

# 奶粉中链霉素与双氢链霉素残留量的 超高效液相色谱 – 串联质谱法测定

何 强<sup>1</sup>, 孔祥虹<sup>1</sup>, 赵 洁<sup>2</sup>, 李建华<sup>1</sup>, 乐爱山<sup>1</sup>, 吴双民<sup>1</sup>

(1 陕西出入境检验检疫局, 陕西 西安 710068 2 西安理工大学 理学院, 陕西 西安 710054)

**摘要:** 建立了奶粉样品中链霉素与双氢链霉素残留量的超高效液相色谱 – 串联质谱测定方法。样品用 EDTA – Na<sub>2</sub> 缓冲溶液提取, 弱阳离子交换树脂固相萃取柱 (WCX) 净化后, 采用 HILIC 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 以乙腈和含 0.3% 甲酸的 100 mmol/L 甲酸铵溶液梯度洗脱, 多反应监测模式测定, 外标法定量。在优化实验条件下, 链霉素和双氢链霉素在 2.0~ 50.0 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 检出限均为 0.01 mg/kg 方法的回收率为 74%~ 110%, 相对标准偏差均不大于 9.4%。该方法简便、快速、实用、准确, 能够满足奶粉中链霉素和双氢链霉素残留量的检测要求。

**关键词:** 奶粉; 链霉素; 双氢链霉素; 残留; 超高效液相色谱 – 串联质谱

中图分类号: O657.63 S482.28 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2010)07- 0691- 04

doi: 10.3969/j.issn.1004- 4957.2010.07.009

## Determination of Streptomycin and Dihydrostreptomycin Residues in Milk Powder by UPLC – MS/MS

HE Qiang<sup>1</sup>, KONG Xiang-hong<sup>1</sup>, ZHAO Jie<sup>2</sup>, LI Jian-hua<sup>1</sup>, YUE Aishan<sup>1</sup>, WU Shuangmin<sup>1</sup>

(1. Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China

2. College of Science, Xi'an University of Technology, Xi'an 710054, China)

**Abstract** An ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was developed for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk powder. Samples were extracted with EDTA – Na<sub>2</sub> buffer and cleaned up on a weak cation exchange SPE column (WCX). The extract was separated on a HILIC column (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) using acetonitrile – 100 mmol/L ammonium formate solution containing 0.3% formic acid as mobile phase with gradient elution. The detection of streptomycin and dihydrostreptomycin was carried out by MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode. An external standard method was used for quantitative analysis. Results indicated that the calibration curves for streptomycin and dihydrostreptomycin were linear in the range of 2.0– 50.0 μg/L, and the detection limits were both 0.01 mg/kg. The recoveries of streptomycin and dihydrostreptomycin ranged from 74% to 110% with relative standard deviations no more than 9.4%. The method was simple, rapid and practical and could meet the requirements for determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk powder.

**Key words** milk powder; streptomycin; dihydrostreptomycin; residues; ultrahigh performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS)

链霉素 (Streptomycin)、双氢链霉素 (Dihydrostreptomycin) 是氨基糖苷类抗生素<sup>[1]</sup>, 在奶牛及奶羊养殖中应用普遍, 但由于使用管理不规范, 常造成鲜奶及奶粉中链霉素、双氢链霉素残留。由于链霉素、双氢链霉素对人体具有较大的毒副作用, 严重时可能造成过敏性休克和耳聋, 特别是对小孩的危害较大, 可透过胎盘进入羊水和胎儿循环, 危害胎儿健康。各国对乳制品中的链霉素、双氢链霉素均制定了严格的残留限量, 如日本规定奶中链霉素与双氢链霉素的总限量为 0.2 mg/kg 美国规定乳及牛奶中双氢

收稿日期: 2010- 04- 22 修回日期: 2010- 06- 06

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科研资助项目 (2009K285)

第一作者: 何 强 (1980- ), 男, 湖北丹江口人, 工程师, 硕士, Tel: 029- 85407235, E-mail: heq@snciq.gov.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

