

亲水相互作用液相色谱—三重四极杆质谱联用法测定动物组织中氨基糖苷类抗生素药物残留量

LCMSMS-163

摘要：本文建立了使用亲水相互作用液相色谱和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定动物组织中 10 种氨基糖苷类抗生素药物残留量的方法。仪器重复性良好，不同浓度基质匹配混合标准溶液重复进样 6 次，保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02~0.19 % 和 0.87~4.13 % 之间。10 种氨基糖苷类抗生素基质匹配标准曲线线性关系良好，相关系数大于 0.998，壮观霉素定量限 14.2 $\mu\text{g/L}$ ，新霉素定量限 7.28 $\mu\text{g/L}$ ，其他定量限在 0.96~1.76 $\mu\text{g/L}$ 之间。鸡肉样品经前处理后获得的空白基质加标，回收率在 88.6 %~119 % 之间。

关键词：氨基糖苷类抗生素亲水相互作用色谱三重四极杆质谱仪

氨基糖苷类抗生素 (Aminoglycosides)，是一种由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗生素药物。对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌都具有显著的抗菌效果，可以有效抑制细菌的生长和繁殖，也常被添加到饲料中促进动物生长发育，是目前我国畜牧业中常用兽药。该类药物具有耳毒性和肾毒性等毒副作用，人类长期食用残留超标的畜产品将直接造成伤害。

为了保障食品安全，2002 年我国农业部在《动物组织中兽药残留最高限量》中规定庆大霉素、壮观霉素、链霉素、二氢链霉素和潮霉素在动物肌肉中的最高残留

限量分别为 100、500、600、600 $\mu\text{g/kg}$ 及不得检出，安普霉素在猪肾脏中的最高残留限量为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。

氨基糖苷类抗生素是一类强极性的碱性化合物，目前这类抗生素痕量残留的同时检测通常采用反相离子对色谱—串联质谱法。但是所用的离子对试剂七氟丁酸会造成离子抑制，污染质谱。

本文建立了无需离子对试剂，使用 HILIC 柱分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 测定动物组织中 10 种氨基糖苷类抗生素药物残留量的方法。供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.60SP2 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：ZICHLIC(4.6 mmI.D. \times 150 mmL., 3.5 μm)

流动相 A：175 mmol/L 甲酸铵 (pH=4.5)

流动相 B：乙腈 (0.3 % 甲酸)

流速：0.5 mL/min

进样体积：20 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 60 %

清洗液：80 % 乙腈水溶液

表 1 梯度时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
10.00	Pumps	Pump B Conc.	15
20.00	Pumps	Pump B Conc.	15
20.10	Pumps	Pump B Conc.	60
30.00	Controller	Stop	

质谱条件
 分析仪器: LCMS-8050
 离子源: ESI, 正离子扫描
 离子源接口电压: 4.5 kV
 雾化气及干燥气: 氮气 3.0 L/min、10 L/min
 源温: 350°C
 加热气: 10 L/min

碰撞气: 氩气
 脱溶剂管温度: 150°C
 加热模块温度: 400°C
 扫描模式: 多反应监测 (MRM)
 驻留时间: 80 ms
 MRM 参数: 见表 2

表2 MRM 参数

No.	中文名称	英文名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
1	壮观霉素	Spectinomycin	1695-77-8	333.2	98.0*	-23	-26	-18
					140.2	-23	-23	-26
2	二氢链霉素	Dihydrostreptomycin	128-46-1	584.3	263.1*	-40	-30	-19
					246.1	-40	-35	-27
3	潮霉素	Hygromycin	31282-04-9	528.2	177.1*	-36	-26	-17
					352.0	-36	-24	-25
4	链霉素	Streptomycin	3810-74-0	582.3	263.1*	-20	-31	-28
					246.0	-20	-41	-16
5	丁胺卡那霉素	Amikacin	37517-28-5	586.3	163.1*	-40	-30	-29
					425.1	-40	-20	-20
6	卡那霉素	Kanamycin	70560-51-9	485.2	163.1*	-17	-23	-17
					324.0	-17	-16	-22
7	安普霉素	Apramycin	37321-09-8	540.2	216.9*	-38	-25	-24
					378.0	-38	-17	-27
8	妥布霉素	Tobramycin	32986-56-4	468.3	163.1*	-16	-21	-17
					324.1	-16	-15	-16
9	庆大霉素	Gentamycin	1403-66-3	478.3	322.2*	-17	-14	-22
					157.1	-17	-25	-29
10	新霉素	Neomycin	1404-04-2	615.3	161.0*	-22	-31	-27
					163.0	-22	-36	-16

