

实验技术与方法

超高效液相色谱-四极杆串联线性离子阱质谱法测定
乳制品中 8 种青霉素类药物及其主要代谢产物

刘红河¹, 廖仕成¹, 康莉¹, 毛丽莎¹, 肖惠贞², 尹江伟²

(1. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518055;

2. 深圳市宝安区疾病预防控制中心, 广东 深圳 518101)

摘要:目的 建立一种超高效液相色谱-四极杆串联线性离子阱质谱技术测定乳制品中 8 种青霉素类抗生素(青霉素 G、氨苄西林、青霉素 V、阿莫西林、苯唑西林、萘夫西林、氯唑西林、双氯西林)及其相应的代谢产物青霉噻唑酸(青霉素 G 噻唑酸、氨苄青霉噻唑酸、青霉素 V 噻唑酸、羟氨苄青霉噻唑酸、苯唑青霉噻唑酸、乙氧萘青霉噻唑酸、氯唑青霉噻唑酸、双氯青霉噻唑酸)残留的方法,并对市售乳制品中青霉素及青霉噻唑酸残留情况进行调查。
方法 乳制品样品中青霉素及青霉噻唑酸采用纯水超声提取,经乙腈沉淀蛋白,正己烷液液萃取除去脂肪,用氮气吹至近干,用乙腈-水(10:90, V/V)复溶后,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,经超高效液相色谱 C₁₈ 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)分离,选用乙腈-水(含 0.1% 甲酸)为流动相,梯度洗脱分离 8 种青霉素及相应青霉噻唑酸共 16 种组分;在优化的四极杆串联线性离子阱质谱条件下,采用 ESI 源、正离子模式、多反应监测方式,外标法定量,采用信息依赖采集扫描功能(IDA)结合增强子离子扫描(EPI)模式对检出阳性结果进行定性分析。
结果 方法的线性范围为 1.0 ~ 200 μg/L, 8 种青霉素及相应青霉噻唑酸在各种乳制品基质中均有良好的线性相关性,相关系数 *r* 在 0.999 1 ~ 0.999 9 之间,方法最低检测限为 0.01 ~ 0.05 μg/kg(固体乳粉)和 0.002 ~ 0.010 μg/kg(液体奶);方法回收率在 80.0% ~ 110.0%,相对标准差为 0.16% ~ 7.06%。
结论 该方法测定 8 种青霉素药物及相应代谢产物青霉噻唑酸的残留量简便、快速、定性准确,可以满足对青霉素类药物及其代谢产物残留的检测要求。

关键词:青霉素类药物;青霉噻唑酸;四极杆-串联线性离子阱质谱;乳制品;兽药残留

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0192-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.011

Determination of eight penicilins and its penicilloic acids in milk products by ultra performance liquid chromatography-hybrid triple quadrupole linear ion trap-mass spectrometry

LIU Hong-he, LIAO Shi-cheng, KANG Li, MAO Li-sha, XIAO Hui-zhen, YIN Jiang-wei

(Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Shenzhen 518055, China)

Abstract: Objective A ultra performance liquid chromatography-hybrid triple quadrupole linear ion-mass spectrometric method (UPLC-QqQLIT) was established for determination of 8 penicilins (penicillin G, ampicillin, penicillin V, amoxicillin, nafcillin, cloxacillin, oxacillin and dicloxacillin) and their penicilloic acids (penicilloic acid G, ampicilloic acid, penicilloic acid V, amoxicilloic acid, nafcilloic acid, cloxacilloic acid, oxacilloic acid and dicloxacilloic acid) in milk products. The 8 penicilins and there penicilloic acids in milk products were surveyed. **Methods** The 8 penicilins and penicilloic acids in milk products were extracted by water in super-sonic instrument, proteins were precipitated by acetonitrile and degreased fat by n-hexane with liquid-liquid extraction, then the purified solution was concentrated by nitrogen, dissolved with acetonitrile-water (10:90, V/V) and cleaned by 0.22 μm millipore filter. The filtrate was detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), identified by electrospray ionization (ESI) in positive mode using multiple reaction monitoring, and quantified with external standards. Information dependent acquisition scan function (IDA) combined with enhanced production scan (EPI) was used to confirm the 8 penicilins and their penicilloic acids. **Results** The calibration curves of 8 penicilins and penicilloic acids showed good linearity in the range of 1.0-200 μg/L with correlation coefficients of 0.999 1-0.999 9. The detection limits of the method were 0.01-0.05 μg/kg for milk powder and 0.002-0.010 μg/kg for liquid milk. The recoveries of three spiking

levels ranged from 80.0% to 110.0% , and the relative standard deviations (*RSD*) were 0.16% -7.06% . **Conclusion**
The method for determination of 8 penicilins and penicilloic acids in milk products by UPLC-QqQLIT was of operation convenience, less interference from impurities and good accuracy, which could meet the requirements for the determination of 8 penicilins and penicilloic acids residues in milk products.
Key words: Penicillin; penicilloic acids; hybrid triple quadrupole linear ion trap-mass spectrometry; milk products; residue of veterinary drug

