

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.10.06

# 庆大霉素在羊体内代谢和残留消除规律研究

胡 剑<sup>1,2</sup>, 孙丰梅<sup>2</sup>, 张聪聪<sup>3</sup>, 李艳华<sup>1</sup>, 陈 刚<sup>3\*</sup>

(1.唐山市丰南区农牧局,河北唐山 063300;2.河北北方学院农林科技学院,河北张家口 075000;

3.中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,北京 100081)

[收稿日期] 2018-03-26 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 10-0039-11 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 为研究庆大霉素在羊体内代谢和残留消除规律,以 4 mg/kg 肌肉注射硫酸庆大霉素注射液,每日 2 次,代谢研究连续注射 2.5 d,残留消除研究连续注射 3 d。按动物试验要求采集肌肉、肝脏、肾脏、脂肪、血液、尿液和粪便,UPLC-MS/MS 法测定样品中庆大霉素的残留量。结果显示,庆大霉素在羊体内 1 h 可到血药峰浓度,尿液中的排泄总量占注射总量的 80%左右,粪便中不足 0.1%;在肝脏、肾脏、尿液中原型药总量占注射总量 90%以上,证明庆大霉素在羊体内不代谢,原型药随尿液排出体外;庆大霉素在肾脏中残留浓度最高且消除时间长,确定肾脏是庆大霉素在羊体内的靶组织,庆大霉素原型药为残留标示物。研究结果可为庆大霉素的安全使用以及正确制订其在羊组织中的最高残留限量标准提供科学依据和建议。

**[关键词]** 庆大霉素;羊;代谢;消除

## Study on Metabolism and Depletion of Gentamicin in Sheep

HU Jian<sup>1,2</sup>, SUN Feng-mei<sup>2</sup>, ZHANG Cong-cong<sup>3</sup>, LI Yan-hua<sup>1</sup>, CHEN Gang<sup>3\*</sup>

(1. Agriculture &amp; Animal Husbandry Bureau of Fengnan District, Tangshan, Hebei 063300, China;

2. Agriculture and Forest College of Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China;

3. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-Products, CAAS, Beijing 100081, China)

Corresponding author: CHEN Gang, E-mail: gang\_chen2012@126.com

**Abstract:** This study was aimed to explore the metabolism and elimination of gentamicin in sheep. Gentamicin were injected twice a day with a quantity of 4 mg per kilogram body weight (BW). The continuous injection was

**基金项目:** 农业部农业行业标准制修订项目(SY-98-3)

**作者简介:** 胡 剑,硕士研究生,从事食品安全检测技术研究。

**通讯作者:** 陈 刚。E-mail: gang\_chen2012@126.com

Ni L, Xu Q, Tong Y L, *et al.* Diagnosis and treatment of mixed infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2011, (3): 105-106.

[7] Giles C J, Magonigle R A, Grimshaw W T, *et al.* Clinical pharmacokinetics of parentally administered danofloxacin in cattle[J].

Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics, 1991, 14(4): 400.

[8] Turnidge J, Paterson D L. Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2007, 20(3): 391-408.

(编辑:侯向辉)

lasted for 2.5 days for metabolism study, and for 3 days for elimination study. The samples of muscle, liver, kidney, fat, blood, urine and stool were collected according to the requirement of animal experiment. The residues of gentamicin in different tissues were detected using UPLC-MS/MS. The results showed that the concentration of gentamicin in blood reached peak after one hour of injection. Approximately eighty percent of totally injected gentamicin was excreted via urine, and less than 0.1 percent was excreted via stools. More than 90% of gentamicin existed as prototype form in liver, kidney and urine, when comparing with the totally injected amount, exhibiting that gentamicin was not metabolized in sheep, and the drug was excreted as its original form via urine. Kidney is the highest with gentamicin residual concentration, and with longest elimination time, exhibiting that kidney is the target organ for gentamicin residue analysis in sheep. Our work can give further evidence for rational usage of gentamicin in sheep, and also provide basic data for establishing MRLs in sheep tissues.

**Key words:** gentamicin; sheep; metabolism; depletion

庆大霉素是由小单孢子属产生的多组分氨基糖苷类抗生素<sup>[1]</sup>, 主要由庆大霉素 C<sub>1</sub>、C<sub>1a</sub>、C<sub>2</sub> 和 C<sub>2a</sub> 组成, 分子量 475.9 (C<sub>1</sub>, 477.6; C<sub>2</sub>, 463.6; C<sub>1a</sub>, 449.5)<sup>[2-3]</sup>。可与硫酸结合成在临床上普遍使用的硫酸庆大霉素<sup>[4]</sup>, 其作用机制是与细菌核糖体 30S 亚基结合, 抑制细菌蛋白的合成, 并间接导致细菌细胞膜、细胞壁的缺损, 对静止期细菌杀灭作用较强, 且对许多致病菌有抗生素后效应<sup>[5-7]</sup>。对多种革兰氏阴性菌(大肠杆菌、变形杆菌、沙门氏菌等)和金黄色葡萄球菌均有抗菌作用<sup>[8]</sup>。肌肉注射后吸收迅速而完全。在 0.5~1 h 达血药峰浓度。皮下或肌内注射的生物利用度超过 90%<sup>[9]</sup>。主要用于治疗动物敏感的革兰氏阴性和阳性菌感染, 如败血症、泌尿生殖道感染、呼吸道感染、胃肠道感染、腹膜炎、乳腺炎及皮肤和软组织感染以及传染性鼻炎等<sup>[10-12]</sup>。我国农业部规定庆大霉素在牛、猪肌肉、脂肪、肝脏和肾脏的残留限量分为 100、100、2000、5000 μg/kg, 牛奶、鸡肉中的残留限量 200、100 μg/kg<sup>[13]</sup>, 但尚未制定其在羊组织中的最高残留限量标准。目前世界各国及国内尚未有开展羊组织中庆大霉素代谢和残留消除规律研究的报道。本文针对庆大霉素在羊体内的代谢分布及残留消除规律进行了研究, 确定庆大霉素在羊体内的残留靶组织和残留标示物, 以期安全使用兽药, 正确制订最高残留限量标准提供科学依据和建议。

