

# 离子色谱串联三重四极杆质谱快速检测动物源食品中14种氨基糖苷类抗生素残留

徐媛, 陈达, 钟新林, 徐牛生, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司色谱质谱部

## 关键词

TSQ Fortis, ICS5000, 抑制器, 氨基糖苷类抗生素

## 摘要

本文基于Thermo Scientific™ Dionex™ ICS 5000离子色谱串联三重四极杆质谱Thermo Scientific™ TSQ Fortis™平台(IC-MS/MS)建立了适用于动物源性食品中14种氨基糖苷类抗生素(AGs)残留的检测方法。本方法以离子对试剂七氟丁酸(HFBA)和三氟乙酸(TFA)为流动相, 搭配氨基糖苷类抗生素检测专用柱Thermo Scientific™ Acclaim™ AmG C18和离子色谱专利的电解再生膜抑制器技术, 猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素保留良好, 分离快速, 通过创新性的柱后加氨水, 进一步提高灵敏度, 此14种化合物在相应浓度范围内线性关系良好( $R^2 > 0.993$ ), 检出限和定量限均满足国标GBT21323-2007要求。

## 前言

氨基糖苷类抗生素(Aminoglycoside antibiotics, AGs)是临床应用较早的一类抗生素, 与 $\beta$ -内酰胺类药物联合使用具有良好的协同作用, 用药方便, 价格低廉, 目前在农业、养殖业及医疗等领域均有广泛的应用。AGs化学结构均由两个或多个氨基糖基团通过糖苷和氨基环多醇键合而成<sup>[1]</sup>, 极性大, 易溶于水, 脂溶性差, 人体和禽畜的胃肠道吸收困难, 通过肌肉注射后大部分以原药经肾排泄, 经过粪肥可能迁移至土壤及周围水体中, 最终进入食物链, 对动物和人体健康及生态系统构成潜在威胁<sup>[2]</sup>。

AGs极性大, 一般无紫外吸收或紫外吸收弱, 常规色谱方法保留弱或无保留, 目前业内缺少稳定且灵敏的检测方法。国标GBT21323-2007《动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱/质谱法》中采用100 mM七氟丁酸(HFBA, 离子对试剂)为流动相, 结合常规的C18柱, 检测了10种氨

基糖苷类抗生素, 保留良好, 但灵敏度不高, LOQ分别为50 ppb、300 ppb(进样量为30  $\mu$ L)。此外, 由于HFBA等离子对试剂易残留在质谱系统中且不易清洗干净, 其负离子响应极高, 严重影响其他负离子化合物的检测灵敏度, 一般不建议在质谱应用中使用离子对试剂, 除非有特殊的办法能在质谱前端去除离子对试剂, 以防止污染仪器影响质谱性能。

本文采用Thermo Scientific™ Dionex™ ICS 5000与Thermo Scientific™ TSQ Fortis™三重四极杆质谱仪联用技术, 并巧妙的结合赛默飞离子色谱专利的电解再生膜抑制器技术建立了快速检测动物源食品中14种氨基糖苷类抗生素残留的方法。方法使用HFBA和TFA等离子对试剂为流动相, 搭配Thermo Scientific™ Acclaim™ AmG C18柱(可耐pH范围0.5~10)以增强保留与分离度, 再通过电解再生膜抑制器技术有效去除柱后流动相中的三氟乙酸根和七氟丁酸根, 结合柱后加氨水, 显著提高灵敏度。采用本方法检测猪肉中14种氨基糖苷类抗生素(包含国标中的10种), 灵敏度满足国标要求, 连续6针LOQ浓度的峰面积RSD均小于16%, 本方法较国标方法更加适用于快速检测动物源性食品中残留的氨基糖苷类抗生素(AGs)。

## 实验方法

### 1. 仪器与试剂

- 1.1 Thermo Scientific™ Dionex™ ICS 5000离子色谱(含单四元梯度泵系统、CSRS300 4 mm型抑制器及电导检测器)
- 1.2 Thermo Scientific™ Dionex™ AXP泵
- 1.3 Thermo Scientific™ TSQ Fortis™三重四极杆质谱仪
- 1.4 乙腈(色谱纯, 美国Thermo Fisher公司); 实验用水为