*表示定量离子

1.3 样品前处理方法

称取试料 (3±0.02) g, 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 提取液 (10 mM 乙酸铵 +0.4 mM EDTA+1 % 氯化钠 +2 % 三氯乙酸), 涡旋混合 30 s, 振荡混合 10 min, 10000 r/min 离心 10 min。上清液用氢氧化钠 (20 %) 或盐酸 (1 M) 水溶液调 pH 至 6.5。10000r/min 离心 10 min 后备用。

取 WCX 柱依次用甲醇 3 mL 和水 3 mL 活化, 取备用液过柱, 用 3 mL 水淋洗, 抽干, 加 175 mM 甲酸铵 (pH=3) 3 mL 洗脱, 收集洗脱液, 涡旋混匀, 0.22 μm 滤膜过滤, 待测。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

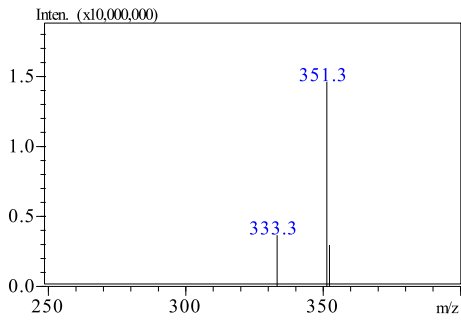


图1 壮观霉素一级质谱图

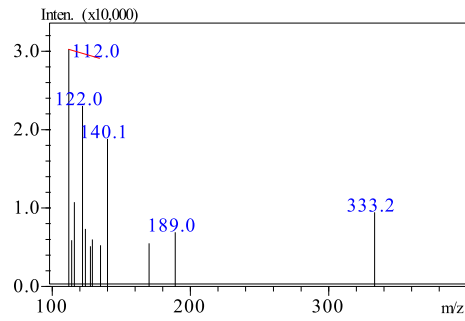


图2 壮观霉素产物离子扫描质谱图(CE: -30V)

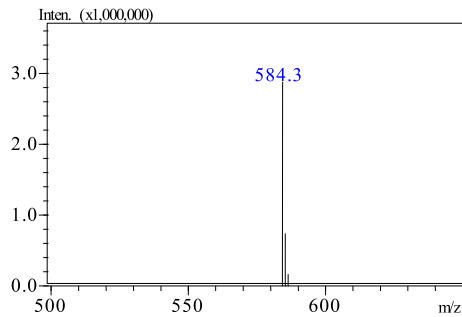


图3 二氢链霉素一级质谱图

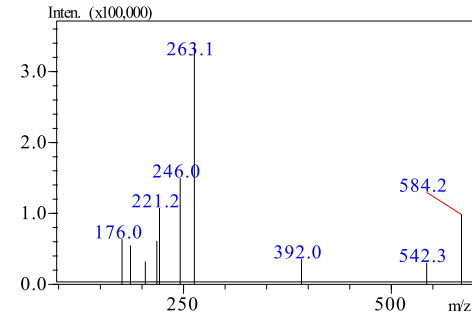


图4 二氢链霉素产物离子扫描质谱图(CE: -32V)

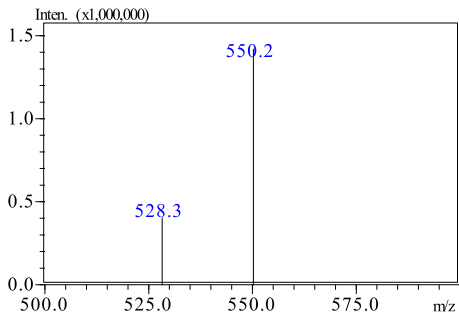


图5 潮霉素一级质谱图

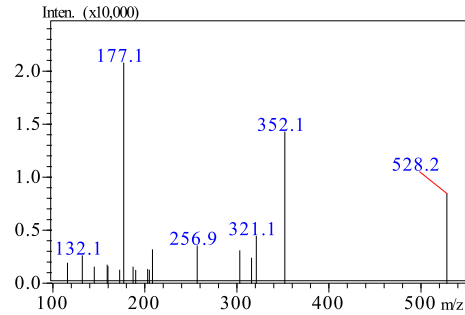


图6 潮霉素产物离子扫描质谱图(CE: -28V)

