



doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2019.04.011

分散固相萃取结合 UPLC – MS/MS 测定柑桔中青霉素 G 及其代谢物残留

周杰, 赵静, 董超, 张耀海, 赵其阳, 焦必宁*

(中国农业科学院/西南大学柑桔研究所, 农业农村部柑桔产品质量安全风险实验室(重庆),
农业农村部柑桔及苗木质量监督检验测试中心, 重庆 400712)

摘要: 建立了分散固相萃取结合超高效液相色谱 – 串联质谱 (DSPE/UPLC – MS/MS) 快速检测柑桔中青霉素 G 及其代谢物青霉二酸和去羧青霉噻唑酸的分析方法。样品经 80% 乙腈提取, 十八烷基键合硅胶吸附剂 (C₁₈) 净化。目标残留物经 Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱分离, 以乙腈 – 0.1% 甲酸溶液为流动相进行梯度洗脱, 采用正离子多反应监测模式 (MRM) 检测, 基质匹配标准曲线法定量。结果表明, 3 种目标分析物可在 5 min 内实现有效快速分离; 在 5 ~ 2 000 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好 ($r^2 \geq 0.998 1$), 方法检出限 (LOD) 为 0.5 ~ 1 μg/kg, 定量下限 (LOQ) 为 5 ~ 10 μg/kg。在 3 个不同加标水平下, 柑桔果肉、果皮和全果中的平均回收率为 76.7% ~ 107%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.3% ~ 9.6%。该方法快速、简便、灵敏、准确, 适用于柑桔中青霉素 G 及其两种代谢物残留的测定。

关键词: 分散固相萃取; 青霉素 G; 代谢物; 超高效液相色谱 – 串联质谱 (UPLC – MS/MS); 柑桔
中图分类号: O657.7; TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 – 4957(2019)04 – 0442 – 07

Determination of Penicillin G and Its Metabolite Residues in Citrus by Ultra-high Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry with Dispersive Solid-phase Extraction

ZHOU Jie, ZHAO Jing, DONG Chao, ZHANG Yao-hai, ZHAO Qi-yang, JIAO Bi-ning*

(Quality Supervision and Testing Center for Citrus and Seedling, Laboratory of Risk Assessment for Citrus Quality and Safety, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Citrus Research Institute, Southwest University/Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: A rapid method was developed for the determination of penicillin G and its two metabolites (penillic acid and penilloic acid) residues in citrus by dispersive solid-phase extraction/ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (DSPE/UPLC – MS/MS). The citrus samples were extracted with 80% acetonitrile, then purified with C₁₈. The analytes were separated on an Acquity UPLC[®] HSS T3 column with acetonitrile and 0.1% formic acid solution as mobile phases by gradient elution, and finally detected by tandem mass spectrometry in positive ESI mode (ESI⁺). Identification and quantitation were performed by UPLC – MS/MS under multi-reaction monitoring (MRM) mode and matrix-matched standard curve method, respectively. Results showed that three analytes could realize an effective and rapid separation within 5 min. There were good linear relationships for the analytes in the concentration range of 5 – 2 000 μg/L with their correlation coefficients (r^2) not less than 0.998 1. The limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of the method were in the ranges of 0.5 – 1 μg/kg and 5 – 10 μg/kg, respectively. The spiked recoveries for penicillin G and its metabolites in blank citrus samples were in the range of 76.7% – 107%,

收稿日期: 2018 – 10 – 12; 修回日期: 2018 – 11 – 05

基金项目: 国家现代农业(柑桔)产业技术体系建设专项(CARS – 26); 国家柑桔及热带作物产品质量安全风险实验室(GJFP2018004); 2017年农业行业标准制订项目(181721301092371115); 中央高校基本科研业务费专项资金(SWU116078)

* 通讯作者: 焦必宁, 研究员, 研究方向: 果蔬质量安全与检测技术, E-mail: jiaobining@eric.cn

with relative standard deviations (RSD) of 1.3% - 9.6%. The method is rapid, simple, sensitive and accurate, and is suitable for the determination of penicillin G and its two metabolite residues in citrus.

