg}$ 。我国目前还未有相关的药物上市, 所以我国农业部未对五氯柳胺的最高残留限量未作出明确规定。

3.2 休药期 关于五氯柳胺休药期的相关报道相对较少, Ali and Bogan 等研究表明, 将五氯柳胺以 15 mg/kg.bw 剂量口服给药, 测得其在羊血浆中半衰期为 6.4 d ^[20]。Fujinuma 等报道了将五氯柳胺以 10 mg/kg.bw 剂量给奶牛口服给药, 测得其在血浆中的半衰期为 7.4 d , 检测限为 $2 \mu\text{g/kg}$; 在奶中的半衰期为 $30 \sim 47 \text{ h}$, 检测限为 $1 \mu\text{g/kg}$ ^[21]。欧盟规定, 五氯柳胺在牛、羊肉和内脏中的休药期均为 28 d。

3.3 五氯柳胺的残留检测方法

3.3.1 高效液相色谱法 Kyul Jo 和 Hee-Jung Cho 等建立了牛肉及牛奶中五氯柳胺的残留检测的高

效液相色谱法, 以乙腈和 0.1% 磷酸 (4 : 6) 为流动相, 出峰时间为 8.3 min , 定量限 $9.7 \sim 9.8 \mu\text{g/kg}$, 回收率为 $(70.70 \pm 7.90) \% \sim (110.79 \pm 14.95) \%$ ^[22]。

王伟、黄显会等采用高效液相测定牛羊奶中五氯柳胺、硝碘酚脒、氯氰碘柳胺、碘醚柳胺的残留量, 建立的标准曲线在 $5 \sim 500 \mu\text{g/kg}$ 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数 > 0.99 , 检测限为 $3 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$, 五氯柳胺在 1/2 最高残留限量 (MRL)、1 倍 MRL、2 倍 MRL 添加水平下的平均回收率和相对标准偏差分别是 $87.40\% \sim 94.74\%$ 和 $5.40\% \sim 12.21\%$ ^[23]。

Rodrigo Sanabria 等使用高效液相色谱法对血浆及胃肠组织中五氯柳胺的残留量进行了检测, 以 100% 乙腈 (40%, A 液) 和 0.025 mol/L 乙酸胺 ($\text{pH} = 8.5$, 60%, B 液) 作为流动相, 使用紫外检测器在 254 nm 下进行检测, 测得保留时间为 4.7 min , 定量限为 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 在 $0.1 \sim 40 \mu\text{g/mL}$ 范围内, 平均绝对回收率为 $75\% \sim 86\%$ ^[15]。

3.3.2 液相色谱-串联质谱法 Whelan 等采用超高效液相色谱法-串联质谱法测定牛奶及奶酪中五氯柳胺的残留量, 以 0.01% 的乙酸水: 乙腈 (9 : 1) (A 液) 和 5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液: 乙腈 (75 : 25) (B 液) 作为流动相进行梯度洗脱, 测得五氯柳胺的保留时间为 6.83 min , 在给药后第三次 (即第 2 天) 采样时测得五氯柳胺最高残留浓度范围为 $8 \sim 24 \mu\text{g/kg}$, 在给药后第 13 次 (即第七天) 采样后, 测得残留量小于 $1 \mu\text{g/kg}$, 低于最高残留限量^[24]。

李帅鹏、黄显会等采用高效液相色谱-串联质谱法研究牛、羊组织中硝碘酚脒、五氯柳胺、氯氰碘柳胺、碘醚柳胺 4 种苯酚类和水杨酸苯胺类抗蠕虫药的多残留检测方法, 在 $1 \sim 100 \mu\text{g/kg}$ 范围内呈现良好的线性关系, 相关系数大于 0.99。在牛、羊组织中的检测限为 $1 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $2.5 \mu\text{g/kg}$ 。在 LOQ、0.5 倍最高残留限量 (MRL)、1 倍 MRL、2 倍 MRL 添加水平下, 平均回收率为 $71\% \sim 112\%$, 日内相对标准偏差 (RSD) 为 $1.1\% \sim 14.0\%$, 日间 RSD 为 $6.4\% \sim 14.7\%$ ^[25]。

