

doi: 10.12452/j.fxcxb.25011220

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱 法快速检测儿童尿中11种青霉素

赵 华¹, 李胜男¹, 张 博^{2*}

(1. 遵义市疾病预防控制中心, 贵州 遵义 563000; 2. 遵义医科大学 基础医学院, 贵州 遵义 563000)

摘要: 基于超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)技术, 建立了快速检测儿童尿液中11种青霉素残留的分析方法。在尿样中加入一定量的缓冲液, 经过HLB固相萃取小柱净化和提取后, 采用Hypersil GOLD C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)色谱柱进行分离, 0.1%甲酸-2 mmol/L乙酸铵水溶液和乙腈为流动相梯度洗脱, 采用空白基质匹配标准曲线外标法定量。阿洛西林、甲氧西林在0.5~200 μg/L, 氨苄西林、氯唑西林、青霉素V在1~200 μg/L, 羧夫西林、哌拉西林、双氯西林在2~200 μg/L, 阿莫西林、苯唑西林、青霉素G在5~200 μg/L范围内具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于0.994, 方法检出限为0.5~5 μg/L, 定量下限为1~10 μg/L, 3个水平的加标回收率为60.0%~112%, 相对标准偏差(RSD)为3.6%~15%。对50份儿童尿样进行检测, 检出5种青霉素, 质量浓度为2.5~88.6 μg/L, 说明儿童存在青霉素暴露风险。该方法前处理简单、灵敏度、重现性、精密度良好, 适用于儿童尿中11种青霉素的快速测定。

关键词: 儿童尿液; 青霉素; 固相萃取; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱

中图分类号: O657.63; R115 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)01-0143-07

Rapid Detection of 11 Penicillins in Children Urine Samples by Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Electrostatic Field Orbitrap High-resolution Mass Spectrometry

ZHAO Hua¹, LI Sheng-nan¹, ZHANG Bo^{2*}

(1. Zunyi Center for Disease Control and Prevention, Zunyi 563000, China; 2. College of Basic Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract: A rapid analytical method for the screening of 11 penicillins in children urine samples was established based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap HRMS). A certain amount of phosphate buffer solution is added to the urine sample, followed by purification and concentration through HLB solid-phase extraction columns. The samples were separated on the Hypersil GOLD C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) with a gradient elution system consisting of 0.1% formic acid in water and 2 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile. Quantification was performed using matrix-matched standard curves and external calibration. Good linear relationships ($r^2 > 0.994$) were observed for azlocillin, methicillin at 0.5~200 μg/L, and ampicillin, cloxacillin, penicillin V at 1~200 μg/L, and nafcillin, piperacillin, dichloropenicillin at 2~200 μg/L, and amoxicillin, oxacillin, penicillin G at 5~200 μg/L. The detection limits and quantification limits ranged of 0.5~5 μg/L and 1~10 μg/L, respectively. The recoveries at three different levels were between 60.0% to 112%, and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 3.6% to 15%. Application of the method to 50 child urine samples revealed penicillin concentrations between 2.5 and 88.6 μg/L, indicating potential exposure risk for children. This method demonstrates simplicity in sample preparation, high sensitivity, reproducibility and precision, making it suitable for rapid determination of 11 penicillins in children urine.

Key words: children urine; penicillin; solid-phase extraction; ultra performance liquid chroma-

收稿日期: 2025-01-12; 修回日期: 2025-03-03

基金项目: 贵州省卫生健康委科学技术基金资助项目(gzwbj2024-052/2024GZWJKJXM0505)

* 通讯作者: 张 博, 博士, 副教授, 研究方向: 酶与蛋白质检验, E-mail: bozhangzmu@163.com

网络首发日期: 2025-11-11

tography quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry

青霉素是目前应用最广泛的一类抗生素,其单一使用率占所有抗生素的一半以上,常被用于治疗人类和动物细菌感染引起的疾病^[1-2]。青霉素大部分是水溶性抗生素,约 75% 的剂量通过代谢排出体外,最终进入生态环境,导致严重的环境污染,受污染环境可能滋生耐药性病原微生物,并通过食物链传播给人类。青霉素的耐药性危机与其过度使用及滥用密切相关,或将引发全球性公共卫生健康危机^[3-4]。儿童比成人更容易受到环境和食物链中青霉素的影响,可能引发肥胖、超敏反应、代谢紊乱等疾病,抗生素耐药性还会限制儿童治疗选择,增加儿童患病的严重性和长期患病风险^[5-8]。青霉素大部分不能被人体吸收,会随着尿液排出体外,因此尿液被认为是分析人体抗生素有效的生物基质。尿液非侵入性的采集方式使样本获取更为便捷,同时尿液基质虽然成分复杂但相对纯净,不含血液中的大量蛋白质和脂质干扰物,是临床和科研领域中首选的优质检测样本来源。因此,监测儿童尿液中青霉素的暴露水平,规范其使用与管理,对减缓耐药菌株的产生与传播、保障抗生素对后代的有效性具有重要意义^[9-11]。

