

β - 内酰胺类抗生素残留检测技术研究进展

白国涛^{1,2}, 储晓刚^{2,*}, 潘国卿¹, 凌云², 张峰²

(1. 内蒙古出入境检验检疫局, 内蒙古 呼和浩特 010020; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要: β - 内酰胺类抗生素具有杀菌活性强、毒副作用小等特点, 在动物饲养过程中应用非常普遍。随着其在临床上应用研究和毒理学研究的深入, 由其残留问题引起的食品安全问题已引起各国食品安全管理部门及国际组织的广泛关注。本文对 β - 内酰胺类抗生素药物残留的检测方法做了全面的综述。

关键词: β - 内酰胺类抗生素; 残留; 检测

Research Development of Detection Techniques for β-Lactam Antibiotics Residues

BAI Guo-tao^{1,2}, CHU Xiao-gang^{2,*}, PAN Guo-qing¹, LING Yun², ZHANG Feng²

(1. Inner Mongolia Entry-Exit Inspection and Quarantine, Hohhot 010020, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: As β lactam antibiotics has strong anti-microbial activities without severe adverse effects, it has common application in animal breeding process. With its application in clinical research and in-depth toxicological studies, food safety issues caused by its residues have been widely concerned by management department of food safety and international organizations. This paper will make a comprehensive review on the detection methods of β-lactam antibiotics drug residue.

Key words: β-lactam antibiotics; residues; determination

中图分类号: TS207.53

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)07-0485-05

β - 内酰胺类抗生素是历史最悠久的抗微生物药物, 同时也是最大和最重要的一类抗生素, 自1941年青霉素首次应用以来, 至今已研制出了近百种β - 内酰胺类抗生素, 分为青霉素类、头孢菌素类、头霉素类、碳青霉烯类、氧头孢类、碳头孢烯类、青霉烯类、单环β - 内酰胺类和β - 内酰胺酶抑制剂等。主要用于治疗革兰氏菌^[1], 如葡萄球菌、肺炎球菌、链球菌、大肠杆菌、嗜血杆菌、沙门氏菌等引起的各种感染。使用后会在动物体内有一定的残留, 食用含有β - 内酰胺类抗生素残留的食品后会危害人们身体健康, 已有人食用牛奶后引起青霉素过敏^[2], 头孢曲松钠制剂与含钙产品合用可能致人死亡的报道^[3], 而且长期使用会产生抗药性。为了避免消费者受到食品中抗生素残留的危害, 保护人民的身体健康, 各国都对各种抗生素制定了严格的最高残留限量, 并且随着人们对健康问题的重视和新的具有更高灵敏度仪器的出现, 对残留限量的规定有越来越严格、取消限量、甚至不得检出的趋势! 表1列出了部分国家和组织对β - 内酰胺类抗生素在牛肉中的最高残留限量。由表可见, 日本规定的残留限量最多, 也

表1 β - 内酰胺类抗生素在牛肉中的最高残留限量

Table 1 MRL of β-lactam antibiotics in beef

药物名称	英文名称	日 (mg/kg)	欧盟 (mg/kg)	FDA (mg/kg)	CAC (mg/kg)
青霉素G	Penicillin G	0.05	0.05	—	—
普鲁卡因青霉素	Procaine Benzylpenicillin	0.05	0.05	—	0.05
苯唑青霉素	Oxacillin	0.3	0.3	—	—
邻氯青霉素	Cloxacillin	0.04	0.3	—	—
氨苄青霉素	Ampicillin	0.03	0.05	—	—
乙氧萘青霉素	Nafcillin	0.005	0.3	—	—
双氯青霉素	Dicloxacillin	0.03	0.3	—	—
头孢氨苄	Cefalexin	0.2	0.2	—	—
头孢噻吩(以Desfuroylceftiofur计)	Ceftiofur	1.0	1.0	1.0	1.0
头孢匹林	Cefapirin	0.03	0.05(头孢匹林与Desacetylcephapirin的和)	—	—
头孢喹酮	Cefquinome	0.04	0.05	—	—
头孢唑林	Cefazolin	0.05	—	—	—
头孢洛宁	Cephalonium	0.01	—	—	—
头孢呋肟	Cefuroxime	0.02	—	—	—
克拉维酸	Clavulanate	0.1	0.06	—	—

