

硫酸头孢喹肟乳房注入剂在牛奶中的药代动力学研究

魏占勇¹, 刘欣^{1*}, 魏丽娟¹, 曹兴元², 张缨^{1*}

(河北远征药业有限公司, 石家庄 050041; 2. 中国农业大学, 北京 100083)

[收稿日期] 2014-10-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2014) 12-0022-05 [中图分类号] S859.84

[摘要] 为研究硫酸头孢喹肟乳房注入剂给药后在乳区的分布情况, 进行了奶牛牛奶中药物的药动学研究。选取 8 头健康黑白花奶牛, 每头牛随机选择两个乳区, 以每个乳区 1 支(8g : 75 mg/支)的剂量进行单次乳房灌注给予硫酸头孢喹肟乳房注入剂。采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法检测乳中头孢喹肟的浓度。结果表明, 该制剂采用单次乳房灌注给药后, 给药乳区测得 24~30 h 之内乳中头孢喹肟的平均浓度在 1.51~2.76 $\mu\text{g/mL}$ 之间; 未给药乳区仅在给药后 12 和 24 h 能够检测到较低水平的药物含量(分别为 0.05 ± 0.01 和 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $n=4$); 血液中仅在 6 和 12 h 检测到较低水平的药物含量(分别为 0.05 ± 0.03 和 $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $n=4$); 说明药物主要集中在给药乳区, 进入体循环及未给药乳区的量及其微少。

[关键词] 头孢喹肟; 牛奶; 药代动力学; 超高效液相色谱-串联质谱

Pharmacokinetics of Cefquinome Sulfate Intramammary Infusion in Milk

WEI Zhan-yong¹, LIU Xin^{1*}, WEI Li-juan¹, CAO Xing-yuan², ZHANG Ying^{1*}

(1. HeBei Yuanzheng Pharmaceutical Co., Ltd. Shijiazhuang 050041, China; 2. China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: Pharmacokinetic in cow milk was evaluated to study the distribution of cefquinome sulfate intramammary infusion in mammary region after administration. 8 healthy black-white cows and two mammary regions of each cow were randomly selected. A single intramammary infusion of 8 g cefquinome sulfate intramammary infusion was given on each mammary region. Concentration of cefquinome was detected by the method of high performant liquid chromatography and mass spectrometer (UPLC-MS/MS). The mean concentration of cefquinome was 1.51~2.76 $\mu\text{g/mL}$ in mammary region 24~30 h after administration; while lower drug concentrations of (0.05 ± 0.01) $\mu\text{g/mL}$ and (0.02 ± 0.01) $\mu\text{g/mL}$ were found in mammary region not administrated with drug at 12 and 24 h; in blood, the lower drug contents of (0.05 ± 0.03) $\mu\text{g/mL}$ and (0.03 ± 0.01) $\mu\text{g/mL}^{-1}$ were detected at 6 and 12 h. The results demonstrated that cefquinome was mainly concentrated in mammary region after administration and rarely drug entered mammary region without administration and systemic circulation.

Key words: cefquinome; milk; pharmacokinetics; UPLC-MS/MS

作者简介: 魏占勇, 高级工程师, 从事药物制剂研究方面研究。

通讯作者: 刘欣, E-mail: xinliu76@126.com; 张缨, E-mail: 1229455646@qq.com

头孢喹肟 (Cefquinome) 是德国赫司特公司开发的产品,是目前最新的第四代头孢类抗生素中唯一的动物专用药,该药于 1993 年首次批准上市,1994 年之后,英国英特威公司 (Intervet) 的相关产品也被欧盟批准在欧洲等国相继上市销售,商品名为 Cobactan^[1-2] 和 Cephguard^[3],剂型为注射用混悬剂、乳房注入剂(泌乳期和干乳期)、子宫注入剂,在动物疾病防治工作中多次发挥了重要的作用。国外有关硫酸头孢喹肟在奶中的药代动力学报道很少,国内尚未见报道,本研究为临床合理用药提供指导。

1 材料

1.1 药品与试剂 硫酸头孢喹肟对照品(95.0%),Sigma 公司生产;超纯水,Milli-Q 超纯水仪制得;乙腈,色谱纯与农残级,迪马公司生产;正己烷:分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产。硫酸头孢喹肟乳房注入剂(泌乳期),8g : 75mg/支,批号 100410,河北远征药业有限公司提供。

