

喹乙醇在鸡组织的消除及残留研究

曾振灵 董漓波 陈杖榴

(华南农业大学动物医学系)

摘要 本文报道鸡多次内服(30mg/kg, 每隔12h 1次, 连用6次)及单剂量内服(120mg/kg)喹乙醇在肝、肾、肌肉及脂肪4种组织中的消除及残留的研究。用乙腈-乙酸乙酯(3/2, V/V)提取组织中的药物, 反相高效液相色谱法测定组织中喹乙醇的浓度。色谱条件: C₁₈-ODS柱(25cm×4.6cm); 流动相为甲醇-水(15/85, V/V); 流速1.0ml/min, 紫外检测波长260nm。鸡多次内服喹乙醇, 于第6次给药后在肝、肾、肌肉及脂肪中药物的消除半衰期分别是4.32、4.54、3.31及3.03h。若规定组织中喹乙醇的最高残留限量0.001mg/kg为可食用, 则休药期应为2.5d。内服单剂量喹乙醇(120mg/kg)后在肝、肾、肌肉及脂肪中药物的消除半衰期分别是16.16、15.19、12.37及11.05h, 若规定食用组织中喹乙醇的最高残留限量为0.001mg/kg, 则休药期应为8.5d。结果表明, 鸡内服中毒剂量的喹乙醇(120mg/kg)显著减慢其在体内的消除, 而延长在组织中的消除半衰期及残留时间。

关键词 喹乙醇, 鸡, 组织消除, 残留, 高效液相色谱法

喹乙醇是氧化喹噁啉类化合物, 具有促进动物生长、提高饲料转化率及广谱抗菌作用。国内外广泛用作饲料添加剂。《中国兽药典》(1990年版)已收载, 主要作为猪、禽的预混剂应用。但在家禽的应用中出现不少问题, 由于使用剂量过大或饲喂时间过长等原因, 引起鸡、鸭中毒的现象时有发生^[1-4]。关于喹乙醇在鸡组织中残留的报道, 国内外仍很少。FAO及WHO也未公布喹乙醇在家禽组织中的最高残留限量^[5]。为了较全面地了解喹乙醇在鸡组织的消除及残留状况, 为兽医临床的合理应用, 避免或减少毒副作用, 以及为食品卫生等方面提供可靠的理论依据。本试验对内服常用治疗剂量(30mg/kg, 每隔12h 1次, 连续使用6次)及内服引起鸡中毒的剂量(120mg/kg, 给药1次)后, 进行喹乙醇在鸡体内组织的消除及残留的研究。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂 美国 Beckman-344 型高效液相色谱(HPLC)仪, 165型可变双波长检测器, Kipp & Zonen BD 41 型记录仪。THZ-84型台式恒温振荡器, 上海跃进医疗器械厂生产; XW-80型旋涡混合器, 上海第一医学院仪器厂制造; 800型离心沉淀器, 上海手术器械厂产品; JC-3型超声处理机, 通化市超声设备厂出品。

喹乙醇粉(批号890603)为广东京南兽药厂生产, 含量98.47%, 喹乙醇对照品(批号881)由中国兽药监察所提供, 含量99.7%。甲醇、乙腈、乙酸乙酯、磷酸二氢钾、硫酸铵等均为分析纯。

* 收稿日期 1993-12-22。

1.2 试验动物 健康石歧杂肉鸡72只, 公母兼有, 体重 $1.72 \pm 0.19\text{kg}$, 随机分为12组, 每组6只。

1.3 实验方法

1.3.1 给药: 1~6组鸡以 30mg/kg 的剂量(每隔12h 1次, 连续使用6次)内服噻乙醇。7~12组按 120mg/kg 的剂量一次内服噻乙醇。给药方法是将噻乙醇装入胶囊中, 塞至舌根处, 让其自然咽下。

