

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中 7 种四环素和
14 种喹诺酮类药物残留

孟娟, 杨永红

(北京市疾病预防控制中心营养与食品所, 北京 100013)

摘要:目的 采用超高效液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱, 正离子多反应监测 (MRM) 模式同时测定牛奶中 7 种四环素和 14 种喹诺酮残留。方法 试样经 EDTA-McIlvaine (pH = 4.0) 缓冲溶液提取, 用 HLB 固相萃取柱浓缩和净化, Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-乙腈混和液和含 0.2% 甲酸的水溶液为流动相梯度洗脱, 进行测定。结果 该方法的平均回收率为 89.2% ~ 119.1%, 相对标准偏差为 1.8% ~ 19.0%, 方法的定量限介于 0.1 ~ 0.5 μg/kg。结论 该方法灵敏度高, 重现性良好, 适用于牛奶中多种抗生素的检测。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱法; 四环素; 喹诺酮; 固相萃取; 牛奶; 食品安全; 兽药残留

中图分类号: TS207.53; R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)06-0546-04

Simultaneous determination of tetracyclines and quinolones residues in milk by
ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Meng Juan, Yang Yonghong

(Institute of Nutrition and Food Hygiene, Beijing Center for Disease Control and
Prevention, Beijing 100013, China)

Abstract: Objective A comprehensive analytical method based on ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) with positive mode has been developed for the simultaneous determination of seven tetracyclines and fourteen quinolones in milk. **Methods** Milk samples were extracted by EDTA-McIlvaine (pH = 4.0) buffer solution and then purified and enriched by Oasis HLB solid phase extraction cartridges. The separation was performed on a Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm i. d., 1.7 μm) with gradient elution using methanol-acetonitrile and water (containing 0.2% formic acid) at a flow rate of 0.2 ml/min. **Results** The average recoveries of this method for fortified samples were ranged from 89.2% to 119.1%, with relative standard deviations between 1.8% to 19.0%. The limits of quantification (LOQ) were ranged from 0.1 to 0.5 μg/kg. **Conclusion** Due to its high sensitivity and reproducibility, the method is suitable for the determination of seven tetracyclines and fourteen quinolones in milk samples.

Key words: Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; tetracycline; quinolone; solid-phase extraction; milk; food safety; veterinary drugs residue

近年来, 食品安全问题受到了我国消费者的普遍关注, 兽药残留问题是其中的一个重要方面。喹诺酮类和四环素类抗生素是常用的人工合成抗菌药, 在动物养殖中广泛使用。这些药物作为兽药时主要用于预防和治疗畜禽及鱼类的感染性疾病, 但是过量使用或使用不当会造成动物体内药物残留, 该残留通过食物链进入人体, 可能导致细菌耐药性等问题, 给消费者带来潜在危害^[1]。许多国家规定不同动物性食品中相关药物的最大残留限量

(MRL), 我国规定牛奶中喹诺酮类药物单诺沙星、环丙沙星、恩诺沙星和氟甲喹的 MRL 分别为 30、100、100 和 50 μg/kg, 四环素类药物土霉素、金霉素和四环素的 MRL 均为 100 μg/kg^[2-3]。

目前, 动物性食品中四环素和喹诺酮的分析方法主要有免疫学方法^[4]、高效液相色谱法^[5-7]和液质联用分析法^[8-10]等。其中免疫学方法灵敏度较高, 但特异性不强, 只适于样品的初步筛查; 高效液相色谱法灵敏度较低; 液相色谱-质谱法灵敏度高, 可以同时测定多种类药物, 其检测能力远远超过高效液相色谱法, 已经成为兽药残留检测的主要手段。本文应用超高效液相色谱-串联四级杆质谱技术实现牛奶中 14 种喹诺酮类药物和 7 种四环素类

