

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.05.05

超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 氨苄西林及其代谢物残留

黎乃添¹, 雍燕¹, 叶渭源¹, 黎健业¹, 吴玉枝¹, 方炳虎^{1,2,3*}

(1. 广东温氏大华农生物科技有限公司, 广东云浮 527400; 2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642;

3. 广东省兽用生物制品技术研究与企业重点实验室, 广东肇庆 526268)

[收稿日期] 2023-05-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 05-0034-11 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立一种同时测定鸡蛋中氨苄西林及其主要代谢物氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的超高效液相色谱串联质谱方法。样品经乙腈水溶液(70:30, V/V)提取、浓缩、SAX 固相萃取小柱净化后, 采用超高效液相色谱串联质谱法进行检测。结果显示, 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在 1~200 ng/g 的浓度范围内呈良好的线性关系。在鸡蛋中氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的检测限均为 0.5 ng/g, 定量限为 1 ng/g。在 1~100 ng/g 添加浓度范围内, 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中的平均回收率分别为 84.0%~96.2%、85.6%~96.4% 和 89.2%~95.8%, 批内、批间 *RSD* 均小于 10%。添加不同浓度药物的鸡蛋样品具有良好的长期冷冻放置稳定性和反复冻融稳定性。蛋鸡在服用氨苄西林后, 所产鸡蛋均能检出氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪, 且氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的残留量和残留时间高于氨苄西林原型。上述内容表明, 该方法各项技术指标均能满足残留检测要求, 可用于定量测定鸡蛋中氨苄西林及其主要代谢物的残留量。

[关键词] 鸡蛋; 氨苄西林; 超高效液相色谱串联质谱法; 药物残留

Determination of Ampicillin and Its Metabolites in Eggs by UPLC-MS/MS

LI Nai-tian¹, YONG Yan¹, YE Wei-yuan¹, LI Jian-ye¹, WU Yu-zhi¹, FANG Bing-hu^{1,2,3*}

(1. Guangdong Wenshi Dahuanong Biotechnology Co., Ltd., Yunfu, Guangdong 527400, China; 2. South China Agricultural University,

College of Veterinary Medicine, Guangzhou 510642, China; 3. Guangdong Provincial Key Enterprise Laboratory of Veterinary Biological

Products Technology Research and Application, Zhaoqing, Guangdong 526268, China)

Corresponding author: FANG Bing-hu, E-mail: fangbh@scau.edu.cn

Abstract: A method of ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry was developed for the simultaneous determination of ampicillin and its main metabolites including ampicillin acid and ampicillin

基金项目: 2020 年农业行业标准制修订(14202058); 广东省科技计划项目(2020B1212070015); 云浮市 2022 年科技创新项目(2022020501)

作者简介: 黎乃添, 本科, 技术员, 研究方向为兽药药物分析与检测。

通讯作者: 方炳虎。E-mail: fangbh@scau.edu.cn

diketopiperazine in eggs. After extracted by acetonitrile: water (70 : 30, V/V) and concentrated by rotary evaporation, the sample solution was purified by SAX solid phase extraction column, and injected into the UPLC – MS/MS system to be tested. The results showed a good linear relationship between the range of 1 to 200 ng /g concentrations for ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine. The detection and quantification limit of ampicillin and its metabolites in eggs were 0.5 ng/g and 1.0 ng/g, respectively. The recoveries of ampicillin and its metabolites were 84.0% ~ 96.2% , 85.6% ~ 96.4% and 89.2% ~ 95.8% , and the coefficients of variation within and between the batches were less than 10% at the concentraion range of 1.0 ng/g to 100.0 ng/g. In stability experiments, the results also showed low – temperature storage stability and freeze – thaw stability of the compounds in different concentrations in eggs. The actual sample testing results show that after taking ampicillin, the eggs produced by laying hens can detect ampicillin, ampicillin acid, and ampicillin diketopiperazine, and the residual amount and residual time of ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine are higher than those of the ampicillin. The technical indicators of this method can meet the requirements of residue testing. And the method has good reproducibility, and meets the relevant regulations of testing residues on veterinary drugs, which is suitable for the simultaneous determination of ampicillin and its metabolites in eggs. Ampicillin, ampicillin acid, and ampicillin diketopiperazine can be detected in the eggs produced by laying hens after taking ampicillin, and the residual amount and residual time of ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine are higher than ampicillin. The technical indicators of this method can meet the requirements of residue testing, which indicates the established method is suitable for the simultaneous determination of ampicillin and its metabolites in eggs.

Key words: egg; ampicillin; UPLC – MS/MS; drug residues

氨苄西林是一种半合成的耐酸、长效的青霉素类抗生素,对革兰氏阳性菌、阴性菌等均具有较强的杀灭效果,主要用于防治禽畜胃肠道及呼吸道感染性疾病。由于鸡蛋在蛋禽体内成形往往需要数天时间,在蛋鸡开产前使用氨苄西林等药物,仍有可能造成药物在鸡蛋中的残留,存在食品安全和危害人体健康等潜在风险。食品安全国家标准 GB31650.1 – 2022 规定了以氨苄西林原型为残留标志物,鸡蛋中氨苄西林的最大残留限量是 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[1]。经查阅文献资料发现,氨苄西林在体内主要通过 β – 内酰胺环开环降解形成氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪^[2–4]。而氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等代谢物是引起过敏反应的主要成分^[5–6]。因此,除了氨苄西林原型外,也需关注氨苄西林的代谢物如氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等在鸡蛋中的残留情况。