Milli-Q去离子水；HFBA（色谱纯25 g，SIGMA），TFA（色谱纯100 mL，SIGMA）

## 2. 实验方法

### 2.1 色谱方法

色谱柱：Thermo Scientific™ Acclaim™ AmG C18 (150 mm\*3.0 mm, 3 μm)；柱温：35℃；进样量：5 μL；抑制器电流：150 mA；抑制器再生水流速：1 mL/min。

流动相A为5 mM HFBA&100 mM TFA 水溶液，B为80%ACN & 20% Water，梯度洗脱程序见表1。抑制器后端接一个三通，引入一路5%氨水，流速为0.1 mL/min。

表1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Flow Rate(mL/min)	A%	B%
0.0	0.5	100	0
3.0	0.5	100	0
14.0	0.5	75	25
18.0	0.5	75	25
18.1	0.5	100	0
25.0	0.5	100	0

### 2.2 质谱方法

电喷雾离子源（HESI），正离子模式；监测模式：选择反应监控（SRM），具体质谱采集信息见表2；喷雾电压：4000 V；鞘气压力：40 Arb；辅助气压力：10 Arb；蒸发温度：400℃；离子传输管温度：320℃；碰撞气压力：1.5 mTorr；Cycle time为2 s，Chromatographic Peak Width为40 s，Q1和Q3分辨率分别为0.7 Da和1.2 Da。

表2. 14种化合物及质谱采集信息

Compound	Precursor (m/z)	Product (m/z)	Collision Energy (V)	Tube Lens (V)	Source Fragmentation (V)
CMS	528.3	177.1*	27.8	122	23
CMS	528.3	352.1	22.5	122	23
AMKX	586.3	264.2	25.6	134	0
AMKX	586.3	425.2*	18.1	134	0
KNMS	485.2	163.1*	24.2	167	0
KNMS	485.2	324.1	15.8	167	0
LMS	600.3	263.1	34.8	Calibrated TF	5
LMS	600.3	582.2*	17.9	Calibrated TF	5
SQLMS	584.4	246.2	37.6	112	0
SQLMS	584.4	263.1*	30.4	112	0
DGMS	351.2	207.1	22.0	Calibrated TF	5
DGMS	351.2	333.1*	19.0	Calibrated TF	5
APMS	540.3	217.1*	26.6	145	8
APMS	540.3	378.2	16.6	145	8
TBMS	468.2	163.2*	22.6	127	0
TBMS	468.2	323.9	13.7	127	0
XSMX	448.3	254.2*	20.3	160	0
XSMX	448.3	322.1	12.1	160	0
XMS	615.4	293.0*	23.5	128	29.4
XMS	615.4	323.0	21.4	128	29.4
BLMS	308.4	161.3*	10.5	52	0
BLMS	308.4	163.1	18.7	52	0
NTMX	476.3	299.28*	19.2	141	5
NTMX	476.3	458.3	13.3	141	5
YTMX	478.3	191.0	23.5	Calibrated TF	5
YTMX	478.3	350.2*	14.5	Calibrated TF	5
QDMS	478.4	157.2	21.2	125	14.7
QDMS	478.4	322.1*	13.5	125	14.7

注：标“\*”为定量离子

## 3. 猪肉基质前处理

前处理过程参考GBT21323-2007中“7.1 提取”和“7.2 净化”，具体如下，

提取：称取约5 g(精确至0.01 g)试样于50 mL聚丙烯离心管中，加入10 mL磷酸盐缓冲液均质2 min，于平板振荡器上振荡提取10 min，离心10 min (4500 r/min)，将上清液转移到另一个50 mL聚丙烯离心管中。在残渣中再加入10 mL磷酸盐缓冲液，重复上述操作，合并上清液，用1 mol/L的盐酸调pH值为3.5±0.2，加入2 mL七氟丁酸溶液，涡旋混匀。

