

高效液相色谱 - 串联质谱法同时检测动物性食品中多种大环内酯类药物

王 敏¹, 林维宣², 郭德华¹, 韩 丽¹, 邓晓军¹,
杨惠琴¹, 陈墨莲¹

(1. 上海出入境检验检疫局, 上海 200135; 2. 辽宁出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116015)

摘 要: 高效液相色谱 - 串联质谱法同时检测动物性食品中 6 种大环内酯类药物泰乐霉素、交沙霉素、柱晶白霉素、螺旋霉素、替米考星和红霉素残留。样品经乙腈提取, C18 固相萃取柱净化, 以 0.1% (φ) 甲酸 - 乙腈和 0.1% (φ) 甲酸 - 水作流动相梯度洗脱。电喷雾正离子 MRM 模式检测, 罗红霉素作为内标。方法的定量下限为 20 μg/kg, 在 2 ~ 50 μg/L 范围内, 峰面积与质量浓度成良好的线性关系, 相关系数大于 0.999。样品在 20、100、200 μg/kg 添加水平的回收率为 70% ~ 110%, 相对标准偏差为 4.1% ~ 10.3% (n = 6)。方法灵敏、检出限低、实用性强。

关键词: 高效液相色谱 - 串联质谱; 大环内酯; 动物性食品

中图分类号: O657.31; O614.811 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)05 - 0675 - 04

Determination of Macrolides in Animal Origin Food by HPLC - MS/MS

WANG Min¹, L N Wei-xuan², GUO De-hua¹, HAN Li¹, DENG Xiao-jun¹,
YANG Hui-qin¹, CHEN Mo-lian¹

(1. Shanghai Entry - exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 2. Liaoning Entry - exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116015, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method was developed for the simultaneous determination of tylosin, josamycin, kidasamycin, spiramycin, tilmicin, and erythromycin. The samples were extracted with acetonitrile and cleaned-up by C18 SPE. Separation of targeted analytes was achieved by a gradient elution program with 0.1% formic acid - acetonitrile and 0.1% formic acid - water. The mass spectrometer was operated in the positive electrospray ionization mode. Roxithromycin was used as internal standard. The detection limits were 20 μg/kg. The assay was validated by analyzing samples spiked with 20, 100, 200 μg/kg macrolides. The range of linearity was 2 - 50 μg/kg, with correlation coefficient greater than 0.999. The average recoveries and the relative standard deviations were in the range of 70% - 110% and 4.1% - 10.3%, respectively. The method is sensitive, reliable and reproducible.

Key words: HPLC - MS/MS; Macrolides; Animal origin food

大环内酯类药物包括红霉素、泰乐霉素、柱晶白霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星等。它们的基本结构特点都是以一个大环内酯为母体, 通常为 12 ~ 20 元环, 在大环上通过羟基, 以苷键与 1 ~ 3 个去氧氨基糖或二甲氨基糖缩合成碱性苷。该类物质具有广谱抗菌作用, 广泛应用于畜牧业中, 动物性食品中药物残留较为普遍, 高残留会对人类造成致敏性、毒性反应, 尤其是敏感个体。长期使用, 会改变人类肠道菌群的微生态环境, 造成人体肠道细菌菌群失调, 同时易产生细菌抗药性。

国内外制定了泰乐霉素等的最大残留限量。我国农业部于 1999 年颁布标准规定泰乐霉素的最大残留限量: 动物肌肉和内脏 0.1 mg/kg, 奶为 0.05 mg/kg。有关大环内酯类药物的检测工作, 目前有液相色谱法和液相色谱 - 串联质谱法^[1-4]。液相色谱方法存在着干扰大、灵敏度低、不能同时检测多种药物的局限性^[3-4]。国内虽有报道用液相色谱 - 离子阱质谱联用检测肉中 5 种大环内酯类药物, 但泰乐霉素检出限为 0.6 ng, 高于牛奶中的残留限量, 而且回收率偏低 (50% ~ 60%)^[1-2]。本文采用罗红霉素作为内标, 高效液相色谱串联质谱同时检测动物性食品中 6 种大环内酯类药物, 检出限低、回收率高。

收稿日期: 2006 - 12 - 26; 修回日期: 2007 - 02 - 14

作者简介: 王 敏 (1972 -), 女, 山东东营人, 主管医师, 硕士, Tel: 021 - 68549999, E-mail: wangn@shciq.gov.cn

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱 - 串联四极杆质谱联用仪 (API4000), Millipore 纯水制备系统, 固相萃取装置、C18 固相萃取小柱 3 mL (200 mg)。

标准物质: 泰乐霉素、螺旋霉素、柱晶白霉素、交沙霉素、红霉素、替米考星、罗红霉素标准品, 纯度均大于 95%; 甲醇、乙腈、正己烷、甲酸, 均为 HPLC 级; 氯化钠、磷酸二氢钠、无水硫酸钠, 分析纯; 水为二次蒸馏水。