目前,氨苄西林及其代谢物的残留检测方法包括微生物法、试管扩散法、分子印迹法、HPLC 法和 UPLC – MS/MS法等^[7–12]。虽然微生物法和试管扩散

法能够定性检测残留的氨苄西林及其代谢物,但是难以对其残留量进行准确定量。液相色谱 – 质谱法实现了高效的色谱分离和高灵敏度检测,已经成为了抗生素类药物残留的主要检测方法。利用液相色谱 – 质谱法系统地检测鸡蛋中氨苄西林及其代谢产物的残留未见报道。因此,本文拟建立一种同时测定鸡蛋中氨苄西林及其主要代谢物的 UPLC – MS/MS 法,快速定量测定鸡蛋中氨苄西林及其主要代谢物的残留量,以期对鸡蛋中兽药残留的检测提供有效手段。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 1290 型超高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);4500 型三重四级杆质谱仪(美国 AB 公司);CPA225D 型分析天平(感量 0.01 mg,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司);Sorvall ST16R 型高速冷冻离心机(美国赛默飞公司);Milli – Q reference 型超纯水系统(美国密理博公司);VORTEX MS3 型高速涡旋仪(德国艾卡公司);BCD – 656 WDPT型冰箱(海尔公司);R205B 型旋转蒸发

仪(上海申生科技有限公司);PHS-3C 型 pH 调节计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

1.2 对照品与试剂 氨苄西林标准品(含量为 86.0%,批号为 K0211410,中国兽医药品监察所);氨苄西林酸标准品(含量为 94.5%,批号为 0521-RB-0015,广州佳途科技股份有限公司);氨苄西林二酮哌嗪标准品(含量为 92.5%,批号为 0521-RB-0016,广州佳途科技股份有限公司)。甲醇(色谱纯,美国默克公司);乙腈(色谱纯,美国默克公司);甲酸(质谱纯,美国赛默飞公司);超纯水(实验室自制,符合 GB/T 6682-1992 规定的一级水要求);其他试剂均为分析纯。SAX 固相萃取小柱(150 mg/6 mL,美国 Welch 公司)。

1.3 试液配制 氨苄西林、氨苄西林酸、氨苄西林二酮哌嗪标准溶液:分别精密称取适量 3 种标准品各约 10 mg,于 10 mL 棕色容量瓶中,用 50%(V/V)乙腈水溶解并稀释定容至刻度,配制成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液。分别精密量取 1 mL 各标准贮备液于 100 mL 棕色容量瓶中,用 50%(V/V)乙腈水稀释定容至刻度,配制成 10 μg/mL 的混合标准溶液。

磷酸盐缓冲液:取 6.8 g 磷酸二氢钾,加水溶解并稀释至 1000 mL,用 12.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8.0。

提取液:700 mL 乙腈与 300 mL 水混合均匀。

洗脱液 A:取超纯水 450 mL,加甲醇 50 mL、甲酸 2 mL,混匀。

洗脱液 B:取甲醇 100 mL,加甲酸 0.4 mL,混匀。

1.4 样品采集与制备 鸡蛋样品来源于云浮市新兴县某蛋鸡养殖场。经检测无氨苄西林及其代谢物残留。将鸡蛋的蛋清和蛋黄均质匀浆,置于 50 mL 离心管中,备用。

1.5 样品前处理

1.5.1 样品提取 称取鸡蛋匀浆样品(2±0.02)g 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 提取液,涡旋 1 min,2000 r/min 离心 5 min,取上清液。向残渣中再加入 5 mL 提取液重复提取,合并上清液,于 12000 r/min 离心 5 min。将上清液转移至鸡心瓶中,40℃水浴下旋转蒸发除去有机相。浓缩液转

移至新的离心管中,先后用 3 mL 磷酸盐缓冲液洗涤鸡心瓶两次,合并浓缩液和洗涤液,12000 r/min 离心 5 min。取上清液作为提取液,备用。

1.5.2 样品净化 SAX 固相萃取小柱依次用甲醇 6 mL、水 6 mL 及磷酸盐缓冲液 6 mL 活化。将上述提取液加入活化后的 SAX 固相萃取柱,控制流速在 3 mL/min 以内,流完后再用磷酸盐缓冲液 3 mL 淋洗。最后依次用洗脱液 A 3 mL、洗脱液 B 1 mL 洗脱,收集洗脱液,经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后,供 UPLC-MS/MS 分析。

1.6 测定方法

1.6.1 色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC® BEH, C18 2.1×50 mm, 1.7 μm(美国沃特世公司);流动相:A 相为甲醇,B 相为 0.1% 甲酸水;柱温:25℃;进样量:5.0 μL;流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution conditions of mobile phase			
时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.300	0.00	100.00
0.90	0.300	0.00	100.00
1.00	0.500	100.00	0.00
3.40	0.500	100.00	0.00
3.50	0.300	0.00	100.00
5.00	0.300	0.00	100.00

1.6.2 质谱条件 大气压电喷雾离子源(ESI⁺);采用多反应监测(MRM)模式采集;电喷雾电压(IS):5500 V;雾化气压力(GS1):50 psi;辅助气流速(GS2):50 psi;气帘气压力(CUR):40 psi;离子源温度(TEM):550℃;碰撞室压力(CAD):9 psi;氨苄西林、氨苄西林酸、氨苄西林二酮哌嗪的定性定量离子对及去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)见表 2。

表 2 定性定量离子对及去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)

Tab 2 Qualitative and quantitative ion pair and corresponding declustering potential (DP), collision energy (CE)				
化合物	母离子	子离子	DP/V	CE/eV
氨苄西林	349.7	106.1 [*]	75.0	33.2
		192.1	76.0	21.0
氨苄西林酸	367.8	324.2 [*]	22.0	15.0
		307.3	22.0	21.0
氨苄西林二酮哌嗪	349.7	160.1 [*]	40.0	19.0
		191.0	40.0	21.0

