

刘明生,甘辉群,刘俊栋,等.鸡蛋中头孢噻呋的残留检测技术研究[J].江苏农业科学,2013,41(7):305-306.

鸡蛋中头孢噻呋的残留检测技术研究

刘明生¹,甘辉群¹,刘俊栋¹,陆广富¹,王健¹,魏宁¹,付师一²

(1.江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2.江西省兽药饲料监察所,江西南昌 330029)

摘要:本试验建立了用高效液相色谱法测定鸡蛋中头孢噻呋残留的方法。鸡蛋样品经二硫赤藓醇提取,碘乙酰胺衍生, C_{18} 固相柱萃取净化,甲醇溶液洗脱,洗脱液氮气吹干,用流动相溶解,微孔过滤,HPLC 分析。结果表明,用该方法测得鸡蛋中头孢噻呋的最低检测限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率 87% 以上,日内、日间相对标准偏差小,能够满足鸡蛋中头孢噻呋残留检测技术要求。

关键词:高效液相色谱法、头孢噻呋、鸡蛋、残留

中图分类号: S859.84 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0305-02

头孢噻呋是 20 世纪 80 年代美国普强公司开发成功的兽医专用的第三代头孢菌素类药物。其抗菌谱广,抗菌活性强,对革兰氏阳性菌、阴性菌及一些厌氧菌都有很强的抗菌活性,广泛应用于奶牛、肉牛、猪、马、羊的呼吸道疾病治疗和 1 日龄鸡感染的防治。随着头孢噻呋在畜牧业中的广泛使用,不可避免地引起其在动物组织或其产品中的残留,欧盟 2002 年 4 月颁布了关于头孢噻呋在动物组织中的最大残留量(MRL)。

农业部(2008)公告了动物性食品中头孢噻呋的残留检测方法^[1],国内外也有关于头孢噻呋在动物组织和牛奶中残留检测研究^[2-5],但尚未见鸡蛋中头孢噻呋残留的检测报道,本研究拟建立鸡蛋中头孢噻呋残留的高效液相色谱检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

色谱仪(Agilent1100)、二极管阵列检测器(G1315B)、色谱柱(ZORBAX)、旋涡混合器(SK-1)、电热恒温水浴锅(DU-30G)、离心机(MICRO22R)、分析天平(CP153)、匀浆机(DY89-1)、氮气吹干仪(HSC-24)、双重水蒸馏器(SZ-93)。

1.2 试验材料

1.2.1 主要药品和试剂 头孢噻呋标准品(含量 98%,江苏倍康药业有限公司产品);乙腈、甲醇为色谱纯;二硫赤藓醇(纯度 99%);碘乙酰胺(纯度 99%);三氟乙酸、四硼酸钠均为分析纯试剂。

1.2.2 主要溶液及配制 (1)标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$):精密称取 10.0 mg 头孢噻呋标准品,置于 100 mL 容量瓶内,用磷酸缓冲液溶解并稀释定容至刻度,即成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的头孢噻呋储备液,临用前用磷酸缓冲液配成系列标准浓度。(2)标准工作液:取 1 mL 头孢噻呋储备液,依次用磷酸缓冲液稀释定容至 10.00、5.00、1.00、0.50、0.25、0.10、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。(3)0.05 mol/L 硼酸缓冲液(pH 值 9):准确称取四硼酸钠 19.05 g、氯化钾 3.70 g,定容至 1 000 mL。(4)

0.025 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7):准确称取 3.4 g 磷酸二氢钾,加水约 700 mL 后用氢氧化钾调节 pH 值至 7.0,定容至 1 000 mL。(5)0.4% 二硫赤藓醇提取液:称取 4.0 g 二硫赤藓醇,溶于 1 000 mL 0.05 mol/L 硼酸缓冲液中(现配现用)。(6)4% 碘乙酰胺溶液:称取 4.0 g 碘乙酰胺,溶于 100 mL 0.025 mol/L 磷酸缓冲液中(现配现用)。(7)HPLC 流动相:分别量取 800 mL 水,1 mL 三氟乙酸,200 mL 乙腈,然后混匀。

1.3 方法

1.3.1 动物 32 周龄某品种蛋鸡 50 只,体重(1.6 ± 0.2) kg,从江苏省泰州市某蛋鸡场购回后,按常规饲养方法进行饲养,饲喂不含抗菌药物的全价饲料,连续饲喂 7 d,之后收集空白鸡蛋样品,备用。

