

# 超高压液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 $\beta$ -内酰胺类抗生素及其酶抑制剂

张立<sup>1</sup>, 李娜思<sup>2</sup>, 冯峰<sup>1</sup>, 王文枝<sup>1</sup>, 杨丙成<sup>2</sup>, 储晓刚<sup>1\*</sup>

(1. 中国检验检疫科学研究院, 食品安全研究所, 北京 100123; 2. 华东理工大学药学院, 上海 200237)

**摘要:** **目的** 建立同时测定乳制品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素(头孢哌酮、头孢噻肟)及其抑制剂(舒巴坦、他唑巴坦)的超高压液相色谱-串联质谱分析方法。**方法** 样品经乙腈沉淀蛋白, 正己烷去除脂肪后, 采用 Oasis HLB 固相萃取柱进一步净化, 得到样品溶液。以 Waters UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(50 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu$ m)分离, 采用电喷雾负离子模式电离(ESI), 多反应监测(MRM)模式检测, 以保留时间和两对 MRM 离子对的比定性, 基质匹配曲线定量。**结果** 4种分析物在 1~100  $\mu$ g/L 范围内成线性, 相关系数  $r>0.997$ , 空白样品中 4种分析物的添加回收率为 85.5%~95.5%, 检出限为 0.1~0.2  $\mu$ g/L。**结论** 本方法快速、灵敏, 重现性好, 可用于乳制品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素及其酶抑制剂的快速准确检测。

**关键词:** 超高压液相色谱-串联质谱; 抗生素酶抑制剂;  $\beta$ -内酰胺类抗生素; 乳制品

## Simultaneous determination of $\beta$ -lactam antibiotics and $\beta$ -lactamase inhibitors in milk by ultra pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry

ZHANG Li<sup>1</sup>, LI Na-Si<sup>2</sup>, FENG Feng<sup>1</sup>, WANG Wen-Zhi<sup>1</sup>, YANG Bing-Cheng<sup>2</sup>, CHU Xiao-Gang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China;  
2. School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

**ABSTRACT: Objective** An ultra pressure liquid chromatography (UPLC) tandem mass spectrometric (MS/MS) method has been developed for the simultaneous determination of two  $\beta$ -lactam antibiotics (cefotaxime and cefoperazone) and two  $\beta$ -lactamase inhibitors (tazobactam and sulbactam) in bovine milk and infant formula. **Methods** The analysts were extracted from milk sample with acetonitrile, defatted with liquid-liquid extraction by hexane, and further purified by Oasis HLB solid phase extraction cartridges. The extracted analysts were separated by UPLC BEH C<sub>18</sub> column (50 mm × 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m), and determined by UPLC-MS/MS under negative ionization mode. **Results** The method showed a good linearity over the range of 1~100  $\mu$ g/L, with the linear correlation coefficient  $r>0.997$ . The mean recoveries for four analysts in bovine milk ranged from 85.5% to 95.5%. The limit of detection was 0.1~0.2  $\mu$ g/L. **Conclusion** This method is rapid, sensitive and repeatable, and it could be performed for the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics and  $\beta$ -lactamase inhibitors in milk-matrix.

**KEY WORDS:** ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry;  $\beta$ -lactamase inhibitors;  $\beta$ -lactam antibiotics; milk-matrix

基金项目: 质检总局公益性行业科研专项(2012104002)、国家“十二五”科技支撑计划项目(2011BAK10B04)

**Fund:** Supported by Public Science and Technology Research Funds Project (2012104002) and the National Key Technology R&D Program (2011BAK10B04)

\*通讯作者: 储晓刚, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: xgchu@vip.163.com

\*Corresponding author: CHU Xiao-Gang, Researcher, Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Jia 3 Gaobei-dianbei Road, Beijing 100123, China. E-mail: xgchu@vip.163.com