* 为定量离子

2 方法验证

2.1 特异性考察 分别取空白鸡蛋样品、空白鸡蛋添加混合标准工作溶液样品,按照 1.5 项下方法进行处理,按照 1.6 项下的 UPLC-MS/MS 条件分析测定,判断空白鸡蛋基质是否会干扰氨苄西林及其主要代谢物的测定。

2.2 方法灵敏度确定 取 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液用 50% (V/V) 乙腈水配制浓度为 20 ng/mL 的混合标准工作溶液,现用现配。分别添加适量浓度为 20 ng/mL 混合标准工作溶液于空白鸡蛋样品中,制得添加浓度为 0.1、0.2、0.5、1、2 ng/g 的系列鸡蛋样品。添加样品按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下的 UPLC-MS/MS 条件分析测定。以最低检出浓度计算,按照信噪比 $S/N \geq 3$ 时确定方法检测限 (LOD), $S/N \geq 10$ 时确定方法定量限 (LOQ)。

2.3 线性范围测定 取 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准贮备液用 50% (V/V) 乙腈水分别配制系列浓度为 4000、2000、800、400、200 和 20 ng/mL 的混合标准工作液。分别精密移取 0.1 mL 上述系列混合标准工作液,并加入至 (2 ± 0.02) g 空白鸡蛋样品中,制得添加浓度为 200、100、40、20、10 和 1 ng/g 的系列鸡蛋样品。添加样品按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下的 UPLC-MS/MS 条件分析测定。以待测组分定量离子的峰面积为纵坐标,对应的添加浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线。

2.4 准确度与精密度的测定 分别配制氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪添加浓度均为 1、10 和 100 ng/g 的低、中、高 3 个不同浓度的鸡蛋样品进行加标回收率试验。各浓度设置 6 个平行样品,每个加标浓度重复 3 批。添加样品按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下的 UPLC-MS/MS 条件分析测定。通过外标法定量,计算各药物的回收率和批内、批间精密度。

2.5 稳定性测定

2.5.1 样品冷冻长期放置稳定性测定 分别配制氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪添加浓度均为 1、10 和 100 ng/g 的低、中、高 3 个不同浓度的鸡蛋样品,各浓度设置 6 个平行样品。将上述添

加样品放置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温环境中,分别于 0、7、14 d 各取出一批次样品,按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下的 UPLC-MS/MS 条件分析测定。考察上述添加样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温条件下长期放置的稳定性。

2.5.2 样品反复冻融稳定性测定 分别配制氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪添加浓度均为 1、10 和 100 ng/g 的低、中、高 3 个不同浓度的鸡蛋样品,各浓度设置 6 个平行样品。将上述添加样品分别在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反复冻融 3 次与常温条件下,按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下 UPLC-MS/MS 条件分析测定。考察上述添加样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下反复冻融 3 次后的稳定性。

2.6 基质效应试验 取浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准贮备液适量,分别并加入至 (2 ± 0.02) g 空白鸡蛋样品中,制得添加浓度为 100、10 和 1 ng/g 的系列鸡蛋样品,各浓度设置 6 个不同来源的鸡蛋样品。添加样品按 1.5 项下方法进行处理,制得基质匹配对照品溶液。

另取浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准贮备液适量用洗脱液(洗脱液 A 3 mL、洗脱液 B 1 mL)配制浓度分别为 50、5 和 0.5 ng/mL 的混合标准工作液,其浓度分别与基质匹配对照品溶液上机浓度一致。每个浓度设置 6 个平行样品。经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后,供 UPLC-MS/MS 分析。

按 1.6 项色谱工作条件对上述样品进行检测,记录相同浓度下各定量离子的峰面积,并分析鸡蛋基质对检测结果的基质效应。

2.7 实际样品检测 选取 25 羽京红一号在产蛋期的蛋鸡(28 周龄,体重约 1.5 kg,来源于温氏蛋业公司),试验前分别称重、编号。试验前于试验条件下观察饲养 1 周,临床表现健康,饲喂不含任何抗菌药物的蛋鸡专用饲料,自由饮水。按照氨苄西林可溶性粉标准中推荐的最高剂量和最长疗程,通过灌胃给药方式进行给药。于末次给药后停药当天开始分别采集 1~10 d 鸡蛋样品,每个采样时间点收集的鸡蛋不少于 10 枚。收集的鸡蛋分别洗净蛋壳,将蛋清和蛋黄混合均质后,按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下 UPLC-MS/MS 条件分析测定。

3 结果与分析

3.1 特异性试验结果 分别对空白鸡蛋样品和空白鸡蛋添加混合标准工作溶液样品进行测定,可见图 1 至

图 6。结果表明,鸡蛋样品中的内源性杂质不会干扰氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的检测。药物峰与杂质峰分离良好,表明该方法具有较好的特异性。

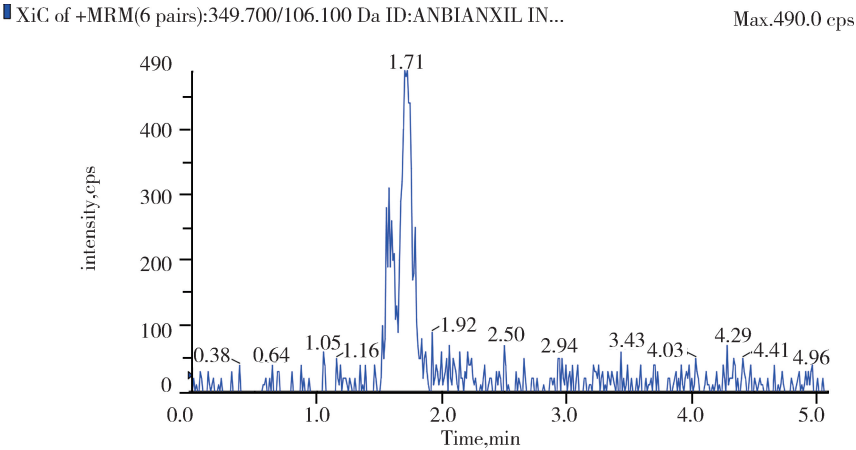


图 1 空白鸡蛋样品在氨苄西林质谱条件下色谱图

Fig 1 The chromatogram of blank eggs sample under ampicillin mass spectrometry conditions

