

丁香酚和三卡因甲磺酸盐 在大口黑鲈中代谢残留的比较

李宁^{1,2}, 白婵¹, 熊光权¹, 李瑞¹, 王彩霞¹, 张金木¹, 任红佳³, 王炬光¹, 廖涛¹

(1. 湖北省农业科学院农产品加工与核农技术研究所, 湖北武汉 430064) (2. 华中农业大学水产学院, 湖北武汉 430070) (3. 武汉工程大学化学与环境工程学院, 湖北武汉 430205)

摘要: 为了确定大口黑鲈成鱼适合的麻醉方式和麻醉剂量, 研究了不同浓度的丁香酚和 MS-222 对大口黑鲈的静水麻醉效果。在最适麻醉质量浓度下模拟运输 24 h, 记录 24 h 存活率并测定麻醉 0.5、4、8、16 和 24 h 后的血清生化指标、水质 pH、氨氮以及麻醉剂的残留量。结果表明: 随着丁香酚和 MS-222 浓度增加, 入麻时间缩短, 复苏时间延长; 丁香酚和 MS-222 的最适质量浓度分别为 18~20 mg/L、50~60 mg/L 时, 两麻醉组模拟运输和复苏 24 h 后的成活率为 100%, 显著高于无麻醉运输组的 80% 和 90% ($p<0.05$); 随着麻醉时间延长, 丁香酚和 MS-222 组血清中的皮质醇(COR)分别从 336.83 pg/mL 下降到 291.41 pg/mL, 从 286.11 上升到 367.05 pg/mL ($p<0.05$), 丁香酚组血清中的 COR 显著低于对照组; 葡萄糖分别从 14.36、7.48 mg/dL 下降到 7.36、3.11 mg/dL ($p<0.05$), 而丁香酚组中乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(AKP)、谷草转氨酶(GOT)、尿素氮(BUN)的浓度显著低于 MS-222 组 ($p<0.05$); 残留检测结果表明在麻醉 0.5 h 时, 鱼肉中丁香酚含量达到最大值 5.14 mg/kg, 在清水中复苏 1 d 时丁香酚残留量为 0.45 mg/kg; 而 MS-222 组在 8 h 残留量达到最大值为 36.24 mg/kg, 复苏 4 d 时基本消除完全。结果显示, 丁香酚剂量小, 代谢快, 在诱发氧化应激和组织损伤时有较少的副作用。

关键词: 大口黑鲈; 丁香酚; 三卡因甲磺酸盐; 生理生化指标; 代谢残留

文章编号: 1673-9078(2020)03-56-64

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.3.008

Comparison of Metabolic Residues of Eugenol and Tricaine Methanesulfonate (MS-222) in Large Mouth Bass

LI Ning^{1,2}, BAI Chan¹, XIONG Guang-quan¹, LI Rui¹, WANG Cai-xia¹, ZHANG Jin-mu¹, REN Hong-jia³,
WANG Ju-guang¹, LIAO Tao¹

(1. Institute of Agricultural Product Processing and Nuclear Agriculture Technology, Wuhan 430064, China)

(2. College of Fisheries Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

(3. School of Chemical and Environmental Engineering, Wuhan Engineering University, Wuhan 430205, China)

Abstract: To determine the appropriate anesthetic method and dose for perch, hydrostatic anesthesia effects of two common fish anesthetics (MS-222 and eugenol) on perch under different concentrations was compared. An experiment of 24-hour anesthesia transport was carry out under the optimal anesthetic concentrations of MS-222 and eugenol. The changes of serum biochemical indexes, water quality pH, ammonia nitrogen and residual concentration of anesthetics were measured after 0.5, 4, 8, 16 and 24 h of anesthesia. The results showed that the anesthetic time was shortened and the recovery time was prolonged with the increase of anesthetics concentration. The concentrations of eugenol and MS-222 are suitable for long-distance transportation of perch at 18-20 mg/L and 50-60 mg/L respectively. The survival rate during the

引文格式:

李宁,白婵,熊光权,等.丁香酚和三卡因甲磺酸盐在大口黑鲈中代谢残留的比较[J].现代食品科技,2020,36(3):56-64

LI Ning, BAI Chan, XIONG Guang-quan, et al. Comparison of metabolic residues of eugenol and tricaine methanesulfonate (MS-222) in large mouth bass [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(3): 56-64

收稿日期: 2019-09-21

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助 (CARS-46); 湖北省科技特派员项目; 湖北省农业科技创新中心项目 (2019-620-000-001-25)

作者简介: 李宁 (1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 水产品保活运输

通讯作者: 廖涛 (1979-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 水产品加工与安全

transportation and after 24 h of recovery for the anesthesia group were both 100%, there were significantly higher than those for the non-anesthetic transportation group ($p<0.05$). The serum cortisol (COR) in eugenol group and MS-222 group decreased from 336.83 pg/mL to 291.41 pg/mL and increased from 286.11 to 367.05 pg/mL ($p<0.05$) with the prolongation of anesthesia time, and the serum COR in eugenol group was significantly lower than that in control group. The glucose decreased from 14.36, 7.48 mg/dL to 7.36, 3.11 mg/dL ($p<0.05$), respectively. The concentrations of lactate dehydrogenase (LDH), alkaline phosphatase (AKP), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), urea nitrogen (BUN) in eugenol group were significantly lower than those in MS-222 group ($p<0.05$). Residual test results showed that the maximum eugenol content was 5.14 mg/kg at 0.5 h of anesthesia and the residual amount of eugenol was 0.45 mg/kg at 1 day of resuscitation in clear water. In MS-222 group, the maximum content was 36.24 mg/kg after 8 h of anesthesia, and it was almost eliminated after 4 days of resuscitation. The results showed that eugenol had low dosage, fast metabolism and fewer side effects in inducing oxidative stress and tissue damage.

