

混合型固相萃取-亲水作用色谱串联质谱法测定熊胆粉中7种氨基糖苷类抗生素残留量

胡青^{1,2}, 孙健², 于泓², 张静娴², 毛秀红², 季申^{1,2*}

(1. 中国医药工业研究总院, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验研究院, 国家药品监督管理局中药质量控制重点实验室, 上海 201203)

摘要: 建立了亲水作用色谱串联三重四极杆质谱测定熊胆粉中7种氨基糖苷类抗生素的方法。采用混合型弱阳离子交换反相吸附固相萃取净化样品, Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm), 以0.2% 甲酸水溶液-0.2% 甲酸乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 在电喷雾离子化正离子模式下, 以多反应监测方式 (MRM) 检测。大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、新霉素在各自浓度范围内均呈良好线性关系, 相关系数均在0.99以上; 三水平平均加样回收率为61.3%~127.3%, 相对标准偏差 (RSD) 为0.1%~1.9%; 定量限为0.2~1.0 mg·kg⁻¹。本方法已应用于实际样品的测定。

关键词: 亲水作用色谱串联质谱; 混合型固相萃取; 熊胆粉; 氨基糖苷

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)12-3621-05

Determination of 7 aminoglycoside antibiotics residues in bear bile powder by mix-mode SPE-hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry

HU Qing^{1,2}, SUN Jian², YU Hong², ZHANG Jing-xian², MAO Xiu-hong², JI Shen^{1,2*}

(1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: An analytical method was developed for determination of 7 aminoglycosides antibiotics in bear bile powder by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry. The samples were purified by mix-mode weak cation exchange and reversed-phase SPE. Waters ACQUITY UPLC BEH Amide column (100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm) was used with 0.2% formic acid aqueous solution-0.2% formic acid acetonitrile solution as mobile phases by gradient elution. The aminoglycosides were detected by electrospray ionization mass spectrometry in positive mode with multiple reaction monitoring (MRM) mode. Spectinomycin, streptomycin, amikacin, kanamycin, tobramycin, apramycin and neomycin possessed good linear correlation in the respective concentration ranges, with the correlation coefficients more than 0.99. The mean recoveries at 3 spiked levels were in the range of 61.3%~127.3%, and the RSDs were 0.1%~1.9%. The limits of quantification were 0.2~1.0 mg·kg⁻¹. The method had been applied to the analysis of actual samples.

Key words: hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry; mix-mode solid-phase extraction; bear bile powder; aminoglycoside

收稿日期: 2022-06-22; 修回日期: 2022-09-22.

基金项目: 国家中药标准化项目 (ZYBZH-C-SH-48); 上海市自然科学基金资助项目 (19ZR1448300).

*通讯作者 Tel: 86-21-50798195, E-mail: jishen2021@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0620

熊胆粉为熊科动物黑熊 *Selenaretos thibetanus* Cuvier 经胆囊手术引流胆汁而得的干燥品, 具清热、平肝、明目之功效。在黑熊养殖、胆囊手术、术后恢复过程中均有可能使用抗生素等兽药。作者团队^[1]前期采用 QuEChERS 前处理方法, 建立了超高效液相色谱串联质谱法定性筛查熊胆粉中 169 种兽药残留的方法, 发现了多种兽药残留安全风险。

氨基糖苷类抗生素是水溶性碱性抗生素, 是动物养殖中常使用的一类兽药。但由于氨基糖苷类抗生素的强极性, 难以采用常规的多兽药残留的筛查方法进行检测。且本研究对象熊胆粉中, 牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸等胆汁酸占 44%~61%^[2], 与多数弱酸性小分子药物化学结构有相似性, 去除困难而对检测带来较强干扰。因此, 需针对熊胆粉的基质特性和氨基糖苷类的强极性, 建立专属的前处理方法和检测方法。

目前, 针对动物源性食品的兽药残留检测研究较多。GB/T 21323-2007《动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定》^[3]采用 C18 固相萃取柱净化样品, 使用七氟丁酸离子对试剂作为流动相, 采用液质联用法进行测定。文献报道的食品中氨基糖苷类检测的前处理方法有基质分散固相萃取^[4,5]、反相固相萃取^[6-8]、阳离子交换^[9]、分子印迹固相萃取^[10]; 色谱分离方法一般为 HILIC 等亲水作用色谱^[4,6,8,10], 也可使用 C18 或 C8 等反相色谱加离子对试剂进行分离^[7,9]; 检测方法均为液质联用法。

