高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的阿莫西林残留量

许 蔚*, 张晓燕, 吴 斌, 殷 耀, 杨雯笙, 沈崇钰, 丁 涛, 陈惠兰
(江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 国家蜂产品基准实验室, 江苏 南京 210001)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱测定蜂蜜中阿莫西林残留的方法。样品用磷酸氢二钾溶液提取,经固相萃取柱进行净化提取后,以 C18 柱为分离柱,甲醇和 0.1% (v/v) 甲酸水溶液为流动相,用串联质谱仪检测,选择 1 个母离子和 2 个子离子进行选择反应监测,选择信号最强的子离子进行定量测定。该方法采用外标法定量,在 2.0 ~ 100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内,阿莫西林的峰面积与其质量浓度呈良好的线性关系 ($r^2 > 0.99$),方法的检出限和定量限分别为 2.0 $\mu\text{g/kg}$ 和 5.0 $\mu\text{g/kg}$,回收率范围为 74.2% ~ 81.7%,日内精密度范围为 2.8% ~ 7.8%,日间精密度范围为 9.1% ~ 11.3%。该方法简便快捷,可以用于蜂蜜中阿莫西林残留量的测定。

关键词:固相萃取;高效液相色谱-串联质谱;阿莫西林;蜂蜜

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2012)10-1089-04

Determination of amoxicillin in honey by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Wei*, ZHANG Xiaoyan, WU Bin, YIN Yao, YANG Wenquan,
SHEN Chongyu, DING Tao, CHEN Huilan

(National Honey Reference Laboratory, Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC) of
Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: A method for the determination of amoxicillin in honey by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was established. The samples were dissolved by phosphate buffer and cleaned-up by solid phase extraction (SPE) cartridge. The analytes were determined by HPLC-MS/MS on a C18 column with methanol and 0.1% (v/v) formic acid solution as mobile phases with gradient elution. The analysis of amoxicillin was performed under selected reaction monitoring mode by selecting one parent ion and two daughter ions as qualitative ions and the most abundant daughter ion as quantitative ion. The external standard was used for quantitative analysis in this method. The calibration curve showed good linearity in the range of 2.0 – 100.0 $\mu\text{g/L}$ with good precision and accuracy ($r^2 > 0.99$). The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) were 2.0 $\mu\text{g/kg}$ and 5.0 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The average recoveries of amoxicillin in spiked honey ranged from 74.2% to 81.7% with the intra-day precisions (relative standard deviations, RSDs) from 2.8% to 7.8% and the inter-day precisions (RSDs) from 9.1% to 11.3%. This method is convenient and suitable for the determination of amoxicillin in honey.

Key words: solid phase extraction (SPE); high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); amoxicillin; honey

阿莫西林是一种广谱半合成青霉素,杀菌作用强,不仅是医学上的重要抗感染药物,也是目前畜禽养殖业中动物疾病预防和治疗的常用药物。阿莫西林使用后会在生物体内残留,人长期食用含青霉素残留的制品,相当于长期低剂量的吸收青霉素,从而使人体产生耐药性。因此对动物性食品中青霉素类抗生素残留进行有效监测已经成为保障食品安全的一个重要环节^[1]。

* 通讯联系人:许 蔚,助理工程师,主要从事蜂产品中的各类抗生素分析。Tel: (025)52345187, E-mail: Cathy_xuwei@163.com.
收稿日期:2012-06-21

目前,关于阿莫西林的检测方法比较多,如免疫分析法^[2]、酶联免疫吸附测定法 (ELISA)^[3]、毛细管电泳法^[4]、高效液相色谱法^[5-8]和高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS/MS)^[9-14]等。但是检测的基质多针对奶制品和畜产品,用于蜂蜜中阿莫西林的检测方法却很少^[15]。奶制品和畜产品由于蛋白含量高或油脂较多,前处理时需沉淀蛋白或去除油脂,而蜂蜜的主要成分是糖类,所以奶制品和畜产品中阿莫西林的提取方法不适用于蜂蜜。本方法用磷酸氢二钾溶液提取,经强阴离子交换固相萃取柱净化后,采用 HPLC-MS/MS 测定蜂蜜中阿莫西林的含量。该方法获得了较好的回收率,检测限量较低,满足日常检测工作的需要。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及材料

