

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.04.06

超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡组织中泰乐菌素的残留量

李文辉¹, 李 建², 孙志文^{1*}

(1. 北京市兽药监察所, 北京 102600; 2. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037)

[收稿日期] 2019-12-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 04-0036-05 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了鸡组织中泰乐菌素残留的超高效液相色谱-串联质谱法检测方法, 样品用甲醇(含 2% 氨水)提取, 经 C18 固相萃取柱净化, 洗脱液氮气吹干, 残渣用甲醇: 乙腈(20: 80, V/V)复溶, 超高效液相色谱-串联质谱法检测, 基质添加标准溶液外标法定量。结果表明泰乐菌素在 5 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系。在鸡组织中泰乐菌素的检测限为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 10 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内, 泰乐菌素在鸡组织中的回收率均在 85.9% ~ 110.4% 之间, 批内批间变异系数在 1.2% ~ 4.0% 之间。该方法各项技术指标均能满足残留检测要求, 且方法的重现性良好, 满足国内外兽药残留相关法规规定。

[关键词] 鸡组织; 泰乐菌素; 残留; 超高效液相色谱-串联质谱

Determination of Tylosin Residues in Chicken Tissues by Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry

LI Wen-hui¹, LI Jian², SUN Zhi-wen^{1*}

(1. Beijing Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 102600, China;

2. China Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Corresponding author: SUN Zhi-wen, E-mail: sunzw673@163.com

Abstract: A liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC – MS/MS) method for the determination of tylosin residues in chicken tissues was developed. The samples were extracted with methanol (containing 2% ammonia), purified by C18 solid phase extraction column, and the eluted liquid was dried by nitrogen. The residue was redissolved with methanol: acetonitrile (20: 80, V/V), determination by high – performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry and quantitative analysis by external standard solution added to matrix. The results showed that tylosin showed a good linear relationship in the concentration range of 5 ~ 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The detection limit of tylosin in chicken tissues was 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and the quantitative limit was 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in

作者简介: 李文辉, 兽医师, 从事畜禽产品兽药残留检测研究。

通讯作者: 孙志文。E-mail: sunzw673@163.com

the range of 10 ~ 200 $\mu\text{g/kg}$, the recoveries of tylosin in the tissues of and chickens were from 85.9% to 110.4%, and the coefficient of variation between batches were from 1.2% to 4.0%. All the technical indexes of the method can meet the requirements of residue detection, and the reproducibility of the method is good, which can meet the requirements of relevant laws and regulations of veterinary drug residue at home and abroad.

Key words: chicken tissue; tylosin; residue; liquid chromatography – tandem mass spectrometry

泰乐菌素是一种大环内酯类抗生素,常以酒石酸盐、磷酸盐的形式存在,泰乐菌素因酒石酸肠道吸收好、抗菌谱广普遍应用于防治畜禽呼吸道、胃肠道感染等疾病,同时也可作生长促进剂。但其容易在机体或鸡蛋中残留,即使加热也不易分解,间接加剧细菌耐药性^[1-3]。但畜牧业中该类药物的滥用或违规使用易造成食品中兽药高残留问题,进而引起人体胃肠道的不良反应,损害耳蜗神经,甚至造成肝肾损伤^[4]。为保障食品安全和人类健康,各国政府均对动物源性食品中大环内酯类药物的最大残留限量作出规定^[5-6],我国农业农村部 2019 年颁布的食品安全国家标准 GB31650-2019《食品中兽药最大残留限量》规定^[7],泰乐菌素的 ADI 为 0 ~ 30 $\mu\text{g/kg}$,在鸡的肌肉、脂肪、肝脏肾脏中的最大残留限量为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。近年来国内外对大环内酯类药物的关注逐渐增加,但对于大环内酯类残留检测的研究较少,国外的检测方法是利用毛细管气相色谱法和紫外检测法共同测定食品中的泰乐菌素^[8],固相萃取-液相色谱-大气压化学电离质谱法测定泰乐菌素残留量^[9],国内没有专门检测泰乐菌素的检测方法,大环内酯类药物的检测方法以液相色谱-串联质谱法为主^[10-12],但这些方法具有前处理步骤多,效率低、检测组织等局限,为更全面监测鸡产品中的泰乐菌素药物残留,本研究建立了一种快速高效的超高效液相色谱-串联质谱方法,通过对仪器分析条件,净化方式和提取溶剂进行优化,使所建方法能够满足现行检测需求,充实检测方法,对检测方法的研究提供现实指导意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和耗材 Waters Acquity UPLC-Xevo TQ-S 超高效液相色谱-串联质谱仪, Waters 公司; XP-205 电子天平, METTLER 公司; 24 位水浴型氮

