

## 使用两性离子固定相和液相色谱-串联质谱法分析食品中的氨基糖苷类抗生素

---

Jinchua Yang, Paul D. Rainville

Waters Corporation

---

### 摘要

本研究系统地考察了色谱条件（例如，流动相、pH和离子强度或缓冲液浓度）对使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱分离17种强极性氨基糖苷类抗生素(AMG)的影响。本研究涉及的AMG包括阿米卡星(AMI)、安普霉素(APR)、庆大霉素(GEN C1、C1a、C2/C2a)、潮霉素B(HYG)、卡那霉素(KAN)、春雷霉素(KAS)、新霉素(NEO)、新霉素(或新霉素A、NEO A)、巴龙霉素(PAR)、核糖霉素(RIB)、大观霉素(SPC)、链霉素(STP)、双氢链霉素(DSTP)、西索米星(SIS)和妥布霉素(TOB)。使用由20 mM甲酸铵水溶液(pH 3.0)和0.1%甲酸的乙腈溶液组成的二元流动相对这些AMG进行梯度洗脱以实现可靠且充分的分离，并通过电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)发挥优异的灵敏度。使用三氯乙酸溶液萃取食品样品。使用Oasis HLB小柱优化固相萃取(SPE)和净化程序。利用牛奶、牛肉、猪肉、肝脏和蜂蜜样品评估该方法的性能。16种AMG获得了良好的灵敏度、准确度和精密度性能特征，证明最终优化的HILIC-ESI-MS/MS方法可靠、准确且灵敏，适用于测定食品中的AMG。

### 优势

- 使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱可靠地分离17种氨基糖苷类抗生素
  - 高灵敏度HILIC-MS/MS方法，满足主要市场的法规要求
  - 准确可靠地测定牛奶、肌肉、肝脏和蜂蜜中的AMG
-

- 兼容MS的流动相，无需使用离子对试剂或高浓度缓冲液

---

## 简介

氨基糖苷类抗生素(AMG)是一类重要的抗生素，广泛用于人用药品及兽药中治疗革兰氏阴性菌感染引起的疾病。AMG在畜牧业中的超说明书用药（例如，不遵守治疗后的停药时间）可能导致食品中存在高残留AMG。食品中存在的AMG会对消费者健康构成威胁，因为它们具有毒性和致敏性，并可能导致抗生素耐药性。监测食品中的AMG含量对于确保正确使用AMG以及食品安全至关重要。已经有多个国家/地区和国际组织规定了动物源性食品中的AMG最大残留限量(MRL)（见表1）<sup>1-5</sup>。

AMG为水溶性、极性化合物，离子对试剂已成功用于AMG的反相液相色谱分析<sup>6,7</sup>。但是，由于离子对试剂在实际使用中的相关问题，例如平衡缓慢以及可能对其他非离子对应用产生不利影响，这种方法的应用受到限制<sup>8</sup>。另外也可以使用亲水作用液相色谱法(HILIC)分析AMG，但使用酰胺或氨丙基HILIC固定相时，观察到这些化合物的分离选择性有限<sup>9</sup>。有研究报道，与酰胺或氨丙基色谱柱相比，两性离子固定相在AMG的分离中表现出更出色的分离度，但某些两性离子HILIC色谱柱需要采用缓冲液浓度较高（高达175 mM）的流动相，这种条件不利于LC-MS分析<sup>9</sup>。

本研究通过电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)法评估了Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱（采用基于BEH颗粒的两性离子磺烷基甜菜碱固定相）分析食品中17种AMG的性能。本研究涉及的AMG包括阿米卡星(AMI)、安普霉素(APR)、庆大霉素(GEN C1、C1a、C2/C2a)、潮霉素B(HYG)、卡那霉素(KAN)、春雷霉素(KAS)、新霉素(NEO)、新霉素(或新霉素A、NEO A)、巴龙霉素(PAR)、核糖霉素(RIB)、大观霉素(SPC)、链霉素(STP)、双氢链霉素(DSTP)、西索米星(SIS)和妥布霉素(TOB)。这些AMG的结构如图1所示。本研究系统地评估了色谱条件对AMG分离和检测的影响，调整并优化了最初用于STP、DSTP、GEN和NEO的固相萃取和净化程序<sup>10</sup>。利用牛奶、肌肉、肝脏和蜂蜜样品评估了方法性能。

