

QuEChERS—UPLC—MS/MS 法同时测定羊奶中 8 种 β -内酰胺类抗生素

Determination of β -lactams by ultra performance liquid
chromatography-tandem mass spectrometry with QuEChERS in goat milk

王帅帅^{1,2} 郑小平² 孟瑾² 何亚斌²

WANG Shuai-shuai^{1,2} ZHENG Xiao-ping² MENG Jin² HE Ya-bin²

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; 2. 上海必诺检测技术服务有限公司, 上海 200436)

(1. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. ShangHai Bino Testing Service co., LTD, Shanghai 200436, China)

摘要:建立 QuEChERS 净化样品, 超高效液相色谱—串联质谱同时测定羊奶中 8 种 β -内酰胺类抗生素的检测方法。样品以乙腈作为提取试剂, 用 C_{18} 和 PSA 吸附剂进行净化, 以 0.1% (V/V) 甲酸水溶液—乙腈为流动相, 反相 C_{18} 色谱柱分离, 正离子扫描, 多反应监测模式进行质谱分析。结果表明, 8 种 β -内酰胺类抗生素的线性关系良好, 相关系数均大于 0.986, 样品加标回收率为 83.8%~95.4%, 相对标准偏差小于 6.5%, 方法检出限为 0.25~1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 1.0~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法适用于羊奶及其它奶制品中 β -内酰胺类抗生素的测定。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱; 羊奶; β -内酰胺类抗生素; QuEChERS

Abstract: A method was developed for simultaneous determination of 8 β -lactams in goat milk by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC—MS/MS). The milk was extracted with acetonitrile, purified with C_{18} and PSA sorbent and separated by an ACQUITY UPLC BEH C_{18} column using water (containing 0.1% formic acid) and acetonitrile as mobile phase. The mass spectrometric acquisitions were carried out by means of multiple reaction monitoring (MRM) in positive ionization mode. The linear relation of eight β -lactams was good and the correlation coefficient was more than 0.986. The recovery rates of the target analyte were between 83.8%~95.4%. The relative standard deviations were less than 6.5%. The limit of detection (LOD) of 8 β -lactams was 0.25~1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limit of quantification (LOQ) was 1.0~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. This method was reliable for the determination of β -lactams in goat milk and other dietary products.

Keywords: UPLC—MS/MS; goat milk; β -lactams; QuEChERS

羊奶营养丰富、易于吸收, 其蛋白质和脂肪含量均高于牛奶, 被国际营养学界称为“奶中之王”^[1]。在中国奶类产量中, 山羊奶是第二大奶类, 中国已成为饲养奶山羊最多的国家^[2]。 β -内酰胺类抗生素可以治疗奶羊乳腺炎、心包炎等疾病, 在奶羊养殖过程中, 由于缺乏科学用药的知识, 或受经济利益的驱使, 不合理用药现象仍很严重^[3]。长期食用含有 β -内酰胺类抗生素的羊乳会引起疾病, 如过敏反应、致畸反应以及增加细菌的耐药性^[4]。

目前, 国内外关于羊奶中 β -内酰胺类抗生素的检测报道较少^[5], 牛奶中 β -内酰胺类抗生素的测定多采用传统的固相萃取法 (SPE) 净化样品^[6-9], 与传统的固相萃取净化法相比, QuEChERS 净化法具有样品前处理时间短、节省溶剂、降低检测成本等优点。本研究拟在参考牛奶中 β -内酰胺类抗生素检测方法^[10-13]的基础上, 用改进的 QuEChERS 净化法^[14], 结合超高效液相色谱串联质谱法 (UPLC—MS/MS) 测定羊奶中 8 种 β -内酰胺类抗生素。试验以乙腈为提取试剂, C_{18} 和 PSA 吸附剂净化处理, 具体考察提取试剂、吸附剂类别和用量等条件对回收率的影响。以期羊奶中 β -内酰胺类抗生素的检测提供一种快速、可靠的检测方法, 同时对相关标准的制定亦具有指导意义。羊奶中蛋白质和脂肪的含量与牛奶中相差不大, 本方法也适用于牛奶中 β -内酰胺类抗生素的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱—串联质谱仪: Waters XEVO TQ 型,

