

超高效液相色谱串联质谱法对鳗鱼中大环内酯类、 喹诺酮类和磺胺类兽药残留量的同时测定

陈莹, 陈辉, 林谷园, 林荆, 江滨炜, 吴文凡

(福清出入境检验检疫局 技术中心, 福建 福清 350300)

摘要: 建立了同时测定鳗鱼组织中大环内酯、喹诺酮和磺胺类共 25 种兽药残留的超高效液相色谱串联质谱分析方法。采用多反应监测模式进行测定, 外标法定量, 鳗鱼组织在酸化条件下用乙腈提取, 经正己烷除油, 检出限为 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。除泰乐菌素外, 回收率均在 $60\% \sim 97\%$ 之间, 相对偏差不大于 12.6% , 线性回归相关系数在 $0.9974 \sim 0.9999$ 之间。

关键词: 超高效液相色谱串联质谱法; 大环内酯; 喹诺酮类; 磺胺类; 兽药; 鳗鱼

中图分类号: O657.63 R978.15 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2008)05-0538-04

Simultaneous Determination of 25 Macrolides, Quinolones and Sulfonamides Residues in Eels by Ultra Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

CHEN Ying CHEN Hui LIN Gu-yuan LIN Jing JIANG Bin-wei WU Wen-fan

(Inspection and Quarantine Technology Center, Fuqing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuqing 350300 China)

Abstract A UPLC-MS/MS method to simultaneously detect veterinary residues of macrolides, quinolones and sulfonamides in eel was established. The eel tissue was extracted by acidified acetonitrile, degreased by *n*-hexane. The detection limit were $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$. Except for tylosin, the recovery were $60\% \sim 97\%$, $\text{RSD} \leq 12.6\%$, the relative coefficients of their regression equations were $0.9974 \sim 0.9999$.

Key words UPLC-MS/MS; macrolides; quinolones; sulfonamides; veterinary; eel

大环内酯 (macrolides)、喹诺酮 (quinolones) 和磺胺类 (sulfonamides) 化合物是合成抗菌剂, 广泛应用于水产品养殖中, 大环内酯类可用于防治呼吸道疾病或在饲料中作促生长剂, 喹诺酮应用于系统各种感染症的防治, 磺胺类是常用的抗菌、抗原虫药物。但这些合成抗菌剂具有导致过敏反应和使人体产生抗药性等副作用, 世界各国对此有严格的限量要求。因此监测多种抗生素的残留对促进水产品出口和保证动物源性食品安全具有积极意义。

从目前文献和资料方法来看, 抗生素类检测方法的对象局限于单类抗生素在一种或多种基质中的残留^[1-4], 可能是由于这些化合物的结构和化学特性不同, 导致多类合成抗菌剂在动物组织中残留的同时检测技术难度加大^[4-8]。本文在文献研究基础上, 应用电喷雾正离子扫描和多反应监测 (MRM) 技术, 建立了超高效液相色谱串联质谱法同时测定鳗鱼组织中大环内酯、喹诺酮和磺胺类共 25 种兽药残留量的方法。本方法操作简便、选择性和灵敏度高、分析时间短, 可满足进出口鳗鱼中多种抗菌剂残留量检测分析和确证工作的需要。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪 UPLC (美国 Waters 公司), 串联四极杆质谱仪 (美国 Waters 公司), 超纯水仪 (Millipore Gradient), 均质器 (德国 IKA T18)。甲酸和甲醇为色谱纯 (Merck 公司), 其他试剂均为分

收稿日期: 2007-07-23 修回日期: 2007-10-17

基金项目: 福清出入境检验检疫局科技资助项目 (FQ2007009)

第一作者: 陈莹 (1980-), 女, 福建莆田人, 硕士研究生, Tel: 0591-85347223, E-mail: cycurl@yahoo.com.cn

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

析纯(中国国药化学试剂有限公司), 水为 Millipore-Q 超纯水; 兽药标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer公司)。
标准溶液: 由甲醇配制为 100 mg/L 标准储备液, 4 ℃避光保存。