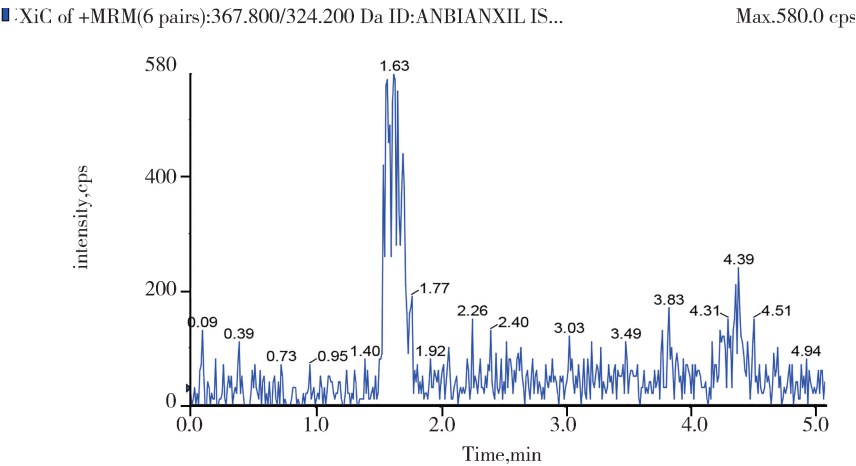


图 2 空白鸡蛋样品在氨苄西林酸质谱条件下色谱图

Fig. 2 The chromatogram of blank eggs sample under ampicillin acid mass spectrometry conditions

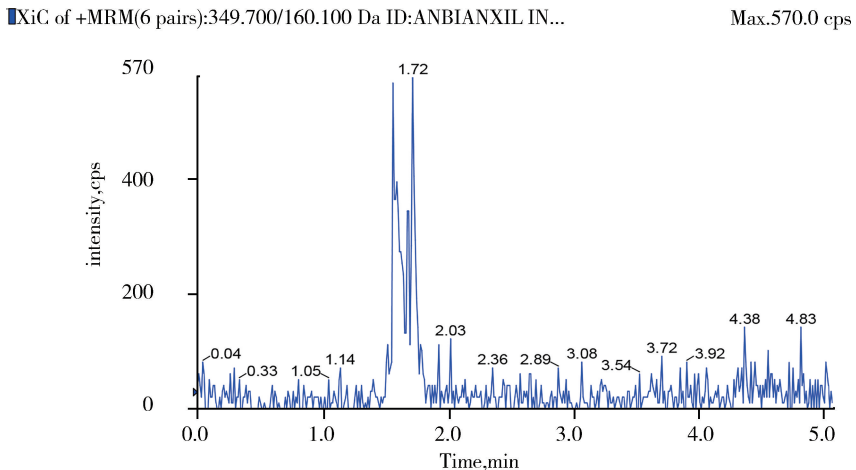


图 3 空白鸡蛋样品在氨苄西林二酮哌嗪质谱条件下色谱图

Fig 3 The chromatogram of blank eggs sample under ampicillin diketopiperazine mass spectrometry conditions

