

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.8.06

分散固相萃取法结合液相色谱串联质谱法检测 鸡可食性组织中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量

吴剑平, 张 婧, 李丹妮*, 严 凤, 潘 娟

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

[收稿日期] 2017-01-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 08-0030-10 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了检测鸡肉、鸡皮脂、鸡肝和鸡蛋中泰万菌素以及其主要代谢产物 3-乙酰泰乐菌素残留量的液相色谱串联质谱方法。前处理使用分散固相萃取法, 选择使用 50% (V/V) 乙腈提取, 无水 MgSO_4 进行脱水和盐析, 正己烷脱脂, 酸性氧化铝粉末进行样品净化。将离心后的上清液以如下方法进行上机检测: 使用反相色谱柱进行分离, 流动相为 0.1% 甲酸和乙腈, 采用梯度程序进行洗脱, 三重四级杆质谱进行定性定量分析。实验结果表明, 方法的最低检出限为 $2.5 \mu\text{g/kg}$, 最低定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$, 在 $5 \sim 200 \mu\text{g/kg}$ 范围内线性关系良好 ($r > 0.995$), 添加回收率在 $60\% \sim 110\%$, $\text{RSD} < 20\%$, 表明该方法具有较好的准确度与精密度。

[关键词] 泰万菌素; 3-乙酰泰乐菌素; 分散固相萃取; 串联质谱法

Determination of Aivlosin and 3-Acetyl Tylosin in Edible Chicken Tissues by Dispersive Solid Phase Extraction Combined with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WU Jian-ping, ZHANG Jing, LI Dan-ni*, YAN Feng, PAN Juan

(Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

Corresponding author: Li Dan-ni, E-mail: yure@sina.com

Abstract: To determine residue of tylvalosin (TLV) and 3-acetyl tylosin (3-AT) in edible chicken tissues such as muscle, skin/fat, liver and egg, a dispersive solid phase extraction method was used to process the sample. The 50% (V/V) acetonitrile was chosen to extract the target compounds, the anhydrous magnesium sulfate was chosen to dehydrate and salt out, the n-hexane was chosen to degrease and the acid alumina powder were chosen to purify the sample. After centrifugation, the extract was determined by the method below. The targets was separated by the gradient elution with a reverse phase column as the stationary phase and 0.1% formic acid with acetonitrile as the mobile phase. The qualification and quantification were achieved by a tandem mass

基金项目: 2017 年农业行业标准制定和修订项目; 上海市市级农口系统青年人才成长计划 (沪农青字 (2016) 第 2-5 号)

作者简介: 吴剑平, 硕士, 畜牧师, 从事兽药残留分析与研究。

通讯作者: 李丹妮。E-mail: yure@sina.com

spectrometry. The results showed that the LOD of the method was 2.5 μg/kg and the LOQ was 5 μg/kg. The linearity of the method was good in the range of 5~200 μg/kg and the liner correlations were all above 0.995, and the recovery of 7 targets were between 60% and 110%, and the RSD were lower than 20%, which showed the good accuracy and precision of the method.

Key words: tylvalosin; 3-acetyl tylosin; dispersive solid phase extraction; tandem mass spectrometry

泰万菌素(Tylvalosin)是新一代的大环内酯类抗生素^[1],常作为酒石酸盐使用,即酒石酸泰万菌素(Tylvalosin Tartrate)。该产品在 2007 年之前曾用名是酒石酸乙酰异戊酰泰乐菌素(Acetylsivaleryltylosin Tartrate,简称 AIV)。泰万菌素是一种畜禽专用的抗生素,通过抑制细菌蛋白质的合成从而抑制细菌的繁殖,其在中国已被注册批准用于治疗猪、鸡支原体感染和猪赤痢螺旋体以及其他敏感细菌的感染,其批准用药剂量为每 1 L 水添加 200 mg (有效成分),连用 3~5 d;酒石酸泰万菌素预混剂的批准用药剂量为每 1000 kg 饲料添加 100~300 g (有效成分),连用 7 d^[2]。泰万菌素可在动物体内经代谢后以原药和 3-乙酰泰乐菌素(3-O-Acetyltylosin,简称 3-AT)的形式残留在肝脏和油脂中^[3]。欧盟对泰万菌素的使用有严格规定^[4],泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素在鸡皮/脂肪、鸡肝和鸡蛋中的最大残留限量(MRL)之和不得超过 50 μg/kg,两者的 MRL 分别不得超过 25 μg/kg。泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素基本化学结构见图 1。