收稿日期: 2007-09-10

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAK02A08)

作者简介: 白国涛(1980-), 男, 工程师, 双学士, 研究方向为农兽药残留检测。E-mail: baigt@163.com

* 通讯作者: 储晓刚(1958-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为农兽药残留检测。E-mail: xgchu@vip.163.com

更严格, 优以乙氧萘青霉素明显, 日本限量要严于欧盟的60倍。

目前, 针对 β -内酰胺类抗生素残留的检测方法, 有微生物法、酶联免疫法、薄层色谱法、气相色谱法、气-质联用法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法和毛细管电泳-质谱法等。

1 样品的制备和提取

1.1 取样及制备样品

正确的取样、制样对测定抗生素残留十分关键。对于液体和动物器官等抗生素残留均匀分布的试样, 常规取样即可取到具有代表性的样品。但在肌肉组织中, 抗生素的残留分布不均匀, 要取到有代表性的样品, 尽可能的使检测结果真实有效, 就需要加大样品量, 并将其尽可能的混匀。关于这个问题, 加拿大动物卫生实验室在早期的实验中已经确定, 分析青霉素G时, 至少要取40g样品混匀才能得到有代表性的样品^[4]。

1.2 样品的萃取

样品的萃取有水溶剂^[5-6]、有机溶剂^[7-8]、酸性缓冲溶液^[9-11]和混合体系萃取^[12]等多种方法。一般使用水、酸和有机溶剂中的两种或三种, 以一定比例配制的混合溶剂萃取, 以达到同时脱蛋白和萃取青霉素的目的。初提液大都为水性溶剂, 酸化后 β -内酰胺类结构中羧基电离被抑制, 使药物呈中性, 因此可用氯仿或二氯甲烷萃取, 然后再用pH为7.0磷酸盐缓冲溶液萃取氯仿层。Fletouris D J等采用离子对萃取^[13-14], 将pH调为7.0, 加入四丁基铵或18-冠-6醚离子对试剂, 用氯仿或二氯甲烷萃取。这种方法对 β -内酰胺类盐萃取非常有效, 但对氨基青霉素、羟氨基青霉素等两性化合物提取不理想。Wang J^[6]使用水溶解蜂蜜样品均质离心, 实现了多种青霉素的同步萃取。Moats^[15]使用乙腈从牛奶中萃取青霉素和脱蛋白, 再用二氯甲烷和正己烷净化、脱脂和去除非极性干扰物。加拿大Boison^[16]使用钨酸钠、硫酸和水从组织中提取青霉素并脱掉蛋白质, 这种方法对萃取牛奶中的青霉素效果非常好, 使用这种方法, 样品中的蛋白质通常会变性, 留在液-液界面。

将脱蛋白溶剂甲醇、乙腈、硫酸、钨酸钠、酸化乙腈等与试样一起均质, 这样可以增加溶剂与试样的接触面积, 更好的除去蛋白质。液体试样与有机溶剂混合后可以通过振荡脱蛋白质。脱蛋白完成后通过离心除沉淀^[4]。

2 样品的净化

通常, β -内酰胺类抗生素因使用量和降解等原因, 在样品中的含量并不高, 得到的提取液中的浓度会很低, 同时含有很多共萃物, 检测时会污染色谱柱, 还增加了仪器噪音, 达不到痕量分析的目的。因此, 需要除去部分共萃物, 并提高目标物的浓度。