## 1 材料与方法

1.1 材料与试剂 水:符合 GB/T 6682 规定, 一级

水;庆大霉素标准品(纯度≥94%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司);4%硫酸庆大霉素注射液,批号:B75140316,河北远征药业;甲醇、乙腈和甲酸(HPLC 级,美国 Dikma 公司);28%氨水(分析纯,国药集团化学试剂公司);三氯乙酸(纯度≥99%,北京百灵威科技有限公司);乙二胺四乙酸二钠(瑞士 Sigma Aldrich 公司);磷酸二氢钾(纯度≥94%,北京百灵威科技有限公司);乙酸铵(色谱纯,北京试剂公司);阳离子交换固相萃取柱 PCX(美国 Agilent 公司,60 mg,3 mL);HPH C8 色谱柱(3.0×100 mm,2.7 μm,美国 Agilent 公司)。

1.2 仪器与设备 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(Agilent 6470 MPLC-QQQ-MS/MS,美国 Agilent 公司);天平(德国梅特勒-托利多公司);漩涡混合仪(MS-3,德国 IKA 公司);高速冷冻离心机(德国 Thermo 公司);固相萃取装置;氮吹仪(TTL-DCII,北京同泰联公司);真空泵(美国 Agilent 公司);Millipore 纯化水系统(Milli-Q 公司)。

1.3 主要溶液的配制 氨化甲醇溶液:量取浓氨水 15 mL,用甲醇溶解并稀释至 100 mL;2%三氯乙酸提取液:称取磷酸二氢钾 1.36 g,用 980 mL 水溶解,分别加入乙二胺四乙酸二钠 0.15 g 和三氯乙酸 20 g,溶解混匀并定容至 1000 mL;2 mol/L 乙酸铵溶液:称取 15.416 g 乙酸铵,用水溶解并定容至 100 mL;庆大霉素标准贮备溶液:取庆大霉素标准品约 10 mg,精密称定,用水溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液,置 4 °C 避光静止保存;庆

大霉素标准工作液:准确量取庆大霉素标准贮备液一定量,用 0.3% 醋酸水稀释定容成 10、50、100、200、500、1000 ng/mL 的标准工作液,置 4 °C 冰箱中避光保存。

## 1.4 试验设计

### 1.4.1 庆大霉素在羊体内代谢研究

1.4.1.1 试验动物 动物:健康湖羊 5 只,平均 6 月龄,体重 20~30 kg,购自北京某羊场。空白对照组 1 只,试验组 4 只(对照组为♀,试验组 I、IV 为♀,II、III 为♂)。代谢笼饲养,自由采食饮水,适应 1 周,饲喂不添加任何抗菌药物的饲料,试验前后饲养条件相同。

1.4.1.2 给药方案 给药途径:羊颈部肌内注射(在同一侧注射),每日给药 2 次,连续给药 2.5 d;用法与用量:4 mg/kg×体重;第 1 天:上午 9:00;下午 3:00;第 2 天:上午 9:00;下午 3:00;第 3 天:上午 9:00;第 4 天上午 9:00 屠宰。

1.4.1.3 样品采集和保存 采样时严格遵守动物及动物产品兽药残留监控抽样规范<sup>[14]</sup>,每头羊取肌肉 300~500 g(腿肌),皮肤+脂肪 200~300 g,双肾各取 1/2(纵切),肝脏取整叶全肝。用绞肉机充分搅碎混匀;血浆:每日给药前及给药后 1、3、6、24 h 颈静脉采血,采集的血液经 4000 r/min 离心 10 min,吸取上清于 EP 离心管中;尿、粪便:收集给药后 0~6 h,6~12 h,12~24 h 全部的尿液和粪便,尿液不离心,直接保存,粪便保存前研磨并混合均匀,包装后-20 °C 保存。

### 1.4.2 庆大霉素在羊组织中消除规律研究

1.4.2.1 试验动物 动物:健康湖羊 22 只(♂ 11 只,♀ 11 只),平均 6 月龄,体重 20~30 kg,购自北京某羊场。空白对照组 1 只,试验组分 7 组,每组 3 只。代谢笼饲养,自由采食饮水,适应一周,饲喂不添加任何抗菌药物的饲料,试验前后各组饲养条件相同。

1.4.2.2 给药方案 给药途径:羊颈部肌内注射(在同一侧注射),每日给药 2 次,连续给药 3 d;用法与用量:4 mg/kg×体重;第 1 天:上午 9:00;下午 3:00;第 2 天:上午 9:00;下午 3:00;第 3 天:上午 9:00;下午 3:00。

1.4.2.3 样品采集和保存 最后一次给药后 1、3、5、7、10、20、30 d 分别随机宰杀 3 头,采样时严格遵守动物及动物产品兽药残留监控抽样规范,每头羊取肌肉 300~500 g(腿肌),皮肤+脂肪 200~300 g,双肾各取 1/2(纵切),肝脏取整叶全肝。用绞肉机充分搅碎混匀,包装后-20 °C 保存。

