

液相色谱-电喷雾串联质谱法检测鸡组织中5种聚醚类药物残留

梁春来, 程林丽, 沈建忠, 张玉洁, 张素霞*

(中国农业大学动物医学院, 国家兽药残留基准实验室, 北京 100193)

摘要 :建立了鸡组织中聚醚类药物多残留检测的高效液相色谱-电喷雾串联质谱方法。采用甲醇提取鸡组织中的拉沙洛菌素、盐霉素、莫能菌素、甲基盐霉素和马杜霉素,经硅胶柱净化,以乙腈(含0.1%甲酸)-0.1%甲酸水溶液(体积比为97:3)为流动相,Symmetry Shield RP18作为色谱分析柱,多反应监测(MRM)正离子扫描方式进行质谱检测。当5种聚醚类药物的添加水平为鸡肉0.1~1500 μg/kg、鸡肝0.2~4500 μg/kg时,平均回收率为71.6%~99.1%,日内测定的相对标准偏差(RSD)($n=5$)为3.2%~10.7%,日间RSD($n=3$)为4.6%~14.7%。2种鸡组织中5种聚醚类药物的定量限为0.1~1.0 μg/kg。该方法的灵敏度、准确度和精密度均符合兽药残留分析技术的要求,适用于鸡肉和鸡肝中5种聚醚类药物的多残留检测。

关键词 :液相色谱-电喷雾串联质谱法;聚醚类药物;鸡肉;鸡肝

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)06-0815-05 栏目类别 :研究论文

Determination of 5 polyether antibiotics in chicken tissues by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

LIANG Chunlai, CHENG Linli, SHEN Jianzhong, ZHANG Yujie, ZHANG Suxia*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, National Reference Laboratory for Veterinary Drug Residue, Beijing 100193, China)

Abstract : A liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS) method for the determination of 5 polyether antibiotics (lasalocid, salinomycin, monensin, narasin and maduramicin) in chicken tissues was developed. The polyether antibiotics were extracted from chicken tissues with methanol. The extract was evaporated to dry, and re-dissolved in hexane, then cleaned up on a Sep-Pak Silica solid-phase extraction cartridge. The target drugs were eluted with 6 mL methylene chloride-methanol (90:10, v/v), and the eluate was collected and dried under a gentle stream of nitrogen gas, then the residue was dissolved with 1 mL acetonitrile (containing 0.1% formic acid) and analyzed by LC-MS/MS. The LC separation was performed on a Symmetry Shield reversed phase C18 bonded silica column with acetonitrile (containing 0.1% formic acid) - 0.1% formic acid (97:3, v/v) as mobile phase. The quantification was carried out by positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The validation was carried out on spiked chicken muscle (spiked at 0.1 - 1500 μg/kg) and chicken liver (spiked at 0.2 - 4500 μg/kg), the average recoveries of target drugs ranged from 71.6% - 99.1% with intra-day relative standard deviations (RSDs) of 3.2% - 10.7% and inter-day RSDs of 4.6% - 14.7%. The limits of quantification (LOQs) in chicken muscle and liver were 0.1 - 1.0 μg/kg. The results demonstrated that the sensitivity, accuracy and precision of this method meet the requirements of veterinary drug residue analysis. The method is applicable to detect 5 polyether antibiotics in chicken muscle and liver.

Key words : liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI MS/MS); polyether antibiotics ; chicken muscle ; chicken liver

* 通讯联系人:张素霞,博士,教授,研究方向为兽药残留分析。Tel: (010) 62733289, E-mail: suxia@cau.edu.cn.

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(No. 2006BAK02A08-3)。

收稿日期:2009-03-27

聚醚类抗生素 (polyether antibiotics, PEs) 是从金色链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*) 的发酵产物分离得到的一类离子载体抗生素, 对多种球虫有抑制作用, 并能提高饲料转化率, 促进家畜生长, 在家畜生产中广泛应用。但是 PEs 毒性较大, 安全范围较窄, 不合理给药或饲料污染会导致动物中毒、动物性食品中药物残留及抗药性问题^[1-2]。目前, 欧盟不允许 PEs 作为饲料添加剂使用, 我国规定鸡肉和鸡肝中 PEs 的最高残留限量 (MRLs) 分别为: 盐霉素 (salinomycin, SAL) 600 和 1 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 甲基盐霉素 (narasin, NAR) 600 和 1 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 莫能菌素 (monensin, MON) 1 500 和 4 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 马杜霉素 (maduramicin, MAD) 240 和 720 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 拉沙洛菌素 (lasalocid, LAS) 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (鸡肝)。因此, 研究建立鸡组织中聚醚类药物多残留检测方法, 对于有效监控该类药物的合理使用、保障我国动物性食品安全具有重要的意义。

