高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中头孢洛宁残留

李帅鹏¹, 郭春娜¹, 孟 蕾², 黄显会^{1*}

(1. 华南农业大学国家兽药残留基准实验室, 广东 广州 510642; 2. 河南省兽药监察所, 河南 郑州 450008)

摘要:建立了牛奶中头孢洛宁残留检测的高效液相色谱-串联质谱方法。1 g 牛奶经乙腈沉淀蛋白质后,上清液于 37 ℃水浴下氮气吹干,用 1 mL 甲醇-0.1%甲酸水溶液(3:7, v/v)复溶,正己烷除脂净化后检测。流动相为乙腈和 0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱,经 C₁₈ 色谱柱分离,采用多反应监测正离子模式对头孢洛宁进行定性定量分析。采用基质匹配法对牛奶中头孢洛宁的含量进行标准校正,在 2~200 μg/L 范围内,头孢洛宁质量浓度与其对应峰面积的线性关系良好,相关系数>0.999。牛奶中加标样品的检出限(按 S/N≥3 计)为 0.5 μg/kg,定量限(S/N≥10 计)为 2 μg/kg。在定量限、1/2 最高残留限量、最高残留限量、2 倍最高残留限量添加水平下,牛奶中头孢洛宁的平均回收率为 78.5%~86.2%,日内相对标准偏差为 1.5%~6.2%,日间相对标准偏差为 2.9%~5.6%。该方法可用于牛奶中头孢洛宁的残留检测。

关键词:高效液相色谱;串联质谱;头孢洛宁;牛奶;残留

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2014)05-0519-05

Determination of cefalonium residue in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Shuaipeng¹, GUO Chunna¹, MENG Lei², HUANG Xianhui^{1*}

(1. National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Henan Institute of Veterinary Drug Control, Zhengzhou 450008, China)

Abstract: An analytical method was developed for the determination of cefalonium in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). A total of 1 g milk was deproteinized by acetonitrile. The supernatant was transferred into a test tube to be blown dry with N₂ at 37 ℃. Then the residue was dissolved with methanol-0.1% formic acid in water (3:7, v/v). The sample was determined by HPLC-MS/MS after the purification. The chromatographic separation was achieved on a C₁₈ column using 0.1% formic acid in water and acetonitrile as mobile phases with gradient elution. Qualitative and quantitative analyses were achieved by HPLC-MS/MS under positive ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode. Matrix-matched calibration curve was used for the quantification. Good correlation coefficients were obtained (*r*>0.999) in the mass concentration range of 2–200 μg/L. The limit of detection (LOD, *S/N*≥3) was 0.5 μg/kg in milk, and the limit of quantification (LOQ, *S/N*≥10) was 2 μg/kg. The mean recoveries at the four levels of LOQ, 1/2MRL (maximum residue level), MRL, 2MRL were between 78.5% and 86.2%, with the intra-day relative standard deviations (RSDs) of 1.5% to 6.2% and inter-day RSDs of 2.9% to 5.6%. In conclusion, the established method can be applied for the determination of cefalonium residue in milk.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); tandem mass spectrometry (MS/MS); cefalonium; milk; residue

头孢洛宁(cefalonium)是美国先灵葆雅(Schering-Plough)制药公司在英联邦国家内开发的奶牛枯奶期针对乳房炎的预防性用药,是全球 3 个指定的动物专用头孢类抗生素之一,属于第二代

* 通讯联系人.E-mail: xhhuang@ scau.edu.cn.
基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201303038-5).
收稿日期:2013-12-25

头孢类抗生素^[1]。头孢洛宁对酸和 β -内酰胺酶稳定,杀菌力强,抗菌谱广,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均有效;尤其对引起奶牛乳房炎的大多数病原菌有效,主要用于细菌感染引起的奶牛乳房炎的防治^[2-4]。目前该药只在日本、新西兰、澳大利亚、欧盟和英联邦国家范围内使用,美国、加拿大等市场未使用该药,我国也未见进口或开发报道。

