

液相色谱-串联质谱法分析海产品中四环素类药物残留

程雪梅, 苏青云, 胡炎明

(东莞市农业检验检测所, 广东 东莞 523086)

摘要:为满足海产品检测中对快速、低检出限分析方法的迫切需要,建立了海产品中四环素类抗生素(四环素、土霉素、金霉素、强力霉素)残留量的测定方法。样品经过 2% 的高氯酸提取,固相萃取柱净化,以乙腈-水-三氟乙酸体系为流动相,采用电喷雾离子源以正离子检测方法进行质谱分析。结果显示,样品中 4 种化合物的定性限(LOD)为:金霉素 $0.008 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其他 3 种化合物均为 $0.002 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;定量限(LOQ)为:金霉素 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,其他 3 种化合物均为 $0.006 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;线性范围为 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,相关系数大于 0.995。从 $0.05, 0.08, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3 个添加浓度检测结果可见,平均回收率为 $50.2\% \sim 91.2\%$,RSD 为 $4.0\% \sim 9.2\%$,可以满足海产品中四环素类抗生素残留量的监测要求。

关键词:液相色谱-串联质谱;海产品;四环素类抗生素;残留分析

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2009)02-74-04

Determination of 4 Tetracyclines Residues in Seafoods by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

CHENG Xue-mei, SU Qing-yun, HU Yan-ming

(Agricultural Test & Supervise Institution of Dongguan, Dongguan 523086, China)

Abstract: A method for the determination of 4 tetracyclines (tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, chlortetracycline) residues in seafood was developed. Sample was extracted with 2% perchloric acid, purified by a solid-phase extraction procedure. Then the reconstituted sample solution was analyzed by UPLC-MS/MS in ESI position mode using the mobile phase with trifluoroacetic acid (TFA)/water and acetonitrile. The detection limits of chlortetracycline is $0.008 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, the others are $0.002 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The quantification limit of chlortetracycline is $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, the others are $0.006 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Range of the calibration curve 4 tetracycline is $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and RSD is more than 0.995. The average recoveries from spiked sample at 3 concentrations of $0.05, 0.08, 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ range from 50.2% to 91.2% , and RSD is $4.0\% \sim 9.2\%$.

Key words: HPLC/MS-MS; seafoods; tetracyclines; residues

四环素类药物是一类广谱抗生素,包括从链霉菌属培养物提取的四环素(TC)、土霉素

(OTC)、金霉素(CTC),以及半合成四环素(如强力霉素)等。四环素类药物对多种病原菌有较

强的抑制作用,在兽药和饲料添加剂方面得到广泛的应用。我国水产养殖的一些地区由于放养密度过高、环境污染严重等原因,致使水生动植物发病率增加,为追求经济效益最大化,渔民常在饲料中添加抗生素类药物,致使水产品中抗生素残留增加。四环素类药物残留毒性作用表现为降解产物的溶血或肝毒作用,对胃肠、肝脏的损害及使牙齿染色等,长期低浓度的药物残留还会诱发病菌的耐药性,因此水产品中四环素类抗生素残留的危害已引起世界范围的广泛关注。

目前海产品中抗生素的分析策略包括筛选方法和确证方法,常用的检测方法有微生物法、放射免疫分析法、酶联免疫法、气质联用法、液相色谱法^[1-2]等,这些手段在监测时效、选择性、灵敏度等方面各有优缺点。为满足海产品检测中对快速、低检出限分析方法的迫切需要,本试验采用超高效液相色谱-串联质谱联用技术,同时检测虾样品中四环素、土霉素、金霉素和强力霉素的残留量。

1 试验部分

1.1 主要仪器

超高效液相色谱-串联四极杆质谱联用仪:美国 Waters 公司产品,配有电喷雾离子源(ESI);固相萃取仪:美国 Suppcol 公司产品;小流量多通道泵:美国 Watson 公司产品;水浴氮气吹干仪:美国 Organomation Associate 公司产品;破碎乳化机:日本 ACE 公司产品;台式高速冷冻离心机:德国 Sigma 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

