

UHPLC 三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的六种 β -内酰胺类抗生素残留

LCMSMS-108

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 6 种常见 β -内酰胺类抗生素残留的检测方法。该方法在 2.5 min 内完成青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素六种常见 β -内酰胺类抗生素的分离。在牛奶基质中青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素在 0.2~500 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.996 以上。用牛奶基质配制浓度为 5 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.12% 和 2.43~4.96% 之间，仪器精密度良好。牛奶中 6 种常见 β -内酰胺类抗生素的定量限在 0.038~0.085 ng/mL 之间，检出限在 0.011~0.025 ng/mL 之间。

关键词：三重四极杆质谱 牛奶 β -内酰胺类抗生素

β -内酰胺类抗生素 (β -lactams) 是指化学结构中具有 β -内酰胺环的一类抗生素，包括临床常用的青霉素与头孢菌素。其化学结构特点，特别是侧链的改变形成了许多不同抗菌谱和抗菌作用的抗生素。此类药物广泛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，它们的使用会引起动物源性食品中兽药残留的存在，这种残留将对青霉素过敏的人产生健康危害。更为重要的是，抗生素被长期低剂量摄入健康人肠道，会破坏健康人肠道正常菌群环境，导致人体免疫力的降低使用后会于动物体内有一定的残留，食用含有 β -内酰胺类抗生素残留的食品后会危害人们身体健康，已有人食用牛奶后引起青霉素过敏，而且长期使用会产生抗药性。为确保消费者的食品安全，世界各地均对牛奶中上述各种青霉素有允许最大残留量的要求。本研究参照《SN/T2050-2008 进出口动物源食品中 14 种 β -内酰胺类抗生素残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法》使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用建立牛奶中的 6 种常见 β -内酰胺类抗生素残留的检测方法。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μ m)

流动相：A: 0.1% 甲酸水溶液；B: 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40 $^{\circ}$ C

进样量：10 μ L

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.80	Pumps	Pump B Conc.	65
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.51	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8040	雾化气流速:	3.0 L/min
离子源:	ESI, 正离子	加热气流速:	15.0 L/min
加热模块温度:	500°C	离子源电压:	4.5 kV
脱溶剂管温度:	300°C	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
		MRM 参数:	见表 2

表2 样品MRM参数及信息

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)	英文名	CAS
青霉素 G	335.1	160.00*	-23.0	-10.0	-15.0	peillin G	61-33-6
		176.20	-23.0	-11.0	-11.0		
青霉素 V	351.20	160.10*	-26.0	-11.0	-28.0	Penicillin V	87-08-1
		114.10	-25.0	-29.0	-11.0		
苯唑青霉素	402.20	160.10*	-29.0	-15.0	-30.0	Proctaphlin	1173-88-2
		243.10	-29.0	-14.0	-25.0		
乙氧萘青霉素	414.90	199.10*	-20.0	-14.0	-20.0	Nafcillin	7177-50-6
		255.90	-20.0	-16.0	-27.0		
邻氯青霉素	436.10	277.10*	-23.0	-15.0	-30.0	Cloxacillin	7081-44-9
		160.10	-16.0	-15.0	-30.0		
双氯青霉素	470.00	160.00*	-24.0	-15.0	-16.0	Dicloxacillin	343-55-5
		310.90	-24.0	-13.0	-21.0		

*表示定量离子

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质: 共 6 种, 青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素。

标准工作溶液配制: 用乙腈 - 水 (1:1) 配制 1 mg/mL 的标准贮备液, 用乙腈 - 水 (2:8) 溶液稀释成 5 µg/mL 的混合标准溶液。

1.4 标准曲线的配制

牛奶前处理液用氮气吹干后再用乙腈 - 水 (2:8) 溶液复溶, 该复溶液过 0.22 µm 有机滤膜后再用其将 5 µg/mL 的标准溶液稀释成 500 ng/mL、200 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.2 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

前处理方法采用《SN/T2050-2008 进出口动物源食品中 14 种 β- 内酰胺类抗生素残留量检测方法液相色谱 - 质谱 / 质谱法》的第 7 部分。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

