

固相萃取-液相色谱-质谱/质谱法同时测定 蜂蜜中的多类药物残留

侯建波^{1,2}, 谢文^{1,2*}, 陈笑梅^{1,2}, 奚君阳³, 钱艳³, 王峰³, 刘海山^{1,2}

(1. 浙江出入境检验检疫局技术中心, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310016; 3. 浙江立德产品技术有限公司, 浙江 杭州 310016)

摘要: 建立了采用固相萃取-液相色谱-质谱/质谱 (SPE-LC-MS/MS) 对蜂蜜中磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡嗪酮共计 6 大类 54 种药物残留同时测定的方法。蜂蜜经磷酸盐缓冲溶液 (pH 8) 稀释, Oasis HLB 固相萃取柱净化后, 通过液相色谱-质谱联用技术进行检测 (正离子方式, 多反应监测模式)。采用同位素稀释内标法或外标法进行定量, 线性关系良好, 相关系数大于 0.992。方法的定量限 (LOQ, 以信噪比 (S/N) 大于 10 计) 分别为磺胺类和硝基咪唑类药物 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 喹诺酮类和林可酰胺类药物 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 大环内酯类药物 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 吡嗪酮 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。总体回收率为 32.6%~114%, 相对标准偏差为 1.3%~28.9%。该方法的定量限满足目前国内外药物的最大残留限量要求, 可作为蜂蜜中相关药物残留量的筛选检测方法。

关键词: 液相色谱-质谱/质谱; 多类药物残留; 蜂蜜

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2011)06-0535-08

Simultaneous determination of multi-veterinary drug residues in honey by solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HOU Jianbo^{1,2}, XIE Wen^{1,2*}, CHEN Xiaomei^{1,2}, XI Junyang³,
QIAN Yan³, WANG Feng³, LIU Haishan^{1,2}

(1. Technic Center of Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China;
2. Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China;
3. Zhejiang Lead Product Technic Co., Ltd., Hangzhou 310016, China)

Abstract: A method of solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-LC-MS/MS) for simultaneous determination of 54 drug residues (sulfonamides, nitroimidazoles, quinolones, macrolides, lincosamides and praziquantel) in honey was developed. The honey samples were diluted by phosphate buffer solution (pH 8) followed by a further cleanup procedure with an Oasis (HLB) SPE column. The detection was carried out by LC-MS/MS, using positive-ion electrospray ionization in multiple reaction monitoring (MRM) mode, with one precursor/two product ion transitions for each compound. Isotope dilution internal standard method or external standard method was used to determine the residue contents with a good linear relationship ($r > 0.992$). The limits of quantification (LOQs, $S/N > 10$) were 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for sulfonamides and nitroimidazoles, 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for quinolones and lincosamides, 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for macrolides, and 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for praziquantel. The recovery ranges were from 32.6% to 114% with the relative standard deviations (RSDs) between 1.3% and 28.9%. As a screening method, the developed procedure is suitable for the determination and confirmation of the drug residues in honey samples.

Key words: liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); multi-veterinary drug residues; honey

* 通讯联系人: 谢文, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品中兽药残留检测。Tel: (0571) 81100817, E-mail: xw@zq.gov.cn.
基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研项目 (No. 2008IK130).
收稿日期: 2011-01-24

药物残留是通过在预防和治疗动物疾病用药、在饲料中添加以及在食品保鲜中引入而带来对食品的污染。蜂蜜是我国重要的出口产品之一,也一直是各国药物残留检测的重点产品。随着全球经济一体化和食品贸易国际化,蜂蜜中的药物残留受到主要经济体如日本、欧盟以及美国等国家和地区的特别关注。世界各国纷纷制定相应的法律法规来限制药物的使用^[1-4],药物残留测定技术也成为国内外设立技术壁垒的主要手段。

由于各类药物的理化性质差别较大,现行的蜂蜜中药物残留分析方法一般针对化学结构相类似的同族药物开发。已有资料报道通过免疫筛选法^[5-6]、气相色谱法^[7-8]、气相色谱-质谱联用法^[9]、液相色谱法^[10-15]和液相色谱-质谱/质谱法^[16-24]等测定方法对蜂蜜中各类药物的残留量进行分类测定。随着人们食品安全意识的提高,对同一批蜂蜜经常需要进行许多种类的药物残留检测。而传统的分析方法的检测周期长、所需人力和物力多、检测成本高,不能满足目前药物种类不断增加、分析通量相应提高的需求。随着检测技术的快速发展,蜂蜜中的药物多残留检测方法正逐步从针对单一类别药物发展为多种不同类别药物的同时定性与定量分析^[25-30]。