Key words: dispersive solid-phase extraction; penicillin G; metabolites; ultra-high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC - MS/MS); citrus

柑桔是世界第一大水果,我国的柑桔种植面积和产量均居世界第一,但柑桔黄龙病、溃疡病等检疫性病害严重威胁我国柑桔业的发展。研究表明,通过叶面喷施或树干注射青霉素 G 对防治柑桔黄龙病有效^[1]。青霉素 G 属于 β -内酰胺类抗生素,广泛应用于人和动物疾病治疗、畜牧养殖以及种植业。其在酸、碱、亲核试剂、氧化剂等条件下易发生开环反应,产生的代谢物主要为青霉二酸 (Penillic acid) 和去羧青霉噻唑酸 (Penilloic acid)^[2]。这些代谢物无抗菌活性,但 3% ~ 5% 的青霉素过敏反应与其有关^[3],其中去羧青霉噻唑酸是造成过敏反应的主要原因^[4]。我国农业部 235 号公告^[5]和欧盟指令 No. 37/2010/EU^[6]规定青霉素类药物在动物性食品中的最大残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但对植物性食品未设相应限量。因此,建立柑桔中青霉素 G 及其代谢物残留的检测方法,对于研究青霉素在柑桔中的残留降解代谢规律,以及制定符合良好农业规范 (GAP) 的安全使用规程具有重要意义。

目前,食品中青霉素类药物残留的分析方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)^[7]、液相色谱 - 串联质谱法 (LC - MS/MS)^[8]、近红外光谱法 (NIR)^[9]、表面增强拉曼光谱法 (SERS)^[10] 和酶联免疫吸附测定法 (ELISA)^[11] 等,样品多为乳类、肉类、蛋类、水产品以及蜂蜜等动物性食品,而对植物性食品的检测鲜有报道^[2,12-13]。Aldeek 等^[2,12]建立了固相萃取结合超高效液相色谱 - 串联质谱法 (UPLC - MS/MS) 分析柑桔中青霉素 G、青霉二酸和去羧青霉噻唑酸的方法,青霉素 G 的回收率为 90% ~ 100%,青霉二酸和去羧青霉噻唑酸的回收率为 50% ~ 73%。随后利用该方法测定了柑桔果汁中的青霉素 G 及其代谢物,青霉素 G 的回收率接近 100%,青霉二酸和去羧青霉噻唑酸的回收率为 60% ~ 75%^[13]。但该方法操作繁琐,耗时费力,所用同位素内标的成本较高,且代谢产物的回收率偏低。

本研究采用分散固相萃取 (DSPE) 前处理技术,结合 UPLC - MS/MS 法,建立了柑桔中青霉素 G、青霉二酸和去羧青霉噻唑酸的快速测定方法。该方法操作简单、快速准确、灵敏度高、重现性好,检测成本低,可作为植物源食品中青霉素 G 及其代谢物的常规检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC - Quattro Premier XE 超高效液相色谱 - 串联质谱仪 (美国 Waters 公司),配有电喷雾离子源 (ESI) 和 MassLynx 4.1 工作站; Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); CL31/CL31R 多用途离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); KQ5200DE 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); 有机相针式滤器 (0.22 μm , 上海安谱科学仪器有限公司); Oasis HLB 柱 (6 mL/500 mg, 美国 Waters 公司); ENVI C₁₈ 柱 (12 mL/2 000 mg, 美国 Supelco 公司)。

甲醇、乙腈 (色谱纯, 德国 CNW 公司); 甲酸 (色谱纯, 成都市科龙化工试剂厂); N-丙基乙二胺 (PSA, 德国 CNW 公司); 超纯反相 C₁₈ 填料 (加拿大 SiliCycle 公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。标准品: 青霉素 G (97.2%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 青霉二酸 (99.3%)、去羧青霉噻唑酸 (95.0%, 德国 LGC GmbH 公司)。

