

# 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳和猪肉中5种青霉素类抗生素

刘莉萍

(深圳职业技术学院, 广东 深圳 518055)

**摘要:** 建立一种用固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测牛乳和猪肉中苄星青霉素G、氨苄西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林5种青霉素类抗生素方法。样品经乙腈提取, Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取柱净化, 用高效液相色谱-串联质谱检测, 外标法定量。结果表明, 本方法5种青霉素在2.0~200 µg/L范围内呈良好线性关系, 线性相关系数大于0.999; 牛乳样品添加回收实验, 回收率为85.2%~122.7%, 相对标准偏差为3.43%~16.8% ( $n=6$ ); 猪肉样品添加回收实验在50 µg/kg和100 µg/kg添加水平, 除氨苄西林外, 回收率在94.3%~116.4%, 相对标准偏差为1.62%~5.09% ( $n=6$ )。方法定量限为1.0~2.0 µg/kg。该方法具有简便快捷、准确度高、定量限低的优点, 适用于牛乳和猪肉中青霉素类抗生素的测定。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱-串联质谱; 青霉素; 牛乳; 猪肉

## Determination of 5 Penicillin Residues in Milk and Pork by SPE-HPLC-MS-MS

LIU Li-ping

(Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

**Abstract:** A method was established for the determination of 5 penicillin residues in milk and pork by solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS-MS). The samples were extracted with acetonitrile, purified on a Bond Elut C<sub>18</sub> column by solid-phase extraction, and finally detected by HPLC-MS-MS and quantified by an external standard method. As a result, the method showed a good linearity with a correlation coefficient higher than 0.999 in the range from 2.0 to 200 µg/L for 5 penicillin compounds. The average recoveries of these five penicillins in milk were in the range of 85.2% to 122.7% with relative standard deviations (RSDs) of 3.43% to 16.8% ( $n=6$ ). As for pork samples spiked at 50 and 100 µg/kg, the average recoveries were between 94.3% and 116.4% except for ampicillin with RSDs of 1.62% to 5.09%. The limit of quantification (LOQ) was in the range of 1.0~2.0 µg/kg. In conclusion, the method is convenient, rapid, accurate and sensitive so that it can be applied to determinate penicillin residues in milk and pork.

**Key words:** solid-phase extraction; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS-MS); penicillins; milk; pork

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 24-0308-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201424059

青霉素类抗生素主要用于治疗革兰氏阳性菌引起的各种感染, 因高效低毒, 成本低, 在畜禽中广泛应用。据文献[1]报道, 青霉素可产生各种过敏反应, 严重的会引发过敏性休克, 同时还能产生耐药性, 对人体健康造成严重危害。因此世界各国对青霉的最大残留量 (maximum residue limits, MRL) 均提出了限量要求<sup>[2-3]</sup>, 我国农业部规定食用动物组织中氨苄青霉素的MRL均为50 µg/kg; 美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 规定青霉素类抗生素在各类农产品中的MRL不超过5 µg/kg。青霉素类抗生素的分析方法

主要有微生物法<sup>[4]</sup>、免疫分析法<sup>[5-7]</sup>、电化学分析法<sup>[8]</sup>、光学分析法<sup>[9-11]</sup>、毛细管电泳法<sup>[12]</sup>、高效液相色谱法<sup>[13-14]</sup>和液相色谱-质谱联用法<sup>[15-22]</sup>, 其中高效液相色谱-质谱联用因可弥补其他方法准确定性、高灵敏检测的困难, 而成为国际上广泛采用的青霉素类抗生素分析方法。本实验采用固相萃取-高效液相色谱-串联质谱 (solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, SPE-HPLC-MS-MS) 法同时检测牛乳和猪肉中青霉素类抗生素残留, 方法简便快捷、定量限低, 完全能满足兽残分析要求。

收稿日期: 2014-02-24

作者简介: 刘莉萍 (1962—), 女, 高级工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: maryliu@szpt.edu.cn

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甲醇、乙腈（均为色谱纯）；磷酸二氢钠、正己烷、磷酸、氢氧化钠、乙酸铵、氯化钠（均为分析纯）。

青霉素类抗生素标准品：氯唑西林、双氯西林、苄星青霉素G、氨苄西林和苯唑西林（纯度为96%~99%）德国Riedel-Dehaen公司；苄青霉素-D<sub>7</sub> 德国Dr. Ehrenstorfer公司。

