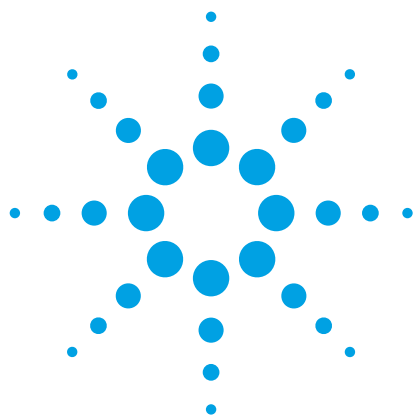




使用 Agilent Bond Elut Plexa SPE、 Agilent Poroshell 120 和液相色谱/ 串联质谱分析牛奶中的氨基糖苷类

应用简报

食品检测和农业

作者：

Andy Zhai
安捷伦科技公司
(上海) 有限公司

摘要

本文开发并验证了一种可同时测定牛奶中壮观霉素、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、庆大霉素和新霉素氨基糖苷类残留物的方法。首先采用 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取 (SPE) 方法提取和净化分析物，然后使用液相色谱与电喷雾电离串联质谱 (LC/Tandem MS) 在正离子多反应监测模式下对分析物进行定量。本方法对牛奶中的所有氨基糖苷类残留物均具有 ng/g 级检测限。这些化合物的动态校准范围在 10 到 500 ng/g 之间。总体回收率在 67% 到 107% 的范围内，相对标准偏差值在 1.7% 到 10.1% 之间。

前言

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 已在畜牧业中被广泛应用于治疗细菌感染或促进生长。由于它们具有毒性并且可能造成抗生素抗性，因此它们存在的对人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 严格规定了其最大残留水平 [1, 2]。

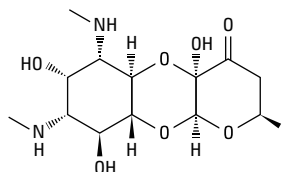
这项工作的目标在于开发多残留分析方法，用于简单、快速的常规法规分析牛奶中的氨基糖苷类残留物。本方法通过使用聚合吸附剂 (Bond Elut Plexa) 依靠简单的 SPE 步骤完成。表 1 显示了氨基糖苷类的详细信息。