净化：C18固相萃取柱用3 mL甲醇，3 mL七氟丁酸溶液淋洗后，将提取液加载在固相萃取柱上，控制流速约1滴/s，先用3 mL七氟丁酸溶液淋洗，再用每次3 mL水淋洗两次，弃去淋洗液，抽干5 min。用5 mL乙腈-七氟丁酸溶液（80+20，体积比）洗脱，手机洗脱液于精密刻度试管中，40℃氮气吹去部分溶剂，用七氟丁酸溶液定容至1 mL，涡旋混匀后，过0.2 μm微孔滤膜，上机测定

## 4. 基质标曲配制

用初始流动相即5 mM HFBA&100 mM TFA 水溶液分别配制100 ppm的14种化合物（潮霉素、阿米卡星、安普霉素、巴洛霉素、卡那霉素、链霉素、奈替米星、庆大霉素、大观霉素、双氢链霉素、妥布霉素、新霉素、西索米星、依替米星）的单标1 mL备用，各取5 μL（14个）加到930 μL上述配制而得的空白基质中，获得500 ppb含14种化合物的基质混标，再用空白基质将其逐步稀释，配制0.5 ppb、1 ppb、2 ppb、5 ppb、10 ppb、20 ppb、50 ppb、100 ppb、200 ppb、500 ppb系列标曲点。

## 5. 数据采集与处理软件

液相控制软件：Thermo Foundation 3.1, Thermo Scientific SII for Xcalibur; 质谱控制软件：TSQ Fortis Tune Application 3.1.2415.15;数据采集工作站及数据处理软件：TraceFinder 4.1 SP4

## 实验结果与讨论

### 1. 赛默飞离子色谱专利的电解再生膜抑制器技术原理

图1和图2分别为电解再生膜抑制器的实物图与工作原理图。在图2原理图中，两边是选择性透过膜，中间为流动相通道，通过电解水作用，在阴极产生OH<sup>-</sup>置换出流动相中的TFA-和HFBA<sup>-</sup>，直接从阳极排到废液。

TFA-和HFBA-与分析物离子结合，生成的离子对化合物较为稳定，影响分析物在质谱中的电离，显著降低灵敏度。且流动相中的TFA和HFBA对质谱系统（离子源、喷针等）有吸附腐蚀作用，TFA-和HFBA-残留在质谱离子源区难以完全洗干净，其负离子响应极高，会竞争抑制后续负离子化合物的检测灵敏度。采用赛默飞离子色谱专利的电解再生膜抑制器技术可以有效去除流动相中的三氟乙酸根和七氟丁酸根离子，从而避免污染，并显著提高分析物的检测灵敏度。



图1 电解再生膜抑制器的实物图

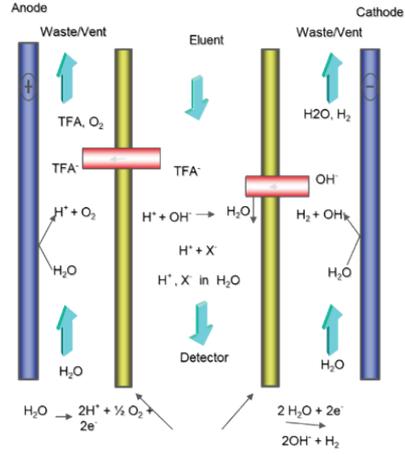


图2 电解再生膜抑制器的工作原理图

## 2. 灵敏度和线性范围测试

采用上述仪器分析方法，对猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素药物进行测试，LOD、RT、线性范围和相关系数等结果见表3，部分化合物标准曲线图见图3。

表3. 猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素LOD, RT, 线性范围, 相关系数及线性方程

