

喹烯酮及其主要代谢物在猪体内的残留规律研究

钟家林, 王 林, 赵 宁, 于慧敏, 贾慧琴, 鲁晓雄, 吴子莹, 丁焕中

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:研究了喹烯酮及其3种主要代谢物在猪肌肉、肝脏、肾脏、脂肪中的残留消除规律。猪按体质量20 mg/kg多剂量灌服给药,按既定时间点采集组织样品。组织样品用乙酸乙酯提取后经固相萃取小柱净化,液相色谱-串联质谱法测定样品中喹烯酮及其代谢物含量。结果表明:给药后猪几种组织中以肌肉中喹烯酮及其代谢物消除相对缓慢,药物含量以猪肝脏中3-甲基-苯乙烯酮-喹恶啉含量较高。3-甲基-苯乙烯酮-喹恶啉-N4-一氧化物在肌肉中的消除半衰期可达39.50 h。3-甲基-2-羧酸-喹恶啉仅能在肾脏中检测到。

关键词:喹烯酮; 代谢物; 高效液相色谱串联质谱法; 残留消除; 猪
中图分类号:S859.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)02-0248-05

Study on Residue Depletion of Quinocetone and Its Major Metabolites in Swine

ZHONG Jia-lin, WANG Lin, ZHAO Ning, YU Hui-min, JIA Hui-qin, LU Xiao-xiong,
WU Zi-ying, DING Huan-zhong
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:Residue depletion of quinocetone and three of its major metabolites in muscle, liver, kidney and fat of swine were determined in this study. Quinocetone was administered to 40 healthy cross-breed swine orally at dosage of 20 mg · kg⁻¹ body mass twice a day for 5 consecutive days. Animals were slaughtered in groups and samples were taken at different time intervals after administration. The tissues were extracted with ethyl acetate, and cleaned up with HLB SPE column. A sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed to determine quinocetone and its metabolites. Quinocetone and its metabolites were eliminated more slowly in swine muscle than those in other tissues. The highest drug levels occurred in liver for 3-methyl-styryl ketone-quinoxaline. The residue lasted the longest half-life of elimination for 39.50 h with 3-methyl-styryl ketone-quinoxaline -N4-monoxide in pig muscle. The 3-methyl-2-carboxylic acid-quinoxaline was detected only in kidney at very low concentration.

Key words:quinocetone; metabolites; high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; residue depletion; swine

喹烯酮(QCT)是中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所研制的一种新兽药饲料添加剂,属于喹恶啉类-1,4-二氧化物的衍生物。曾报道该药具有抗菌作用强、促进畜禽生长作用明显、在畜禽体内代谢快、无残留、无蓄积、“无三致”^[1-4]等优点,并广泛用于水产养殖、畜禽生产中。近年来研究发现喹烯酮具有潜在的细胞毒性和基因毒性^[5],

在动物体内代谢过程复杂,可产生几十种代谢产物^[6-7]。喹烯酮在动物体内的残留消除研究报道较少^[8-9],为进一步评价喹烯酮在动物性食品中的安全性,本试验研究了喹烯酮及其主要代谢物在猪组织中的残留消除规律,为确定喹烯酮在动物可食性组织中的残留标示物及休药期提供基础数据。

收稿日期:2011-03-25
作者简介:钟家林(1986—),男,硕士研究生;通信作者:丁焕中(1969—),男,副教授,博士,E-mail:hzding@scau.edu.cn
基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2009CB118805);“十一五”国家科技支撑计划项目(2009BADB7B05-03)。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;API 4000 电喷雾-串联四级杆质谱仪,美国应用生物系统公司.

喹烯酮标准品($w = 90\%$)为 Sigma 公司产品,喹烯酮原料药(QCT, $w = 98\%$)由华中农业大学提供,3-甲基-苯乙烯酮-喹恶啉(Q4, $w = 95\%$)、3-甲基-苯乙烯酮-喹恶啉-N4-一氧化物(Q2, $w = 95\%$)和3-甲基-2-羧酸-喹恶啉(Q31, $w = 97\%$)由中国农业大学合成.

