

采用 LC/MS/MS 同时测定尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 中的多种抗生素残留物

应用简报

食品检测和农业

作者

Sérgio Henrique Monteiro

生物学研究所，
圣保罗，巴西

Valdemar Luiz Tornisielo 和 Jeane
Gisele Francisco
CENA/USP，
皮拉西卡巴，巴西

摘要

我们开发和验证了一种同时测定尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 鱼肉中 11 种不同类抗生素（氯霉素、土霉素、四环素、金霉素、磺胺地托辛、磺胺噻唑、磺胺二甲嘧啶、恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星和沙氟沙星）的方法。样品预处理过程包括使用 5 g 鱼肉、1 mL 0.1 M Na_2EDTA 溶液和 24 mL 乙腈：水（含 0.1% 甲酸）(70:30) 进行提取，然后通过 Captiva 小柱进行纯化。单次运行中即可完成这些化合物的测定。所有化合物的定量限 (LOQ) 均低于 4.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，回收率范围为 83.8 - 110.1%，测量准确度低于 5.5%。



Agilent Technologies

前言

世界上的水产养殖业以每年约 9% 速度不断在扩大 [1]。在巴西，渔产品的增长从 2007 年到 2009 年只有 60.2%，而罗非鱼产量 7 年间却增长了 105% (2003–2009) [2]。这迫使水产养殖业越来越多地依赖化学药品的投入。由于放养密度很高，生物体间经常互相攻击受伤，导致化学药品需求增加，尤其是抗生素。然而，渔产品进口国如欧共体国家和美国，对抗生素残留制定了越来越严格的限量要求。

由于药物的滥用，动物源性产品中的抗生素残留颇受消费者关注。这些残留可能有毒性，也会使一些敏感个体发生过敏反应。另外，长期摄入食品中低剂量的抗生素也会导致耐药微生物的蔓延。

本研究介绍了一种采用 Captiva 小柱进行化学过滤和 ESI LC/MS/MS 分析的快速方法。Captiva 小柱（部件号 A5300002）的主要优点是可以非常简便高效地去除沉淀蛋白和颗粒物质。

为获得更可靠的结果，使用氘代磺胺地托辛-d6 作为内标。根据欧盟委员会决议 2002/657/EC，对所开发方法的选择性、线性、准确度、基质效应、精密度和灵敏度进行了充分验证 [3]。



实验部分

化学品

所用溶剂甲醇和乙腈为 HPLC 级 (Tedia)。所用试剂甲酸 (Vetec) 和 Na₂EDTA (Sigma-Aldrich) 均为分析级。所用水经过 Milli-Q 系统 (美国密理博) 纯化。分析标准品土霉素 (97%, OTC)、四环素 (97.5%, TC)、金霉素 (93%, CTC)、环丙沙星 (99.5%, CFX)、恩诺沙星 (99.0%, EFX)、沙氟沙星 (97.2%, SAR)、磺胺噻唑 (98.0%, STZ)、诺氟沙星 (99%, NFX)，以及内标磺胺地托辛-d6 (99.4%) 来自 Fluka Analytical 公司。磺胺地托辛 (SDM) 和磺胺二甲嘧啶 (SMZ) 来自 Chem Service 公司，纯度均为 99.5%。氯霉素 (98.5%, CAP) 来自 Dr. Ehrestorfer 公司。

每个化合物的标准储备液 (100 µg/mL) 用甲醇制备，置于棕色瓶中，在 -20 °C 下可保存 6 个月。混标工作液 (1000 µg/L) 通过用水适当稀释储备液来制备，在低于 5 °C 的条件下保存，每周更新。

样品前处理

将 5 g 样品置于 50 mL 螺旋盖聚四氟乙烯管中。加入 50 µL 磺胺地托辛-d6 溶液 (1.0 µg/mL) 作为内标，然后加入 1 mL 0.1 M Na₂EDTA 溶液和 24 mL 乙腈：水 (70:30, 含 0.1% 甲酸) 混合溶剂。该混合物采用 Marconi ultraturrax 分散机 (MA102) 混匀 5 min，然后采用 Hitachi CF16RXII 离心机在 1370 xg 的离心力下离心 5 min。采用 Manifold Supelco Visiprep 系统，将 500 µL 上清液加入 Captiva ND 小柱 (部件号 A5300002) 进行洗脱，洗脱液收集在 2 mL 样品瓶中，并采用 LC/MS/MS 进行分析。

