

UPLC-MS/MS 检测生鲜牛奶中 72 种抗生素残留

Determination of 72 antibiotics residues in raw milk by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

王承平^{1,2} 秦宇^{1,2} 侯蓓蓓^{1,2}WANG Cheng-ping^{1,2} QIN Yu^{1,2} HOU Bei-bei^{1,2}雷涛^{1,2} 虞成华^{1,2} 葛宇^{1,2}LEI Tao^{1,2} YU Cheng-hua^{1,2} GE Yu^{1,2}

(1. 上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233; 2. 国家食品质量监督检验中心, 上海 200233)

(1. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China;

2. National Quality Supervision and Inspection Center for Food Products, Shanghai 200233, China)

摘要:建立并优化了生鲜牛奶中抗生素残留的预处理方法,进行有效提取和净化,并使用超高效液相色谱—串联质谱仪对其进行分析。考察了不同提取溶剂和净化方式对 5 类 72 种化合物回收率的影响并优化了条件。结果表明,72 种抗生素在 1.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 时线性关系良好;5 种化合物 LOD 为 10.0 $\mu\text{g/kg}$,15 种化合物 LOD 为 5.0 $\mu\text{g/kg}$,其余 52 种化合物 $\text{LOD} \leq 2.5 \mu\text{g/kg}$ 。72 种抗生素加标回收率在低、中、高 3 个水平下分别为 74.0%~118.8%,63.8%~122.6%,43.9%~139.7%,相对标准偏差分别为 1.37%~29.61%,1.79%~30.27%,6.03%~39.70%。该方法灵敏度高,保留时间稳定,检测时间短,操作简便。

关键词:超高效液相色谱—串联质谱法;抗生素残留;生鲜牛奶

Abstract: The pretreatment method of antibiotic residues in fresh milk was established and optimized. At the same time, 72 kinds of compounds were effectively extracted and purified, and analyzed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In this paper, the effects of different extraction solvents and purification methods on the recovery rate of the target were investigated and the conditions were optimized. 72 antibiotics were linearly good in the range 1.0 ~100.0 $\mu\text{g/L}$. The LOD of the five compounds was 10.0 $\mu\text{g/kg}$, the LOD of the 15

compounds was 5.0 $\mu\text{g/kg}$, and the LOD of the remaining 52 compounds was no more than 2.5 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries of 72 kinds of antibiotics were 74%~118.8%, 63.8%~122.6% and 43.9%~139.7%, respectively, at low, medium and high levels, and the relative standard deviations were 1.37%~29.61%, 1.79%~30.27% and 6.03%~39.70%. The method has good reproducibility, short detection time and simple operation, and provides a new rapid detection method for detecting antibiotic residues in fresh milk.

Keywords: ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); antibiotics residues; raw milk

牛奶是人们日常生活中需经常消费的食品。近年来,抗生素残留问题日益突出,而牛奶中抗生素残留主要来源于兽医临床及畜牧生产中的大量使用^[1]。其中一部分违禁抗生素被违禁应用于动物饲料添加剂中^[2],或是使用抗生素来预防动物疾病且促进动物快速增长^[3],或是在休药期违法使用抗生素而造成抗生素残留^[4]。

牛奶中的抗生素残留可能产生以下危害^[5]:① 对人体的危害,包括导致人体免疫力下降、降低药物对人体的治疗作用、使人体慢性中毒、导致基因突变等;② 对生态环境的危害,包括造成环境污染、破坏微生物种群平衡、增加耐药菌种等。因此,建立牛奶中的抗生素多残留检测方法已成为保障食品安全的迫切需求。而多残留检测方法的关键是前处理中的提取和净化。目前报道的牛乳中抗生素残留的净化方法有直接法^[6]、QuEChERS 法^[7]、固相萃取法^[8]及免疫固相萃取法^[9]等。

试验拟建立一套超高效液相色谱—串联质谱法测定生鲜牛奶中 72 种抗生素残留的方法,并对 200 批次生鲜

基金项目:上海市科学技术委员会科研计划项目(编号:16391903800)

作者简介:王承平,男,上海市质量监督检验技术研究院工程师,硕士。

通信作者:葛宇(1971—),女,上海市质量监督检验技术研究院教授级高级工程师,博士。E-mail:geyu@sqi.org.cn

收稿日期:2019-04-23

牛奶进行检测,为生鲜牛奶中抗生素残留的检测提供新的快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生鲜牛奶:抽检样品;

甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷:色谱纯,美国 Thermo 公司;

甲酸:色谱纯,美国 ACS 色谱试剂公司;

乙二胺四乙酸二钠:纯度 $\geq 99.0\%$,国药集团化学试剂有限公司;

Oasis® PRiME HLB: 3 mL/60 mg,美国 Waters 公司;

24 种喹诺酮类抗生素混合标准溶液(100 mg/L)、10 种青霉素类抗生素混合标准溶液(100 mg/L)、20 种磺胺类抗生素混合标准溶液(100 mg/L)、12 种头孢类抗生素混合标准溶液(100 mg/L)、氨苄西林、苯唑西林标准品:纯度均 $\geq 98\%$,美国 A ChemTek Inc 公司;

9 种四环素标准品:纯度 $\geq 98\%$,德国 Dr Ehrenstorfer 公司。

1.2 仪器与设备

三重四极杆串联质谱仪:TQ-XS 型,带电喷雾离子源(ESI),美国 Waters 公司;

液相色谱系统:AcquityH® UPLC CLASS 型,美国 Waters 公司;

电子天平:MSZO 204S 型,瑞士 MettlerToledo 公司;

高速离心机:Centrifuge 5804 型,德国 Eppendorf 公司;

多管涡旋振荡器:D-91126 型,德国 Heidolph 公司;

快速溶剂蒸发仪:EZ-2.3 Elite 型,英国 Genevac 公司;

超纯水系统:Milli-Q 型,美国 Millipore 公司。

1.3 样品前处理

1.3.1 提取 称取 5.00 g 试样于 50 mL 塑料离心管中,涡旋 2 min,加入 10 μ L 甲酸及 20.0 mL 乙腈[考察溶剂包括甲醇、乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、EDTA-2Na—乙腈溶液、1.5% (体积分数)甲酸—乙腈溶液和 5% (体积分数)甲酸—乙腈溶液],涡旋 3 min,超声 15 min,加 2 g 氯化钠,涡旋 2 min,9 000 r/min 离心 3 min,收集上清液,残渣再次加入 10.0 mL 乙腈重复上述操作,合并两次上清液于另一离心管中,混合均匀,40 $^{\circ}$ C 下氮气吹干待净化。

1.3.2 净化 取氮气吹干的离心管,加入定容液(乙腈:水=1:3,体积比)5.0 mL,超声 2 min,加入乙腈饱和的正己烷 10.0 mL,涡旋混合 2 min,9 000 r/min 离心 1 min,收集下层清液,使其全部通过 Oasis PRiME HLB 柱(使用前无需活化平衡处理)并收集于另一离心管中,流速

2~3 mL/min,再次涡旋混合后,取适量混合液过 0.22 μ m PTFE 滤膜,供液相色谱串联—质谱/质谱仪测试。

1.3.3 基质加标标准工作曲线的制备 将混合标准工作液,用定容液逐级稀释成 5.0~100.0 μ g/L 标准系列溶液。称取与试样基质相应的阴性样品 5.00 g,加入标准系列溶液 1.0 mL,其余操作同 1.3.1、1.3.2。

1.3.4 加标回收试验 取空白鲜奶样品,添加混合标准溶液,进行总数为 96 批次(4 基质 $\times$ 6 平行 $\times$ 4 批次,为期 1 月)的加标回收率试验。

1.4 LC-MS/MS 条件

1.4.1 液相色谱条件 色谱柱 Atlantis® T3 柱(2.1 mm $\times$ 50 mm,1.7 μ m),柱温 30 $^{\circ}$ C,进样体积 2 μ L,流动相 A 为 0.1% (体积分数)甲酸—水溶液,流动相 B 为乙腈,流速 0.5 mL/min。梯度洗脱程序:0~2 min,5% B;2~7 min,5%~95% B;7~8 min,95% B;8~8.1 min,95%~5% B;8.1~10 min,5% B。

1.4.2 质谱条件 多反应监测(MRM),电喷雾正离子模式(ESI⁺);毛细管电压 3.00 kV;脱溶剂气温度 500 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流速 1 000 L/h;反吹气流速 150 L/h;碰撞气流速 0.15 mL/min。

1.4.3 质谱参数的优化 将 5 类混合标准溶液分别注入质谱仪中,对去簇电压(Cone)、碰撞能量(CE)进行优化,选取相对丰度较高的两对多反应监测(MRM)离子对作为定量离子和定性离子。

