

栾枫婷, 龚 兰, 朱 磊, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蛋和奶中氨基糖苷类药物残留[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 1033-1042.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.04.028

## 高效液相色谱-串联质谱法测定蛋和奶中氨基糖苷类药物残留

栾枫婷<sup>1,2</sup>, 龚 兰<sup>1,2</sup>, 朱 磊<sup>1,2</sup>, 陈 明<sup>1,2</sup>, 唐敏敏<sup>1,2</sup>, 邵雪梅<sup>1,2</sup>, 魏瑞成<sup>1,2</sup>, 王 冉<sup>1,2</sup>

(1.江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏 南京 210014; 2.江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 建立了高效液相色谱-串联质谱法测定蛋和奶中氨基糖苷类药物(双氢链霉素、卡那霉素 A、庆大霉素、链霉素、妥布霉素、潮霉素 B、大观霉素、阿米卡星、新霉素 B 和安普霉素)残留。用 5% 三氯乙酸水溶液提取目标物, 经 HLB 固相萃取柱净化, 高效液相色谱柱分离, 梯度洗脱, 外标法定量。结果表明, 10 种药物在各自范围内线性关系良好,  $R^2 > 0.99$ , 方法的检出限为 10.0~50.0  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 30.0~100.0  $\mu\text{g/kg}$ , 平均回收率为 62.3%~110.4%, 相对标准偏差为 1.0%~13.6%。该方法简便、准确、灵敏, 且扩大了检测范围, 适用于蛋和奶中氨基糖苷类药物的定量测定。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱; 固相萃取; 氨基糖苷类药物; 残留; 禽蛋; 奶

**中图分类号:** S859.84 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)04-1033-10

## Determination of aminoglycoside residues in eggs and milk by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LUAN Feng-ting<sup>1,2</sup>, GONG Lan<sup>1,2</sup>, ZHU Lei<sup>1,2</sup>, CHEN Ming<sup>1,2</sup>, TANG Min-min<sup>1,2</sup>, SHAO Xue-mei<sup>1,2</sup>, WEI Rui-cheng<sup>1,2</sup>, WANG Ran<sup>1,2</sup>

(1. Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Nanjing 210014, China; 2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** The high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was developed for the simultaneous determination of ten aminoglycosides (dihydrostreptomycin, kanamycin A, gentamycin, streptomycin, spectinomycin, tobramycin, hygromycin B, amikacin, neomycin B and apramycin) in milk and eggs. The samples were extracted with 5% trichloroacetic acid solution, followed by Oasis HLB solid phase extraction for further purification. The analytes were separated on a high performance liquid chromatography column, then analyzed by MS/MS with electrospray ionization in positive mode, and quantified by external standard method. Results showed that there were good linear relationships for 10 target analytes, and the linear correlation coefficients were greater than 0.99. The limits of detection and the

limits of quantitation were in the ranges of 10.0~50.0  $\mu\text{g/kg}$  and 30.0~100.0  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. The average recoveries for ten aminoglycosides ranged from 62.3% to 110.4% with relative standard deviations of 1.0%~13.6%. The developed method is simple, rapid, accurate, sensitive and has wide detection range, so it is suitable for the

收稿日期: 2020-01-15

作者简介: 栾枫婷(1993-), 女, 江苏南京人, 学士, 研究实习员, 主要从事畜禽产品质量安全研究。(Tel) 025-84391617; (E-mail) 245886650@qq.com

通讯作者: 魏瑞成, (E-mail) rcwei79@jaas.ac.cn; 王 冉, (E-mail) ranwang@jaas.ac.cn

determination of ten aminoglycosides in eggs and milk.

**Key words:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); solid phase extraction (SPE); aminoglycosides (AGs); residues; eggs; milk

氨基糖苷类药物(Aminoglycosides, 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。AGs 因其价格低廉且具有广谱抗菌性,被广泛用于治疗和预防禽霍乱、奶牛乳腺炎及奶牛结核病等,还作为促生长剂提高饲料报酬率<sup>[1]</sup>。但该类药物长期食用后易蓄积于动物细胞、组织和器官中,食用这些动物产品后会损害人体健康。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<sup>[2]</sup>。由农业农村部、国家卫生健康委员会和国家市场监督管理总局联合发布的

食品安全国家标准《食品中兽药最大残留限量》(标准号:GB 31650-2019)中对蛋中 5 种药物及奶中 7 种药物的残留限量做出了相关规定,且欧盟(European Union, EU)在 2010 年发布的《动物源性食品中药物活性物质及其最大残留限量》中除潮霉素 B 外对其他 9 种药物的残留限量均有规定。除此之外,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)、加拿大通用标准局(Canadian General Standards Board, CGSB)和日本食品卫生协会(Japan Food Hygiene Association, JFHA)对 AGs 的最高残留限量(MRL)也有相关规定<sup>[2-3]</sup>(表 1)。

表 1 欧盟及其他部分国家的 AGs 最大残留限量标准

Table 1 Maximum residue limits for aminoglycosides(AGs) in the EU and other countries

药物	标记物	动物产品	最大残留限量(μg/kg)				
			EU	FDA	CGSB	JFHA	中国国家标准
双氢链霉素	双氢链霉素	牛奶/羊奶	200	-	125	200(链霉素、双氢链霉素总量)	200(链霉素、双氢链霉素总量)
链霉素	链霉素	牛奶/羊奶	200	-	125		
大观霉素	大观霉素	牛奶/羊奶	200	-	-	-	200
		鸡蛋	禁用	-	-	-	2 000
卡那霉素	卡那霉素-A	牛奶/羊奶	150	-	-	400	150
		鸡蛋	禁用	-	-	500	禁用
庆大霉素	庆大霉素 C <sub>1</sub> 、C <sub>1a</sub> 、C <sub>2</sub> 和 C <sub>2a</sub> 的总和	牛奶/羊奶	100	-	-	200	200
新霉素	新霉素 B	牛奶	1 500	150	-	500	1 500
		鸡蛋	500	-	-	500	500
安普霉素	安普霉素	羊奶	禁用	-	-	-	禁用
		鸡蛋	禁用	-	-	-	禁用
潮霉素 B	潮霉素 B	羊奶	-	-	-	-	禁用
		鸡蛋	-	-	-	-	禁用

