

# 高效液相色谱-高分辨质谱法定性筛查牛奶中 49 种 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留

于倩倩<sup>1</sup>, 汪龙飞<sup>2</sup>, 鲍蕾<sup>2\*</sup>

[1. 吉林大学食品科学与工程学院, 长春 130062; 2. 雀巢研发(中国)有限公司,  
雀巢食品安全研究院, 北京 100016]

**摘要: 目的** 开发和验证定性筛查牛奶中 49 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的高效液相色谱-高分辨质谱法(high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS)。**方法** 牛奶经磷酸盐缓冲液及乙腈提取后, 加入硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )和氯化钠( $\text{NaCl}$ )进行盐析, 离心后取部分上清液经  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  和  $\text{C}_{18}$  混合的分散式固相萃取填料(dispersive solid phase extraction, d-SPE)净化, 净化液浓缩定容后, 使用 HPLC-HRMS 分别以全扫描-数据依赖型二级扫描(full scan-data dependent secondary acquisition, Full MS/dd-MS<sup>2</sup>)和全扫描-平行反应监测二级扫描(full scan-selected ion monitoring/parallel reaction monitoring, Full MS/PRM)两种模式进行数据采集。**结果** 在 Full MS/PRM 模式下, 45 种抗生素通过方法验证, 假阳性率和假阴性率都小于 5%; 在 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 模式下, 43 种抗生素通过方法验证, 假阳性率和假阴性率在规定的目标浓度下均低于 5%, Full MS/PRM 数据采集模式更适用于多兽药残留的定性筛查。**结论** 此方法适用于牛奶样品中  $\beta$ -内酰胺类抗生素的定性筛查, 并且高分辨质谱的 Full MS/PRM 采集模式相较于 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 采集模式, 抗干扰性更好, 更适用于复杂基质中目标物的定性筛查。

**关键词:**  $\beta$ -内酰胺类抗生素; 高分辨质谱法; 目标物筛查; 牛奶

## Qualitative screening of 49 kinds of $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry

YU Qian-Qian<sup>1</sup>, WANG Long-Fei<sup>2</sup>, BAO Lei<sup>2\*</sup>

[1. College of Food Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Nestlé China Food Safety Institute, Nestlé Research & Development (China), Beijing 100016, China]

**ABSTRACT: Objective** To developed and validate a qualitative screening method for the determination of 49 kinds of  $\beta$ -lactam antibiotic residues in milk by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS). **Method** Milk was extracted with a mixture of a phosphate buffer solution and acetonitrile followed by a salt partition using sodium sulphate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) and sodium chloride ( $\text{NaCl}$ ). After centrifugation, an aliquot of the supernatant was cleaned by dispersive solid phase extraction (d-SPE) which consisted of a mixture of  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and octadecyl-silica  $\text{C}_{18}$  sorbents. After concentration and constant volume of the purification solution, HPLC-HRMS were used for data acquisition in 2 modes: Full scan-data dependent secondary acquisition

\*通信作者: 鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com

\*Corresponding author: BAO Lei, Professor, Nestlé Research & Development (China), No.6, Jiuxianqiao Road, Chaoyang District, Beijing 100016, China. E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com

(Full MS/dd-MS<sup>2</sup>) and full scan-selected ion monitoring/parallel reaction monitoring (Full MS/PRM). **Result** The 45 kinds of antibiotic passed through the validation with false positive and negative rate less than 5% in Full MS/PRM mode; 43 kinds of antibiotics passed through the validation with false positive and negative rate less than 5% at the specified target concentration in Full MS/dd-MS<sup>2</sup> mode, Full MS/PRM was more suitable for the qualitative screening of multiple veterinary drug residues. **Conclusion** This method is suitable for the qualitative screening of  $\beta$ -lactam antibiotics residues in milk. Comparing to Full MS/dd-MS<sup>2</sup>, Full MS/PRM is more robust, and it is more suitable for the qualitative screening of veterinary drug residues in complex matrix.

**KEY WORDS:**  $\beta$ -lactam antibiotic; high resolution mass spectrometry; targeted screening; milk

## 0 引言

$\beta$ -内酰胺类抗生素是治疗奶牛乳腺炎的常用药物,不合理给药或治疗后不遵循用药指南停止收奶会导致在牛奶中存在此类药物残留,给食品安全和人类健康造成潜在危害<sup>[1-5]</sup>。牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留检测方法多是基于液相色谱-串联三重四极杆质谱法(liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry, LC-MS/MS),但是受限于 LC-MS/MS 的扫描速度、灵敏度和分辨率,其更适用于十几种甚至上百种目标抗生素残留的定量分析,不能进行更多组分的非目标物定性筛查目的。静电场离子阱高分辨质谱(Orbitrap)则具有多组分检测时所需要的高分辨率和灵敏度,一针进样可以同时分析上百种化合物。并且 Orbitrap 的超高质量精度能确保筛查结果的正确性。相对于 LC-MS/MS 只能采集目标化合物的信息,Orbitrap 在进行目标物筛查时,可以同时开启全扫描的模式收集样品中未知污染物的信息,进而可对任何可疑或新的物质进行回顾性分析<sup>[6-11]</sup>。

