

Application News

No. C175

LC/MS

快速定量分析肉类、蛋和牛奶中的氨基糖苷类抗生素残留，并用 MRM 扫描模式进行化合物确认

氨基糖苷类抗生素 (AG) 属于抗生素产品，广泛用于治疗牛、羊、猪和家禽的细菌感染。它们具有广谱活性，可用于抑制革兰氏阳性和革兰氏阴性菌。

AG 具有耳毒性和肾毒性，但由于价格低，并没有妨碍它在兽医应用中的广泛使用。

AG 对组织具有高度的亲和力，如果没有遵守停药期或使用不当，它们可能会出现在肉类、牛奶或蛋中。因此，吃含氨基糖苷类抗生素的食物对人体健康有潜在危害。

监管机构已为这些兽用化合物设定了最大残留限量 (MRL)。

氨基糖苷类抗生素属于极性很强的化合物，难以通过反相液相色谱保留。

选择离子对试剂并不理想，因为其容易污染分析系统并干扰其它方法。

对此，已开发出一种方法包来克服这些难题。其中包括从各种产品中制得纯净提取物的方法，以及使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 结合三重四极杆质谱检测的快速定量方法。必要时，在无需更换试剂的情况下，可以使用另外一种方法 MRM 扫描模式进行正式峰鉴定。

