

高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中头孢噻肟及其主要代谢物残留

杨小体^{1,2} 汤晓艳^{*1} 沈习习^{1,2} 张小庆¹

¹(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所,农业部农产品质量安全重点实验室,北京 100081)

²(南京农业大学食品科技学院,肉品加工与质量控制教育部重点实验室,南京 210095)

摘 要 建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法同时测定鸡蛋中头孢噻肟及其代谢物去乙酰头孢噻肟残留量的检测方法。样品经乙腈-水(9:1, V/V)提取,正己烷除脂,C₁₈固相分散萃取除杂,Agilent Eclipse Plus C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)分离,以0.2% (V/V)甲酸-乙腈为流动相,进行梯度洗脱,目标物采用电喷雾正离子(ESI+)模式电离,多反应监测(MRM)模式检测,基质匹配标准溶液外标法定量。结果表明,头孢噻肟和去乙酰头孢噻肟分别在1.0~143.0 μg/L和1.0~120.0 μg/L浓度范围内线性关系良好($R^2>0.999$)。方法检出限(LOD, $S/N=3$)分别为0.07和0.14 μg/kg,定量限(LOQ, $S/N=10$)分别为0.23和0.99 μg/kg。在5.0、50.0和100.0 μg/kg 3个添加水平下,头孢噻肟和去乙酰头孢噻肟的回收率分别为83.1%~103.0%和88.2%~101.0%,相对标准偏差(RSD, $n=6$)均介于2.0%~6.2%。实际样品测定结果表明,本方法简便、快速、灵敏、准确,可用于鸡蛋中头孢噻肟及去乙酰头孢噻肟的残留分析检测。

关键词 鸡蛋; 头孢噻肟; 去乙酰头孢噻肟; 高效液相色谱-串联质谱

1 引言

头孢噻肟(Cefotaxime, CTX)为半合成的第三代人用头孢菌素,属于β-内酰胺类抗生素,具有广谱、高效、耐酶等特点,被广泛应用于临床已有30余年。头孢噻肟在肝内代谢为有活性的去乙酰头孢噻肟和几种无活性的其它代谢物^[1,2]。头孢噻肟及去乙酰头孢噻肟的分子结构式如图1所示。农业部176号公告^[3]明文规定,未办理兽药、饲料添加剂审批手续的人用药品,不得直接用于饲料生产和饲养过程,而且头孢噻肟作为禁用药也在农业部第560号公告^[4]中的兽药地方标准废止目录中。但由于头孢噻肟对兽医临床上常见的病原菌(如大肠杆菌、鸡鸭沙门氏菌、肺炎双球菌、流感嗜血杆菌等)疗效突出^[5~7],近年被大量用于家禽饲养中,因而不可避免地残留在畜禽组织及其制品中^[8,9],造成安全隐患,同时也会加剧细菌耐药性的问题,给人类感染性疾病的预防和控制带来困难。随着该类药物的代谢机理、毒理和残留研究的不断深入,世界各国政府及有关国际组织已高度重视该类药物在动物性食品中的残留问题,对许多头孢类抗生素的残留量都制定了非常严格的要求。头孢噻肟由于过去很少兽用,目前欧盟、美国、日本以及我国均未对该药在动物中的残留限量做出相关规定。

为保障食品安全及人类健康,针对头孢噻肟在畜禽中滥用的现象,亟需对其进行有效的监管监测。头孢噻肟在机体内代谢迅速,不易检出,因而对于其代谢物的检测至关重要^[10,11]。但目前报道的关于头孢噻肟的检测方法,如分光光度法^[12]、高效毛细管电泳(HPCE)^[13,14]、高效液相色谱(HPLC)法^[15]等,主要针对头孢噻肟原型,而对于其代谢物的研究仅有针对脑脊液、血浆等非食用性基质建立的高效液相色谱方法,且定量限大于100 μg/kg^[16~18],达不到动物源性食品残留检测的要求。本研究采用HPLC-MS/MS法建立了同时测定鸡蛋中头孢噻肟及其主要代谢物去乙酰头孢噻肟残留量的检测方法,并应用于阳性鸡蛋样品的检测分析。结果表明,本方法简便、快速、准确,可为头孢噻肟在动物源性食品中残留检测和生产监控提供技术支撑。