收稿日期: 2012-05-17

作者简介: 孟娟 女 主管技师 研究方向为食品检验

E-mail: mengj777@sina.com

药物的同时检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY™超高效液相色谱仪(Waters公司)、Micromass®-Quattro Premier XE质谱仪(Waters公司)、离心机、Oasis HLB固相萃取(SPE)小柱(6 ml, 200 mg, Waters公司) 甲醇、乙腈、乙酸乙酯(色谱纯), 甲酸(纯度为99%, Ameisensaure), 实验用水均为超纯水, 电阻率为 $18.2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(pH 4.0): 称取一水合柠檬酸 12.9 g, Na_2HPO_4 10.9 g, Na_2EDTA 37.2 g, 用超纯水溶解定容至 1 L。

7种四环素: 土霉素、四环素、强力霉素、去甲基金霉素、甲烯土霉素、二甲胺四环素、金霉素; 14种喹诺酮: 恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、依诺沙星、洛美沙星、吡哌酸、萘啶酸、奥索利酸、氟甲喹、西诺沙星、单诺沙星(均购自于 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)。

标准溶液的配制: 准确称取 10.0 mg 标准品, 四环素用甲醇溶解并定容至 10 ml, 喹诺酮先加 50 μl 甲酸溶解, 再用甲醇定容至 10 ml, $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。用甲醇稀释至 10 mg/L, 再由 0.2% 甲酸水配制不同浓度的标准工作液。

1.2 色谱条件

色谱条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC™ BEH C_{18} 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm i. d., 1.7 μm), 柱温: $30\text{ }^\circ\text{C}$, 样品温度: $4\text{ }^\circ\text{C}$, 进样体积: 10 μl ; 流动相 A 为含 0.2% 的甲酸水, 流动相 B 为乙腈 + 甲醇(v/v , 6/4), 流速为 0.2 ml/min, 流动相线性梯度洗脱, 洗脱程序为: 90% A 6.00 min 内线性降低到 70% A, 3.00 min 内线性降低到 50% A, 0.5 min 内降低到 0% A, 保持 1 min, 再于 0.1 min 内线性升高到 90% A, 保持 3 min, 等待下一次进样。

质谱条件 离子源: 电喷雾电离(ESI+), 毛细管电压: 3.0 kV, 射频透镜(RF Lens)为 0.0 V; 离子源温度: $110\text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂温度: $350\text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂气流量: 500 L/h; 碰撞气流速: 0.06 ml/min。各种四环素和喹诺酮的质谱采集参数见表 1。

1.3 样品前处理

准确称取牛奶样品 5 g, 置于 50 ml 聚丙烯离心管中, 用 10 ml 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液低温超声提取, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液。用定量滤纸过滤, 然后用 5 ml 水洗滤纸。此溶液待过 HLB(6 ml, 200 mg) 柱净化。HLB 固相萃取柱, 使用前用 6 ml 甲醇、6 ml 水、6 ml EDTA-

McIlvaine 缓冲溶液活化。样品溶液 2 ~ 3 ml/min 的速度过 HLB 柱, 用 2 ml 5% 甲醇水淋洗, 再用 6 ml 甲醇洗脱, 洗脱液用氮气吹干, 用 1 ml 0.2% 甲酸水定容, 漩涡 1 min, 过 0.25 μm 滤膜, 供超高效液相色谱-质谱/质谱测定。

2 结果与讨论

2.1 提取液的选择

四环素和喹诺酮可溶极性有机溶剂、有机酸、有机碱或酸/碱水溶液, 分别用甲醇、乙腈、EDTA-McIlvaine 缓冲溶液作为提取液进行了比较。结果表明, EDTA-McIlvaine 缓冲溶液的提取效率优于甲醇和乙腈。优于四环素易与金属离子螯合, EDTA-McIlvaine 缓冲溶液可对此起到抑制作用, 有效提高了四环素的回收率。