本文中，我们报告了使用该方法包来评估多种肉类样品和牛奶的安全水平。

Mikaël Levi, 日本京都市岛津制作所。

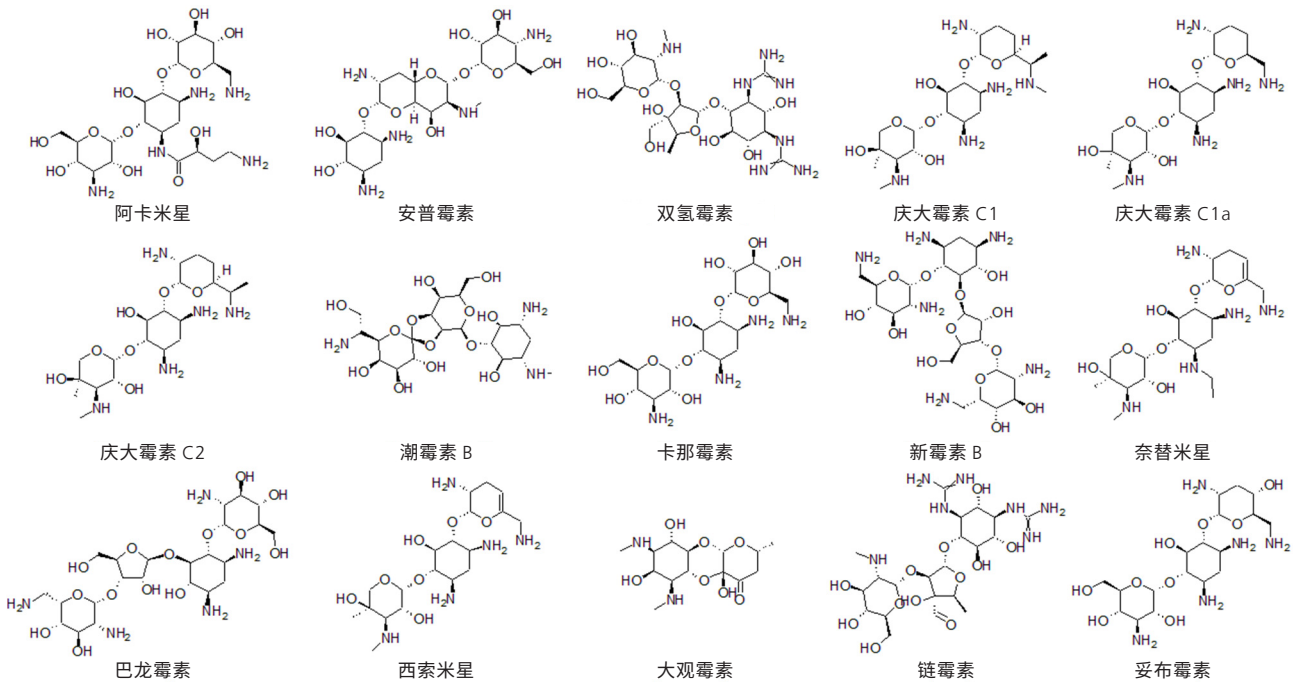


图 1. 本文涉及的氨基糖苷类抗生素

■ 样品制备

肉类样品（神户牛肉、鸡胸肉和鸡肝、猪排）和牛奶均从当地超市购买。研磨后，依据方法包中的说明处理 5 g 样品。简而言之，添加内标物（核糖霉素）后，用酸性缓冲液分两次提取化合物。然后，利用弱阳离子交换作用纯化提取物，并在进样前稀释 5 倍（5 μL ）。另外，按日本厚生劳动省规定的 0.5 倍和 1.5 倍 MRL（最大残留限量）加标各个样品。

除了 0.5 倍 MRL 加标水平的牛肉样品制备 6 次以外，所有样品均制备一次。

■ LC-MS/MS 分析

使用方法包中的 LC-MS/MS 条件和即用型方法测定纯化的提取物。使用流动相溶解的校准曲线定量样品。

首先，使用快速定量法来测定样品。该方法在 HILiC 条件下用乙腈和甲酸盐缓冲液对化合物进行梯度洗脱。分析的周期时间为 4.5 分钟。在多反应监测（MRM）模式下进行检测，每个化合物采集 2 个离子对。

对阳性样品（即，超过 MRL）的纯化提取物进行二次进样，从而评估峰的同源性。为此，采用了第二种方法，该方法具有相同的色谱柱和流动相，但梯度有所不同，且每种化合物（ISTD 除外）选择 15 个 MRM 离子对。

分析系统为 Nexera™ X2 UHPLC 与 LCMS-8060 三重四极杆质谱仪的联用系统。用 LabSolutions Insight™ v.3.1 在筛选选项下进行数据处理。

■ 结果

MRL 视种类和产品而有所不同。根据日本现行规定，如果没有对兽药残留的 MRL 做出正式规定，则对于任何被测化学物质，均应考虑将‘默认’MRL 设为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。将安普霉素、二氢链霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素、大观霉素和链霉素的校准曲线范围设为涵盖最低 MRL 的 10% 到最高 MRL 的 150%。将没有正式规定 MRL 的其它化合物的校准范围设为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 20% 至 150%。表 1 中列出了校准曲线浓度值。评估了在该范围内定期使用的七个校准级别。选择准确度范围介于 85 - 115% 的校准标准品。图 2 列出了代表性校准曲线。

未加标的样品显示不含氨基糖苷类抗生素残留物。然后，使用计算的浓度计算加标样品的回收率。表 2 中列出了计算结果。所有化合物和所有类型样品的回收率均在 70 - 120% 的可接受范围内。利用 0.5 \times MRL 水平加标的牛肉样品评估重复性。结果见表 3。%RSD 小于 20%，说明适合此类应用。

图 3 显示了质谱图示例。

表 1. 所选样品在日本的最大残留限量和相应校准曲线范围

| | 校准曲线范围 | | | | | |
|-----------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | 低 MRL ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 高 MRL ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | LLOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | LLOQ (ng/mL) | ULOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | ULOQ (ng/mL) |
| 阿卡米星 | 无值 | 默认值 (10) | 2 | 0.1 | 15 | 0.75 |
| 安普霉素 | 60 | 500 | 6 | 0.3 | 750 | 37.5 |
| 二氢链霉素 | 200 | 600 | 20 | 1.0 | 900 | 45.0 |
| 庆大霉素 (总和) | 100 | 200 | 10 | 0.5 | 300 | 15.0 |
| 潮霉素 | 无 MRL | 默认值 (10) | 2 | 0.1 | 15 | 0.75 |
| 卡那霉素 | 40 | 500 | 4 | 0.2 | 750 | 37.5 |
| 新霉素 | 500 | 500 | 50 | 2.5 | 750 | 37.5 |
| 奈替米星 | 无 MRL | 默认值 (10) | 2 | 0.1 | 15 | 0.75 |
| 巴龙霉素 | 无 MRL | 默认值 (10) | 2 | 0.1 | 15 | 0.75 |
| 西索米星 | 无 MRL | 默认值 (10) | 2 | 0.1 | 15 | 0.75 |
| 大观霉素 | 200 | 2000 | 20 | 1.0 | 3000 | 150.0 |
| 链霉素 | 200 | 600 | 20 | 1.0 | 900 | 45.0 |
| 妥布霉素 | 无 MRL | 默认值 (10) | 2 | 0.1 | 15 | 0.75 |

