

高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 9种青霉素类药物的残留量

赵 维¹, 杜 钢², 李向荣¹

(1. 浙江大学城市学院医学与生命科学学院, 浙江 杭州 310015;

2. 四川省食品药品检验所, 四川 成都 610036)

[摘要] **目的:**建立一种 HPLC-MS/MS 方法快速测定牛奶中 9 种青霉素类药物的残留量。**方法:**前处理方法采用乙腈沉淀蛋白,正己烷液液萃取除脂;经高效液相色谱 C₁₈ 柱分离,选用 pH 3.1 甲酸水溶液和乙腈-pH3.1 甲酸水溶液为流动相,11 min 内在线梯度洗脱;在优化的质谱条件下,采用多反应监测(MRM),外标法定量。**结果:**方法的线性范围为 0.4~400 μg/L,9 种青霉素类药物在牛奶基质中均有良好的线性关系($r>0.990$);方法最低检测限为 0.1~0.8 μg/L,定量限为 0.3~2.6 μg/L;方法回收率均在 80% 以上,重复性良好,日内精密度<8.5%。**结论:**该方法测定 9 种青霉素药物的残留量简便、快速、准确,可以满足对青霉素残留的监测要求。

[关键词] 药物残留物/分析;乳制品;色谱法,高压液相;液相色谱-串联质谱;牛奶;青霉素

[中图分类号] R 978.1;TS 252.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)02-0171-07

Determination of nine penicillin residues in milk by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry

ZHAO Wei, DU Gang, LI Xiang-rong (1. School of Medicine and Life Sciences, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 2. Sichuan Provincial Institute for Drug and Food Control, Chengdu 610036, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for detection of nine penicillin residues in milk. **Methods:** The samples were precipitated with acetonitrile and degreased with n-hexane for pre-processing. The chromatography was performed by reversed-phase HPLC in a C₁₈ column and eluted gradiently on line for 11 min. The mobile phases were water with formic acid (pH 3.1) and acetonitrile-water with formic acid (pH 3.1). By optimizing the mass condition, the method was operated by multiple-reaction monitoring (MRM) and quantitated by external standard calibration. **Results:** The standard curves were linear in concentration range of 0.4~400 μg/L and all nine penicillins showed a good linear relationship in the milk matrix ($r>0.990$). The detection limit of the method was from 0.1 to 0.8 μg/L while the limit of quantification was from 0.3 to 2.6 μg/L. The average recoveries were higher than 80%. The within-day precisions were less than 8.5%. **Conclusion:** The established method is convenient, rapid and accurate and meets the requirement of monitoring penicillin residues in milk.

收稿日期:2011-04-18 修回日期:2011-05-15

基金项目:浙江大学城市学院 2012 年教师基金项目

作者简介:赵 维(1983-),女,硕士,从事体内药物分析及药品质量控制研究。

通讯作者:李向荣(1957-),男,硕士,教授,研究生导师;Email:lixr@zucc.edu.cn

[**Key words**] Penicillins/anal; Drug residues/anal; Dairy products; Chromatography, high pressure liquid; LC-MS/MS; Milk; Penicillin

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2012,41(2):171-177.]

青霉素(Penicillins)属 β -内酰胺类药物,是常用的一类广谱抗生素,兽医临床上常把它作为消炎抗感染的首选药物。据调查,目前我国奶牛患乳腺炎的治疗方法就是注射青霉素,或者对乳房局部用药,用药3天内采集的牛奶中会残留青霉素。也有报道称,不法商家为了防止牛奶在夏天变坏,直接在鲜奶中添加青霉素类药物。长期饮用“有抗奶”,会使正常人被动接受、积累青霉素,造成人体生理紊乱,产生耐药性,因此需要一个准确、简便的方法来对其进行监测。

目前,食品中青霉素类残留的分析方法有传统的微生物法^[1]、高效液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)^[2-3]、高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)^[4]、及液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[5-7]等。由于青霉素类药物结构相近,且在食品中痕量存在,微生物法的专属性及灵

