

研究报告

超高效液相色谱串联质谱法测定鳗鱼中大环内酯类和林可酰胺类抗生素残留量的研究

刘正才 杨 方 林永辉 张 琼 刘素珍, 苏芝娇, 潘迎芬

(福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350001)

摘要: 本文建立了鳗鱼中9种大环内酯类和林可酰胺类药物残留量的超高效液相色谱-串联质谱同时测定的方法。采用中性磷酸盐缓冲液水解, 乙腈萃取, 正己烷脱脂, 固相萃取小柱净化, 电喷雾串联质谱进行检测, 多离子反应监测(MRM)模式, 外标法定量。在0~100 μ g/L内, 峰面积与质量浓度有良好的线性关系, 相关系数大于0.9900, 在1.0、2.0、4.0 μ g/kg 3个浓度水平进行验证试验, 总体平均回收率为70.26%~124.22%, 相对标准偏差为1.31%~16.00%, 各项技术指标均满足国内外法规要求。结果表明, 该法快速、高效、特异性强, 可用于鳗鱼样品中大环内酯类及林可酰胺类抗生素残留量的确证检测。

关键词: 超高效液相色谱串联质谱; 大环内酯类; 林可酰胺类; 残留; 鳗鱼

中图分类号: O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1009-8143(2010)03-0001-05

Study on Determination of Residues of Macrolides and Lincosamides Antibiotics in Eel by Ultra-performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry

Liu Zheng-cai, Yang Fang, Lin Yong-hui, Zhang Qiong, Liu Su-zhen, Su Zhi-jiao, Pan Ying-fen

(Fujian Entry- Exit Inspection & Quarantine Bureau, Fuzhou, Fujian350001, China)

Abstract: An ultra- performance liquid chromatographic method with tandem mass- spectrometric detection was developed for the simultaneous analysis of 9 macrolide and lincosamides antibiotics in eel. The samples were firstly dispersion with phosphate buffer buffer solutions; The target compounds were extracted with acetonitrile, and then cleaned up with solid phase extraction cartridges, followed by liquid chromatography- tandem mass spectrometry analysis. The range linearity was from 0 to 100 μ g/L and the linear correlation coefficient was more than 0.9900. The method was validated at 1.0, 2.0 and 4.0 μ g/kg. The validation results were as follows: the average recovery for all the compounds was 70.26%~124.22%, variation coefficients was 1.31%~16.00%. The results showed that the established method was fast, effective, specific and quite suitable for identification and quantity of macrolide and lincosamides antibiotics in eel.

Keywords: ultra- performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry; macrolide antibiotics; lincosamides antibiotics; residues; eel

大环内酯类抗生素(macrolide antibiotics, MAs)是由链霉菌产生的一类弱碱性化合物, 主要有红霉素、泰乐霉素、竹桃霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星等。林可酰胺类抗生素(Lincosamides, LINs)化

学结构中含有氨基酸和糖苷部分, 也是一类弱碱性化合物, 主要有林可霉素。这两类抗生素药物具有广谱抗菌作用, 广泛应用于畜牧和水产养殖中, 由于此类药物高残留会对人类造成致敏性、毒性反

收稿日期 2010-2-1

基金项目 国家质检总局科技计划项目(2007IK147)

作者简介 刘正才(1977-), 男, 工程师, 从事农兽药残留分析。E-mail: zhengcailiu@yahoo.com.cn

应,同时易产生细菌抗药性^[1],因此很多国家对食品中大环内酯类和林可酰胺类抗生素设定了相应限量要求,其中日本肯定列表中对鳗鱼提出的限量要求为:红霉素、螺旋霉素 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$;泰乐霉素、林可霉素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$;替米考星 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前这两类抗生素的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[2-3]、气相色谱质联用法(GC-MS)^[4]和液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[5-7]。HPLC-MS/MS 可以克服背景干扰,多反应检测模式(MRM)可以提高信噪比,因此对复杂样品仍可达到很高的灵敏度,是目前药物残留分析中理想方法。本文以复杂基体鳗鱼和烤鳗为研究对象,先用磷酸盐缓冲液分散基体,以乙腈提取待测组分、正己烷脱脂,固相萃取柱除去杂质,建立了 9 种大环内酯类和林可酰胺类抗生素同时检测的 HPLC-MS/MS 方法,重点研究了该方法的提取和净化,该方法简单、快速、实用,易于在分析实验室推广应用。