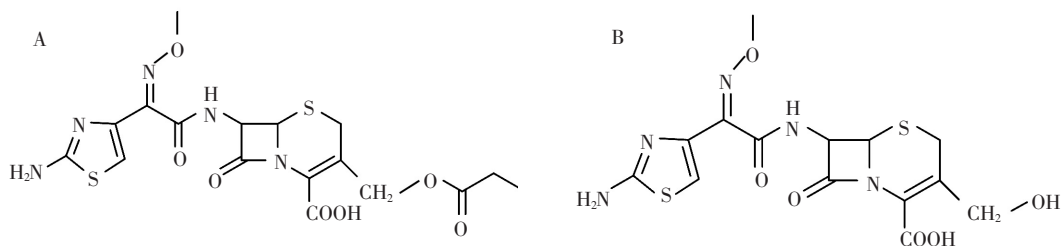


图 1 (A) 头孢噻肟和(B) 去乙酰头孢噻肟的结构式

Fig. 1 Molecular structures of (A) cefotaxime and (B) desacetylcefotaxime

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200 series 高效液相色谱(美国 Agilent Technologies 公司); QTRAP[®] 5000 三重四极杆质谱仪(美国 AB Sciex 质谱系统公司); BiofugeStratos 台式高速冷冻离心机(德国贺力氏公司); TTL-DCHI 型氮气浓缩仪(北京同泰联科技发展有限公司); XS105DM 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 培英 ZP-400 振荡器(苏州市培英实验设备有限公司); VORTEX-5 涡旋振荡器(海门市其林贝尔有限公司); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); 超声波清洗机(宁波新艺超声设备有限公司)。

头孢噻肟钠标准品(纯度 $\geq 99.5\%$, 上海源叶生物科技有限公司); 去乙酰头孢噻肟标准品(纯度 $\geq 98\%$, 加拿大 TRC 公司); 甲醇(HPLC 级, 德国 Merck 公司); 乙腈(HPLC 级, 美国 J. T. Baker 公司); 甲酸(HPLC 级, 美国 Mreda Technology 公司); 实验用水为 Milli-Q 纯水仪制备的超纯水($\geq 18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)

2.2 标准溶液的配制

以甲醇-水(1:1, V/V)为溶剂分别配制 143 mg/L 头孢噻肟钠和 120 mg/L 去乙酰头孢噻肟标准储备液, 于棕色容量瓶中低温避光短期保存。测定当天用甲醇-水(1:1, V/V)逐级稀释至所需浓度, 现配现用。

2.3 样品处理

准确称取已混匀的全蛋样品(1.0 ± 0.01) g, 置于 50 mL 具塞离心管中, 加入 10 mL 乙腈-水(9:1, V/V), 涡旋 30 s, 振荡 20 min 提取, 8000 r/min 离心 10 min, 转移上清液至另一个 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 乙腈饱和正己烷除脂, 涡旋 30 s, 振荡 10 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取下层溶液 5 mL 于 10 mL 离心管中, 加入 100 mg C_{18} 净化后, 转移上清液于 40℃ 以下水浴氮吹浓缩至干, 以 1 mL 甲醇-水(1:1, V/V) 复溶, 经 0.22 μm 滤膜过滤后, 待测。

2.4 色谱条件

Agilent Eclipse C_{18} 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm); 流动相 A 为 0.2% (V/V) 甲酸溶液, 流动相 B 为乙腈; 柱平衡时间 1 min; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 95% A; 1.0~3.0 min, 95%~60% A; 3.0~5.0 min, 60% A; 5.1~7.0 min, 95% A; 流速 0.3 mL/min; 进样体积 5 μL ; 外标法定量。

2.5 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 检测方式: 多重反应监测(MRM); 扫描方式: 正离子扫描; 碰撞气(CAD) 压力为 8 MPa; 气帘气(CMR) 压力为 35 MPa; 雾化气(GS1) 压力为 55 MPa; 干燥气(GS2) 压力为 55 MPa; 电喷雾电压(IS) 为 5500 V; 离子化温度(TEM) 为 550℃; MRM 定量离子对、去簇电压(DP) 及碰撞电压(CE) 见表 1。

3 结果与讨论

3.1 前处理方法优化

头孢类抗生素多采用不同浓度的甲酸-水、乙腈-水、甲醇作为提取剂^[19]。本实验通过对比发现, 乙腈-水(9:1, V/V) 作为提取剂时, 提取液清澈, 蛋白质沉淀完全, 回收率较高; 甲酸-水作为提取剂的回收率相对较低, 原因可能是头孢噻肟在酸性溶液中不稳定, 氮吹水浴时分解所致。

