

HPLC-ESI-MS/MS 检测蜂蜜中林可霉素残留

阮祥春, 曾明华*, 赵明 (1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036; 2. 安徽省兽药饲料监察所, 安徽合肥 230022)

摘要 [目的] 建立蜂蜜中林可霉素残留的高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)检测方法。[方法] 样品经固相萃取净化、液相色谱分离后进行质谱分析,在多反应监测模式(MRM)下进行特征母离子、子离子对信号采集。根据保留时间、母离子和两个特征子离子进行定性分析,以离子峰度最强的基峰离子 m/z 126 进行定量。[结果] 在 1.0~20.0 ng/ml 线性范围内,峰强度与添加浓度的线性关系良好($r^2 > 0.9996$)。在 2.5、5.0、10.0 ng/g 3 个添加水平,林可霉素的平均回收率范围为(95.1±3.3)%,日内测定结果的相对标准偏差小于 5.3%,日间测定结果的相对标准偏差小于 8.5%,最低检测限 0.1 ng/g。[结论] HPLC-ESI-MS/MS 用作检测蜂蜜中林可霉素残留的方法,灵敏度高、精密度好,达到了林可霉素残留分析的要求。

关键词 蜂蜜;林可霉素;高效液相色谱-电喷雾串联质谱;残留

中图分类号 S896.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-01889-03

Detection on the Residues of Lincomycin in Honey by LC-ESI-MS/MS

RUAN Xiang-chun et al (College of Animal Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract [Objective] The purpose was to set up the method of detecting the residues of lincomycin in honey by HPLC-ESI-MS/MS. [Method] The samples purified by solid-phase extraction and isolated by liquid-phase extraction were analyzed by MS. The signal collection of characteristic maternal ions and sub-ion pairs was conducted in MRM. The qualitative analysis was conducted on the basis of retaining time, maternal ions and the two characteristic sub-ions. The quantification was conducted on base peak ion m/z 126, whose ion peak was most intense. [Result] In the linear scope of 1.0-20.0 ng/ml, the peak intensity had good linear correlation with added concn. ($r^2 > 0.9996$). Under the 3 addition levels of 2.5, 5.0 and 10.0 ng/g, the average recovery of lincomycin was (95.1±3.3)%, the RSD of determination results during one day was smaller than 5.3%, that between two days was smaller than 8.5%, with detection limit being 0.1 ng/g. [Conclusion] HPLC-ESI-MS/MS was a sensitive and precise method in detecting the residues of lincomycin in honey and met the requirements of residues analysis on lincomycin.

Key words Honey; Lincomycin; HPLC-ESI-MS/MS; Residues

林可霉素(Lincomycin, 又称洁霉素) 主要用链霉菌发酵得到,常作用于细菌核糖体的 50s 亚单位,通过抑制肽链的延长而抑制细菌蛋白质的合成,从而清除细菌表面 A 蛋白质和绒毛状外衣,使其易被吞噬和杀灭^[1]。对机体免疫系统有增强免疫调节作用,增强多核型白细胞的吞噬和杀菌功能,改变细菌表面活性和抑制细菌毒素的产生。在蜂业生产中主要用于蜜蜂幼虫细菌病的防治,尤其是美幼病的防治^[2]。林可霉素临床不良反应常见的有胃肠道反应^[3],口服或注射给药均可发生,表现为恶心、呕吐、胃部不适、舌尖或肛门瘙痒和腹泻,后者多于用药后 3~10 d 内发生,严重者可引起伪膜性肠炎。另外有肝脏损害^[4]、过敏反应^[5]、心血管反应^[6]。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 试验动物。意大利蜜蜂由安徽省鸿汇集团基地蜂场提供。选健康强蜂群 6 箱,随机分成 2 组(A 喂药组、B 空白组),饲喂不含抗生素的糖浆。两周后,A 组按林可霉素 0.25 g(箱·bw)的剂量饲喂,每天 1 次,连续 3 d,收集蜂蜜,置于 -20℃ 冰箱保存备用。B 组空白蜜蜂在 A 组喂药结束之日,开始收集蜂蜜样品,于 -20℃ 冰箱保存待测。

1.1.2 试剂。盐酸林可霉素对照品:纯度 86.2%,批号 13042-200407,中国药品生物制品检定所;甲醇、乙腈、碳酸钠、碳酸氢钠、硼砂、85% 磷酸、三乙胺、乙酸铵、固相萃取小柱(SPE)、色谱柱、超纯水、水质可达 18.3 M \cdot cm,符合国家实验室用水规格(GB6682-92)。