1.3.2 组织样品采集: 1~6组鸡分别于最后1次内服噻乙醇后6、8、10、12、16及24h剖杀; 7~12组分别于内服噻乙醇后12、24、36、48、60及72h剖杀, 迅速取出肝、肾、肌肉(胸肌)及脂肪, 分别装于塑料薄膜袋中, -20°C 冰箱保存。

1.3.3 组织中残留药物的萃取: 参考朱柱振等^[6]的方法作适当修改。取相当于 1.0g 组织(肝、肾、肌肉和脂肪)的匀浆置于 15ml 具塞试管内, 加 1ml 饱和硫酸铵溶液, 台式振荡器上振荡 10min , 离心 15min (4000 r/min) 后, 将上清液吸至另一 15ml 试管中, 加入 1.0ml 1mol/L 的磷酸二氢钾溶液, 加入提取液(乙腈:乙酸乙酯=3:2, V/V) 5ml , 振荡 20min , 离心 10min , 吸出有机相于另一试管中, 余液重复提取1次。合并有机相, 加入 0.2mol/L NaCl 溶液 1ml , 振荡 10min 后静置 10min , 吸出有机相并置于离心管中, 在 $60\sim 80^\circ\text{C}$ 砂浴上氮气缓慢蒸发有机相, 使其体积约为 1.5ml 时, 转移到 5ml 的离心管内。以 2ml 提取液冲洗原试管, 冲洗液加入离心管内, 用氮气吹干, -20°C 保存直至测定。测定前先用 $100\mu\text{l}$ 甲醇溶解样品, 然后以 $10\mu\text{l}$ 注 HPLC 进行检测。

1.3.4 组织中噻乙醇浓度的测定:

1.3.4.1 色谱条件: 色谱柱长 25cm , 内径 4.6mm , 固定相为 Altex Ultrasphere ODS- C_{18} ; 流动相为甲醇-水 ($15/85$, V/V); 流速 1.0ml/min ; 柱温室温; 紫外检测器波长 260nm ; 记录仪纸速为 2mm/min 。在上述条件下, 将噻乙醇用甲醇溶解后, 测得其保留时间为 7.8min , 而空白组织的提取液在上述保留时间无色谱峰。色谱图见图 1 (A)。

1.3.4.2 标准曲线的制备: 以空白组织匀浆(肝、肾、肌肉和脂肪)稀释噻乙醇对照品为 6.4 、 3.2 、 1.6 、 0.8 、 0.4 、 0.2 、 $0.1\mu\text{g/g}$ 的浓度, 按“1.3.3组织中残留药物的萃取”抽提噻乙醇, 作 HPLC 分析。将噻乙醇的色谱峰高与浓度作直线回归, 制备标准曲线 ($r = 0.9968\sim 0.9991$)。检出限为 10ng , 组织中的最低检出浓度为 $0.1\mu\text{g/g}$ 。

1.3.4.3 回收率的测定: 以空白组织匀浆稀释噻乙醇对照品为 6.4 、 3.2 、 1.6 、 0.8 、 0.4 、 0.2 、 $0.1\mu\text{g/g}$ 的浓度, 按“1.3.3”抽提噻乙醇, 进样 $10\mu\text{l}$ 作 HPLC 分析。同时还将噻乙醇对照品直接溶解在甲醇内, 使浓度为 64 、 32 、 16 、 8 、 4 、 2 、 $1\mu\text{g/ml}$, 进样 $10\mu\text{l}$ 作 HPLC 分析。用下式计算噻乙醇的绝对回收率。回收率是 $71.52 \pm 4.79\%$ 。

$$\frac{\text{组织药物萃取后残渣的峰高}}{\text{溶于甲醇的药物峰高}} \times 100\%$$

1.3.4.4 组织中残留噻乙醇的定量: 将给药后各时间点扑杀鸡的组织, 按“1.3.3”的方法抽提噻乙醇, 在前面所述的色谱条件下, 经 HPLC 分析获得噻乙醇的色谱峰高, 从标准曲线算得组织中残留噻乙醇的浓度。鸡肌肉组织提取液中噻乙醇的色谱图见图 1 (B)。