青霉素的检测方法主要包括生物传感器法、酶联免疫法、液相色谱-串联质谱法、微生物法、毛细管电泳法以及液相色谱-高分辨质谱法等。生物传感器法需基于特定抗生素的化学性质进行设计,存在开发复杂、成本高昂、可检测抗生素种类有限及定量检出限较高等局限性^[12]。酶联免疫法在青霉素检测中具有分析时间短、成本低的优势,但可检测药物种类有限,且需设计特异性高效抗体,操作步骤繁琐,仅适用于小规模研究,应用范围较窄^[13]。毛细管电泳法存在检出限较高、特异性不足及实验操作复杂耗时等局限性^[14]。微生物法虽对抗生素具有较高敏感性,但选择性较差,无法实现多种抗生素的同时检测,且需进行细菌细胞培养,检测周期较长^[15-16]。随着检测技术的快速发展,高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)逐渐成为抗生素检测的主流方法,可在单次分析中实现目标物的快速、特异及灵敏定量检测^[17-19]。超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Orbitrap HRMS)结合了四极杆的高选择性与高分辨质谱的精确质量数,是一种新型的药物分析手段。由于尿液基质复杂,传统 HPLC-MS/MS 法难以准确区分青霉素与某些化合物的离子共流出情况,而 Orbitrap HRMS 技术凭借更高的灵敏度与分辨率,可更精确地检测尿液中的青霉素含量,降低假阳性率并提高检测准确度,尤其在生物样本基质中显著提升了精确定量分析能力。此外,Orbitrap HRMS 法不仅能够识别化学物质的结构信息,还为青霉素代谢研究提供了有力支持,有助于深入理解青霉素在人体内的代谢过程及其影响因素^[20-21]。

目前,Q-Orbitrap HRMS 法已广泛应用于畜禽^[17]、环境^[18]及食品^[22]等领域的抗生素测定,但在生物样本中青霉素检测的研究较少,且涉及的青霉素种类有限^[23],尤其针对儿童尿液的验证方法目前未见报道。本研究采用固相萃取前处理技术结合 UPLC-Q-Orbitrap HRMS,建立了一种快速、高通量、准确检测儿童尿液中青霉素类抗生素的分析方法,可为评估儿童群体暴露情况及青霉素污染现状提供可靠的技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Orbitrap 120 超高效液相色谱四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司); Multi Reax 型涡旋振荡器(德国 Heidolph 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); 54 位 XcellIVAP 型氮吹仪(美国 Horizon technology 公司); TGL-16A 型高速冷冻离心机(湖南平凡科技有限公司); Mettler Toledo XSR205 型电子天平(梅特勒-托利多公司); GX-241 型全自动固相萃取仪(美国 Gilson 公司); ZDJ-5B 型雷磁自动滴定仪(上海仪电科学仪器股份有限公司); Bong Elut HLB(200 mg/6 mL)固相萃取柱(美国 Agilent 公司); 0.22 μm 有机相针式滤器(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.2 材料与试剂

甲醇、乙腈(均为质谱纯)购于美国 Thermo Fisher 公司; 甲酸(质谱纯)购于上海安谱实验科技股份有限公司; 乙酸铵(色谱纯)、NaOH(优级纯)、磷酸二氢钾(分析纯)购于天津市科密欧化学试剂有限公司; 实验用水为 Milli-Q 纯水机制备的超纯水(电阻率为 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$)。11 种青霉素标准品与混合标准

品:阿莫西林(Amo, CAS号:26787-78-0)、氨苄西林(Amp, CAS号:69-53-4)、青霉素G钾(Pen G, CAS号:113-98-4)、青霉素V(Pen V, CAS号:87-08-1)、苯唑西林钠(Oxa, CAS号:1173-88-2)、氯唑西林钠一水合物(Clo, CAS号:7081-44-9)、萘夫西林钠一水合物(Naf, CAS号:7177-50-6)、哌拉西林(Pip, CAS号:61477-96-1)、阿洛西林(Azl, CAS号:37091-66-0)、甲氧西林钠(Met, CAS号:132-92-3)、双氯西林(Dic, CAS号:3116-76-5),购于天津阿尔塔科技有限公司。