链霉素的限量为 0. 125 mg/kg 中国规定奶中链霉素与双氢链霉素的限量均为 0. 2 mg/kg 所以对奶粉中的链霉素、双氢链霉素残留量进行检测对于控制奶粉质量, 维护人类的饮食健康有重要意义。

目前, 链霉素和双氢链霉素残留的检测方法主要有酶联免疫法<sup>[2]</sup>、微生物法<sup>[3]</sup>、液相色谱法<sup>[4-7]</sup>、液相色谱-串联质谱法<sup>[8-12]</sup>, 但酶联免疫法和微生物法易产生假阳性或假阴性, 一般仅用于普通筛查; 而液相色谱法不能有效分离链霉素和双氢链霉素, 且灵敏度较低, 已不能适应目前的残留检测要求; 液相色谱-串联质谱法是目前的主流检测方法, 但文献报道的相关方法前处理复杂, 且检测时均采用反相色谱柱, 链霉素、双氢链霉素的色谱保留行为不够理想, 流动相中需要采用离子对试剂, 容易污染质谱检测器。本实验采用新的样品前处理方法和新型 HILIC 色谱柱, 建立了一种奶粉中链霉素、双氢链霉素残留量的超高效液相色谱-串联质谱快速检测方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Aquity<sup>TM</sup> 超高效液相色谱仪, 配 Quattro Premier XE 串联质谱仪、电喷雾电离 (ESI) 接口 (美国 Waters 公司); Rapidtrace SPE 自动固相萃取仪 (美国 Caliper 公司); HS 501 型振荡器 (德国 IKA 公司); 乙腈、甲酸 (均为 HPLC 级, 美国 TEDIA 公司); 乙酸、甲酸铵、乙二胺四乙酸二钠 (含 2 个结晶水)、磷酸、氢氧化钠均为国产分析纯; WCX 固相萃取柱 (60 mg/3 mL, Waters 公司); 链霉素标准品 (纯度为 98. 0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH); 双氢链霉素标准品 (纯度为 99. 0%, 美国 Supelco 公司); 超纯水 (由美国 Millipore 公司 MilliQ 超纯水净化系统制备)。将链霉素和双氢链霉素标准品分别用乙腈-水 (体积比为 1: 1) 溶解配成 1. 0 g/L 的标准储备液, 置于 4℃ 冰箱保存, 标准使用溶液用空白样品基质溶液配制。

EDTA 缓冲溶液: 称取 3. 72 g 乙二胺四乙酸二钠, 用 500 mL 超纯水溶解, 加入 0. 5 mL 磷酸, 用氢氧化钠溶液 (2 mol/L) 调节 pH 至 7. 0~ 7. 2。

### 1.2 样品的提取与净化

称取 1 g 奶粉试样 (精确到 0. 01 g), 置于 50 mL 具塞刻度离心管中, 加入 18 mL EDTA 缓冲液, 涡旋混匀, 振摇提取 20 min, 用 EDTA 缓冲液定容至 20 mL, 4 500 r/min 离心 10 min, 滤纸过滤, 滤液待净化。

将 WCX 固相萃取柱依次用 5 mL 2% 的乙酸溶液、5 mL 水活化, 准确移取 10 mL 滤液上样, 依次用 5 mL 水、5 mL 乙腈淋洗固相萃取小柱, 弃去所有流出液, 用 5. 0 mL 乙腈-2% 乙酸溶液 (体积比为 20: 80) 洗脱, 收集洗脱液, 用乙腈定容至 5. 0 mL, 过 0. 2 μm 微孔滤膜, 进样检测。

### 1.3 测定条件

ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱 (50 mm × 2. 1 mm, 1. 7 μm, Waters 公司); 柱温 40℃; 流动相采用乙腈 (A) - 100 mmol/L 甲酸铵 (含 0. 3% 甲酸) 溶液 (B) 体系梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~ 1 min, 80%~ 20% A; 1~ 2 min, 20% A; 2~ 2. 1 min, 20%~ 80% A; 2. 1~ 3. 5 min, 80% A; 流速 0. 3 mL/min, 进样量 5 μL。

