

# 三聚氰胺在奥尼罗非鱼体内的药动学研究

蔡勤仁<sup>1,2</sup>, 曾振灵<sup>2</sup>, 彭玉芬<sup>1</sup>, 丁焕中<sup>2</sup>, 张毅<sup>1</sup>

(1 珠海出入境检验检疫局, 广东 珠海 519015; 2 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**采用高效液相色谱串联质谱内标定量法, 研究内服给药途径下, 三聚氰胺在奥尼罗非鱼 *Oreochromis aureus* × *O. niloticus* 体内的药动学特征. 按奥尼罗非鱼体质量 2.0 mg/kg 的剂量内服三聚氰胺后, 其血浆中药物浓度-时间曲线关系符合一级吸收-一室模型. 三聚氰胺在奥尼罗非鱼体内的主要药动学参数: 吸收半衰期( $t_{1/2ka}$ )为(0.24 ± 0.14) h; 消除半衰期( $t_{1/2ke}$ )为 14.33 h; 达峰时间( $t_{max}$ )为 1.42 h, 峰浓度( $C_{max}$ )为 0.26 mg · L<sup>-1</sup>, 平均滞留时间(MRT)为 18.01 h. 三聚氰胺在奥尼罗非鱼体内的主要药动学特征为: 吸收迅速, 达峰时间短, 消除比较缓慢.

**关键词:**三聚氰胺; 奥尼罗非鱼; 药动学

中图分类号: S859.79

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)01-0089-04

## Pharmacokinetics of Melamine in Hybrid Tilapia

CAI Qin-ren<sup>1,2</sup>, ZENG Zhen-ling<sup>2</sup>, PENG Yu-fen<sup>1</sup>, DING Huan-zhong<sup>2</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>

(1 Zhuhai Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China;

2 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Hybrid tilapias, *Oreochromis aureus* × *O. niloticus* were treated by oral administration of melamine in a single dose of 2.0 mg/kg. Melamine concentrations in hybrid tilapia plasma collected over 96 h following the treatment, were determined by HPLC-MS/MS, and pharmacokinetic parameters were analyzed using the computer program WinNonLin. It was shown that after a single dosage of oral administration, plasma melatonin concentration-time data could be described by one-compartment open model with first absorption. The main parameters were as follows:  $t_{1/2ka} = (0.24 \pm 0.14) h$ ,  $t_{1/2ke} = 14.33 h$ ,  $t_{max} = 1.42 h$ ,  $C_{max} = 0.26 mg \cdot L^{-1}$ ,  $MRT = 18.01 h$ . These parameters indicated that melamine were rapidly absorbed, slowly eliminated in hybrid tilapias.

**Key words:** melamine; hybrid tilapia; pharmacokinetics

三聚氰胺(Melamine)是一种氮杂环有机化工原料,近年来,因不法厂商将三聚氰胺添加到宠物食品和牛奶中引起宠物死亡和婴幼儿结石的事件而得到广泛关注<sup>[1-2]</sup>. 美国和我国政府都严禁在饲料或食品中添加该类物质,但三聚氰胺在鸡蛋、鸡肉、猪肉、鱼等动物源性食品中仍有检出<sup>[3-6]</sup>. 因此有必要阐明三聚氰胺在动物体内的药代动力学过程并对三聚氰胺做相应的风险评估. 三聚氰胺在大鼠和猪等动物体内的相关研究已见报道<sup>[7-9]</sup>,但在水产动物体内药动学的研究报道较少. 本试验选用我国南方大规模养殖的淡水鱼类奥尼罗非鱼 *Oreochromis aureus* × *O. niloticus* 进行了内服给药方式下三聚氰胺的药动学

研究,以期全面了解三聚氰胺在奥尼罗非鱼体内的药动学特征,为职能部门制定水产动物中三聚氰胺相关法律法规提供参考数据.

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂

三聚氰胺,纯度 99.0%,CAS 号为 108-78-1, sigma 公司. 三聚氰胺内标(Melamine-<sup>15</sup>N<sub>3</sub>),纯度 98.0%,由加拿大 Toronto research chemicals 公司提供. 甲醇和甲酸均为色谱纯(Merck),其他试剂均为广州化学试剂厂生产的分析纯.

