

亲水交互作用-反相二维液相色谱-串联质谱同时测定 乳制品中 20 种抗生素残留

王 炼^{* 1 2} 杨碧霞³ 张新申¹ 郑洪国⁴ 冉良骥⁴

¹(四川大学制革清洁技术国家工程实验室,成都 610065) ²(成都市疾病预防控制中心,成都 610041)

³(四川大学华西公共卫生学院,成都 610041) ⁴(赛默飞世尔科技中国有限公司,上海 201023)

摘 要 建立了亲水作用-反相二维液相色谱-串联质谱测定乳制品中 β -内酰胺、四环素、大环内酯、氨基糖苷、酰胺醇、喹诺酮和磺胺 7 类 20 种抗生素残留的方法。样品与 C_{18} 和 CN 填料混合,进行基质固相分散萃取,以乙腈和水洗脱,洗脱液旋转蒸发至近干,残渣流动相溶解后分析。对样品前处理条件、色谱流动相、质谱参数进行了优化。各分析物回归方程的相关系数为 0.9945 ~ 0.9998;以定量离子信噪比为 3 和 10 时所对应的样品中分析物浓度计算检出限和定量限,分别为 0.10 ~ 2.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.33 ~ 7.92 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。奶粉和牛奶中添加水平 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标回收率分别为 72.5% ~ 97.2% 和 70.1% ~ 96.8%,相对标准偏差为 4.2% ~ 8.8% 和 3.7% ~ 9.9%。本方法应用于实际样品测定,结果满意。

关键词 亲水交互作用色谱; 二维液相色谱; 抗生素; 基质固相分散

1 引 言

抗生素具有抑制或杀灭细菌、真菌、螺旋体、支原体、衣原体等致病微生物的作用。广义的抗生素常常包括: β -内酰胺类、四环素类、大环内酯类、氨基糖苷类(Aminoglycosides, AGs)、酰胺醇类、喹诺酮类、磺胺类和多肽类^[1-2]。作为常用的兽药,近年来抗生素常被多类混合添加在动物饲料中,以掩盖单个药物残留量超限的现象。因此,为保障食品安全,建立同时检测多类抗生素的方法意义重大。

AGs 极性最强,采用反相液相色谱(RPLC)分离,几乎没有保留。在流动相中加入离子对试剂,通过中和电荷降低其极性后可进行 RPLC 分离,但会极大增加平衡时间,且不利于与质谱联机^[3-4]。亲水交互作用色谱(HILIC)使用 RPLC 的流动相,可分离强极性有机物,能解决了 AGs 的分离问题^[5-6],且易与质谱联用^[7]。由于 AGs 和其它类抗生素极性差异大,抗生素多残留分析的难点在 AGs 和其它类同时提取和检测,现有方法通常只涉及 4 ~ 5 类抗生素^[8-12],且 AGs 和其它类抗生素同时检测的方法鲜有报道。

本研究利用双三元高效液相色谱仪^[13],外接 1 个可变流速泵,7 条流路组成亲水交互作用与反相色谱二维液相色谱系统(HILIC-RPLC),经三段分离,串联质谱(Tandem mass spectrometry, MS/MS)检测,建立了乳制品中的 7 类 20 种抗生素同时分离、定性定量分析的方法。对 HILIC-RPLC,前人也做过一些研究,但与本方法在目的和原理上有所差异。Jandera 等讨论了 HILIC 与 RP 的正交性,得出二者不能完全正交的结论^[14];Wang 等采用 4 个流路两段分离模式对 12 种亲水和 13 种亲脂的混合物进行了检测,但分析物不涉及抗生素,也未对 HILIC 和 RP 都有所保留的情况进行探讨^[15];Liang 等则采用了离线 HILIC-RPLC 的方式^[16]。本研究采用了 HILIC-RPLC-MS/MS 三段检测模式,并提出了混合基质固相分散(Mixed matrix solid phase dispersion, MMSPD)的样品前处理技术,较好地解决了 7 类抗生素同时提取并检测的难点,方法简便、快速、灵敏度高,满足国际社会食品法规的最大允许残留量要求。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Ultimate3000 高效液相色谱仪(美国 ThermoFisher 公司),带 DGP-3600SD 泵,带十通阀和六通阀各

2014-10-17 收稿; 2015-03-11 接受

本文系中国博士后面上项目(No. 2012M521703)资助

* E-mail: septwolvesnjlw@163.com

1 个; AXP Auxiliary Pump(美国 ThermoFisher 公司); 3200Qtrap 质谱仪(美国 AB Sciex 公司); R-200 旋转蒸发仪(瑞士 BÜCHI 公司); Vortex Genius3 型涡旋混匀器(德国 IKA 公司); 2034 型真空泵(美国 Welch 公司); Visiprep™-DL 固相萃取系统(美国 Sepulco 公司) 6 mL SPE 空管及配套熔融玻璃隔板(美国 Agilent 公司); Chromatorex C₁₈ 键合硅胶填料(40 ~ 75 μm ,日本富士公司); Cleanert 氰基(CN) ,硅胶(Silica) 强阳离子(SCX) 填料(平均粒度 45 μm ,美国 Agela Technologies) 。

