

高效液相色谱 – 串联质谱法测定 猪组织中的土拉霉素

倪姮佳, 黄显会, 方炳虎, 贺利民, 赵永达

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 建立了高效液相色谱 – 串联质谱法测定土拉霉素在猪肝脏、肾脏、肌肉、皮脂和肺脏中的残留检测方法, 并初步探讨了土拉霉素的基质效应。样品用乙腈提取, 涡旋振荡离心后经正己烷脱脂, C_{18} 固相萃取柱净化后, 40 °C 氮气吹干, 用 50% 乙腈定容。以 Penomenex Luna C_{18} 柱为色谱柱, 乙腈 – 2 mmol/L 乙酸铵水溶液 (含 0.1% 甲酸) 为流动相, 梯度洗脱; 流速 0.25 mL/min, 柱温 35 °C。质谱条件为电喷雾离子源, 检测方式为正离子多离子反应监测 (MRM), 外标法定量。在 10.0~ 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 方法的线性关系良好 ($r > 0.99$)。5 种基质中土拉霉素的检出限为 3~ 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量下限均为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在高、中、低 3 个加标水平下的平均回收率为 74%~ 96%, 批内相对标准偏差 (RSD) 为 4.0%~ 16%, 批间 RSD 为 7.0%~ 15%。该法准确、灵敏, 适用于猪组织中土拉霉素的测定。

关键词: 高效液相色谱 – 串联质谱法; 土拉霉素; 猪组织

中图分类号: O657.63; S859.796 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)03-0307-05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.03.015

Determination of Tulathromycin in Pork Tissues by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

NI Heng-jia HUANG Xian-hui, FANG Bing-hu, HE Li-min, ZHAO Yong-da
(College of Veterinary Medicine, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract A high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (HPLC – MS/MS) method was developed for the determination of tulathromycin in pork tissues such as liver, kidney, muscle, skin, fat and lung samples. The matrix effects of tulathromycin were also discussed in this paper. The samples were extracted with acetonitrile and defatted with *n*-hexane. The extract was cleaned up on a C_{18} solid phase extraction (SPE) cartridge. After washed with 4% ammonium hydroxide in methanol and then condensed to nearly dryness at 40 °C water bath, the extract was redissolved with 50% acetonitrile. Tulathromycin was separated on a Penomenex Luna C_{18} column with a mobile phase of acetonitrile – 2 mmol/L ammonium acetate (containing 1% formic acid) at a flow rate of 0.25 mL/min. The column temperature was set at 35 °C. The identification was carried out by MS/MS with electrospray ionization under positive scan and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The quantitation was performed by the external standard method. The results showed that the calibration curves for all the tissues were linear ($r > 0.99$) in the range of 10.0 – 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limits of detection (LODs) of tulathromycin in five tissues were in the range of 3 – 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the limits of quantitation (LOQs) for all the tissues were 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The spiked recoveries at three spiked concentration levels were in the range of 74% – 96%. The RSDs of intra-day and inter-day were in the range of 4.0% – 16% and 7.0% – 15%, respectively. The method was proved to be simple and accurate and could be applied in the determination of tulathromycin in real samples.

Key words high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS); tulathromycin; pork tissue

收稿日期: 2010-09-30 修回日期: 2010-12-04

基金项目: 2010 广州市科技支撑计划项目 (2010Z1-E371)

通讯作者: 黄显会, Tel: 020-87344801, E-mail: xhhuang@scau.edu.cn

土拉霉素 (Tulathromycin) 是新型的半合成猪牛专用大环内酯类抗生素, 其分子式为 $C_{41}H_{79}N_3O_{12}$, 相对分子质量为 806.23, 由 10% 的 13 元氮杂内酯环和 90% 的 15 元氮杂内酯环两个同分异构体组成^[1-2]。该药自 2004 年在欧盟和美国上市以来, 备受关注。土拉霉素给药后吸收迅速, 生物利用度高、半衰期长、药效持久。肠胃外单次给药即能供全程的治疗, 在兽医临床上具有广阔的应用前景^[1-4]。