2.2 固相萃取条件的选择

四环素和喹诺酮均能与反相填料发生吸附作用。这里选择 C_{18} 柱和 HLB 柱进行比较。取 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液稀释的混合标准溶液(2 $\mu\text{g/L}$) 25 ml, 分别过 HLB(6 cc, 200 mg) 柱、 C_{18} (6 cc, 500 mg), 6 ml 甲醇洗脱, 氮吹至干, 定容上机分析, 其回收率结果表明, HLB 柱回收率高于 C_{18} 柱, 因此采用 HLB 柱进行净化。

2.3 定容液的选择

测定样品时, 定容液中甲醇的比例会直接影响到目标化合物的色谱峰形及灵敏度, 因此, 本文分别用 0%、10%、30%、50% 和 100% 的甲醇-0.2% 甲酸水配制 50 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液进行分析, 其色谱图结果显示, 测定溶液为 0.2% 甲酸水时四环素和喹诺酮的峰形及响应值最好。当定容液中含有甲醇时, 保留弱的化合物如吡哌酸等物质的色谱峰出现了前伸和展宽, 因此采用 0.2% 甲酸水定容。

2.4 线性范围、回收率、精密度及检出限

配制喹诺酮浓度为 1、2.5、5、10、25、100 $\mu\text{g/L}$, 四环素浓度 3、7.5、15、30、75、300 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准系列, 称取 5.00 g 牛奶, 并加入上述溶液, 按 1.3 进行前处理后上机分析。以目标组分的峰面积 y 对相应的质量浓度 x (ng/ml) 绘制标准曲线, 回归分析其相关系数均 >0.99 , 表明 21 种目标化合物在上述浓度范围内时具有较好的线性关系。各药物的方法检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别以最低加标浓度试样中被分析物质的定性离子满足信噪比为 3 和 10 计算所得。回收率、相对标准偏差(RSD)和 LOQ 见表 2。3 个加标水平下, 牛奶中 14 种喹诺酮和 7 种四环素类药物的平均回收率为 89.2% ~ 119.1%, 相对标准偏差为 1.8% ~ 19.0%, 满足国

表 1 四环素和喹诺酮的质谱采集参数
Table 1 Mass parameters for tetracyclines and quinolones analysis

化合物	保留时间 (min)	母离子	离子迁移	碰撞能量 (eV)	锥孔电压 (V)
吡哌酸	3. 68	304. 29	304. 29 > 217. 12 *	21	38
			304. 29 > 189. 00	32	38
二甲胺四环素	3. 83	458. 45	458. 45 > 441. 40 *	18	35
			458. 45 > 352. 43	29	35
培氟沙星	4. 64	334. 26	334. 26 > 290. 31 *	17	38
			334. 26 > 233. 18	25	38
氧氟沙星	4. 64	362. 24	362. 24 > 318. 31 *	18	38
			362. 24 > 261. 19	27	38
依诺沙星	4. 7	321. 35	321. 35 > 303. 31 *	19	50
			321. 35 > 233. 9	22	50
四环素	4. 88	445. 38	445. 38 > 410. 40 *	19	28
			445. 38 > 427. 72	14	28
诺氟沙星	4. 88	320. 31	320. 31 > 302. 27 *	19	50
			320. 31 > 276. 25	17	50
土霉素	5. 08	461. 39	461. 39 > 426. 44 *	19	30
			461. 39 > 443. 57	13	30
环丙沙星	5. 16	332. 23	332. 23 > 314. 28 *	19	36
			332. 23 > 288. 34	17	36
恩诺沙星	5. 46	360. 30	360. 30 > 316. 37 *	19	38
			360. 30 > 342. 30	23	38
单诺沙星	5. 51	358. 26	358. 26 > 340. 33 *	25	38
			358. 26 > 81. 96	42	38
洛美沙星	5. 69	352. 29	352. 29 > 265. 23 *	23	36
			352. 29 > 308. 33	17	36
去甲基金霉素	6. 07	465. 33	465. 33 > 430. 39 *	22	36
			465. 33 > 448. 36	17	36
沙拉沙星	6. 28	386. 27	386. 27 > 342. 28 *	18	40
			386. 27 > 299. 26	28	40
强力霉素	9. 86	445. 48	445. 48 > 428. 47 *	19	24
			445. 48 > 154. 01	32	24
金霉素	7. 57	479. 34	479. 34 > 444. 43 *	20	32
			479. 34 > 462. 34	18	32
西诺沙星	7. 57	263. 10	263. 10 > 244. 12 *	16	35
			263. 10 > 188. 80	28	35
奥索利酸	8. 51	262. 11	262. 11 > 244. 12 *	16	50
			262. 11 > 155. 92	28	50
甲稀土霉素	9. 14	443. 27	443. 27 > 426. 42 *	18	28
			443. 27 > 201. 15	34	28
萘啶酸	10. 85	233. 09	233. 09 > 215. 06 *	15	26
			233. 09 > 186. 99	28	26
氟甲喹	11. 49	262. 18	262. 18 > 244. 13 *	17	50
			262. 18 > 202. 05	28	50