LC/MS/MS 方法

液相色谱条件

仪器	Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱系统		
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (3 × 100 mm, 3.5 µm)		
柱温	30 °C		
流动相	A) 0.1% 甲酸水溶液 B) 0.1% 甲酸乙腈溶液		
梯度程序	时间 (min)	%A	%B
	0	95	5
	13	5	95
流速	0.4 mL/min		
进样量	10 µL		
质谱条件			
仪器	Agilent 6430 三重四极杆液质联用系统		
电离模式	ESI (正)		
干燥气流速	10 L/min		
雾化器压力	50 psi		
干燥气温度	350 °C		
毛细管电压	4000 V		
软件	Agilent Mass Hunter(B.03.01)		
检测模式	多反应监测 (MRM)		

验证和定量分析程序

对提出的程序与欧盟委员会决议 2002/657/EC 标准进行一致性的验证，主要考虑了以下参数：特异性、检出限 (LOD) 定量限和 LOQ、精密度以及回收率。

在 5 - 400 µg/kg 范围内取 11 个目标化合物的 7 个不同浓度，采用空白和加标样品进行基质匹配的校准 (MMC)。每个浓度平行分析三次。

采用内标法测定样品中目标化合物的浓度。为获得更可靠的结果，使用氘代磺胺地托辛-d6 作为内标。

结果与讨论

每个化合物的监测离子见表 1。响应强度最高的离子对作为定量离子, 第二高的离子对作为定性离子, 用于分析确证。

表 1. 所选化合物的保留时间 (RT) 和 MS/MS 条件

化合物	RT (min)	母离子	子离子	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)
金霉素	10.610	479.1	462.2*	125	12
		479.1	444.1**	125	17
土霉素	9.685	461.2	426*	115	16
		461.2	201.1**	115	41
四环素	9.944	445.2	410.2*	115	17
		445.2	154.2**	115	30
磺胺地托辛	11.982	311.1	156*	120	16
		311.1	108**	120	28
磺胺二甲嘧啶	10.127	279.1	186*	115	12
		279.1	156**	115	16
磺胺噻唑	9.128	256	156*	90	8
		256	108**	90	20
环丙沙星	9.786	332.1	288.1*	125	13
		332.1	245.1**	125	22
恩诺沙星	10.021	360.2	342.2*	132	17
		360.2	316.2**	132	16
诺氟沙星	9.695	320.1	302.1*	125	20
		320.1	231.0**	125	44
沙氟沙星	10.560	386.1	342.1*	119	15
		386.1	299.1**	119	26
氯霉素	11.563	323	305*	70	0
		323	275**	70	8
磺胺地托辛-d6	11.945	317.1	162.2*	65	20
		317.1	108.1**	65	28

*定量离子对

** 定性离子对

粗体标识化合物为内标。

采用保留时间和两个 MRM 离子对对抗生素残留进行鉴定。使用所选离子对分析得到的化合物色谱图见图 1。

Captiva 小柱的主要优点是可用于简便高效地去除沉淀蛋白和颗粒物质。通过考察方法的选择性来论证该优点，并且通过进样空白鱼样品（不含抗生素）和加标抗生素样品提取物进行验证。空白鱼样品分析表明，定量限 (LOQ) 实际为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时，选用与那些化合物相同、且呈现最佳选择性的保留时间处，测得干扰低于 10%。

基质中所有化合物在 $5 - 400 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度范围内线性关系良好，测得的决定系数 (R^2) 均大于 0.99 (见表 2)。图 2 展示了采用该方法分析尼罗罗非鱼基质中药物所得结果的一个实例。

该结果还说明宽浓度范围的分析可以有效检出鱼样品中的抗生素，并且校准曲线上数据点的离差低于 10%。校准曲线的制备、信噪比和相关计算由 Agilent MassHunter 软件 (B.03.01) 来完成。