目前 PEs 残留的检测方法有微生物法^[3]、免疫学法^[4]、高效液相色谱法 (HPLC)^[5-7]、液相色谱-质谱法 (LC-MS)、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[8-12] 等。微生物法和免疫学法适用于药物的快速筛选, 但无法准确地对其定性定量, 且存在假阳性现象。HPLC 法多采用柱前衍生化^[5-6] 或柱后衍生化^[7], 操作相对繁琐, 且未检索到可同时分析盐霉素、甲基盐霉素、莫能菌素、马杜霉素、拉沙洛菌素的方法。LC-MS 法、LC-MS/MS 法不需衍生化, 样品处理简单快速, 可同时检测上述 5 种药物, 而且后者还能获得更高的灵敏度和更佳的定性效果。因此, 本文在已有的研究基础上, 对样品前处理方法进行了优化, 建立了鸡肉和鸡肝中 5 种聚醚类药物的 LC-MS/MS 检测法, 方法简单快速, 具有良好的回收率和重现性。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Waters 2690 高效液相色谱仪, 配在线脱气机 (美国 Waters 公司); Micromass Quattro LC 三重四极杆串联质谱仪 (英国 Micromass 公司); Anke TDL-40B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); Model 111 氮吹仪 (美国 Organomation Associates 公司); Bü CHI Heating Bath B490 旋转蒸发仪 (德国 Bü CHI 公司); HQ-60 涡动仪 (北京同正生物技术有限公司); Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); Sep-Pak Silica 固相萃取柱 (500 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司)。

乙腈 (农残级)、甲酸 (色谱纯, 美国 Dima 公

司); 甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); Milli-Q 纯化水; 正己烷、二氯甲烷、正丙醇和乙醚均为分析纯 (北京化学试剂公司)。标准品 (纯度): 盐霉素 ($\geq 98\%$)、甲基盐霉素 ($\geq 97\%$)、莫能菌素 (90% ~ 95%)、马杜霉素 (98.1%) 和拉沙洛菌素 ($\geq 98\%$) (均购于美国 Sigma 公司)。

标准储备液和标准工作液的配制: 称取适量的 SAL、NAR、MON、MAD、LAS 标准品, 用甲醇分别配制成 500 mg/L 的标准储备液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。从冰箱中将标准储备液取出, 恢复至室温, 取适量的标准储备液并用甲醇稀释, 配制成混合标准工作液, 密封, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。

1.2 仪器条件

1.2.1 液相色谱条件

色谱柱: Symmetry Shield RP18 (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (含 0.1% (体积分数, 下同) 甲酸)-0.1% 甲酸水溶液 (体积比为 97:3); 流速 0.2 mL/min; 柱温 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 进样量 10 μL 。

1.2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (ESI), 多反应监测 (MRM), 正离子扫描; 毛细管电压 2.8 kV; 离子源温度 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$; 去溶剂温度 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; 反吹气 (N_2) 流速 25 L/h; 去溶剂气 (N_2) 流速 450 L/h; 碰撞气 (Ar) 压力 0.2 Pa; 倍增器电压 650 V; 其他条件见表 1。

表 1 测定 5 种聚醚类药物的串联质谱参数

Table 1 MS/MS parameters for the determination of 5 polyether antibiotics

Analyte	Retention time/ min	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)	Cone voltage/ V	Collision energy/ eV
Lasalocid (拉沙洛菌素)	5.22	613.4	377.3*	50	35
			359.4	50	35
Salinomycin (盐霉素)	5.32	773.3	431.2*	45	50
			265.1	45	55
Monensin (莫能菌素)	5.97	693.4	461.3*	50	48
			479.4	50	48
Narasin (甲基盐霉素)	6.20	787.3	431.2*	50	50
			531.2	50	45
Maduramicin (马杜霉素)	6.67	939.8	877.5*	50	50
			719.0	50	55

* quantification ion.

