

头孢噻呋在猪组织中残留消除规律

李帅鹏¹, 黄显会¹, 孔祥凯¹, 张晓会², 李向阳²

(1. 华南农业大学国家兽药残留基准实验室, 广州 510642; 2. 洛阳惠中兽药有限公司, 洛阳 471003)

摘要: 本研究旨在分析头孢噻呋在猪体内的残留消除规律, 并为制定休药期提供依据。改进了猪可食性组织中头孢噻呋残留检测的高效液相色谱法(HPLC), 试验猪按体重以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌注给药, 连续给药 3 d, 分别在最后一次给药后第 12 小时及第 3、5、7、9 天随机宰杀 5 头猪取样。样品先用二硫赤藓糖醇提取, 再用碘乙酰胺衍生化后经 MCX 固相萃取小柱净化, 经高效液相色谱 C_{18} 柱分离后用紫外检测器检测。结果显示: 给药后第 12 小时肾脏组织中的药物浓度最高, 为 $2.589 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 第 3 天所有组织的药物浓度均低于最高残留限量(MRL)。采用 Win-nonlin 软件计算各组织的消除动力学参数, 消除快慢依次为皮脂、肌肉、肝、肾和注射位点, 其消除半衰期($t_{1/2\beta}$)分别为 28.99、35.80、36.76、55.72 和 160.8 h。肾的药时曲线下面积(AUC)最高, 为 $123.4 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$, 说明肾脏是头孢噻呋作用的靶器官。参照 EMEA 对头孢噻呋制定的 MRL, 计算得注射位点的休药期最长, 为 98.64 h。结果提示水性头孢噻呋注射液吸收迅速, 体内分布广, 消除较快, 建议休药期为 5 d。

关键词: 高效液相色谱; 头孢噻呋; 残留; 休药期

中图分类号: S859.84

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)08-1311-06

Determination of Ceftiofur Residues in Swine Tissues

LI Shuai-peng¹, HUANG Xian-hui¹, KONG Xiang-kai¹, ZHANG Xiao-hui², LI Xiang-yang²

(1. National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Luoyang Huizhong Animal Medicine CO. LTD, Luoyang 471003, China)

Abstract: This experiment was conducted to study tissue residues of ceftiofur in swine, preparing for determination of the withdrawal time. A confirmative method has been improved to determine ceftiofur residues in edible tissues of pigs by high-performance liquid chromatography (HPLC). Ceftiofur was administered to 30 healthy pigs intramuscularly at a dosage of $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for 3 consecutive days. Animals were sacrificed at 12 hours and the 3rd, 5th, 7th, 9th days after administration. The tissues were extracted with dithioerythritol, derivatized with iodoacetamide, and cleaned up on MCX solid-phase extraction cartridges. The analyte was detected by UV absorptive spectroscopy after separation by C_{18} column. The results showed that kidney had the highest drug concentration with $2.589 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ at 12 hours, while the concentration of ceftiofur in all of tissues at 3 days was lower than the Maximum Residue Limit (MRL). The pharmacokinetic parameters were estimated using Winnonlin software package. The results indicated that the elimination rate was skin/fat > muscle > liver > kidney > injection site, with the elimination half-life of 28.99, 35.80, 36.76, 55.72, 160.8 h respectively. Compared with other tissues, the area under concentration-time curve (AUC) in kidney was highest with $123.4 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$. Kidney was considered as the target organ. According to the MRL set by EU, the longest withdraw-

收稿日期: 2013-03-18

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303038-5)

作者简介: 李帅鹏(1988-), 男, 河南省鲁山县人, 硕士生, 主要从事兽药残留检测和药物代谢动力学方面的研究, E-mail: 1632762954@qq.com

* 通信作者: 黄显会, E-mail: xhhuang@scau.edu.cn

al time was suggested in injection site with 98.64 h. The results demonstrated that absorption and elimination was quickly and the distribution was wide. It is proposed that the withdrawal time was 5 days.