注:带*号的离子用作定量分析。

际上动物性食品中兽药残留检测的要求。选取 1.0 μg/kg 加标水平进行日内精密度评价,结果为 3.6% ~16.1%,表明该方法重现性良好。

2.5 样品分析

用所建立的方法对市售牛奶进行分析,包括 10 份纯牛奶和 5 份酸奶,结果发现纯牛奶中均含有环丙沙星,含量为 1.40 ~14.8 μg/kg,其中 2 件样品中还检出培氟沙星、环丙沙星和氧氟沙星,含量为 0.37 ~4.70 μg/kg;5 件酸奶中仅 1 件检出环丙沙星,含量为 0.46 μg/kg。四环素类药物均未检出。

图 1 为纯牛奶样品色谱图,分别含有 0.89 μg/kg 诺氟沙星、1.4 μg/kg 环丙沙星、0.37 μg/kg 培氟沙星、1.0 μg/kg 氧氟沙星。

3 结论

本研究采用 HLB 固相萃取柱浓缩净化,超高效液相色谱-质谱/质谱(UPLC-MS/MS)同时筛选确证 7 种四环素和 14 种喹诺酮类药物多残留检测方法,方法回收率和精密度符合残留检测要求。对奶制品的监管和保证食品安全提供了简便快速、灵敏度

表 2 牛奶中 21 种目标化合物的定量限、加标回收率和相对标准偏差

Table 2 The quantitation limits, mean recoveries and the relative standard deviation of 21 target drugs in milk

化合物	定量限 (LOQ/ $\mu\text{g/kg}$)	加标浓度 0.5 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 1.0 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 2 $\mu\text{g/kg}$	
		回收率 (%)	相对标准 偏差 (%)	回收率 (%)	相对标准 偏差 (%)	回收率 (%)	相对标准 偏差 (%)
吡哌酸	0.1	106.6	10.9	107.4	12.6	104.7	5.2
二甲胺四环素	0.5	103.5	7.9	112.9	4.4	98.5	4.8
培氟沙星	0.2	101.9	11.1	108.3	10.5	108.4	5.0
氧氟沙星	0.1	105.7	12.6	102.4	15.4	100.8	4.9
依诺沙星	0.5	102.3	7.9	103.7	12.8	101.8	5.0
四环素	0.2	106.3	16.0	101.8	14.8	95.4	8.8
诺氟沙星	0.5	97.3	14.8	104.9	12.9	95.3	5.8
土霉素	0.5	92.9	11.5	105.4	11.4	99.8	4.4
环丙沙星	0.2	89.2	14.6	95.6	10.7	103.6	7.6
恩诺沙星	0.1	119.1	19.0	108.8	18.7	98.7	7.3
单诺沙星	0.1	112.5	14.0	105.9	11.3	97.4	1.9
洛美沙星	0.1	100.8	7.5	101.7	12.3	100.2	3.4
去甲基金霉素	0.5	106.7	16.5	103.4	11.5	96.6	1.8
沙拉沙星	0.1	117.1	16.4	105.9	12.1	102.7	6.3
强力霉素	0.5	107.7	18.4	104.7	11.4	94.8	4.4
金霉素	0.5	109.2	16.9	110.4	11.9	94.7	5.3
西诺沙星	0.1	110.3	14.6	107.1	16.8	96.4	5.5
奥索利酸	0.2	102.0	15.4	101.4	15.3	100.3	3.1
甲稀土霉素	0.2	111.5	18.6	102.4	12.7	96.0	3.2
萘啶酸	0.1	109.4	18.9	105.7	13.9	99.6	6.3
氟甲喹	0.1	106.8	17.9	100.5	14.9	101.4	4.8

