

液相色谱-串联质谱法测定牛奶中万古霉素和去甲万古霉素残留

郭启雷, 史海良, 杨红梅, 王浩, 刘艳琴
(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

摘要:建立了牛奶中2种多肽类抗生素万古霉素和去甲万古霉素残留量的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测方法。牛奶样品用三氯乙酸水溶液提取、沉淀蛋白,经混合型阳离子固相萃取柱Oasis MCX净化后,利用LC-MS/MS进行定性和定量分析。测定时样品溶液经ZORBAX SB-C₁₈色谱柱分离,0.1%甲酸水溶液和乙腈作为流动相进行梯度洗脱,质谱测定采用正离子模式,多反应监测(MRM)。结果表明,万古霉素和去甲万古霉素的检出限为5μg/kg,回收率为72.5%~87.2%,相对标准偏差小于10%。

关键词:牛奶,万古霉素,去甲万古霉素,液相色谱-串联质谱

Simultaneous determination of vancomycin and norvancomycin in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

GUO Qi-lei, SHI Hai-liang, YANG Hong-mei, WANG Hao, LIU Yan-qin

(National Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: A simple, rapid and specific analytical methods for the determination of vancomycin and norvancomycin in milk had been developed based on liquid chromatography tandem mass spectrometry in a multiple reaction monitoring mode. Milk samples were extracted with 0.1% trifluoroacetic acid in water. Antibiotics in the extract were separated on a ZORBAX SB-C₁₈ column using a gradient elution program of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile. Limits of detection for vancomycin and norvancomycin were 5μg/kg. Mean recoveries were 72.5%~87.2%, and the relative standard deviation(RSD) was less than 10%.

Key words: milk; vancomycin; norvancomycin; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)08-0086-03

动物源性食品中抗生素的残留一直是威胁食品安全的重大隐患之一。虽然国家已经颁布了相关管理条例,但是由于各种原因,我国动物源性食品中抗生素残留问题依然存在。万古霉素(Vancomycin)和去甲万古霉素(Norvancomycin)属于糖肽类抗生素^[1-2],分子中含有糖及肽链结构,在临床常用于由革兰阳性菌尤其是葡萄球菌、肠球菌和肺炎链球菌所致严重感染性疾病的治疗。由于与其他抗生素截然不同的分子结构,对于常见抗生素的耐药菌株来说,万古霉素通常是其唯一有效的治疗药物,代表着治疗这些严重感染性疾病的最后防线。传统上,万古霉素被用作“最后一线药物”,用来治疗其他抗生素无效的严重感染。万古霉素的滥用,会造成超级耐药菌的出现和个体对常规抗生素的耐受,给临床抗感染治疗带来极大困难,可能面临无药可用的困境。另外,万古霉素本身具有一定的耳毒性和肾毒性。目前,对万古霉素的含量测定研究多集中在医药

卫生领域,研究对象涉及血清、血浆、尿液及药物制剂^[2-7]。动物源性食品基质复杂,本文选择牛奶为研究对象,优化适宜的提取、净化和富集方法,采用液相色谱-质谱联用技术,利用其强大的定性能力,排除基质干扰,准确定性,同时利用其高灵敏度特性对牛奶中的万古霉素、去甲万古霉素的残留量进行准确定量。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

甲醇、乙腈、甲酸 美国Fisher公司,色谱纯;乙二胺四乙酸二钠(EDTA)、氨水、三氯乙酸 国药集团化学试剂有限公司,分析纯;Oasis MCX(60mg, 3 mL)固相萃取小柱 美国waters公司;万古霉素、去甲万古霉素 中国药品生物制品检定所。

Agilent 1200高效液相色谱仪 Agilent 6410A三重四极杆串联质谱仪(配电喷雾离子源,ESD,美国Agilent公司;Milli Q超纯水发生器 美国密理博公司;电子天平,感量0.0001、0.01g 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;GL-88B旋涡混合器 其林贝尔仪器制造有限公司;KQ5200超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司。

