

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.08.06

# UPLC-MS/MS 检测牛奶中 19 种 $\beta$ -内酰胺类药物残留的两种前处理方法对比试验

王淑婷<sup>1</sup>, 刘坤<sup>1</sup>, 刘静<sup>1</sup>, 李月华<sup>1</sup>, 王玉东<sup>1</sup>, 焉华骏<sup>2</sup>,  
王晓茵<sup>1</sup>, 曹旭敏<sup>1</sup>, 秦立得<sup>1</sup>, 孙晓亮<sup>1</sup>, 宋翠平<sup>1\*</sup>, 赵思俊<sup>1\*</sup>

(1. 中国动物卫生与流行病学中心, 山东青岛 266032; 2. 青岛华测检测技术股份有限公司, 山东青岛 266100)

[收稿日期] 2022-01-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 08-0038-08 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 对比用超滤离心管和 HLB-SPE 柱两种不同前处理方法检测牛奶中 19 种  $\beta$ -内酰胺类药物残留的试验研究, 确立一种简单、快捷, 回收效果好的前处理方法。使用 19 种药物的混合标准溶液为外标, 样品经沉淀蛋白, 离心后同时用 HLB-SPE 柱和超滤离心管净化、富集处理, 在 Waters Acquity UPLCTM BEH C18 柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) 中分离, 以 0.1% 甲酸水溶液/乙腈为流动相, 经梯度洗脱将 19 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素完全分离; 采用正离子扫描方式确定丰度比最高的两对离子作为监测离子, 进行 MRM 模式定性定量分析。结果表明: 上述 19 种药物的检测限 (LOD) 为 0.1 ~ 1.0  $\mu$ g/kg, 定量限 (LOQ) 为 0.3 ~ 3.0  $\mu$ g/kg, 在 10.0 ~ 100.0  $\mu$ g/kg 线性范围内, 相关系数  $r$  均大于 0.99, 且用超滤离心管对牛奶进行净化浓缩处理比 HLB 柱的回收效果好, 回收率均在 60.7% ~ 96.6%。超滤离心管的前处理方法简单, 试剂消耗少, 测定时间短, 回收率好, 结果准确可靠, 可成功应用于牛奶中  $\beta$ -内酰胺类药物的残留检测。

**[关键词]** 牛奶;  $\beta$ -内酰胺类; 残留; 前处理

## Comparative Test of Two Pretreatment Methods for Detection of 19 $\beta$ -lactam Drugs Residues in Milk by UPLC-MS/MS

WANG Shu-ting<sup>1</sup>, LIU Kun<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>1</sup>, LI Yue-hua<sup>1</sup>, WANG Yu-dong<sup>1</sup>, YAN Hua-jun<sup>2</sup>,  
WANG Xiao-yin<sup>1</sup>, CAO Xu-min<sup>1</sup>, QIN Li-de<sup>1</sup>, SUN Xiao-liang<sup>1</sup>, SONG Cui-ping<sup>1\*</sup>, ZHAO Si-jun<sup>1\*</sup>

(1. China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, Shandong 266032, China;

2. Centre Testing International Corporation, Qingdao, Shandong 266032, China)

Corresponding author: SONG Cui-ping, E-mail: 157569253@qq.com; ZHAO Si-jun, E-mail: zhaosjun@126.com

基金项目: 中国动物卫生与流行病学中心科技创新基金项目 (2021221200)

作者简介: 王淑婷, 硕士研究生, 从事畜禽产品质量安全研究。

通讯作者: 宋翠平, E-mail: 157569253@qq.com; 赵思俊, E-mail: zhaosjun@126.com

**Abstract:** This study compared ultrafiltration centrifuge tube with HLB – SPE column in two different pretreatment methods of detecting 19  $\beta$  – lactam drugs residues in milk, to establish a simple, fast, good recovery pretreatment method. The samples were separated on an Acquity UPLCTM BEH C18 column (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu$ m) after centrifugation with an UPLCTM SPE column and an ultrafiltration centrifuge for purification and enrichment. 19  $\beta$  – lactam antibiotics were separated by gradient elution using 0.1% formic acid aqueous solution/acetonitrile as mobile phase. Positive ion scanning method was used to determine the two pairs of ions with the highest abundance ratio as monitoring ions, and qualitative and quantitative analysis was carried out by MRM mode. Results: The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the 19 drugs were 0.1 ~ 1.0  $\mu$ g/kg and 0.3 ~ 3.0  $\mu$ g/kg respectively. The correlation coefficients  $r$  were all greater than 0.99 within the linear range of 10.0 ~ 100.0  $\mu$ g/kg. The purification and concentration of milk by ultrafiltration centrifuge was better than that by HLB column, and the recovery rate was 60.7% ~ 96.6%. The pretreatment method of ultrafiltration centrifugal tube was simple, the reagent consumption was less, the determination time was short, the recovery rate was good, the result was accurate and reliable, and it can be successfully used for the detection of  $\beta$  – lactam drug residues in milk.