1.3.2 色谱操作条件及参数 色谱柱:Agilent Zorbax XDB- C_{18} (4.6 m × 250 mm × 5 μm ,I.D);检测器:紫外检测器,检测波长 266 nm;流动相为水:三氟乙酸:乙腈 = 800:1:200(体积比);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:1.0 mL/min;进样量:100 μL 。

1.3.3 样品的提取净化步骤 (1)提取和衍生,将鸡蛋打碎,去壳转移到 100 mL 干净的小烧杯中,用玻璃棒将其搅拌均匀,称取(5.0 ± 0.1) g 鸡蛋样品,置 50 mL 具塞离心管中,加入 0.4% 二硫赤藓醇提取液 10 mL,涡旋 1 ~ 2 min 混匀,50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,每隔 3 ~ 5 min 涡旋振荡 1 次,振荡后立即放入水浴中,30 min 后置于室温。冷却后加入 4% 碘乙酰胺溶液 3 mL,涡旋 1 ~ 2 min 混匀,室温避光衍生 30 min,每隔 10 min,涡旋混匀 1 次。衍生完毕后加入 0.025 mol/L 磷酸缓冲液 5 mL,调节 pH 值至 2.5 ~ 3.0,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液置于另一离心管中,备用。(2)净化,用 3 mL 甲醇、3 mL 磷酸缓冲液预先将 C_{18} 固相萃取柱活化,然后将上清液加入柱中,用 10 mL 超纯水淋洗,真空固相萃取装置抽干,最后用 5 mL 甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,用 0.5 mL 流动相溶解,涡旋振荡 5 min,超声 5 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,取 100 μL 进行 HPLC 检测。

1.3.4 标准曲线制作 移取适量头孢噻呋标准工作液,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,然后按照方法“1.3.3”进行提取净化,每个浓度样品测定 3 次,不同时间重复上述操作 3 次,以头孢噻呋标准工作液浓度为横坐标(x),以测得的首孢噻呋峰面积为纵坐标(y)建立标准曲线,求出线性相关系数,计算

收稿日期:2012-12-27

基金项目:江苏农牧科技职业学院科研项目(编号:ZN1243)。

作者简介:刘明生(1976—),男,江西吉安人,博士,副教授,主要研究方向为药物残留检测技术研究。Email:4624689@qq.com。

线性回归方程。

1.3.5 回收率和精密度测定 称取空白鸡蛋匀浆 5 g, 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 分别加入 0.1、1.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液各 1 mL, 经上述方法提取和净化后, HPLC 检测, 求得鸡蛋样品中头孢噻唑在 0.02、0.20、2.00 $\mu\text{g/g}$ 水平上的回收率。测定时, 每个浓度处理在同一工作日内测定 5 次(日内); 在不同工作日测定 5 批次(日间), 每批次 5 次重复, 分别计算日内和日间的色谱峰面积平均值及标准误, 求日内和日间相对标准偏差(RSD)。

1.3.6 灵敏度测定 称取 5 份空白鸡蛋匀浆各 5 g, 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 分别加 0.05、0.10、0.25、0.50、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液各 1 mL, 使每 1 g 鸡蛋匀浆含头孢噻唑 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 μg , 按上述方法提取、净化,

再经 HPLC 检测, 观察出现头孢噻唑色谱峰的最低药物浓度。

2 结果

2.1 色谱峰与保留时间

试样中的头孢噻唑与二硫赤藓醇(DTE)溶液培养, 使头孢噻唑及去味喃甲酰头孢噻唑(DFC)有关代谢物从蛋白或含硫化合物中分离, 产生 DFC。DFC 与碘乙酰胺反应, 生成稳定的 DFC 乙酰胺衍生物(DCA), 原形药或代谢物均转化为 DCA。在本试验选定的色谱操作条件及参数下, 鸡蛋中的 DCA 与其他干扰杂质可有效分离。测得 DCA 的保留时间为 10.6 min(图 1), 从图 1 可以看出, 该色谱峰峰形较佳, 且均为基线分离峰。而空白对照组的鸡蛋匀浆提取液在上述保留时间无色谱峰出现。