头孢噻唑、氨苄青霉素、邻氯青霉素、大观霉素、链霉素、双氢链霉素、庆大霉素 C1a、阿米卡星、卡那霉素、恩诺沙星、环丙沙星、替米考星、交沙霉素、强力霉素、土霉素、氯霉素(Dr. Ehrenstorfer GmbH); 头孢氨苄(Fluka 公司); 磺胺甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪(Sigma 公司); 异帕米星(上海士锋生物科技有限公司) 。甲醇和乙腈(HPLC 级) ,乙酸铵和甲酸(色谱纯) 均购自 Dikma 公司; EDTA 二钠、草酸为分析纯 ,实验用水为超纯水。1.0 mg/mL 标准储备液均用甲醇配制 ,20 ℃ 条件下 ,头孢氨苄和氨苄青霉素保存 14 天 ,其它抗生素保存 3 个月。

2.2 样品前处理

称取 0.50 g 奶粉或牛奶样品于研钵中 ,加入 C₁₈和 CN 填料各 0.50 g ,加入 EDTA 二钠 1.00 g ,用研钵充分碾磨至均匀 ,装入 6 mL SPE 空管(底部塞入熔融玻璃隔板) 中 ,另用熔融玻璃隔板于上部将其压至无明显空隙。将装好的 SPE 管置于固相萃取装置上 ,用 2.5 mL 乙腈、2.5 mL 水依次清洗研钵两次后 ,分步加入到 SPE 管中 ,减压洗脱(流速控制在 3 mL/min 以内) ,收集洗脱液 ,于(40 ± 1) ℃ 旋转蒸发至近干 ,加入 20 mmol/L 乙酸铵-乙腈-甲酸(5: 5: 1) 至 1.0 mL ,涡旋混匀 1.0 min 后 ,过 0.2 μm 水系滤膜 ,供测定。

2.3 色谱-质谱条件

2.3.1 液相色谱条件 左泵流动相: A 为 0.2% 甲酸 ,B 为乙腈 ,C 为 20 mmol/L 草酸; 右泵流动相: A 为 20 mmol/L 乙酸铵(含 0.4% 甲酸) ,B 为乙腈(含 0.4% 甲酸) ,C 为水。AXP 泵流动相: 水; 流速: 0.50 mL/min (0.70 ~ 1.30min) 、0.20mL/min(6.50 ~ 11.00min) 。色谱柱 1: Inspire HILIC (100 mm × 2.1 mm ,3 μm ,Dikma 公司); 色谱柱 2: Spursil C₁₈-EP(100 mm × 2.1 mm ,3 μm ,Dikma 公司); 捕获柱(T 柱): Oasis HLB (20 mm × 2.1 mm ,25 μm ,Waters公司) 。柱温: 30 ℃。进样体积: 10 μL。洗针液: 乙腈-水(90: 10 ,V/V) 。阀切换和流动相梯度条件见表 1 和表 2。

2.3.2 质谱条件 气帘气流量: 172.38 Pa; 碰撞气流量: 34.48 Pa; 离子源电压: 3500 V; 接口温度: 550 ℃; 雾化器流量: 344.75 Pa; 辅助加热气流量: 344.75 Pa; 检测器电压: 2000 V; 电离模式: ESI⁺。化合物的母离子、子离子及离子检测参数见表 3。

表 2 左泵和右泵的流动相条件

Table 2 Mobile phase conditions of left pump and right pump

时间 Time (min)	流速 Flow rate (μL/min)	左泵 Left pump			时间 Time (min)	流速 Flow rate (μL/min)	右泵 Right pump		
		A (%)	B (%)	C (%)			A (%)	B (%)	C (%)
0	300	80	20	0	0	300	5	95	0
1.31	300	80	20	0	1.30	300	5	95	0
3.30	300	40	60	0	1.31	0	10	90	0
6.50	300	40	60	0	6.50	0	10	90	0
6.51	0	5	95	0	6.51	300	10	90	0
11.00	0	5	95	0	11.00	300	10	90	0
11.01	300	5	95	0	11.01	0	15	85	0
11.20	300	5	95	0	14.70	0	15	85	0
11.21	300	0	5	95	14.71	300	15	85	0
12.70	300	0	5	95	18.00	300	60	40	0

表 1 阀切换条件

Table 1 Conditions of valve switching

时间 Time (min)	左阀(六通阀) Left valve	右阀(十通阀) Right valve	连接状态(图 2) Connection state (Fig. 2)
0.00	1-2	1-2	I
1.31	6-1	1-2	II
6.51	1-2	1-2	I
11.01	6-1	1-2	II
14.01	1-2	10-1	III

续表 2(Continued to Table 2)

时间 Time (min)	流速 Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	左泵 Left pump			时间 Time (min)	流速 Flow rate ($\mu\text{L}/\text{min}$)	右泵 Right pump		
		A (%)	B (%)	C (%)			A (%)	B (%)	C (%)
12. 71	300	80	20	0	20. 00	300	60	40	0
14. 00	300	40	60	0	20. 01	300	0	5	95
					20. 50	300	0	5	95
					20. 51	300	5	95	0
					24. 00	300	5	95	0