“-”表示暂无规定。EU:欧盟;FDA:美国食品药品监督管理局;CGSB:加拿大通用标准局;JFHA:日本食品卫生协会。

关于动物源食品中 AGs 残留的检测方法有微生物法、分光光度法、发光分析法、免疫分析法、色谱分析法、电化学分析法等,其中微生物法和分光光度法易受条件限制,且操作繁琐,灵敏度低,重现性

差<sup>[4]</sup>。随着生物技术的快速发展,基于抗体的免疫分析法通过特异性生物识别元件,能够提高检测灵敏度,且缩短检测时间,但获取高灵敏度的抗体难度高<sup>[2]</sup>。虽然液相色谱的紫外检测器和荧光检测器

具有高灵敏度、宽线性范围以及定量准确等优势,但不能测定某些无荧光基团或弱紫外吸收的 AGs(如庆大霉素、卡那霉素 A 和链霉素等)<sup>[1]</sup>。近年来,由于高效液相色谱-串联质谱检测方法能定量准确、灵敏度高、抗背景干扰能力强以及无需衍生等特点而得到广泛应用<sup>[5]</sup>,但多数研究中使用离子对试剂及高浓度盐,且操作繁复,损伤仪器和色谱柱性能,不利于批量化检测和实际操作<sup>[6-10]</sup>。除此之外,国内已制定的由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局和中国国家标准化委员会联合发布的《奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》(标准号:GB/T 22969-2008)中蛋和奶的品种及待测药物种类覆盖不全,无法同时测定 10 种 AGs。因此,为保障农产品质量和人类健康,亟待建立蛋和奶中 AGs 残留量检测的标准方法。

本研究考察了蛋和奶的前处理方法,且优化了目标物的色谱分离条件及质谱测定条件,确立了测定蛋和奶中 10 种 AGs 的液相色谱-串联质谱法。该方法覆盖畜禽养殖行业中常用的 10 种 AGs,无需使用离子对试剂及高浓度盐检测蛋和奶中目标化合物的含量,结果准确、可靠、杂质干扰小,为相关部门的监管提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

Arium<sup>®</sup> Pro 超纯水系统,德国 Sartorius 公司产品;ME104E 万分之一电子分析天平,瑞士 Mettler-Toledo 集团产品;VORTEX 3 涡旋混匀器,德国 IKA 公司产品;5810R 高速冷冻离心机,美国 Eppendorf 公司产品;KQ-500E 型超声波清洗机,昆山超声仪器有限公司产品;N-EVAP-24 型氮吹仪,美国 Organomation 公司产品;Oasis HLB 固相萃取小柱(填料质量为 200 mg,柱体积为 6 ml),美国 Waters 公司产品;滤膜(孔径为 0.22  $\mu\text{m}$ )购自南京大沪科技仪器有限公司;Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱(粒径为 1.7  $\mu\text{m}$ ,柱长 $\times$ 内径为 100.0 mm $\times$ 2.1 mm),美国 Waters 公司产品;高效液相色谱-三重四极杆-串联质谱联用仪(SCIEX Triple Quad<sup>TM</sup> 6500+),美国 SCIEX 公司产品。

本试验所用标准物质(表 2)均购于德国 Dr.Ehrenstorfer 公司,10 种 AGs 含量均 $\geq 89.0\%$ 。

色谱级异丙醇,德国 Merck 公司产品;色谱级乙腈和甲醇,美国 Honeywell 公司产品;色谱级甲酸和乙酸铵,意大利阿拉丁科技有限公司产品;分析纯氨水、三氯乙酸和甲醇,国药集团化学试剂有限公司产品。

试验所用鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋、牛奶、羊奶均购于市场。

### 1.2 标准溶液配制

标准储备液(0.5 mg/ml)的配制:准确称取适量标准品于 50 ml 聚丙烯容量瓶中,用水溶解后定容,配制标准储备溶液。储备液置于圆形广口聚丙烯瓶中,2~8  $^{\circ}\text{C}$  保存,有效期为 30 d。

混合标准中间液(50  $\mu\text{g/ml}$ )配制:分别移取 5.0 ml 标准储备液置于 50 ml 聚丙烯容量瓶中,用甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵水溶液(10:5:85,体积比,pH=0.80)定容至 50.0 ml,有效期为 7 d。

混合标准工作液配制:移取 0.01~2.00 ml 混合标准中间液,置于 50 ml 聚丙烯容量瓶中,用甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵水溶液(10:5:85,体积比,pH=0.80)稀释成 10~2 000 ng/ml 混合标准工作液,有效期为 7 d。

### 1.3 样品前处理

准确称取 2.00 g 样品于 50 ml 离心管内,加入 20 ml 5% 三氯乙酸提取,涡旋混匀,振荡 15 min,10 000 r/min 离心 5 min,转移上清液,用氨水调节上清液 pH 至 7.5 $\pm$ 0.2,作为备用液。

HLB 固相萃取柱预先用 5 ml 甲醇、水活化,取备用液全部过柱,用水和 5% 甲醇水溶液各 3 ml 依次淋洗,抽干。准确加入 2.0 ml 甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵水溶液(10:5:85,体积比,pH=0.80)洗脱并收集,涡旋混匀后,经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