收稿日期:2010-03-24

作者简介:蔡勤仁(1974—),男,博士;通信作者:曾振灵(1963—),男,教授,博士,E-mail:zizeng@scau.edu.cn

基金项目:珠海市科技攻关项目(PC20081001)

## 1.2 仪器与设备

Agilent 1200 高效液相色谱仪, API4000 Q-Trap 三重四级杆质谱仪 - 配有电喷雾离子源; Agilent 固相萃取仪; Hitachi CR22GII 高速冷冻离心机; Zymark TurboVap® LV 浓缩站; Siemens 冰箱; 恒温水浴振荡器等实验室常用设备。

## 1.3 试验动物

20 尾奥尼罗非鱼, 年龄在 5~6 个月之间, 购于珠海北极品有限公司。无明显疾病和肉眼可见畸形, 平均初始体质量 ( $245.2 \pm 25.0$ ) g, 抽样检查无三聚氰胺残留。试验开始前在实验室中喂养 20 d, 使其适应试验环境。饲养用水为曝气除氯的自来水, 喂养及试验期间饲喂鱼专用全价颗粒料, 日饲量为奥尼罗非鱼初始体质量的 2%, 多余的饲料用虹吸管吸出。试验期间不断充氧气并对水体进行循环过滤, 每日早晚投喂适量奥尼罗非鱼饲料各 1 次, 及时排出残饵和粪便, 每 2 d 换水 1/2 体积。试验期间奥尼罗非鱼成活率为 100%。

## 1.4 给药与血样采集

按体质量 2.0 mg/kg 给奥尼罗非鱼内服三聚氰胺, 将不回吐的个体用于试验。分别于给药后第 0、0.083、0.167、0.5、0.75、1、2、4、8、12、24、36、48、72、96 h 采血, 奥尼罗非鱼用抄网捞起, 用湿毛巾裹住鱼体, 尾静脉取血 0.3 mL, 放入事先加入 2 滴体积分数为 1% 肝素钠的 1.5 mL 塑料离心管中, 混合均匀后离心, 取上层血浆, 置于  $-20$  °C 保存。

## 1.5 样品处理

从冰箱中取出血浆样品, 解冻并混匀, 取 0.1 mL 血浆加入 50  $\mu$ L 内标溶液和 2 mL 体积分数为 2% 的三氯乙酸, 振荡混匀 2 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液待 SPE 净化。Waters Oasis MCX 柱分别用 3 mL 甲醇、水、0.03 mol/L 盐酸依次润洗, 加入提取的上清液, 用 3 mL 水、甲醇淋洗, 3 mL 体积分数为 5% 氨甲醇洗脱, 45 °C 吹氮浓缩至干。用 1.0 mL 体积分数为 70% 乙腈溶解, 过 0.22  $\mu$ m 有机滤膜, 供 LC-MS/MS 分析。

## 1.6 色谱和质谱条件

色谱柱: Agilent SB AQ, 2.1 mm  $\times$  150.0 mm, 3  $\mu$ m; 流动相: A 为 5 mmol/L 乙酸铵, B 为乙腈,  $V_A:V_B = 95:5$ , 等度洗脱, 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10  $\mu$ L。

离子源(Source): ESI(+); 雾化气 65 mL/min, 气帘气 20 mL/min, 辅助加热气 70 L/min, 辅助加热气温度 700 °C, 碰撞气 5 mL/min, 4 种气体均为氮气; 电离电压: 5.5 kV, 去簇电压 (Declustering potential, DP) 和碰撞能 (Collision energy, CE) 见表 1; Q1 和 Q3 均为单位分辨率。检测方式为多反应监测 (MRM) 模式。

表 1 部分仪器参数

Tab. 1 Partial parameters of MS/MS analysis for melamine

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能/eV	去簇电压/eV
三聚氰胺	127.1	85 <sup>1)</sup>	27	90
		68	40	90
三聚氰胺- <sup>15</sup> N <sub>3</sub>	130.0	87 <sup>1)</sup>	28	90