表 3 20 种抗生素离子检测参数

Table 3 Parameters of determination for 20 antibiotics

序号 No.	化合物 Compounds	去簇电压 Decluster potential (V)	母离子 Precursor ion (m/z)	定量离子 Quantitative ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)	定性离子 Qualitative ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)	液相分离 分组 Group of LC separation
1	头孢噻吩 Ceftiofur	40	523. 9	241. 1	18	285. 2	21	1
2	磺胺甲氧嘧啶 Sulfamethoxypyridazine	50	281. 2	156. 2	22	108. 1	35	1
3	磺胺氯吡啶嗪 Sulfachloropyridazine	45	285. 2	156. 2	20	92. 1	40	1
4	氯霉素 Chloramphenicol	25	323. 0	275. 0	19	165. 0	33	1
5	邻氯青霉素 Cloxacillin	33	468. 0	160. 0	22	178. 0	38	1
6	氨苄青霉素 Ampicillin	28	350. 1	106. 0	23	191. 9	20	2
7	头孢氨苄 Cefalexin	55	348. 0	158. 0	13	174. 0	19	2
8	恩诺沙星 Enrofloxacin	40	360. 1	316. 3	25	245. 0	37	2
9	环丙沙星 Ciprofloxacin	50	332. 1	231. 1	46	288. 2	24	2
10	强力霉素 Doxycycline	30	445. 3	154. 2	37	428. 3	26	2
11	土霉素 Oxytetracycline	25	461. 1	154. 2	40	426. 3	28	2
12	交沙霉素 Josamycin	80	828. 5	109. 1	65	174. 3	45	2
13	替米考星 Tilmicosin	34	435. 2	174. 2	27	340. 0	20	3
14	大观霉素 Spectinomycin	65	333. 1	140. 0	30	121. 9	33	3
15	链霉素 Streptomycin	160	582. 2	263. 3	42	246. 1	50	3
16	双氢链霉素 Dihydrostreptomycin	80	584. 2	246. 1	52	263. 4	39	3
17	庆大霉素 C1a Gentamicin C1a	36	450. 2	112. 2	47	322. 2	30	3
18	阿米卡星 Amikacin	32	425. 2	163. 0	30	264. 3	23	3
19	卡那霉素 Kanamycin	33	485. 2	163. 1	32	205. 1	30	3
20	异帕米星 Isepamicin	13	285. 4	115. 2	19	250. 3	18	3

在优化的色谱和质谱条件下,空白奶粉样品添加 20 种抗生素的混合标准溶液(各分析物浓度均为 20 ng/mL) 的总离子流图见图 1。

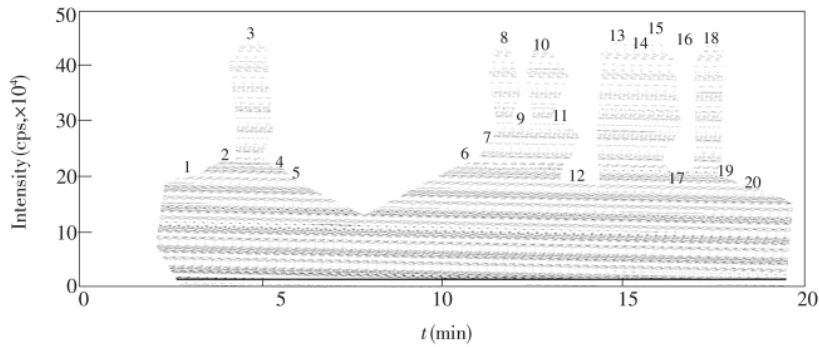


图 1 20 种抗生素的总离子流图

Fig. 1 Total ion current chromatogram of 20 antibiotics

1 ~ 20 峰号同表 1 (1 ~ 20 Peak numbers are the same as in Table 3) 。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理条件的优化

基质固相分散(Matrix solid phase dispersion, MSPD)萃取技术使用 C_8 和 C_{18} 键合硅胶,提取亲脂性化合物,简便快速、提取效率高,常用于动物源性食品中兽药多残留检测的样品前处理中^[17]。本方法针对极性强的AGs提出的混合MSPD技术,利用氰基(CN)、 C_{18} 键合硅胶与EDTA二钠共同组成提取材料,结果表明,对极性差异大的7类抗生素均有较高的提取效率,能较好的去除样品基质。

实验考察了平均粒度45 μm 的氰基(CN)、硅胶(Silica)、强阳离子(SCX)、 C_{18} 填料和EDTA二钠等提取材料,用奶粉和牛奶的加标回收率考察提取效率。结果表明,如混合提取材料中不含EDTA二钠,强力霉素和土霉素无回收率,这可能与四环素类药物结构中两个酮基易与金属离子形成螯合物造成损失有关。采用SCX或Silica与 C_{18} 和EDTA二钠组成提取材料时,采用水或乙腈洗脱液,7种AGs均不能被有效洗脱,采用氯化乙腈为洗脱液,可以部分洗脱AGs,仅在使用CN时,奶粉和牛奶中的回收率分别为81.3%(链霉素)~98.3%(环丙沙星),78.4%(链霉素)~97.0%(氯霉素)。这可能与CN填料为硅胶键合氰丙基,同时具备正相和反相保留机制,非极性溶剂溶解待测物并用极性溶剂洗脱时,表现为正相作用,对极性化合物有较好的保留有关,而Silica和SCX对极性化合物保留较强。

3.2 HILIC固定相的选择

已知的HILIC固定相有未衍生化的硅胶^[18,19]或杂化颗粒^[20,21]、酰胺^[22,23]、氨基^[24]、二醇^[25]、两性离子^[26]等。适合AGs分离的固定相有3种:杂化颗粒、未衍生化的硅胶和两性离子。杂化颗粒与未衍生化的硅胶两种固定相保留机理相似,均使用有机相与水相的混合流动相,促使硅醇基团产生,形成带负电的酸性表面,从而有利于阳离子物质的保留,常用来分析碱性极性物质^[27];但硅胶基质颗粒(未衍生化)在中高pH下容易溶解,因此适用范围小于杂化颗粒。两性离子固定相包含摩尔比为1:1的强碱(季铵)和强酸(磺酸)基团,有利用两性离子固定相对AGs进行分离的报道^[28,29]。