本研究利用氨基糖苷类待测物与熊胆粉基质的酸碱差异, 采用混合型弱阳离子交换反相吸附固相萃取进行前处理, 以超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定熊胆粉药材中卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、新霉素共 7 种氨基糖苷类抗生素。

材料与方法

仪器与试剂 1290 超高效液相色谱仪和 6495 三重四极杆质谱 (美国 Agilent 公司); ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm) 和 Oasis WCX 固相萃取柱 (规格 500 mg/6 mL), 美国 Waters 公司; 卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、新霉素混合对照溶液 (天津阿尔塔有限公司, 浓度 100 μg·mL⁻¹, 批号 S035517); 甲醇、乙腈、甲酸均为高效液相色谱级试剂。熊胆粉样品由上海凯宝药业提供, 批号 X0120190801、X0220190802、X0320190803。

色谱和质谱条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱 (100 mm × 3.0 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司);

柱温为 40 °C, 流速为 0.4 mL·min⁻¹, 进样量 5 μL。流动相: A 为 0.2% 甲酸水溶液, B 为 0.2% 甲酸乙腈溶液; 梯度洗脱: 0~2.0 min, 20% A; 2.0~7.0 min, 20%~50% A; 7.0~12.0 min, 50%~60% A; 12.0~12.1 min, 60%~20% A; 12.1~16.0 min, 20% A。

电喷雾离子化 (ESI) 正离子模式; 干燥气 (N₂) 流速 13 L·min⁻¹, 温度 210 °C; 雾化气 (N₂) 0.24 MPa; 鞘气 (N₂) 流速 12 L·min⁻¹, 温度 380 °C; 毛细管电压 3 500 V。采用多反应监测方式 (MRM) 检测, 监测离子、碰撞能量等参数见表 1。

Table 1 Monitoring ion pairs and collision energy (CE) of aminoglycosides. *Quantitative ion

Aminoglycoside	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	CE/V
Spectinomycin	333.2	98.0 [*] , 140.0	26, 25
Streptomycin	582.3	263.0 [*] , 246.0	37, 43
Amikacin	586.3	163.1 [*] , 264.3	30, 25
Kanamycin	485.2	163.1 [*] , 324.2	29, 17
Tobramycin	468.3	163.2 [*] , 145.1	29, 21
Apramycin	540.3	55.1 [*] , 83.0	57, 45
Neomycin	615.3	114.0 [*] , 80.0	61, 73

对照品溶液制备方法 分别精密量取卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、新霉素对照品适量, 加水制成 1 μg·mL⁻¹ 混合对照品储备液。精密量取混合对照品储备液适量, 加 10% 甲酸水溶液制成卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素 4、8、10、20、40、80 μg·L⁻¹, 安普霉素、新霉素 20、30、40、60、80、100 μg·L⁻¹ 的系列混合溶液, 作为对照品溶液。

供试品溶液制备方法 取本品粉末 0.1 g, 精密称定, 置离心管中, 加水 5 mL, 置振荡器剧烈振荡 (500 次/min) 10 min 至完全溶解。将上述溶液, 加于混合型弱阳离子交换反向吸附填料固相萃取柱 (Oasis WCX, 规格 500 mg/6 mL, 已预先用 4 mL 甲醇, 4 mL 水活化), 弃去上样液, 再依次用 4 mL 水、4 mL 甲醇清洗, 弃去洗液, 最后用 20% 甲酸乙腈溶液 4 mL 进行洗脱, 收集洗脱液至 5 mL 塑料 (聚四氟乙烯材质) 量瓶中, 用 20% 甲酸乙腈稀释至刻度, 滤过, 取续滤液, 装聚四氟乙烯材质进样小瓶, 即得。

方法学验证

线性关系 取系列对照品溶液进样测定, 以各组分峰面积对质量浓度绘制曲线。

准确度 取样品, 分别添加低 (卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素 0.2 mg·kg⁻¹, 安普霉素、新霉素 1.0 mg·kg⁻¹)、中 (卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素 0.4 mg·kg⁻¹, 安普霉素、