1.2 试验动物及试验设计

40 头去势的三元杂交猪(以杜洛克为父本,长白、大白杂交一代为母本),体质量(50.0 ± 5.3) kg,购于广州力智农业有限公司. 每天饲喂空白饲料并让其自由饮水,饲养2周后猪只表现健康,将其随机平均分成8组. 按照体质量 $20\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量,在每天8:00和18:00内服给药,连续5 d,最后一次给药后4、6、12、24、72、120、168、216 h 各宰杀1组,采集动物的肝脏、肾脏、肌肉、脂肪.

1.3 样品制备

称取2 g 均质过的组织,加5 mL 乙酸乙酯,振荡10 min,8 000 r/min 离心10 min,取上清液移入15 mL 离心管中,残渣用5 mL 乙酸乙酯重提1次,在氮气流下吹干;加5 mL $0.3\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液溶解残渣,再用10 mL 乙酸乙酯分2次从HCl 溶液中萃取药物,将上清液全部转移至前面吹干的15 mL 离心管中,再次用 N_2 吹干. 用6 mL 体积分数为16.7% 甲醇水溶液溶解残渣,过HLB 固相萃取小柱,用1 mL 体积比2:98 的甲酸-乙腈溶液洗脱,取10 μL 上样.

1.4 液相色谱与质谱条件

1.4.1 液相条件 色谱柱:phenomenex C_{18} 柱(150

$\text{mm} \times 2\text{ mm}$,粒径5 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流动相 A:体积分数0.1% 甲酸水溶液,流动相 B:乙腈;流速0.25 mL/min,进样量10.0 μL . QCT、Q2、Q4 的梯度洗脱条件:0 ~ 1 min,90% A ~ 40% A;1 ~ 7 min,40% A ~ 20% A;7.0 ~ 7.1 min,20% A ~ 90% A;7.1 ~ 13.0 min,90% A. Q31 的梯度洗脱条件:0 ~ 1.5 min,2% A ~ 70% A;6.0 ~ 6.1 min,70% A ~ 2% A;6.1 ~ 12.0 min,2% A.

1.4.2 质谱条件 QCT、Q2、Q4 采用电喷雾正离子模式扫描,多反应监测方式(MRM),QCT 的母离子为307.1(m/z),子离子为273.1(m/z)、131.1(m/z),307.1/131.1(m/z)为定量离子对;Q2 的母离子为291.1(m/z),子离子为159.0(m/z)、245.2(m/z),291.1/159.0(m/z)为定量离子对;Q4 的母离子为275.2(m/z),子离子为143.1(m/z)、247.2(m/z),275.2/247.2(m/z)为定量离子对;Q31 采用电喷雾负离子模式扫描,多反应监测方式,母离子为187.1(m/z),子离子为142.9(m/z)、101.9(m/z),其中187.1/142.9(m/z)为定量离子对.

1.5 给药后各组织中药物浓度的测定及结果分析

给药后不同时间点组织样品,按“1.3”方法处理后做LC-MS/MS 分析,记录QCT、Q2、Q4 的峰面积,计算组织中药物浓度. 根据药物浓度-时间数据,采用WinNonLin 6.1 软件进行非房室模型计算,分别求出组织药动学参数.

2 试验结果

2.1 色谱图

QCT、Q2、Q4 及 Q31 的出峰时间分别为6.97、8.25、9.65、8.98 min,相互之间无干扰(图1). 空白组织样品、空白添加样品、给药后4 h 组织样品的色谱如图2 所示.

