

论著

LC-MS/MS 测定牛奶中六种青霉素类抗生素残留

黄百芬¹ 任一平¹ 蔡增轩¹ 莫燕霞²

(1. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江工业大学, 浙江 杭州 310019)

摘要:目的 建立一种用 LC-MS/MS 快速测定牛奶中 6 种青霉素类抗生素残留的方法。方法 选择青霉素 G-D7 为内标, 样品经乙腈沉淀蛋白, SPE 柱净化、浓缩, 有效地去除杂质。经高效液相色谱 C₁₈ 柱分离, 选用含 0.1% 甲酸的水和乙腈作流动相, 在 26 min 内, 在线梯度洗脱将 6 种青霉素类抗生素得以分离。结果 方法检出限为青霉素 G 0.02 ng/ml、青霉素 V 0.06 ng/ml、苯唑西林 0.04 ng/ml、氯唑西林 0.11 ng/ml、奈夫西林 0.02 ng/ml、双氯唑西林 0.19 ng/ml, 在 0.2~2.0 ng/ml 线性范围内, 相关系数 r 为 0.991, 回收率大于 90%, 方法精密度的 RSD 为 4.87%。结论 该方法准确可靠, 重复性好, 灵敏度高。适用于牛奶中多组分 - 内酰胺类抗生素的确认和准确定量检测, 能满足各国对上述 - 内酰胺类抗生素的最低检出要求。

关键词: 乳制品; 青霉素类; 液相色谱-电喷雾串联质谱; 药物残留物

Residue Analysis of Six Penicillins in Milk by LC-MS/MS

HUANG Bai-fen, REN Yi-ping, CAI Zeng-xuan, MO Yan-xia

(Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Zhejiang Hangzhou 310009, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the detection of 6 penicillins residues in milk. **Method** The extracts were separated and detected by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Mass spectral acquisition was done in the positive ion mode by multiple reaction monitoring (MRM). The sample was cleaned-up and concentrated by SPE in a HLB column. The chromatography was performed by reversed-phase HPLC in a C₁₈ column with MRM detection. The mobile phase was acetonitrile (0.1% formic acid) - water (0.1% formic acid). **Results** The correlation coefficient was 0.991 within the linear range 0.2~2.0 ng/ml. The average recovery was above 90%, with RSD = 4.87% ($n = 6$). **Conclusion** The method is sensitive, specific and easy for detecting penicillins residues in milk.

Key word: LC-MS/MS; - Lactam residues, milk

目前关于反式脂肪酸对健康产生不利影响的报道已经很多。特别是丹麦关于限制高含量反式脂肪酸食物的法律已经实施, 这对国内学术界和相关管理部门有很大震动。但是反式脂肪酸类型有多种, 且对健康的影响也存在差异。学术界在这方面应为公众提供更多更准确的信息, 同时也使管理部门在制定有关食品法规时能够更加科学。

参考文献

- [1] GURR M I. Trans fatty acids: metabolic and nutritional significance [J]. Int, Dairy Fed Doc, 1983, 166:5-17.
- [2] OVESEN L, LEITH T. Trans fatty acids: time for legislative action? [J]. Nutr Food Sci, 1995, 3:16-19.
- [3] REPORT OF THE EXPERT PANEL ON TRANS FATTY ACIDS AND CORONARY HEART DISEASE. Trans Fatty Acids and Coronary
- Heart Disease Risk [J]. Am J Clin Nutr, 1995, 62:655-708.
- [4] 沈治平, 王光亚, 范文洵, 等. 食物营养成分测定法 [M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [5] GB/T 17376—1998. 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备 [S].
- [6] ISO(2002) 15304. Animal and vegetable fats and oils-determination of the content of trans fatty acid isomers of vegetable fats and oils - Gas chromatographic method [Z].
- [7] TLETH, L OVESEN, K HANSEN. Fatty acids composition of meat from ruminants, with special emphasis on trans fatty acids [J]. JAOCS, 1998, 75(8): 1001-1005.
- [8] CLEMENT I P. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals [J]. Am Clin Nutr, 1997, 66 (Suppl): 1523s-1529s.
- [9] 陈炳卿, 薛英本, 杨艳梅, 等. 苯并芘诱导小鼠前胃癌模型的建立及共轭亚油酸对其预防作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(5): 354-357. [收稿日期: 2006-10-20]

