doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.2.07

## 动物源食品中氨曲南残留检测方法的建立

阎玉林1,王世永2,陈 玲3,李桂华4\*,章安源3,李冬晓1,张苏苏1

(1. 青岛谱尼测试有限公司,山东青岛 266100; 2. 福州市海洋与渔业技术中心,福州 350007;

3. 山东省兽药质量检验所,济南 250010;4. 山东省饲料质量检验所,济南 250010)

[ 收稿日期] 2020 - 07 - 21 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2021) 02 - 0040 - 06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立了高效液相色谱 - 串联质谱法(HPLC - MS/MS)测定动物源食品中氨曲南残留的方法。样品经磷酸缓冲盐溶液提取后,过固相萃取柱净化,进 HPLC - MS/MS 检测。结果表明,该方法的标准工作曲线线性良好( $R^2 > 0.995$ ),样品加标回收率均在 70 % ~110 %之间,相对标准偏差(RSD)小于 10 %,方法的检出限为 1.0  $\mu$ g/kg,定量限为 2.0  $\mu$ g/kg。该方法前处理简便、可靠、灵敏度高,可适用于动物源食品中氨曲南残留的测定。

「关键词】 动物源食品:氨曲南:高效液相色谱 - 串联质谱

# Establishment of a Detection Method for Aztreonam Residues in Foods of Animal Origin

YAN Yu $-\ln^1$ , WANG Shi $-\,yong^2$ , CHEN  $Ling^3$ , LI Gui $-\,hua^{4\,*}$ , ZHANG An $-\,yuan^3$ , LI Dong $-\,xiao^1$ , ZHANG Su $-\,su^1$ 

(1. Qing Dao Pony Testing Group, Qingdao 266100, China; 2. Fuzhou Ocean And Fishery Technology Center, Fuzhou 350007, China;

3. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Provincial, Jinan 250010, China;

4 Institute of Feed Quality Inspection of Shandong Provincial, Jinan 250010, China)

Corresponding author: LI Gui - hua, E - mail: guihua69@ 163. com

Abstract: A high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS) method for the determination of aztreonam residues in foods of animal origin was established in this study. The sample was firstly extracted with phosphate buffered saline solution, and purified by solid phase extraction column, and then the extracted solution was detected by HPLC – MS/MS. The results showed the linearity of the standard work curve was good ( $R^2 > 0.995$ ), and the average sample recovery rates were 70% ~ 110%, and the relative standard deviation of the method was less than 10%. The limition of detection and quantitation was 1.0  $\mu$ g/kg and 2.0  $\mu$ g/kg, recpectively. The method was simple, reliable, and sensitive, and can be applied to the determination of aztreonam residues in foods of animal origin.

**Key words:** animal original food; aztreonam; HPLC - MS/MS

作者简介:阎玉林,工程师,硕士研究生,从事农产品、饲料中的农药、兽药、添加剂、生物毒素等的检测及研发工作。

通讯作者: 李桂华。E - mail: guihua69@163.com

氨曲南(aztreonam)是第一个应用于临床的单环β-内酰胺类抗生素,常作为氨基糖苷类药物的替代品,用于治疗肾功能损害患者的需氧革兰氏阴性菌感染;也可在密切观察情况下用于对青霉素、头孢菌素过敏的患者<sup>[1-3]</sup>。根据农业农村部《2018年兽医工作要点》的要求,兽用抗生素的监控将越来越严格。从耐药性上考虑,将氨曲南列为12类不宜被批准使用的兽药抗生素。

目前,国内外关于氨曲南检测的研究主要集中在两方面,一是对于氨曲南原药及其副产物的研究<sup>[4-7]</sup>;二是研究氨曲南在人体血液和尿等组织中的代谢规律<sup>[8-10]</sup>。而动物源食品中氨曲南的测定鲜有报道。本试验针对动物源食品基质复杂,样品前处理繁复、不易检测等问题,采用磷酸盐缓冲溶液提取,固相萃取柱净化样品,建立了一种液相色谱串联质谱测定动物源食品中的氨曲南残留量的方法,有效解决了动物源食品中氨曲南不易测定的难题,弥补了该项工作的空白。方法的建立将对打击违法滥用药物,保障动物源性食品质量安全具有重要的科学意义和应用价值。