作者简介:王帅帅(1987—), 男, 上海海洋大学在读硕士研究生。

E-mail: 13162738271@163.com

通讯作者:郑小平

收稿日期:2014-09-15

ESI 源,美国沃特世公司;

高速冷冻离心机:Heraeus Multifuge X1R 型,美国热电公司;

氮吹仪:ANPEL DC12 型,上海安谱科学仪器有限公司;

超声波仪:TH 型,上海安谱科学仪器有限公司。

乙腈:色谱纯,德国 Merck 公司;

甲酸:分析纯,美国 Sigma 公司;

C₁₈ 粉,PSA 吸附剂:天津博纳艾杰尔科技有限公司;

标准品:阿莫西林、头孢唑肟、头孢氨苄、氨苄西林、头孢噻吩、青霉素 G、苯唑西林、氯唑西林,纯度>98.5%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

羊奶:市售。

1.2 标准溶液配制

- (1) 标准储备溶液:分别准确称取 8 种标准品各 10 mg,用 50%乙腈水溶液溶解并定容至 10 mL,即得 1.0 mg/mL 的标准储备液,低温储存备用。
- (2) 混合标准储备液:吸取 8 种标准储备液各 100 μ L,用 50%乙腈水溶液溶解并定容至 10 mL,即得 10 μ g/mL 的混合标准储备液。
- (3) 标准工作溶液:用 50%乙腈水溶液逐级稀释混合标准储备液。

1.3 样品前处理

- 1.3.1 提取 称取 5.00 g 羊奶于 50 mL 离心管中,加入乙腈 10 mL,涡旋振荡 1 min,超声提取 10 min,8 000 r/min 离心 5 min,上清液待净化。
- 1.3.2 净化 取 1.3.1 中上清液 8 mL 转移至 15 mL 离心管中(管中预先加入 150 mg C₁₈ 和 150 mg PSA),涡旋混匀 1 min,5 000 r/min 离心 3 min,取 6 mL 上清液氮气吹干,残渣用 1 mL 10%乙腈水溶液复溶,过 0.22 μ m 有机相滤膜,上机分析。

1.4 分析条件

- 1.4.1 液相色谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UP-LCTM C₁₈ (2.1 mm $\times$ 50 mm,1.7 μ m);流动相:A 为 0.1%甲酸水溶液,B 为乙腈;柱温 30 $^{\circ}$ C;流动相梯度洗脱程序:0~1 min,95% A,1~4 min,95%~50% A,4~6 min,50% A,6~7 min,50%~95% A,7~8 min,95% A,进样量:5 μ L,流速:0.3 mL/min。
- 1.4.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子扫描;毛细管电压:1.60 kV;离子源温度:150 $^{\circ}$ C;去溶剂温度:500 $^{\circ}$ C;去溶剂气流:氮气,800 L/h;碰撞气:氩气;多反映监测模式(MRM)采集。8 种 β -内酰胺类抗生素的保留时间、母离子、子离子以及对应的碰撞能量见表 1。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

测定牛奶中 β -内酰胺类抗生素时通常使用甲醇/0.1%

表 1 8 种 β -内酰胺类抗生素质谱条件				
Table 1 MS parameters of 8 β -lactams				
化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
阿莫西林	2.45	366.20	114.00/349.00	8/20
头孢唑肟	2.80	528.97	134.09/395.99	12/12
头孢氨苄	3.06	348.16	157.98/174.00	8/16
氨苄西林	3.28	350.20	106.00/160.00	12/18
头孢噻吩	4.36	524.22	125.07/241.02	30/30
青霉素 G	4.88	335.10	160.00/176.00	10/15
苯唑西林	5.34	402.20	160.00/243.10	12/15
氯唑西林	5.63	436.20	160.00/277.10	15/15