**Key words:** milk;  $\beta$  – lactam; residual; pretreatment

$\beta$  – 内酰胺类抗生素 ( $\beta$  – lactam antibiotics) 是指化学结构中含有  $\beta$  – 内酰胺环的一类抗生素, 主要包括青霉素类和头孢菌素类, 其作用特点是能够抑制细菌黏肽转肽酶的活性, 从而阻止细菌细胞壁的合成, 呈现杀菌活性<sup>[1]</sup>。 $\beta$  – 内酰胺中四元环的存在, 使得这些化合物的理化性质与其他类的抗生素有较大不同<sup>[2]</sup>。在奶牛养殖业中,  $\beta$  – 内酰胺类抗生素常被用于医治奶牛的乳腺炎, 由于其使用广泛, 可能导致在牛奶中存在残留<sup>[3]</sup>。牛奶中的抗生素残留是乳制品生产过程中一个严重的健康和技术问题<sup>[4]</sup>。随着新药研究的不断更新, 建立先进的牛奶中  $\beta$  – 内酰胺分析方法已成为残留监控的重点问题。在药物残留分析检测的过程中, 对样品的前期处理非常重要, 也是整个检测过程中最可能出现误差的环节, 处理得当可以提高对样品分析的准确性, 所以优化前处理技术, 保证多种药物的回收效果和试验结果的精密度是建立检测方法的关键<sup>[5]</sup>。在报道的方法中, Oasis HLB 柱常被用于  $\beta$  – 内酰胺类药物提取液的净化。张琦<sup>[6]</sup>等用阿莫西林、头孢氨苄、氨苄西林和青霉素 V 等药物的标准混合液对 HLB 柱、C18 柱、MAX 柱的净化效果进行对比, 结果表明 HLB 柱对所测药物的保留能力和重现性最好, 回收率最高, 回收率为 34% ~ 93%,

4 种药物除了阿莫西林外, 其余 3 种抗生素的平均回收率均高于 70%。超滤 (Ultrafiltration, UF) 是一种压力驱动系统<sup>[7]</sup>, 通过仅允许低于某个分子量截止值的小分子通过膜来实现与大分子物质分离的目的<sup>[8]</sup>。膜在食品工业中的应用主要集中在乳清、牛奶、葡萄酒、啤酒、水果和蔬菜汁等几种食品和副产品的分离、分馏、纯化、澄清和浓缩中<sup>[9-11]</sup>。张秀尧等<sup>[12]</sup>使用超滤离心法, 先用乙腈对牛奶中  $\beta$  – 内酰胺类药物进行提取, 提取液经超滤管离心净化处理, 通过超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱快速测定牛奶中 53 种  $\beta$  – 内酰胺类抗生素及其代谢产物的残留量。相关系数均优于 0.9911, 平均加标回收率在 71% ~ 121% 之间, 相对标准偏差为 1.7% ~ 19%。本试验在已建立的 UPLC – MS/MS 仪器检测法的基础上, 分别用超滤离心浓缩管与 Oasis HLB 柱对牛奶样品进行净化浓缩, 目的为确立一种方法简单, 试剂消耗少, 测定时间短, 回收效果好, 结果准确可靠的前处理方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

1.1.1 牛奶样品 超市购买。经实验室分析检测, 购买的牛奶样品中未检出  $\beta$  – 内酰胺类药物, 可作为空白样品使用。

1.1.2 标准物质 青霉素 G (PEN - G, 纯度 99.5%)、青霉素 V (PEN - V, 纯度 99.0%)、氯唑西林 (LZXL, 纯度 97.0%)、双氯西林 (SLXL, 纯度 99.5%)、氟氯西林 (FLXL, 纯度 91.0%)、萘夫西林 (NFXL, 纯度 91.0%)、头孢哌酮 (TBPT, 纯度 94.0%), 上述 7 种标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 苯唑西林 (BZXL, 纯度 99.5%)、甲氧西林 (JYXL, 纯度 91.4%)、头孢地尼 (TBDN, 纯度 98.0%)、美罗培南 (MLPN, 纯度 98%)、多尼培南 (DNPN, 纯度 98%)、青霉噻唑酸 V (QM - SZS - V, 纯度 95.0%) 购自加拿大 Toronto Research chemicals INC 公司; 美西林 (MXL, 纯度 90.0%)、哌拉西林 (PLXL, 纯度 94.4%)、美洛西林 (MLXL, 纯度 95.10%)、头孢噻吩 (TBSFEN, 纯度 94.7%) 均购自 USP 公司; 阿洛西林 (ALXL, 纯度 93.74%) 购自中国药品生物制品检定所; 头孢匹林 (TBPLin, 纯度 99.6%) 购自英国 British Pharmacopeia 公司。