本文建立了基于液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)的蜂蜜中磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡嗪酮 6 大类 54 种药物残留量同时检测的方法。蜂蜜样品通过磷酸盐缓冲溶液(pH 8)直接稀释, Oasis HLB 固相萃取柱净化。通过同位素稀释内标法和外标法定量。该方法简便快捷,检测成本低,适用于蜂蜜中多类药物的同时测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API 4000 液相色谱-质谱/质谱仪,配有电喷雾离子源(美国 AB 公司); Oasis HLB SPE 柱(500 mg, 6 mL; Waters 公司);固相萃取装置(Supelco 公司);台式离心机(Thermo 公司);旋转蒸发器(Buchi Rotavapor R-210)。

甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯;实验用水为 Milli-Q 高纯水。磷酸盐缓冲溶液:溶解 13.8 g 磷酸二氢钠(分析纯)于 950 mL 水中,加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值到 8.0,加水稀释至 1 L。磺胺类药物(16 种)、硝基咪唑类药物(10 种)、喹诺

酮类药物(15 种)、大环内酯类药物(9 种)、林可酰胺类药物(3 种)和吡嗪酮(纯度 $\geq 98\%$, Dr Ehrenstorfer GmbH)的名称及编号见表 1。同位素内标物(磺胺嘧啶-D₄、磺胺噻唑-D₆、磺胺吡啶-D₆、磺胺二甲基嘧啶-D₄、磺胺甲基异恶唑-D₆、磺胺二甲氧嘧啶-D₄、磺胺喹恶啉-D₆、羟基二甲硝咪唑-D₃、二甲硝咪唑-D₃、洛硝哒唑-D₃、羟基异丙硝唑-D₃、异丙硝唑-D₃、依诺沙星-D₈、氧氟沙星-D₃、诺氟沙星-D₅、环丙沙星-D₈、恩诺沙星-D₅、双氟沙星-D₄和沙拉沙星-D₈)标准化合物(纯度 $\geq 98\%$, Dr Ehrenstorfer GmbH)。标准化合物储备液用甲醇配制,质量浓度均为 1.0 g/L,贮存在 0~4℃的冰箱中,实验中根据需要用甲醇-水(3:7, v/v)溶液稀释为适当浓度的混合标准工作液。

蜂蜜样品:杭州天厨蜜源保健品有限公司提供。

1.2 样品处理

称取 5.00 g 蜂蜜试样置于 50 mL 具塞离心管中,加入同位素内标溶液(磺胺类同位素内标 8 ng, 硝基咪唑类同位素内标 40 ng, 喹诺酮类同位素内标 30 ng)。再加入 20 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 8)稀释,混匀。Oasis HLB 固相萃取小柱预先依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水、5 mL 磷酸盐缓冲溶液淋洗活化。将稀释溶液转移至活化后的 Oasis HLB 固相萃取小柱上,弃去流出液。再加 20 mL 水淋洗并抽干。随后用 6 mL 甲醇洗脱,控制流速 1~2 mL/min。收集洗脱液,在 40℃以下水浴中减压浓缩至近干。用 2.0 mL 甲醇-水(3:7, v/v)溶液定容、混匀,溶液过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-质谱/质谱测定。

1.3 液相色谱与质谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A),乙腈(B),0.15% 甲酸水溶液(C);梯度洗脱程序:流动相 A 的体积比保持 20% 不变,流动相 B 和 C 的体积比变化程序:0~4.0 min, 2% B~5% B; 4.0~8.0 min, 5% B~10% B; 8.0~10.0 min, 10% B~38% B; 10.0~16.0 min, 38% B; 16.0~16.5 min, 38% B~2% B; 16.5~23.0 min, 2% B。流速:0.8 mL/min;进样量:50 μL。

电喷雾离子源(ESI),正离子方式(ESI⁺)扫描,检测方式为多反应监测(MRM)。电喷雾电压:5 500 V;雾化气(GS1)压力:358.28 kPa;气帘气(CUR)压力:172.25 kPa;辅助气(GS2)压力:378.95 kPa;离子源温度(TEM):550℃;碰撞气(CAD):6。其他质谱条件如表 1 所示。

表 1 54 种药物信息及质谱测定条件
Table 1 Information and optimized mass spectrometry parameters of 54 standard veterinary drugs