Key words: high-performance liquid chromatography; ceftiofur; residue; withdrawal time

头孢噻呋(ceftiofur)又名赛得福,是第1个动物专用的第3代头孢菌素类抗生素^[1]。1988年,FDA批准了头孢噻呋钠用于治疗牛呼吸道细菌性疾病,此时该药在美国首次上市^[2]。此后FDA又陆续批准了头孢噻呋钠、盐酸头孢噻呋及头孢噻呋晶体自由酸用于1日龄鸡、火鸡、猪、肉牛、奶牛、马、山羊及绵羊等的呼吸道疾病的治疗^[3-5]。加拿大、日本及欧洲一些国家也相继正式批准用于猪、肉牛、奶牛、羊的呼吸道疾病的治疗^[6]。头孢噻呋抗菌谱广,抗菌活性强,对革兰阳性菌、阴性菌及厌氧菌都有很强的抗菌活性,而且对胃酸和 β -内酰胺酶较稳定,过敏反应少,体内残留非常低,在世界范围内得到广泛应用^[7]。目前,国内有多家公司相继研制出头孢噻呋注射液,但制剂的溶剂体系均为植物油、大豆油等油性介质。华南农业大学联合洛阳惠中兽药有限公司在国内首先研制出水性头孢噻呋注射液,由于其溶剂体系为水性,流动性好,易于吸收,肌注时不容易堵塞针头,对动物的刺激性小,具有广阔的市场应用前景。为了全面地了解该注射液在猪体内的残留情况,为制定相应的休药期,指导临床合理应用提供理论依据,特进行该研究。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:ALLIANCE Waters e2695,美国WATERS公司;AUX 120型电子分析天平,日本SHIMADZU(岛津)公司;Mach1.6R冷冻型离心机,美国Thermo公司;KS501digital轨道式摇床,德国IKA公司。乙腈、三氟乙酸(TFA)均为色谱纯,二硫赤藓糖醇、碘乙酰胺、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、四硼酸钠、乙酸铵均为分析纯。头孢噻呋注射液:含量5%,批号20110701,购自洛阳惠中兽药有限公司;头孢噻呋标准品:纯度96.0%,购自德国Dr. Ehrenstorfer公司。

1.2 溶液配制

头孢噻呋标准储备液($1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$):准确称取头孢噻呋标准品26.04 mg于25 mL棕色容量瓶中,用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液配制成 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 头

孢噻呋标准液,密封, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,临用前用 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液配成系列标准工作液。pH 7.0磷酸盐缓冲液:准确量取 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钠溶液390 mL,加 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸氢二钠溶液610 mL,混合即得; $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四硼酸钠缓冲液:准确称取19.10 g四硼酸钠,加水溶解并定容至1 000 mL; $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙酸铵溶液:准确称取3.85 g乙酸铵,加水溶解并定容至1 000 mL; $130\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫赤藓糖醇(DTE)工作液(现配现用):准确称取DTE 1.0 g,加 $0.05\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四硼酸钠缓冲液溶解并定容至50 mL; $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的碘乙酰胺工作液(现配现用):准确称取碘乙酰胺5.0 g,加pH 7.0的磷酸盐缓冲液溶解并定容至50 mL。

1.3 试验动物

30头健康的长白 \times 大白杂交猪,体重75 kg左右,公母兼有,公猪已去势,购于广东省种猪场。按常规饲养,自由饮水和采食,饲料为全价日粮,不含任何抗菌药物。临床观察2周表现健康。

1.4 给药和样品采集

将30头猪随机分为6组进行残留消除试验,每组5头,试验猪按体重以 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 颈部肌肉注射给药,每天1次,连续给药3 d。分别在最后一次给药后第12小时及第3、5、7、9天随机宰杀5头猪。分别采集以下组织和部位,肌肉:背部左侧的背最长肌,500 g;肝脏:最大叶部位,500 g;肾脏:双肾纵切,各取一半;注射位点肌肉:皮肤去毛后,以注射点为中心,划 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}$ 方形,采 $10\text{ cm}\times 10\text{ cm}\times 6\text{ cm}$ (深)的肌肉样本;皮脂:腹部脂肪200 g。各样品采集后立即做好标记、包装,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,待测。