Key words: large mouth bass; eugenol; tricaine mesylate; physiological and biochemical indicators; residual metabolism

大口黑鲈(Large mouth bass)属鲈形目, 又称加州鲈, 是中国高档淡水经济鱼类品种之一^[1]。在大口黑鲈养殖与流通过程中, 活鱼运输是水产养殖中重要的一项常见活动, 造成机械压力和水质恶化^[2]。运输导致氨氮含量上升, 水的 pH 值和溶解氧水平下降, 产生不同程度的应激和损伤, 进而影响后续成活率^[3]。如果用药物将鱼麻醉, 使鱼进入休眠状态, 从而降低代谢强度, 减少溶解氧的消耗和二氧化碳以及氨的排放, 减缓水质污染同时还可以控制鱼的过度活动, 减少死亡, 能达到提高运输效率和降低成本的目的^[4]。李晓璐等^[5]将冰片和 MS-222 用于麻醉草鱼, 显著提高存活率。

在科学研究和鱼类水产养殖中最广泛使用的麻醉剂是三卡因甲磺酸盐 (MS-222) 和丁香酚。MS-222 是美国食品药品监督管理局 (FDA) 唯一批准的食用鱼类麻醉剂。其休药时间, 不同国家存在差异, 美国和挪威规定的休药期均为 21 d, 且目前仅美国规定其最高残留限量(maximum residue limit, MRL)不超过 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。朱敏等^[6]在 12 $^{\circ}\text{C}$, 通过将大菱鲂浸泡于浓度为 60 mg/L 的 MS-222 溶液 60 h 后, 存活率为 100%, 放入循环海水中进行消除试验, 发现 52 h 后基本消除完全, 建议大菱鲂的休药时间 3 d。丁香酚及代谢物能够快速地从血液和组织中排出, 不会与机体中的 DNA 结合, 导致人体组织畸变^[7], 对人体健康无影响, 联合国粮食与农业组织、世界卫生组织专家委员会规定, 丁香酚作为食品添加剂, 每日可接受的日摄入量 (acceptable daily intake, ADI)为 2.5 mg/kg^[8]。

一些血液特征是鱼类健康状况的指标, 然而麻醉可能导致血液生化改变, 皮质醇和葡萄糖是应激和代谢状态的可靠指标^[3]。鱼类血清溶菌酶是一种具有杀菌活性的重要酶, 是鱼类天然免疫系统的指标之一, 谷草转氨酶、谷丙转氨酶和尿素氮是与组织损伤有关的指标^[9]。Velíšek^[10]等和 Hoseini 等^[11]研究麻醉剂对水产品酶活性的影响, 发现麻醉会使谷草和谷丙转氨酶

升高, 然而复苏 24 h 后可恢复到初始水平。鲈鱼麻醉效应和残留代谢规律的相关研究国内外报道较少。因此, 本研究旨在通过测量这些参数来评估丁香酚和 MS-222 麻醉运输对黑鲈成鱼健康的影响。(1) 2 种麻醉剂在不同浓度下对大口黑鲈成鱼的麻醉效果, 以期获得较佳浓度; (2) 并比较两种麻醉剂对黑鲈不同麻醉时间下的血清生化指标的影响, 分析两者在同等麻醉强度下对鱼体健康的影响和残留代谢规律, 以明确在本实验条件下大口黑鲈成鱼适合的麻醉方式与麻醉剂量, 为大口黑鲈成鱼活体运输提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 材料与试剂

大口黑鲈全部购买于湖北省嘉鱼县三湖渔业有限责任公司, 体重约为 360.4 \pm 50 g, 体长约 30 cm-33 cm, 实验鱼暂养在 600 L 鱼缸中, 溶氧大约在 5.5~7.5 mg/L, pH: 7.3 \pm 0.1, 水温在 15 $^{\circ}\text{C}$ 间 8 $^{\circ}\text{C}$ 每天投喂一次, 实验前停食 48 h。

MS-222(为白色粉末, 易溶于水), 上海晶纯生化科技股份有限公司; 丁香酚 (为橘黄色的油状液体, 有浓重的香味, 难溶于水, 丁香酚使用前按 1:9 的比例用乙醇溶解, 使用时现用现配), 上海晶纯生化科技股份有限公司; 甲醇、乙腈 (色谱纯, 其他均为分析纯), SIGMA-ALORICH; 乳酸脱氢酶、葡萄糖、谷草转氨酶、尿素氮、皮质醇、碱性磷酸酶和过氧化氢酶试剂盒, 南京建成生物科技有限公司。

1.1.2 仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; 3K15 离心机, 美国 Sigma-Aldrich 公司; TA-XTplus 型质构仪、ISO 9001 电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; IKA[®] VORTEX 3 涡旋振荡器, 美国 Sigma-Aldrich 公司; BJ-1000A 粉碎机, 德清拜杰电器有限公司;

RE 52-99 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂; FD5-2.5 冷冻干燥机, 美国 GOLD-SIM 公司; KQ5200DE 数字超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; HSC-24A 氮吹仪, 天津市恒奥科技发展有限公司; Direct-Q@5UV 超纯水, Millipore 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 两种麻醉剂在不同浓度下对大口黑鲈成鱼的麻醉效果

实验在 40 L 水箱中进行, 鱼水比为 1:2, 实验前先将鲈鱼停食 48 h。MS-222 按终质量浓度为 40、50、55、60、65、70 mg/L 设置 6 个梯度组, 丁香酚按终

质量浓度为 10、15、18、20、25 和 30 mg/L 设置 5 个梯度组,

每一个浓度有两组实验鱼, 每组 10 尾鱼。第一组麻醉 30 min 内, 当鱼停止呼吸或不能进入更深的麻醉状态时将鱼放入清水中复苏, 记录鱼达到各麻醉阶段和恢复所需的时间。另一组用来记录麻醉 24 h 后鲈鱼存活率, 将鲈鱼转入相同水温的清水中复苏。麻醉和复苏时间均为所有鱼进入到相应状态的时间。参照 Holloway 等^[12]、及 Hikasa^[13]等的分类标准结合大口黑鲈的实际情况, 将麻醉诱导过程分为 6 个阶段, 复苏过程分为 4 个阶段(表 1、2)。