## 1 引言

$\beta$ -内酰胺类抗生素如头孢哌酮、头孢噻肟等作为奶牛饲养过程中经常使用的一类抗生素,其在牛奶中的残留将会对人体健康带来重要影响<sup>[1-3]</sup>。近年来,随着一些细菌耐药性的增强, $\beta$ -内酰胺类抗生素的使用量呈不断增大的趋势。为了保护消费者特别是婴幼儿健康,科研人员已经发展了一些检测牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素的检测方法<sup>[4-7]</sup>。然而,部分不法奶农或是奶站收购人员为了逃避牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素的检测,会在新鲜的牛奶中加入“生鲜牛乳抗生素分解剂”等物质,并以此逃避监管<sup>[8]</sup>。据报道,这些抗生素分解剂中的主要成分是 $\beta$ -内酰胺酶,该酶可以在短时间内将牛奶中的抗生素分解。鉴于此,科研人员又发展了一些专门用于检测生鲜乳中 $\beta$ -内酰胺酶的方法,以判定生鲜乳中是否有 $\beta$ -内酰胺酶的添加<sup>[9]</sup>。随着这一技术的广泛应用,部分不法奶农又采取了先在新鲜牛奶中加入 $\beta$ -内酰胺酶将抗生素残留分解,随后又在这些牛奶中加入舒巴坦等 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的方式来逃避对 $\beta$ -内酰胺酶的检测<sup>[10]</sup>,这也给乳品安全埋下了新的隐患。由于对 $\beta$ -内酰胺酶的

检测已经比较成熟,所以为了确保乳制品的食用安全,亟需建立一些同时检测乳制品中的 $\beta$ -内酰胺类抗生素及 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的检测方法。

尽管目前已经有一些针对 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的检测方法<sup>[11,12]</sup>,但同时检测乳制品中的 $\beta$ -内酰胺类抗生素及 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的检测方法少有研究,本文选取常见的2种 $\beta$ -内酰胺类抗生素头孢哌酮、头孢噻肟以及2种 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂舒巴坦、他唑巴坦(四种化合物的结构式见图1),通过对样品前处理技术进行优化,结合超高压液相色谱-串联质谱技术,建立了同时快速、准确、灵敏检测乳制品中 $\beta$ -内酰胺类抗生素及 $\beta$ -内酰胺酶抑制剂的超高压液相色谱-串联质谱分析方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂与仪器

头孢哌酮(cefoperazone, CFP)、头孢噻肟(cefotaxime, CFT)、舒巴坦(sulbactam, SUL)和他唑巴坦(tazobactam, TAZ)(纯度 $\geq 99\%$ ),均购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司。上述标准品在使用时用水溶解并定容。乙腈、正己烷、乙酸、甲酸为色谱纯,购自