甲酸水溶液或乙腈/0.1%甲酸水溶液作流动相,本试验比较了这两种流动相对 8 种 β -内酰胺类抗生素色谱行为的影响。结果表明,以甲醇/0.1%甲酸水溶液为流动相时,5 种青霉素类化合物响应值较低,峰形较差,以乙腈/0.1%甲酸—水溶液为流动相时,8 种目标化合物分离完全,且峰形较好,故选用乙腈/0.1%甲酸水溶液为流动相,8 种 β -内酰胺类抗生素的总离子流图见图 1。

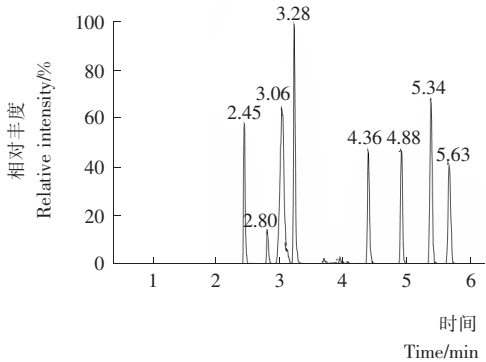


图 1 8 种 β -内酰胺类抗生素总离子流图

Figure 1 Total ion chromatogram (TIC) of 8 β -lactams

2.2 样品处理条件的选择与优化

- 2.2.1 提取试剂的选择 试验比较了甲醇、乙腈、1%甲酸乙腈 3 种提取试剂对待测组分回收率的影响,结果见图 2。由图 2 可知,乙腈去蛋白的能力较强,提取效果最好,甲醇中的羟基会加速青霉素的分解,酸性条件下,头孢类抗生素的提取效果比青霉素类抗生素好,综合考虑,选择乙腈作为提取试剂。
- 2.2.2 吸附剂对净化效果的影响 试验比较了 C₁₈、PSA 和 C₁₈+PSA(1+1) 3 种净化方式对回收率的影响,结果见图 3。由图 3 可知,C₁₈+PSA(1+1)混合使用比单独使用净化效果好,这是由于 C₁₈ 主要吸附样品中的脂肪和蛋白,PSA

主要吸附样品中的脂肪酸和糖类杂质,单独使用 C_{18} 或 PSA 时,样品中脂肪和蛋白吸附不完全,存在较大的基质效应,综合考虑,选择 C_{18} +PSA 净化方式净化样品。

2.2.3 C_{18} +PSA(1+1)吸附剂用量对净化效果的影响 试验优化了 C_{18} +PSA(1+1)吸附方式的不同用量对 8 种 β -内酰胺类抗生素的净化效果,结果见图 4。由图 4 可知,当 C_{18} +PSA 吸附剂为 300 mg 时,各组分的回收率最高。吸附剂用量为 100 mg 时,样品中蛋白和脂肪吸附不完全,吸附剂用量为 500 mg 时,吸附剂会吸附样品中目标化合物,导致

回收率降低,综合考虑,选择吸附剂用量为 300 mg。

2.3 线性范围和方法检出限

用空白样品提取液配制系列标准曲线,标准曲线浓度分别为 1.0,5.0,10.0,25.0,50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按 1.3 的方法处理测定,测定后以各组分的峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X , $\mu\text{g}/\text{kg}$)为横坐标,绘制标准曲线,以信噪比 $S/N \geq 3$ 确定方法的检出限(LOD),以信噪比 $S/N \geq 10$ 确定方法的定量限(LOQ),8 种 β -内酰胺类抗生素的方法检出限为 0.25~1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 1.0~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 1.0~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内,8 种目标化合物的线性方程、相关系数、方法检出限和定量限见表 2。