表 1 麻醉程度分期及鱼类行为特征

Table 1 Anesthesia degree staging and fish behavior characteristics

麻醉程度分期	行为特征	备注
0(正常期)	对外部刺激具有明显的反应, 并且鳃盖和肌肉收缩是正常的频率。	
A1(轻度镇静期)	能够对外部的刺激做出反映, 鳃盖的频率略有下降, 但平衡性良好。	
A2(深度镇静期)	除强刺激外反应能力完全丧失, 鳃盖张合频率略微减少, 身体平衡性较好。	
A3(平衡失调期)	部分地失去肌肉张力, 不规则游泳, 增加鳃盖的频率。	适用于运输
A4 麻醉期)	身体侧翻, 失去平衡, 呼吸频率减缓	最佳的操作时期
A5(深度麻醉期)	完全失去反应能力, 呼吸微弱	应立即进行复苏
A6(延髓麻醉)	鳃盖的张合停止。	无法复苏, 死亡

表 2 复苏程度分期及鱼类行为特征

Table 2 Stages of recovery and fish behavior characteristics

复苏分期	行为特征
复苏 I 期	在水底部侧卧静止, 鳃盖开始有轻微张合
复苏 II 期	尾柄轻微摆动, 呼吸加快, 开始有挣扎
复苏 III 期	可勉强保持身体平衡, 尾柄摆动加快呼吸接近正常
复苏 IV 期	身体平衡, 可以自如游动

1.2.2 麻醉模拟运输实验

根据麻醉实验得出的 2 种麻醉剂诱导鲈鱼成鱼深度镇静的浓度, 进行模拟麻醉运输实验。实验设置麻醉组 I (55 mg/L MS-222 麻醉)、麻醉组 II (10 mg/L 丁香酚)、对照组 (无麻醉), 水温维持在 18 ℃ 每组 10 尾鱼, 鱼水比 1:2, 每组 3 个重复, 静水模拟运输 24 h。实验共进行 2 次模拟运输, 第一次用于记录运输 24 h 成活率和运输后复苏 24 h 的成活率, 并在复苏 1、2、3、4、5、6 d 进行取样 (鱼肉), 于 -20 ℃ 冰箱保存, 检测鱼肉中麻醉剂的残留量。第二次分别在模拟运输 0.5、4、8、16、24 h 取血进行血清生化指标分析。

1.2.3 氨氮的测定

氨氮浓度测定: 参照 HJ 535-2009《水质氨氮的测定纳氏试剂分光光度法》^[14]。

1.2.4 血清生化指标分析

实验设计条件下, 在尾静脉取血, 不加抗凝剂。全血样品在 4 ℃ 下静置 4 h, 待血液分层后 4000 r/min 离心 10 min, 收集血清于 10 mL 离心管。血清中皮质醇、葡萄糖、乳酸脱氢酶、丙氨酸转氨酶、碱性磷酸酶、过氧化氢酶、尿素氮以及钠含量用南京建成生物试剂盒测定。

1.2.5 残留测定的样品前处理

鱼肉种丁香酚和 MS-222 的测定方法参考王彩霞等^[15]和朱敏等^[6]的高效液相色谱检测水产品中丁香酚和 MS-222 的残留。

1.3 数据分析

用 Microsoft Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件对试验结果进行统计分析, 每组 3 个重复。用 graphpad prism 5 作图, 在单因素方差分析的基础上采用 Duncan 氏多重比较法进行分析, 统计值为平均值(SEM)±标准差,

显著性水平为 $p < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的丁香酚和 MS-222 对大口黑鲈的麻醉效果

由表 3 可知, 随着 MS-222 和丁香酚浓度增加, 鲈鱼进入相同麻醉时期的时间缩短, 完全复苏时间延长。MS-222 在低浓度 40 mg/L 时, 不能诱导鲈鱼麻醉, 浓度增加, 鱼体的麻醉程度加深。用 50~60 mg/L 的 MS-222 麻醉 24 h 后鱼体依然存在呼吸, 在清水中复苏能恢复到正常状态。当浓度达到 65 mg/L, 鱼体进入深度麻醉状态, 麻醉 24 h 后 20% 的鲈鱼在清水中无法复苏, 当浓度达到 70 mg/L, 麻醉 24 h 后所有的鱼都不能在清水中复苏, 存活率为 0。丁香酚的浓度在 10、15 mg/L 时只能使鲈鱼进入深度镇静状态。当浓度达到 18、20 mg/L 会使鲈鱼进入到平衡失调期和麻醉期, 24 h 后存活率 100%, 在 25~30 mg/L 时会使鲈鱼进入到延髓麻醉期, 24 h 后在清水中不能全部复苏,

存活率分别为 80%、70%。

麻醉剂在现代水产养殖和养殖动物福利方面发挥着重要作用。时效性、持久性、安全性和经济性等是筛选麻醉剂的几个关键指标。从本实验结果(表 3), 随着两种麻醉剂浓度的增大, 入麻时间显著减小, 复苏时间延长, 但浓度过高时, 导致鲈鱼无法复苏。严银龙等^[6]研究 MS-222、丁香酚对刀鲚幼鱼的麻醉效果, 结果表明, 麻醉剂浓度越大, 入麻时间越短, 复苏时间延长, 分别在 30、8 mg/L 的 MS-222 和丁香酚溶液中麻醉后, 复苏 48 h 存活率 100%, 与本文研究结果相似。朱敏^[6]研究发现, MS-222 进入鱼体后大部分富集在脾脏和肝脏中, 大剂量的麻醉剂会麻痹呼吸中枢, 丁香酚也被认为会引起肝脏方面的问题^[7], 因此是麻醉过度会引起肝脏或者脾脏受损, 从而导致鱼类死亡。此外, 过度麻醉带来的鱼体急性缺氧也是造成死亡的原因之一^[18], 进而影响成活率, 以选择合适的麻醉剂量对水产品的保活运输至关重要。本实验将成鱼置于 20 mg/L 的丁香酚和 55 mg/L 的 MS-222 时, 成鱼均能达到休眠状态, 没有产生不适现象, 复苏后 24 h 成活率为 100%, 说明两种麻醉剂都具有持久性。