大环内酯标准储备液: 分别准确称取适量大环内酯标准品, 用甲醇配成 100 mg/L 的标准储备液, 4 °C 保存, 根据需要用甲醇将标准储备液稀释至适当浓度, 作为混合标准工作液, 4 °C 冰箱保存。

罗红霉素内标溶液: 准确称取适量罗红霉素标准品, 用甲醇配成 100 mg/L 的标准储备液, 4 °C 保存。根据需要用甲醇将内标储备液稀释到一定浓度的内标工作液。

磷酸盐缓冲液: 取 13.8 g 磷酸二氢钠溶于 950 mL 水, 用氢氧化钠调至 pH 8.0, 用水稀释到 1 L。

1.2 样品处理

称取 2 g 均质样品置于 50 mL 具塞离心管中, 加 25 mL 乙腈和 1 mL 100 μ g/L 内标工作液, 在均质器中以 2 000 r/min 均质 30 s; 于 3 000 r/min 离心 3 min, 将上层乙腈提取液过滤收集。再加 20 mL 乙腈, 重复上述操作, 合并乙腈提取液。加入 20 mL 正己烷于旋涡混合器上以 2 000 r/min 混匀 1 min, 以 3 000 r/min 离心 3 min, 弃去上层正己烷。然后将乙腈提取液过无水硫酸钠柱, 在 40 °C 以下水浴减压浓缩至近干。再加入 15 mL 磷酸盐缓冲溶液, 溶液移至 C18 净化柱, 再用 5 mL 水和 5 mL 甲醇 - 水 (体积比 2 : 8) 依次洗涤离心管, 洗涤液过 C18 柱, 弃去流出液, 负压抽干, 用 6 mL 甲醇洗脱, 收集全部洗脱液, 用水定容至 10 mL, 混匀。如果溶液浑浊, 加正己烷净化, 弃去上层正己烷, 供 LC-MS/MS 测定。

对于蜂蜜样品, 称取 2 g 样品, 加入 1 mL 100 μ g/L 内标工作溶液和 15 mL 磷酸盐缓冲溶液溶解, 混匀, 直接移至 C18 净化小柱, 步骤同上。

1.3 色谱与质谱条件

色谱柱: KR100-5C8, 150 mm $\times$ 2.1 mm, 内径 5 μ m。流动相: A, 含 0.1% 甲酸的乙腈; B, 0.1% 甲酸水溶液; 梯度洗脱: 0 ~ 4 min, 20% A; 4 ~ 6.5 min, 20% A $\rightarrow$ 80% A; 6.5 ~ 6.6 min, 80% A $\rightarrow$ 95% A; 9.9 ~ 10 min, 95% A $\rightarrow$ 20% A。流速: 400 μ L/min。进样量: 10 μ L。柱温: 室温。

采用电喷雾离子源, 正离子扫描, 喷雾电压 5 500 V, 离子源温度 550 °C, 雾化器压力 310 kPa, 气帘气压力 138 kPa, 辅助气流速 310 kPa。

2 结果与讨论

2.1 样品净化

采用单一的液液萃取方法, 对于基质复杂的样品, 如肝脏、肾脏等, 色谱峰杂质干扰大。当使用 Oasis (HLB) 3 cc 60 mg 和 6 cc 500 mg 两种柱子时, 虽然可以去除样品溶液中色素等杂质, 但大环内酯类药物同时也不同程度地被洗下来, 回收率降低。当使用 SCX 柱和 C18 柱净化样品溶液时, 大环内酯类药物没有损失, 考虑到 C18 柱成本低, 因此本实验采用 C18 柱净化样品提取液^[5-6]。

2.2 液相条件的选择

本实验选用了 KR100-5C8 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m)、Discovery-C18 (150 mm $\times$ 2.1 mm, 5 μ m)、CAPCELL PAK C18 (50 mm $\times$ 2.0 mm, 3 μ m) 3 种不同规格、不同填料的色谱柱进行实验。结果发现, 使用 Discovery-C18 时, 有的药物没有出峰。而使用 CAPCELL PAK C18 时, 6 种药物分离效果没有 KR100-5C8 好, 因此本实验选用了 KR100-5C8 色谱柱, 获得较好的分离效果。实验对比了流动相用梯度洗脱和未用梯度洗脱对出峰的影响, 结果显示, 梯度洗脱时, 基线平稳, 峰形对称; 而未用梯度洗脱时, 基线上扬, 峰形不对称。此外, 研究发现, 柱温 (25 ~ 40 °C) 对出峰时间和峰形影响不大, 本实验中柱温设置为室温。