中图分类号: R15; TS252.5; O623.61

文献标识码: A

文章编号: 1004-8456(2007)01-0028-04

作者简介: 黄百芬 女 主管技师

青霉素 G、青霉素 V、苯唑西林、氯唑西林、双氯唑西林、奈夫西林都是广谱青霉素类抗生素,广泛用于兽医学中。该类药物用于产肉动物的呼吸、肠胃、泌尿、生殖和皮肤病毒感染的治疗和预防。青霉素在食品中的残留会对青霉素过敏的人产生健康危害,更为重要的是,抗生素被过量摄入健康人肠道,会破坏健康人的正常菌群环境,导致人体免疫力的降低^[1]。为确保消费者的安全,欧盟规定动物组织和牛奶允许的上述各种青霉素最大残留量为 4~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$,美国 FDA 规定牛奶中青霉素类抗生素的安全限为或 2.5~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前,对食品中青霉素类抗生素残留的分析方法还是采用传统的微生物法和 HPLC 法^[2]。常规 HPLC 往往仅适宜于测定比较纯的产物,对于具有复杂组分的生物培养基中的抗生素,特别是痕量的抗生素,往往由于高背景干扰而难于定量分析^[3]。E. Verdon, P. Couedor^[4]曾报道用柱前衍生-离子对高效液相色谱法测定牛奶中的异恶唑青霉素残留,但前处理步骤过于复杂,操作难于控制,其准确性和选择性较差。D. M. Holsteg^[5]等采用 LC-MS 测定了牛奶中 5 种 β -内酰胺类抗生素残留。Sonja Riediker 和 Yuko Ito 也用 LC-MS/MS 测定牛奶中的青霉素含量,准确性较好,但灵敏度不高^[6,7]。本研究借鉴各方法的优点,建立同时测定牛奶中 6 种青霉素类抗生素残留的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

牛奶样品 超市购买。

氯唑西林钠、奈夫西林钠、双氯唑西林钠、苯唑西林均购自美国 Sigma 化学公司;青霉素 G 钾、青霉素 V 钾购自中国药品生物制品鉴定所。

内标 氘代青霉素 G(PCG-*d7*) 购自剑桥同位素实验室。

甲醇,一级色谱纯,美国 Merck 公司出品;乙腈,一级色谱纯,美国 Merck 公司出品;甲酸,分析纯,TEDIA 化学公司;水为 Milli-Q 系统纯化水。

标准储备液的配制 分别称取氯唑西林钠、奈夫西林钠、双氯唑西林钠、苯唑西林、青霉素 G 钾、青霉素 V 钾各 1 mg,用 50% 甲醇水溶液溶解并定容至 25 ml。各储备液浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

青霉素 G-*d7* 内标溶液的配制 准确称取 0.010 0 g 内标,用甲醇定容至 50 ml 棕色瓶中,混匀,浓度为 200 ng/ml,再用甲醇稀释至 20 ng/ml。

1.1.2 设备

Waters 高效液相色谱-质谱系统,(包括:Waters 2695 Separations Module, Waters 2996 Photodiode Array Detector, Micromass Quattro UltimaTM Pt, Waters 2414 Refractive Index Detector, EmpowerTM 软件)。

色谱分离柱 Atlantis dC₁₈ 5 μm , 2.1 mm \times 150 mm 柱,part No:186001301;固相萃取柱 Waters HLB 柱,60 mg/5ml;Milli-Q RiOsTM 水纯化系统 美国 Millipore 公司出品;WH-861 涡流混合器,太仓市科教器材厂生产;pH-S3 酸度计;BECKMAN AvantiTMJ-20XP 高速离心机;抽滤装置、电子天平、精密移液枪、超声波振荡器等实验室常用仪器设备。

1.2 方法

1.2.1 色谱分离条件 色谱柱 Waters Atlantis ODS-C₁₈ 柱,2.1 mm \times 150 mm,粒径 5 μm ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;样品温度 室温;进样体积 10 μl ;流动相 A 纯水(含 0.1% 甲酸),流动相 B 乙腈(含 0.1% 甲酸)流动相梯度见表 1。A、B 液梯度淋洗可使 6 种被测青霉素得到较好的分离。