表 3 麻醉剂浓度对复苏时间的影响

Table 3 Effects of anesthetic concentration on induction and recovery time

麻醉剂质量浓度/(mg/L)	进入不同麻醉程度的时间/s						复苏至 R4 的时间/s	24 h 后成活率/%	
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄	A ₅	A ₆			
MS-222	40	178±21	-	-	-	-	60±21	90.52±5.70	
	50	138±11	260±21	300±30	-	-	81±21	100.00	
	55	121±8	205±11	245±25	408±40	-	222±21	100.00	
	60	100±9	156±15	190±24	309±32	-	338±21	100.00	
	65	64±8	105±18	160±15	256±21	230±22	324±24	600±21	50.00±8.70
	70	25±4	48±10	60±11	98±9	120±12	165±11	/	0
丁香酚	10	-	-	-	-	-	20±4	88.67±5.70	
	15	220±14	366±22	-	-	-	89±45	100.00	
	18	129±11	204±20	300±28	-	-	128±35	100.00	
	20	100±9	120±13	240±11	280±14	-	268±21	100.00	
	25	60±5	82±6	102±19	165±12	206±15	308±8	390±21	80.00±4.50
	30	40±5	62±8	88±22	118±23	130±21	246±9	550±21	40.00±10.67

注: 水温 16 °C; A₁~A₆ 对应表 1 的麻醉程度; R4 对应表 2 的复苏程度; “-”表示试验中没有观察到对应的麻醉状态; “/”表示鱼死亡。

2.2 两种麻醉剂对大口黑鲈成鱼模拟麻醉运输效果

大口黑鲈模拟运输和复苏 24 h 后的存活率如图 1 所示, 丁香酚和 MS-222 两麻醉组的运输后存活率以

及复苏 24 h 后的存活率均为 100%, 显著高于对照组的 80% 和 90% ($p < 0.05$)。在运输过程中, 观察实验鱼的行为发现, 两麻醉组前 10 h 处于休眠状态, 呼吸微弱, 对刺激敏感应差, 10 h 后逐渐恢复正常, 呼吸平缓, 有轻微的应激现象。对照组的鱼全程四处游动, 表现出呼吸强, 代谢快, 应激敏感的特点。

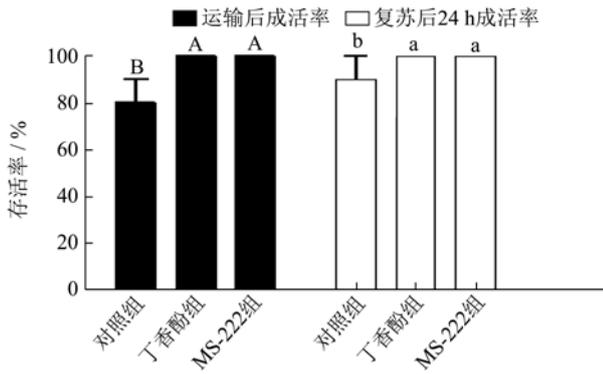


图1 鲈鱼运输和复苏 24 h 的成活率

Fig.1 Survival rate of largemouth bass after anaesthesia transport

注：大写字母不同表示运输后成活率差异性显著，小写字母不同表示复苏后 24 h 成活率差异性显著 ($p<0.05$)。

2.3 丁香酚和 MS-222 麻醉对氨氮的影响。

不同运输时间对水中氨氮含量的影响如图 2，可以得出在有水保活 8 h 后，经过丁香酚和 MS-222 麻醉的鱼的水样中的氨氮质量浓度显著低于对照组，可以说明 MS-222 和丁香酚对延长加州鲈鱼出现死亡的时间及抑制氨氮排放的效果较好。

鱼类状态影响鱼体代谢率，直接对鱼体排泄产生影响，代谢越强，代谢产物的排出越多，越会造成水质污染，进而对保活时间与存活率造成影响。在一般鱼类运输中，水中氨氮含量逐渐增加，水质 pH 也不断下降。但添加一定的麻醉剂可以缓解这一现象。结果表明，添加麻醉剂运输能减少鲈鱼的应激，减少氨氮的产生，缓解水质恶化，提高存活率。王利娟等^[1]对大口黑鲈的保活研究发现，麻醉剂组的氨氮含量低于对照组，与本文结论相一致。

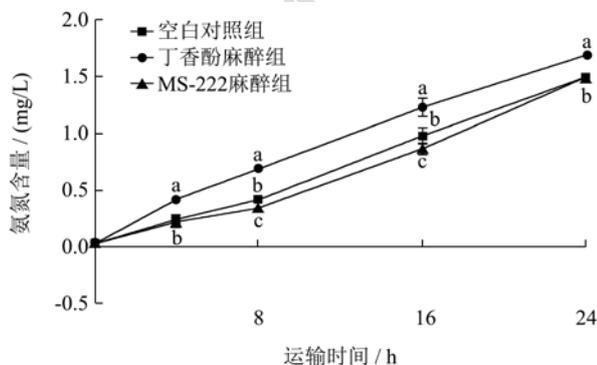


图2 不同运输时间对水中氨氮含量的影响

Fig.2 Effect of different transportation time on ammonia nitrogen content in water

注：小写字母不同表示相同运输时间下不同组之间差异显著 ($p<0.05$)。

2.3 麻醉运输后血清生化指标分析

2.3.1 皮质醇和葡萄糖

皮质醇被认为是反应鱼类应激的指标之一。在正常情况下，鱼的血液皮质醇浓度偏低，但受到刺激时，会使得下丘脑-垂体-肾间组织轴被激活，最终使血浆中皮质醇含量显著升高。因此，它可以被用来指示应激的强度^[3]。如图 3，与对照组相比，在麻醉 0.5 h 时，丁香酚组皮质醇含量显著升高 ($p<0.05$)。随着保活时间的延长，皮质醇含量显著下降 ($p<0.05$)。而 MS-222 组皮质醇含量显著升高 ($p<0.05$)，8 h 达到最大值，在 16、24 h 保持稳定。因此 MS-222 麻醉组产生的应激强于丁香酚组，但总体低于对照组。与对照组相比，两麻醉组的血清葡萄糖显著升高 ($p<0.05$)，但随着运输时间的延长，血糖含量先升高后降低，且丁香酚麻醉组的血糖含量显著高于 MS-222 组 ($p<0.05$)。