头孢菌素类抗生素的过量使用具有毒副作用,主要体现在对脑神经、听觉以及肾脏的损害^[5],对人体健康造成危害。因此,世界各国对动物源性食品中的头孢洛宁残留量均提出了限量要求,欧盟规定牛奶中头孢洛宁的最高残留限量(MRL)为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6],日本肯定列表规定牛组织和牛奶中头孢洛宁的最高残留限量均为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。

国外头孢洛宁乳房注入剂(Cepravin Dry Cow 250 mg Intramammary suspension (Dry Cow))已上市使用多年,但有关牛奶中头孢洛宁残留检测方法的报道较少,主要有微生物法^[8]、酶联免疫分析法^[9,10]和高效液相色谱-串联质谱法^[11,12]。牛奶中头孢洛宁的MRL为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,且牛奶中干扰基质较多,HPLC法不能满足残留检测的要求。本研究采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)分析牛奶中头孢洛宁残留,并进行了方法学评价。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API 4000 电喷雾-串联四极杆质谱仪,配 Analyst 4.1.5 软件(美国应用生物系统公司);Agilent 1200 型液相色谱仪(美国安捷伦公司);B-260 型恒温水浴锅(上海雅荣生化仪器设备有限公司);Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司);Mach1.6 R 冷冻型离心机(美国 Thermo 公司)。头孢洛宁标准物质:产品编号 32904, CAS 号 5575-21-3,由美国 Sigma 公司提供;正己烷为国产分析纯;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯(美国 Fisher 公司)。

1.2 溶液的配制

头孢洛宁标准储备液(500 mg/L):准确称取头孢洛宁标准物质 5.00 mg,置于 10 mL 容量瓶中,用 30% (v/v) 乙腈水溶液溶解并定容至刻度,配成 500 mg/L 标准溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存。临用前用甲醇-0.1% 甲酸水溶液(3:7, v/v)稀释成头孢洛宁系列标准工作液,现用现配。0.1% 甲酸水溶液:取 1 mL 甲酸,置于 1 000 mL 容量瓶内,用超纯水定容至刻度,超声后使用。甲醇-0.1% 甲酸水溶液(3:7, v/v):取 30 mL 甲醇与 70 mL 0.1% 甲酸水混匀

即得。

1.3 样品前处理

准确称取(1.00 $\pm$ 0.01) g 牛奶置于 15 mL 离心管中。加入 5 mL 乙腈,涡旋 1 min,置于振荡器上以 300 r/min 振荡 10 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,以 9 000 r/min 离心 10 min。转移上清液至 10 mL 试管中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹干,加入 1 mL 甲醇-0.1% 甲酸水溶液(3:7, v/v)复溶,涡旋 1 min,溶液转移至 2 mL 离心管中,加入 0.8 mL 正己烷除脂,涡旋 1 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 000 r/min 离心 10 min,弃去正己烷,过 0.22 μm 有机相针式过滤器至 2 mL 棕色进样瓶中,LC-MS/MS 分析。

1.4 色谱-质谱条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱:美国 Phenomenex Luna C₁₈(150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm);流动相:乙腈(A), 0.1% 甲酸水溶液(B)。梯度洗脱程序:0.0~0.5 min, 10% B;0.5~1 min, 10% B~95% B;1~4 min, 95% B;4~4.5 min, 95% B~10% B;4.5~10 min, 10% B。流速:0.25 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL 。

1.4.2 质谱条件

用多反应监测(MRM)扫描模式;电喷雾离子源(ESI);正离子扫描;电喷雾电压 4 kV;离子源温度 600 $^{\circ}\text{C}$;辅助气压力 35 kPa;雾化气压力 55 kPa;气帘气压力 15 kPa。头孢洛宁的MRM质谱检测参数:选择离子对 m/z 459.4/337.3, 459.4/152.3,其中定量离子对为 m/z 459.4/337.3;碰撞能量(CE)14 eV;去簇电压(DP)70 V;碰撞室射出电压(CXP)10 V,射入电压(EP)10 V。