表 2. 加标样品中的计算回收率

| | | AMI | APRA | DHSTP | GENT C1a | GENT C1 | GENT C2/C2a | HYGRO | KANA |
|--------------------|-----|-------|-------|-------|----------|---------|-------------|-------|-------|
| 0.5 x MRL 时的回收率 | 牛奶 | 91.9% | 88.7% | 108% | 76.6% | 89.4% | 83.3% | 94.3% | 100% |
| | 牛肉 | 107% | 89.0% | 117% | 90.4% | 94.2% | 95.2% | 107% | 102% |
| | 猪肉 | 88.3% | 98.9% | 114% | 80.4% | 86.3% | 87.6% | 96.5% | 88.7% |
| | 鸡胸肉 | 82.2% | 90.3% | 97.4% | 98.7% | 92.4% | 90.3% | 105% | 94.8% |
| | 鸡肝 | 70.9% | 91.5% | 103% | 91.3% | 80.8% | 86.1% | 99.4% | 101% |
| 1.5 x MRL 时的回收率 | 牛奶 | 83.0% | 99.0% | 106% | 85.8% | 91.0% | 101% | 91.8% | 98.1% |
| | 牛肉 | 89.9% | 95.9% | 96.9% | 98.8% | 91.2% | 95.5% | 104% | 96.1% |
| | 猪肉 | 86.3% | 89.5% | 98.5% | 95.1% | 102% | 96.9% | 112% | 97.2% |
| | 鸡胸肉 | 82.2% | 90.3% | 97.4% | 98.7% | 92.4% | 90.3% | 105% | 94.8% |
| | 鸡肝 | 87.8% | 90.7% | 90.7% | 99.5% | 85.5% | 88.8% | 91.6% | 83.8% |
| | | NEO | NETIL | PARO | SISO | SPC | STP | TOB | |
| 0.5 x MRL 时的回收率 | 牛奶 | 81.2% | 101% | 73.3% | 75.3% | 94.0% | 111% | 91.0% | |
| | 牛肉 | 91.4% | 101% | 88.1% | 88.4% | 110% | 114% | 91.5% | |
| | 猪肉 | 85.7% | 91.0% | 90.7% | 76.4% | 101% | 111% | 85.8% | |
| | 鸡胸肉 | 94.1% | 90.5% | 78.4% | 84.9% | 92.7% | 102% | 107% | |
| | 鸡肝 | 78.6% | 90.8% | 76.5% | 78.8% | 101% | 108% | 92.5% | |
| 1.5 x MRL 时的回收率 | 牛奶 | 96.7% | 93.6% | 86.9% | 99.4% | 94.8% | 105% | 102% | |
| | 牛肉 | 113% | 91.1% | 103% | 106% | 86.9% | 93.1% | 105% | |
| | 猪肉 | 106% | 90.4% | 94.8% | 94.3% | 95.2% | 105% | 108% | |
| | 鸡胸肉 | 94.1% | 90.5% | 78.4% | 84.9% | 92.7% | 102% | 107% | |
| | 鸡肝 | 109% | 82.4% | 89.5% | 95.3% | 75.3% | 90.0% | 98.1% | |