收稿日期:2012-10-25

作者简介:郭启雷(1979-),男,博士,高级工程师,研究方向:食品安全。

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2011QK047)。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈柱, 150mm×2.1mm (id), 3.5μm; 流动相: 乙腈-0.1%甲酸水溶液, 梯度洗脱程序见表1; 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 25℃; 进样量: 20μL。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Elution gradient of HPLC

溶液	时间 (min)				
	0	10	10.1	16	16.1
乙腈	5	50	100	100	5
0.1%甲酸水溶液	95	50	0	0	95

1.2.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI源); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测 (MRM); 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 10L/min; 雾化器压力: 40psi; 毛细管电压: 4000V。定性离子对、定量离子对、碰撞能量见表2。

表2 万古霉素和去甲万古霉素的质谱参数

Table 2 MS parameters of vancomycin and norvancomycin

化合物	定性离子对	定量离子对	Fragmentor (V)	CE (eV)
万古霉素	725.0/99.9	725.0/99.9	100	35
	725.0/143.9			10
去甲万古霉素	718.0/144.0	718.0/144.0	100	10
	718.0/99.9			10

1.2.3 样品处理 称取牛奶样品5.0g (精确至0.01g) 于25mL比色管中, 加入5mmol/L EDTA-1%三氟乙酸水溶液定容至25mL, 涡旋混匀, 超声提取15min, 过滤后取10mL滤液转移至Oasis MCX固相萃取柱 (预先用甲醇和1%三氟乙酸水溶液各5mL活化、平衡), 先后用5mL水、甲醇淋洗, 弃去淋洗液。用5mL 5%氨水甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液并于缓慢氮气流下将有机相吹干。样品用50%甲醇水溶液复溶并定容到1.0mL, 混匀, 过0.22μm有机相滤膜, 供LC-MS/MS测定。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的选择

万古霉素是多肽类抗生素, 分子量为1448, 进入一级质谱后, 与两个H⁺结合, 产生带正电的双电荷离子, 因此选择丰度最大的[M+2H]²⁺m/z 725.3作为万古霉素的母离子。产生碎片离子主要有m/z 99.9、m/z 143.9、m/z 1306.4 (见图1 (a)), 选择丰度最大的m/z 99.9为定量离子, m/z 143.8为定性离子。类似的, 去甲万古霉素的分子量为1433, 选择双电荷离子m/z 718.0作为去甲万古霉素的母离子。产生碎片离子主要有m/z 99.9、m/z 144.0、m/z 1292.0 (见图1 (b)), 选择丰度最大的m/z 144.0为定量离子, m/z 99.9为定性离子。

