

采用 Captiva EMR-Lipid 结合 HPLC-MS/MS 测定猪肉猪肝中 头孢噻呋及其代谢产物

作者

孙雷
中国兽医药品监察所

公敬欣, 邓素文, 吴翠玲
安捷伦科技 (中国) 有限公司

前言

头孢噻呋 (Ceftiofur, EFT) 是第三代头孢菌素中的一种, 它因抗菌谱广、抑菌活性强、药物半衰期长、药效持久等特点, 广泛应用于动物养殖过程中。但是, 头孢噻呋在动物饲养过程中的不规范使用会导致药物残留于动物源性食品中, 引起一系列食品安全问题; 而且可能导致细菌产生耐药性, 给人类的健康带来隐患。

EFT 进入动物体内后, 会在短时间内被吸收, 并代谢成同样具有抗菌活性的去哌喃甲酰基头孢噻呋 (Desfuroylceftiofur, DFC)。《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019) 中指定的头孢噻呋的残留标志物为 DFC, 并且规定牛/猪肌肉组织中的残留限量为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 肝组织中的残留限量为 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本文采用 Captiva EMR-Lipid 结合 HPLC-MS/MS 建立了一种分析猪肉和猪肝中头孢噻呋及其代谢产物的方法。该方法采用头孢噻呋代谢产物 DFC 作为标志物, 可以更加准确地反映头孢噻呋在动物源性食品中的实际代谢情况, 避免仅分析头孢噻呋原型药时无法检出的安全漏洞问题, 更好地保障食品安全。

头孢噻吩及其代谢产物分析

硼酸盐缓冲溶液 (pH 9) 配制：准确称取四硼酸钠 1.90 g 和氯化钾 0.37 g，加水约 90 mL 后用磷酸将 pH 调节至 9.0 (±0.1)，用水定容至 100 mL。

二硫赤藓醇 (DTE) 提取溶液的配制：准确称取 5.0 g 二硫赤藓醇，用硼酸盐缓冲溶液 (pH 9) 溶解并定容至 250 mL，现配现用。

5% 甲酸乙腈:水 (4:1) 溶液的配制：准确量取 80 mL 乙腈、15 mL 水和 5 mL 甲酸，混合均匀。

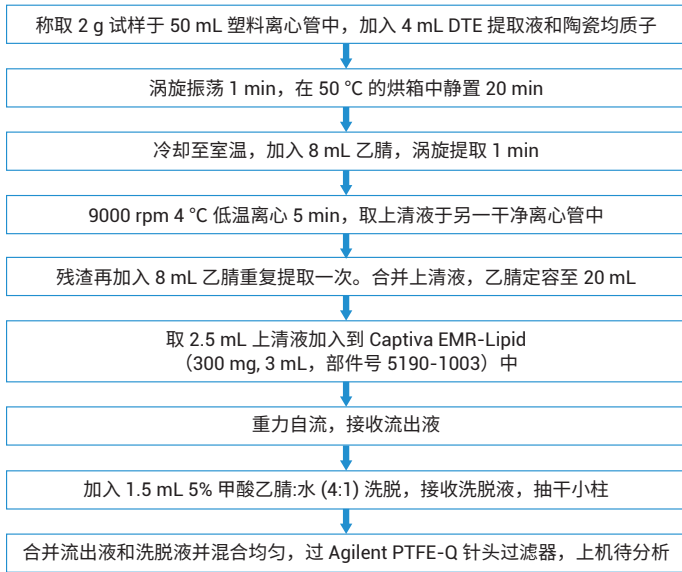


图 1. 样品前处理流程

表 1. 液相色谱分析条件

色谱系统	Agilent 1290 Infinity II 高液相色谱系统
色谱柱	Agilent-Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm
流动相 A	0.05% 甲酸水溶液
流动相 B	乙腈
流速	0.3 mL/min
进样量	2 μL
柱温	30 °C
梯度条件	0.0 min, 5% B 1.0 min, 5% B 3.0 min, 50% B 4.5 min, 50% B 5.0 min, 95% B 6.0 min, 95% B
后运行时间	2 min

表 2. 质谱条件

质谱	Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统
离子源	ESI+
监测模式	0 min, MRM, 至废液 1 min, MRM, 至 MS
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	7 L/min
鞘气温度	325 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3000 V
喷嘴电压	300 V