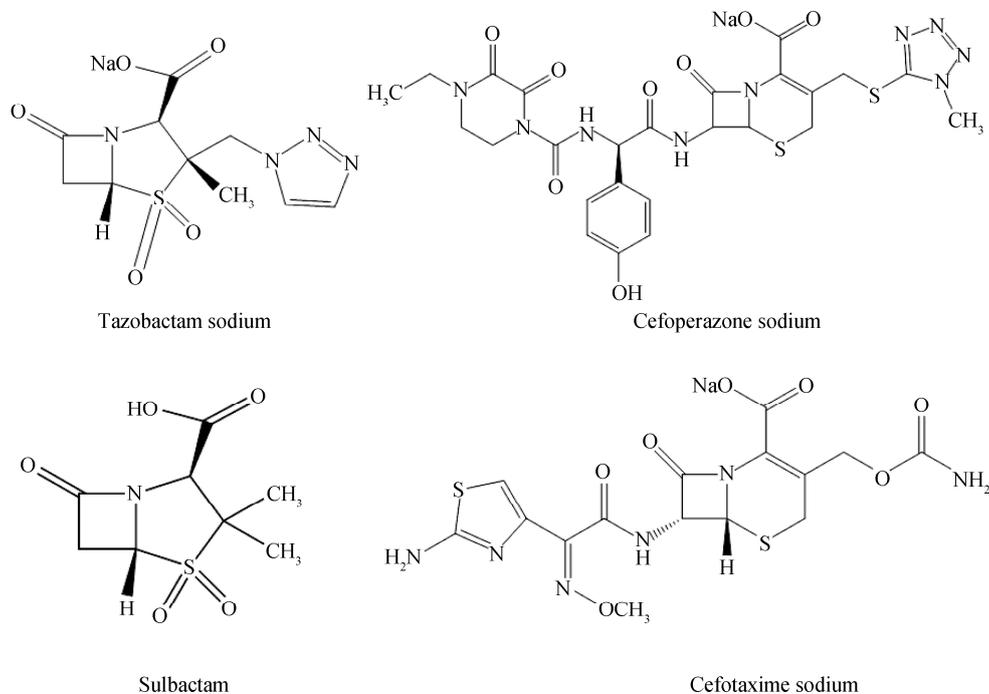


图1 四种分析物的结构式  
Fig. 1 Structures of four chemicals

美国 J. T. Baker 公司; 其他试剂均为分析纯, 实验室用水由 Millipore 纯水仪制备。包含巴氏杀菌奶、超高温奶及部分婴儿奶粉等牛奶样品 20 份均购自北京当地超市。

超高压液相色谱仪 (美国 Waters 公司) 串联 API 5500 三重四极杆质谱仪 (美国 Applied Biosystem 公司), 配备 Waters UPLC 自动进样器, 柱温箱, 数据采集由 Analyst 1.5.1 软件完成; Avanti J-26 XPI 高速冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); 分析天平 XP 105 (瑞士 Mettler 公司); 振荡器 SA-31 (日本 Yamato 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水机 (美国 Millipore 公司); 0.22  $\mu\text{m}$  微孔尼龙膜 (美国 PALL 公司)。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 样品前处理

称取 2.0 g 固体样品于 50 mL 具塞离心管中, 用 2 mL 60  $^{\circ}\text{C}$  温水溶解 (液体样品直接量取 2.0 mL), 加入乙腈 6 mL, 涡旋 1 min, 以 5000 r/min 离心 10 min。离心后, 吸取上清液 5 mL 至另一支 50 mL 具塞离心管中, 加入正己烷 8 mL, 涡旋 1 min, 以 5000 r/min 离心 5 min。随后弃去上层正己烷, 将下层溶液转移至玻璃管中, 氮气吹干。用 5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=8.5) 充分溶解残余物, 上样于 Oasis HLB 固相萃取柱 (预先用 5 mL 乙腈、5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 (pH=8.5) 活化) 净化。用 3 mL 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液、2 mL 去离子水淋洗, 3 mL 乙腈洗脱。收集洗脱液, 氮气吹干;

用 2 mL 初始流动相定容, 滤膜过滤, 待测。

### 2.2.2 仪器分析条件

液相色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  柱 (50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 柱温: 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 样品室温度: 4  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样体积: 5  $\mu\text{L}$ ; 流动相 A 为含 0.1% (v/v) 甲酸的水, 流动相 B 为含 0.1% (v/v) 甲酸的乙腈。梯度洗脱程序: 0~3.0 min, 5%~50% B; 3.1~4.0 min, 95% B; 4.1~5.0 min, 5% B, 流速为 0.25 mL/min。

质谱条件 电喷雾电离源, 负离子模式, 多反应监测 (MRM); 实验中所用的气体均为高纯氮气, 碰撞气 (CAD) 压力为 41 kPa, 气帘气 (CUR) 压力为 138 kPa, 雾化气 (GS1) 压力为 413 kPa, 辅助气 (GS2) 压力为 345 kPa。电喷雾电压 (IS) 为 -4.5 kV, 去溶剂温度 (TEM) 为 400  $^{\circ}\text{C}$ , Q0 入口电压 (EP) 为 -10 V, 碰撞室出口电压 (CXP) 为 -11 V, 4 种分析物的定性/定量离子对, 去簇电压 (DP) 及碰撞电压 (CE) 见表 1。

## 3 结果与讨论

### 3.1 样品前处理条件的优化

由于多数乳制品样品中含有大量的蛋白质和脂肪, 这会对后续的检测带来极大的干扰, 所以在其样品前处理中需要使用酸或者有机溶剂将其中大部分的蛋白成分进行变性和沉淀<sup>[7]</sup>。考虑到  $\beta$ -内酰胺类抗

表 1 四种化合物的质谱参数  
Table 1 Mass spectrometer parameters of the four analytes

序号	化合物	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞能 (V)
1	他唑巴坦 (TAZ)	299.0	138.1*	-80	-18
			207.0		-17
2	舒巴坦 (SUL)	232.0	140.0*	-100	-24
			64.2		-26
3	头孢噻肟 (CFT)	455.0	239.0*	-100	-16
			124.1		-36
4	头孢哌酮 (CFP)	644.0	115.2*	-80	-20
			188.0		-17