### 1.2 仪器与设备

API 3000液相色谱-质谱仪（配有电喷雾离子源和1100高效液相色谱仪） 美国应用生物系统公司；LV型吹氮浓缩仪 美国Zymark公司；Minishaker MS1型旋涡混合器 德国IKA公司；UNIVERSAL 32R型低温离心机 德国Hettich公司；4000旋转蒸发仪 德国Heidolph公司；TF-123组织切碎机 日本Hitachi公司；POLYGRON PT3000型均质器 德国Brinkmann公司；Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取柱（500 mg，6 mL） 美国Varian公司。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 溶液的配制

0.15 mmol/L磷酸缓冲溶液（pH 8.5）：准确称取0.018 g磷酸二氢钠，用去离子水溶解，并使溶液总体积达到约950 mL，然后用磷酸或氢氧化钠溶液调节pH值至8.5，用去离子水定容至1 000 mL。

1:1乙腈溶液：500 mL乙腈与500 mL去离子水等体积混合。

标准储备溶液（100 mg/L）：分别称量经折算相当于10 mg（精确到0.1 mg）的各种青霉素标准品，用乙腈-水（50:50，V/V）溶液溶解，定容至100 mL。此溶液各种青霉素质量浓度分别为100 mg/L。溶液可在-18 ℃条件下避光保存6个月。

标准使用溶液（1 mg/L）：准确吸取1.00 mL标准储备溶液至100 mL容量瓶中，用乙腈-水（50:50，V/V）溶液定容。此溶液各种青霉素质量浓度分别为1 mg/L。溶液可在4 ℃条件下避光保存1个月。

标准工作溶液：用20 mmol/L磷酸缓冲溶液（pH 7.0）配制质量浓度分别为0、5、10、50、100、200 μg/L青霉素标准工作溶液（现用现配）。

#### 1.3.2 色谱条件

色谱柱：SunFire™ C<sub>18</sub>（150 mm×2.1 mm，3.5 μm）；柱温30 ℃；进样量20 μL；流速0.3 mL/min；流动相A为乙腈，流动相B为5 mmol/L乙酸铵溶液（pH 4.5），梯度洗脱程序：0~10.0 min，5%~80% A；10.0~11.0 min，80%~90% A；11.0~12.0 min，90% A；12.0~13.0 min，90%~5% A；13.0~18.0 min，5% A。

#### 1.3.3 质谱条件

电喷雾离子源；正离子扫描；多反应监测；喷雾电压：4 000 V；离子源温度：450 ℃；雾化气流量：11.00 L/min；气帘气流量：11.00 L/min；碰撞气流量：5.00 L/min；射入电压：10.00 V。其他质谱参数见表1。

表1 5种青霉素类抗生素的质谱分析参数  
Table 1 Mass spectrometric parameters for analysis of 5 penicillins

化合物名称	母离子/u	子离子/u	驻留时间/ms	去簇电压/V	聚焦电压/V	碰撞电/V	碰撞室射出电压/V
氨苄西林	348.13	207.00	50	-30	-120	-18	-9
		304.10	100	-30	-120	-12.5	-7
氯唑西林	434.10	293.00	50	-28	-100	-17	-7
		390.00	100	-30	-100	-12.9	-10
双氯西林	467.90	326.90	50	-29	-100	-18	-8
		423.90	100	-29	-100	-12.9	-11
苯唑西林	400.17	259.00	50	-26.9	-100	-18	-20
		356.00	100	-26.9	-100	-12.2	-20
苄星青霉素G	333.08	192.00	100	-27	-100	-14	-9
		289.00	100	-20	-100	-12	-9
苄青霉素-D <sub>7</sub>	340.0	199.0	50	-27	-100	-14.0	-9
		296.0	50	-20	-100	-12.0	-9

#### 1.3.4 样品处理

##### 1.3.4.1 猪肉试样

取代表性猪肉样品（应尽量避免取脂肪部分），用组织切碎机搅碎，均质处理。准确称取均质良好的样品2 g（精确到0.01 g）于15 mL具塞离心管中，加入苄青霉素-D<sub>7</sub>内标50 μg/kg，再加入2 mL磷酸缓冲溶液（50 mmol/L）和8 mL乙腈，涡旋2 min，在低于10 ℃条件下2 500×g离心10 min。上层清液转移到另一干净的50 mL具塞离心管中，分别加入8、5 mL乙腈进行提取，合并提取液。

##### 1.3.4.2 牛乳试样

准确取5 mL牛乳样品于50 mL具塞离心管中，称量和记录其质量。加入内标苄青霉素-D<sub>7</sub> 4 μg/kg，再加入5 mL磷酸缓冲溶液（50 mmol/L）和30 mL乙腈，涡旋2 min，在低于10 ℃条件下2 500×g离心10 min。取20 mL上清液到另一个干净的50 mL具塞离心管中，注意不要混入析出的乳脂肪。