高效液相色谱串联质谱法 (HPLC-MS/MS) 由于具有灵敏度高、定性准确等优点, 而广泛应用于残留痕量物质的分析检测。因为土拉霉素无紫外吸收, 故无法用高效液相色谱法直接检测, 国内外对土拉霉素的分析检测也以高效液相色谱串联质谱法为主^[4-14]。土拉霉素作用的靶部位是肺脏, 所以其分析研究集中在血浆、肺脏及肌肉。刘勇军^[3]和 Benchaoui^[8]等建立了以磷酸盐溶液为提取液的猪肺脏和肌肉中土拉霉素的检测方法, 方法高效, 但不能满足该化合物在所有组织如肝脏、肾脏等的检测要求。Martos 等^[9]建立了 9 种大环内酯类 (包括土拉霉素) 物质在肌肉中的多残留检测方法, 但其净化过程不适用于肝、肾、皮脂等部位。目前国内外尚无肝、肾、皮脂等部位中土拉霉素分析测定方面的报道, 而对这些部位的药物残留分析正是药物代谢动力学等研究的基础, 同时, 鉴于各国的膳食习惯不同以及全面分析土拉霉素在猪体内残留的要求, 肝、肾及皮脂也应列入重点研究对象的范围, 为建立全面的土拉霉素分析方法提供技术支持。

本研究以乙腈为提取液, C_{18} 固相萃取柱净化, HPLC-MS/MS 检测, 建立了土拉霉素在猪肌肉、肝脏、肾脏、肺脏、皮脂中残留的分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Agilent1200 型高效液相色谱仪, Penmenex Luna C_{18} 色谱柱 (150 mm × 2.0 mm, 5 μ m); API 4000 电喷雾-串联四极杆质谱仪, 配 Analyst 4.1.5 软件 (美国应用生物系统公司); Avanti J-26 高速冷冻离心机 (美国 BECKMAN COULTER 公司); C_{18} 固相萃取柱 (500 mg/3 mL, 德国 CNW 科技公司); XW-80A 旋涡混合仪 (上海青浦沪西仪器厂); KS501digital 轨道式摇床 (德国 KA 公司)。

土拉霉素标准品 (美国辉瑞公司); 甲醇、乙腈 (德国 CNW 科技公司), 甲酸、乙酸铵 (美国 OMEGA 公司) 均为色谱纯; 正己烷、氨水 (分析纯, 广州分析试剂厂); 水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

土拉霉素储备液: 准确称取标准品 25 mg 于 25 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容, 混匀后置冰箱冷藏储存。标准工作液的配制: 吸取储备液 1 mL 于 10 mL 容量瓶, 用 50% 乙腈水溶液定容。再根据需要稀释成不同浓度。

1.2 提取与净化

各组织匀浆后分别称取 (1 ± 0.01) g 试样于 30 mL 离心管中。加入 4 mL 乙腈, 旋涡 3 min, 置摇床上 300 r/min 振荡 10 min, 4 °C 下以 5 500 r/min 离心 10 min, 上清液转移至 10 mL 加盖玻璃管内。3 mL 乙腈重提 1 次, 合并上清液, 于 40 °C 下氮吹至近 1 mL 后加入 3 mL 水、3 mL 正己烷, 旋涡 1 min 后, 以 4 000 r/min 在 4 °C 离心 3 min, 取下清液 (含土拉霉素的乙腈水溶液) 备用。

下清液经 4 mL 乙腈活化, 过 4 mL 25% 乙腈水溶液平衡的 C_{18} 固相萃取柱, 过柱速率约为 1 mL/min, 加 4 mL 水淋洗, 负压抽干后用 5 mL 的 4% 氯化甲醇溶液洗脱。洗脱液于 40 °C 水浴氮气流吹干, 用 1.0 mL 50% 的乙腈溶液溶解混匀后, 于 12 000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 μ m 滤膜, 待 HPLC-MS/MS 分析。

1.3 仪器分析条件

液相色谱: Penmenex Luna C_{18} 色谱柱 (150 mm × 2.0 mm, 5 μ m); 流动相 A: 乙腈; 流动相 B: 2 mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸)。梯度洗脱程序: 0~1 min 5% A; 1~2.5 min 5%~45% A; 2.5~5 min 45% A; 5~5.5 min 45%~5% A; 5.5~10 min 5% A; 流速 0.25 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 5 μ L。

质谱: 采用多反应监测 (MRM) 扫描模式; 电喷雾电离源 (ESI); 正离子扫描; 喷雾电压 5.0 kV;

离子源温度 $600\text{ }^{\circ}\text{C}$; 帘气压力 $1.72 \times 10^5\text{ Pa}$ 辅助加热气压力 $G_{\text{as}1}$ 为 $4.13 \times 10^5\text{ Pa}$ 辅助气流速 $G_{\text{as}2}$ 为 50 L/min 。土拉霉素的 MRM 质谱检测参数: 选择离子对 (m/z) $806.4/577.8$, $404.0/158.1$, 其中定量离子为 $806.4/577.8$ 去簇电压 (DP) $71\text{ V}/106\text{ V}$; 碰撞能量 (CE) $33\text{ eV}/31\text{ eV}$; 射入电压 (EP) $10\text{ V}/8\text{ V}$; 碰撞室射出电压 (CXP) $40\text{ V}/10\text{ V}$ 。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件