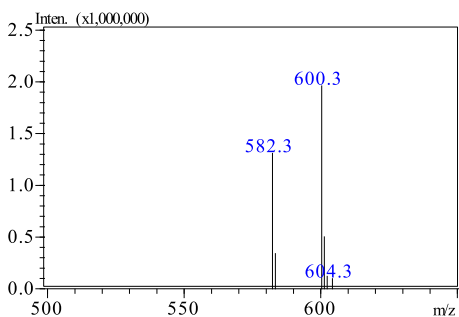


图7 链霉素一级质谱图

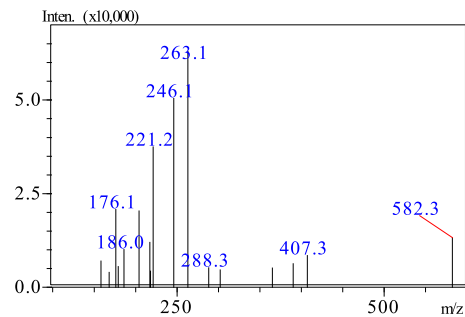


图8 链霉素产物离子扫描质谱图(CE: -35V)

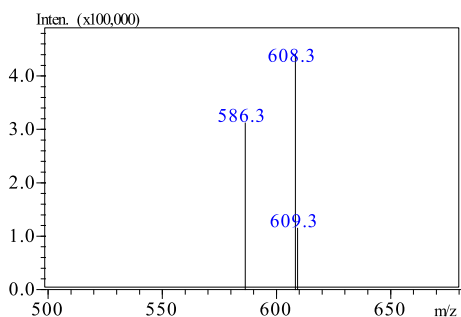


图9 丁胺卡那霉素一级质谱图

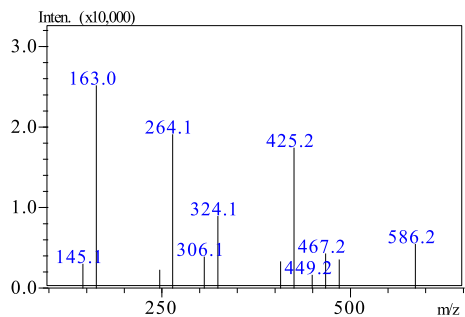


图10 丁胺卡那霉素产物离子扫描质谱图(CE: -22V)

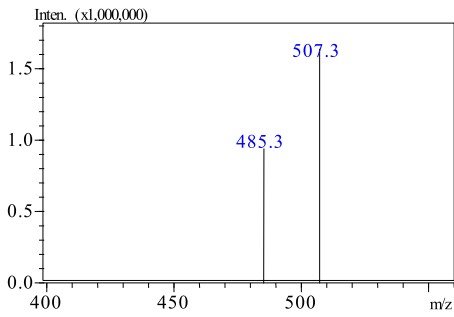


图11 卡那霉素一级质谱图

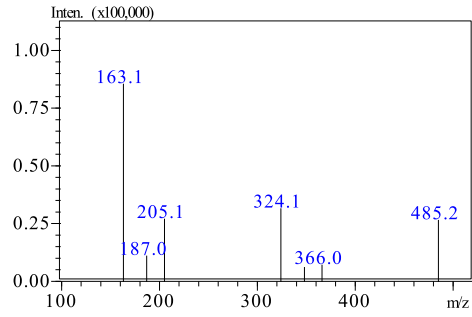


图12 卡那霉素产物离子扫描质谱图(CE: -20V)