1.2 标准溶液的配制

以乙腈 - 水 (1 : 1, 体积比) 为溶剂分别配制 500 mg/L 青霉素 G、1 000 mg/L 青霉二酸和 1 000 mg/L 去羧青霉噻唑酸单标储备液,再分别移取适量单标储备液,以乙腈 - 水 (1 : 1) 定容,配成质量浓度均为 100 mg/L 的 3 种目标物混合标准储备液,于棕色容量瓶内 - 50 $^{\circ}\text{C}$ 保存。测定时以乙腈 - 水 (1 : 1) 逐级稀释至所需浓度,现用现配。

1.3 样品前处理

准确称取均质的柑桔果皮、果肉及全果样品 5 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 80% 乙腈,涡旋混匀 30 s 后,超声提取 15 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 10 000 r/min 离心 5 min,将上清液倒入另一 50 mL 具塞离心管中。残渣中加入 10 mL 80% 乙腈,重复提取 1 次 (果皮重复提取 2 次,最后 1

次加入 9 mL 提取剂), 合并提取液并用 80% 乙腈定容至 25 mL(果皮定容至 30 mL)。上述提取液经涡旋混匀后, 取 2 mL 转移至装有 50 mg C_{18} 的离心管中涡旋 2 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.22 μm 有机滤膜后, 待测定。

1.4 色谱-质谱条件

1.4.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC[®] HSS T3 色谱柱(50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸溶液。梯度洗脱程序: 0~6.0 min, 5%~60% A; 6.0~8.0 min, 60%~90% A; 8.0~9.0 min, 90%~5% A。流速 0.25 mL/min; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 样品室温度 20 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 5 μL 。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI); 正离子扫描; 毛细管电压 3.5 kV; 射频透镜电压 0.1 V; 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$; 锥孔反吹气流量 50 L/h; 脱溶剂气温度 380 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流量 800 L/h; 光电倍增器电压 650 V; 碰撞气体为氩气, 碰撞气压 0.18 Pa; 多反应监测(MRM)模式检测。其它质谱参数见表 1。

表 1 青霉素 G 及其代谢物的质谱参数
Table 1 MS/MS parameters for penicillin G and its metabolites

Analyte	Retention time(min)	Precursor ion(m/z)	Product ion(m/z)	Cone voltage(V)	Collision energy(eV)
Penicillin G(青霉素 G)	4.65	335.1	160.0*, 176.0	20	12, 11
Penillic acid(青霉二酸)	2.69	335.1	128.0*, 289.1	30	26, 24
Penilloic acid(去羧青霉噻唑酸)	3.42	309.1	174.0*, 128.0	25	17, 21

* quantitative ion

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的优化

2.1.1 提取剂的选择 用于青霉素类抗生素残留分析的提取剂多为乙腈、水、乙腈-水溶液、甲醇以及磷酸盐缓冲液等。由于甲醇含有羟基, 会加速青霉素 G 降解为去羧青霉噻唑酸^[8], 而磷酸盐缓冲液不易挥发, 会污染离子源, 降低质谱的检测性能。因此, 实验比较了不同比例乙腈水溶液的提取效果。结果显示, 纯乙腈提取的回收率可满足要求(>70%), 但提取液颜色深, 杂质较多; 随着水的比例增加, 提取液的颜色变浅, 但青霉素 G 和去羧青霉噻唑酸的回收率逐渐降低; 而用 80% 乙腈提取时, 3 种分析物的回收率均能达到 75%, 且色素提取相对较少。因此, 本实验选择 80% 乙腈作为提取剂。

2.1.2 提取剂体积的选择 以加标水平为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的果皮为研究对象, 考察了 80% 乙腈的体积(5、10、15 mL)对 3 种分析物提取效率的影响。结果表明, 当提取剂体积为 5 mL 时, 3 种分析物的回收率均较低, 而提取剂体积为 10 mL 和 15 mL 时, 回收率均能达到 70% 以上。但提取剂体积越大, 稀释倍数越高, 方法的灵敏度会降低。综合考虑, 选用提取剂体积为 10 mL。