No.	Drug	Ion pair (<i>m/z</i>)	Declustering potential/V	Collision energy/V	Collision cell exit potential/V	Isotope internal compound	Retention time/min
1	sulfadiazine	251.1/156.3 [*]	65	22	10	sulfadiazine-D ₄	4.35
	(磺胺嘧啶)	251.1/108.2		33			
2	sulfathiazole	255.8/156.3 [*]	70	22	10	sulfathiazole-D ₆	4.90
	(磺胺噻唑)	255.8/108.2		30			
3	sulfapyridine	249.9/156.2 [*]	70	24	10	sulfapyridine-D ₆	5.29
	(磺胺吡啶)	249.9/184.4					
4	sulfamerazine	265.1/156.3 [*]	65	25	10	sulfadiazine-D ₄	6.06
	(磺胺甲基嘧啶)	265.1/172.2		23			
5	sulfamethazine	279.2/156.3 [*]	70	26	10	sulfamethazine-D ₄	7.78
	(磺胺二甲基嘧啶)	279.2/186.1					
6	sulfameter	281.2/156.3 [*]	70	25	10	sulfamethazine-D ₄	8.35
	(磺胺-5-(对) 甲氧嘧啶)	281.2/215.4		26			
7	sulfamethizole	271.0/156.2 [*]	70	24	10	sulfamethazine-D ₄	8.75
	(磺胺甲噻二唑)	271.0/108.2		32			
8	sulfamethoxyipyridazine	281.2/156.3 [*]	70	25	10	sulfamethazine-D ₄	9.29
	(磺胺甲氧哒嗪)	281.2/215.4		26			
9	sulfachloropyridazine	285.0/156.3 [*]	70	22	10	sulfadimethoxine-D ₄	11.5
	(磺胺氯哒嗪)	285.0/108.2		35			
10	sulfamonomethoxine	281.2/156.3 [*]	70	25	10	sulfamethazine-D ₄	11.9
	(磺胺-6-(间) 甲氧嘧啶)	281.2/215.4		26			
11	sulfadoxine	311.2/156.3 [*]	70	30	10	sulfadimethoxine-D ₄	12.1
	(磺胺邻二甲氧嘧啶)	311.2/108.2		37			
12	sulfamethoxazole	254.1/156.3 [*]	65	22	10	sulfamethoxazole-D ₆	12.1
	(磺胺甲基异恶唑)	254.1/108.2		36			
13	sulfafurazole	268.0/156.3 [*]	70	22	10	sulfadimethoxine-D ₄	12.5
	(磺胺二甲异恶唑)	268.0/113.2					
14	sulfabenzamide	277.0/156.2 [*]	68	19	7	sulfadimethoxine-D ₄	12.8
	(苯酰磺胺)	277.0/92.0		41			
15	sulfadimethoxine	311.2/156.3 [*]	70	30	10	sulfadimethoxine-D ₄	13.1
	(磺胺二甲氧嘧啶)	311.2/108.2		37			
16	sulfaquinoxaline	301.2/156.3 [*]	55	24	13	sulfaquinoxaline-D ₆	13.1
	(磺胺喹恶琳)	301.2/108.2		37			
	sulfadiazine-D ₄	255.2/160.3	56	22	12		
	(磺胺嘧啶-D ₄)						
	sulfathiazole-D ₆	262.0/97.9	72	39	8		
	(磺胺噻唑-D ₆)						
	sulfapyridine-D ₆	256.2/97.9	70	38	7		
	(磺胺吡啶-D ₆)						
	sulfamethazine-D ₄	283.1/186.3	63	29	10		
	(磺胺二甲基嘧啶-D ₄)						
	sulfamethoxazole-D ₆	260.2/162.3	75	22	20		
(磺胺甲基异恶唑-D ₆)							
sulfadimethoxine-D ₄	315.3/156.3	65	29	10			
(磺胺二甲氧嘧啶-D ₄)							
sulfaquinoxaline-D ₆	307.3/162.3	80	24	12			
(磺胺喹恶琳-D ₆)							
17	metronidazole-OH	188.1/123.0 [*]	53	19	10	DMZOH-D ₃	3.34
	(MNZOH 羟基甲硝唑)	188.1/126.0		26			
18	2-methyl-5-nitroimidazole	128.0/82.0 [*]	60	26	10		3.59
	(2-甲基-5-硝基咪唑)	128.0/42.0		51			
19	dimetridazole-OH	158.0/140.1 [*]	48	16	10	DMZOH-D ₃	4.14
	(DMZOH 羟基二甲硝咪唑)	158.0/55.0		31			
20	metronidazole	172.0/128.2 [*]	62	21	11	DMZOH-D ₃	4.07
	(MNZ 甲硝唑)	172.0/82.1		35			