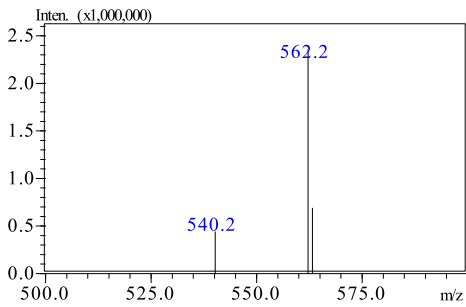


图13 安普霉素一级质谱图

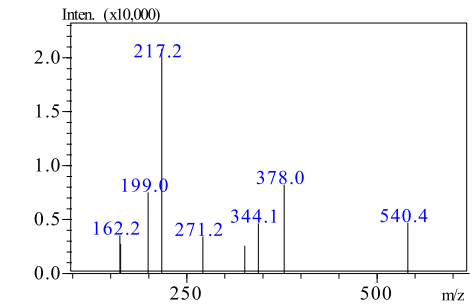


图14 安普霉素产物离子扫描质谱图(CE: -23V)

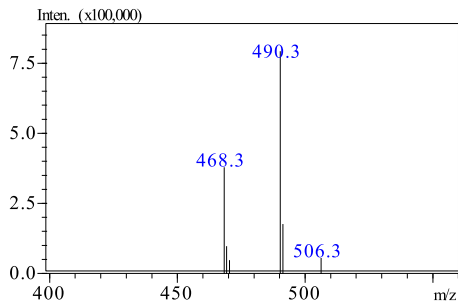


图15 妥布霉素一级质谱图

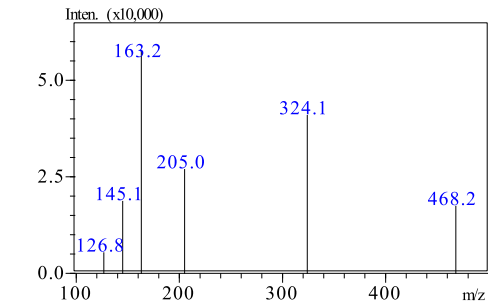


图16 妥布霉素产物离子扫描质谱图(CE: -18V)

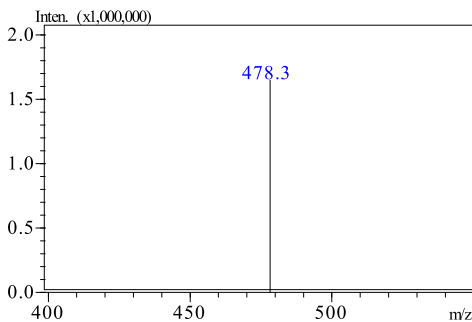


图17 庆大霉素一级质谱图

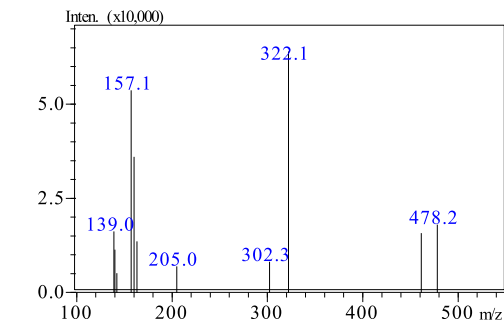


图18 庆大霉素产物离子扫描质谱图(CE: -18V)

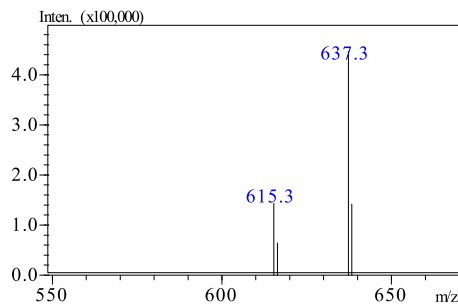


图19 链霉素一级质谱图

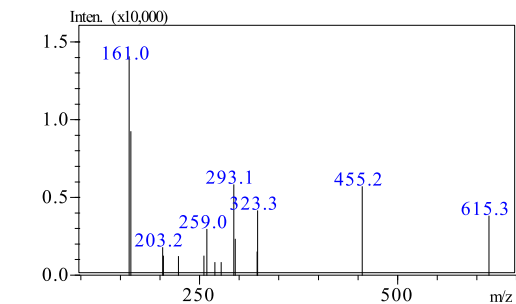


图20 链霉素产物离子扫描质谱图(CE: -25V)