表 2 各化合物的线性方程及方法检出限

Table 2 Linear equations and correlation coefficients

组分	线性方程	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
阿莫西林	$Y=180.879X-31.261$	0.998	0.50	1.0
头孢唑肟	$Y=0.120X-0.060$	0.986	1.00	2.0
头孢氨苄	$Y=19.378X+18.189$	0.995	0.50	1.0
氨苄西林	$Y=4.335X-0.421$	0.999	0.25	1.0
头孢噻唑	$Y=1.192X-0.256$	0.997	0.50	1.0
青霉素 G	$Y=319.86X-158.53$	0.997	0.50	1.0
苯唑西林	$Y=1.405X+0.916$	0.996	0.50	1.0
氯唑西林	$Y=16.434X-0.199$	0.994	0.50	1.0

图 2 提取试剂对提取效果的影响

Figure 2 Effect of extraction reagent on extraction efficiency

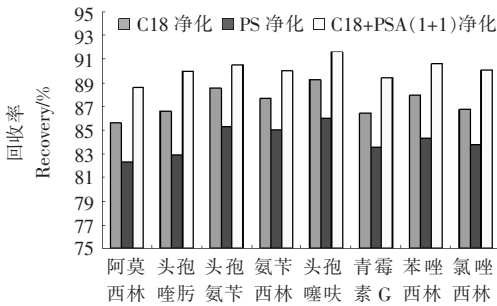


图 3 吸附剂对净化效果的影响

Figure 3 Effect of different sorbents on extraction efficiency

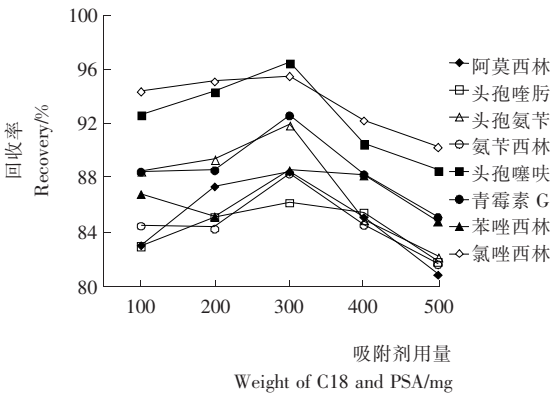


图 4 C_{18} +PSA 用量对净化效果的影响

Figure 4 Effect of weight of C_{18} and PSA on extraction efficiency

2.4 方法回收率和精密度

用同一空白羊奶样品做加标回收试验,8 种 β -内酰胺类抗生素的添加水平分别设定为 5.0,10.0,25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。按照 1.3 的方法进行测定,每个添加水平做 6 个平行样,结果见表 3。

2.5 实际样品的测定

应用本方法对 15 份市售的羊奶进行检测,按 1.3 中样品处理方法操作,各样品中均未检测到 8 种 β -内酰胺类抗生素的残留,说明测定的 15 份羊奶质量较好。

3 结语

本试验建立了 QuEChERS 净化法结合超高效液相色谱串联质谱法测定羊奶中 8 种 β -内酰胺类抗生素的方法,该方法使用吸附剂直接净化样品,与传统固相萃取净化相比,该方法样品前处理简单快速、提高了检测效率,同时也具有较好的回收率和较低的检出限,方法实用性较强,为羊奶及其他奶制品中 β -内酰胺类抗生素的残留检测提供了可靠的方法,对相关标准的制定也具有指导性意义。

表 3 8 种 β-内酰胺类抗生素的回收率和精密度

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSD) of 8 β-lactams in spiked milk samples (n=6)