\*Quantitative daughter ion

生素含有的四元环结构在强酸条件下不稳定<sup>[6]</sup>,因此样品提取及沉淀蛋白应避免强酸的使用。本研究对比了有机溶剂甲醇和乙腈的提取效果。发现乙腈的提取效率优于甲醇。乙腈提取物在经过离心取上清液后,用正己烷对上清液进行了液液萃取,以有效去除牛奶中的脂肪。

考虑不同配方奶粉基质的复杂性,在对经乙腈萃取和正己烷除脂后的提取液,本研究比较了Waters公司的三种固相萃取小柱C<sub>18</sub>、MAX和Oasis HLB对牛奶提取液的净化效果(三种填料均为500 mg, 6 mL),三种固相萃取小柱的净化条件均按照Waters公司推荐步骤进行。结果见图2。由图2可以看出,C<sub>18</sub>柱对所有目标分析物回收率偏低;MAX柱仅对SUL回收率较高;HLB柱对4种目标分析物的回收率较高(介于90%~98%)。因此,本研究最后选用Oasis HLB柱对提取液进行净化。本实验在优化Oasis HLB柱的上样条件时发现,上样液中乙腈含量超过10%时,目标分析物发生穿透。因此,本实验使用氮气吹干提取溶剂乙腈,用水进行复溶之后再过SPE柱(步骤见2.2.1)。为了增强目标化合物在SPE柱上的保留,本实验优化了上样液的pH值。结果发现当上样液pH为8.5时,四种化合物的回收率最好。因此,选用pH 8.5的磷酸缓冲液作为上样液。

### 3.2 质谱条件的优化

在ESI<sup>+</sup>和ESI<sup>-</sup>离子化模式下,分别考察了四种化合物的电离效果。实验表明,SUL、TAZ和CFT在ESI<sup>-</sup>电离方式下响应较好,而CFP在ESI<sup>+</sup>和ESI<sup>-</sup>电离

方式下均有响应。考虑到正负离子同时扫描会降低分析灵敏度,同时对仪器也有损害,本研究最终采用ESI<sup>-</sup>电离方式对四种化合物进行分析。4种化合物的定量离子对提取离子色谱图见图3。

### 3.3 线性关系与检出限

使用阴性牛奶提取液逐级稀释标准溶液至0.1、1、5、10、25、100 μg/L浓度范围,在优化的色谱和质谱条件下测定,根据各待测物浓度和定量离子峰面积关系进行线性回归。对阴性空白样品提取液进行加标实验,根据各定量离子3和10倍信噪比(S/N)对应样品中目标化合物的浓度,得到检出限和定量限(表2)。4种分析物标准品,空白样品及加标样品(20 μg/L)的总离子色谱图见图4。

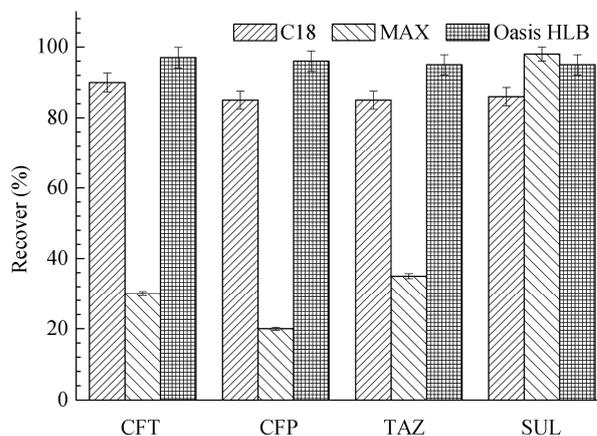


图2 不同填料的SPE柱富集效果对比  
Fig. 2 Comparison of different SPE sorbents

表2 四种目标化合物线性关系,检出限以及定量限(n=6)  
Table 2 Linearity, LOD and LOQ of the four chemicals in milk samples (n=6)