液相色谱-串联四极杆质谱联用仪: Thermo TSQ ULTRA(配备电喷雾离子 (ESI) 源和大气压化学电离 (APCI) 源), Surveyor 液相色谱系统 (包括自动进样器 (Autosampler 1.3)), 质谱泵 (MS Pump 2.0)。氮吹仪 (美国 Organomation 公司); 超纯水器 (Millipore 公司)。

阿莫西林标准品 (纯度 98.0%, Dr. Ehrenstorfer)。甲醇 (色谱纯,德国 Merck 公司), 甲酸 (色谱纯,德国 CNW 公司), 磷酸氢二钾、氢氧化钠和甲醇 (分析纯,南京化学试剂厂)。

蜂蜜样品为市售蜂蜜以及养蜂场的原料蜂蜜。

1.2 标准溶液

称取阿莫西林标准品适量,用乙腈-水 (4:6, v/v) 溶解并定容至 10 mL,配成 1.0 g/L 标准储备液,于冰箱中冷冻保存。

准确吸取一定量的 1.0 g/L 的标准储备液,用乙腈-水 (4:6, v/v) 逐级稀释成 1.0 mg/L。按照检测需求,用流动相稀释标准储备液,配制标准工作溶液,质量浓度范围为 2.0 ~100.0 μg/L。

1.3 样品提取

称取蜂蜜样品 (5.00 ±0.05) g 于 50 mL 玻璃离心管内,加入 0.2 mol/L 磷酸氢二钾溶液 (pH 8.0) 15 mL,涡旋混匀,并用中速滤纸过滤到干净的玻璃离心管内,加入预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水处理的强阴离子交换固相萃取小柱 (MAX) 中,上样流速控制在 1 ~2 滴/s,用 3 mL 水洗小柱,弃去全部流出液,减压抽干 (10 min),最后用 5 mL 含 0.2% (v/v,下同) 甲酸的甲醇溶液洗脱,收集洗脱液于 10 mL 试管中,于 45 ℃ 用氮吹仪吹干,用甲醇-水 (3:7,

v/v) 定容至 1.0 mL,过 0.45 μm 滤膜到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

1.4 仪器参数与测定条件

色谱条件: Poroshell 120 EC-C18 色谱柱 (100 mm ×4.6 mm, 2.7 μm)。流动相: A, 0.1% 甲酸水溶液; B, 甲醇。梯度洗脱程序: 0 ~1.0 min, 10% B; 1.1 ~3.0 min, 10% B ~30% B; 3.1 ~4.0 min, 30% B; 4.1 ~6.0 min, 30% B ~95% B; 6.1 ~8.0 min, 95% B; 8.1 ~9.5 min, 10% B。流速: 0.4 mL/min。柱温为室温。进样体积为 25 μL。

质谱条件: 采用 ESI 源,正离子方式检测; 喷射电压: 2 500 V; 鞘气 (Sheath Gas): 5.5 MPa (55 bar), 辅助气 (Auxiliary Gas): 1.0 MPa (10 bar); 毛细管温度: 350 ℃。母离子: *m/z* 336; 子离子: 定性离子为 *m/z* 114, 碰撞能量为 25 eV; 定量离子为 *m/z* 349, 碰撞能量为 12 eV。

2 结果与讨论

2.1 固相萃取条件的选择

首先对不同的固相萃取柱进行了试验。文献中青霉素类的前处理多采用亲水亲脂反相平衡柱 (HLB)、C18 等固相萃取柱进行净化萃取,本实验在试验过程中发现蜂蜜样品溶液在过 HLB 柱时,阿莫西林在上样过程中有损失,经由水洗过后,损失了一大半,因此回收很低 (见表 1)。这是由于阿莫西林的结构中含有一个酚羟基,极性较强,不易在柱上保留。考虑到阿莫西林还含有羧基,在弱碱性条件下较稳定,因此考虑采用强阴离子交换柱。我们仔细比较了 HLB、MAX 两种小柱后发现,强阴离子交换柱很好地保留了目标物质 (见表 1)。因此,选择 MAX 作为固相萃取柱。

