

使用 Agilent Bond Elut Plexa SPE（即 Agilent Poroshell 120 色谱柱）和液相色谱/串联质谱系统分析牛骨骼肌中的氨基糖苷类

应用简报

食品检测和农业

作者

Andy Zhai
安捷伦科技（上海）有限公司

摘要

本文开发并验证了一种可同时测定牛骨骼肌中壮观霉素、潮霉素 B、链霉素、双氢链霉素、阿米卡星、卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、庆大霉素和新霉素的氨基糖苷类残留物的方法。采用固相萃取来提取和净化分析物，使用液相色谱与电喷雾电离串联质谱在正离子多反应监测模式下对分析物进行定量。本方法对牛骨骼肌中的所有氨基糖苷类残留物都具有 ng/g 级检测限。这些化合物的动态校准范围在 10 ng/g 至 500 ng/g 之间。总体回收率在 71% 到 98% 的范围内，相对标准偏差值在 1.4% 到 11.2% 之间。

引言

氨基糖苷类 (AG) 是一类广谱抗生素，对一些好氧革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌具有抑菌活性。AG 已广泛用于畜牧业治疗细菌感染或促进生长。由于它们具有毒性且可能造成抗生素抗性，因此这类抗生素对人类可能存在的潜在健康风险受到了极大关注。欧盟 (EU)、中国、美国、日本和其他国家已经针对多种动物源食物中的 AG 的最大残留水平颁布了严格的规定 [1, 2]。



Agilent Technologies

本应用简报的目标在于开发一种多残留物的分析方法，用于动物组织中氨基糖苷类残留物简单、快速的常规监管分析。本方法依赖于使用了聚合吸附剂 (Agilent Bond Elut Plexa) 的简单固相萃取步骤。表 1 显示了 β -拮抗剂的详细信息。

实验部分

试剂与化学品

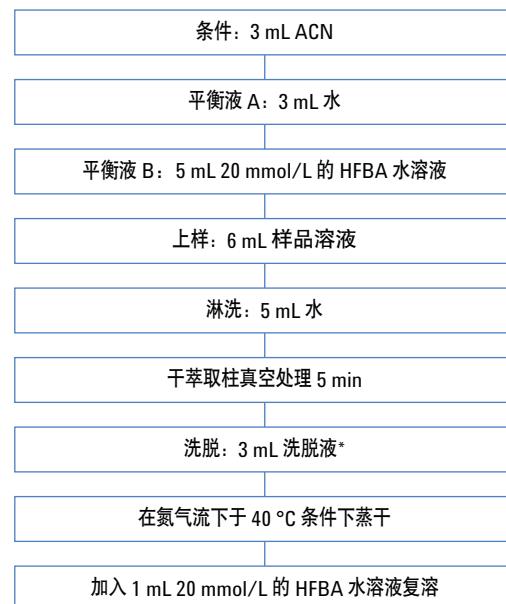
所有试剂均为质谱、HPLC 或分析纯级。乙腈和水购自 Honeywell。标样购自 Dr. Ehrenstorfer (德国奥格斯堡)。牛骨骼肌购自当地超市。标样溶液 (1.0 mg/mL) 分别在水中制备，储存在冷冻箱 (4 °C) 内。混合工作溶液 (10 μ g/mL) 在乙腈:水 (10:90) 中制备，也储存在 4 °C 下。然后用水对混合工作溶液进行适当稀释，制得浓度较小的加标溶液。

样品前处理

使用厨用搅拌器将牛骨骼肌 (500 g) 绞碎并储存于 -20 °C 下。称取 5 g 等分碎肉放入 50 mL 加盖聚丙烯管中，然后加入 10 mL 5% 的三氯乙酸 (TCA) 水溶液。所得混合物在 Ultra-Turrax T-18 搅拌器 (IKA-Labortechnik, Staufen, 德国) 中充分搅拌 1 min，然后在 4000 rpm 下离心 5 min。将上层清液转移至另一个管内。使用 10 mL 5% TCA 水溶液重复进行相同的萃取步骤，将上层清液混入同一个管内。向萃取物中加入 5 mL 0.2 mol/L 的七氟丁酸 (HFBA) 水溶液。将上层清液涡旋混合 1 min 并在 4000 rpm 下离心 5 min，然后用 5% 氨水将其 pH 调为 4.0。样品萃取溶液用水定容至 30 mL，备好以进行后面的固相萃取。

