

超高效液相色谱-串联质谱测定尿中 14 种 β -内酰胺类抗生素残留

李宏亮, 闵巍, 郑磊, 詹铭, 郝莉鹏

上海市浦东新区疾病预防控制中心/复旦大学浦东预防医学研究院, 上海 200136

摘要: **目的** 建立测定尿液中 14 种 β -内酰胺类抗生素残留的超高效液相色谱-串联质谱分析方法。 **方法** 尿液经酶解后, Oasis PRiME HLB (200 mg, 6 ml) 固相萃取柱净化, 采用 Waters BEH C18 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m), 0.01 mol/L 乙酸铵的水-甲醇作为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾离子源电离, 正离子扫描, 多反应监测模式进行定性和定量分析。 **结果** 阿莫西林和头孢曲松的线性范围为 10~1 000 ng/ml, 其余 12 种 β -内酰胺类抗生素为 5~1 000 ng/ml, 相关系数均大于 0.99。阿莫西林和头孢曲松的定量限为 10 ng/ml, 其余的方法定量下限为 5 ng/ml, 检出限为 0.5~2.9 ng/ml, 3 个加标水平下的回收率为 79.8%~97.9%, 相对标准偏差为 2.1%~11.9%。 **结论** 该方法操作简便、具有较高的灵敏度、特异度和精确性, 适用于尿中痕量 14 种 β -内酰胺类抗生素残留量的测定。

关键词: β -内酰胺类抗生素; 尿; 超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号: R978.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2021)10-1194-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2021.10.011

Determination of 14 β -lactam antibiotics residues in human urine by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

LI Hong-liang, MIN Wei, ZHENG Lei, ZHAN Ming, HAO Li-peng

Pudong New Area Center for Disease Control and Prevention/Pudong Institute of Preventive Medicine, Fudan University, Shanghai 200136, China

Corresponding author: HAO Li-peng, E-mail: lphao@pdcde.sh.cn

Abstract: **Objective** A confirmative method was developed to detect 14 β -lactam antibiotics residues in human urine by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Urine samples were analyzed following incubation with β -glucuronidase, and then purified with an Oasis PRiME HLB (200 mg, 6 ml) solid-phase extraction (SPE) cartridge. The UPLC separation was performed on an Waters BEH C18 column (2.1 \times 100 mm, 1.7 μ m) utilizing a gradient elution program of methanol (containing 0.01 mol/L ammonium acetate) and water (containing 0.01 mol/L ammonium acetate) as the mobile phase. Identification and quantification were achieved using electrospray ionization (ESI) in positive mode with multiple reaction monitoring (MRM). **Results** Good linearities of amoxicillin and ceftriaxone were achieved over the concentration of 10~1,000 ng/ml, and other 12 analytes were 5~1,000 ng/ml, with the correlation coefficients being above 0.99. The method quantitation limits (MQL) for amoxicillin and ceftriaxone were 10 ng/ml, and for other target compounds were 5 ng/ml. The detection limits of the method were 0.5~2.9 ng/ml. Average recoveries of analytes at three spiked levels ranged from 79.8% to 97.9%, with relative standard deviations (RSDs) of 2.1%~11.9%. **Conclusion** This method is of simple operation, high sensitivity, specificity and precision, and it is applicable to the determination of 14 β -lactam antibiotics residues in human urine.

Keywords: β -lactam antibiotic; urine; ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry

内酰胺类抗生素是目前生产和使用最多的抗生素种类之一, 每年产生大量的制药废水, 并且我国是世界上最大的 β -内酰胺类抗生素原料药生产国, 因此在不同的环境基质中都能检出其残留, 具有潜在的环境风

基金项目: 上海市浦东新区卫生和计划生育委员会科技发展专项基金资助 (PW2016A-11)

作者简介: 李宏亮 (1981-), 男, 山西人, 硕士, 副主任技师, 主要从事理化检验与研究工作。

通信作者: 郝莉鹏, E-mail: lphao@pdcde.sh.cn。

险^[1]。另外, β -内酰胺类药物的半衰期比较短, 但是它们被频繁地使用, 在进入环境后导致环境中 β -内酰胺类药物的“假持续”现象, 对人体健康及生态系统构成了长期的潜在风险。近年来对抗生素在环境中的残留及转归现状研究报道较多^[2-4], 而对体内抗生素的暴露状况及对人群健康影响的研究开展不多^[5], 且缺乏相应的生物监测技术来测量人体内抗生素的内暴露剂量^[6-7], 因此急需研究建立生物样本中 β -内酰胺类抗生素的检测方法。但目前 β -内酰胺类抗生素检测