1.3 溶液配制

1.3.1 标准溶液 青霉素标准品和11种青霉素混合标准品均为100 μg 固体,向标准品瓶中准确加入1.0 mL 30%乙腈,溶解配制成质量浓度为100 mg/L的标准储备液, $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存。再逐级稀释成1 mg/L与10 mg/L混合标准使用液。混合标准工作溶液:根据实验需要,取1 mg/L和10 mg/L混合标准使用液,以初始流动相为溶剂,配制质量浓度为5、10、20、50、100、200、500、1 000、2 000 $\mu\text{g/L}$ 的混合溶剂标准工作液。

1.3.2 磷酸盐缓冲溶液 称取磷酸二氢钾6.80 g,用纯水溶解后,转移至1 000 mL容量瓶中,混匀。加入100 g/L氢氧化钠,调节pH至8.5,配制成0.05 mol/L的磷酸盐缓冲溶液。

1.4 样品前处理及检测

1.4.1 样品前处理 将冷冻尿液样本于室温下解冻,取10 mL尿样置于15 mL离心管中,以10 000 r/min离心5 min。准确吸取2.0 mL上清液于另一15 mL离心管中,加入5 mL 0.05 mol/L磷酸盐缓冲液(pH 8.5),涡旋混匀30 s后,以10 000 r/min离心3 min,取上清液备用。依次用5 mL甲醇、5 mL超纯水活化Bond Elut HLB(200 mg/6 mL)固相萃取柱,将备用上清液以0.5 mL/min流速全部过柱,待液面达到柱床表面后,依次用5 mL磷酸盐缓冲液和5 mL超纯水淋洗,弃去淋洗液,真空泵抽干柱子。用3 mL乙腈以1.0 mL/min流速洗脱柱子,收集洗脱液于15 mL离心管中,于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮吹至近干,用初始流动相定容至1.0 mL,涡旋混匀1 min,过0.22 μm 针式滤膜,待测定。

1.4.2 样品检测 通过本单位相关项目收集了某小学50名儿童的尿样,在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光条件下保存。尿样按照“1.4.1”方法进行前处理后,按照优化的检测方法进行检测。阳性样本的判定标准:目标物的信噪比 $S/N>3$,保留时间参数偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内,目标物可匹配上一级母离子和一个二级碎片离子,且一级母离子的质量精度偏差 $<5\text{ ppm}$,二级碎片离子的质量精度偏差 $<10\text{ ppm}$ 。

1.5 加标实验

在优化的质谱与色谱条件下,采用空白尿样分别添加15、50、100 $\mu\text{g/L}$ 3个浓度水平的混合标准溶液,每个浓度平行测定6次,计算加标回收率与方法精密度。在空白尿样中加入一定量的混合标准溶液,前处理后进样分析,按照3倍信噪比($S/N=3$)和10倍信噪比($S/N=10$)分别得出方法检出限(LOD)和定量下限(LOQ)^[24]。加标样本采用基质匹配标准曲线进行定量检测。基质匹配标准曲线溶液的制备:准确移取0.90 mL处理好的空白基质提取液,加入0.10 mL混合标准工作溶液,配制质量浓度为0.5、1、2、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准曲线溶液,现配现用。

1.6 仪器条件

1.6.1 色谱条件 色谱柱为Hypersil GOLD C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μm),流动相流速为0.2 mL/min,柱温:35 $^{\circ}\text{C}$,样品池温度:10 $^{\circ}\text{C}$,进样量:10 μL ,流动相A为0.1%甲酸-2 mmol/L乙酸铵水溶液,流动相B为乙腈。采用线性梯度洗脱:0~0.5 min, 5% B; 0.5~3 min, 5%~20% B; 3~9 min, 20%~50% B; 9~13.5 min, 50%~95% B; 13.5~15.5 min, 95%~5% B。

1.6.2 质谱条件 采用Orbitrap 120高分辨质谱仪,加热型电喷雾离子源(H-ESI),采用正负离子切换模式进行扫描,离子传输管温度:320 $^{\circ}\text{C}$,喷雾电压:正离子为3 500 V、负离子为2 800 V,鞘气(N_2)压力:35 Arb,辅助气(N_2)压力:8 Arb,加热蒸发温度:350 $^{\circ}\text{C}$,一级质谱质量扫描范围(m/z):50~700,分辨率:120 000,自动增益控制(AGC)配置为:标准模式,扫描模式:Full MS/dd- MS^2 ,启用EASY-IC内标校正源,二级质谱分辨率:30 000,碰撞能量:20%、50%、70%、90%,顶点激发:30%。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱条件的选择