2.1 液液萃取

液液萃取是利用溶液中各组分在所选用的溶剂中溶解度的不同, 即分配系数的差异, 使溶质进入液液传质, 以达到分离均相液体混合物的操作。在早期的样品净化方法中, 主要应用液液萃取以实现样品的净化。提取液经固相萃取等方式净化后, 还含有一些杂质, 为得到更加纯净的试液, 再进行一步液液萃取除去杂质。 β -内酰胺类抗生素在酸性条件下不太稳定, 尤其是青霉素G, 因此在液液分配中, 酸化后立即加入二氯甲烷或氯仿提取, 避免因时间过长而分解。Catharina V^[10]等测定鲑鱼中的阿莫西林时, 使用乙醚和醋酸铵缓冲液的液液萃取法进行了净化。

2.2 固相萃取

SPE具有安全、回收率高、重现性好、操作简便、快速、易实现自动化操作等特点, 从而显示出良好的发展前景, 在相关领域的应用越来越多。检测 β -内酰胺类主要使用C₁₈^[11,17-19]和HLB^[5,8,12]柱。Terada^[20]使用Sep-Pak C₁₈柱净化青霉素G和青霉素V提取液。Bioson等^[16]用Bond Elut C₁₈柱替代了Terada等所用Sep-Pak C₁₈柱, 他们在研究中发现, Sep-Pak C₁₈柱填料的碳含量小于14%, 而Bond Elut C₁₈柱的碳含量为18%。实验表明, 为了从萃取柱中得到大于70%的回收率, C₁₈柱填充料的碳含量至少应为17%。所以在使用SPE净化的方法中, 要使药物的损失最小, 必须考虑SPE柱的碳含量。此外, 缓冲溶液的浓度及种类和洗脱溶剂的用量等因素都会对回收率有影响。实验表明, 当磷酸盐的浓度低于0.07mol/L时回收率也随之降低, 特别是两性 β -内酰胺类, 更需一定的缓冲溶液, 使其保留在净化柱上, 为防止磷酸盐缓冲液阻塞柱, 洗脱前要先用水淋洗。

2.3 基质固相分散法

Barker^[21]等提出了固相分散技术, 把样品和固体填料C₁₈混合搅拌均匀, 装入层析柱中, 用甲醇淋洗层析柱洗脱。并用这种方法检测了牛肉中的苄青霉素、氨基青霉素和头孢匹林。Bogialli等^[22]用这种方法检测牛组织和牛奶中阿莫西林和氨基青霉素。

2.4 样品处理自动化

Moats^[14]首次分析 β -内酰胺类抗生素时, 应用自动在线痕量富集的技术。这种技术是使用馏分收集器收集色谱淋洗液中的目标组分, 浓缩后进行测定。并利用这种方法测定牛奶中的羟氨基青霉素等。Regina等^[23]检测了牛奶中的头孢派酮、头孢氨基、头孢乙腈、头孢噻吩和头孢匹林等五种头孢菌素类抗生素。

3 测定方法

3.1 微生物法

微生物测定法^[24]可以分为微生物抑制法、微生物受体法和酶比色法。其中微生物抑制法包括纸片分析平板法、戴尔沃-P-法、戴尔沃-X-Press法、亮黑还原法、

滕皇微球菌法、三碟法、六碟法等,微生物受体法包括CHARM I 和CHARM II 法。王大菊等^[25]用藤黄八叠球菌为指示剂,用杯碟法检测猪、鸡组织中氨苄青霉素的残留,其最低检测限可达0.25 µg/kg,标准曲线的工作范围1.25~20 µg/kg,变异系数为2.91%±0.2%,不同浓度氨苄青霉素的回收率为83%~107%。这些方法的主要优点是价廉,易操作和适合于大量样品的筛选,对于筛选样品中是否存在残留非常有效。但是只能测定总量,不具有特异性。

3.2 免疫测定法

免疫分析法是以抗原与抗体的特异性可逆性结合反应为基础的分析技术。Samsonova 等^[26]采用间接免疫法测定牛奶中氨苄青霉素的含量,检测范围0.01~1mg/L,检测限5.0 µg/L。Benito-Pena E 等^[27]建立了荧光免疫测定β-内酰胺类抗生素残留的方法,对青霉素的检测限为2.4 µg/L,回收率为99%~105%。这种方法作为筛选方法非常有效,但存在假阳性问题。