新霉素 $2.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高(卡那霉素、大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、安普霉素、新霉素 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 3个水平的对照品溶液, 每个水平做3个平行样, 共9份, 按上述供试品溶液制备方法和色谱质谱条件进行分析, 计算回收率和精密度。

重复性 取同一批供试品溶液, 按“准确度”低水平加样制备6份供试品溶液, 按“色谱和质谱条件”进行测定, 记录峰面积, 计算各组分峰面积的RSD。

稳定性 取同一低水平加样溶液, 在室温下, 于0、3、5、9 h时进样测定, 记录峰面积, 计算各组分峰面积的RSD。

定量限 采用直观法, 以符合回收率要求的低水平加样溶液作为定量限。

结果

1 方法学验证

1.1 线性关系 大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素在 $4\sim 80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内, 安普霉素、新霉素在 $20\sim 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 内均呈良好线性关系, 相关系数均在0.99以上, 结果见表2。色谱图见图1。

1.2 准确度 在 0.2 、 0.4 和 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的加样水平下, 大观霉素的平均加样回收率为 $61.3\%\sim 81.6\%$, RSD为 $0.5\%\sim 1.0\%$; 链霉素的平均加样回收率为 $116.2\%\sim 124.0\%$, RSD为 $0.1\%\sim 1.0\%$; 丁胺卡那霉素的平均加样回收率为 $109.2\%\sim 127.3\%$, RSD为 $0.5\%\sim 0.9\%$; 卡那霉素的平均加样回收率为 $98.7\%\sim 108.6\%$, RSD为 $1.0\%\sim 1.8\%$; 妥布霉素的平均加样回收率为 $101.6\%\sim 126.0\%$, RSD为 $0.6\%\sim 1.2\%$ 。在 1.0 、 2.0 和 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的加样水平下, 安普霉素的平均加样回收率为 $71.2\%\sim 78.6\%$, RSD为 $0.3\%\sim 0.8\%$; 新霉素的平均加样回收率为 $88.1\%\sim 101.9\%$, RSD为 $0.7\%\sim 1.9\%$ 。具体结果见表3。

根据中国药典2020年版四部通则<9101>, 样品中待测定成分含量为 $0.01\sim 1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级别时, 回收率要求为 $70\%\sim 125\%$, 重复性要求为不超过 15% , 在基质复杂、组分含量低于 0.01% 及多成分等分析中, 回收率和精密度范围可适当放宽^[11]。因此, 本次实验回收率

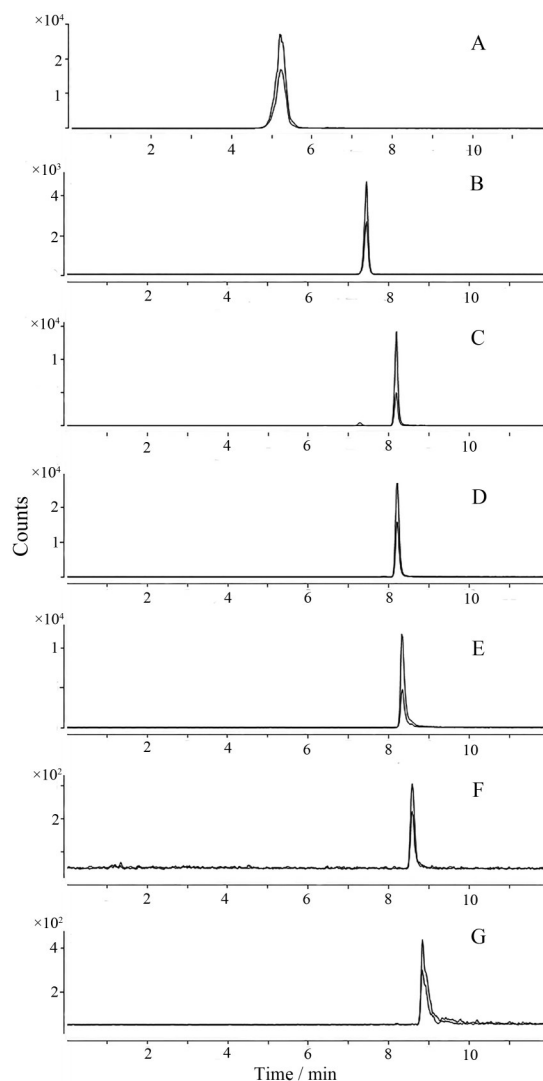


Figure 1 MRM chromatograms of aminoglycosides. A: Spectinomycin; B: Streptomycin; C: Amikacin; D: Kanamycin; E: Tobramycin; F: Apramycin; G: Neomycin