1.5 色谱条件

色谱柱:Gemini 5u C_{18} 100A($250\text{ mm}\times 4.0\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$),美国Penomenex公司;流动相:A液为0.1%TFA水溶液,B液为乙腈,梯度洗脱,流速为 $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;紫外检测波长为266 nm;柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。流动相梯度洗脱条件: $0\sim 11\text{ min}$,100% A \sim 68% A; $11\sim 12\text{ min}$,68% A \sim 100% A;

12~13 min, 100% A。

1.6 样品处理

1.6.1 提取与衍生 已匀浆组织在室温下自然解冻, 称取(2.00±0.02)g 组织样品于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 2% DTE 溶液, 摇匀, 放入恒温振荡水槽仪中 50 °C 温浴 20 min。取出, 静置至室温, 加入 2 mL 10% 碘乙酰胺溶液, 摇匀, 用锡纸包好置于恒温振荡培养箱中 30 °C 衍生 30 min, 衍生后的混合液体加 500 μL 20% 的磷酸酸化, 加入 5 mL 水混匀。离心 20 min (4 °C, 10 000 r·min⁻¹); 取 7 mL 中间层清液备用。

1.6.2 净化 将“1.6.1”最后所得的中间层液过 MCX 固相萃取柱, 保持流速 1~2 mL·min⁻¹, 再依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水淋洗, 真空抽干 4 min; 加入 1 mL 醋酸铵-乙腈(85+15)混合洗脱液; 所得的洗脱液用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 50 μL 进样。

1.7 标准曲线制作

准确称取空白匀浆组织适量, 添加 100 μL 头孢噻呋系列标准工作液, 使得样品中头孢噻呋浓度分别为 0.1、0.25、0.5、1、2.5、5、10 μg·g⁻¹。按“1.6”方法处理和测定, 将去味喃羰基头孢噻呋乙酰胺(des-furoyl ceffiofur acetamide, DCA) 的色谱峰面积(A) 与相对应的药物浓度(C) 作线性回归, 求得标准曲线方程和相关系数, 共作 3 个批次。

1.8 检测限和定量限

准确称取适量空白匀浆组织, 添加头孢噻呋系列标准工作液适量, 配置成系列加标样品, 按“1.6 组织样品前处理方法”处理样品, 再按“1.5 色谱条件”进行 HPLC 分析测定。以最低检出浓度计算, S/N≥3 时的加标样品浓度为检测限, S/N≥10 时的加标样品浓度为定量限。

1.9 回收率和精密度

采用在空白样品中加标的方法进行回收率和精密度的测定。根据中国对头孢噻呋制定的最高残留限量及残留控制要求, 在空白组织中加入头孢噻呋标准工作液, 制成含药物浓度为 0.1、1、10 μg·g⁻¹ 的肾、肝、肌肉、脂肪组织。按“1.6”方法处理和测定, 进样分析, 每批每个浓度平行 5 个重复样品, 共 3 个批次, 以样品 DCA 峰面积与标液衍生化后上机测定的 DCA 峰面积之比, 求得低、中、高 3 种浓度的回收率, 计算批内和批间变异系数。

1.10 数据处理

根据测得组织中残留头孢噻呋的浓度, 采用美国 Pharsight 公司药动学软件 Winnonlin5.2.1 的非房室模型计算不同组织的消除动力学参数; 运用计算机软件 WT1.4, 计算不同组织中头孢噻呋的休药期。

2 结果

2.1 检测方法的有效性

本方法检测条件下, DCA 与组织中的其它组分分离良好, 相互之间无干扰; DCA 在组织中的保留时间约为 9.7 min 左右。头孢噻呋标准溶液、空白组织、空白添加样品、连续给药后样品色谱图如图 1 所示。各组织添加质量浓度在 0.1~10 μg·g⁻¹ 范围内, 线性关系良好, 相关系数均大于 0.999。该方法检测限为 0.05 μg·g⁻¹, 定量限为 0.1 μg·g⁻¹, 低于中国规定的最大残留限量值。各组织回收率为 82.87%~116.76%, 批内变异系数为 1.62%~11.21%, 批间变异系数为 3.13%~11.62%。药物回收率及变异系数符合农业部相关规定, 表明该方法能够满足头孢噻呋残留消除规律试验要求。