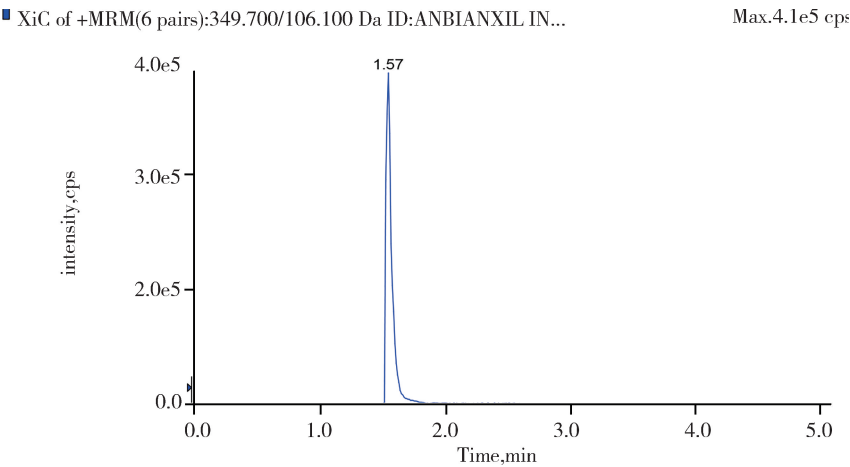


图 4 空白鸡蛋中添加氨苄西林对照品的定量离子色谱图

Fig.4 The quantitative chromatogram of ampicillin in egg samples

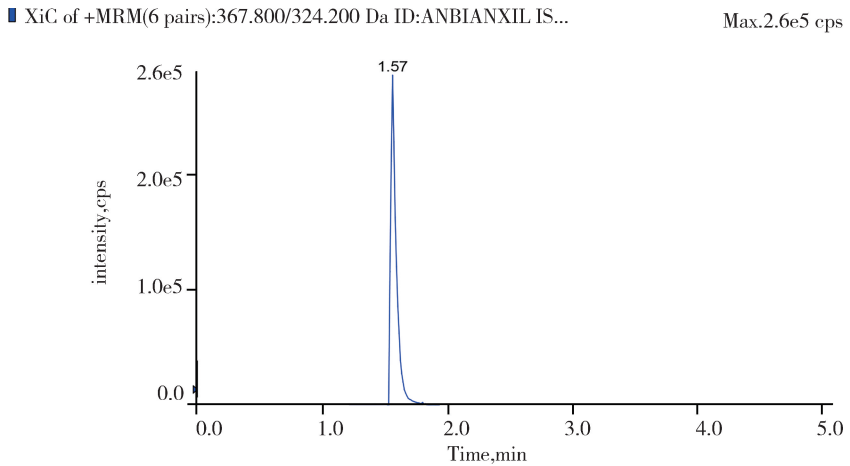


图 5 空白鸡蛋中添加氨苄西林酸对照品的定量离子色谱图

Fig 5 The quantitative chromatogram of ampicillin acid in egg samples

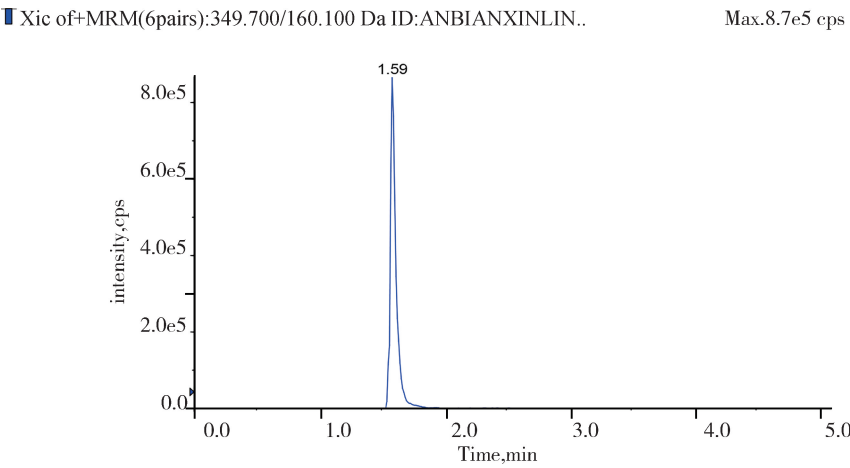


图 6 空白鸡蛋中添加氨苄西林二酮哌嗪对照品的定量离子色谱图

Fig.6 The quantitative chromatogram of ampicillin diketopiperazine in egg samples

3.2 方法灵敏度 根据建立的检测方法,氨苄西林、氨苄西林酸、氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中的 LOD 均为 0.5 ng/g、LOQ 均为 1 ng/g,验证了该方法灵敏度高,完全满足氨苄西林、氨苄西林酸、氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中残留检测的要求。

3.3 线性范围 鸡蛋基质中的氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在 1~200 ng/g 的浓度范围内呈良好的线性关系,相关系数 R^2 均大于 0.99。其定量离子在鸡蛋基质中的线性范围、回归方程和相关系数可见表 3。

表 3 鸡蛋中氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的线性范围考察结果

Tab 3 The linear range results of ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine in eggs			
化合物	线性范围 /(ng·g ⁻¹)	回归方程	R ²
氨苄西林	1~200	$y = 2.47e^{+04}x + -1.36e^{+04}$	0.9996
氨苄西林酸	1~200	$y = 1.37e^{+04}x + -1.93e^{+04}$	0.9956
氨苄西林二酮哌嗪	1~200	$y = 5.77e^{+04}x + 2.88e^{+04}$	0.9996

3.4 准确度与精密度 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中的添加回收率和精密度考察结果可见表 4。氨苄西林在 1、10、100 ng/g 添加水平的平均回收率为 84.0%~96.2%,批内精密度均小于 5.8%,批间精密度均小于 5.3%。氨苄西林酸在 1、

10、100 ng/g 添加水平的平均回收率为 85.6%~96.4%,批内精密度均小于 8.0%以内,批间精密度均小于 6.2%。氨苄西林二酮哌嗪在 1、10、100 ng/g 添加水平的平均回收率为 89.2%~95.8%,批内精密度均小于 8.7%,批间精密度均小于 7.9%。上述结果表明建立的检测方法准确度高,重现性好。

3.5 稳定性

3.5.1 样品冷冻长期放置稳定性 添加氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的鸡蛋样品在 -20℃低温条件下的长期放置稳定性试验结果可见表 5。结果表明,不同添加浓度的鸡蛋样品在 -20℃低温条件下储存 7 d 和 14 d 后药物浓度均值与 0 天相比均在 ±10% 范围内,批内变异系数均小于 15%,符合生物样品定量分析方法验证的要求。鸡蛋样品在 -20℃条件下储存 14 d,组织样品中的氨苄西林及其主要代谢物氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪稳定性较好。

3.5.2 样品反复冻融稳定性 添加氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的鸡蛋样品在 -20℃低温条件下反复冻融稳定性的试验结果可见表 6。结果表明,不同添加浓度的鸡蛋样品在 -20℃低温条件下反复冻融 3 次后,变异系数均小于 15%;其与冻融 0 次检测的浓度相比较,每一浓度的均值与标示浓度的偏差均在 ±10% 范围内,表明氨苄西林及其主要代谢物氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋组织中具有良好的反复冻融稳定性。