1.3 样品前处理方法

称取 2.00 g 匀浆的鸡肉或鸡肝于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇, 涡动 2 min, 离心 (3 500 r/min) 5 min, 取上清液于 50 mL 鸡心瓶中; 剩余残渣用 10 mL 甲醇重复提取 1 次; 合并上清液。向鸡心瓶中加入 3 mL 正丙醇, 混匀, 于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至干, 用 3 mL 正己烷洗涤鸡心瓶, 涡动 30 s, 转入 10 mL 离心管中, 再用 2 mL 正己烷洗涤鸡心瓶, 转入相同离心管中, 离心 (3 500 r/min) 5 min, 取上

清液备用。

用 5 mL 正己烷预洗硅胶柱,并使正己烷不流干。将收集的上清液过柱,用 8 mL 正己烷-乙醚(体积比为 50:50)淋洗,再用 6 mL 二氯甲烷-甲醇(体积比为 90:10)洗脱,收集洗脱液,并于 40 °C 下用氮气吹干,然后用 1 mL 乙腈(含 0.1% 甲酸)复溶,过 0.2 μm 有机滤膜,滤液供 LC-MS/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 基质添加标准曲线

取空白鸡肉和鸡肝按 1.3 节的方法进行前处

理,在洗脱溶液中加入适当体积的混合标准工作溶液,配制成质量浓度为 0.2 ~ 1 000 μg/L 的一系列基质添加标准溶液,于 40 °C 下用氮气吹干,加入 1 mL 乙腈(含 0.1% 甲酸)复溶,过 0.2 μm 有机滤膜,滤液用于 LC-MS/MS 分析。以质量浓度为横坐标,各药物定量离子的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到的线性范围及相关系数如表 2 所示。在相应的质量浓度范围内,各药物定量离子的峰面积与质量浓度呈线性关系,相关系数(r^2)均大于 0.99。若待测样品中各目标物的质量浓度不在该范围内,则将其稀释或浓缩后进样分析。

表 2 鸡肉和鸡肝中 5 种聚醚类药物的线性范围、相关系数(r^2)、检出限($S/N=3$)、定量限($S/N=10$)以及各添加浓度水平下的平均回收率和日内、日间测定的相对标准偏差(RSD)

Table 2 Linear ranges, correlation coefficients (r^2), limits of detection (LOD, $S/N=3$), limits of quantification (LOQ, $S/N=10$), the average recoveries, relative standard deviations (RSD) of intra-day and inter-day determinations of five PEs spiked at 3 levels in chicken muscle and liver

Sample	Analyte	Linear range/ (μg/L)	r^2	LOD/ (μg/kg)	LOQ/ (μg/kg)	Spiked/ (μg/kg)	Recovery ($n=5$)/%	RSD of intra-day ($n=5$)/%	RSD of inter-day ($n=3$)/%
Chicken muscle	lasalocid (拉沙洛菌素)	0.2 - 200	0.9999	0.03	0.1	0.1	86.4	8.0	11.7
						40	91.9	3.9	7.8
						400	81.9	6.1	11.8
	salinomycin (盐霉素)	0.2 - 200	0.9982	0.06	0.2	0.2	93.9	6.7	9.3
						60	91.9	4.7	8.5
						600	88.9	4.3	9.6
monensin (莫能菌素)	0.2 - 200	0.9974	0.07	0.2	0.2	90.8	4.4	9.6	
					150	86.9	4.8	11.0	
					1500	89.8	4.4	8.7	
narasin (甲基盐霉素)	0.2 - 200	0.9959	0.06	0.2	0.2	88.3	4.0	9.4	
					60	99.1	3.2	4.6	
					600	84.9	4.8	10.5	
maduramicin (马杜霉素)	0.4 - 200	0.9991	0.20	0.5	0.5	94.2	6.5	8.9	
					24	96.5	8.5	9.7	
					240	86.7	6.2	13.7	
Chicken liver	lasalocid (拉沙洛菌素)	0.2 - 1000	0.9902	0.07	0.2	0.2	74.6	9.1	14.7
						40	71.6	10.7	10.7
						400	83.4	10.2	10.5
	salinomycin (盐霉素)	0.4 - 1000	0.9978	0.13	0.4	0.4	90.8	8.1	8.2
						180	85.5	9.3	11.7
						1800	80.2	7.9	8.1
monensin (莫能菌素)	0.4 - 1000	0.9987	0.14	0.4	0.4	94.2	5.4	6.5	
					450	94.4	6.9	8.6	
					4500	91.0	5.9	7.3	
narasin (甲基盐霉素)	0.4 - 1000	0.9942	0.13	0.4	0.4	87.5	8.6	13.1	
					180	84.7	9.4	12.6	
					1800	77.4	7.1	9.1	
maduramicin (马杜霉素)	2 - 400	0.9959	0.40	1.0	1.0	90.4	9.3	11.0	
					72	95.5	8.2	8.7	
					720	91.6	5.3	11.5	