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

No.	Drug	Ion pair (<i>m/z</i>)	Declustering potential/V	Collision energy /V	Collision cell exit potential/V	Isotope internal compound	Retention time/min
21	dimetridazole (DMZ 二甲硝咪唑)	142.0/96.0*	62	23	8	DMZ-D ₃	4.83
		142.0/81.0		36	14		
22	Ronidazole (RNZ 洛硝哒唑)	201.1/140.2*	37	17	8	RNZ-D ₃	4.65
		201.1/110.2		25			
23	5-chloro-4-methyl-4-nitroimidazole(氯甲硝咪唑)	162.0/116.0*	68	26	10		7.09
		162.0/145.0		24			
24	5-nitrobenzimidazole (苯硝咪唑)	164.0/118.0*	64	32	10		7.51
		164.0/91.0		52			
25	ipronidazole-OH (IPZOH 羟基异丙硝唑)	186.3/168.1*	45	19	9	IPZOH-D ₃	10.5
		186.3/122.3		29	5		
26	ipronidazole (IPZ 异丙硝唑) DMZOH-D ₃ (羟基二甲硝咪唑-D ₃) DMZ-D ₃ (二甲硝咪唑-D ₃) RNZ-D ₃ (洛硝哒唑-D ₃) IPZOH-D ₃ (羟基异丙硝唑-D ₃) IPZ-D ₃ (异丙硝唑-D ₃)	170.2/109.0*	63	37	10	IPZ-D ₃	12.5
		170.2/124.1		26			
		161.2/143.1	51	18	6		
		145.2/99.0	85	25	10		
		204.2/143.3	50	17	10		
		189.2/171.2	60	20	9		
		173.1/127.2	67	28	6		
27	marbofloxacin (麻保沙星)	363.2/320.2*	63	23	10		5.58
		363.2/345.3		25			
28	enoxacin (伊诺沙星)	321.2/303.1*	67	29	10	enoxacin-D ₈	6.38
		321.2/234.4		32			
29	ofloxacin (氧氟沙星)	362.2/318.3*	75	27	8	ofloxacin-D ₃	6.76
		362.2/261.2		39	6		
30	norfloxacin (诺氟沙星)	320.0/233.3*	74	35	11	norfloxacin-D ₅	7.51
		320.0/276.3		25	14		
31	ciprofloxacin (环丙沙星)	332.1/288.3*	85	27	7	ciprofloxacin-D ₈	8.00
		332.1/230.9		50	12		
32	danofloxacin (达氟沙星)	358.2/340.3*	65	35	9		8.17
		358.2/283.1		33	9		
33	enrofloxacin (恩诺沙星)	360.2/316.2*	76	29	7	enrofloxacin-D ₅	8.38
		360.2/245.4		35	9		
34	lomefloxacin (洛美沙星)	352.3/265.1*	80	35	10		8.70
		352.3/308.2		24	10		
35	orbifloxacin (奥比沙星)	396.0/352.0*	76	27	9		8.92
		396.0/295.0		35	9		
36	difloxacin (双氟沙星)	400.0/356.0*	76	29	9	difloxacin-D ₄	10.6
		400.0/299.0		42			
37	sarafloxacin (沙拉沙星)	386.1/342.4*	87	27	8	sarafloxacin-D ₈	11.2
		386.1/299.2		39	7		
38	sparfloxacin (司帕沙星)	393.2/292.2*	94	36	10		11.7
		393.2/349.2		28	10		
39	oxolinic acid (恶喹酸)	262.0/244.4*	75	25	18		12.9
		262.0/216.3		40	18		
40	nalidixic acid (萘啶酸)	233.2/215.0*	53	21	10		14.1
		233.2/187.0		35	10		
41	flumequine (氟甲喹) enoxacin-D ₈ (依诺沙星-D ₈)	262.1/244.0*	73	27	10		14.3
		262.1/202.1		49	10		
		329.4/311.2	66	28	7		

表 1 (续)
Table 1 (Continued)

No.	Drug	Ion pair (<i>m/z</i>)	Declustering potential/V	Collision energy /V	Collision cell exit potential/V	Isotope internal compound	Retention time/min
	ofloxacin-D ₃ (氧氟沙星-D ₃)	365.2/321.4	65	26	8		
	norfloxacin-D ₅ (诺氟沙星-D ₅)	325.4/281.2	65	25	9		
	ciprofloxacin-D ₈ (环丙沙星-D ₈)	340.1/296.5	90	27	10		
	enrofloxacin-D ₅ (恩诺沙星-D ₅)	365.1/321.5	70	28	8		
	difloxacin-D ₄ (双氟沙星-D ₄)	404.3/360.2	76	28	9		
	sarafloxacin-D ₈ (沙拉沙星-D ₈)	394.1/376.5	70	30	8		
42	spiramycin (螺旋霉素)	843.6/174.3* 843.6/318.5	110	50 40	14 9		11.8
43	tilmicosin (替米考星)	869.7/174.4* 869.7/156.6	120	58 68	15 12		12.1
44	oleandomycin (竹桃霉素)	688.6/158.4* 688.6/544.6	65	40 23	13 19		12.6
45	tylosin (泰乐菌素)	916.5/174.2* 916.5/772.7	96	53 41	15		12.7
46	erythromycin (红霉素)	734.6/158.5* 734.6/576.5	80	40 27	13 17		12.7
47	roxithromycin (罗红霉素)	837.6/679.6* 837.6/158.4	90	48 30	14 22		13.3
48	josamycin (交沙霉素)	828.8/174.3* 828.8/229.3	105	45 42	14		13.6
49	kitasamycin (吉他霉素)	772.7/174.3* 772.7/109.0	115	47 63	8 10		13.0
50	tiamulin (泰妙菌素)	494.3/192.5* 494.3/119.2	60	26 54	10		12.9
51	lincomycin (林可霉素)	407.2/126.3* 407.2/359.4	90	26 28	10 9		5.15
52	clindamycin (氯林可霉素)	425.9/126.1* 425.9/378.2	90	48 28	10		12.4
53	pirlimycin (吡利霉素)	411.2/112.1* 411.2/363.1	90	44 24	10		12.3
54	praziquantel (吡喹酮)	313.5/203.2* 313.5/83.2	74	25 39	4 6		17.1