#### 1 材料与方法

1.1 仪器与材料 Waters Xevo TQ - S micro 液质 联用仪(Waters 公司); JY3002 电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司); XW - 80A 旋涡混合器(上海精科实业有限公司); KQ - 500E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); IKA T18 basic组织匀浆机(德国 IKA)。

氨曲南,批号 130507 - 201303,纯度 96.9%,购自中国食品药品检定研究院。甲醇、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司)、甲酸(纯度 98%,北京百灵威科技有限公司);磷酸二氢钠、氢氧化钠(分析纯,青岛合力兴化玻有限公司);一级水(电阻率≥18 MΩ·cm);固相萃取柱: SBEQ - CA6685 CNW Poly - Sery HLB Pro SPE,(200 mg,6 mL)(上海安谱实验科技股份有限公司),0.22 μm疏水型 PTFE 聚四氟乙烯微孔滤膜(天津领航实验设备股份有限公司),高纯氮、高纯氮(纯度均为 99.999%,青岛长松气体有限公司)。

- 1.2 标准溶液的配制 准确称取适量氨曲南标准品,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇配制成标准储备液(1000 μg/mL),避光储存于冰箱中( $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ )备用,有效期  $3 \text{ }^{\circ}\text{}$ 月。
- 1.3 仪器条件 Agilent SB AQ(3.0 mm × 100 mm,1.8 μm);流动相 A:0.1% 甲酸水溶液,B相:甲醇,梯度洗脱条件:20% B保持 0.5 min,在 1.0 min内线性增至50% B,保持 0.5 min,在 0.3 min内线性增至80% B,保持 1 min,在 0.5 min 内线性增至95% B,保持 1 min,然后降至20% B,保持 1 min;流速: 0.35 mL/min;进样量:5 μL;柱温:30  $^{\circ}$ C。

质谱条件: ESI 源负离子模式电离;反应监测 (MRM);毛细管电压: 2.4 kV;离子源温度:  $150 \text{ $\mathcal{C}$}$ ;脱溶剂气流速: 800 L/h;脱溶剂气温度:  $500 \text{ $\mathcal{C}$}$ :锥孔气流速: 50 L/h;二级碰撞气: 氩气。定量离子对为 m/z=434.06/95.94,定性离子对为 m/z=434.06/121.81,锥孔电压为 20 V,碰撞能量分别为 20 eV 和 30 eV。

1.4 样品前处理 称取( $5.00 \pm 0.05$ )g样品,置于 50 mL 玻璃离心管内,加 10 mL 0.15 mol/L 磷酸二氢钠(pH = 7.0)提取液,匀浆 1 min,提取 15 min,8000 r/min 离心 5 min,将上清液转移到新的离心管中,剩余残渣重复提取,再加入 10 mL 提取液,重复提取一遍,合并提取液,作为备用液。

HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇,5 mL 水和 5 mL 0.15 mol/L 磷酸二氢钠 (pH = 7.0) 活化,取 10 mL备用液过固相萃取柱,用 5 mL 水淋洗,然后用5 mL甲醇洗脱,收集洗脱液,40  $\mathbb{C}$  氮吹至近干。加 2 mL 0.1% 甲酸甲醇/水溶液(50:50,v/v)复溶,充分涡旋混匀,8000 r/min 离心 5 min,上清液过 0.22  $\mu$ m有机滤膜后,供液相色谱 – 串联质谱仪测定。