的研究报道主要集中在环境样品^[8]和食品样品^[9],方法主要是高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, HPLC/MS/MS)^[10-11],有关尿液中β-内酰胺类抗生素残留的检测方法报道很少。

本研究采用固相萃取技术结合超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS),建立了检测人体尿液中 14 种β-内酰胺类抗生素的分析方法,为进一步研究β-内酰胺类抗生素的污染现状、暴露特征及评价其对人群的潜在危害,提供了有效的技术保障。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱仪 UPLC、XEVO-TQD四极杆串联质谱仪、BEH C18 色谱柱(美国 Waters公司);Oasis PRiME HLB(200 mg,6 ml)固相萃取柱(美国 Waters 公司);EXTRA 全自动固相萃取仪(上海屹尧仪器科技发展有限公司);超纯水仪(美国 Millipore公司);HMS-350 振荡器(天津恒奥科技发展有限公司);水浴氮吹仪(美国 Organomation 公司);HWS-26 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

甲醇、乙酸铵、乙腈(德国 Merck 公司);均为色谱纯;磷酸二氢钾、无水硫酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司);均为分析纯,用于配置 pH=6.5 磷酸盐缓冲溶液;β-葡糖苷酸酶:含β-葡糖苷酸酶≥100 000 单位/ml(美国 Sigma 公司);β-内酰胺类抗菌药物标准:青霉素 V (penicillin V 87-08-1),青霉素 G (penicillin G 61-33-6),苯唑西林(钠盐 oxacillin sodium salt 1173-88-2),氨苄西林(ampicillin 69-53-4),哌拉西林(piperacillin 61477-96-1),阿莫西林(amoxicillin 26787-78-0),邻氯青霉素(氯唑西林 clocxacillin 61-72-3),头孢唑林(cefazolin 25953-19-9),头孢拉定(cephradine 38821-53-3),头孢氨苄(cephalexin 15686-71-2),头孢曲松(ceftriaxone 733 84-59-5),头孢他啶(ceftazidime 72558-82-8),头孢噻肟(头孢噻肟酸 cefotaxime 63527-52-6),头孢克肟(cefixime 79350-37-1)(均为固体)(天津阿尔塔公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 液相色谱条件 色谱柱:Waters BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm);流动相:母液, 1 mol/L乙酸铵溶液 pH=5;A:母液稀释 100 倍的水溶

液;B:母液稀释 100 倍的甲醇溶液;梯度洗脱:0~0.2 min,2% B;0.2~12.2 min,2% B 升至 99% B;12.2~12.21 min,99% B 到 2% B;12.21~14 min,2% B,流速:0.45 ml/min,柱温:35℃,进样量:10 μl。

1.2.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源,正离子模式(electrospray ionization in positive mode, ESI+),采集方式:多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM),毛细管电压:3.0 kV,离子源温度:150℃,脱溶剂气温度:600℃,脱溶剂气流速:1 000 L/h,锥孔气:50 L/h,MRM 条件见表 1。

表 1 14 种β-内酰胺类化合物的 MRM 方法参数及参考保留时间

抗生素	保留时间(min)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压(v)	碰撞能量(ev)
头孢克肟	2.05	453.9	284.9 ^a ,125.9	44	38,14
头孢他啶	2.09	546.9	467.9 ^a ,167.0	34	28,12
阿莫西林	2.17	366.1	113.8 ^a ,207.9	26	18,10
头孢曲松	2.26	554.9	395.8 ^a ,125.0	32	12,64
头孢噻肟	3.48	455.9	125.0 ^a ,395.9	38	56,10
头孢唑林	3.50	454.9	322.8 ^a ,155.9	24	12,14
头孢氨苄	3.86	347.9	157.9 ^a ,105.9	30	34,8
氨苄西林	4.15	250.0	105.9 ^a ,173.9	36	16,12
头孢拉定	4.22	350.0	175.9 ^a ,157.9	26	8,12
青霉素 G	5.49	334.9	159.9 ^a ,175.9	30	12,12
哌拉西林	5.73	518.0	143.0 ^a ,159.9	40	18,22
青霉素 V	6.15	350.9	159.9 ^a ,113.9	32	32,12
苯唑西林	6.35	401.9	159.9 ^a ,242.9	32	16,12
氯唑西林	6.70	435.9	276.9 ^a ,159.9	32	12,18