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 提取净化条件考察

蜂蜜样品中含有大量的糖分和其他有机物等杂质,因而需要通过提取和净化两个过程来对蜂蜜进行处理,以便尽可能地去除干扰成分^[22]。研究发现,蜂蜜样品用水稀释后,若加入氯化钠和乙腈提取,喹诺酮类药物、大环内酯类药物和林可酰胺类药物中的一些化合物提取效率很低,其中奥比沙星、螺旋霉素、红霉素、林可霉素、氯林可霉素和吡利霉素的提取效率更是小于 5%。因此,使用乙腈无法有效地将这些化合物从水中提取出来。

本文考察了直接用水或磷酸盐缓冲溶液(pH 8) 稀释蜂蜜样品,采用不同类型固相萃取柱(C₁₈、Oasis HLB、MCX) 净化、水淋洗、甲醇洗脱处理样品

的效果。结果表明,用水稀释蜂蜜样品时,蜂蜜中大量的糖分会造成 C₁₈ 固相萃取柱阻塞;使用 MCX 固相萃取柱时,喹诺酮类药物洗脱带较宽。而用磷酸盐缓冲溶液(pH 8) 稀释蜂蜜样品时,采用 Oasis HLB 固相萃取柱净化,大环内酯类药物和林可酰胺类药物的回收率相对采用水稀释蜂蜜样品时的回收率提高 5%~15%。这个结果与文献[19,31,32]中用磷酸盐缓冲液溶解净化的效果一致。

2.2 液相色谱条件考察

2.2.1 色谱柱的选择

分别考察了 Agilent Eclipse XDB-C₈ 柱(150 mm×4.6 mm,5 μm)、Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm,5 μm) 和 Phenomenex Kinetex C₁₈(150 mm×4.6 mm,2.6 μm) 3 种不同色谱柱分离 54 种药物化合物时的分离度和灵敏度。具

有相同离子对 (m/z 281.2/156.3 和 m/z 281.2/215.4) 的磺胺-5-(对) 甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪和磺胺-6-(间) 甲氧嘧啶 3 种化合物在上述 3 种色谱柱中均具有很好的分离度, 结果如图 1 所示。但 Phenomenex Kinetex C_{18} 色谱柱的填料粒径只有 2.6 μm , 流速为 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ 时已达到较高柱压, 而以上 3 种化合物的保留时间比在 Agilent Eclipse 色谱柱上更长。又由于在 Agilent Eclipse XDB- C_8 色谱柱上分离各化合物时的灵敏度较高, 因此最终选择以 Agilent Eclipse XDB- C_8 色谱柱作为分离柱。

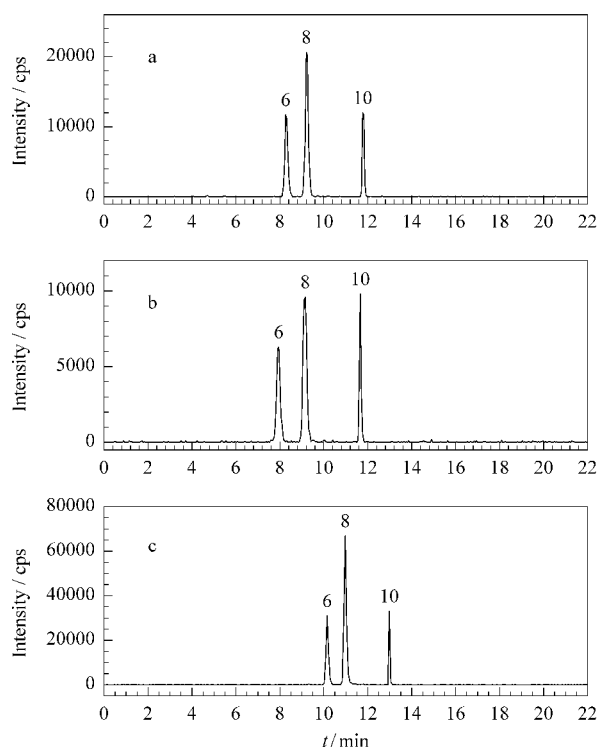


图 1 离子对同为 m/z 281.2/156.3 和 m/z 281.2/215.4 的 3 种化合物分别在 (a) Agilent Eclipse XDB- C_8 , (b) Agilent Eclipse XDB- C_{18} 和 (c) Phenomenex Kinetex C_{18} 3 种色谱柱上的分离色谱图

Fig. 1 Chromatograms of three compounds with ion pairs of m/z 281.2/156.3 and 281.2/215.4 separated on (a) Agilent Eclipse XDB- C_8 column, (b) Agilent Eclipse XDB- C_{18} column and (c) Phenomenex Kinetex C_{18} column, separately

For peak identifications, see Table 1.