表 1 头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟质谱参数
Table 1 Parameters and fragment ions for cefotaxime sodium and deacetylcefotaxime

目标物 Analyte	保留时间 Retention time (min)	母离子 Parent ion (<i>m/z</i>)	子离子 Daughter ion (<i>m/z</i>)	驻留时间 Dwell time (ms)	碰撞能 Collision energy (eV)	去簇电压 Declustering potential (V)
头孢噻肟钠 Cefotaxime sodium	3.15	456.2 *	324.1 *	100	20	75
			396.0	100	15	75
去乙酰头孢噻肟 Deacetylcefotaxime	2.67	414.1 *	241.0 *	100	21	80
			285.0	100	23	80

注: * 为定量离子对 (Quantitative ion)。

QuEChERS 作为一种简单快速的样品前处理方法,近年被逐渐应用于 β -内酰胺类药物的前处理中^[20]。鉴于动物组织中含有大量蛋白质和脂肪,应针对不同的样品基质,选择合适的提取溶剂和吸附剂。目前,动物源性食品常用 C₁₈ 和 PSA 作为吸附剂吸附杂质,C₁₈ 为非极性吸附剂,主要去除脂类和弱极性杂质;PSA 为弱阴离子交换剂,主要去除有机酸、金属离子和酚类等^[21]。本实验考察了 PSA 和 C₁₈ 对头孢噻肟钠及其主要代谢物去乙酰头孢噻肟的净化效果,结果表明,PSA 对目标物有吸附作用,而 C₁₈ 对头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟几乎无吸附,净化效果较好,目标物回收率均在 83.1% ~ 103.0% 之间。此外,本实验也采用 LiChrolut RP-18 柱和 HLB 柱等传统的固相萃方式对鸡蛋样品进行了净化,发现去乙酰头孢噻肟回收率只有 30% ~ 40%,相比之下,QuEChERS 方法具有回收率高,简便快速,成本低廉等优点,更适用于大批量样品的残留检测。

3.2 色谱-质谱条件的选择与优化

在正离子模式下,头孢噻肟和去乙酰头孢噻肟主要以 [M+H]⁺ 分子离子峰形式存在,二级质谱图见图 2 和图 3。质谱数据表明,以头孢噻肟的分子离子 *m/z* 456.1 为母离子进行二级质谱分析,得到特征离子峰 *m/z* 396.1 和 324.1;以去乙酰头孢噻肟的分子离子 *m/z* 414.1 为母离子进行二级质谱分析,得到特征离子峰 *m/z* 241 和 285;其中 *m/z* 241 为 β -内酰胺环主要裂解碎片,且丰度最高,*m/z* 285 为 β -内酰胺环较为特殊的开环方式^[22]。

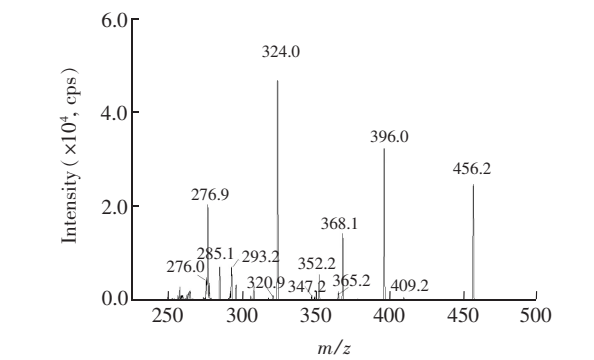


图 2 头孢噻肟标准溶液在正离子模式下的二级质谱图
Fig. 2 MS² spectrum of cefotaxime standard solution under positive ion mode

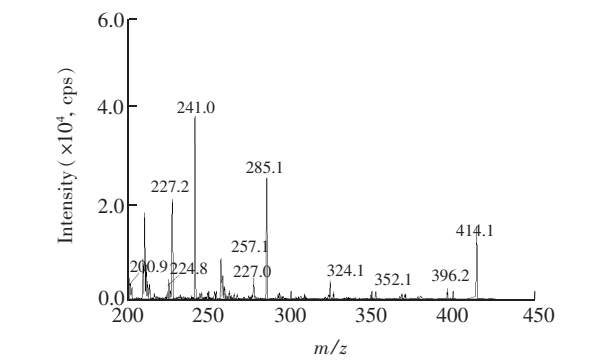


图 3 去乙酰头孢噻肟标准溶液在正离子模式下的二级质谱图
Fig. 3 MS² spectrum of desacetylcefotaxime standard solution under positive ion mode