青霉素类抗生素(penicillins)属于 β -内酰胺类药物,其作为治疗牛乳腺炎、肺炎、尿道炎、肠胃炎等细菌感染性疾病的首选药物^[1]而被广泛用于奶牛养殖业。我国 NY 5045—2008《无公害食品 生鲜牛乳》标准规定,生鲜乳中“不得检出”抗生素^[2]。有些不法商家为逃避监管,人为使用抗生素消解剂(β -内酰胺酶)将青霉素代谢而掩蔽乳制品中青霉素的存在^[3],使目前监管方法无法测定出这些抗生素,加上大多数青霉素在生物体内代谢半衰期较短,因此目前常规检测乳制品中青霉素的方法并不能有效监管乳制品中青霉素类抗生素的滥用。我国食品风险监测方案目前并没有将青霉素残留纳入乳制品的监测项目。青霉素被 β -内酰胺酶作用或体内代谢的主要产物均为青霉噻唑酸,青霉噻唑酸保留了青霉素的基本活性结构,长期摄入残留有青霉噻唑酸的食品可引起人体正常菌群破坏、产生耐药性和过敏等变态反应而危害人体健康^[4]。监测青霉素代谢产物青霉噻唑酸作为监管乳制品中青霉素残留的有效手段是目前的研究方向。

目前有关乳制品中青霉素类抗生素及抗生素消解剂 β -内酰胺酶的检测分析方法报道较多^[5-10],由于商品化标准品的缺乏,目前对于青霉素代谢产物的检测研究较少,只有针对青霉素 G 噻唑酸等少数几种代谢产物的报道^[11-16]。本文在总结文献^[17-18]的基础上,通过自行合成青霉噻唑酸标准物质,建立了同时测定奶粉、奶酪、液体奶和酸奶等乳制品中 8 种青霉素及其代谢物相应青霉噻唑酸的超高效液相色谱-四极杆串联线性离子阱质谱联用技术(UPLC-QqQLIT)测定方法,方法简便、灵敏、快速,结果稳定可靠,适合于食品风险监测和相关部门对乳制品质量实现安全监控,并对有关青霉素类抗生素及其代谢产物残留进行确证分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

购于深圳市多家超市各种品牌奶粉 21 份、奶酪 5 份、鲜奶 8 份、液体奶 23 份和酸奶样品 8 份,共

65 份。

1.1.2 主要仪器与试剂

API QTRAP 5500 四极杆串联线性离子阱质谱联用仪(美国 AB Sciex)、Shimadzu 20ADXR UFLC 超快速液相色谱仪(日本岛津)、ABN 2500 氮气发生器(上海析维公司)、Allegra X-22R 高速冷冻离心机、MS3 漩涡振荡器、KQ-250DV 超声清洗仪、Turbo Vap II 型氮吹浓缩仪(美国 Caliper)。

青霉素 G (CAS:61-33-6)、氨苄西林 (CAS:69-53-4)、青霉素 V (CAS:87-08-1)、阿莫西林 (CAS:26787-78-0)、苯唑西林 (CAS:1173-88-2)、萘夫西林 (CAS:985-16-0)、氯唑西林 (CAS:642-78-4)和双氯西林 (CAS:3116-76-5)等标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH,纯度均 > 99% ; 8 种青霉噻唑酸实验室自制;青霉素 G 噻唑酸(德国 LGC GmbH); β -内酰胺酶(日本 TCI);乙腈、正己烷和甲酸均为色谱纯;其他试剂除注明外均为分析纯;试验用水为二次蒸馏超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

青霉素标准溶液配制:分别精确称取 8 种青霉素固体标准品 0.010 00 g 于 8 个 10 ml 容量瓶中,分别用乙腈溶解定容,混匀,配成浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液, - 20 ℃ 下避光保存;分别移取各标准储备液 100 μ l 于 10 ml 容量瓶中,用乙腈-水 (1:1, V/V) 定容至 10 ml,制备成浓度为 10 μ g/ml 的 8 种青霉素混合标准使用液。4 ℃ 冰箱中保存。

青霉噻唑酸的制备:参照文献[17]的方法制备各种青霉噻唑酸,移取 1 000 mg/L 的青霉素标准储备溶液各 1 ml,分别置于不同 10 ml 容量瓶中,加入 500 g/L KOH 各 0.2 ml,加入约 5 ml 水,混匀后放置 3 ~ 4 h 后,用 1 mol/L 盐酸调节 pH 至 8.7,用水定容至刻度,得 0.1 mg/ml 的各种青霉噻唑酸的标准储备溶液。准确移取 1.0 ml 各种青霉噻唑酸的标准储备液于 10 ml 容量瓶中,用乙腈-水 (1:1, V/V) 定容至 10 ml,成浓度为 10 μ g/ml 的 8 种青霉噻唑酸混合标准使用液。

1.2.2 样品前处理

准确称取奶粉、奶酪等固体乳制品约 1.00 g 于 50 ml 离心管中,加入 4 ml 水,漩涡 2 min 混匀

后,超声提取 15 min,液体奶准确称取 5.00 g 于 50 ml 离心管中。在样品中加入 10 ml 乙腈,漩涡 2 min 充分混匀,3 000 r/min 离心 10 min;吸取 10 ml 上清液(避开表面脂肪层)于另一 15 ml 离心管,加入 2 ml 正己烷,漩涡 1 min,静置分层后弃去上层正己烷层,下层溶液于 40 ℃ 水浴氮气吹至近干,加入 1 ml 乙腈-水(10:90,V/V),漩涡 2 min 溶解残渣,过0.22 μm 有机系微孔滤膜,供 UPLC-QqQLIT 测定。

