


 农牧渔业

加米霉素注射液在猪体内残留消除研究

邓菲 段鹏 孙晓蒙*

(华北制药集团动物保健品有限责任公司, 石家庄 050041)

摘要: **目的** 为了探讨自制加米霉素注射液在猪体内的残留消除规律, 验证休药期。**方法** 本试验将选取体质健康的 28 头猪, 随机分为 2 组, 对照组 4 头, 试验组 24 头。试验组猪按 6mg/kg B.W. 单次肌注射加米霉素, 对照组不做处理。在注射后第 0.5、7、14、21、28 和 35d 时, 采集肌肉、肝脏、肾脏、皮脂及注射部位肌肉。UPLC-MS/MS 法测定组织中的加米霉素残留量, 并用 WT 1.4 软件计算休药期。**结果** 加米霉素在猪肌肉、肝脏、肾脏、皮脂和注射部位肌肉的休药期分别是 9.68、11.62、17.37、24.35 和 26.75d。**结论** 为保证兽药使用安全、食品安全, 推荐加米霉素注射液在猪的休药期为 27d。

关键词: 加米霉素; 残留; 猪; 休药期

中图分类号: R96; S859.79*6 **文献标志码:** A

Residue depletion study of gamithromycin injection in swine

Deng Fei, Duan Peng and Sun Xiao-meng

(North China Pharmaceutical Group Animal Health Products Company with Limited Liability, Shijiazhuang 050041)

Abstract In order to explore the residual elimination characteristics of gamithromycin injection in swine, the duration of withdrawal was verified. The experiment selected 32 healthy swine to be randomly divided into two groups, two in the control group and 30 in the treatment group. Swine were single muscle injected with 6mg/kg B.W in the treatment group. The control group did not deal with it. On 0.5, 7, 14, 21, 28 and 35d after the injection, muscle, liver, kidney, sebum, and injection site muscles were collected. The concentrations of residues of gamithromycin in tissues were determined using UPLC-MS/MS, and WT1.4 software was used to calculate the withdrawal time. The results showed that, the withdrawal periods of gamithromycin in swine muscle, liver, kidney, sebum, and injection site muscles were 9.68, 11.62, 17.37, 24.35 and 26.75d. To ensure the safe use of veterinary drugs and food safety, the recommended time for the withdrawal of gamithromycin injection is 27d in swine.

Key words Gamithromycin; Residue; Swine; Withdrawal time

加米霉素 (gamithromycin) 属氮杂内酯类抗生素, 是由法国梅里亚 ((MERIAL) 公司研发的最新动物专用大环内酯类半合成抗生素^[1]。2008 年, 加米霉素注射液首次在欧盟被批准用于治疗溶血曼氏菌、多杀巴氏菌、睡眠嗜组织菌等引起牛呼吸系统疾病 (BRD)。

为了打破国外对国内加米霉素的垄断地位, 华

北制药集团动保公司成功仿制出加米霉素注射液, 经过大量的试验研究证明, 本产品除了可以治疗牛的 BRD 外, 也可以防治由胸膜肺炎放线杆菌、多杀性巴氏杆菌、副猪嗜血菌及链球菌引起的猪呼吸系统疾病 (SRD), 其在靶动物体内具有吸收快、分布广、安全高效、残留低等特点^[2-6]。为了更深一步了解国产加米霉素注射液在猪体内残留时间。因此, 本试

收稿日期: 2018-10-11

作者简介: 邓菲, 女, 生于 1980 年, 硕士。研究方向为新型抗生素及原药制剂技术。

* 通讯作者, E-mail: 1006823712@qq.com

旨在通过对猪注射加米霉素, 探讨其在猪体内的残留消除时间, 以期科学制定休药期, 指导合理临床用药, 保障动物源性食品安全提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验药品与试剂

加米霉素注射液, 含量 150mg/mL, 批号: GMM03-1-GMM2, 由华北制药集团动物保健品有限责任公司提供; 加米霉素对照品 (加拿大 TRC 公司, 含量 $\geq 99.0\%$); 加米霉素-D5 对照品 (加拿大 TRC 公司, 含量 $\geq 94.0\%$); 乙腈、甲醇、甲酸为色谱级 (德国 Merck 公司); MCX 固相萃取柱 (Waters 公司, 60mg³/mL)。

1.2 仪器和设备

液相色谱-串联质谱仪, 配有电喷雾离子源 (美国 Waters 公司); BS-201S 型电子天平 (北京赛多利斯公司); DC12H 型氮吹仪 (上海安谱科学仪器有限公司); 3K30 型低温高速离心机 (德国 Sigma 公司); WH-3 型微型旋涡混匀仪 (上海沪西分析仪器厂); 24 通道固相萃取装置 (上海安谱科学仪器有限公司)。