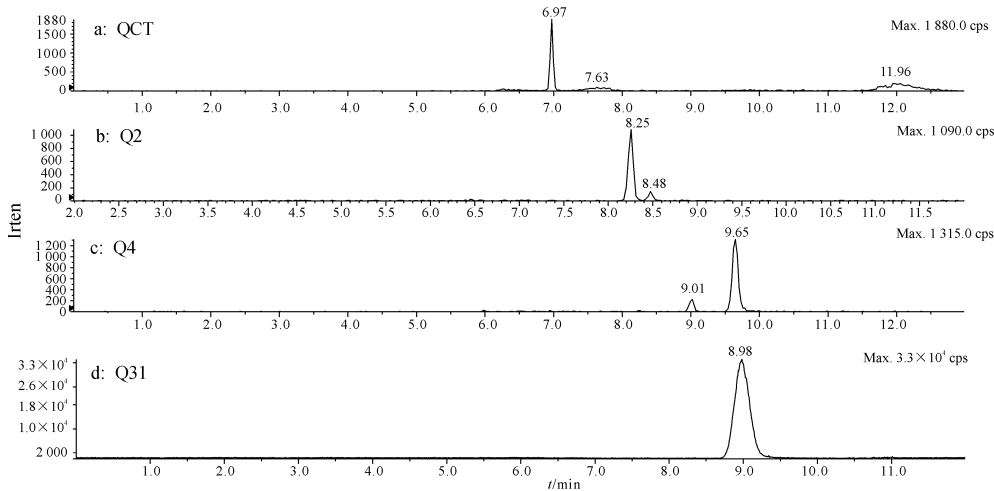


图1 喹烯酮及其代谢物对照品的LC-MS/MS 色谱图($2\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

Fig.1 The chromatograms of quinocetone and its metabolites standard($2\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

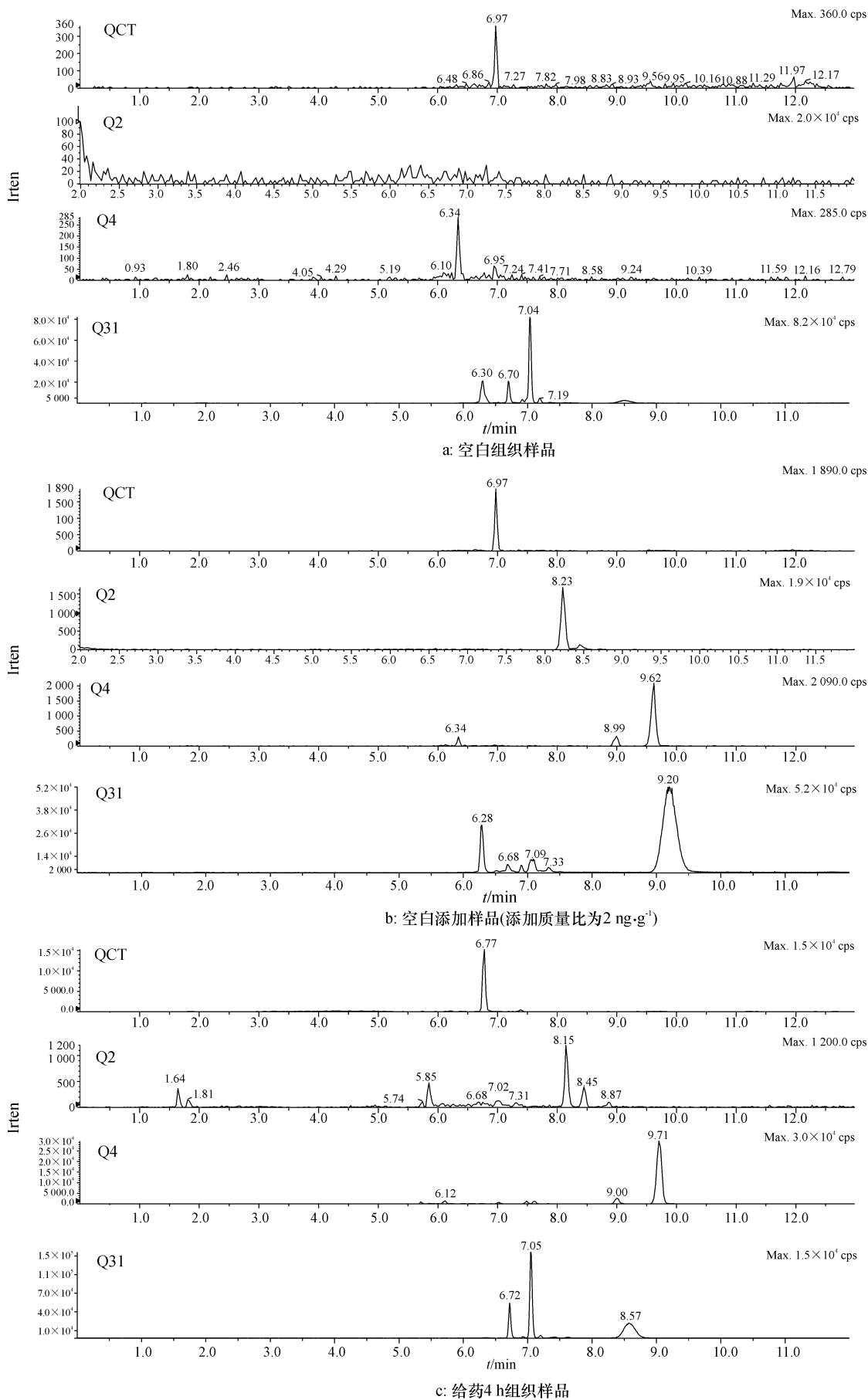


图 2 组织中喹烯酮及其代谢物的 HPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 2 The chromatograms of quincetone and its metabolites in tissues