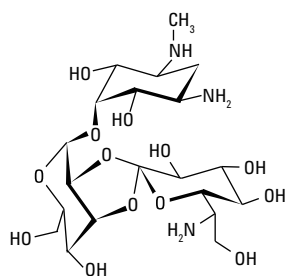
Agilent Technologies

表 1. 本研究中所用的氨基糖苷类化合物

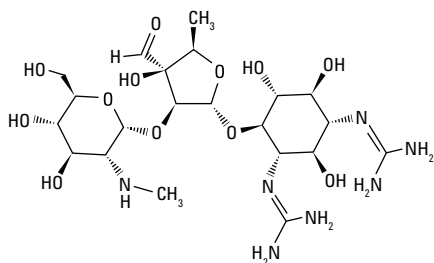
化合物	CAS 号	LogP
-----	-------	------



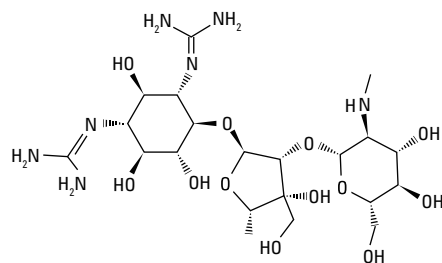
壮观霉素 1695-77-8 -2.3



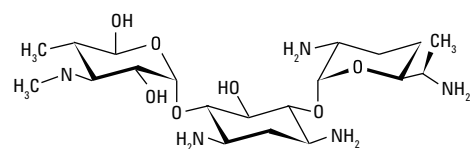
潮霉素 B 31282-04-9 NA



链霉素 57-92-1 -6.4

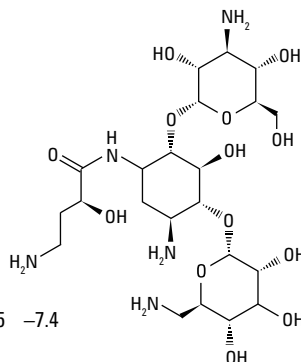


双氢链霉素 128-46-1 NA

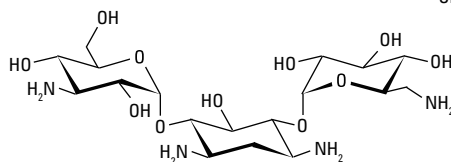


庆大霉素 1403-66-3 NA

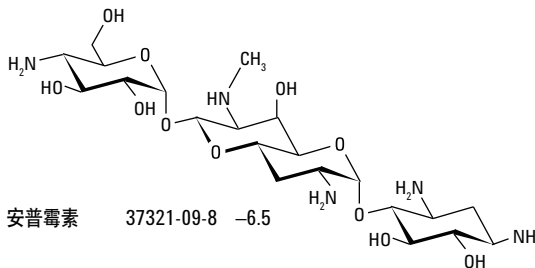
化合物	CAS 号	LogP
-----	-------	------



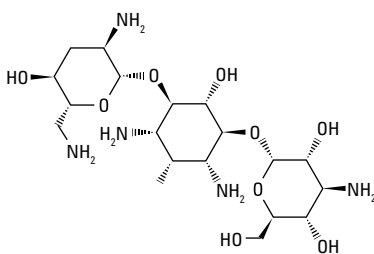
阿米卡星 37517-28-5 -7.4



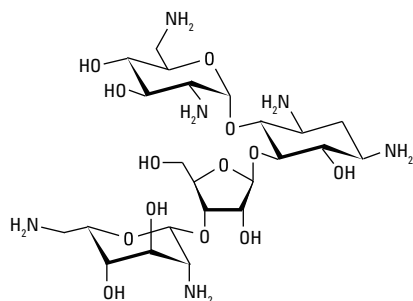
卡那霉素 59-01-8 -6.3



安普霉素 37321-09-8 -6.5



妥布霉素 32986-56-4 -5.8



新霉素 1404-04-2 -7.8

材料与方法

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 International, Inc.。标准品从 Dr. Ehrenstorfer（德国奥格斯堡）处购得。牛奶购自当地超市。标样溶液 (1.0 mg/mL) 单独在水中制备，储存在冷冻箱 (4 °C) 内。混合工作溶液 (10 µg/mL) 在乙腈:水 (10:90) 中制备，也储存在 4 °C 条件下。实验时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。

样品制备

称取 5 g 牛奶放入聚丙烯离心管内。向管中加入 10 mL 提取液（5% 三氯乙酸，0.6 mmol/L Na₂EDTA 和 15 mmol/L KH₂PO₄）。充分振摇混合物 5 min，然后在 4 °C 条件下以 4000 rpm 的转速离心 5 min。接着将上清液转移到另一个管内。使用 5 mL 提取液重复进行相同的萃取步骤，将上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。将上清液涡旋混合 1 min 并在 4000 rpm 转速下离心 5 min，然后用 5 mol/L NaOH 溶液将其 pH 调为 4.0 ± 0.5。然后准备好样品提取液进行 SPE 步骤。

固相萃取

图 1 显示了 SPE 步骤。使用 3 mL 乙腈对 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。然后将样品提取液加载到萃取柱上，样品提取液在重力作用下穿过萃取柱（速度大约为 1 mL/min）。用 5 mL 水淋洗萃取柱。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 40 °C 条件下于氮气环境中干燥。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 µm 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。

条件：3 mL 乙腈
平衡液 A：3 mL 水
平衡液 B：5 mL 20 mmol/L 的 HFBA 水溶液
上样：样品提取液
淋洗：5 mL 水
干燥萃取柱真空处理 5 min
洗脱：3 mL 洗脱液*
在氮气流下于 40 °C 蒸干
加入 1 mL 20 mmol/L 的 HFBA 水溶液复溶

*洗脱液：ACN:0.2 mol/L HFBA (8:2) 水溶液

图 1. 牛奶净化和富集——Agilent Bond Elut Plexa SPE 步骤

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		
多管装置：	Agilent Vac Elut 20 多管装置 (部件号 12234101)		
仪器：	Agilent 1200 Infinity 系列 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS/MS 系统		

质谱条件

在正离子模式下对 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

表 2. 多反应监测所得到的质量数

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

结果与讨论

线性和检测限

在至空白基质中加标混工作溶液，制得所需溶液（0.01 mg/kg、0.02 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg 和 0.5 mg/kg），用于创建外标校准曲线。可通过去除整个步骤（包括预处理和 SPE 步骤）中的牛奶来得到空白基质。将每种化合物信噪比 (S/N) 高于 3:1 时的浓度作为检测限 (LOD)。校准曲线和 LOD 的结果列在表 3 中。