敏度较仪器分析方法差,已很少采用。其中液相色谱-质谱联用法(LC-MS)已成为当今重要的分离与鉴定的方法之一^[8-10],它为解决兽药残留的痕量检测这一难题提供了较佳的解决方案。随着我国经济的发展和食品安全的重视,以及液质联用技术的完善,LC-MS将在兽药残留检测领域得到更加广泛的应用^[11]。

LC-MS对青霉素类残留的分析最早见于20世纪80年代末,目前此方法检测牛奶中多种青霉素药物,液相分离时间较长,前处理方法繁琐,检测结果不理想。本研究在国内外研究基础上,以9种青霉素类药物(青霉素G、青霉素V、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、哌拉西林、阿莫西林、氨苄西林)为研究对象(结构见图1),通过选择合适的质谱、色谱条件,优化牛奶样品前处理方法,并对方法进行验证,建立在痕量级水平上分析测定牛奶中残留

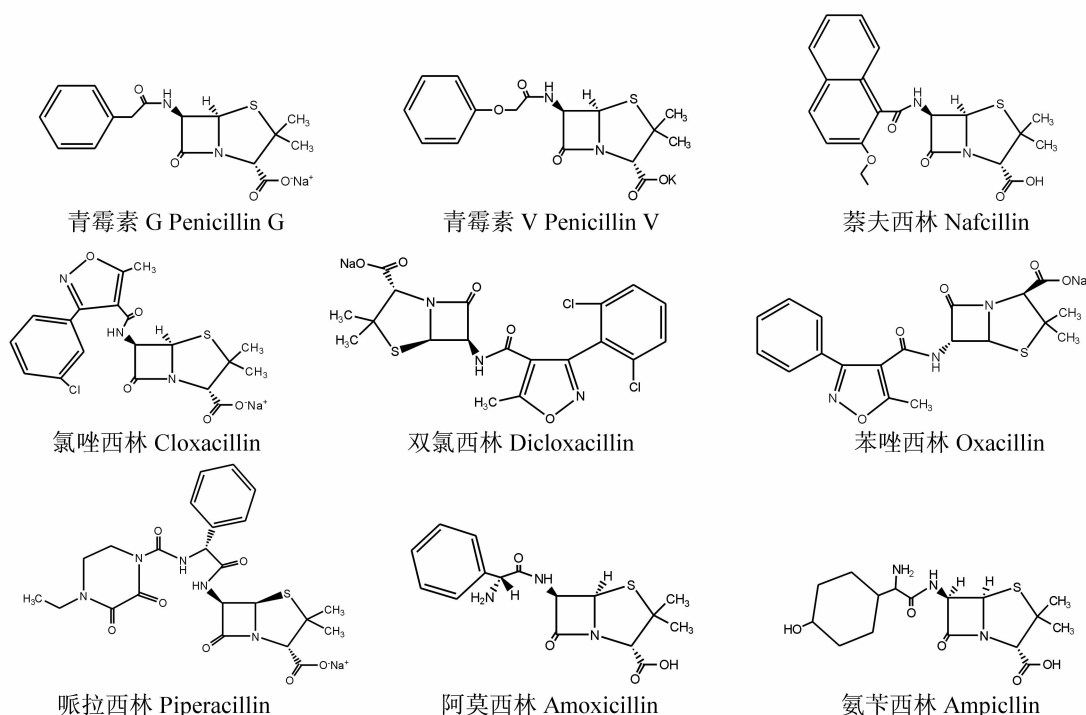


图1 青霉素类9种药物的结构

Fig.1 Nine chemical structures of Penicillins

的9种青霉素类药物的液相色谱-串联质谱法。该方法更简便、快速、准确,为市场监管提供有力的技术支撑,对保障人民身体健康和促进我国动物性食品的出口都具有重要意义。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 色谱系统:岛津 SHIMADZU Prominence 系列高效液相色谱仪,包括系统控制器 GBM-20A,在线脱气机 DGU-20A3,二元泵 LC-20AD,自动进样器 SIL-20AHT,柱温箱 CTO-20A。质谱系统:美国 Applied Biosystems 公司 API 3200 LC/MS/MS Systems 串联四极杆质谱仪,电喷雾电离离子源(ESI),Analyst 1.4.2 数据处理软件。十万分之一电子分析天平,BP 211D STARTORIUS;冷冻高速离心机,3K30, SIGMA;氮气浓缩仪,OA-SYS HEATING SYSTEM/N-EVAP 111 NITROGEN EVAPORATOR;离心机,BAIYANG;涡旋混匀仪,MS3 digital, IKA;超纯水仪,MILLI-Q。

1.2 试剂 牛奶样品,全国各超市购买。青霉素类9种药物对照品见表1。其他试剂:(均为色谱纯)甲酸,乙酸,氨水,Dikma Pure;甲醇,乙腈,Burdick & Jackson;正己烷,Fisher Scientific;研究用水均为超纯水。

表1 青霉素类对照品

Table 1 Reference substances of penicillins

药物名称	对照品厂家	批号	纯度/%
青霉素 G	VETRANAL	3027X	96.9
青霉素 V	VETRANAL	5213X	98.3