2.2 灵敏度

取 20 个空白样品按 1.3 节的方法进行前处理,LC-MS/MS 检测。按信噪比(S/N) = 3 为检出限(LOD), $S/N=10$ 为定量限(LOQ),结果见表 2,可见鸡肉和鸡肝中 5 种聚醚类药物的检出限为 0.03 ~ 0.40 μg/kg,定量限为 0.1 ~ 1.0 μg/kg。

2.3 准确度和精密度

取 2.00 g 空白鸡肉和鸡肝,以定量限、0.1 倍及 1 倍的 MRL^[13] 3 个浓度水平(见表 2)进行添加回收试验,按 1.3 节的方法前处理后用 LC-MS/MS 检测。鸡肉空白样品和加标样品的色谱图见图 1,可看出各药物的峰形良好,目标物出峰处无杂峰干扰。

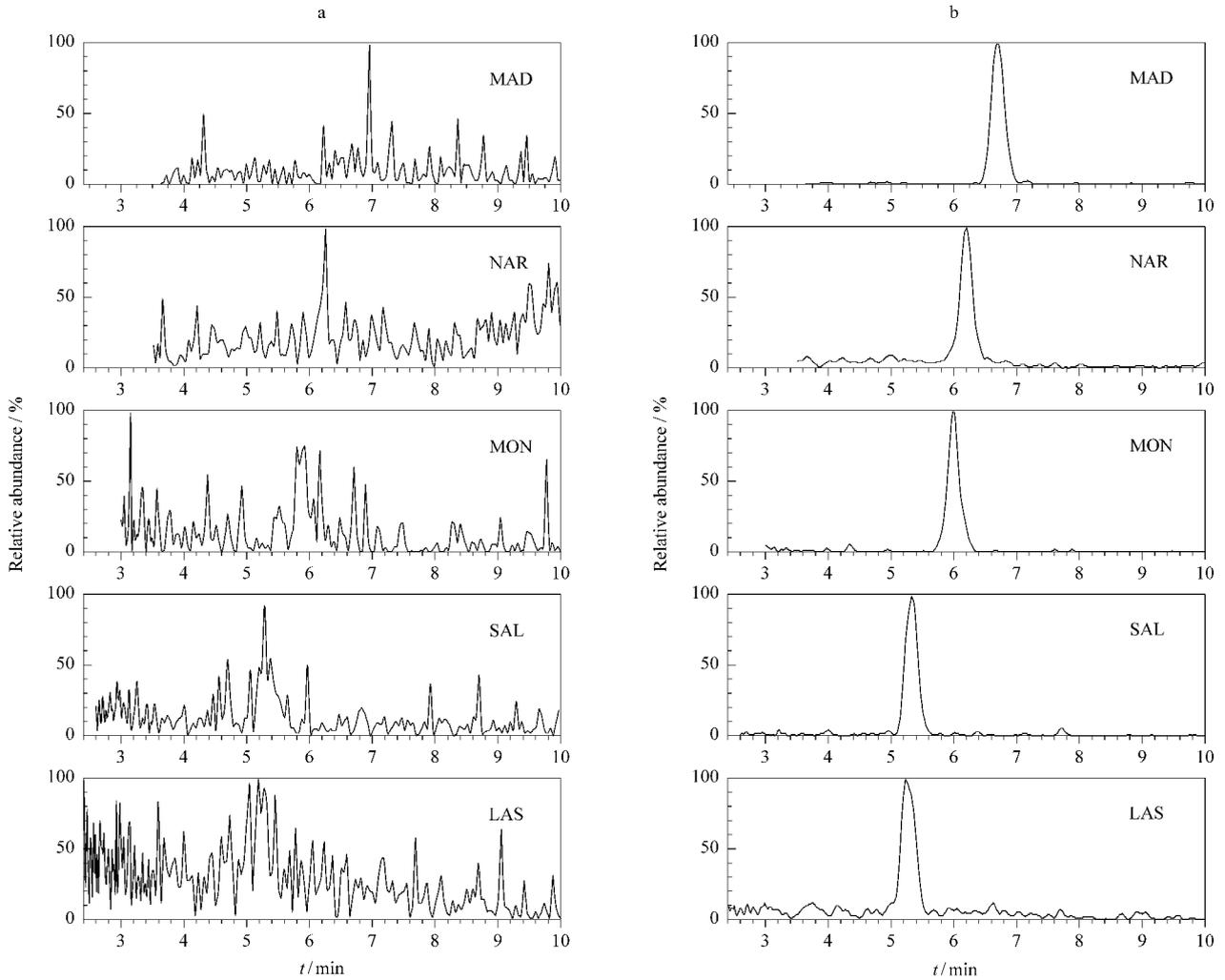


图 1 鸡肉 (a) 空白样品和 (b) 空白加标样品 (MAD、NAR、MON、SAL 和 LAS 添加水平分别为 0.5、0.2、0.2、0.2、0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的 MRM 总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion current chromatograms of (a) blank chicken muscle and (b) blank chicken muscle spiked with PEs (spiking levels were 0.5, 0.2, 0.2, 0.2, 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for MAD, NAR, MON, SAL and LAS, respectively) by MRM mode