头孢类抗生素常用的流动相为水、甲酸溶液、乙酸铵溶液与乙腈、甲醇等^[23-25]。本研究以 Agilent Eclipse C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5 μ m) 为分析柱。流动相的水相分别考察了纯水、0.1% 和 0.2% (V/V) 的甲酸溶液、乙酸铵溶液 (以甲酸调至 pH 4.5); 有机相分别考察了乙腈、0.1% 和 0.2% (V/V) 甲酸-乙腈、甲醇,在同一色谱条件下对目标物进行梯度洗脱分离。结果表明,使用 0.2% (V/V) 甲酸-乙腈作为流动相时,头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟的峰形、分离度与灵敏度均优于上述其它流动相,结果如图 4B 所示,因此本研究选用 0.2% (V/V) 甲酸-乙腈作为流动相。

实验表明,甲醇或纯水复溶效果均不理想,头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟保留性差,峰形易受基质干扰。因此,本实验对不同比例的甲醇-水的复溶效果也进行了考察,最后确定以甲醇-水(1:1, V/V)作为复溶液,目标物的出峰时间、分离度、峰型均能达到理想效果。

3.3 方法检出限和定量限

分别以信噪比 $S/N \geq 3$ 及 $S/N \geq 10$ 确定方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ),得到头孢噻肟和去乙酰头孢噻肟的检出限分别为 0.07 和 0.14 $\mu\text{g/kg}$; 定量限分别为 0.23 和 0.99 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.4 方法的线性范围、回收率和精密度

为了消除基质效应对测定结果的影响,本方法采用基质标准曲线对头孢噻肟和去乙酰头孢噻肟进行分析。准确吸取适量头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟的混合标准溶液,分别加入到按 2.3 节方法处理过的空白样品提取液中,使溶液中头孢噻肟钠的浓度分别为 1、6、36、72 和 144 $\mu\text{g/L}$,去乙酰头孢噻肟的浓度分别为 1、10、30、60 和 120 $\mu\text{g/L}$,以峰面积和质量浓度作定量标准曲线。

取空白鸡蛋样品,分别添加 5、50 和 100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个水平浓度的头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟混合标准溶液,每个浓度作 6 个平行样,按本方法测定回收率。线性方程、加标回收率及精密度如表 2 所示。

表 2 头孢噻肟钠和去乙酰头孢噻肟的加标回收率和相对标准偏差

Table 2 Recovery and relative standard deviation of cefotaximesodium and desacetylcefotaxime

化合物 Compound	线性范围 Linearity ($\mu\text{g/L}$)	线性方程 Regression equation	决定系数 Correlation coefficients (R^2)	添加浓度 Spiked ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 Recovery (%, $n=6$)	精密度 RSD (%, $n=6$)
头孢噻肟钠 Cefotaxime sodium	1 ~ 144	$Y=700.47X-209.76$	0.9995	5	103.0	6.1
				50	83.1	6.0
				100	95.1	3.8
去乙酰头孢噻肟 Desacetylcefotaxime	1 ~ 120	$Y=1369.2X-898.19$	0.9993	5	101.0	6.2
				50	82.4	2.0
				100	82.6	3.0

3.5 实际样品分析

以头孢噻肟在蛋鸡养殖中的常用剂量 20 mg/kg 对实验蛋鸡连续 5 天肌注给药,并于停药后不同时间点采集鸡蛋样品,应用本方法测定其中头孢噻肟及去乙酰头孢噻肟的残留量。经检测分析,空白、加标样品和停药 1 d 后的鸡蛋样品 LC-MS/MS 总离子流色谱图见图 4。停药 20 天后,鸡蛋样品中仍可检测到头孢噻肟和去乙酰头孢噻肟,残留浓度分别为 32.5 和 4.8 $\mu\text{g/kg}$,说明此药在鸡蛋中消除非常缓慢,因此,鸡蛋可作为蛋鸡养殖中监测头孢噻肟违规使用的靶组织。