1.4 数据处理 计算给药后同一时间点6只鸡的肝、肾、肌肉和脂肪等各组织残留噻乙醇浓度的平均值±标准差, 再将各组织药物浓度的平均值-时间数据用 IBM 计算机进行非线性

最小二乘法回归处理, 计算消除相的初始浓度及消除速率常数。

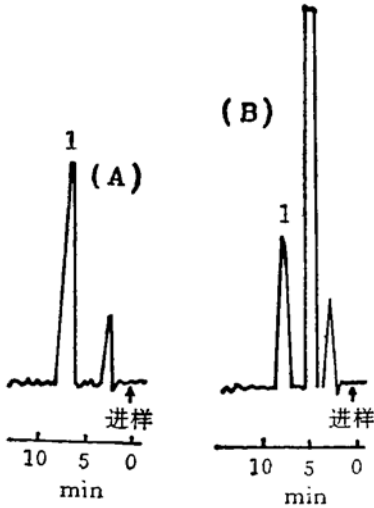


图 1 喹乙醇(1)的高效液相色谱图。

(A) 于甲醇中的喹乙醇; (B) 鸡内服喹乙醇后, 肌肉组织提取液中的喹乙醇。

Fig 1. High performance liquid chromatogram of olaquinox(1). (A) In methanol; (B) Extract of chicken muscle after oral administration.

2 结果

2.1 鸡多次内服治疗剂量喹乙醇后的组织残留及消除

以 30mg/kg 剂量给鸡内服喹乙醇, 每 12h 1 次, 连用 6 次, 第 6 次给药后, 各时间点扑杀鸡的组织药物浓度见表 1。经计算机回归处理, 肝、肾、肌肉和脂肪组织药物浓度 (C) 与时间 (t) 关系的消除曲线方程可用下述数学表达式描述:

$$C_{\text{肝}} = 14.50e^{-0.1065t}$$

$$C_{\text{肾}} = 5.91e^{-0.1525t}$$

$$C_{\text{肌肉}} = 11.56e^{-0.2093t}$$

$$C_{\text{脂肪}} = 2.51e^{-0.2287t}$$

消除曲线方程的相关系数、消除半衰期及组织达到某一浓度的理论残留时间见表 2。

2.2 鸡一次内服中毒剂量喹乙醇后的组织残留及消除

以 120mg/kg 剂量给鸡 1 次内服喹乙醇后, 各时间点扑杀鸡的组织药物浓度见表 3。经计算机回归处理, 肝、肾、肌肉和脂肪组织的药物浓度与时间关系的消除曲线方程可用下述数学表达式描述:

$$C_{\text{肌}} = 4.95e^{-0.0429t}$$

$$C_{\text{肾}} = 3.49e^{-0.0450t}$$

$$C_{\text{肌肉}} = 3.13e^{-0.0560t}$$

$$C_{\text{脂肪}} = 1.15e^{-0.0627t}$$

消除曲线方程的相关系数、消除半衰期及组织达到某一浓度的理论残留时间见表 4。

3 讨论

鸡多次内服常用治疗剂量的喹乙醇 (30mg/kg, 每隔 12h 1 次, 连用 6 次), 第 6 次给

药后肝、肾、肌肉及脂肪的消除速率常数分别是0.1605、0.1525、0.2093及0.2287 h⁻¹，消除半衰期分别是4.32、4.54、3.31及3.03 h。这表明，内服常用治疗剂量的喹乙醇在鸡体内组织的消除较快，从4种组织消除的速率为脂肪>肌肉>肾脏<肝脏。最后1次内服给药后24 h的组织药物浓度，肝、肾、肌肉及脂肪分别为0.24、0.11、0.13及<0.1 μg/g。这一结果与朱柱振等报道鸡内服单剂量(30 mg/kg)喹乙醇的组织药物浓度结果^[6]相似。郭文欣等报道AA鸡内服单剂量(50 mg/kg)喹乙醇在心、肝、肾和肌肉组织的消除半衰期分别是1.96、2.89、3.11及1.77 h^[7]。上述结果均表明，鸡内服治疗量的喹乙醇后药物从机体组织的消除较快。因此，生产上若严格使用治疗量的喹乙醇，鸡中毒的可能性是很小的。