### 1.4 仪器条件

色谱条件:色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH Amide(粒径为 1.7  $\mu\text{m}$ ,柱长 $\times$ 内径为 100.0 mm $\times$ 2.1 mm),柱温为 40  $^{\circ}\text{C}$ ,流速为 0.3 ml/min;进样量为 5.0  $\mu\text{l}$ 。流动相 A 为 1%(体积分数)甲酸(混有 0.002 mol/L 乙酸铵),流动相 B 为 1%(体积分数)甲酸乙腈(混有 0.002 mol/L 乙酸铵)。梯度洗脱程序为 0~2.5 min,20% 流动相 A;2.6~4.0 min,20%~65% 流动相 A;4.1~5.5 min,65%~90% 流动相 A;5.6~6.7 min,90% 流动相 A;6.8~7.5 min,90%~

20%流动相 A;7.6~12.0 min,20%流动相 A。

质谱条件:电喷雾电离(Electron Spray Ionization, ESI),正离子模式,气帘气为 30 V,碰撞气为 8 V,离子源电压为 5 500 V,离子源温度为 550 ℃,雾

化气压力为 448.2 kPa,辅助加热气压力为 413.7 kPa。扫描方式:多反应监测模式,母离子、子离子、去簇电压(Declustering Potential, DP)和碰撞能量(Collision Energy, CE)见表 2。

表 2 10 种 AGs 的质谱参数

Table 2 Mass spectrometric parameters for the ten aminoglycosides

化合物	英文缩写	化学物质 登记号	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞电压 (V)
大观霉素	STM	21736-83-4	5.0	333.1	98.2 <sup>*</sup> /140.1	155.0	33.0/31.0
双氢链霉素	DSM	5490-27-7	5.4	584.4	263.1 <sup>*</sup> /246.2	244.0	40.0/57.0
链霉素	SPM	3810-74-0	5.3	582.4	263.2 <sup>*</sup> /221.4	270.0	44.3/49.0
卡那霉素 A	KNM	25389-94-0	5.4	485.2	163.2 <sup>*</sup> /324.3	50.0	33.0/24.3
庆大霉素	GTC	1405-41-0	5.3	478.4	322.2 <sup>*</sup> /157.2	85.0	20.8/27.0
新霉素 B	NMC	4146-30-9	5.5	615.4	161.3 <sup>*</sup> /293.2	90.0	38.0/34.9
妥布霉素	TBC	32986-56-4	5.3	468.0	163.1 <sup>*</sup> /205.2	85.0	32.6/32.0
潮霉素 B	HGC	31282-04-9	5.3	528.3	177.1 <sup>*</sup> /351.9	30.0	39.2/33.6
阿米卡星	AKH	37517-28-5	5.4	586.1	425.2 <sup>*</sup> /324.0	30.0	27.0/31.0
安普霉素	APC	65710-07-8	5.5	540.3	378.3 <sup>*</sup> /217.0	108.0	25.0/36.0

\* 为定量离子。

## 2 结果与分析

### 2.1 质谱条件优化

在正离子模式下,取质量浓度为 200 ng/ml 的 AGs 混合标准溶液,在质荷比为 300~650 的条件下用一级质谱扫描目标物,依次选取 10 种 AGs 的母离子,并通过优化传输电压确定目标物的最优离子源去簇电压。在最优去簇电压下,采取不同的碰撞能量,用二级质谱扫描 10 种 AGs 的母离子,在主要离子碎片中选取高离子丰度、干扰小的离子碎片作为目标化合物的定量离子以及定性离子,最佳质谱条件见表 2。结果表明,庆大霉素(GTC)为多组分抗生素,由 C<sub>1</sub>、C<sub>1a</sub>、C<sub>2</sub> 3 种抗菌活性基本相同的同分异构体组成,本方法采用 GTC C<sub>1</sub> 作为定量标记物。