2.3 内标物质的确定

由于大环内酯类药物没有同位素内标物质，本实验选用一种没有用于兽药用途的大环内酯类药物罗红霉素作为内标，其结构与红霉素类似。实验结果显示，使用内标物质定量，与没有使用内标相比，方法的灵敏度和回收率均有所提高^[7-8]。

2.4 质谱条件的选择

利用质谱的 ES⁺模式，6种大环内酯类药物在正离子检测方式下均有良好响应，可观察到各组分的 [M + H]⁺ 分子离子峰。在对分子离子进行二次质谱扫描时，又得到它们的碎片离子。实验中对质谱参数去簇电压 (DP)、碰撞气能量 (CE)和碰撞室出口电压 (CXP)进行了优化，结果见表 1。

表 1 6种大环内酯药物和内标物质的定性离子对、定量离子对、去簇压力、碰撞气能量及碰撞室出口电压
Table 1 Qualitative ion pairs, quantitative ion pairs, declustering potential, collision energy, cell exit potential of six macrolide drugs and internal standard

Compound	Qualitative ion pairs (定性离子对) <i>m/z</i>	Quantitative ion pairs (定量离子对) <i>m/z</i>	Declustering potential(DP) (去簇电压) V/V	Collision energy(CE) (碰撞气能量) V/V	Cell exit potential(CXP) (碰撞室出口电压) V/V
Tylosin (泰乐霉素)	916 5/174. 4 916 5/772. 5	916 5/174. 4	90 90	53 43	10 12
Josamycin (交沙霉素)	829. 4/229. 3 829. 4/601. 7	829. 4/229. 3	88 96	43 37	14 10
Kitasamycin (柱晶白霉素)	772. 4/215. 3 772. 4/558. 4	772. 4/215. 3	71 76	45 37	17 15
Spiramycin (螺旋霉素)	843. 5/174. 1 843. 5/243. 2	843. 5/174. 1	117 106	47 42	10 15
Tilmicosin (替米考星)	869. 6/174. 5 869. 6/696. 6	869. 6/174. 5	84 93	60 58	11 10
Erythromycin (红霉素)	734. 6/158. 2 734. 6/576. 6	734. 6/576. 6	59 71	41 27	10 15
Roxithromycin (罗红霉素)	837. 5/679. 5 837. 5/158. 2	837. 5/679. 5	69 73	28 45	19 9

2.5 线性范围、回收率与精密度实验

本实验工作曲线中，大环内酯混合标准溶液的质量浓度分别为 2、4、20、40、50 μg/L，结果表明，标准溶液在 2~50 μg/L 范围内，峰面积与质量浓度成良好的线性关系，其相关系数大于 0.999。本实验以 5种动物性食品 (猪肉、禽肉、肝脏、肾脏、蜂蜜)作为样品，取适量标准品加入到 2.0 g样品中，使添加量相当于 20、100、200 μg/kg，按照操作方法进行实验，回收率和精密度见表 2。结果显示，样品在 20、100、200 μg/kg添加水平的回收率为 70%~110%，相对标准偏差 (RSD)为 4.1%~10.3%。根据回收率试验，确定定量下限 (LOQ)为 20 μg/kg。

表 2 内标法测得大环内酯的回收率及精密度 (n = 6)
Table 2 Recovery and precision of macrolides using internal standard method (n = 6)

Compound	Sample	Added	Average recovery	RSD
		<i>w</i> / (μg · kg ⁻¹)	<i>R</i> / %	<i>s_r</i> / %
Tylosin (泰乐霉素)	Pork	20, 100, 200	80, 86, 90	4.1, 4.9, 7.0
	Chicken	20, 100, 200	82, 85, 90	4.6, 6.5, 7.7
	Liver	20, 100, 200	82, 85, 90	5.2, 10.3, 8.4
	Kidney	20, 100, 200	80, 83, 87	6.6, 5.9, 7.5
	Honey	20, 100, 200	86, 90, 87	6.6, 8.8, 5.4
Josamycin (交沙霉素)	Pork	20, 100, 200	81, 83, 89	4.5, 4.1, 7.4
	Chicken	20, 100, 200	79, 89, 90	5.9, 8.3, 7.3
	Liver	20, 100, 200	81, 90, 86	5.0, 7.8, 7.0
	Kidney	20, 100, 200	81, 87, 86	7.2, 9.6, 6.2
	Honey	20, 100, 200	81, 87, 92	6.2, 7.8, 7.5
Kitasamycin (柱晶白霉素)	Pork	20, 100, 200	82, 85, 88	6.0, 5.9, 6.6
	Chicken	20, 100, 200	81, 88, 86	4.8, 5.4, 5.9
	Liver	20, 100, 200	81, 87, 89	5.4, 6.2, 9.8
	Kidney	20, 100, 200	81, 87, 84	5.8, 6.6, 6.6
	Honey	20, 100, 200	81, 87, 86	6.6, 9.4, 6.9