四环素、土霉素、金霉素和强力霉素(纯度>99%);德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品;乙腈(质谱级):美国 Fisher 公司产品;甲酸、甲醇、正己烷(色谱纯):美国 Fisher 公司产品;高氯酸:分析纯;固相萃取柱:Supelco EnviTM-18 SPE,3 mL,填料 500 mg;瓶装屈臣氏蒸馏水。

配制标准工作液:称取四霉素、土霉素、金霉素、强力霉素 4 种标准品各 0.010 0 g,分别用乙腈定容至 10.0 mL,得到浓度为 1.0 g·L⁻¹ 的标准贮备液,用安培瓶分装,保存于-18℃。测定前用流动相稀释成浓度为 0.01,0.025,0.05,0.1 mg·L⁻¹ 的标准工作液。

1.3 试验条件

1.3.1 样品处理 将去皮、去头的虾组织绞碎,准确称取 2.0 g 放入 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 10.0 mL 2% 的高氯酸,振荡 15 min 后,超声波提取 10 min,离心 5 min(8 000 r·min⁻¹,10℃),取上清液于另一离心管,残渣再用 10.0 mL 2% 的高氯酸提取 2 次,合并上清液。加入 5 mL 正己烷,涡旋混匀,离心 5 min(8 000 r·min⁻¹,10℃),弃去上层,再加入 5 mL 正己烷,重复脱脂操作。

C₁₈ 固相萃取柱首先用甲醇和水各 5 mL 平衡活化,吸取 10.0 mL 提取液过 C₁₈ 柱净化,加入样品后,流速控制在每分钟 50 滴,再用 10 mL 水洗涤,弃去流出液。加入 3 mL 4% 的甲酸甲醇溶液进行洗脱,流速控制在每分钟 40 滴,收集的洗脱液在 40℃ 水浴中氮气吹干,以 2.0 mL 流动相溶解定容,过 0.2 μm 滤膜后上机。

1.3.2 色谱条件 色谱柱:UPLC Acquity BEH(50 mm×2.1 mm×1.7 μm);进样量:10 μL;柱温:35℃;流动相 A 为乙腈,流动相 B 为 10 mmol·L⁻¹ 三氟乙酸水溶液;流速 0.2 mL·min⁻¹;梯度洗脱:0~8 min,15% A 线性变化到 30% A,8~10 min,30% A 线性变化到 15% A。

1.3.3 质谱条件 电喷雾 ESI 正离子电离模式,多反应监测离子采集数据,毛细管电压 3.5 kV,萃取电压 25 V,透镜电压 0.2 V,离子源温度 100℃,脱溶剂气温度 350℃,锥孔气流速 60 L·h⁻¹,脱溶剂气流速 500 L·h⁻¹,碰撞气流速 0.20 mL·min⁻¹。

4 种目标化合物的检测条件列于表 1。

表 1 4 种四环素类药物检测条件
Table 1 Detection conditions of 4 tetracyclines

名称	保留时间/min	定性离子对/m/z		定量离子对/m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
土霉素	2.36	461.4>426.2	461.4>381.2	461.4>426.2	30	20 25
四环素	2.91	445.3>410.3	445.3>154.1	445.3>410.3	30	20 15
金霉素	5.16	479.3>444.1	479.3>154.2	479.3>444.1	30	20 30
强力霉素	6.13	445.4>428.4	445.4>154.5	445.4>428.4	25	20 25

2 结果讨论

2.1 方法回收率与精密度

于空白样品中添加混合标准,在 0.05、0.08、0.1 mg · kg⁻¹ 3 个水平上做添加回收率测试,结果列于表 2。4 种化合物平均回收率在 50.2%~91.2%,RSD 在 4.0%~9.2%,方法批内和批间变异系数均小于 20%。

表 2 4 种四环素类药物加标回收率
Table 2 Spiked recoveries of 4 tetracyclines

名称	平均回收率/%		
	添标 0.05 mg · kg ⁻¹	添标 0.08 mg · kg ⁻¹	添标 0.10 mg · kg ⁻¹
土霉素	74.5	89.2	86.6
四环素	71.0	73.0	91.2
金霉素	50.2	78.2	83.0
强力霉素	85.9	81.4	87.0

2.2 线性范围及最低检测浓度

配制 0.01、0.025、0.05、0.1 mg · L⁻¹ 的系列标准溶液,以峰面积与浓度进行线性回归。土霉素、四环素、金霉素和强力霉素的相关系数依次为 0.997 0、0.995 6、0.999 2、0.998 7,说明该