2.2.2 色谱流动相和样品稀释溶剂的选择

液相色谱流动相和样品稀释溶剂的选择对待测物质的峰形、分离度和灵敏度有很大的影响。通常液相色谱流动相由乙腈或甲醇和水相体系组成。经过比较发现, 流动相为单一的有机溶剂时, 喹诺酮类药物的峰形不对称; 而加入乙腈和甲醇混合溶剂时, 喹诺酮类药物的色谱峰形得到改善。

色谱分离前一般采用流动相作为样品稀释溶

剂; 而应用梯度洗脱程序时, 选用梯度起始时间的流动相组成为样品稀释溶剂。分别考察了以乙腈-水 (3:7, v/v) 溶液、甲醇-水 (3:7, v/v) 溶液和乙腈-甲醇-0.15% 甲酸水溶液 (2:20:78, v/v/v) 作为样品稀释溶剂的分离效果。结果发现, 以乙腈-水 (3:7, v/v) 溶液作为样品稀释溶剂时, 喹诺酮类药物的色谱峰峰形较宽, 林可霉素的色谱峰不尖锐、不对称 (见图 2a); 以甲醇-水 (3:7, v/v) 溶液或乙腈-甲醇-0.15% 甲酸水溶液 (2:20:78, v/v/v) 作为稀释溶剂时, 各化合物的灵敏度和峰形无显著差异。但考虑到大环内酯类药物在酸性溶剂中不稳定易水解^[33], 最终选择甲醇-水 (3:7, v/v) 作为样品稀释溶剂。

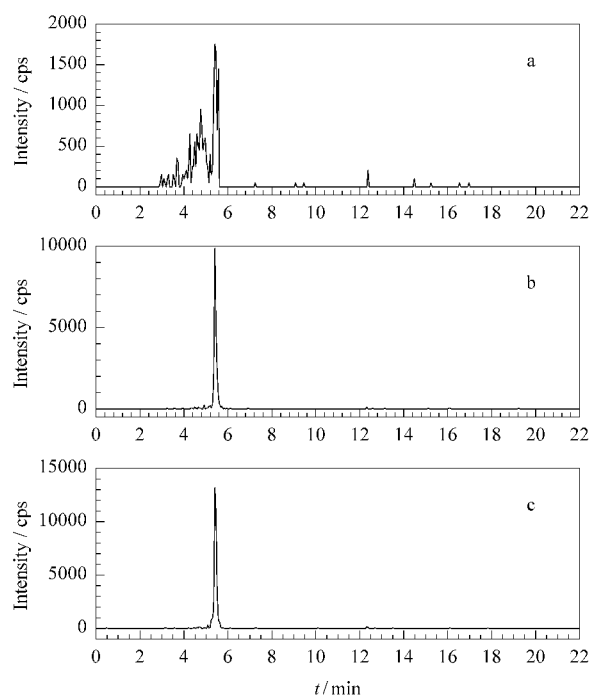


图 2 使用不同稀释溶剂时林可霉素的 MRM 色谱图
Fig. 2 MRM chromatograms of lincomycin dissolved in various solvents

a. acetonitrile-water (3:7, v/v); b. methanol-water (3:7, v/v); c. acetonitrile-methanol-0.15% formic acid solution (2:20:78, v/v/v).

2.3 质谱条件考察

分别以流动注射的方式在正离子模式下对各待测化合物进行母离子全扫描, 确定分子离子峰; 再分别以待测化合物的分子离子为母离子, 对其子离子进行全扫描。选择两个特征子离子, 以信噪比高、峰形好、干扰小的离子对作为定量离子对。该方法符合欧盟 EC/657 指令中利用质谱方法对药物残留进行确证必须满足 4 个识别点的要求 (母离子 1 点, 特征子离子 1.5 点/个)。同时, 特征离子的丰度比与标准物质对比结果在欧盟 EC/657 允许范围内。以 ESI⁺-MRM 模式优化各种质谱参数, 获得的最佳质

谱条件如表 1 和 1.3 节所述。

2.4 线性关系和定量限

本文中部分药物选用同位素稀释内标法定量，但大部分药物需要通过外标法定量。而基于液相色谱-质谱/质谱法测定药物残留时，某些基质对离子对信号强度具有增强或抑制效应。因此本文采用样品空白提取液作为标准溶液的稀释溶剂，可使标准

溶液和样品溶液具有同样的离子化条件，从而降低样品基质效应的影响，提高方法的准确度。在空白基质溶液中分别加入混合标准溶液，配制系列浓度的各类药物溶液（见表 2）。在此范围内进行测试，以标准品与内标物峰面积的比值为纵坐标，以待测物质质量浓度（ $\mu\text{g/kg}$ ）为横坐标，绘制各类药物的工作曲线，各药物的线性方程相关系数 $r > 0.992$ 。