表 1 阿莫西林在固相萃取过程中的峰面积 (在蜂蜜样品中的添加水平为 40 μg/kg)
Table 1 Peak areas of amoxicillin during solid phase extraction (SPE) procedure (honey was spiked with amoxicillin at 40 μg/kg)

SPE column	0-5 mL solution	5-10 mL solution	10-15 mL solution	3 mL water	Elution
HLB	-	4.50 × 10 ⁴	3.95 × 10 ⁵	1.73 × 10 ⁶	3.54 × 10 ⁵
MAX	-	-	-	-	2.05 × 10 ⁶

- : Not detected.

此外,实验还对洗脱溶剂进行了优化,具体见图 1。结果表明,甲醇中甲酸的体积分数在 0.1% 以下时,阿莫西林无法被洗脱完全,回收率不高;随着甲酸体积分数的增大,阿莫西林的回收率增加;当甲酸体积分数继续增加至 0.5% 以上时,阿莫西林回收率又开始降低。由图 1 可见,使用含 0.2% 甲酸的

图 1 采用含不同体积分数甲酸的甲醇溶液洗脱时阿莫西林的回收率

Fig. 1 Recoveries of amoxicillin with different volume percentages of formic acid in methanol

甲醇溶液洗脱时得到的回收率最高,因此我们选择含 0.2% 甲酸的甲醇溶液作为洗脱溶剂。

2.2 提取溶剂的优化

MAX 是强阴离子交换柱,需要用氢氧化钠等强碱性溶液提取,但由于阿莫西林在强碱性溶液中会迅速分解,因此使用弱碱性溶液磷酸氢二钾溶液进行提取。对于提取溶剂的 pH 值进行了试验,分别用 pH 值为 7.0、8.0、9.0 的溶液对蜂蜜基质进行提取。结果表明 pH 值为 8.0 的溶液提取效果好,回收率高。

磷酸氢二钾溶液的 pH 值为 8.0,呈弱碱性,本实验研究了阿莫西林在该溶液中的稳定性,考虑到前处理过程在 6 h 内可以完成,因此将添加了阿莫西林(10.0 μg/kg)的样品溶解于磷酸氢二钾溶液后,分别放置 0、2、4、6 h,然后进行固相萃取,结果显示回收率在 75.0%~80.1% 内,表明阿莫西林在磷酸氢二钾溶液中稳定,不会发生降解。

2.3 色谱柱的选择

考察了 Agilent Polaris C18-A (100 mm×2.0 mm, 5 μm)、Agilent Eclipse Plus C18 (150 mm×2.1 mm, 5 μm)、Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 mm×4.6 mm, 2.7 μm) 3 种 C18 柱,比较后发现,阿莫西林在前两种 C18 柱上保留时间为 2~3 min,而在 Poroshell 120 柱上的保留时间为 5~6 min,相对其他两种色谱柱,保留时间延长,峰形有所改善,而且灵敏度显著提高,因此选用 Poroshell 120 为色谱柱。阿莫西林标准溶液以及蜂蜜样品和蜂蜜加标样品的色谱图见图 2。

2.4 线性范围和检出限

配制质量浓度为 2.0~100.0 μg/L 的系列标准溶液,在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定,以待测物的峰面积为纵坐标,待测物的质量浓度

图 2 (a) 阿莫西林标准溶液(20.0 μg/L)、(b) 阴性蜂蜜样品和 (c) 蜂蜜加标样品(添加水平为 5.0 μg/kg) 的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) amoxicillin standard solution (20.0 μg/L), (b) a negative honey sample and (c) the sample spiked with amoxicillin at the level of 5.0 μg/kg

(μg/L) 为横坐标进行线性回归,方程为 $Y = -7\,167.59 + 319\,399X$,其线性相关系数(r^2) > 0.99。在蜂蜜样品中添加阿莫西林标准溶液,提取净化后进行测定,分别以 3 倍信噪比($S/N = 3$)和 10 倍信噪比($S/N = 10$)确定方法的检出限和定量限,分别为 2.0 μg/kg 和 5.0 μg/kg。