3.3 气相色谱法

由于β-内酰胺类抗生素本身不易气化,应用气相、气质检测时需要进行甲酯化,检测仪器有氮磷检测器和质谱检测器等。Meetschen 等^[28]用气相法测定了动物组织中7种青霉素,利用重氮甲烷衍生化,形成易挥发的青霉素甲基酯类化合物,提高了灵敏度和再现性,其回收率在46%~73%之间。该方法前处理要经过液液萃取、衍生等多次处理,操作繁琐费时,而且甲氧青霉素的回收率仅为46%,方法的总体回收率也不高。Preu M 等^[29]用气相-质谱联用仪试验了使用不同内标和不使用内标检测青霉素G的区别,发现使用¹³C同位素内标回收率较好。

3.4 液相色谱法

应用液相色谱检测时,对于两性离子型化合物,在流动相中添加离子对试剂的方法来调节容量因子,改善分离效果。即侧链含酸性基团的加酸抑制剂并加碱性反离子;侧链含碱性基团的,加有机胺类化合物或选择含胺的缓冲溶液,或选择低pH值的乙酸缓冲溶液。

3.4.1 液相色谱/紫外检测器测定法

青霉素类的紫外吸收波长在200~235nm之间,在残留检测中干扰组分很多,因此应用液相色谱检测时需要衍生化,使其具有特征吸收。衍生化分为柱前衍生化和柱后衍生化两种,其中柱后衍生需另外加泵、反映芯、T型混合器、脱气机等。广泛使用的柱前衍生化反应是在咪唑或1,2,3-三唑催化下,青霉素形成青霉烷酸硫酸汞衍生物。Boison 等^[16]建立的柱前衍生测定衍生化形成的青霉烷酸硫酸汞的方法,紫外最大吸收波长为325nm,减少了干扰组分。Benoci 等^[30]对猪组织中头孢噻吩及其代谢物进行了检测,采用海藻糖醇盐缓冲溶液提取,碘代乙酰胺柱前衍生,回收率在70%~95%之间,检出限为100 µg/kg。Verdon 等^[31]利用此方法,测

定了牛奶中的苯唑青霉素、邻氯青霉素和双氯青霉素,检出限为2 µg/L。但这种方法对不能形成青霉烷酸硫酸汞的不适用^[32]。Yasufuku 等^[33]对牛肉中的5种头孢菌素类进行了检测,回收率在78.3%~91.6%之间,检出限为0.05 µg/g。赵军等^[34]采用反相液相色谱,C₈柱,同时检测了尿样中5种常用β-内酰胺类抗生素,以醋酸缓冲溶液和甲醇(75:25)为流动相,检出限0.18~0.35 µg/ml,回收率在85.3%~92.0%之间。其实验中发现,当流动相中甲醇的浓度大于30%时不能完全分离,当浓度为20%时能完全分离,但保留时间过长。

3.4.2 液相色谱/荧光检测器测定法

由于β-内酰胺类抗生素本身不具有荧光发色基团,应用荧光检测时需进行衍生化。Terada 等^[35]利用氨苄青霉素在甲醛和三氯乙酸溶液中能形成产生荧光衍生物的原理,用荧光检测器测定牛奶中氨苄青霉素残留量。这不仅提高了方法的选择性,而且灵敏度可达1 µg/L。Ang CY 等^[36]检测了鲑鱼肉中羟氨苄青霉素残留量,用磷酸盐缓冲液萃取待测物,甲醛和三氯乙酸衍生化,检出限为0.5 µg/kg。但是这种方法对于没有氨基的青霉素不适用。