1) 标注的特征碎片离子是用来进行定量分析的离子。

在上述条件下, 三聚氰胺的重构离子色谱图见图 1~4。

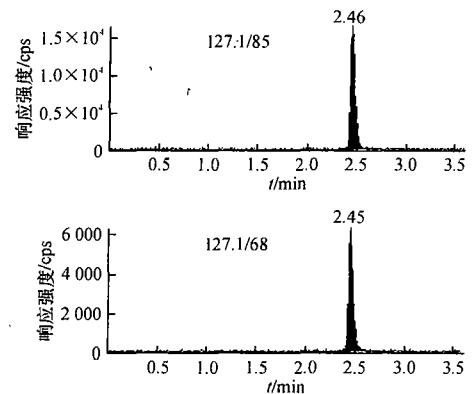


图 1 三聚氰胺标准品重构离子色谱图 (50  $\mu$ g/kg)

Fig. 1 Reconstituted ion chromatogram of melamine standard solution (50  $\mu$ g/kg)

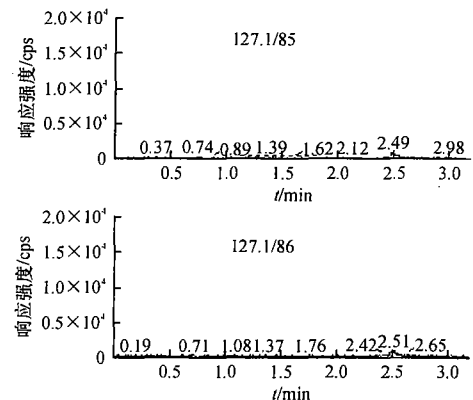


图 2 空白血浆重构离子色谱图

Fig. 2 Reconstituted ion chromatogram of blank plasma

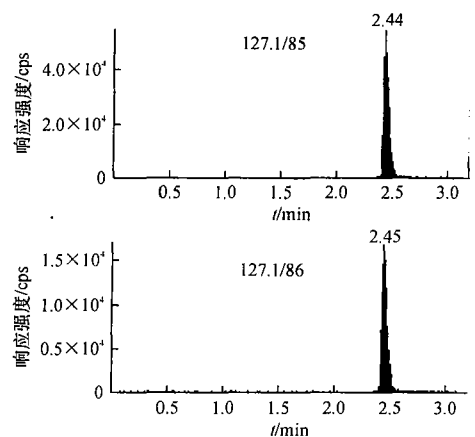


图 3 加标 50  $\mu$ g/kg 三聚氰胺重构离子色谱图

Fig. 3 Reconstituted ion chromatogram of plasma spiked melamine at 50  $\mu$ g/kg

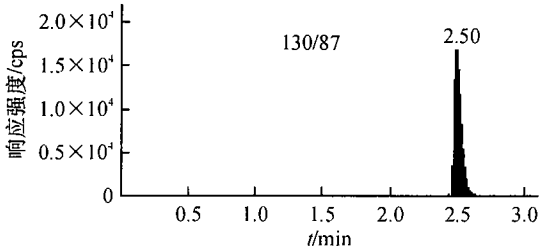


图 4 三聚氰胺内标重构离子色谱图

Fig. 4 Reconstituted ion chromatogram of internal

1.7 数据分析

三聚氰胺在奥尼罗非鱼体内实测血浆药物浓度-时间(Ci-ti)数据,采用 WinNonLin 药物动力学软件进行处理,并比较 AIC 值选择最佳模型,分别计算出三聚氰胺在鱼体内的药动学参数,再求出各参数的平均值和标准差.同时将三聚氰胺在鱼体内实测血浆药物浓度-时间数据(Ci-ti),采用非房室模型的统计矩原理来计算平均滞留时间(MRT).

2 结果

2.1 LC-MS/MS 检测方法的回收率、标准曲线和线性范围

在 8 支塑料离心管中各加入 0.1 mL 空白血浆,第一支管加入 0.11 mL 双蒸水作为空白对照,其余 7 支离心管中加入 50 μg/mL 内标溶液 10 μL 和标准溶液,制得三聚氰胺的质量浓度为 0.01 ~ 5 000 μg/L,再加入 2 mL 体积分数为 2% 的三氯乙酸,按 1.5 处理后进行 LC-MS/MS 分析.采用内标法定量,将待测物峰面积(A)与相应的质量浓度(C)作直线回归,求得回归方程和相关系数,重复 4 次.将一定量的三聚氰胺标准溶液加入鱼的空白血浆中,制得质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0 μg/mL 添加水平样品,并加入内标溶液,按 1.5 处理和测定.每个质量浓度做 5 个重复,共做 4 批.本方法检测限为 0.01 μg/mL,在 10 ~ 5 000 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999,向空白血浆中添加 0.1、0.5、1.0 μg/mL 3 个质量浓度水平三聚氰胺时,获得三聚氰胺的回收率、批内变异系数、批间变异系数分别为:95.1% ~ 99.5%、2.3% ~ 5.1%、5.0% ~ 10.3%.