注:a 为定量离子。

1.2.3 样品前处理

1.2.3.1 酶消解提取 准确量取尿样 1.00 ml,再加入磷酸盐缓冲溶液 0.5 ml(pH=6.5)、β-葡糖苷酸酶 10 μl,然后震荡混匀,恒温 37℃水浴 12 h 以上。

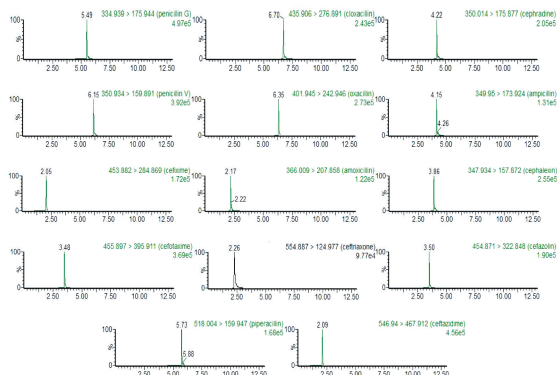
1.2.3.2 固相萃取净化 在提取液中加 4 ml 乙腈漩涡震荡萃取 1 min,超声萃取 3 min,5 000 r/min 离心 5 min。取上清液直接转入 Oasis PRiME HLB(200 mg、6 ml)固相萃取柱,小柱无需活化和平衡,流速为 1.0 ml/min,用 4 ml 乙腈以 1.0 ml/min 洗脱,收集上述全部流出液,氮气吹至近干,用液相流动相(A 液:B 液为 9:1)定容至 1.0 ml,漩涡混匀后,过 0.22 μm 滤膜,上机测定。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱-质谱条件的优化

2.1.1 液相色谱条件的优化 分别考察了常用的溶剂水、甲醇、乙腈,添加甲酸或乙酸铵后不同配比的流动相体系,及其梯度,对 β -内酰胺类抗生素离子化及分离度的影响,结果表明,含 0.01 mol/L 乙酸铵的甲醇和 0.01 mol/L 乙酸铵的水作为流动相,以优化好的梯度洗脱条件,14 种 β -内酰胺类抗生素可以获得良好的分离效果及质谱响应,各组分保留时间见表 1。

2.1.2 质谱条件的优化 14 种 β -内酰胺类抗生素在 ESI 源的正离子化模式下电离,均可获得较高丰度的 $[M+H]^+$ 母离子。在 ESI+ 模式下分别对 14 种抗生素的单标准溶液采用仪器工作站 Masslynx 附带的 MS Tune 及 Intellistart 方式进行质谱条件的优化,14 种组分的定量和定性离子及相应的质谱参数见表 1,加标样品的 MRM 色谱图见图 1。



注:图中右上角括号内为所检测的化合物,分别是青霉素 G (penicillin G),邻氯青霉素 (cloxacillin),头孢拉定 (cephradine),青霉素 V (penicillin V),苯唑西林 (oxacillin),氨苄西林 (ampicillin),头孢克肟 (cefixime),阿莫西林 (amoxicillin),头孢氨苄 (cephalexin),头孢噻肟 (cefotaxime),头孢曲松 (ceftriaxone),头孢唑林 (cefazolin),哌拉西林 (piperacillin),头孢他啶 (ceftazidime)。

图 1 加标浓度为 100 ng/ml 的 14 种 β -内酰胺类药物的 MRM 色谱图

2.2 提取条件的优化 由于尿液中 β -内酰胺类抗生素与葡萄糖醛酸结合形成葡萄糖醛酸甾级合物,所以尿样需经酶水解处理,使 β -内酰胺类抗生素释放游离后再行提取。分别试验考察了 β -葡萄糖苷酸酶水解尿样时,所需时间、温度、酶的用量及溶液 pH 等条件的影响,发现在水浴 37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH=6.5 环境中,加入 β -葡萄糖苷酸酶 10 μl 水解尿样 12 h 以上,尿液样品中 14 种 β -内酰胺类抗生素可以最大程度释放。

2.3 固相萃取条件优化 按照之前磺胺类抗生素的固相萃取程序^[12]处理 β -内酰胺类抗生素的空白加标样。调节样品 pH=2,然后加入 20 mg 乙二胺四乙酸二钠,混匀,经 Oasis PRiME HLB (200 mg、6 ml) 固相萃取柱净化,甲醇洗脱,用液相流动相定容后上机。结