Compounds		RT/min	linear range	LOD	Curve Equation
Tetracycline hydrochloride	潮霉素	3.62	5-500 ppb	2ppb	$Y = 5.861e1X - 9.798e0$ ; $R^2: 0.9963$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Amikacin	阿米卡星	4.81	5-500 ppb	2 ppb	$Y = 6.195e1X + 5.026e1$ ; $R^2: 0.9943$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Streptomycin	链霉素	6.74	20-500 ppb	5 ppb	$Y = 1.202e2X + 4.897e2$ ; $R^2: 0.9944$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Kanamycin	卡那霉素	6.52	2-500 ppb	1 ppb	$Y = 1.005e3X + 7.286e2$ ; $R^2: 0.9980$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Dihydrostreptomycin	双氢链霉素	8.34	5-500 ppb	1 ppb	$Y = 1.859e2X + 1.588e2$ ; $R^2: 0.9979$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Apramycin	安普霉素	11.88	2-500 ppb	1 ppb	$Y = 2.422e2X + 2.136e2$ ; $R^2: 0.9973$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Tobramycin	妥布霉素	12.81	1-500 ppb	0.5 ppb	$Y = 5.336e2X + 3.703e2$ ; $R^2: 0.9993$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Sisomicin	西索米星	14.14	2-500 ppb	0.2 ppb	$Y = 2.081e4X - 5.782e3$ ; $R^2: 0.9934$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Neomycin Sulfate	新霉素	14.26	2-500 ppb	1 ppb	$Y = 6.221e2X + 1.424e2$ ; $R^2: 0.9950$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Paromomycin Sulfate	巴龙霉素	14.3	2-500 ppb	1 ppb	$Y = 3.934e2X + 3.421e2$ ; $R^2: 0.9973$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Netilmicin	奈替米星	14.98	5-500 ppb	2 ppb	$Y = 2.76e2X + 5.006e2$ ; $R^2: 0.9941$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Gentamicin	庆大霉素	15.19	10-500 ppb	5 ppb	$Y = 1.546e2X - 1.018e2$ ; $R^2: 0.9961$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Etimicin	依替米星	15.18	20-500 ppb	10 ppb	$Y = 1.51e2X + 2.311e3$ ; $R^2: 0.9948$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area
Spectinomycin	大观霉素	8.49	20-500 ppb	10 ppb	$Y = 5.833e1X + 6.863e2$ ; $R^2: 0.9941$ ; Origin: Ignore; W: 1/X; Area

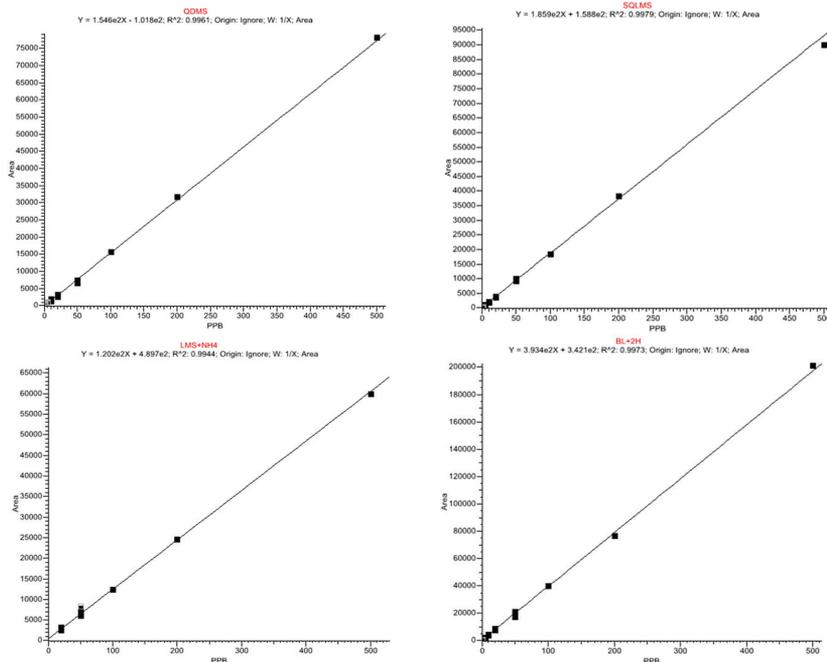


图3. 部分氨基糖苷类抗生素化合物标准曲线图

### 3. 色谱图

采用上述仪器分析方法检测猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素化合物，浓度为50 ppb，各化合物的提取离子流见图4