1.5 数据处理

使用 MassLynx® 软件对每个化合物的定量离子进行数据处理以得到样品溶液浓度数据,并使用定性离子进行辅助定性。然后计算样品含量、精密度、回收率数据。

2 结果与分析

2.1 色谱、质谱条件优化

2.1.1 色谱柱的选择 通过比较分析,选择可在宽 pH 条件下使用且对极性化合物有较好分离效果的 Waters Atlantis T3 色谱柱,并选择柱长 50 mm、粒径 1.7 μ m 的 UPLC 型号,分离检测 72 种抗生素残留单次运行时间为 10 min。

2.1.2 流动相的选择及洗脱梯度的优化 通过比较水—甲醇、水—乙腈、0.1% (体积分数)甲酸—甲醇、0.1% (体积分数)甲酸—乙腈 4 种流动相组合的分离效果,发现乙腈相对于甲醇的峰形更好,色谱柱反压更低,保留时间更稳定;而在 ESI⁺ 模式下,0.1% (体积分数)甲酸相对于水能提供更多地离子化所需的 H⁺,从而明显增强化合物的响应,提高检测灵敏度。因此,最终选择 0.1% (体积分数)甲酸—乙腈作为流动相,并优化了洗脱梯度,所有化合物均得到了较好地分离并具有良好的峰形。5 类抗生素代表化合物的 MRM 色谱图见图 1。

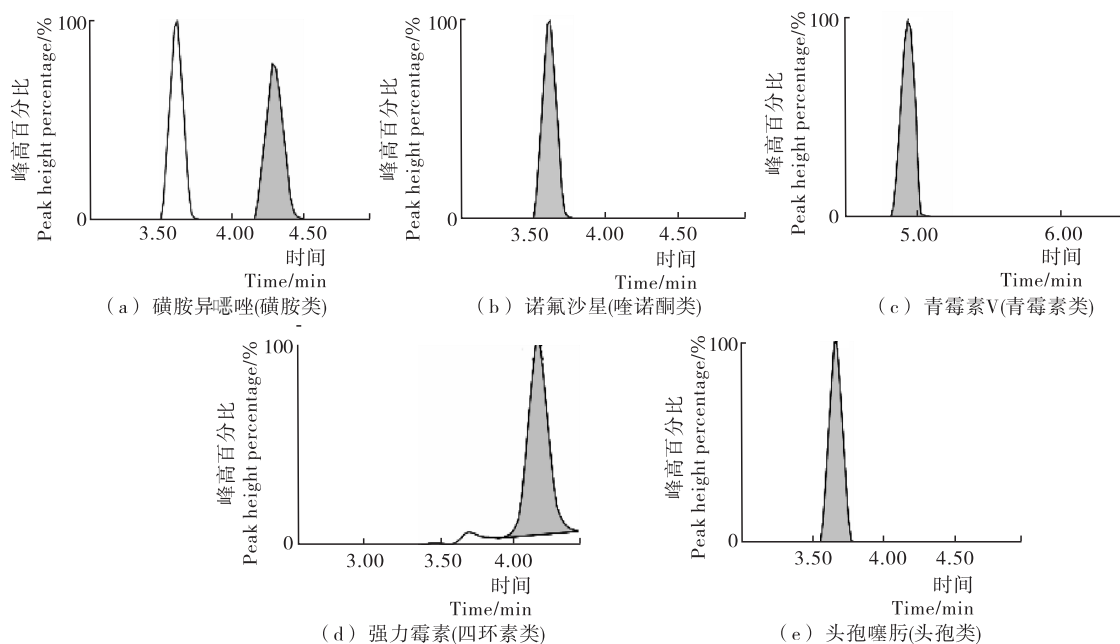


图 1 5 类抗生素代表化合物 MRM 色谱图

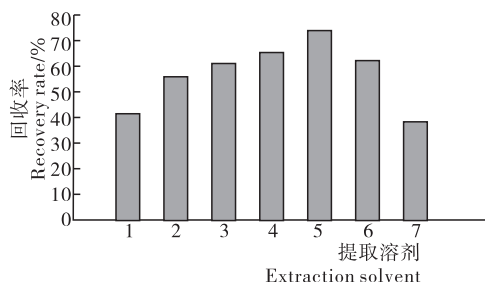
Figure 1 Chromatograms of the representative target in 5 antibiotics category with MRM mode