1.1.3 试剂 乙腈, 色谱纯, 美国 Merck 公司出品。

1.1.4 主要仪器设备 Acquity™ UPLC - Xevo TQMS UPLC - MS/MS 仪 (美国 Waters 公司); 固相萃取设备 (Wat 200677, 美国 Waters 公司); 超滤离心浓缩管 (0.2  $\mu\text{m}$  Supor®, Aqua, MCPM02C67, 美国 PALL 公司); Milli - Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司出品; 高速冷冻离心机; 数控超声波清洗仪; 冰箱; 漩涡混合器;  $\text{N}_2$  蒸发仪。

超滤离心管: 体积为 6 mL, 截留分子量 (MWCO) 为 0.2  $\mu\text{m}$  和 0.45  $\mu\text{m}$ ; 体积为 20 mL, 截留分子量 (MWCO) 为 3、10 kD, 购自美国 PALL 公司。新超滤管在使用前先加入超纯水, 水量完全过膜, 放置冰浴或冰箱里预冷几分钟, 再将水倒出, 加入前处理液。

### 1.1.5 溶液的配制

1.1.5.1 标准储备溶液配制 (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) 准确称取适量的  $\beta$  - 内酰胺类药物标准品到棕色容量瓶中, 分别用 50% 乙腈水溶解并定容至 10 mL, 配成 1000  $\mu\text{g/mL}$  的标准储备液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏保存。

### 1.1.5.2 混合标准储备溶液配制 (10.0 $\mu\text{g/mL}$ )

从冰箱中取出  $\beta$  - 内酰胺类药物标准储备液 (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) 放至室温, 分别准确吸取 250  $\mu\text{L}$  于 25 mL 容量瓶中, 加 50% 乙腈水稀释至刻度, 配成 10.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏保存。

### 1.1.5.3 混合标准工作溶液配制 (1.0 $\mu\text{g/mL}$ )

从 10.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液中取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加 50% 乙腈水稀释至刻度, 配成 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的标准工作液, 即配即用。

1.1.5.4 流动相配制 流动相 A: 配制 0.1% 甲酸 (V/V) 水溶液, 甲酸与超纯水按体积比 1:1000 混合。流动相 B: 乙腈; 使用前将流动相 A、B 分别超声 5 min, 现用现配。

1.1.5.5 复溶液配制 乙腈与超纯水按体积比 1:5 混合, 现用现配。

1.1.6 灵敏度的考察 用 1.1.5.5 项确定的复溶液制备不同浓度的混合标准溶液, 用实验室已建立的 UPLC - MS/MS 仪器检测法进行分析, 重复 6 次。以信噪比  $S/N = 3$  时为检测限 (LOD), 信噪比  $S/N = 10$  时为定量限 (LOQ)。

1.1.7 标准曲线的绘制 依照 10、20、50、100  $\mu\text{g/kg}$  的浓度分别准确吸取 19 种药物的混合标准工作液, 氮气吹干, 用水 - 乙腈 (80/20, V/V) 水复溶, 制备系列标准溶液, 进行 UPLC - MS/MS 分析, 以定量离子的峰面积为纵坐标 ( $y$ ), 标准品添加浓度为横坐标 ( $x$ ) 绘制标准曲线, 并求回归方程和相关系数。

1.1.8 精密度的考察 取 50 ng/mL 的标准混合溶液置于 1 mL 的进样瓶中, 3 个平行, 重复 3 次, 测定各药物的峰面积积分值, 通过回归方程计算各物质浓度, 计算各药物浓度的  $RSD$  ( $n = 3$ ), 以  $RSD$  来考察方法的精密度。

## 1.2 方法

### 1.2.1 UPLC - MS/MS 检测法

1.2.1.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC™ BEH  $\text{C}_{18}$  柱 (100 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相: A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为乙腈溶液, 采用梯度洗脱, 条件如表 1。进样量: 5  $\mu\text{L}$ ; 柱温: 35  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速: 0.3 mL/min。

表 1 梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions

| 时间/<br>(Time,min) | 0.1% 甲酸溶液/<br>(Formic acid solution,% ) | 乙腈/<br>(Acetonitrile,% ) |
|-------------------|-----------------------------------------|--------------------------|
| Initial           | 90                                      | 10                       |
| 1.5               | 90                                      | 10                       |
| 2.5               | 80                                      | 20                       |
| 3.5               | 60                                      | 40                       |
| 4.8               | 60                                      | 40                       |
| 5.5               | 10                                      | 90                       |
| 5.7               | 90                                      | 10                       |