3.4.3 液相色谱-质谱法

液相色谱-质谱法为一种高灵敏度和高选择性的,可以用于确证的仪器,随着仪器的不断改进,其检出限越来越低,提供的碎片信息越来越多,在食品兽药残留中的应用也日趋广泛^[37-38]。表2为液质法检测β-内酰胺类抗生素残留用的部分典型流动相^[5-8,10-12,22,39-40]。Tyczkowska 等^[41]用LC/TSP/MS鉴别了牛奶中的青霉素G,用等体积的乙腈-甲醇-水(2:1:1)与牛奶混合,离心后进样,最低检出限为0.1 mg/L。

LC/ESI/MS用于牛奶和肉中的β-内酰胺类抗生素残留,采用选择离子检测,提高了灵敏度,改善了选择性。Straub 等^[39]使用这种技术测定了牛奶中的几种青霉素残留,用50%乙腈水溶液脱蛋白,离心后进样测定,邻氯青霉素和青霉素G的检出限为3~5 µg/kg,而氨苄青霉素和羟氨苄青霉素的检出限为20~30 µg/kg。

Voyksner 等^[42]用电喷雾和离子喷雾接口,源内碰撞

表2 液质法检测β-内酰胺类抗生素残留用的部分流动相
Table 2 Partial mobile phases for determination of β-lactam antibiotic residues by LC-MS/MS

基质	流动相	文献	基质	流动相	文献
动物组织	水/乙腈 (均含0.05%蚁酸)	[6]	蜂蜜	水(0.4% 乙酸)/乙腈	[5]
牛奶	水/甲醇 (均含1%蚁酸)	[7]	牛奶	水/乙腈(均含 0.1%蚁酸)	[8]
鲑鱼	18%乙腈水	[10]	畜禽肉	水/乙腈(均含0.3% 乙酸)	[11]
动物组织/	水(0.005% 的蚁酸)/甲醇	[12]	牛奶	乙腈/水溶液(含0.2% 甲酸和25mmol 七氟丁酸)	[39]
动物组织	甲醇/水 (均含10 mmol/L蚁酸)	[22]	畜、水 产品	乙腈/0.1% 蚁酸	[40]

解离(CID)技术,对青霉素裂解机理做了探讨,发现在正离子电喷雾或离子喷雾电离,CID电压在160V时,得到质子化分子离子 $[M+H]^+$ 强度较高, β -内酰胺环开环后,得到共有特征离子 $[C_6H_9HSO_2+H]^+$, m/z 为160,进一步脱COOH,得到 $[C_6H_9HSO_2+H-COOH]^+$, m/z 为114,酰胺部分断裂,产生化合物的特征离子。采用负离子电喷雾电离,得到脱质子分子离子 $[M-H]^-$,CID碰撞后, β -内酰胺环开环,脱去中性分子 CO_2 和 H_2O ,形成 $[M-H-CO_2]^-$ 和 $[M-H-H_2O]^-$,但负离子电喷雾电离得到的离子强度较正离子电喷雾电离弱。

Blanchflower等^[43]使用LC/ESI/MS技术测定了肌肉、肾及牛奶中的青霉素G、青霉素V、苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素,使用乙氧萘青霉素做内标,在肌肉和肾中的回收率为85%~114%,牛奶中的回收率为70%~118%,肌肉和肾中的回收率分别是在200 μ g/kg和500 μ g/kg,该方法添加量有些偏高。Heller等^[44]用LC/ESI/MS/MS测定了牛奶中的7种 β -内酰胺类抗生素残留,样品经乙腈提取后,用SPE C_{18} 柱净化,检出限为5~10 μ g/kg。这种方法灵敏度高,给出的结构信息也比较多,但重现性不好。