1.5 试验方法 采用实验室自建的超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)对样品进行测定。

1.5.1 样品前处理 称取样品 2±0.02 g 于 50 mL 离心管中,加 10 mL 磷酸盐缓冲液,涡旋混匀 1 min,超声 5 min,以 10000 r/min 离心 10 min。取上清液于另一 50 mL 离心管中。残渣再加磷酸盐缓冲液 4 mL,重复提取一次,合并两次提取液并定容至 15 mL,涡旋混匀,为备用液,供 SPE 净化。

PCX 阳离子交换柱依次用甲醇 5 mL 和水 5 mL 活化,取 7.5 mL 的备用液上柱,流干后,依次用水 5 mL 和甲醇 5 mL 淋洗,抽干,用氯化甲醇 5 mL 洗脱,收集洗脱液于 10 mL 塑料离心管中,于 40 °C 下用氮气吹干,用 0.3% 醋酸水溶液溶解并定容至 2 mL,充分涡旋,0.22 μm 滤膜过滤,滤液供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.5.2 色谱、质谱条件 色谱仪:seAgilent 1290 Infinity II;色谱柱:Agilent Poroshell HPH-C8(3.0×100 mm,2.7 μm);柱温 35 °C;流速:0.4 mL/min;进样量:5 μL;流动相 A:水相(50 mmol/L 乙酸铵、2% 氨水、0.2% 甲酸);流动相 B:乙腈。

质谱仪:Agilent 6470 三重四级杆 MS/MS;离子源:ESI+;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应检测;干燥气温度:250 °C;干燥气流速:7 L/min;雾化器:40 psi;鞘气流速:12 L/min;鞘气温度:350 °C;毛细管电压:3500 V;喷嘴电压:0 V。

## 2 结果与分析

2.1 庆大霉素在羊体内代谢研究 因庆大霉素在不同的羊组织、排泄物、血液中浓度范围相差很大,因此在定量过程中,对不同基质采取了合适的浓度范围进行定量,各基质在不同浓度范围内线性良好,定量方法可行,添加标准品的样品随样品上样做添加回收实验,计算方法回收率,结果见表 1,标准溶液和添加标准品样品色谱图见图 1 和图 2。

表 1 羊组织、排泄物、血液中庆大霉素的线性方程和回收率

Tab 1 Linear equations and recoveries of gentamicin in sheep tissues, excreta, and blood

样品 Samples	线性方程 Linear equations	线性范围 Linear range	相关系数 $R^2$	回收率 Recovery/%
肝脏	$Y = 388.04X - 2498.3$	10~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9992	94.55
肾脏	$Y = 14157X - 344299$	10~1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9998	88.98
肌肉	$Y = 7335.3X - 12576$	10~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9992	90.03
脂肪	$Y = 8507.4X + 11553$	10~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9993	90.62
粪便	$Y = 3596.6X - 23529$	10~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.9990	86.86
尿液	$Y = 9968.9X - 283501$	50~1000 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.9997	91.63
血液	$Y = 9712.2X - 66726$	10~500 $\mu\text{g}/\text{L}$	0.9999	96.81

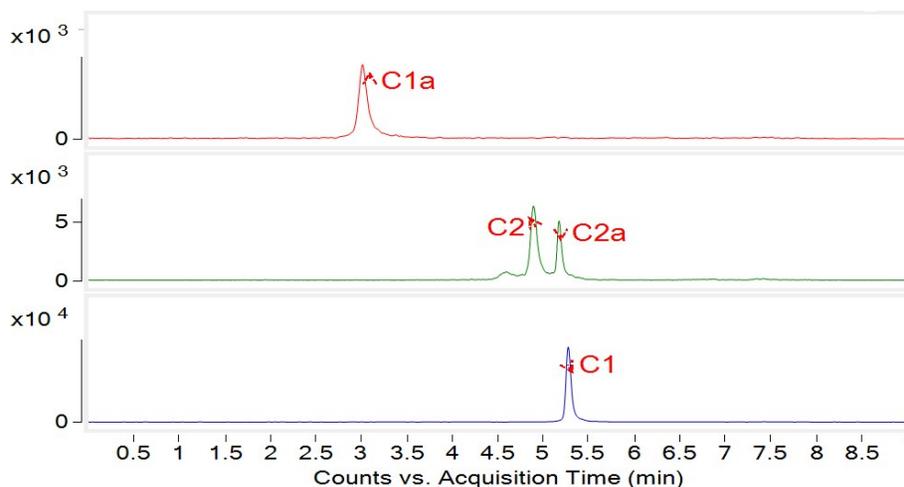


图 1 25 ng/mL 标准品溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of 25 ng/mL standard solution