2.5 不同基质对阿莫西林添加回收率的影响

本实验选取了 6 种不同种类的国产蜂蜜为基质,添加阿莫西林标准品,添加水平为 5.0 μg/kg,每个水平做 3 个平行测定,平均回收率结果为:洋槐蜜 80.3%,枣花蜜 76.8%,油菜蜜 78.2%,荔枝蜜 82.1%,紫云英蜜 79.0%,椴树蜜 78.4%,表明不同种类的蜂蜜对于阿莫西林的测定没有明显影响。

2.6 添加回收试验和精密度

选取阴性蜂蜜样品,添加阿莫西林标准品,添加水平分别为为 2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{g/kg}$,每个水平做

6 个平行测定,连续测定 3 天,考察其回收率及精密度(以相对标准偏差(RSD)计),具体实验数据见表 2。

表 2 回收率和精密度试验结果
Table 2 Results of recovery and precision tests

Added/ ($\mu\text{g/kg}$)	Found/ ($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/ %	Intra-day precision (RSD)/% ($n=6$)			Inter-day precision (RSD)/% ($n=3$)
			1st day	2nd day	3rd day	
2.5	2.04	81.7	5.5	6.7	7.3	11.3
5	4.01	80.2	4.7	7.8	5.0	10.4
10	7.42	74.2	6.7	2.8	5.5	9.1

RSD: relative standard deviation.

3 结语

建立了高效液相色谱-串联质谱测定蜂蜜中阿莫西林残留的方法,强阴离子交换固相萃取柱较好地保留了目标物质同时去除了大部分杂质干扰。该方法有较好的重现性,符合实际检测工作的需要。

参考文献:

[1] Meng H H, Chen D D, Qi K Z. Progress in Veterinary Medicine (孟欢欢,陈玎玎,祁克宗. 动物医学进展), 2008, 29 (1): 32

[2] Xie H L, Chen W, Peng C F, et al. Food Science (谢会玲,陈伟,彭池方,等. 食品科学), 2008, 29(7): 490

[3] Wei D, Wang C L, Liang S Z, et al. Jiangsu Agricultural Sciences (魏东,王存连,梁淑珍,等. 江苏农业科学), 2009 (2): 268

[4] Tian C Q, Tan H R, Gao L P, et al. Chinese Journal of Chromatography (田春秋,檀华蓉,高丽萍,等. 色谱), 2011, 29(11): 1128

[5] Zhang Y T, Liu Y, Zheng H Z, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory (张玉廷,刘艳,郑虎哲,等. 分析试验室), 2007, 26(3): 95

[6] Yu G Y. Food Science (于桂阳. 食品科学), 2008, 29(4):

332

[7] Liu Y, Ding L, Xie M X, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘媛,丁岚,谢孟峡,等. 色谱), 2003, 21(6): 541

[8] Hou D J, Wu Y L, Liu S Y, et al. Chinese Journal of Veterinary Drug (侯东军,吴银良,刘素英,等. 中国兽药杂志), 2005, 39(12): 16

[9] Chen R C, Jia H T, Ai L F, et al. Food Science (陈瑞春,贾海涛,艾连峰,等. 食品科学), 2011, 32(18): 249

[10] Sun H W, Li H, Zhang J X, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (孙汉文,李挥,张敬轩,等. 分析化学), 2010, 38(8): 1203

[11] Ito Y, Goto T, Oka H, et al. J Chromatogr A, 2004, 1042: 107

[12] Bi Y F, Wang X, He J K, et al. Journal of Instrumental Analysis (毕言锋,汪霞,何家康,等. 分析测试学报), 2011, 30(8): 863

[13] Qin F, Zheng W J, Chen G L, et al. Chinese Journal of Antibiotics (秦峰,郑文捷,陈桂良,等. 中国抗生素杂志), 2009, 34(6): 348

[14] Fan Y Y, Qi L, Yang S M. Chinese Journal of Analysis Laboratory (范莹莹,其鲁,杨树民. 分析试验室), 2007, 26(12): 76

[15] Bai G T, Chu X G, Pan G Q, et al. Food Science (白国涛,储晓刚,潘国卿,等. 食品科学), 2008, 29(7): 485