1 实验部分

1.1 实验仪器

超高效液相色谱-质谱联用仪(Quattro Premier, Waters 公司);离心机(5000 r/min, ANKE TDL-5, 上海安亭科学仪器厂);涡旋混合器(XW-80, 上海医科大学仪器厂);固相萃取装置(Waters 公司);MilliQ 纯水系统(Millipore 公司);OASIS HLB 固相萃取小柱(3cc, 60 mg, Waters 公司), 0.22 μm 微孔滤膜。

1.2 试剂与材料

乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯(福建同春药业股份有限公司),其余试剂均为分析纯;水为 Milli-Q 超纯水。

标准品(纯度均 $\geq 90\%$)购自于 Sigma-Aldrich 公司,用甲醇分别配制成 1.0 mg/mL 贮备液,置于棕色容量瓶避光 4°C 保存,临用时根据需要稀释成适当浓度的混合标准溶液。

5 mmol/L 乙酸铵溶液:称取 0.35 g 乙酸铵,溶于约 700 mL 水中,以加入 2.0 mL 甲酸,以水定容 1 L。磷酸盐缓冲液(0.2 M, PH=7.0):取磷酸二氢钾 6.8 g, 加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 291 mL, 用水稀释至 1 L。

1.3 样品前处理

鳗鱼取连皮的鱼肉,将皮、肉分离后置于微波

炉中加热,烤鳗先去皮后用水洗去外面的酱油等添加剂,取可食部分放入高速组织捣碎机均质,充分混匀,装入清洁容器内,并标明标记。

称取约 5 g(精确至 0.01 g)匀样,加入 5.0 mL 磷酸盐缓冲液(PH=7.0),涡旋振荡器振荡 2 min 分散样品,加入 25 mL 乙腈,于涡旋振荡器振荡提取 1 min 后常温超声提取 10 min,再置震荡器上震荡 5 min, 4500 r/min 离心 2 min, 准确移 10 mL 上清液, 40°C 下氮吹至近干,加入 5 mL 0.1% 甲酸水溶液和 3 mL 正己烷,涡旋振荡 30 s, 2500 r/min 离心 2 min, 将下层水相液以约 1 mL/min 的流速全部过已经用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化的 Oasis HLB 固相萃取小柱,再以 3 mL 的 5% 甲醇水洗涤离心管,待淋洗液流干后继续抽干约 10 min,以 3 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液置于 40°C 下氮吹至近干,以 1 mL 10% 乙腈/水溶液溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱上机测定分析。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈ 柱(55 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm waters 公司),流动相 A: 5 mmol/L 醋酸铵-0.2% 甲酸(体积比),流动相 B: 乙腈;梯度洗脱,洗脱程序:起始比例 B 为 20%, 1.5 min 升至 50%, 3.0 min 升至 80%, 至 4.0 min 后回复至起始比例平衡系统,总分析时间为 5.0 min。流速为 0.35 mL/min, 进样量 5 μL 。

1.4.2 质谱条件

电离方式:ESI+, 电离电压:3.0 KV, 锥孔电压:25 V, 离子源温度:115°C, 锥孔反吹气流速:50 L/hr, 脱溶剂气温度:320°C, 脱溶剂气流速:750 L/hr, 碰撞室压力:3.6 \times 10⁻⁵ Pa; MRM 分析。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

大环内酯类、林可酰胺化合物都具有含氮的氨基基团,在流动相中加入少量甲酸,可以有效地改善离子化效率,提高灵敏度,另外,加入少量的乙酸铵,可以增加一些药物的电离效果,经实验证明,流动相中加入 5 mmol/L 乙酸铵和 0.2% 甲酸可以同时有效地分离两类药物,离子化效果比较好。