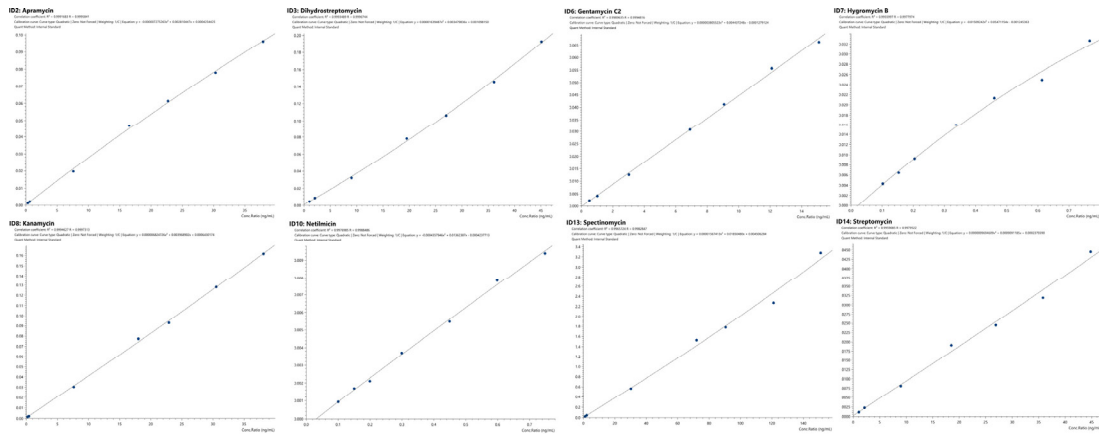


图 2. 代表性校准曲线

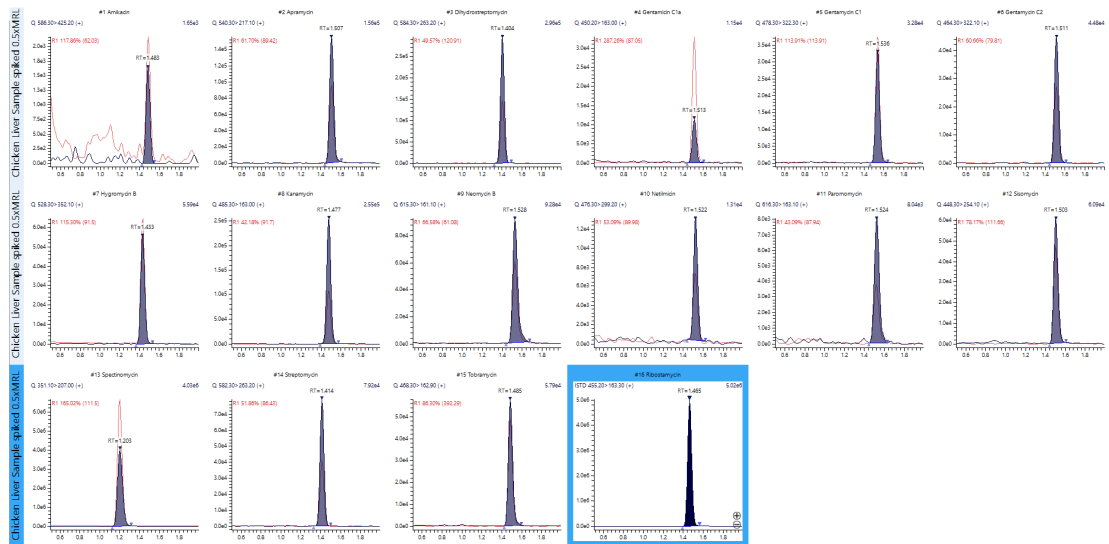


图 3. 针对每种化合物以 50% MRL 加标的鸡肝样品

表 3. 0.5× MRL 牛肉样品的重复性

| | AMI | APRA | DHSTP | GENT C1a | GENT C1 | GENT C2/C2a | HYGRO | KANA |
|---------------|-------|-------|-------|----------|---------|-------------|-------|-------|
| 浓度平均值 (µg/kg) | 5.38 | 225 | 350 | 45.6 | 47.5 | 48.0 | 5.32 | 21.1 |
| 回收率 | 107% | 89.0% | 117% | 90.4% | 94.2% | 95.2% | 107% | 102% |
| %RSD | 19.9% | 7.7% | 10.0% | 10.8% | 10.2% | 6.9% | 7.1% | 12.0% |

| | NEO | NETIL | PARO | SISO | SPC | STP | TOB |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 浓度平均值 (µg/kg) | 228 | 5.03 | 4.39 | 4.47 | 275 | 348 | 4.66 |
| 回收率 | 91.4% | 101% | 88.1% | 88.4% | 110% | 114% | 91.5% |
| %RSD | 8.8% | 10.0% | 8.1% | 4.4% | 11.0% | 11.9% | 6.2% |

■ 结果 (续)