2.2 线性范围

取一系列标准混合溶液,在“1.4”条件下检测药物含量,做出标准曲线. QCT、Q2、Q4 在 2~200 ng·g⁻¹ 范围内线性关系良好. 用直线回归法对数据进行分析处理,以一定标准品溶液的质量比作为横坐标,相应的峰面积作为纵坐标, QCT 的标准曲线方程: $y = 803.31x + 1\,879.7$, $r^2 = 0.995\,5$; Q2 的标准曲线方程: $y = 2\,268.6x + 348.44$, $r^2 = 0.999\,7$; Q4 的标准曲线: $y = 4\,297.7x - 1\,168.8$, $r^2 = 0.999\,6$; Q31 的标准曲线: $y = 4\,009x - 605.07$, $r^2 = 0.999\,3$. 药物的检测限 (3 S/N) 为 2 ng·g⁻¹, 定量限 (10 S/N) 为 4 ng·g⁻¹.

2.3 回收率和精密度

在 2 g 空白组织中加入 100 μL 不同质量比的标准混合溶液,使终质量比为 5、50 和 200 ng·g⁻¹,前

处理操作步骤同“1.3”,每批 5 个重复,做 5 个批次. QCT、Q2 和 Q4 在各类样品中的方法回收率 70%~100%,批内和批间变异系数均小于 10%,可满足测定的需求.

2.4 喹烯酮及其主要代谢物在各组织中的浓度

猪只按体质量 20 mg·kg⁻¹ 多剂量口服给药后, QCT、Q2、Q4 在肌肉、肾脏、肝脏、脂肪中不同时间点的药物质量比实测值见表 1. Q31 仅在肾脏中检测到,6 h 达到最高质量比,为 (8.47±3.85) ng·g⁻¹, 24 h 已经检测不到. 从表 1 可见,给药后肝脏中 Q4 的残留量最多,最高质量比为 (474.73±58.62) ng·g⁻¹,脂肪的残留量最少,肌肉中的药物残留时间最长;而 4 种药物中 Q4 的残留量最多, Q31 的残留量最少, QCT 的残留时间相对较长一些.

表 1 QCT、Q2、Q4 在各组织中的质量比¹⁾ (n=5)
Tab.1 The concentration of the QCT, Q2 and Q4 in tissues

t/h	$w_{\text{肌肉}}/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$			$w_{\text{肾脏}}/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$			$w_{\text{肝脏}}/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$			$w_{\text{脂肪}}/(\text{ng}\cdot\text{g}^{-1})$		
	QCT	Q2	Q4	QCT	Q2	Q4	QCT	Q2	Q4	QCT	Q2	Q4
4	76.86±12.35	51.13±5.34	50.59±6.82	77.05±8.53	60.25±7.25	80.85±10.91	209.93±31.52	57.09±7.28	245.22±35.31	39.72±6.97	23.43±5.84	68.95±15.84
6	90.55±18.54	59.72±7.89	105.94±16.62	190.34±10.78	69.70±7.98	118.09±16.86	224.90±35.94	100.97±13.52	474.73±58.62	68.25±13.58	34.59±8.72	94.17±23.87
12	107.52±26.87	68.09±8.67	129.93±17.09	137.66±12.34	93.68±9.34	208.09±28.37	160.75±28.36	90.86±12.68	355.91±50.23	95.55±31.68	42.08±10.34	117.12±48.26
24	80.71±15.63	39.63±6.91	31.19±4.68	59.09±7.52	35.77±4.82	73.30±10.46	48.57±8.67	34.86±5.68	92.95±9.53	29.63±8.26	16.68±5.91	43.60±10.67
72	62.38±12.38	21.28±4.83	18.28±3.52	15.12±3.87	11.76±3.46	21.57±4.32	27.66±4.05	11.99±2.67	17.09±3.15	5.91±1.63	-	8.71±2.06
120	24.78±6.38	-	-	6.75±1.23	-	-	5.01±1.63	-	-	-	ND	-
168	8.48±2.17	ND	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
216	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

1)“-”表示低于定量限 4 ng·g⁻¹,“ND”表示未检测到.