#### 1.3.5 样品的净化

在提取液中加入10 mL正己烷，涡旋2 min，以5 000 r/min离心5 min，去除上层有机相，正己烷重复去脂一次。于45 ℃水浴旋蒸至约5 mL，加入5 mL 0.15 mol/L磷酸缓冲溶液（pH 8.5），混合均匀。

取Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取柱，依次用3 mL甲醇、3 mL水处理和3 mL磷酸缓冲溶液平衡。当溶剂液面达到小柱吸附层表面时，立即将上述提取液加入萃取柱中（以1 mL/min流速），依次用3 mL 50 mmol/L磷酸缓冲溶液（pH 8.0）和3 mL水洗柱，最后用3 mL乙腈-水

(1:1, *V/V*) 洗脱, 定容至5.0 mL。过0.22 μm滤膜供HPLC-MS-MS分析。

2 结果与分析

2.1 提取液的选择

选择去离子水、4%氯化钠溶液和磷酸二氢钠缓冲液(0.15 mol/L)作为提取液, 5种青霉素测定回收率实验, 结果见表2。

表2 不同提取液对5种青霉素回收率的影响

Table 2 Effects of different extractants on recoveries of 5 penicillins %			
青霉素名称	去离子水	4%氯化钠溶液	磷酸二氢钠缓冲液
氨苄西林	21.8	25.8	89.3
苄星青霉素G	90.2	94.8	88.9
苯唑西林	94.6	102.2	89.6
氯唑西林	87.8	97.6	87.8
双氯西林	100.8	95.4	95.3

由表2可见, 选择去离子水和4%氯化钠溶液作为提取液时, 氨苄西林的回收率小于30%, 其他4种青霉素的回收率均在87%~101%之间, 故此应选用磷酸二氢钠缓冲液作为5种青霉素提取液。

由于磷酸二氢钠缓冲溶液浓度和pH值对氨苄西林回收率的影响较大, 分别比较磷酸二氢钠浓度和pH值对氨苄西林回收率的影响, 见表3。

表3 不同浓度磷酸二氢钠缓冲溶液和pH值对氨苄西林回收率的影响  
Table 3 Effect of buffer concentration and pH on recoveries of ampicillins

磷酸二氢钠 浓度/(mol/L)	氨苄西林 回收率/%	pH*	氨苄西林 回收率/%
0.03	68.5	4.2	52.0
0.05	89.0	5.1	55.4
0.07	96.6	6.0	57.5
0.08	95.3	6.9	75.6
0.10	87.9	7.5	89.3
0.12	96.5	8.0	95.4
0.15	97.4	8.5	97.6
0.17	96.6	9.0	94.0
0.20	95.2	9.5	97.5

注: \*.磷酸二氢钠缓冲溶液浓度为0.15 mol/L。

由表3可见, 磷酸二氢钠浓度在0.03~0.1 mol/L之间, 回收率和重复性不好; 当磷酸二氢钠浓度大于0.17 mol/L时, 峰形变宽, 流速减慢。本方法选择0.15 mol/L的磷酸二氢钠缓冲溶液作为提取液, pH值为8.5。

2.2 固相萃取柱及洗脱条件的选择

2.2.1 固相萃取柱的选择

分别选用Oasis HLB固相萃取柱、Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取柱、ENVI-18固相萃取柱、Octadecyl C<sub>18</sub>固相萃取柱、LiChrolut EN固相萃取柱和Sep-Pak C<sub>18</sub>固相萃取柱对

5种青霉素类抗生素的提取效率和净化效果进行比较, 结果表明: Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取柱提取效率和净化效果较好, 重复性好; ENVI-18固相萃取柱、Octadecyl C<sub>18</sub>固相萃取柱、LiChrolut EN固相萃取柱和Oasis HLB固相萃取柱回收率均良好, 但样品溶液过柱速度较慢, 样品预处理时间长, 不同批次之间回收率有显著差异; Sep-Pak C<sub>18</sub>固相萃取柱回收率小于60%, 净化效果不理想。本方法选用Bond Elut C<sub>18</sub>固相萃取柱净化样品。

2.2.2 洗脱条件的选择

本方法选用乙腈-水(1:1, *V/V*)为固相萃取样品洗脱剂, 比较不同用量洗脱剂对5种青霉素回收率的影响, 见表4。

表4 乙腈-水洗脱剂用量对5种青霉素回收率的影响

Table 4 Effect of elution with different amounts of acetonitrile-water on recoveries of 5 penicillins %				
青霉素名称	用量/mL			
	1	2	3	4
氨苄西林	16.5	72.8	98.4	97.8
苯唑西林	85.9	94.0	101.3	97.5
苄星青霉素G	82.6	93.0	95.6	97.2
氯唑西林	82.0	93.3	97.3	101.2
双氯西林	84.6	92.8	102.2	97.8