1.3 主要试液配制

加米霉素标准储备液 (50 μ g/mL): 精密称取加米霉素对照品 2.5mg, 于 50mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 混匀即得 (-20 $^{\circ}$ C 保存)。

加米霉素标准工作液 (10 μ g/mL): 精密量取 50 μ g/mL 的加米霉素标准储备液 20mL, 于 100mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 混匀即得 (4 $^{\circ}$ C 保存)。

加米霉素-D5 标准储备液 (10 μ g/mL): 精密称取加米霉素-D5 对照品 1mg, 于 100mL 量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 混匀即得 (-20 $^{\circ}$ C 保存)。

加米霉素-D5 标准工作液 (1 μ g/mL): 精密量取 10 μ g/mL 的加米霉素-D5 标准储备液 10mL, 于 100mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 混匀即得 (4 $^{\circ}$ C

保存)。

1.4 试验动物及饲养管理

试验实施时间为 2016 年 9 月 10 日—2016 年 10 月 14 日, 试验场地为南京市某猪场。选取体质健康, 体重 (60 \pm 4.3)kg, 并在试验前 2 周末使用抗生素治疗的 28 头二元猪 (雌雄各半), 随机分为 2 组, 对照组 4 头, 试验组 24 头。试验组猪单次颈部肌注射加米霉素 (6mg/kg B.W. 以加米霉素计), 对照组不做处理, 试验期 35d。各组常规饲养并饲喂相同日粮及饮水。

1.5 样品采集及处理

猪注射后, 分别在第 0.5 天、7 天、14 天、21 天、28 天和 35 天时, 采集肌肉、肝脏、肾脏、皮脂及注射部位肌肉。对照组猪在试验 7d 时宰杀; 各时间段, 随机剖杀 4 头试验猪进行采样。收集的组织保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中, 待测加米霉素残留指标^[7]。

1.6 试验方法

加米霉素在猪体内残留含量检测方法^[8], 采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 测定。

1.7 数据分析

试验数据采用 Excel 软件进行处理, 数值以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并采用 WT 1.4 休药期软件处理药物浓度-时间数据, 计算休药期^[9]。

2 结果

2.1 检测方法有效性

加米霉素的标准曲线在 2~500 μ g/kg 的浓度范围内呈现良好的线性关系, 其曲线方程为: $Y=1.11256X-0.208095$, 相关系数 (R^2) 均大于 0.999。该方法各组织最低检测限为 2 μ g/kg; 所有组织定量限为 5 μ g/kg。各组织回收率为 73%~114%, 批内、批间相对标准偏差均小于 14.03%。药物回收率及变异系数符合农业部相关规定^[10], 表明该方法能够满足加米霉素残留消除规律试验要求。

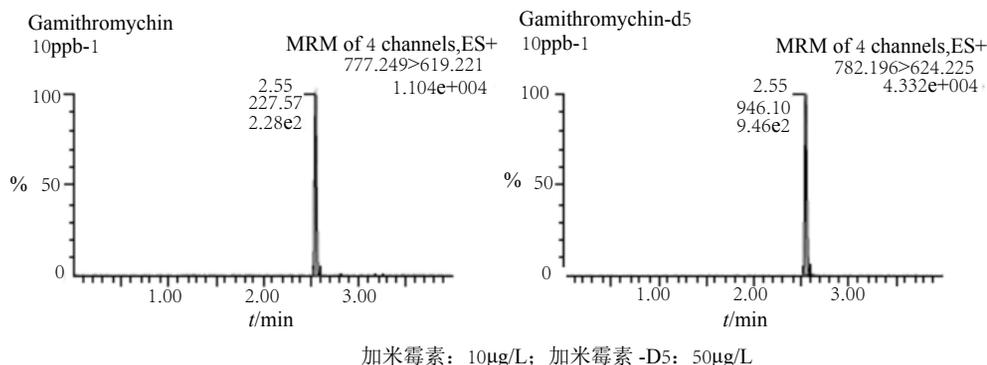


图 1 加米霉素及内标标准溶液特征离子质量色谱图

Fig. 1 Characteristic ion mass chromatogram of gamithromycin and internal standard solution