2.1.3 提取次数的选择 考察了提取次数(1、2、3、4 次)对分析物回收率的影响, 结果表明, 分析物的回收率随着提取次数的增加而增大。对于果肉和全果, 提取 2 次的效果与提取 3 次和 4 次无显著差异; 而果皮提取 3 次的效果与提取 4 次无显著差异。因此, 采用果肉、全果提取 2 次, 果皮提取 3 次。

2.1.4 净化方式的选择 目前, 测定动物性食品中青霉素类药物残留的常用净化方法为固相萃取法(SPE), 所用小柱主要是 HLB 柱和 C_{18} 柱; 其次为分散固相萃取法(DSPE), 所用吸附剂主要是 C_{18} 和 PSA。因此, 以加标水平为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的果皮为研究对象, 比较了 SPE-HLB、SPE- C_{18} 、DSPE- C_{18} 、DSPE-PSA 净化方式的效果(图 1)。结果显示, 经两种 SPE 柱净化后的样品中杂质较少, 色谱图无明显干扰, 但青霉素 G 的回收率均低于 50%。这可能是由于青霉素 G 在洗

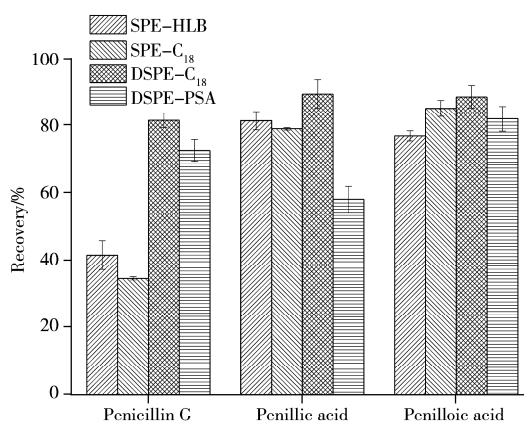


图 1 不同净化方式对 3 种分析物提取率的影响
Fig. 1 Effects of clean-up method on recoveries of three analytes

脱至浓缩过程中发生降解,并且 C_{18} 和HLB均为反相层析填料,目标化合物的极性越大则在柱上的保留能力越弱,因此对于极性较强的青霉素G回收率偏低,这与文献^[14]研究结果相符。此外,SPE小柱成本较高,操作繁琐,不适用于处理大批量样品。而经DSPE净化后,3种分析物的回收率优于SPE,因此采用DSPE净化。采用PSA进行DSPE净化时青霉二酸的回收率低于60%,这可能与弱碱性的PSA会与酸性的青霉二酸发生作用有关;而采用 C_{18} 进行DSPE净化得到的回收率较好,这是由于 C_{18} 吸附剂的比表面积大、吸附能力强,可较好除去脂类、脂肪等非极性物质的干扰。因此选用 C_{18} 进行DSPE净化。

2.1.5 净化剂用量的选择

以加标水平为100

$\mu\text{g}/\text{kg}$ 的果皮为研究对象,分别考察了 C_{18} 用量(0、25、50、75、100 mg)对3种分析物净化效果的影响。结果表明,随 C_{18} 用量的增加,分析物的回收率整体呈先增加后降低的趋势。 C_{18} 用量为25 mg时的回收率最好,但净化效果差于50 mg C_{18} 。其中 C_{18} 用量对两种代谢物的影响相对较小,两者的回收率基本在80%以上;而对于青霉素G,当 C_{18} 用量超过50 mg时,其回收率大幅下降,这可能是由于过量的净化剂会吸附青霉素G所致。因此,选择净化剂 C_{18} 用量为50 mg。