对每个浓度水平每天做 5 个平行测试,连续做 3 d,计算添加回收率、日内和日间测定的 RSD。结果如表 2,可见在 3 个添加浓度水平下,鸡肉和鸡肝中 5 种聚醚类药物的平均回收率分别为 81.9% ~ 99.1% 和 71.6% ~ 95.5%;日内 RSD 分别为 3.2% ~ 8.5% 和 5.3% ~ 10.7%,日间 RSD 分别为 4.6% ~ 13.7% 和 6.5% ~ 14.7%,表明本文所建立的方法回收率高,精密度好。

2.4 前处理条件的优化

2.4.1 提取条件的优化

聚醚类药物通常用乙腈^[8-11,14]作为提取溶剂,振荡^[8,10,11,14]或超声^[9]的方法提取,偶尔也用甲醇^[15]提取鸡肝中的拉沙洛菌素。我们对这些方法均进行了研究,结果表明,超声或振荡对回收率没有明显的影响。采用乙腈提取 LAS 的回收率略低,为 65% 左右,其他 PEs 的回收率为 80% 左右,和 Jes-

toi 等^[11]报道的基本一致,同时我们发现在添加浓度增高后回收率不能达到残留分析的要求,如用乙腈提取鸡肉中添加水平为 0.1 倍的 MRL 时回收率仅为 40% ~ 65%,添加水平为 1 倍的 MRL 时回收率更低,而采用甲醇提取的药物回收率较高。因此最后采用甲醇涡动 2 min 提取 5 种聚醚类药物,回收率均达到要求,稳定性好,基质对测定无干扰,且操作过程简单快速。

2.4.2 固相萃取条件的优化

本文按 Rokka 等^[10]报道的硅胶柱固相萃取方法进行的研究时,5 种药物在添加水平不大于 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时萃取回收率大于 90%,添加 0.1 倍的 MRL (鸡肉)时萃取回收率大于 65%,添加 1 倍的 MRL (鸡肉)时 LAS、MON 和 MAD 的萃取回收率均大于 75%,但 SAL 和 NAR 低于 20%,该结果表明大部分 SAL 和 NAR 发生了柱保留。因此,我们先尝试使用