方法具有较大的线性范围和良好的线性相关性。得到方法定性检出限(LOD)(S/N=3):金霉素 0.008 mg · kg⁻¹,其他 3 种化合物均为 0.002 mg · kg⁻¹;定量限(LOQ)(S/N=10):金霉素 0.02 mg · kg⁻¹,其他 3 种化合物均为 0.006 mg · kg⁻¹。

2.3 提取条件的选择

四环素类抗生素在生物样品中容易与蛋白质强烈结合,需要用强酸或酸性脱蛋白剂从生物样品中提取^[3-4]。实验选择了 McIlvaine Buffer-EDTA 溶液和高氯酸水溶液作为提取剂,进行提取效果对比。实验结果显示:McIlvaine Buffer-EDTA 溶液提取的杂质较多,不利于过柱净化,导致回收率偏低。高氯酸可以沉淀蛋白质,随着含量的增加,蛋白质沉淀越好,有利于过滤净化,但易使目标物质发生化学变化,2%的高氯酸可以较好地提取抗生素,又尽可能少地提取干扰物,回收率效果良好。

2.4 检测条件优化

四环素和强力霉素为同分异构体,[M+H]⁺ 均为 m/z 445,要对色谱分离和质谱检测条件进行优化,确保二者有较好的分离度。四环素容易在反相色谱柱的硅醇基上吸附,产生拖尾峰,

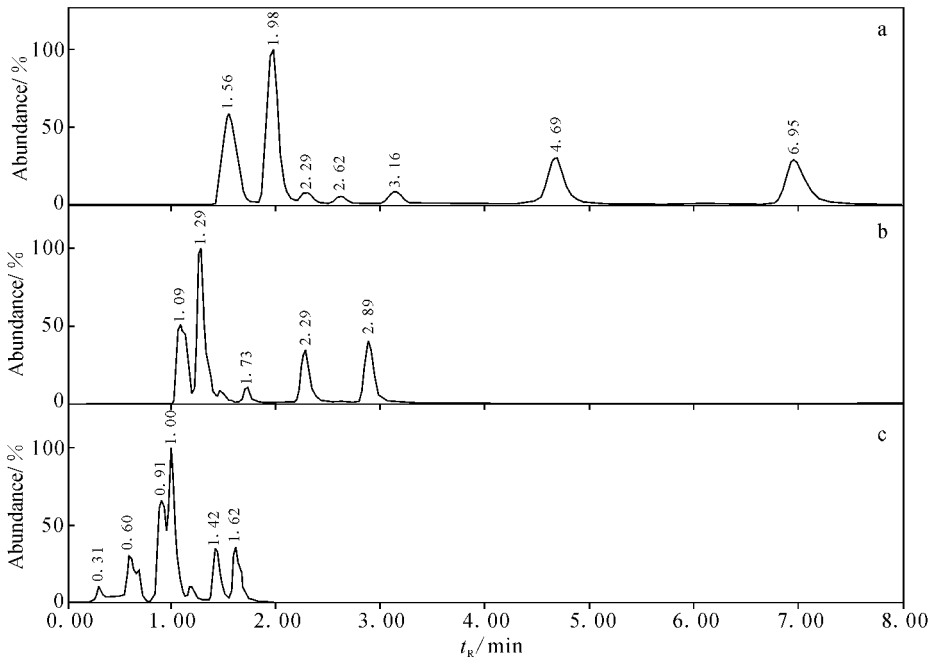


图 1 流动相中不同乙腈配比时,4 种化合物标准溶液的色谱图
a. 20%; b. 25%; c. 30%

Fig. 1 Chromatograms of 4 tetracycline by different acetonitril rate in mobile phase
a. 20%; b. 25%; c. 30%

需要在流动相中加入有机酸,才能取得较好的分离效果。实验结果表明,4 种化合物在三氟乙酸水溶液浓度为 $0.5 \sim 10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,均可以得到较好的分离效果。流动相中有机相与酸液的配比对化合物的分离有较大的影响,随着有机相乙腈(A 相)的增加,目标化合物流出速率加快,保留时间缩短,分辨率也变差,示于图 1。A 相 20%时,4 种化合物分离效果良好;25%时,金霉素、强力霉素分离效果尚可,土霉素、四环素达不到基线分离;30%时,土霉素、四环素分辨率差,且与杂质分不开。采用梯度洗脱得到较好的