2.2 仪器条件的优化

2.2.1 色谱条件的优化

UPLC-MS/MS分析中多选择甲醇或乙腈作有机相,由于甲醇会使青霉素G降解,且乙腈-水体系的峰形优于甲醇-水体系^[15],故选择乙腈为有机相。由于青霉素G及其代谢物在水溶液中以离子状态存在,为增强分析物在色谱柱上的保留并提高离子化效率,在流动相中加入甲酸或乙酸等挥发性酸。实验考察了在水相中分别添加0.05%、0.1%、0.15%和0.2%甲酸对仪器灵敏度和分离度的影响。结果显示,甲酸体积分数对灵敏度的影响不大,但0.1%甲酸的效果略好,因此选择乙腈-0.1%甲酸为流动相。最优色谱条件下各分析物的总离子流色谱图见图2,3种目标分析物可在5 min内有效分离。

2.2.2 质谱条件的优化

将100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的青霉素G及其代谢物标准溶液采用单针自动进样分析,在 ESI^+ 和 ESI^- 离子化模式下进行全扫描,确定电离方式和准分子离子峰。结果显示, ESI^+ 模式下可产生稳定的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 母离子,确定母离子并优化去簇电压后,再进行子离子扫描。母离子进入二级质谱,发生断裂或重排等碎裂反应,产生不同的离子碎片,选择响应最高的离子为定量离子,响应次高的离子为辅助定性离子,并优化其碰撞能量。最后,将母离子和子离子组成离子对,在MRM模式下优化毛细管电压、锥孔电压和碰撞能量等参数,使分析物的离子对强度达到最大。优化的质谱条件如“1.4.2”所示。

2.3 基质效应

基质效应(Matrix effects, ME)是指共流出物影响分析物的离子化效率,使其分析信号增强或减弱的现象。实验考察了青霉素G及其代谢物在溶剂、柑桔果肉、全果及果皮基质中的响应情况(加标水平为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$),计算基质效应($\text{ME} = \text{基质匹配标准曲线的斜率} - \text{溶剂标准曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率}$)。由表2可知,除青霉二酸表现出轻微的基质增强效应外,其余两种分析物均表现出基质抑制效应。本研究采用基质匹配标准溶液校正基质效应的方法,确保实验结果的准确性。

2.4 线性范围及检出限

用空白柑桔样品加入标准溶液配制系列标准工作溶液,在优化条件下进行测定。由表2可知,在5~2000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内,青霉素G及其代谢物的果肉、果皮和全果基质匹配标准溶液的峰面积(y)与对应质量浓度(x)间呈良好的线性关系,相关系数(r^2)为0.9981~0.9997。以信噪比(S/N) ≥ 3 确定分析物的方法检出限(LOD),以满足农残分析回收率要求的最低加标浓度为方法定量下限(LOQ),结果

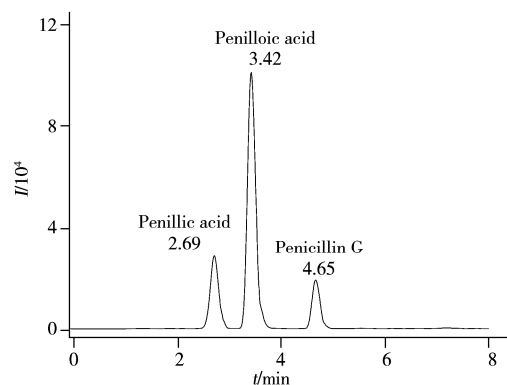


图2 3种分析物混合标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of three analytes mixed standard solution(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)

显示, 3种分析物的 LOD 为 0.5~1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 为 5~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。以 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 溶剂标准溶液在优化条件下进行测定, 保留时间和峰面积的日内相对标准偏差(RSD)分别为 0.11%~0.24% 和 2.7%~3.8% ($n=3$); 日间 RSD 分别为 0.12%~0.21% 和 3.7%~6.9% ($n=3$)。本方法灵敏度高, 线性范围宽, 能够满足食品中青霉素 G 及其代谢物残留的分析要求。

表2 青霉素 G 及其代谢物的线性范围、相关系数(r^2)、基质效应、方法检出限、定量下限和精密度

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients(r^2), matrix effects, limits of detection(LOD), limits of quantitation(LOQ) and precisions for penicillin G and its metabolites