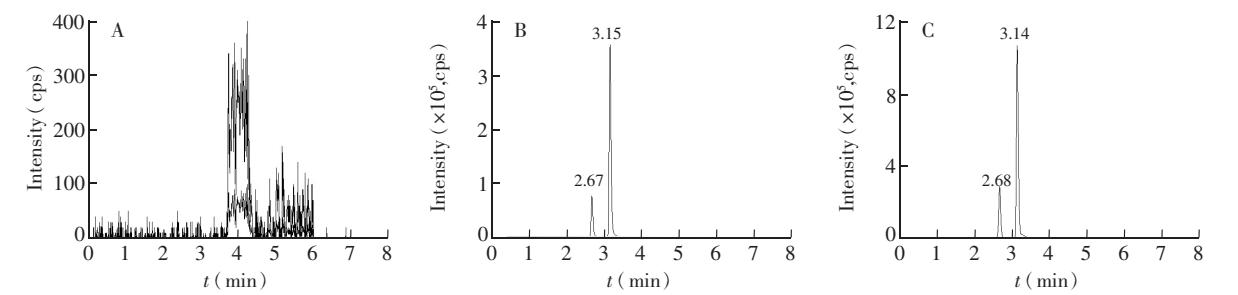


图 4 鸡蛋空白(A)、加标样品(B)及阳性样品(C)的总离子流色谱图
Fig.4 Total ion chromatograms of blank egg (A), spiked egg (B) and positive samples (C)

4 结论

本研究建立了同时测定鸡蛋中头孢噻肟及其主要代谢物去乙酰头孢噻肟的高效液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法。本方法样品前处理简便快速,回收率高,定量限及精密度均能满足残留检测要求,解决了此药在动物组织由于残留低、易代谢转化而难于监测的问题,为此药在畜禽养殖中违禁使用的监管监测提供理论依据和技术支撑。

References

- 1 Harding S M, Monro A J, Thornton J E, Ayrton J, Hogg M I. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, **1981**, 8, SupplB(4): 263–272
- 2 Jacobs R F, Kearns G L. *Diagnostic Microbiol. Infect. Dis.*, **1989**, 12(1): 93–99
- 3 Ministry of Agriculture. No. 176 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, [2002-02-09] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第176号公告, [2002-02-09]
- 4 Ministry of Agriculture. No. 560 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, [2005-10-28] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第560号, [2005-10-28]
- 5 Hering J, Frömke C, Von M C, Hartmann M, Schneider B, Friese A, Rösler U, Kreienbrock L, Hille K. *Prevent. Vet. Med.*, **2016**, 125: 154–157
- 6 De J A, Smet A, Ludwig C, Stephan B, De Graef E, Vanrobaeys M, Haesebrouck F. *Vet. Microbiol.*, **2014**, 171(3–4): 298–306
- 7 Muhtadi F J, Hassan M M A. *Anal. Profiles Drug Substances*, **1982**, 11: 139–168
- 8 Collignon P, Aarestrup F M, Irwin R, McEwen S. *Emerg. Infect. Dis.*, **2013**, 19(8): 1339–1340
- 9 Lin L, Xu X, Ren X, Cui S. *Microb. Drug Resistance*, **2014**, 20(1): 73–81
- 10 Fu K P, Aswapokee P, Ho I, Matthijssen C, Neu H C. *Antimicrob. Agent. Chemotherapy*, **1979**, 16(5): 592–597
- 11 Chamberlain J, Coombes J D, Dell D, Fromson J M, Ings R J, Macdonald C M, McEwen J. *J. Antimicrob. Chemotherapy*, **1980**, 6(Suppl A): 69–78
- 12 Bushra M U, Hossain M S, Ahmed K T, Nesa J U, Mahmud M F. *Inter. J. Pharmaceut. Sci. Res.*, **2014**, 4(1): 74–77
- 13 CHEN Ding-Ding, HE Dong-Xu, QI Ke-Zong, LU Cui-Zhen. *Journal of Instrumental Analysis*, **2012**, (10): 1334–1338
陈玓玓, 何东旭, 祁克宗, 陆翠珍. 分析测试学报, **2012**, (10): 1334–1338
- 14 HE Dong-Xu, MENG Hian-Huan, CHEN Ding-Ding, QI Ke-Zong. *Journal of Animal Science & Veterinary Medicine*, **2008**, 27(6): 5–7
何东旭, 孟欢欢, 陈玓玓, 祁克宗. 畜牧兽医杂志, **2008**, 27(6): 5–7
- 15 Verdier M C, Tribut O, Tattevin P, Le Tulzo Y, Michelet C, Bentué-Ferrer D. *Antimicrob. Agents Chemotherapy*, **2011**, 55(10): 4873
- 16 Hakim L, Bourne D W A, Triggs E J. *J. Chromatogr.*, **1988**, 424(1): 111
- 17 Rosseel M T, Vandewoude K H. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 811(2): 159
- 18 Scanes T, Hundt A F, Swart K J, Hundt H K. *J. Chromatogr. B*, **2001**, 750(1): 171
- 19 SUN Lei, ZHANG Li, WANG Xia, WANG Shu-Huai, BI Yan-Feng, XU Qian. *Journal of Instrumental Analysis*, **2009**, (5): 576–580
孙雷, 张骊, 汪霞, 王树槐, 毕言锋, 徐倩. 分析测试学报, **2009**, (5): 576–580
- 20 Guo C, Wang M, Xiao H, Huai B, Wang F, Pan G, Liao X, Liu Y. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1027: 110
- 21 CUI Feng-Yun, ZHANG Chao-Hui, LI Jian-Hui, HUANG Hua, YAN Hua, YUN Huan, LIU Xin, QI He-Ming, HE Yue, XU Xiang. *Journal of Food Safety and Quality*, **2016**, 7(2): 575–583
崔凤云, 张朝晖, 李建辉, 黄华, 严华, 云环, 刘鑫, 齐鹤鸣, 何悦, 许翔. 食品安全质量检测学报, **2016**, 7(2): 575–583
- 22 WANG Wei, ZHANG Hong-Sen, GUO Shi-En. *Journal of Engineering of Heilongjiang University*, **2012**, (04): 33–37
王威, 张宏森, 郭世恩. 黑龙江大学学报, **2012**, (04): 33–37
- 23 Chen D, Yu J, Tao Y, Pan Y, Xie S, Huang L, Peng D, Wang X, Wang Y, Liu Z, Yuan Z. *J. Chromatogr. B*, **2016**, s1017–1018: 82–88
- 24 LI Xue-Min, CAO Yan-Zhong, ZHANG Jin-Jie, FAN Chun-Lin, LIU Xiao-Mao, QIAN Xiao-Qing. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(5): 735–739
李学民, 曹彦忠, 张进杰, 范春林, 刘晓茂, 钱小清. 分析化学, **2010**, 38(5): 735–739
- 25 LIU Chuang-Ji, WANG Hai, DU Zhen-Xia, JIANG Yan-Bin, SHAN Ji-Hao, CAI Ying-Hua. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(5): 617–622
刘创基, 王海, 杜振霞, 姜艳彬, 单吉浩, 蔡英华. 分析化学, **2011**, 39(5): 617–622