国家/地区 或组织	基质	MRL (µg/kg)						
		APR	DSTP/STP	GEN (C1, C1A, C2, C2A)	KAN	NEO	PAR	SPC
美国	肌肉		500	100		1,200		250 <sup>B</sup> ; 100 <sup>A</sup>
	脂肪		500	400 <sup>S</sup>		7,200		100 <sup>A</sup>
	肝脏		500	300 <sup>S</sup>		3,600		100 <sup>A</sup>
	肾脏	100 <sup>S</sup>	2,000	400 <sup>S</sup>		7,200		4,000 <sup>B</sup> ; 100 <sup>A</sup>
	牛奶		125			150		
欧盟	肌肉	1,000	500	50	100	500	500	300
	脂肪	1,000	500	50	100	500		500
	肝脏	10,000	500	200	600	500	1,500	1,000
	肾脏	20,000	1,000	750	2,500	5,000	1,500	5,000
	牛奶		200	100	150	1,500		200
	鸡蛋					500		
中国	肌肉		600	100	100	500		500
	脂肪		600	100	100	500		2,000
	肝脏		600	2,000	600	5,500		2,000
	肾脏	100	1,000	5,000	2,500	9,000		5,000
	牛奶		200	200	150	1,500		200
	鸡蛋					500		2,000
日本	肌肉	500 <sup>B,A</sup> ; 60 <sup>S</sup>	600	100	40 <sup>B,S</sup> ; 200 <sup>A</sup>	500		500
	脂肪	500 <sup>B,A</sup> ; 60 <sup>S</sup>	600	100	40 <sup>B,S</sup> ; 300 <sup>A</sup>	500		2,000
	肝脏	5000 <sup>B</sup> ; 60 <sup>S</sup> ; 500 <sup>A</sup>	600	2,000	1,000 <sup>B</sup> ; 900 <sup>S</sup> ; 13,000 <sup>A</sup>	500		2,000
	肾脏	15,000 <sup>B</sup> ; 2,000 <sup>S,A</sup>	1,000	5,000	13,000 <sup>B</sup> ; 4,000 <sup>S</sup> ; 25,000 <sup>A</sup>	10,000		5,000
	牛奶		200	200	700	1,500		200
	鸡蛋				200	500		2,000
国际食品法典	肌肉		600	100		500		500
	脂肪		600	100		500		2,000
	肝脏		600	2,000		500		2,000
	肾脏		1,000	5,000		10,000		5,000
	牛奶		200	200		1,500		200
	鸡蛋					500		2,000