Analyte	Matrix	Linear range ($\mu\text{g}/\text{L}$)	r^2	Matrix effect(%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Precision(%)			
							Intra-day($n=3$)		Inter-day($n=3$)	
							Retention time	Peak area	Retention time	Peak area
Penicillin G	Peel	10~2 000	0.998 7	-41.8	1	10	0.11	3.8	0.13	6.9
	Pulp	5~2 000	0.998 2	-15.2	1	5				
	Whole fruit	5~2 000	0.998 6	-34.1	1	5				
Penillic acid	Peel	5~2 000	0.999 7	6.8	1	5	0.16	2.7	0.12	3.7
	Pulp	5~2 000	0.998 1	7.7	1	5				
	Whole fruit	5~2 000	0.999 2	2.4	1	5				
Penilloic acid	Peel	5~2 000	0.999 7	-15.4	1	5	0.24	3.7	0.21	5.6
	Pulp	5~2 000	0.998 3	-19.4	0.5	5				
	Whole fruit	5~2 000	0.999 4	-29.2	0.5	5				

2.5 回收率与相对标准偏差

分别取全果、果皮和果肉的空白样品进行 3 个不同水平的加标回收实验, 每个水平做 6 个平行, 按本方法进行测定。由表 3 可知, 3 种分析物在柑桔果肉、果皮和全果中的平均回收率为 76.7%~107%, RSD 为 1.3%~9.6%, 回收率和精密度良好。

表3 不同基质中 3 种分析物的加标回收率和相对标准偏差($n=6$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations(RSD) of three analytes in different matrix($n=6$)

Analyte	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Whole fruit		Peel		Pulp	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Penicillin G	10	87.6	9.0	76.7	3.7	82.9	7.5
	50	82.8	6.2	79.8	9.5	101	5.7
	500	93.2	3.6	79.6	4.6	99.4	3.5
Penillic acid	5	89.5	9.6	90.1	7.6	88.8	9.3
	50	84.8	3.6	89.8	6.8	98.1	7.1
	500	89.8	5.5	87.3	3.0	102	5.1
Penilloic acid	5	94.1	5.3	85.6	7.4	107	7.0
	50	83.6	4.4	84.8	5.9	100	4.3
	500	94.2	4.8	89.5	1.3	102	4.3

2.6 方法对比

对本方法与文献方法进行了对比。由表 4 可知, 与文献^[2]相比, 本方法由于在前处理阶段未进行氮吹浓缩导致 LOD 较高(稀释了 5~6 倍), 但本方法对 2 种代谢物的回收率为 83.6%~107%, 而文献中仅为 50%~73%。此外, 文献中使用价格昂贵的同位素内标物进行定量, 而本方法利用基质匹配标准曲线法定量, 检测成本较低。同时, 本方法的前处理更简单, 适合于大批量样品处理。

表4 食品中青霉素 G 及其代谢物残留的检测方法对比

Table 4 Comparison of detection methods for penicillin G and its metabolites in food

Analyte	Sample	Sample preparation	Instrument detector	Recovery (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Reference
Penicillin G and its two metabolites	Orange	DSPE: 80% acetonitrile extraction, C_{18} purification	UPLC-MS/MS	76.7~107	0.5~1	This method
Penicillin G and its two metabolites	Lemon, orange and grapefruit	SPE: PBS extraction, HLB column purification	UPLC-MS/MS	50.0~118.0	0.1	[2]

(续表4)