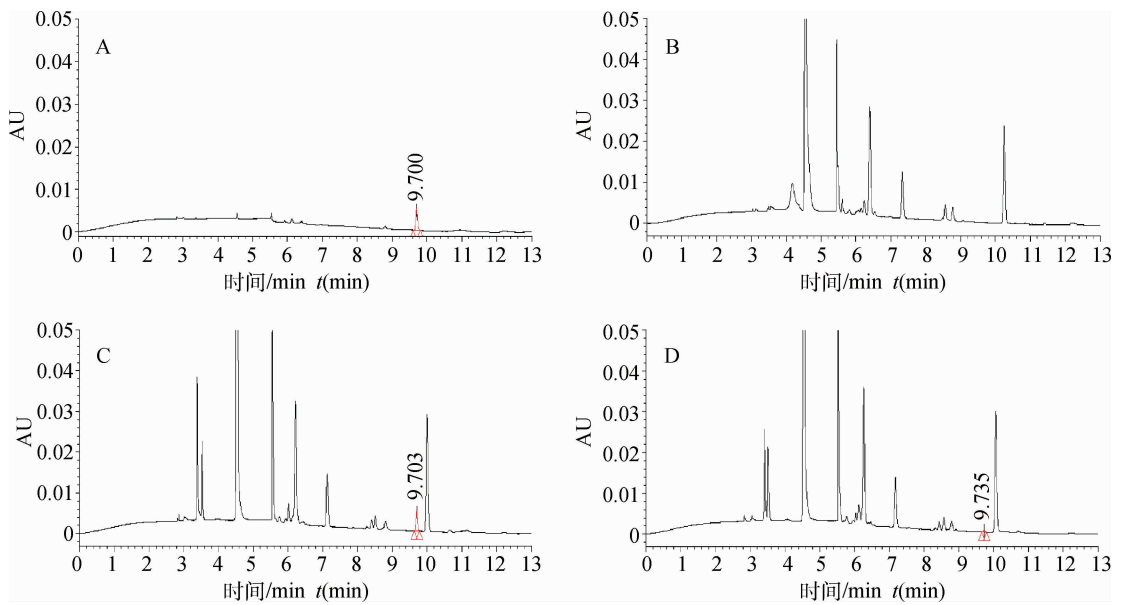
2.2 头孢噻呋在猪组织残留消除

对给药后不同时间点采集的样品进行检测, 检测结果见表 1。从表 1 可以看出试验猪按体质量以 5 mg·kg⁻¹ 肌注给药, 连续给药 3 d, 最后一次给药后 12 h 药物在猪体内分布广泛, 能迅速达到各个脏器。各组织均达到最高药物浓度。给药后 12 h 只有皮脂和注射位点的药物浓度略高于 MRL, 所有部位在 3 d 后药物浓度均低于 MRL。给药后 12 h 肾脏组织中的药物浓度最高, 为 2.589 μg·g⁻¹。

采用统计矩原理计算头孢噻呋在各组织中的残留消除参数, 结果见表 2。由表 2 可见肾脏的 AUC (药时曲线下面积) 最高, 为 123.4 h·μg·g⁻¹。注射位点的 $t_{1/2\beta}$ 最长, 为 160.8 h, MRT (平均滞留时间) 为 52.75 h。

2.3 头孢噻呋在猪组织中的休药期

参照 EMEA^[8] 制定的 MRL: 肝脏 2 μg·g⁻¹、肾脏 6 μg·g⁻¹、肌肉 1 μg·g⁻¹、脂肪 2 μg·g⁻¹, 经计算机软件 WT1.4 处理药物浓度-时间数据 (95% 置信限), 计算头孢噻呋在猪组织中的休药期, 结果见图 2 和表 3。