液相色谱常用的有机相流动相为乙腈与甲醇,实验利用 1 mg/L 的混合标准溶液比较了乙腈与甲醇对 11 种青霉素分离效果及色谱峰形的影响。结果表明,以甲醇为有机相时,苯唑西林、氯唑西林及萘夫西林出现峰形较差及峰分叉现象,且双氯西林、哌拉西林和阿洛西林未出峰,这可能是由于甲醇的洗脱能力比乙腈弱;另外由于甲醇含有羟基,青霉素化学结构含有官能团羧基,可能导致甲醇与青霉素形成青霉素酯,影响目标化合物分离,因此出现未出峰的现象^[25]。而采用乙腈作为有机相时,11 种青霉素的色谱峰形良好,未出现分叉或未出峰现象。进一步比较了 0.1% 甲酸水溶液、2 mmol/L 乙酸铵水溶液及 0.1% 甲酸-2 mmol/L 乙酸铵水溶液 3 种水相流动相的效果,发现 0.1% 甲酸-2 mmol/L 乙酸铵水溶液作为水相时,11 种青霉素的离子峰响应值最高,分离度最佳,灵敏度最优,而单独使用 0.1% 甲酸水溶液或 2 mmol/L 乙酸铵水溶液时,化合物的响应值偏低且峰形不佳。因此,实验最终选择乙腈作为有机相,0.1% 甲酸-2 mmol/L 乙酸铵水溶液作为水相。11 种青霉素的提取离子色谱图如图 1 所示,所有化合物在 11.5 min 内实现准确分离,具体保留时间见表 1。

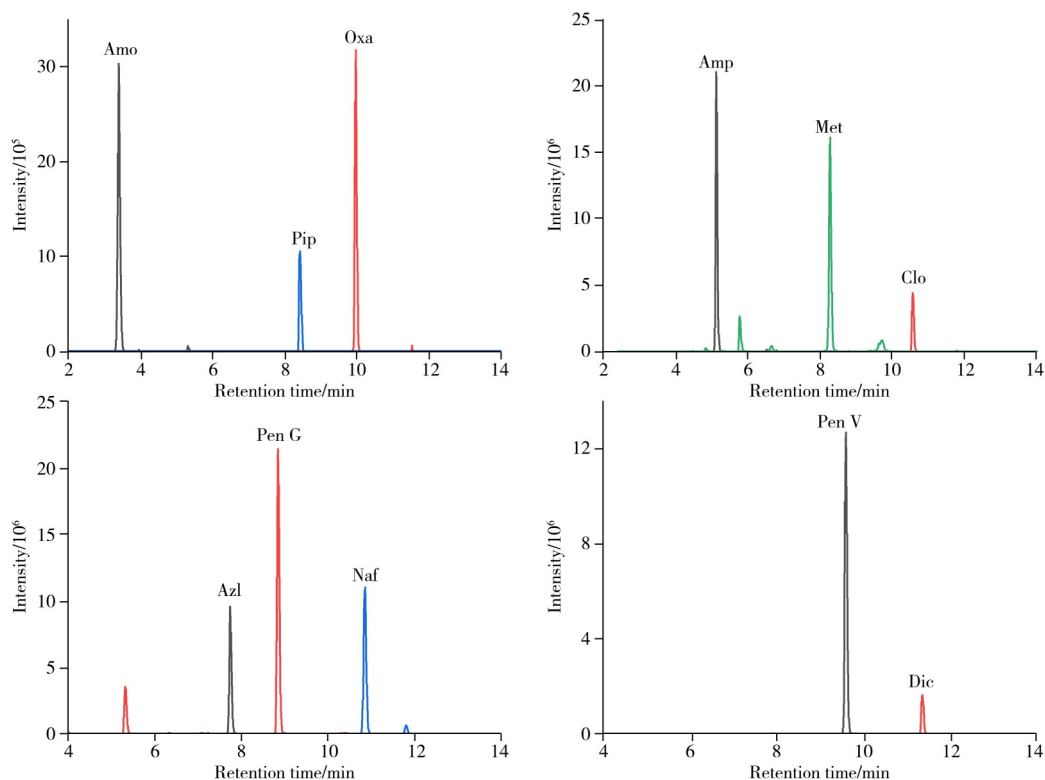


图 1 11 种青霉素的提取离子色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of the 11 penicillins