由于食品成分复杂,基质效应和离子干扰仍是进行多组分兽药残留分析的限制因素<sup>[12-16]</sup>。因此需要选择一个通用的样品前处理方式去除牛奶基质中的干扰物质,减少基质效应和离子干扰,有效地提取被分析物质。QuEChERS 法与其他传统样品前处理方法相比,样品处理效率高,有机溶剂使用量少,对目标物具有更高的回收率和更好的分析性能<sup>[17-21]</sup>。在高分辨质谱采集模式方面,每种扫描模式各有优缺点,全扫描-数据依赖型二级扫描(full scan-data dependent secondary acquisition, Full MS/dd-MS<sup>2</sup>)对碎片离子识别具有良好重复性和较少的假阳性<sup>[22-24]</sup>,而全扫描-平行反应监测二级扫描(full scan-selected ion monitoring/parallel reaction monitoring, Full MS/PRM)模式仅监测目标前体离子,可以克服共洗脱基质信号对低浓度目标物的抑制<sup>[25-26]</sup>。本研究对传统的 QuEChERS 法进行改进,并应用于牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素的筛查,并对比 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 和 Full MS/PRM 两种采集模式在目标物筛查时的性能,从而选择一种更适用的多组分目标物筛查的

采集模式。另外,方法验证是确认开发的分析方法是否满足应用目的的主要途径和手段,本研究根据欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)发布的《兽药残留筛查的方法验证指南》,以假阴性率和假阳性率为指标,对开发的筛查方法进行验证<sup>[27]</sup>。

综上,本研究拟建立以 QuEChERS 样品前处理结合高效液相色谱-高分辨质谱法(high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS)对牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留进行定性筛查,并通过方法验证确认此方法在牛奶中 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留的定性筛查中的适用性,从而为市场上的牛奶质量安全的监控提供一种快速可靠的质谱筛查方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

市售常温奶、鲜奶购于当地超市。

甲醇、水、乙腈、甲酸(质谱纯,德国 Merck 公司); 甲酰胺(分析纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);  $\beta$ -内酰胺类抗生素标准品(纯度 90%~99%,天津阿尔塔科技有限公司); QuEChERS 提取盐包(4 g 硫酸钠+1 g 氯化钠)、净化盐包(0.9 g 硫酸钠+0.2 g C<sub>18</sub> 填料)、氧化锆均质子(分析纯,北京本立科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

超高效液相色谱 U3000 串联高分辨质谱仪 Q-Exactive Orbitrap、Multifuge X3R 离心机、Legend Micro 21R 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SPEX®SamplePrep Geno Grinder® 2010 样品均质机(美国 SPEX 公司); G-560 涡旋机(美国科技工厂); N-EVAPTM112 氮吹仪(美国 Organomation 公司); S100H 超声清洗机(德国 Elma 公司); AT200 分析天平(精度 0.01 g, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 混合标准工作溶液配制

按照表 1 分别移取相应体积的各个抗生素母液(0.1 mg/mL)于 10 mL 容量瓶中,用 25%乙腈水溶液定容,配制混合标准溶液(现配现用),用于样品检测。

表 1 标准工作溶液的制备  
Table 1 Preparation of standard working solution

兽药名称	CAS 号	储存液转移 体积/ $\mu\text{L}$	标准工作溶液 质量浓度/ $(\mu\text{g}/\text{mL})$
阿莫西林	61336-70-7	20	0.2
氨苄西林	69-53-4	20	0.2
阿洛西林	37091-66-0	20	0.2
阿扑西林	63358-49-6	40	0.4
苜星青霉素	1538-09-6	20	0.2
氯唑西林	642-78-4	20	0.2
双氯西林	13412-64-1	20	0.2
美洛西林	32887-01-7	20	0.2
甲氧西林	7246-14-2	20	0.2
萘夫西林	7177-50-6	20	0.2
苯唑西林	1173-88-2	20	0.2
青霉素 G	113-98-4	20	0.2
青霉素 V	87-08-1	40	0.4
苯氧乙基青霉素	30302-52-4	80	0.8
哌拉西林	61477-96-1	20	0.2
匹氨西林	26309-95-5	40	0.4
普鲁卡因青霉素 G	6130-64-9	20	0.2
舒巴坦	68373-14-8	20	0.2
舒他西林	83105-70-8	40	0.4
他唑巴坦	89786-04-9	20	0.2
头孢乙腈	10206-21-0	100	1
头孢克洛	53994-73-3	100	1
头孢羟氨苄	50370-12-2	400	4
头孢孟多	30034-03-8	100	1
头孢匹林	21593-23-7	100	1
头孢硫脒	33075-00-2	100	1
头孢地尼	91832-40-5	100	1
头孢吡肟	123171-59-5	100	1
头孢他美酯	65243-33-6	100	1
头孢克肟	79350-37-1	400	4
头孢地嗪	69739-16-8	200	2
头孢哌酮	62893-19-0	100	1
头孢噻肟	63527-52-6	100	1
头孢替坦	69712-56-7	200	2
头孢替安	61622-34-2	400	4
头孢西丁	35607-66-0	200	2
头孢匹罗	84957-29-9	100	1
头孢泊肟	80210-62-4	100	1
头孢喹诺	118443-89-3	100	1
头孢他啶	72558-82-8	200	2
头孢唑肟	68401-81-0	100	1
头孢呋辛	55268-75-2	100	1
头孢呋辛酯	64544-07-6	100	1
头孢氨苄	15686-71-2	100	1
头孢洛宁	5575-21-3	100	1
头孢噻吩	153-61-7	100	1
头孢拉定	38821-53-3	100	1
脱乙酰头孢噻肟	66340-28-1	100	1
去乙酰甲酰头孢 噻吩	120882-22-6	500	5