2 结果与讨论

2.1 质谱参数的确定

头孢洛宁标准溶液(1 mg/L)分别在正离子和负离子模式下全扫描,发现头孢洛宁在正离子模式下的响应值更高。头孢洛宁标准溶液(1 mg/L)在正离子模式下全扫描,得到 $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ (m/z 459.4)准分子离子峰。对 m/z 459.4 进行二级质谱全扫描,得到头孢洛宁二级全扫描质谱图(见图1)。结合头孢菌素质子化离子的一般断裂规律^[13]可知,头孢洛宁的质谱行为较简单,主要为R2断裂(见图2)得到的 m/z 123.4 和 337.3; C(6)-C(7)键及 C(7)-C(8)键断裂导致 β -内酰胺环开环得到的 m/z 152.3 和 309.3;而 m/z 337.3 进一步裂解又可得到 m/z 152.3。其中 m/z 337.3 和 152.3 的强度相对较大,干扰较小,故选择 m/z 337.3 作为定量离子,

图1 头孢洛宁的二级质谱图

Fig. 1 MS/MS spectrum of cefalonium

图2 头孢洛宁的结构式

Fig. 2 Chemical structure of cefalonium

m/z 152.3 为辅助定性离子。

2.2 色谱条件的优化

头孢洛宁属于 β -内酰胺酶类抗生素,结构式中既有游离羧基,又带有氨基,为两性物质,极性小^[14]。所选色谱柱的填料应为直链烷烃键合的硅胶,其中最常见的是十八烷基键合硅胶(即 C_{18})。研究对比了 Phenomenex Luna C_{18} (150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m) 和 Waters C_{18} (150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m) 色谱柱。两种色谱柱对头孢洛宁均有良好的保留,头孢洛宁均可得到优异的峰形。综合考虑,本文选择 Phenomenex Luna C_{18} (150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m) 色谱柱。为了改善峰形及提高分离度,增强目标物在反相色谱柱上的保留,经常在流动相溶液中添加甲酸、乙酸等酸性物质或者甲酸铵、乙酸铵等缓冲盐。在水相中添加 0.1% 的甲酸^[15]及对流动相条件的调整能使头孢洛宁在色谱柱上较好的保留(保留时间在 6.1 min 左右),响应值高,峰形优良。

2.3 样品前处理方法的优化

2.3.1 样品前处理方法的考察

有关牛奶中头孢洛宁残留检测方法报道的文献资料中,有的采用离心的方法预先除去脂肪^[11],有的采用乙腈沉淀蛋白^[16],有的添加 pH 8.5 磷酸盐缓冲液稀释牛奶^[12]然后过固相萃取(SPE)柱净化。文献报道的样品前处理方法中,大部分都包含了操作繁琐的 SPE 净化步骤,成本较高。国家标准方法^[16]称取 5 g 牛奶,最后定容至 2 mL,浓缩了约

2.5 倍,SPE 柱净化后样品足够干净。本方法称取 1 g 牛奶,最后定容至 1 mL,正己烷除脂后,采用空白基质匹配标准溶液法^[17]进行校准,检测结果显示样品同样足够干净。而本试验无需 SPE 柱净化,成本较低,简便易行,效率高,定量限为 2 μ g/kg,灵敏度更高。

2.3.2 提取液及浓缩条件的选择

牛奶中蛋白质较多,本试验比较了乙腈、甲醇和乙醇沉淀蛋白的效果,结果发现乙腈的沉淀效果更好,头孢洛宁的回收率较高,在 75% 以上;甲醇和乙醇沉淀蛋白效果不如乙腈,且回收率也相对低些(约 60%),所以最后选用乙腈作为蛋白沉淀剂。考察了沉淀 1 g 牛奶中蛋白质所需要的乙腈的体积,尝试过 4、5、6、8、10 mL。4 mL 时提取不充分,回收率约 65%;5 mL 时回收率为 75%~85%;连续增加乙腈体积至 10 mL,回收率几乎没有提高。为了节约试剂及提高方法的简便性,最终确定采用 5 mL 乙腈进行提取。氮气流吹干浓缩时考察了温度分别为 30、37、40 $^{\circ}$ C 时对头孢洛宁的影响。结果表明 30 $^{\circ}$ C 下浓缩效率低,单个样品吹干所需时间为 1.2 h,回收率为 74%~80%;40 $^{\circ}$ C 下浓缩效率高,但头孢洛宁有所降解,回收率只有 58%~65%;在 37 $^{\circ}$ C 时浓缩效率较高,单个样品吹干所需时间为 40 min,且头孢洛宁降解不明显,回收率为 75%~87%。在浓缩吹干后,加入 1 mL 甲醇-0.1% 甲酸水溶液(3:7, v/v)复溶,加入正己烷进一步除去脂溶性杂质,低温高速离心后过 0.22 μ m 滤膜可保证样品足够干净。