分离效果,示于图 2。

3 结 论

研究了虾样品中 4 种四环素类药物残留的分析方法,通过高氯酸沉淀蛋白质、超声波提取、固相萃取柱净化,以超高效液相色谱-串联质谱技术进行定性定量分析。实验结果表明:该方法选择性强、灵敏度高,线性范围和加标回收率测试结果均能满足水产品中四环素类抗生素残留的量的监测要求。

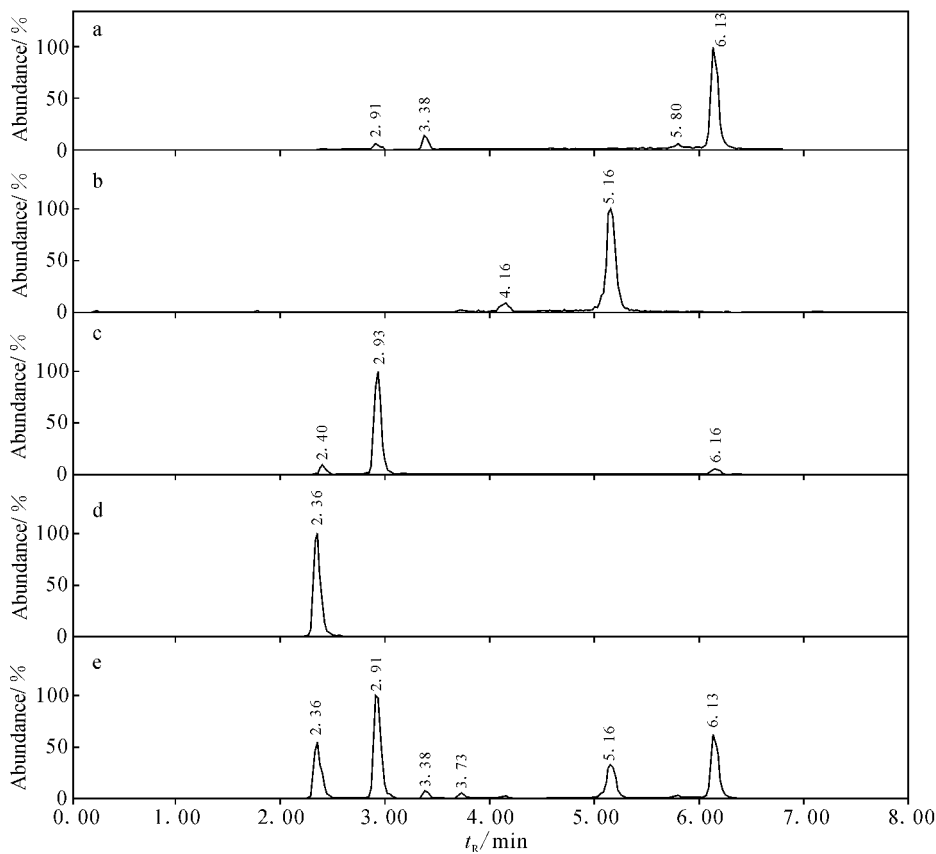


图 2 典型多反应监测条件下,4 种四环素类药物标准溶液色谱图($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

a. 强力霉素;b. 金霉素;c. 四环素;d. 土霉素;e. 总离子流图

Fig. 2 Chromatograms of 4 tetracycline by multiple reaction monitoring (MRM)scan mode ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

a. doxycycline;b. chlortetracycline;c. tetracycline;d. oxytetracycline;e. TIC

参考文献:

[1] 王 覃,陈大舟,汤 桦,等. 高效液相色谱法同时测定海产品中四种抗生素的分析方法[J]. 北京化工学报,2006,5:90-93.

[2] 徐冬梅,刘广深,李 青,等. 高效液相色谱法同时测定动物组织中 3 种抗生素残留量[J]. 中国公共卫生,2002,2:233-234.

[3] 李俊锁,邱月明,王 超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002:365.

[4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.