本实验比较了未衍生化硅胶的Atlantis HILIC-silica(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μm , Waters公司)、两性离子的ZIC-HILIC(50 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μm , Merck公司)和杂化颗粒硅胶的Inspire HILIC(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μm , Dikma公司)的色谱柱,使用Inspire HILIC时,7种AGs分离良好。ZIC-HILIC柱分析效果不佳的原因,可能与它同时提供带正电和负电荷的官能团,使最终总净电荷接近为零,流动相pH变化对分离影响小有关,在分析带正电的碱性极性化合物时,ZIC-HILIC柱的分离效果不一定优于杂化颗粒。

3.3 三段检测模式的选择

研究发现,HILIC与RP的分离模式接近于正交^[30]。但在实际分离中,所选的20种抗生素中,5种完全不被HILIC柱保留,7种AGs和大环内脂类替米考星在 C_{18} 柱上几乎不保留,而7种物质在两种色谱柱上均有所保留,而流动相组成和AXP流速的变化对这7种物质的影响也不相同。

实验中将20种抗生素分为3组(见表4),第一组为5种在HILIC柱上完全不保留的物质,第二组为7种在HILIC和 C_{18} 上均有保留的物质,第三组为 C_{18} 柱不保留的7种AGs和大环内脂类的替米考星,分阶段检测。如图2,状态I,20种待测物进入HILIC柱后,第二和第三组物质在HILIC上保留;第一组物质在死时间通过HILIC柱,AXP泵在0.70~1.30 min,引入0.5 mL/min的水用于稀释高比例有机流动相,第一组物质被T柱捕获。状态II(1.30~6.50 min),左泵流动相反向将T柱中待测物洗脱至 C_{18} 柱并分离后,到达检测器。6.50~11.00 min(状态I)和11.01~14.00 min(状态II),同样方法分离和检测第二组物质,AXP泵流速为0.20 mL/min。14.00~20.00 min(状态III),右泵流动相将HILIC上强保留的第三组物质洗脱至质谱检测器分析。

3.4 流动相条件优化

3.4.1 左泵流动相 对第一组物质,使用乙腈和0.2%甲酸水溶液流动相,分离良好且质谱响应度高。第二组中四环素类的强力霉素和土霉素,特有的两个酮基结构使之易与硅羟基作用,分离时出现明显拖尾峰。研究表明,流动相中加入草酸^[31]、琥珀酸^[32]、柠檬酸^[33]等螯合剂可改善分离。本实验中,流动相中加入草酸,结果表明,强力霉素和土霉素峰形得到极大改善;但草酸浓度太高会对其它物质峰形和分