### 2.2 色谱条件优化

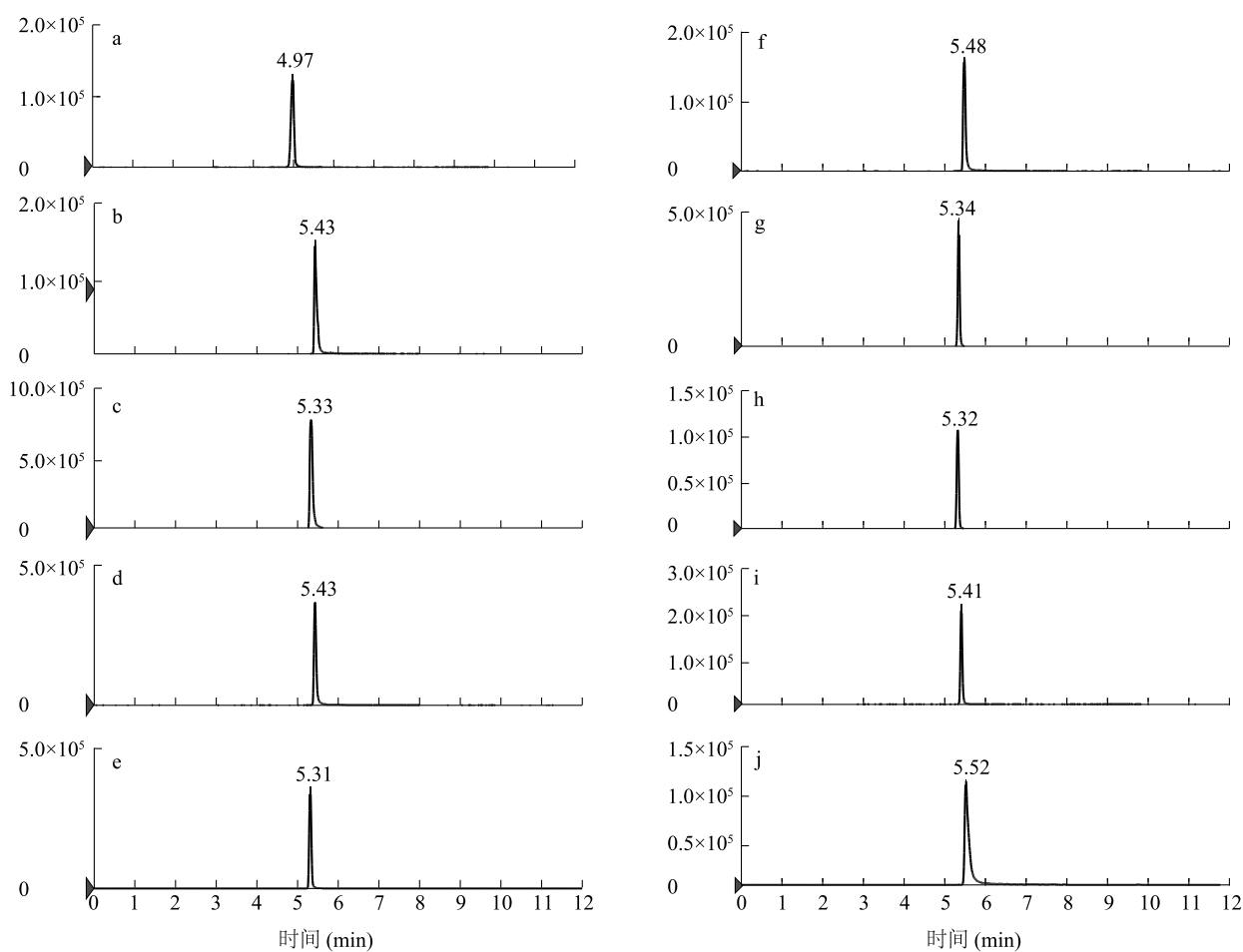
2.2.1 色谱柱的选择 AGs 含有羟基、氨基等极性基团,徐丽佳等<sup>[6]</sup>、Frederique 等<sup>[9]</sup>、龚强等<sup>[11]</sup>分别在流动相中添加了 20 mmol/L、3 μmol/L、2 mmol/L 七氟丁酸,离子对试剂与极性基团形成稳定的疏水性离子可增强目标物的保留,但离子对试剂与色谱柱的固定相结合产生不可逆吸附,影响填料活性位点,缩短色谱柱寿命。除此之外,为增强目标物在色

谱柱上的保留时间及改善峰型和拖尾现象,戴辉等<sup>[7]</sup>、Feng 等<sup>[12]</sup>在流动相中分别加入 250 mmol/L、200 mmol/L 甲酸铵,但其中高浓度盐的使用对液相系统使用后的冲洗要求高,易增加液相系统泵中活塞杆堵塞磨损的风险。因此,本研究在无离子对试剂和低盐浓度流动相的试验条件下,考察了 OSAKA SODA SILICA、SiELC Obelisc R、BEH C18、HSS T3、BEH HILIC 和 BEH Amide 6 种分析色谱柱对目标物与杂质的分离效果和灵敏度<sup>[8,13-14]</sup>。试验结果表明 BEH Amide 色谱柱内填料为酰胺基键合亚乙基桥杂化颗粒,随 1% (体积分数) 甲酸(混有 0.002 mol/L 乙酸铵)比例的增加,目标物被分离洗脱,峰型良好,出峰时间均晚于 4 min,且对流动相系统无特殊的试剂要求,使用便捷。使用 SiELC Obelisc R 色谱柱时,微量醇类试剂会造成目标物峰形拖尾,对仪器管路系统要求高。此外,BEH C18、HSS T3、O-SAKA SODA SILICA、BEH HILIC 色谱柱对部分目标物无保留,出峰时间均小于 2 min,杂质干扰大。因此,本试验选择 BEH Amide 分析色谱柱。

2.2.2 流动相体系的优化 研究设定当有机相为甲醇或乙腈,水相为乙酸铵缓冲溶液、甲酸水溶液和乙酸水溶液时,对比峰形、灵敏度以及分辨率的改变情

况。结果表明,以 0.002 mol/L 乙酸铵水溶液作为水相,乙腈较甲醇洗脱目标物能力强,且在流动相体系中加入 1% 的甲酸有助于增强离子化程度并改善峰形,提高检测灵敏度,而当在有机相中加入 0.002 mol/L 乙酸铵时,稳定的酸性环境增强了对目标物的吸附洗脱能力,减少了拖尾现象,提高了仪器的响应值。但随着乙酸铵浓度逐渐增大,乙酸铵与目标物竞争电荷,影响目标化合物的电离,导致目标物响应值降低<sup>[15]</sup>。试验结果表明,当有机相为 1% 甲酸 0.002 mol/L 乙酸铵乙腈溶液时,目标物呈现良好峰形。

因此,本试验以 1% 甲酸 0.002 mol/L 乙酸铵水溶液和 1% 甲酸 0.002 mol/L 乙酸铵乙腈溶液作为流动相,梯度洗脱。由图 1 可以看出,质量浓度为 200  $\mu\text{g/L}$  的 10 种氨基糖苷类抗生素色谱具有较好的峰形,与徐丽佳等<sup>[6]</sup>、龚强等<sup>[11]</sup>的研究结果相比,本研究在无离子对试剂的试验条件下,优化流动相体系,保证了灵敏度高,不受杂峰的干扰。避免了质谱在负离子模式下,目标物与溶液中阳离子形成紧密的中性离子对,不能被检出且易累积,造成污染。



a: 大观霉素; b: 妥布霉素; c: 庆大霉素; d: 卡那霉素 A; e: 潮霉素 B; f: 安普霉素; g: 链霉素; h: 双氢链霉素; i: 阿米卡星; j: 新霉素 B。

