

快速高分离液相色谱-串联质谱法检测 原乳中活性 β -内酰胺酶

孙汉文^{*1} 李挥^{1,2} 张敬轩² 周正²

¹ (河北省分析科学重点实验室 河北大学化学与环境科学学院,保定 071002)

² (河北省食品质量监督检验研究院,石家庄 050051)

摘 要 建立了原乳中活性 β -内酰胺酶拮抗剂的快速高分离液相色谱-串联质谱 (RRLC-MS/MS) 检测方法。利用活性 β -内酰胺酶能够酶解青霉素族药物的特性,在原乳中加入适量氨苄青霉素,酶解 1 h 后,检测原乳中氨苄青霉素酶解率,定性检测活性目标物。试样中氨苄青霉素经乙腈溶液提取,HLB 固相萃取柱净化和浓缩后,RRLC-MS/MS 多反应监测模式定性定量分析。本方法对活性 β -内酰胺酶检出限为 4 U/mL;对原乳中添加 1 mg/kg 水平氨苄青霉素的加标回收率为 92.3% ~ 95.5%;相对标准偏差 $RSD \leq 10\%$ ($n=6$)。本方法的定性结果与生物杯碟法完全一致。

关键词 液相色谱-串联质谱;原乳; β -内酰胺酶

1 引言

牛奶中残存抗生素药物问题受到普遍关注。各国政府对超过一定限量抗生素的原料乳实施标准控制^[1]。但为谋求私利,仍存在使用生物制剂(即 β -内酰胺酶)降解牛乳中残留的抗生素,生产人造“无抗奶”的违法行为。 β -内酰胺酶使细菌通过水解内酰胺环而抵抗抗生素的攻击,使人体产生耐药性^[2]。

目前, β -内酰胺酶的检测方法主要有微生物杯碟法、快速试剂盒法^[3,4]、液相色谱法和双流向酶联免疫法^[5]。杯碟法仅适用于舒巴坦敏感的活性 β -内酰胺酶的定性判定,且检测时间较长,需培养 20 h 左右,满足企业对原乳收购的时限性要求;快速试剂盒法和双流向酶联免疫法检测速度快、操作简便、灵敏度高,双流向酶联免疫法检出限为 0.0005 和 0.001 U/mL^[5],由于易出现“假阳性”情况;液相色谱法检测抗生素灵敏度低、定性不准确。本研究采用快速高分离液相色谱-质谱/质谱 (RRLC-MS/MS) 法测定原乳中活性 β -内酰胺酶,具有操作时间短、灵敏度高、准确的优点,可以作为开展仲裁检验的依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

1200-6410A MS/MS 快速高分离液相色谱-三重四级杆串联质谱仪 (Rapid Resolution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, 美国 AGLENT 公司); R-210 旋转蒸发仪 (瑞士 BUCHI 公司); AL104 万分之一分析天平 (法国 METTLER 公司);固相萃取装置 (美国 AGLENT 公司),配 Oasis HLB 固相萃取柱 (500 mg, 6 mL, 美国 WATERS 公司); CR22G 高速冷冻离心机 (日本 HITACHI 公司)。

β -内酰胺酶标准物质 (Sigma 公司);氨苄青霉素标准品 (中国药品生物制品检定所);甲醇与乙腈 (色谱纯),磷酸二氢钾和乙酸铵 (分析纯);实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 氨苄青霉素的加入与酶解

称取 10 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 0.1 mL 氨苄青霉素标准储备液 (100 mg/L),混匀。在 37 °C 恒温水浴中酶解 1 h。同时进行不添加氨苄青霉素的空白实验。

2.3 样品前处理

酶解后样品,加入 20 mL 乙腈,均质提取 30 s,以 4000 r/min 低温冷冻离心 5 min,上清液转至

2009-09-17 收稿;2010-01-06 接受

本文系河北省科技支撑项目基金 (Nos 09227114D, 09227134D) 资助项目

* E-mail: hanwen@hbu.edu.cn

50 mL 离心管,用乙腈-水 (15:2, V/V)定容至 50 mL。转至鸡心瓶于旋转蒸发器上蒸发去除乙腈。加入 25 mL 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L),用 0.1 mol/L NaOH 调节至 pH 8.5。转至分别用 2 mL 甲醇和 1 mL 水淋洗的 HLB 固相萃取柱,用 2 mL 磷酸盐缓冲液 (0.05 mol/L)淋洗两次,再用 1 mL 水淋洗,然后用 3 mL 乙腈洗脱,洗脱液于 45℃ 氮气吹干,以 0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液定容至 1 mL,过 0.22 μ m 滤膜,供 RRLC-MS/MS 分析。