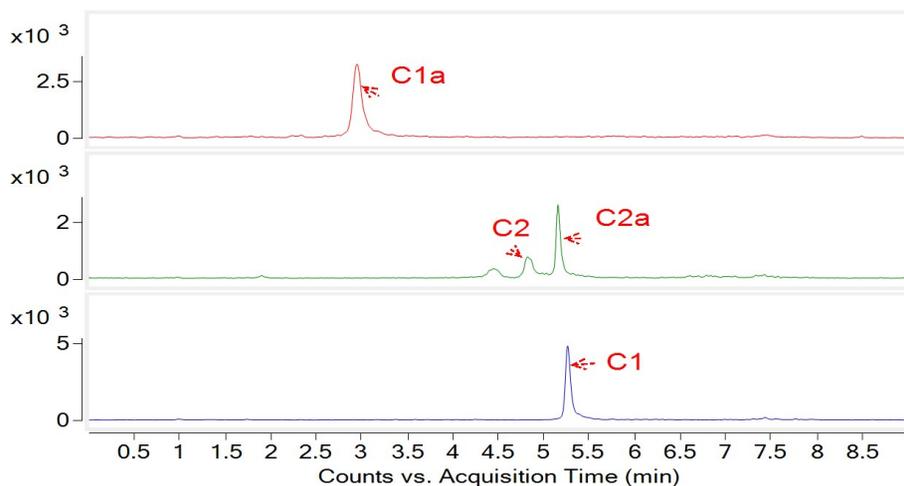


图 2 羊肾脏添加 50 ng/mL 标准品色谱图

Fig 2 Chromatogram of sheep kidney with a spiked concentration of 50 ng/mL

用药期间、停药期间庆大霉素在羊血液中的残留代谢规律见表 2。每日给药前及给药后 1、3、6、24 h 颈静脉采血,研究发现肌肉注射庆大霉素后在血液中 1 h 左右达血药峰浓度,最高血药浓度可达 133.23 mg/L,给药后 1~6 h 血药浓度迅速下降,再次给药,重复相同血药浓度变化规律;最后一次给药后,血药浓度不断下降,24 h 后检测的血药浓度仅为给药后 1 h 的 10%左右,表明庆大霉素通过肌肉注射进入羊体,首先进入到血液中,随后浓度降

低,可能随血液流动循环分布到各器官组织中。

同一剂量多次给药,用药和停药期间分别收集四只羊给药后 0~6、6~12、12~24 h 的粪便和尿液。由表 3 分析得出,庆大霉素在粪便中排泄量较低,没有明显的代谢规律,含量最高时仅有 168.6 μg;在尿液中,代谢规律明显,0~6 h 浓度最高,随之减少,连续注射药物呈现相同代谢变化规律。庆大霉素在尿液中的含量远远高于粪便,证明庆大霉素主要通过尿液排出体外。

表 2 羊血液中庆大霉素的残留浓度变化 (μg/L)

Tab 2 The variation in concentration of residue gentamicin in sheep blood

天数 Day	时间点 Time	浓度 Concentration/(μg · L <sup>-1</sup> )				x ± s
		I	II	III	IV	
1	08:50	ND	ND	ND	ND	ND
	10:00	11448.45	10164.73	1448.27	14284.46	9336.48±5533.32
	12:00	2045.73	1691.93	578.23	2798.87	1778.69±923.89
	15:00	362.84	324.09	129.10	551.45	341.87±173.16
	16:00	10444.16	9834.73	1448.91	14131.24	8964.76±5358.05
	18:00	2238.47	2009.39	685.17	4051.53	2246.14±1384.70
	21:00	459.31	382.06	141.43	606.06	397.22±194.19
	08:50	100.89	70.90	ND	76.88	62.17±43.42
2	10:00	12464.75	9919.80	1289.96	10818.41	8623.23±5001.13
	12:00	2893.61	2791.84	596.04	3660.01	2485.38±1317.82
	15:00	967.02	364.52	102.73	790.11	556.10±394.07
	16:00	12579.79	9533.45	1137.40	13009.03	9064.92±5506.83
	18:00	3183.54	2267.48	606.87	3679.80	2434.42±1351.54
	21:00	579.99	323.73	145.38	718.83	441.98±256.68
	08:50	94.73	69.37	36.76	88.92	72.45±26.15
	10:00	13323.10	9877.37	1376.90	12826.72	9351.02±5529.36
3	12:00	2814.65	2237.29	526.97	2989.16	2142.02±1123.2
	15:00	543.78	518.57	131.26	673.45	466.77±233.74
	16:00	533.56	524.45	91.33	388.50	384.46±206.37
	18:00	299.60	476.79	59.11	588.00	355.88±230.75
	21:00	273.03	97.51	41.65	124.94	134.28±98.78
4	09:00	123.98	162.32	61.84	187.39	133.88±54.65

每日 9:00、15:00 给药 2 次,连用 2.5 d。ND:未检出(Not Detected)  
administrated at 9:00 am, 15:00 pm, respectively, for 2.5 days

表 3 羊尿液、粪便中庆大霉素的残留浓度和排泄量

Tab 3 Residual concentration and excretion of gentamicin in urine and feces of sheep