表1 鸡多次内服喹乙醇(30 mg/kg, 每隔12 h 1次, 连用6次), 第6次给药后的组织药物浓度(μg/g)

Table 1 Tissue concentrations of olaquinox after the sixth dose of multiple oral administration (30 mg/kg, every 12 hours for 6 doses) in chickens

时间(h) Time	组织 Tissues	肝 Liver	肾 Kidney	肌肉 Muscle	脂肪 Fat
	6		5.48±1.93*	2.33±0.70	3.26±1.86
8		4.14±0.82	1.83±0.50	2.30±0.36	0.44±0.20
10		2.97±0.40	1.28±0.34	1.38±0.41	0.22±0.06
12		1.86±0.28	0.86±0.15	0.76±0.14	0.15±0.03
16		1.28±0.21	0.58±0.17	0.54±0.15	0.08±0.07
24		0.24±0.15	0.11±0.05	0.13±0.08	ND**

* 数据为6只鸡的平均值±标准差。Each value is the mean±SD of six chickens.

** ND = not detectable (测不到)

表2 鸡多次内服喹乙醇(30 mg/kg, 每隔12 h 1次, 连用6次), 第6次给药后药物在鸡组织中的消除

Table 2 Elimination of olaquinox after the sixth dose of multiple oral administration (30 mg/kg, every 12 hours for 6 doses) in chicken tissues

组 织 Tissues	消除速率常数(h ⁻¹) Rate of elimination constant	相关系数(r) Correlation coefficient	消除半衰期(h) Elimination of half-life	理论残留时间(h) Calculated residue time			
				0.1*	0.05*	0.01*	0.001*
肝 Liver	0.1605	0.997	4.32	31.01	35.33	45.35	59.70
肾 Kidney	0.1525	0.997	4.54	26.75	31.29	41.85	56.95
肌肉 Muscle	0.2093	0.995	3.31	22.70	26.01	33.70	44.70
脂肪 Fat	0.2287	0.993	3.03	14.09	17.12	24.16	34.23

* mg/kg

表 3 鸡内服单剂量喹乙醇 (120 mg/kg) 后的组织药物浓度 ($\mu\text{g/g}$)

Table 1 Tissue concentrations of olaquinox after single oral administration (120mg/kg) in chickens

时间(h) Time	组织 Tissues	肝 Liver	肾 Kidney	肌肉 Muscle	脂肪 Fat
	12		2.93 \pm 0.59*	1.99 \pm 0.37	1.61 \pm 0.35
24		1.85 \pm 0.37	1.21 \pm 0.17	0.78 \pm 0.19	0.27 \pm 0.09
36		1.01 \pm 0.29	0.73 \pm 0.38	0.41 \pm 0.15	0.13 \pm 0.07
48		0.67 \pm 0.13	0.35 \pm 0.09	0.25 \pm 0.05	0.02 \pm 0.04
60		0.35 \pm 0.11	0.19 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03	ND**
72		0.16 \pm 0.05	0.06 \pm 0.07	ND	ND

* 数据为 6 只鸡的平均值 \pm 标准差。Each value is the mean \pm SD of six chickens.