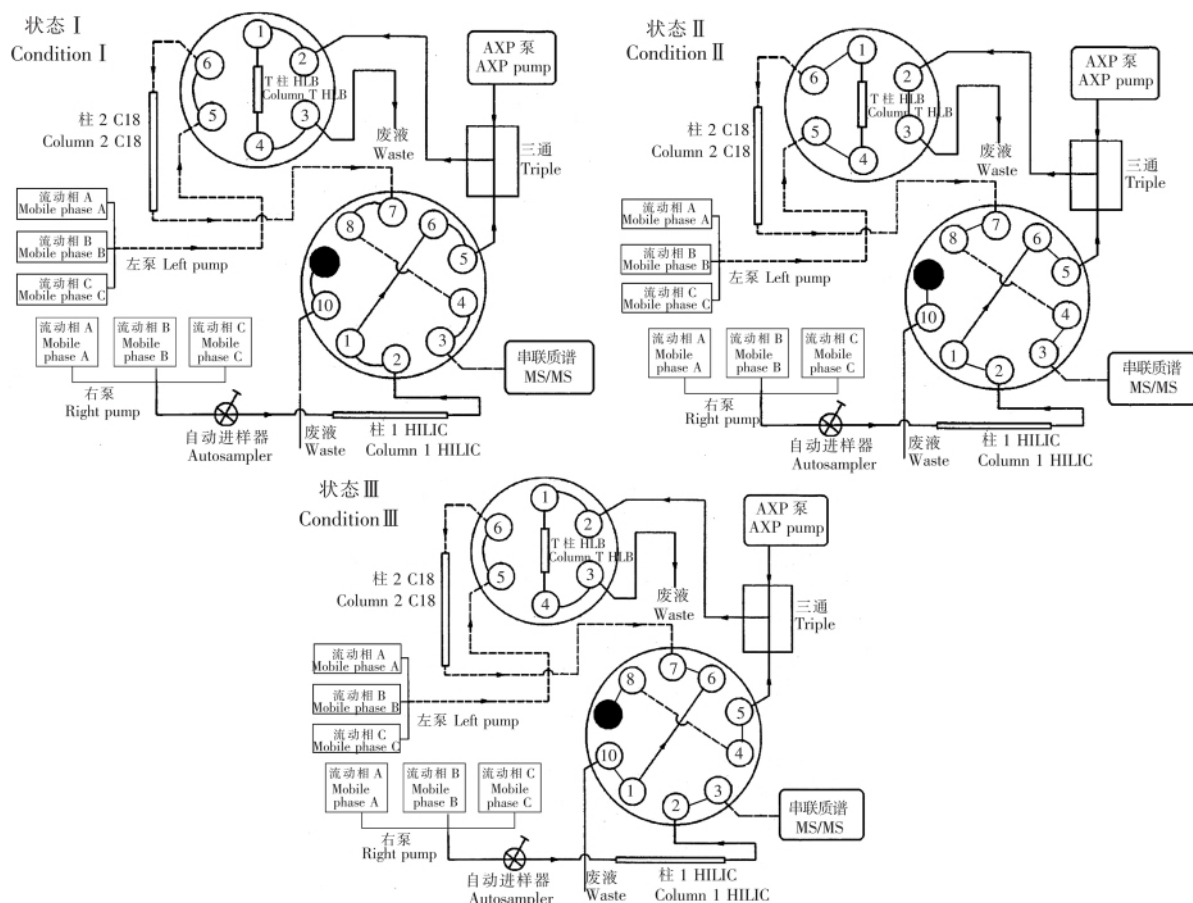


图 2 二维液相系统状态

Fig. 2 States of two-dimensional liquid chromatographic system

离带来很大影响。实验采用了 11.01 ~ 11.20 min, 0.2% 甲酸-乙腈(5: 95, V/V) 反向冲洗 T 柱, 防止峰展宽; 11.21 ~ 12.70 min, 乙腈-20 mmol/L 草酸(5: 95, V/V) 保证了足够的螯合剂, 防止了强力霉素和土霉素的拖尾; 12.71 ~ 14.00 min 0.2% 甲酸-乙腈梯度变化, 使第二组 7 种物质峰形良好。

3.4.2 右泵流动相 实验表明, 在将第一组物质(0 ~ 1.30 min) 和第二组物质(6.50 ~ 11.00 min) 洗脱至 T 柱阶段, 需分别使用高比例的有机相(95% 和 90%), 才能将两组物质有效洗脱至 T 柱, 并确保第三组物质不被冲出 HILIC 柱。这可能与两组物质极性较弱以及 HILIC 柱保留强极性物质时, 乙腈是弱洗脱溶剂有关。

3.4.3 AXP 泵条件 AXP 泵开启时间及流速在一定程度上影响分离, 系统死时间为 0.70 min, AXP 泵开启过早或流速过大, 产生的反压会通过三通影响到 HILIC 柱的分离, 使第一组物质无法顺利通过三通进入 T 柱。比较 4 种流速(0, 0.25, 0.50 和 0.75 mL/min) 的实验表明, AXP 泵流速死时间(0.70 min) 后开启, 保持 0.50 mL/min 流速时, 综合效果最佳。

采用同样方法优化 AXP 泵在第二组物质分离时的条件, 结果表明, AXP 泵开启 6.50 ~ 11.00 min, 流速: 0.20 mL/min, 第二组物质分离良好。

在优化色谱和质谱条件下 8 种代表性的抗生素多反应监测色谱图如图 3 所示。

3.5 方法学评价

对空白奶粉分别添加 1.0 mL 待测物浓度分别为 0.2, 0.5, 2.0, 5.0, 20 和 100 ng/mL 混合标准溶液, 按 2.2 节进行样品前处理后, 在优化的色谱和质谱条件下测定, 对各待测物浓度和定量离子峰面积进行线性回归。根据定量离子信噪比(S/N) 分别为 3 和 10 时对应的样品中待测物浓度, 得到检出限和定量限(表 4)。