#### 2 结果与分析

2.1 线性考察 质谱定量结果的准确性受基质的 影响,在没有内标的情况下一般需要配制基质标曲,取空白样品(检测结果为阴性的鸡肉、鸡蛋、鸡肝、猪肉、鱼肉)按照 1.4 进行处理,得到空白基质溶液,用空白基质溶液配制成 1、2、5、10、20 ng/mL

的氨曲南标准工作液,以待测物的浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线,其线性相关系数( $R^2$ )均大于0.995,详细数据见表1,说明在1~20 ng/mL的标准曲线范围内,线性良好。

表 1 不同动物组织中添加氨曲南的标准曲线

Tab 1 Standard curve of aztreonam added in different animal tissues

组织	线性范围 (ng/mL)	线性方程	线性相关系数 (R <sup>2</sup> )
鸡肉	1 ~ 20	y = 406.4x + 129.3	0.9997
鸡蛋	1 ~ 20	y = 434.0x + 161.3	0.9972
鸡肝	1 ~ 20	y = 529.4x + 24.4	0.9974
猪肉	1 ~ 20	y = 406.5x + 164.9	0.9986
鱼肉	1 ~ 20	y = 465.7x + 10.1	0.9968

2.2 方法的检出限和定量限 检出限和定量限采用空白组织(检测结果为阴性的鸡肉、鸡蛋、鸡肝、猪肉、鱼肉)中添加氨曲南的方法,按照1.4的方法

处理样品进行测定,经实验得到特征离子色谱峰信噪比大于或等于3( $S/N \ge 3$ )的最低浓度为1.0 μg/kg,即方法的检出限,信噪比大于或等于10( $S/N \ge 10$ )且回收率和精密度较好的浓度为2.0 μg/kg,即方法的定量限。

2.3 方法的准确度与精密度 在空白鸡肉样品 (检测结果为阴性的样品)中添加 2.0、4.0、10.0 μg/kg的氨曲南进行加标回收率实验,各添加水平进行6个样品的平行试验,测得氨曲南的准确度和精密度,空白鸡肉样品添加氨曲南后得到的特征离子质量色谱图如图 1 所示。本方法同时考察了鸡蛋、鸡肝、猪肉、鱼肉等动物性食品中氨曲南适用性,数据显示本方法在空白加标样品中的回收率为70%~110%,批内和批间相对标准偏差(RSD)均未超过 10%,说明重现性良好,该方法比较稳定,数据详见表 2。

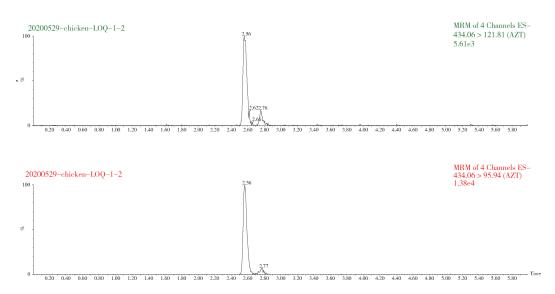


图 1 空白鸡肉中添加 2.0 µg /kg 氨曲南的特征离子质量色谱图

Fig 1 Characteristic ion mass chromatogram of aztreonam 2.0 μg/kg added in blank chicken

#### 3 讨论与结论

3.1 流动相的优化 试验考察了 5 mmol/L 乙酸 铵水溶液 - 乙腈,5 mmol/L 乙酸铵水溶液 - 甲醇,0.1% 甲酸水溶液 - 卫腈 和水 - 甲醇等 5 种流动相体系对分析效果的影响。

当采用 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇作为流动相时,目标物色谱峰对称性好,响应强度高,保留时间和色谱峰面积重复性好,因此选择 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇作为流动相。氨曲南标准品的总离子流图见图 2。

表 2	方法的准确度和精密度 $(n=6)$
1X 4	刀, 体的性侧皮性骨盆, 皮(ルーサ)

Tab 2	Accuracy	and	precision	of the	method	n = 6
		unu	DI CCIBIOII	or the	memou	n - 0