化合物	标准曲线	相关系数	线性范围(μg/L)	LOD(μg/L)	LOQ(μg/L)
TAZ	$Y=718X+156$	0.9986	1~100	0.1	0.35
SUL	$Y=620X+213$	0.9989	1~100	0.1	0.35
CFT	$Y=480X+301$	0.9987	2~100	0.2	0.6
CFP	$Y=3040X-2060$	0.9993	1~100	0.1	0.35

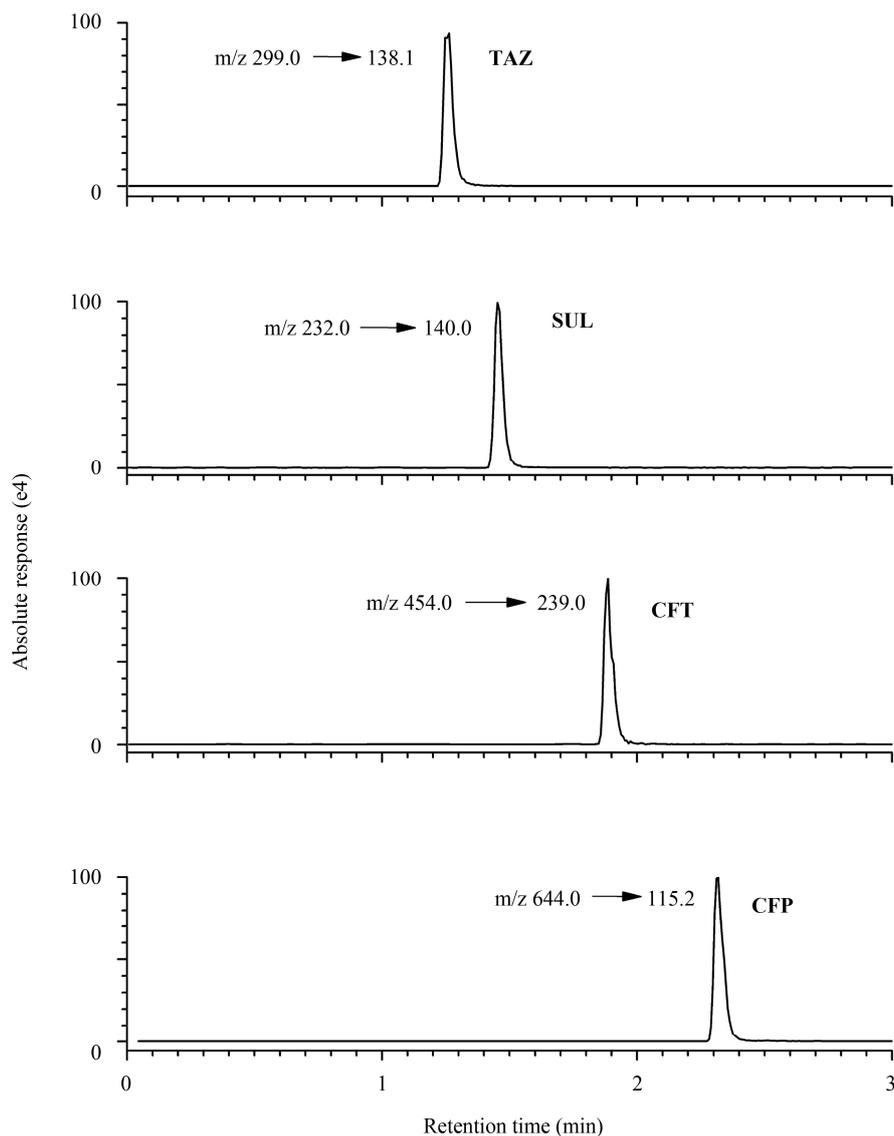


图 3 4 种分析物标准品的提取离子色谱图

Fig. 3 Extracted ion chromatographs of four standards

### 3.4 方法回收率与精密度

在空白牛奶样品中添加 3 个浓度水平(2、10、100  $\mu\text{g/L}$ )的混标溶液, 每个添加水平平行测定 6 次, 测定结果见表 3。实验结果表明, 本方法的回收率在 85.5%~95.5%范围内, 精密度(RSD)小于 9%, 这表明本方法可以应用于实际样品的测定。