### 1.3.2 磷酸盐缓冲液配制

称取 $(35.5\pm 0.1)$  g 磷酸氢二钠, 置于 500 mL 的烧杯中, 加入 400 mL 水, 用磁力搅拌器搅拌直至完全溶解, 转移至 500 mL 容量瓶中并用水定容, 混合均匀。

### 1.3.3 样品前处理

准确称取 $(5\pm 0.01)$  g 牛奶于 50 mL 离心管中。向样品中加入 10 mL 磷酸盐缓冲液, 并加入一袋氧化锆均质子, 使用均质机以 1700 r/min 均质 3 min。随后加入 12 mL 乙腈, 以 1700 r/min 的速度均质 5 min。加入 QuEChERS 提取盐包后, 立即手摇或涡旋 1 min, 确认样品无结块的现象发生, 以 1700 r/min 的速度混匀 5 min 后, 将样品转移至离心机, 在室温下以  $3800\times g$  离心 10 min 得上清液。取 8 mL 上清液于 15 mL 离心管中, 加入 QuEChERS 净化盐包, 立即手摇或涡旋 1 min, 使用均质机以 1700 r/min 的速度混匀 5 min, 转移至离心机, 在室温下以  $3800\times g$  离心 10 min。取 6 mL 上清液于 15 mL 的离心管中, 在 $(35\pm 2)^\circ\text{C}$ 下氮吹至 1 mL 左右, 加 1 mL 水, 涡旋均匀并超声 1 min, 继续氮吹至少于 1 mL, 用水补加至 1 mL, 转移至 1.5 mL 离心管中, 在  $4^\circ\text{C}$  下以  $17000\times g$  离心 10 min, 将上清液转移到进样瓶中以备 HPLC-HRMS 分析。

### 1.3.4 色谱条件

流动相 A: 水 $[0.5\text{ mmol/L}$  甲酸铵和  $0.1\%$  甲酸 $(V/V)]$ ; 流动相 B: 甲醇 $[0.5\text{ mmol/L}$  甲酸铵和  $0.1\%$  甲酸 $(V/V)]$ ; 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) (美国 Waters 公司); 保护柱: UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  Van Guard (5 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) (美国 Waters 公司); 柱温:  $40^\circ\text{C}$ ; 进样体积: 10  $\mu\text{L}$ ; 转换阀: 在 0.5~12 min 之间将洗脱液切换至质谱检测器, 0.5 min 之前和 12 min 之后洗脱液切换至废液; 流速: 0.4 mL/min; 梯度洗脱程序: 0 到 0.5 min, 流动相 A 维持在 95%; 0.5 到 2.5 min, 流动相 A 从 95% 降低至 65%; 2.5 到 10 min, A 从 65% 减至 0%; 10 到 12 min, A 维持在 0%; 12 到 12.5 min, A 从 0% 升至 95%; 12.5 至 16 min, A 维持 95% 不变。

### 1.3.5 质谱条件

加热电喷雾离子源 (heated electrospray ionization, HESI), 鞘气流速 50 psi, 辅助气流速 13 psi, 吹扫气流速 3 psi, 正模式喷雾电压 3.8 kV, 负模式喷雾电压 2.8 kV, 离子传输管温度  $380^\circ\text{C}$ , 加热气温度  $450^\circ\text{C}$ , 离子透镜水平 50。正模式负模式各扫一次, 分别采用两种扫描模式: Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 和 Full MS/PRM。质量轴扫描范围: 100~1000  $m/z$ ,  $\beta$ -内酰胺类抗生素高分辨质谱扫描母离子  $m/z$  值和保留时间如表 2 所示。碰撞能量 (collision energy, NCE) 分别为 10、20 和 30。一级全扫描分辨率为 70000, dd-MS<sup>2</sup> 和 PRM 二级子离子扫描分辨率为 17500。PRM 采集模式下各个兽药二级子离子采集窗口为保留时间 $\pm 30$  s。