组织	添加量(μg/kg)	批内平均回收率(%)	批间平均回收率(%)	批内 RSD(%)	批间 RSD(%)
	2.0	76.7	81.5	4.28	7.12
鸡肉	4.0	81.1	73.6	3.23	8.94
	10.0	86.6	76.8	4.43	9.63
	2.0	78.1	74.1	3.33	9.16
鸡蛋	4.0	76.0	79.8	2.75	7.04
	10.0	79.6	77.4	4.43	8.58
	2.0	73.4	81.5	6.52	8.38
鸡肝	4.0	77.9	73.6	3.23	4.52
	10.0	79.2	76.8	4.43	6.39
	2.0	83.7	80.6	3.37	5.97
猪肉	4.0	93.7	84.9	4.06	6.08
	10.0	81.0	83.3	2.75	6.69
	2.0	84.3	80.2	2.83	7.10
鱼肉	4.0	78.2	71.0	2.63	4.08
	10.0	86.6	88.2	4.09	9.37

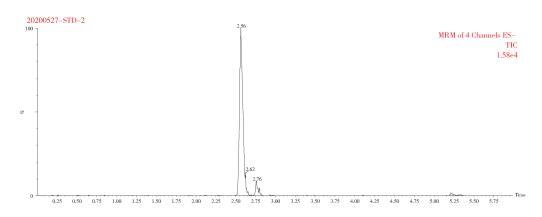


图 2 氨曲南的总离子流图

Fig 2 Total ion chromatograms of the aztreonam

3.2 提取条件的选择 参考文献报道的关于 β - 内酰胺类抗生素的实验条件 [11-15],通常采用乙腈、乙腈/水溶液 (15:2, v/v)、乙腈/水溶液 (80:20, v/v)、0.15mol/L磷酸二氢钠 (pH = 8.5)、0.15mol/L磷酸二氢钠 (pH = 5.0),经过阴性样品添加,通过回收率来选择最佳的提取条件。结果显示,含乙腈的提取液回收率均低于 10%,分析原因可能是氨曲南微溶于乙腈溶液导致;另外一个原因是采用含乙腈的提取液整个过程繁琐,容易导致目标化合物降解或损失。 β - 内酰胺类抗生素以磷酸盐缓冲液作为提取液的检测方法,大都选择 pH 保持在 8.0 ~ 9.0,而实验

结果表明,氨曲南在中性条件下稳定,因此本实验选择 0.15mol/L磷酸二氢钠(pH = 7.0)作为提取液。

实验也考察了提取液用量、提取方法和提取次数对提取效果的影响,经过优化,当称样量为5.00 g时,用10 mL 0.15 mol/L 磷酸二氢钠(pH = 7.0),提取两次为最佳,平均回收率可以达到80%左右。同时考虑提取液用量过大,会增加后续净化浓缩等步骤的难度,且不利于环保。对于实验室常用的提取方法,超声提取和震荡提取对于氨曲南的回收率基本相同,不同提取方法对回收率的影响不大。

3.3 固相萃取柱的选择 实验主要是针对动物源食品,基质复杂,而且是采用磷酸盐缓冲溶液提取,为了达到更好的富集和净化效果,因此需要增加净化处理步骤。实验主要考察了常用的 MAX, C<sub>18</sub>和 HLB 三种不同极性的固相萃取柱。配制浓度为 10 ng/mL 的氨曲南磷酸盐缓冲溶液,通过直接过固相萃取柱净化的方式考察其回收率。结果显示: MAX和 C<sub>18</sub>固相萃取柱对氨曲南不保留,回收率接近为0,而 HLB 固相萃取柱的净化效果好,平均回收率在 80% 左右,因此实验选择 HLB 固相萃取柱对样品做进一步的净化处理。