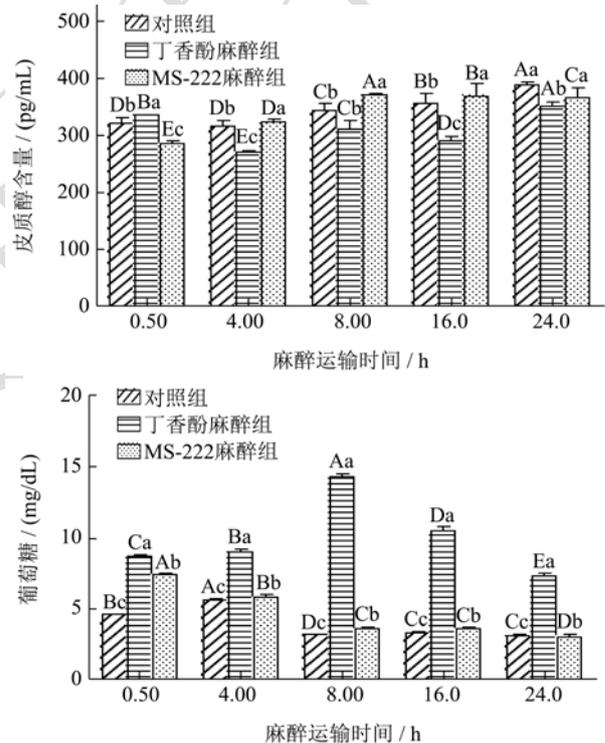


图3 不同麻醉时间对皮质醇和葡萄糖含量的影响

Fig.3 Effects of different transportation time on cortisol and glucose content

注：不同大小写字母表示同组不同运输时间差异显著 ($p<0.05$)，下同。

糖和皮质醇是鱼在应激条件下压力升高的指标，它们升高的水平和持续的时间表明了压力的严重程度^[19]。在使用了麻醉剂后皮质醇和葡萄糖迅速升高反映了麻醉对鱼体造成胁迫，鱼体产生应激^[20,21]。但在麻醉运输过程中皮质醇含量变化不明显，这可能是因

麻醉剂降低了鱼体对外界刺激的反应能力。Pereira-Da-Silva 等人研究硬骨鱼在麻醉时产生的应激程度,发现血液葡萄糖和皮质醇水平先显著升高^[22],后逐渐趋于稳定。

2.3.2 乳酸脱氢酶、谷草转氨酶和碱性磷酸酶的变化

乳酸脱氢酶 (LDH) 是糖代谢中催化丙酮酸无氧代谢生成乳酸的酶。LDH 活性主要取决于细胞内氧分压的高低,当细胞内氧分压降低时,LDH 的合成加快,其活性增强;当细胞内供氧充足时,LDH 的合成受到抑制,活性降低^[23]。如图 4,随着运输时间延长,两麻醉组的 LDH 的活性先稍微升高后下,丁香酚麻醉组 LDH 活性在 4 h 达到最大 6740.28 mmol/L,24 h 时下降到 5759.80 mmol/L,MS-222 组从 6574.74 下降到 5161.50 mmol/L,显著低于对照组。表明运输水体中氧气充足,鱼体主要以有氧代谢供能。GOT 主要存在于肝脏内,通常 GOT 含量在鱼体内保持比较低的范围,但当鱼体受到强烈刺激时,谷草转氨酶会从肝脏释放到血液中,故谷丙转氨酶含量的变化可作为肝脏受损程度的检测指标^[24]。与对照组相比,麻醉运输组血清中 GOT 水平显著升高 ($p < 0.05$),随着运输时间的延长,两麻醉组 GOT 活性显著下降 ($p < 0.05$),但 MS-222 组显著高于丁香酚组。表明 MS-222 对肝脏的损伤程度大于丁香酚。

AKP 变化趋势如下,丁香酚麻醉组 AKP 活性先略微升高后下降,但与对照组差异不显著,而 MS-222 麻醉组 AKP 活性逐渐升高,8 h 后显著高于对照组和丁香酚麻醉组 ($p < 0.05$)。MS-222 麻醉组血清中 GOT 和 AKP 的含量显著高于丁香酚麻醉组。尿素氮作为蛋白分解的一种产物,血液中尿素氮含量可以反映了肾脏功能的好坏。当肾功能受到损害时,血液中尿素氮含量会升高^[23]。如图 4 所示,两麻醉组尿素氮浓度显著高于对照组,随着运输时间延长,尿素氮浓度显著降低并保持稳定,且丁香酚组高于 MS-222 组,在 24 h 时 MS-222 组尿素氮浓度为 2.36 mmol/L,显著低于丁香酚组 ($p < 0.05$),恢复到对照水平,显然丁香酚麻醉剂对肾脏的损伤大于 MS-222。在大菱鲆的保活过程中,BUN、CR 与 UA 均显著上升,本试验结果与其一致^[25]。

Velisek J 等人认为 LDH、AKP 和 GOT 活性的增加表明组织受到一定的损伤^[24]。Vellísek J 等人^[26]研究 MS-222、丁香油和丙霉素对虹鳟鱼的血 ALT、AST 和 LDH 活性的变化;然而,与丁香油和丙霉素麻醉虹鳟鱼相比,MS-222 麻醉虹鳟鱼中 ALT、AST 和 LDH 活性增加的更显著,这与本文的结论一致。Yousefi M