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测模式 (MRM), 监测条件见表 1。毛细管电压: 3 kV; 萃取电压: 5 V; 离子源温度: 120℃; 脱溶剂温度: 500℃; 脱溶剂气流速: 1 000 L/h; 锥孔气流速: 50 L/h; 碰撞室氮气流速: 0. 2 mL/min。

表 1 链霉素和双氢链霉素的多重反应监测条件  
Table 1 Multiple reaction monitoring (MRM) parameters of streptomycin and dihydrostreptomycin

| Compound            | MRM transitions<br><i>m/z</i> | Dwell time<br><i>t/s</i> | Cone voltage<br><i>U/V</i> | Collision energy<br><i>E/eV</i> |
|---------------------|-------------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Streptomycin        | 582. 23/263. 42*              | 0. 10 0. 10              | 50                         | 30 35                           |
|                     | 582. 23/176. 29               |                          |                            |                                 |
| Dihydrostreptomycin | 584. 58/263. 12*              | 0. 10 0. 10              | 60                         | 30 35                           |
|                     | 584. 58/246. 11               |                          |                            |                                 |

\* quantitative ion pair

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取与净化条件的选择

考察了提取溶剂的影响, 由于链霉素和双氢链霉素均为水溶性物质, 所以用水提取的效果较好, 而奶粉样品富含蛋白质, 一般需沉淀蛋白, 文献[9]采用磷酸溶液提取, 三氯乙酸沉淀蛋白, 苯磺酸

型固相萃取柱和羧酸型固相萃取柱双柱净化, 但存在操作复杂、成本较高的问题。本文考察了用水提取, 乙腈或乙醇等有机溶剂沉淀蛋白的方法, 蛋白沉淀效果较好, 但仍有较多脂溶性的杂质被提取, 且回收率及重复性不好。进一步考察发现, 在提取溶液中添加 EDTA 可提高回收率并改善其稳定性, 可能是由于 EDTA 使络合态的链霉素和双氢链霉素游离, 从而提高回收率和稳定性, 经考察加入 0.02 mol/L 的 EDTA 溶液可满足要求。但由于 EDTA 水溶液偏酸性 ( $\text{pH}$  约 4.0), 过弱阳离子交换固相萃取柱(WCX)净化时会降低回收率, 所以应将提取液的  $\text{pH}$  调节至中性。考察了先提取后调  $\text{pH}$  和先调  $\text{pH}$  后提取两种方式, 发现提取效率及回收率无显著差异, 鉴于先调  $\text{pH}$  后提取的方法操作相对简便, 所以选择该方式, 提取液中加入磷酸可在调节  $\text{pH}$  时形成缓冲体系, 便于  $\text{pH}$  的准确调节。虽然采用该提取方法, 提取液蛋白质并未沉淀完全, 提取液呈浑浊的乳状, 但容易被滤纸过滤, 过固相萃取柱时不会造成柱堵塞, 且不影响待测物的加标回收率。

文献报道升高提取液温度可以提高回收率<sup>[10]</sup>, 本文考察了常温、60℃及 80℃时振荡提取的情况, 发现 3 种温度下链霉素和双氢链霉素的回收率无明显差异。

分别考察了强阳离子固相萃取柱(MCX)和弱阳离子固相萃取柱(WCX)的净化效果, 发现弱阳离子固相萃取柱的选择性更强, 净化效果更好, 且链霉素和双氢链霉素容易被酸洗脱, 洗脱液可直接进样测定, 简化了实验操作。WCX 固相萃取柱淋洗时, 先用水洗下柱上未吸附的水溶性物质, 再用乙腈淋洗脂溶性杂质, 可以有效消除质谱测定时的基质效应。