3.4 定容液的确定 实验对比了水,甲醇,乙腈, 乙腈/水溶液(50:50, v/v),乙腈/水溶液(20:80, v/v),甲醇/水溶液(50:50, v/v)和0.1%甲酸甲醇/水溶液(50:50, v/v)等7种不同的定容液,实验结果显示,含乙腈的定容液氨曲南出两个峰,峰型差,因此不建议使用含乙腈的溶液作为定容液。当采用0.1%甲酸甲醇/水溶液(50:50, v/v)作为定容液时,氨曲南的响应最高,因此本实验选用0.1%甲酸甲醇/水溶液(50:50, v/v)作为定容液。

3.5 基质效应实验结果 基质效应是影响定量分析结果准确性的重要因素,实验通过比较溶剂标准溶液和基质标准溶液响应值来评价基质效应的影响。

溶剂标准溶液: 将 1000 μg/mL 的标准溶液 (1.2)用 0.1%甲酸甲醇/水溶液(50:50, v/v)稀释至 5 ng/mL,得溶剂标准溶液。

基质标准溶液:称取(5.00±0.05)g 空白组织(鸡肉、鸡蛋、鸡肝、猪肉和鱼肉)各5份,按1.4项方法处理后获得相应组织空白基质溶液,取适量标准品工作溶液将其稀释至5 ng/mL,得基质标准溶液。

将 5 ng/mL 的溶剂标准溶液和基质标准溶液 按 1.3 项的仪器条件进样测试,所得峰面积均值和 RSD 如表 3 所示。实验结果表明,不同动物源组织 的基质标准溶液与溶剂标准溶液相比,均存在不同程度的基质抑制作用,因此本方法采用基质标准曲线进行定量校正。

表 3 不同动物组织中检测氨曲南的基质效应研究
Tab 3 Study of matrix effect in determination of aztreonam in different animal tissues

样品	浓度(ng/mL)	峰面积均值(n=5)	RSD(%)
溶剂标准溶液	5	2674	1.25
鸡肉基质标准溶液	5	2091	4.14
鸡蛋基质标准溶液	5	2138	3.54
鸡肝基质标准溶液	5	1984	5.41
猪肉基质标准溶液	5	2248	2.87
鱼肉基质标准溶液	5	2176	2.64

3.6 结论 试验采用磷酸盐缓冲溶液作为提取液,经过固相萃取柱净化,液相色谱串联质谱法检测,基质匹配标准曲线法定量。该方法样品前处理简单、耗时短、有机溶剂用量少,而且测试数据重复性好,回收率高,精密度和准确度均能满足食品理化分析的要求,适用于鸡肉、鸡蛋、鸡肝、猪肉和鱼肉等动物源性食品中氨曲南的用常检测,也可为其它动物组织中氨曲南的测定提供参考。

### 参考文献:

- [1] 陈华彪,刘兰侠,刘 莉. 氨曲南致不良反应 65 例文献分析 [J]. 中国药房,2015,26(14):1956 1958.

  Chen H B, Liu L X, Liu L. Analysis on 65 Reports of Aztreonam [J]. China Pharmacy, 2015,26(14):1956 1958.
- [2] 于 雯,治 洪,赵海花,等. 氨曲南的配伍禁忌文献概述[J]. 中国药物滥用防治杂志,2016,22(4):227-228.

  Yu W, Ye H, Zhao H H, et al. Literature review of the compatibility taboo of aztreonam [J]. Chinese Journal of Drug Abuse Prevention and Treatment, 2016,22(4):227-228.
- [3] 湛朝果.β-内酰胺类抗生素与聚磷菌相互作用机理研究
   [D]. 天津: 天津理工大学, 2018.
   Zhan C G. Study on the Interaction Mechanism betweenβ-Lactam Antibiotics and Phosphorus-Accumulating Organisms [D].

Tianjin: Tianjin University Technology, 2018.