表 1 高效液相色谱分离梯度条件

时间 (min)	水(含 0.1% 甲酸) (%)	乙腈(含 0.1%甲酸) (%)	梯度变化 曲线
0.00	85	15	1
5.00	70	30	1
6.00	50	50	11
17.00	50	50	1
17.60	0	100	5
20.00	85	15	6
26.00	结束		

1.2.2 质谱条件 离子源(Source) ESI(+);毛细管电压(Capillary) 3.80 kV;锥孔电压(Cone) 50 V;离子源温度(Source Temperature) 100 $^{\circ}\text{C}$;锥孔反吹气流量(Cone Gas Flow) 55 L/h;脱气温度(Desolvation Temperature) 350 $^{\circ}\text{C}$;脱气流量(Desolvation Gas Flow) 402 L/h。

质量分析器 分析器 1 低端分辨率 RF Lens1: 12.5 V;高端分辨率 HM Lens1: 12.5 V;入口透镜电压(Entrance): -2v;碰撞电压(Collision): 8~16 V;碰撞梯度: 2.0;出口电压(Exit): 1.0 V;分析器 2 低端分辨率 RF Lens2: 12.5 V;高端分辨率 HM Lens2: 12.5 V。6 种青霉素类抗生素色谱和质量条件及参数详见表 2。

1.2.3 实验方法 吸取 5.00 ml 牛奶试样于 50 ml 的离心管中,摇匀,加入 5 ml 乙腈,涡流混合 60 s,再加 10 ml 乙腈涡流,离心 5 min (1 800 r/min),取 10

ml 上层清液,用氮气吹干,加入 3 ml 磷酸盐缓冲液 (pH 4.5),涡流 15 s。HLB 柱依次用 3 ml 甲醇,3 ml 水活化。将试样溶液以 1~2 ml/min 的速度完全过柱后,抽干 HLB 柱中的溶液,再用 8 ml 70%乙腈水溶液洗脱,用定量瓶收集洗脱液并定容至 10 ml,经 0.3 μm 微孔滤膜过滤后用于 LC-MS/MS 测定。

表 2 6 种青霉素类抗生素质谱条件及参数

组 分	保留时间 (min)	母离子相对分子量 (Da)	子离子相对分子量 (Da)	碰撞能量 (eV)
青霉素 G	12.98	335.15	160.00 ^a	8
			176.05	8
青霉素 V	13.84	351.17	160.00 ^a	8
			114.06	28
苯唑西林	14.61	402.20	160.05 ^a	12
			243.12	12
氯唑西林	15.70	436.15	160.06 ^a	16
			277.10	16
奈夫西林	16.21	415.23	199.11 ^a	16
			171.07	36
双氯唑西林	17.87	470.12	160.08 ^a	20
			311.10	20

注:a 表示定量离子。

3 结果与讨论

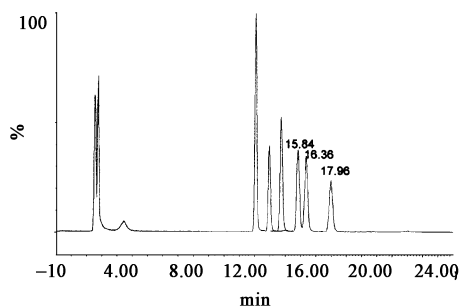
3.1 方法的优化

3.1.1 固相萃取柱的选择 由于牛奶中存在多种基质效应,在进样前需要进行处理,否则会干扰电喷雾过程的离子化程度,从而影响测定结果的灵敏度和准确性。加之牛奶中的蛋白质必须在进样前去除,否则会影响色谱柱的使用寿命。本文分别采用 HLB 固相萃取柱、C₁₈ 柱、MAX 柱等对试样进行净化,后两种柱子的保留能力及洗脱效果较差,而采用 HLB 固相萃取柱进行净化,平均回收率均在 90% 以上。可见,HLB 固相萃取柱是净化牛奶试样的理想固相萃取柱。