2.2 质谱条件的优化

大环内酯类、林可酰胺类化合物在 ESI 源中, 容易得到其带一个(MH^+)正电荷的母离子。选取丰度较强、干扰较小的两对子离子为定性离子, 最后

以多反应监测(MRM)正离子模式优化各种质谱参数。林可酰胺类和大环内酯类抗生素的优化质谱条件见表 1。

表1 大环内酯类、林可酰胺类药物的质谱条件参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for the macrolide and lincosamides antibiotics analysis

序号	被测物	简写	保留时间 (min)	定量离子对(m/z) 定性离子对(m/z)	Cone (V)	C E
1	竹桃霉素	OLM	1.93	688.39/157.83 688.39/544.41	24	26 16
2	红霉素	ERM	2.06	734.63/157.97 734.63/576.50	30	28 20
3	替米考星	TIL	1.85	869.75/173.97 869.75/696.58	45	46 40
4	交沙霉素	JOS	2.64	828.42/173.85 828.42/600.43	28	34 28
5	罗红霉素	ROM	2.57	837.49/157.91 837.49/679.50	25	25 22
6	螺旋霉素	SPM	1.55	843.75/174.04 843.75/540.42	38	35 30
7	泰乐菌素	TYL	2.12	916.50/173.85 916.50/772.49	35	40 30
8	林可霉素	LIN	0.92	407.10/125.91 407.10/359.25	30	30 18
9	北里霉素	KIT	2.31	772.34/108.83 772.34/173.94	40	40 32

2.3 提取条件的选择

鳗鱼中含有大量的油脂, 而烤鳗基体更为复杂, 如果样品净化的不干净, 会发生严重的基体抑制作用影响回收率。本实验采用乙腈提取样品, 油脂含量少, 蛋白易沉淀, 杂质较少, 如果单纯以乙腈提取, 鳗鱼很容易结团, 造成提取不充分, 因此本实验采用以磷酸盐缓冲液(PH 7.0)使基体分散开; 大环内酯类和林可酰胺类一般均为弱碱性化合物, 易溶于有机溶剂, 可与酸形成盐, 化学性质不稳定, 易

发生苷键的水解, 遇碱内酯环则易破裂的化学特点。因此本文采用中性的提取条件, 采用乙腈提取效果对全部药物都较为理想。

2.4 净化条件的选择

采用单一的液液萃取方法处理样品, 色谱图显示背景干扰大 SPE 柱可以有效净化样品, 根据文献报道, 重点比较了 Oasis(HLB) C_{18} 柱对样品提取溶液进行净化效果。结果表明 Oasis(HLB) 对各个化合物净化效果比较理想, 其洗脱曲线如图 1。

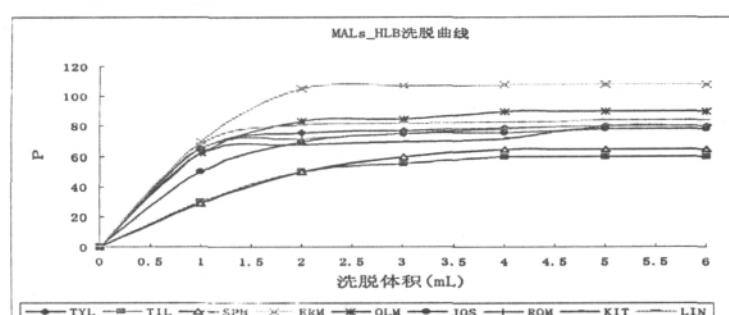


图1 9种化合物在SPE(Oasis HLB, 60mg/3mL)上的洗脱曲线

Fig.1 Elution curves of 9 analytes on Oasis(HLB)SPE cartridges(60mg/3mL)