1.2 样品处理

称取 5.00 g均质后的鳗鱼组织样品、5 g无水硫酸钠, 置于 50 mL离心管中, 加入 0.1% (体积分数)甲酸水溶液 4 mL和 25 mL乙腈, 匀浆 1 min, 超声振荡 15 min, 以 3 800 r/min离心 5 min, 上清液移入分液漏斗中; 残渣用 15 mL乙腈重复提取 1次, 合并上清液; 加 10 mL用乙腈饱和的正己烷于分液漏斗中, 振荡后取乙腈层至鸡心瓶中, 正己烷层用 5 mL 乙腈重复提取 1遍, 合并乙腈层; 加 2 mL 正丁醇于鸡心瓶作为消泡剂, 37 ℃ 水浴中旋转蒸发至近干, 准确加入 1 mL流动相和 1 mL正己烷溶解残渣, 洗脱液转移至 5 mL离心管中, 以 12 000 r/min离心 3 min, 取下层清液, 过 0.22 μm 滤膜, 待测。

1.3 色谱条件

色谱柱 Acquity UPLC BEH C₁₈, 2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm (美国 Waters公司); 流动相: 甲醇(0.1% 甲酸)–20 mmol/L 乙酸铵水溶液(0.1% 甲酸), 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 0.3 mL/min; 柱温 36 ℃; 进样量: 5 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

Time <i>t</i> /min	Flow rate <i>v</i> /(mL·min ⁻¹)	Methanol φ/%	Ammonium acetate φ/%	Curve
0	0.3	3	97	Initial
0.5	0.3	3	97	6
15	0.3	45	55	6
17	10	90	10	6
19	0.3	90	10	6
21	0.3	3	97	1
23	0.3	3	97	1

1.4 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子扫描模式, 多反应监测 MRM; 毛细管电压 3.5 kV; 离子源温度 120 ℃; 雾化气流速 700 L/h, 反吹气流速 50 L/h, 其他质谱参数见表 2。

表 2 25种兽药的 LC–ESIMS/MS 仪器参数
Table 2 LC–ESIMS/MS parameters for 25 veterinaries

Compound (化合物)	Formula (分子式)	MRM transition [*] (MRM 离子对) <i>m/z</i>	Cone voltage (锥孔电压) <i>V/V</i>	Collision energy <i>V/eV</i> (碰撞能量)	Retention time (保留时间) <i>t</i> /min
Sulfacetamide(磺胺醋酰)	C ₈ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	215. 2/156. 3 215. 2/108. 1	30	25, 18	3. 17
Sulfadiazine(磺胺嘧啶)	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251. 2/156. 0 251. 2/108. 1	30	18, 25	4. 48
Sulfathiazole(磺胺噻唑)	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	256. 2/92. 0 256. 2/108. 0	30	25, 20	5. 31
Sulfapyridine(磺胺吡啶)	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250. 2/155. 9 250. 2/107. 9	30	15, 25	5. 84
Sulfamerazine (磺胺甲基嘧啶)	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265. 2/156. 2 265. 2/108. 2	30	18, 25	6. 08
Sulfamethazole (磺胺甲噻二唑)	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	271. 2/108. 0 271. 2/155. 9	30	22, 15	7. 33
Sulfamethazine (磺胺二甲嘧啶)	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279. 1/108. 0 279. 1/124. 0	35	28, 22	7. 65
Lincmycin(林可霉素)	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	407. 3/126. 2 407. 3/359. 3	35	25, 20	7. 85
Sulfamer (磺胺对甲氧嘧啶)	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281. 2/155. 9 281. 2/108. 0	30	20, 15	8. 07
Sulfachloropyridazine (磺胺氯哒唑)	C ₁₀ H ₉ CN ₄ O ₂ S	285. 1/92. 0, 285. 1/155. 9	30	30, 15	8. 38
Oxfloxacin(氧氟沙星)	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	362. 3/318. 0 362. 3/261. 1	40	25, 18	8. 67
Norfloxacin(诺氟沙星)	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	320. 2/302. 2 320. 2/231. 1	40	25, 40	8. 93
Sulfamethoxypyridazine (磺胺甲氧哒唑)	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281. 2/155. 9 281. 2/108. 0	30	20, 15	9. 01
Ciprofloxacin(环丙沙星)	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	332. 2/314. 1 332. 2/231. 0	40	20, 35	9. 33
Danofloxacin(单诺沙星)	C ₂₀ H ₂₂ FN ₃ O ₃	358. 1/340. 1 358. 1/82. 0	40	22, 40	9. 65
Enrofloxacin(恩诺沙星)	C ₁₉ H ₂₂ F ₃ N ₃ O ₃	360. 2/245. 1 360. 2/342. 1	40	28, 20	9. 85
Sarafloxacin(沙拉沙星)	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	386. 2/342. 1 386. 2/299. 0	40	20, 27	10. 66
Difloxacin(双氟沙星)	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O	400. 2/299. 1 400. 2/356. 1	40	30, 20	10. 64
Sulfadoxin (磺胺邻二甲氧嘧啶)	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	311. 2/156. 0 311. 2/108. 1	30	30, 20	12. 25
Oxolinic acid(噁唑酸)	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	262. 3/244. 2 262. 3/216. 1	35	23, 30	12. 55
Sulfquinolaxaline (磺胺喹恶琳)	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301. 0/156. 0 301. 0/108. 1	30	28, 18	12. 78
Spiramycin(螺旋霉素)	C ₄₃ H ₇₄ N ₂ O ₁₄	843. 6/174. 1 843. 6/699. 6	50	35, 25	14. 81
Flumequine(氟甲喹)	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	262. 3/202. 2 262. 3/244. 3	35	25, 30	15. 96
Tinicosin(替米考星)	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	869. 7/174. 2 869. 7/696. 8	50	45, 40	16. 65
Tylosin(泰乐菌素)	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	916. 6/174. 2 916. 6/772. 7	55	35, 30	17. 05