图 1 10 种待测药物标准品的 MRM 图

Fig.1 MRM chromatograms of ten aminoglycosides mixed standard solution

### 2.3 提取溶剂的选择

本试验选取磷酸盐缓冲溶液、乙二胺四乙酸二钠盐溶液和 5% 三氯乙酸等酸性溶液作为提取液,考察其对 AGs 的回收率。结果表明,经 10 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液、0.4 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐

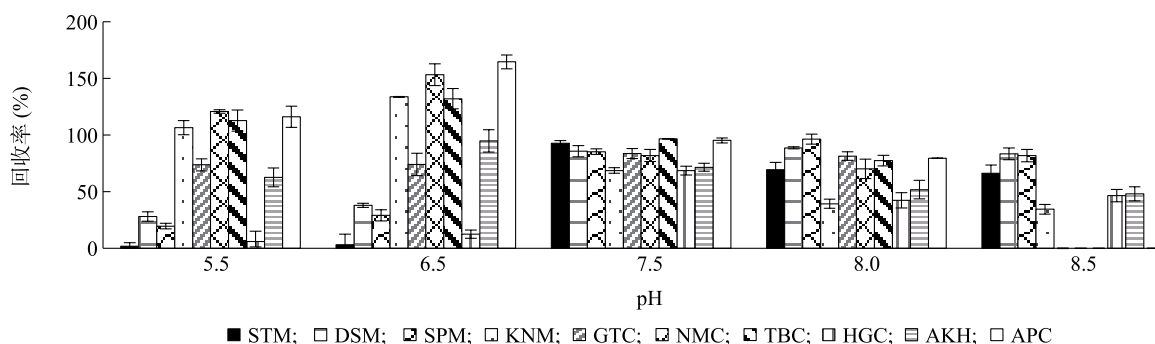
溶液提取后的溶液浑浊且杂质较多,不利于后续净化,影响回收率。而 5% 三氯乙酸作为提取液,易于沉降样品中蛋白质,溶液澄清,10 种目标物回收率为 70.2%~80.5%。因此,选择 5% 三氯乙酸作为样品提取剂。

## 2.4 固相萃取条件的优化

**2.4.1 不同固相萃取柱的选择** 由于 10 种 AGs 属于碱性化合物,在标准号为 GB/T 22969-2008 的国家标准及万译文等<sup>[10]</sup>的方法中均在提取液中加入庚烷磺酸钠,并将其作为备用液通过固相萃取柱(Solid Phase Extraction, SPE)净化。除此之外,国家标准中使用 2 种固相萃取柱,净化步骤复杂。本研究为简化净化步骤,在避免使用离子对试剂的条件下,设计对比了 WCX、PRiME HLB 和 HLB 3 种不同类型 SPE 的回收率。结果表明,WCX 对目标药物保留较少,经 PRiME HLB 净化浓缩,GTC、DSM、SPM、HGC、AKH 的回收率均低于 40%,且添加回收重现性低,而 HLB 对目标药物的含量保留稳定,回

收率在 65.1%~87.9%。因此,本研究选择 HLB 柱作为净化浓缩的 SPE。

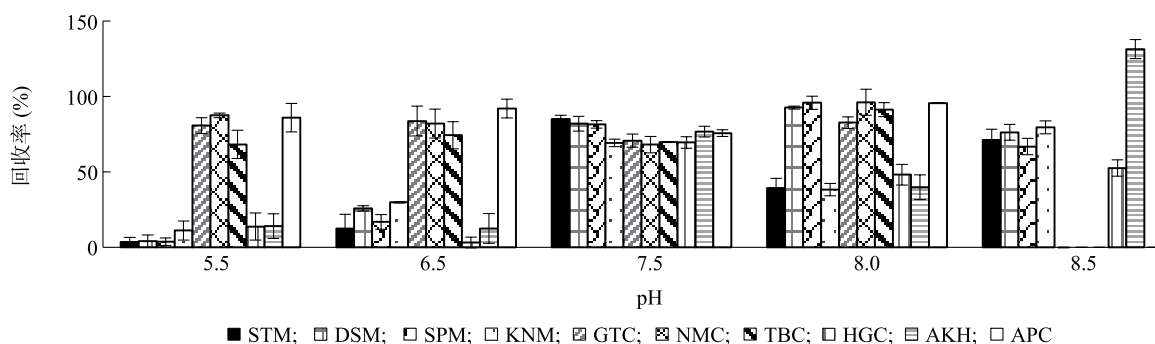
**2.4.2 pH 值对固相萃取效率的影响** 通过固相萃取柱时,备用液的 pH 值会影响目标物的离子化程度及填料对目标物的吸附率。试验结果表明,pH ≤ 5 和 pH ≥ 9 时,目标物均无法在 HLB 柱上保留,所以本试验考察了 pH 值在 5.5、6.5、7.5、8.0、8.5 条件下,5% 三氯乙酸溶液为提取液时,HLB 柱对 10 种目标物的回收率。图 2 和图 3 表明,当鸡蛋和牛奶基质的备用液 pH 为 7.5 时,目标药物在 HLB 柱上保留,回收率提高至 68.1%~96.7%。因此,选择 pH 为 7.5 作为 SPE 上样溶液的 pH 值。



STM:大观霉素;DSM:双氢链霉素;SPM:链霉素;KNM:卡那霉素 A;GTC:庆大霉素;NMC:新霉素 B;TBC:妥布霉素;HGC:潮霉素 B;AKH:阿米卡星;APC:安普霉素。

图 2 鸡蛋中 10 种 AGs 不同 pH 值提取液的回收率(添加水平 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Fig.2 Recovery of extracts of ten aminoglycosides in eggs with different pH values (spiked 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )



STM:大观霉素;DSM:双氢链霉素;SPM:链霉素;KNM:卡那霉素 A;GTC:庆大霉素;NMC:新霉素 B;TBC:妥布霉素;HGC:潮霉素 B;AKH:阿米卡星;APC:安普霉素。

图 3 牛奶中 10 种 AGs 不同 pH 值提取液的回收率(添加水平 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

Fig.3 Recovery of extracts of ten aminoglycosides in milk with different pH values (spiked 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

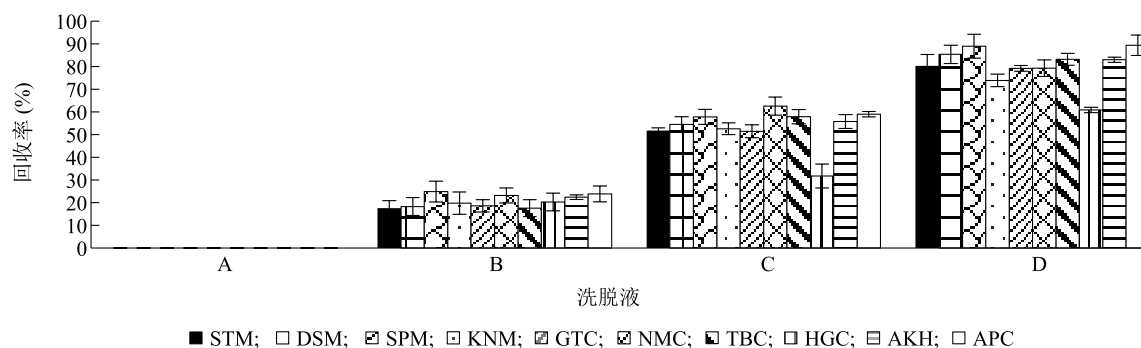
**2.4.3 洗脱溶液的选择** AGs 属于强极性化合物,为提高目标物在 HLB 的洗脱效率,本试验考察了纯水

(A)、10%甲酸水溶液(B)、5%异丙醇水溶液(C)和甲酸:异丙醇:水(10:5:85,体积比)(D)4 种洗脱液

的效果。结果表明,异丙醇极性较强,在酸性水溶液中加入异丙醇提高了目标物在 HLB 柱上的洗脱效率,所以选取甲酸:异丙醇:水(10:5:85,体积比)洗脱目标物,鸡蛋和牛奶中 10 种 AGs 的回收率在 60.9%~89.4%(图 4),明显高于其他洗脱液。

由于洗脱液中水分含量高,为提高检测分析效率,本试验设计以洗脱液作为氨基糖苷类药物的上机溶液。结果表明,洗脱液的 pH 值对目标物的峰型有显著的影响。设计对比了 2 种洗脱液[甲酸:

异丙醇:水(10:5:85,体积比)(D)和甲酸:异丙醇:2 mmol/L 乙酸铵水溶液(10:5:85,体积比,pH=0.80)(E)]的回收率,分别是 60.6%~98.9%和 73.6%~101.0%。洗脱液 E 对目标物回收率略有提高,且作为上机测定液时,APC 和 TBC 的半峰宽更窄,上机响应值更高。因此,本研究选择甲酸:异丙醇:0.002 mol/L 乙酸铵水溶液(10:5:85,体积比,pH=0.80)作为洗脱液及其洗脱后溶液作为上机测定液。



A:纯水;B:10%甲酸水溶液;C:5%异丙醇水溶液;D:甲酸:异丙醇:水(10:5:85,体积比)。STM:大观霉素;DSM:双氢链霉素;SPM:链霉素;KNM:卡那霉素 A;GTC:庆大霉素;NMC:新霉素 B;TBC:妥布霉素;HGC:潮霉素 B;AKH:阿米卡星;APC:安普霉素。

图 4 不同洗脱液对固相萃取效果的影响(添加水平 200  $\mu\text{g/kg}$ )

Fig.4 Effects of different eluents on solid phase extraction (spiked 200  $\mu\text{g/kg}$ )

## 2.5 前处理方法的基质效应评估

ESI 离子源易受到基质中蛋白质、脂肪、磷脂等物质干扰,产生基质效应。因此,为了准确定量目标物的含量,本研究设计评估前处理方法的基质效应。

本研究按照方法 1.2 的方法制备基质标准溶液,参照由原中华人民共和国卫生部发布的标准号为 WS/T 356-2011 的《基质效应与互通性评估指南》,根据空白基质中标准物质的峰面积(A)和溶剂标准物质的峰面积(B)的比值评估基质效应(ME), $ME=A/B$ ,若 ME 为 0.8~1.2,则表明基质效应不明显。表 3 表明,在最佳前处理条件下,10 种目标物中新霉素 B(NMC)和潮霉素 B(HGC)在禽蛋中基质效应不明显,其余 8 种药物在鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋中存在基质抑制或增强效应。在羊奶、牛奶中卡那霉素(KNM)、庆大霉素(GTC)、NMC、妥布霉素(TBC)、阿米卡星(AKH)和安普霉素(APC)的基质效应不明显,其余 4 种药物在牛奶、羊奶中存在基质抑制或增强效应。为了消除基质效应带来的定量偏差,本研究采用基质混合标准工作液进行定量。

表 3 10 种 AGs 在禽蛋和奶中的基质效应

Table 3 Matrix effects of ten aminoglycosides in eggs and milk

化合物	基质效应				
	鸡蛋	鸭蛋	鹅蛋	牛奶	羊奶
STM	1.3	1.3	1.4	0.3	0.4
DSM	0.7	0.8	0.7	0.4	0.3
SPM	0.7	0.8	0.7	0.4	0.6
KNM	1.4	1.4	1.4	1.1	1.0
GTC	1.4	1.4	1.5	1.0	0.9
NMC	1.1	1.0	0.9	0.9	1.1
TBC	1.5	1.4	1.4	1.2	1.1
HGC	1.2	0.9	0.9	0.4	0.5
AKH	1.4	1.4	1.3	0.8	1.1
APC	1.4	1.2	1.5	1.0	0.9