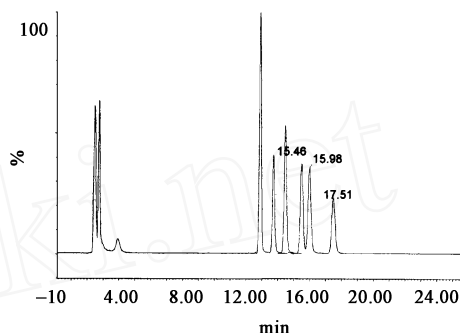
3.1.2 流动相的选择

流动相组成的选择 在本实验中采用了乙腈/含 0.1% 甲酸的水或含 0.1% 甲酸的乙腈/含 0.1% 甲酸的水作为流动相,使用同一色谱柱、色谱条件进行梯度洗脱分离。由图 1 结果可见,使用 0.1% 甲酸的乙腈/含 0.1% 甲酸的水 (b) 作流动相的峰形优于乙腈/含 0.1% 甲酸的水 (a) 作流动相的峰形,且能得到更好的分离度。这说明甲酸对青霉素类抗生素的离子化有促进作用。

流动相梯度洗脱的确定 本文采用乙腈和水作流动相进行液相色谱梯度分离测定,试验结果见图

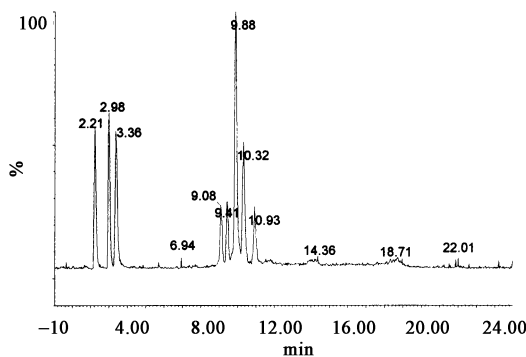


a. 乙腈 / 0.1% 甲酸的水作流动相

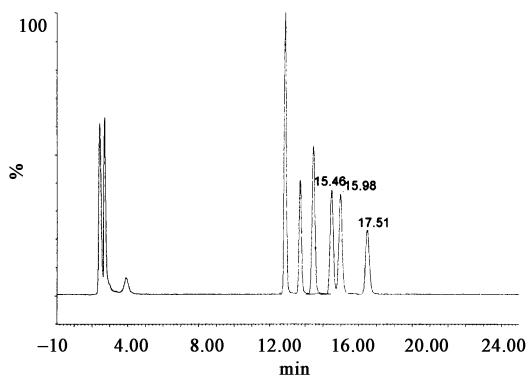


b. 0.1% 甲酸的乙腈 / 0.1% 甲酸的水作流动相

图 1 不同流动相对出峰效果的影响



a. 恒梯度: 水 + 乙腈 = 85+15



b. 在线可变梯度

图 2 流动相梯度洗脱的比较

2。可见,采用在线可变梯度洗脱较之恒梯度 (水 + 乙腈 = 85 + 15) 洗脱更为合理,6 组分的分辨率和峰形明显优于恒梯度,梯度参数见表 1。

3.1.3 前处理方法的探讨

试样过柱前 pH 的选择 吸取 1 μg/ml 的青霉素混合标准溶液 100 μl, 分别用 pH = 2.6、3.5、4.5、6.0、7.0、8.5、9.2 的磷酸盐缓冲液定容至 10 ml。将溶液以 1~2 ml/min 的速度通过 HLB 柱后, 抽干 HLB 柱中的溶液, 再用 8 ml 60% 乙腈洗脱, 用定量瓶收集洗脱液。将净化后的试样溶液定容至 10 ml, 经 0.3 μm 微孔滤膜过滤后用于 LC-MS/MS 测定。从测定结果观察, pH 对各组分的峰面积无明显的影响, 本文选用 pH = 4.5 的磷酸盐缓冲液。

洗脱液强度的选择 吸取 1 μg/ml 的青霉素混合溶液 100 μl, 用 pH = 4.5 的磷酸盐配成 10 ng/ml 的混合标准品, 将溶液以 1~2 ml/min 的速度完全过柱后, 抽干 HLB 柱中的溶液, 分别用浓度为 30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100% 的乙腈水溶液洗脱, 将净化后的试样溶液定容至 10 ml, 经 0.3 μm 微孔滤膜过滤后用于 LC-MS/MS 测定。测定结果表明, 当乙腈浓度在 70% 以上时就能得到完全洗脱, 但当乙腈浓度在 90% 以上时各组分的峰形较差, 考虑实际情况, 所以选择浓度为 70%~80% 的乙腈作为洗脱液。