吹仪, Organomation Associates 公司; 3-30K 型冷冻离心机, Sigma 公司; MS 3 basic 旋涡混匀器, IKA 公司; C18 固相萃取柱 (500 mg/6cc), Waters 公司; 溶剂过滤器, 美国 PALL 公司; 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; 微量加样器, Eppendorf 公司。

1.2 药品和试剂 泰乐菌素标准品购自 Dr 公司, 含量为 99.5%; 甲醇、乙腈为质谱纯, 购自赛默飞公司; 氨水, 分析纯, 购自北京化工试剂厂; 所有水均为超纯水。

1.3 样品制备 试验所采用的样品, 来自北京市场, 经检测无药物残留, 分别取鸡肉、鸡肝、鸡肾、鸡脂肪部分, 均质匀浆, 置于 50 mL 离心管中备用。

1.4 标准溶液配制 用精度为 0.01 mg 的天平精密称取泰乐菌素标准品约 50 mg, 于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 的泰乐菌素标准储备液; 准确吸取 0.1 mL 标准储备液至另一 10 mL 容量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 配制成 10 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液。

1.5 样品的前处理 提取: 称取 1 g 均质的组织, 加入甲醇 (含 2% 氨水) 10 mL, 涡旋 1 min, 300 r/min 振荡 10 min, 4000 r/min 离心 5 min。收集上清液, 下层用甲醇 (含 2% 氨水) 10 mL 重复提取 1 次。合并提取液, 混匀, 10000 r/min 离心 5 min。取上清液 2 mL, 加水 15 mL。混匀, 备用。

净化: C18 固相萃取柱, 依次用乙腈 5 mL、甲醇 5 mL、水 5 mL 活化平衡, 取全部备用液上样, 然后用甲醇: 水 (35: 65, V/V) 5 mL 洗涤, 抽干 5 min, 最后用 5 mL 甲醇: 乙腈 (20: 80, V/V) (含 2% 氨水) 洗脱。收集洗脱液, 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干。加入 1 mL 20% 乙腈, 涡旋 1 min, 14000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μm 滤膜过膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

1.6 仪器条件

1.6.1 超高效液相色谱参考条件 色谱柱:BEH C18,2.1×50 mm, 1.7 μm;流动相:A 相为 0.1% 甲酸水溶液;B 相为 0.1% 甲酸乙腈溶液;流速:0.3 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL;梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件			
Tab 1 Gradient elution conditions			
时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.3	90	10
0.5	0.3	90	10
1.5	0.3	5	95
2.0	0.3	5	95
2.1	0.3	90	10
3.5	0.3	90	10

1.6.2 质谱参考条件 离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测;电离电压:3.0 kV;源温:100 ℃;雾化温度:350 ℃;锥孔气流速:30 L/h;雾化气流速:600 L/h,测试药物定性、定量离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表 2。

表 2 泰乐菌素的定性、定量离子及锥孔电压、碰撞能量			
Tab 2 Qualitative and quantitative ion and hole voltage, collision energy of Tylosin			
化合物	离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
泰乐菌素	916.7>772.4	50	30
	916.7>173.9 ^a	50	40

^a定量离子

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立 每种组织取 5 份空白样品,按实验操作步骤提取,洗脱液氮气吹干后,分别移取 5、10、50、100、200、400、1000 ng/mL 的标准工作液各 1000 μL 溶解残余物,过滤后供液相色谱-串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为

纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线,回归方程及相关系数见表 3,从中可以看出各样品中泰乐菌素 5~1000 μg/kg 的浓度范围内呈现良好的线性关系。

表 3 线性回归方程及相关系数		
Tab 3 Linear regression equations and correlation coefficients		
样品名称	线性方程	r ²
鸡肉	Y=584.5x-113.6	0.9950
鸡肝	Y=687.7x+222.4	0.9923
鸡肾	y=3956.8x-1164.9	0.9991
鸡脂肪	Y=854.7x+94.561	0.9984

2.2 方法的检出限和定量限(灵敏度) 采用空白组织中添加目标化合物的方法,依据特征离子质量色谱峰信噪比 S/N≥3 为方法检测限,S/N≥10 为方法定量限,添加适量标准溶液于 1 g 空白试样中,分别制备得到 4 μg/kg 和 10 μg/kg 的添加样品,经前处理后检测,在相应的保留时间,空白试样对所测药物无干扰,检测限(LOD)满足信噪比 S/N=3,定量限(LOQ)满足信噪比 S/N=10,本测定方法测得泰乐菌素在鸡肉、鸡肝、鸡肾、鸡脂肪中的检测限为 4 μg/kg,定量限为 10 μg/kg。其中 50 μg/kg 泰乐菌素基质匹配标准溶液 MRM 色谱图如图 1 所示。