2.2 质谱条件的选择

高分辨四极杆-Orbitrap 质谱仪可测定化合物的精确质量数,实验采用 Full MS/dd-MS² 采集模式,该模式在对化合物进行一级全扫描后,可识别目标物并同时进行二级碰撞碎片扫描。为确保检测准确性,设置当目标化合物母离子的响应强度达到 10^3 时方可触发二级质谱扫描,基于母离子与子离子的精确质量数实现青霉素的定性与定量分析。青霉素母核结构含有 β -内酰胺环及羟基、氨基等官能团,其离子化模式可为正离子或负离子模式,实验表明苯唑西林、双氯西林、哌拉西林采用负离子模式时的离子峰响应值最高,离子化效应最佳,其余 8 种青霉素采用正离子模式可获得最大离子峰响应值。因此,采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 对 11 种青霉素进行正、负离子同时扫描,获得一级质谱全扫描图,并以化合物的理论精确质量数提取目标物 $[M+H]^+$ 、 $[M-H]^-$ 离子色谱图,11 种青霉素的精确质量相对偏差均小于 0.8×10^{-6} ,具体偏差值及每种青霉素响应最高的二级 (dd-MS²) 特征离子质量分数见表 1。

表1 11种青霉素的保留时间和质谱信息
Table 1 Retention time and mass spectrum information of 11 penicillins

Compound	Molecular formula	Retention time/ min	Precursor ion(<i>m/z</i>)			Product ion(<i>m/z</i>)	
			Theoretical value	Measured value	Mass error/10 ⁻⁶	Fragment 1	Fragment 2
Amo	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	3.39	366.111 88	366.111 60	0.757 19	114.000 76	134.059 77
Amp	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	5.10	350.116 73	350.116 94	0.609 39	106.065 09	160.042 68
Pen G	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	8.85	335.105 99	335.106 02	0.083 75	114.037 20	176.070 61
Pen V	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	9.58	351.100 92	351.100 89	0.082 27	160.042 66	87.026 30
Oxa	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	9.96	400.111 85	400.111 79	0.159 44	243.076 42	114.044 39
Clo	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₅ S	10.55	436.072 88	436.072 81	0.149 19	277.037 45	178.005 42
Naf	C ₂₁ H ₂₂ N ₂ O ₅ S	10.85	415.132 17	415.132 20	0.077 44	199.075 36	171.044 06
Dic	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	11.34	468.033 81	468.033 87	0.137 25	310.998 47	211.966 45
Pip	C ₂₃ H ₂₇ N ₅ O ₇ S	8.42	516.170 17	516.170 23	0.110 10	143.081 50	115.050 20
Azl	C ₂₀ H ₂₃ N ₃ O ₆ S	7.73	462.143 86	462.143 80	0.132 37	218.092 40	175.086 59
Met	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ O ₆ S	8.26	381.111 27	381.111 36	0.232 59	165.054 62	222.076 08

2.3 样品提取缓冲液 pH 值的选择

考察了不同 pH 值缓冲液(5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0)对青霉素提取效果的影响。结果表明,当样品溶液 pH 值为 8.5 时,8 种青霉素在 HLB 固相萃取柱上的加标回收率最高。尽管阿莫西林、双氯西林及氨苄西林在 pH 8.5 时的加标回收率(分别为 73.0%、89.1%、79.8%)略低于 pH 8.0 时的回收率(分别为 74.6%、90.9%、81.5%),但综合考虑 11 种化合物的整体回收率,pH 8.5 条件下的加标回收率优于其他 pH 值。因此,本研究选用 pH 8.5 的缓冲液稀释尿样。在此 pH 条件下,目标化合物结构中含羧基和碱性 N 的分子呈中性,其与 HLB 固相萃取小柱聚合物吸附剂的相互作用更有效,从而进一步提高加标回收率^[26]。

2.4 方法的基质效应、线性范围、检出限及定量下限

基质效应(ME)是指样品提取液经色谱分离时,样品中的干扰物与目标化合物共流出,影响目标化合物的离子化效率的现象。共流出的基质成分可能对目标信号产生显著的离子增强或抑制作用,从而影响方法的准确性^[27]。基质效应通过基质因子(MF)评估,该因子为净化提取后目标物的峰面积与标准溶液中峰面积的比值,通常情况下,MF 接近 100%值(90%~110%)时表示没有或可忽略基质效应,小于 100%表示离子抑制,大于 100%表示离子增强^[28]。实验采用空白尿样,按“1.4.1”方法进行净化提取后,以提取液为溶剂配制 50 μg/L 的基质匹配标准溶液,并以 30%乙腈为溶剂配制 50 μg/L 标准溶液,上机测定 11 种青霉素的响应值。通过比较基质匹配标准溶液与溶剂标准溶液的离子峰面积,结果表明,氨苄西林的基质效应为 77.0%,表现出一定的基质抑制作用;阿莫西林、氯唑西林及双氯西林的基质效应接近 100%,表明几乎无基质干扰;其余 7 种青霉素的基质效应均大于 117%,说明具有较强的基质增强作用。11 种青霉素中,仅阿莫西林、氯唑西林及双氯西林的基质效应可忽略,其余 8 种青霉素表现出不同程度的基质增强或抑制作用,因此需采用基质匹配标准曲线进行定量分析以补偿基质效应。