已报道的五氯柳胺的残留检测研究表明, 各种

检测方法均具有良好的线性关系,且回收率范围均符合相关规定,可以满足临床对五氯柳胺残留检测的需要。王伟等^[23]所采用的测定牛羊奶中五氯柳胺残留的液相方法,其平均回收率为 87.40%~94.74%,与 Kyul Jo 和 Hee-Jung Cho 等建立的牛肉及牛奶中五氯柳胺的残留检测的高效液相色谱法的回收率 $(70.70\pm 7.90)\%$ ~ $(110.79\pm 14.95)\%$ ^[22]、Rodrigo Sanabria 等所采用的测定组织样品中五氯柳胺的残留的液相方法的回收率 75%~86%^[15]、李帅鹏、黄显会等采用高效液相色谱-串联质谱法研究牛、羊组织中硝碘酚腈、五氯柳胺、氯氰碘柳胺、碘醚柳胺 4 种苯酚类和水杨酸苯胺类抗蠕虫药的多残留检测方法的回收率 71%~112%^[25]相比,其回收率更高,且方法稳定性更好;其检测限为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,相比于其他方法较低。而 Rodrigo Sanabria 等所采用的测定组织样品中五氯柳胺的残留的液相方法,其定量限仅为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[15],相比于其他方法更低。

4 展 望

五氯柳胺作为一种化学合成类抗寄生虫药物,具有高效、安全的特点,五氯柳胺不仅对于治疗肝片吸虫病具有良好的效果,而且对线虫和绦虫效果显著。对于牛来说,以 10 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 剂量给药,对于治疗牛的大部分肝片吸虫以及绦虫的有效率可达到 90%以上,同时可以促进产奶率以及脂肪率的增加,因此建议以 10 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 剂量给药较宜;对于羊来说,以 20 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 剂量给药,羊胆管中无成活肝片吸虫成虫,在治疗五天之后其粪便中虫卵减少率可达到 99.5%,因此建议以 20 $\text{mg}/\text{kg}\cdot\text{bw}$ 剂量给药较宜。随着一些抗寄生虫药物的长期大量使用,使寄生虫病得到了有效的控制,与此同时,耐药性的产生,也成为临床用药的重要障碍,上世纪 90 年代便有关于三氯苯达唑、氯氰碘柳胺耐药性的相关报道,而五氯柳胺至今未出现耐药性的相关报道,并且凭借其显著的疗效在国外得以广泛应用。五氯柳胺作为治疗动物肝片吸虫病的主要药物,其在国外得到了广泛的使用,已有片剂、口服混悬剂、复方片剂、复方混悬剂等多种产品上市,而在国内

还没有相关的产品上市。目前所报道的多种五氯柳胺残留的检测研究表明,各种检测方法均具有良好的线性关系,回收率范围均符合相关规定,其样品处理方法完全可行,可以满足五氯柳胺残留检测的需要。

随着我国草食畜牧业的发展,牛羊饲养量的正在迅速增长,兽药的使用给养殖业带来高效益的同时,由于兽药使用量的大幅度增加,导致动物性食品兽药残留超标,直接危害人体健康。目前,我国有 50%以上的牛患有肝片吸虫病,随着三氯苯达唑、氯氰碘柳胺等药物耐药性的产生,临床药效不断下降,五氯柳胺作为治疗肝片吸虫病最好的药物之一,开发和研制一种或几种五氯柳胺的制剂不仅可以有效防治肝片吸虫病,给人们带来巨大的经济利益,而且可以促进我国畜牧业的良性发展。但药物的使用必定会带来药物残留问题,本文对五氯柳胺的临床药效学和残留检测方法进行了综述,以期在五氯柳胺的临床应用以及残留检测研究和监测提供指导。

参考文献:

- [1] Mari, Mercedessantana, Mariamorales, *et al.* Risk of Gallstone Disease in Advanced Chronic Phase of Fascioliasis: An Experimental Study in a Rat Model[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2003, 188(5): 787-793.
- [2] Joseph CB, Love S. Liver fluke disease in sheep and cattle, NSW Department of Primary Industries[R/OL], 2017.
- [3] Lane J, Jubbs T, Shepherd R, *et al.* Priority list of endemic diseases for the red meat industries. Final Report[R]. Meat & Livestock Australia L, 2015.
- [4] Mazyad S A, Elnemr H I. The endoparasites of sheep and goats, and shepherd in North Sinai Governorate, Egypt.[J]. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2002, 32(1): 119-126.
- [5] Elshazly AM, Elwafa SA, Haridy FM, *et al.* Fascioliasis among live and slaughtered animals in nine centers of Dakahlia Governorate[J]. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 2002, 32(1): 47.
- [6] World Health organization(2006). Animal Production and health paper No.78.USA
- [7] Rolfe PF, Boray JC. Chemotherapy of paramphistomosis in sheep