### 1.3.6 数据处理

首先利用  $\beta$ -内酰胺类抗生素标准品建立此类兽药定性

筛查的数据库, 数据库包含所筛查兽药母离子的精确  $m/z$  值, 保留时间及同位素比例信息。用 Trace Finder™5.0(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)软件处理原始数据, 按表 2 的筛查参数, 结合已建立的数据库对原始数据进行定性分析。

### 1.3.7 方法验证实验设计

对于同一个牛奶样品分别称取 3 份, 一份牛奶不进行加标, 记作空白样品。一份牛奶加标 1 倍的  $\beta$ -内酰胺类抗生素 STC, 记作  $1 \times \text{STC}$ 。一份牛奶加标 2 倍的  $\beta$ -内酰胺类抗生素目标筛查浓度, 记作  $2 \times \text{STC}$ 。每种  $\beta$ -内酰胺类抗生素的 STC 值如表 2 所示。3 份样品分别按照 1.3.3 进行样品前处理和 1.3.6 进行数据处理。分别按公式(1)、(2)计算各个抗生素的空白响应比值( $R_{\text{SB}/\text{S1}}$ )和加标响应比值( $R_{\text{S1}/\text{S2}}$ )。

$$R_{\text{SB}/\text{S1}} = \text{空白样品中抗生素的响应值} / 1 \times \text{STC 样品中抗生素的响应值} \quad (1)$$

$$R_{\text{S1}/\text{S2}} = 1 \times \text{STC 样品中抗生素的响应值} / 2 \times \text{STC 样品中抗生素的响应值} \quad (2)$$

分别将  $R_{\text{SB}/\text{S1}}$  和  $R_{\text{S1}/\text{S2}}$  的值与实验中设定的截断值 ( $V_{\text{cut-off}}$ ) 进行比较, 当样品中  $R_{\text{S1}/\text{S2}} \leq V_{\text{cut-off}}$ , 该抗生素在  $1 \times \text{STC}$  样品中被判定为假阴性(FN); 当样品中  $R_{\text{SB}/\text{S1}} \geq V_{\text{cut-off}}$ , 该抗生素在空白样品中被判定为假阳性(FP)。

本研究选取了 51 个牛奶样品(包含全脂灭菌乳、部分脱脂灭菌乳、脱脂灭菌乳)进行方法验证的研究, 牛奶样品使用

HPLC-HRMS 对目标  $\beta$ -内酰胺类抗生素进行筛查, 确认牛奶本底不存在待检测的抗生素。依据欧盟《兽药残留筛查方法验证指南》方法性能考察参数规定, FP 和 FN 同时满足  $< 5\%$ , 则证明此方法适用于此抗生素在牛奶中的筛查目的。

### 1.3.8 样品检测

分别称取 2 份 5 g 样品, 一份样品不加标, 一份样品加标  $1 \times \text{STC}$  浓度。按照 1.3.3 进行样品前处理和 1.3.6 进行数据处理。如样品中此抗生素的响应与  $1 \times \text{STC}$  中此抗生素的响应比值大于  $V_{\text{cut-off}}$ , 则样品中可能含有抗生素, 抗生素的含量可以使用相应的定量方法进行定量检测, 否则样品中此抗生素的含量小于 STC 浓度。

## 2 结果与分析

### 2.1 方法验证

#### 2.1.1 筛查目标浓度的设定

定性筛查方法中目标化合物的 STC 确认取决于高分辨质谱的灵敏度, 通常在满足灵敏度要求的情况下, STC 的值越低越好。另外, STC 值需要低于此化合物法规规定的 MRL。本研究中抗生素的 STC 设置参考了 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》, 方法中设置的 STC 均小于等于其规定的 MRL。

表 2 兽药提取离子荷质比、保留时间、筛查目标浓度及最大残留限量信息

Table 2 Charge-to-mass ratios, retention times, screening targeted concentrations and maximum residue limits of veterinary drugs