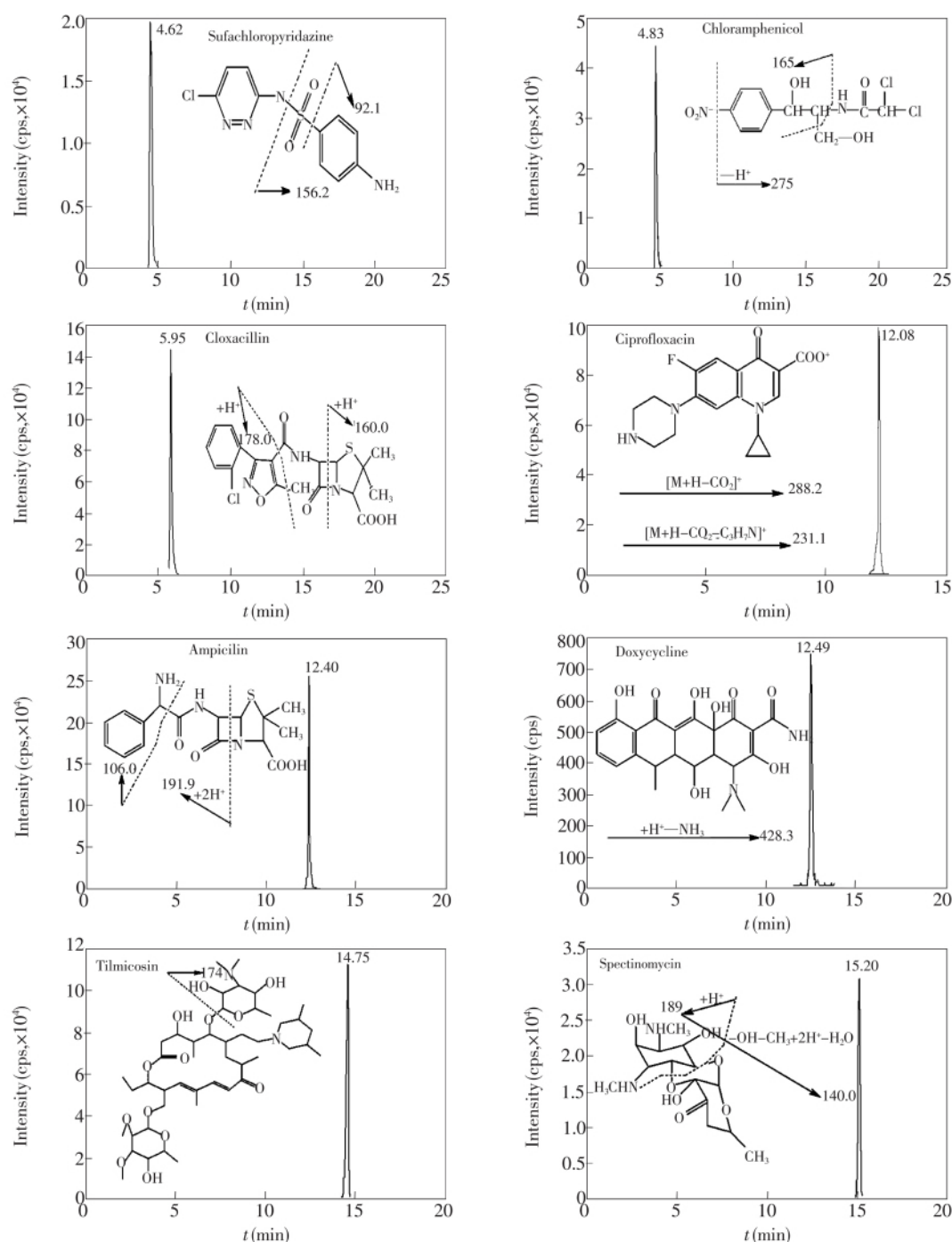


图3 8种抗生素标准应用液的MRM图

Fig. 3 MRM chromatogram of standard applying solution for several antibiotics

在奶粉和牛奶中添加0.5, 1.0, 1.5倍最大残留限量(MRL)的各抗生素(以MRL值最小的头孢族抗生素50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为基准), 即25, 50和75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个水平, 平行测定6份。

计算奶粉和牛奶中平均加标回收率和相对标准偏差(RSD), 结果: 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平, 回收率分别为72.5%(强力霉素)~97.2%(环丙沙星)和70.1%(强力霉素)~96.8%(环丙沙星), RSD分别为4.2%(替米考星)~8.8%(四环素)和3.7%(替米考星)~9.9%(四环素); 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平, 回收率分别为77.0%(强力霉素)~102.1%(环丙沙星)和76.4%(四环素)~98.9%(环丙沙星), RSD分别为2.8%(卡那霉素)~6.9%(四环素)和4.0%(氯霉素)~7.8%(四环素); 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平, 回收率分别为82.4%(四环素)~104.7%(恩诺沙星)和79.0%(四环素)~105.8%(环丙沙星), RSD分别为3.6%

表 4 20 种抗生素的回归方程、检出限和定量限

Table 4 Regression equations, limits of detection and limits of quantification of 20 compounds

化合物 Compounds	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient (<i>r</i>)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g/L}$)	检出限 LOD ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
头孢噻呋 Cefotiofur	$y = 60.80x + 180.3$	0.9976	0.5 ~ 100	0.30	1.00
磺胺甲氧嘧啶 Sulfamethoxypyridazine	$y = 134.2x - 23.75$	0.9989	0.5 ~ 100	0.35	1.16
磺胺氯吡嗪 Sulfachloropyridazine	$y = 70.28x + 41.01$	0.9996	2.0 ~ 100	1.20	3.96
氯霉素 Chloramphenicol	$y = 230.5x + 20.11$	0.9990	0.5 ~ 100	0.30	1.00
邻氯青霉素 Cloxacillin	$y = 318.0x - 88.25$	0.9981	0.2 ~ 100	0.12	0.96
氨苄青霉素 Ampicillin	$y = 228.6x + 33.54$	0.9993	0.5 ~ 100	0.30	1.00
头孢氨苄 Cefalexin	$y = 165.9x - 78.67$	0.9960	0.5 ~ 100	0.30	1.00
恩诺沙星 Enrofloxacin	$y = 334.8x + 117.2$	0.9998	2.0 ~ 100	1.10	3.63
环丙沙星 Ciprofloxacin	$y = 89.06x + 11.74$	0.9972	0.2 ~ 100	0.12	3.96
强力霉素 Doxycycline	$y = 425.0x - 61.93$	0.9955	5.0 ~ 100	2.40	7.92
土霉素 Oxytetracycline	$y = 190.9x + 42.61$	0.9945	5.0 ~ 100	2.10	6.93
交沙霉素 Josamycin	$y = 447.0x + 31.37$	0.9988	2.0 ~ 100	1.08	3.57
替米考星 Tilmicosin	$y = 60.51x + 38.06$	0.9993	0.2 ~ 100	0.10	0.33
大观霉素 Spectinomycin	$y = 308.9x - 12.43$	0.9997	0.5 ~ 100	0.35	1.16
链霉素 Streptomycin	$y = 114.6x + 21.92$	0.9977	0.5 ~ 100	0.33	1.09
双氢链霉素 Dihydrostreptomycin	$y = 155.7x - 44.02$	0.9984	0.2 ~ 100	0.15	0.50
庆大霉素 C1a Gentamicin C1a	$y = 186.3x + 11.96$	0.9986	2.0 ~ 100	1.20	3.96
阿米卡星 Amikacin	$y = 179.0x + 51.04$	0.9991	2.0 ~ 100	1.10	3.63
卡那霉素 Kanamycin	$y = 96.08x - 57.64$	0.9995	0.5 ~ 100	0.35	1.16
异帕米星 Isepamicin	$y = 325.7x - 10.25$	0.9970	2.0 ~ 100	1.18	3.90