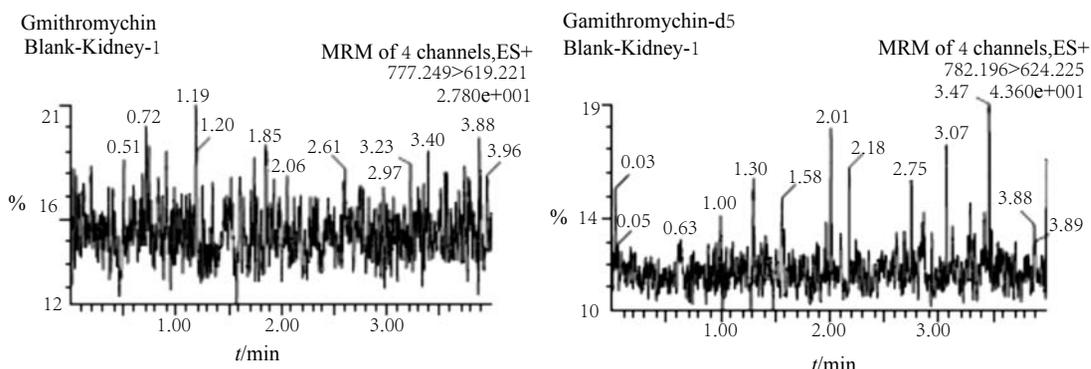
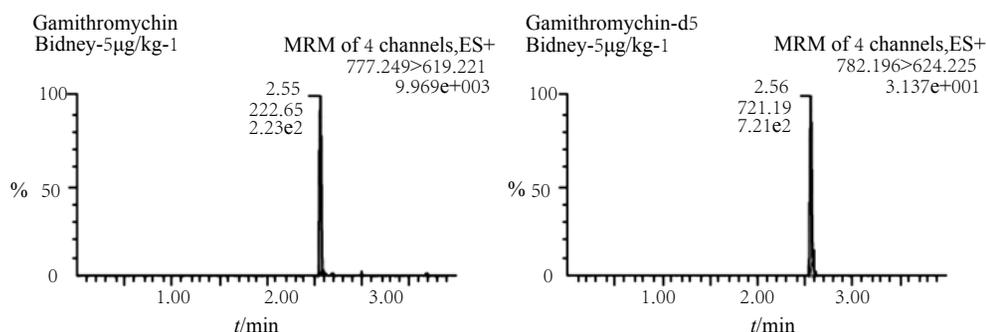


图 2 猪肾脏空白特征离子质量色谱图
Fig. 2 Mass chromatogram of porcine kidney



加米霉素: 5µg/kg, 加米霉素-D5: 25µg/kg

图 3 猪肾脏空白添加加米霉素及内标特征离子质量色谱图

Fig. 3 Chromatogram of characteristic ion for adding gamithromycin and internal standard in swine kidney blank

由图 1~3 可知, 标准溶液色谱图、空白组织以及空白组织添加加米霉素色谱图对照相比发现, 待测物在保留时间处无干扰, 方法专属性良好。

2.2 组织中药物残留

由表 1 可知。猪注射加米霉素后, 在 0.5d 时, 各个组织均达到最大残留含量, 除注射部位肌肉组织外, 加米霉素在肾脏中残留量最高, 平均 (13540.9±581.00)µg/kg; 其次为肺脏组织, 平均 (8142.53±428.12)µg/kg; 接着依次为肝脏、皮脂及肌肉, 平均残留量为 (7634.75±545.15)、(1158.07±231.26) 及 (1047.98±109.92)µg/kg。随时间的延长, 加米霉素在各组织中的残留含量下降, 在 7d 时, 下降速

度尤为明显, 肌肉、皮脂、肝脏、肾脏、注射点及肺脏的残留量分别为 (16.13±3.25)、(34.25±5.45)、(200.43±24.92)、(346.9±44.65)、(2092.75±386.42) 和 (753.5±90.95)µg/kg。之后, 猪各组织中加米霉素残留量下降缓慢, 基本在 28 时, 各组织均未残留加米霉素。并通过各组织中加米霉素残留量变化确定在动物体内的靶组织为肾脏。

2.3 休药期计算

由表 2 和图 4 可知。休药期的计算采用 WT 1.4 软件, 确保有 95% 的可信限使 99% 的残留低于最大残留量 (MRL)。注射加米霉素后, 猪各组织肌肉、皮脂、肝脏、肾脏及注射位点的休药期分别为 9.68、

表 1 注射加米霉素对猪不同组织残留量实测数据 (µg/kg)

Tab.1 Measured data of injecting gamithromycin on different tissue residues in swine (µg/kg)