采用流动注射法进行母离子扫描, 获得土拉霉素的一级质谱图, 然后选其母离子进行二级质谱扫描, 优化碰撞能量, 获得土拉霉素的二级质谱图。根据质谱图, 选择相应特征离子, 优化各项质谱参数, 以获得最佳灵敏度。图 1 为肾脏的空白基质及其加标水平为 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 土拉霉素的 MRM 图。

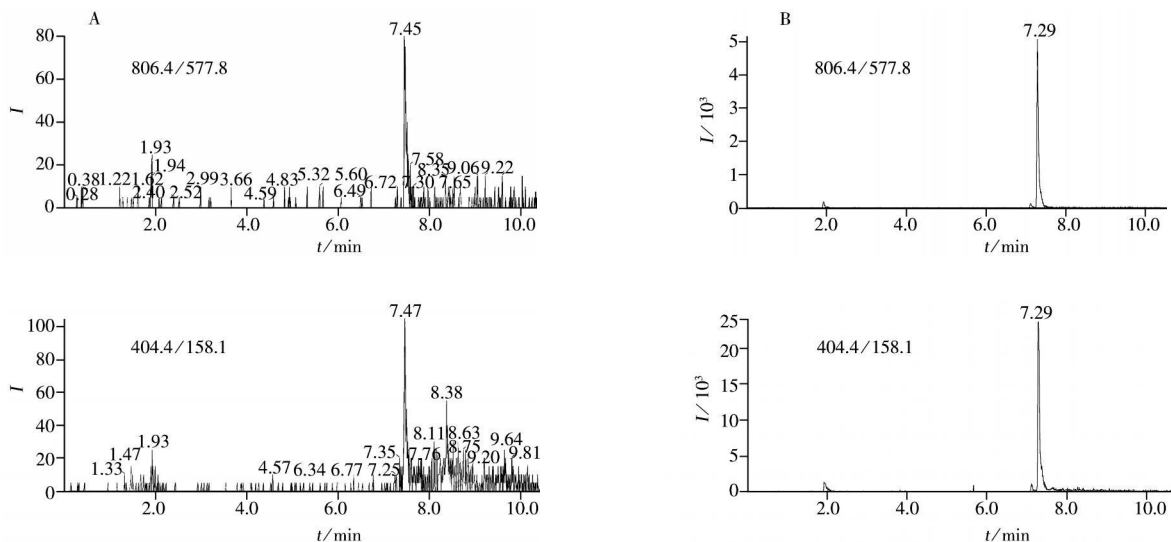


图 1 猪空白肾脏 (A) 及加标水平为 $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ 土拉霉素 (B) 的 MRM 谱图

Fig. 1 MRM chromatograms of blank kidney (A) and blank kidney spiked with $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ of tulathromycin (B)

2.2 色谱条件

比较了乙腈与甲醇分别作为流动相时的分离效果, 发现乙腈优于甲醇。以乙腈水溶液作为流动相, 当 pH 约为 7.0 时, 药物的峰形不对称, 拖尾现象较严重。在流动相中加入 0.1% 甲酸能有效解决峰形拖尾问题, 将土拉霉素与样品中的其他组分分开, 且响应值增大, 其中土拉霉素的保留时间为 $(7.3 \pm 0.2)\text{ min}$ 。

2.3 样品前处理

2.3.1 提取剂的选择 基于土拉霉素弱碱性及亲脂性的特点, 其提取剂主要有 2 种: 1 种是纯有机溶剂, 如乙腈、甲醇^[6,9]; 另 1 种是含磷酸盐缓冲液的提取液, 如磷酸、磷酸氢二钾等^[3,8,11-14]。本文考察了上述几种提取剂的提取效果, 发现萃取效率无显著差异。使用纯甲醇或乙腈为提取剂时, 操作简单、易于浓缩, 且以乙腈作为提取剂时, 提取液更干净, 便于后续的净化操作, 故本实验选择乙腈为最佳提取剂。