## 2.2 测定条件的优化

**2.2.1 色谱柱的选择** 由于链霉素、双氢链霉素的极性较大, 在  $\text{C}_{18}$ 、 $\text{C}_8$  等反相色谱柱上必须采用离子对试剂才能获得较好的保留效果, 而 HILIC 色谱柱是一种新型的亲水色谱柱, 对高极性化合物有良好的保留效果, 链霉素、双氢链霉素在 HILIC 色谱柱上的色谱保留行为良好。在“1.3”测定条件下, 标准溶液(链霉素和双氢链霉素均为 5  $\mu\text{g/L}$ )的选择离子对离子流图如图 1 所示, 链霉素和双氢链霉素定性离子对与定量离子对的丰度比分别为 18.4%、55.9%。

**2.2.2 色谱条件的优化** 对色谱条件进行了考察, 发现流动相中甲酸铵的浓度对链霉素、双氢链霉素的峰形有显著影响, 当流动相中甲酸铵浓度降至 50 mmol/L 时, 链霉素、双氢链霉素的峰形变宽, 拖尾加重, 甲酸铵浓度降至 10 mmol/L 时, 链霉素、双氢链霉素基本不出峰, 而甲酸铵浓度为 100 mmol/L 时峰形较好。另外, 流动相中加入 0.3% 的甲酸可改善峰形。

**2.2.3 质谱条件的优化** 考察了质谱条件的影响, 发现脱溶剂气温度及流速均对链霉素、双氢链霉素的响应值有影响。脱溶剂气温度由 350℃升至 500℃, 响应值升高近 2 倍; 考察了脱溶剂气流速为 650、900、1 000、1 200 L/h 时的情况, 发现当流速为 1 000 L/h 时链霉素、双氢链霉素的响应值最高。

## 2.3 方法的线性关系与检出限

采用阴性样品提取液配制质量浓度分别为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0  $\mu\text{g/L}$  的链霉素和双氢链霉素系列混合基质标准溶液, 按“1.3”条件进样检测, 并以质量浓度( $X$ ,  $\mu\text{g/L}$ )为横坐标, 峰面积( $Y$ )为纵坐标作图, 同时用最小二乘法进行线性回归。链霉素的线性方程为  $Y = 61.64X - 12.01$  ( $r = 0.9987$ ), 双氢链霉素的线性方程为  $Y = 46.63X - 2.660$  ( $r = 0.9991$ ), 方法在 2.0~50.0  $\mu\text{g/L}$  范围内

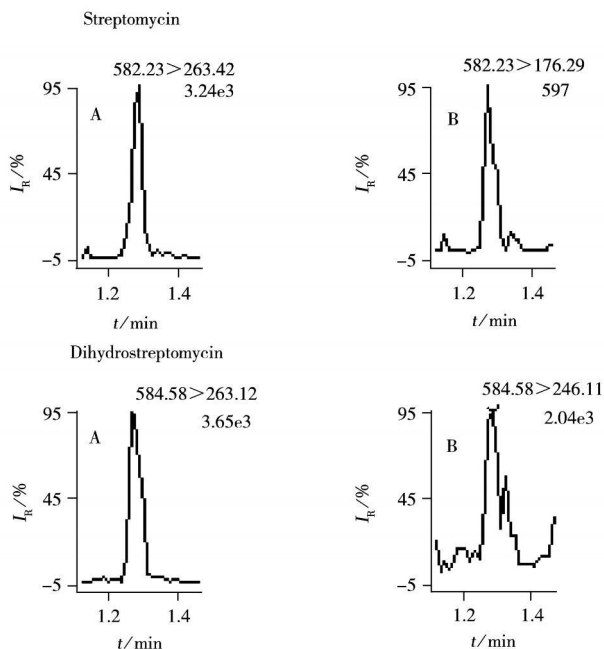


图 1 链霉素与双氢链霉素标准溶液的离子流图

Fig. 1 MRM chromatograms of streptomycin and dihydrostreptomycin  
A. quantitative ion pair B. qualitative ion pair