* bold type stands for quantitative ion pair(黑体表示定量离子对)

2 结果与讨论

2.1 LC-MS/MS条件的优化

实验发现，在流动相中加入乙酸铵可增加喹诺酮类和磺胺类化合物在柱中的保留，其分离度加大且峰形得到有效改善。选择乙腈和含 0.1%（体积分数，下同）甲酸的水溶液作流动相时，目标化合物的响应值比用甲醇和含 0.1% 甲酸的水溶液为流动相时低，可能因为乙腈降低了目标化合物的离子化效率，目标化合物的响应值亦随之降低。以纯甲醇或乙腈作为定容液时，喹诺酮类化合物的响应值较低，且出峰时间不稳定，因此选用甲醇和含 0.1% 甲酸的水溶液作为定容液。

在质谱条件中，各化合物均选用 $[M+H]^+$ 作为母离子，磺胺的子离子^[9]多为 *p*-氨基苯磺酸部分 $[M-RNH_2]^+$ (*m/z* 156)， $[M-RNH_2-SO_2]^+$ (*m/z* 108)， $[M-RNH_2-SO_2]^+$ (*m/z* 92)和不同的胺类离子 RNH_3 $[MH-155]^+$ ；喹诺酮的子离子^[2]为脱羧峰 $[M+H-CO_2]^+$ 和脱羧后哌嗪环断裂重排 $[M+H-CO_2-C_2H_4NR]^+$ ；大环内酯的子离子主要有 $[M+2H-C_8H_{15}O_3]^+$ 和 $[C_8H_{15}NO_3+H]^+$ 等^[10-11]。

2.2 前处理条件的选择

在实验中，对比了乙腈、二氯甲烷和乙酸乙酯等不同有机溶剂作为提取液时对实验结果的影响。结果表明二氯甲烷和乙酸乙酯作为提取剂时，油脂过多，不易控制，而选择乙腈时，3类抗菌剂的回收率均较佳。

在鳗鱼肌肉组织中加入 0.1% 甲酸水溶液，回收率明显增加。由于鳗鱼组织中蛋白质和油脂含量较高，在实验过程中油脂含量过高使得回收率降低和稳定性较差，在提取步骤中加入无水硫酸钠，可减少旋转蒸发时油脂对回收率的影响。