氨苄西林	VETRANAL	6129X	99.8
苯唑西林	中检所	0482-9901	90.4
氯唑西林	中检所	0423-9902	90.9
哌拉西林	中检所	130419-200103	90.5
阿莫西林	中检所	13049-200609	86.6
萘夫西林Dr. Ehrenstorfer GmbH		60328	93.0
双氯西林Dr. Ehrenstorfer GmbH		60830	97.0

1.3 标准溶液配制

1.3.1 标准储备溶液 分别精密称取9种青霉素对照品约10 mg 用水稀释,制得浓度约为100 µg/ml 的标准储备溶液,于4℃冰箱中贮存

备用。

1.3.2 混合标准工作溶液 将标准储备溶液用水逐级稀释为混合标准工作溶液,临用时制备。

2 方法

2.1 牛奶前处理方法 精密量取牛奶样品2 ml 于10 ml 玻璃离心管中,精密加入4 ml 乙腈,1 000 r/min 涡旋2 min,2 800 r/min 离心4 min,精密移取5 ml 上清液至另一10 ml 玻璃离心管,加入2.5 ml 正己烷,2 000 r/min 涡旋1 min,静置,待分层后弃去上层溶液,下层溶液于45℃水浴中氮吹至尽干,用1 ml 水-乙腈(90:10)溶解残渣,0.45 µm 微孔滤膜滤过,滤液再用0.2 µm 微孔滤膜滤过,作为供试液,供 LC-MS/MS 检测。

2.2 色谱条件 色谱柱 Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (5 µm, 4.6 mm × 150 mm);保护柱 Phenomenex Security Guard Cartridge C₈ (4 mm L × 3.0 mm I.D.);柱温 35℃;进样量 10 µl;洗脱梯度见表2。

表2 9种青霉素液相分离的洗脱梯度

Table 2 Elution gradient of nine penicillins

时间 /min	流速 /ml · min ⁻¹	A 相/%	B 相/%
		水(甲酸) (pH 3.1)	乙腈-pH 3.1 水 (90:10)
0.01	0.8	90	10
8.00	0.8	20	80
10.00	0.8	90	10
11.00	0.8	90	10

2.3 质谱条件 离子源参数为气帘气(CUR) 30 psi,碰撞气(CAD) 10 psi,离子源温度(TEM)400℃,雾化气(GAS1)60 psi,辅助加热气(GAS2)60 psi,各离子在多反应监测(MRM)模式下测定。将采集时间11 min 分成两段,前段0.0~4.2 min,ESI 正模式采集,离子源喷雾电压(IS)5 000 V;后段4.2~11.0 min,ESI 负模式采集,IS -4 500 V,并将两个采集段合并并在同一记录过程中。9种青霉素的出峰时间、质谱测定参数见表3。