等^[27]人研究百里香酚和丁香酚麻醉剂在鲤鱼中的应用,结果表明:丁香酚使血清中 COR、GLU、AST、LDH 和 SOD 显著升高,CAT 下降。

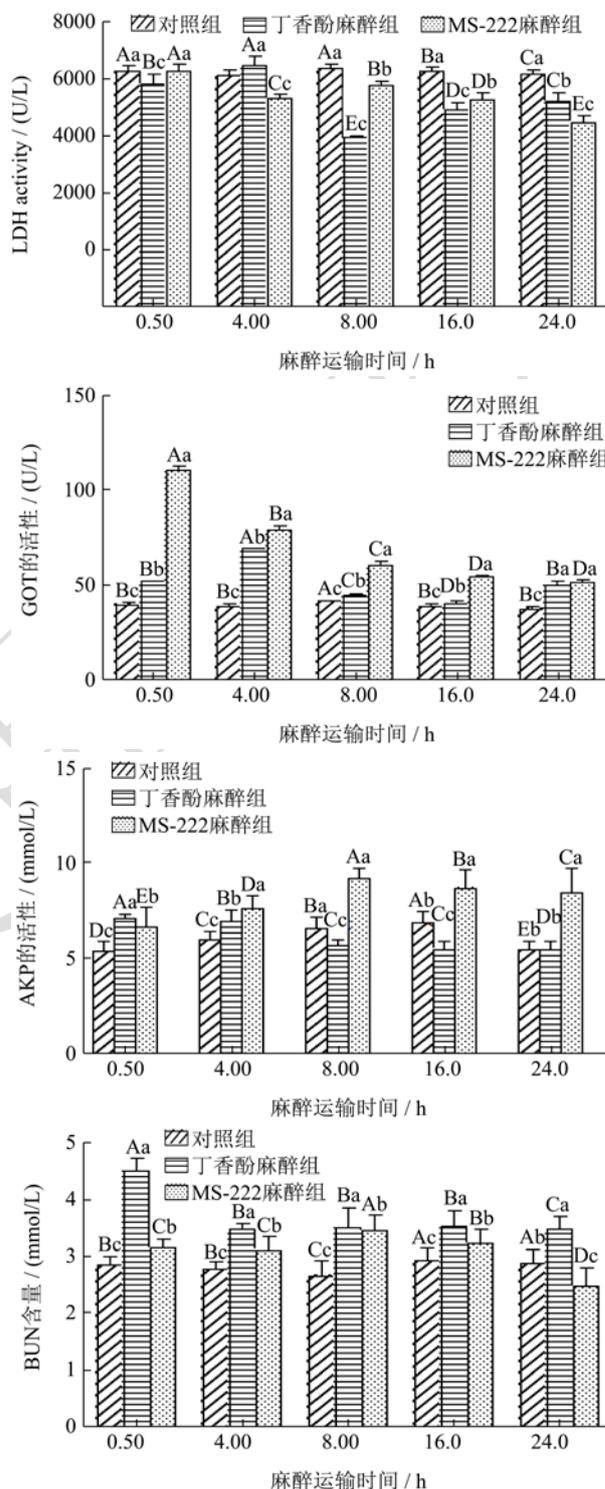


图 4 不同运输时间对 LDH、GOT、AKP 和 BUN 活性的影响
Fig.4 Effect of different transportation time on LDH, GOT, AKP and BUN activity

2.3.3 过氧化氢酶的变化

如图 5 可以看出,与对照组相比,两麻醉组的鱼在暴露 0.5、4 h 时 CAT 的活性显著下降 ($p < 0.05$),8

h 时显著升高 ($p < 0.05$), 16、24 h 逐渐恢复到对照组水平, 但丁香酚组的血浆 CAT 水平显著高于 MS-222。

CAT 是在氧化条件下保护机体的抗氧化酶。在本研究中, 暴露在麻醉液 0.5、4 h 时 CAT 活性下降, 因为麻醉初期, 鱼体内自由基急剧增加, CAT 为了抵抗机体氧化作用, 进而导致 CAT 活性下降。在 8 h 时, CAT 含量才有显著升高 ($p < 0.05$), 保护机体免受氧化应激损伤。Mazandarani M 等人^[28]对鲤鱼的研究表明, 不同的麻醉剂 (MS-222、丁香油、2-苯氧基乙醇) 对大多数抗氧化酶有明显影响, 且丁香酚麻醉鱼血浆中过氧化氢酶含量先减少后增加。

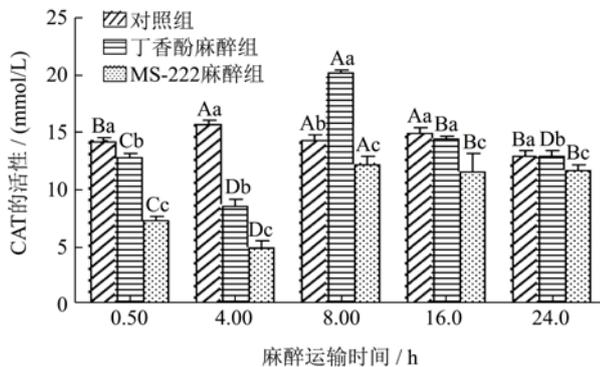


图 5 不同运输时间对 CAT 活性的影响

Fig.5 Effect of different transportation time on activity of CAT

2.3.4 溶菌酶的变化

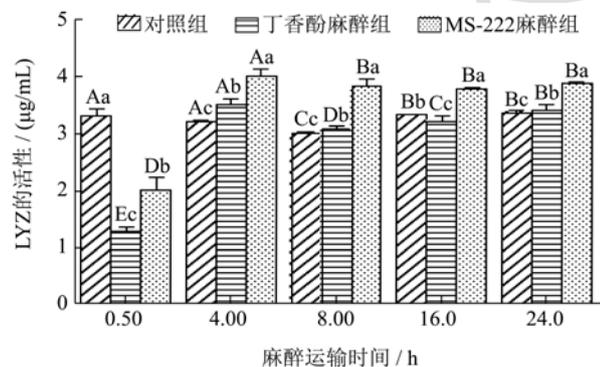


图 6 不同运输时间对溶菌酶的影响

Fig.6 Effect of different transportation time on LYZ

LYZ 一种是与机体免疫系统有关的活性物质, 当机体受到胁迫时, 会释放更多的溶菌酶, 提高机体防御能力。如图 6 可以看出, 与对照组相比, 麻醉组中血清溶菌酶活性在 0.5 h 显著下降 ($p < 0.05$), 随着麻醉时间增加, 溶菌酶活性显著升高且趋于稳定 ($p < 0.05$), 丁香酚组基本恢复到对照组水平, MS-222 组显著高于丁香酚组。

麻醉处理可以改善鱼的免疫状态, 因为它能恢复血清 LYZ 活性血液离子的含量, 很少有文献研究运输对鱼类免疫应答的影响, 并进行比较。有报告表明, 血清溶菌酶在两种不同的鱼中变化多样, 它可能基于