1.2.3 标准工作曲线的配制

根据样品基质不同选取不同的空白样品。称取 7 份经预试验证实不含青霉素和青霉噻唑酸的空白奶粉 1.00 g 或液体奶样品液体奶 5.00 g,分别加入浓度为 10 μg/ml 青霉素混合标准使用液和青霉噻唑酸标准使用液各 0.0、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μl,加入 4 ml 水(液体奶不加),漩涡 2 min,混匀,按 1.2.2 样品前处理方法进行处理后,上机测定。

1.2.4 仪器条件

色谱条件:采用 Dikma Endeavorsil C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm,1.8 μm),以水(含 0.1% 甲酸)

和乙腈(含 0.1% 甲酸)为流动相进行梯度洗脱(见表 1);流速 0.30 ml/min;柱温 30 ℃;进样体积 10 μl;进样前平衡时间 5 min。

Table 1 Gradient elution program for separation of seven penicilins and the penicilloic acids		
时间/min	水(含 0.1% 甲酸)/%	乙腈(含 0.1% 甲酸)/%
0	95	5
2.0	95	5
2.01	90	10
7.0	60	40
9.0	25	70
12.0	25	70
12.01	95	5
13.0	95	5

质谱条件:离子源为 ESI⁺,采用多反应监测(MRM)方式定量,利用保留时间和定性定量离子丰度比值进行初步定性,增强子离子扫描图谱精确定性。质谱条件具体为:喷雾电压(IS)5 500 V,入口电压(EP)10 V,气帘气压力(CUR)0.21 MPa,源内气(GS₁)50 L/min,辅助气(GS₂)50 L/min,碰撞气流速中等,离子源温度 600 ℃,驻留时间(dwel time)100 ms,其他部分 MRM 参数见表 2。

表 2 青霉素及青霉噻唑酸 MRM 参数表

Table 2 Some parameters of multiple reaction monitoring detection for seven penicilins and the penicilloic acids						
化合物	保留时间/min	母离子/amu	子离子/amu	去簇电压/V	碰撞电压/V	碰撞池出口电压/V
青霉素 G	7.05	335.1	160.1 [*] ,176.1	70	18,18	15
青霉素 G 噻唑酸	5.43	353.0	174.1 [*] ,160.1	60	25,19	15
氨苄西林	3.53	350.1	106.1 [*] ,192.1	100	25,22	15
氨苄青霉噻唑酸	3.02	368.0	324.1 [*] ,307.1	60	15,20	15
青霉素 V	7.67	351.1	160.1 [*] ,192.1	70	20,15	15
青霉素 V 噻唑酸	5.94	368.8	160.1 [*] ,325.1	60	19,17	15
阿莫西林	0.95	366.1	114.0 [*] ,208.1	70	28,18	15
羟氨苄青霉噻唑酸	0.80	384.2	189.1 [*] ,160.1	60	28,28	15
苯唑西林	8.02	402.1	160.1 [*] ,242.9	70	20,18	15
苯唑青霉噻唑酸	6.61	420.1	376.1 [*] ,174.1	60	18,25	15
萘夫西林	8.62	415.1	199.1 [*] ,171.0	70	20,50	15
乙氧萘青霉噻唑酸	7.13	433.1	199.1 [*] ,171.1	50	24,53	15
氯唑西林	8.46	436.0	277.1 [*] ,160.1	80	20,19	15
氯唑青霉噻唑酸	6.95	454.1	410.0 [*] ,160.1	70	19,30	15
双氯西林	8.90	469.8	160.1 [*] ,311.0	80	18,20	15
双氯青霉噻唑酸	7.73	488.0	174.1 [*] ,160.1	60	27,20	15

注: * 为定量离子对

信息依赖采集(IDA)条件:在质谱条件下增加 IDA 监测模式,设定监测响应值超过 5 000 cps 时触发增强子离子扫描(EPI)扫描模式,扫描分子量为 50~500 Da 的离子,扫描速率为 1 0000 Da/s,EPI 电压参数:去簇电压(DP)100 V,碰撞电压(CE)25 V;碰撞能量散射值(CES)10 V。

2 结果与分析

2.1 青霉噻唑酸合成条件的优化

青霉素经 β-内酰胺酶作用后,β-内酰胺环开环生成青霉噻唑酸^[10,16-17],为了验证本试验采用氢氧化钾溶液对 8 种青霉素进行碱水解的产物与被 β-内

酰胺酶酶解后的产物是否一致,移取浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 青霉素混合标准溶液 100 μl ,加入 100 μl β -内酰胺酶溶液,再加入 800 μl 水,混匀,在常温下放置 2 h。将此溶液稀释作为样品上机用 UPLC-QqQLIT 检测,结果发现,溶液中未检出 8 种青霉素,而检出了 8 种青霉噻唑酸,8 种物质的选择离子流图与试验中采用氢氧化钾碱水解方式制备的青霉噻唑酸混合标准溶液得到的选择离子流图一致,峰面积也基本相同。青霉素裂解成相应青霉噻唑酸的反应比例为 1:1,即一个青霉素分子反应生成一个青霉噻唑酸分子,反应产物青霉噻唑酸分子量比相应的青霉素分子量多 18(分子中增加 1 个氧和 2 个氢),本课题组测定的 8 种青霉素分子量范围为 334 ~ 468,因此可以忽略两种物质分子量差别导致的质量浓度差别,即青霉素碱水解产物青霉噻唑酸的质量浓度与相应青霉素的质量浓度基本一致。本课题组将反应得到的青霉素 G 噻唑酸与购买的商品化青霉素 G 噻唑酸标准物质测定结果进行比较,也证实了本课题组自制标准与购买的商品化标准间质谱图及浓度关系的一致性。试验结果表明,可用碱水解的方式制备青霉噻唑酸的标准溶液。