2.3 线性、回收率、精密度与检出限

在最佳的分离条件下，配制系列浓度的混合标准溶液进行测定，以各化合物峰面积 (*y*)对兽药含量 (*x*, $\mu\text{g/kg}$)绘制工作曲线，见表 3。结果表明，UPLC-MS/MS分析方法同时测定大环内酯类、喹诺酮类和磺胺类兽药，在 1~100 $\mu\text{g/kg}$ 范围内线性良好，相关系数在 0.997 4~0.999 9 之间，满足定量要求。

在鳗鱼空白样品中添加 3个水平的 25种抗菌剂的混合标准溶液，按“1.2”方法做回收率实验。每个添加浓度重复 6次，计算添加回收率和结果相对标准偏差，结果见表 3。根据 $SN \geq 3$ 作为检出限，除了磺胺噻唑为 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 外，其他均达 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 3 25种兽药的线性范围、线性方程及相关系数
Table 3 Linear ranges regression equation and related coefficient for 25 veterinaries

Compound	Linear range $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Regression equation	Related coefficient <i>r</i>	Spiked <i>w</i> /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Recovery <i>R</i> /%	RSD <i>s_r</i> /%
Sulfacetamide	1~100	$y=101.93x-13.18$	0.998 5	5, 10, 20	78.73, 70	5.7, 8.8, 4.6
Sulfadiazine	1~100	$y=50.12x-25.63$	0.999 0	5, 10, 20	78.81, 87	8.5, 7.9, 6.6
Sulfathiazole	1~100	$y=24.56x+2.07$	0.997 8	5, 10, 20	97.93, 89	10.2, 6.3, 11.2
Sulfapyridine	1~100	$y=156.28x+126$	0.999 2	5, 10, 20	82.89, 79	5.7, 12.2, 4.6
Sulfamerazine	1~100	$y=262.28x+4.44$	0.999 0	5, 10, 20	70.69, 75	8.3, 5.7, 6.1
Sulfamethizole	1~100	$y=42.62x+39.37$	0.999 1	5, 10, 20	90.94, 88	7.2, 3.7, 6.4
Sulfamethazine	1~100	$y=182.60x+48.76$	0.999 3	5, 10, 20	74.71, 80	7.2, 5.6, 6.1
Lincomycin	1~100	$y=564.93x+231$	0.999 8	5, 10, 20	79.74, 77	4.9, 7.5, 5.3
Sulfameter	1~100	$y=327.64x+142.08$	0.998 1	5, 10, 20	72.74, 78	6.7, 8.4, 4.4
Sulfachloropyridazine	1~100	$y=121.66x+0.75$	0.999 5	5, 10, 20	70.81, 72	8.8, 9.3, 9.1
Oxfloxacin	1~100	$y=153.77x+30.66$	0.997 5	5, 10, 20	80.79, 78	5.9, 4.4, 6.2
Norfloxacin	1~100	$y=179.15x+86.44$	0.999 5	5, 10, 20	92.83, 81	8.3, 9.1, 8.4
Sulfamethoxypyridazine	1~100	$y=103.45x+31.23$	0.997 4	5, 10, 20	66.78, 72	5.4, 8.1, 6.7
Ciprofloxacin	1~100	$y=69.46x-10.44$	0.998 5	5, 10, 20	75.70, 75	9.0, 7.4, 5.5
Danofloxacin	1~100	$y=346.10x-100.92$	0.999 4	5, 10, 20	81.96, 88	6.9, 7.1, 4.9
Enrofloxacin	1~100	$y=95.54x-37.93$	0.999 1	5, 10, 20	96.95, 87	6.6, 8.1, 3.3
Sarafloxacin	1~100	$y=64.33x-37.55$	0.998 7	5, 10, 20	76.73, 72	10.0, 7.0, 7.5
Difloxacin	1~100	$y=99.74x+16.58$	0.999 9	5, 10, 20	88.83, 82	5.7, 6.0, 6.0
Sulfadoxin	1~100	$y=192.41x+40.77$	0.999 4	5, 10, 20	74.72, 76	8.3, 9.1, 8.5
Oxolinic acid	1~100	$y=172.75x+10.93$	0.998 9	5, 10, 20	72.75, 78	6.3, 4.5, 3.8
Sulfquinolaxaline	1~100	$y=135.57x+64.82$	0.999 2	5, 10, 20	91.82, 81	8.3, 9.1, 8.5

