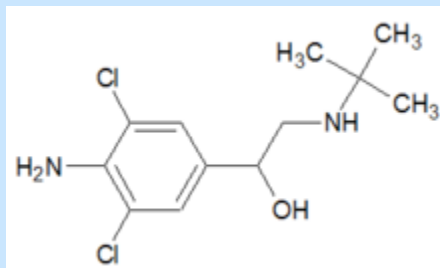


关于瘦肉精在大鼠 体内的代谢

瘦肉精简介

理化性质：通常我们所说的瘦肉精是指克伦特罗(Clenbuterol)，学名为盐酸克仑特罗，简称克仑特罗，又名克喘素、氨哮素、氨必妥、氨双氯喘通。为白色结晶状粉末，味略苦。

结构简式：



分子式： $C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$

理化特性：白色或类白色的结晶粉末，无臭、味苦，熔点161℃，溶于水、乙醇，微溶于丙酮，不溶于乙醚。



长三角系统
Bio-X Science

【储存条件】原包装在4-25℃阴凉避光干燥处储存

盐酸克伦特罗 (瘦肉精)快速检测卡

SHOU ROU JING KUAI SU JIAN CE XI TONG

苏州市长三角系统生物交叉科学研究院有限公司

1支

【生产日期】

CLEO TEST DEVICE
LOT: 1-200902 EXP: 201102

当盐酸克林特罗以超过治疗剂量5-10倍的用量用于家畜饲养时，即有显著的营养“再分配效应”——促进动物体蛋白质沉积、促进脂肪分解抑制脂肪沉积，能显著提高胴体的瘦肉率、增重和提高饲料转化率，因此曾被用作牛、羊、禽、猪等畜禽的促生长剂、饲料添加剂。

1 μ g/mL的盐酸克伦特罗添加于猪饲料中用于促生长，人食用猪肝或猪肺足够引起中毒。世界没有任何正规机构批准克伦特罗作为饲料添加剂用于动物促生长。“瘦肉精”包括盐酸克伦特罗在我国已经被禁用。由于美国人不吃畜禽的内脏，因此允许使用一定量的瘦肉精。



摘要

本实验研究了 ^{14}C 标记的克伦特罗在雌雄大鼠体内的代谢。喂食每只大鼠 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的 ^{14}C 克伦特罗，并在之后8天期间研究其代谢产物和过程。发现有大约60%的放射性物质（ ^{14}C ）从尿液中排出，雄鼠和雌鼠分别有20%和30%的放射性物质（ ^{14}C ）从粪便中排出。利用HPLC（高效液相色谱法）检测放射性物质（ ^{14}C ）可以对克伦特罗的代谢产物进行鉴定和定量，发现尿液中的一些代谢产物是不稳定的。大部分尿液和粪便中的克伦特罗代谢产物可以使用各种MS（质谱）分析技术进行分离和鉴定。在大鼠被给药后，分析方法也可以建立克伦特罗在粪便和组织中代谢产物长达72h的图谱。克伦特罗的主要代谢过程包括：N-脱烷基化（仲胺），N-氧化和硫酸共轭（伯胺）。另外，对不同性别大鼠的克伦特罗代谢产物中N-脱烷基化比率的差异进行观察。大鼠尿液中检测到的主要代谢产物是4-N-羟胺，而粪便中的放射性物质（ ^{14}C ）大多与氨基磺酸克伦特罗有关。

实验材料和方法

- 1.实验试剂：**克伦特罗和用于标记的分子 $[^{14}\text{C}]$ CL[4-氨基-3,5-二氯- α -[（叔丁基氨基甲基）]苄基醇。甲酸、乙酸、解旋酶、VI型硫酸、D型葡萄糖二酸-1,4-内酯。
- 2.实验动物：**8只成年大鼠（4只雄性和4只雌性）。

3.实验样品的采集:

- **大鼠的排泄物的采集:** 8只成年大鼠被单独饲养在不锈钢笼中。允许大鼠自由饮水并且有一个标准的日常饮食。大鼠的平均重量分别为 $427 \pm 21\text{g}$ (雄性) 和 $299 \pm 24\text{g}$ (雌性)。一周的环境适应期后, 每只大鼠被强制喂食 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 体重的 ^{14}C 标记的克伦特罗。后面的8天, 每天把尿液和粪便收集起来备用。最后, 大鼠被放血致死。鼠笼要单独用500ml的甲醇/水 (1: 1, v/v) 清洗干净, 并从中取1ml作为样品做放射性物质测定。取下肝脏, 如果不立即使用, 这些样品都要储存在 -20°C 下。