1.1.3 主要仪器设备。UV-2501PC 型紫外分光光度计,由日本岛津公司生产;黛安 DIONEX 型高效液相色谱仪,配备

四联泵、脱气泵、自动进样器、柱温箱,由化学工作站控制,美国黛安公司生产;API2000 型质谱仪,由美国 ABI 公司生产;固相萃取装置,由美国 SUPELCO 公司生产;可调微量移液器,螺口自动进样瓶,冷冻离心机,精密 pH 计,冷藏柜,超声波清洗器,纯水仪,电子天平,分析天平,快速混匀器,电热恒温水浴锅。

1.2 方法

1.2.1 试液配制。LC-MS/MS 法流动相:准确称取乙酸铵 3.72 g,用水稀释至 1 000 ml,按乙酸氨水溶液-甲醇(50:50)配比,过滤脱气后当天使用。LC-MS/MS 所用储备液、工作液:准确称取林可霉素标准品 29.002 ng,置于 25 ml 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度、摇匀,即成 1 000 μ g/ml 的林可霉素标准贮备液。分别用小瓶分装,封口, -20℃ 冰箱保存。用前,用甲醇稀释成 10 μ g/ml 的母液,4℃ 冰箱保存,取此母液,用甲醇梯度稀释 1.5、10、20、50、100 ng/ml 标准工作液备用。提取液的配制:碳酸盐缓冲液用 100 mmol/L NaHCO₃ 与 100 mmol/L Na₂CO₃ 混合至 pH 值为 9.0。

1.2.2 LC-MS/MS 条件的建立。液相条件:色谱柱采用 Hypersil BDS C₁₈250 mm \times 4.6 mm(美国 Agilent);检测波长为 204 nm;流动相为 20 mmol/L 乙酸氨水溶液-甲醇(50:50);柱温为 20℃;流速为 1.0 ml/min;进样量为 20 μ l。质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI);扫描方式为正离子扫描;检测方式为多反应检测(MRM)。质谱参数:CUR(气帘气)流速为 10 L/min;GAS1(雾化气)流速为 5 L/min;GAS2(辅助气)流速为 30 L/min;TEM(离子源温度)为 350℃;IS(电喷雾电压)为 5 500 V;CAD(碰撞气电压)为 5 V;DP(去簇电压)为 20 V;CEP(射入电压)为 22 V。其他参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 林可霉素残留 LC-MS/MS 检测方法的建立

2.1.1 标准曲线与线性范围。精密吸取适量体积的标准工

作者简介 阮祥春(1980-),男,安徽无为人,硕士,助理实验师,从事动物源性食品安全。* 通讯作者,硕士,副教授, E-mail: znhznh@ahau.edu.cn。

作液至容量瓶中,用甲醇稀释成1、2、5、10、20 ng/ml,各准确量取1 ml 添加到2.0 g 蜂蜜中,按提取净化方法处理上机测定。以测得的林可霉素的峰面积强度 S 相对应的药物浓度 C 作线性回归,制作标准曲线,得到林可霉素的标准曲线线性回归方程为: $S = 764\,089C - 12\,297$, 相关系数 $R = 0.999\,6$ (图1)。由相关系数知,在标准曲线线性范围1~20 ng/ml 内,LC/MS/MS 法线性良好,此标准曲线可以用于准确定量。

表1 多反应检测模式

Table 1 Multiple reaction monitoring mode

Q1	Q3	CE 碰撞能量 V	CXP 碰撞室出口电压 V
407.2	359.2	25	14
407.2	126.1	33	16

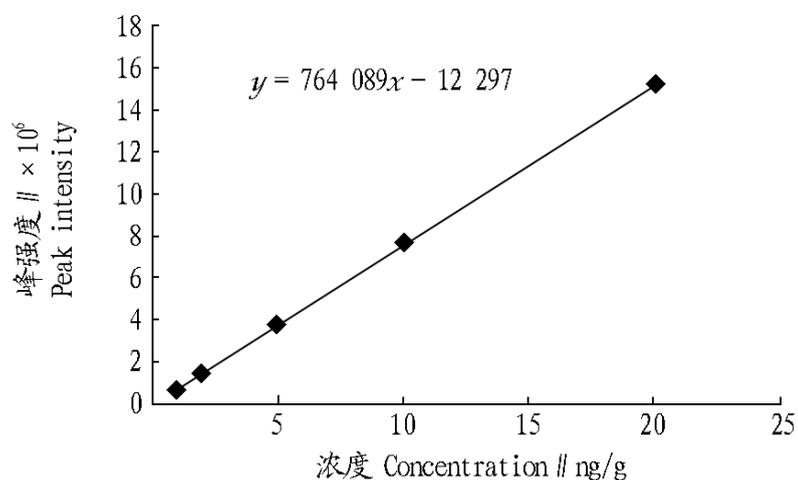


图1 林可霉素LC/MS/MS 标准曲线

Fig.1 The standard curve of lincomycin in honey with LC/MS/MS

2.1.2 回收率。准确称取9 份各2.0 g(精确至0.01 g) 蜂蜜样品,分别添加5、10、20 ng/ml 林可霉素标准工作液。按方法回收率的测定项下操作,按外标法以峰面积计算回收率,由表2 可知,符合残留检测要求。