由表4可见, 当洗脱剂用量小于3 mL时, 氨苄西林的回收率偏低, 其他4种青霉素的回收率为82.0%~94.0%; 当洗脱剂用量为3 mL时, 5种青霉素回收率为95.6%~102.2%, 满足工作要求。洗脱剂用量为4 mL时, 5种青霉素回收率没有显著提高。因此, 本方法使用3 mL乙腈-水(1:1, *V/V*)作为固相萃取柱的洗脱剂。

2.3 液相色谱分析柱的选择

分别使用μBondapak C<sub>18</sub>(300 mm×4.0 mm, 10 μm)色谱柱和SunFire™ C<sub>18</sub>(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)色谱柱对5种青霉素分析进行比较。实验发现, 这两种色谱柱的灵敏度均能满足要求, 但μBondapak C<sub>18</sub>色谱柱对氯唑西林分离度不如SunFire™ C<sub>18</sub>色谱柱好。μBondapak C<sub>18</sub>柱流速在1.5 mL/min时, 进质谱仪之前必须分流, 但分流时对5种青霉素结果的测定会产生一定误差; 而使用SunFire™ C<sub>18</sub>柱则不需分流, 定量准确度优于μBondapak C<sub>18</sub>柱。本方法选用SunFire™ C<sub>18</sub>(150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)色谱柱为5种青霉素的分析柱。

2.4 线性范围和方法定量限

配制含苯唑西林质量浓度为1.0~200 μg/L; 苄星青霉素G、氨苄西林、氯唑西林、双氯西林质量浓度分别为2.0~400 μg/L的样品基质混合标准溶液。在选定的条件下进行测定, 进样量为20 μL, 以各青霉素与苄星青霉素-D<sub>7</sub>峰面积之比为纵坐标, 各青霉素质量浓度为横坐标进行



线性回归分析。采用空白样品中添加青霉素抗生素的方法,以 $R_{SN}$ 不小于10的方法确定定量限,5种青霉素的线性方程、相关系数和定量限见表5。

表5 5种青霉素线性方程、相关系数和定量限

青霉素名称	检测范围/( $\mu\text{g/L}$ )	线性方程	相关系数( $R^2$ )	定量限/( $\mu\text{g/kg}$ )
苄星青霉素G	2.0~400	$Y=6.671X+1.478$	0.999 2	2.0
氨苄西林	2.0~400	$Y=13.803X+2.176$	0.999 2	2.0
苯唑西林	1.0~200	$Y=16.602X+934$	0.999 4	1.0
氯唑西林	2.0~400	$Y=10.000X+1.065$	0.999 7	2.0
双氯西林	2.0~400	$Y=6.411X+699$	0.999 5	2.0

## 2.5 方法的回收率和精密度

用空白样品进行加标回收率和和精密度实验,样品中添加3个不同水平的5种青霉素后,按本方法提取和净化,用HPLC-MS-MS进行测定,其回收率和精密度结果见表6。

表6 牛乳和猪肉中5种青霉素加标回收率和精密度( $n=6$ )

Table 6 Recoveries and precision (RSDs) of 5 penicillins from spiked milk and pork ( $n=6$ )

青霉素名称	牛乳			猪肉		
	添加量/ ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率/%	相对标准偏差/%	添加量/ ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率/%	相对标准偏差/%
氨苄西林	2	93.2	16.0	5	52.8	4.72
	4	85.3	6.31	50	71.0	5.09
	8	85.2	8.54	100	79.6	2.93
氯唑西林	2	99.0	16.8	5	60.2	13.5
	4	98.4	6.52	50	94.3	2.42
	8	98.3	6.35	100	105.8	2.96
双氯西林	2	116.8	9.85	5	90.0	9.25
	4	122.7	5.85	50	99.2	4.42
	8	121.2	3.43	100	110.8	4.03
苯唑西林	2	97.4	14.7	5	69.0	8.46
	4	101.1	11.2	50	102.7	4.48
	8	105.6	5.37	100	116.4	1.62
苄星青霉素G	2	94.2	14.2	5	68.2	10.5
	4	91.0	6.82	50	95.1	4.67
	8	91.5	6.18	100	104.8	4.32