2.5 定溶液的选择

标准稀释溶液的选择对待测物质的峰形,分离度和灵敏度有很大的影响。本文分别选用乙腈:水:甲酸溶液(10:90:0.2),乙腈:水溶液(10:90),乙腈:水:氨水溶液(10:90:0.2)3种作为样品稀释溶液进行实验,结果表明,酸性溶液对红霉素有明显的抑制作用,而对其他化合物有增强作用。样品基体提取液对替米考星、螺旋霉素有明显的基体增强作用。因此,本文选择乙腈:水溶液(10:90)作为定溶液。

2.6 方法学验证

2.6.1 标准曲线和定量限

以空白样品提取液作为标准溶液的稀释溶液,将大环内酯类和林可酰胺类药物混合标准溶液逐级稀释成标准混合工作液。以各组分的峰面积Y对添加质量浓度X(ng/mL)绘制标准曲线,线性关系和相关系数见表2。以样品空白的3倍信噪比为检测限(LOD),10倍信噪比为定量限(LOQ),各化合物的定量限均为1.0μg/kg,完全能满足日本等国对进出口鳗鱼中大环内酯类和林可酰胺类药物残留的检测要求。

表2 大环内酯类、林可酰胺类药物的线性方程和相关系数、定量限

Table 2 LOQ and regression equations for every compound

化合物	线性范围 ng/mL	线性方程	相关系数(γ)	LOD(μg/kg)	LOQ(μg/kg)
泰乐菌素	0~100	Y=1617.92X+14.9554	0.9994	0.2	1.0
替米考星	0~100	Y=435.17X-1.69193	0.9976	0.3	1.0
螺旋霉素	0~100	Y=106.114X+4.93933	0.9963	0.3	1.0
红霉素	0~100	Y=73.5162X-0.02222	0.9933	0.3	1.0
竹桃霉素	0~100	Y=2583.43X-23.7854	0.9994	0.2	1.0
交沙霉素	0~100	Y=367.231X+23.8322	0.9992	0.3	1.0
罗红霉素	0~100	Y=1731.74X-8.9559	0.9989	0.2	1.0
北里霉素	0~100	Y=1454.27X+13.2928	0.9957	0.2	1.0
林可霉素	0~100	Y=1311.62X+25.5205	0.9993	0.2	1.0

2.6.2 回收率和精密度

选用不含9种待测组分的鳗鱼样品,进行1.0、2.0、4.0μg/kg3种浓度水平添加回收试验,每个浓度水平重复6次,其结果见表3,添加回收色谱图见图

2. 方法的总体回收率为70.26%~124.22%,方法的总体相对标准偏差为1.31%~16.00%,可以满足残留分析的要求。

表3 鳗鱼中9种化合物的添加回收率和精密度数据(n=6)

Table 3 Results of recovery and repeatability for 9 compounds in eel(n=6)

化合物	鳗鱼						烤鳗					
	添加浓度水平(μg/kg)				添加浓度水平(μg/kg)				添加浓度水平(μg/kg)			
	1.0		2.0		4.0		1.0		2.0		4.0	
	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD	平均	RSD
TYL	78.05	1.31	72.01	2.32	71.52	7.15	78.70	9.35	82.82	3.57	95.80	2.22
TIL	96.82	2.48	88.72	3.10	83.96	7.74	76.83	10.07	93.07	7.88	103.93	5.94
SPM	99.99	11.65	86.82	5.88	75.92	5.84	87.90	12.86	95.93	10.68	97.89	10.8
ERM	73.34	4.65	79.02	3.65	76.79	11.28	82.20	13.69	88.45	16.00	104.85	11.41
OLM	81.44	3.10	77.13	1.78	78.09	7.24	78.23	8.88	88.12	4.96	103.98	2.60
JOS	77.42	3.32	74.08	2.89	73.27	6.35	87.10	11.50	95.30	11.24	106.41	7.63
ROM	73.03	3.72	70.26	2.64	70.38	6.89	97.37	5.02	110.10	6.47	124.22	3.80
KIT	78.13	2.63	74.78	2.38	74.87	7.92	75.80	13.67	79.52	12.07	93.23	7.10
LIN	83.93	2.37	83.03	1.38	84.57	7.98	71.67	9.84	75.98	11.45	82.31	9.28

