

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法

## 测定牛奶中的6种 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留

**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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -内酰胺类抗生素

$\beta$ -内酰胺类抗生素( $\beta$ -lactams)是指化学结构中具有  $\beta$ -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有一定的残留，食用含有  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的检测方法。

### 1.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-20A<sub>5</sub> 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. × 50 mm L., 1.6 μm)

流动相: A: 0.1%甲酸水溶液; B:乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 10 μL

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

离子源: ESI, 正离子

加热模块温度: 500℃

脱溶剂管温度: 300℃

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 15.0 L/min

离子源电压: 4.5 kV

扫描模式: 多反应监测(MRM)

MRM 参数: 见表 2

## 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、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。

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

## 1.4 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。

## 2. 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

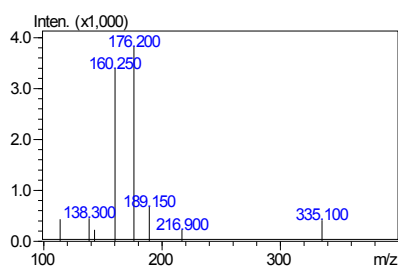


图1 青霉素G一级质谱图

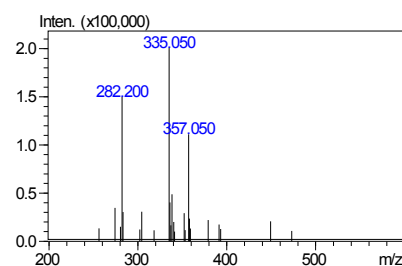


图2 青霉素G产物离子扫描图(CE值-15 V)

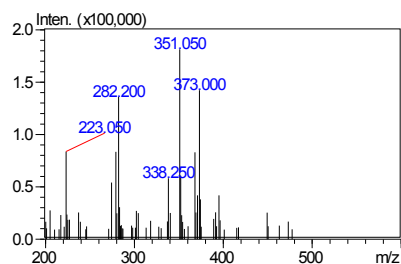


图3 青霉素V一级质谱图

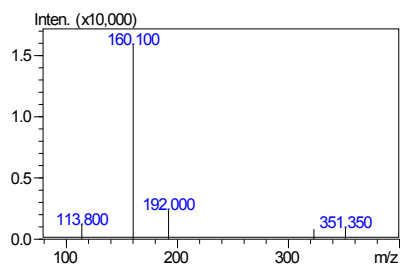


图4 青霉素V产物离子扫描图(CE值-10 V)

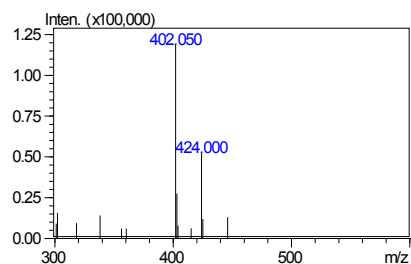


图5 苯唑青霉素一级质谱图

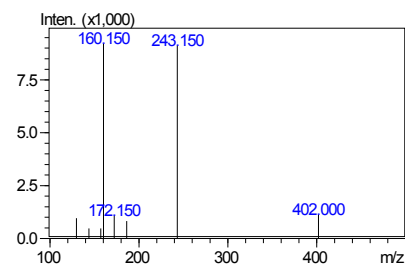


图6 苯唑青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

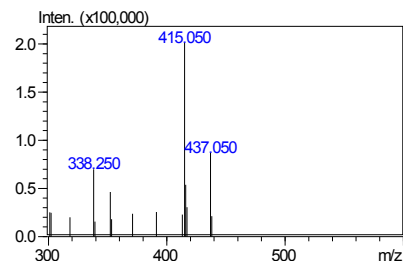


图7 乙氧萘青霉素一级质谱图

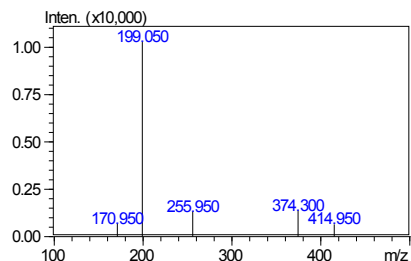


图8 乙氧萘青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

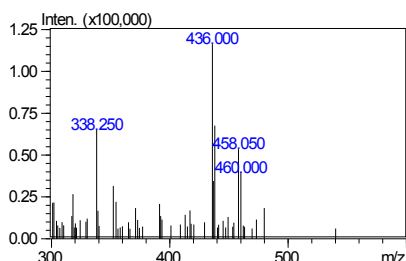


图9 邻氯青霉素一级质谱图

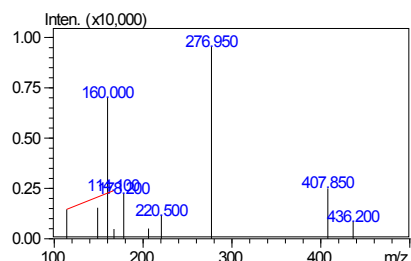


图10 邻氯青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

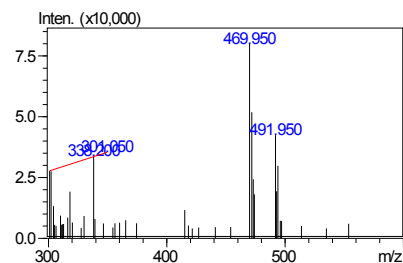


图11 双氯青霉素一级质谱图

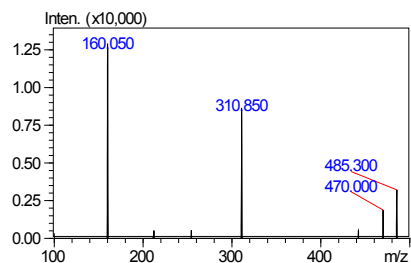


图12 双氯青霉素产物离子扫描图(CE值-15 V)