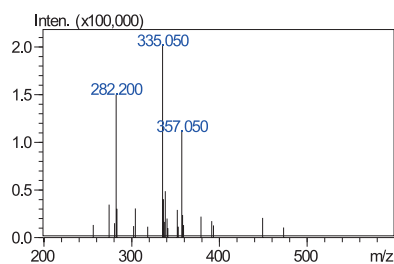


图1 青霉素G一级质谱图

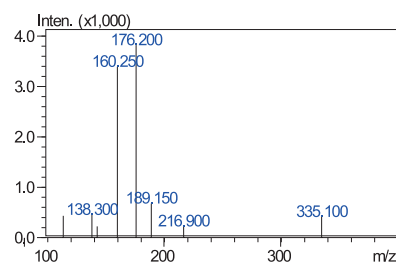


图2 青霉素G产物离子扫描图(CE值-15 V)

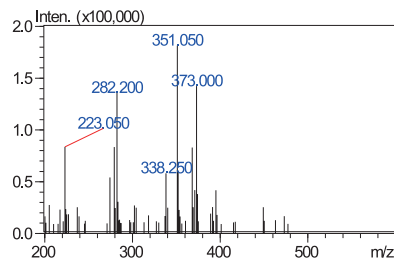


图3 青霉素V一级质谱图

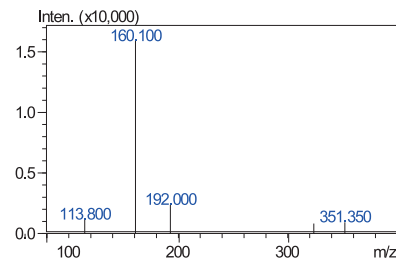


图4 青霉素V产物离子扫描图(CE值-10 V)