固相萃取技术已被广泛应用于各种残留检测领域,其具有简便快捷、特异性好等特点。据文献报道^[5-8],常用的固相萃取主要有分散固相萃取和填料柱固相萃取这两种方式,通过这些手段可以达到去除试样中的干扰物质,使痕量组分得到富集,便于检测和分离,保护色谱分析柱等目的。相比传统填料柱固相萃取,分散固相萃取具有节省人力和时间,提高前处理稳定性和降低耗材成本的优势。

1 材料与方法

1.1 仪器 Ultimate 3000 双三元超高效液相色谱、Excalibur 控制软件、串联四极杆质谱带 HESI 电离喷雾源(TSQ Quantiva)、Xcalibur 数据处理系统、高速冷冻离心机(Allegra X-22R, BECKMAN COUL-

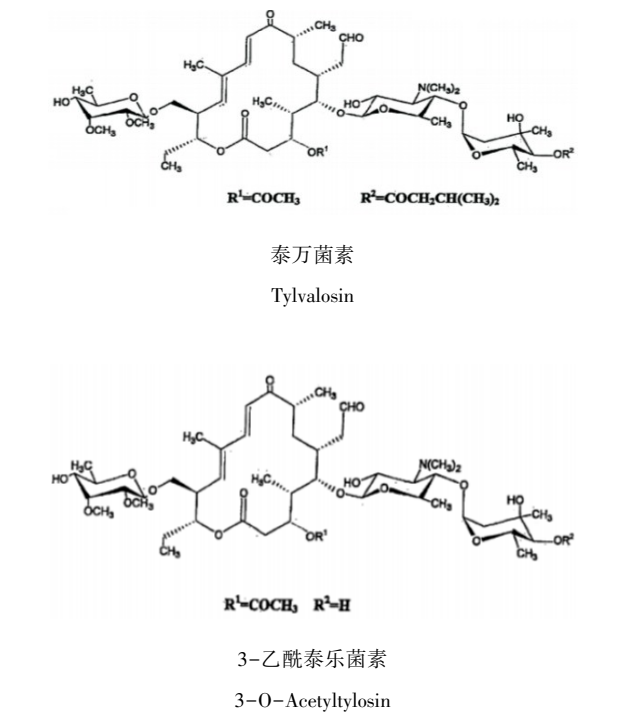


图 1 泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素基本化学结构图
Fig 1 Structure of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin

TER); AL204 电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;减压旋转蒸发仪(B-490, BUCHI);水浴控温氮吹仪(N-EVAP,上海安谱公司)。

1.2 材料、药品与试剂 C18 分析柱(Thermo Accucore RP-MS 100 mm×2.1 mm, 2.6 μm),泰万菌素对照品(英国伊科拜克,批号:130503, 93.69%),3-乙酰泰乐菌素对照品(英国伊科拜克,批号:Q3317, 96.54%),无水硫酸镁(分析纯),氯化钠(分析纯),正己烷(色谱纯),乙腈(色谱纯),酸性氧化铝(100~200 目),乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯);去离子水(电阻率≥18 MΩ·cm);高纯氮、高纯氩(纯度均为 99.999%)。

1.3 色谱条件 色谱柱:Thermo Accucore RP-MS 100 mm×2.1 mm, 2.6 μm, 柱温 35℃, 流速

0.3 mL/min,进样量 10 μL,流动相:A 为 0.1% 甲酸,B 为乙腈,采用梯度洗脱程序如表 1 所示,所得特征离子质量色谱图如图 2。从上至下通道依次为泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Procedure of gradient elution			
时间 Time/min	流速 Flow rate /(mL · min ⁻¹)	A%	B%
0	0.3	80	20
3	0.3	20	80
6	0.3	20	80
6.1	0.3	80	20
8.1	0.3	80	20

1.4 质谱条件 使用 Thermo Fisher 公司的 TSQ Quantiva 串联四极杆质谱带 HESI 电离喷雾源质谱检测器对 1 μg/mL 的泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素单标溶液进行优化,兼顾各目标化合物优化后的质谱条件为:选择正离子模式,源电压 3900 V,鞘气 (Sheath gas) 压力 344 kPa,辅助气 (Aux gas) 流速 5 L/min,吹扫气 (Sweep gas) 流速 0.3 L/min,离子传输管 (Ion transfer tube) 温度 350 ℃,雾化器 (Vapourizer) 温度 350 ℃,检测模式为选择反应监控 (Selected reaction monitor, SRM),碰撞气压力 0.2 Pa,Q1 段分辨率设为半峰宽 0.7,Q2 段分辨率设为半峰宽 0.7,泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素的定性与定量离子对以及对应的撞击能量见表 2。