兽药名称	化学式	提取离子量	加荷方式	STC/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MRL/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	保留时间/min
阿莫西林	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	366.1118	M+H	4	4	2.26
氨苄西林	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	350.1169	M+H	4	4	3.47
阿洛西林	$\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}$	462.1442	M+H	4	ND	5.43
阿扑西林	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$	494.1704	M+H	8	ND	2.61
苄星青霉素	$\text{C}_{16}\text{N}_2\text{H}_{20}$	241.1699	M+H	4	ND	2.12
氯唑西林	$\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_5\text{S}$	436.0729	M+H	4	30	6.66
双氯西林	$\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	470.0339	M+H	4	ND	7.03
美洛西林	$\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	326.1533	M+H	4	ND	3.60
甲氧西林	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$	381.1115	M+H	4	ND	5.37
萘夫西林	$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	415.1322	M+H	4	ND	7.03
苯唑西林	$\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	402.1118	M+H	4	30	6.45
青霉素 G	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	335.106	M+H	4	ND	5.85
青霉素 V	$\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	373.0829	M+Na	8	ND	6.43
苯氧乙基青霉素	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$	365.1166	M+H	16	ND	6.75
哌拉西林	$\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}$	518.1704	M+H	4	ND	5.63
匹氨西林	$\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	464.185	M+H	8	ND	6.29
普鲁卡因青霉素 G	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$	237.1598	M+H	4	4	2.27
舒巴坦	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_5\text{S}$	232.0285	M-H	4	ND	2.38
舒他西林	$\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2$	593.1381	M-H	8	ND	4.61
他唑巴坦	$\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$	301.0601	M+H	4	ND	2.24
头孢乙腈	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$	357.0863	M+NH <sub>4</sub>	20	ND	2.93
头孢克洛	$\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$	368.0466	M+H	20	ND	3.18
头孢羟氨苄	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	386.0781	M+Na	80	ND	2.39
头孢孟多	$\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$	485.0672	M+Na	20	ND	4.19
头孢匹林	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$	424.0632	M+H	20	ND	2.61

表 2(续)

兽药名称	化学式	提取离子量	加荷方式	STC/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	MRL/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	保留时间/min
头孢硫脒	$\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}_2$	473.1523	M+H	20	ND	3.81
头孢地尼	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2$	396.0431	M+H	20	ND	3.03
头孢吡肟	$\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$	481.1322	M+H	20	ND	2.01
头孢他美酯	$\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$	512.1268	M+H	20	ND	6.23
头孢克肟	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$	454.0486	M+H	80	ND	3.47
头孢地嗪	$\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_4$	585.0349	M+H	40	ND	4.45
头孢哌酮	$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_9\text{O}_8\text{S}_2$	646.1497	M+H	20	ND	3.69
头孢噻肟	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$	456.0642	M+H	20	ND	3.35
头孢替坦	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_7\text{O}_8\text{S}_4$	597.9914	M+Na	40	ND	3.31
头孢替安	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_9\text{O}_4\text{S}_3$	548.0927	M+Na	80	ND	1.88
头孢西丁	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_7\text{S}_2$	450.04	M+Na	40	ND	3.84
头孢匹罗	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$	515.1166	M+H	20	ND	2.55
头孢泊肟	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$	428.0693	M+H	20	ND	3.25
头孢喹诺	$\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}_2$	529.1322	M+H	20	ND	2.83
头孢他啶	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_7\text{S}_2$	547.1064	M+H	40	ND	2.67
头孢唑肟	$\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_2$	384.0431	M+H	20	ND	2.99
头孢呋辛	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$	442.1027	M+NH <sub>4</sub>	20	ND	3.51
头孢呋辛酯	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$	533.0949	M+Na	20	ND	4.88
头孢氨苄	$\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	348.1013	M+H	20	100	3.29
头孢洛宁	$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}_2$	459.0791	M+H	20	ND	3.00
头孢噻吩	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	419.0342	M+Na	20	ND	4.85
头孢拉定	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$	350.1169	M+H	20	ND	3.49
脱乙酰头孢噻肟	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_6\text{S}_2$	414.0537	M+H	20	ND	2.60
去吠喃甲酰头孢噻肟	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}_3$	430.0308	M+H	100	100	3.55

注: 筛查目标浓度(screening targeted concentration, STC); 最大残留限量(maximum residue limit, MRL); ND 代表目前没有法规最大残留限量。

### 2.1.2 $V_{\text{cut-off}}$ 的设定

$V_{\text{cut-off}}$  通常是定性筛查方法中的一个判定阳性和阴性的临界值, 它可以是某一浓度下的信号绝对响应值, 也可以是信号响应的相对比值。当使用质谱做定性筛查工具时, 与信号的绝对响应值筛选相比, 信号的相对比值筛选能够对每个测试样本的结果进行自我质量控制, 降低仪器性能及基质效应对被测物响应值的影响<sup>[28-30]</sup>。本研究分析基质空白样品和相应加标样品(1×STC 和 2×STC)的响应比值来确定  $V_{\text{cut-off}}$ , 通过计算 51 个样品中每种抗生素的  $R_{\text{SB}/\text{S1}}$  和  $R_{\text{S1}/\text{S2}}$  值, 作点状分布图(图 1), 选取合理的  $V_{\text{cut-off}}$ 。考虑到

该值的选取越靠近  $R_{\text{S1}/\text{S2}}$ , 呈现假阴性的可能性越大, 反之呈现假阳性的可能性大。为了降低假阴性概率的出现, 从确保食品安全的角度考虑, 本研究将  $V_{\text{cut-off}}$  设定为 0.2, 并以此判断此抗生素是否在样品中检出。