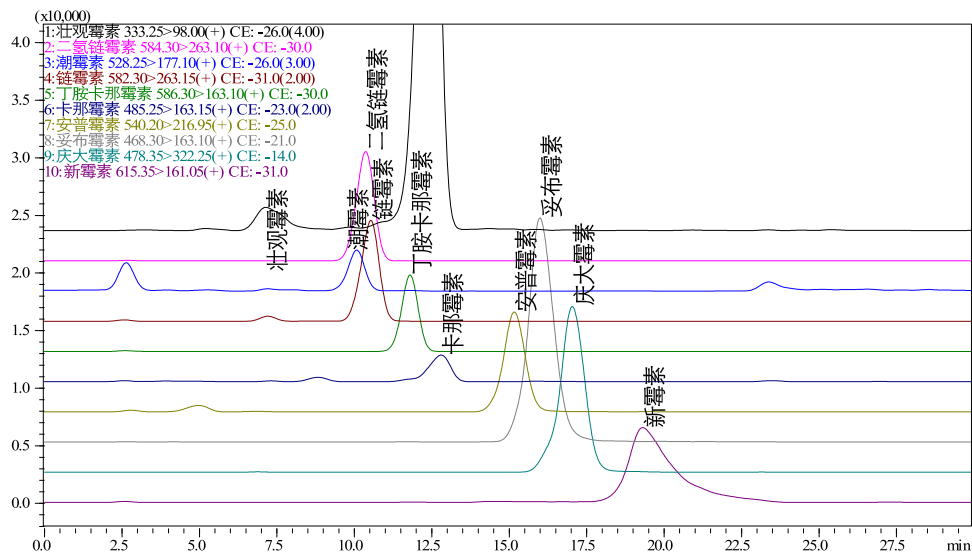


图21 20 μg/L 10种氨基糖苷类抗生素标准品色谱图

2.3 基质匹配标准曲线线性关系

按照 1.3 处理 4 个空白鸡肉样品，净化液混合均匀后备用。用 10 % 甲醇水溶液分别配制 1mg/mL 的 10 种氨基糖苷类抗生素标准溶液，再用上述净化液逐级稀释成浓度分别为 2, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 和 2000 μg/L 的系列混合标准溶液，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标制作基质匹配外标标准曲线。标准曲线见图 22~ 图 31。线性方程、相关系数见表 3。以线性范围最低点浓度重复进样，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 MDL=3.14×S，定量限 LOQ=4×MDL，测定结果如表 3 所示。