动物编号 Animal No.	天数 Day	时间点 Time	残留浓度 Residual Concentration		体积和重量 Volume and Weight		排泄量 Excretion	
			尿液 $/(mg \cdot L^{-1})$	粪便 $/(mg \cdot kg^{-1})$	尿液/L	粪便/kg	尿液/mg	粪便/mg
I	1	9:00-15:00	101.33	0.008	0.599	0.325	60.70	0.003
		15:00-21:00	70.81	0.124	0.375	0.106	26.55	0.013
		21:00-9:00	25.91	0.043	0.526	0.335	13.63	0.015
	2	9:00-15:00	237.90	0.065	0.265	0.245	63.04	0.016
		15:00-21:00	239.47	0.087	0.245	0.226	58.67	0.020
		21:00-9:00	64.58	0.057	0.409	0.384	26.41	0.022
	3	9:00-15:00	503.52	0.632	0.115	0.233	57.90	0.147
		15:00-21:00	81.87	0.062	0.240	0.186	19.65	0.012
		21:00-9:00	13.31	0.718	0.405	0.235	5.39	0.169
排泄总量 Total amount of excretion (mg)							331.95	0.415
II	1	9:00-15:00	123.86	0.037	0.280	0.086	34.68	0.003
		15:00-21:00	1061.89	0.654	0.050	0.099	53.09	0.065
		21:00-9:00	74.75	0.267	0.390	0.360	29.15	0.096
	2	9:00-15:00	377.11	0.065	0.147	0.179	55.44	0.012
		15:00-21:00	689.78	0.157	0.101	0.172	69.67	0.027
		21:00-9:00	60.30	0.119	0.242	0.375	14.59	0.045
	3	9:00-15:00	525.99	0.082	0.095	0.196	49.97	0.016
		15:00-21:00	190.18	0.477	0.027	0.145	5.13	0.069
		21:00-9:00	46.61	0.262	0.120	0.200	5.59	0.052
排泄总量 Total amount of excretion e (mg)							317.32	0.385
III	1	9:00-15:00	ND	ND	ND	0.022	ND	ND
		15:00-21:00	1325.57	ND	0.060	0.041	79.53	ND
		21:00-9:00	126.23	0.044	0.310	0.135	39.13	0.006
	2	9:00-15:00	170.71	0.019	0.319	0.090	54.46	0.002
		15:00-21:00	177.27	0.067	0.275	0.132	48.75	0.009
		21:00-9:00	105.66	0.024	0.390	0.150	41.21	0.004
	3	9:00-15:00	195.95	0.015	0.238	0.087	46.64	0.001
		15:00-21:00	100.83	0.016	0.139	0.126	14.02	0.002
		21:00-9:00	19.72	0.015	0.400	0.245	7.89	0.004
排泄总量 Total amount of excretion(mg)							331.62	0.027
IV	1	9:00-15:00	114.38	0.025	0.870	0.173	99.51	0.004
		15:00-21:00	198.72	0.264	0.330	0.174	65.58	0.046
		21:00-9:00	14.72	0.093	0.420	0.572	6.18	0.053
	2	9:00-15:00	218.25	0.075	0.358	0.371	78.13	0.028
		15:00-21:00	212.48	0.168	0.372	0.333	79.04	0.056
		21:00-9:00	42.89	0.121	0.405	0.621	17.37	0.075
	3	9:00-15:00	288.67	0.096	0.230	0.453	66.39	0.043
		15:00-21:00	442.80	0.316	0.022	0.275	9.74	0.087
		21:00-9:00	16.36	0.088	0.588	0.736	9.62	0.065
排泄总量 Total amount of excretion(mg)							431.57	0.458

每日 9:00、15:00 给药 2 次,连用 2.5 d。ND: 未检出 (Not Detected)  
 administrated at 9:00 am, 15:00 pm, respectively, for 2.5 days

表 4 羊组织中庆大霉素的残留浓度 (µg/kg)

Tab 4 Residual concentration of gentamicin in sheep tissues (µg/kg)

动物编号 Animal No.	残留浓度 Residual Concentration			
	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	肌肉 Muscle	脂肪 Fat
I	1151.33	77633.52	21.45	125.53
II	1408.76	74773.57	21.07	12.29
III	1279.77	96947.47	57.56	30.07
IV	859.87	104120.07	25.32	104.46
$\bar{x} \pm s$	1174.93±234.87	88368.66±14396.44	31.35±17.58	68.09±55.32

通过表 4 研究发现,同一剂量多次给药,停药 24 h 后,同一时间点宰杀处理的肝脏、肾脏、肌肉、脂肪,经前处理后通过 UPLC-MS/MS 检测,结果显示庆大霉素在羊肾脏中残留浓度最高,其次是肝脏,肌肉和脂肪含量很少。

为证明庆大霉素在羊体内不代谢,以原型药的形式随尿液排出,在动物试验中,肝脏、肾脏两种主要药物代谢组织取样后称重(表 5),所有尿液、粪便(表 3)收集完全并记录,以此计算庆大霉素原型药总量占注射总量的比例。

表 5 肝脏、肾脏中庆大霉素的原型残留量 (mg)

Tab 5 The prototype residue of Gentamicin (mg) in liver and kidney

动物编号 Animal No.	残留浓度		重量		原型药残留量	
	Residual Concentration/(µg·kg <sup>-1</sup> )		Weight/g		Prototype residue/mg	
	肝脏	肾脏	肝脏	肾脏	肝脏	肾脏
I	1151.33	77633.52	311.75	67.41	0.36	5.23
II	1408.76	74773.57	418.89	84.27	0.59	6.30
III	1279.77	96947.47	432.88	75.54	0.55	7.32
IV	859.87	104120.07	350.30	80.79	0.30	8.41
$\bar{x} \pm s$	1174.93±234.87	88368.66±14396.44	378.46±57.27	77.00±7.33	0.45±0.14	6.82±1.36

表 6 肾脏、肝脏、尿液中原型药量占注射量的比例 (%)

Tab 6 The proportion of kidney, liver, urine prototype drugs accounted injection volume

动物编号 Animal No.	体重 Body Weight/kg	注射量 Injection Volume/mg	肝脏 mg /(94.55%)	肾脏 mg /(88.98%)	尿液 mg /(91.63%)	(肝脏+肾脏+尿液) /注射量×100%
I	21.00	420.00	0.38	5.88	362.27	87.7%
II	19.80	396.00	0.62	7.08	346.31	89.4%
III	20.60	412.00	0.59	8.23	369.91	90.0%
IV	25.50	510.00	0.32	9.44	470.99	94.3%
$\bar{x} \pm s$	21.73±2.57	434.50±51.31	0.48±0.15	7.66±1.53	387.37±56.61	(90.00±3)%