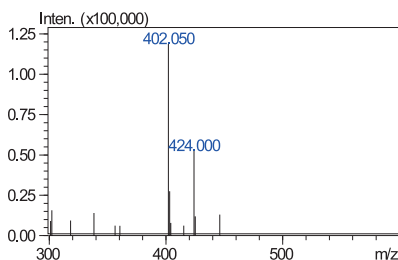


图5 苯唑青霉素一级质谱图

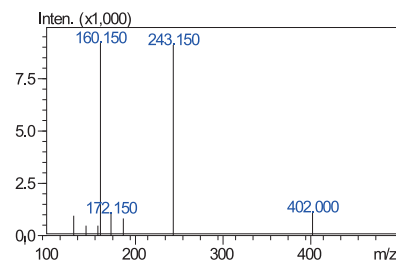


图6 苯唑青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

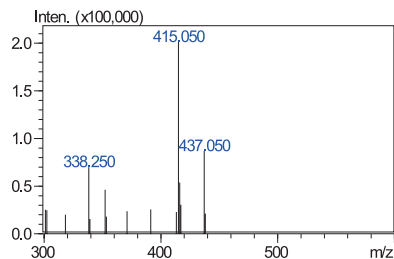


图7 乙氧萘青霉素一级质谱图

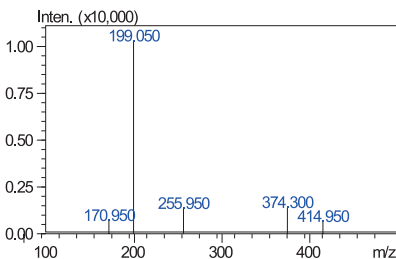


图8 乙氧萘青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

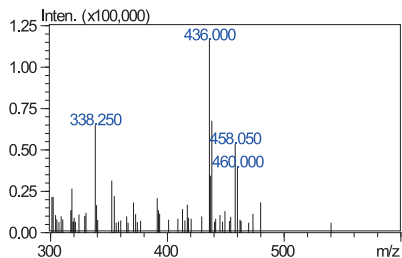


图9 邻氯青霉素一级质谱图

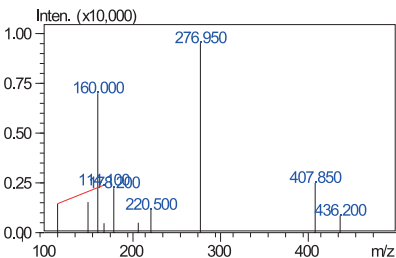


图10 邻氯青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

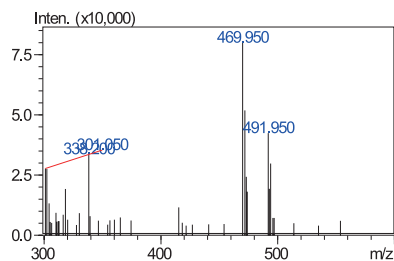


图11 双氯青霉素一级质谱图

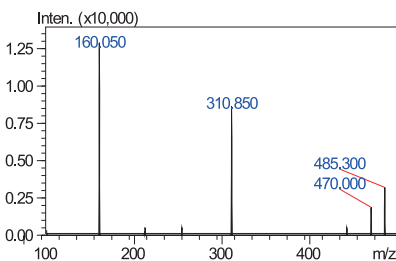


图12 双氯青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

2.2 牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图

空白牛奶样品的色谱图如图 13 所示，加标样品色谱图如图 14 所示。

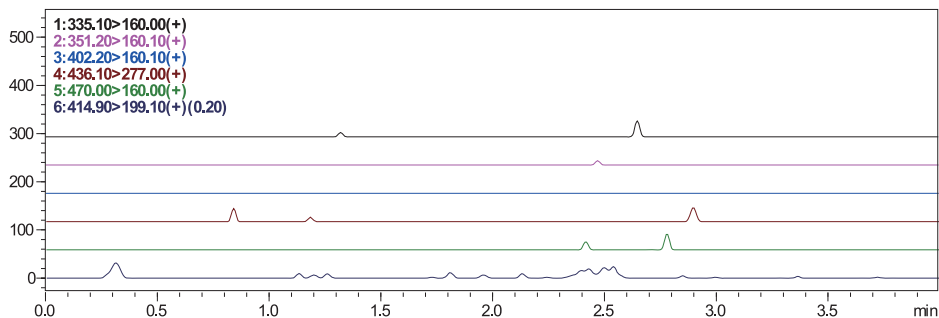


图13 牛奶空白基质样品的MRM色谱图

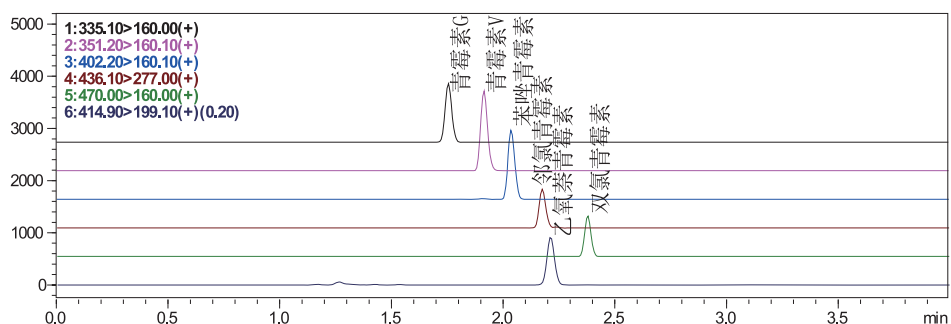


图14 基质加标样品的MRM色谱图 (1 ng/mL)

2.3 线性关系

将 0.2 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 15 至图 20 所示。青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉在 0.2~500 ng/mL 范围内校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