表 4 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中回收率与精密度结果

Tab 4 The recovery and precision results of ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine in eggs										
添加浓度 /(ng · g ⁻¹)(n = 6)	批次	氨苄西林			氨苄西林酸			氨苄西林二酮哌嗪		
		平均回收率 /%	批内 RSD /%	批间 RSD /%	平均回收率 /%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	平均回收率 /%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
1	1	94.6	4.0		96.4	2.0		91.1	5.8	
	2	90.4	4.6	5.3	94.3	3.2	5.2	90.5	6.4	6.4
	3	96.2	5.8		87.0	2.9		89.2	7.8	
10	1	90.7	4.4		96.4	4.0		91.9	8.3	
	2	93.3	3.7	4.4	95.8	4.0	4.0	92.2	8.1	7.9
	3	92.2	5.5		96.1	4.7		91.2	8.7	
100	1	90.4	4.4		85.6	4.2		95.8	4.8	
	2	84.0	3.1	4.7	92.7	8.0	6.2	93.2	4.8	5.3
	3	86.6	1.3		88.6	2.1		89.6	3.3	

表 5 添加氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的鸡蛋样品冷冻长期放置稳定性结果

Tab 5 The low – temperature storage stability results of ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine in eggs										
添加浓度 /(ng · g ⁻¹)	时间 /d	氨苄西林			氨苄西林酸			氨苄西林二酮哌嗪		
		$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV /%	$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ /%	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV /%	$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ /%	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV /%	$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ /%
1	0	0.82 ± 0.08	9.9	/	0.84 ± 0.08	9.1	/	0.86 ± 0.06	6.8	/
	7	0.88 ± 0.12	13.9	107.3	0.83 ± 0.08	10.1	98.8	0.84 ± 0.07	8.1	97.7
	14	0.82 ± 0.07	9.1	100.0	0.82 ± 0.08	9.6	97.6	0.87 ± 0.05	5.7	101.2
10	0	9.06 ± 0.53	5.9	/	9.00 ± 0.27	3.0	/	9.16 ± 0.34	3.7	/
	7	8.78 ± 0.57	6.5	96.9	8.77 ± 0.37	4.3	97.4	8.99 ± 0.23	2.6	98.1
	14	8.91 ± 0.67	7.6	98.3	8.95 ± 0.27	3.0	99.4	8.94 ± 0.42	4.7	97.6
100	0	97.57 ± 5.53	5.7	/	96.89 ± 4.62	4.8	/	94.18 ± 4.68	5.0	/
	7	92.62 ± 3.53	3.8	94.9	94.72 ± 6.36	6.7	97.8	92.34 ± 5.11	5.5	98.0
	14	92.23 ± 3.25	3.5	94.5	94.36 ± 6.67	7.1	97.4	91.63 ± 5.33	5.8	97.3

($X_T/(X_0$ 为 -20 ℃ 冻存待测样品(7 d 或 14 d)检测浓度平均值与 0 h 检测浓度平均值比

表 6 添加氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的鸡蛋样品冻融稳定性结果

Tab 6 The freeze – thaw stability results of ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine in eggs										
添加浓度/ (ng · g ⁻¹)	冻融 次数	氨苄西林			氨苄西林酸			氨苄西林二酮哌嗪		
		$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV /%	$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ /%	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV /%	$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ /%	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV /%	$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ /%
1	0	0.84 ± 0.07	8.2	/	0.86 ± 0.08	9.1	/	0.86 ± 0.07	8.4	/
	3	0.83 ± 0.08	9.8	98.8	0.84 ± 0.05	6.3	97.7	0.84 ± 0.05	5.6	97.7
10	0	9.13 ± 0.31	3.7	/	9.11 ± 0.40	4.4	/	9.02 ± 0.38	4.2	/
	3	9.00 ± 0.33	3.7	98.6	8.97 ± 0.25	2.7	98.5	8.91 ± 0.13	1.5	98.8
100	0	93.94 ± 4.35	4.6	/	92.07 ± 4.62	5.0	/	93.10 ± 4.44	4.8	/
	3	92.81 ± 3.15	3.4	98.8	90.80 ± 5.07	5.6	98.6	92.64 ± 3.21	3.5	99.5

$\bar{X}_T/\bar{X}_0$ 为冻融 3 次检测浓度平均值与冻融 0 次检测浓度平均值的比

3.6 基质效应试验 按 2.6 项下考察氨苄西林、氨苄西林酸、氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中的基质效应。以相同上机浓度的基质匹配对照品与标准工作液的峰面积比平均值作为考察鸡蛋基质对氨苄西林、氨苄西林酸、氨苄西林二酮哌嗪响应值的影响,结果见表 7。结果表明,组织样品在 1、10、100 ng/g 添加浓度下基质效应均在 86.2% ~ 88.8% 范围内,基质效应不明显。为获得更准确的结果,本实验采用通过基质匹配溶液的方法对基质效应进行校正。

表 7 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪基质效应研究结果

Tab 7 Research results on the matrix effect of ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine						
上机浓度/(ng · g ⁻¹)	氨苄西林		氨苄西林酸		氨苄西林二酮哌嗪	
	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV/%	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV/%	$\bar{X} \pm S. D$ (n = 6)	CV/%
0.5	87.4 ± 1.6	1.8	86.7 ± 1.4	1.6	87.2 ± 1.4	1.6
5	87.1 ± 2.5	2.9	88.2 ± 2.4	2.8	86.7 ± 1.3	1.5
50	86.2 ± 1.2	1.4	87.5 ± 2.3	2.6	88.8 ± 1.9	2.1

$\bar{X}$ 为基质匹配对照品与标准工作液峰面积比的平均值(%)

3.7 实际样品检测结果 按 2.7 项下开展动物试验,并对收集的鸡蛋样品按 1.5 项下方法进行处理,按 1.6 项下 UPLC – MS/MS 条件分析测定,实际样品检测结果见表 8。结果表明该检测方法能准确检测鸡蛋中氨苄西林、氨苄西林酸及氨苄西林二