表2 LC/MS/MS 法蜂蜜中林可霉素的回收率(n=6)

Table 2 The recovery of lincomycin in honey with LC/MS/MS (n=6)

添加浓度 ng/g	回收率 %	平均回收率 %
Adding concentration	Recovery	Average recovery
2.5	95.3 ±2.4	95.1 ±3.3
5.0	93.6 ±3.0	
10.0	96.5 ±1.5	

2.1.3 精密度。准确称取9 份各2.0 g(精确至0.01 g) 蜂蜜样品,分别添加5、10、20 ng/ml 林可霉素标准工作液。按方法精密度的测定项下操作,由表3 可知,日内、日间变异系数均低于15%,符合残留分析对精密度的要求。

表3 LC/MS/MS 法蜂蜜中林可霉素的精密度

Table 3 The precision of lincomycin in honey with LC/MS/MS

添加浓度 ng/g	日内变异系数	日间变异系数
Adding concentration	Intra-day variation coefficient	Inter-day variation coefficient
2.5	3.2	8.5
5.0	5.3	6.3
10.0	3.9	5.2

2.1.4 检测限。应用该试验建立的检测方法,以出现药物峰(是基线噪音的3 倍峰高)的最低组织药物浓度作为药物在蜂蜜中的检测限。LC/MS/MS 法测得林可霉素标准品在蜂蜜

中的检测限为0.1 ng/g。

2.2 林可霉素残留样品的检测 采用液相色谱-电喷雾串联质谱法测定蜂蜜中药物浓度,并与高效液相色谱法测得的数据进行相关性分析由表4 可知,给药6 h 后,两种方法测定林可霉素的残留量在蜂蜜中分别为0.74~0.85 μg/g、0.76~0.89 μg/g。高效液相色谱和液相色谱电喷雾串联质谱两种方法在检测结果上具有良好的相关性,林可霉素的检测值相关性达到了90.6%以上(图2、3)。