A. 头孢噻呋标准溶液($1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$); B. 空白肌肉; C. 空白肌肉添加($1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); D. 连续给药后肌肉样品

A. $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ standard solutions of ceftiofur; B. Blank muscle; C. Blank muscle spiked with $1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ceftiofur; D. The muscle after 3 days' administration

图 1 头孢噻呋衍生化 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of ceftiofur

表 1 不同时间点组织中头孢噻呋残留量($n=5$)

Table 1 The concentration of ceftiofur in tissues in different time ($n=5$)

$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

时间/d Time/d	肌肉 Muscle	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	皮脂 Skin/Fat	注射位点 Injection site
0.5	0.487 ± 0.097	2.589 ± 0.184	0.961 ± 0.236	2.078 ± 0.497	1.602 ± 0.132
3	0.103 ± 0.012	0.340 ± 0.018	0.119 ± 0.015	0.223 ± 0.013	0.254 ± 0.015
5	0.062 ± 0.007	0.194 ± 0.022	0.135 ± 0.018	0.167 ± 0.023	0.189 ± 0.015
7	ND	0.103 ± 0.040	ND	ND	0.174 ± 0.061
9	ND	ND	ND	ND	0.131 ± 0.007

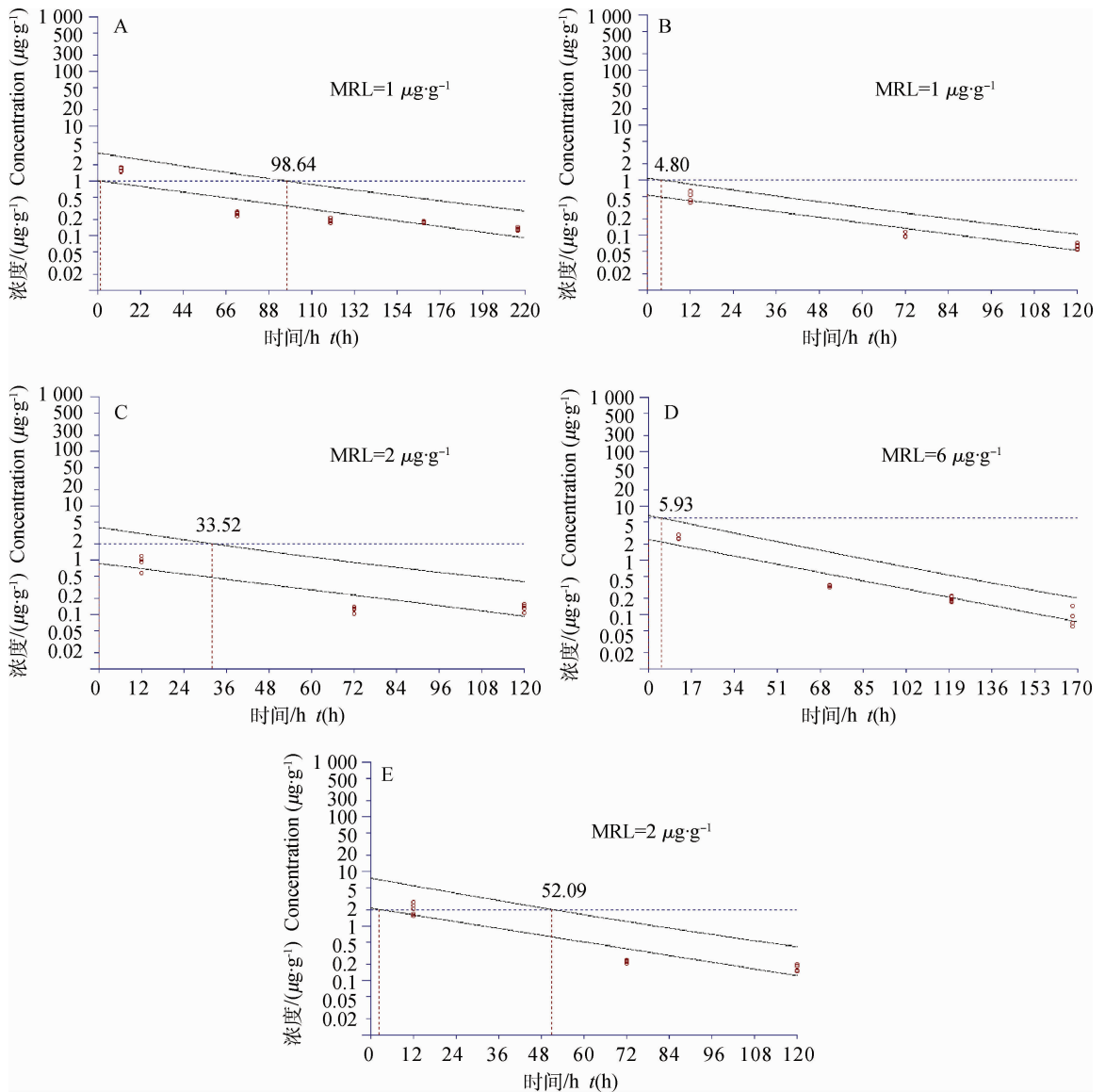
ND. 未测得

ND. Not determined

表 2 头孢噻呋在猪组织中的消除动力学参数

Table 2 Pharmacokinetic parameters in pigs following the injection of ceftiofur