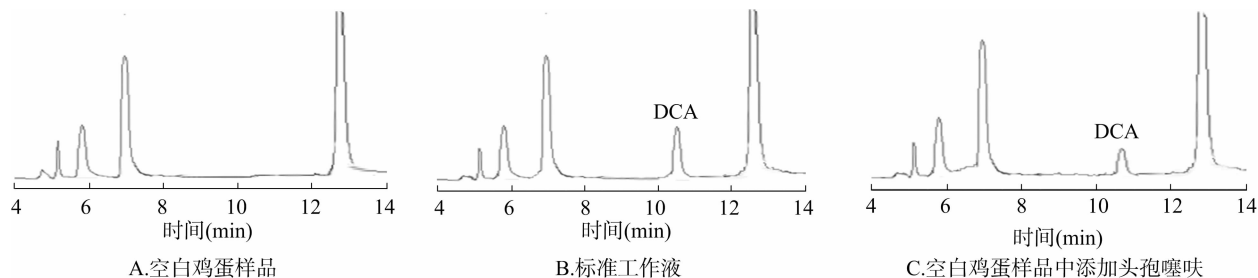


图1 头孢噻唑的高效液相色谱图

2.2 标准曲线

在选定的色谱操作条件和参数下, 标准工作液经方法 1.3.3 处理, 进样 100 μL , HPLC 测定, 得到当头孢噻唑浓度为 0.05 ~ 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 时头孢噻唑标准曲线的回归方程为: $y = 65.25x + 24.35$, 相关系数(r) = 0.999 8, 式中 y 代表头孢噻唑峰色谱峰面积, x 代表头孢噻唑标准液浓度($\mu\text{g/mL}$)。说明, 当头孢噻唑浓度为 0.05 ~ 10.00 $\mu\text{g/mL}$ 时线性关系良好。

2.3 回收率和精密度

鸡蛋中添加混合标准工作液后, 样品经提取、净化、HPLC 检测, 鸡蛋样品中头孢噻唑平均回收率为 90.41%, 日内 RSD 为 4.91%, 日间 RSD 为 5.57%。

表1 鸡蛋样品回收率和精密度测定结果

头孢噻唑添加量 ($\mu\text{g/g}$)	回收率 (%)	RSD (%)	
		日内	日间
0.02	87.25 \pm 5.62	5.84	4.93
0.20	92.86 \pm 4.45	4.65	6.76
2.00	91.12 \pm 3.78	4.25	5.02

2.4 灵敏度

将标准工作液添加到空白鸡蛋匀浆中, 使 1 g 鸡蛋匀浆含头孢噻唑 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 μg , 应用本试验所建立的方法测得鸡蛋样品中头孢噻唑最低检测限为 0.01 $\mu\text{g/g}$, 即 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

3 讨论

3.1 检测方法

国内外关于头孢噻唑的检测方法主要有高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)、高效液相色谱-质谱法(HPLC-MS)、微生物法和免疫分析法等, 其中 HPLC-UV 法是最常

用的检测方法。本试验也建立了用高效液相色谱技术测定鸡蛋中头孢噻唑残留的方法。鸡蛋样品经二硫赤藓醇提取, 碘乙酰胺衍生, C_{18} 固相柱萃取净化, 甲醇溶液洗脱, 结果表明, 该方法操作简便、快速、灵敏度高。

3.2 操作条件的选择

应用 HPLC 检测药物残留量时, 选择合适的液相色谱操作条件是至关重要的。在一定的柱温(30 $^{\circ}\text{C}$)下, 流动相的组分和流速直接影响到柱压, 进而影响到组分的保留时间。本试验在前人工作的基础上, 通过改变流动相混合物的组成、比例与流速, 调节柱压和组分在色谱柱中的分离效果, 使之出现了较佳的色谱峰和保留时间。

3.3 回收率和精确率

在空白鸡蛋样品中分别添加 0.02、0.20、2.00 $\mu\text{g/g}$ 水平的头孢噻唑, 测得头孢噻唑的回收率高, 日内、日间 RSD 小, 符合残留检测要求。

参考文献:

- [1] 农业部 1025 号公告-13-2008 动物性食品中头孢噻唑残留检测高效液相色谱法[S].
- [2] 申春红. 头孢噻唑在鸡体内的药物动力学研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [3] 李长流. 头孢噻唑钠在不同生产阶段猪体内的比较药代动力学研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [4] Makeswaran S, Patterson I. An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 529: 151-157.
- [5] Hornish R E, Hamlow P J, Brown S A. Multilaboratory trial for determination of ceftiofur residues in bovine and swine kidney and muscle, and bovine milk[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(1): 30-38.