注:A:禽类;B:牛;S:猪。  
来源:见参考文献1-5。

表1.不同国家/地区和组织规定的动物源性食品中AMG的MRL

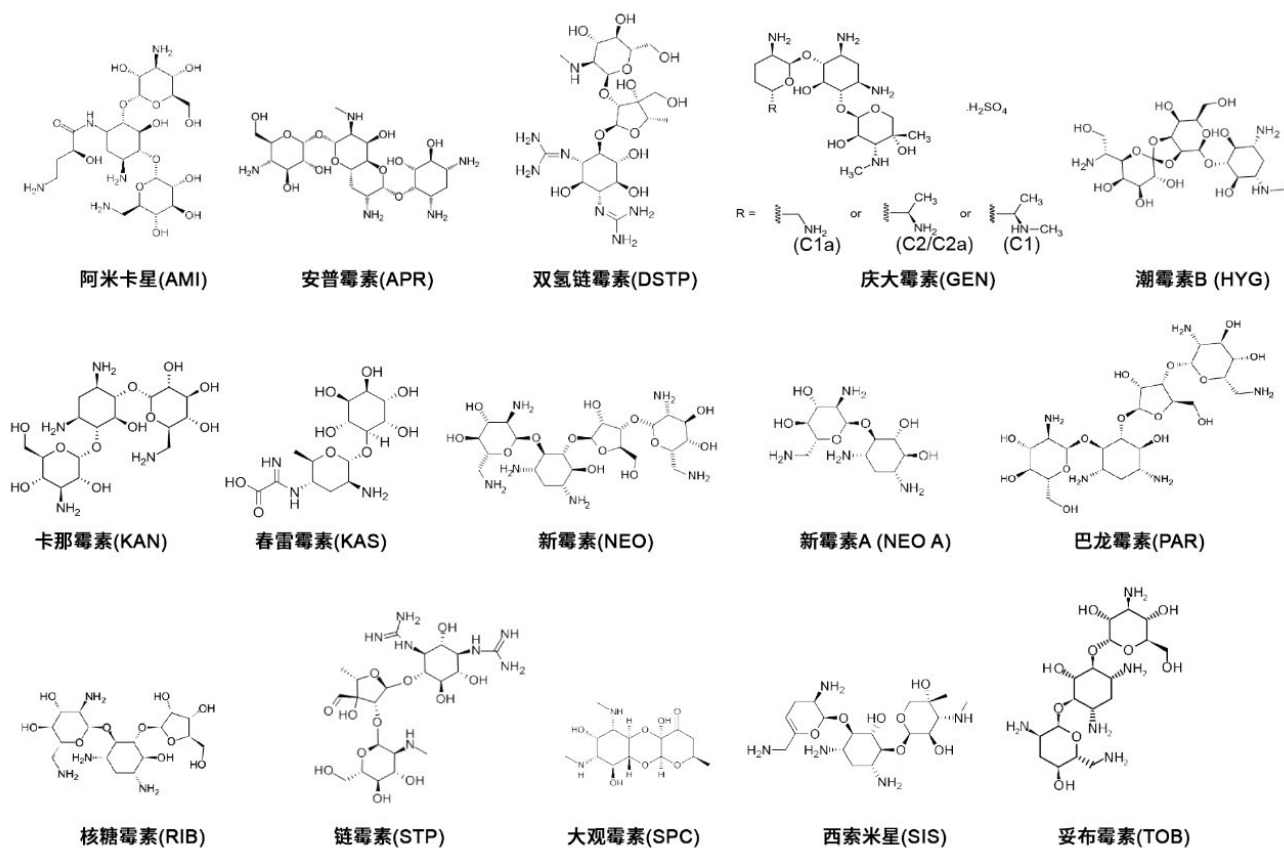


图1.本研究涉及的AMG的结构。庆大霉素有4种异构体(C1, C1A, C2, C2A)。

## 实验

所有食品样品和AMG标样均在聚丙烯(PP)或塑料容器或实验室器皿中制备。

## 化学品与溶液

阿米卡星、潮霉素B、硫酸核糖霉素、硫酸西索米星、硫酸庆大霉素、新霉素三硫酸盐水合物、硫酸妥布霉素和硫酸卡那霉素购自Sigma-Aldrich (美国宾夕法尼亚州阿伦敦)。盐酸新霉素(或新霉素A)、硫酸安普霉素、盐酸春雷霉素、硫酸链霉素、硫酸巴龙霉素、硫酸双氢链霉素和大观霉素二盐酸盐水合物购自Cayman Chemical (美国密歇根州安娜堡)。GEN由四种组分(GEN C1、C1a、C2和C2a)的混合物组成, GEN C2和C2a为立体异构体

。这些AMG的结构如图1所示。

将AMG标准品溶于去离子水(>18.2 Mohm·cm)中制得标准储备液(1 mg/mL)。混合各标准储备液并用去离子水稀释，制得混合标准工作溶液。所有溶液均盛装于PP容器中，储存在冷冻柜(-20 °C)中。使用AMI作为内标(IS)。

制备包含10 mM乙酸铵、0.4 mM乙二胺四乙酸(EDTA)、0.5%氯化钠和2%三氯乙酸(TCA)的提取溶液，方法如下：称取0.385 g乙酸铵加入500 mL容量瓶中。加入约450 mL去离子水，溶解乙酸铵。用甲酸(FA)试剂将pH调节至4.0后，向容量瓶中加入0.074 g乙二胺四乙酸二钠盐二水合物、2.5 g氯化钠和10 g TCA。充分混合，使固体溶解，加去离子水至刻度。

## 样品描述

牛奶、肌肉（牛肉和猪肉）、肝脏（家禽）和蜂蜜样品均购自当地商店。本研究还包括蜂蜜，因为蜜蜂细菌感染的治疗会用到AMG。蜂蜜和牛奶样品储存在冰箱(0–4 °C)中，肌肉和肝脏样品保存在冷冻柜(-20 °C)中。