表 2 质谱 MRM 方式检测参数

Tab 2 Mass spectrum of MRM detection parameter

| 药物      | 母离子<br>( <i>m/z</i> ) | 子离子<br>( <i>m/z</i> ) | 锥孔<br>电压/V | 碰撞<br>能量 /eV | 药物           | 母离子<br>( <i>m/z</i> ) | 子离子<br>( <i>m/z</i> ) | 锥孔<br>电压/V | 碰撞<br>能量/eV |
|---------|-----------------------|-----------------------|------------|--------------|--------------|-----------------------|-----------------------|------------|-------------|
| PEN – G | 335.3                 | 160.1 *               | 16         | 12           | MLXL         | 562.5                 | 398.4 *               | 40         | 24          |
|         |                       | 176.1                 | 16         | 12           |              |                       | 403.4                 | 40         | 20          |
| PEN – V | 351.3                 | 160.1 *               | 16         | 10           | TBPLin       | 424.1                 | 151.9 *               | 26         | 22          |
|         |                       | 114.1                 | 16         | 36           |              |                       | 292.1                 | 26         | 14          |
| BZXL    | 402.3                 | 160.1 *               | 16         | 16           | TBDN         | 396.2                 | 126.0 *               | 28         | 32          |
|         |                       | 243.2                 | 16         | 14           |              |                       | 227.1                 | 28         | 14          |
| LZXL    | 436.4                 | 160.1 *               | 20         | 12           | TBPT         | 646.5                 | 148.1 *               | 18         | 58          |
|         |                       | 277.2                 | 20         | 12           |              |                       | 143.2                 | 18         | 48          |
| SLXL    | 470.3                 | 160.1 *               | 16         | 14           | PLXL         | 518.2                 | 143.1 *               | 22         | 26          |
|         |                       | 311.2                 | 16         | 16           |              |                       | 159.9                 | 22         | 10          |
| FLXL    | 454.4                 | 160.1 *               | 18         | 14           | MLPN         | 384.3                 | 114.2 *               | 22         | 14          |
|         |                       | 114.1                 | 18         | 42           |              |                       | 68.1                  | 22         | 26          |
| NFXL    | 415.4                 | 199.1 *               | 16         | 18           | DNPN         | 421.2                 | 112.1 *               | 24         | 40          |
|         |                       | 171.1                 | 16         | 38           |              |                       | 274.2                 | 24         | 18          |
| MXL     | 326.2                 | 167.0 *               | 24         | 22           | QM – SZS – V | 309.1                 | 128.0 *               | 28         | 26          |
|         |                       | 139.0                 | 24         | 32           |              |                       | 174.0                 | 28         | 16          |
| JYXL    | 381.4                 | 165.2 *               | 22         | 24           | TBSFEN       | 419.2                 | 204.1 *               | 24         | 18          |
|         |                       | 107.1                 | 22         | 64           |              |                       | 359.2                 | 24         | 12          |
| ALXL    | 462.2                 | 218.1 *               | 38         | 12           |              |                       |                       |            |             |
|         |                       | 246.1                 | 38         | 20           |              |                       |                       |            |             |

\* 为定量离子对中性离子。

心 10 min,上清液转移至洁净试管内,再加 4 mL 乙腈重复提取一次,合并上清。分别转移 5 mL 上清液于另一新管中,均于 45 ℃ 氮气吹干,用 3 mL

1.2.1.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI + ),正离子扫描,多反应监测(MRM)模式,毛细管电压:2.5 kV;离子源温度 150 ℃,雾化气流 1000 L/h,锥孔气流 50 L/h,雾化室温度 450 ℃。质谱条件如表 2。

1.2.2 两种前处理方法对比试验

1.2.2.1 HLB – SPE 柱法的样品提取 分别取空白牛奶样品(经 1.1.1 项中确认可作为空白样品使用)1 个、回收(添加浓度为 50 ng/mL)3 个牛奶样品各 2 mL 于 50 mL 离心管中,加 6 mL 乙腈,涡旋混匀,超声提取 20 min,4℃ 条件下 10000 r/min 离

