

LC-MS/MS 检测蜂蜜中氨基糖苷类药物残留量

LCMSMS-938

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定蜂蜜中氨基糖苷类药物残留量的方法。11种氨基糖苷类药物在 5 $\mu\text{g/L}$ ~500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.998 以上。在高、中、低三个浓度下，化合物的保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.09%~0.47% 和 1.13%~11.75% 之间，仪器精密度良好。加标浓度在 25 和 50 $\mu\text{g/kg}$ 的样品，其回收率在 68.5~93.4% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于蜂产品中氨基糖苷类药物残留量的准确定量检测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 蜂蜜 氨基糖苷类药物

技术特点：

- ❖ 七氟丁酸添加到进样小瓶中，无需在流动相中使用离子对试剂和高浓度的盐溶液，即可在增强氨基糖苷类药物的保留能力的同时不抑制质谱信号。
- ❖ 采用 Peakintelligence 积分方式，无额外参数设置，数据处理操作更简便。

氨基糖苷类药物 (AGs) 是通过氨基糖和氨基环醇以苷键结合而构成，主要作用是阻碍细菌的蛋白质合成，使细菌细胞壁的通透性发生变化，从而发挥抗菌作用。近年来，有文献报道 AGs 对人体具有显著的耳毒性、肾毒性且会损害前庭神经功能，严重时会导致休克，甚至死亡。

2019 年，农业农村部、卫健委和国家市场监督管理总局联合发布的 GB 31650-2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》对不同基质中的庆大霉素、卡那霉素、新霉素 B、大观霉素、链霉素和双氢链霉素的残留限量做出了相关规定。

我国现行有效的动物源性食品中氨基糖苷类药物残留检测标准相对较少。为了保障人们的食品安全，我们参考标准《食品安全国家标准 蜂产品中氨基糖苷类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》征求意见稿，提取液分成两等份后分别经混合型强阳离子和混合型弱阳离子交换 SPE 小柱净化，建立了蜂蜜中氨基糖苷类药物残留的检测方法。该方法覆盖畜禽养殖行业常用的 AGs，无需在流动相中使用离子对试剂和高浓度的盐溶液，结果准确、可靠，杂质干扰小，可实现对蜂产品中氨基糖苷类药物残留量的有效检测。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	自动进样器：	SIL-40C X3
输液泵：	LC-40 X3 \times 2	质谱仪：	LCMS-8050
柱温箱：	CTO-40C	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机：	DGU-405		

1.2 分析条件

液相条件

- 色谱柱：Shim-pack Scepter C8-120 (100 mm \times .2.1 mm I.D, 1.9 μm)
岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-31033-05
- 流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液 (含 0.5 mM 乙酸铵), B 相 - 乙腈

柱 温 : 35°C
 流 速 : 0.3 mL/min
 进 样 体 积 : 5 μL
 洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 5%, 时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Pumps	Pump B Conc.	40
6.50	Pumps	Pump B Conc.	90
7.50	Pumps	Pump B Conc.	90
7.51	Pumps	Pump B Conc.	5
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI, 正离子模式	DL 管 温 度 : 150°C
雾 化 气 : 氮气 2.5 L/min	加 热 模 块 温 度 : 400°C
干 燥 气 : 氮气 10 L/min	接 口 温 度 : 300°C
加 热 气 : 空气 3 L/min	扫 描 模 式 : 多反应监测 (MRM)
碰 撞 气 : 氩气 (230 kPa)	MRM 参 数 : 见表 2

表 2 MRM 参数

No	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE (V)	Q3 Pre Bais(V)
1	庆大霉素 C1a	26098-04-4	450.3	322.4*	-17.0	-14.0	-16.0
				160.2	-17.0	-23.0	-30.0
2	庆大霉素 C2+C2a	287916-51-2	464.4	160.0	-11.0	-21.0	-10.0
				322.2*	-17.0	-14.0	-23.0
3	庆大霉素 C1	25876-10-2	478.4	322.1*	-14.0	-15.0	-22.0
				160.1	-11.0	-21.0	-30.0
4	新霉素 B	1405-10-3	615.3	161.2*	-22.0	-29.0	-16.0
				293.1	-20.0	-22.0	-20.0
5	双氢链霉素	5490-27-7	584.3	262.9*	-22.0	-31.0	-12.0
				246.2	-22.0	-38.0	-16.0
6	大观霉素	22189-32-8	351.2	333.2*	-14.0	-20.0	-23.0
				207.1	-13.0	-24.0	-14.0
7	链霉素	3810-74-0	582.3	263.1*	-22.0	-33.0	-17.0
				246.1	-20.0	-39.0	-11.0
8	妥布霉素	32986-56-4	468.3	324.2*	-17.0	-17.0	-22.0
				163.2	-17.0	-23.0	-17.0
9	潮霉素 B	31282-04-9	528.3	177.2*	-20.0	-27.0	-12.0
				352.1	-20.0	-25.0	-25.0