数据表明庆大霉素在羊肌肉、脂肪、粪便和血液中原型药量较少,通过方法回收率换算后的量远

低于 0.5 mg,可忽略不计。由表 6 得出,肝脏、肾脏、尿液的原型药量同样经过换算后,药量总和和分

别占注射量的 87.7%、89.4%、90.0%、94.3%，一般情况下，经过注射、口服等方式进入动物体内的药物，最终原型药量占总注射量的 90% 以上时，即可认为该药物在动物体内不被代谢转化，以原型药形式排出体外。

2.2 庆大霉素在羊体内消除规律研究 庆大霉素在羊组织中的残留量随给药后的时间变化以近似

负指数函数递减的规律变化，是按照一级动力学的过程在体内消除，即将组织中测得的药物浓度作对数转换后，与时间作回归分析，得到组织中药物浓度与时间消除曲线方程  $y = ax + b$  ( $y = \text{Ln}C$ ,  $b = \text{Ln}C_0$ )，庆大霉素在羊组织中残留浓度见表 7，残留消除曲线见图 3。

表 7 庆大霉素注射给药后在羊组织的残留浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Tab 7 Gentamicin residue concentrations ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in sheep tissues after intramuscular administration

休药期 Withdrawal time (day)	动物编号 Animal No.	肝脏/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	肾脏/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	肌肉/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	脂肪/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$
1	1-1	6009.70	160717.99	98.08	442.65
	1-2	3777.19	130699.68	96.85	396.18
	1-3	4572.86	85265.07	128.33	334.39
3		4786.58±1131.49	125560.91±37988.04	107.75±17.83	391.07±161.79
	3-1	3034.69	90666.49	60.01	136.58
	3-2	3536.88	135811.90	90.73	144.32
5	3-3	3722.76	63659.41	110.02	141.51
		3431.44±355.95	96712.60±36454.24	86.92±25.22	140.80±42.38
	5-1	2642.45	55252.46	77.12	66.49
7	5-2	2608.80	46745.32	60.97	126.65
	5-3	2769.34	21306.43	66.46	56.20
		2673.53±84.66	41101.40±17662.77	68.18±8.22	83.11±32.22
10	7-1	2315.98	21866.73	73.75	85.80
	7-2	1732.54	18671.20	43.12	82.83
	7-3	1139.49	17964.14	64.71	45.41
20		1729.34±588.26	19500.69±2079.33	60.53±15.74	71.35±23.44
	10-1	1484.21	8791.39	50.66	34.21
	10-2	1369.36	6678.59	38.46	26.57
30	10-3	1803.88	8464.35	36.86	23.30
		1552.48±225.16	7978.11±1137.24	41.99±7.55	28.03±13.20
	20-1	825.91	8080.14	36.33	25.92
ND	20-2	734.76	4283.64	39.17	ND
		780.33±64.45	6181.89±2684.53	37.75±2.01	
	30-1	833.70	3748.62	45.65	24.55
ND	30-2	496.34	3707.85	28.71	ND
	30-3	644.37	3383.93	28.23	ND
		658.14±169.10	3613.47±199.83	34.20±9.92	

ND: 未检出 (Not Detected)

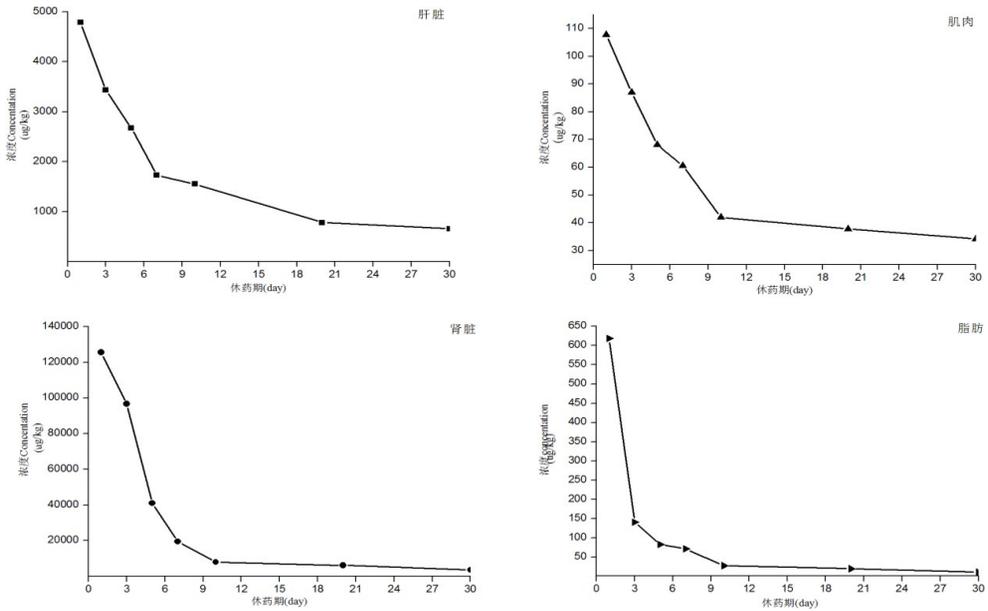


图 3 羊组织中庆大霉素的残留消除曲线

Fig 3 The residual elimination curve of gentamicin in sheep tissues

研究表明,按 8 mg/kg×体重连续给药 3 d,给药后 1 d 时各组织药物浓度均较高,尤以肝脏、肾脏为主,这两个组织可能是庆大霉素在羊体内的重要药理和毒理作用部位。