20% 乙腈溶解,分别作样液备用。

1.2.2.2 HLB – SPE 柱法的净化与浓缩 依次用 3 mL 乙腈活化,3 mL 水平衡,3 mL 样液上样,依次

用 3 mL 水淋洗,3 mL 乙腈洗脱后,收集洗脱液,45 ℃下 N<sub>2</sub> 吹干,加 1 mL 水-乙腈(80/20,V/V)复溶,过 0.2 μm 滤膜,供 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.2.3 超滤离心管法的样品提取 分别取空白(经 1.1.1 项中确认可作为空白样品使用)1 个、回收(添加浓度为 50 ng/mL)3 个牛奶样品各 2 mL 于 50 mL 离心管中,加 6 mL 乙腈,涡旋混匀,超声提取 10 min,4 ℃条件下 10000 r/min 离心 10 min,上清液转移至洁净试管内,再加 4 mL 乙腈重复提取一次,合并上清。分别于 45 ℃氮气吹干,用 1 mL 20% 乙腈溶解,分别作样液备用。

1.2.2.4 超滤离心管法的净化与浓缩 将样液倒

入超滤离心浓缩管中,4 ℃条件下 10000 r/min 离心 10 min,取滤液装瓶,供 UPLC-MS/MS 分析。

## 2 结果与分析

2.1 线性关系和灵敏度 19 种 β-内酰胺类药物的线性关系和灵敏度结果见表 3。结果表明,19 种药物的灵敏度好,在线性范围内相关系数均大于 0.99,线性关系良好,能够满足定性和定量分析的要求。

2.2 精密度 测得的 β-内酰胺类药物的浓度及计算的标准偏差见表 4,结果表明,19 种分析药物的日内相对标准偏差(RSD)为 0.68%~3.47%,日间的相对标准偏差(RSD)为 0.89%~4.11%,说明试验 19 种药物的测定精密度良好。

表 3 19 种 β-内酰胺类药物的线性范围、线性方程、相关系数、检测限和定量限

| Tab 3 Linear ranges, Regression equations, Correlation coefficient, LOD and LOQ of 19 β-lactams |                             |                     |                  |                            |                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|----------------------------|----------------------------|
| 化合物                                                                                             | 线性范围/(μg/kg <sup>-1</sup> ) | 线性方程                | 相关系数( <i>r</i> ) | LOD/(μg·kg <sup>-1</sup> ) | LOQ/(μg·kg <sup>-1</sup> ) |
| MXL                                                                                             | 10.0~100.0                  | $Y=865.40X-70.56$   | 0.998            | 0.1                        | 0.3                        |
| TBPLN                                                                                           | 10.0~100.0                  | $Y=1339.93X-130.99$ | 0.995            | 0.1                        | 0.3                        |
| SLXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=991.15X-47.97$   | 0.992            | 1.0                        | 3.0                        |
| LZXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=594.32X+108.99$  | 0.989            | 0.1                        | 0.3                        |
| MLXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=863.50X-418.73$  | 0.993            | 0.5                        | 1.5                        |
| NFXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=685.90X+82.80$   | 0.999            | 0.1                        | 0.3                        |
| FLXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=590.51X-47.30$   | 0.998            | 0.1                        | 0.3                        |
| QM-SZS-V                                                                                        | 10.0~100.0                  | $Y=4884.10X-334.54$ | 0.997            | 0.5                        | 1.5                        |
| BZXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=1176.86X-22.79$  | 0.996            | 0.1                        | 0.3                        |
| TBDN                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=325.73X-178.91$  | 0.995            | 0.2                        | 0.6                        |
| TBPT                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=822.87X-213.19$  | 0.997            | 0.5                        | 1.5                        |
| QMS-V                                                                                           | 10.0~100.0                  | $Y=908.13X+98.16$   | 0.994            | 0.1                        | 0.3                        |
| QMS-G                                                                                           | 10.0~100.0                  | $Y=5242.11X+702.79$ | 0.995            | 0.1                        | 0.3                        |
| TBSFEN                                                                                          | 10.0~100.0                  | $Y=1106.70X-539.68$ | 0.996            | 0.5                        | 1.5                        |
| JYXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=1085.64X+168.80$ | 0.997            | 0.1                        | 0.3                        |
| ALXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=612.85X-48.02$   | 0.998            | 1.0                        | 3.0                        |
| PLXL                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=774.74X-186.15$  | 0.995            | 0.5                        | 1.5                        |
| MLPN                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=937.29X-363.57$  | 0.995            | 0.1                        | 0.3                        |
| DNPN                                                                                            | 10.0~100.0                  | $Y=580.64X-264.88$  | 0.999            | 0.1                        | 0.3                        |

2.3 两种前处理方法的结果回收率比较 由图 1 可知,HLB-SPE 柱法整体回收效果不如超滤离心浓缩管法回收效果理想,回收率在 4.2%~104.1%,超滤离心浓缩管的回收率均在 60.7%~96.6% 范围内,回收效果更好。