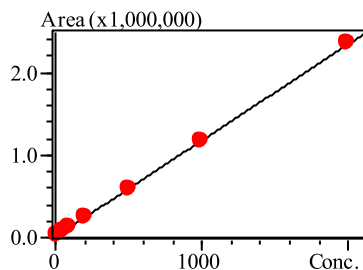


图22 壮观霉素标准曲线

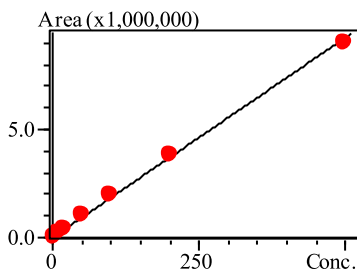


图23 二氢链霉素标准曲线

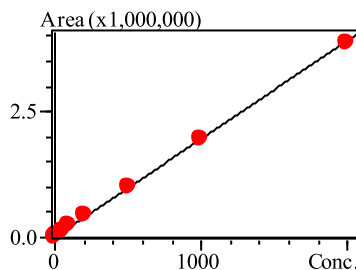


图24 潮霉素标准曲线

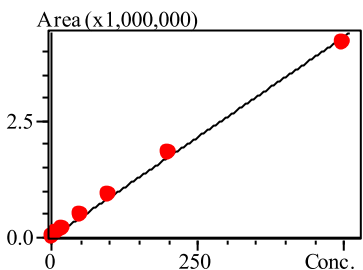


图25 链霉素标准曲线

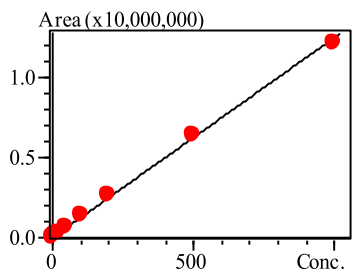


图26 丁胺卡那霉素标准曲线

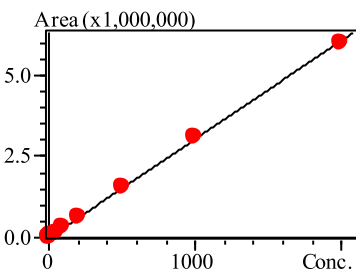


图27 卡那霉素标准曲线

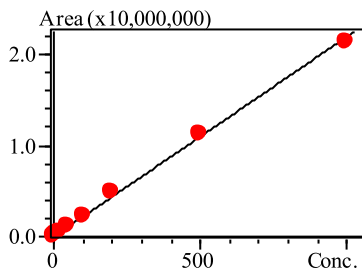


图 28 安普霉素标准曲线

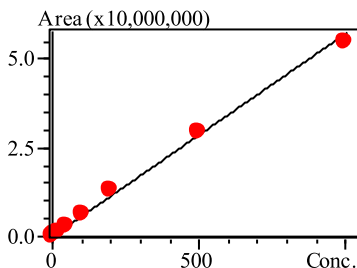


图 29 妥布霉素标准曲线

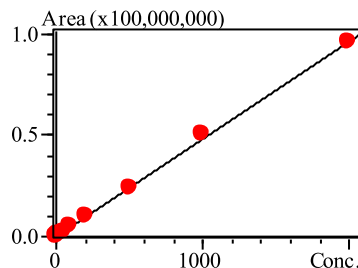


图 30 庆大霉素标准曲线

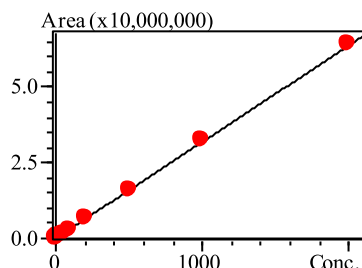


图 31 庆大霉素标准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 R	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	壮观霉素	$Y = (1168.9)X + (8792.2)$	20~2000	0.9999	3.55	14.2
2	二氢链霉素	$Y = (18509.7)X + (10398.6)$	2~500	0.9991	0.75	0.96
3	潮霉素	$Y = (1956.4)X + (6576.7)$	2~2000	0.9996	0.28	1.12
4	链霉素	$Y = (8621.0)X + (6362.3)$	2~500	0.9990	0.35	1.40
5	丁胺卡那霉素	$Y = (12507.6)X + (6557.5)$	2~1000	0.9992	0.38	1.52
6	卡那霉素	$Y = (3035.7)X - (127.8)$	2~2000	0.9997	0.28	1.12
7	安普霉素	$Y = (21964.7)X + (4021.0)$	2~1000	0.9990	0.42	1.68
8	妥布霉素	$Y = (57201.0)X + (53184.2)$	2~1000	0.9982	0.40	1.60
9	庆大霉素	$Y = (48237.2)X - (34801.5)$	2~2000	0.9994	0.44	1.76
10	新霉素	$Y = (32156.9)X - (92372.2)$	10~2000	0.9997	1.82	7.28

2.4 精密度实验

配制如表 4 所示三个浓度的混合标液，平行测试 6 次。8 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02 ~ 0.19 % 和 0.87 ~ 4.13 % 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

序号	样品名称	RSD% (10 µg/L)		RSD% (50 µg/L)		RSD% (200 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	壮观霉素	-	-	0.12	2.22	0.10	1.31
2	二氢链霉素	0.07	1.80	0.03	3.42	0.03	1.86
3	潮霉素	0.13	2.94	0.04	2.16	0.04	1.34
4	链霉素	0.05	0.98	0.03	4.13	0.03	2.24
5	丁胺卡那霉素	0.05	1.15	0.02	3.70	0.02	1.14
6	卡那霉素	0.19	2.40	0.06	1.76	0.07	0.87
7	安普霉素	0.06	1.23	0.03	3.44	0.02	1.38
8	妥布霉素	0.05	1.00	0.03	3.28	0.03	1.31
9	庆大霉素	0.08	1.46	0.02	3.21	0.02	1.68
10	新霉素	0.11	3.96	0.08	3.30	0.02	1.25

2.5 回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测鸡肉样品，检测到微量妥布霉素、庆大霉素和新霉素，浓度低于定量限。鸡肉样品的MRM色谱图见图32。在鸡肉样品按1.3中的方法处理后，获得的空白基质中标，壮观霉素加标量50 µg/kg，其他10 µg/kg。按1.2中的分析条件测定加标回收率。基质加标样品MRM色谱图如图33所示，加标结果见表5，加标回收率在88.6%~119%之间。