### 3.5 样品分析

应用本方法对 20 份采集自超市的牛奶和奶粉样品进行测定, 均未检出  $\beta$ -内酰胺类抗生素及其酶抑制

剂, 典型阴性样品的总离子色谱图见图 4。下一步将扩大样品范围、对集贸市场等地的样品也进行检测和分析, 以摸清我国目前的乳制品中的  $\beta$ -内酰胺类抗生素及其酶抑制剂的使用情况。

## 4 结 论

本研究建立了超高压液相色谱-串联质谱法同时检测牛奶中  $\beta$ -内酰胺类抗生素及其酶抑制剂的分析方法。该方法对牛奶样品处理步骤简单, 检测结果灵敏度高、准确性好。相对于传统将  $\beta$ -内酰胺类抗生

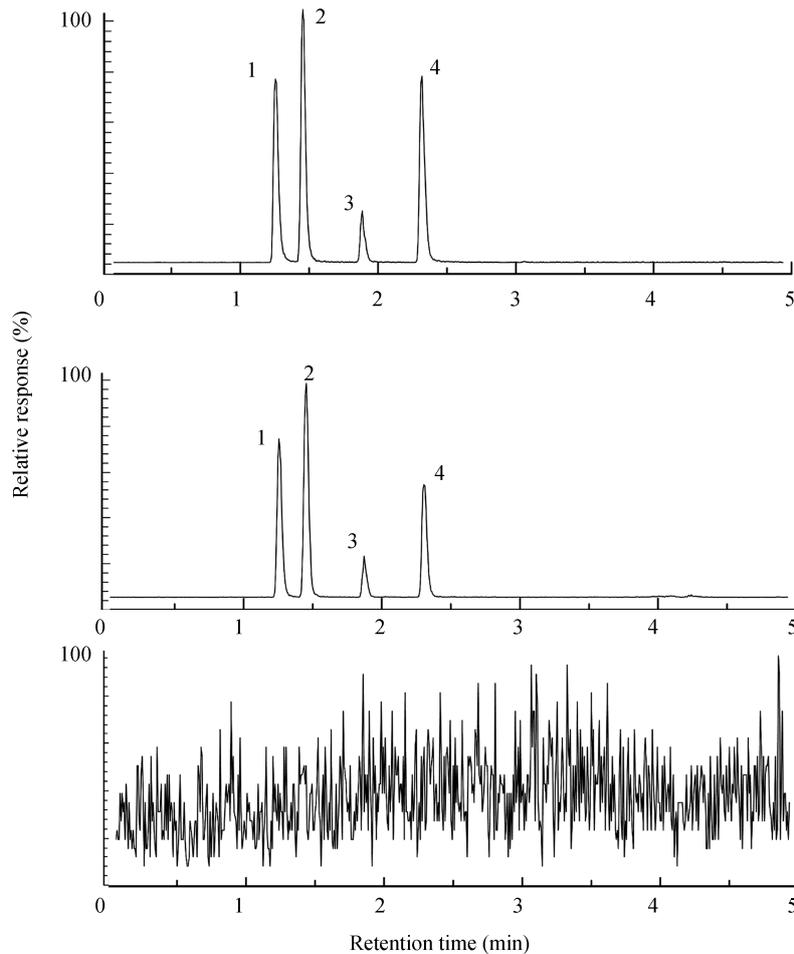


图4 4种分析物标准品(上)、加标样品(中)、空白样品的总离子色谱图(下,编号所对应的化合物名称同表1)

Fig. 4 Total ion chromatographies of 4 standard chemicals(up); spiked sample(middle); blank sample(down)

表3 四种目标化合物在样品中的回收率和精密度( $n=6$ )  
Table 3 Recoveries and precision of the four chemicals in milk samples( $n=6$ )

化合物	加标浓度/( $\mu\text{g/L}$ )	回收率/%	RSD/%
TAZ	2	90.6	8.7
	10	94.1	7.2
	100	95.4	5.6
SUL	2	86.7	7.9
	10	88.8	5.6
	100	93.2	5.6
CFT	2	92.6	6.5
	10	94.3	5.8
	100	95.4	4.2
CFP	2	92.5	6.7
	10	93.0	6.5
	100	94.2	4.3

素及其酶抑制剂分别进行检测的方法,可大大提高分析效率。本研究将在相关部门对市售牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留及其酶抑制剂的日常监测中发挥重要作用。