** ND = not detectable (测不到)

表 4 鸡内服单剂量喹乙醇 (120mg/kg) 后药物在鸡组织中的消除

Table 4 Elimination of olaquinox after single oral administration (120mg/kg) in chicken tissues

组 织 Tissues	消除速率常数 (h^{-1}) Rate of elimination constant	相关系数 (r) Correlation coefficient	消除半衰期 (h) Elimination of half-life	理论残留时间 (h) Calculated residue time			
				0.1*	0.05*	0.01*	0.001*
肝 Liver	0.0429	0.999	16.16	90.96	107.11	144.63	198.30
肾 Kidney	0.0456	0.998	15.19	77.91	93.11	128.40	178.90
肌肉 Muscle	0.0560	0.999	12.37	61.49	73.87	102.61	143.73
脂肪 Fat	0.0627	0.995	11.05	38.95	50.01	75.68	112.40

* mg/kg

鸡 1 次内服高剂量 (120mg/kg) 的喹乙醇后, 其从肝、肾、肌肉及脂肪的消除速率常数分别为 0.0429、0.0456、0.0560 及 0.0623 h^{-1} , 消除半衰期分别为 16.16、15.19、12.37 及 11.05 h。与鸡多次内服 (30mg/kg, 每隔 12 h 1 次, 连用 6 次) 喹乙醇从各种组织中的消除半衰期比较, 其消除半衰期显著延长。Busch 等报道给犊牛饲喂含 240、600 及 1200ppm 喹乙醇的牛奶代用品后, 血浆峰浓度分别是 1.299、2.353 及 281.1 $\mu\text{g/L}$, 药时曲线下面积分别是 8.449、14.684 及 1276.883 $\mu\text{g}\cdot\text{h/L}$, 表明牛奶代用品喹乙醇的含量达到中毒剂量 1200 ppm 时, 喹乙醇在犊牛血浆的消除受到限制^[8]。根据董漓波报道, 鸡内服喹乙醇的半数致死量 (LD_{50}) 为 304mg/kg^[9], 故本文中应用的一次内服 120mg/kg 的剂量已达到鸡中毒水平。喹乙醇中毒主要引起肝脏和肾脏的病变^[9-10]。由于喹乙醇大部分通过肾脏排出体外,

肝脏是其主要的代谢场所^[5]。因此, 作者认为, 鸡内服高剂量 (120mg/kg) 喹乙醇所致的肝和肾功能障碍, 可能是引起鸡内服高剂量喹乙醇后的组织消除半衰期比内服治疗剂量 (30mg/kg) 喹乙醇的组织消除半衰期显著延长的主要原因。我们曾测定过喹乙醇中毒死亡鸡组织中的药物浓度, 其中肝中的浓度达 8~25 μ g/g, 肾中的浓度也高达11.2~30 μ g/g。由于内服治疗剂量的喹乙醇在鸡体内消除很快, 而在内服中毒剂量的情况下, 则消除减慢; 同时喹乙醇还具有中等至明显的蓄积毒性^[9~11]。因此, 为避免喹乙醇中毒, 建议在兽医临床上使用时, 务必遵循推荐剂量, 切勿随意加大剂量。

测定猪组织中喹乙醇残留量的液相色谱法已有报道^[12]。本研究对使用的分离柱、流动相及紫外检测波长等色谱条件作了改动, 使肝、肾、肌肉及脂肪组织中的喹乙醇能与杂质峰较好分离, 而且又不影响测定。此外, 还将组织药物萃取液由乙腈-乙酸乙酯混合液代替乙腈, 使回收率明显提高。但本法的灵敏度尚不很理想, 最低组织检出浓度为 0.1 μ g/g。作为组织残留的测定还可进一步完善或通过增加组织量进行萃取而提高灵敏度。