1.2 仪器设备 ACQUITY™型超高效液相色谱仪,美国 Waters 公司; Quattro LC 四极杆质谱仪,英国 Micromass 公司;BEH C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm,粒径 1.7 μm),美国 Waters 公司;离心机,Eppendorf 5804R,德国 Eppendorf 公司;旋涡混合仪,北方同正公司。氮吹仪,N-EVAP112,美国 Organomation Associates 公司。

1.3 试验动物 选取某奶牛养殖场 8 头健康的黑白花泌乳奶牛,平均泌乳量为 23 kg/d。给予正常饲料,自由饮水。饲料和饮水中不含头孢类等抗菌药物。

2 方法

2.1 给药 每头牛随机选择两个乳区,以每个乳区一支(8g : 75 mg/支)的剂量进行单次乳房灌注给予硫酸头孢喹肟乳房注入剂。

2.2 样品采集 分别于给药后 0.08、6、9、12、24、30、36、48、54、60、72 和 96 h 挤奶,每次挤奶 40~50 mL,置于聚丙烯专用塑料瓶中,密封,-20 ℃短期保存待用。

另外选择四头给药奶牛,分别于 0.08、12、24 和 36 h 采集未给药乳区奶样,检测头孢喹肟药物浓度,同时于 6、12 和 24 h 颈静脉采血 10 mL,测定血液中药物浓度。

2.3 样品前处理

2.3.1 提取 准确量取 5±0.05 g 牛奶,置于 50 mL 聚丙烯离心管中。加入 20 mL 乙腈,涡动 1 min,4 ℃,10000 r/min 离心 10 min,取上清液置于 100 mL 离心管中。向剩余残渣中加入 15 mL 乙腈-水(75+25, V/V) 溶液,涡动 1 min,4 ℃,10000 r/min离心 10 min,合并两次提取液于100 mL 离心管中。向提取液中加入 10 mL 正己烷,300 r/min震摇 10 min,4500 r/min 离心 10 min,弃去上层正己烷,将剩余液体转移至 100 mL 鸡心瓶中,40 ℃减压蒸至≤3 mL,加入 20 mL 纯水稀释,备用。

2.3.2 净化 将 HLB(6 cc,500 mg)固相萃取柱安装于固相萃取装置上,依次用 3 mL 乙腈和 3 mL 水平衡,将上述备用液过柱,再用水 6 mL 淋洗,吹干。加 3 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液于 5 mL 试管中,40 ℃水浴下氮气吹干,1 mL 2%乙腈溶液复溶,过 0.2 μm 滤膜,供 UPLC-MS/MS 分析。

2.4 含量测定

2.4.1 主要溶液配制

2.4.1.1 标准储备液(200 μg/mL) 准确称取头孢喹肟标准品约 10.0±0.1 mg,用超纯水溶解于 50 mL 容量瓶中。配制成 200 μg/mL 的标准储备液,4 ℃避光保存。

2.4.1.2 标准工作液(10 μg/mL、1 μg/mL、100 ng/mL) 从冰箱中取出头孢喹肟标准储备液(200 μg/mL)放至室温,取标准储备液 2.5 mL 于 50 mL 容量瓶中,加超纯水配成 10 μg/mL、1 μg/mL、100 ng/mL 的标准工作液。

2.4.2 色谱条件及质谱系统 色谱条件:BEH C18 柱(50 mm×2.1 mm,粒径 1.7 μm);柱温:室温;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL;以表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度洗脱程序				
时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	纯水/%	乙腈/%	变化曲线
0.0	0.3	95.0	5.0	1
1.0	0.3	5.0	95.0	6
1.2	0.2	5.0	95.0	6
2.5	0.2	95.0	5.0	1

质谱系统:Quattro LC 四极杆串联质谱仪;电离模式:电喷雾正离子(ESI^+);毛细管电压:2.8 kV;离子源温度:80 ℃;脱溶剂温度:300 ℃;脱溶剂氮气流速:460 L/h;采集方式:多反应监测(MRM)。

测试药物定位定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 头孢喹肟定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量				
药物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
头孢喹肟	529.1	133.9 ^a	20	20
	529.1	395.9	20	13
a 代表定量离子				