## 样品提取与净化

在50 mL PP离心管中，将3 g蜂蜜、牛奶或捣碎的肌肉或切碎的肝脏组织与20 mL提取溶液混合。将离心管高速(3200 RPM)涡旋2 min，然后在冰箱中放置30 min。将样品再次涡旋混合，并在4 °C下以3200 g离心10 min。用塑料移液管定量移取上清液至另一个50 mL PP离心管中。在固相萃取(SPE)和净化之前，采用经校准的pH计，将上清液用碱性溶液（50%和10%氢氧化钾溶液）调节至pH 6.75 ± 0.25。在上样所有上清液（约18 mL）之前，将SPE小柱（Oasis HLB SPE小柱，6 cc Vac小柱，500 mg吸附剂，60 μm，部件号：[186000115 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000115-oasis-hlb-6-cc-vac-cartridge-500-mg-sorbent-per-cartridge-60--m-.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186000115-oasis-hlb-6-cc-vac-cartridge-500-mg-sorbent-per-cartridge-60--m-.html)）用3 mL甲醇和3 mL去离子水活化和平衡。上样后，用3 mL去离子水冲洗小柱，并在真空下干燥15 min。用3 mL洗脱溶液（含10% (v/v)甲酸和5% (v/v)异丙醇的水溶液）洗脱分析物。最终提取物不经任何复溶或稀释，通过LC-MS/MS进行分析。在SPE净化程序中使用沃特世（真空）萃取装置（部件号：186008998）和Otto SPEcialist正压萃取装置（部件号：[725000682 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/725000682-otto-specialist-positive-pressure-manifold.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/725000682-otto-specialist-positive-pressure-manifold.html)），二者获得相媲美的结果。使用Oasis PRiME HLB小柱（部件号：[186008718 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186008718-oasis-prime-hlb-6-cc-vac-cartridge-500-mg-sorbent-per-cartridge-.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/186008718-oasis-prime-hlb-6-cc-vac-cartridge-500-mg-sorbent-per-cartridge-.html)）也获得相媲美的结果，且无需活化和平衡步骤。

## 液相色谱条件

液相色谱系统： 配备二元溶剂管理器的Arc Premier系统

质谱系统： Xevo TQ-S micro系统

运行时间： 10.0 min

色谱柱： Atlantis Premier BEH Z-HILIC (2.5  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  150 mm, 部件号： 186009987)

温度： 50  $^{\circ}\text{C}$

流动相： A: 20 mM甲酸铵水溶液(pH 3.0)  
B: 0.1%甲酸的乙腈溶液

清除溶剂： 水/乙腈(1:9, v/v)混合溶液

进样体积： 6.0  $\mu\text{L}$

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.70	10.0	90.0	初始
1.00	0.70	75.0	25.0	6
5.00	0.70	85.0	15.0	6
8.00	0.70	85.0	15.0	6
8.10	0.70	10.0	90.0	6
10.00	0.70	10.0	90.0	6

## 质谱条件

软件: MassLynx v4.2 SCN1017

极性: ES+

脱溶剂气温度: 600 °C

毛细管电压: 1.5 kV

锥孔气流速: 50 L/h

离子源温度: 150 °C

脱溶剂气流速: 1000 L/h

AMG	RT (min)	通道	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
KAS	1.49	<b>380.3&gt;200.1</b>	35	10
		380.3>112.0	35	20
SPC	1.56	<b>351.3&gt;333.3</b>	60	30
		351.3>140.1	60	20
HYG	1.85	<b>528.5&gt;352.3</b>	70	20
		528.5>177.1	70	20
DSTP	1.89	<b>585.5&gt;263.4</b>	110	20
		586.5>247.4	110	20
STP	1.91	<b>582.5&gt;263.5</b>	120	30
		582.5>246.4	120	40
AMI	2.21	<b>586.5&gt;163.1</b>	120	20
		586.5>425.4	120	20
KAN	2.59	<b>485.5&gt;205.1</b>	55	20
		485.5>324.30	55	20
RIB	2.87	<b>455.5&gt;163.1</b>	50	20
		455.5>295.3	50	20
NEO A	2.95	<b>323.3&gt;161.0</b>	40	10
		323.3>125.0	40	20
PAR	3.65	<b>616.5&gt;163.1</b>	80	30
		616.5>161.1	80	30
GEN C1	3.73	<b>478.5&gt;322.3</b>	50	10
		478.5>160.1	50	20
APR	3.75	<b>540.5&gt;217.1</b>	70	30
		540.5>378.4	70	20
GEN C2+C2A	3.88	<b>464.6&gt;322.3</b>	50	10
		464.6>160.1	50	20
SIS	3.91	<b>448.4&gt;160.1</b>	50	20
		448.4>322.4	50	20
GEN C1A	3.99	<b>450.4&gt;322.4</b>	40	10
		450.4>129.1	40	30
TOB	4.15	<b>468.5&gt;163.1</b>	50	20
		468.5>145.1	50	20
NEO	6.06	<b>615.6&gt;161.0</b>	70	30
		615.6>163.0	70	30