表 3. 牛奶中氨基糖苷类的线性和检测限

化合物	回归方程	R ²	牛奶中的检测限 (ng/g)
壮观霉素	$Y = 13790.2955x + 39429.2957$	0.996	0.1
潮霉素 B	$Y = 891.7225x - 1190.5976$	0.998	0.2
链霉素	$Y = 1197.4506x - 2934.9645$	0.994	2
双氢链霉素	$Y = 2240.1902x - 1236.0908$	0.998	0.2
阿米卡星	$Y = 1393.7561x - 1742.7928$	0.999	0.2
卡那霉素	$Y = 1107.6982x - 1720.5534$	0.998	0.2
安普霉素	$Y = 288.9123x - 207.5481$	0.999	0.5
妥布霉素	$Y = 804.6063x - 1295.9858$	0.999	0.2
庆大霉素	$Y = 1494.7223x - 894.2355$	0.999	0.2
新霉素	$Y = 183.7889x - 240.7272$	0.994	0.5

回收率和重现性

在 3 种浓度水平下测定方法的回收率和重现性：牛奶加标浓度为 0.01 mg/kg、0.02 mg/kg 和 0.05 mg/kg。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 给出了加标牛奶萃取物 (0.02 mg/kg) 的色谱图。

表 4. 牛奶中氨基糖苷类的回收率和重现性

化合物	加标值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (n = 6, %)
壮观霉素	0.01	78.7	3.8
	0.02	82.5	5.6
	0.1	87.3	4.1
潮霉素 B	0.01	73.1	8.7
	0.02	69.7	6.3
	0.1	77.3	5.9
链霉素	0.01	78.1	7.7
	0.02	66.5	10.1
	0.1	71.8	7.1
双氢链霉素	0.01	84.2	2.1
	0.02	88.2	3.1
	0.1	91.5	5.4
阿米卡星	0.01	102.3	2.4
	0.02	97.2	2.7
	0.1	99.4	3.6
卡那霉素	0.01	98.7	4.5
	0.02	92.1	3.9
	0.1	93.6	6.8
安普霉素	0.01	97.1	4.8
	0.02	101.9	6.6
	0.1	89.6	7.1
妥布霉素	0.01	92.5	2.9
	0.02	98.5	4.9
	0.1	94.8	1.7
庆大霉素	0.01	107.3	3.9
	0.02	101.4	3.1
	0.1	105.8	4.5
新霉素	0.01	88.2	6.7
	0.02	97.4	7.2
	0.1	87.6	5.4

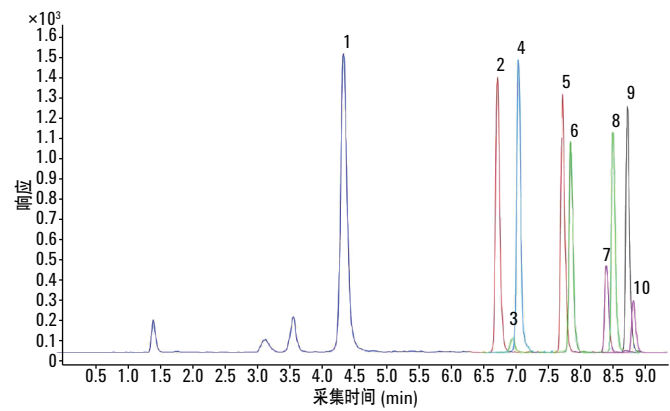


图 2. 0.02 mg/kg 加标牛奶样品萃取物的色谱图 1. 壮观霉素；
2. 潮霉素 B；3. 链霉素；4. 双氢链霉素；5. 阿米卡星；
6. 卡那霉素；7. 安普霉素；8. 妥布霉素；9. 庆大霉素；
10. 新霉素

结论

LC/MS/MS 是一种可靠而强大的技术，可同时定量和鉴定牛奶中的氨基糖苷类。本应用简报的结果显示 Agilent Bond Elut Plexa 是一种适合纯化和富集复杂基质（例如牛奶）中多种氨基糖苷类的有效方法。根据基质加标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对牛奶中氨基糖苷类残留物进行测试的要求。杂质和基质的影响甚微，且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。

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，2013
中国印制
2013 年 1 月 18 日
5991-1758CHCN



Agilent Technologies