2.2 样品提取和净化条件的选择

目前有关乳制品中青霉噻唑酸提取的报道,多采用乙腈提取后氮吹至干再用水复溶后测定^[12,15],或用乙腈-水提取后经固相萃取小柱净化后测定^[14,16]。本课题组对这两种方法均进行了尝试:采用乙腈直接提取,试验中发现因待测物尚未完全提取到溶液中(即因蛋白变性沉淀导致待测成分共沉淀)而导致回收率较差;固相萃取法净化,测定成本高、操作复杂、前处理时间长,各种组分绝对回收率只有约 50%,测定效果并不理想。8 种青霉素和相应的青霉噻唑酸均易溶于水,本试验考虑采用水溶液提取样品中青霉素和青霉噻唑酸。比较了用纯水、pH = 8.0 的磷酸盐缓冲液、pH = 5.5 的乙酸铵缓冲液、不同比例的乙腈-水及乙腈对固体乳制品样品的提取效率,发现当溶液中乙腈比例达到 50% 以上时提取效果较差,其余水溶液结果一致,考虑操作方便,试验中采用纯水作为提取液。比较了 5 ml 的液体奶或固体乳制品提取液加入不同体积乙腈沉淀蛋白的效果,发现加入乙腈 8 ml 以上即可达到良好的效果,实际试验时统一采用加入 10 ml 乙腈来沉淀蛋白。由于青霉素热稳定性较差,本试验对氮吹浓缩的水浴温度也进行了比较,发现使用 50 $^{\circ}\text{C}$ 以上的水浴温度,回收率明显下降,考虑到温度太低氮吹浓缩时间较长,最终选择氮吹时水浴温度为 40 $^{\circ}\text{C}$ 。样品加入乙腈沉淀蛋白后的上清液仍可能

混有油脂,导致氮气吹干加水溶解后溶液浑浊,预先用正己烷萃取除去剩余的脂肪可有效消除这种现象。本试验建立方法采用样品经水提取后,再加入乙腈沉淀蛋白,方法简单、回收结果较好,优于目前文献报道方法。

2.3 色谱条件的选择

比较了 Xterra C₁₈、Atlantis C₁₈、Capcell PAK C₁₈、Proshell 120 EC-C₁₈ 和 Endeavorsil C₁₈ 等不同规格和不同粒径大小的色谱柱。结果发现 8 种青霉素峰形和分离效果均较好,Proshell 120 EC-C₁₈ 分离羟苄青霉噻唑酸峰形较宽,Xterra C₁₈、Atlantis C₁₈ 和 Capcell PAK C₁₈ 分离多数青霉噻唑酸均峰形较宽,且个别峰拖尾较严重。综合比较不同色谱柱分离效果、峰形及灵敏度,最终选择采用 Dikma Endeavorsil C₁₈ (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm) 柱,在合适的色谱条件下,各种青霉素峰形尖锐、灵敏度较好、保留时间适中,可有效地满足 8 种青霉素及其相应青霉噻唑酸的定量检测要求。由于青霉素极易与甲醇发生化学反应,加上液相色谱-质谱联用对流动相的要求,可供选择的反相流动相体系只有乙腈-水,考虑到在流动相中加入如甲酸、乙酸或乙酸铵等一般可以提高待测物离子化效率,在流动相中添加不同浓度的甲酸、乙酸铵、乙酸等试剂,比较分离效果和灵敏度,最终发现流动相中加入 0.1% 甲酸,灵敏度和分离度均达到最好。为了使 16 种物质有较好的分离和适当的出峰时间,最终选择线性梯度洗脱。在优化的条件下,空白奶粉添加浓度均为 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 的 8 种青霉素及相应青霉噻唑酸的 MRM 质谱图见图 1。

2.4 质谱的定性及质谱优化条件选择

根据 8 种青霉素及其相应噻唑酸的分子结构的特征,本试验选择了 ESI⁺ 电离模式。将质量浓度为 1.0 mg/L 的混合标准溶液用针泵连续直接进样,分别对喷雾电压、离子源温度、气帘气、碰撞气、源内气、辅助气、去簇电压、入口电压、碰撞气能量、碰撞池电压等质谱参数进行了优化,以确定 16 种物质的母离子和子离子,以强度较大的子离子作为定量离子,而以强度稍小的子离子作为定性离子,以待测样品出现与标准物质相同的质谱信号和保留时间,且信号响应值(峰高)超过 5 000 cps 时触发增强子离子全扫描(EPI),比较样品子离子全扫描图谱与预先储存的标准碎片谱库的匹配程度作为定性确证的质量控制依据。优化后的各化合物质谱参数见 1.2.4 及表 2。