通过计算得出各组织中庆大霉素的残留消除参数(表 8)。庆大霉素在脂肪中的消除半衰期最短,肌肉中半衰期最长,第 1、3 天时,肌肉中的庆大霉素比脂肪中残留量少,但庆大霉素在肌肉中消除缓慢,30 d 还可检测出少量,在脂肪中消除迅速,30 d 已基本代谢完。

肝脏、肾脏中的庆大霉素残留浓度较高:第 20 天时,肝脏中的平均浓度为 780.33 μg/kg,肾脏为 6181.89 μg/kg;第 30 天时,肝脏中的平均浓度为 658.14 μg/kg,肾脏为 3613.47 μg/kg,和 EMA 报道的庆大霉素在牛、猪体内残留消除规律相近。肝脏和肾脏的消除半衰期也不同,在确定庆大霉素在羊体内的残留靶组织时要具体分析。

### 3 讨论

3.1 庆大霉素在羊体内分布和代谢特征 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测了庆大霉素在羊的主要组织、尿液、粪便和血液中的分布和代谢情况。按中国兽药典(2015 版)推荐的

表 8 羊组织中庆大霉素的残留消除参数

Tab 8 Residual elimination parameters of gentamicin in sheep tissues

组织 Tissues	消除方程 Elimination Equation	消除指数 Elimination Rate Constant/d <sup>-1</sup>	消除半衰期 Elimination Half Life/d
肝脏	C = 3641.8e <sup>-0.065x</sup>	0.065	10.66
肾脏	C = 71496e <sup>-0.115x</sup>	0.115	5.97
肌肉	C = 84.48e <sup>-0.036x</sup>	0.036	19.25
脂肪	C = 255.31e <sup>-0.172x</sup>	0.172	4.03

最大用量<sup>[15]</sup>肌肉注射,庆大霉素在羊体内 1 h 可到血药峰浓度;尿液排泄量最高,通过多次收集给药后 0、3、6 h 的尿液,检测发现尿液排泄总量占注射总量的 80% 以上,在粪便中不足 0.1%;停药 24 h 后,庆大霉素在肾脏中残留浓度最高,其次是肝脏,肌肉和脂肪含量很少,这和欧洲药品管理局 EMEA 对庆大霉素在牛体内代谢和分布的报道<sup>[16]</sup>一致,可能因为牛和羊同为反刍动物,二者代谢途径相似。参考庆大霉素在其他动物体内不代谢的报道<sup>[16-18]</sup>,将羊肝脏、肾脏、尿液全部称重、收集,保存检测,通过方法回收率换算,得出庆大霉素在羊肝脏、肾脏、尿液中原型药总量占注射总量 90% 以上,故得出结论:庆大霉素在羊体内的代谢途径主

要是经血液运输到肾脏并经肾小球吸收形成原尿,随尿液排出体外,在羊体内不代谢。与国内外庆大霉素在人、猪、牛体内的代谢报道一致。

**3.2 庆大霉素在羊体内残留标示物的确定** 残留标示物对兽药在动物体的代谢、消除、残留的监控和兽药食品安全具有重要的意义<sup>[19]</sup>。美国药品管理局(FDA)规定残留标示物是指在靶组织中占总残留的消除规律具有一定的相关性,且其较容易合成和提取检测的化合物,它可能是受试药物、可能是受试药物的一种代谢物或代谢物的结合物<sup>[20]</sup>。国际食品法典委员会(CAC)对庆大霉素猪、牛体内的残留标示物研究报道<sup>[21]</sup>,庆大霉素的残留标示物为母体药物(parent drug),也就是其原型药。通过分析表明本试验结果和CAC报道一致,因此,研究确定庆大霉素原型药作为庆大霉素在羊体内的残留标示物。

**3.3 庆大霉素在羊体内残留消除规律** 对羊肌肉、肝脏、肾脏和脂肪中庆大霉素的残留消除特征及消除规律进行了研究。以8 mg/kg×体重的剂量连续给药3 d后,按兽药残留取样规范要求,选取7个时间点宰杀动物,测定四种组织中庆大霉素的残留量。结果表明,四种组织中庆大霉素均有残留且残留浓度、消除速率不同,庆大霉素在脂肪中消除半衰期最短,肌肉中最长;给药1 d后,肾脏残留浓度最大,30 d后,四种组织中庆大霉素的残留浓度已降至我国现行庆大霉素在其他动物(猪、牛)组织中最高残留限量标准以下<sup>[13]</sup>。

**3.4 庆大霉素在羊体内残留靶组织的确定** 肝脏一般是动物体主要的药物代谢器官,对来自体内和体外的许多非营养性物质如各种药物、毒物以及体内某些代谢产物具有“解毒”、生物转化功能,来自血液或者其他组织的庆大霉素可能都需要经过肝脏的解毒功能;肾脏是形成尿液的器官,庆大霉素因通过肾脏排泄而蓄积,残留浓度最高。尿液的形成和排出相比较肝脏的解排毒等功能生物周期短,因此,肾脏的消除半衰期比肝脏短。优先考虑靶组织的残留浓度,结合庆大霉素具有肾毒性的毒性机理<sup>[22]</sup>,本研究确定肾脏作为庆大霉素在羊体内的

