

液相色谱-串联质谱快速检测禽类组织中 黄霉素 A 残留量

许 辉*, 张鸿伟, 王凤美, 张晓梅, 蔡 雪

(山东出入境检验检疫局, 青岛 266002)

摘要: **目的** 建立检测禽类组织(肌肉、脂肪、肝脏、肾脏)中黄霉素 A 残留的超快速液相色谱-四极杆/线性离子阱质谱方法。**方法** 混合均匀的试样经 10% 氯化甲醇提取, 乙腈沉淀蛋白净化后, 以 0.3% 甲酸-5% 乙腈-水溶液和 0.3% 甲酸-5% 水-乙腈为流动相, 使用 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱超快速液相色谱分离, 优化多反应检测(selected multiple reaction monitoring, sMRM) 模式检测, 外标法定量。**结果** 黄霉素 A 在 20~200 μg/L 线性范围内线性关系良好($r \geq 0.995$); 黄霉素 A 定量限(limit of quantity, LOQ, $S/N \geq 10$) 为 10 μg/kg; 3 个添加水平(10、20 和 100 μg/kg) 下的回收率为 66.5%~89.4%; 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD) 为 4.7%~10.2%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 可有效用于禽类组织中黄霉素 A 残留的测定。**关键词:** 黄霉素 A; 液相色谱-串联质谱法; 禽类组织

Determination of moenomycin A residues in poultry tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Hui*, ZHANG Hong-Wei, WANG Feng-Mei, ZHANG Xiao-Mei, CAI Xue

(Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine, Qingdao 266002, China)

ABSTRACT: Objective To establish a highly sensitive method to confirm moenomycin A residues in poultry tissues (muscle, fat, liver and kidney) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The poultry tissues were extracted with 10% ammoniation of methanol, and purified by acetonitrile. The chromatography separation was conducted on an Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) with a mobile phase of 0.3% formic acid-5% acetonitrile-water (v:v:v) and 0.3% formic acid-5% water-acetonitrile (v:v:v) with gradient elution. The analytes were separated by LC and determined by LC-MS/MS and multiple reaction monitor (selected multiple reaction monitoring, sMRM) mode. External standard was used for the quantification. **Results** Moenomycin A showed a good linearity with the correlation coefficients (r) no less than 0.995 in the range of 20~200 μg/L, with the limits of quantification (limit of quantity, LOQ, $S/N \geq 10$) of 10 μg/kg for all analytes. The developed method gave average recoveries of 66.5%~89.4% for drugs spiked at 10~100 μg/kg, with the relative standard deviation of 4.7%~10.2%.

基金项目: 青岛市公共领域科技支撑计划项目(12-1-3-80-jh)、质检公益行业科研专项(201510036-01)

Fund: Supported by the Public Domain Technology Support Project of Qingdao(12-1-3-80-jh) and Scientific Research Projects by Quality Inspection Service Industry (201510036-01)

*通讯作者: 许辉, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: xh2k12@sohu.com

*Corresponding author: XU Hui, Engineer, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, Shandong Province, China. E-mail: xh2k12@sohu.com

Conclusion The proposed method could be used to screen and confirm moenomycin A in a single run, which made it effective in residue surveillance and detection of moenomycin A in poultry tissues.

KEY WORDS: moenomycin A; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; poultry tissues

1 引言

黄霉素(moenomycin)属于磷酸多糖类抗生素,又名黄磷脂素(flavomycin)、斑伯霉素(banbermycin)、默诺霉素或黄磷脂醇^[1,2],至少含有5种活性成分,以黄霉素A为主,化学分子式 $C_{69}H_{107}N_4PO_{35}$ 。黄霉素为磷酸化多糖类抗生素,其抗菌作用机制是通过干扰细菌细胞壁结构物质肽聚糖的生物合成从而抑制细菌繁殖。黄霉素的促生长原理在于它能提高饲料中能量和蛋白质的消化,能使肠壁变薄,从而提高营养物质的吸收,能有效地持续肠道菌群的平衡和稳定瘤胃的pH值。细菌对黄霉素不易产生耐药性,黄霉素也不容易与其他抗生素产生交叉耐药性。黄霉素抗菌谱较窄,主要对革兰氏阳性菌有效,且对其他抗生素耐药的革兰氏阳性菌也有效,但对革兰氏阴性菌作用很弱^[3-7]。黄霉素类药物主要的危害是对人的骨骼发育有影响,长期食用会产生造血功能障碍。2005年欧盟农业部长会议^[8,9]决定,黄霉素等四种抗生素自2006年起禁止使用。