STM、DSM、SPM、KNM、GTC、NMC、TBC、HGC、AKH、APC 见图 4 注。

## 2.6 蛋和奶中 10 种 AGs 的定量检测

选取未检出 AGs 的蛋和奶样品为空白基质,按方法 1.3 的方法配制 10 种 AGs 的基质系列标准溶液,通过 10 种 AGs 定量离子的峰面积和相应的质量

浓度求出线性方程,分别选取 3 倍和 10 倍信噪比为检出限和定量限。结果(表 4)表明,10 种药物在各自的范围内线性关系较好,相关系数( $R^2>0.99$ ),方法

的检出限和定量限分别为 10.0~50.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 30.0~100.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,满足标准号为 GB 31650-2019 的《食品中兽药最大残留限量》中对 AGs 的限量要求。

表 4 10 种 AGs 的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, the limits of detection and the limits of quantitation of ten aminoglycosides

基质	化合物	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	线性方程	相关系数	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
鸡蛋	STM	25~1 000	$Y=2\ 887x-23\ 077$	0.997 7	20.0	50.0
	DSM	20~800	$Y=17\ 572x+60\ 137$	0.998 5	15.0	40.0
	SPM	20~800	$Y=6\ 054x+32\ 640$	0.999 8	15.0	40.0
	KNM	20~800	$Y=80\ 422x+13\ 287$	0.998 6	15.0	40.0
	GTC	50~2 000	$Y=48\ 447x+176\ 317$	0.999 9	50.0	100.0
	NMC	50~2 000	$Y=1\ 278x+7\ 580$	0.997 2	50.0	100.0
	TBC	50~2 000	$Y=36\ 240x-1\ 709\ 410$	0.997 5	50.0	100.0
	HGC	20~800	$Y=13\ 666x+27\ 584$	0.998 9	15.0	40.0
	AKH	25~1 000	$Y=35\ 135x+14\ 603$	0.999 7	20.0	50.0
	APC	25~1 000	$Y=16\ 217x-264\ 019$	0.997 9	20.0	50.0
牛奶	STM	25~1 000	$Y=2\ 289x-12\ 367$	0.995 3	20.0	50.0
	DSM	15~600	$Y=9\ 723x+19\ 442$	0.999 5	10.0	30.0
	SPM	15~600	$Y=2\ 566x+8\ 360$	0.999 3	10.0	30.0
	KNM	25~1 000	$Y=19\ 403x-126\ 028$	0.997 3	20.0	50.0
	GTC	50~2 000	$Y=13\ 278x-215\ 031$	0.998 7	50.0	100.0
	NMC	50~2 000	$Y=1\ 032x+608$	0.999 7	50.0	100.0
	TBC	50~2 000	$Y=7\ 063x-58\ 962$	0.999 6	50.0	100.0
	HGC	25~1 000	$Y=6\ 545x+13\ 179$	0.999 3	20.0	50.0
	AKH	25~1 000	$Y=3\ 833x-28\ 695$	0.996 5	20.0	50.0
	APC	25~1 000	$Y=4\ 584x-59\ 435$	0.997 7	20.0	50.0

STM、DSM、SPM、KNM、GTC、NMC、TBC、HGC、AKH、APC 见图 4 注。

## 2.7 添加回收率和批内批间相对标准偏差

设计添加 1 倍、2 倍、10 倍定量限这 3 种质量浓度目标物于禽蛋和奶阴性样品中,考察添加目标物的回收率,且每种添加水平作 6 次重复,平均回收率及相对标准偏差见表 5。结果(表 5)表明,10 种 AGs 的平均回收率均在 62.3%~110.4%,批间和批内的相对标准偏差均在 1.0%~13.6%。与叶磊海等<sup>[8]</sup>的研究结果相比,本方法更稳定且批间相对标准偏差均小于 15%。除此之外,戴辉等<sup>[7]</sup>的研究中仅新霉素和潮霉素 B 的回收率满足要求,而本研究中 10 种 AGs 均可满足要求。

## 2.8 实际样品检测

为了进一步验证方法的可行性,应用所建立的方法对市售不同类型的 20 份蛋(鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑

蛋)和奶(牛奶、羊奶)进行检测,其中检测出 1 份鸡蛋中 SPM 的残留质量浓度为 88.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,其余 19 份蛋和奶中均未检出。

## 3 结论

本试验中蛋和奶样品通过 5%三氯乙酸溶液提取,经 HLB 柱净化,采用高效液相色谱-串联质谱检测 10 种 AGs。该方法的检出限为 10.0~50.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 30.0~100.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率为 62.3%~110.4%,批内和批间标准偏差为 1.0%~13.6%。方法准确、灵敏、快速,扩展了相关国家标准中的检测对象和参数范围,同时避免使用离子对试剂,适用于实际操作,为行业监管提供了强有力的技术支持。

表 5 10 种 AGs 在蛋、奶产品中 3 个水平下的加标回收率 ( $n=6$ )Table 5 Recoveries of the ten aminoglycosides at three levels in eggs and milk ( $n=6$ )

