

文豪,周绪正,李冰,等.液相色谱-串联质谱法测定羊肉中伊维菌素残留[J].江苏农业科学,2016,44(9):290-292.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.083

液相色谱-串联质谱法测定羊肉中伊维菌素残留

文豪,周绪正,李冰,魏小娟,张继瑜

(中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所/农业部兽用药物创制重点实验室,甘肃兰州 730050)

摘要:为建立以液相色谱-串联质谱检测羊肉中伊维菌素的残留方法,所采用的主要仪器参数为:安捷伦 1200-6410 液质联用仪,ESI 电离源,干燥气温度 250 ℃;安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C₈ 柱;流动相为乙腈-含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液(体积比为 90:10),流速 0.2 mL/min。样品使用乙腈提取,使用碱性氧化铝固相萃取小柱净化,在 10、20、40 μg/kg 的添加水平下,羊肌肉组织中伊维菌素的添加回收率为 87%、87%、89%,变异系数为 4.01%、3.48%、1.14%,方法的定量限为 0.5 μg/kg,该方法可用于检测羊肌肉组织中的伊维菌素的药物残留。

关键词:羊肉;伊维菌素;液相色谱-串联质谱;残留

中图分类号: S852.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0290-03

阿维菌素类(AVMs)药物是由阿维链霉菌产生的一组高效、广谱、安全的大环内酯类抗寄生虫药,国内外广泛应用于包括猪、牛、羊等家畜在内的食品动物中,其中使用最广泛的是伊维菌素^[1]。伊维菌素是一种具有神经毒性的化合物,其脂溶性较强,在动物组织中残留时间较长。当伊维菌素残留过量时,可能会给食品安全带来隐患。欧盟、美国和中国等都设定了最高残留限量(MRLs),欧盟伊维菌素的最高限量标准是 15 μg/kg,美国和中国是 20 μg/kg^[2-5]。羊肉营养价值高,纤维细嫩,其所含的主要氨基酸的种类和数量能满足人体的需要^[6]。因此,随着社会经济的发展,人们出于饮食

营养和健康的考虑,肉食类食品结构也逐渐从快速生产的鸡肉、猪肉转向味美、质优、安全、保健的羊肉,根据国家肉羊产业技术研发中心调查,我国已是羊肉生产和消费大国,羊肉生产已成为我国畜牧业发展的支柱产业^[7]。目前,国内针对伊维菌素的检测方法主要是参照国标 GB/T 21320—2007《动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定》和 SN/T 1973—2007《进出口食品中阿维菌素残留量的检测方法》,并没有专门针对羊组织中伊维菌素残留检测的国家标准,所以对羊组织中伊维菌素残留的检测方法进行研究很有必要。本研究应用液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS),成功建立了羊肉与羊肝组织中伊维菌素残留的检测方法。

收稿日期:2015-07-14

基金项目:国家现代农业肉牛牦牛产业技术体系建设专项(编号:CARS-38);传统中兽医药资源抢救和整理项目(编号:2013FY110600-8)。

作者简介:文豪(1990—),男,硕士研究生,主要从事兽医药理学与毒理学研究。E-mail:wh901226@sina.com。

通信作者:张继瑜,博士,研究员,博士生导师,主要从事兽医药理学与毒理学研究。E-mail:infzjy@sina.com。

1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂

安捷伦 1200-6410 液质联用仪,美国 Agilent 公司生产;高速匀浆机,江苏省金坛市荣华仪器公司生产;KL512 型氮吹仪,北京康林科技有限责任公司生产;湘仪离心机,湘仪公司生产;涡旋振荡器(Heros BIO,RS-2 Shaker);针筒式微孔滤膜过滤器(0.22 μm、有机系),天津津腾试验设备有限公司生

理作用研究进展[J]. 河北医药,2010,32(15):2094-2096.

[4]刘品华,金亚蓉,刘明研,等.臭参地上部分总黄酮含量及抗氧化活性的研究[J]. 西南农业学报,2014,27(5):1894-1898.

[5]孟庆华,于晓霞,张海凤,等.天然黄酮类化合物清除自由基机理及其应用进展[J]. 云南民族大学学报:自然科学版,2012,21(2):79-83.

[6]胡英竹,柳焯.植物黄酮提取物药理活性的研究[J]. 黑龙江医药,2014,27(3):605-606.

[7]谢鹏,张敏红.黄酮类化合物抑菌作用的研究进展[J]. 中国动物保健,2004(12):35-37.

[8]唐浩国,李叶,刘建学.黄酮类化合物抑菌作用的研究进展[J]. 农产品加工·学刊,2008(12):53-55.

[9]周文亮,孙蕴哲,唐星.用大孔树脂纯化柿叶总黄酮工艺考察[J]. 中国药理学杂志,2008,6(5):276-282.