2.4.3 空白添加标准曲线 取 7 份空白牛奶样品,分别添加头孢喹肟标准溶液,按照 2.3 项下方法处理样品、制得头孢喹肟 10、20、50、100、200、500 和 1000 ng/g 的基质添加标准溶液供超高效液相色谱-串联质谱法测定,以添加浓度为横坐标,定量离子对峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

2.4.4 检测限和定量限 分别按照 2.3 项下方法,处理 10 份空白牛奶,基质分别添加头孢喹肟标准品,以药物保留时间的药物响应值是空白样品基质噪音的 3 倍为检测限,10 倍为定量限,分别测定方法的检测限和定量限。

2.4.5 准确性、精密度 设定牛奶中头孢喹肟 20、50 和 100 ng/g 三个添加水平,每个水平设 6 个平行,按照 2.3 项下方法处理样品后上机分析。计算相应浓度的回收率和日内变异系数。随机选择不同 3 d,依照样品处理方法,每天测定一批样品,计算 3 d 所测样品的回收率和日间变异系数。

3 结果

3.1 空白添加标准曲线绘制 测定了牛奶的添加标准曲线,头孢喹肟在 10、20、50、100、200、500、1000 ng/mL 添加浓度范围内,药物峰面积与浓度呈线性相关,其回归方程见表 3,可见头孢喹肟的离子对峰面积响应值与浓度成线性关系,回归系数大于 0.999。

表 3 牛奶基质添加标准曲线方程及线性回归系数		
药品	标准曲线	回归系数(R^2)
头孢喹肟	$Y = 2.72X - 34.40$	0.9998

3.2 检测限和定量限 根据 10 个空白牛奶样品的基线噪音值求其平均值,按信噪比 $S/N \geq 3$ 为检测限(LOD), $S/N \geq 10$ 为定量限(LOQ),求得牛奶中头孢喹肟的检测限和定量限分别为 6 和 20 ng/mL。

3.3 准确性、精密度和重复性 重复性试验随机选取三日进行测定,每日测定一批,三日所测定的平均回收率为方法的准确度,三日的日间变异系数为该方法的重复性,测定结果见表 4。

表 4 牛奶中头孢喹肟的平均回收率和变异系数				
药物名称	添加浓度/(ng · mL ⁻¹)	回收率/%	日内变异系数/%	日间变异系数/%
头孢喹肟	20	70.59	9.25	10.97
	50	89.23	6.13	7.23
	100	96.57	4.65	5.64

由表 4 可见,在 20、50 和 100 ng/mL 添加水平时,牛奶中头孢喹肟的平均添加回收率范围在 70.59~96.57% 之间,日内变异系数在 4.65~9.25% 之间,日间变异系数在 5.64~10.97% 之间。药物的回收率和变异系数符合我国和欧盟规定的分析方法要求。空白牛奶样品、添加样品及基质标准品质量色谱图见图 1-图 3。