10	卡那霉素	25389-94-0	485.3	163.1*	-12.0	-25.0	-16.0
				324.2	-17.0	-17.0	-15.0
11	安普霉素	37321-09-8	540.4	217.2*	-20.0	-27.0	-23.0
				378.2	-20.0	-18.0	-18.0

* 表示定量离子

■ 样品前处理方法和标准溶液配制

2.1 样品前处理

提取：称取试料 5 g（精确至 ± 0.05 g）于 50 mL 离心管中，加 10 mL 磷酸盐缓冲液（含 5% 三氯乙酸和 0.4 mM 乙二胺四乙酸二钠），涡旋振荡 1 min，超声 5 min，于 4°C 下 8000 r/min 离心 10 min，取上清液于另一塑料刻度离心管中，残渣加 5 mL 磷酸盐缓冲液重复提取一次，合并上清液，用磷酸盐缓冲液定容至 20 mL，备用。

净化：依次用甲醇、水各 5 mL 分别活化 MCX SPE 柱（200 mg/6 mL）、WCX SPE 柱（150 mg/3 mL）。备用液分成两等份，一份过 MCX SPE 柱，再依次用超纯水、甲醇各 7.5 mL 淋洗抽干，5 mL 氨水甲醇溶液洗脱，用于分析新霉素、卡那霉素、安普霉素、大观霉素、潮霉素和妥布霉素。另一份用氢氧化钠溶液调节 pH 为 7.5，过 WCX SPE 柱，用 7.5 mL 水淋洗抽干，用 5 mL 乙酸甲醇溶液洗脱，用于分析链霉素、双氢链霉素和庆大霉素。两部分洗脱液分别于 40°C 下氮吹至近干，用 2 mL 0.3% 乙酸水 -HFBA 溶液（99:1）复溶，经 0.22 μ m 滤膜过滤后放入塑料进样瓶中，供 LC-MS/MS 测定。

2.2 基质匹配标准溶液配制

混合标准工作液：精密量取 11 种氨基糖苷类药物储备液（100 μ g/mL）各 0.5 mL 于 10 mL 塑料容量瓶中，用 0.3% 乙酸水溶液定容至刻度，配制成浓度为 5 μ g/mL 的混合标准工作液。

精密量取混合标准工作液适量，分别加入经提取和净化的蜂蜜空白试料残渣中，40°C 水浴吹干，加入 2 mL 0.3% 乙酸水 -HFBA 溶液（99:1）涡旋溶解残余物，配制成浓度为 5、10、50、100、200 和 500 μ g/L 的基质匹配系列混合标准溶液，经 0.22 μ m 滤膜过滤后 LC-MS/MS 测定。

■ 结果与讨论

3.1 标准样品色谱图

试样加入空白试样残渣后吹干，加入离子对试剂复溶，流动相仅为反相常见的缓冲液 - 乙腈体系，无需在其中添加离子对试剂和高浓度的缓冲盐，在 C18 柱上保留较强，色谱峰分离良好，灵敏度高、通道无干扰（见下图 1）。

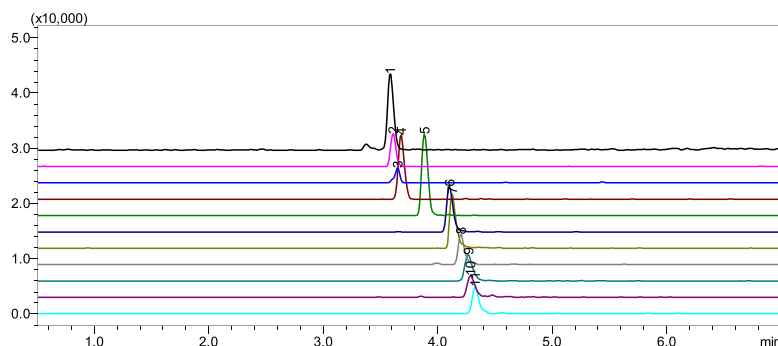


图 1 5 μ g/L 氨基糖苷类药物 MRM 色谱图

(1、大观霉素；2、潮霉素 B；3、链霉素；4、双氢链霉素；5、卡那霉素 A；6、安普霉素；7、妥布霉素；8、庆大霉素 C1a；9、庆大霉素 C2+C2a；10、新霉素 B；11、庆大霉素 C1)