#### 参考文献

- [1] 张琦,叶能胜,谷学新,等.  $\beta$ -内酰胺类抗生素分析检测技术及其应用研究进展[J]. 化学通报, 2009, 72(5): 394-400.  
Zhang Q, Ye NS, Gu XX, *et al.* Development and Application of Analytical Methods for Analyses of  $\beta$ -Lactam Antibiotics Residues [J]. Chem, 2009, 72(5): 394-400.
- [2] 孟静,王锐,祝建华. 生鲜牛乳中抗生素检测方法的新问题[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(9): 42-44.  
Meng J, Wang R, Zhu JH. New problem in the detection of antibiotics in raw milk [J]. Chin Dairy Ind, 2010, 38(9): 42-44.
- [3] Holthoon F, Mulder PPJ, Bennekoum EO. Quantitative analysis of

- penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 396: 3027–3040.
- [4] Riediker S, Stadler RH, *et al.* Simultaneous determination of five  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 1614–1621.
- [5] Lara FJ, Garcia-Capana AM, Alés-Barrero F, *et al.* Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2006, 78: 7665–7673.
- [6] 张琦, 叶能胜, 谷学新, 等. 固相萃取-胶束电动色谱法测定牛奶中的 4 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素[J]. *色谱*, 2008, 26(6): 682–686.  
Zhang Q, Ye NS, Gu XX, *et al.* Simultaneous determination of four  $\beta$ -lactam antibiotics in milk by solid-phase extraction–micellar electro kinetic chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2008, 26(6): 682–686.
- [7] Li H, Xia X, Xue YN, *et al.* Simultaneous determination of amoxicillin and prednisolone in bovine milk using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 900: 59–63.
- [8] 崔生辉, 李景云, 马越, 等. “生鲜牛乳抗生素分解剂”的鉴定与检测[J]. *中国食品卫生杂志*, 2007, 19: 113–116.  
Cui SH, Li JY, Ma Y, *et al.* Characterization and detection of antibiotic destroyer in raw milk [J]. *Chin J Food Hyg*, 2007, 19: 113–116.
- [9] 李锦荣, 胡科锋, 张远平. 抗生素分解剂  $\beta$ -内酰胺酶的检测方法研究[J]. *现代食品科技*, 2011, 27: 1020–1024.  
Li JR, Hu KF, Zhang YP. Development of a detection method for  $\beta$ -lactamase as antibiotic destroyer in milk [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2011, 27: 1020–1024.
- [10] 刘珊珊, 单艺, 满朝新, 等. 高效液相色谱—二极管阵列检测法测定原料乳中的舒巴坦[J]. *食品工业科技*, 2012, 33 (16): 64–66.  
Liu SS, Shan Y, Man CX, *et al.* Determination of sulbactam in raw milk by the high-performance liquid chromatography–photodiode array detection [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2012, 33 (16): 64–66.
- [11] 郑小严, 林钦, 游飞明, 等. 超高效液相色谱-串联四极杆质谱法同时检测乳制品中  $\beta$ -内酰胺酶抑制剂克拉维酸钾、他唑巴坦和舒巴坦的残留量[J]. *分析实验室*, 2013, 32 (7): 47–51.  
Zheng XY, Lin Q, You FM, *et al.* Simultaneous determination of  $\beta$ -lactamase inhibitors such as clavulanate potassium, tazobactam and salbactam residues in dairy products by UPLC–MS/MS [J]. *Chin J Anal Lab*, 2013, 32 (7): 47–51.
- [12] 薛霞, 王骏, 刘桂亮, 等. 亲水作用色谱 - 串联四极杆质谱测定液态奶中舒巴坦[J]. *分析测试学报*, 2012, 31 (6): 700–704.  
Xue X, Wang J, Liu GL, *et al.* Determination of sulbactam in milk by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry (HILIC–MS/MS) [J]. *J Instrum Anal*, 2012, 31 (6): 700–704.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



张立, 学士, 副研究员, 主要研究方向为食品检验检疫技术。

E-mail: zhangli@caiq.gov.cn,  
fengf\_2005@163.com



储晓刚, 研究员, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: xgchu@vip.163.com