## 3 讨论与小结

3.1 复溶液的优化 分别采用水-乙腈(90/10、80/20、70/30、60/40,V/V)体系和 0.1% 甲酸水-乙腈(90/10、80/20、70/30、60/40,V/V)体系作为复溶液对 19 种 β-内酰胺类药物混标(加标水平

表 4 标准方程计算的 19 种  $\beta$ -内酰胺类药物浓度及相对标准偏差

| Tab 4 concentrations of 19 $\beta$ -lactams calculated by standard curve equations and RSD |                                   |           |                                   |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------|
| 化合物                                                                                        | 日内                                |           | 日间                                |           |
|                                                                                            | 平均浓度<br>/(ng · mL <sup>-1</sup> ) | RSD<br>/% | 平均浓度<br>/(ng · mL <sup>-1</sup> ) | RSD<br>/% |
| MXL                                                                                        | 51.29                             | 2.77      | 50.62                             | 0.89      |
| TBPLN                                                                                      | 50.09                             | 2.38      | 48.52                             | 2.78      |
| SLXL                                                                                       | 50.53                             | 2.26      | 52.42                             | 3.53      |
| LZXL                                                                                       | 48.67                             | 2.58      | 51.06                             | 3.18      |
| MLXL                                                                                       | 49.03                             | 3.47      | 48.79                             | 2.19      |
| NFXL                                                                                       | 50.31                             | 2.48      | 50.52                             | 1.15      |
| FLXL                                                                                       | 51.56                             | 1.75      | 50.71                             | 3.96      |
| QM-SZS-V                                                                                   | 49.82                             | 2.61      | 50.36                             | 3.04      |
| BZXL                                                                                       | 50.72                             | 0.68      | 52.24                             | 1.87      |
| TBDN                                                                                       | 49.48                             | 0.79      | 49.96                             | 1.88      |
| TBPT                                                                                       | 51.32                             | 2.31      | 50.59                             | 3.24      |
| QMS-V                                                                                      | 52.44                             | 2.51      | 51.29                             | 4.11      |
| QMS-G                                                                                      | 52.96                             | 2.55      | 50.74                             | 1.95      |
| TBSFEN                                                                                     | 48.55                             | 1.83      | 49.64                             | 1.76      |
| JYXL                                                                                       | 51.64                             | 1.38      | 50.77                             | 2.79      |
| ALXL                                                                                       | 52.82                             | 2.43      | 51.45                             | 1.30      |
| PLXL                                                                                       | 47.48                             | 0.79      | 49.36                             | 1.94      |
| MLPN                                                                                       | 50.58                             | 1.63      | 50.88                             | 1.81      |
| DNPN                                                                                       | 48.49                             | 2.56      | 49.94                             | 3.09      |

10.0  $\mu\text{g/kg}$ ) 在用  $\text{N}_2$  吹干后进行回收复溶试验。试验结果发现水相中添加甲酸明显对苯唑西林、氯唑西林、双氯西林等青霉素类药物的回收率产生不

利影响,可能是加入甲酸后 pH 降低,对药物保留和稳定性产生了影响<sup>[13]</sup>。在水-乙腈体系中,多种药物随乙腈含量的增加而响应增高,但乙腈含量过高会出现峰形差的问题。所以综合考虑峰形、回收率等因素,选择水-乙腈(80/20, V/V)作为样品的复溶液,既能保证各组分峰形良好,又能保证药物的回收率,从而达到理想的检测效果。

3.2 超滤膜分子量的选择 通常情况下选择合适的超滤管,主要考虑 MWCO 和浓缩体积,而本实验是需要离心透析出的液体,因此在选用超滤管时不但要考虑能否透析出目标化合物,还要考虑被截留的大分子物质在离心时是否会损坏超滤膜<sup>[14]</sup>。19 种  $\beta$ -内酰胺类药物的分子量均在 300~700 之间,根据现有的 6 mL 和 20 mL 超滤管的型号规格(0.2  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$ , 3 kD, 10 kD)进行试验。

先加入 1 mL 20% 乙腈离心 10 min, 0.2  $\mu\text{m}$ , 0.45  $\mu\text{m}$ , 3、10 kD 超滤管均能全部滤出; 选用牛奶样品, 按 1.2.2.3 项方法进行样品处理后, 取 1 mL 上清液加入超滤管中, 10000 r/min 离心 10 min, 0.2  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$  和 3 kD 超滤膜均能够离心彻底, 且未见破损, 滤液澄清, 而 10 kD 超滤管存在透滤现象, 滤液浑浊; 选用空白样品进行加标回收(加标水平 50.0  $\mu\text{g/kg}$ ) 试验, 按 1.2.2.3 项和 1.2.2.4 项方法进行检测, 结果显示采用 0.2  $\mu\text{m}$  超滤管的回收效果较好。为了更好地截留生物大分子物质, 达到最佳回收效果, 本试验选用截留分子量为 0.2  $\mu\text{m}$  的超滤管。