2.5 喹烯酮及其主要代谢产物在各组织中的主要动力学参数

采用 WinNonLin6.1 软件进行非房室模型计算,所得药物在各组织中的药动学参数见表 2. 由表 2 可见,肝脏中 Q4 药时曲线下面积及肌肉中 QCT 药

时曲线下面积相对较大,分别为 9 036.43 和 7 561.14 μg·kg⁻¹·h,4 种组织中消除半衰期均以肌肉中为最长, QCT、Q2、Q4 在肌肉的消除半衰期分别为 33.53、39.50、26.13 h.

3 讨论

喹烯酮及其 3 种主要代谢产物结构不同,极性大小也有较大差异,尤其是 Q31 必须在酸性条件下才能提取出来,而且动物可食组织中含量很小,这就要求建立的方法必须灵敏度高、检测限低、重复性好. 本测定方法的关键是如何从组织中将 4 种药物全部提取出来同时与杂质分离. 本研究过程中利用 QCT、Q2、Q4、Q31 这 4 种药物的酯水分配系数的特性,以乙酸乙酯提取后选用 HLB 固相萃取小柱净化样品,既保证了稳定的药物回收率又减少了杂质的干扰.

喹烯酮是我国自主研制的一类新兽药,目前尚未完全确定该药的残留标示物,但初步认为 Q2、Q4、Q31 是 QCT 重要的代谢物. 李剑勇等^[10-11]初步将喹烯酮原形药做为残留标示物,随后又通过 HPLC 测定尿液中的代谢产物,认为 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸是残留标示物,但是刘兆颖^[6]采用体外肝代谢系统

表 2 多剂量口服给药后药物在各组织中的主要药动学参数
Tab.2 Main pharmacokinetics parameters of QCT, Q2 and Q4 in tissues of the pigs after multi-dose oral dose

药物	组织	AUC/ (μg·kg ⁻¹ ·h)	MRT/h	β/(h ⁻¹)	t _{1/2β} /h
QCT	肌肉	7 561.14	50.79	0.021	33.35
	肝脏	4 030.27	29.32	0.028	24.66
	肾脏	3 624.08	24.71	0.027	25.95
	脂肪	394.64	5.04	0.077	8.99
Q2	肌肉	2 704.70	27.62	0.018	39.50
	肝脏	2 726.45	21.54	0.030	22.75
	肾脏	2 658.01	22.04	0.031	22.13
	脂肪	3 154.78	19.71	0.041	17.11
Q4	肌肉	3 119.59	22.83	0.027	26.13
	肝脏	9 036.43	16.51	0.046	14.08
	肾脏	5 304.43	21.93	0.034	20.23
	脂肪	2 283.00	19.27	0.043	16.23

在肝微粒体中发现 25 种代谢产物,但是没有 Q31. 本试验条件下,仅在肾脏中发现很低浓度的 Q31,这与刘兆颖^[6]所说的代谢物 Q31 可能不在肝微粒体中产生相吻合. 据估计,产生 Q31 的代谢酶可能在肾脏中,也可能是肝脏、肾脏等几种组织几种酶共同作用的结果,这个问题还有待进一步的研究.

李剑勇等^[9]曾在喹烯酮残留消除研究中以肝组织为靶组织,喹烯酮原形药为残留标示物,认为喹烯酮在猪使用上无需休药期. 本研究中猪只按体质量 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 多剂量给药后, Q4 的含量相对较高,给药后 6 h,在肝脏中达到最大浓度. 肌肉中 QCT 药时曲线下面积也相对较大,不同组织中其浓度也略高于 Q2. 比较 QCT 及其代谢物在几种组织中的消除半衰期可以发现肌肉组织中的半衰期相对较长,因 Q4 相关的理化性质、毒理学特征等目前尚不完全清楚,是以喹烯酮或是 Q2 或二者总量为残留标示物估算 QCT 的休药期,还需要进一步的研究. 从本研究结果看,在猪 QCT 残留靶组织选择应重点关注肝脏和肌肉组织.