表2.本研究中使用的MRM通道、锥孔电压和碰撞能量参数。MRM定量通道以粗体显示。



---

## 结果与讨论

### 1 Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱对AMG的分离效果

流动相含水量、pH和缓冲液浓度是优化Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱对AMG分离效果的主要因素。

#### 1.1 流动相含水量的影响

图2显示了等度洗脱条件下，流动相含水量对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)上的保留时间(RT)的影响。流动相A为pH 3.0的20 mM甲酸铵水溶液，流动相B为0.1%甲酸的乙腈溶液。图2显示，流动相含水量越高，洗脱速度越快（RT越短）。

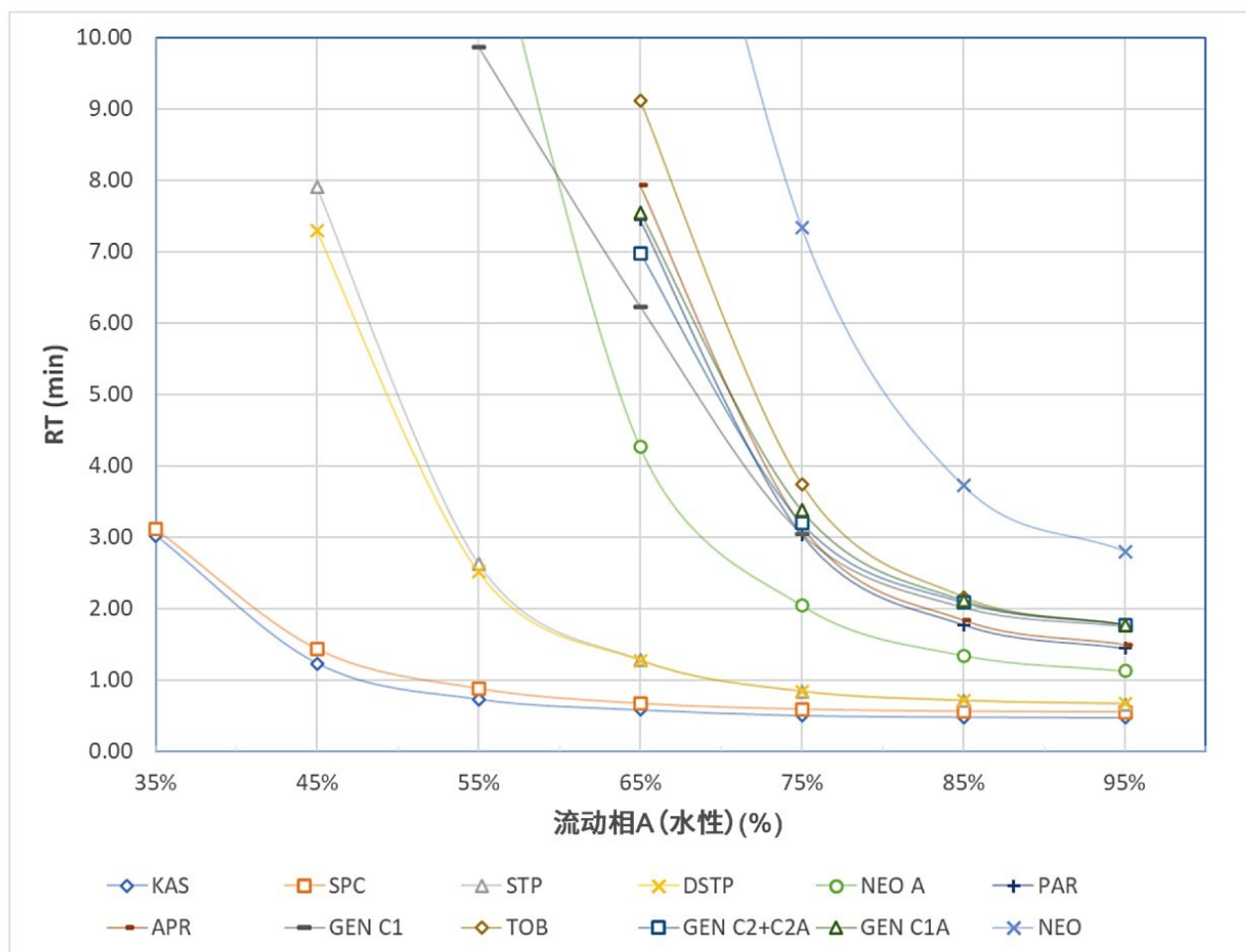


图2.流动相含水量对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱上的保留时间的影响

## 1.2 流动相pH的影响

图3显示了梯度洗脱条件下（流动相A在5 min内从20%增加至95%，在95%下保持10 min），流动相A的pH对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)上的RT的影响。流动相A为不同pH的20 mM甲酸铵水溶液，流动相B为0.1%甲酸的乙腈溶液。流速为0.2 mL/min，柱温为40 °C。图3显示，后洗脱的AMG表现出更高的pH依赖性。在高pH条件下，AMG（弱碱）离子化率降低，并与固定相具有更强的疏水作用，导致RT更长。峰形、峰强度和分离度也受流动相pH的影响。图4显示了选定AMG在与图3相同的条件下得到的色谱图。随着pH从9降至3，峰（尤其是后洗脱峰）变得更窄、更对称、强度更高且分离度更出色。