2.4 RRLC-MS/MS 分析条件

色谱条件:ODS-C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相 A 为 0.01 mol/L 乙酸铵 (甲酸调至 pH 4.5),流动相 B 为乙腈, V(A):V(B) = 90:10;流速 1.0 mL/min;进样量 10 μ L。保留时间 2.109 min。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源;扫描方式为正离子扫描;检测方式为多反应监测 (MRM);离子源温度 350℃;毛细管电压 4 kV;雾化气压力 0.055 MPa;干燥气流速 10 L/min;定性离子对 m/z 350/192, 350/160;定量离子对 m/z 350/160;碰撞气能量 10 eV;碰撞电压 120 V。

3 结果与讨论

3.1 青霉素组药物的选择

考察了青霉素 V、青霉素 G、氨苄青霉素、邻氯青霉素、苯唑青霉素和甲氧苄青霉素的自然降解率、RRLC-MS/MS 分析灵敏度和稳定性。结果表明,氨苄青霉素自然降解率低,分析灵敏度高,稳定性好。

3.2 实验条件和参数的优化

3.2.1 酶解时间的选择 选择 4, 10 和 100 U/mL 酶活性, 37℃ 酶解温度,选择 15, 30, 60, 90, 120 和 180 min 作为酶解时间设计正交实验,计算氨苄青霉素的降解率。结果表明,不同活性 β -内酰胺酶在 1 和 3 h 的酶解率基本一致。因此,酶解时间选择 1 h。

3.2.2 提取条件的选择 参考文献 [6~8],以乙腈、15% 甲醇-乙腈和 0.5% 乙酸溶液为提取液,考察回收率、重现性和基质干扰情况。结果表明,以乙腈提取,回收率高,脂肪等基质干扰少。

3.2.3 净化条件的选择 考虑到目标物的特性和基质成分组成,选择弱、中极性填料的固相萃取柱 C₁₈、XAD-2 和 HLB3,并考察了回收率。结果表明:以 HLB 柱净化,回收率最高。

3.2.4 RRLC-MS/MS 条件的选择 以 0.1% 甲酸-乙腈、乙酸铵-乙腈、0.1% NH₃·H₂O-乙腈为流动相,并调节流动相比比例。乙酸铵-乙腈可有效改善目标物的峰形,分析速度快,在 2.11 min 出峰 (色谱图略)。比较了正离子和负离子模式下的质谱结果。在正离子模式下进行母离子全扫描确定分子离子,并对电离电压、碰撞能量、离子源温度和碰撞气温度等参数进行优化,选择强且稳定的子离子进行检测,其 MS/MS 图见图 1。

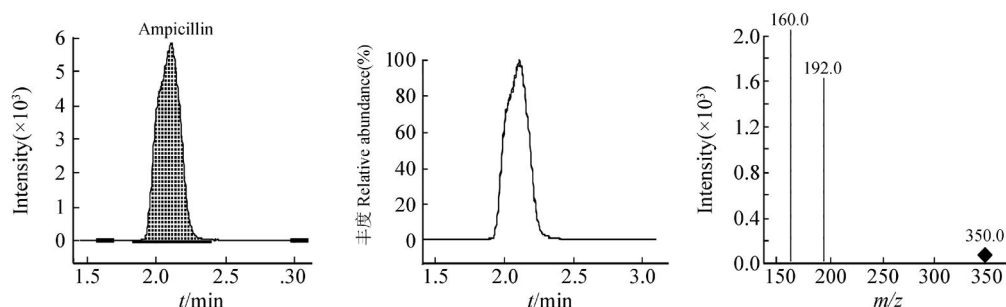


图 1 氨苄青霉素的二级质谱图

Fig 1 MS/MS spectra of ampicillin

3.3 方法的检出限与定性判定

参考本方法中原乳内氨苄青霉素的添加水平 (1 mg/kg),分别加入 1, 2, 4, 6, 8, 10 和 20 U/mL β -内酰胺酶,按本法进行测定,计算加入氨苄青霉素的酶解率。在添加水平大于 4 U/mL 时,酶解率 $\geq$ 50%,有显著变化。因此,本方法检出限定为 4 U/mL。