2.2 液相条件的选择

多肽类抗生素本身带有的氨基、羧基和酚羟基, 实验比较了0.1%甲酸水溶液-乙腈、水-乙腈、5mmol/L乙酸铵-乙腈对离子化的影响。结果表明, 0.1%甲酸

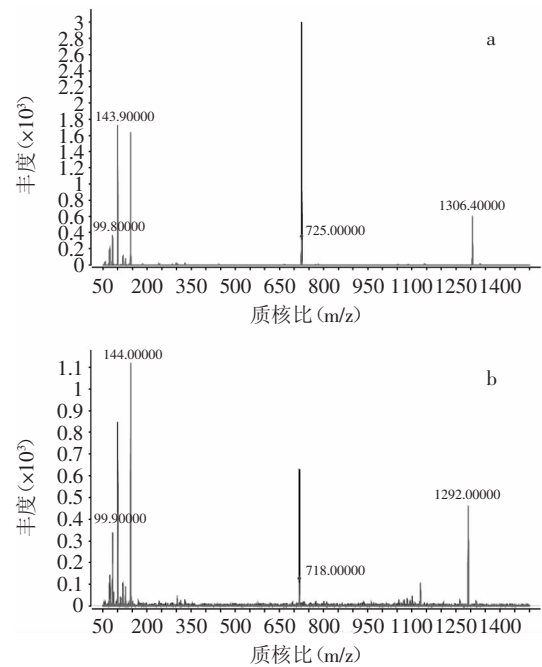


图1 二级质谱图

Fig.1 Product ion spectra

注: a: 万古霉素; b: 去甲万古霉素。

水溶液-乙腈体系能使多肽类在质谱中有最好的响应值, 这是由于甲酸可以为阳离子的形成提供必需的质子来源, 从而提高其离子化效率, 因此选用甲酸作为酸度调节剂。由于牛奶样品基质的复杂性, 采用梯度洗脱程序, 待万古霉素和去甲万古霉素出峰后采用大比例有机相冲洗色谱柱, 提高色谱柱的耐受

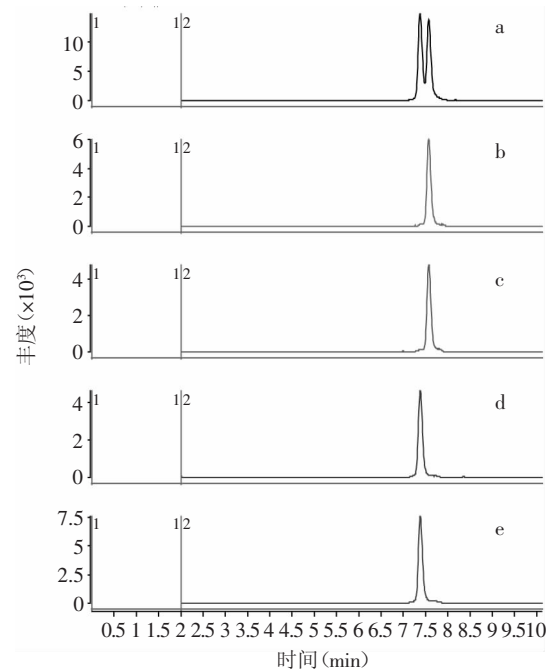


图2 多反应监测质量色谱图

Fig.2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram

注: a: 总离子流图; b: 万古霉素的定量离子图; c: 万古霉素的定性离子图; d: 去甲万古霉素的定量离子图; e: 去甲万古霉素的定性离子图。

(下转第101页)

Food Science and Emerging Technologies, 2012(13): 112-119.
 [7] MAYER-MIEBACH E, BEHSNILIAN D, REGIER M, *et al.* Thermal processing of carrots: Lycopene stability and isomerisation with regard to antioxidant potential[J]. Food Research International, 2005, 38: 1103-1108.
 [8] CHEN Jianchu, SHI J, XUE S J, *et al.* Comparison of lycopene stability in water- and oil-based food model systems under thermal- and light-irradiation treatments[J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42: 740-747.
 [9] 郭金耀, 杨晓玲. 温度光照氧气对番茄红素稳定性的影响[J]. 山西农业大学学报, 1990, 10(2): 124-127.
 [10] DUANGMAL K, APENTEN R K O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum var. Romano*) [J]. Food Chemistry, 1999, 64: 351-359
 [11] Perkins-veazie p, Collins j k, Pair s d, *et al.* Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2001, 81(10):

983-987.
 [12] 郑德勇, 安鑫南. 竹叶提取物清除DPPH自由基的测定方法[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2005, 34(1): 59-61.
 [13] Decker e a, Welch b. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38: 674-677.
 [14] AX K, MAYER-MIEBACH E, LINK B, *et al.* Stability of lycopene in oil-in-water emulsions[J]. Engineering in Life Sciences, 2003, 3(4): 199-201.
 [15] 邱伟芬, 汪海峰. 天然番茄红素在不同环境条件下的稳定性研究[J]. 食品科学, 2004, 25(2): 56-60.
 [16] 吴雪辉, 黄永芳, 高强, 等. 肉桂精油的抗氧化作用研究[J]. 食品科技, 2007, 32(4): 85-88.
 [17] 郑虎哲, Lee hye-ryun, Lee sang-han, 等. 果胶酶对苹果渣中多酚类物质的提取效果研究[J]. 分析化学, 2008, 36(3): 306-310.
 [18] 张强, 周正义, 储俊, 等. 大蒜、生姜、洋葱醇提物抗氧化活性的比较[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(1): 93-96.

