

关键词

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；青霉素类化合物

介绍

青霉素类化合物属于 β -内酰胺类抗生素中的一类，分为天然青霉素和半合成青霉素，能破坏细菌的细胞壁并在细菌细胞的繁殖期起杀菌作用，广泛用于预防和治疗动物疾病。青霉素在食品中的残留会对青霉素过敏的人产生健康危害，更为重要的是，青霉素被过量摄入人体中容易破坏健康人的正常菌群环境，导致人体免疫力降低。

本方案参考《GB/T 22975-2008牛奶和奶粉中阿莫西林、氨苄西林、哌拉西林、青霉素G、青霉素V、苯唑西林、氯唑西林、萘夫西林和双氯西林残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，采用75%乙腈水溶液对目标化合物进行提取，提取液用HLB柱经睿科Fotector Plus全自动固相萃取仪进行净化，高效液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量，整个检测结果具有良好的平行性与准确性。

1. 仪器与耗材

仪器和耗材

睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

睿科 MPE 真空平行浓缩仪

高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410

HLB 固相萃取柱 (RayCure, 500mg/6mL, 货号: RC-204-36477)

甲醇 (色谱纯), 乙腈 (色谱纯)、超纯水

75%乙腈水溶液: 取 300mL 乙腈与 100mL 水混合

0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH=8.0): 准确称取磷酸氢二钠 6.0g 溶解于 450mL 水中, 用氢氧化钠溶液调节 pH 值=8, 加水至 500mL

2. 样品制备及前处理

2.1 提取

准确称牛奶 4.0g 于 50mL 离心管中, 加入 20mL 75%乙腈水溶液, 涡旋提取 2.0min, 于离心机上以 4000rpm 的转速离心 10min。转移上清液至 MPE 浓缩杯, 再用 10mL 75%乙腈水溶液提取一次, 合并上清液于同一浓缩杯中。在 45℃ 条件下用 MPE 浓缩至约 7mL, 加入 2mL 磷酸盐缓冲液混匀, 转移到玻璃上样管中, 待净化。

2.2 固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科 Fotector Plus
固相萃取柱	HLB 柱 (RayCure, 500mg/6mL)
活化	甲醇, 超纯水, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液
淋洗	0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 超纯水
洗脱	75%乙腈水溶液

2.3 固相萃取净化

分别以 6mL 甲醇、6mL 水和 5mL 磷酸盐缓冲液活化 HLB 柱, 将上述样品溶液以 2.5mL/min 的速度进行上样, 用 2mL 磷酸盐缓冲液清洗样品瓶 2 遍, 再用 3mL 水淋洗柱子, 然后用气推的方式推干柱子。最后以 4mL 75%乙腈水溶液洗脱目标化合物, 收集洗脱液 (具体方法设置见图 1)。用超纯水将洗脱液定容至 4.0mL, 涡旋混匀, 过滤膜上机检测。

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	甲醇				2.8
2	活化	甲醇	有机废液	3	6	2.5
3	活化	水	废水	3	6	2.5
4	活化	0.1 mol/L磷酸盐缓冲液	废水	3	5	2.1
5	上样		废水	2.5	10	4.8
6	清洗样品瓶	0.1 mol/L磷酸盐缓冲液	废水	60	2	1.5
7	清洗样品瓶	0.1 mol/L磷酸盐缓冲液	废水	60	2	1.5
8	淋洗	水	废水	3	3	1.4
9	气推		废水	80	30	2.2
10	清洗注射泵	75%乙腈水溶液		60	4	0.5
11	洗脱	75%乙腈水溶液	收集	2	4	2.4
12	气推		收集	2	2	1.4
13	气推		收集	20	10	1.3
14	结束					
15						

图-1 Fotector Plus 固相萃取净化方法

3. 检测条件

3.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μ m \times 21 mm \times 50mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A:0.1% formic acid, B: Methanol
柱温	30 $^{\circ}$ C
进样体积	10 μ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 $^{\circ}$ C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	0.0-6.0 min, 80%流动相 A; 6.01-8.0 min, 20 %的流动相 A; 8.01-10.0 min, 80%流动相 A 保持 2 min

3.2 MRM 参数

Compound 化合物	Prec Ion 母离子	Prod Ion 子离子	Dwell (ms) 驻留时间	Frag (V) 裂解电压	CE (V) 碰撞能量
双氯西林	470	310.9	22	110	13
		160*	22	110	9
氯唑西林	436	277*	22	100	10
		160.1	22	100	9
奈夫西林	415	256*	22	110	14
		160	22	110	13
苯唑西林	402.1	243*	22	110	9
		160	22	110	9
阿莫西林	366.1	349.2*	22	70	4
		113.7	22	70	19
青霉素 V	351.1	160*	22	80	8
		113.9	22	80	39
氨苄西林	350.1	160.1	22	90	11
		106.1*	22	90	19
青霉素 G	335.1	175.9	22	100	12
		160.1*	22	100	14
哌拉西林	518.1	142.9	22	90	34
		160.1*	22	90	12

注：带“*”的为定量离子对

4. 样品测试

4.1 基质效应验证

为了消除基质带来的离子抑制对定量测定的影响，需要用空白样品按照上述前处理操作制备空白基质液，然后稀释一系列浓度标准品，制备基质工作曲线。

4.2 样品基质加标测试

为了验证该方法的回收率，本实验向空白牛奶样品(4g)中加入上述9种青霉素类标准品，添加水平为10 μg/kg 进行加标回收验证。测试结果如表-2所示，9种青霉素类的回收率在73%-95%之间，RSD值小于10%。说明该方法能够很好地用于牛奶样品中9种青霉素类抗生素的检测。



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2021年10月版