目前对黄霉素的检测多应用于饲料和禽肉中,检测方法有微生物检测法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等^[10-12],对禽类组织中黄霉素A残留量的检测研究报道相对较少,因此建立一套禽类组织中黄霉素A的快速检测方法尤为必要。本实验针对禽组织(肌肉、脂肪、肝脏、肾脏)中黄霉素A的残留量检测进行了研究。

2 材料和方法

2.1 主要仪器与试剂

Agilent 1290 液相色谱系统(美国 Agilent 公司); API 5500 三重四极杆质谱分析仪(美国 AB 公司); T25 Basic 高速均质器(德国 IKA 公司); 涡旋混匀器(德国 IKA 公司); HS260 Basic 水平振荡器(德国 IKA 公司); CR22G II 高速冷冻离心机(日本日立公司); KQ-100E 超声波仪(国产仪器); Turbo Vap LV 型氨吹浓缩仪(美国 Caliper 公司)。

甲酸为色谱级(Riedel-de Haen 公司); 甲醇、乙腈、正己烷均为色谱级(B & J Brand 公司); 氨水为国产分析纯试剂; 水为 Milli-Q Advantage A10 系统制备的超纯水(电阻率 18.2 MΩ·cm)。

10%氯化甲醇: 量取 100 mL 氨水用甲醇溶解并定容至 1 L。标准物质: 黄霉素 A(moenomycin A, 85.9%)购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

2.2 标准溶液的配制

标准储备液: 准确称取 116.4 mg 黄霉素 A 标准品于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解并定容, 得到质量浓度为 1000 mg/L 的标准储备溶液, 于 -20 °C 下保存; 标准中间液: 准确移取标准储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到浓度为 100 mg/L 的标准中间液, 于 -20 °C 下保存; 标准工作液: 移取适量上述混合标准中间液, 用甲醇稀释至适当浓度, 当日使用。

2.3 样品前处理

2.3.1 禽肉、禽脂肪

称取(2.00±0.01) g 混合均匀的试样, 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 10%氯化甲醇, 均质 1 min, 涡旋混匀 1 min, 置于水平振荡器中振荡 10 min, 以 12000 r/min, 0 °C 离心 10 min。移取上清液, 向其内加入 10 mL 乙腈, 涡旋混匀 1 min, 振荡 5 min, 以 12000 r/min, 0 °C 离心 10 min, 移取上清液于 40 °C 下氮气吹干, 用 1 mL 甲醇定容, 混合均匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜后测定。

2.3.2 禽类肝脏、肾脏

称取(2.00±0.01) g 混合均匀的试样, 置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 10%氯化甲醇, 均质 1 min, 涡旋混匀 1 min, 置于水平振荡器中振荡 10 min, 以 12000 r/min, 0 °C 离心 10 min。移取上清液, 向其中加入 30 mL 乙腈, 涡旋混匀 1 min, -20 °C 冷冻 10 min, 以 12000 r/min, 0 °C 离心 10 min, 弃去上清液。残渣中加入 5 mL 10%氯化甲醇, 超声 5 min, 使其完全溶解, 以 12000 r/min, 0 °C 离心 10 min, 移取上清液于 40 °C 氮气吹干, 用 1 mL 甲醇定容, 混合均匀, 过 0.22 μm 微孔滤膜后测定。

2.4 仪器工作条件

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL; 流动相: A 为 0.3%甲酸-5%乙腈-水(v:v:v), B 为 0.3%甲酸-5%水-乙腈(v:v:v)。梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Elution conditions for the determination

时间(min)	A(0.3%甲酸-5%乙腈-水)	B(0.3%甲酸-5%水-乙腈)
0	50	50
0.5	70	30
5.0	5	95
6.0	5	95
6.1	50	50
10.0	50	50