压力和采样时间的性质^[26,29]。有报道表明, LYZ 活性在强应激鱼体存在下降趋势^[30]。本研究表明, 麻醉的初期机体的免疫能力大幅度的下降, 但在 4 h 的时候就已经基本恢复到了正常的水平。在 8 h 溶菌酶含量超过对照组水平, 且 MS-222 组高于丁香酚组。说明麻醉运输 24 h 对鱼的免疫系统有一定改善。

2.3.5 钠含量的变化

如图 7 可以看出, 在麻醉 0.5 h 时, Na 的含量分别为 1.53、2.02 ng/mL, 显著低于对照组 ($p < 0.05$), 在 4 h 时, 两麻醉组中 Na 含量显著升高 ($p < 0.05$)。随着运输时间延长, 各组 Na 含量趋于稳定, 且 MS-222 组显著高于丁香酚组 ($p < 0.05$)。与 Cooke 等^[17]研究结果一致, 表明在麻醉初期, 为应对应激会导致鱼体内离子流失, 随着麻醉时间延长, 应激显著低于对照组, 麻醉组钠的含量高于空白对照组, 表明麻醉运输 24 h 能减缓离子流失。

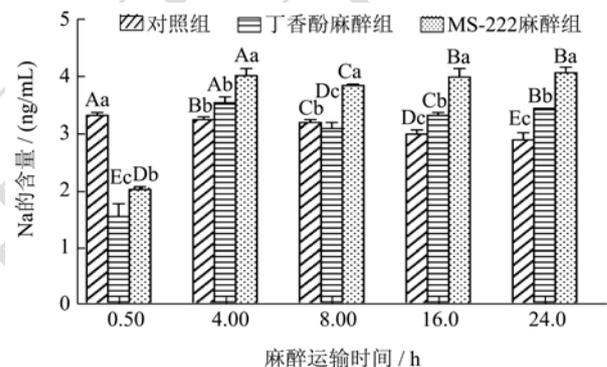


图 7 不同运输时间对钠 (Na) 含量的影响

Fig.7 Effect of different transportation time on sodium (Na) content

2.4 鱼肉中丁香酚和 MS-222 的残留

由表 4 可知用 MS-222 麻醉组, 在 4 h 时鱼肉中 MS-222 的残留量达到最大值, 复苏 3 d 左右残留量为 1.21 mg/kg, 第五天基本上代谢干净。而丁香酚麻醉组, 在 0.5 h 含量就达到了最大值, 随着麻醉时间延长, 体内残留量呈下降趋势, 复苏 6 d 时残留量为 0.055 mg/kg, 基本达到日本规定丁香酚残留限量标准为 0.05 mg/kg。

目前, 国内外对于麻醉剂在鱼体残留代谢的研究较少。根据部分国家的相关法规, 浸泡过麻醉剂的鱼入市前要经过一段休药期, 以确保最终残留浓度低于最大残留浓度, 而代谢的快慢, 则取决于剂量多少、麻醉剂种类、作用物种等^[31]。Li 等^[32]将鲤鱼放于浓度为 10.0 mg/L 的丁香酚溶液中, 在 25 ℃浸 2 h, 后移到清水中做消除实验, 结果发现 48 h 时丁香酚的残留量为 55.52 µg/kg。朱敏等^[6]在 12 ℃, 将大菱鲆浸

泡在 60 mg/L 的 MS-222 溶液 60 h 后,放入水中进行消除试验,发现随着消除时间的增长,大菱鲆肌肉中残留的 MS-222 会快速减少,在 52 h 后基本代谢干净。上述结果与本文结论相似,将鲈鱼放于 20 mg/L 丁香酚中,在 0.5 h 时鱼肉丁香酚含量达到最大,在 4 h 时

迅速下降,在清水中复苏 24 h 时丁香酚的残留量为 0.45 mg/kg,在 96 h 时已经满足新西兰规定的最低残留量;对于 MS-222 而言,在麻醉 8 h 时残留量达到最大值,麻醉 24 h 时迅速下降,120 h 基本消除完全。

表 4 鱼肉中 MS-222 和丁香酚的残留量

Table 4 Residues of MS-222 and eugenol in fish

麻醉剂残留量/(mg/kg)	麻醉时间/h					
	0.5	4	8	24		
MS-222	20.06±1.1	36.90±1.6	36.23±0.83	28.96±1.55		
丁香酚	5.13±0.50	3.89±0.25	3.57±0.18	1.14±0.30		
麻醉剂残留量/(mg/kg)	复苏时间/d					
	1	2	3	4	5	6
MS-222	5.62±0.81	1.27±0.45	0.91±0.22	0.52±0.08	0.45±0.09	0.13±0.09
丁香酚	0.57±0.28	0.54±0.20	0.45±0.10	0.36±0.08	0.14±0.08	0.055±0.01

3 结论

随着丁香酚和 MS-222 麻醉剂浓度增加,大口黑鲈进入相同麻醉状态的时间缩短,复苏时间延长,丁香酚和 MS-222 的最适质量浓度分别为 18~20 mg/L、50~60 mg/L。在 20 和 55 mg/L 的丁香酚和 MS-222 模拟运输 24 h 后存活率 100%,对照组存活率为 80%。两麻醉组运输 24 h 后总氮含量分别降低了 18.23%、19.41%。丁香酚麻醉组中 COR、GOT、AKP、LYZ 和 Na 含量低于 MS-222 组,BUN、GLU、CAT 含量高于 MS-222 组,丁香酚对肝脏组织的损伤小于 MS-222 组。大口黑鲈在清水中进行麻醉剂消除规律发现,丁香酚的休药期为 96 h,MS-222 的休药期约为 120 h。与 MS-222 相比,丁香酚剂量小,代谢快,降低血清皮质醇水平,在诱发氧化应激时有较少的副作用,因此丁香酚作为麻醉剂要优于 MS-222。