2.6.3 方法应用

运用此方法对福建地区进出口鳗鱼中以上药

物进行多批次的检测和监测，均未检出。

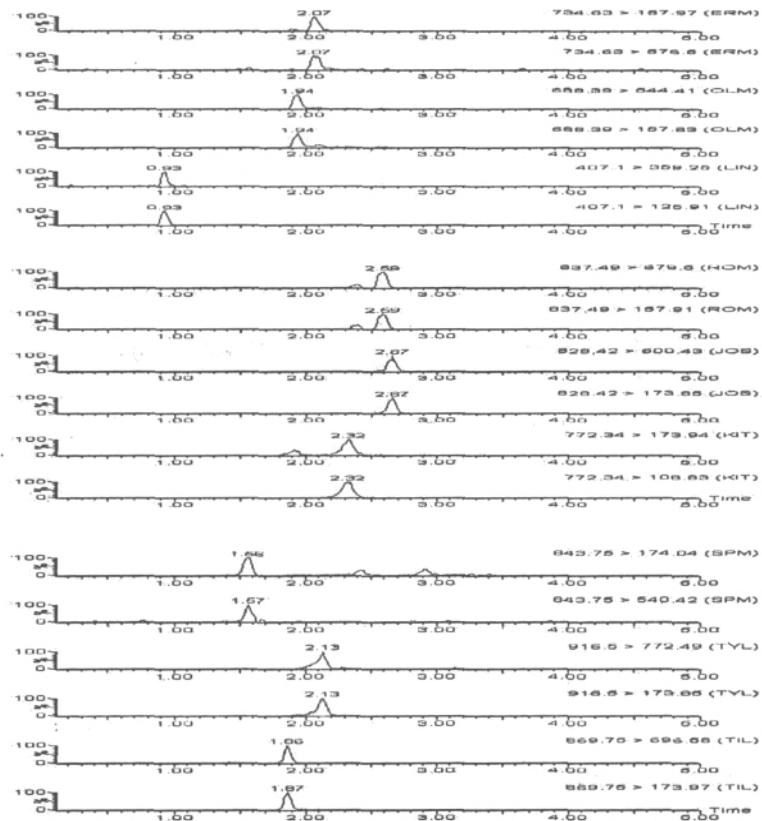


图2 空白鳗鱼标准添加大环内酯类、林可酰胺类药物的样品提取离子色谱图(2.0 μg/kg)

Fig.2 Extracted ion chromatograms of spiked macrolide and lincosamides antibiotics in blank eel(2.0 μg/kg)

sheep's milk[J].J Chromatogr A,2006,1122(1-2):76-83.

- [3] Horie M, Saito K, Ishii R, et al. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A.,1998,812(1-2): 295-302.
- [4] Takatsuki K, Ushizawa I, Shoji T. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring[J]. J Chromatogr.,1987, 391(1): 207-217.
- [5] Benetti C, Piro R, Binato G, et al. Simultaneous determination of lincomycin and five macrolide antibiotic residues in honey by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry(LC-MS/MS)[J].Food Addit Contam,2006,23 (11):1099-1108.
- [6] 谢丽琪,岳振峰,唐少冰,等. 高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中林可酰胺类和大环内酯类抗生素残留量的研究[J]. 分析试验室,2008,27(3):5-8.
- [7] 徐锦忠,吴忠贤,杨雯筌,等. 液相色谱-电喷雾串联质谱测定蜂蜜中8种大环内酯类药物残留 [J]. 分析化学,2007,35 (2):166-170.

参考文献

- [1] 李岩,邵兵,徐锁洪. 动物性食品中大环内酯类抗生素残留分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 10:1275-1277.
- [2] Garcia-Mayora M A, Garcinuno R M, Fernandez-Heurando P, et al. Liquid chromatography-UV diodearray detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in