

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛肉中 9种头孢菌素类药物残留

白国涛^{1,2}, 储晓刚^{2*}, 潘国卿¹, 李秀琴², 雍伟²

(1. 内蒙古出入境检验检疫局, 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要: 建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定牛肉中9种头孢菌素类药物残留的方法。头孢菌素类药物经乙腈-水溶液提取, Oasis HLB柱净化。以乙腈-水(含0.05%甲酸)为流动相, UPLC-MS/MS法测定。结果表明, 9种头孢菌素类抗生素在5 min内达到分离。头孢呋辛的定量限为10 μg/kg, 头孢洛宁和头孢噻夫的定量限为0.5 μg/kg, 其他头孢菌素的定量限均为1.0 μg/kg。加标回收率为74.2%~119%, 精密度(RSD)≤15%。该方法简单、灵敏、可靠, 适用于牛肉中头孢菌素类药物残留的分析确证。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 头孢菌素类药物; 牛肉

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)04-0417-04 栏目类别: 研究论文

Determination of 9 cephalosporin drug residues in beef by ultra performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry

BAI Guotao^{1,2}, CHU Xiaogang^{2*}, PAN Guoqing¹, LI Xiuqin², YONG Wei²

(1. Inner Mongolia Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hohhot 010020, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: A confirmative method to determine 9 cephalosporin residues in beef by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed. The sample was homogenized and extracted with acetonitrile and water for 1 min at 14 000 r/min, centrifuged at 10 000 r/min and 4 °C for 10 min. A total of 2 mL saturated sodium chloride solution was added to avoid foaming during the acetonitrile evaporation, the acetonitrile was evaporated below 37 °C using a rotary evaporator, and then cleaned up on an Oasis HLB (500 mg, 6 mL) SPE column by washing with 5 mL water and eluting with acetonitrile-water (7:3, v/v). The eluate was blown to dryness under a stream of nitrogen and adjusted to 3.0 mL with water. The separation was carried out on an ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ column within 5 min, analyzed by UPLC-MS/MS system with external standard method. The limits of quantification (LOQs) of cefuroxime, ceftiofur and cefalonium were 10, 0.5 and 0.5 μg/kg, respectively; the LOQs of other cephalosporins were 1.0 μg/kg. The recoveries of cephalosporins ranged from 74.2% to 119% and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 2.9% to 15% for the spiked beef sample. The method is quick, easy, very sensitive and suitable for the determination of cephalosporin residues in beef.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); cephalosporin; beef

头孢菌素类抗生素主要用于治疗革兰氏菌引起的各种感染, 具有抗菌谱广、疗效高、毒性低、过敏反应少等优点, 但过量的抗生素又具有毒副作用, 主要

体现在对脑神经、听觉以及肾脏的损害^[1]。欧盟规定牛肉中头孢氨苄、头孢噻吩(以脱呋喃甲酰头孢噻吩计)、头孢匹林(以头孢匹林与去乙酰头孢匹林

* 通讯联系人: 储晓刚, 博士, 研究员, 研究方向为农兽药残留检测。E-mail: xgchu@vip.163.com.

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题(2006BAK02A08)。

收稿日期: 2009-02-11

之和计)和头孢喹咪的最大残留限量分别为 0.2, 1.0 μ .05 和 0.05 mg/kg^[2];日本对牛肉中头孢菌素类最大残留限量规定了 7 种,其中头孢氨苄为 0.2 mg/kg、头孢噻吩(以脱呋喃甲酰头孢噻吩计)为 1.0 mg/kg、头孢匹林为 0.03 mg/kg、头孢喹咪为 0.04 mg/kg、头孢唑啉为 0.05 mg/kg、头孢洛宁为 0.01 mg/kg 和头孢呋辛为 0.02 mg/kg^[2]。

文献报道的头孢菌素类药物残留的检测方法主要有微生物法^[3,4]和液相色谱法^[5-14],液相色谱应用尤为广泛。液相色谱-紫外检测法^[5-8]只能通过保留时间定性,准确性较差,且灵敏度低;文献[9-11]所报道的液相色谱-串联质谱法测定的头孢菌素类药物种类均少于 3 种,在要求检测多种头孢菌素时成本较高,而文献[12-14]所报道的液相色谱-串联质谱法能同时检测 3 种以上的头孢菌素类抗生素,但未同时涵盖牛肉中有最大残留限量要求的所有头孢菌素类药物的检测。本文建立了同时对牛肉中 9 种头孢菌素类药物定性确证和定量检测的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY™ 超高效液相色谱仪、Micromass-Quattro Ultima™ Pt 质谱仪(美国 Waters 公司);3K15 离心机(德国 SIGMA 公司);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