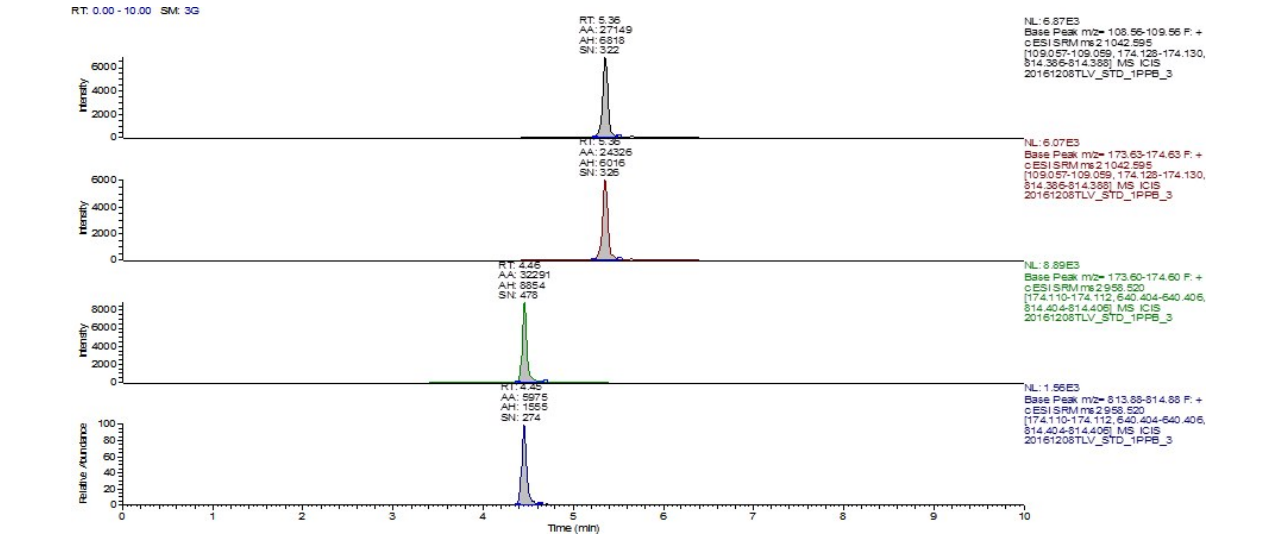


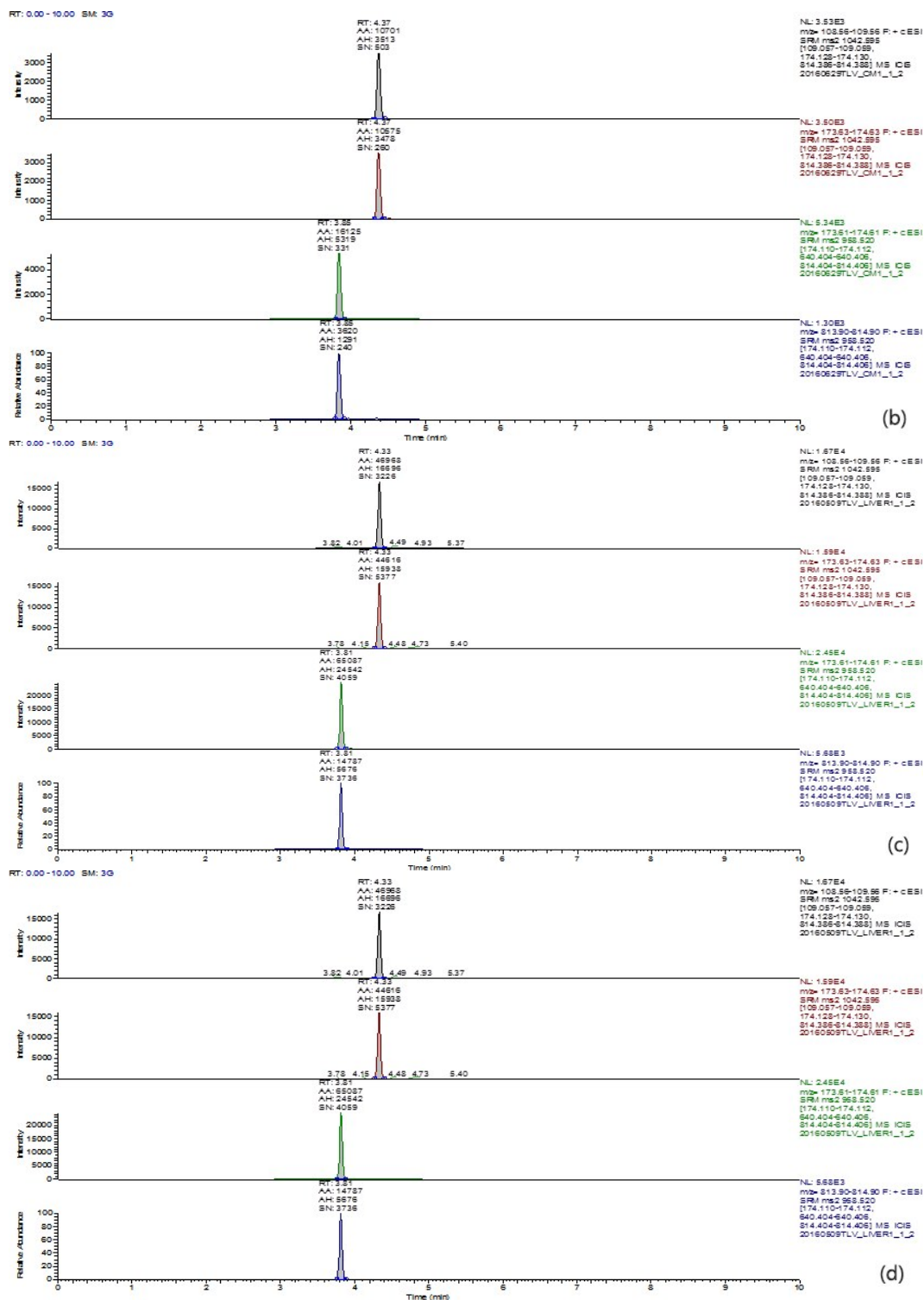
图 2 1 ng/mL 混合对照品溶液 SRM 图

Fig 2 SRM chromatography of 1 ng/mL mixed standard solution

表 2 泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素定性与定量离子对

Tab 2 Qualitative and quantitative ion pair for Tylosin and 3-O-Acetyltirosin				
化合物 Compound	定性离子对 Qualitative ion pair (m/z)	定量离子对 Quantitative ion pair (m/z)	透镜电压 Lens voltage /V	碰撞能量 Collision energy /eV
泰万菌素 Tylosin	1042.60>109.06	1042.60>109.06	185	48
	1042.60>174.13			45
3-乙酰泰乐菌素 3-O-Acetyltirosin	958.52>174.11	958.52>174.11	181	44
	958.52>814.40			32

(a)



(a) 空白鸡肉添加 5 $\mu\text{g/kg}$; 5 $\mu\text{g/kg}$ added in blank muscle; (b) 空白鸡皮/脂肪添加 5 $\mu\text{g/kg}$; 5 $\mu\text{g/kg}$ added in blank skin/fat;

(c) 空白鸡肝添加 5 $\mu\text{g/kg}$; 5 $\mu\text{g/kg}$ added in blank liver; (d) 空白鸡蛋添加 5 $\mu\text{g/kg}$ 5 $\mu\text{g/kg}$ added in blank egg

图 3 泰万菌素和 3-乙酰泰万菌素实际添加实验特征离子质量色谱图

Fig 3 Typical SRM chromatogram of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin added in tissues

2.3 方法准确度与精密度 采用标准添加法,在鸡皮、鸡肉、鸡肝和鸡蛋中添加 4 个不同浓度(定量限、1/2MRL、MRL、2MRL 四个浓度)的泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素进行回收率试验,各浓度进行 3 个批间样品平行试验,批内重复 5 次,求批内、批间相对标准偏差,计算结果见表 4~表 7。从表中试验结果可以看出,本方法在空白鸡皮、鸡肉、鸡肝和鸡蛋