表 2 所示的 LOD 和 LOQ 完全满足鱼肉中抗生素的分析。

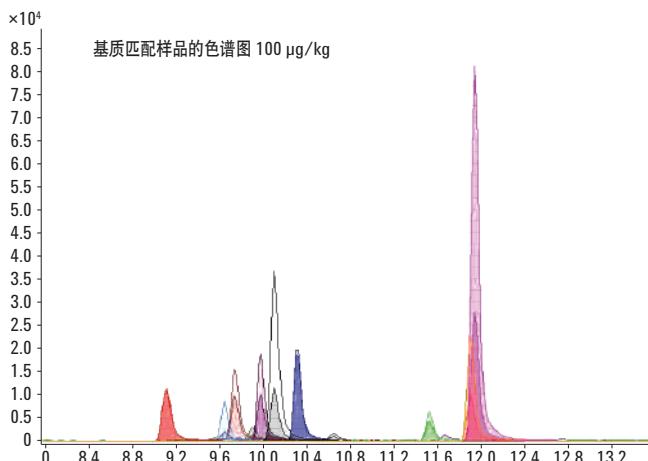


图 1. 加标鱼样品 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) 的总离子流色谱图 (TIC)。

表 2. 尼罗罗非鱼鱼肉中抗生素分析的 LOD、LOQ 和测定的决定系数 (R^2)

化合物	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	R^2
金霉素	0.91	3.00	0.9992
土霉素	1.20	4.00	0.9994
四环素	1.00	3.20	0.9994
磺胺地托辛	0.30	0.90	0.9995
磺胺二甲嘧啶	0.80	2.56	0.9992
磺胺噁唑	1.30	4.00	0.9990
环丙沙星	0.40	1.20	0.9994
恩诺沙星	0.50	1.50	0.9976
诺氟沙星	1.30	4.30	0.9992
沙氟沙星	0.60	1.90	0.9986
氯霉素	1.00	3.50	0.9992