2.4 标准曲线和线性范围

准确称取 1 g 空白牛奶 7 份分别置于 15 mL 离心管中,按 1.3 节方法处理样品,用所得空白基质液分别配制头孢洛宁标准工作液(2、5、10、20、50、100、200 μ g/L),用 HPLC-MS/MS 进行检测。每一水平设 5 个平行样品同日检测,连续测定 5 日。以头孢洛宁峰面积平均值为纵坐标(Y),质量浓度为横坐标(X , μ g/L)绘制标准曲线,求得牛奶中头孢洛宁的回归方程 $Y = 2\,944.9X + 2\,227.5$,相关系数 $r = 0.999\,6$ 。

2.5 检出限和定量限

准确称取空白牛奶 1 g,依次加入不同质量浓度(1、5、10、20、50 μ g/L)的头孢洛宁标准工作液 100 μ L,涡旋混匀,使得样品中头孢洛宁的添加浓度分别为 0.1、0.5、1、2、5 μ g/kg,按 1.3 节方法处理样品。以 $S/N \geq 3$ 确定检出限(LOD),以 $S/N \geq 10$ 确定定量限(LOQ)。牛奶中头孢洛宁的检出限为 0.5 μ g/kg,定量限为 2 μ g/kg。

2.6 回收率和精密度的测定

回收率和精密度采用在空白牛奶中添加标准溶液的方法进行检测。其 MRM 谱图见图 3 和图 4。根据残留限量要求及欧盟对头孢洛宁设置的 MRL, 在 LOQ、1/2MRL、MRL、2MRL 4 个添加水平, 1 g 空白牛奶中分别添加 20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的头孢洛宁标准工作液 100 μL , 即牛奶中添加浓度为 2、5、10、20 $\mu\text{g/kg}$, 旋涡混匀, 按 1.3 节方法处理样品, 每一水平设 5 个平行样品同日检测, 连续测定 5 日。求得空白牛奶中添加头孢洛宁回收率的平均值(X)和标准差(SD), 同时计算日内和日间相对标准偏差。结果表明, 头孢洛宁在牛奶中的平均回收率介于 78.5%~86.2% 之间, 日内相对标准偏差为 1.5%~6.2%, 日间相对标准偏差为 2.9%~5.6% (见表 1)。

图 3 空白牛奶的 MRM 谱图

图 4 空白牛奶添加 2 $\mu\text{g/kg}$ 头孢洛宁的 MRM 谱图

Fig. 4 MRM chromatogram of a blank milk sample spiked with cefalonium at 2 $\mu\text{g/kg}$

2.7 稳定性

取 20 份空白牛奶, 添加 MRL 水平的头孢洛宁标准溶液, 按 1.3 节方法处理样品, 用 HPLC-MS/MS 进行检测, 记录其峰面积; 于室温条件下放置 24 h 后重新检测, 比较两次峰面积的变化。结果显示, 牛奶样品中头孢洛宁的峰面积变化在 -3.35%~3.80% 之间, 说明样品在室温条件下放置 24 h 内,

表 1 牛奶中头孢洛宁的加标回收率及相对标准偏差 ($n=5$)
Table 1 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of cefalonium spiked in milk ($n=5$)

Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/ %	Intra-day RSD/ %	Inter-day RSD/ %
2	78.5 $\pm$ 2.3	1.8	2.9
5	84.5 $\pm$ 3.7	2.3	4.4
10	86.2 $\pm$ 3.1	1.5	3.6
20	80.8 $\pm$ 4.5	6.2	5.6