中进行 5~50 μg/kg 的添加浓度,方法的回收率均在 60%~120%之间,批内、批间相对标准偏差均小于 20%。

2.4 方法选择性的验证 选择空白鸡皮、鸡肉、鸡肝和鸡蛋各 20 个空白样品,按优化条件进行处理后上机测定,未发现有假阳性结果,表明该方法的选择性良好。

表 4 鸡皮中泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素添加回收率及精密度(n=5)

Tab 4 Recovery and precision of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin added in chicken skin/fat(n=5)						
化合物 Compound	添加浓度 Added concentration /(μg·kg ⁻¹)	批次 Batch	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery /%	批内 Intra-batch RSD/%	批间 Inter-batch RSD/%
泰万菌素 Tylvalosin	5	I	95.4、97.2、88.6、73.6、71.8	85.2	14.3	18.9
		II	71.6、67.0、67.2、68.7、78.8	70.7	6.9	
		III	94.3、96.8、100.4、114.7、112.0	103.6	8.8	
	12.5	I	75.8、79.0、91.3、89.4、92.6	85.6	9.0	19.4
		II	60.0、60.2、78.0、77.5、77.0	70.5	13.5	
		III	110.3、74.5、82.5、114.1、107.8	89.7	18.4	
	25	I	96.0、86.5、89.8、87.1、82.7	88.4	5.6	15.6
		II	66.8、73.8、75.2、69.3、73.6	71.7	4.9	
		III	83.9、88.7、107.2、101.4、111.6	98.6	12.0	
	50	I	108.3、111.2、99.5、88.0、86.5	98.7	11.5	15.5
		II	60.7、71.2、86.2、82.1、77.8	75.6	13.2	
		III	87.7、93.7、106.4、95.9、99.6	96.7	7.2	
3-乙酰泰乐菌素 3-O-Acetyltylosin	5	I	88.0、90.3、90.7、86.8、92.6	89.7	2.6	11.2
		II	106.6、113.8、105.4、108.8、107.5	108.4	3.0	
		III	112.6、118.9、110.6、119.2、116.6	115.6	3.3	
	12.5	I	86.6、89.8、91.4、91.3、87.2	89.3	2.5	11.0
		II	109.8、113.9、107.2、107.2、115.8	110.8	3.5	
		III	111.9、104.3、109.5、119.7、113.2	111.7	5.0	
	25	I	87.3、83.4、83.0、83.1、85.3	84.4	2.2	13.8
		II	97.5、116.9、118.1、118.3、116.5	113.5	7.9	
		III	94.1、101.3、107.3、111.1、108.4	104.4	6.5	
	50	I	80.0、79.8、83.6、81.4、79.4	80.8	2.1	11.6
		II	94.7、101.8、101.0、102.0、101.5	100.2	3.1	
		III	91.1、100.7、108.6、111.2、94.5	101.2	8.6	

表 5 鸡肉中泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素添加回收率及精密度 (n=5)

Tab 5 Recovery and precision of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin added in chicken muscle (n=5)

化合物 Compound	添加浓度 Added concentration /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次 Batch	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	批内 Intra-batch RSD/%	批间 Inter-batch RSD/%
泰万菌素 Tylvalosin	5	I	106.6、108.4、102.4、101.2、103.2	104.4	2.9	4.9
		II	96.8、100.4、97.5、94.3、93.6	96.5	2.8	
		III	97.5、98.7、102.3、90.8、95.4	96.9	4.4	
	12.5	I	102.4、103.5、93.9、95.5、94.1	97.9	4.8	4.4
		II	98.0、99.3、98.7、92.4、90.9	95.9	4.1	
		III	104.3、98.8、104.6、99.6、96.6	100.8	3.5	
	25	I	86.8、87.6、81.4、85.8、79.7	84.3	4.2	5.6
		II	86.4、80.8、70.9、80.6、83.5	80.4	7.2	
		III	90.7、87.4、85.1、83.8、83.1	86.0	3.6	
	50	I	83.8、85.2、87.2、83.5、82.8	84.5	2.1	3.6
		II	85.0、86.4、84.4、81.9、82.0	83.9	2.3	
		III	90.7、90.5、83.4、88.6、90.6	88.8	3.5	
3-乙酰泰乐菌素 3-O-Acetyltylosin	5	I	107.3、106.1、106.4、107.4、100.8	105.6	2.6	12.1
		II	83.2、79.7、80.7、79.1、81.6	80.9	2.0	
		III	104.8、100.0、108.3、96.1、99.7	101.8	4.7	
	12.5	I	100.5、102.6、101.2、93.7、94.2	98.4	4.2	5.6
		II	92.9、88.4、87.5、86.2、86.8	88.4	3.0	
		III	97.9、94.6、96.6、92.2、92.3	94.7	2.7	
	25	I	100.4、98.3、92.5、90.5、94.0	95.1	4.3	4.1
		II	91.0、92.4、83.6、92.6、91.6	90.2	4.2	
		III	92.2、94.0、94.8、95.0、89.4	93.1	2.5	
	50	I	89.2、95.5、91.8、92.2、86.6	91.1	3.7	4.2
		II	90.4、88.0、89.5、86.7、91.2	89.1	2.0	
		III	84.8、86.4、79.5、90.8、88.0	85.9	4.9	