Matthias Becker等^[42]用四极杆质谱技术同时检测了动物组织、牛奶中的15种 β -内酰胺类抗生素残留,利用了正负离子结合模式,样品经Oasis HLB柱净化后,进仪器测定,其回收率在65%~111%之间,检出限未见报道。中国国家标准有检测蜂蜜中六种青霉素^[5]和畜禽肉中九种青霉素^[11]的同时测定方法,回收率在73%~106%之间,检出限在0.25~2.0 μ g/kg之间,仅在九种青霉素的同时测定中包含了氨苄青霉素一种两性青霉素,对羟氨苄青霉素没有涉及。“日本肯定列表”涉及检测方法中头孢唑啉、头孢吡啶、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢呋酮和头孢呋肟检测方法(畜、水产品)^[40],此方法用甲醇:0.2%偏磷酸溶液的混合溶液萃取,再用0.2%偏磷酸溶液从样品中萃取目标物一次,经二乙基苯-N-乙烯基吡咯烷酮共聚物小柱净化后,上仪器进行测定和确证,检出限为0.01mg/kg。

3.5 其他方法

检测 β -内酰胺类抗生素,还有一些其他方法,因只能检测总量或目标物本身的性质或仪器不普及等原因,未广泛应用。

Smither R等^[45]用薄层色谱法测定了动物组织中的青霉素钠。Tsikas等^[46]用毛细管等速电泳法测定了药物中12种青霉素和头孢菌素及6-氨基青霉烷酸和7-氨基头孢烷酸。Everest等^[47]用紫外分光光度法测定了肾脏中的 β -内酰胺类抗生素残留。原理是利用特殊反应使其产生发色团,或利用含 α -氨基的头孢菌素水解产物具有荧光等进行测定。Luttings等^[48]用凝胶电泳-生物自显影法测定和鉴别了牛奶中的5种 β -内酰胺类抗生素。样液经2%琼脂糖凝胶分离,用嗜热脂肪芽孢菌显色,检出

限为5~50 μ g/kg。Gala等^[49]用荧光光度法测定了牛奶中的氨苄西林,检出限40 μ g/kg,回收率在95%~103%之间。Gustavsson等^[50]用细胞质皮因子生物传感器法测定了牛奶中的 β -内酰胺类抗生素。其原理是利用细胞质皮因子(SPR)上具有羧肽酶活性 β -内酰胺受体蛋白,其含量同它的活性之间存在线性关系,从而推算浓度,最低检出限1.5 μ g/kg,添加浓度在MRL(4 μ g/kg)时变异系数小于5%。

4 结 语

随着 β -内酰胺类抗生素的广泛应用,代谢机理、毒理及残留研究的深入,各国对残留限量要求越来越严格,检测方法的研究也越来越多。在前处理方法中,对于目标物的萃取多用水、酸和有机溶剂以一定比例配制的混合溶剂萃取,而针对样品的净化过程,固相萃取技术得到了广泛的应用。在检测方法方面,液相色谱法占绝对优势,其中液相色谱-质谱联用法因其高灵敏度、高选择性,在药物残留检测中的应用日趋广泛。但是,目前对于一些不常用 β -内酰胺类抗生素还没有在食品中的残留检测方法;已有的检测方法流动相中酸的浓度差异很大;多残留同时检测了15种 β -内酰胺类抗生素,但没有报道检出限。因此,建立一种快速、准确,多残留同时测定 β -内酰胺类抗生素的方法将比较可行。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中国兽药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 78-94.
- [2] 程慧娟. 动物性食品中青霉素残留的研究进展[J]. 中国公共卫生, 2000, 16(7): 655.
- [3] 国食药监注[2006]8号关于修订头孢曲松钠说明书中警示语和注意事项的通知(急件)[B]. 2006.
- [4] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学出版社, 2002: 301-339.
- [5] 庞国芳, 李学民, 张进杰, 等. GB/T 18932.25-2005蜂蜜中青霉素G、青霉素V、乙氧萘青霉素、苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素残留量的测定方法液相色谱-串联质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [6] GOTO T, ITO Y, YAMADA S. High-throughput analysis of tetracycline and penicillin antibiotics in animal tissues using electrospray tandem mass spectrometry with selected reaction monitoring transition [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1100: 193-199.
- [7] HOLSTENG D M, PUSCHNER B, WHITEHEAD, et al. Screening and Mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS-MS[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 406-411.
- [8] DAESLEIRE E, RUYCK H D, RENTERGHEM R V. Confirmatory assay for the simultaneous detection of penicillins and cephalosporins in milk using liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14: 1404-1409.
- [9] WANG J. Confirmatory determination of six penicillins in honey by liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. Journal of AOAC International, 2004, 87: 45-55.
- [10] ANG C Y W, LIU F F, LAY O, et al. Liquid chromatographic analysis of incurred amoxicillin residues in catfish muscle following oral administration of the drug[J]. J Agric Food Chem, 2000, 48: 1673-1677.
- [11] 庞国芳, 李学民, 张进杰, 等. GB/T 20755-2006 畜禽肉中九种青