2.5 标准曲线的线性范围和检出限

按照优化的分析条件,以 16 种待测物的标准峰

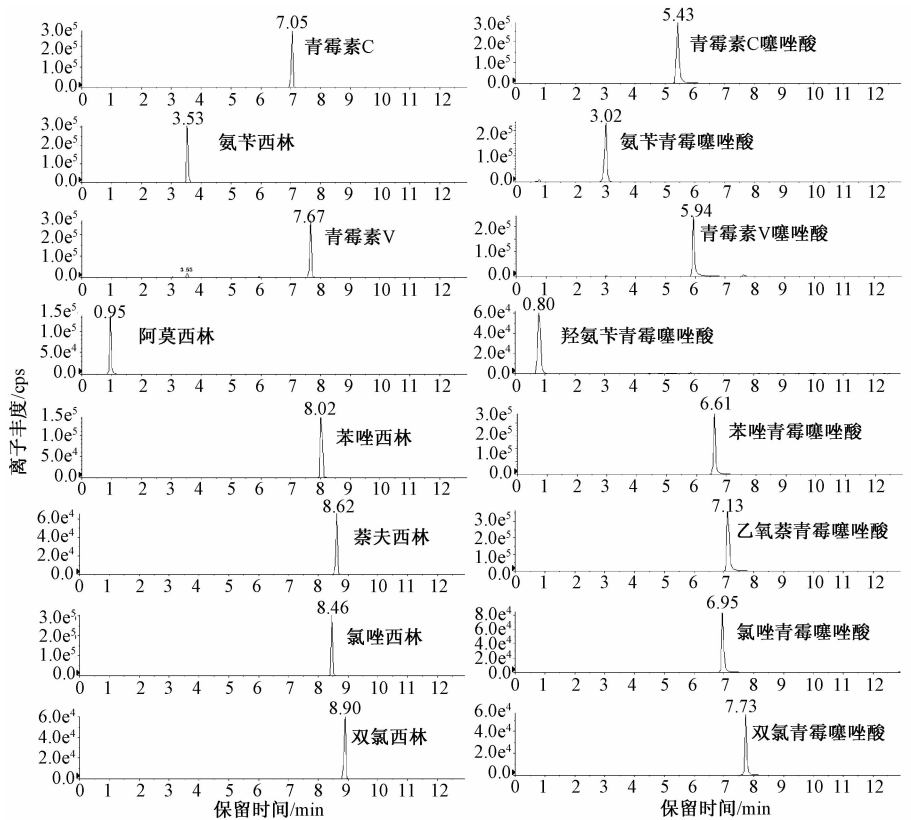


图1 空白奶粉添加8种青霉素及相应青霉噻唑酸(5.0 μg/kg)的MRM质谱图

Figure 1 Multiple reaction monitor(MRM) mass spectra of eight penicilins and the penicilloic acids (5.0 μg/kg) spiked to milk

面积为纵坐标,以在空白样品中加入青霉素及青霉噻唑酸的浓度为横坐标,计算标准工作曲线的线性回归方程。本方法对于测定8种青霉素及相应的青霉噻唑酸在1.0~200 g/L的浓度范围内有良好线性关系,相关系数(*r*)在0.999 1~0.999 9之间。将标准

溶液用不含待测成份的空白样品提取液逐级稀释,以响应信号接近3倍信噪比的标准溶液峰面积在标准工作曲线上查得结果作为定性检出限(LOD)、以接近10倍信噪比的标准溶液峰面积在标准工作曲线上查得结果作为定量限(LOQ),结果见表3。

表3 8种青霉素及青霉噻唑酸的标准曲线、线性范围和检出限

Table 3 Linear regression equations,correlation coefficients and limits of quantitation for sixteen penicilins and the penicilloic acids							
化合物	标准曲线	线性范围 /(μg/L)	相关系数 <i>r</i>	固体乳粉		液体奶	
				LOD/ (μg/kg)	LOQ/ (μg/kg)	LOD/ (μg/kg)	LOQ/ (μg/kg)
青霉素 G	$y=2.57\times10^4x+3.35\times10^4$	1.0~200.0	0.999 8	0.02	0.07	0.004	0.012
青霉素 G 噻唑酸	$y=6.66\times10^4x+3.89\times10^3$	1.0~200.0	0.999 9	0.03	0.10	0.006	0.020
氨苄西林	$y=1.81\times10^4x+1.75\times10^5$	1.0~200.0	0.999 2	0.02	0.08	0.004	0.016
氨苄青霉噻唑酸	$y=3.46\times10^4x+2.46\times10^4$	1.0~200.0	0.999 9	0.03	0.11	0.006	0.022
青霉素 V	$y=2.15\times10^4x+5.42\times10^4$	1.0~200.0	0.999 1	0.02	0.07	0.004	0.014
青霉素 V 噻唑酸	$y=5.19\times10^4x-2.25\times10^4$	1.0~200.0	0.999 8	0.01	0.04	0.002	0.007
阿莫西林	$y=1.89\times10^4x+4.87\times10^4$	1.0~200.0	0.999 5	0.04	0.14	0.008	0.028
羟氨苄青霉噻唑酸	$y=1.90\times10^4x-5.59\times10^3$	1.0~200.0	0.999 5	0.03	0.11	0.006	0.21
苯唑西林	$y=1.51\times10^4x+4.97\times10^4$	1.0~200.0	0.999 9	0.05	0.17	0.010	0.033
苯唑青霉噻唑酸	$y=5.08\times10^4x-1.76\times10^4$	1.0~200.0	0.999 9	0.04	0.14	0.008	0.028
羧苄西林	$y=4.93\times10^4x+4.03\times10^4$	1.0~200.0	0.999 8	0.01	0.04	0.002	0.008
乙氧羧青霉噻唑酸	$y=8.68\times10^4x-2.05\times10^4$	1.0~200.0	0.999 9	0.02	0.07	0.004	0.014
氯唑西林	$y=2.28\times10^4x+2.46\times10^4$	1.0~200.0	0.999 9	0.02	0.06	0.004	0.013
氯唑青霉噻唑酸	$y=1.70\times10^4x-1.42\times10^4$	1.0~200.0	0.999 9	0.04	0.13	0.008	0.026
双氯西林	$y=1.16\times10^4x+4.52\times10^3$	1.0~200.0	0.999 9	0.02	0.06	0.004	0.012
双氯青霉噻唑酸	$y=8.30\times10^3x+1.45\times10^4$	1.0~200.0	0.999 1	0.03	0.10	0.006	0.020