### 2.1.3 方法验证结果

49 种  $\beta$ -内酰胺类抗生素在 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 和 Full MS/PRM 两种数据扫描模式下的验证结果如表 3 所示。结果发现, 匹氨西林极易降解, 需现配现用, 及时上样检测, 所以只选取 40 个有效数据进行假阳性和假阴性分析, 其余抗生素分别以 51 个数据点进行假阳性和假阴性分析。在 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 数据采集模式下, 头孢克肟和头孢地嗪在当前 STC (40 和 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 下未通过验证, 假阴性率分别为 25.49% 和 17.65%。通过原始数据分析, 此两种抗生素在 HRMS 上的响应相对其他抗生素较低, 由于此两种抗生素目前没有规定 MRL, 因此, 可以提高此两种抗生素的 STC, 进一步验证此方法对其的适用性。阿莫西林、舒他西林、头孢替坦和头孢他啶 4 种抗生素在两种扫描模式下加标样品都未出现正常响应。但是相同加标浓度的标准品溶液在高分辨质谱上响应正常, 由此推断可能是样品前处理方法不适用这 4 种抗生素, 导致加标样品回收率较低, 因此, 需要考虑改善样品前处理方法, 再进一步验证。综合验证数据发现, 在 Full MS/PRM 模式下, 45 种抗生素通过方法验证,

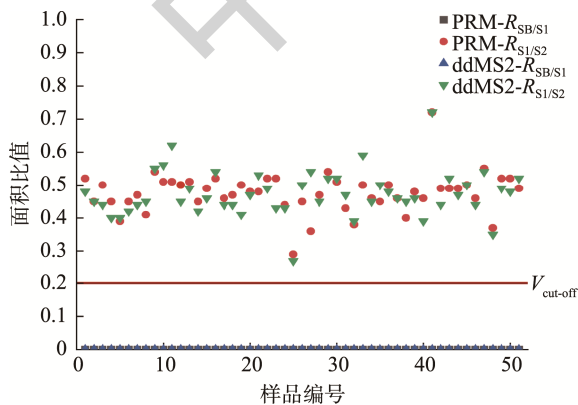


图 1 氨苄西林  $R_{\text{SB}/\text{S1}}$ 、 $R_{\text{S1}/\text{S2}}$  和  $V_{\text{cut-off}}$  值分布图

Fig.1 Distributions diagram of  $R_{\text{SB}/\text{S1}}$ ,  $R_{\text{S1}/\text{S2}}$  and  $V_{\text{cut-off}}$  for ampicillin

假阳性率和假阴性率都小于 5%; 在 Full MS/dd-MS<sup>2</sup> 模式下, 43 种抗生素通过方法验证, 假阳性率和假阴性率在规定的目标浓度下均低于 5%, Full MS/PRM 采集模式更适用于多抗生素的目标物筛查方式。后续常规样品分析将只采用 Full MS/PRM 采集模式。

表 3 牛奶中  $\beta$ -内酰胺类抗生素的验证结果(%)  
Table 3 Validation results of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk (%)

兽药名称	样品数	Full MS/PRM		Full MS/dd-MS <sup>2</sup>	
		假阳性率	假阴性率	假阳性率	假阴性率
氨苄西林	51	0	0	0	0
阿洛西林	51	0	0	0	0
阿扑西林	51	0	0	0	1.96
苜星青霉素	51	0	1.96	0	1.96
氯唑西林	51	0	0	0	0
双氯西林	51	0	0	0	0
美洛西林	51	0	0	0	0
甲氧西林	51	0	0	0	0
萘夫西林	51	0	0	0	0
苯唑西林	51	0	1.96	0	0
青霉素 G	51	0	1.96	0	3.92
青霉素 V	51	0	1.96	0	0
苯氧乙基青霉素	51	0	0	0	3.92
哌拉西林	51	0	0	0	0
匹氨西林	40	0	0	0	0
普鲁卡因青霉素 G	51	0	0	0	0
舒巴坦	51	0	0	0	1.96
他唑巴坦	51	1.96	0	1.96	0
头孢乙腈	51	0	1.96	0	1.96
头孢克洛	51	0	0	0	0
头孢羟氨苄	51	0	0	0	0
头孢孟多	51	0	0	0	0
头孢匹林	51	0	0	0	0
头孢硫脒	51	0	0	0	0
头孢地尼	51	0	0	0	0
头孢吡肟	51	0	0	0	1.96
头孢他美酯	51	0	0	0	0
头孢克肟	51	0	3.92	0	25.49
头孢地嗪	51	0	0	0	17.65
头孢哌酮	51	0	0	0	0
头孢噻肟	51	0	0	0	0
头孢替安	51	0	0	0	0
头孢西丁	51	0	0	0	1.96
头孢匹罗	51	0	0	0	0
头孢泊肟	51	0	0	0	0

表 3(续)