- 霉素类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [12] BECKER M, ZITTLAU E, PETZ M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 520: 19-32.
- [13] FLETOURIS D J, PSOMAS J E, MANTIS A J. Determination of some monobasic penicillins in milk by ion-pair liquid chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 617-621.
- [14] BERGER K, PETZ M. Proceeding of the Euro residue conference on veterinary drug in food[C]. Noordwijkerhout, Netherlands, May 21-23. ADDIX, Wijk bij Duurstede, 1990: 280.
- [15] MOATSWA. Determination of penicillin G, penicillin V, and cloxacillin in milk by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 1983, 31: 880-883.
- [16] BOSION J O, SALISBURY C D C, CHAN W, et al. Determination of penicillin G residues in edible animal tissues by liquid chromatography[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1991, 74 (3): 497-501.
- [17] RIEDIKER S, STADLER R H. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 1614-1621.
- [18] ITO Y, GOTO T, OKAWA H, et al. Determination of six penicillins in bovine tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1042: 107-111.
- [19] MAKESWARAN S, PATTERSON I, POINTS J. An analytical method to determine conjugated residues of ceftiofur in milk using liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 529: 151-157.
- [20] TERADA H, ASANO M, SAKABE Y. Studies on residual antibiotics in foods. III. High-performance liquid chromatographic determination of penicillin G in animal tissues using an on-line pre-column concentration and purification system[J]. *J Chromatogr*, 1985, 318: 299-306.
- [21] BARKER S A, LONG A R, SHORT C R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion[J]. *J Chromatogr*, 1989, 475: 353-361.
- [22] BOGIALLI S, CAPITOLINI V, CURINI R, et al. Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 3286-3291.
- [23] OLIVEIRA R V, CASS Q B. Evaluation of liquid chromatographic behavior of cephalosporin antibiotics using restricted access medium columns for on-line sample cleanup of bovine milk[J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 1180-1187.
- [24] 顾欣. 牛奶中青霉素残留的微生物学检测方法研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2007, 41 (1): 40-45.
- [25] 王大菊, 袁宗辉, 范盛先, 等. 氨苄青霉素在猪和鸡组织残留的微生物法测定法研究[J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(3): 245-247.
- [26] SAMSONOVA Z V, SHCHELOKOVA O S, IVANOVA N L, et al. Enzyme immunoassay of ampicillin in milk[J]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2005, 41(6): 668-675.
- [27] BENITO-PENA E, MORENO-BONDI M C, ORELLANA G, et al. Development of a novel and automated fluorescent immunoassay for the analysis of beta-lactam antibiotics[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53 (17): 6635-6642.
- [28] MEETSCHEN U, PETZ M. Proceedings of the Euro residue conference on residues of veterinary drugs in food[J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1991, 193: 337-343.
- [29] PREU M, PETZ M. Isotope dilution GC-MS of benzylpenicillin residues in bovine muscle[J]. *Analyst*, 1998, 123: 2785-2788.
- [30] BENOCLE-BARKER M G. Determination of ceftiofur and its desfuryleftiofur-related metabolites in tissues by high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatography B Biomed Appl*, 1995, 673(2): 231-244.
- [31] VERDON E, COUEDOR P. Determination of isoxazolylpenicillins residues in milk by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization[J]. *Journal of Chromatography B*, 1998, 705(1): 71-78.