2.3 回收率实验(精密度和准确度) 采用标准添加法,分别准确称取空白样品 2 g,添加一定体积的标准工作溶液,使组织中泰乐菌素浓度分别为 10、50、100、200 μg/kg,按上述样品前处理方法处理后进行测定,一日内每种药物的每个添加浓度取 5 个平行样品分别进行测定,每个添加浓度设 5 个平行,重复测定 3 d,计算回收率和批间相对标准偏差。试验结果表明,在 10~200 μg/kg 添加浓度范围内,在鸡的不同基质中,平均添加回收率在 85.9%~110.4% 之间,相对标准偏差在 1.2%~4.0% 之间。结果表明添加回收率及相对标准偏差均满足残留检测的相关要求,且方法的重现性很好。结果见表 4。

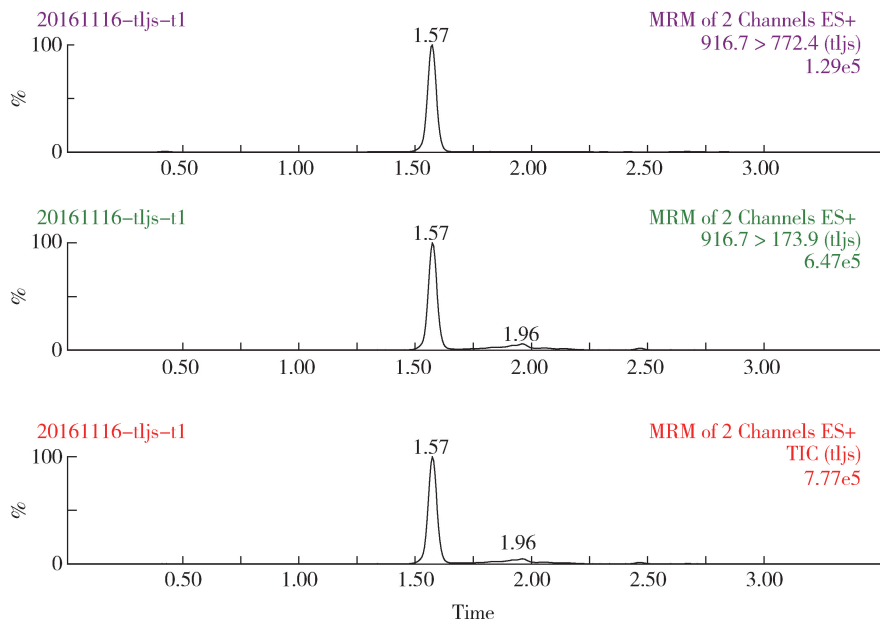


图 1 基质匹配标准溶液 MRM 色谱图(50 µg/kg)

Fig 1 MRM Chromatogram of Matrix matching standard solution(50 µg/kg)

表 4 鸡组织中泰乐菌素的添加回收率					
Tab 4 The recovery of Tylosin in chicken tissues					
组织名称	添加浓度 /(µg·kg ⁻¹)	日内(n=5)		日间(n=5)	
		回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
鸡肉	10	100.4	1.2	101.2	1.5
	50	102.7	1.7	100.5	2.2
	100	105.7	2.3	104.6	1.6
	200	110.4	1.5	110.1	2.0
鸡肝	10	98.4	2.1	98.5	1.6
	50	99.5	1.9	99.2	2.2
	100	100.4	1.9	99.2	1.9
	200	102.6	1.5	101.4	1.9
鸡肾	10	94.3	2.8	95.7	2.3
	50	95.5	3.2	96.4	1.3
	100	99.7	1.5	98.4	1.4
	200	97.4	3.3	97.1	1.9
鸡脂肪	10	85.9	3.5	85.4	3.1
	50	86.5	3.7	85.9	3.7
	100	88.7	4.0	97.5	3.9
	200	90.3	2.1	90.1	1.5