兽药名称	样品数	Full MS/PRM		Full MS/dd-MS <sup>2</sup>	
		假阳性率	假阴性率	假阳性率	假阴性率
头孢喹诺	51	0	1.96	0	0
头孢唑肟	51	0	0	0	0
头孢呋辛	51	0	0	0	0
头孢呋辛酯	51	0	1.96	0	0
头孢氨苄	51	0	0	0	0
头孢洛宁	51	0	0	0	0
头孢噻吩	51	0	0	0	0
头孢拉定	51	0	0	0	0
脱乙酰头孢噻肟	51	0	0	0	0
去咪喃甲酰胺头孢噻肟	51	0	0	0	3.92
阿莫西林	51	0	100	0	100
舒他西林	51	0	100	0	100
头孢替坦	51	0	100	0	100
头孢他啶	51	0	100	0	100

## 2.2 样品筛查

本研究对采购于市面上的 48 个牛奶样品进行筛查分析。在 Full MS/PRM 采集模式下, 头孢克洛在 38 个样品中检出, 含量可能超过 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 头孢氨苄在 15 个样品中检出, 含量可能超过 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前头孢克洛在 GB 31650—2022 没有最大限量要求, 因此不存在合规问题的担忧。头孢氨苄在牛奶中的 MRL 为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 从食品安全角度出发, 需要进一步利用现有的定量分析方法(如 LC-MS/MS)或后续开发高分辨质谱法进行定量分析, 对阳性样品进行定量, 以提供检测数据进行风险评估, 进而推断是否会对消费者身体健康产生安全隐患。

## 3 结论

本研究开发了改进的 QuEChERS 样品前处理结合 HPLC-HRMS 对牛奶样品中的  $\beta$ -内酰胺类抗生素残留进行定性筛查的方法。相对于传统的胶体金法或酶联免疫法等快速筛查方法, HPLC-HRMS 选择性更强, 并且质谱可作为确性的筛查工具, 增加筛查的确认度, 避免假阳性和假阴性的发生。与利用 LC-MS/MS 对兽药筛查方法相比, HPLC-HRMS 具有更高的质量精度和分辨率, 方法可以筛查更多的化合物, 更重要的是 HPLC-HRMS 在进行目标物筛查的同时可以采集更多的非目标化合物的信息。可以后期对样本进行其他污染物回顾分析。

本方法选择合理的  $V_{\text{cut-off}}$  作为判读假阳性和假阴性的临界值, 较好的降低了仪器性能及基质效应对被测物响

应值的影响。同时比较了全扫描加数据依赖二级扫描(Full MS/dd-MS<sup>2</sup>)和全扫描-选择离子监测/平行反应监测二级扫描(Full MS/PRM)两种数据采集模式,两者相较而言,Full MS/PRM 扫描模式在克服共洗脱基质信号对目标物的抑制方面更具优势,更适合于目标物质的定性筛查应用。通过对市售样品的筛查,头孢克洛和头孢氨苄在部分牛奶中检出。目前建立的方法可用于对市售牛奶中包含本研究涉及药物进行定性筛查,但在鸡蛋、鸡肉类的动物源性食品基质中的适用性需进一步验证,但是目前此方法仅适用于定性筛查,对于阳性样品中抗生素的定量分析,有待进一步开发高分辨质谱定量方法,达到一针进样对所检药物既能定性又能精准定量的目的,以期为检测动物源性食品中的 $\beta$ -内酰胺类抗生素残留提供更高效的方法。