Analyte	Sample	Sample preparation	Instrument detector	Recovery (%)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Reference
Penicillin G and penilloic acid	Tomato	SPE: 80% acetonitrile extraction, HLB column purification	HPLC-UV	52.5~87.8	30.0	[16]
7 Penicillins	Beef	LLE: 90% acetonitrile extraction	UPLC-MS/MS	91.0~106.0	0.05~0.5	[14]
12 Penicillins	Chicken and fish	SPE: 80% acetonitrile extraction, HLB column purification	UPLC-MS/MS	81.7~111.9	0~2.0	[17]
8 Penicillins	Catfish	On-line SPE: 90% acetonitrile extraction, C_8/C_{18} column purification	HPLC-MS/MS	72.0~92.0	<0.6	[18]
11 Penicillins	Fishery products	SPE: 80% acetonitrile extraction, HLB column purification	UPLC-MS/MS	85.5~110.0	0.3~1.5	[8]

2.7 实际样品的检测

2017年7~10月在重庆北碚区进行青霉素G田间残留消解试验,喷施浓度为9 g/L,在喷药后45 d内分别对温州蜜柑和纽荷尔脐橙进行采样并测定3种分析物的浓度。结果表明,青霉素G在柑桔中的降解符合一级动力学方程,降解速率较快:在温州蜜柑中的降解方程为 $C_{11} = 1\,147.44e^{-0.309t}$ ($r^2 = 0.8666$),半衰期 $T_{1/2} = 2.3$ d;在纽荷尔脐橙上为 $C_{12} = 1\,396.17e^{-0.259t}$ ($r^2 = 0.9449$), $T_{1/2} = 2.7$ d。由图3可知,青霉二酸在柑桔中快速降解,在10 d时含量降至10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,而去羧青霉噻唑酸在柑桔中降解较为平缓,尤其在脐橙中的残留量呈现先降低后增加,随后波动变化的趋势,含量为200~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。研究表明^[19],青霉素G在柠檬基质中5 d内即降解完全,首先形成青霉二酸和少量的去羧青霉噻唑酸,随后青霉二酸会缓慢转化为青霉酸,最后青霉酸脱去 CO_2 形成去羧青霉噻唑酸。因此,最终青霉素G的代谢物以去羧青霉噻唑酸为主,这与田间试验结果相符。

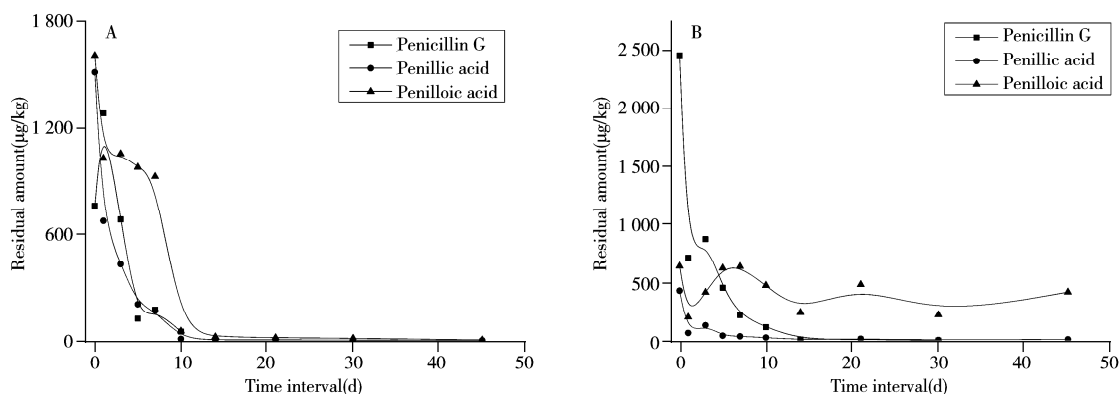


图3 青霉素G及其代谢物在温州蜜柑(A)与纽荷尔脐橙(B)上的动态变化

Fig. 3 Dynamic changes of penicillin G and its metabolites in *Satsuma Mandarin*(A) and *Newhall Navel Orange*(B)

3 结论

本研究建立了柑桔中青霉素G及其两种代谢物青霉二酸和去羧青霉噻唑酸残留的DSPE/UPLC-MS/MS检测方法。该方法操作简单、快速准确、灵敏度高、重现性良好,检测成本低,并成功应用于田间残留试验的实际样品中青霉素G及其代谢物含量的检测。