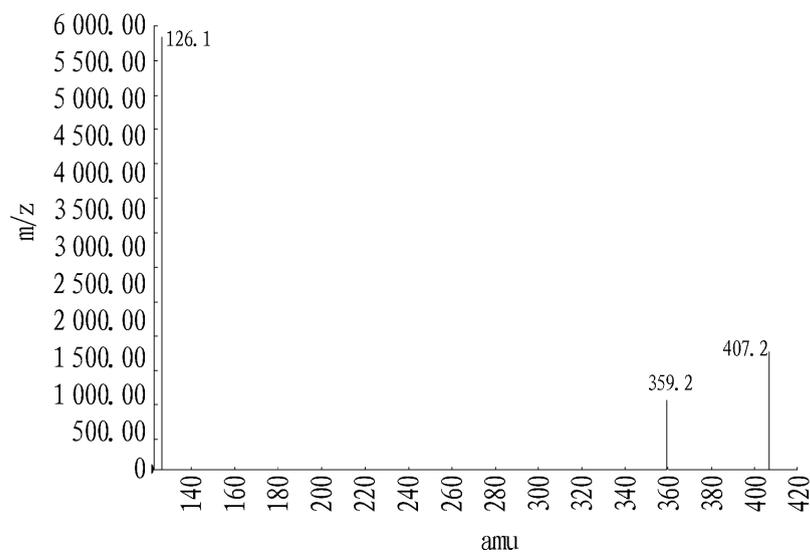


图2 林可霉素质谱图

Fig.2 Mass spectrogram of lincomycin

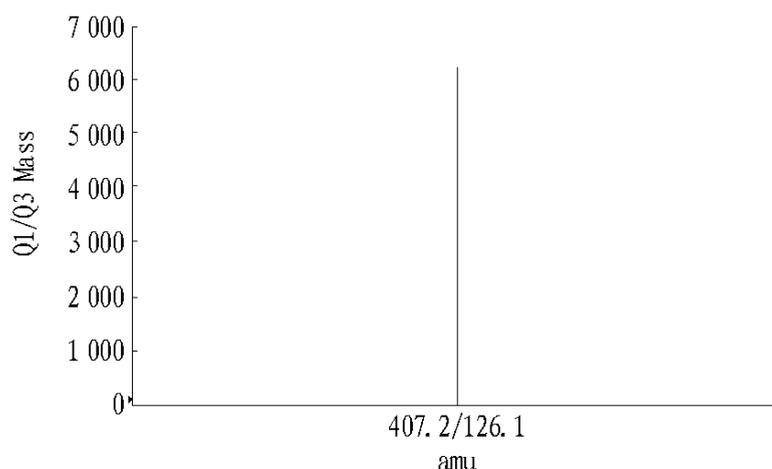


图3 m/z126.1 MRM 质谱图

Fig.3 Mass spectrogram of m/z126.1

表4 不同方法测给药6 h 后蜂蜜中林可霉素浓度

Table 4 The concentration of lincomycin in honey by different medication methods after 6 h

方法	试验号	浓度 μg/g	相关性 R %
Method	Test No.	Concentration	Relationship
HPLC	1	0.74	90.6
	2	0.81	
	3	0.85	
LC ESI-MS/MS	1	0.76	90.6
	2	0.89	
	3	0.88	

3 讨论

3.1 LC/MS/MS 方法的选择 由于林可霉素的紫外吸收强度较弱,HPLC 法很难达到较高的灵敏度,该试验同时建立了LC/MS/MS 法。质谱分析基于不同质量数的带电离子在电场或磁场中的不同运动行为的原理进行定性或定量分析,其优点在于定性能力强,可以同时进行分析,且具有较快的响应速度。液相色谱-质谱联用仪充分结合色谱与质谱的优点,实现了对间歇性人工进样的精确、快速定性、定

量分析。同时还可以提供更多的化合物信息,如分子量、分子式等。该试验分别对林可霉素两对特征性离子进行定性和定量分析,选择信号较强的子离子 m/z 359.2,作为定性离子,离子丰度最强的 m/z 126.1 为定量离子,裂解方式见图4,得到了很好的重现性和回收率。

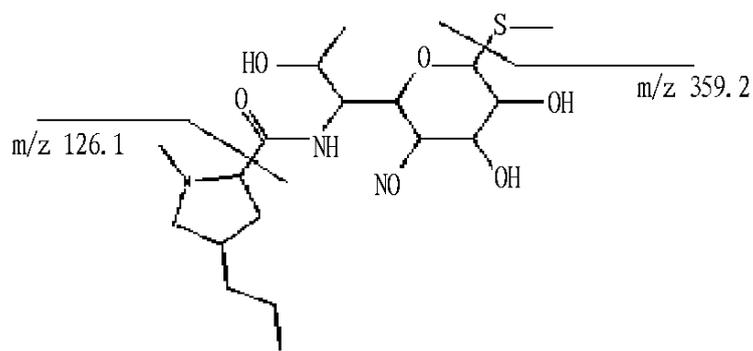


图4 林可霉素母离子、子离子裂解原理

Fig 4 The fragmentation principle of parent ion and daughter ion of lincomycin

3.2 样品的前处理 样品处理是残留分析的关键,生物样品中的组分复杂,蜂蜜中含有大量的葡萄糖、果糖、有机酸等,这些组分的存在对药物的干扰很大,因而必须进行样品前处理。样品处理前应考虑待测药物的理化性质、浓度范围、药物测定的目的及选用的生物体液和组织的类型等。由于林可霉素化学结构的特点,与组织成分结合能力较强,且 pH 值变化对其稳定性有一定影响。试验比较了 pH 值 8.0、9.0、10.0 的碳酸盐缓冲液提取效果后发现, pH 值为 9.0 的缓冲液提取效果最好,杂质干扰较少,回收率最高。在提取过程中,许多与待测组分溶解性相似的杂质被一起转移出来,这些杂质会干扰光谱检测、增加基线噪声、降低柱效、阻塞色谱管路、污染色谱柱和检测器^[7-8],因此有必要对提取液进

(上接第1878页)

明,当浸提温度为 50、70、80、90、100 时,樱桃汁对亚硝酸盐的清除率分别为 10.6%、22.3%、26.7%、25.5%、9.6%。可见,随着温度的升高,樱桃汁对亚硝酸盐的消除率增高;到 80 时消除率最高;继续升高温度,维生素遭到破坏,樱桃汁对亚硝酸盐的消除率也随之下降。

2.2 反应时间对亚硝酸盐消除效果的影响 试验结果表明,当反应时间分别为 5、8、10、13、15、20 min 时,樱桃汁对亚硝酸盐的清除率分别为 20.1%、25.5%、28.3%、28.1%、27.8%、27.5%,可见,樱桃汁与亚硝酸钠反应时间为 10 min 时,消除率最高。