采用加标实验,按照“1.5”方法进行处理和检测,以基质匹配标准溶液的质量浓度为横坐标,目标化合物的提取离子峰面积为纵坐标,绘制基质匹配标准曲线,获得线性回归方程及相关系数(见表 2)。结果表明,11 种青霉素在相应质量浓度范围内均呈现良好的线性关系,相关系数(*r*²)均大于 0.994,方法检出限为 0.5~5 μg/L,定量下限为 1~10 μg/L。

表2 11种青霉素的线性方程、线性范围、相关系数和定量限
Table 2 Linear equations, linear ranges, *r*², LODs and LOQs of 11 penicillins

Compound	Linear range/(μg·L ⁻¹)	Regression equation	<i>r</i> ²	LOD/(μg·L ⁻¹)	LOQ/(μg·L ⁻¹)
Azl	0.5~200	<i>y</i> =4.167×10 ⁵ <i>x</i> -8.112×10 ³	0.998 5	0.5	1
Amo	5~200	<i>y</i> =3.748×10 ⁴ <i>x</i> -1.312×10 ³	0.998 7	5	10
Amp	1~200	<i>y</i> =2.023×10 ⁵ <i>x</i> -9.093×10 ³	0.994 9	1	2
Oxa	5~200	<i>y</i> =7.038×10 ⁴ <i>x</i> -7.328×10 ³	0.998 2	5	10
Met	0.5~200	<i>y</i> =5.472×10 ⁵ <i>x</i> -4.295×10 ³	0.996 2	0.5	1
Clo	1~200	<i>y</i> =8.111×10 ⁴ <i>x</i> -8.154×10 ³	0.998 6	1	2
Naf	2~200	<i>y</i> =1.008×10 ⁵ <i>x</i> -7.75×10 ³	0.999 2	2	5
Pip	2~200	<i>y</i> =1.91×10 ⁵ <i>x</i> +6.653×10 ³	0.998 3	2	5

(续表 2)

Compound	Linear range/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Regression equation	r^2	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Pen G	5~200	$y=1.007\times 10^5x-7.159\times 10^3$	0.996 7	5	10
Pen V	1~200	$y=1.628\times 10^5x-8.753\times 10^3$	0.999 3	1	2
Dic	2~200	$y=4.331\times 10^4x+3.074\times 10^2$	0.997 2	2	5

2.5 方法的回收率和相对标准偏差

根据“1.5”加标实验,对加标样本处理后,计算平均加标回收率与相对标准偏差(RSD),见表3。结果表明,低浓度(15 $\mu\text{g/L}$)的加标回收率为60.0%~82.8%,RSD为6.3%~15%;中浓度(50 $\mu\text{g/L}$)的加标回收率为70.3%~109%,RSD为3.6%~11%;高浓度(100 $\mu\text{g/L}$)的加标回收率为74.0%~112%,RSD为3.6%~8.8%。该方法具有较高的精密度及准确度,满足定量分析要求^[29]。

表3 11种青霉素的加标回收率与相对标准偏差($n=6$)Table 3 The average recoveries and relative standard deviations of 11 penicillins($n=6$)

Compound	Added/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/($n=6$)
Azl	15, 50, 100	66.6, 77.0, 81.5	15, 11, 8.8
Amo	15, 50, 100	60.0, 70.3, 74.0	6.3, 10, 5.2
Amp	15, 50, 100	69.8, 77.2, 84.8	8.8, 11, 4.4
Oxa	15, 50, 100	63.7, 81.4, 85.2	8.9, 11, 5.1
Met	15, 50, 100	79.0, 100, 111	11, 5.4, 6.2
Clo	15, 50, 100	65.3, 78.6, 76.9	11, 10, 6.2
Nafc	15, 50, 100	60.4, 86.0, 89.1	9.9, 7.8, 5.7
Pip	15, 50, 100	82.8, 109, 96.4	6.3, 5.3, 3.6
Pen G	15, 50, 100	77.3, 94.4, 112	9.0, 3.6, 3.8
Pen V	15, 50, 100	80.9, 88.8, 105	8.8, 4.7, 6.5
Dic	15, 50, 100	76.8, 98.0, 91.9	6.9, 7.3, 8.7