表 2 各类药物的定量限及工作曲线浓度
Table 2 Limits of quantification (LOQ) and the concentration values of working curves for veterinary drugs

Drug	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)	Concentration of working solution/ ($\mu\text{g/L}$)	Concentration of working curve/ ($\mu\text{g/kg}$)
Sulfonamides and nitroimidazoles	1.0	1.5, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0	0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0
Quinolones and lincosamides	2.0	3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0	1.2, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0
Macrolide antibiotics	3.0	4.5, 7.5, 15.0, 30.0, 45.0	1.8, 3.0, 6.0, 12.0, 18.0
Praziquantel	0.3	0.45, 0.75, 1.5, 3.0, 4.5	0.18, 0.3, 0.6, 1.2, 1.8

在空白蜂蜜样品中添加各类药物混合标准溶液。添加量为磺胺类和硝基咪唑类药物 $1.0\ \mu\text{g/kg}$ 、喹诺酮类和林可酰胺类药物 $2.0\ \mu\text{g/kg}$ 、大环内酯类药物 $3.0\ \mu\text{g/kg}$ 、吡喹酮 $0.3\ \mu\text{g/kg}$ 时的信噪比 (S/N) 大于 10，因而以此添加量为方法的定量限。该定量限能满足目前国内外对蜂蜜中相应药物残留测定的要求。

2.5 回收率和精密度

选用不含各类待测组分的蜂蜜样品进行 3 个浓度水平的添加回收实验。各类药物的添加量见表 3。每个浓度水平取 6 个平行样，相应的回收率 and 相对标准偏差 (RSD) 范围见表 3。

表 3 空白蜂蜜样品中多类药物的添加浓度、回收率和相对标准偏差范围

Table 3 Spiked concentrations, recovery ranges and relative standard deviation (RSD) ranges of veterinary drugs in a blank honey sample

Drug	Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery range /%	RSD range /%
Sulfonamides	1.0	52.5 – 110	3.63 – 13.4
	2.0	55.8 – 107	1.30 – 10.9
	4.0	53.6 – 114	3.52 – 12.4
Nitroimidazoles	1.0	62.8 – 108	3.13 – 9.80
	2.0	72.0 – 110	3.80 – 11.4
	4.0	81.3 – 107	2.50 – 8.88
Quinolones	2.0	67.5 – 110	2.78 – 12.8
	4.0	63.1 – 110	1.76 – 13.9
	8.0	71.6 – 111	2.12 – 13.8
Macrolide antibiotics	3.0	32.6 – 106	7.24 – 28.9
	6.0	37.1 – 111	5.39 – 21.0
	12.0	42.7 – 111	4.51 – 19.5
Lincosamides	2.0	64.1 – 107	4.20 – 15.2
	4.0	61.3 – 93.9	2.42 – 9.50
	8.0	69.4 – 107	4.20 – 10.4
Praziquantel	0.3	62.3 – 76.8	9.39
	0.6	69.3 – 79.5	4.58
	1.2	67.2 – 85.6	9.80

2.6 阳性样品分析

应用本方法对 23 批阳性蜂蜜样品进行测定，其中阳性药物分别为磺胺嘧啶、磺胺甲基异恶唑、甲硝唑、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、林可霉素，结果如表 4 所示。与各类药物的确证方法的测定结果^[18, 32, 34–36]进行对比，未发现假阴性情况。

表 4 本文方法与确证方法测定 23 种阳性蜂蜜样品中的药物含量
Table 4 Drug contents in positive honey samples by this method and confirmed method

Sample No.	Drug	This method/ ($\mu\text{g/kg}$)	Confirmed method* / ($\mu\text{g/kg}$)
1	sulfadiazine	3.8	5.3
2	sulfamethoxazole	6.9	5.0
3	metronidazole	13.5	15.4
4	metronidazole	2.0	2.2
5	metronidazole	2.2	2.4
6	norfloxacin	4.7	3.0
7	norfloxacin	4.9	3.3
8	norfloxacin	1.8	3.3
9	norfloxacin	3.4	3.5
10	norfloxacin	3.0	4.5
11	norfloxacin	3.5	5.2
12	ciprofloxacin	38.4	25.2
13	ciprofloxacin	36.5	23.8
14	ciprofloxacin	3.3	3.0
15	ciprofloxacin	3.1	3.8
16	ciprofloxacin	8.4	8.5
17	ciprofloxacin	2.9	3.4
18	ciprofloxacin	1.7	2.9
19	enrofloxacin	4.4	5.1
20	lincomycin	18.9	18.0
21	lincomycin	8.7	8.4
22	lincomycin	10.2	8.0
23	lincomycin	10.2	7.0

* Confirmed method was from Refs. 18, 32, 34 – 36.