3.2 校准曲线和检出限

按照 2.2 方法配制基质匹配标准系列溶液，上机分析，以待测物特征离子峰面积为纵坐标，相应的基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。根据最低点标样数据，以 3 倍信噪比计算氨基糖苷类药物的仪器检出限，其结果如表 3 所示。

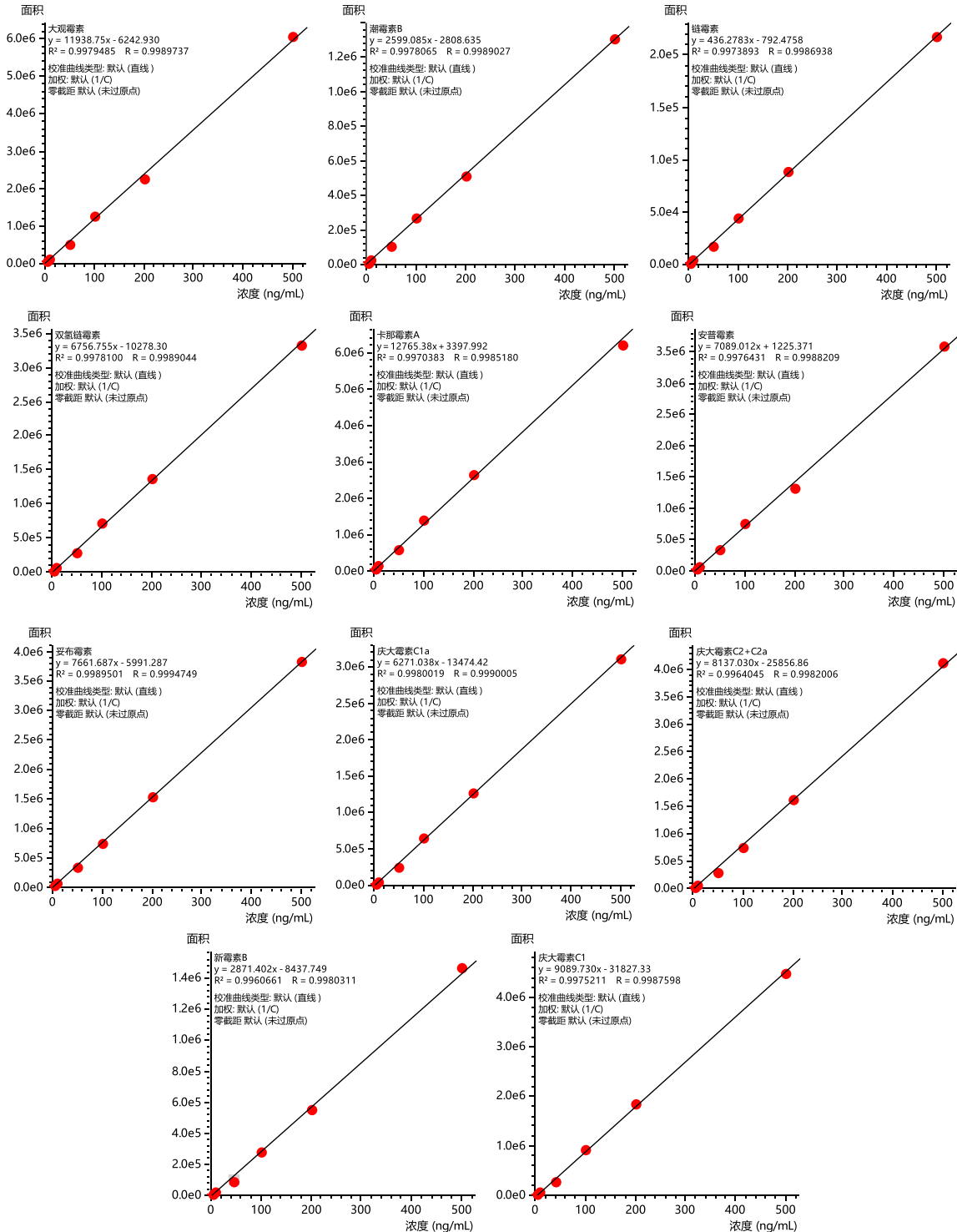


图 2 氨基糖苷类药物校准曲线

表 3 氨基糖苷类药物校准曲线及检出限

No	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	大观霉素	$Y = (11938.8)X + (-6242.93)$	0.9990	89.0~111.3	0.35	1.06
2	潮霉素 B	$Y = (2599.09)X + (-2808.64)$	0.9990	79.7~118.1	0.07	0.22
3	链霉素	$Y = (436.278)X + (-792.476)$	0.9987	75.9~114.7	0.90	2.74
4	双氢链霉素	$Y = (6756.75)X + (-10278.3)$	0.9989	86.8~119.1	0.14	0.44
5	卡那霉素 A	$Y = (12765.4)X + (3397.99)$	0.9985	82.9~115.7	0.05	0.15
6	安普霉素	$Y = (7089.01)X + (1225.37)$	0.9988	87.5~114.0	0.04	0.12
7	妥布霉素	$Y = (7661.69)X + (-5991.29)$	0.9995	83.3~121.3	0.06	0.20
8	庆大霉素 C1a	$Y = (6271.04)X + (-13474.4)$	0.9990	83.1~107.4	0.20	0.61
9	庆大霉素 C2+C2a	$Y = (8137.03)X + (-25856.9)$	0.9982	76.3~119.6	0.15	0.46
10	新霉素 B	$Y = (2871.40)X + (-8437.75)$	0.9980	77.6~121.4	0.55	1.68
11	庆大霉素 C1	$Y = (9089.73)X + (-31827.3)$	0.9988	81.6~115.6	0.09	0.28

3.3 重复性实验

浓度为 5、50 和 500 $\mu\text{g/L}$ 的基质标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度。不同浓度样品中待测物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.09%~0.47% 和 1.13%~11.75% 之间，仪器精密度良好。

表 4 氨基糖苷类药物保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No	化合物	RSD% (5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (500 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	大观霉素	0.37	2.38	0.11	6.24	0.11	2.19