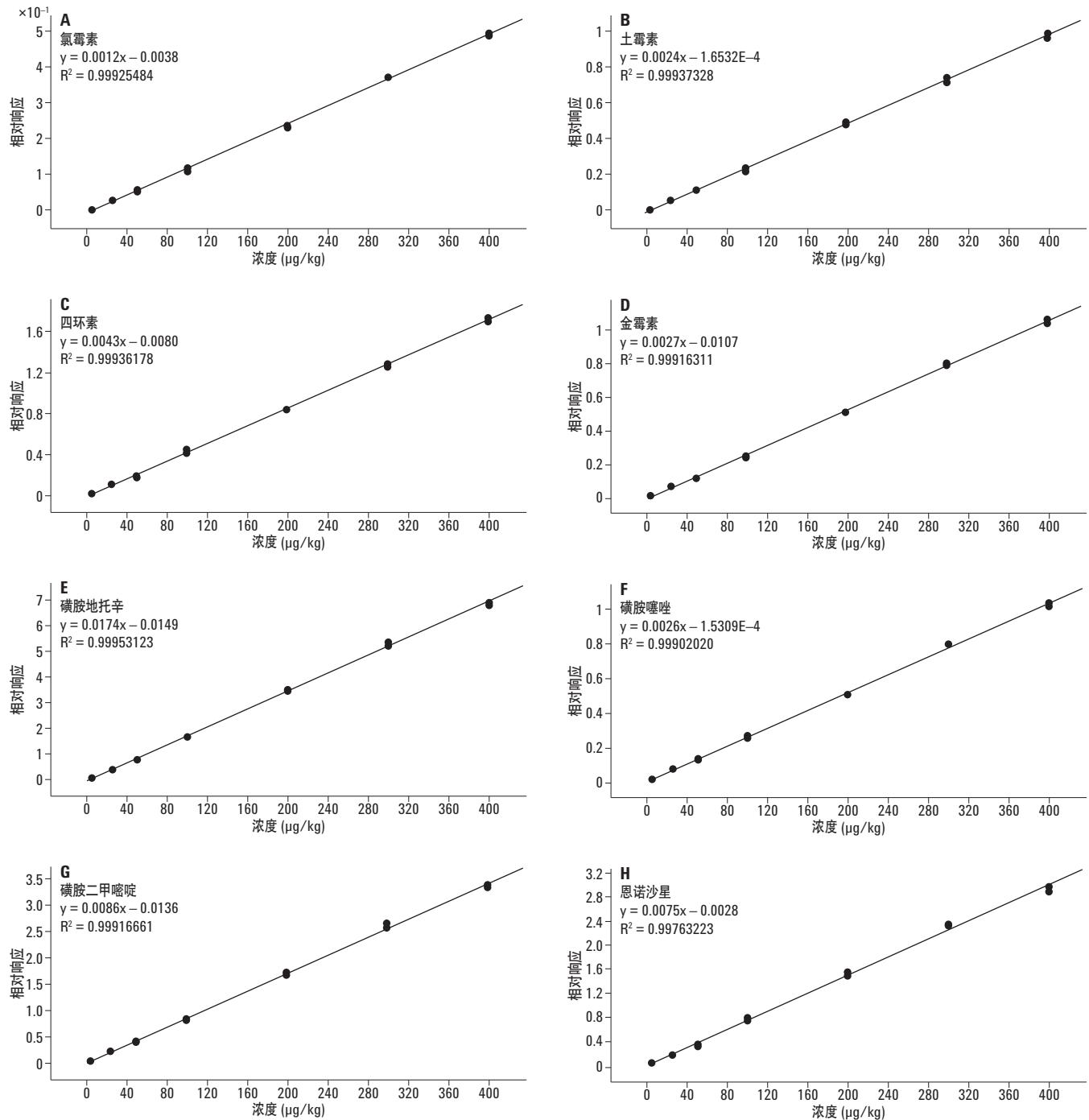


图2. 鱼样品中氯霉素(A)、土霉素(B)、四环素(C)、金霉素(D)、磺胺地托辛(E)、磺胺噻唑(F)、磺胺二甲嘧啶(G)和恩诺沙星(H)的校准曲线, 浓度范围 5.0 - 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。
 接下页