当添加的氨苄青霉素酶解率 $\geq$ 50%,原乳中 β -内酰胺酶为阳性。

3 4 标准加入的回收率和方法验证

选取 7 份不含抗生素和内酰胺酶的空白原乳样品,分别按本方法规定的添加水平 (1 mg/kg)加入 氨苄青霉素标准储备液,测定结果见表 1。回收率在 92.3%~95.5%之间;RSD 均小于 10%。

表 1 样品中氨苄青霉素的加标回收率和精密度

Table 1 Recovery and precision for the determination of ampicillin in samples

样品号 Samples No	回收率 Recovery(%, n=6)	精密度 RSD(%, n=6)	样品号 Samples No	回收率 Recovery(%, n=6)	精密度 RSD(%, n=6)
1	95.5	7.7	5	94.8	6.9
2	93.6	6.5	6	93.9	6.6
3	92.3	8.1	7	93.1	5.4
4	94.1	5.4			

本方法用于含 0, 4, 10 和 100 U/mL β 内酰胺酶的模拟原乳样品的检测,不含 β 内酰胺酶样品的酶解率为 2.4%,判为阴性样品;不含 β 内酰胺酶样品的酶解率为 53.7%,其余酶解率均为 100%,判为阳性样品;不含 β 内酰胺酶样品的抑菌圈半径为 0 mm,判为阴性;含 4 U/mL β 内酰胺酶样品的抑菌圈差异大于 3 mm,其余均大于 5 mm,判为阳性。本方法定性结果与杯碟法完全一致。

References

1 NY 5045-2008, China Standard of Agriculture (中华人民共和国农业行业标准)——Pollution-free Food Fresh Milk《无公害食品生鲜牛乳》

2 LI Jing (李静). Chinese Journal of Medical Laboratory Technology (中国医学检验杂志), 2008, 9(2): 117~120

3 CUI Sheng-Hui (崔生辉), LI Jing-Yun (李景云), MA Yue (马越). Chinese Journal of Food Hygiene (中国食品卫生杂志), 2007, 19(2): 113~116

4 Cui S H, Li J Y, Hu C Q. Journal of AOAC International, 2007, 90(4): 1128~1130

5 HAN Yi-Yi (韩奕奕), WANG Jian-Jun (王建军), MENG Jin (孟瑾). Chinese Milk Cow (中国奶牛), 2009, (6): 46~48

6 Holstege D M, Puschner G B, Whitenead G, Galey F D. J. Agric Food Chem., 2002, 50: 406~411

7 HUANG Bai-Fen (黄百芬), REN Yi-Ping (任一平), CAI Zeng-Xuan (蔡增轩), MO Yan-Xia (莫燕霞). Chinese Journal of Food Hygiene (中国食品卫生杂志), 2007, 19(1): 31~35

8 Richard S, Stadler R H. Anal. Chem., 2001, 73(7): 1614~1621

Qualitative Analysis of Active Beta-Lactamases in Milk Samples
by Rapid Resolution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

SUN Han-Wen^{*1}, LI Hui^{1,2}, ZHANG Jing-Xuan², ZHOU Zheng²

¹ (Key Laboratory of Analytical Science of Hebei, College of Chemistry and Environmental Science,
Hebei University, Baoding 071002)

² (Hebei Institute of Food Quality Supervision Inspection and Research, Shijiazhuang 050051)

Abstract A rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometric method (RRLC-MS/MS) has been developed for the qualitative analysis of active beta-lactamases in milk samples. Penicillin was added to the samples solution to enzymolyze the active beta-lactamases. Then, the analytes were extracted by CH₃CN-H₂O from homogenized samples, and the extract was cleaned by Oasis HLB solid phase extraction cartridge. Quantification of penicillin was achieved by RRLC-MS/MS with multiple reaction monitoring. Detection limit of active beta-lactamases was 4 U/mL, the mean recoveries were in the range of 92.3% - 95.5%, and the RSD was less than 10% (n=6). The results of this method were consistent with these by the cylinder plate method.

Keywords Rapid resolution liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Milk; β -Lactamases

(Received 17 September 2009; accepted 27 January 2010)