2.4.2 质谱条件

离子化方式: 负离子扫描(electronic spray ion, ESI-); 采集模式: 优化多反应监测(multiple reaction monitoring, sMRM); sMRM 参数: 检测窗口 45 s, 目标扫描时间 1 s; 离子源参数: 离子源温度 500 °C, 雾化气(氮气)压力 0.276 MPa, 气帘气(氮气)压力 0.241 MPa, 辅助气(氮气)压力 0.344 MPa, 电喷雾电压: -4500 V; sMRM 参数结果见表 2。

3 结果与分析

3.1 液相条件的选择

3.1.1 色谱柱的选择

黄霉素极性较强, 根据其结构性质, 采用 C₁₈ 柱进行样品分析。分别试验了 ZORBAX SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 5.0 μm) 色谱柱、ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 5.0 μm) 色谱柱、ZORBAX Eclipse plus C₁₈(100 mm×2.1 mm, 5.0 μm) 色谱柱以及

Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱, 结果表明 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm) 色谱柱能获得良好的峰形, 且具有良好的稳定性, 因此本实验选其作为分析柱。

3.1.2 流动相的选择

在负离子模式下, 碱性条件的流动相有利于提高离子的响应, 但是本研究发现, 在低 pH 值的流动相下, 黄霉素 A 反而有较好响应。分别使用乙腈-乙酸胺、乙腈-甲酸铵、乙腈-水、乙腈-甲酸水为流动相, 结果显示采用乙腈-甲酸水体系黄霉素 A 能获得较好的保留和响应值, 具体比例如本文“2.4.1”所述。

3.2 质谱条件的选择

黄霉素 A 在电力过程中产生 2 个母离子, 分别为 [M-H]⁻m/z 1580.7 和 [M-H]²⁻m/z 789.4。其中 [M-H]²⁻m/z 789.4 较 [M-H]⁻m/z 1580.7 响应值明显更高, 因此在质谱优化过程中以 789.4 作为黄霉素 A 的母离子进行相关研究。黄霉素 A 20 μg/L 的标准溶液色谱图和质谱图分别如图 1、图 2 所示。

3.3 前处理条件的选择

目前黄霉素 A 的提取液多选择为甲醇和氨化甲醇^[7-11], 本研究分别以甲醇、5%氨化甲醇、10%氨化甲醇、15%氨化甲醇为提取液, 进行添加回收实验, 比较黄霉素 A 的回收率, 结果显示 10%氨化甲醇作为提取液时效果最好。

黄霉素 A 的净化在已有的相关报道中多采用固相萃取的方式, 固相萃取柱以 C₁₈ 柱和 HLB 柱居多^[10-12]。本研究以 5 mL 含有 20 ng 黄霉素 A 的 10%氨化甲醇溶液为样品溶液, 分别用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化过的 C₁₈ 柱、HLB 柱、氨基柱进行固相萃取, 结果显示黄霉素 A 的回收率不理想, 约为 30%~60%。

考虑到提取液中基质的影响绝大部分来自蛋白的干扰, 本实验通过乙腈沉降蛋白的方式, 对提取液进行了净化。向 5 mL 含有基质的提取液中, 分别加入 1 μg/mL 的黄霉素 A 标准工作液 20 μL, 按照不同

表 2 黄霉素 A 优化 sMRM 设置

Table 2 Optimized sMRM settings for moenomycin A

Analyte	t _R (min)	sMRM (m/z)	Declustering potential(V)	Entrance potential(V)	Collision energy (V)	Collision cell exist potential(V)
moenomycin A	4.35	789.4/575.9*, 789.4/554.3	-155	-10	-42, -37	-10, -11