残留靶组织。

## 4 结 论

通过对庆大霉素在羊体内代谢和残留消除规律研究,表明庆大霉素在羊体内不代谢,在肾脏中形成原尿随尿液排出体外,肾脏可作为庆大霉素在羊体内的残留靶组织,庆大霉素原型药可作为残留标示物。研究结果可为评价兽药及其残留物的安全性,制定最高残留限量值,促进养殖业、食品加工业和贸易行业健康发展提供理论和技术支撑。

## 参考文献:

- [1] Alamoud A. I., Clark B. J., Chrystyn H. Determination of gentamicin in urine samples after inhalation by reversed-phase high-performance liquid chromatography using pre-column derivatisation with *o*-phthalaldehyde [J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 769 (1):89-95.
- [2] WHO. WHO Food Additives Series 41. The 50th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [S].
- [3] Tao Y, Chen D, Yu H, *et al.* Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2012, 135 (2):676-683.
- [4] Lehotay S J, Mastovska K, Lightfield A R, *et al.* Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1313 (19):103-112.
- [5] Zhu W X, Yang J Z, Wei W, *et al.* Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1207 (12):29-37.
- [6] Kaufmann A, Butcher P, Maden K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 711 (711):46-53.
- [7] Vucicevic-Prctic K, Cservenák R, Radulovic N. Development and validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry methods for the determination of gentamicin, lincomycin, and spectinomycin in the presence of their impurities in pharmaceutical formulations [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical*

- Analysis, 2011, 56 (4) :736-742.
- [ 8 ] Rok Grahek. Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry [ J ]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009, 50: 1037-1043.
- [ 9 ] 苏 晶, 汤立忠, 陈长毅, 等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定 9 种龙虾中氨基糖苷类和四环素类抗生素残留 [ J ]. 食品工业科技, 2016, 37(2) : 60-67.
- Jing S U, Tang L Z, Chen C Y, *et al.* Simultaneous determination of nine aminoglycosides and tetracyclines antibiotics residues in crayfish by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [ J ]. Science & Technology of Food Industry, 2016, 37(2) : 60-67.
- [ 10 ] Yang B, Wang L, Luo C, *et al.* Simultaneous Determination of 11 Aminoglycoside Residues in Honey, Milk, and Pork by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry and Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction [ J ]. Journal of Aoac International, 2017, 100(6) : 1869-1878.
- [ 11 ] Dasenaki M E, Michali C S, Thomaidis N S. Analysis of 76 veterinary pharmaceuticals from 13 classes including aminoglycosides in bovine muscle by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [ J ]. Journal of Chromatography A 2016, 1452:67.
- [ 12 ] Praveen Kumar, Antoni Rúbies, Ramon Companyó, Francesc Centrich. Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [ J ]. Journal of Separation Science, 2011, 35: 498-504.
- [ 13 ] 中华人民共和国农业部第 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留限量 [ S ].
- 235th Bulletin of The ministry of agriculture of the People's Republic of China. The Maximum limit of veterinary drug residues in animal food [ S ].
- [ 14 ] 中华人民共和国农业部. NY/T 1897-2010. 动物及动物产品兽药残留监控抽样规范 [ M ]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- The ministry of agriculture of the People's Republic of China. NY/T 1897-2010. Specification for veterinary drug residue monitoring sampling of animals and animal products [ M ]. Beijing: Standards Press of China, 2010.
- [ 15 ] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版 [ S ]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. China Veterinary Pharmacopoeia 2015 [ S ].
- [ 16 ] EMEA. European Public MRL assessment report ( EPMAR ) for gentamicin ( all mammalian food producing species and fin fish ) [ S ].
- [ 17 ] 简心韵, 邓子新, 孙宇辉. 氨基糖苷抗生素庆大霉素: 基础研究的新进展及应用研究的新潜力 [ J ]. 生物工程学报, 2015, 31(6) : 829-844.
- Jian X Y, Deng Z X, Sun Y H. Aminoglycoside gentamicin research: fundamental progress and new application prospects [ J ]. Sheng wu gong cheng xue bao = Chinese journal of biotechnology, 2015, 31(6) , 829-844.
- [ 18 ] 汪 宁, 张冬霞, 张素才, 等. 预测庆大霉素、多柔比星和腺嘌呤致大鼠肾损伤的生物标志物 [ J ]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(1) : 84-91.
- Wang N, Zhang D X, Zhang S C, *et al.* Biomarkers for kidney injury induced by gentamicin, doxorubicin and adenine in rats [ J ]. Chinese Journal of Pharmacology & Toxicology, 2015, 29(1) : 84-91.
- [ 19 ] Pompa G, Arioli F, Fracchiolla M L. Presence of residues in food of animal origin and related risk. [ J ]. Veterinary Research Communications, 2005, 29(2) : 113-116.
- [ 20 ] FDA. General Principles for Evaluating the Safety of Compounds Used in Food-Producing Animals. Guidance for Industry #3 [ S ].
- [ 21 ] CAC. Maximum Residue Limits ( MRLs ) and Risk Management Recommendations ( RMRs ) For Residues of Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 40th Session of the Codex Alimentarius Commission [ S ].
- [ 22 ] Kim S, Lesherperez S C, Kim B C, *et al.* Pharmacokinetic profile that reduces nephrotoxicity of gentamicin in a perfused kidney-on-a-chip [ J ]. Biofabrication, 2016, 8(1) : 15-21.

( 编 辑: 侯向辉 )