[10]刘细祥,黄斌,马博,等.香蕉皮总黄酮提取工艺及其氧化

活性研究[J]. 食品工业科技,2014,35(12):258-262.

[11]张益娜,翁琴.沙棘叶总黄酮的抑菌性研究[J]. 农产品加工·学刊,2008(9):25-27.

[12]郑津辉,王威,黄辉.苦参提取液中黄酮类化合物的抑菌作用[J]. 武汉大学学报:理学版,2008(4):439-442.

[13]张延杰,田金河.绿豆壳中提取黄酮工艺的研究[J]. 粮食食品科技,2005,13(5):39-40.

[14]徐金龙,李倩,王召君,等.南酸枣皮黄酮提取及其抑菌活性的研究[J]. 食品工业科技,2013,34(11):251-254.

[15]梁梓,杜兵,汪淑芳,等.九节龙总黄酮的抑菌作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):294-295.

[16]李雪峰,符智荣,魏燕,等.田基黄总黄酮提取物的抑菌性能研究[J]. 应用化工,2014,43(3):432-434.

[17]张生潭,王兆玉,兰新宇,等.响应面法优化麻疯树叶总黄酮提取工艺及其抗菌活性研究[J]. 中药材,2013,36(2):308-311.

产;乙腈、甲酸和乙酸铵均为色谱纯,美国 Fisher 公司生产;无水硫酸钠为分析纯(650 °C 灼烧 4 h 生产);试验用水为屈臣氏纯净水;固相萃取 SPE 柱为碱性氧化铝小柱,美国 Sepax 公司生产;99.5% 伊维菌素标准品,中国食品药品检定研究院提供生产;96.0% 内标物多拉菌素(德国 Dr Ehrenstorfer GmbH)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

1.2.1.1 标准储备液的制备 分别准确称取 10 mg 伊维菌素和多拉菌素标准品用乙腈溶解并稀释,分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,置于 -20 °C 冰箱中避光保存。

1.2.1.2 标准中间溶液的制备 分别准确吸取 1 mL 伊维菌素和多拉菌素的标准储备液至 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度混匀即得 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间溶液,于 4 °C 贮藏备用。

1.2.1.3 系列标准工作溶液的制备 用乙腈溶液逐级稀释上述伊维菌素混合标准中间液,配制成浓度不等的系列标准工作溶液,现用现配。

1.2.1.4 基质匹配标准溶液的制备 分别准确量取系列标准工作溶液,依次加入到空白羊肉经提取、净化及浓缩后的样品中,涡旋 30 s,制成基质匹配的系列标准溶液。

1.2.2 LC-MS/MS 条件

1.2.2.1 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正离子模式,动态多反应监测(dynamic MRM)方式采集,毛细管电压 4 kV,碰撞气(N_2)流速 10 L/min,雾化器压力 206.85 kPa,去溶剂气温度 200 °C。伊维菌素与多拉菌素的质谱参数见表 1,质谱结果见图 1。

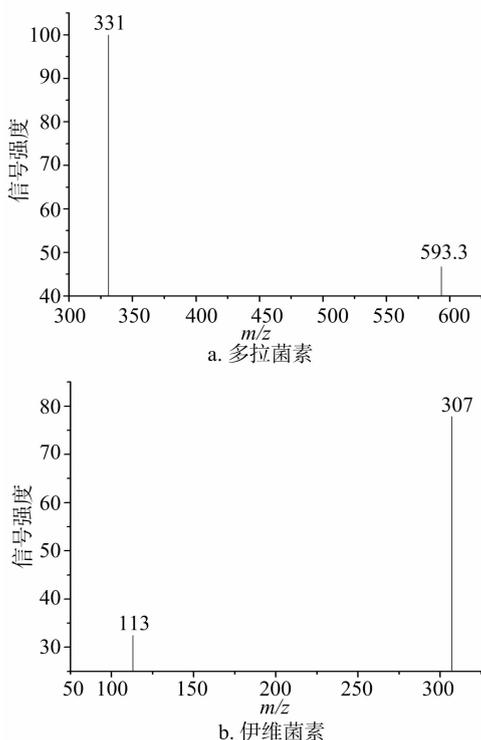


图1 多拉菌素与伊维菌素的 MRM 质谱结果

1.2.2.2 色谱条件 分析柱为安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus

表 1 多反应监测母离子、子离子、碎裂电压和碰撞能量

分析物	母离子的 m/z	碎裂电压 (V)	子离子的 m/z	碰撞能量 (V)	保留时间 (min)
伊维菌素	892.5	140	113/307*	52/24	6.1
多拉菌素	916.5	135	331/593.3*	16/10	4.7