- [4] 吴高芬,任荣军,刘 伟,等. HPLC 法测定注射用氨曲南的有 关物质[J]. 药物分析杂志,2010,30(12): 2381 – 2384. Wu G F, Ren R J, Liu W, et al. HPLC Determination of the Related Substances in Aztreonam for Injection [J]. Chin J Phram Anal,2010,30(12): 2381 – 2384.
- [5] Mahgoub H. Spectrophotometric and fluorimetric determination of aztreonam in bulk and dosage forms [J]. J Pharm Biomed Anal,

2003,31(4):767-774.

- [6] 曾庆瑞,江 虹. 维多利亚蓝 B 可见分光光度法测定复曲南 [J]. 化学世界,2019,60(12):865-869.

  Zeng Q R, Jiang H. The Determination of aztreonam by visible spectrophotometry with victoria blue b [J]. Chemical World, 2019,60(12):865-869.
- [7] Huang X, Kok W, Fabre H. Determination of aztreonam by liquid chromatrography with UV and amperometric detertion [J]. J Liqulid Chrom, 1991,14(14);2721-2733.
- [8] 程乙真,江 虹. 荧光分析法测定药物及尿样中的氨曲南[J]. 现代化工,2019,(4):228-231.

  Cheng Y Z, Jiang H. Determination of aztreonam in drugs and urine sample by fluoroscopy [J]. Modern Chenical Industry, 2019,(4):228-231.
- 9] 李 捷,符婉瑜,罗益海. 高效分子排阻法测定注射用氨曲南中聚合物的含量[J]. 北方药学, 2015, 12(12):8-9.
  Li J, Fu W Y, Luo Y H. Determination of the Polymers in Aztreonam for Injection by HPSEC [J]. Journal of North Pharmacy, 2015, 12(12):8-9.
- 的氨曲南及甲硝唑[J]. 复旦学报(医学版),2017,44(增刊):11-15.

  Shi Y, Bu J, Shen M. Analysis of aztreonam and metronidazole in blood by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2017,44(Suppl):11-15.

[10] 施 妍, 卜 俊, 沈 敏. 超高效液相色谱串联质谱法检测血液中

- [11] 任召珍,刘志敏,徐 娜,等. LC MS/MS 测定动物源食品中 10 种 β 内酰胺类抗生素残留 [J]. 食品工业, 2018,9 (39):284-286.
  - Ren Z Z, Liu Z M, Xu N, *et al.* Residue analysis of 10 kinds of  $\beta$  lactams in animal source foods by liquid chromatography/ electrospray ionization ttandem mass spectrometry [J]. The Food

Industry, 2018,9(39):284 - 286.

- [12] 孙 涛,刘圣红,刘河疆,等. SPE UPLC MS/MS 法测定牛奶 中的 β 内酰胺类药物残留[J]. 分析仪器, 2017(1): 7 12.
  - Sun T, Liu S H, Liu H J, et al. Determination of  $\beta$  Lactams residues in milk by SPE UPLC MS/MS[J]. Analytical Instrumentation, 2017(1): 7 12.
- [13] 陈 娟,翟纹静. 高效液相 串联质谱法测定猪肉中 7 种青霉素残留量[J]. 肉类工业, 2019,10:47 51.

  Chen J, Zhai W J. Determination of seven kinds of penicillin residues in pork by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Meat Industry, 2019,10:47 51.
- [14] 郭萌萌, 李兆新, 王智, 等. 通过式固相萃取净化/液相色谱 串联质谱法快速检测水产品中 11 种青霉素残留[J]. 分析测试学报,2017,36(3):337-342.
  - Guo M M, Li Z X, Wang Z, et al. Rapid and simultaneous determination of 11 penicillin residues in fishery products by Pass through SPE purification and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(3):337 –342.
- [15] 万译文,黄向荣,伍远安,等. 分散固相萃取/液相色谱串联质谱法测定水产品中磺胺类、喹诺酮类、青霉素类多种兽药残留[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2018,41(3):52-57. Wan Y W, Huang X R, Wu Y A, et al. Simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and penicillins residues in aquatic products by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2018,41(3):52-57.

(编辑:陈希)