3 讨论与结论

由于国内外对泰乐菌素检测方法的研究比较

少,因此,可对比性不强,本研究跟国内外文献相比的优势在于,采用液相色谱串联质谱法测定泰乐菌素采用 MRM 扫描方式,可以同时扫描母离子和子离子,去除干扰离子,提高灵敏度和重复性。液相色谱法、毛细管气相色谱法和紫外检测法、固相萃取-液相色谱-大气压化学电离质谱法测定泰乐菌素不具备这样的特点^[3,8-9]。本研究简化处理方法,仅需要经过两次甲醇提取,本试验采用氨化甲醇跟单独用甲醇和乙腈相比更能高效结合在 C18 柱上^[4],使残留药物更好的保留,再过 C18 柱净化即可,大大缩短了检测时间,本研究采用固相萃取技术,同液-液提取相比^[11],能更好的去除杂质,特别是基质复杂的组织,C18 柱跟 HLB 萃取柱相比,在活化过程中不适用酸性试剂,酸性试剂会造成待测药物的降解和破坏,而且跟国外使用复杂的耗材相比,价格适中,方便购买;使用 35℃ 水浴氮吹,保护待测物不被分解。在检测方法的适用性方面,跟国内外检测方法相比^[4,10-12],适应更多可食的鸡组织,其他方法只能测定其他属种或单一组织,鸡组织中有很复杂的基质,单独只检测鸡肉不能满足检测人员同时检测同一属种的多种不同组

织的需求,本研究也会进一步加大适应多种大环内酯类药物的检测方法的研究,以满足更多药物高通量的检测需求。

本研究建立的鸡组织中泰乐菌素残留的超高效液相色谱-串联质谱检测方法,采用基质匹配外标法进行定量,样品经提取、净化处理等有效的降低了基质干扰,方法具有较高的灵敏度,通过优化前处理方法获得了良好的回收率,具有高效、准确的特点,本方法的检出限、定量限、回收率、线性、*RSD* 值等指标均能满足检测要求,适用于鸡组织中泰乐菌素的测定。

参考文献:

- [1] 杨娜娜,刘聚祥,王琳,等. 鸡蛋中兽药残留及检测技术的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, (2): 226-228.
Yang N N, Liu J, Wang L, *et al.* Research Progress of veterinary drug residues in eggs and detection techniques J. Heilongjiang Animal Veterinarian, 2015, 2: 226-228.
- [2] 张眉,龚月生,马国际. 泰乐菌素检测方法研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(3): 41-43.
Zhang M, Gong Y S, Ma G J. Research progress of tylosin detection methods[J]. Journal of Animal Husbandry and veterinary medicine, 2009, 283: 41-43.
- [3] 刘敬先. 高效液相色谱法检测鸡蛋中泰乐菌素残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3329-3333.
Liu J X. The High-performance liquid chromatography tested the eggs for Tylosin. Journal of food safety and quality inspection, 2019, 10(11): 3329-3333.
- [4] 王一涵,王展华,陈万勤,等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中 14 种大环内酯类兽药残留[J]. 分析测试学报, 2019, 38(10): 1247-1253.
Wang Y H, Wang Z H, Chen W Q, *et al.* Simultaneous determination of 14 veterinary drug residues of Macrolide in pork by solid phase extraction/High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Analytical Testing, 2019, 3810: 1247-1253.
- [5] European Union. Commission Regulation(EU) No. 37/2010 of 22 December 2009. [2012-01-30]. <http://down.foodmate.net/standard/sort/44/22938.html>.
- [6] Electronic Code of Federal Regulations. Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food. [2011-09-30]. <http://ishare.iask.sina.com.cn/f/1H01cCfScDF6.html/>.
- [7] GB31650-2019. 食品安全国家标准 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
GB31650-2019. National standard for Food Safety, maximum residue limit of veterinary drugs in animal food[S].
- [8] Jenny Jeehan Nasr, Shereen Shalan, Fathalla B, *et al.* Simultaneous determination of tylosin and josamycin residues in muscles, liver, eggs and milk by MLC with a monolithic column and time-programmed UV detection: application to baby food and formulae[J]. Chemistry Central Journal, 2014, 8(1): 1-9.
- [9] Thompson Thomas S, Noot Donald K, Calvert Jane, *et al.* Determination of lincomycin and tylosin residues in honey using solid-phase extraction and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.08.095>.
- [10] 罗燕. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中 6 种大环内酯类药物残留量[J]. 饲料博览, 2018, (9): 52-56.
Luo Y. Determination of Macrolide residues in chicken by High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Feed Expo, 2018, (9): 52-56.
- [11] Jank Louise, Martins Magda Targa, Arsand Juliana Bazzan, *et al.* High-throughput method for macrolides and lincosamides antibiotics residues analysis in milk and muscle using a simple liquid-liquid extraction technique and liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry analysis (LC-MS/MS)[J]. Talanta, 2015, 685-9510. 1016/j.talanta.2015.06.078
- [12] Wang Hao, Zhao Li, Yang Hongme, *et al.* Determination of 35 antibiotic residues of tetracyclines, sulfonamides, penicillins, macrolides and amphenicols in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese journal of chromatography, 2015, 995-1001

(编辑:侯向辉)