(上接第87页)

表3 牛奶中万古霉素、去甲万古霉素的线性范围、线性方程、检出限及回收率
 Table 3 Linear ranges, regression equations, LOD, recovery and repeatability for 2 polypeptides in milk

化合物	线性范围	线性方程	检出限(μg/kg)	添加浓度(μg/kg)	回收率(%)	RSD%(n=5)
万古霉素	2~100μg/kg	y=68.90x+7.56 (r ² =0.9935)	5	20	72.5	8.2
				50	80.2	6.6
				100	85.6	3.5
去甲万古霉素	2~100μg/kg	y=73.30x+4.04 (r ² =0.9991)	5	20	73.4	7.6
				50	87.2	4.5
				100	82.1	5.1

性和方法的重现性,在优化后的分析条件下,万古霉素和去甲万古霉素的多反应监测质量色谱图见图2。

2.3 线性范围、回收率和精密度

用空白样品提取液制备基质标准曲线,万古霉素和去甲万古霉素的线性方程、线性范围和相关系数见表3。以信噪比为3估算检出限(LOD),2种多肽抗生素的检出限见表3。通过相同浓度的基质标准溶液和溶剂标准溶液的峰面积比值计算,万古霉素和去甲万古霉素的基质效应分别为92.5%和99.1%,显示本方法前处理的良好效果。

采用经测定不含有万古霉素、去甲万古霉素的牛奶样品,进行添加回收和精密度实验,样品添加20、50、100μg/kg的标准溶液,按本实验方法进行处理,用高效液相色谱-串联质谱进样测定。平均添加回收率(每个添加浓度平行测定5次)为72.5%~87.2%,相对标准偏差小于10%,结果见表3。采用本方法对市场上的20例牛奶样品进行检测,未发现阳性样品。

3 结论

本文以牛奶为研究对象,采用三氯乙酸沉淀蛋白,混合型阳离子交换固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱定性定量分析,建立了牛奶中万古霉素和去甲万古霉素残留的检测方法,方法加标回收率为72.5%~87.2%,相对标准偏差小于10%。该方法操作

简单,具有较高的灵敏度和选择性,满足对牛奶中多肽类抗生素的快速、准确的检测要求。

参考文献

[1] 季闰春,沈晓英,杨耀芳. 万古霉素的药代动力学研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2008, 24(6): 529-532.
 [2] 张菁,胡瑾瑜,郁继诚,等. 去甲万古霉素临床药代动力学及血药浓度监测[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003, 3(4): 202-205.
 [3] 熊磊,苏丹,辛华雯,等. HPLC法同时测定人血清中万古霉素和去甲万古霉素浓度[J]. 中国药师, 2008, 11(8): 278-280.
 [4] 钱南萍,乔峰,王华,等. HPLC和微生物法测定万古霉素的血药浓度[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(11): 937-940.
 [5] 冯霞光,张敏,赵虎,等. 酶催化-荧光猝灭法测定药物中的万古霉素[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(7): 1270-1272.
 [6] Yoke-Lin Lo, Johan G C van Hasselt, Siow-Chin Heng, *et al.* Population Pharmacokinetics of Vancomycin in Premature Malaysian Neonates: Identification of Predictors for Dosing Determination[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010, 54(6): 2626-2632.
 [7] Chang Cheng, Shaorong Liu, Deqing Xiao, *et al.* LC-MS/MS method development and validation for the determination of polymyxins and vancomycin in rat plasma[J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878: 2831-2838.