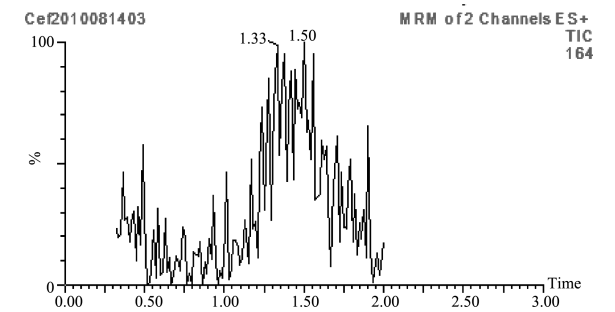


图 1 空白牛奶样品的总离子流色谱图

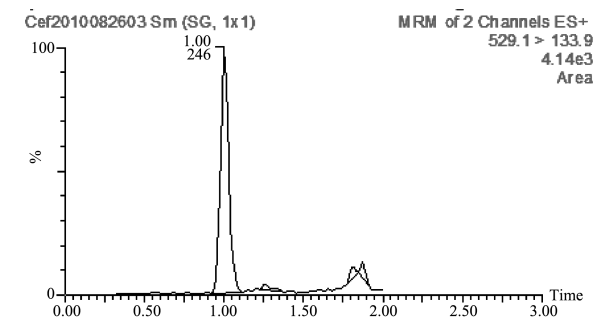


图 2 空白牛奶样品中添加头孢喹肟 20 ng/mL 的特征离子质量色谱图

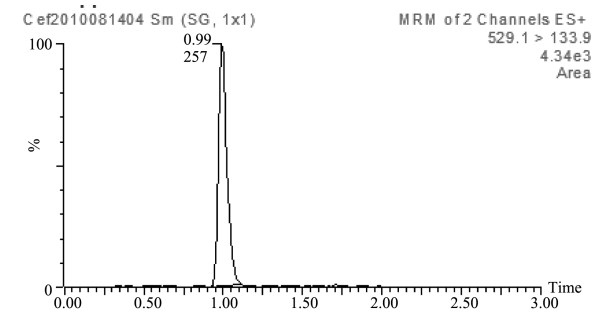


图 3 20 ng/mL 头孢喹肟基质标准品的特征离子质量色谱图

3.4 乳药浓度及药代动力学参数 8 头奶牛不同乳区经单次注入硫酸头孢喹肟乳房注入剂后在不同时间采血,样品经前处理后经 UPLC-MS/MS 检测,硫酸头孢喹肟的乳药浓度-时间数据见表 5,由

表中可见,乳房注入后乳样中硫酸头孢喹肟 72 h 后药物浓度低于检测限。药时曲线见图 4。

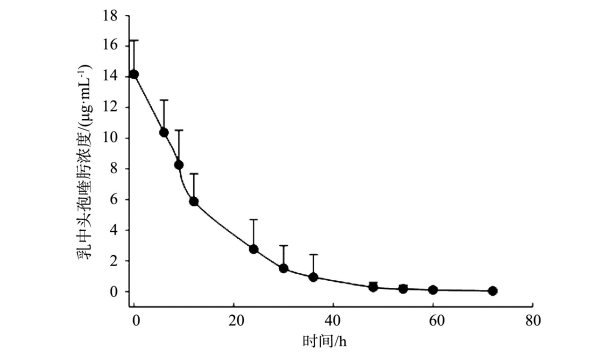


图 4 奶牛乳房灌注硫酸头孢喹肟乳房注入剂后(每个乳区 75 mg/支)后头孢喹肟的乳中药物浓度-时间曲线

表 5 8 头奶牛乳房灌注硫酸头孢喹肟乳房注入剂后头孢喹肟随时间变化的乳药浓度 (μg · mL⁻¹) (n = 8)

乳区	0 h	6 h	9 h	12h	24 h	30 h	36 h	48 h	54 h	60 h	72 h	96 h	
1#	右前	18.89	11.34	9.77	7.62	3.98	2.36	1.91	0.21	0.12	0.03	ND	-
	左后	17.99	15.75	10.99	6.89	2.36	1.10	0.56	0.28	0.13	0.03	ND	-
2#	右后	14.41	9.87	7.58	4.84	2.60	1.73	0.58	0.18	0.08	ND	-	-
	左前	15.15	10.08	8.95	3.88	1.08	0.84	0.53	0.12	0.05	ND	-	-
3#	左后	13.37	8.03	7.48	6.13	3.15	1.32	0.34	0.11	0.07	0.03	ND	-
	右前	12.51	9.81	7.63	4.68	2.83	1.53	0.29	0.15	0.09	0.02	ND	-
4#	左前	11.04	8.50	6.91	4.01	2.04	0.68	0.22	0.12	0.06	ND	-	-
	右后	11.33	8.55	7.57	5.72	2.00	0.53	0.24	0.23	0.04	ND	-	-
5#	左前	15.34	11.23	8.89	6.70	1.22	0.59	0.18	0.09	0.04	ND	ND	-
	右后	13.55	10.32	6.99	5.40	1.51	0.42	0.24	0.13	0.06	0.02	ND	-
6#	左前	15.95	14.29	12.75	9.12	7.07	4.71	4.23	0.95	0.63	0.14	ND	-
	右后	13.37	11.42	10.88	9.45	7.48	5.38	4.91	1.15	0.95	0.09	ND	-
7#	左前	14.77	9.63	9.13	5.83	2.58	0.95	0.28	0.44	0.16	0.02	ND	-
	右后	14.43	10.03	8.15	6.44	1.55	0.93	0.21	0.18	0.13	0.02	ND	-
8#	左后	12.86	8.29	4.33	3.92	1.39	0.48	0.16	0.07	0.03	ND	-	-
	右前	11.77	8.73	4.08	3.29	1.36	0.59	0.12	0.05	0.02	ND	-	-
平均值		14.17	10.37	8.26	5.87	2.76	1.51	0.94	0.28	0.17	0.04	-	-
标准差		2.20	2.12	2.26	1.81	1.93	1.48	0.32	0.25	0.04	-	-	-