Simultaneous Determination of Cefotaxime and Its Main Metabolite Residue in Eggs by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

YANG Xiao-Ti^{1,2}, TANG Xiao-Yan^{*1}, SHEN Xi-Xi^{1,2}, ZHANG Xiao-Qing¹

¹(Key Laboratory of Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products, Chinese Academy of Agricultural & Science, Beijing 100081, China)

²(National Centre of Meat Quality and Safety Control, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract An efficient method for the analysis of cefotaxime and its metabolite desacetylcefotaxime residues in eggs was developed based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). The samples were homogenized and extracted with acetonitrile/water (9:1, V/V) solution. The fat was removed by hexane, and the other impurities were removed with C₁₈ sorbent. The separation of cefotaxime and desacetylcefotaxime was performed on an Agilent Eclipse Plus C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) using a mobile phase of 0.2% formic acid (A)-acetonitrile (B) by gradient elution. The analytes were detected by MS/MS in positive electrospray ionization mode (ESI+) and multiple reaction monitoring (MRM), quantitated by matrix-matched external standard method. Results showed that the calibration curves had a good linearity in the range of 1.0–143 μg/L (cefotaxime) and 1.0–120 μg/L (desacetylcefotaxime), respectively, with correlation coefficient $R^2 > 0.999$. Limits of detection (LOD, $S/N=3$) for cefotaxime and desacetylcefotaxime were 0.07 and 0.14 μg/kg, and limits of quantitation (LOQ, $S/N=10$) for cefotaxime and desacetylcefotaxime were 0.23 and 0.99 μg/kg, respectively. At three spiked concentration levels, the recoveries of cefotaxime and desacetylcefotaxime ranged from 83.1% to 103.0% and 88.2% to 101.0%, respectively, both with RSDs ($n=6$) less than 6.2%. The results demonstrated that the method was simple, quick, sensitive and reliable, and suitable for determination of cefotaxime and desacetylcefotaxime residues in eggs.

Keywords Egg; Cefotaxime; Desacetylcefotaxime; High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(Received 13 March 2017; accepted 17 May 2017)