2.3.2 固相萃取柱的选择 比较了 SCX、MCX 和 C_{18} 3 种固相萃取柱的萃取效果, 发现三者的回收率差别不大, 但 MCX 固相萃取柱须在活化及淋洗后加入 $\text{pH} 6.2$ 的磷酸二氢钾才能有效保留目标物及洗去杂质, 相对于 C_{18} 固相萃取柱的成本更高, 步骤更繁琐。而 SCX 柱相对于 C_{18} 柱更昂贵, 故本实验选择 C_{18} 固相萃取柱进行萃取。

2.4 方法的线性范围与检出限

以基质加标做标准曲线, 以仪器响应峰面积对土拉霉素的含量 ($\mu\text{g/kg}$) 进行线性回归。结果表明, 含量为 $10.0\sim 500\text{ }\mu\text{g/kg}$ 时, 土拉霉素在猪肝、肾、肺、肌肉、皮脂 5 种组织中线性关系良好, 结果见表 1。

表 1 方法的回收率、相对标准偏差 (RSD)及标准曲线
Table 1 Recovery, RSD and calibration curve of the method

Matrix	Linear range		LOD		LOQ		Added		Recovery		Intra-day RSD		Inter-day RSD	
	w /	r	w /	($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	w /	($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	w /	($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	R / %	s_r / %	s_r / %	s_r / %		
Muscle	10.0~ 500	0.999 1	3	10	0.1	0.5	1	83~ 91	84~ 90	82~ 91	13~ 14	12~ 15,	15, 13	13
Liver	10.0~ 500	0.999 7	5	10	0.1	3,	6	80~ 86	84~ 85	89~ 90	9.0~ 13	12~ 15,	11, 13	15
Skin+ fat	10.0~ 500	0.999 2	5	10	0.02	0.1,	0.2	79~ 90	75~ 83	77~ 88	4.0~ 12	14~ 15,	13.14	14
Kidney	10.0~ 500	0.998 6	5	10	0.1	3,	6	76~ 87	89~ 96	74~ 84	13~ 15	13~ 15,	15, 13	15
Lung	10.0~ 500	0.999 0	4	10	0.1	3,	6	81~ 88	80~ 91	83~ 92	12~ 13	11~ 12,	13.13	7.0
											5.0~ 7.0			

称取 1 g 空白组织, 分别加入 100 μL 各低水平的标准工作液, 按“1.2”方法进行处理, 每个水平重复 3 次。以最低检出浓度计算, 3 倍信噪比为检出限, 10 倍信噪比为定量下限。猪肝、肾、皮脂中土拉霉素的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 肺中为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 肌肉中为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 所有组织的定量下限均为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (表 1)。

2.5 方法的回收率与相对标准偏差

根据欧盟对土拉霉素制定的最高残留限量^[15]及残留控制要求, 以小于 1/2MRL、1MRL、2MRL 3 个添加水平, 按“1.2”方法进行处理, 每个浓度样品平行 5 份同日测定, 得日内相对标准偏差 (RSD) 为 4.0%~ 16%; 每个浓度样品平行 5 份分别于 3 日内测定, 得日间 RSD 为 7.0%~ 15%; 将空白样品加入标准溶液后所测得峰面积与该浓度的基质加标样品的峰面积相比, 回收率为 74%~ 96%, 结果见表 1。

2.6 土拉霉素的稳定性

将同一浓度的标准溶液和基质加标样品分别置于室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 及 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 0、1、2、3、4、5、6、7、9、10 d 结果显示, 以 50% 乙腈水溶液为溶剂的标准溶液的稳定性大于 7 d 而在基质中的稳定性大于 3 d 且样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存时较 25 $^{\circ}\text{C}$ 更稳定。因此, 样品以 3 d 内检测为佳, 标准溶液至少每周配制 1 次, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2.7 基质效应的研究

样品基质对目标物的电喷雾离子化有很大影响。由于待测组分与生物样品的基质成分在雾滴表面的离子化过程存在竞争关系, 会显著降低或增加目标离子的生成效率及离子强度, 进而影响测定结果的精密度和准确度^[16]。本实验在 5 种空白组织基质提取液中添加不同浓度土拉霉素标准溶液, 与相应流动相 (纯溶剂) 中的信号强度 (峰面积) 相比较, 结果见图 2。实验表明, 土拉霉素在猪组织中的响应值比标准溶液低, 且浓度越低, 基质对土拉霉素的抑制作用越明显, 其中肝、肾、皮脂的基质效应最为明显。鉴于 5 种组织基质对土拉霉素均有一定抑制作用, 为消除基质效应, 本实验以基质匹配标准校正定量。