为了增加超过 MRL 的化合物鉴定的精准度, 可以将提取物再次进样, 使用另外一种方法进行分析, 延长梯度时间, 并针对每种化合物选择 15 个 MRM 离子对。然后, 合并 MRM 信号以生成在最佳碰撞能量下的 MRM 扫描谱。

下面显示了 LabSolutions Insight 在筛选选项下搜索结果的示例 (图 4)。可以在批表模式下自动完成样品处理和谱库检索。在此情况下, 可以获得较高的鉴定分数。二氢链霉素得分为 95, 而第二条筛选结果中的化合物 (链霉素, 结构非常相似的化合物) 得分仅为 51。

■ 结论

新开发的方法包成功用于真实肉类和牛奶样品的鉴定。即使对于痕量水平下的非监管化合物, 定量方法也获得了较高的回收率和准确度, 无需使用对应的基质标曲即可将其用于各种不用的样品。

利用 MRM 扫描模式的补充方法提高了超限化合物鉴定的精准度。

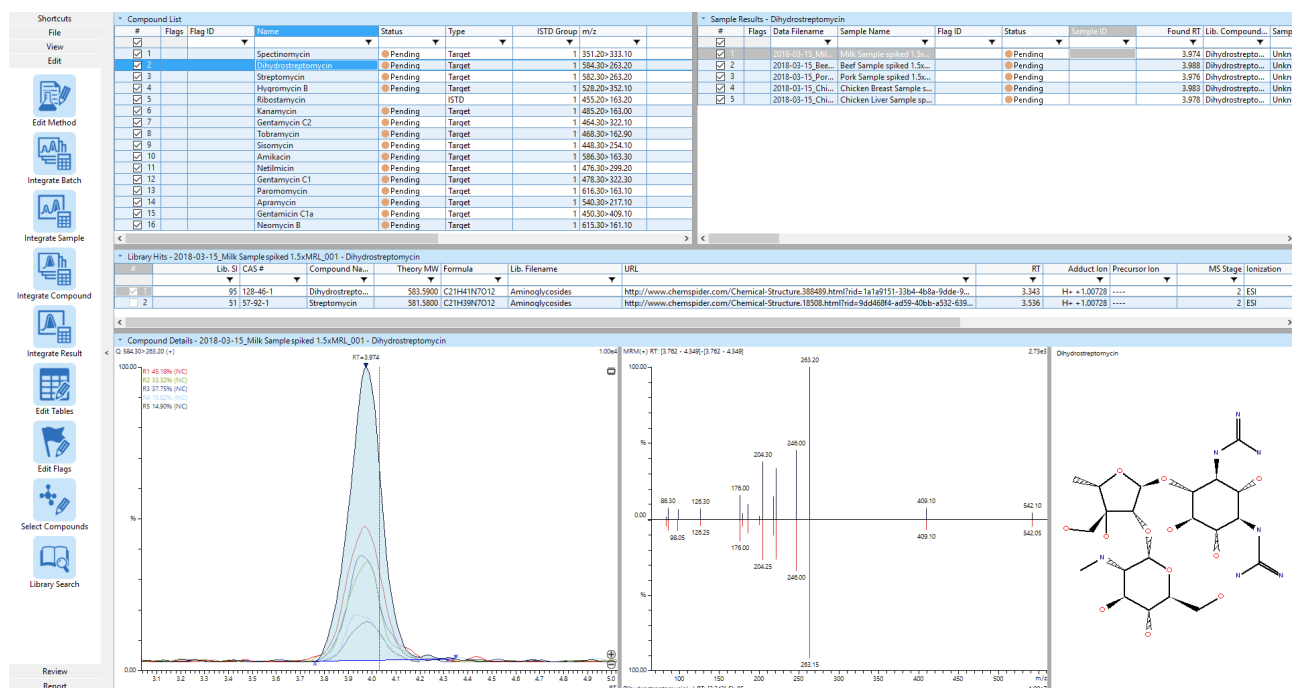


图 4. 1.5×MRL 加标牛奶样品中二氢链霉素 MRM 扫描的质谱检索结果

岛津应用云

LCMS 及 Nexera 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家所使用的商标。
Traverse MS 是 Life Fix 株式会社的商标。



岛津企业管理 (中国) 有限公司
岛津 (香港) 有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2018 年 5 月