2.6 方法准确度和精密度

取空白奶粉在 1.0、20.0、100.0 μg/kg 3 个浓度水平,液体牛奶在 0.2、4.0、20.0 μg/kg 3 个浓度水平上分别进行加标回收试验,每个水平重复 7 次,试验结果见表 4、5。样品的平均回收率为 80.0% ~ 110.0 %, 相对标准差为 0.16% ~

7.06%。而对于固体奶粉在 1.0 μg/kg 和液体牛奶在 0.2 μg/kg 两个较低添加水平,样品的平均回收率为 81.0% ~ 110.0 %, 相对标准差为 0.16% ~6.39%。该法精密度和准确度都较好,可满足我国有关食品中禁用物质理化检测技术要求。

表 4 空白奶粉中 8 种青霉素及青霉噻唑酸的加标回收率测定结果($n=7$)

Table 4 Recoveries of 8 penicilins and the penicilloic acids spiked to milk powder

化合物	添加水平 1.0 μg/kg			添加水平 20.0 μg/kg			添加水平 100.0 μg/kg		
	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%
青霉素 G	0.91	91.0	4.87	19.6	98.0	3.70	100.0	100.0	5.28
青霉素 G 噻唑酸	1.04	104.0	5.89	18.0	90.0	4.23	101.1	101.1	2.81
氨苄西林	1.05	105.0	3.85	18.0	90.0	3.11	98.7	98.7	2.33
氨苄青霉噻唑酸	0.85	85.0	3.09	20.4	102.0	6.32	99.2	99.2	3.44
青霉素 V	1.06	106.0	2.09	19.6	98.0	0.84	100.0	100.0	2.28
青霉素 V 噻唑酸	0.91	91.0	2.21	18.4	92.0	4.22	99.5	99.5	2.06
阿莫西林	0.81	81.0	1.20	17.2	86.0	0.60	101.0	101.0	1.87
羟氨苄青霉噻唑酸	1.04	104.0	3.46	17.7	88.5	2.17	99.6	99.6	2.21
苯唑西林	1.03	103.0	2.78	17.2	86.0	1.03	101.3	101.3	1.99
苯唑青霉噻唑酸	0.97	97.0	4.29	17.0	85.0	1.58	100.1	100.1	2.09
萘夫西林	1.10	110.0	6.39	16.0	80.0	5.01	102.5	102.5	4.12
乙氧萘青霉噻唑酸	1.02	102.0	4.08	16.4	82.0	7.06	103.2	103.2	1.27
氯唑西林	1.05	105.0	0.42	19.4	97.0	4.37	101.7	101.7	2.16
氯唑青霉噻唑酸	0.92	92.0	2.33	19.0	95.0	3.23	98.1	98.1	3.66
双氯西林	0.99	99.0	0.16	18.9	94.5	2.10	99.2	99.2	0.79
双氯青霉噻唑酸	1.06	106.0	2.63	18.4	92.0	6.57	98.3	98.3	2.02

表 5 液体奶中 8 种青霉素及青霉噻唑酸的加标回收率测定结果($n=7$)

Table 5 Recoveries of 8 penicilins and the penicilloic acids spiked to fluid milk

化合物	添加水平 0.20 μg/kg			添加水平 4.0 μg/kg			添加水平 20.0 μg/kg		
	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%	平均浓度 /(μg/kg)	平均回收率 /%	RSD /%
青霉素 G	0.18	90.0	4.35	3.88	97.0	3.35	20.5	102.5	4.67
青霉素 G 噻唑酸	0.20	100.0	5.10	3.90	97.5	3.52	19.8	99.0	2.02
氨苄西林	0.22	110.0	4.11	3.98	99.5	1.55	19.6	98.0	3.11
氨苄青霉噻唑酸	0.18	90.0	3.33	4.01	100.3	4.20	19.8	99.0	3.37
青霉素 V	0.21	105.0	2.67	4.00	100.0	2.16	20.3	101.5	3.55
青霉素 V 噻唑酸	0.17	85.0	2.03	3.97	99.3	3.25	20.0	100.0	2.77
阿莫西林	0.17	85.0	1.85	3.68	92.0	2.72	20.0	100.0	2.39
羟氨苄青霉噻唑酸	0.20	100.0	3.03	3.66	91.5	2.93	19.8	99.0	1.77
苯唑西林	0.21	105.0	3.01	3.57	89.3	2.61	19.2	96.0	2.54
苯唑青霉噻唑酸	0.19	95.0	4.55	3.55	88.8	2.38	19.5	97.5	2.87
萘夫西林	0.22	110.0	5.65	3.55	88.8	4.13	19.3	96.5	3.42
乙氧萘青霉噻唑酸	0.20	100.0	3.77	3.51	87.8	6.31	19.9	99.5	2.12
氯唑西林	0.19	95.0	1.24	3.82	95.5	3.66	19.4	97.0	3.02
氯唑青霉噻唑酸	0.18	90.0	2.35	3.91	97.8	2.63	19.6	98.0	3.36
双氯西林	0.19	95.0	1.05	3.88	97.0	2.55	20.0	100.0	2.19
双氯青霉噻唑酸	0.22	110.0	2.21	3.93	98.3	4.29	19.2	96.0	2.87