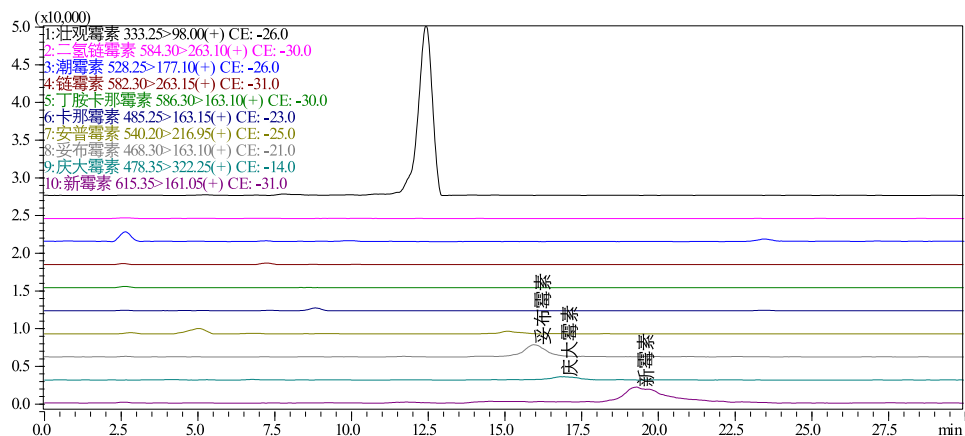


图32 鸡肉样品的MRM色谱图

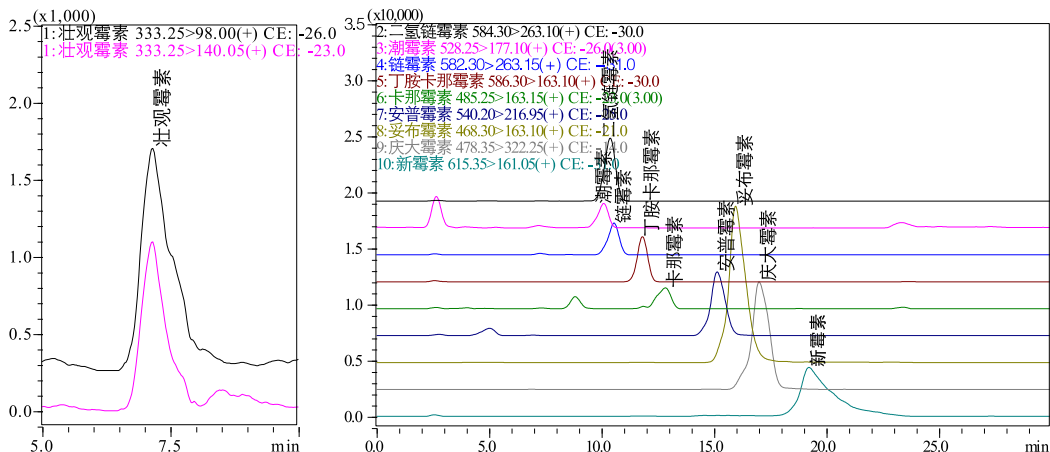


图33 鸡肉加标样品的MRM色谱图 (壮观霉素 50 µg/kg，其他 10 µg/kg)

表5 基质加标回收率结果

序号	名称	回收率/%
1	壮观霉素	88.6
2	二氢链霉素	102
3	潮霉素	94.9
4	链霉素	106
5	丁胺卡那霉素	97.9
6	卡那霉素	98.2
7	安普霉素	109
8	妥布霉素	119
9	庆大霉素	114
10	新霉素	118

■ 结论

本文建立了使用亲水相互作用色谱和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定动物组织中氨基糖苷类抗生素药物残留量的方法。仪器重复性良好，不同浓度基质匹配混合标准溶液重复进样 6 次，保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02~0.19 % 和 0.87~4.13 % 之间。10 种氨基糖苷类抗生素线性关系良好，相关系数大于 0.998；鸡肉样品经前处理后获得的空白基质加标，回收率在 88.6 %~119 % 之间。该方法可满足动物组织中氨基糖苷类抗生素药物残留量的检测。