固相萃取

图 1 显示了固相萃取步骤。使用 3 mL 乙腈 (ACN) 对 Bond Elut Plexa 萃取柱进行预处理，然后用 3 mL 水和 5 mL 20 mmol/L 的 HFBA 水溶液进行平衡。然后将 6 mL 样品溶液加载到萃取柱上。样品溶液在重力作用下穿过萃取柱 (速度大约为 1 mL/min)。萃取柱用 5 mL 水进行淋洗。对萃取柱施加 5 min 全真空以使树脂完全干燥。用 3 mL ACN:0.2 mol/L HFBA 水溶液在 1 mL/min 的流速下洗脱化合物。洗脱液在氮气环境中于 40 °C 干燥。残留物重新溶解于 1 mL 20 mmol/L 的 HFBA 水溶液中。然后对样品进行涡旋混合和超声以充分溶解残留物，并用 0.22 μ m 膜对其进行过滤。然后将样品最终转移至 2 mL 的色谱样品瓶中准备分析。



* 洗脱液 ACN:0.2 mol/L HFBA 水溶液 (8:2)。

图 1. 牛骨骼肌净化和富集——固相萃取步骤

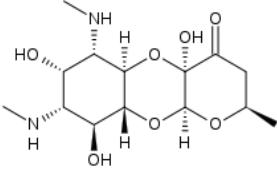
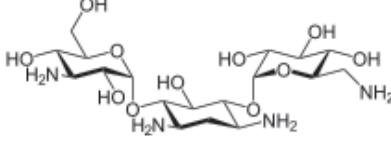
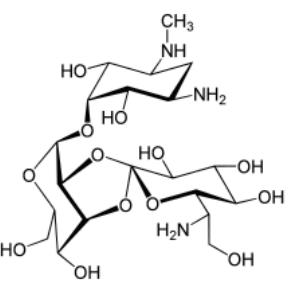
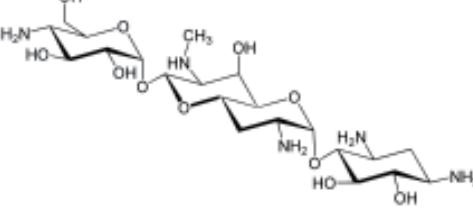
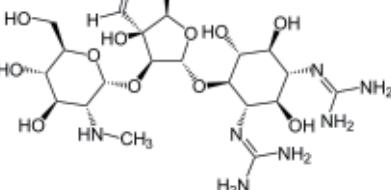
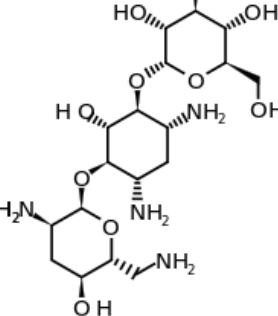
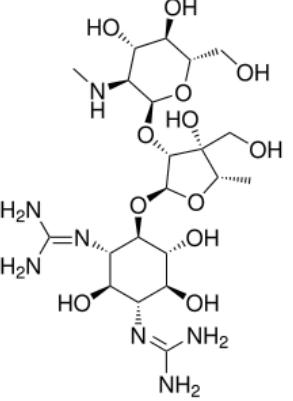
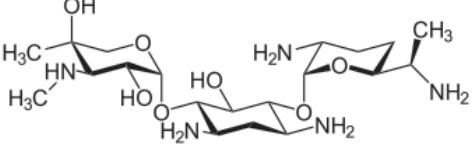
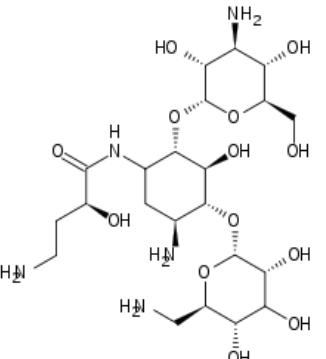
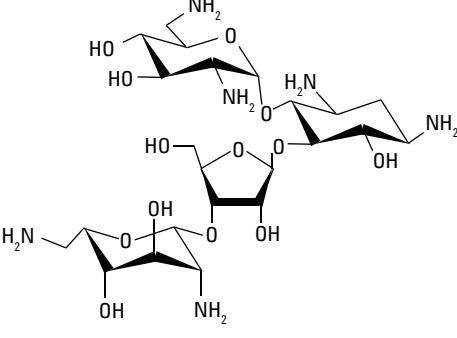
化合物	CAS号	Log P	结构	化合物	CAS号	Log P	结构
壮观霉素	1695-77-8	-2.3		卡那霉素	59-01-8	-6.3	
潮霉素 B	31282-04-9	NA		安普霉素	37321-09-8	-6.5	
链霉素	57-92-1	-6.4		妥布霉素	32986-56-4	-5.8	
双氢链霉素	128-46-1	NA		庆大霉素	1403-66-3	NA	
阿米卡星	37517-28-5	-7.4		新霉素	1404-04-2	-7.8	