酮哌嗪的含量。同时也证明了蛋鸡在服用氨苄西林后,鸡蛋中均可检测出氨苄西林及其主要代谢物氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪。而且,氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中的残留量和残留时间均高于氨苄西林原型。

表 8 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪实际样品检测结果
Tab 8 Actual sample detection results of ampicillin, ampicillin acid and ampicillin diketopiperazine

目标物	浓度/(ng · g ⁻¹) (X̄ ± S. D, n = 10)									
	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d
氨苄西林	10.44 ± 2.3	4.81 ± 1.6	3.53 ± 0.9	1.22 ± 0.3	ND	ND	ND	ND	ND	ND
氨苄西林酸	42.03 ± 8.6	36.40 ± 5.6	37.96 ± 3.7	17.11 ± 4.6	12.14 ± 3.6	7.86 ± 2.3	3.62 ± 0.9	1.34 ± 0.5	ND	ND
氨苄西林二酮哌嗪	27.20 ± 5.8	23.64 ± 5.5	32.48 ± 5.9	10.53 ± 2.4	7.79 ± 3.0	4.50 ± 1.2	2.14 ± 1.0	ND	ND	ND

4 讨论与结论

4.1 氨苄西林监测代谢物的选择 食品安全国家标准 GB31650 – 2019^[13] 和 GB31650.1 – 2022^[1] 中分别严格制定了所有食品动物的可食性组织(包括肌肉、脂肪、肝、肾等)、牛奶和鸡蛋中的最大残留限量。但是,上述标准中均是以氨苄西林原型为残留标志物制定的最大残留限量,并未对其代谢物的残留情况进行监测。相关文献资料表明^[5-7],氨苄西林在体内的代谢物如氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等是引起过敏反应的主要成分。本文在实际样品研究中也发现,蛋鸡在产蛋期服用氨苄西林后,其生产的鸡蛋中均可检测到氨苄西林及其主要代谢物氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪。在停药 3 d 后,鸡蛋中的氨苄西林残留量已经低于其残留限量。但是,氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在鸡蛋中的残留量和残留时间均高于氨苄西林原型。因此,考察氨苄西林用药后的残留也需要重点关注氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等代谢物在鸡蛋中的残留情况。

4.2 提取溶剂的选择 氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪在水中难以溶解,但其结构中含羧基基团,易溶于碱性溶液中,可采用乙腈等有机溶剂或碱性溶液来提取基质中的药物。由于鸡蛋组织中含有蛋白质和脂肪等复杂成分,会对检测结果产生基质效应,因此选用的提取溶剂不仅需要能

将鸡蛋中的药物提取完全,也要降低蛋白质和脂肪等基质成分对药物的提取和检测的干扰。

参考国家标准 GB/T 22975 – 2008^[14] 的提取方法,拟采用乙腈 – 水溶液体系来提取鸡蛋中的氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等药物。乙腈对鸡蛋中的蛋白质等具有良好的沉淀效果,随着乙腈用量的提高,分离所得上清液的澄清度越好。经优化,最终确定乙腈: 水(70: 30, V/V)作为提取溶液、高速离心处理、重复提取 2 次的方式提取鸡蛋中的药物。为了降低鸡蛋基质中脂肪等成分的基质干扰,采用 pH 8.0 的磷酸盐缓冲液对浓缩后的乙腈 – 水基质溶液进一步的提取。采用上述提取方法,鸡蛋中氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等药物的回收率均能达到 90% 以上,能满足检测要求。

4.3 净化条件的选择 固相萃取法是常见的净化方式。在前期研究中,本文也比较了 C18、MCX、WCX、HLB 和 SAX 等系列固相萃取小柱对氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的保留效果。结果表明,C18、MCX 和 WCX 等固相萃取小组均不能完全保留三种药物。国家标准 GB/T 22975 – 2008^[14] 中采用 HLB 固相萃取小柱来萃取和净化牛奶和奶粉中的氨苄西林,但是 HLB 固相萃取小柱对氨苄西林酸的保留效果差。SAX 固相萃取小柱是以硅胶为基质的强阴离子交换萃取柱,含有季铵

盐官能团。阳离子态的季铵基团对含羧基等阴离子有机化合物具有较强的选择性保留。与上述四种固相萃取小柱相比,SAX 固相萃取小柱对氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的保留效果均较好,保留率均能达到 95% 以上。因此,优选 SAX 固相萃取小柱进行净化处理。

4.4 淋洗液和洗脱液的选择 在前期研究中,采用纯化水作为淋洗液进行净化处理时,氨苄西林无法被 SAX 固相萃取小柱保留,被大量洗脱。为了保证氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等药物维持阴离子状态,使其有效滞留于 SAX 固相萃取小柱中,本文选用 pH = 8.0 的磷酸盐溶液作为淋洗液。

氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等药物主要通过离子化后滞留于 SAX 固相萃取柱中,洗脱液中需要加入适量的甲酸等有机酸便于其被洗脱和回收。由于氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等药物极性有所区别,也需要选用合适的洗脱液。经验证,甲酸: 甲醇: 水 = 0.04: 1: 9 (V/V/V) 的洗脱液 A 可将氨苄西林和氨苄西林酸洗脱完全,而甲酸: 甲醇 = 0.4: 100 (V/V) 的洗脱液 B 可将氨苄西林二酮哌嗪从 SAX 固相萃取柱上洗脱完全。因此,依次使用上述两种洗脱液,将氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪洗脱回收后,供 UPLC - MS/MS 检测。