## 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。

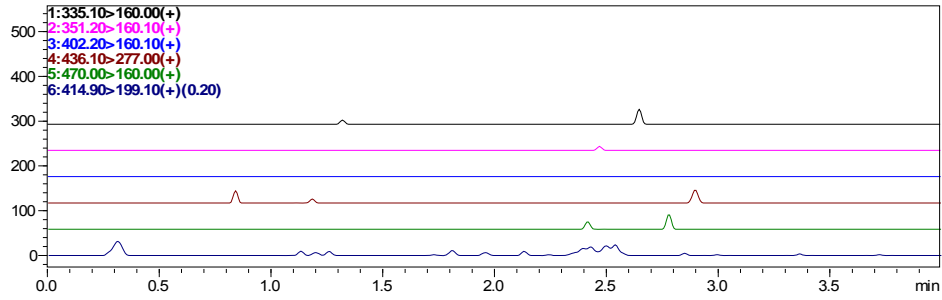


图 13 牛奶空白基质样品的 MRM 色谱图

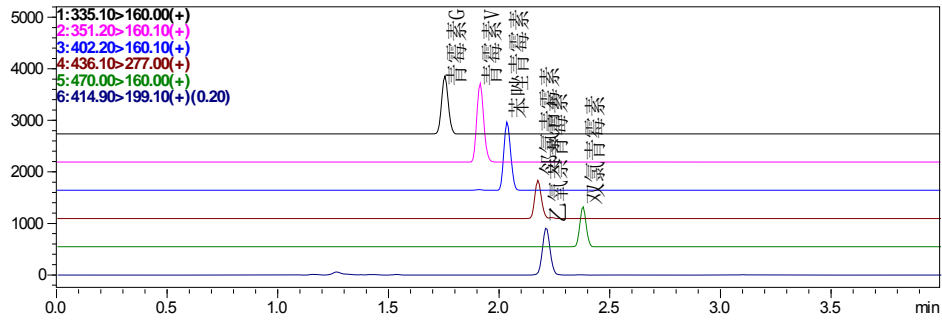


图 14 基质加标样品的 MRM 色谱图 (1 ng/mL)

### 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。

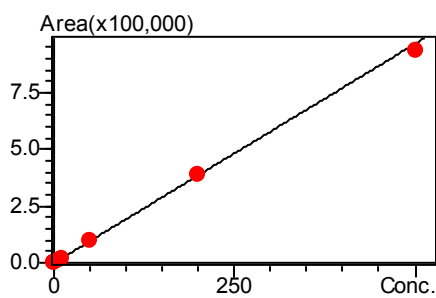


图 15 青霉素 G 标准曲线

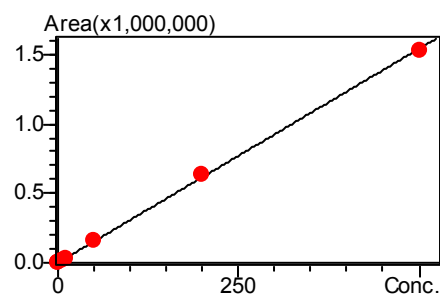


图 16 青霉素 V 标准曲线

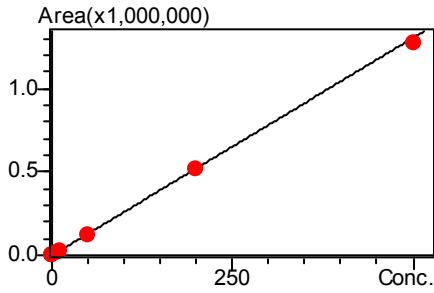


图 17 苯唑青霉素标准曲线

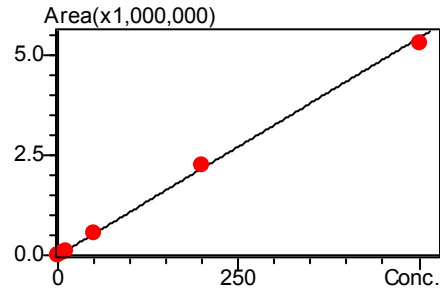


图 18 乙氧萘青霉素标准曲线

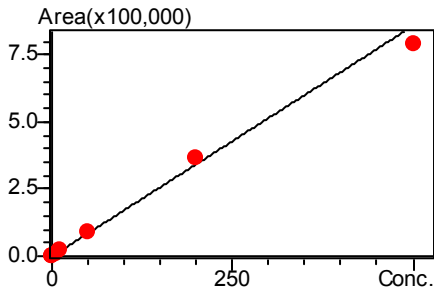


图 19 邻氯青霉素标准曲线

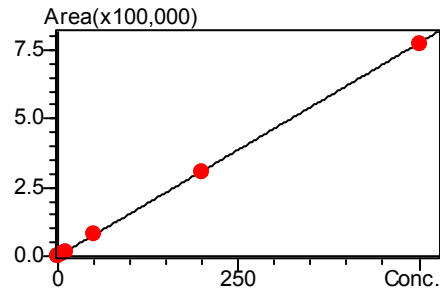


图 20 双氯青霉素标准曲线

表 3 六种  $\beta$ -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。

## 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  $\beta$ -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 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

表 5 六种  $\beta$ -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  $\mu\text{g/kg}$ ，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 ( $\mu\text{g/kg}$ )	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

## 3.结论

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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