表 3 青霉素类药物在 ESI 条件下的保留时间与质谱参数

Table 3 Retention time and mass parameters of penicillins in ESI

药物名称	保留时间 /min	母离子 (<i>m/z</i>)	定量离子 (<i>m/z</i>)	定性离子 (<i>m/z</i>)
阿莫西林	2.44	366.1	114.1	114.1 208.1
氨苄西林	3.68	350.1	106.1	106.1 192.1
哌拉西林	6.53	515.9	232.8	232.8 329.9
青霉素 G	7.09	333.0	191.8	191.8 288.8
青霉素 V	7.55	348.9	207.8	207.8 113.8
苯唑西林	7.96	399.9	258.8	258.8 355.8
氯唑西林	8.41	433.9	292.8	292.8 398.9
羧夫西林	8.64	412.9	271.8	271.8 242.8
双氯西林	9.09	467.8	326.8	326.8 290.7

3 结 果

3.1 方法学验证

3.1.1 干扰性试验 取不含青霉素的空白牛奶,按样品前处理方法进行处理,进样,经质谱检测,结果见图 2;9 种青霉素的总离子流谱图见图 3。可见,牛奶中不含有与各青霉素相对应的干扰峰,不影响青霉素的检测。

3.1.2 检测限和定量 在 ESI 正模式下,对阿莫西林和氨苄西林进行检测,其余 7 种青霉素在 ESI 负模式下检测。最低检测限(LOD)以信噪比等于 3(*S/N* = 3)的目标化合物浓度表示,最低定量限(LOQ)以信噪比等于 10(*S/N* = 10)的浓度表示,并计算方法检出限与定量限(结果见表 4)。可见,各组分在牛奶中的 LOD 与 LOQ 均低于国家标准对最高残留量的要求,表明该方法灵敏度较高。

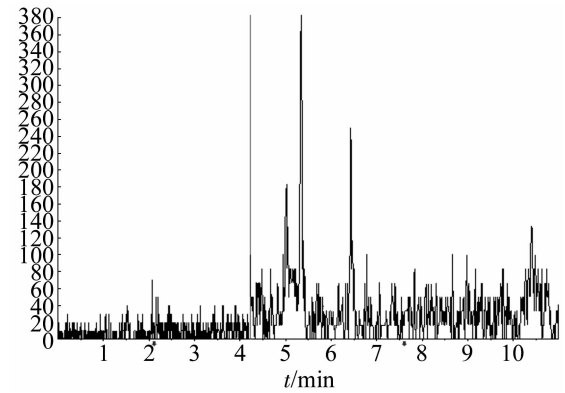


图 2 空白牛奶样品图

Fig. 2 TIC of milk

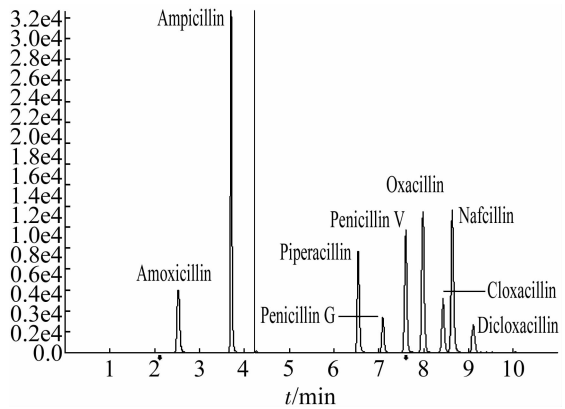


图 3 9 种青霉素总离子流谱图

Fig. 3 TIC of nine penicillins

表 4 9 种青霉素检出限与定量限

Table 4 LOD and LOQ of nine penicillins

药物名称	LOD / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LOQ / $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	国家药监局规定牛奶 中最高残留量/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
青霉素 G	0.2	0.8	4
青霉素 V	0.1	0.4	4
羧夫西林	0.2	0.5	—
苯唑西林	0.1	0.4	30
哌拉西林	0.3	1.0	—
氯唑西林	0.4	1.2	—
双氯西林	0.8	2.6	300
阿莫西林	0.5	1.6	10
氨苄西林	0.1	0.3	10