果发现,头孢氨苄、头孢拉定和头孢噻肟 4 种抗生素的回收率为 50% 左右,氨苄西林约 20%,其他 10 种抗生素回收率都低于 10%,可见之前的固相萃取方法不适合 β -内酰胺类抗生素的检测。

根据 β -内酰胺类抗生素的理化性质,修改前处理方法,应用乙腈溶剂超声提取尿样中 β -内酰胺类抗生素,离心取上清液过固相萃取柱,用乙腈洗脱,收集上述全部流出液,上机测定,结果发现,青霉素 G、苯唑西林、氯唑西林、头孢克肟、头孢噻肟、哌拉西林、头孢他啶、头孢曲松等 10 个组分的回收率为 80% 以上,头孢氨苄、氨苄西林、头孢拉定、青霉素 V 等 4 个组分的回收率也明显高于之前方法的回收率,但是阿莫西林和头孢唑林的回收率大于 150%,基质效应的影响很大,为此配置了基质曲线,对加标样品重新校正,14 个组分的回收率均大于 75%。

实验发现,固相萃取有以下几个关键影响因素:①样品提取溶剂及固相萃取洗脱溶剂—乙腈,乙腈提取尿中 14 种 β -内酰胺类抗生素效果较好,而且样品过固相萃取小柱后也需使用乙腈洗脱;②样品上样流速及固相萃取洗脱流速—1.0 ml/min,流速对样品抗生素的回收率影响较大,样品上样流速太快,抗生素无法吸附在小柱上,回收率低,太慢样品处理效率低,固相萃取洗脱流速太快的话,乙腈溶剂无法将吸附在固相萃取小柱上的抗生素洗脱下来,经试验发现,样品上样流速及固相萃取洗脱流速为 1.0 ml/min 时,14 种 β -内酰胺类抗生素的回收率较高;③收集的流出液,氮气吹至近干,氮吹时须特别注意,不能太干,必须管壁湿润,如果太干,样品的回收率很差。

2.4 线性范围、检出限、定量限及定性确认 分别取 14 种 β -内酰胺类抗生素标准,用空白样品提取液配制浓度为 0、5、10、50、100、500、1 000 ng/ml 的基质混合标准工作溶液,用峰面积对标准溶液中各被测组分的浓度绘制工作曲线。结果表明,阿莫西林和头孢曲松浓度在 10~1 000 ng/ml 范围内,其余 12 种抗生素浓度在 5~1 000 ng/ml 范围内时,线性关系良好,其相关系数 r 均大于 0.99。空白样品阿莫西林和头孢曲松的加标质量浓度为 10 ng/ml,其余 12 种抗生素的加标质量浓度为 5 ng/ml 时,14 种抗生素的信噪比均大于 10,且 14 种抗生素均具有较好的回收率,故确定阿莫西林和头孢曲松的定量限为 10 ng/ml,其余 12 种抗生素的定量限为 5 ng/ml;以信噪比为 3 估算检出限,14 种抗生素的检出限为 0.5~2.9 ng/ml,结果见表 2。定性确认需计算各组分的定量离子与定性离子的离子比,通过比对样品和标准的离子比来确认是否是所测

抗生素。

表 2 14 种 β -内酰胺类抗生素的回收率、精密度和检出限($n=6$)

抗生素	加标量 (ng/ml)	回收率 (%)	相对标准偏差 (%)	检出限 (ng/ml)
头孢克肟	10	87.5	4.2	0.9
	100	89.3	6.4	
	500	92.1	3.9	
头孢他啶	10	86.7	4.0	1.0
	100	90.1	4.9	
	500	93.9	3.0	
阿莫西林	10	82.3	4.2	2.9
	100	92.9	3.9	
	500	91.1	2.8	
头孢曲松	10	81.8	3.4	1.8
	100	97.9	3.7	
	500	90.0	2.6	
头孢噻肟	10	81.7	2.8	1.0
	100	81.9	8.3	
	500	92.9	7.1	
头孢唑林	10	80.8	4.9	0.9
	100	88.6	5.2	
	500	93.3	6.9	
头孢氨苄	10	83.1	11.7	0.8
	100	85.3	9.6	
	500	90.2	5.8	
氨苄西林	10	89.2	9.7	0.5
	100	97.1	8.1	
	500	93.1	4.2	
头孢拉定	10	88.3	11.9	1.1
	100	92.4	7.7	
	500	90.1	3.6	
青霉素 G	10	87.8	9.0	1.2
	100	97.3	5.6	
	500	96.0	3.8	
哌拉西林	10	79.8	6.8	0.6
	100	89.9	4.3	
	500	91.7	2.9	
青霉素 V	10	81.2	6.4	0.8
	100	88.6	4.2	
	500	91.5	4.1	
苯唑西林	10	90.2	5.8	0.5
	100	92.3	2.6	
	500	92.8	2.1	
氯唑西林	10	81.2	7.6	0.9
	100	89.0	4.5	
	500	91.0	3.3	