和精密度基本符合要求。

1.3 重复性 大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、新霉素一式六份的峰面积RSD分别为 1.3% 、 1.3% 、 1.6% 、 0.8% 、 1.4% 、 1.5% 、 2.1% 。

1.4 稳定性 大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、新霉素的峰面积RSD分别为 1.0% 、 0.2% 、 1.3% 、 0.6% 、 1.2% 、 0.5% 、 2.1% 。在9 h内

Table 2 Linear ranges, equations and correlation coefficients of aminoglycosides

Aminoglycoside	Linear range/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Linear equation	Correlation coefficient
Spectinomycin	4-80	$y = 2\ 956.29x - 1\ 013.15$	0.998 8
Streptomycin	4-80	$y = 120.73x - 190.47$	0.995 3
Amikacin	4-80	$y = 368.64x - 794.48$	0.994 5
Kanamycin	4-80	$y = 879.19x - 1\ 686.61$	0.996 8
Tobramycin	4-80	$y = 342.51x - 859.39$	0.997 4
Apramycin	20-100	$y = 10.23x - 12.59$	0.997 9
Neomycin	20-100	$y = 22.05x - 91.59$	0.996 7

Table 3 Recoveries, precisions and limit of quantification (LOQ) of aminoglycosides

Aminoglycoside	Spiked /mg·kg ⁻¹	Recovery /%	RSD /%	LOQ /mg·kg ⁻¹
Spectinomycin	0.2	81.6	1.0	0.2
	0.4	64.8	0.5	
	1.0	61.3	0.7	
Streptomycin	0.2	124.0	0.4	0.2
	0.4	122.8	1.0	
	1.0	116.2	0.1	
Amikacin	0.2	127.3	0.5	0.2
	0.4	112.6	0.9	
	1.0	109.2	0.7	
Kanamycin	0.2	98.7	1.0	0.2
	0.4	103.9	1.8	
	1.0	108.6	1.0	
Tobramycin	0.2	126.0	0.6	0.2
	0.4	106.6	1.2	
	1.0	101.6	0.8	
Apramycin	1.0	78.6	0.7	1.0
	2.0	74.4	0.8	
	5.0	71.2	0.3	
Neomycin	1.0	101.9	1.9	1.0
	2.0	92.9	0.7	
	5.0	88.1	0.8	

基本稳定。

1.5 定量限 大观霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素定量限为 0.2 mg·kg⁻¹, 安普霉素、新霉素定量限为 1.0 mg·kg⁻¹ (表 3)。

2 样品测定

本次研究测定了上海凯宝药业提供的 3 批熊胆粉药材样品, 均检出卡那霉素, 含量分别为 0.45、0.22、0.44 mg·kg⁻¹, 未检出其他 6 种氨基糖苷类抗生素, 体现了一定的安全风险。

讨论

由于熊胆粉基质复杂, 胆汁酸含量高, 样品前处理考察了反相固相萃取 (HLB) 和混合型弱阳离子交换反相吸附固相萃取 (WCX) 两种净化方式。结果显示, HLB 固相萃取的回收率低于 20%, 而使用 WCX 固相萃取净化利用了基质和待测物较大的酸碱差异性, 对氨基糖苷类碱性化合物具高度专属性。熊胆粉基质提供的弱酸性环境使 WCX 固相萃取吸附剂和待测物处于电离状态, 待测物能较好保留, 比较了多种上样液 pH 值, 发现不调节上样液 pH 时各待测物回收率最好。同时实验发现: 低浓度溶液在碱性环境下不稳定, 因此在对照品和供试品制备溶剂中加入一定浓度的酸; 玻璃材质对低浓度化合物有吸附作用, 因此实验中所用的量瓶和进样小瓶为聚四氟乙烯材质。