2	潮霉素 B	0.37	5.45	0.11	8.63	0.11	3.07
3	链霉素	0.35	9.73	0.13	7.95	0.11	3.10
4	双氢链霉素	0.40	6.10	0.13	1.66	0.12	2.65
5	卡那霉素 A	0.40	3.91	0.12	2.28	0.12	1.55
6	安普霉素	0.39	5.82	0.11	2.21	0.12	1.42
7	妥布霉素	0.39	4.64	0.12	4.36	0.12	3.32
8	庆大霉素 C1a	0.34	7.83	0.13	3.39	0.12	1.13
9	庆大霉素 C2+C2a	0.46	5.20	0.09	3.22	0.13	1.99
10	新霉素 B	0.40	11.75	0.12	5.17	0.12	1.94
11	庆大霉素 C1	0.47	5.43	0.12	6.64	0.12	1.30

3.4 加标回收率

取未检出氨基糖苷药物的蜂蜜 5 g，加入混标工作液，使浓度分别为 25 和 50 $\mu\text{g/kg}$ ，样品经提取及净化后，按照 1.2 中的分析条件测定 11 种氨基糖苷药物的加标回收率，平行测定 3 次，其回收率在 68.5~93.4% 之间，具体结果见表 5。

表 5 氨基糖苷类药物回收率结果 (n=3)

No.	化合物	加标浓度 25 µg/kg		加标浓度 50 µg/kg	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	大观霉素	88.4	3.59	93.4	2.90
2	潮霉素 B	83.7	4.91	86.8	3.74
3	链霉素	78.4	7.22	77.9	6.75
4	双氢链霉素	74.8	6.48	74.1	7.54
5	卡那霉素 A	77.8	3.92	83.0	3.54
6	安普霉素	74.4	7.34	79.4	4.12
7	妥布霉素	79.6	7.38	85.7	8.23
8	庆大霉素 C1a	69.3	5.66	68.9	3.22
9	庆大霉素 C2+C2a	76.2	7.59	80.1	8.13
10	新霉素 B	70.4	9.47	68.9	6.50
11	庆大霉素 C1	68.5	8.34	73.6	5.29

■ 结论

依据食品安全国家标准《蜂产品中氨基糖苷类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》征求意见稿建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定蜂蜜中氨基糖苷类药物残留的方法。11 种药物在 5 µg/L~500 µg/L 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.998 以上。加标浓度为 25 和 50 µg/kg 的样品，回收率在 68.5~93.4% 之间。该方法无需在流动相中使用离子对试剂和高浓度盐溶液，分析时间短，灵敏度高、结果准确，可用于蜂产品中氨基糖苷类药物残留量的准确检测。

岛津应用云