添加的目标物	鸡蛋					牛奶				
	添加水平 ( $\mu\text{g/kg}$ )	测定含量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率 (%)	批间标准 偏差 (%)	批内标准 偏差 (%)	添加水平 ( $\mu\text{g/kg}$ )	测定含量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率 (%)	批间标准 偏差 (%)	批内标准 偏差 (%)
STM	500	359.1	71.8	5.8	4.7	500	393.4	78.7	5.6	5.6
	100	96.5	96.5	5.2	7.5	100	85.0	85.0	3.7	3.7
	50	48.8	97.7	4.7	9.0	50	42.1	84.2	7.0	7.0
DSM	400	366.8	91.7	7.8	7.0	300	324.9	108.3	7.5	7.5
	80	81.3	101.6	7.9	11.4	60	59.7	99.5	5.5	5.5
	40	31.0	77.4	4.7	7.1	30	30.2	100.7	5.3	5.3
SPM	400	389.4	97.4	5.4	12.2	300	279.6	93.2	5.3	5.3
	80	86.7	108.3	3.7	1.0	60	57.2	95.3	4.4	4.4
	40	41.2	103.0	5.6	13.6	30	28.7	95.7	4.0	4.0
KNM	400	327.3	81.8	3.6	11.9	500	311.3	62.3	3.1	3.1
	80	79.3	99.1	7.6	5.4	100	64.9	64.9	4.1	4.1
	40	38.7	96.8	7.0	7.5	50	31.2	62.4	2.8	2.8
GTC	1 000	847.7	84.8	9.0	10.4	1 000	829.3	82.9	4.1	4.1
	200	190.5	95.2	7.5	13.0	200	143.9	71.9	6.2	6.2
	100	84.9	84.9	8.1	12.0	100	75.2	75.2	7.0	7.0
NMC	1 000	938.1	93.8	7.7	12.5	1 000	909.9	91.0	6.9	6.9
	200	193.0	96.5	8.7	12.8	200	170.9	85.5	6.5	6.5
	100	97.5	97.5	6.5	13.2	100	110.4	110.4	3.8	3.8
TBC	1 000	934.7	93.5	6.9	8.4	1 000	962.2	96.2	4.0	4.0
	200	183.3	91.6	4.0	7.4	200	148.7	74.3	5.5	5.5
	100	97.4	97.4	3.2	8.3	100	65.1	65.1	4.6	4.6
HGC	400	262.9	65.7	5.2	11.0	500	313.5	62.7	5.4	5.4
	80	52.9	66.2	3.5	5.7	100	66.3	66.3	5.2	5.2
	40	26.6	66.5	7.0	12.5	50	33.4	66.8	5.6	5.6
AKH	500	403.5	80.7	6.2	7.5	500	330.7	66.1	4.8	4.8
	100	103.5	103.5	8.6	5.0	100	64.7	64.7	3.8	3.8
	50	45.7	91.3	6.4	7.8	50	33.5	67.1	3.4	3.4
APC	500	451.1	90.2	5.7	7.4	500	371.7	74.3	7.0	7.0
	100	75.0	75.0	8.0	6.5	100	65.4	65.4	4.2	4.2
	50	39.3	78.7	4.9	9.4	50	33.3	66.6	5.7	5.7

STM、DSM、SPM、KNM、GTC、NMC、TBC、HGC、AKH、APC 见图 2 注。回收率=测定含量/添加水平 $\times 100\%$ 。

## 参考文献:

- [1] 张元,周昱,周伟娥,等.食品中氨基糖苷类残留前处理及分析方法研究进展[J].食品工业,2016,37(4):223-227.
- [2] 邵杰,韦达理,曾昆,等.食品中氨基糖苷类抗生素快速分析方法研究进展[J].江苏农业科学,2019,47(8):18-24.
- [3] FATEN F, HASSAN M A, WILFRIED M N. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 890: 21-43.
- [4] 胡小莉,刘绍璞,罗红群,等.氨基糖苷类抗生素分析方法的研究进展[J].分析科学学报,2005,21(3):316-321.
- [5] 李佩佩,龙举,方益,等.液相色谱法检测动物源食品中 AGs 残留的研究进展[J].理化检验(化学分册),2019,55(11):1356-1364.

- [6] 徐丽佳,刘 笑,张秀芹,等.超高效液相色谱串联质谱法检测鸡蛋中残留的 AGs[J].药物分析杂志,2016,36(2):301-305.
- [7] 戴 辉,孟 晶,祖立青,等.基于 HPLC-MS 检测食品中新霉素和潮霉素 B 的残留量[J].山西农经,2016(18):97-98.
- [8] 叶磊海,钟世欢,叶佳明,等.LC-MS-MS 法同时测定动物肌肉组织和牛奶中 10 种 AGs 的方法优化研究[J].化工设计通讯,2016,42(12):107-108.
- [9] FREDERIQUE L H, MARTIEN L E, PATRICK J M, et al. A generic method for the quantitative analysis of aminoglycosides (and spectinomycin) in animal tissue using methylated internal standards and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 637(1):135-143.
- [10] 万译文,黄向荣,伍远安,等.固相萃取净化-高效液相色谱串联质谱法测定鱼肉制品中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的含量[J].现代食品科技,2018,34(8):255-259.
- [11] 龚 强,丁 利,朱绍华,等.高效液相色谱-串联质谱法检测乳制品中 10 种氨基糖苷类抗生素残留[J].色谱,2012,30(11):1143-1147.
- [12] FENG J, SHE X, HE X, et al. Synthesis of magnetic graphene/mesoporous silica composites with boronic acid-functionalized porewalls for selective and efficient residue analysis of aminoglycosides in milk[J]. Food Chemistry, 2018, 239: 612-621.
- [13] 钟名琴,黄 婷,吴雯娟,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物肌肉组织中 6 种 AGs 残留[J].饲料博览,2019(5):1-6.
- [14] 陶大利,白 鹤,李 琴.SPE 净化-液质联用测定 AGs 残留[J].中国乳品工业,2019,47(2):51-53.
- [15] 王钦钦.饲料中氨基糖苷类抗生素和地昔尼尔的测定[D].烟台:烟台大学,2019.

(责任编辑:陈海霞)