2.7 EPI 模式的特征优化及阳性样品判断

EPI 扫描模式能够提供高灵敏度和高准确度的定性分析能力。普通串联四级杆质谱一般以选定的目标物两对或以上的离子对(包括定量离子和定性离子)的强度比与标准溶液相应的离子对强度比基本一致作为定性确证的质量控制依据。但实际

样品中当待测物含量较低时,某些离子通道干扰较大而导致各离子对比例与标准品的差别较大而影响定性结果的正确判断,本试验在样品检测中利用线性离子阱的 EPI 扫描功能来协助定性。在 EPI 模式下优化 CE 值和测定分子量范围,以获得待测青霉素及其相应噻唑酸具有足够碎片离子信息的碎

片图谱。CE 值为 25 V,测定分子量范围 50 ~ 500 dDa 时,得到的碎片信息可有效用于可疑阳性结果的定性判断。通过比较 1.0 μg/kg 的混合标准溶液及添加有 1.0 μg/kg 混合青霉素及其噻唑酸标准的奶粉样品进行分析,两种基质测定的 MRM 图谱及 EPI 图谱完全一致,因此,本试验以添加有 1.0 μg/kg 混合青霉素及其噻唑酸标准的奶粉样品进行 EPI 模式扫描,建立 8 种青霉素及其相应噻唑酸的碎片谱库,以样品分析中响应值(峰高)超过 5 000 cps 时触发增强子离子全扫描(EPI),进行定

性判断。在实际样品分析测定中,如待测样品和标准溶液的定性离子对出峰时间一致,且待测样品和预先储存的标准碎片谱库中的碎片图谱基本一致的话,就可以判断该目标物检出阳性。图 2 分别为疑似检出青霉素 G 噻唑酸的牛奶样品,从总离子流图(TIC)看保留时间(5.50 min)与青霉素 G 噻唑酸标准图谱基本一致,其 MRM 图也与标准接近,通过触发 EPI 扫描,其 EPI 碎片图与标准的 EPI 的碎片谱库基本一致,由此可以判断样品中检出青霉素 G 噻唑酸。

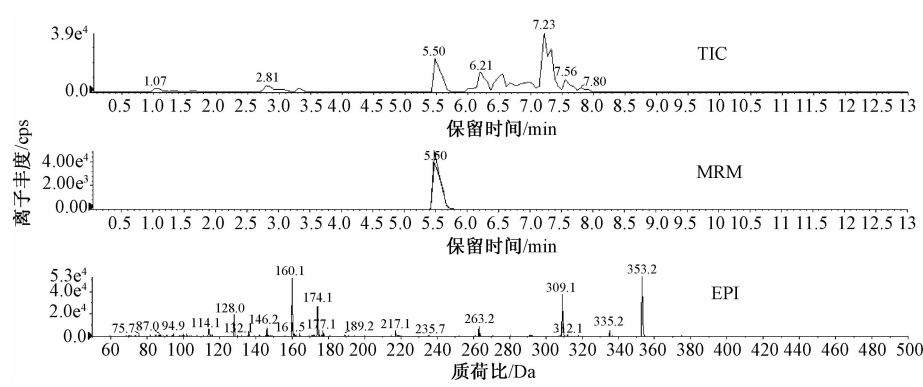


图 2 MRM 和 IDA 两种扫描模式下检出青霉素 G 噻唑酸的牛奶样品测定结果
Figure 2 Multiple Reaction Monitor spectrum and enhanced product ion spectrum of penilloic acid G in milk

3 小结

本次建立了乳制品中 8 种青霉素及其相应青霉噻唑酸的超高效液相色谱-四极杆串联线性离子阱质谱分析方法,并采用建立的方法测定了市场上随机采集的乳制品样品,结果表明,该法快速、准确、灵敏,适合于生产过程监控和日常检测的高灵敏度确证分析,同时在个别牛奶中检出青霉噻唑酸,提示在我国市售乳制品中也存在青霉素代谢产物残留情况,应引起有关食品监管部门的重视,下次调整食品风险监测项目时,应适当考虑增加乳制品中青霉素代谢物等项目。

参考文献

[1] Dayan A. Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man [J]. Veterinary Microbiology, 1993, 35 (3/4): 223-226.

[2] 中华人民共和国农业部. NY 5045—2008 无公害食品 生鲜牛乳 [S]. 北京: 农业出版社, 2008.

[3] 周蕊, 丁颖, 周爽, 等. 我国部分地区市售巴氏杀菌乳中 β -内酰胺酶含量调查 [J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26 (3): 209-212.

[4] 贾久满, 要瑞莉, 马越, 等. 我国动物性食品中抗生素残留问题的现状及对策 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (5): 1368-1370.

[5] 马丽萍, 纠敏, 秦翠丽, 等. 微生物抑制法检测牛乳中青霉素

类药物残留的研究 [J]. 现代食品科技, 2013, 29 (1): 193-196.

[6] Samsonova Z, Shchelokova O, Ivanova N, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay of ampicillin in milk [J]. Applied Biochemistry Andmicrobiology, 2005, 41 (6): 589-595.