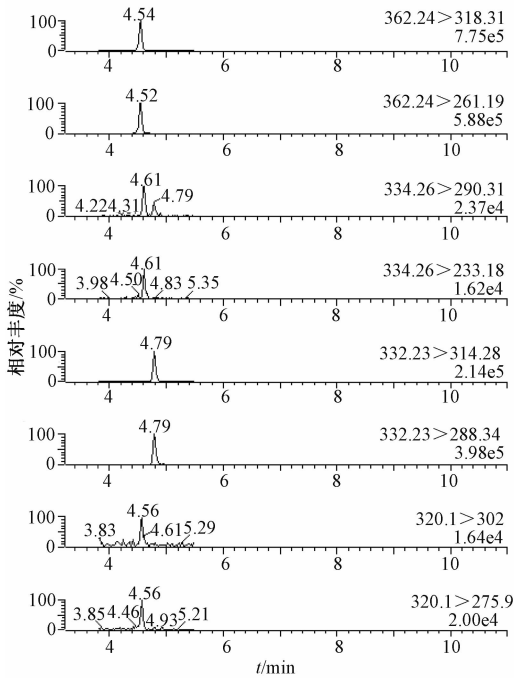


图 1 纯牛奶样品色谱图

Figure 1 LC-MS/MS chromatograms of a pure milk sample

高,重现性好,稳定性强的检测方法。

参考文献

[1] 刘德炎.我国动物性食品中兽药残留的现状、问题及对策[J]. 养殖与饲料,2009(1):78-82.

[2] 岳振峰,周乃元,叶卫翔.国内外食品安全限量标准实用手册[M].北京:中国劳动保障出版社,2011.

[3] 农业部.中华人民共和国农业部公告 第 193 号食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[S].北京:中国标准出版社,2002.

[4] 刘智宏,叶妮,黄耀凌,等.ELISA 法测定牛奶和鸡肌肉中四环素类药物残留[J].中国兽药杂志,2006,40(11):1-4.

[5] 蔡志斌,张英,刘丽.固相萃取-高效液相色谱法测定牛奶中 3 种四环素类抗生素残留量[J].中国食品卫生检验杂志,2007,17(2):270.

[6] 宋欢,林勤保,连庚寅,等.基质固相分散-高效液相色谱法测定兔肉中四环素类药物多残留[J].食品科学,2008,29:250-253.

[7] 赖克强,陆勤丰,丛健.基质固相分散-高效液相色谱法测定鱼肉中四环素类药物残留的研究[J].分析试验室,2009,28(S):29-31.

[8] JOHNSTON L, MACKAY L, CROFT M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection[J]. J Chromatography, 2002, 982(1):97-109.

[9] SHAO Bing, JIA Xiaofei, WU Yongning, et al. Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21:3487-3496.

[10] 刘芑岩,姜宁,王英峰.高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定鸡肉中残留的磺胺类和喹诺酮类兽药[J].色谱,2008,26(3):348-351.