表 3. 头孢噻吩及其代谢产物的质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
去乙酰氨基头孢噻吩 (DFC)	429.8	125.9	130	20
		240.9	130	15
		226.9	130	20
头孢噻吩 (EFT)	524.0	241.0	130	16
		210.0	130	24
		125.9	130	48

头孢噻吩在动物体内主要以其代谢物 DFC 的形式存在，DFC 在血浆、尿液和组织中极少以游离状态或原型存在，其通过 3 位取代基上的巯基与半胱氨酸、谷胱甘肽形成二硫化合物，还可能与血浆蛋白或组织蛋白结合以形成 DFC-蛋白复合物。结合态 DFC 不容易被溶剂萃取出来，因此需要使结合态化合物转化为游离态。DTE (二硫赤藓醇) 可以切断二硫酯键，使结合态 DFC 及原型药 EFT 转化为游离态 DFC。经过样品前处理后，上机分析的溶液中仅含游离态 DFC。如下表 4 所示，原型药 EFT 转换为游离态 DFC 以 EFT 平均转换系数表示，并在表 5 不同加标浓度下的回收率计算时使用。

表 4. 不同加标浓度下的 EFT 平均转换系数* (n = 3)

基质	加标浓度	80 μg/kg	100 μg/kg	500 μg/kg
	EFT 平均转换系数	EFT 平均转换系数	EFT 平均转换系数	EFT 平均转换系数
猪肉	1.61	1.41	1.57	
猪肝	1.43	1.44	1.32	

$$* \text{ EFT 平均转换系数} = \frac{\text{EFT 计算浓度}}{\text{EFT 添加浓度}}$$

如图 3 所得数据, 以 6.25 ng/mL 的基质标准品 (用基质空白配置的标准溶液) 的峰面积除以 6.25 ng/mL 的溶剂标准品的峰面积百分比, 考察头孢噻呋代谢产物在不同基质中的基质效应。结果表明, 头孢噻呋代谢产物在猪肉、猪肝中的基质效应分别为 108% 和 182%。因此, 采用基质校正定量方法。

利用基质空白溶液配制标准溶液, 并对其分析绘制标准曲线。该标准曲线在 3.125–200 ng/mL 的范围内表现出良好的线性, $R^2 > 0.999$, 如图 2 所示。头孢噻呋代谢产物在猪肉和猪肝中的平均回收率分别为 98.7%–107.0% 和 89.9%–99.3%, 且 RSD 均小于 10% ($n = 3$), 如表 5 所示。以最低添加回收浓度作为方法定量限, 计算得到猪肉和猪肝样品的定量限为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 检测限 ($S/N \geq 3$) 分别为 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 5. 不同加标浓度下的回收率* 与相对标准偏差 ($n = 3$)

基质 \ 加标浓度	80 $\mu\text{g}/\text{kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
猪肉	99.9	1.1	107.0	1.9	98.7	3.1
猪肝	99.3	7.4	89.9	7.1	90.3	8.6

$$* \text{回收率} = \frac{\text{MIX 计算浓度}}{(\text{DFC 加标浓度} + \text{EFT 加标浓度} * \text{EFT 平均转换系数})} \times 100\%$$