2.3 浸提液用量对亚硝酸盐消除效果的影响 试验结果表明,当浸提液用量分别为 10、15、20、25、30、35 ml 时,樱桃汁对亚硝酸盐的清除率分别为 15.6%、24.7%、26.5%、29.1%、28.8%、29.0%。可见,樱桃汁用量为 25~35 ml 时,亚硝酸盐的消除率较大,考虑到色度影响,选用 25 ml 最佳。

3 结论

(1) 试验结果表明,樱桃汁对亚硝酸盐有一定的消除

一步净化以尽量除去杂质。综合考查了固相萃取柱、淋洗液和洗脱液对净化效果的影响。

3.3 方法学考察 LC/MS/MS 法在 2.5、5 和 10 ng/g 3 个添加水平下,各组织中林可霉素平均回收率范围在 (95.1 ± 3.3)%。C. BENETTI 等用 LC/MS/MS 法同时检测蜂蜜中林可霉素和 5 种大环内酯类抗生素的残留,林可霉素的回收率达到 93.5%~102.2%。Sn DW 等建立了一种 LC-ESI-MS/MS 方法,用于检测牛奶和动物组织中林可霉素的残留,回收率达 94.4%~107.8%^[9]。可见该试验所得回收率达到了药物残留分析的要求。该试验 LC/MS/MS 法测得蜂蜜中林可霉素的检测限 (LOD) 为 0.1 μg/kg,其日内和日间变异系数分别均不大于 5.3% 和 8.5%,可满足蜂蜜中林可霉素残留分析的要求。

参考文献

- [1] 陈杖榴. 兽医药理学 M. 中国农业出版社, 224 - 225.
- [2] 戎映君, 陈盛禄等. 蜜蜂美洲幼虫腐臭病研究进展 J. 中国蜂业, 2006, 8 (57): 11 - 13.
- [3] 戴自英, 刘裕昆, 汪复. 实用抗菌药理学 M. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 219.
- [4] 国家药典委员会. 临床用药须知 M. 3 版. 北京: 化学工业出版社, 2001: 685.
- [5] VCAISHP. Physician's desk reference M. 54th ed. Montvale: Medical Economics Company, 2000: 2423.
- [6] 陈世铭. 药物不良相互作用的临床意义与处理 M. 北京: 中国科学技术出版社, 1993: 170.
- [7] LAWRENCE J F. Organic trace analysis by liquid chromatography M. London: Academic Press, 1981: 198.
- [8] STEINWANDER H. Universal extraction and cleanup methods C // SHERMA J. Analytical methods for pesticides and plant growth regulators, advanced analytical techniques, Vol X V. San Diego: Academic Press, Inc, 1989: 35.
- [9] MCMURRAY C H, BLANCHFLOWER W J, RICE D A. Gas chromatographic-mass spectrometric detection and quantitation of lincomycin in animal feed stuffs J. J Assoc Off Anal Chem, 1984, 67(3): 582 - 588.

作用。

(2) 樱桃汁提取的最佳条件为: 物料比为 1:2, 浸提温度 80, 反应时间 10 min, 樱桃汁用量为 25 ml。

参考文献

- [1] 周家华, 杨辉荣, 黎碧娜. 食品添加剂 M. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [2] 天津轻工业学院食品工业教学研究室. 食品添加剂 M. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [3] 蔺毅峰, 王俊贤, 高文庚. 食品工艺实验与检验技术 M. 北京: 轻工业出版社, 2005.
- [4] 于信令, 林云芬. 食品添加剂检验方法 M. 北京: 中国轻工业出版社, 2003.
- [5] 刘志皋, 高彦祥. 食品添加剂基础 M. 北京: 中国轻工业出版社, 1997.
- [6] 曹会兰. 亚硝酸盐对人体的危害和预防 J. 微量元素与健康研究, 2003 (2): 78 - 80.
- [7] 丁旭光, 张捷莉, 刘志强, 等. 几种肉制品中硝酸盐的测定 J. 食品科技, 2004, 25(10): 276 - 279.
- [8] 方正祥, 张水华, 高建华, 等. 一些果蔬对活性自由基和亚硝酸盐的清除作用 J. 食品与发酵工业, 1995(2): 31 - 35.
- [9] 赵玉斌, 胡樱樱, 王增珍, 等. 大葱清除亚硝酸盐的实验研究 J. 食品科学, 2001(5): 76 - 77.
- [10] 刘莲芳, 王式箴, 李家瑞. 食品添加剂的分析方法 M. 北京: 轻工业出版社, 1998.