表 1. 本研究中所用的氨基糖苷类化合物。

条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 SB-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685775-902)
样品制备: Agilent Bond Elut Plexa 萃取柱, 500 mg, 6 mL (部件号 12259506)
流动相: A: 水:乙腈 (950:50, 20 mmol/L HFBA),
B: 乙腈:水 (800:200, 20 mmol/L HFBA)
进样体积: 20 μL
流速: 0.3 mL/min
梯度:

时间 (min)	%A	%B
0	85	15
3	85	15
9.5	25	75
9.55	85	15
10	85	15

温度: 室温
歧管: Agilent Vac Elut 20 歧管 (部件号 12234101)
仪器: Agilent 1200 Infinity 系列液相色谱系统
Agilent 6460 三重四极杆液相色谱-串联质谱系统

质谱条件

正离子模式下对 AG 进行监测。表 2 列出了多反应监测的详细信息。

质谱离子源参数

载气温度: 350 °C
载气流速: 5 L/min
雾化器: 45 psi
鞘气温度: 400 °C
鞘气流速: 11 L/min
喷嘴电压: 正, 0 V
毛细管: 正, 3500 V

化合物	前体离子	产物离子	裂解电压 (V)	碰撞能量 (V)	保留时间 (min)
壮观霉素	351.2	333.2	170	15	4.64
		207.1	170	18	
潮霉素 B	528.3	177.1	170	25	6.77
		352	170	20	
链霉素	582.4	263.2	180	30	6.98
		245.8	180	35	
双氢链霉素	584.4	263.3	180	30	7.06
		246.2	180	40	
阿米卡星	586.4	163.1	170	30	7.68
		425.2	170	15	
卡那霉素	485.3	163.1	150	20	7.8
		324.2	150	10	
安普霉素	540.3	217.1	140	25	8.32
		378.2	140	12	
妥布霉素	468.3	163.2	125	20	8.42
		324.2	125	8	
庆大霉素	478.3	322.3	125	8	8.64
		157.2	125	15	
新霉素	615.3	161.1	175	30	8.74
		293.1	175	20	

表 2. 多反应监测所得到的质量数

结果与讨论

线性和检测限

将混合工作溶液加标至空白基质中，制得用于创建外标校准曲线的溶液（10 ng/g、20 ng/g、50 ng/g、100 ng/g 和 500 ng/g）。在整个步骤（包括预处理和固相萃取步骤）中去掉牛骨骼肌得到空白基质。将各种化合物高于 3:1 信噪比（S/N）时的浓度作为检测限（LOD）。校准曲线和 LOD 的结果列在表 3 中。

化合物	回归方程	R ²	肌肉中的检测限 (ng/g)
壮观霉素	Y=293.4698x-325.2314	0.9998	2
潮霉素 B	Y=270.2367x-424.6557	0.9999	0.5
链霉素	Y=28.7892x+10.1849	0.9999	5
双氢链霉素	Y=458.6225x-1320.7826	0.9999	0.1
阿米卡星	Y=572.3138x-923.7852	0.9999	0.2
卡那霉素	Y=508.1929x-905.1314	0.9998	0.5
安普霉素	Y=239.2452x-646.2071	0.9999	0.5
妥布霉素	Y=696.8031x-1922.6636	0.9999	0.1
庆大霉素	Y=1076.2438x-3690.8511	0.9996	0.1
新霉素	Y=196.7006x-534.5063	0.9997	2

表 3. 牛骨骼肌中氨基糖苷类的线性和检测限

回收率和重现性

在 3 个浓度下测定方法的回收率和重现性：牛肉加标浓度分别为 20 ng/g、100 ng/g 和 500 ng/g。每个浓度下重复分析六次。表 4 列出了回收率和重现性数据。图 2 给出了加标牛骨骼肌萃取物（20 ng/g）的色谱图。