3.1.3 线性和范围 制备 9 种青霉素混合标准对照溶液于按照前处理方法制备的牛奶基质

中,照样品检测方法测定,并记录峰面积。以对照品峰面积为纵坐标,浓度为横坐标分别作校正曲线,线性范围、回归方程与相关系数,见表5。结果表明相关系数均>0.990,9种青霉素类药物在牛奶基质中均有良好的线性关系。

表5 牛奶中9种青霉素标准曲线的线性范围、回归方程与相关系数

Table 5 Linearity range, regression equation and *r* of nine penicillins in milk

药物名称	线性范围 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	回归方程	相关系数
青霉素 G	1.026 ~ 51.31	$y = 171x + 278$	0.9980
青霉素 V	0.4548 ~ 36.38	$y = 356x + 229$	0.9991
羧苄西林	0.4432 ~ 35.45	$y = 951x + 189$	0.9996
苯唑西林	0.4841 ~ 38.73	$y = 1120x + 12.5$	0.9997
氯唑西林	1.451 ~ 48.36	$y = 414x + 16.8$	0.9994
双氯西林	4.707 ~ 407.7	$y = 143x + 633$	0.9988
哌拉西林	1.501 ~ 50.05	$y = 562x - 172$	0.9993
阿莫西林	2.492 ~ 49.83	$y = 481x + 203$	0.9999
氨苄西林	0.3692 ~ 36.92	$y = 1700x - 47.9$	0.9991

3.1.4 回收率研究 对氯唑西林进行200、300、400 $\mu\text{g/L}$,其余8种青霉素进行20、30、40 $\mu\text{g/L}$,高、中、低三个浓度的回收研究($n=3$)。在不含待测青霉素的牛奶中加入不同浓度对照品后,照前处理方法回收样品,测定结果见表6。结果表明,方法回收率均在80%以上,对动物源性食品来说回收较好。

表6 牛奶中9种青霉素回收研究结果($n=3$)

Table 6 Recoveries of nine penicillins in milk ($n=3$)

药物名称	低浓度回收率/%	中浓度回收率/%	高浓度回收率/%	相对标准偏差 RSD/%
青霉素 G	105.43	109.29	112.13	3.09
青霉素 V	112.62	106.85	107.08	3.00
羧苄西林	97.48	94.30	90.50	3.71
苯唑西林	94.30	95.59	91.06	2.49
哌拉西林	94.65	96.16	91.93	2.27
氯唑西林	96.27	89.00	91.81	3.97
阿莫西林	81.33	84.58	79.85	2.95
氨苄西林	85.27	85.55	82.04	2.31
双氯西林	80.13	83.85	86.73	3.96

3.1.5 重复性研究 取9种青霉素在标准曲线中间浓度的基质对照溶液,一日内分别连续进样6次,记录峰面积,计算RSD均<4.5%,表明方法重复性良好。

3.1.6 日内精密度研究 一日内在0、2、4、6、8 h分别用9种青霉素,在标准曲线中间浓度的基质对照溶液进样,记录峰面积,计算RSD均<8.5%,表明方法日内精密度良好。

3.2 样品测定 对重庆、广西、青海、贵州、陕西、云南、西藏市场销售的各品牌、各类型的牛奶(共420份)进行检测,从测定结果发现某批牛奶可能含有青霉素G。对阳性样品进行了初试和复试,检测结果吻合,含量为4.0 mg/L 。