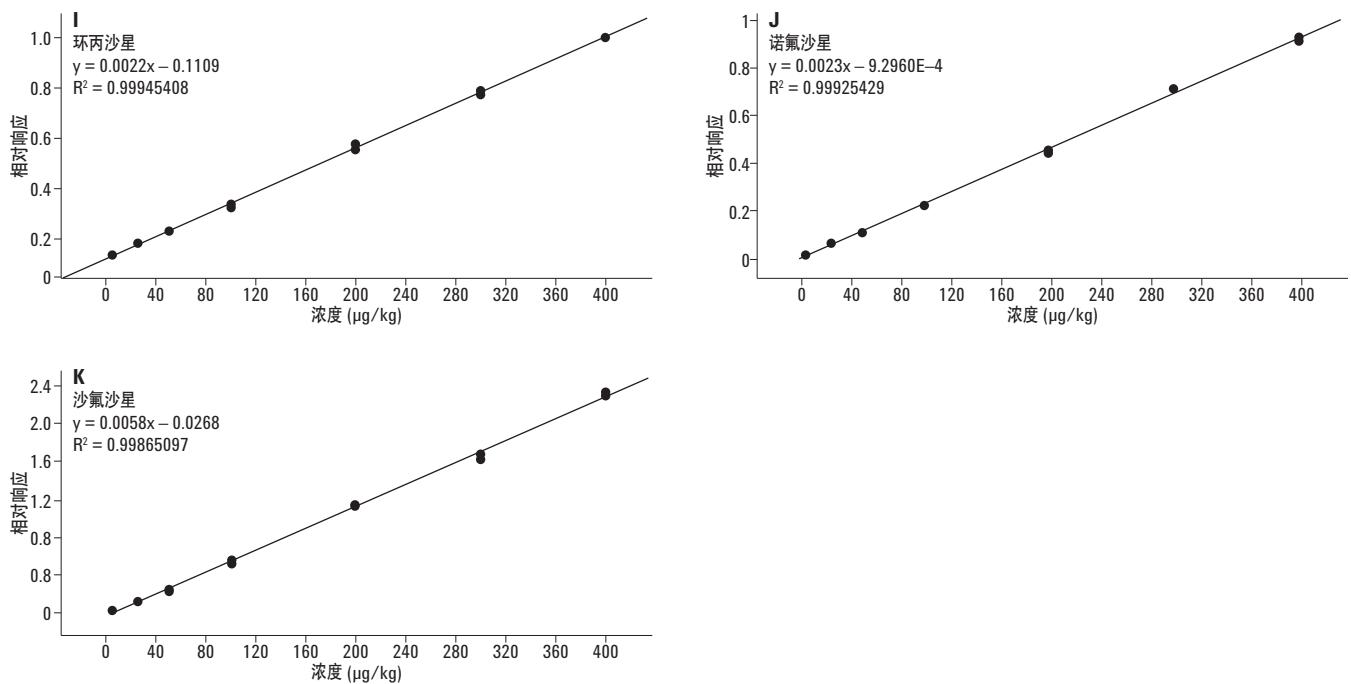


图 2. 鱼样品中环丙沙星 (I)、诺氟沙星 (J) 和沙氟沙星 (K) 的校准曲线, 浓度范围 5.0 - 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$

通过分析加标浓度分别为 50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的尼罗罗非鱼鱼肉样品, 评价方法的精密度和以回收率表示的准确性。通过平行 7 次测定上述浓度样品, 考察了方法的日间精密度。结果见表 3。

在系统经 30 天常规运行, 通过对 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度样品重复 7 次测定, 确定了方法的日间精密度。结果介于 2.8 和 10.3% 之间, 可以接受。

表 3. 三个加标浓度鱼肉样品的百分回收率和日内精密度 (相对标准偏差), 以及浓度 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样品的日间精密度

化合物	日间						
	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	RSD (%)	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	RSD (%)	200 $\mu\text{g}/\text{kg}$	RSD (%)	RSD (%)
金霉素	108.1	3.7	100.8	4.5	87.5	7.7	6.1
土霉素	103.8	4.6	96.8	11.5	86.3	8.3	8.5
四环素	106.4	4.5	107.1	5.4	93.0	7.4	6.2
磺胺地托辛	86.5	6.0	89.3	9.3	96.0	4.8	7.8
磺胺二甲嘧啶	99.3	4.1	94.9	7.7	97.6	5.0	5.6
磺胺噻唑	92.5	3.3	92.3	7.2	95.8	5.8	7.7
环丙沙星	87.9	6.5	87.2	8.6	82.8	6.2	9.1
恩诺沙星	98.4	6.6	108.8	4.7	95.4	8.3	8.5
诺氟沙星	96.0	10.6	100.0	9.4	87.5	5.1	7.8
沙氟沙星	98.1	3.0	90.0	5.4	90.7	4.4	4.7
氯霉素	93.2	5.2	90.5	13.2	94.5	5.5	10.3

通过加标样品中检出分析物的量与加标量的比值来计算回收率，以百分率表示。经证实，所开发的方法精度好、准确度高，能可靠用于抗生素的测定。

结论

本文详述了尼罗罗非鱼鱼肉中选择性测定不同种类抗生素的方法开发。方法采用三重四极杆液质联用系统，具有很高的准确度、精密度和灵敏度。它可以对渔场中低至 ppb 级的目标化合物进行鉴定和定量分析。

拟定的提取程序非常简单，样品处理不需要附加净化步骤即可获得满意回收率。

参考文献

1. FAO, 2009. State of world fisheries and aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. 176 p
2. Brasil, 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available at <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/residuos-e-contaminantes>. Accessed in 08 October 2013
3. Commission Decision, 2002. 2002/657/EC of 12 August 2002 *Off. J. Eur. Commun.* L221, 8–36

更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2013
2013 年 12 月 18 日, 中国印刷
5991-3768CHCN



Agilent Technologies