ND=未检测到药物。—表示未开展检测

4 讨论

本研究给奶牛乳房灌注硫酸头孢喹肟乳房注入剂,每头奶牛随机选择了两个乳区,每个乳区给药剂量约 75 mg。在给药乳区测得 24~30 h 之内乳中头孢喹肟的平均浓度在 1.51~2.76 μg/mL 之间。

据报道头孢喹肟对奶牛乳房炎金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、无乳和停乳链球菌的 MIC 值范围分别为 1~2 μg/mL、≤ 0.031~0.25 μg/mL 和 ≤ 0.031~1 μg/mL^[5-6],该药物浓度高于上述几种病原菌的

MIC 值,说明该制剂采用单次乳房灌注给药后,乳中药物能发挥较好抑菌效果的时间约为 24~30 h。

同时试验也采集了未给药乳区以及奶牛血液进行药物含量测定。未给药乳区仅在给药后 12 和 24 h 能够检测到较低水平的药物含量(分别为 $0.05 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.02 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $n = 4$),说明给药后药物主要集中在给药乳区,通过吸收进入体循环进而分泌至未给药乳区的量及其微少。血液中仅在 6 和 12 h 检测到较低水平的药物含量(分别为 $0.05 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$ 和 $0.03 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$, $n = 4$),说明头孢喹肟可通过吸收进入血液,但由于该药物在体内代谢较快,因此血液中药物含量较低^[4],初步说明乳房灌注硫酸头孢喹肟仅能局部治疗奶牛乳房炎,不能通过该种给药方式对奶牛进行系统治疗。

国外也建立了相应的检测方法检测头孢喹肟在可食性动物组织的残留,其中以高效液相色谱法^[7-9]和液-质联用方法^[10]最为常见。本试验采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法检测乳中头孢喹肟的浓度,定量限为 20 ng/mL,本方法药物的回收率和变异系数能满足头孢喹肟在乳中药动学检测的要求。

国内尚未见关于头孢喹肟在牛奶中药动学的研究报道。根据欧洲药品评价署(EMA)的报道,头孢喹肟经过乳房内给药后仅有一小部分吸收,与本试验结果一致,药物主要集中在给药乳区,进入体循环及未给药乳区的量及其微少。

参考文献:

- [1] VMD (The Veterinary Medicines Directorate), 2012, COBACTAN LA, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS[DB/OL]. http://www.vmd.defra.gov.uk/Product_Information_Database/SPC_Documents/SPC_159285.DOC.
- [2] VMD (The Veterinary Medicines Directorate), 2012, Cobactan LC, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS[DB/OL]. http://www.vmd.defra.gov.uk/Product_Information_Database/SPC_Documents/SPC_137989.DOC.
- [3] VMD (The Veterinary Medicines Directorate), 2010, Cephguard DC, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS[DB/OL]. http://www.vmd.defra.gov.uk/Product_Information_Database/SPC_Documents/SPC_118464.DOC.
- [4] 高金兴. 头孢喹肟在牛奶中残留的 HPLC 检测及消除规律研究[D]. 扬州大学硕士学位论文, 2009 年 5 月.
- [5] 王付民, 陈杖榴. 头孢喹诺的研究进展[J]. 动物医学进展, 2004, 25(4): 50-53.
- [6] 王绍琛, 刘金凤, 廖建维, 等. 头孢喹诺对几种常见动物病原菌的体外抗菌作用[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(5): 26-28.
- [7] Gertraud Suhren, Karin Knappstein. Detection of cefquinome in milk by liquid chromatography and screening methods [J]. Analytica Chimica Acta, 2003; 363-372.
- [8] 郭亚楠, 周德刚, 李建成, 等. 硫酸头孢喹肟注射液在猪体内的药代动力学及生物等效性研究[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(7): 33-37.
- [9] 杨大伟, 陈杖榴, 丁焕中, 等. 头孢喹肟在猪体内的药动学及生物利用度[J]. 中国兽医学报, 2009, 9(29): 1182-1185.
- [10] 王林, 束建花, 赵宁, 等. 牛奶和牛血浆中头孢喹肟 HPLC-MS/MS 检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2012, 44(11): 55-59.

(编辑:陈希)