由表6可见,对于牛乳样品,2、4  $\mu\text{g/kg}$ 和8  $\mu\text{g/kg}$ 添加水平5种青霉素加标回收率在85.2%~122.7%之间,相对标准偏差均在3.43%~16.8%之间;对于猪肉样品,5  $\mu\text{g/kg}$ 添加水平,5种青霉素加标回收率均较低;50  $\mu\text{g/kg}$ 和100  $\mu\text{g/kg}$ 添加水平,除氨苄西林外,回收率为94.3%~116.4%,相对标准偏差均在1.62%~5.09%,符合兽药残留分析要求。

## 3 结论

猪肉组织的基质非常复杂,其中的微量青霉素很难检测。本实验采用SPE-HPLC-MS-MS分析技术建立了牛

乳和猪肉中5种青霉素类抗生素残留的检测和确证方法,该方法适用于牛乳和猪肉中青霉素类抗生素的定量检测。

## 参考文献:

- [1] 程中华. 再谈滥用青霉素[J]. 中国药业, 1998, 7(4): 31.
- [2] 农业部. 农业部2002年235号公告: 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [3] 陈卓婧, 阎淑男, 夏澜, 等. 农产品中青霉素检测技术研究进展[J]. 浙江农业科学, 2013(11): 1476-1479.
- [4] 李延华, 王伟君, 张兰威, 等. 牛乳中青霉素G残留三种检测方法的比较研究[J]. 食品科学, 2008, 29(3): 325-327.
- [5] SAMSONVA Z H, SHCHELOKOVA O S, IVANOVA N L, et al. Enzyme immunoassay of ampicillin in milk[J]. Prikl Biokhim Mikrobiol, 2005, 41(6): 668-675.
- [6] 杨鹏华, 林敏, 倪凤娥. 一种牛乳中青霉素G残留ELISA检测方法的建立[J]. 食品工业, 2010, 31(4): 96-98.
- [7] 李效君, 李兰, 马洁, 等. 电化学免疫法测定猪肉组织中青霉素的研究[J]. 化学传感器, 2009, 29(1): 25-31.
- [8] 刘平, 朱亚琪, 马洁, 等. 氧化苏木精复合电极测定牛乳中残留青霉素[J]. 应用化学, 2006, 23(5): 519-523.
- [9] 毕莉, 张丹扬, 张尹, 等. 催化动力学光度法测定青霉素G及其机理研究[J]. 分析试验室, 2011, 30(5): 22-25.
- [10] CHIVULESCU A I, BADEA-DONI M, CHEREGI M C, et al. Determination of amoxicillin, ampicillin and penicillin using a flow injection analysis method with chemiluminescence detection[J]. Revue Roumaine de Chimie, 2011, 56(3): 247-254.
- [11] 马小红, 赵武奇, 谷月, 等. 牛乳中青霉素近红外光谱定量分析[J]. 中国酿造, 2012, 31(12): 124-127.
- [12] 陈玢玢, 孟欢欢, 祁克宗, 等. 高效毛细管电泳法检测鸡肉中青霉素类药物残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2011, 47(11): 1293-1298.
- [13] 叶能胜, 谷学新, 张琦. 固相萃取-高效液相色谱法检测牛乳和猪肉中5种 $\beta$ -内酰胺类抗生素[J]. 分析试验室, 2010, 9(6): 73-77.
- [14] XIE Kaizhou, JIA Longfei, XU Dong, et al. Simultaneous determination of smoxycillin and sampicillin in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using pre-column derivatization[J]. Journal of Chromatographic Science, 2012, 50(7): 620-624.
- [15] 郭萌萌, 李兆新, 谭志军, 等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水产品中的8种青霉素残留[J]. 分析测试学报, 2011, 30(9): 969-975.
- [16] 范莹莹, 其鲁, 杨树民. 高效液相色谱-质谱联用法检测猪肉中5种青霉素的残留量[J]. 分析试验室, 2007, 26(12): 76-79.
- [17] 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[J]. 中国乳品工业, 2013, 41(5): 48-51.
- [18] HAMMEL Y A, MOHAMED R, GREMAUD E, et al. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1177(1): 58-76.
- [19] 方慧文, 卢跃鹏, 周原. 超高效液相色谱-串联质谱法同时快速测定牛乳中不同类型的11种兽药残留[J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 262-266.
- [20] 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.
- [21] 李学民, 曹彦忠, 张近杰, 等. 液相色谱-串联质谱法测定河豚鱼和鳗鱼中9种青霉素类抗生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(4): 1165-1172.
- [22] 陈瑞春, 贾海涛, 艾连峰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳和奶粉中9种青霉素类药物残留量[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 249-252.