*为定量离子对

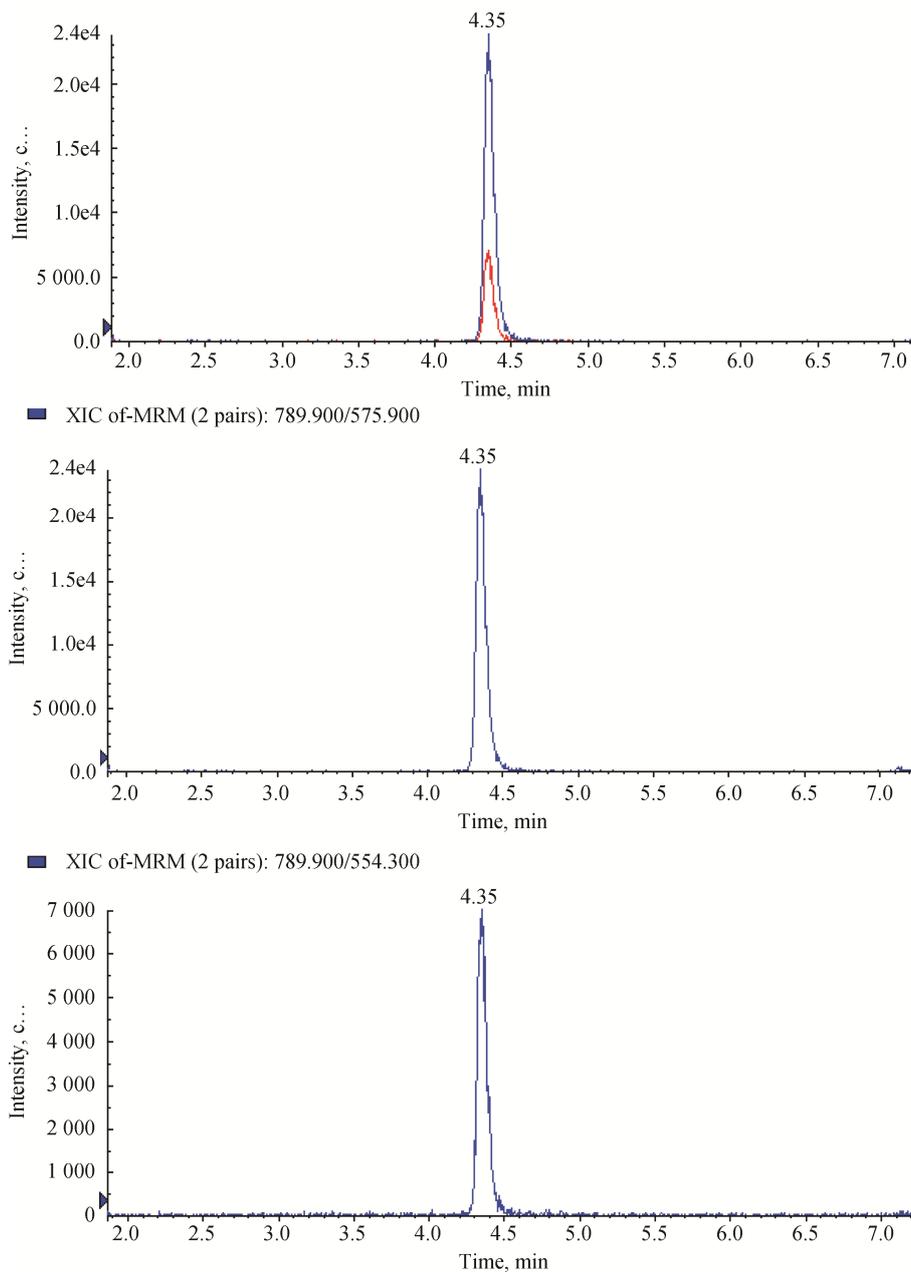


图 1 黄霉素 A 20 $\mu\text{g/L}$ 的 SMRM 色谱图总离子流图及提取离子流图

Fig. 1 TIC and XIC spectra of moenomycin A 9 acquired with composite standard solution (20 $\mu\text{g/L}$)