2.2 鱼内服三聚氰胺后的血药浓度及药物动力学特征

奥尼罗非鱼单剂量内服给药后,不同时间血药浓度的实测值见表 2,血浆三聚氰胺浓度-时间曲线如图 5 所示,三聚氰胺在奥尼罗非鱼血浆中最佳药

物动力学模型为一级吸收-室模型,药动学参数见表 3.

表 2 奥尼罗非鱼内服三聚氰胺的血药浓度

Tab. 2 Plasma concentration of melamine after single p. o. administration in hybrid tilapia

t/h	血药浓度 <sup>1)</sup> /(mg · L <sup>-1</sup> )
0.083	0.08 ± 0.03
0.167	0.15 ± 0.04
0.5	0.18 ± 0.06
0.75	0.22 ± 0.07
1	0.28 ± 0.07
2	0.25 ± 0.05
4	0.23 ± 0.05
8	0.20 ± 0.04
12	0.13 ± 0.04
24	0.10 ± 0.03
36	0.05 ± 0.02
48	0.03 ± 0.02
72	0.01 ± 0.01
96	ND <sup>2)</sup>

1)表中数据为  $\bar{x} \pm SE, n = 20$ ; 2)未测得.

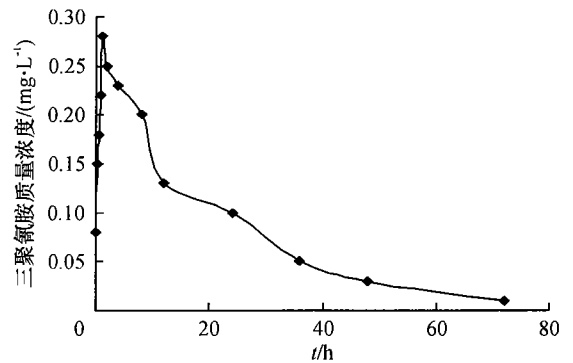


图 5 内服给药后三聚氰胺在奥尼罗非鱼血浆中药物时曲线  
Fig. 5 Melamine concentration-time profile in plasma following a single oral administration to carassius auratus

表 3 奥尼罗非鱼内服三聚氰胺后的药物动力学参数

Tab. 3 Pharmacokinetic parameters for melamine after single p. o. administration in hybrid tilapia (2.0 mg/kg)

参数 <sup>1)</sup>	数值 <sup>2)</sup>
Ka/h <sup>-1</sup>	3.68 ± 1.78
Ke/h <sup>-1</sup>	0.05 ± 0.02
AUC/[(mg · L <sup>-1</sup> ) · h]	5.71 ± 1.71
t <sub>1/2Ka</sub> /h	0.24 ± 0.14
t <sub>1/2Ke</sub> /h	14.33 ± 3.50
t <sub>max</sub> /h	1.42 ± 0.70
C <sub>max</sub> /(mg · L <sup>-1</sup> )	0.26 ± 0.05
MRT/h	18.01 ± 3.51

1)Ka 为吸收速率常数;Ke 为消除速率常数;AUC 为血药浓度-时间曲线下面积;t<sub>1/2Ka</sub> 为吸收半衰期;t<sub>1/2Ke</sub> 为消除半衰期;t<sub>max</sub> 为药物达峰时间;C<sub>max</sub> 为药物峰浓度;MRT 为平均滞留时间;2)表中数据为  $\bar{x} \pm SE, n = 20$ .