2.6 与其他方法的比较

尿液中青霉素的检测方法主要包括生物传感器法、酶联免疫法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法及液相色谱-高分辨质谱法等,这些方法在灵敏度、选择性、检测效率及适用性等方面各具特点。如表4所示,本方法的测定结果与多数文献报道的方法相比具有相似或更低的LOD和LOQ,表明UPLC-Q-Orbitrap HRMS在尿液中多种青霉素检测方面具有显著优势和应用潜力。

表4 测定青霉素的各种方法比较

Table 4 Comparison of various methods for the determination of penicillin

Method	Sample	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD/%	Recovery/%	Reference
HPLC-MS/MS	Urine	0.6~14.3	2.0~47.6	— [*]	73.7~92.6	[5]
Immunosensor	Urine	87.1	—	5.5	—	[30]
HPLC-MS/MS	Urine	$1.0\times 10^2\sim 3.0\times 10^2$	$5.0\times 10^2\sim 1.0\times 10^3$	2.0~24.0	70.0~116.0	[31]
Differential pulse voltammetry	Urine	87.8	—	1.8~2.9	97.0~103.0	[32]
HILIC-UV	Urine	—	$0.5\times 10^3\sim 2.0\times 10^3$	5.0~15.0	66.0~120.0	[33]
HPLC-PDA	Blood serum	1.5×10^2	5.0×10^2	2.3~12.1	88.1~110.3	[34]
UPLC-Q-Orbitrap HRMS	Urine	0.5~5	1~10	3.6~15	60.0~112	This work

*: not provided

2.7 实际样品检测

采用所建方法对50名8~10岁儿童尿样进行分析,结果发现16名儿童尿样中检出5种青霉素。其中,阿洛西林的检出浓度为5.6~13.2 $\mu\text{g/L}$,阿莫西林为11.2~51.5 $\mu\text{g/L}$,氨苄西林为6.2~10.1 $\mu\text{g/L}$,甲氧西林为2.5~12.6 $\mu\text{g/L}$,青霉素G为23.5~88.6 $\mu\text{g/L}$ 。氨苄西林的检出率最高,达31.25%,其次为甲氧西林,检出率为25.00%。

3 结 论

本研究基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术,结合基质匹配标准曲线定量,建立了儿童尿样中11种青霉素的分析方法。该方法具有较高的分辨率与精确度,能够准确识别和定量分析尿样中的多种青霉素类化合物,同时有效降低基质中其他化合物的干扰,确保在复杂尿样基质中实现多种目标物的准确检测。通过优化实验条件并与高分辨质谱技术结合,显著提升了方法的特异性与灵敏度,定性结果准

确,定量结果稳定。实际样本测定结果表明,该方法适用于儿童尿样中11种青霉素的检测。

参考文献:

- [1] Zhao Y F, Zhang J, Gui Y X, Ji G Z, Huang X H, Xie F Z, Shen H Y. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, **2025**, 287: 110057.
- [2] Haque M A, Nath N D, Johnston T V, Haruna S, Ahn J, Ovissipour R, Ku S. *Sci. Total Environ.*, **2024**, 946: 174236.
- [3] Mobarki N S, Almerabi B A, Hattan A H. *Int. J. Med. Dev. Countries*, **2019**, 3(6): 561–564.
- [4] Kumar S B, Arnipalli S R, Ziouzenkova O. *Antibiotics*, **2020**, 9(10): 688.
- [5] Huang W J, Qiu Q J, Chen M Y, Shi J F, Huang X D, Kong Q A, Long D F, Chen Z, Yan S J. *J. Chromatogr. B*, **2019**, 1105: 176–183.
- [6] Merlo F, Montagna J, Maraschi F, Profumo A, Baldanti F, Speltini A. *J. Chromatogr. Open*, **2022**, 2: 100048.
- [7] Huang Y S, Zhang Z H, Hou T C, Shi J F, Huang W J, Bai Z, Long D F, Huang X D, Yan S Y. *PLoS One*, **2020**, 15(2): e0229205.
- [8] Aris I M, Lin P I D, Rifas-Shiman S L, Bailey L C. *JAMA Netw. Open*, **2021**, 4(7): e2116581.
- [9] Warda K, Amari S, Boureddane M, Elkamouni Y, Arsalane L, Bouskraoui M. *Heliyon*, **2024**, 10: e25741.
- [10] Li N, Ho K W K, Ying G G, Deng W J. *Environ. Int.*, **2017**, 108: 246–252.
- [11] Zhong S H, Wu X L, Zhang D, Du S J, Shen J C, Xiao L H, Zhu Y, Xu Y Y, Lin Y L, Rao M T, Lu S Y. *Sci. Total Environ.*, **2022**, 843: 157070.
- [12] Shrikrishna N S, Sharma R, Sahoo J, Kaushik A, Gandhi S. *Chem. Eng. J.*, **2024**, 490: 151661.
- [13] Ahmed S, Ning J, Peng D, Chen T, Ahmad I, Ali A, Lei Z X, Shabbir M A, Cheng G Y, Yuan Z H. *Food Agric. Immunol.*, **2020**, 31(1): 268–290.
- [14] Bi H, Wu Y H, Wang Y H, Liu G Q, Ning G, Xu Z G. *J. Electroanal. Chem.*, **2020**, 870: 114216.
- [15] Feier B, Blidar A, Pusta A, Carciuc P, Cristea C. *Biosensors*, **2019**, 9(31): 1–17.
- [16] Decosterd L A, Mercier T, Ternon B, Cruchon S, Ternon B, Guignard N, Lahrichi S, Pesse B, Rochat B, Burger R, Lamoth F, Pagani J L, Eggimann P, Csajka C, Choong E, Buclin T, Widmer N, André P, Marchetti O. *J. Chromatogr. B*, **2020**, 1157: 122160.
- [17] Doyuk F, Dost K. *Food Chem.*, **2023**, 426: 136549.
- [18] Luo Y T, Sun Y W, Wei X X, He Y Y, Wang H X, Cui Z W, Ma J Q, Liu X C, Shu R X, Lin H Q, Xu D P. *Bio-process Biosyst. Eng.*, **2024**, 47: 1433–1451.
- [19] Zhang Q M, Jiang X Z, Zhang C, Zhang Y, Wu W D, Bai L, Meng L J. *J. Instrum. Anal.* (张秦铭, 姜显智, 张淳, 张莹, 吴卫东, 白璐, 孟令杰. 分析测试学报), **2025**, 44(8): 1620–1630.
- [20] Suo D C, Song Z T, Xiao Z M, Li Y, Liu W Y, Wang J M, Fan X. *J. Chromatogr. A*, **2024**, 1727: 464989.
- [21] Li X L, Li Y X, Xiao S Y, Li Q S, Han C Q, Liu D Y, Cui T F, Rao X Y, Todoroki K, Yang G, Min J Z. *Anal. Chim. Acta*, **2023**, 1264: 341269.
- [22] Deng F, Yu H, Pan X H, Hu G Y, Wang Q Q, Peng R F, Tan L, Yang Z C. *J. Chromatogr. A*, **2018**, 1538: 54–59.
- [23] Hu Y, Zhu Q Q, Wang Y W, Liao C Y, Jiang G B. *Sci. Total Environ.*, **2022**, 830: 154775.
- [24] Lee H J, Ryu H D, Lim D Y, Chung E G, Kim K, Lee J K. *Sci. Total Environ.*, **2020**, 749: 142375.
- [25] Li L X, Guo C H, Ai L F, Dou C Y, Wang G Z, Sun H W. *J. Dairy Sci.*, **2014**, 97(7): 4052–4061.
- [26] Ferrari L, Gonçalves C, Stroka J, Holst C V, Pinotti L, Vincent U. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2024**, 243: 116071.
- [27] Sun Q F, Zhang S E, Chen Q Z, Cao L M. *Food Chem.*, **2024**, 460: 140775.
- [28] Nowacka-Kozak E, Gajda A, Gblylik-Sikorska M. *J. Chromatogr. A*, **2024**, 1729: 465053.
- [29] Tuts L, Rasschaert G, Heyndrickx M, Boon N, Eppinger R, Becue I. *Chemosphere*, **2024**, 352: 141455.
- [30] Merola G, Martini E, Tomassetti M, Tomassetti M, Campanella L. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2015**, 106: 186–196.
- [31] Cazorla-Reyes R, Romero-González R, Frenich A G, Maresca M A R, Vidal J L M. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2014**, 89: 203–212.
- [32] Švorc L, Sochr J, Rievaj M, Tomčík P, Bustín D. *Bioelectrochemistry*, **2012**, 88: 36–41.
- [33] Merlo F, Montagna J, Maraschi F, Profumo A, Baldanti F, Speltini A. *J. Chromatogr. Open*, **2022**, 2: 100048.
- [34] Alamanos V, Kabir A, Furton K G, Samanidou V, Papadoyannis I. *Microchem. J.*, **2019**, 149: 103964.

(责任编辑:丁 岩)