乙腈,高效液相色谱(HPLC)级(Merck 公司),实验用水为二次重蒸水,其他试剂均为分析纯。9

种头孢菌素类药物标准品(见表 1)(纯度均大于 92%)。

头孢菌素类药物标准储备液的配制:称取适量的标准品,分别用乙腈-水(体积比为 3:7)定容至 50 mL,其质量浓度分别为 200 mg/L,于 -18 °C 下避光保存。

1.2 样品的提取

准确称取 2.00 g 样品,置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈和 3 mL 水,于 14 000 r/min 均质 1 min,在 4 °C、10 000 r/min 条件下离心 5 min,取出上清液,残渣再用 10 mL 乙腈和 2 mL 水漩涡提取一次;合并上清液,加入 2 mL 饱和氯化钠溶液,在低于 37 °C 条件下减压浓缩至少于 2 mL。

1.3 样品的净化

采用 Oasis HLB 固相萃取柱(500 mg ϕ 6 mL)对样品进行净化,使用前用 5 mL 甲醇和 5 mL 水预平衡。将上述提取液注入预平衡好的固相萃取柱,先用 5 mL 水淋洗,再用 8 mL 乙腈-水(体积比为 70:30)洗脱,洗脱液经氮吹仪吹至少于 3 mL,用水定容至 3.0 mL。分析前经 0.2 μ m 微孔滤膜过滤。

1.4 液相色谱及质谱条件

1.4.1 超高效液相色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC™ BEH C₁₈ 柱(50 mm \times 2.1 mm,1.7 μ m);柱温:30 °C;进样量:10 μ L;流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 0.05% 甲酸水溶液,流速:0.3 mL/min。梯度洗脱程序:0 \rightarrow 0.5 min,5% A;0.5 \rightarrow 2.5 min,5% A 线性升至 30% A;2.5 \rightarrow 4.5 min,30% A 线性升至 90% A;4.5 \rightarrow 6.0 min,

表 1 测定 9 种头孢菌素类药物的质谱条件及保留时间

Table 1 Mass spectrometric operating conditions and retention times of 9 cephalosporin drugs

Drug	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone voltage/V	Collision energy/eV	Retention time/min
Cefapirin (头孢匹林)	424.0	292.0 151.9*	18	15 22	1.98
Desfuroylceftiofur (脱呋喃甲酰头孢噻吩)	487.0	241.1* 167.1	31	29 19	2.30
Cefquinome (头孢喹咪)	529.2	134.0* 324.1	26	15 16	2.41
Cefalonium (头孢洛宁)	459.1	337.0* 152.0	16	10 18	2.50
Cefalexin (头孢氨苄)	348.1	157.9* 174.0	15	8 12	2.79
Cefazolin (头孢唑啉)	455.1	323.1 156.0*	21	10 14	2.86
Cefuroxime (头孢呋辛)	423.0	362.0 318.0*	16	7 8	2.95
Cefoperazone (头孢哌酮)	646.1	143.0* 530.0	16	35 12	3.46
Ceftiofur (头孢噻吩)	524.0	241.1* 210.2	31	18 23	4.37

* the quantitative ion.

90% A 6.0 min 后迅速降至 5% A。

1.4.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI)。除了头孢呋辛外,其他8种头孢菌素类药物均采用正离子模式,多反应监测;毛细管电压:3.20 kV;离子源温度:110℃;去溶剂温度:380℃;去溶剂气流量:500 L/h;锥孔反吹气流量:50 L/h;碰撞气流速:0.15 L/min。检测头孢呋辛采用负离子模式,毛细管电压:2.9 kV,其他同正离子模式。定性定量离子对、锥孔电压、碰撞气能量及在此仪器条件下的保留时间见表1。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