组分	加标 1			加标 2			加标 3		
	加标量/	回收率/	RSD/	加标量/	回收率/	RSD/	加标量/	回收率/	RSD/
	(μg·kg ⁻¹)	%	%	(μg·kg ⁻¹)	%	%	(μg·kg ⁻¹)	%	%
阿莫西林	5.0	95.4	1.3	10.0	84.2	4.1	25.0	92.2	1.6
头孢唑肟	5.0	90.2	1.7	10.0	84.9	3.1	25.0	91.0	1.0
头孢氨苄	5.0	92.7	2.7	10.0	83.8	0.9	25.0	87.8	5.1
氨苄西林	5.0	92.8	1.9	10.0	84.6	2.2	25.0	88.7	4.7
头孢噻吩	5.0	91.6	3.7	10.0	91.8	1.2	25.0	86.8	6.5
青霉素 G	5.0	85.9	1.2	10.0	85.1	4.6	25.0	87.8	2.7
苯唑西林	5.0	92.6	4.1	10.0	84.9	3.4	25.0	89.6	2.5
氯唑西林	5.0	92.1	3.0	10.0	84.3	1.6	25.0	89.9	0.8

参考文献

1 王逸斌,徐莎,侯艳梅,等. 山羊奶的营养成分研究进展[J]. 中国食物与营养, 2012, 18(10): 67~71.

2 任洪辉,张鹏,王永. 我国奶羊产业发展的前景问题和对策[J]. 江苏农业科学,2013, 41(11): 230~232.

3 赵善仓,李增梅,董燕婕,等. 我国奶羊产业发展与羊乳质量安全现状及对策研究[J]. 农产品质量与安全刊,2014(6): 12~14.

4 Kantiani Lina, Farré Marinella, Barceló Damià, et al. Analytical methodologies for the detection of β-lactam antibiotics in milk and feed samples [J]. Journal of TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2009, 28(6): 729~744.

5 Camara M, Gallego A, Garcinuno R M, et al. An HPLC—DAD method for the simultaneous determination of nine β-lactam antibiotics in ewe milk [J]. Journal of Food Chemistry,2013(141): 829~834.

6 Kukusamude Chunyapuk, Burakham Rodjana, Chailapakul Oranwong, et al. High performance liquid chromatography for the simultaneous analysis of penicillin residues in beef and milk using ion-paired extraction and binary water-acetonitrile mixture [J]. Talanta, 2012, 92: 38~44.

7 Li Na-si, Feng Feng, Yang Bing-cheng, et al. Simultaneous determination of beta-lactam antibiotics and beta-lactamase inhibitors in bovine milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2014, 110(4): 945~946.

8 刘洪斌,文一,刘勇军,等. LC—MS/MS 法检测牛奶中 14 种 β-内酰胺类抗生素残留[J]. 分析实验室, 2014, 33(2): 221~224.

9 张秀尧, 蔡欣欣. 超高效液相色谱 5 三重四极杆质谱法快速同时测定牛奶中 53 种 β-内酰胺类抗生素及其代谢产物的残留[J]. 色谱, 2014,32(7): 693~701.

10 陈瑞春,贾海涛,艾连中,等. 高效液相色谱—串联质谱法测定牛奶和奶粉中 9 种青霉素类药物残留量[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 249~252.

11 黄百芬,吴丹青,蔡增轩,等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定牛奶中 19 种 β-内酰胺类抗生素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010,20(1): 1~6.

12 Shiu-Hsieh Huan, His-Ya Huang, Szetsen Lee. Determination of eight penicillin antibiotics in pharmaceuticals, milk and porcine tissues by nano-liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216(43): 7 186~7 194.

13 李欣楠,韩镌竹,苏藏艺. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定生鲜乳中 7 类 β-内酰胺类抗生素残留[J]. 现代畜牧兽医, 2013(11): 40~45.

14 R Perez-Burgos, E M Grzelak, J Saurina, et al. Quechers methodologies as an alternative to solid phase extraction (SPE) for the determination and characterization of residues of cephalosporins in beef muscle using LC—MS/MS [J]. Journal of Chromatography B, 2012(899): 57~65.