### 3 讨论

奥尼罗非鱼内服三聚氰胺(2.0 mg/kg)后鱼血浆中三聚氰胺的药时数据可以用一级吸收—室模型来解析,三聚氰胺吸收较快,吸收半衰期为0.24 h,在给药后2 h内,血浆中三聚氰胺质量浓度几乎成直线上升,1.5 h左右血药质量浓度即达到最高( $t_{\max}$ 为1.42 h, $C_{\max}$ 为0.26 mg·L<sup>-1</sup>),随后血药质量浓度缓慢下降,消除半衰期为14.33 h,96 h后基本检测不到. Mast等<sup>[10]</sup>通过经口给药方式一次性给予成年雄性 Fisher344 大鼠0.38 mg<sup>14</sup>C 标记的三聚氰胺,试验发现在给药前后24 h内,给药剂量的90%通过尿液进行排泄,肾脏和膀胱中的含量远远高于血液中的含量,膀胱中含量最高,血浆和尿液中的消除半衰期分别为2.71和3.0 h. Baynes等<sup>[11]</sup>通过静注给药方式按6.13 mg/kg的剂量一次性给予5头断奶仔猪三聚氰胺,药代动力学试验结果表明属于一级吸收—室模型,血浆消除半衰期为4.0 h,体清除率为0.11 L·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>,表观分布容积为0.61 L·kg<sup>-1</sup>. 在猪体内的三聚氰胺的表观分布容积为(0.61 ± 0.04) L·kg<sup>-1</sup>,与其体内总水份含量相当. 猕猴单剂量内服1.4 mg/kg三聚氰胺后用非房室模型分析,三聚氰胺平均达峰时间为2.67 h,最高血药浓度为1.77 μg/mL,消除半衰期为4.41 h<sup>[12]</sup>. 三聚氰胺是一个电离常数(pKa)为8.0,相对分子质量较小(126.12)的三嗪类物质,有研究表示极性小相对分子质量的胺类物质具有相类似的药动学性质<sup>[13]</sup>. 三聚氰胺在鱼体内消除半衰期为14.33 h,与大鼠、猪、猕猴等比较,其半衰期要长得多,其主要原因可能是由鱼体内的三聚氰胺体清除率要比大鼠、猪、猕猴等小所引起,这表明三聚氰胺在鱼以及其他动物间药动学参数有明显的种属间差异.

#### 参考文献:

- [1] FDA. Interim melamine and analogues safety; Risk Assessment [R/OL]. USA, Rockville: FDA, 2007 [2009-08-25] <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/07n-0208-ra00001.pdf>.
- [2] EFSA. EFSA provisional statement on request from the European Commission related to melamine and structurally related compounds such as cyanuric acid in protein-rich ingredients used for feed and food[R]. Parma: EFSA, 2007.
- [3] FILIGENZI M S, TOR E R, POPPENGA R H, et al. The determination of melamine in muscle tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(24): 4027-4032.
- [4] ANDERSEN W C, TUMIPSEED S B, KARBIWNYK C M, et al. Determination and confirmation of melamine residues in catfish, trout, tilapia, salmon and shrimp by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(12): 4340-4347.
- [5] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, 26(3): 339-342.
- [6] 祝伟霞, 袁萍, 杨冀州, 等. 亲水色谱-串联质谱法对牛奶与奶粉中三聚氰胺及其衍生物含量的测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(11): 2881-2921.
- [7] DOBSON R L, MOTLAGH S, QUIJANO M, et al. Identification and characterization of toxicity of contaminants in pet food leading to an outbreak of renal toxicity in cats and dogs[J]. Toxicol Sci, 2008, 106: 251-662.
- [8] CIANCIOLO R E, BISCHOFF K, EBEL J G, et al. Clinicopathologic, histologic, and toxicologic findings in 70 cats inadvertently exposed to pet food contaminated with melamine and cyanuric acid[J]. Am Vet Med Assoc, 2008, 233(5): 729-737.
- [9] BROWN C A, JEONG K S, POPPENGA R H, et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007[J]. Vet Diagn Invest, 2007, 19(5): 525-531.
- [10] MAST R W, JEFFCAOT A R, SADLER B W, et al. Metabolism, disposition and excretion of melamine in male fisher 344 rats[J]. Food Chem Toxicol, 1983, 21(6): 807-810.
- [11] BAYNES R E, SMITH G, MASON S E, et al. Pharmacokinetics of melamine in pigs following intravenous administration[J]. Food and Chemical Toxicology, 2008, 46(3): 1196-1200.
- [12] LIU Gang-yi, LI Shui-jun, JIA Jing-ying, et al. Pharmacokinetic study of melamine in rhesus monkey after a single oral administration of a tolerable daily intake dose[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2010, 56(2): 193-196.
- [13] SMITH J L, WISHNOK J S, DEEN W M. Metabolism and excretion of methyamines in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 125: 296-308.

【责任编辑 柴 焰】