3.2 方法学论证

3.2.1 校正曲线的制作 分别吸取浓度为 100 ng/ml 的青霉素混合标准溶液 60、80、100、120、160、200 μl 于 10 ml 容量瓶中, 各加入浓度为 20 ng/ml 的内标溶液 0.6 ml, 用 70% 乙腈水溶液定容至 10 ml, 使其标准系列浓度分别为 0.6、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 ng/ml, 内标浓度为 1.2 ng/ml, 依次进样, 进样量均为 10 μl, 以标样峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标, 标样浓度为横坐标分别作校正曲线, 其相关系数及回归方程见表 3, 可见, 线性相关系数均大于 0.993。

3.2.2 检出限和定量限 当信噪比为 3 比 1 的溶液浓度为检出限 (LOD), 当信噪比为 10 比 1 时的溶液浓度为定量限 (LOQ), 将青霉素的混合标准溶液逐步稀释至 1.0 ng/ml, 依次进样, 各组分在牛奶中的检出限 (LOD)、定量限 (LOQ) 见表 4, 可见, 定量限明显低于欧盟要求。

表 3 6 种青霉素类抗生素的线性回归方程和相关系数

组分名称	回归方程	相关系数
青霉素 G	$y = 40.37x + 0.23$	0.998
青霉素 V	$y = 27.86x + 1.41$	0.999
苯唑西林	$y = 11.76x + 0.18$	0.998
氯唑西林	$y = 35.27x + 0.35$	0.998
奈夫西林	$y = 207.34x - 1.69$	0.997
双氯唑西林	$y = 14.14x - 0.001$	0.993

表 4 牛奶中 6 种青霉素类抗生素的

组分名称	最低检出限		欧盟指令 2377/90/EEC 中规定的 MRL
	LOD	LOQ	
青霉素 G	0.02	0.07	4
青霉素 V	0.06	0.19	/
苯唑西林	0.04	0.12	30
氯唑西林	0.11	0.36	30
奈夫西林	0.02	0.08	30
双氯唑西林	0.19	0.64	30

3.2.3 精密度试验 以牛奶加标样作为阳性试样, 作 6 次重复试验, 分别进样 10 μl, 取其平均值进行计算。结果见表 5。

3.2.4 回收率试验 取精密度试验中牛奶阳性样品 2 份为试样, 每份 5.00 g, 每份加入相应的各组分标样, 分别进样 10 μl, 结果见表 6。

表 5 6 种青霉素类抗生素精密度试验结果

组分名称	峰面积	RSD %
青霉素 G	29682 28976 30097 27956 31897 29541	4.41
青霉素 V	15121 15409 14876 13987 15959 14685	4.52
苯唑西林	23877 22987 21559 23985 24557 22654	4.68
氯唑西林	18327 19726 18995 17806 17186 18597	4.84
奈夫西林	35898 32498 34968 37056 36891 33987	5.02
双氯唑西林	16665 15986 15432 18023 16875 17587	5.76

表 6 6 种青霉素类抗生素回收率测定结果

组分名称	原样中测得量 (ng)	加标后测得量 (ng)	标准加入量 (ng)	回收率 (%)
青霉素 G	0.112	0.274	0.170	95.30
青霉素 V	0.154	0.311	0.170	92.40
苯唑西林	0.176	0.347	0.170	100.50
氯唑西林	0.150	0.315	0.170	97.06
奈夫西林	0.132	0.286	0.170	90.59
双氯唑西林	0.249	0.412	0.170	95.88

3.2.5 干扰性试验 取未经过青霉素处理的空白牛奶, 按试样前处理方法进行处理, 定容至 10 ml, 进样, 经质谱 MRM 检测, 结果见图 3。可见, 牛奶中其他成分对青霉素的测定无干扰。

3.2.6 实样测定 取空白牛奶加入青霉素混合标准样品和内标 (最终浓度 1.2 ng/ml), 按试样前处理方法进行处理, 定容至 10 ml。进样, 经质谱 MRM 检测, 结果见图 4。