- [32] 邓斌, 邓春来, 张曦. 高效液相色谱法检测牛奶中青霉素残留的研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2003, 37(6): 36-40.
- [33] YASUFUKU K, MSKIYAMA I, FUCHIMOTO A, et al. Determination of cephalosporin antibiotics in beef meat using high-performance liquid chromatography[J]. *J Jpn Vet Med Assoc*, 1999, 52: 321-325.
- [34] 赵军, 朱晨, 王晖. 反相高效液相色谱法同时测定多种 β -内酰胺类抗生素[J]. *山东大学学报: 工学版*, 2006, 36(3): 69-72.
- [35] TERADA H, SAKABE Y. Studies on residual antibiotics in foods. IV. Simultaneous determination of penicillin G, penicillin V and ampicillin in milk by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr*, 1985, 348: 379-387.
- [36] ANG C Y, LUO W, HANSEN E B, et al. Determination of amoxicillin in catfish and salmon tissues by liquid chromatography with precolumn formaldehyde derivatization[J]. *JAOAC Int*, 1996, 79(2): 389-396.
- [37] BALIZA G, HEWITT A. Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 492: 105-131.
- [38] 钱永军, 巩军, 李云松. 液相色谱-质谱联用检测乳中 β -内酰胺类抗生素研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2005, 33(2): 41-43.
- [39] STRAUB R F, LINDER M, VOYKSNER R D. Determination of β -lactam residues in milk using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 1994, 66: 3651-3658.
- [40] 李元平, 王大宁, 唐英章, 等. 食品中农用化学品残留检测方法: 增补本[M]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 113-115.
- [41] TYCZKOWSKA K, VOYKSNER R D, ARONSON A L. Development of an analytical method for cephalixin and its metabolite in bovine milk and serum by liquid chromatography with UV-VIS detection and confirmation by electrospray mass spectrometry[J]. *J Chromatogr*, 1989, 490: 101-113.
- [42] VOYKSNER R D, PACK T. Investigation of collisional-activation decomposition process and spectra in the transport region of an electrospray single-quadrupole mass spectrometer[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1991, 5(6): 263-268.
- [43] BLANCHFLOWER W J, HEWITS S A, KENNEDY D G. Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *Analyst*, 1994, 119: 2595-2601.
- [44] HELLER D N, HCON M A. Electrospray ionization and tandem ion trap mass spectrometry for the confirmation of seven β -lactam antibiotics in bovine milk[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998, 12(24): 2031-2040.
- [45] SMITH R R. Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of micro-organisms in chicken liver and pig kidney[J]. *J Appl Bacteriol*, 1978, 45: 267-277.
- [46] TSIKAS D, HOFRICHTER A, BRUNNER G. Capillary isotachopheric analysis of β -lactam antibiotics and their precursors[J]. *Chromatographia*, 1990, 30(11/12): 657-662.
- [47] EVEREST D J, EVEREST S J, JACHMAN R. Spectrophotometric assay for β -lactam residues in kidney tissue[J]. *Anal Chem Acta*, 1993, 275: 249-252.
- [48] CUTTINGS J H, KIESSLING W M, BOND F L, et al. Agarose gel electrophoretic detection of six β -lactam antibiotic residues in milk[J]. *JAOAC Int*, 1995, 78(3): 663-667.
- [49] GALA B, GOMEZ-HENS A, PEREZ-BENDITO D. Simultaneous determination of ampicillin and tetracycline in milk by using a stopped-flow/T-format spectrofluorimeter[J]. *Talanta*, 1997, 44: 1883-1890.
- [50] GUSTAVSSON E, STERNESIO A. Biosensor analysis of β -lactams in milk: Comparison with microbiological, immunological, and receptor-based screening methods[J]. *JAOAC Int*, 2004, 87(3): 614-620.