- **组织样品的采集：**4只雄性大鼠（年龄，10周）被安置在如上文所述的环境中。分别在喂食克仑特罗后12h，24h，48h和72h通过放血处死大鼠。切除肝，肺和肾并存储在-20℃下。
- **盐酸克仑特罗剂量的影响：**3只雄性大鼠（年龄，10周）被安置在如上所述环境中。分别强制喂食5，20，40 mg/kg体重¹⁴C标记的克仑特罗。3天内，每天收集3次尿液和粪便并储存在-20℃下用于研究。

4.仪器设备：主要有HPLC（高效液相色谱仪）、放射性物质检测器、吉尔森模型202馏分收集器、UV（紫外）分光光度计、帕卡德液体闪烁计数器。

5.实验过程:

- **尿液:** 尿液样品与甲醇混合 (1: 2, v/v) , 搅拌, 以10000rpm (4°C) 离心10 min, 将沉淀物丢弃, 上清液在真空下浓缩并用微孔滤膜 (0.5g, 0.45 μ m) 过滤, 最后用HPLC进行分析。
- **粪便:** 通过初步分析这4只大鼠的粪便来确定大鼠组织中瘦肉精代谢产物的概况, 目的是判断大鼠粪便中是否存在不稳定或挥发性的克仑特罗代谢产物。冷冻干燥前后的这些粪便样品中的放射性物质含量需要通过完全燃烧和液体闪烁计数器来确定。通过对粪便提取物进行分析, 比较新鲜和冻干样品中克仑特罗代谢产物。

研究期间将每天收集到的大鼠粪便进行冷冻干燥，然后利用球磨床均质化，再对每个样品中的¹⁴C进行测定。将大约0.5g的冷冻干燥样品与甲醇/100mM的乙酸铵混匀2min，pH值3.2（1：6：3，w/v/v），然后在10000rpm下（4℃）离心10min。将沉淀再用相同的溶剂混合萃取两次，再与甲醇/1mM的氢氧化铵（1：6：3，w/v/v）混均萃取一次。放射性物质计数完成后，将4个上清液合并，用异辛烷去脂，并在N₂条件下浓缩。将所得提取物在微滤膜（0.5g，0.45μm）下进行过滤，然后利用HPLC进行分析，最后通过燃烧分析来确定离心沉淀中的放射性物质残留。对每只大鼠的2天和3天的粪便以及雌性大鼠4天的粪便分别进行处理并分析，以确定粪便中代谢产物的组成和变化。喂食大鼠较高剂量的克仑特罗并对其粪便进行同样的分析流程。

- **组织：**提取约5 g的肝脏组织对肝脏代谢产物进行分析。将样品切成小片，并使用6ml/g的乙腈/甲醇/ 50mM乙酸铵缓冲液均质化，pH 3.2（6：3：1，v/v/v），然后在10000rpm和4℃离心10min。将上清液立即存储在-20℃下，将沉淀物再进行5次萃取，即2次使用同样的溶剂，1次用乙腈/甲醇/ 50mM的碳酸氢钠缓冲液在pH 8.35（6：3：1，v/v/v）条件下进行萃取，最后2次用乙腈/甲醇/ 1mM的氢氧化钠（6：3：1，v/v/v）进行萃取。最后残留的每个样品的离心沉淀通过燃烧分析测定放射性物质残留。合并上述6个上清液，用乙腈饱和异辛烷去脂，真空浓缩，并在如上所述的条件下过滤，最后用HPLC分析。肺和肾脏中的代谢产物的检测是使用相同的提取方法。肾样品使用前，要用水洗涤两次再进行提取。

- **酶解：**将粗制尿20 μ l（或2 μ l纯化代谢产物加入20 μ l水中）与480 μ l 0.1M乙酸钠缓冲液（pH4.8）和20 μ l的培养液（即2000菲什曼单位B-葡萄糖醛酸酶和硫酸酯酶活性的20000罗伊单位）混合，并在42 $^{\circ}$ C酶解16h。对酶解后的产物进行离心，然后用微滤膜（0.5g，0.45 μ l）过滤，再用放射性-HPLC进行分析。复测定在相同的条件下进行，不同的是加入了10 μ l D-葡糖二酸-1,4-内酯来抑制b-葡萄糖醛酸酶的活性。更具体的是通过对纯化后的代谢产物进行测定，来检测是否有硫化反应的发生。在每个2 μ l代谢产物样品中加入450 μ l 20mM Tris缓冲液和50ml产气杆菌、VI型硫酸酯酶在pH为7.1和37 $^{\circ}$ C的条件下培养16h，然后进行和上文中同样的分析。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/407154051133010001>