4 mL 甲醇洗脱,将药物全部洗脱下来,但由于甲醇洗脱能力很强,在获得高回收率的同时也带来了严重的杂质干扰,对质谱仪的污染很大。Hormazúbal 等^[16]用正己烷作为上样液,以乙醚-正己烷(体积比为 60:40)、二氯甲烷-乙醇(体积比为 99.5:0.5)、氯仿依次洗涤,再用二氯甲烷-甲醇(体积比为 90:10)洗脱。参考该文献,本文以正己烷为上样液,对不同比例的乙醚-正己烷(体积比分别为 60:40,50:50,40:60)作为淋洗液进行了研究,确定了二者体积比为 50:50 时,洗涤效果好且回收率高。二氯甲烷-甲醇(体积比为 90:10)作为洗脱液其溶剂强度比甲醇低,能减少极性杂质的共洗脱,而目标药物的洗脱效果好。因此,最终我们采用正己烷为上样液,乙醚-正己烷(体积比为 50:50)洗涤,二氯甲烷-甲醇(体积比为 90:10)洗脱,保证回收率的同时达到去除杂质的作用,使空白无干扰,并减少了有机溶剂的用量,缩短了处理时间。

2.5 方法的应用

用本文建立的方法对购自北京超市的 5 份鸡肉和 10 份鸡肝进行检测,其中 4 份鸡肝检出马杜霉素残留,4 份鸡肝检出莫能菌素残留,2 份鸡肝检出甲基盐霉素残留,2 份鸡肝检出盐霉素残留,但残留量均不超过 20 ng/g,低于我国规定的 PEs 最高残留限量。

3 结语

建立了可同时检测鸡肉和鸡肝中 SAL、NAR、LAS、MAD 和 MON 多残留的 LC-MS/MS 方法。在已有的研究基础上对样品的前处理方法进行了优化和改进。该方法简单快速,回收率高,重现性好,适用于鸡肉和鸡肝中聚醚类药物的多残留检测。

参考文献:

- [1] Dowling L. Avian Pathol, 1992, 21(3):355
- [2] Kong F Y, Ning C S, Yin P Y. Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis (孔繁瑶, 宁长申, 殷佩云. 北京农业大学学报), 1994, 20(3):302
- [3] Shang J, Wu X Y, Gu X. Chinese Journal of Veterinary Drug (商军, 吴霞云, 顾欣. 中国兽药杂志), 1999, 33(1):7
- [4] Hagren V, Peippo P, Tuomola M, et al. Anal Chim Acta, 2006, 557(1/2):164
- [5] Miyakawa H, Horii S, Kokubo Y. J Food Hyg Soc Japan, 1995, 36(6):725
- [6] Martinez E E, Shimoda W. J Assoc Off Anal Chem, 1986, 69(4):637
- [7] Zhang S X, Shen J Z, Lv Y B, et al. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica (张素霞, 沈建忠, 吕亚滨, 等. 畜牧兽医学报), 2000, 31(6):530
- [8] Dubois M, Pierret G, Delahaut Ph. J Chromatogr B, 2004, 813(1/2):181
- [9] Mortier L, Daeseleire E, Peteghem C V. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(4):533
- [10] Rokka M, Peltonen K. Food Addit Contam, 2006, 23(5):470
- [11] Jestoi M, Rokka M, Peltonen K. Mol Nutr Food Res, 2007, 51(5):625
- [12] Bi Y F, Zhong F, Wu Q, et al. Chinese Journal of Veterinary Drug (毕言锋, 仲锋, 吴启, 等. 中国兽药杂志), 2008, 42(12):23
- [13] Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号). (2002-12-24)[2009-03-10]. <http://down.foodmate.net/ziliao/sort/7/5345.html>
- [14] Heller D N, Nochetto C B. J Agric Food Chem, 2004, 52(23):6848
- [15] Zhang S X, Shen J Z, Ding S Y, et al. Chinese Journal of Veterinary Drug (张素霞, 沈建忠, 丁双阳, 等. 中国兽药杂志), 2004, 38(1):19
- [16] Hormazúbal V, Yndestad M. J Liq Chrom & Rel Technol, 2000, 23(10):1585