### 参考文献

- [1] SACHI S, FERDOUS J, SIKDER MH, *et al.* Antibiotic residues in milk: Past, present, and future [J]. *J Adv Vet Anim Res*, 2019, 6(3): 315–332.
- [2] BAYNES RE, DEDONDER K, KISSELL L, *et al.* Health concerns and management of select veterinary drug residues [J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 88: 112–122.
- [3] 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 XY, CAI XX. Rapid simultaneous determination of 53 beta-lactam antibiotics and their metabolites in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(7): 693–701.
- [4] 闫超群, 李帅鹏, 张申, 等. 头孢洛宁乳房注入剂(干乳期)在牛奶中的残留消除[J]. *中国农业科学*, 2019, 52(2): 367–375.  
YAN CQ, LI SP, ZHANG S, *et al.* Residue depletion study and withdrawal period for cefalonium intramammary infusion (dry cow) in bovine milk [J]. *Sci Agric Sin*, 2019, 52(2): 367–375.
- [5] 陈美松, 张敏, 周光胜. 奶牛乳腺炎的诊断与防治[J]. *养殖与饲料*, 2020, (5): 92–93.  
CHEN MS, ZHANG M, ZHOU GS. Diagnosis and prevention of cow mastitis [J]. *Anim Breed Feed*, 2020, (5): 92–93.
- [6] DONG H, XU Y, YE H, *et al.* Advances in analysis of contaminants in foodstuffs on the basis of orbitrap mass spectrometry: A review [J]. *Food Anal Method*, 2021, 15(3): 803–819.
- [7] DELATOUR T, RACAULT L, BESSAIRE T, *et al.* Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges [J]. *Food Addit Contam A*, 2018, 35(4): 632–645.
- [8] DASENAKI ME, BLETSOU AA, KOULIS GA, *et al.* Qualitative multiresidue screening method for 143 veterinary drugs and pharmaceuticals in milk and fish tissue using liquid chromatography quadrupole- time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(18): 4493–4508.
- [9] TURNIPSEED SB, STOREY JM, LOHNEJJ, *et al.* Wide-scope screening method for multiclass veterinary drug residues in fish, shrimp, and eel using liquid chromatography-quadrupole high-resolution mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(34): 7252–7267.
- [10] JIA W, CHU XG, CHANG J, *et al.* High-throughput untargeted screening of veterinary drug residues and metabolites in tilapia using high resolution orbitrap mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 957: 29–39.
- [11] ZHOU H, CAO YM, MIAO S, *et al.* Qualitative screening and quantitative determination of 569 pesticide residues in honeysuckle using ultra high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1606: 460374.
- [12] ALMEIDA MP, REZENDE CP, FERREIRA FD, *et al.* Optimization and validation method to evaluate the residues of beta-lactams and tetracyclines in kidney tissue by UPLC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2015, 144: 922–932.
- [13] HAN RW, ZHENG N, YU ZN, *et al.* Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2015, 181: 119–126.
- [14] LI J, REN XL, DIAO YY, *et al.* Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2018, 257: 259–264.
- [15] OYEDEJI AO, MSAGATI TAM, WILLIAMS AB, *et al.* Determination of antibiotic residues in frozen poultry by a solid-phase dispersion method using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Toxicol Rep*, 2019, 6: 951–956.
- [16] BANI-ASADI FZ, AHMADI M, ROKNI N, *et al.* Assessment of the distribution and concentration of residual antibiotics in chicken meat and liver samples collected in Tehran by liquid chromatography and tandem mass spectrometry [J]. *Egypt J Vet Sci*, 2021, 52(1): 11–21.
- [17] ZHANG CY, DENG YC, ZHENG JF, *et al.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2019, 118: 517–537.
- [18] PERESTRELO R, SILVA P, PORTO-FIGUEIRA P, *et al.* QuEChERS-fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1070: 1–28.
- [19] SANTANA-MAYOR A, SOCAS-RODRIGUEZ B, HERRERA-HERRERA AV, *et al.* Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2019, 116: 214–235.
- [20] KIM L, LEE D, CHO HK, *et al.* Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals [J]. *Trends Environ Anal*, 2019, 22: e00063.

- [21] ZHANG CY, DENG YC, ZHENG JF, *et al.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2019, 118: 517–537.
- [22] IZZO L, RODRIGUEZ-CARRASCO Y, TOLOSA J, *et al.* Target analysis and retrospective screening of mycotoxins and pharmacologically active substances in milk using an ultra-high-performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry approach [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(2): 1250–1260.
- [23] SUN FF, TAN HG, LI YS, *et al.* An integrated data-dependent and data-independent acquisition method for hazardous compounds screening in foods using a single UHPLC-Q-orbitrap run [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 401: 123266.
- [24] RAJSKI L, RAMOS MDG, FERNANDEZ-ALBA AR. Evaluation of MS2 workflows in LC-Q-orbitrap for pesticide multi-residue methods in fruits and vegetables [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(23): 5389–5400.
- [25] CHEN Q, PAN XD, HUANG BF, *et al.* Screening of multi-class antibiotics in pork meat by LC-orbitrap-MS with modified QuEChERS extraction [J]. *RSC*, 2019, 9(48): 28119–28125.
- [26] CHEN Q, PAN XD, HUANG BF, *et al.* Quantification of 16  $\beta$ -lactams in chicken muscle by QuEChERS extraction and UPLC-Q-orbitrap-MS with parallel reaction monitoring [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2017, 145: 525–530.
- [27] BIERNACKI B. ELISA validation and determination of cut-off level for chloramphenicol residues in honey [J]. *J Vet Res*, 2015, 59(3): 353–356.
- [28] DASENAKI ME, THOMAIDIS NS. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 880: 103–121.
- [29] LEHOTAY SJ, LIGHTFIELD AR. Simultaneous analysis of aminoglycosides with many other classes of drug residues in bovine tissues by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an ion-pairing reagent added to final extracts [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(3): 1095–1109.
- [30] DELATOUR T, SAVOY MC, TARRES A, *et al.* Low false response rates in screening a hundred veterinary drug residues in foodstuffs by LC-MS/MS with analyte-specific correction of the matrix effect [J]. *Food control*, 2018, 94: 353–360.

(责任编辑: 郑丽黄周梅)

### 作者简介

于倩倩, 硕士研究生, 主要研究方向为食品污染物检测方法开发。

E-mail: Qianqian.Yu1@rd.nestle.com

鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。

E-mail: Lei.bao@rd.nestle.com