参考文献

- [1] 王利娟.大口黑鲈保活运输的研究[D].上海:上海海洋大学,2015
WANG Li-juan. Research on large-mouth black scorpion keep-alive transport [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2015
- [2] Harmon T S. Methods for reducing stress and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics [J]. Reviews in Aquaculture, 2010, 1(1): 58-66
- [3] Barton B A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids [J]. Integrative and Comparative Biology, 2002, 42(3): 517-525
- [4] 梁养贤.模拟长途运输中草鱼血液和水质变化研究[D].长沙:湖南农业大学,2008
LIANG Yang-xian. Study on the changes of blood and water quality of grass carp in long-distance transportation [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008
- [5] 李晓璐,刘妍,淮亚红,等.活体运输过程中冰片麻醉剂与 MS-222 对草鱼麻醉效果的对比研究[J].现代食品科技, 2017,30(6):220-227
LI Xiao-lu, LIU Yan, HUAI Ya-hong, et al. Comparative study of anesthetic effects of borneol anesthetics and MS-222 on Grass Carp in living transportation [J]. Modern Food Science & Technology, 2017, 30(6): 220-227
- [6] 朱敏,孙伟红,邢丽红,等.液相色谱-串联质谱法测定水产品中麻醉剂 MS-222 残留[J].分析试验室,2012,20(6):59-62
ZHU Min, SUN Wei-hong, XING Li-hong, et al. Determination of tricaine residues in aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 20(6): 59-62
- [7] Phillips DH. Further evidence that eugenol does not bind to DNA *in vivo* [J]. Mycol Res Lett, 1990, 245(1): 23-26
- [8] Sharma A. Evaluation of certain food additives and contaminants, seventy-third report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives [J]. Indian J Med Res, 2012
- [9] Mirghaed A T, Ghelichpour M, Hoseini S M, et al. Hemolysis interference in measuring fish plasma biochemical indicators [J]. Fish Physiology & Biochemistry, 2017: 1-9
- [10] Velisek J, Wlasow T, Gomulka P, et al. Effects of clove oil anaesthesia on European catfish (*Silurus glanis* L.) [J]. Acta

- Veterinaria Brno, 2006, 75(1): 99-106
- [11] Hoseini S M, Ghelichpour M. Efficacy of clove solution on blood sampling and hematological study in beluga [J]. *Fish Physiology & Biochemistry*, 2012, 38(2): 493-498
- [12] Holloway A C, Keene J L, Noakes D G, et al. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum [J]. *Aquaculture Research*, 2015, 35(11): 1025-1030
- [13] Hikasa Y, Takase K, Ogasawara T, et al. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio* [J]. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 1986, 48(2):341-351
- [14] 沈阳市环境监测中心站.水质氨氮的测定纳氏试剂分光光度法:HJ 535-2009[S]
Environmental Monitoring Center Station of SHEN Yang. Determination of water quality ammonia nitrogen Nessler's reagent spectrophotometry: HJ 535-2009 [S]
- [15] 王彩霞,熊光权,白婵,等.高效液相色谱法测定斑点叉尾鲷肌肉组织中丁香酚类化合物的残留量[J].现代食品科技, 2018,35(6):301-307
WANG Cai-xia, XIONG Guang-quan, BAI Chan, et al. High performance liquid chromatography was used to determine the residual amount of eugenol compounds in the muscles of channel catfish [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 35(6): 301-307
- [16] 严银龙,施永海,张海明,等.MS-222、丁香酚对刀鲚幼鱼的麻醉效果[J].上海海洋大学学报,2016,25(2):234-240
YAN Yin-long, SHI Yong-hai, ZHANG Hai-ming, et al. Anesthetic effect of MS-222 and eugenol on juvenile larvae [J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2016, 25(2): 234-240
- [17] Cooke S J, Suski C D, Ostrand K G, et al. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *Aquaculture*, 2014, 239(123): 509-529
- [18] 汤保贵,陈刚,张健东,等.两种麻醉剂对罗非鱼的急性毒性及联合毒性研究[J].水产科技情报,2010,3:111-114.
TANG Bao-gui, CHEN Gang, ZHANG Jian-dong, et al. Study on acute toxicity and joint toxicity of two anesthetics to tilapia [J]. *Fishery Science and Technology Information*, 2010, 3: 111-114
- [19] Pef C, Urbinati E C. Salt as a stress response mitigator of matrinxa, *Brycon cephalus* (Günther), during transport [J]. *Aquaculture Research*, 2015, 32(4): 297-304
- [20] 李宁,白婵,熊光权,等.无水保活时间对斑点叉尾鲷血液生化及肌肉品质的影响[J].现代食品科技,2018,34(12):80-87
LI Ning, BAI Chan, XIONG Guang-quan, et al. Effect of water-free keep alive time on blood biochemistry and muscle quality of channel catfish [J]. *Modern Food Technology*, 2018, 34(12): 80-87
- [21] Mylonas C C, Cardinaletti G, Sigelaki I, et al. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures [J]. *Aquaculture*, 2005, 246(1): 467-481.
- [22] Pereira-Da-Silva E M, Oliveira R H F, Nero B D. Menthol as anaesthetic for lambari *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski 2000): attenuation of stress responses [J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(5): 1413-1420
- [23] Javahery S, Nekoubin H, Moradlu A H. Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review) [J]. *Fish Physiology & Biochemistry*, 2012, 38(6): 1545-1552
- [24] Velíšek J, Stara A, Li Z H, et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on blood biochemical profiles and oxidative stress biomarkers in rainbow trout [J]. *Aquaculture*, 2011, 310: 369-375
- [25] 刘伟东.大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)保活的基础研究[D].青岛:中国海洋大学,2009
LIU Wei-dong. Basic research on keep-alive of turbot (*Scophthalmus maximus*) [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009
- [26] Velíšek J, Stejskal V, Kouřil J, et al. Comparison of the effects of four anaesthetics on biochemical blood profiles of perch [J]. *Aquaculture Research*, 2010, 40(3): 354-361
- [27] Yousefi M, Hoseinifar S H, Ghelichpour M, et al. Anesthetic efficacy and biochemical effects of citronellal and linalool in common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) juveniles [J]. *Aquaculture*, 2018, 493: 107-112
- [28] Mazandarani M, Hoseini S M, Dehghani G M. Effects of linalool on physiological responses of *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) and water physico-chemical parameters during transportation [J]. *Aquaculture Research*, 2017, 30(4): 49-60
- [29] Jiang W D, Liu Y, Hu K, et al. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (Cu, Zn, SOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 155(4): 301-313