组织	0.5d	7d	14d	21d	28d	35d
肌肉	1047.98±109.92	16.13±3.25	<LOQ	ND	ND	ND
皮脂	1158.07±231.26	34.25±5.45	13.73±2.92	10.1±1.74	ND	ND
肝脏	7634.75±545.15	200.43±24.92	10.18±1.44	<LOQ	ND	ND
肾脏	13540.9±581.00	346.9±44.65	32.63±3.42	8.95±1.05	ND	ND
注射位点	28422.77±2129.52	2092.75±386.42	477.85±90.15	49.03±7.72	7.17±1.80	ND
肺脏	8142.53±428.12	753.5±90.95	28.5±3.45	8.53±1.41	ND	ND

注: < LOQ: 低于定量限; ND: 未检出

表 2 注射加米霉素后猪的休药期

Tab. 2 Swine withdrawal after injection of gamithromycin

	肌肉	皮脂	肝脏	肾脏	注射位点
休药期/d	9.68	24.35	11.62	17.37	26.75

24.35、11.62、17.37 及 26.75d。

3 讨论

据欧洲药物评价委员会 (EMEA) 研究报道^[5], 给试验猪单剂量肌注射加米霉素 6mg/kg B.W.; 在给药后第 1、2、3、5、7、10 及 15 天时, 采集肌肉、肝脏、肾脏、脂肪及注射位点肌肉; 其研究表明, 在给药后 7、10 和 15d, 肾脏中加米霉素原药浓度分

别为 0.57、0.14 和 0.04 $\mu\text{g/g}$, 肝脏的分别为 0.275、0.05 和 $< 0.010\mu\text{g/g}$, 肌肉组织的分别为 0.06、0.03 和 0.02 $\mu\text{g/g}$, 注射部位分别为 0.98、0.52 和 0.23 $\mu\text{g/g}$, 脂肪组织中也呈现相似的消除代谢表型。本试验研究表明, 猪注射加米霉素后, 在 0.5d 时, 各组织中加米霉素残留量达到最高; 随之在一周后, 含量迅速锐减下降。本试验与国外同类产品的残留消除结果基本一致。同时本试验研究发现, 加米霉素在猪各食性组织中残留量按高低排列依次为, 注射部位肌肉 $>$ 肾脏 $>$ 肺脏 $>$ 肝脏 $>$ 皮脂 $>$ 肌肉; 本试验中各组织加米霉素残留量高低同样也与 EMEA^[5] 报导结果相一致。