- [J]. Aust Vet J, 1988, 65(5): 148-150.
- [8] Walley J K. Oxcyclozanide (3,3',5,5',6-pentachloro-2,2'-dihydroxybenzanilide--6Zanil") in the treatment of the liver fluke *Fasciola hepatica* in sheep and cattle[J]. Veterinary Record, 1966, 78(8): 267.
- [9] 张吉丽, 司鸿飞, 李 冰, 等. 五氯柳胺的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(11): 65-69.
Zhang JL, Si HF, Li B, *et al.* Research Progress of Oxcyclozanide [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(11): 65-69.
- [10] 蔡登棣. 五氯柳胺对家畜蠕虫的活性[J]. 中国兽医科学, 1990, (11): 58-61.
Cai DD. The activity of pentachloramide on livestock worms[J]. Veterinary Science in China. 1990, (11): 58-61.
- [11] Paraud C, Gaudin C, Pors I, *et al.* Efficacy of oxcyclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats[J]. The Veterinary Journal, 2009, 180(2): 2665.
- [12] Moonney L, Good B, Hanrahan JP, *et al.* The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland[J]. Vet Parasitol, 2009, 164(2/4): 201-205.
- [13] Athar LA, Khan MN, Sajid MS, *et al.* Cost Benefits Analysis of Anthelmintic Treatment of Cattle and Buffaloes[J]. Pakistan Veterinary Journal, 2011, 31(2): 149-152.
- [14] Arias MS, Sanchís J, Francisco I, *et al.* The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle[J]. Vet Parasitol, 2013, 197(1/2): 126-129.
- [15] Sanabria R, Moreno L, Alvarez L, *et al.* Efficacy of oxcyclozanide against adult *Paramphistomum leydeni* in naturally infected sheep [J]. Vet Parasitol, 2014, 206(3/4): 277.
- [16] EMEA, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections. EMEA/MRL/889/03-FINAL [R]. 2004, Committee for Veterinary Medical Products. Oxcyclozanide. Summary report (3).
- [17] Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides efficacy, actions resistance and its management[J]. The Veterinary Journal, 1999, 158(2): 81-112.
- [18] Overend DJ, Bowen FL. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole[J]. Aust Vet J, 1995, 727(2): 75.
- [19] Alvarez-sánchez MA, Mainar-jaime RC, Pérez-garcía J, *et al.* Resistance of *fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain[J]. Veterinary Record, 2006, 159(13): 424-425.
- [20] Mohammed-ali N, Bogan JA. The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxcyclozanide [J]. Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics, 1987, 10(2): 127-133.
- [21] Kenji F, Takeba K, Kamata K. Concentration in plasma and excretion in milk of lactating cows after oral administration of tribromsalan, oxcyclozanide and bromofenofos[J]. Shokuhinseigaku Zasshi, 2006, 47(6): 249-253.
- [22] Jo K, Hee-jung C, Yi HE, *et al.* Determination of Oxcyclozanide in Beef and Milk using High-Performance Liquid Chromatography System with UV Detector[J]. Laboratory Animal Research, 2011, 27(1): 37-40.
- [23] 王伟, 黄显会, 王 辉, 等. 高效液相色谱法检测液态奶中的苯酚类和水杨酸苯胺类抗蠕虫药[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(10): 1028-1032.
Wang W, Huang XH, Wang H, *et al.* Determination of Phenols and Salicylic Acid Aniline Anthelmintics in Liquid Milk using High-Performance Liquid Chromatography. Chinese Journal of Chromatography, 2013, 31(10): 1028-1032.
- [24] Whelan M, Chirillo C, Furey A, *et al.* Investigation of the persistence of levamisole and oxcyclozanide in milk and fate in cheese [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2010, 58(23): 11220-11224.
- [25] 李帅鹏, 王伟, 严常燕, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛羊组织中苯酚类和水杨酸苯胺类抗蠕虫药多残留[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(3): 423-428.
Li S P, Wang W, Yan C Y, *et al.* Determination of Phenols and Salicylic Acid Aniline Anthelmintics in Cattle and Sheep by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(3): 423-428.

(编辑: 侯向辉)