参数 Parameters	单位 Unit	肌肉 Muscle	皮脂 Skin/Fat	肝脏 Liver	肾脏 Kidney	注射位点 Injection site
β	1/h	0.019	0.024	0.019	0.012	0.004
$t_{1/2\beta}$	h	35.80	28.99	36.76	55.72	160.80
AUC	$\text{h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	24.58	90.86	44.26	123.40	91.96
MRT	h	32.11	24.72	28.62	32.21	52.75



A. 注射部位; B. 肌肉; C. 肝脏; D. 肾脏; E. 皮脂

A. Injection site; B. Muscle; C. Liver; D. Kidney; E. Skin/Fat

图 2 WT1.4 各组织休药期计算结果(95%置信限)

Fig. 2 The withdrawal time of tissues(95% confidence limits)

表 3 头孢噻呋在各组织中的休药期

Table 3 The withdrawal time of ceftiofur in each tissue

组织 Tissue	肌肉 Muscle	注射位点 Injection site	皮脂 Skin/Fat	肾脏 Kidney	肝脏 Liver
休药期 WDT	4.80	98.64	52.09	5.93	33.52

3 讨论

3.1 净化条件的优化

有报道只用 HLB 固相萃取柱净化马血浆和关节液, 然后用 HPLC 方法检测^[9], 也有报道用 Oasis

HLB 固相萃取柱净化牛奶, 然后用液相串联质谱检测^[10], 农业部 1025 号公告-13-2008 颁布的国家标准依次用 C₁₈ 柱、SAX 柱和 SCX 柱 3 根固相萃取小柱净化组织样品。本试验过程中也比较过用 Oasis HLB 1 根小柱净化和用 Oasis HLB、SCX 2 根小柱

净化,虽然 HLB 是亲水亲脂通用型的固相萃取小柱,但它并不能特异性除去衍生化之后组织样品中的干扰杂质;Oasis HLB、SCX 2 根小柱净化,肌肉和血脂中药物峰与杂质峰能较好分离,但肾脏和肝脏中药物峰与杂质峰的分离不稳定。本试验样品处理在国家标准《动物性食品中头孢噻呋残留检测 高效液相色谱法》基础上改进的,采用 MCX 固相萃取小柱进行净化,能较好地除去衍生化之后组织样品中的干扰杂质,所有组织的药物峰与杂质峰分离度好又稳定。定量限达到 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,能满足组织中药物浓度的检测。本方法快速、简便、准确,单个样品的运行时间和国家标准的方法相比,缩短了 10 min,适用于生产实践中大批量样品的快速检测,效率较高,成本较低。