注: * 为定量子离子。

C_8 柱;流动相 A 为乙腈,流动相 B 为含 0.1% 甲酸的 10 mmol/L 乙酸铵水溶液;流速 0.2 mL/min,柱温 25 °C;进样量 5 μL 。

1.2.3 样品的前处理

1.2.3.1 提取 称取剪碎混匀的新鲜组织 2.0 g,置于 50 mL 离心管中,加 8 mL 乙腈,高速匀浆 1 min,涡旋振荡 2 min,超声 5 min,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液至 50 mL 离心管。另取 1 支 50 mL 离心管加入 8 mL 乙腈,洗涤匀质刀头 10 s,洗涤液移入前 1 支离心管中,用玻璃棒捣碎残渣,涡旋振荡 2 min,超声 5 min,4 000 r/min 离心 10 min,合并上清液,待净化。

1.2.3.2 净化 在碱性氧化铝小柱上平铺 2 g 无水硫酸钠,使用 10 mL 乙腈活化,取上述提取液过碱性氧化铝小柱,控制流速 1.0~2 mL/min,之后用 3 mL 乙腈淋洗,收集全部流出液,于 50 °C 水浴氮吹至干,用 1.0 mL 流动相溶解残渣,加入 50 μL 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多拉菌素内标液,过 0.22 μm 有机微孔滤膜后,供 HPLC-MS/MS 测定。

2 结果与分析

2.1 特异性

从图 2 可以看出,按以上方法处理羊肌肉空白样品,空白样品在多拉菌素和伊维菌素出峰处无干扰,方法选择性好。

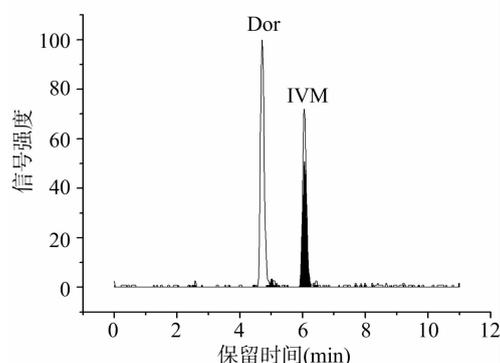


图2 多拉菌素与伊维菌素在羊肉中的特异性

2.2 基质匹配标准曲线的绘制

参照国标 GB/T 21320—2007《动物源食品中阿维菌素药物残留量的测定》,为补偿基质效应,本试验用空白样品提取液配制标准。吸取标准储备液,用空白样品提取液稀释成 1、5、20、40、80、250、500 ng/mL 基质匹配标准溶液,按以上所述仪器条件进行测定。以基质标准溶液浓度(c)为横坐标,伊维菌素特征子离子 m/z 为 307 的色谱峰面积与多拉菌素特征子离子 m/z 为 593.3 的色谱峰面积的比(I)为纵坐标,用最小二乘法进行线性回归得到标准曲线(表 2)。

2.3 添加回收率试验

选取不含伊维菌素本底的羊肉组织样品,进行不同浓度

表2 基质匹配的标准曲线及相关系数

分析物	ρ (ng/mL)	标准曲线	相关系数	检测限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
伊维菌素	1~500	$y=0.0709x+0.1819$	0.9995	0.3	0.5

的伊维菌素加标回收试验,添加水平为10、20、40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 等3个浓度,按以上条件进行分析,得到添加回收率(表3)。

表3 伊维菌素在羊肌肉中的加标回收率与相对标准偏差

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)					RSD (%)
	重复1	重复2	重复3	重复4	重复5	
10	84	82	89	89	89	4.01
20	89	88	87	90	90	3.48
40	85	83	87	87	90	1.14

注: $n=5$ 。

2.4 方法检出限

计算空白组织样品的噪音与对应保留值处的峰面积的比值,以10倍信噪比($S/N>10$)所对应的待测物浓度为最低定量限,确定本方法定量限为0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。以3倍信噪比($S/N>3$)所对应的待测物浓度为检出限,确定本方法检出限为0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结论与讨论