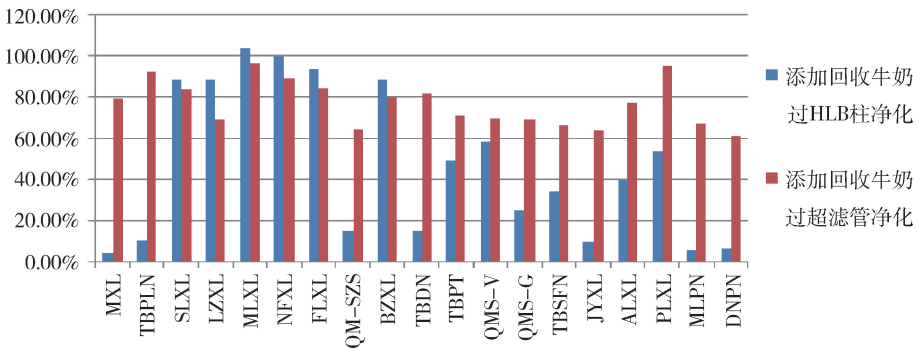


图 1 两种前处理方法对牛奶中 19 种  $\beta$ -内酰胺类药物的回收率的影响  
Fig 1 Effects of the recoveries of 19  $\beta$ -lactams in milk by two pretreatment methods

3.3 离心条件的选择 由于离心力垂直于膜,通常会发生强烈的浓差极化,如此一来,过滤速度可能迅速减慢,甚至堵塞膜,从而对滤液的回收率和体积产生影响<sup>[8]</sup>。因此,需要选择适当的离心速率。该超滤管推荐的离心速率约为 10000 r/min,按 1.2.2.3 项方法进行样品处理后,分别对不同离心速率(6000,8000,10000,12000 r/min)和离心时间(5,10,15,20 min)进行比较,上机检测后计算 19 种目标物的回收率。实验结果显示,离心速率对回收率无明显影响,与离心出的液体快慢有关,即离心速率越大,达到相同净化效果所需的离心时间越短,但离心速率过快,会损坏超滤膜,离心速率太低则会使滤液体积过少,故在实际使用中采用 10000 r/min 离心 10 min,其离心出的液体量满足实验要求且滤膜无破损。

3.4 超滤管的净化效果 在空白牛奶样品中添加 19 种  $\beta$ -内酰胺类药物混标(加标水平为 50.0  $\mu\text{g/kg}$ ),加入 10 mL 乙腈分两次提取, $\text{N}_2$  吹干后,将用 1 mL 20% 乙腈复溶后的上清液加入超滤管中,进行净化处理,上机检测;另取 1 mL 上清液直接上机检测。经超滤管净化处理和未处理的牛奶样品的检测结果可以看出,经超滤管净化处理的样品干扰减少,降低了基质效应,达到了净化目的。

本试验对牛奶样品分别用固相萃取 HLB 柱和超滤离心管进行净化、浓缩处理,比较了两种方法对牛奶中 19 种  $\beta$ -内酰胺类药物的回收效果。其中,HLB 柱对双氯西林、氯唑西林、美洛西林、萘夫西林、氟氯西林和苯唑西林等 6 种药物进行净化浓缩处理的回收率和用超滤离心管处理的回收率相当,两者回收率均在 69.1% ~ 104.1%,而美西林、青霉素-V、青霉素-G、甲氧西林、阿洛西林、哌拉西林、青霉噻唑酸 V、头孢匹林、头孢地尼、头孢哌酮、头孢噻吩、美罗培南和多尼培南等 13 种药物的回收率结果表明,用超滤离心管进行净化浓缩处理远远高于用 HLB 柱处理的回收率,且均在 60.7% ~ 95.4%。综合以上试验结果,用超滤离心管对牛奶进行净化浓缩处理比 HLB 柱的回收效果

好。使用超滤离心管的前处理方法简单,试剂消耗少,测定时间短,结果准确可靠,可以获得良好的测定效果,故本试验选择超滤离心管作为检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺类药物残留的前处理方法。