表 6 鸡肝中泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素添加回收率及精密度 (n=5)

Tab 6 Recovery and precision of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin added in chicken liver (n=5)

化合物 Compound	添加浓度 Added concentration /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次 Batch	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	批内 Intra-batch RSD/%	批间 Inter-batch RSD/%
泰万菌素 Tylvalosin	5	I	68.5、74.0、69.4、72.3、72.2	71.3	3.2	15.5
		II	65.2、87.8、70.2、67.6、60.5	70.3	14.8	
		III	96.4、99.6、90.6、87.6、80.8	91.0	8.1	
	12.5	I	105.3、87.7、89.6、91.9、92.4	93.4	7.4	11.8
		II	84.9、99.3、91.2、94.6、92.0	92.4	5.7	
		III	108.0、115.6、114.1、83.0、77.4	99.6	18.1	

续表						
化合物 Compound	添加浓度 Added concentration /(μg · kg ⁻¹)	批次 Batch	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	批内 Intra-batch RSD/%	批间 Inter-batch RSD/%
泰万菌素 Tylvalosin	25	I	78.9、89.7、83.2、73.4、66.6	78.4	11.3	19.4
		II	91.0、79.6、68.5、60.6、60.0	71.9	18.4	
		III	96.8、103.6、101.4、106.6、105.6	102.8	3.8	
	50	I	89.8、89.9、90.0、84.4、78.1	86.4	6.0	15.6
		II	76.3、61.9、61.6、78.6、75.0	70.7	11.7	
		III	85.2、100.5、95.9、108.0、96.6	97.2	8.5	
3-乙酰泰乐菌素 3-O-Acetyltylosin	5	I	93.4、92.0、91.6、93.0、89.8	92.0	1.5	10.4
		II	111.0、108.2、110.9、109.6、107.0	109.3	1.6	
		III	119.9、105.8、117.6、118.6、117.6	115.9	4.9	
	12.5	I	88.9、93.3、91.2、87.2、89.2	112.5	2.6	9.9
		II	112.2、111.7、117.2、112.2、109.0	112.5	2.6	
		III	98.5、106.3、106.4、106.7、109.6	105.5	3.9	
	25	I	77.7、79.6、77.6、85.3、78.2	79.7	4.1	15.5
		II	113.6、110.6、115.9、111.1、107.6	111.8	2.8	
		III	101.8、102.8、108.9、115.3、114.9	108.7	5.9	
	50	I	77.7、79.6、77.6、85.3、78.2	79.7	4.1	10.4
		II	100.0、99.6、101.0、96.5、92.0	97.8	3.7	
		III	95.9、95.2、98.0、100.1、103.6	98.6	3.4	

表 7 鸡蛋中泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素添加回收率及精密度 (n=5)

Tab 7 Recovery and precision of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin added in chicken egg (n=5)

化合物 Compound	添加浓度 Added concentration /(μg · kg ⁻¹)	批次 Batch	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	批内 Intra-batch RSD/%	批间 Inter-batch RSD/%
泰万菌素 Tylvalosin	5	I	69.8、74.8、100.4、88.0、80.5	82.7	14.5	11.4
		II	77.8、78.7、75.8、75.0、76.5	76.8	1.9	
		III	90.0、73.4、84.5、84.0、100.8	86.5	11.5	
	12.5	I	75.7、72.9、71.0、69.1、70.7	71.9	3.5	13.6
		II	97.6、94.9、95.6、98.0、99.4	97.1	1.9	
		III	77.7、85.6、99.4、89.6、87.3	87.9	8.9	
	25	I	83.2、81.6、75.8、77.1、76.4	78.8	4.2	10.6
		II	97.6、100.4、97.6、96.7、95.4	97.5	1.9	
		III	81.6、84.8、94.8、78.9、77.9	83.6	8.1	
	50	I	89.2、84.6、73.3、85.9、73.4	81.3	9.1	8.1
		II	95.8、94.1、95.5、93.1、90.8	93.9	2.2	
		III	85.6、82.0、94.0、82.9、82.5	85.4	5.9	