头孢洛宁稳定性良好。

2.8 基质效应的消除

样品基质溶液对待测物的电喷雾离子化影响较大, 可抑制或增强信号响应, 导致检测结果的准确度与精密度降低。本试验通过在空白牛奶基质提取液中添加低、中、高 3 个浓度即 2、20、200 $\mu\text{g/L}$ 的头孢洛宁标准溶液, 与纯溶剂中的信号强度进行比较, 牛奶基质峰面积与纯溶剂的峰面积比值分别为 64%~92%、75%~88%、80%~86%, 说明牛奶基质对头孢洛宁检测有抑制效应。为消除样品基质效应的影响, 采用空白基质匹配标准溶液法进行校准。

2.9 抽样检测

从不同市场购买新鲜牛奶 10 份, 从超市购买国产蒙牛、伊利品牌盒装牛奶各 10 份, 以及新西兰、澳大利亚进口盒装牛奶各 10 份, 每份 100 mL, 共 50 份样品, 按本方法进行样品前处理和检测。结果显示, 所有国产样品均未检测出头孢洛宁残留, 有 1 份新西兰进口样品检测出 8.0 $\mu\text{g/kg}$ 头孢洛宁残留。这是因为头孢洛宁在国内尚未批准使用, 有关头孢洛宁防治奶牛乳房炎的制剂还处于研发阶段, 尚未投入生产。上述结果表明该方法可用于检测牛奶中头孢洛宁的残留量。

3 结论

本文建立了 HPLC-MS/MS 测定牛奶中头孢洛宁残留量的分析方法。样品经乙腈提取, 氮气吹干后用甲醇-0.1% 甲酸水溶液 (3:7, v/v) 复溶, 正己烷去除脂肪后, 经 HPLC-MS/MS 分析。本方法前处理操作简便易行, 不需要 SPE 柱净化, 所需试剂较少, 成本较低, 且精密度和重复性好, 灵敏度高, 定量限低于欧盟对牛奶中头孢洛宁制定的最高残留限量, 适用于牛奶中头孢洛宁的残留检测。

参考文献:

[1] Cephalonium (头孢洛宁). [2013-12-16]. <http://www.biomart.cn/infosupply/5329604.htm>
[2] Bryan M A, Heuer C, Emslie F R. New Zeal Vet J, 2011, 59 (4): 166

[3] Shephard R W, Burman S, Marcun P. Aust Vet J, 2004, 82 (10) : 624

[4] McDougall S. New Zeal Vet J, 2010, 58(1) : 45

[5] Bai G T, Chu X G, Pan G Q, et al. Chinese Journal of Chromatography (白国涛, 储晓刚, 潘国卿, 等. 色谱), 2009, 27 (4) : 417

[6] Cefalonium Summary Report (2). Committee for Veterinary Medicinal Products. [2013-12-25]. <http://www.ema.europa.eu/docs/en/2009/11/WC500011741.pdf>

[7] National Food Safety Resource Database (中国食品安全资源数据库). (2007-06-28). <http://www.fsr.org.cn/Index.asp>

[8] Kantiani L, Farre M, Barcelo D. TrAC-Trend Anal Chem, 2009, 28(6) : 729

[9] Beltrún M C, Romero T, Althaus R L, et al. J Dairy Sci, 2013, 96(5) : 2737

[10] Bremus A, Dietrich R, Dettmar L, et al. Anal Bioanal Chem, 2012, 403(2) : 503

[11] Hou X L, Wu Y L, Lv Y, et al. J Chromatogr B, 2013, 931 (15) : 6

[12] Becker M, Zittlau E, Petz M. Anal Chim Acta, 2004, 520 (1/2) : 19

[13] Ye X M, Cao X J, Ma Y P, et al. Journal of Instrumental Analysis (叶学敏, 曹小吉, 马永萍, 等. 分析测试学报), 2010, 29(12) : 1135

[14] Guo C N. [MS Dissertation]. Guangzhou: South China Agricultural University (郭春娜. [硕士学位论文]. 广州: 华南农业大学), 2009

[15] Yang G, Huang X H, Guo C N, et al. Chinese Journal of Chromatography (杨刚, 黄显会, 郭春娜, 等. 色谱), 2012, 30(6) : 568

[16] GB/T 22989-2008

[17] He L M, Liu X G, Zeng Z L. Chinese Journal of Chromatography (贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 色谱), 2008, 26(1) : 98