(续表 1)

Compound	Linear range $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Regression equation	Related coefficient r	Spiked $w/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Spiramycin	1~100	$y=190.68x+25.66$	0.999 2	5, 10, 20	67.62, 63	5.1, 4.1, 8.9
Flumequine	1~100	$y=132.45x+49.71$	0.999 4	5, 10, 20	73.70, 78	6.9, 3.4, 7.7
Trimicosin	1~100	$y=643.99x+171$	0.999 7	5, 10, 20	67.60, 65	5.3, 11.6, 4.3
Tybsin	1~100	$y=235.41x+36$	0.999 2	5, 10, 20	44.47, 40	12.6, 11.7, 10.8

参考文献:

[1] 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20751-2006 鳗鱼及制品中十五种喹诺酮类物残留量的测定, 液相色谱-串联质谱法[S]. 2006

[2] 刘玉春, 徐维海, 余莉莉, 等. 固相萃取液相色谱-质谱/质谱联用测定河水中大环内酯类抗生素[J]. 分析测试学报, 2006, 25(2): 1-5

[3] 杨成对, 宋莉晖. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留的液相色谱串联质谱测定[J]. 分析测试学报, 2006, 25(4): 101-103

[4] YE Zhengqi, WENBERG H S. Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 2007, 79: 1135-1144

[5] HELLER D N, NOCHETTO C B, RUMMEL N G, et al. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and 1/2-Lactam residues[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 5267-5278

[6] KOESUKWAT WAT U, JAYANTA S, LEEPIPAT P, BOON N. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk[J]. J Chromatogr A, 2007, 1140: 147-156

[7] YANG Singwoq, CHA Jongmun, CARLSON K. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2005, 1097: 40-53

[8] JACOBSEN A M, SORENSEN B H, NIGERSLEV F, et al. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2004, 1038: 157-170

[9] PLEASANCE S, BLAY P, QUILLIAM M A, et al. Determination of sulfonamides by liquid chromatography, ultraviolet diode array detection and ion-spray tandem mass spectrometry with application to cultured salmon flesh[J]. J Chromatogr A, 1991, 558: 155-164

[10] 胡守, 郭寅龙, 吕龙. 红霉素类抗生素电喷雾/飞行时间质谱源内CD研究[J]. 质谱学报, 2001, 22(2): 10-16

[11] SONIA A, ROSA C, RAMON C, et al. Analysis of macrolide antibiotics in riverwater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2006, 1114: 73-81

(上接第 537页)

[4] 董宇, 孔璋, 钟大放. 液相色谱-质谱联用法检测中药降糖制剂中非法掺入的苯乙双胍和格列本脲[J]. 沈阳药科大学学报, 2005, 22(1): 19-22

[5] ZHONG Guoping, BI Huichang, ZHOU Shufeng, et al. Simultaneous determination of metformin and gliclazide in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of two formulations in healthy volunteers[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2005, 40(11): 1462-1471

[6] VENKATESH P, HARISUDHAN T, CHOUDHURY H, et al. Simultaneous estimation of six antidiabetic drugs-glibenclamide, gliclazide, glipizide, pioglitazone, repaglinide and rosiglitazone: development of a novel HPLC method for use in the analysis of pharmaceutical formulations and its application to human plasma assay[J]. Biomedical Chromatography, 2006, 2: 28

[7] ABURUZ S, MILLERSHIP J, MCELINAY J. The development and validation of liquid chromatography method for the simultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimepiride in plasma[J]. J Chromatogr B, 2005, 817(2): 277-286

[8] 郭继芬, 陈笑艳, 钟大放. 6种口服降糖药的液相色谱-质谱分析[J]. 分析测试学报, 2000, 19(6): 5-8

[9] 国家药典委员会. 临床用药须知[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 534

[10] 余倩, 车宝泉. RP-HPLC 检查中药保健品中的西药降糖成分[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(4): 316-317