2.2 提取溶剂的优化

牛乳中含有蛋白质、脂肪、乳糖等较多分析干扰物, 试验重点考察了沉淀蛋白的方式对多种抗生素提取效果的影响。由图 2 可知, 当使用 1.5% (体积分数) 甲酸—乙腈溶液为提取溶剂时, 多数化合物能实现有效提取, 回收率较好, 达 74.3%; 但随甲酸浓度的增加, 化合物提取效率呈下降趋势, 可能是甲酸浓度改变了部分化合物的带电状态, 降低了其在乙腈中的溶解效率。因此, 选择 1.5% (体积分数) 甲酸—乙腈为提取溶剂。

2.3 净化方法的优化

试验发现, 当使用 10 mL 1.5% (体积分数) 甲酸—乙



1. 二氯甲烷 2. 甲醇 3. 乙酸乙酯 4. 乙腈 5. 1.5% (体积分数) 甲酸—乙腈溶液 6. 5% (体积分数) 甲酸—乙腈溶液 7. EDTA-2Na—乙腈溶液

图 2 7 种提取溶剂下 72 种抗生素在牛奶基质中的平均回收率

Figure 2 Average recovery of 72 antibiotics in milk matrix in 7 extraction solvents

腈溶液进行蛋白沉淀后, 提取液呈澄清状, 由于免疫固相萃取柱具有一定的专一性, 比较了直接法进样、市售 QuEChERS 净化包及两种固相萃取柱 (HLB 和 Oasis® PRiME HLB) 的净化效果。结果表明, QuEChERS 净化包不适用于生鲜牛奶的化合物净化, 主要为部分化合物无回收。相比直接进样法, 固相萃取方式适用于生鲜牛奶中的抗生素残留分析, 对减少基质效应有较为明显的影响, 综合试验成本及效率, 选择无需活化处理的 Oasis® PRiME HLB 柱进行净化处理试验。

2.4 方法学评价

2.4.1 线性关系、检出限及定量限 试验表明, 72 种抗生素在 1.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内均线性良好。线性相关系数 (R^2) 在 0.960 0~0.999 9。以定量离子信噪比 $S/N=3$ 计算化合物的检出限 (LOD), 5 种化合物 LOD 为 10.0 $\mu\text{g/kg}$, 15 种化合物 LOD 为 5.0 $\mu\text{g/kg}$, 其余 52 种化合物 $\text{LOD} \leq 2.5 \mu\text{g/kg}$ 。

2.4.2 精密度与回收率 试验发现, 72 种抗生素的加标回收率在低、中、高 3 个水平下分别为 74.0%~118.8%, 63.8%~122.6%, 43.9%~139.7%; 相对标准偏差分别为 1.37%~29.61%, 1.79%~30.27%, 6.03%~39.70%。

2.5 实际样品检测

通过试验发现, 共检出 2 批次阳性样品, 分别为氯甲硝咪唑 5.76 $\mu\text{g/kg}$, 替米考星 6.83 $\mu\text{g/kg}$ 。目前, 中国关于氯甲硝咪唑的禁限量标准尚未建立。试验建立的方法可对市售产品进行有效监管, 在检测时间及简单易行上具有优势, 可用于生鲜牛奶中抗生素残留的快速检测。

(下转第 83 页)