实验比较了乙腈-水(体积比为4:1)、磷酸盐溶液(0.05 mol/L, pH 值为8.5)、乙腈-0.2% 偏磷酸溶液(体积比为3:7)、乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐溶液(体积比为4:1)和乙腈(含0.01%的甲酸)为提取剂的提取效果。当用磷酸盐或酸化乙腈提取时提取液呈红色,且随着酸浓度的增加,提取液的颜色加深;采用酸化乙腈提取时,加入氯化钠盐析,取乙腈层浓缩后检测,发现该法对于非钠盐形式的目标物的提取率较低,头孢氨苄的提取效率只有50%,回收率较低,而且在强酸性条件下,待测物不稳定,这种方式的提取效果也最差。用乙腈-0.2% 偏磷酸溶液(体积比为3:7)提取,固相萃取柱净化时上样溶液过多,不便操作。用乙腈-0.05 mol/L 磷酸盐溶液(体积比为4:1)的提取效果与用乙腈-水溶液提取的效果无显著差异,提取效率均在70%~121%之间,但用乙腈-水溶液体系时不必配制磷酸盐缓冲溶液,因此选择乙腈-水溶液为提取溶剂。

2.2 固相萃取柱的选择

净化头孢菌素类抗生素常用的固相萃取柱有 C_{18} 柱、离子交换柱和二乙烯基苯-*N*-乙基氨基吡咯烷酮共聚物小柱。实验比较了Orochem C_{18} 和Oasis HLB柱的净化效果,发现前者对头孢匹林等的吸附能力不强,而后者具有良好的吸附能力和净化效果。采用Oasis HLB柱(60 mg, 3 mL)净化,注入3 mL 1 mg/L混合标准溶液,用1 mL水淋洗,3 mL乙腈-水(体积比为7:3)洗脱,洗脱液和淋洗溶液中均检测到部分目标物,近80%的头孢匹林已经被淋洗至淋洗液中,这表明Oasis HLB柱(60 mg, 3 mL)的吸附容量严重不足。采用Oasis HLB柱(500 mg, 6 mL),用5 mL水淋洗,8 mL乙腈-水(体积比为7:3)洗脱,淋洗液中未检测到目标物,洗脱液中目标物的回收率达80%以上。因此选用Oasis HLB(500 mg, 6 mL)固相萃取柱净化。

2.3 线性范围与方法的定量限

吸取1 mL质量浓度为2 mg/L的混合标准工作溶液(头孢呋辛为20 mg/L),用按照样品处理方法制得阴性样品基质提取液,配制200 μ g/L(头孢呋辛为2 000 μ g/L)的基质工作溶液。将混合基质工作溶液逐级稀释,配制质量浓度分别为100, 50, 20, 5, 1, 0.5 μ g/L(头孢呋辛的质量浓度分别为1 000, 500, 200, 50, 10, 5 μ g/L)系列基质工作溶液。剔除超出线性部分,以分析物的质量浓度 C (μ g/L)为横坐标,以其峰面积 A 为纵坐标做校正曲线,各组分的线性方程、相关系数、线性范围见表2。按照本方法的实验步骤进行添加回收试验,以信噪比(S/N)等于10时的添加浓度为方法的定量限(LOQ)。

表2 9种药物的线性方程、相关系数、线性范围及方法的定量限

Table 2 Regression equations, correlation coefficients (r), linear ranges and limits of quantitation (LOQs) for 9 drugs

Drug	Linear equation *	Correlation coefficient (r)	Linear range/ (μ g/kg)	LOQ/ (μ g/kg)
Cefapirin (头孢匹林)	$A = 199.45C + 77.04$	> 0.9999	1.0 - 200	1.0
Desfuroylceftiofur (脱呋喃甲酰头孢噻吩)	$A = 101.33C - 95.385$	0.9999	1.0 - 200	1.0
Cefquinome (头孢喹咪)	$A = 41.9938C - 12.992$	0.9974	1.0 - 100	1.0
Cefalonium (头孢洛宁)	$A = 224.54C + 93.64$	> 0.9999	0.5 - 200	0.5
Cefalexin (头孢氨苄)	$A = 129.47C - 67.539$	0.9969	1.0 - 100	1.0
Cefazolin (头孢唑啉)	$A = 106.98C - 94.852$	0.9982	1.0 - 200	1.0
Cefuroxime (头孢呋辛)	$A = 1.201C + 50.815$	0.9959	10 - 100	10
Cefoperazone (头孢哌酮)	$A = 149.26C - 65.177$	0.9996	1.0 - 200	1.0
Ceftiofur (头孢噻吩)	$A = 603.07C - 162.14$	0.9998	0.5 - 200	0.5

* A : peak area; C : mass concentration, μ g/L.