参考文献:

- [1] 张书松,王春秀,高春生. 喹烯酮对早期断奶仔猪生长性能和腹泻的影响[J]. 河南农业科学,2007(9):112-113.
- [2] 王玉春,严相林,赵荣材,等. 新型添加剂喹烯酮的一般毒性研究:IV:亚急性毒性试验[J]. 中兽医医药杂志,1994(5):10-11.
- [3] 王玉春,赵荣材,严相林,等. 喹烯酮对小白鼠的致癌试验[J]. 中国兽医科技,1995,25(3):24-25.
- [4] 严相林,李金善,王玉春,等. 喹烯酮的 Ames 试验[J]. 中兽医医药杂志,1998(5):11-12.
- [5] 张伟,彭大鹏,黄玲利,等. 喹烯酮遗传毒性的研究[J]. 毒理学杂志,2007,21(4):335.
- [6] 刘兆颖. 喹恶唑类在大鼠、猪和鸡的比较代谢研究[D]. 武汉:华中农业大学,2009.
- [7] SHEN Jian-zhong, YANG Chun-yan, WU Cong-ming, et al. Identification of the major metabolites of quinocetone in swine urine using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010,24:375-383.
- [8] 胡桂敏. 喹烯酮在鲤体内的药代动力学及残留研究[D]. 武汉:华中农业大学,2008.
- [9] 李剑勇,李金善,徐忠赞,等. 喹烯酮在猪组织中的残留研究[J]. 动物医学进展,2004,25(4):117-120.
- [10] 李剑勇,李金善,徐忠赞,等. 喹烯酮在猪、鸡体内的药代动力学研究[J]. 畜牧兽医学报,2002,34(1):94-97.
- [11] 李剑勇,周绪正,张继瑜,等. 喹烯酮在猪体内的代谢物研究[J]. 动物医学进展,2005,26(9):77-79.
- [12] 李剑勇,李金善,徐忠赞,等. 高效液相色谱仪检测猪组织器官喹烯酮残留方法的建立[J]. 动物医学进展,2004,33(8):48-50.
- [13] 陈明,耿志明. 高效液相色谱法测定牛奶中林可霉素的残留量[J]. 食品科学,2008,28(12):572-574.
- [14] 赵明,曾明华,余林生,等. 高效液相色谱法检测蜂蜜中林可霉素残留的方法研究[J]. 蜜蜂杂志,2008,28(5):5-7.
- [15] CHIU M H, YANG H H, LIU C B, et al. Determination of lincomycin in urine and some foodstuffs by flow injection analysis coupled with liquid chromatography and electrochemical detection with a preanodized screen-printed carbon electrode[J]. Journal of Chromatography: B, 2009, 877(10):991-994.
- [16] EL-SOOU K A, GOUDAH A, EL-ATY A M A. Lack of pharmacokinetic interaction between lincomycin and aspirin in healthy goats[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2004, 27(5):389-392.
- [17] NIELSEN P, GYRD-HANSEN N. Bioavailability of spiramycin and lincomycin after oral administration to fed and fasted pigs[J]. J Vet Pharmacol ther,1998,4(21):251-256.
- [18] RIVIERE J E, PAPICH M G. Veterinary Pharmacology and Therapeutics [M]. 9th eds. Birmingham: Blackwell Pub, 2009:963-975.
- [19] EL-SAYED M G, EL-AZIZ I, EL-KOMY A A, et al. Serum concentrations and tissue residues of spectinomycin in chickens [J]. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 1995, 102:446-450.
- [20] 孙志良,黄兴国,毛学富,等. 盐酸林可霉素的体外抑菌及临床疗效研究[J]. 畜牧兽医杂志,2002,21(2):11-12.
- [21] 吴根福,吴雪昌,余斌,等. 大观霉素的研究进展及其在畜牧业中的应用[J]. 中国兽药杂志,2005,39(9):29-32.
- [22] 尚若锋,胡振英,罗永江,等. 盐酸林可霉素和硫酸大观霉素及其复方的体外抗菌试验[J]. 动物医学进展,2004,25(1):72-73.

【责任编辑 柴 焰】

【责任编辑 柴 焰】

(上接第247页)