2.5 回收率和精密度 采集母乳喂养的新生儿尿液,分别添加 10、100 和 500 ng/ml 的 14 种 β -内酰胺类抗生素混合标准溶液,按前述的方法处理样品,液相色谱-质谱测定并计算其回收率和精密度,结果见表 2,3 个加标水平下的回收率为 79.8%~97.9%,相对标准偏差为 2.1%~11.9%。

2.6 实际样品验证 选取某小学的 30 名学生,使用 50 ml 洁净的聚丙烯离心管,收集学生 30 ml 左右的尿一份,之后立即避光冷藏,尽快运输至实验室在-80 ℃避光条件下保存。检测采集的尿样时,先解冻到室温,测定 30 份尿液比重,结果在 1.010~1.028 之间,符合

人群尿比重的波动范围(1.003~1.030)。按照前述的方法检测尿样中 14 种 β -内酰胺类抗生素,同时本研究使用尿比重对结果校正(以尿液比重 1.020 为标准)。结果发现,30 名学生中 6 名有检出,14 种抗生素中检出头孢克肟和头孢氨苄,其中有 2 名学生 2 种抗生素都有检出。6 名学生检出的抗生素浓度为 2.5~200.1 ng/ml,其中头孢克肟检出浓度最高。

3 小 结

本研究建立了同时测定尿液中 14 种 β -内酰胺类抗生素残留的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱的分析方法。检测方法的精密度和准确度较高,定性确证准确,且实验步骤较简单、快速,适用于尿中痕量 β -内酰胺类抗生素残留量的测定。

参考文献

[1] 张昱,冯皓迪,唐妹,等. β -内酰胺类抗生素的环境行为与制药行业源头控制技术研究进展[J].环境工程学报,2020,14(8):1993-2010.

[2] 魏志雄,刘丹丹,蓝明雄,等. 东江东莞城区段水体中抗生素的含量与污染特征研究[J]. 实用预防医学,2020,27(1):42-45.

[3] 李文最,陈高水,郑艳影,等. 闽江流域福州段水体中抗生素残留污染调查[J]. 实用预防医学,2018,25(12):1455-1458.

[4] Lin YC, Tsai YT. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters; impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities[J]. Sci Total Environ, 2009, 407(12):3793-3802.

[5] Wang H, Wang B, Zhao Q, et al. Antibiotic body burden of Chinese school children: a multisite biomonitoring-based study[J]. Environ Sci Technol, 2015,49(8):5070-5079.

[6] Tuerk J,Reinders M,Dennis D,et al. Analysis of antibiotics in urine and wipe sample from environmental and biological monitoring-comparison of HPLC with UV-, single MS-and tandem MS-detection[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 831(1):72-80.

[7] Cazorla-Reyes R, Romero-González R, Frenich AG, et al. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 89:203-212.

[8] 孙文芳,刘祥萍,袁金华. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水源水中 6 种 β -内酰胺类抗生素的方法优化[J]. 环境与职业医学, 2019,36(5):501-505.

[9] 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,2018,39(9):284-287.

[10] 何欣,聂晓静,赵红霞,等. SPE-LC-MS/MS 同时测定水中 9 种 β -内酰胺类抗生素[J]. 环境科学与技术,2018,41(2):128-132.

[11] 朱峰,吉文亮,阮丽萍,等.高效液相色谱-质谱联用法同时检测水体中 13 种 β -内酰胺类药物残留[J].色谱,2016,34(3):299-305.

[12] 李宏亮,詹铭,郝莉鹏. 尿中十六种磺胺类抗菌药物残留量液相色谱串联质谱法测定[J]. 中国公共卫生,2019,35(7):918-921.

收稿日期:2020-11-25