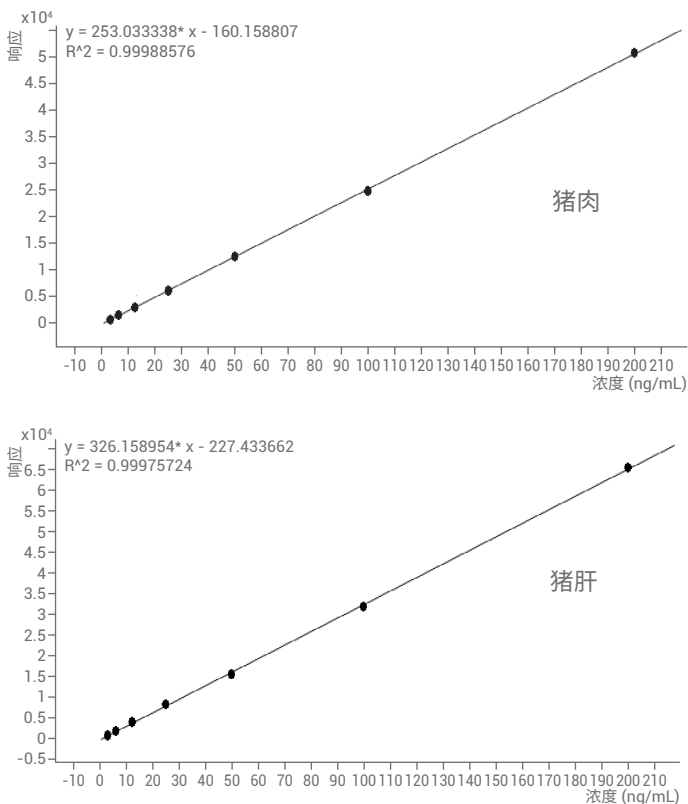


图 2. DFC 基质标准曲线

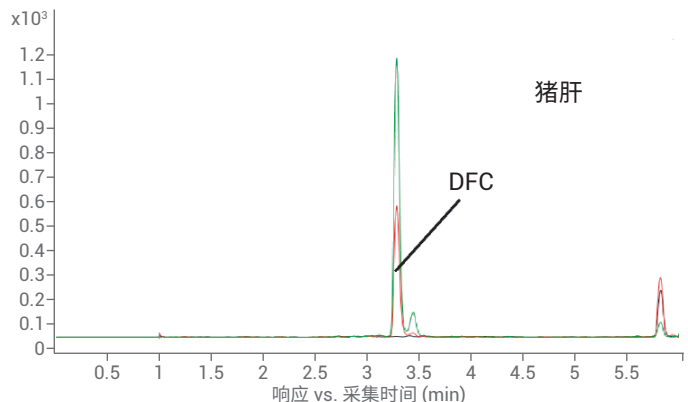
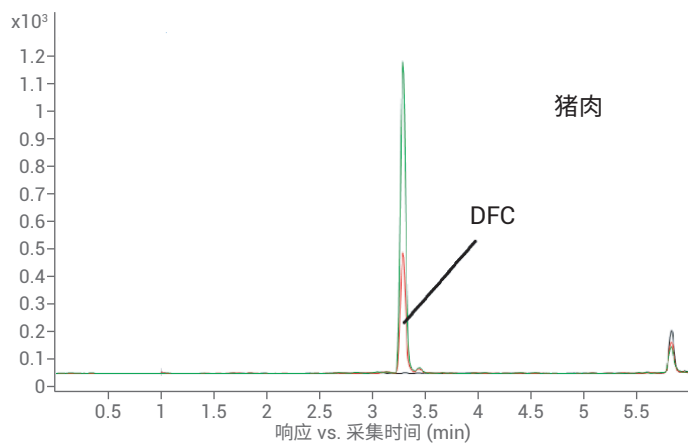


图 3. DFC 空白样品 (黑色)、6.25 ng/mL DFC 基质标准品 (橙色)、加标样品 (同时添加 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EFT 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DFC) (绿色) 的 MRM 色谱图

结论

本文采用 Captiva EMR-Lipid 结合 HPLC-MS/MS 建立了一种分析猪肉和猪肝中头孢噻呋及其代谢产物的方法。该方法操作简单、回收率高, 且以头孢噻呋代谢产物为标志物可以更准确地反映头孢噻呋在动物源性食品中的实际代谢情况, 避免仅分析头孢噻呋原型药时无法检出的安全漏洞。

Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱无需经过活化平衡, 就可将乙腈提取液混合一定比例 (20%) 的水相直接加载到过滤柱上, 收集滤液, 浓缩或过膜后直接分析, 从而大大提高了样品前处理效率。另外, Captiva EMR-Lipid 过滤柱采用特殊的填料结构, 可有效去除动物源性食品中的长链脂质化合物, 有效避免色谱柱污染, 从而大大延长色谱柱使用寿命。总之, 本文所述的方法适用于检测猪肉和猪肝中的头孢噻呋及其代谢产物。

消耗品订购信息

消耗品	部件号
Agilent Captiva EMR-Lipid, 300 mg, 3 mL	5190-1003
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1 \times 100 mm, 2.7 μm	695775-902
Agilent PTFE-Q 针头过滤器, 0.2 μm , 13 mm	5191-4294
Agilent VacElut 20 固相萃取装置	12234104

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2020
2020年11月18日, 中国出版
5994-2886ZHCN