## 参考文献:

- [1] Gu B,Zhou M,Ke X,*et al.* Comparison of resistance to third-generation cephalosporins in *Shigella* between Europe - America and Asia - Africa from 1998 to 2012[J]. *Epidemiol Infect*,2015,143(13):2687-2699.
- [2] 何欣,聂晓静,马洋帆,等.  $\beta$ -内酰胺类抗生素前处理技术及其残留的研究进展[J]. *环境工程*,2017,35(09):145-149.  
He Xin,Nie Xiaojing,Ma Yangfan,*et al.* Research progress on pretreatment technology and residues of  $\beta$ -lactam antibiotics[J]. *Environmental Engineering*,2017,35(09):145-149.
- [3] 路杨,王丽英,秦振顺,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 4 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素及其主要代谢产物[J]. *食品安全质量检测学报*,2021,12(5):1662-1668.  
Lu Yang,Wang Liying,Qin Zhenshun,*et al.* Determination of four  $\beta$ -lactam antibiotics and their main metabolites in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*,2021,12(5):1662-1668.
- [4] Chiesa Luca Maria,Di Cesare Federica,Nobile Maria,*et al.* Antibiotics and Non-Targeted Metabolite Residues Detection as a Comprehensive Approach toward Food Safety in Raw Milk. [J]. *Foods*,2021,10(3):544.
- [5] 王淑婷,孙晓亮,曹旭敏,等. 牛奶中  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测技术研究进展[J]. *动物医学进展*,2018,2018,39(12):170-174.  
Wang Shuting,Sun Xiaoliang,Cao Xumin,*et al.* Research developments of detection techniques of  $\beta$ -lactam antibiotics residues in dairy milk[J]. *Progress in Veterinary Medicine*,2018,2018,39(12):170-174.
- [6] 张琦. 动物性食品中抗生素残留的分离富集及分析检测方法研究[D]. 北京:首都师范大学,2009.  
Zhang Qi. Study on separation enrichment and analysis detection of antibiotic residues in animal food[D]. Beijing:Capital Normal University,2009.
- [7] Suryani Saallah,Jumardi Roslan,Flavian Sheryl Julius,*et al.* Comparative Study of The Yield and Physicochemical Properties of Collagen from Sea Cucumber (*Holothuria scabra*), Obtained through Dialysis and the Ultrafiltration Membrane[J]. *Molecules*.

2021 May; 26(9): 2564.

[ 8 ] Wei – Chong Dong,Zi – Li Hou,Xin – Hui Jiang,*et al.* A Simple Sample Preparation Method for Measuring Amoxicillin in Human Plasma by Hollow Fiber Centrifugal Ultrafiltration,Journal of chromatographic science,2013,51(2):181 – 186.

[ 9 ] Van den Berg G. B,Smolders C. A. Flux decline in ultrafiltration processes. Desalination. 1990,77: 101 – 133.

[ 10 ] Kátia Silva Maciel,Leandro Soares Santos,Renata Cristina Ferreira Bonomo,etal. Purification of lactoferrin from sweet whey using ultrafiltration followed by expanded bed chromatography[J]. Separation and Purification Technology,2020,251.

[ 11 ] Alba Gutierrez – Docio,Paula Almodóvar,Silvia Moreno – Fernandez,etal. Evaluation of an Integrated Ultrafiltration/Solid Phase Extraction Process for Purification of Oligomeric Grape Seed Procyanidins[J]. Membranes ( Basel ),2020,10(7):147.

[ 12 ] 张秀尧,蔡欣欣. 超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱法快速同时测定牛奶中 53 种  $\beta$  – 内酰胺类抗生素及其代谢产物的残留[J]. 色谱,2014,32(7):693 – 701.

Zhang Xiurao,Cai Xinxin. Rapid and simultaneous determination of 53  $\beta$  – lactam antibiotics and their metabolites in milk by ultra performance liquid chromatography – triple quadrupole mass spectrometry[J]. Chromatographic,2014,32(7):693 – 701.

[ 13 ] 刘 静,郑增忍,赵思俊,等. 牛奶中青霉素 G 及青霉噻唑酸的 UPLC – MS/MS 法测定[J]. 动物医学进展,2014,35(9): 85 – 89.

Liu Jing,Zheng Zengren,Zhao Sijun,*et al.* Simultaneous Detection of Penicillin G and Benzylpenicillin Acid in Milk by UPLC – MS/MS[J]. Progress in Veterinary Medicine,2014,35(9):85 – 89.

[ 14 ] 鞠玲燕,宋晓华,谷 婕,等. 超滤管净化/高效液相色谱 – 串联质谱法测定动物源食品中喹诺酮类药物残留[J]. 分析测试学报,2016,35(1):42 – 47.

Ju Lingyan,Song Xiaohua,Gu Jie,*et al.* Determination of quinolones residues in animal – originate foodstuffs by ultrafiltration tube cleaning and high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [ J ]. Journal of Analytical Testing, 2016, 35 ( 1 ):42 – 47.

( 编 辑:侯向辉)