4 讨论

4.1 前处理方法的优化 牛奶中存在复杂的基质,排除基质效应的干扰是本研究的一个重点和难点。这些物质与分析物共同流出喷雾针可能影响待分析物的雾化、挥发、裂分、化学反应及带电过程,导致进入质谱的离子抑制或增加,从而影响定量结果的准确性,方法的线性及重现性。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,因此在进样前必需进行处理。本研究在国家标准GB/T 20755-2006(畜禽肉中9种青霉素类药物残留量的测定—液相色谱-串联质谱法)前处理方法的基础上,对牛奶中青霉素类药物残留前处理方法改进,将沉淀蛋白、液液萃取和固相萃取进行了对比,并对除蛋白,除脂肪,样品浓缩各步骤进行优化。

研究中发现Waters Oasis、Supclean的SEP柱对9种青霉素药物的保留有一定的差异。其中HLB单柱和双柱萃取对青霉素G、青霉素V、羧苄西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、哌拉西林净化后样品中杂质较少,色谱图中没有明显的干扰峰存在,回收率可达60%以上。固相萃取净化后样品中杂质虽少,但是HLB双柱对极性较大的氨苄西林回收率仅47%,阿莫西林回收率仅32%,而单柱对氨苄西林、阿莫西林的回收率为15%和22%,保留不佳。况且固相萃取仪器和小柱成本较高,操

作较烦琐,不是回收牛奶中青霉素的较理想方法。

本研究参照国家标准对禽肉样品的处理方法,改用沉淀蛋白、液液萃取法。研究中发现沉淀蛋白与提取次数对回收率结果影响不大,氮吹后玻璃离心管底有蛋黄色油脂出现,考虑到可能由于其存在使得青霉素药物被吸附与包裹,参照兽药残留的常用除脂方法,采用正己烷。结果表明,是否除脂对青霉素的回收有很大影响,除脂后的回收率明显提高,均有80%以上,结果较好,成本较低,操作简便,使用该方法处理样品,更加快速,且结果准确可靠。

4.2 质谱条件的选择 青霉素分子中有一个游离羧基和酰胺侧链,极性较大,应选择ESI离子源对青霉素进行分析。本研究大多数青霉素的电离常数pKa在2.5~2.8之间,其分子中的游离羧基具有较强的酸性,易带上负电荷,因此对哌拉西林、青霉素G、青霉素V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林、双氯西林采用负离子模式分析。而对氨苄西林和阿莫西林采用正离子模式,这可能是因为氨苄西林pKa为3.5,7.3,阿莫西林pKa为2.4,7.4,9.6,其酰胺侧链的碱性占主导地位,使得二者更易带上正电荷。

本研究在优化离子源条件初,青霉素V和氨苄西林选用ESI正模式MRM扫描时,发现青霉素V离子对351.1/106.1,氨苄西林离子对350.1/106.1,均出现双峰,且两种化合物的两峰的保留时间相同。这可能是由于两个化合物的母离子的m/z值仅相差1,MRM监测时两个离子通道会相互干扰。对青霉素V和氨苄西林的106.1,160.1,192.1三个子离子分别进行质谱参数优化,最后MRM扫描发现对青霉素V 160.1,192.1两个子离子出峰情况较好,而对氨苄西林106.1,192.1两个子离子出峰情况较好,可以排除青霉素V和氨苄西林之间的干扰。

4.3 研究的延伸 青霉素水溶液很不稳定,在酸、碱、青霉素酶、羟胺及某些金属离子(铜、铅、汞和银)或氧化剂等作用下,易发生水解和分子重排,生成青霉噻唑酸、青霉脱羧噻唑酸、青霉二酸、青霉烯酸、青霉醛、青霉胺等,导致

β -内酰胺环被破坏而失去抗菌活性。新鲜牛奶中若残留或添加了青霉素,在生产、贮藏、销售过程中,牛奶复杂的基质环境可能使得青霉素原型药物发生结构的重排或者降解,因此也可以借助LC-MS/MS的高灵敏度,对青霉素降解产物进行初步研究。若牛奶样品检测结果中发现有降解产物出峰,可以推断其中可能加入了青霉素类药物。