续表						
化合物 Compound	添加浓度 Added concentration /(μg · kg ⁻¹)	批次 Batch	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	批内 Intra-batch RSD/%	批间 Inter-batch RSD/%
3-乙酰泰乐菌素 3-O-Acetyltylosin	5	I	69.8、70.0、100.5、84.5、87.8	82.5	15.7	
		II	86.4、92.4、88.0、83.3、89.4	87.9	3.8	11.7
		III	83.6、66.6、100.3、82.9、84.1	83.5	14.3	
	12.5	I	78.1、71.6、64.8、80.7、68.2	72.7	9.2	
		II	94.9、97.9、96.5、102.9、103.2	99.1	3.8	15.6
		III	73.0、84.5、99.0、80.8、75.1	82.5	12.5	
	25	I	88.8、78.4、75.7、74.8、72.0	77.9	8.3	
		II	95.6、101.4、97.4、100.1、93.1	97.5	3.4	13.4
		III	83.9、75.6、89.4、71.1、69.4	77.9	11.0	
	50	I	98.9、84.4、80.1、79.0、76.1	83.7	10.8	
		II	92.9、98.5、98.9、98.9、90.2	95.9	4.2	9.1
		III	93.4、87.7、97.5、84.4、81.6	88.9	7.3	

3 讨论与小结

3.1 提取液提取效率研究 试料中的残留药物尝试了多种提取液,包括纯乙腈、50%乙腈、正己烷、异辛烷。2 g 空白试样中加入 100 ng/mL 的泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素标准工作液 250 μL 分别加入上述提取液进行振荡提取,之后采用 1.5 项中前处理条件进行净化,测得结果如表 8 所示,测试结果表明两种药物极性偏大,在 50%乙腈溶液中的提取

效率接近 90%,在正己烷或异辛烷这类极性小的溶剂中几乎不溶,因此选择 50%乙腈进行提取,正己烷进行脱脂。无水硫酸镁盐析除去杂质蛋白,取适量中间乙腈层提取液,用 20 mM 酒石酸稀释后,再用酸性氧化铝除去剩余脂肪与蛋白后,进液相色谱-串联质谱法检测,用外标法定量。

表 8 泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素提取效率研究

Tab 8 Research on extraction rate of Tylvalosin and 3-O-Acetyltylosin

化合物 Compound	乙腈 Acetonitrile	50%乙腈 50% acetonitrile	正己烷 Hexane	异辛烷 Isooctane
泰万菌素 Tylvalosin	54.2%	89.1%	5.3%	0
3-乙酰泰乐菌素 3-O-Acetyltylosin	84.3%	88.7%	2.6%	3.5%

3.2 分散相基质的选择 鸡肉和鸡蛋中的干扰杂质主要以蛋白质和磷脂为主,主要通过无水硫酸镁和氯化钠进行盐析,其对基质中的血细胞之类的生物杂质也有一定的破坏和沉降能力。乙腈在提取的同时也具有破坏蛋白质结构造成沉淀的作用。

油脂和肝脏中不但有蛋白质,还有大量的脂肪会干扰后续的检测,原本尝试使用 C18 粉末吸附,结果发现在吸附脂肪的同时,会造成提取效率的大幅下降,推测是 C18 粉对目标化合物也有较强的吸附能力,因为在 3.1 项实验发现正己烷中泰万菌素和

3-乙酰泰乐菌素溶解性都很小,而脂肪在其中的溶解度较高,因此采用正己烷脱脂。最后,通过高速离心可以将蛋白、磷脂、血细胞等沉降至下层,未溶解的脂肪粒会漂浮在正己烷层的表面,只要吸取中间的乙腈层即可获得富含目标物的提取液。