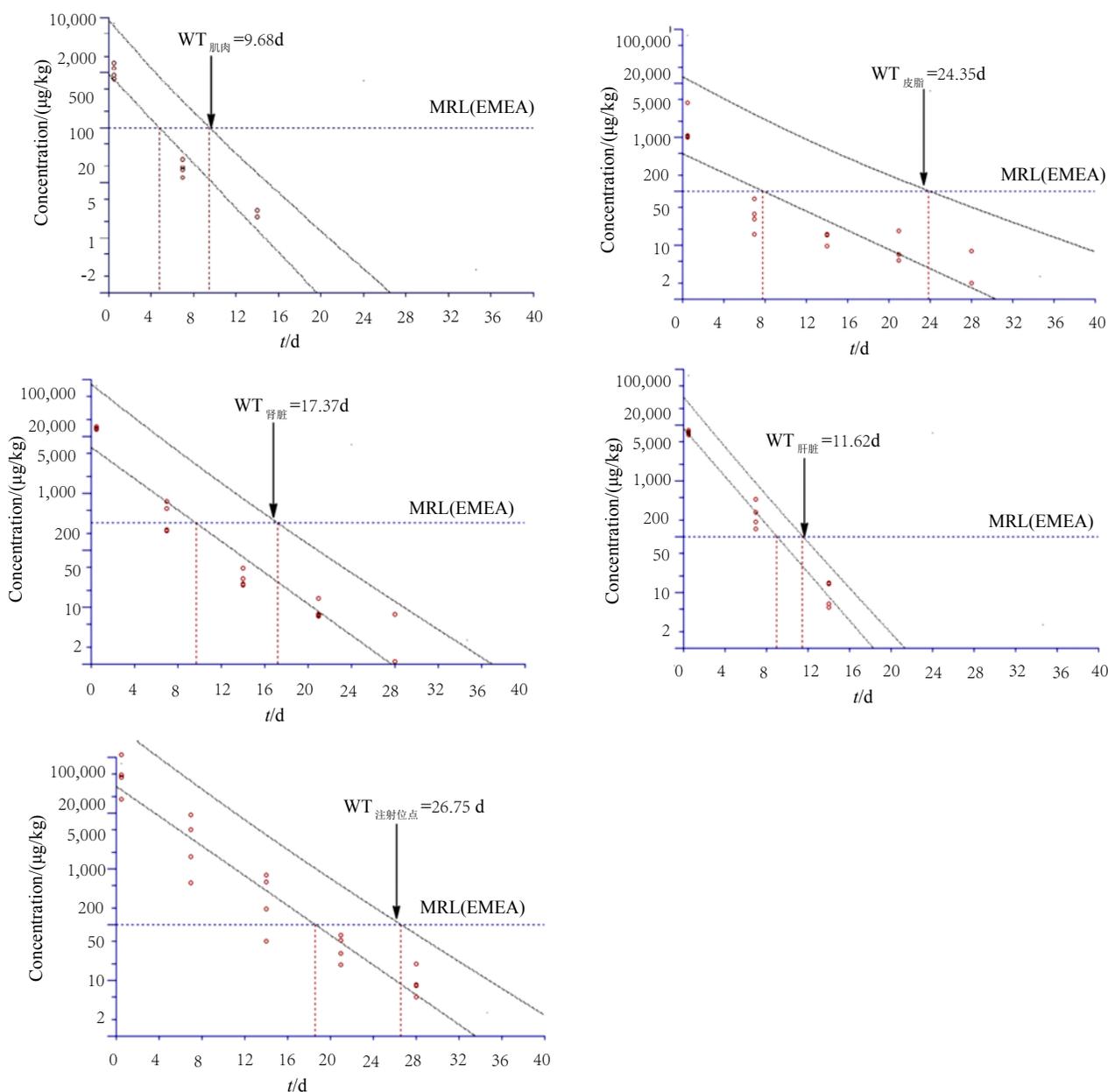


图 4 加米霉素注射液的组织残留消除拟合图

Fig. 4 Elimination of tissue residues in the injection of gamithromycin

根据参考欧盟 EMEA 制定的猪 MRL 标准^[1], 其肌肉、皮脂、肝脏及肾脏的最大残留限量分别为 100、100、100 和 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。鉴于我国尚未制定加米霉素在猪组织中的最大残留量 (MRL) 标准。因此, 综合 WT 1.4 休药期软件处理结果, 建议国产加米霉素注射液按推荐给药方案, 猪的休药期定为 27d。但据欧盟兽药委员会 (CVMP) 公布加米霉素在猪上使用的休药期为 16d^[5]。本试验统计处理结果与其不一致, 可能原因为动物休药期的长短不仅与产品加米霉素密切相关, 还与执行的残留限量标准有关。由于各国制定的, 动物使用加米霉素 (含相同活性成分) 残留限量标准有可能不同。因此, 即使相同活性成分的加米霉素在不同国家的休药期也存在差异。

4 结论

猪单剂量肌注射国产加米霉素注射液 (6mg/kg B.W.), 除注射部位肌肉外, 肾脏残留量最高, 其次是肺脏、肝脏、皮脂及肌肉。建议猪的休药期为 27d。

参考文献

- [1] Wyns H, Meyer E, Plessers E, *et al.* Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in pigs[J]. *Res Vet Sci*, 2014, 96(1): 160-163.
- [2] Hildebrand F, Venner M, Giguère S. Efficacy of Gamithromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchopneumonia[J]. *J Veterin Int Med*, 2015, 29(1): 333-338.
- [3] Wyns H, Meyer E, Plessers E, *et al.* Modulation by gamithromycin and ketoprofen of *in vitro* and *in vivo* porcine lipopolysaccharide-induced inflammation[J]. *Veterin Immunol Immunopathol*, 2015, 168(3-4): 211-222.
- [4] Subbiah M, Mitchell S M, Call D R. Not all antibiotic use practices in food-animal agriculture afford the same risk[J]. *J Environ Qual*, 2015, 45(2): 618.
- [5] 肖天石, 丁久恒, 于泓潇, 等. 加米霉素注射液在靶动物猪的安全性试验 [J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(8): 109-111.
- [6] 田伟, 陈龙, 肖忠云, 等. 加米霉素注射液治疗猪呼吸道疾病的研究进展 [J]. 中国兽医杂志, 2017, 53(4): 66-68.
- [7] 畜牧水产. 中华人民共和国农业部公告 (第 1077 号)[J]. 中国兽药杂志, 2008, 20(9): 39-39.
- [8] 郭洋洋, 罗小清, 彭麟, 等. 猪可食性组织中加米霉素残留量的 UPLC-MS/MS 检测方法研究 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(6): 54-59.
- [9] 中华人民共和国农业部. 兽药停药期规定 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(S1): 49-54.
- [10] 畜牧水产. 中华人民共和国农业部公告第 1031 号 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 20(6): 565-566.