色谱分离选用亲水作用色谱, 可使用水、乙腈等反

相色谱流动相达到极性化合物良好分离的效果, 克服添加七氟丁酸等离子对试剂造成的离子抑制弊端。流动相水相考察 0.2% 甲酸水溶液和含 0.2% 甲酸的 5 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液等, 发现 0.2% 甲酸水溶液时峰形好、响应强。

考虑到熊胆粉为熊胆汁的干燥品, 得率约为 10%。熊胆汁中残留限量参照 GB 31650-2019《食品安全国家标准·食品中兽药最大残留限量》^[12] 中牛/羊奶的残留限量, 大观霉素、链霉素为 200 μg·kg⁻¹, 卡那霉素为 150 μg·kg⁻¹, 新霉素为 1 500 μg·kg⁻¹。经折算至熊胆粉, 本研究的定量限可满足残留检测的需要, 测定的 3 批熊胆粉药材中卡那霉素残留量均低于该参考限度。经调研, 黑熊养殖过程中主要在胆囊手术和术后恢复期使用抗生素等兽药, 正规养殖基地须在停药数天后方可采集胆汁, 进而避免有兽药残留的熊胆粉被用于中成药投料而产生用药的安全性问题。停药后胆汁采集时间与氨基糖苷类抗生素残留量的关系可采用本方法进一步研究, 为提高熊胆粉用药安全性提供技术支撑。

综上, 本研究建立了混合型固相萃取-亲水作用色谱串联质谱法测定熊胆粉药材中 7 种氨基糖苷类抗生素, 方法专属, 解决了复杂中药材基质中氨基糖苷类测定的难题, 灵敏准确, 能够满足残留检测的需求。

作者贡献: 胡青负责数据采集、分析与撰写文章; 孙健负责实验设计、数据分析和阐释; 于泓负责数据采集、分析; 张静娴负责数据采集、分析与审阅文章; 毛秀红负责审阅文章与行政支持; 季申负责技术与材料支持和获取研究经费。

利益冲突: 本文无任何利益冲突。

References

- [1] Sun J, Hu Q, Zhu YR, et al. Qualitative screening of 169 veterinary drug residues in bear bile powder by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 113-122.
- [2] Wang J, Xiong AZ, Cheng RR, et al. Systematical analysis of multiple components in drainage bear bile powder from different sources [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2018, 43: 2326-2332.
- [3] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. GB/T 21323-2007 Determination of Aminoglycosides Residues in Animal Tissues-HPLC-MS/MS Method (动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定-高效液相色谱-质谱/质谱法) [S]. Beijing: Standards Press of China, 2007.
- [4] Gong MM. Determination of 3 aminoglycosides antibiotics residues in animal origin sports foods by hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. China

- Brewing (中国酿造), 2021, 40: 175-179.
- [5] Wang YR. Determination of five aminoglycosides residues in dairy products by MSPD-HILIC-MS/MS [J]. China Dairy Ind (中国乳品工业), 2021, 49: 56-59.
- [6] Luan FT, Gong L, Zhu L, et al. Determination of aminoglycoside residues in eggs and milk by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Jiangsu J Agric Sci (江苏农业学报), 2021, 37: 1033-1042.
- [7] Ma K, Cai FY, Huang YQ, et al. Detection of nine aminoglycosides residues in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2020, 46: 203-208.
- [8] Wei LL, Xue X, Wu CX, et al. Determination of ten aminoglycoside residues in eggs by mixed-mode ion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr (色谱), 2021, 39: 1374-1381.
- [9] Xiao ZM, Wang QQ, You YL, et al. Determination of 9 kinds of aminoglycosides in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报), 2021, 12: 7563-7571.
- [10] Wang M, Ma YQ, Wang HK, et al. Determination of 11 kinds of aminoglycosides in milk by molecularly imprinted solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual (食品安全质量检测学报), 2021, 12: 7969-7976.
- [11] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume IV (中华人民共和国药典) [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 480-483.
- [12] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the people's Republic of China, National Health Commission of the people's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 31650-2019 National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods (食品安全国家标准·食品中兽药最大残留限量) [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2019.