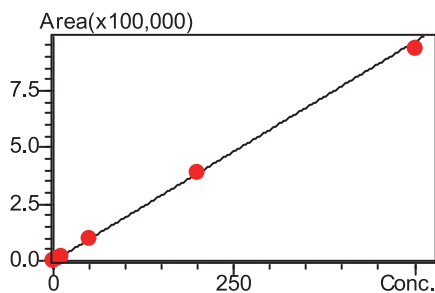


图15 青霉素G标准曲线

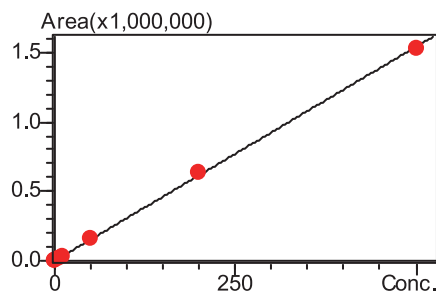


图16 青霉素V标准曲线

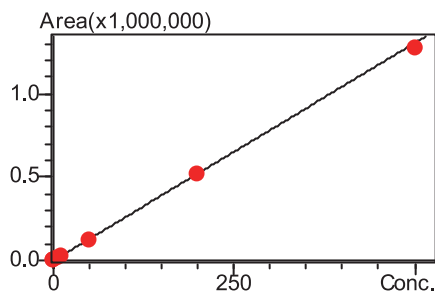


图17 苯唑青霉素标准曲线

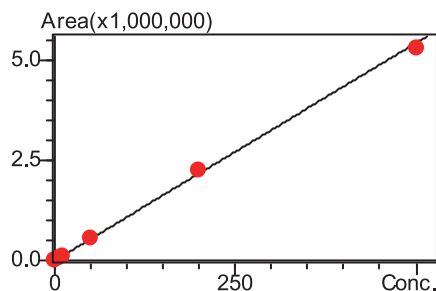


图18 乙氧萘青霉素标准曲线

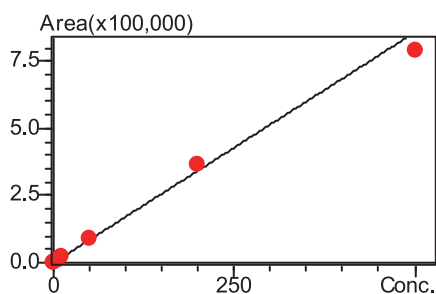


图19 邻氯青霉素标准曲线

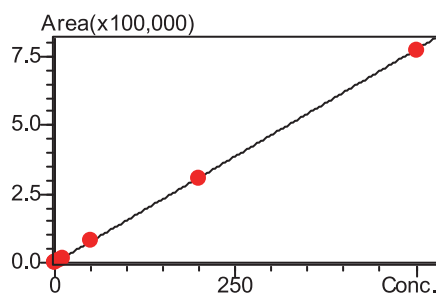


图20 双氯青霉素标准曲线

表3 六种β-内酰胺类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r
1	青霉素G	$Y = (1929.66)X + (-100.168)$	0.2~500	0.9979
2	青霉素V	$Y = (3084.31)X + (227.681)$	0.2~500	0.9999
3	苯唑青霉素	$Y = (2606.83)X + (-112.456)$	0.2~500	0.9978
4	乙氧萘青霉素	$Y = (10875.9)X + (229.853)$	0.2~500	0.9997
5	邻氯青霉素	$Y = (1715.38)X + (22.3400)$	0.2~500	0.9962
6	双氯青霉素	$Y = (1551.58)X + (68.1587)$	0.2~500	0.9990

2.4 精密度实验

对 5 ng/mL、50 ng/mL 和 200 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.12% 和 2.43~4.96% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (5 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)		RSD% (200 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
青霉素G	0.10	4.96	0.12	2.43	0.07	2.85
青霉素V	0.08	4.65	0.10	3.76	0.08	4.91
苯唑青霉素	0.09	4.67	0.09	4.64	0.06	3.99
乙氧萘青霉素	0.07	2.47	0.06	2.66	0.08	2.98
邻氯青霉素	0.08	4.02	0.08	3.33	0.06	2.26
双氯青霉素	0.08	4.76	0.06	3.17	0.03	3.55

2.5 灵敏度分析

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后稀释混标得到浓度为 0.2 ng/mL 的溶液进样分析，六种 β- 内酰胺类抗生素的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 5 所示。

表5 六种β-内酰胺类抗生素的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	青霉素G	23.62	0.025	0.085
2	青霉素V	30.21	0.020	0.066
3	苯唑青霉素	29.25	0.021	0.068
4	乙氧萘青霉素	53.19	0.011	0.038
5	邻氯青霉素	36.70	0.017	0.055
6	双氯青霉素	32.94	0.018	0.061

2.6 基质加标实验

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后加混标至 1 μg/kg, 平行 3 份样品测定回收率。具体结果如表 6, 样品加标回收率在 96.84 ~ 105.60% 之间。

表6 加标样的回收率结果 (n=3)

No.	样品名称	实测平均值 (μg/kg)	回收率 (%)
1	青霉素G	1.0560	105.60
2	青霉素V	1.0250	102.50
3	苯唑青霉素	0.9684	96.84
4	乙氧萘青霉素	1.0032	100.32
5	邻氯青霉素	1.0362	103.62
6	双氯青霉素	1.0500	105.00

结论

1.1 仪器

本应用建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定牛奶中六种 β-内酰胺类抗生素的方法。该方法在 2.5 min 内完成青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、乙氧萘青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉六种 β-内酰胺类抗生素的分离, 线性范围均为 0.2~500 ng/mL, 相关系数均在 0.996 以上。用处理过的牛奶基质配制 5 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL 的标准溶液考察重复性, 连续 6 次进样, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.12% 和 2.43~4.96% 之间, 仪器精密度良好。牛奶中六种 β-内酰胺类抗生素的定量限在 0.038~0.085 ng/mL 之间, 检出限在 0.011~0.025 ng/mL 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的特点, 适合牛奶中 β-内酰胺类抗生素的快速、高灵敏度检测。