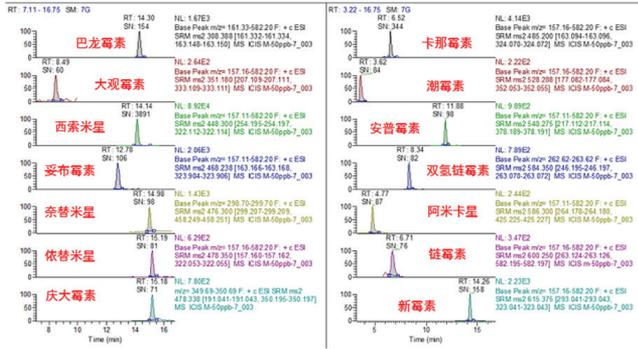


图4：猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素化合物提取离子流图

### 4. 稳定性测试

采用上述仪器分析方法对猪肉基质中浓度为50 ppb的14种氨基糖苷类抗生素进行稳定性测试 (n=6)，RSD%均<10%，LOQ连续6针的RSD%均<16%，其中双氢链霉素10 ppb时连续6针RSD%为4.5% (见图5)。14种氨基糖苷类抗生素在50 ppb和LOQ浓度水平连续6针RSD%测试结果见表4，结果表明稳定性良好。

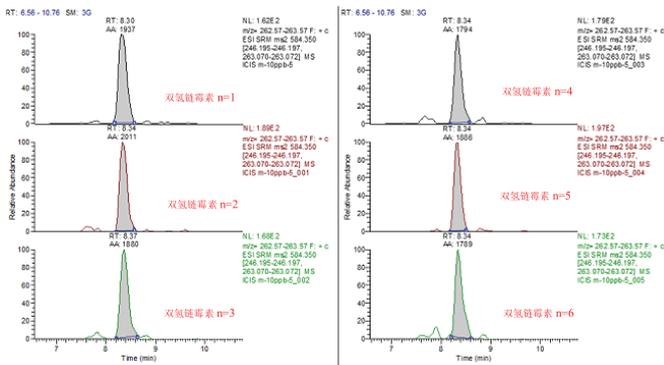


图5 双氢链霉素提取离子流图 (n=6, 浓度为10 ppb)

Compounds	Response/50ppb	RSD % (n=6)	RT	LOQ	RSD% (LOQ, N=6)
Tetracycline hydrochloride	潮霉素	3044	4.91	3.62	5 ppb 10.25
Amikacin	阿米卡星	3478	5.42	4.81	5 ppb 12.01
Streptomycin	链霉素	6725	9.39	6.74	20 ppb 7.81
Kanamycin	卡那霉素	52285	2.8	6.52	2 ppb 3.23
Dihydrostreptomycin	双氢链霉素	10052	2.73	8.34	5 ppb 7.13
Apramycin	安普霉素	12880	2.06	11.88	2 ppb 10.54
Tobramycin	妥布霉素	26325	1.78	12.81	1 ppb 8.31
Sisomicin	西索米星	961766	2.4	14.14	2 ppb 4.09
Neomycin Sulfate	新霉素	29207	4.99	14.26	2 ppb 8.72
Paromomycin Sulfate	巴龙霉素	19383	6.42	14.3	2 ppb 15.55
Netilmicin	奈替米星	13716	4.19	14.98	5 ppb 12.06
Gentamicin	庆大霉素	7225	3.74	15.19	10 ppb 14.41
Etimicin	依替米星	9133	3.1	15.18	20 ppb 7.28
Spectinomycin	大观霉素	3861	3.58	8.49	20 ppb 8.41

表4. 猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素化合物50 ppb和LOQ连续6针的RSD%

### 结论

本文建立了离子色谱 (ICS5000) 串联三重四极杆质谱仪 (TSQ Fortis) 检测猪肉基质中14种氨基糖苷类抗生素的分析方法。由实验结果可以看出，基于IC-MS/MS建立的检测方法灵敏度高、稳定性和线性范围良好，适用于氨基糖苷类抗生素药的常规分析检测。

### 参考文献

- [1] McGlinchey T A, Rafter P A, Regan F, et al. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 624(1): 1-15.
- [2] 张红, 程寒飞. 水环境中氨基糖苷类抗性基因污染及研究进展[J]. 环境科学与技术, 2018,41 ( 10 ) : 121-130. Zhang Hong, Cheng Hanfei. Aquatic environmental pollution of aminoglycoside resistance genes: a review [J]. Environmental Science&Technology, 2018, 41(10):121-130.



热线 800 810 5118  
赛默飞 电话 400 650 5118  
官方微信 www.thermofisher.com