- 征初探[J]. 中国食品学报, 2018, 18(1): 250-256.
- [5] ALCOCK R E, SWEETMAN A, JONES K C. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: Selected compounds and physicochemical properties[J]. Chemosphere, 1999, 38(10): 2 247-2 262.
- [6] JING Tao, NIU Ji-wei, XIA Huan, et al. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples[J]. Journal of Separation Science, 2015, 34(12): 1 469-1 476.
- [7] SNIEGOCKI T, POSYNIK A, ZMUDZKI J. Improved gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of clenbuterol and salbutamol in animal urine[J]. Bulletin- Veterinary Institute in Pulawy, 2005, 49(4): 443-447.
- [8] NEBOT C, GUARDDON M, SECO F, et al. Monitoring the presence of residues of tetracyclines in baby food samples by HPLC-MS/MS[J]. Food Control, 2014, 46: 495-501.
- [9] ZVEREVA E A, SHPAKOVA N A, ZHERDEV A V, et al. Highly Sensitive immunochromatographic assay for qualitative and quantitative control of beta-agonist ractopamine in foods[J]. Applied Biochemistry & Microbiology, 2018, 54(4): 436-441.
- [10] QU Xue-li, LIN Hong, DU Shu-yuan, et al. Development of a nano-gold capillary immunochromatographic assay for rapid and semi-quantitative detection of clenbuterol residues[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(9): 1-10.
- [11] XING Chang-rui, LIU Li-qiang, SONG Shan-shan, et al. Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 66: 445-453.
- [12] 徐桂连, 代翠红, 马莺. 土霉素完全抗原的制备与鉴定[J]. 食品工业科技, 2011, 32(4): 192-196.
- [13] FLEEKER J R, LOVETT L J. Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood [J]. Journal - Association of Official Analytical Chemists, 1985, 68(2): 172-174.
- [14] 刑云端, 孙亚宁, 姚静静, 等. T-2 毒素完全抗原制备及免疫学检测方法的建立[J]. 河南农业科学, 2018, 47(4): 124-129.
- [15] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 56-60.
- [16] SUN Ya-ning, YANG Ji-fei, YANG Su-zhen, et al. Development of an immunochromatographic lateral flow strip for the simultaneous detection of aminoglycoside residues in milk[J]. RSC Advances, 2018, 8(17): 9 580-9 586.
- [17] WANG Yao, LI Zhao-zhou, PEI Ya-feng, et al. Establishment of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of soybean allergen β -conglycinin [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(7): 2 429-2 435.
- [18] 肖治理, 曾文亮, 王弘, 等. 氯霉素胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制[J]. 食品与机械, 2013, 29(4): 54-58, 62.
- [19] SASAKI K M, AOKI A, ICHINOSE S, et al. Scanning electron microscopy and Fourier transformed infrared spectroscopy analysis of bone removal using Er:YAG and CO₂ lasers [J]. Journal of Periodontology, 2017, 73(6): 643-652.
- [20] GAURAV A, GILL J P S, AULAKH R S, et al. ELISA based monitoring and analysis of tetracycline residues in cattle milk in various districts of Punjab [J]. Veterinary World, 2014, 7(1): 26-29.

(上接第 76 页)

3 结论

综合考虑生鲜牛奶基质的特点及 5 类抗生素的理化性质,对仪器条件和前处理方法进行了优化,建立了一套可用于快速检测生鲜牛奶中 72 种抗生素的快速前处理—超高效液相色谱—串联质谱方法,在低、中、高 3 个加标水平下的回收率为 40%~140%,且保留时间稳定,定性准确。该方法灵敏度高,检测时间较少,方法简便,对生鲜牛奶中抗生素的检测具有较高的参考价值。后续将增加可检测抗生素的类别及种类,尽量覆盖所有的有可能造成危害的抗生素。

参考文献

- [1] 李丹妮, 贡松松, 顾欣, 等. 生鲜牛乳中抗生素残留检测技术研究进展[J]. 中国乳品工业, 2017, 45(5): 38-42.
- [2] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 12.
- [3] 宋博利. 动物性食品中抗生素残留及其控制对策[J]. 中国农业信息, 2014, 26(11): 82.
- [4] 王银钱. 畜产品中兽药残留的危害和控制[J]. 北方牧业, 2003(11): 23.
- [5] 侯薄, 王卫, 付智星, 等. 养禽业抗生素使用现状及无抗养殖研究进展[J]. 食品工业, 2017, 39(8): 216-220.
- [6] 王浩, 赵丽, 杨红梅, 等. 液相色谱—串联质谱法测定牛奶中 35 种四环素类、磺胺类、青霉素类、大环内酯类、氯霉素类抗生素残留[J]. 色谱, 2015, 33(9): 995-1 001.
- [7] 张小刚, 王霞, 戴春风, 等. QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱法测定牛奶中 6 种头孢菌素类抗生素残留[J]. 色谱, 2018, 36(4): 345-350.
- [8] 余佩瑶, 陈传胜, 刘寒冰, 等. 固相萃取—高效液相色谱法同时测定鸡粪中四环素类、喹诺酮类和磺胺类抗生素[J]. 色谱, 2019, 37(5): 518-524.
- [9] 章璐幸, 孙洁胤, 王延辉, 等. 免疫亲和固相萃取—超高效液相色谱—串联质谱法同时测定牛奶中 6 种玉米赤霉醇类化合物残留[J]. 色谱, 2018, 36(6): 566-572.