[7] Verdon E, Couedor P, Maris P, et al. Liquid chromatographic determination of ampicillin residues in porcine muscle tissue by a multipenicillin analytical method: European collaborative study [J]. J AOAC Int, 2002, 85 (4): 889-900.

[8] 秦峰, 郑文捷, 陈桂良, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 6 种青霉素类药物的残留量 [J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34 (6): 348-351.

[9] 郎友, 单艺, 满朝新, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定乳及乳制品中青霉素类药物残留量 [J]. 中国乳品工业, 2013, 41 (5): 48-51.

[10] 陈号, 马文静, 田晋红, 等. 牛奶中非法添加 β -内酰胺酶的检测方法及研究现状 [J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 38 (1): 67-69.

[11] 陈聪, 严慧, 沈保华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定全血中青霉素 G 及其主要代谢产物 [J]. 色谱, 2012, 30 (5): 445-451.

[12] 冯月超, 王荣艳, 王颖, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定牛奶中青霉素 G 及青霉噻唑酸 [J]. 食品科技, 2012, 37 (7): 301-304.

[13] 刘创基, 王海, 杜振霞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛肉中青霉素类药物及其代谢产物 [J]. 分析化学, 2011, 39 (5): 617-622.

[14] LIU C J, WANG H, JIANG Y B, et al. Rapid and simultaneous determination of amoxicillin, penicillin G, and their major

metabolites in bovine milk by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2011, 879(7/8):533-540.

[15] 冯月超,范筱京,贾丽,等. 液相色谱-质谱联用法测定牛奶中14种青霉素及相应青霉素唑酸残留量[J]. 分析实验室, 2012,31(9):67-70.

[16] 李玮,艾连峰,郭春海,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶和奶粉中的青霉素类药物及其主要酶解代谢产物[J]. 色谱,2013,31(10):946-953.

[17] Ghebre-Sellassie I, Hem S L, Knevel A M. Epimerization of benzylpenicilloic acid in alkaline media[J]. J Pharm Sci,1984, 73(1):125-128.

[18] 罗智敏,周会艳,王薇薇,等. 青霉素唑酸的制备及检测[J]. 药物分析杂志,2013,33(4):628-632.

实验技术与方法

3M Petrifilm™ 检测系统对食品中沙门菌检测的评价研究

唐颂^{1,2},高飞²,任秀²,张庆生²,丁宏²,陆苏颢³,崔生辉²

(1. 孝感市食品药品检验检测中心,湖北 孝感 432000; 2. 中国食品药品检定研究院,北京 100050; 3. 3M 中国有限公司技术中心,上海 200336)

摘要:目的 结合不同标准和规范要求,对 Petrifilm™ 沙门菌测试片(以下简称 3M 测试片)进行评价。方法 用 53 个血清型的 64 株沙门菌及 30 株不同种属的非沙门菌,对 3M 测试片的包容性和排他性进行评价;针对 12 类食品样品,通过与我国国标方法的平行检测,对不同沙门菌检测系统的检验效果进行对比分析。结果 64 株沙门菌在所测试 4 种分离培养基上生长率差异有统计学意义($P<0.05$),4 种沙门菌分离培养基对 30 株非沙门菌抑制效果也存在一定差异。不同沙门菌选择性增菌肉汤-选择性培养基组合可影响食品样品中 10^{-1} cfu/25 g 染菌水平沙门菌的检出,差异有统计学意义($P<0.05$),其中以 RV(R10)-3M 测试片组合检出率最高,而两种选择性增菌肉汤-选择性培养基组合(如国标法)可提高不同种类食品样品中人工污染低浓度沙门菌的检出。结论 3M 测试片以其快速、方便、易保存,且准确性与国标方法相当的特点值得在食品微生物检测行业推广。

关键词:沙门菌;培养基;3M 测试片;检测;食源性致病菌

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)02-0199-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.02.012

The evaluation of 3M Petrifilm™ *Salmonella* express system in *Salmonella* detection of food samples

TANG Song, GAO Fei, REN Xiu, ZHANG Qing-sheng, DING Hong, LU Su-biao, CUI Sheng-hui (Xiaogan Institute for Food and Drug Control, Hubei Xiaogan 432000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the Petrifilm™ *Salmonella* express system of 3M™ company following the standards and specifications. **Methods** The inclusiveness and exclusivity of the Petrifilm™ *Salmonella* express plate were evaluated using 64 *Salmonella* strains of 53 serotypes and 30 non-*Salmonella* strains. Different *Salmonella* detection systems were compared and evaluated by parallel tests of a wide range of food samples inoculated with *Salmonella* with the GB method. **Results** The growth rates of 64 *Salmonella* strains on four selective media were significantly different ($P<0.05$), and the growth rate of 30 non-*Salmonella* also showed difference. Using different *Salmonella* selective enrichment broth-selective agar combination, the detection rate showed significant difference at 10^{-1} cfu/25 g level ($P<0.05$), and the highest detection rate was found by using RV (R10) -3M express plate. The using of two different selective enrichment broths and two selective agars (such as the GB method) could significantly improve the detection rate at 10^{-1} cfu/25 g level in food samples ($P<0.05$). **Conclusion** The Petrifilm™ *Salmonella* express system of 3M™ company was a rapid, convenient *Salmonella* detection kit and should be promoted in food microbiology testing labs since it showed the same level of accuracy