3.3 色谱条件的选择 通过选择具有更好保留性和选择性的色谱条件可以使目标化合物获得充分的保留与分离,本方法的目标化合物属于中弱极性,因此选择反相色谱柱进行分离较为合适,比较了 Thermo 公司装填的两款反相色谱柱: Accucore RP-MS 150×2.1 mm 2.6 μm 和 Synchronis C18 150×2.1 mm 3.0 μm。实验结果表明,使用 Accucore RP-MS 色谱柱的目标物峰普遍具有保留时间不足、峰型对称性不高的特点,推测其原因为所使用的聚合物性质填料含碳量接近 10%,虽然通过壳层技术增加了填料的比表面积,但并不能提供很好的保留; Synchronis C18 色谱柱的硅胶键合填料含碳量接近 17%,为目标化合物提供了足够的保留。流动相条件也进行了新的尝试,原本欧盟方法所使用的流动相为:水相采用 0.3% 甲酸-乙酸铵溶液,有机相为 0.3% 甲酸甲醇溶液,经试验发现该流动相在进行梯度洗脱条件时会造成较高的色谱柱反压,容易发生质谱仪毛细管喷针处的结晶析出造成堵塞或液流不稳定。因此,将流动相条件改为使用水相为 0.1% 甲酸,有机相改为乙腈溶液,在梯度条件下柱压变化明显减小,毛细管喷针也不易发生堵塞,所获得的保留时间与峰型也可以满足检测要求。

本研究建立了检测鸡肉、鸡皮脂、鸡肝和鸡蛋中泰万菌素与 3-乙酰泰乐菌素残留量的液相色谱串联质谱检测方法。前处理使用分散固相萃取法,液相部分使用反相色谱柱进行分离,三重四级杆质谱进行定性定量分析。实验结果表明,方法的最低检出限为 2.5 μg/kg,最低定量限为 5 μg/kg,在 5~200 μg/kg 范围内线性关系良好 ($r>0.995$),添加回收率在 60%~110% 之间, $RSD<20\%$,表明该方法具有较好的灵敏度、准确度与精密度。

参考文献:

[1] 冯言言,田伟.大环内酯类药物泰万菌素的研究进展[J].广

东畜牧兽医科技,2015,(6):5-6.

Feng Y Y, Tian W. Development of Research on Marcolides Tylvalosin[J]. Technology of Animal Husbandry and Veterinary medicine in Guangdong, 2015, (6): 5-6.

[2] 汪莎莎. 动物性食品中泰乐菌素、泰万菌素、替米考星残留检测研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012.

Wang S S. Development of Methods for Determination of Tylosin, Tylvalosin and Tilmicosin Residues in Food Derived from Animals [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.

[3] 朱晓娟,王华丽,齐鹏,等. 酒石酸乙酰异戊酰泰乐菌素在猪体内的药代动力学研究[J]. 中国兽医杂志, 2013, (2): 73-75.

Zhu X J, Wang H L, Qi P, *et al.* Pharmacokinetics of Aivlosin in Pigs [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, (2): 73-75.

[4] Eco Animal Health Reference No. RES. UK. 060091. Charles River Laboratories Study Number 284084. 136-148 [Z].

[5] 孙雷,李丹,毕言锋,等. 抗病毒药物的毒性及残留检测方法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(10): 57-61.

Sun L, Li D, Bi Y F, *et al.* Research Development of Toxicity and Residue Detection Methods of the Antiviral Drugs [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(10): 57-61.

[6] 张鑫,吴剑平,严凤,等. 基于双柱固相萃取-色质联用技术同时检测鸡肉中 8 种抗病毒药物残留[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(9): 45-50.

Zhang X, Wu J P, Li D N, *et al.* Simultaneous Analysis of Eight Antiviral Drug Residues in Chicken Based on a Double-column Designed Solid Phase Extraction Combined with LC-MS/MS Method [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(9): 45-50.

[7] 吴剑平,张鑫,李丹妮,等. 分散固相萃取结合亲水作用色谱-串联质谱法检测预混合饲料中 7 种抗病毒药物含量[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(3): 49-55.

Wu J P, Zhang X, Li D N, *et al.* Determination of 7 Antivirus in Premixed Feed by QuCHERS Combined with Hydrophilic Interaction Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(3): 49-55.

[8] 吴剑平,张鑫,李丹妮,等. 在线固相萃取/液相色谱-串联质谱法检测饲料中 5 种喹噁啉类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2015, (5): 610-615.

Wu J P, Zhang X, Li D N, *et al.* Determination of 5 Quinoxaline Residues in Feed by On-line Solid Phase Extraction/Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, (5): 610-615.