化合物	加标浓度 (ng/g)	回收率 (%)	RSD (n=6, %)
壮观霉素	20	87.7	2.1
	100	79.7	2.4
	500	91.2	3.2
潮霉素 B	20	75.9	3.9
	100	82.1	3.4
	500	85.6	4.0
链霉素	20	71.5	11.2
	100	80.0	9.4
	500	74.5	8.0
双氢链霉素	20	89.1	4.5
	100	91.2	2.3
	500	93.3	3.6
阿米卡星	20	85.9	1.8
	100	90.1	2.4
	500	96.5	3.8
卡那霉素	20	86.7	1.4
	100	90.0	2.2
	500	97.6	2.8
安普霉素	20	84.6	4.9
	100	87.6	3.1
	500	95.4	5.4
妥布霉素	20	89.3	4.4
	100	88.1	3.4
	500	97.7	5.8
庆大霉素	20	82.4	3.5
	100	81.2	4.6
	500	95.8	6.8
新霉素	20	72.1	2.6
	100	82.8	5.6
	500	90.3	5.5

表 4. 牛骨骼肌中氨基糖苷类的回收率和重现性。

结论

液相色谱-串联质谱是一种可靠而强大的技术，可同时定量和鉴定牛骨骼肌中的氨基糖苷类。此外，本研究结果显示，Agilent Bond Elut Plexa 是一种适用于复杂基质（例如牛骨骼肌）中多种氨基糖苷类纯化和富集的有效方法。根据基质加标样得到的回收率和重现性结果表明，本方法符合国际法规测定牛骨骼肌中氨基糖苷类残留物要求。杂质和基质的影响甚微，并没有干扰任何目标化合物的定量。定量限显著低于 MRL [3]。

参考文献

1. W. Zhu, J. Yang, W. Wei, Y. L, S. Zhang. *J. Chromatography A*, 1207, 29 (2008).
2. A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden. *Anal. Chim. Acta* 711, 46 (2012).
3. Anon. GB/T 21323-2007 Determination of aminoglycosides residues in animal tissues - HPLC-MS/MS method. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.

如需更多信息

这些数据仅代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：www.agilent.com/chem/cn。

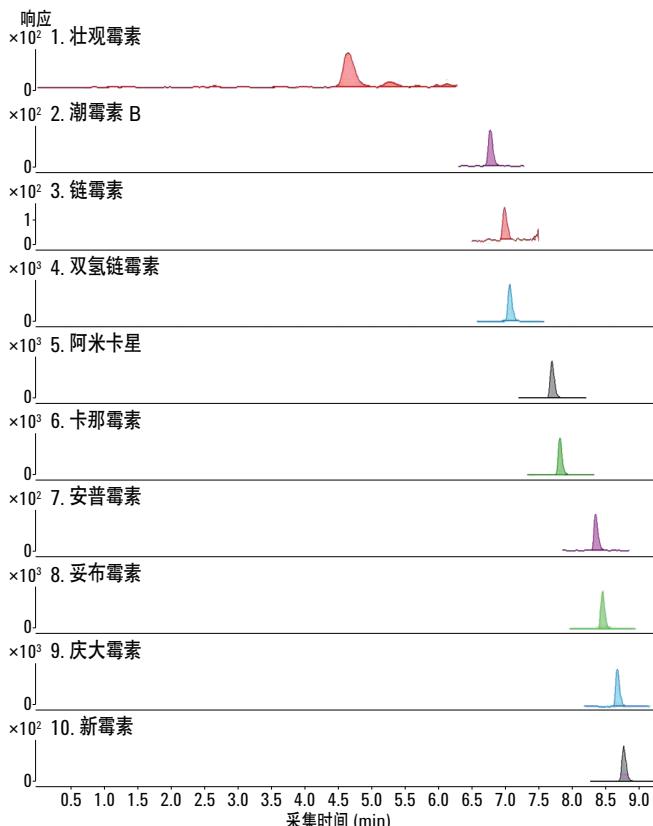


图 2. 20 ng/g 加标牛骨骼肌样品萃取物的色谱图

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司, 2012
中国印制

2012 年 10 月 25 日
5991-1321CHCN



Agilent Technologies