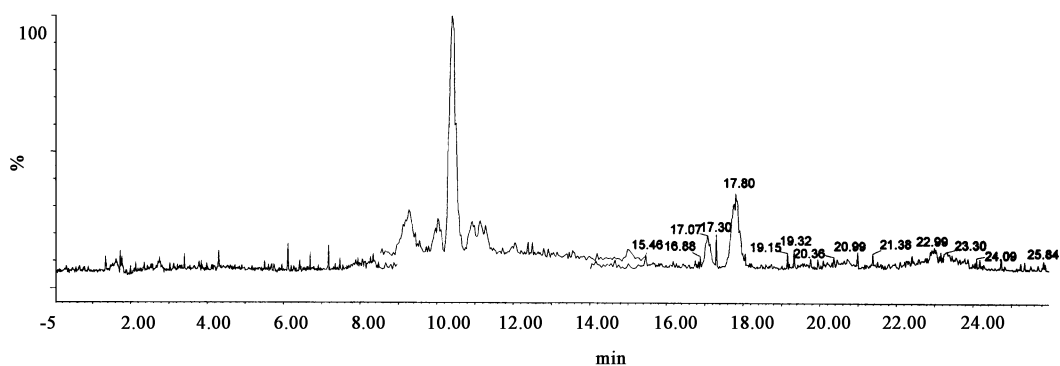


图3 空白牛奶样品图

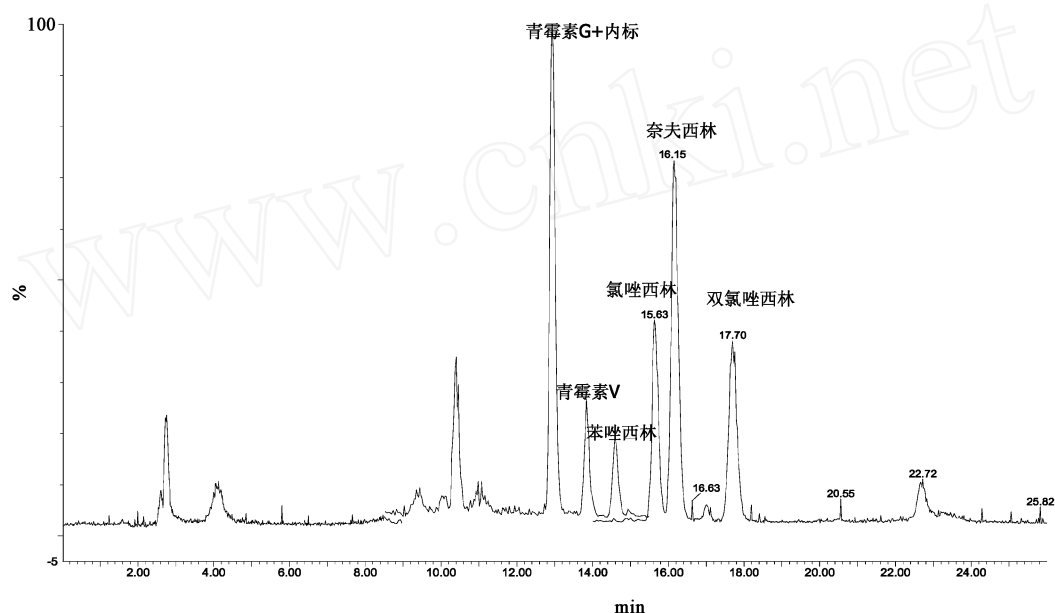


图4 牛奶加标样品图(2 ng/ml)

参考文献

- [1] SARA BOGIALLI, VITTORIO CAPITOLINO, ROBERTA CURINI, et al. Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk[J]. J Agric Food chem, 2004, 52:3286-3291.
- [2] 李发美. 医药高效液相色谱技术[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:269-296.
- [3] MARK A OLSEN, PAUL G. Cummings and sonya kennedy-gabb. The use of deuterium oxide as a mobile phase for structural elucidation by HPLC/UV/ESI/MS[J]. Anal Chem, 2000, 72:5070-5078.
- [4] VERDON E, COUEDOR P. Determination of isoxazoly penicillins residues in milk by ion-pair high-performance liquid chromatography after percolumn derivatization[J]. Journal of Chromatography B, 1998, 705:71-78.
- [5] HOLSTEGE D M, PUSCHNER G B, WHITENEAD, et al. Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS[J]. J Agric Food chem, 2002, 50:406-411.
- [6] SONJA RIEDIKER, RICHARD H STADLER. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotic in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2001, 73:1614-1621.
- [7] YUKO ITO, TOMOMI GOTO, HISAO OKA, et al. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis VI. Determination of six penicillins in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2004, 1042:107-111.

[收稿日期:2006-10-20]

中图分类号:R15;TS252.5;O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)01-0031-05