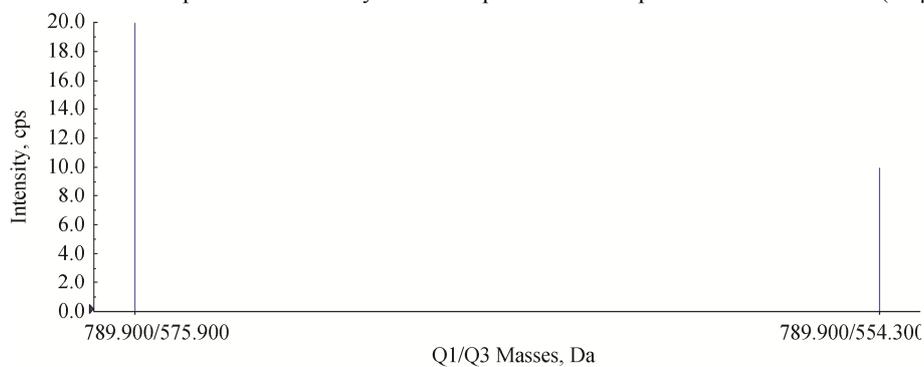


图 2 黄霉素 A 的质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of moenomycin A

体积比添加相应的乙腈, 高速冷冻离心后, 将上清液吹干, 并用 1 mL 甲醇复溶检测。结果显示, 当提取液与乙腈比例为 1:1 时, 黄霉素 A 主要保留在提取液和乙腈的混合液中, 残渣中几乎不含目标物; 而提取液与乙腈比例为 1:6 时, 目标物主要保留在残渣中, 此时用提取液重新溶解残渣, 高速冷冻离心后, 将上清液吹干, 并用 1 mL 甲醇复溶检测, 结果显示回收率良好, 实验结果如图 3 所示。针对不同的基质, 本研究选择了不同比例的乙腈进行蛋白沉降, 具体操作如本文“2.3”所述。

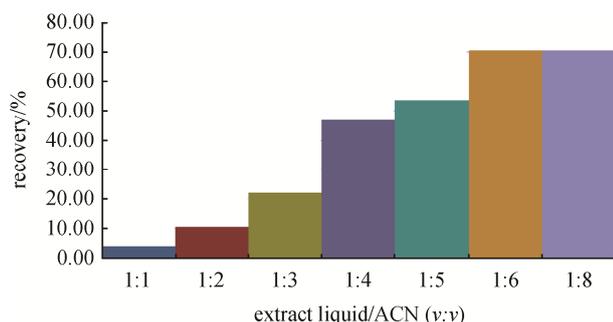


图 3 不同比例下黄霉素 A 回收率

Fig. 3 Recovery of moenomycin A in different scale

分别配制相同浓度的标准溶液和基质标准溶液, 结果显示基质的影响明显, 因此本文用基质标准溶液进行定量。

3.4 线性关系与定量限

用黄霉素 A 标准中间液分别配制浓度为 20、40、100、200、400 $\mu\text{g/L}$ 的基质标准系列, 并按浓度依次从低到高进行测定。每一水平重复 3 次, 按其基质标

准溶液质量浓度 $X(\mu\text{g/L})$ 与对应的峰面积平均值 $Y(\text{cps})$ 作标准曲线, 计算回归方程和相关系数, 结果见表 3。定量限以信噪比 10 定义, 对应的黄霉素 A 定量限为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.5 精密度、稳定性与回收率

取 20 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液, 按照该方法的分析条件, 连续进样测定 8 次, 黄霉素 A 的峰面积 RSD 小于 5.0%, 说明本方法的精密度良好。上述标准溶液每隔 12 h 重复进样 3 次, 黄霉素 A 的峰面积的总体 RSD 小于 5.0%, 说明该方法具有很好的稳定性和重复性。

以不同基质(鸡肉、脂肪、鸡肝、鸡肾)的空白样品进行添加试验, 空白样品中添加一定量的标准溶液, 分别相当于 10 $\mu\text{g/kg}$, 20 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平, 每个水平做 6 次平行试验, 其总体回收率和相对标准偏差见表 4。

3.6 实际样品检测

使用本研究建立的方法对市售 20 余种禽组织进行了黄霉素 A 残留测定分析, 结果发现鸡肉、鸭肉、鸡脂肪、鸡肝、鸭肝等测定样品中未发现有相关黄霉素 A 残留, 而鸡肾中有检出, 检测值为 41.8~100.2 $\mu\text{g/kg}$, 因此这就需要相关部门加大对黄霉素 A 药物残留的相关食品安全风险监控。