2.4 添加回收率和方法精密度的

取不含有待测组分的阴性样品进行添加回收试验,对有最大残留限量要求的,以定量限(LOQ)、1倍最大残留限量水平(MRL)和2倍最大残留限量

水平(2MRL)3个添加水平进行回收率试验;对没有最大残留限量要求的及脱呋喃甲酰头孢噻吩,按定量限、100 μ g/kg、200 μ g/kg 3个添加水平进行回收率试验。在2 g样品中,添加不同水平的头孢菌素

类药物标准溶液进行 10 次平行试验,测定结果、平均回收率及相对标准偏差(RSD)见表 3。本方法的添加回收率均在 74% 以上, RSD ≤ 15%,回收率符合残留检测要求,重现性较好。

表 3 空白牛肉基质中 9 种头孢菌素类药物的添加回收率和相对标准偏差($n=10$)

Table 3 Spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) for 9 cephalosporins in a blank beef sample ($n=10$)

Drug	Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Found/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/ %	RSD/ %
Cefapirin (头孢匹林)	1.0 30 60	0.798 26.43 54.31	79.8 88.1 90.5	9.1 7.5 6.9
Desfuroylceftiofur (脱呋喃甲酰头孢噻呋)	1.0 100 200	1.192 101.2 196.4	119 101 98.2	10.4 5.7 4.0
Cefquinome (头孢喹咪)	1.0 40 80	0.776 35.81 77.12	77.6 89.5 96.4	9.6 7.4 5.4
Cefalonium (头孢洛宁)	0.5 10 20	0.394 8.274 18.64	78.8 82.7 93.2	15.0 10.8 7.6
Cefalexin (头孢氨苄)	1.0 200 400	0.742 168.6 385.9	74.2 84.3 96.5	11.7 5.2 2.9
Cefazolin (头孢唑啉)	1.0 50 100	1.181 43.22 90.53	118 86.4 90.5	10.2 6.0 5.5
Cefuroxime (头孢呋辛)	10 20 40	8.294 18.95 40.04	82.9 94.8 100	7.0 6.3 5.6
Cefoperazone (头孢哌酮)	1.0 100 200	0.802 101.1 196.3	80.2 101 98.2	8.9 4.9 3.2
Ceftiofur (头孢噻呋)	0.5 100 200	0.545 95.11 197.6	109 95.1 98.8	12.1 4.7 3.2

3 结论

本文建立的检测 9 种头孢菌素类抗生素的方法准确可靠,重复性好,灵敏度高,可适用于牛肉中多组分头孢菌素类的定性和定量检测,能够满足各国对上述头孢菌素类抗生素的最大残留限量要求,具有广泛的适用性。

参考文献:

- [1] Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. Veterinary pharmacopoeia of People's Republic of China. Beijing: Chemical Industry Press (中国兽药典委员会. 中国兽药典. 北京: 化学工业出版社), 2005 : 78
- [2] National foodsafety resource database (中国食品安全资源数据库). [2007-06-28]. <http://www.fsr.org.cn/Index.asp>
- [3] Dillon P P, Daly S J, Browne S J, et al. Food Agr Immunol, 2003, 15(3/4): 225
- [4] Okerman L, Wasch K D, Hoof J V. J AOAC Int, 2003, 86 (2): 236
- [5] Yasufuku K, Makiyama I, Fuchimoto A, et al. J Jpn Vet Med Assoc, 1999, 52 : 321
- [6] Schermerhorn P G, Chu P S, Ngoh M A. J AOAC Int, 1998, 81(5): 973
- [7] Oliveira R V, De Pietro A C, Cass Q B. Talanta, 2007, 71 : 1 233
- [8] Evagelou V, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M. J Pharm Biomed Anal, 2003, 31 : 1 119
- [9] Holsiege D M, Puschner B, Whitehead G, et al. J Agric Food Chem, 2002, 50 : 406
- [10] SN/T 1988-2007
- [11] Makeswaran S, Patterson I, Points J. Anal Chim Acta, 2005, 529 : 151
- [12] Becker M, Zittlau E, Petz M. Anal Chim Acta, 2004, 520 : 19
- [13] Fagerquist C K, Lightfield A R. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17 : 660
- [14] Daeseleire E, De Ruyck H, Van Renterghem R. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14 : 1 404