(氯霉素) ~ 7.2% (四环素) 和 4.2% (链霉素) ~ 8.8% (强力霉素)。

3.6 实际样品的分析

对市售的 5 份奶粉、5 份牛奶、5 份原奶进行检测,在 1 份原奶中检出氨苄青霉素,含量 $37.6 \mu\text{g/kg}$, 低于欧盟规定的 MRL ($50 \mu\text{g/kg}$)。阳性样品的总离子流图和二级质谱图见图 4。

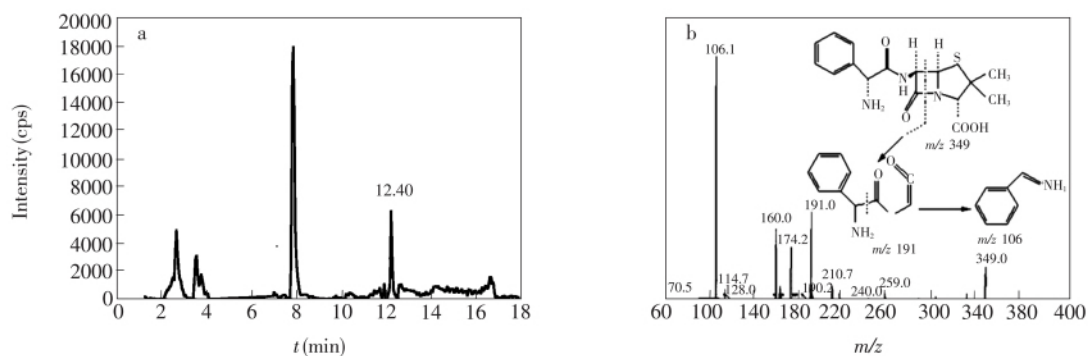


图 4 阳性样品的总离子流图(a) 和二级质谱图(b)

Fig. 4 Total ion current chromatogram (a) and product ion mass spectrogram (b) of positive sample

References

- Kennedy D G, McCracken R J, Cannavan A, Hewitt S A. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 812(1-2): 77-98
- Gentili A, Perret D, Marchese S. *Trends Anal. Chem.*, **2005**, 24(7): 704-733
- van Holthoon F L, Essers M L, Mulder P J, Stead S L, Caldow M, Ashwin H M, Sharman M. *Anal. Chim. Acta*, **2009**, 637(1-2): 135-143
- GONG Qiang, DING Li, ZHU Shao-Hua, JIAO Yan-Na, CHENG Jing, FU Shan-Liang, WANG Li-Bing. *Chinese J. Chromatography*, **2012**, 30(11): 1143-1147
- 龚强, 丁利, 朱绍华, 焦艳娜, 成靖, 付善良, 王利兵. *色谱*, **2012**, 30(11): 1143-1147
- Gremilgianni A M, Megoulas N C, Koupparis M A. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217(1-2): 6646-6651

- 6 Kawano S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* ,**2009** ,23(6): 907–914
- 7 Kahsay G , Song H , Schepdael A V , Cabooter D , Adams E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* ,**2014** ,87(1–2): 142–154
- 8 Aguilera-Luiz M M , Vidal J L M , Romero-González R , Frenich A G. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1205(1–2): 10–16
- 9 Carretero V , Blasco C , Picó Y. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1209(1–2): 162–173
- 10 Chico J , Rúbies A , Centrich F , Prat M D , Granados M. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1213(2): 189–199
- 11 Granelli K , Elgerud C , Lundström Å , Ohlsson A , Sjöberg P. *Anal. Chim. Acta* ,**2009** ,637(1–2): 87–91
- 12 Granelli K , Branzell C. *Anal. Chim. Acta* ,**2007** ,586(1–2): 289–295
- 13 GU Xin , WU Jian-Ping , ZHANG Xing , LI Dan-Ni , YAN Feng , ZHOU Yue-Rong. *Chinese J. Anal. Chem.* ,**2014** ,42(12): 1759–1766
- 顾欣, 吴剑平, 张鑫, 李丹妮, 严凤, 周悦榕. *分析化学* ,**2014** ,42(12): 1759–1766
- 14 Jandera P , Hájek T , Staňková M , Vyňuchalová K , Cesla P. *J. Chromatogr. A* ,**2012** ,1268(1–2): 91–101
- 15 Wang Y , Lehmann R , Lu X , Zhao X J , Xu G W. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1204(1–2): 28–34
- 16 Liang Z , Li K Y , Wang X L , Ke Y X , Jin Y , Liang X M. *J. Chromatogr. A* ,**2012** ,1224(1–2): 61–69
- 17 WANG Lian , LI Yuan-Qian , WANG Hai-Bo , GUAN Yan-Li. *Chinese J. Anal. Chem.* ,**2011** ,39(2): 203–207
- 王炼, 黎源倩, 王海波, 官艳丽. *分析化学* ,**2011** ,39(2): 203–207
- 18 Grumbach E S , Diehl D M , Neue U D. *J. Sep. Sci.* ,**2008** ,31(9): 1511–1518
- 19 Fountain K J , Xu J , Diehl D M , Morrison D. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 740–751
- 20 Novakova L , Kaufmannova I , Janska R. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 765–772
- 21 Chauve B , Guillarme D , Cleon P , Veuthey J. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 752–764
- 22 Liu M , Chen E X , Ji R , Semin D. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1188(1–2): 255–263
- 23 Nguyen H P , Yang S H , Wigginton J G , Simpkins J W , Schug K A. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 793–802
- 24 Jandera P , Hajek T , Skerikova V , Souhup J. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 841–852
- 25 Hemstrom P , Irgum K. *J. Sep. Sci.* ,**2006** ,29(12): 1784–1821
- 26 Goucher E , Kicman A , Wolff K , Smith N , Jickells S. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 955–965
- 27 Dejaegher B , Heyden Y V. *J. Sep. Sci.* ,**2010** ,33(6–7): 698–715
- 28 Buszewski B , Sylwia N. *Anal. Bioanal. Chem.* ,**2012** ,402(1): 231–247
- 29 Kumar P , Rubies A , Companyó R , Centrich F. *J. Sep. Sci.* ,**2011** ,35(4): 498–504
- 30 Liu Y , Xue X , Guo Z , Xu Q , Zhang F , Liang X. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1208(1): 133–140
- 31 Nakazawa H , Ino S , Kato K , Watanabe T , Ito Y , Oka H. *J. Chromatogr. B* ,**1999** ,732(2): 55–64
- 32 Cristofani E , Antonini C , Tovo G , Fioroni L , Piersanti A , Galarini R. *Anal. Chim. Acta* ,**2009** ,637(1–2): 40–46
- 33 Zurhelle G , Müller-Seitz E , Petz M. *J. Chromatogr. B* ,**2000** ,739(1): 191–203