4 结论

本研究使用超快速液相色谱-串联质谱建立了禽组织(肌肉、脂肪、肝脏、肾脏)中黄霉素 A 残留测定的分析方法。该方法快速简便、灵敏度高、重现性好、

表 3 黄霉素 A 的线性关系

Table 3 Linear relationships of moenomycin A

目标物	浓度范围($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数(r)
moenomycin A	20~400	$Y=5.72X+0.0203$	0.9978

表 4 黄霉素 A 药物的回收率及相对标准偏差($n=6$)

Table 4 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of moenomycin A ($n=6$)

Analyte	Spiked($\mu\text{g/kg}$)	Chicken		Fat		Liver		Kidney	
		Average recovery(%)	RSD(%)						
moenomycin A	10	78.9	5.2	81.3	4.7	67.9	6.7	66.5	7.7
	20	81.0	4.7	75.6	6.8	69.7	5.8	72.8	5.9
	100	80.2	5.0	89.4	10.2	72.2	4.6	70.0	8.3

适用性强, 定量限满足国内外相关法规要求, 可有效用于残留监控监测和实验室日常分析。

参考文献

- [1] Pasquale GL, Serena F, Luigi S, *et al.* Determination of the banned growth promoter moenomycin A in feed stuffs by liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *Rapid Commun Mass Sp*, 2010, 24: 1017–1024.
- [2] 李会荣, 刘继明, 强莉, 等. 饲料中黄霉素 A 的测定[J]. *中国畜牧杂志*, 2010, 46(14): 38–42.
Li HR, Liu JM, Qiang L, *et al.* Study of flavomycin a determination in feed [J]. *Chin J Anim Sci*, 2010, 46(14): 38–42.
- [3] Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. Antimicrobial growthpromoters used in animal feed: effects of less well knownantibiotics on gram-positive bacteria [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2003, 16(2): 175–188.
- [4] Pfaller MA. *Diag Microbiol* [J]. *Infect Dis*, 2006, 56: 115
- [5] Thomas R, Mohammed D, Andrij B, *et al.* Studies on the interaction of the antibiotic moenomycin a with the enzyme penicillin-binding protein 1b [J]. *Bioorgan Med Chem*, 2003, 11: 2965–2981.
- [6] Gabriela L, Hans B, Heiko H, *et al.* Aggregation behavior of the antibiotic moenomycin a in aqueous solution [J]. *Langmuir*, 1998, 14: 4095–4104
- [7] 明文庆, 刘红云, 张莉. DB 34/T 1358-2011. 饲料中黄霉素的测定 - 高效液相色谱法 [EB/OL]. [2011-03-16]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/15/28984.html>
Ming WQ, Liu HY, Zhang L. DB 34/T 1358-2011. Determination of flavomycin in feed-High efficiency liquid chromatography method [EB/OL]. [2011-03-16]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/15/28984.html>
- [8] Commission of the European Communities . Update (situation as 30 April 2004) of the list of the authorized additives in feeding stuffs published in application of Article 9t(b)of Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feeding stuffs [Z].
- [9] European Commission . Regulation 1831/2003/EC of the European Parliament and of the council on additives for use in animal nutrition [Z].
- [10] 阮静, 刘晓玥, 饶宏英. 黄霉素的特性及检测方法[J]. *饲料广角*, 2006, 9: 32–33.
Ruan J, Liu XM, Rao HY. The characteristic and the examination method of Flavophosphlipol [J]. *Feed China*, 2006, 9: 32–33.
- [11] Sandra P, Brenna EM, Peter E, *et al.* Determination of the antimicrobial growth promoter moenomycin-A in chicken litter [J]. *J Chromat A*, 2007, 1175(2): 234–241.
- [12] 李金强, 曹鹏, 尹大路, 等. 液相色谱串联质谱测定畜禽肉中黄霉素 A 的残留量[J]. *分析实验室*, 2013, 32(1): 95–98.
Li JQ, Cao P, Yin DL, *et al.* Determination of flavomycinA residues in meat of livestock and poultry by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2013, 32(1): 95–98.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



许 辉, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测。
E-mail: xh2k12@sohu.com