参考文献:

- [1] Shin K, Ascunce M S, Narouei-Khandan H A, Sun X, Jones D, Kolawole O O, Goss E M, van Bruggen A H. *Crop Prot.*, **2016**, 90: 106-116.
- [2] Aldeek F, Rosana M R, Hamilton Z K, Crosswhite M R, Burrows C W, Singh S, Gerard G, Hammack W, Cook J M. *J. Agric. Food Chem.*, **2015**, 63(26): 5993-6000.
- [3] Blaha J M, Knevel A M, Kessler D P, Mincy J W, Hem S L. *J. Pharm. Sci.*, **1976**, 65(8): 1165-1170.
- [4] Li H R. *Chin. Med. Health* (李海蓉. 中国卫生产业), **2011**, 8(2): 107-108.
- [5] Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(农业部. 中华人民共和国农业部公告第235号). [2008-06-29]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm.

- [6] Commission Regulation(EU)No. 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. *Official Journal of the European Union*, **2009**, L15: 13.
- [7] Samanidou V, Michaelidou K, Kabir A, Furton K G. *Food Chem.*, **2017**, 224: 131–138.
- [8] Guo M M, Li Z X, Wang Z, Pan M X, Wu H Y, Xing L H, Sun X J. *J. Instrum. Anal.* (郭萌萌, 李兆新, 王智, 潘明轩, 吴海燕, 邢丽红, 孙晓杰. 分析测试学报), **2017**, 36(3): 337–342.
- [9] Luiz L D, Bell M J V, da Rocha R A, Leal N L, dos Anjos V D. *J. Spectrosc.*, **2018**, 2018: 1–6.
- [10] Chen Y L, Li X L, Yang M, Yang L B, Han X X, Jiang X, Zhao B. *Talanta*, **2017**, 167(2017): 236–241.
- [11] Ju S Y. *Sci. Technol. Food Ind.* (鞠守勇. 食品工业科技), **2018**, 39(8): 126–129, 140.
- [12] Canzani D, Hsieh K, Standland M, Hammack W, Aldeek F. *J. Chromatogr. B*, **2017**, s(1044/1045): 87–94.
- [13] Aldeek F, Canzani D, Standland M, Hammack W, Cook J M, Crosswhite M R, Gerard G. *J. AOAC Int.*, **2017**, 100(1): 189–197.
- [14] Guo M M, Li Z X, Tan Z J, Wu H Y, Han X Q, Leng K L, Zhai Y X. *J. Instrum. Anal.* (郭萌萌, 李兆新, 谭志军, 吴海燕, 韩现芹, 冷凯良, 翟毓秀. 分析测试学报), **2011**, 30(9): 969–975.
- [15] Liu C J, Wang H, Du Z X, Jiang Y B, Shan J H, Cai Y H. *Chin. J. Anal. Chem.* (刘创基, 王海, 杜振霞, 姜艳彬, 单吉浩, 蔡英华. 分析化学), **2011**, 39(5): 617–622.
- [16] Duan Z H. *Effect of Penicillin Mycelial Dreg Fertilizer on Soil Environment and Growth of Tomato*. Harbin: Harbin Institute of Technology (段子恒. 青霉素菌渣肥对土壤环境和西红柿生长的影响研究. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学), **2016**.
- [17] Liang J J, Shen D, Xu X Y, Ding Y Q, Luo J W. *Food Ferment. Ind.* (梁晶晶, 沈丹, 徐潇颖, 丁宇琦, 罗金文. 食品与发酵工业), **2018**, 44(5): 265–269.
- [18] Luana M, Jorge H M, Amaya Z, Liliana B, Francisco A M, Manuel C. *Food Anal. Methods*, **2012**, 5: 1047–1053.
- [19] Aldeek F, Canzani D, Standland M, Crosswhite M R, Hammack W, Gerard G, Cook J M. *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64(31): 6100–6107.

(责任编辑: 丁 岩)