(续表 2)

Compound	Sample	Added	Average recovery	RSD
		w / (μg · kg ⁻¹)	R / %	s _r / %
Spiramycin (螺旋霉素)	Pork	20, 100, 200	81, 88, 86	5.6, 6.3, 5.2
	Chicken	20, 100, 200	82, 86, 87	5.6, 4.9, 5.0
	Liver	20, 100, 200	80, 86, 91	4.7, 5.9, 8.3
	Kidney	20, 100, 200	80, 86, 87	7.6, 4.9, 6.4
	Honey	20, 100, 200	81, 84, 102	4.7, 6.0, 4.7
Tilmicosin (替米考星)	Pork	20, 100, 200	76, 82, 85	9.8, 6.7, 5.9
	Chicken	20, 100, 200	78, 83, 101	9.6, 8.9, 7.0
	Liver	20, 100, 200	79, 84, 89	6.7, 5.8, 8.5
	Kidney	20, 100, 200	77, 81, 84	7.6, 5.9, 6.3
	Honey	20, 100, 200	81, 83, 87	7.7, 8.0, 6.7
Erythromycin (红霉素)	Pork	20, 100, 200	74, 79, 83	9.6, 8.3, 5.7
	Chicken	20, 100, 200	78, 82, 85	8.6, 7.8, 6.1
	Liver	20, 100, 200	76, 80, 85	7.7, 6.9, 7.3
	Kidney	20, 100, 200	75, 82, 86	9.6, 8.9, 6.2
	Honey	20, 100, 200	80, 83, 86	8.8, 7.0, 5.7

参考文献:

[1] 刘玉春, 徐维海, 余莉莉, 等. 固相萃取液相色谱-质谱/质谱联用测定河水中大环内酯类抗生素[J]. 分析测试学报, 2006, 25(2): 1 - 5.

[2] 夏 敏, 贾 丽, 季怡萍. 液相色谱-质谱法同时检测畜禽肉中五种大环内酯类抗生素[J]. 分析测试学报, 2004, 23(增): 217 - 222.

[3] 孔 科, 袁宗辉, 范盛先, 等. 高效液相色谱法检测泰乐菌素在肉鸡组织中的残留[J]. 中国兽医学报, 1999, 19(5): 489 - 491.

[4] 吴伟洁, 汪 红, 沈 熊, 等. 高效液相色谱法测定交沙霉素血药浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 9(5): 294 - 295.

[5] CODONY R, COMPANO R, GRANADOS M, et al. Residue analysis of macrolides in poultry muscle by liquid chromatography - electrospray mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2002, 959: 131 - 141.

[6] WANG J, LEUNG D, LENZ S P, et al. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54: 2873 - 2880.

[7] DUBOISM, FLUCHARD D, SDR E, et al. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr, B, 2001, 753: 189 - 202.

[8] DRASCIR, PALLESCHIL, FERRETTIE, et al. Confirmatory method for macrolide residues in bovine tissues by micro-liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2001, 926: 97 - 104.

2008年度《理化检验 - 化学分册》杂志征订启事

《理化检验 - 化学分册》杂志创刊于 1963 年, 系由上海材料研究所与机械工程师学会理化检验分会联合主办的技术类刊物。主要报道材料的化学分析与仪器分析专业领域中的新方法、新技术、新设备以及国内外的研究方向。“面向生产、注重实用、反映动向、兼顾普及”是刊物的编辑方针, 旨在最大程度地满足不同层次读者的需要。涉及的领域为机械、冶金、石油化工、环境科学、生命科学等。主要栏目有“试验与研究”、“工作简报”、“知识与经验介绍”、“综述”、“专题讲座”、“读者园地”、“动态与信息”等。

《理化检验 - 化学分册》为国内理化检验行业权威刊物, 中国期刊方阵中双效期刊。已被列为全国中文核心期刊、中国科技论文统计用期刊、美国“CA 千种表”中我国化学化工类核心期刊、中国学术期刊(光盘版)和中国期刊网全文数据库及美国工程信息公司 Ei Page One 数据库收录期刊。

本刊为月刊, 大 16 开本, 每月 18 日出版, 由邮局征订向国内外公开发行, 邮发代号: 4 - 182, 每册定价: 10.00 元, 全年 12 期共 120.00 元。

本刊已于 2006 年 12 月开通网上远程投稿系统, 欢迎大家登录 www.mat-test.com 进行网上投稿。

欲订阅本刊的单位与个人, 请尽快到当地邮政局(所)办理订阅手续, 切勿贻误。

本刊地址: 上海市邯郸路 99 号, 邮编: 200437, 电话: 021 - 65556775 - 263, 021 - 55882970, 传真: 021 - 65544911, E-mail: hx@mat-test.com 或 mppnc@81890.net