1993年, 我国农业部根据国际食品中兽药残留立法委员会 (CCRVDF) 的规定起草了猪组织中喹乙醇的最高残留限量 (MRLs): 肌肉、肝和肾中均为 0.05mg/kg; 澳大利亚规定猪和家禽肌肉中喹乙醇的 MRLs 均为 0.3mg/kg。然而国内及 FAO 和 WHO 均未公布喹乙醇在鸡组织中的 MRLs。若按 30mg/kg 的剂量给鸡内服, 计算组织中喹乙醇浓度为 0.10、0.05、0.01及 0.001mg/kg 所需的时间, 肝分别是31.01、35.33、45.35及 59.70 h; 肾分别为26.75、31.29、41.85及 56.95 h; 肌肉分别是22.70、26.01、33.70及 44.70 h; 脂肪分别为14.09、17.12、24.16及34.23 h。若规定组织中喹乙醇的 MRLs 是0.001mg/kg 为可食用, 则制订的休药期为 2.5 d; 但若鸡按 120mg/kg 剂量内服, 则休药期应为8.5 d。

参 考 文 献

- [1] 黄玉廷. 鸭喹乙醇中毒. 中国兽医杂志, 1991, 17(7):34.
- [2] 赵凤荣等. 鸭喹乙醇中毒. 黑龙江畜牧兽医, 1992, (8):28.
- [3] 董漓波. 鸡群发生喹乙醇中毒的调查. 动物毒物学, 1988, 3(1):6~7.
- [4] 王叔姿. 一起肉鸡喹乙醇中毒事故. 畜牧与兽医, 1989, 21(2):91.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO food and nutrition paper 41/3. 1991, 85~96.
- [6] 朱柱振等. 喹乙醇在鸡体内的药物动力学及组织浓度研究. 畜牧兽医学报, 1993, 24(3):259~264.
- [7] 郭文欣等. 喹乙醇在肉鸡体内的组织动力学与残留的研究. 黑龙江畜牧兽医, 1992, (10):1~2.
- [8] Busch A et al. Results of toxicokinetic studies with olaquinox on calves. In veterinary pharmacology, toxicology and therapy in food producing animals. Ed F. Simon. The University of Veterinary Science, Budapest, Hungary. 1988, 99.
- [9] 王树槐等. 喹乙醇亚慢性毒性试验. 中国兽药杂志, 1991, 25(4):13~14.
- [10] 董漓波. 喹乙醇对鸡的急性毒性试验. 动物毒物学, 1989, 4(1):30~31.
- [11] 徐士新等. 喹乙醇蓄积性毒性试验. 中国兽药杂志, 1992, 26(2):22~24.
- [12] Tomoko Negata et al. Determination of olaquinox residues in swine tissues by liquid chromatography. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1987, 70(4):706~707.

STUDIES ON ELIMINATION AND RESIDUES OF OLAQUINDOX IN CHICKEN TISSUES

Zeng Zhenling, Dong Libo, Chen Zhangliu
(*South China Agricultural University,*
Guangzhou, P. R. China)

Abstract

Elimination and residues of olaquinox in chicken tissues were studied after multiple oral administration (30mg/kg, every 12h for 6 doses) and single oral administration (120mg/kg). Olaquinox in tissues (liver, kidney, muscle and fat) was extracted with acetonitrile—ethyl acetate (3/2, v/v). The tissue concentrations of olaquinox were determined using reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with the following conditions: The mobile phase consisted of methanol—deionized water (15/85, v/v), and flowed at a rate of 1.0ml/min, wavelength of UV detector was 260 nm. Elimination half-life of olaquinox in liver, kidney, muscle and fat was 4.32, 4.51, 3.31 and 3.03h, respectively, after the sixth dose of multiple oral administration (30mg/kg). Withdrawl time was 2.5 days if the above four tissues with 0.001mg/kg olaquinox were not consumed for human. Elimination half-life of olaquinox in liver, kidney, muscle and fat was 16.16, 15.19, 12.37 and 11.05h, respectively, after single oral administration (120mg/kg). Withdrawl time was 8.5 days if the above four tissues with 0.001mg/kg olaquinox were not consumed for human. The results show that the toxic dosage olaquinox (120mg/kg) slowed the elimination of the drug in chicken, and thus prolonged the elimination half-life and residue time of olaquinox in chicken tissues.

Key words Olaquinox, Chicken, Tissue elimination, Residue, HPLC