4.5 色谱条件的优化 在前期研究中,分别比较了沃特世公司的 ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱和安捷伦公司的 Eclipse Plus C18 色谱柱对氨苄西林、氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪等目标物的分离效果。通过比较发现 ACQUITY UPLC® BEH C18 色谱柱对氨苄西林及其代谢物的保留和分离效果更优。

β - 内酰胺类抗生素的残留分析常使用 0.1% 甲酸水 - 甲醇、0.1% 甲酸水 - 乙腈两种体系流动相^[11-12]。但与乙腈相比,使用甲醇作为流动相时,氨苄西林及其主要代谢物在色谱柱上的保留以及洗脱效果更优。因此,试验选用 0.1% 甲酸水 - 甲醇作为流动相。

本文建立了一种可同时测定鸡蛋中氨苄西林及其主要代谢物氨苄西林酸和氨苄西林二酮哌嗪的超高效液相色谱串联质谱的方法。该方法前处理简便快捷,特异性好,背景干扰少,灵敏度高,能够准确测定鸡蛋中氨苄西林及其主要代谢物的残留量,为鸡蛋的食品质量安全监控提供了重要的技术支持。

参考文献:

- [1] GB31650.1 - 2022. 食品安全国家标准 食品中 41 种兽药最大残留限量[S].
GB31650.1 - 2022. National Food Safety Standard - Maximum residue limits of 41 kinds of veterinary drugs in foods[S].
- [2] Juliana Bazzan Arsand, Rodrigo Barcellos Hoff, Louise Jank, *et al.* Transformation products of amoxicillin and ampicillin after photolysis in aqueous matrices: Identification and kinetics[J]. *Science of the Total Environment*. 2018, (642):954 - 967.
- [3] Connor S C, Everett J R, Jennings K R, *et al.* High Resolution 1H NMR Spectroscopic Studies of the Metabolism and Excretion of Ampicillin in Rats and Amoxycillin in Rats and Man[J]. *Journal of Pharmacy & Pharmacology*. 2011, 46(2):128 - 134.
- [4] 李丽欣. 关于抗生素残留飞行时间质谱分析方法学与青霉素降解规律的研究[D]. 河北:河北大学, 2016.
LI Li - xin. Studies on TOF - MS analysis methodology of antibiotic residues and degradation rule of penicillin[D]. Hebei: Hebei University, 2016.
- [5] 李海蓉. 青霉素过敏反应的原因分析与防范[J]. *中国卫生产业*. 2011, (4):107 - 108.
LI Hai - rong. Analysis and prevention of allergic reactions to penicillin[J]. *China Health Industry*. 2011, (4):107 - 108.
- [6] 乔海灵, 赵永星, 马统勋. 青霉素类抗生素过敏反应机制及诊断的新近研究进展[J]. *国外医药: 抗生素分册*. 2002, (5):197 - 205.
QIAO Hai - ling, ZHAO Yong - xing, MA Tong - xun. Recent research progress in the mechanism and diagnosis of allergic reactions to penicillin antibiotics [J]. *World Notes on Antibiotics*. 2002, (5):197 - 205.
- [7] 王莹. 致敏性青霉素降解物定性免疫分析方法的研究[D]. 天津:天津科技大学, 2014.
WANG Ying. Qualitative Immunoassay for the Determination of Allergic Degradation Product of Benzyl Penicillin[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2014.

- [8] 李文平, 阚鹿枫, 马浩. 微生物法测定鸡肉组织中的氨苄西林残留[J]. 中国兽药杂志. 2004, (9):20-22.
- LI Wen - ping, KAN Lu - feng, MA Hao. Determination of ampicillin residues in chicken muscle tissues with microbiological method[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug. 2004, (9): 20-22.
- [9] 吴瑕, 邵辉, 王鑫, 等. 试管扩散法检测牛乳中 β -酰胺类抗生素残留研究[J]. 东北农业大学学报. 2011, (5): 31-35.
- WU Xia, SHAO Hui, WANG Xin, *et al.* Method of tube diffusion test detecting β -lactam antibiotics residue in raw milk [J]. Journal of Northeast Agricultural University. 2011, (5): 31-35.
- [10] Yang Tian, Yue Wang, Shanshan Wu, *et al.* Preparation of Ampicillin Surface Molecularly Imprinted Polymers for Its Selective Recognition of Ampicillin in Eggs Samples [J]. International Journal of Analytical Chemistry. 2018, 2018:1-11
- [11] 王波, 张杨杨, 谢恺舟, 等. 氨苄西林在鸡排泄物中的残留消除规律[J]. 中国兽药杂志. 2016, (6):33-38.
- WANG Bo, ZHANG Yang - yang, XIE Kai - zhou, *et al.* Ampicillin Residue Depletion in Chicken Excrement [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug. 2016, (6):33-38.
- [12] 路杨, 王丽英, 秦振顺, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中4种 β -内酰胺类抗生素及其主要代谢产物[J]. 食品安全质量检测学报. 2021, 12(05):1662-1668.
- Lu Yang, Wang Li - ying, Qin Zhen - shun, *et al.* Determination of 4 kinds of β -lactam antibiotics and their main metabolites in milk by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety and Quality. 2021, 12(05):1662-1668.
- [13] GB31650-2019. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S].
- GB31650-2019. National Food Safety Standard - Maximum residue limits of veterinary drugs in foods[S]
- [14] GB/T 22975-2008. 牛奶和奶粉中阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素G、青霉素V、苯唑西林、氯唑西林、羧夫西林和双氯西林残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- GB/T 22975-2008. Determination of amoxicillin, ampicillin, piperacillin, penicillin G, penicillin V, oxacillin, cloxacillin, naftacillin and dicloxacillin residues in milk and milk powder by HPLC-MS/MS[S].

(编辑:侯向辉)