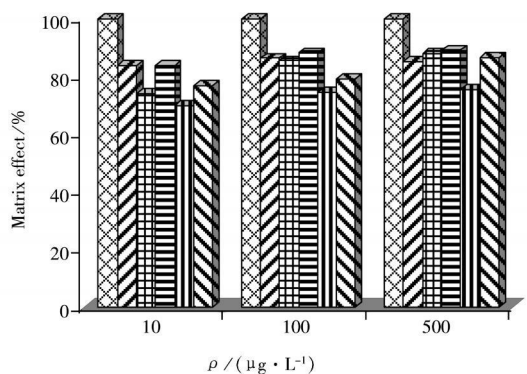


图 2 5 种组织与标准溶液的基质效应比较
Fig. 2 Comparison of matrix effects of five kinds of tissues with the standard solution

▨ standard solution; ▤ muscle; ▧ liver; ▩ lung; ▪ kidney; ▫ skin and fat

3 结论

本文建立了猪组织 (肝、肾、肌肉、肺、皮脂) 中土拉霉素残留的测定方法, 方法操作简便快速、

结果准确、重复性好, 适合大批量样本的分析, 具有一定的推广价值, 为客观评价土拉霉素在猪体内的残留消除规律研究提供了方法学参考。

参考文献:

- [1] 李玮, 郭腾, 陈洪亮, 褚宝山. 兽用新型大环内酯类抗生素——土拉霉素 (tulathromycin) [J]. 中国动物保健, 2006, 7(4): 38-39.
- [2] 宋福杰, 刘明春, 邹美, 符特. 兽用抗菌药物土拉霉素研究进展 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(4): 4-6.
- [3] 刘勇军, 吴银良. 高效液相色谱串联质谱测定猪肉中新型兽药泰拉霉素 [J]. 宁波农业科技, 2009, (2): 17-20.
- [4] GODNHO K S, RAE A, WINDSOR G D, TILTON, ROWAN T G, SUNDERLAND S J. Efficacy of tulathromycin in the treatment of bovine respiratory disease associated with induced mycoplasma bovis infections in young dairy calves [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2005, 6(2): 96-112.
- [5] 钮伟民, 刘晔, 戴军, 张敬平, 王洪新. 动物性食品中大环内酯类抗生素的 HPLC 分析 [J]. 食品与机械, 2007, 23(6): 95-98.
- [6] SCHEUCH E, SPIEKER J, VENNEM, SEGMUND M. Quantitative determination of the macrolide antibiotic tulathromycin in plasma and bronchoalveolar cells of foals using tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2007, 850(1/2): 464-470.
- [7] 赵东豪, 贺利民, 聂建荣, 彭聪, 连瑾, 刘雅红. HPLC-MS/MS 检测猪肉中六种大环内酯类抗生素 [J]. 分析实验室, 2009, 28(1): 117-119.
- [8] BENCHAOUIH A, NOWAKOWSKIM, SHERINGTON J, ROWAN T G, SUNDERLAND S J. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2004, 27(4): 203-210.
- [9] MARTOS P A, LEHOTAY S J, SHURMER B. Ultratrace analysis of nine macrolides, including tulathromycin A (draxxin), in edible animal tissues with microcolumn liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(19): 8844-8850.
- [10] PIKEMAATA M G, RAPALLINIM L B A, OOSTRA-VAN DIJK S, ELFERINKA J W A. Comparison of three microbial screening methods for antibiotics using routine monitoring samples [J]. Anal Chim Acta, 2008, 637(1/2): 298-304.
- [11] NOWAKOWSKIM A, NSKEEP P B, RISK J E, SKOGERBOE T L, BENCHAOUIH A, MENERT T R, SHERINGTON J, SUNDERLAND S J. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin, a new trimolide antibiotic, in cattle [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2004, 5(1): 60-74.
- [12] GALER D, HESSONG D S, BEATO B. An analytical method for the analysis of tulathromycin, an equilibrating trimolide, in bovine and porcine plasma and lung [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(8): 2179-2191.
- [13] BOGIALLI S, DICORCI A, LAGANA A, MASTRANTONIV, SERGI M. A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. J Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(2): 237-246.
- [14] WANG J, LEUNG D, LENZ S P. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Food Chem, 2006, 54(8): 2873-2880.
- [15] E.U. European Medicines Agency. Committee for veterinary medicinal products. tulathromycin, summary report MRL/894/04-FINAL[R]. London: EMEA, 2004.
- [16] 谢家树, 葛庆华. LC-MS 测定生物样品的基质效应问题 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(8): 1386-1389.