Simultaneous Determination of Twenty Antibiotics Residues in Dairy Using Hydrophilic Interaction Chromatography-Reversed Phase Two Dimensional Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Lian^{*1,2} , YANG Bi-Xia³ , ZHANG Xin-Shen¹ , ZHENG Hong-Guo⁴ , RAN Liang-Ji⁴

¹(National Engineering Laboratory for Clean Technology of Leather Manufacture , Chengdu 610065 , China)

²(Chengdu Centre for Disease Control and Prevention , Chengdu 610041 , China)

³(West China School of Public Health , Sichuan University , Sichuan Chengdu 610041 , China)

⁴(Thermofisher Scientific (China) Corporation , Shanghai 201203 , China)

Abstract A method for the simultaneous determination of residues of 7 classes (20 species) antibiotics , β -lactams , tetracyclines , macrolides , aminoglycosides , amphenicols , quinolones and sulphonamides in dairy was established by hydrophilic interaction chromatography-reversed phase (HILIC $\times$ RP) two-dimensional liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. The sample of milk powder or milk was

extracted by mixed matrix solid phase dispersion with C_{18} and CN material. The analytes were eluted by acetonitrile and water, and nearly dried with rotary evaporation. Finally, the residues were dissolved with mobile phase and then analyzed. The sample pretreatment conditions, chromatographic mobile phase and mass spectrometric parameters were optimized. Twenty analytes showed good linearity with correlation coefficients of 0.9945–0.9998. The LODs of milk powder and milk samples were in the range of 0.10–2.40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at a S/N of 3, and LOQs were in the range of 0.33–7.92 $\mu\text{g}/\text{kg}$ at a S/N of 10. The recoveries of standard addition for milk powder and milk samples were 72.5%–97.2% and 70.1%–96.8% at the spiked level of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the relative standard deviations were in the ranges of 4.2%–8.8% and 3.7%–9.9% respectively. The proposed method has been applied to the determination of antibiotics residues in actual milk powder and milk samples.

Keywords Hydrophilic interaction; Two-dimensional liquid chromatography; Antibiotics; Mixed matrix solid phase dispersion

(Received 17 October 2014; accepted 11 March 2015)

中国化学会第二届全国质谱分析学术报告会 (第一轮通知)

为促进我国质谱分析及相关研究的快速发展,增进质谱研究与应用领域科技人员的学术交流与合作,由中国化学会及国家自然科学基金委主办,中国化学会质谱分析专业委员会与浙江大学承办的“中国化学会第二届全国质谱分析学术报告会”将于 2015 年 10 月 16 日~10 月 19 日在浙江大学紫金港校区召开。

本次会议将以大会邀请报告、分组邀请报告、口头报告、墙报、仪器展览等形式开展多领域质谱同行间的学术交流。会议将邀请多位院士和质谱专家参会并作特邀报告。会议热诚邀请全国从事质谱研究与应用、及相关仪器研究与开发等领域的广大学者、研究生、相关单位代表及仪器厂商参会。

一、征文内容:

应征的论文是未曾发表的质谱分析研究成果,涉及如下方面: 1 环境分析; 2 生命分析; 3 食品分析; 4 石油化工; 5 医药卫生; 6 公共安全; 7 天然物及烟草; 8 裂解机理、方法; 9 新材料、新能源; 10 样品前处理方法; 11 仪器研制与新技术; 12 其它。

征集的论文将被分为大会报告、邀请报告、口头报告和墙报四种形式交流。大会学术委员会将根据论文的质量确定是否录用及交流方式。大会将设优秀青年报告奖和优秀墙报奖。

二、征文格式与要求:

1. 请在会议网站(<http://www.ms-china.org/>) 下载论文模板,在线注册投稿。请严格按论文模板编辑,文责自负。请务必提供稿件联系人、电话、通讯地址和 Email。

2. 论文提交截止日期为 2015 年 8 月 15 日。

三、会议联系人

柴云峰,电话: 0571-87951285, E-mail: hplcms@zju.edu.cn

潘远江,电话: 0571-87951629, E-mail: fticrms@zju.edu.cn

通讯地址: 浙江大学玉泉校区化学系 735 室 310027。

有关会议的详细介绍、组织机构、征文格式、日程安排、宾馆住宿等相关信息,请登录会议网址(<http://www.ms-china.org/>) 查询。

中国化学会质谱分析专业委员会
浙江大学化学系