References:

- [1] Detection method for penicillin antibiotic residues in animal-derived food-Microbiological Method [J]. **Chinese Journal of Veterinary Drug (中国兽药杂志)**, 2004, 38(3): 14-15. (in Chinese)
- [2] VERDON E, COUEDOR P. Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after precolumn derivatization [J]. **J AOAC Int**, 1999, 82(5): 1083-1095.
- [3] 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.
- [4] LUO W, ANS C Y, THOMPSON H C, Jr. Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. **J Chromatogr B Biomed Sci Appl**, 1997, 694(2): 401-407.
- [5] ANG C Y, LUO W. Rapid determination of ampicillin in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. **J AOAC Int**, 1997, 80(1): 25-30.
- [6] HUANG Bai-fen, REN Yi-ping, CAI Zeng-xuan, et al (黄百芬, 任一平, 蔡增轩, 等). Analysis of six penicillin residues in milk by LC-MS/MS [J]. **Chinese Journal of Food Hygiene (中国食品卫生杂志)**, 2007, 19(1): 31-35. (in Chinese)
- [7] QIN Feng, ZHENG Wen-Jie, CHEN Gui-liang, et al (秦峰, 郑文捷, 陈桂良, 等). Determination of six penicillin residues in milk by LC-MS/MS [J]. **Chinese Journal of Antibiotics (中国抗生素杂志)**, 2009, 34(6): 348-351. (in Chinese)

- [8] SHENG Long-sheng, SU Huan-hua, GUO Dan-bin (盛龙生, 苏焕华, 郭丹滨). Chromatography-mass spectrometry Technology (色谱质谱联用技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2006: 175-179. (in Chinese)
- [9] BOISON J O, KENGI J Y. Determination of sulafdimethoxine and sulafmethazine residues in animal tissues by chromatography and thermospray mass spectrometry [J]. J AoAC Int, 1995, 78(3): 651-658.
- [10] DELEPINE B D, HURTAUD-PESSE J D, SANDERS P. Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotins in bovine muscle by chromatography-mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 1996, 79(2): 397-404.
- [11] YING Yong-fei, CHEN Hui-hua, WU Ping-gu (应永飞, 陈慧华, 吴平谷). The application of Chromatography-mass spectrometry Technology in veterinary drugresidue [J]. Journal of Analytical Science (分析科学学报), 2008, 24(3): 359-366. (in Chinese)

[责任编辑 张荣连]

《浙江大学学报:医学版》征订和征稿启事

《浙江大学学报:医学版》是由国家教育部主管,浙江大学主办的报道医药学等方面研究成果的学术性刊物,从2003年起,正式被医学领域中最权威的美国《医学索引》,即IM/Medline收录,刊物印刷本被美国国立医学图书馆永久收藏。2008年起,《浙江大学学报:医学版》被《中文核心期刊要目总览》收录。

此外,《浙江大学学报:医学版》还被中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)数据库、中国科学引文数据库(CSCD)、美国《化学文摘》、美国《乌利希国际期刊指南》、荷兰《医学文摘》、波兰《哥白尼索引》等收录。

《浙江大学学报:医学版》主要登载医学、药学、生物医学以及相关学科的学术论文。读者对象为医务工作者、医药学教育和科研人员,以及研究生等。

《浙江大学学报:医学版》欢迎广大作者来稿,稿件的取舍以学术质量为标准,一视同仁。投稿须知请查阅刊物网址(<http://www.journals.zju.edu.cn/med>)上所登载的《稿约》。

《浙江大学学报:医学版》编辑部地址:杭州市天目山路148号;邮编:310028;联系电话:0571-88272797;电子信箱:zdxbyxb@zju.edu.cn;国内邮发代号:32-2,国外邮发代号:BM 6585;订阅:全国各地邮局。