线性关系良好。

将标准溶液添加至阴性样品提取液中，以信噪比  $SN > 3$  确定链霉素和双氢链霉素的检出限均为  $1.0 \mu\text{g/L}$ ，以信噪比  $SN > 10$  确定链霉素和双氢链霉素的定量下限均为  $2.0 \mu\text{g/L}$ 。按照本文建立的样品处理方法，奶粉样品中链霉素和双氢链霉素的检出限和定量下限分别为  $0.01$ 、 $0.02 \text{ mg/kg}$  满足国内外奶粉中相关残留限量的检测要求。

2.4 加标回收率实验

每个样品分别添加  $0.02$ 、 $0.05$ 、 $0.10 \text{ mg/kg}$  3 个水平的链霉素和双氢链霉素，每个添加水平重复 6 次，考察样品的加标回收率。回收率及相对标准偏差如表 2 所示，回收率为  $74\% \sim 110\%$ ，相对标准偏差为  $6.8\% \sim 9.4\%$ ，方法的精密度能满足农兽药残留检测要求。

2.5 实际样品的测定

利用本文建立的方法，共检测奶粉样品 14 批，其中有 2 批检出链霉素残留，分别为  $0.053$ 、 $0.027 \text{ mg/kg}$  双氢链霉素均未检出。

3 结 论

本方法采用 EDTA 缓冲液提取、弱阳离子交换固相萃取柱(WCX)净化、HILIC 色谱柱分离、超高效液相色谱 – 串联质谱法检测奶粉样品中的链霉素和双氢链霉素残留量。与已有的液相色谱 – 串联质谱检测方法相比<sup>[7-9]</sup>，该方法在不完全沉淀奶粉蛋白的情况下进行样品的提取和净化，样品前处理简便，净化效果良好，适合于大批量样品的快速检测，提高了工作效率，且方法采用新型的 HILIC 色谱柱对样品进行分离，避免了离子对试剂的使用，减少了质谱检测器的污染。

参考文献:

[1] 安东, 王国民, 李贤良, 张进忠, 李应国, 张雷, 周启明. 动物源性食品中氨基糖苷类药物残留检测方法研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(10): 45–49

[2] 黄耀凌, 刘智宏, 叶妮, 郭筱华. ELISA 法检测牛奶中链霉素残留量 [J]. 中国乳品工业, 2007, 35(2): 54–56

[3] 蔡金华, 刘雅妮, 顾欣. 链霉素在牛奶中残留的微生物学检测方法 [J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(11): 7–9

[4] SUHREN G, KNAPPSTEIN K. Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods [J]. Analyst, 1998, 123(12): 2797–2801

[5] 周萍, 胡福良, 章征天, 余秀珍. 高效液相色谱法测定蜂王浆中链霉素残留 [J]. 中国蜂业, 2006, 57(7): 5–6

[6] 姜莉, 赵守成. 柱后衍生 – 荧光检测高效液相色谱法快速测定鲜牛奶中链霉素残留量 [J]. 分子科学学报, 2005, 21(1): 20–24

[7] 陈晓红, 刘小莉, 董明盛, 陈慧兰. 高效液相色谱法测定蜂产品中链霉素残留量 [J]. 分析试验室, 2004, 23(10): 30–32

[8] 刘晓茂, 赵淑军, 张进杰, 曹亚平, 张守军, 孙海侠. 蜂蜜中链霉素与双氢链霉素残留量的液相色谱串联质谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(12): 1351–1354

[9] 刘晓茂, 张守军, 张进杰, 曹彦忠, 曹亚平, 孙海侠, 庞国芳. GB/T 22969–2008 奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱 – 串联质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社.

[10] BOGALLIS CURNIR, DICORCIA A, IAGANÀ A, MELEM, NAZZARIM. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1/2): 93–100

[11] VAN BRUIJNSVOORT M, OTTINKS J, JONKER KM, DE BOER E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1058(1/2): 137–142

[12] BABIN Y, FORTIER S. A high-throughput analytical method for determination of aminoglycosides in veal tissues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with automated cleanup [J]. JAOAC Int, 2007, 90(5): 1418–1426