3.2 头孢噻呋在猪组织中的分布与消除

试验猪按体质量以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌注给药,连续给药 3 d,最后一次给药后 12 h,各组织均达到最高药物浓度,其中以肾脏最高,为 $2.589 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。表明头孢噻呋在猪体内能被迅速吸收,且分布广泛。给药后 12 h 只有血脂和注射位点的药物浓度略高于 MRL,所有部位在 3 d 后药物浓度均低于 MRL,表明头孢噻呋在猪体内消除较快。

给药后 12 h 注射位点的药物浓度为 $1.602 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,仅次于肾脏,其 $t_{1/2\beta}$ 最长,为 160.8 h,说明该药物在注射位点吸收较快,消除缓慢,在注射位点有一定程度的蓄积。给药后 12 h 肾脏组织中的药物浓度最高,为 $2.589 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,且肾脏的 AUC 最高,为 $123.4 \text{ h} \cdot \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$,说明肾脏是头孢噻呋的主要代谢器官,药物经肾脏排泄而蓄积的结果,这与之前的报道^[11]一致。给药后 7 d 血脂、肌肉和肝脏已检不出头孢噻呋,同时这 3 种组织的 $t_{1/2\beta}$ 分别为 28.99、35.80、36.76 h, MRT 分别为 24.72、32.11、28.62 h,表明该药在血脂、肝脏和肌肉中分布较少,消除较快。试验结果表明:该注射液在猪体内吸收较快,分布广泛,消除较快。

3.3 关于头孢噻呋休药期的评价

参照 EMEA 制定的 MRL,经计算机软件 WT1.4 处理药物浓度-时间数据(95%置信限),测得头孢噻呋注射液按体质量以 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肌注给药,连续给药 3 d 后,各组织的休药期分别如下:肌

肉 4.80 h、肝脏 33.52 h、肾脏 5.93 h、血脂 52.09 h、注射位点为 98.64 h。根据以上 WT1.4 软件分析结果建议休药期为 5 d。

参考文献:

- [1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京:中国农业出版社, 2002:214-217.
- [2] 郭桂芳,梁先明,杨大伟,等. 肌肉注射盐酸头孢噻呋混悬注射液对猪安全性试验[J]. 中国兽医杂志, 2010,46(11):66-69.
- [3] 胡振英,张新国,罗永江,等. 头孢噻呋钠在猪体内的药代动力学和生物利用度研究[J]. 中兽医医药杂志, 2003(5):14-16.
- [4] 郝智慧,刘力,冯淇辉. 动物性食品中头孢噻呋残留检测研究[J]. 动物科学与动物医学,2004,21(4):26-27.
- [5] 李长流,俞道进,马玉芳,等. 猪血浆中去呋喃甲酰基头孢噻呋浓度的 HPLC 测定[J]. 福建农林大学学报, 2010,39(1):58-62.
- [6] 王付民,胡功政,苑丽. 新的第三代头孢菌素—头孢噻呋[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2001,11(4):2-4.
- [7] 王丽霞. 盐酸头孢噻呋注射液在猪体内的药理学及安全性研究[D]. 广州:华南农业大学,2010.
- [8] Committee for Veterinary Medicinal Products Ceftiofur. EMEA/CVMP/MRL/80785/2006-FINIAL [M]. The European Agency for Evaluation of Medicinal Products, 2006.
- [9] BARERE S D, PILLE F, CROUBELS, et al. High-performance liquid chromatographic-UV detection analysis of ceftiofur and its active metabolite desfuroyl ceftiofur in horse plasma and synovial fluid after regional intravenous perfusion and systemic intravenous injection of ceftiofur sodium[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004,1(512):75-84.
- [10] BECKER M, ZITTELEU E, PETZ M. Quantitative determination of ceftiofur related residues in bovine raw milk by LC-MS/MS with electrospray ionization [J]. *Eur Food Res Technol*, 2003,217(5):449-456.
- [11] 曾繁活. 盐酸头孢噻呋混悬注射液在猪的药理学及组织残留研究[D]. 广州:华南农业大学,2009.

(编辑 白永平)