3.1 质谱条件的选择

由于质谱检测时较灵敏,各种因素对检测结果影响较大,本试验选用多拉菌素作为内标物,提高检测的准确性。本试验在ESI源正模式下对伊维菌素与多拉菌素标准溶液(1 mg/L)进行全扫描,得到伊维菌素与多拉菌素的 $[M+NH_4]^+$ 母离子峰,在流动相中加入甲酸以增强待测物的离子化,加入乙酸铵用来促进 $[M+NH_4]^+$ 峰的形成。以该分子离子峰对离子源参数进行优化,使仪器灵敏度达到最高。再对该离子进行二级质谱全扫描,选取二级质谱中没有干扰、信号相对较强的2个特征碎片离子,与其母离子组成2对离子对,对该药物进行定性和定量分析。ESI离子源为软电离方式,伊维菌素在ESI离子源内通常与 H^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 等结合而形成准分子离子峰,其中, $[M+Na]^+$ 离子结构稳定,若对其进行二级质谱裂解,不易得到碎片离子,且 H^+ 、 NH_4^+ 等可竞相与目标分子结合,从而引起 $[M+Na]^+$ 离子丰度极不稳定^[8]。本试验结果显示,离子源去溶剂气体温度对阿维菌素类药物的离子加合物形态有较大的影响。当去溶剂气温度低于250 $^{\circ}\text{C}$ 时,离子加合物主要以 $[M+NH_4]^+$ 形式存在;当去溶剂气温度高于250 $^{\circ}\text{C}$ 时, $[M+Na]^+$ 峰的比例迅速升高,当达到350 $^{\circ}\text{C}$ 时,伊维菌素基本以 $[M+Na]^+$ 峰的形式存在。

3.2 色谱条件的选择与优化

由于伊维菌素是一种相对分子质量较高的弱极性化合物,所以选用反相高效液相色谱进行分离较合适^[9]。本试验对 C_{18} 色谱柱进行观察,结果表明,伊维菌素在 C_{18} 柱上保留相对较强,能完全与杂质分离。由于干燥气温较低,流速越小,其气化越好,所以选定0.2 mL/min为理想流速。在流动相中加入10 mmol/L乙酸铵可有效促进 $[M+NH_4]^+$ 母离子的形

成,同时在流动相中加入0.1%甲酸可有效增强待测物的离子化,最终选择乙腈:缓冲液(0.1%乙酸+10 mmol/L乙酸铵)=90:10为流动相。

3.3 提取条件与净化条件的选择

伊维菌素是一种脂溶性化合物,参考国内外相关文献资料以及GB/T21320—2007《动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定》和SN/T 1973—2007《进出口食品中阿维菌素残留量的检测方法》,伊维菌素的提取选用乙腈作为提取溶剂,亦是如此。乙腈本身对样品中的糖、脂肪和蛋白质的溶解性较小,对蛋白质又有沉淀作用,且乙腈与水可以任意比例混溶,很容易渗透到组织内部,提取效率高,所以试验选用乙腈作为提取溶剂^[10]。实验室较常用的净化方法有液-液萃取法和固相萃取法。碱性氧化铝柱对脂肪以及组织内的内源性因子的去除效果很好,操作简便,而且回收率也高,既保证了试验的准确性,又缩短了分析时间,可以满足方法要求,因此,本试验确定用碱性氧化铝柱净化。

本试验建立了一种超高效液相色谱-质谱法检测羊肉组织中伊维菌素残留量的方法。该法专属性强,灵敏度高,简便准确,准确度、精密度均达到了兽药残留检测的要求,所以适用于羊肉组织中伊维菌素的测定。

参考文献:

- [1] 武志雄,胡江涛,郑卫东,等. 猪肉组织中阿维菌素、伊维菌素残留的高效液相色谱-串联质谱法研究[J]. 四川大学学报:医学版,2010,41(3):523-526.
- [2] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量(续)[J]. 中国兽药杂志,2003,37(4):5-11.
- [3] 中华人民共和国农业部公告第235号[EB/OL]. [2015-06-30]. http://wenku.baidu.com/link?url=NINFLVw8X2GqgaG5z8JfDXLIXFKIZyGLnjTVE__b31BNib204a6P3VMGNRH_sz47Qef_uf2GFIArBUH8aWy-PvSRhregGr_DfCFJbKapz7
- [4] European Medicines Agency, Committee for Veterinary Medicinal Products. EMEA/CVMP/915/04-FINAL, ivermectin summary report (5)[EB/OL]. [2015-06-30]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014505.pdf
- [5] U. S. food and drug administration. 21CFR556.344[EB/OL]. [2015-06-30]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/CFRSearch.cfm?fr=556.344>.
- [6] 康永锋,邹世文,段吴平,等. 超声波-微波辅助提取-高效液相色谱法同时检测羊肉组织中4种非甾体抗炎药物残留[J]. 色谱,2010,28(11):1056-1060.
- [7] 邹世文. HPLC同时检测多种非甾体抗炎药残留的研究[D]. 上海:上海海洋大学,2011.
- [8] 赵国华,曹赵云,牟仁祥,等. 液相色谱-串联质谱法测定蔬菜、水果中5种阿维菌素类药物残留量[J]. 分析测试学报,2012,31(10):1266-1271.
- [9] 郑卫东,胡江涛,阴文娅,等. 高效液相色谱-串联质谱测定猪肝中阿维菌素、伊维菌素残留[J]. 食品科学,2011,32(4):185-188.
- [10] 王祖翔,余杨,孙莉,等. 离子色谱法测定食品中的无机铵[J]. 食品与机械,2012,28(4):96-99.