3 结论

建立了蜂蜜中磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡嗪酮共计 6 大类 54 种药物同时测定的方法。本方法操作简单,选择性好,检测成本低,定量限能满足目前国内外对蜂蜜中相应药物残留测定的要求。液相色谱-质谱/质谱法结合同位素内标稀释法定量,可以解决蜂蜜中部分药物的基质效应问题,定量准确,总体回收率为 32.6% ~ 114%,相对标准偏差小于 28.9%。对 23 批阳性蜂蜜样品进行测定,未发现假阴性情况。本方法可作为筛选方法在蜂蜜中药物残留的测定中予以应用。

参考文献:

- [1] 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). (2002-12-24) [2008-06-29]. <http://yz.hz-agri.gov.cn/uploadFiles/2005-10/1130221564406.doc>
- [2] European Communities. Council Regulation (EEC) No. 2377/90. (1990-08-18). http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf
- [3] US FDA. Code of Federal Regulations Title 21. Part 556: Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food. [2010-12-08]. http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_09/21cfrv6_09.html
- [4] Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods (Japan). [2010-12-08]. <http://m5.ws001.squarestart.ne.jp/foundation/search.html>
- [5] Pastor-Navarro N, Gallego-Iglesias E, Maquieira Á, et al. Talanta, 2007, 71 (2): 923
- [6] Burkin M A, Galvidis I A. J Agric Food Chem, 2010, 58 (18): 9893
- [7] Liu B, Huang W H, Wang J Z. Journal of Analytical Science (刘波, 黄为红, 王金中. 分析科学学报), 2008, 24(5): 586
- [8] Tao Y F, Yu G, Chen D M, et al. Journal of Agricultural Science and Technology (陶燕飞, 于刚, 陈冬梅, 等. 中国农业科技导报), 2008, 10(S2): 63
- [9] Wang J L, Li Y K, Zhao J Y, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (王金玲, 李义坤, 赵京杨, 等. 分析实验室), 2010, 29(1): 107
- [10] Posyniak A, Śniegocki T, Zmudzki J. Bull Vet Inst Pulawy, 2002, 46: 111
- [11] Maudens K E, Zhang G F, Lambert W E. J Chromatogr A, 2004, 1047: 85
- [12] Zotou A, Vasiliadou C. Chromatographia, 2006, 64: 307
- [13] Zhou J H, Shen J Z, Xue X F, et al. J AOAC Int, 2007, 90 (3): 872
- [14] Zhao M, Zeng M H, Yu L S, et al. Journal of Bee (赵明, 曾明华, 余林生, 等. 蜂蜜杂志), 2008(5): 5
- [15] Bernal J, Nozal M J, Jiménez J J, et al. J Chromatogr A, 2009, 1216: 7275
- [16] Thompson T S, Noot D K, Calvert J, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(3): 309
- [17] Thompson T S, Noot D K. Anal Chim Acta, 2005, 551: 168
- [18] GB/T 20757-2006
- [19] Wang J. J Agric Food Chem, 2004, 52(2): 171
- [20] Benetti C, Piro R, Binato G, et al. Food Addit Contam, 2006, 23(11): 1099
- [21] Lin F, Lin H D, Wu Y X, et al. Journal of Instrumental Analysis (林峰, 林海丹, 吴映璇, 等. 分析测试学报), 2007, 26(5): 621
- [22] Xu J Z, Wu Z X, Yang W Q, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (徐锦忠, 吴宗贤, 杨雯莹, 等. 分析化学), 2007, 35(2): 166
- [23] Mottier P, Hammel Y A, Gremaud E, et al. J Agric Food Chem, 2008, 56(1): 35
- [24] Liu Y M, Cao Y Z, Li J, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘永明, 曹彦忠, 李金, 等. 色谱), 2010, 28 (6): 596
- [25] Xu J Z, Ding T, Wu B, et al. China Patent (徐锦忠, 丁涛, 吴斌, 等. 中国专利), CN 101358953A. 2009-02-04
- [26] Vidal J L M, Aguilera-Luiz M M, Romero-González R, et al. J Agric Food Chem, 2009, 57: 1760
- [27] Zuo Z H, Gao L Q, Tang S F. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (左志辉, 高立勤, 唐素芳. 药物分析杂志), 2009, 29(7): 1196
- [28] Lopez M I, Pettis J S, Smith I B, et al. J Agric Food Chem, 2008, 56(5): 1553
- [29] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. J Chromatogr A, 2008, 1194: 66
- [30] Ortelli D, Cognard E, Jan P, et al. J Chromatogr B, 2009, 877: 2363
- [31] Li J S, Qiu Y M, Wang C. The Analysis of Veterinary Drugs Residues. Shanghai: Shanghai Scientific Press (李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析. 上海: 上海科学出版社), 2002
- [32] SN/T 1777. 2-2007
- [33] Pang G F. The Modern Analytical Technology of Veterinary Drugs and Pesticides Residues. Beijing: Science Press (庞国芳. 农药兽药残留现代分析技术. 北京: 科学出版社), 2007
- [34] GB/T 18932. 17-2003
- [35] SN/T 1928-2007
- [36] SN/T 1979-2007