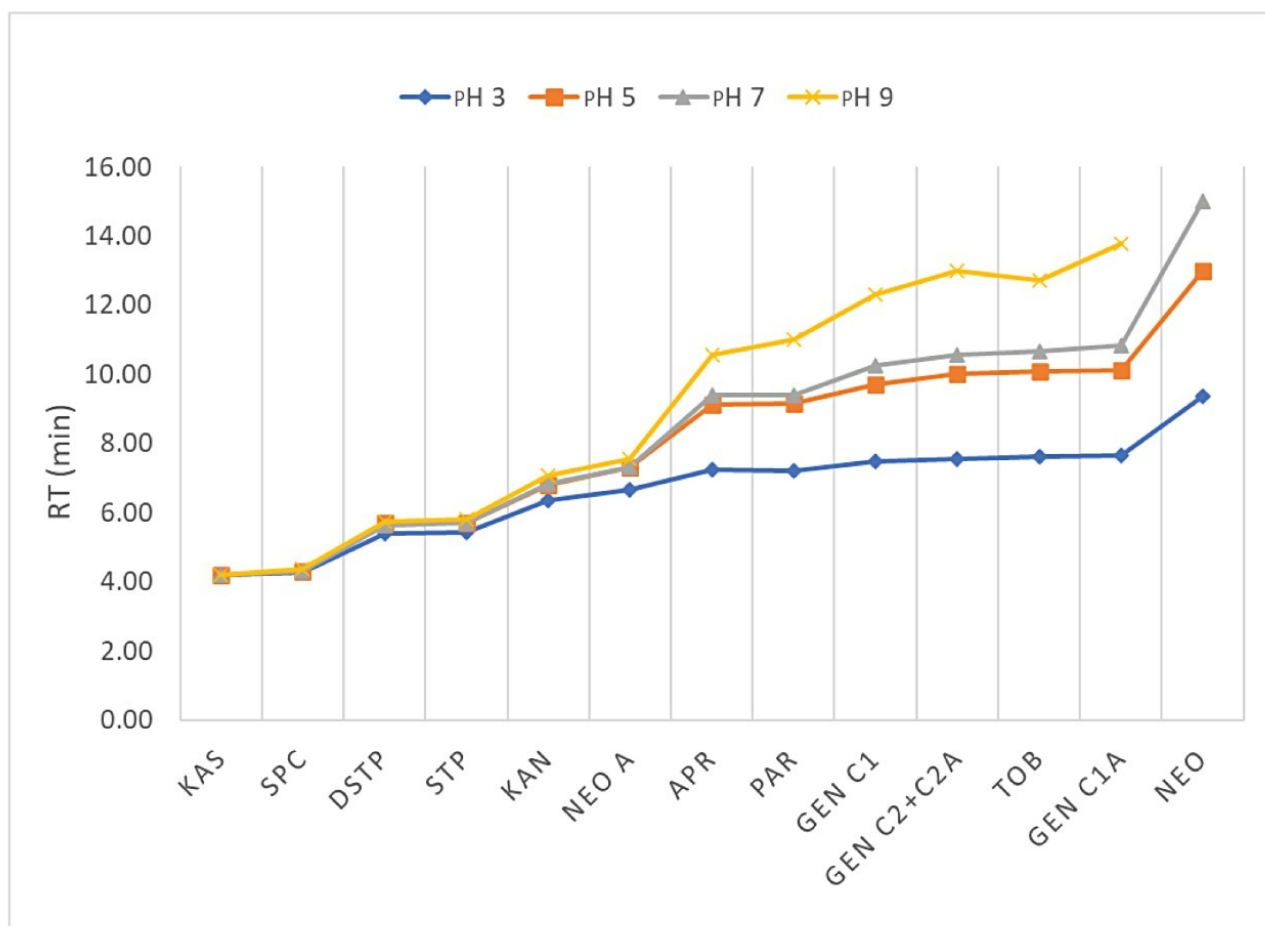


图3.pH对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱上的RT的影响

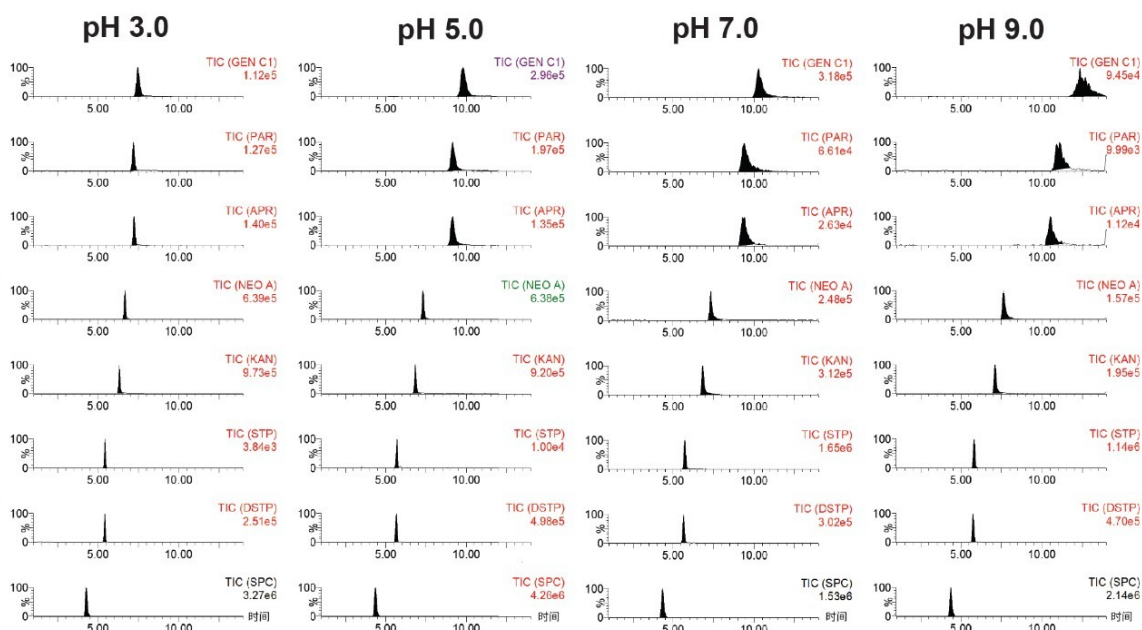


图4.水性流动相pH对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱上的RT、峰形和峰强度的影响

### 1.3 缓冲液浓度的影响

图5显示了在流速为0.7 mL/min、柱温为50 °C的条件下，水性流动相缓冲液（甲酸铵）浓度对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱(2.1 × 150 mm, 2.5 μm)上的分离效果的影响。流动相A为pH 3.0的各种浓度（5 mM、10 mM、20 mM和40 mM）甲酸铵水溶液，流动相B为0.1%甲酸的乙腈溶液。洗脱程序与实验部分所述相同。在缓冲液浓度为20 mM的条件下获得的峰强度最高。

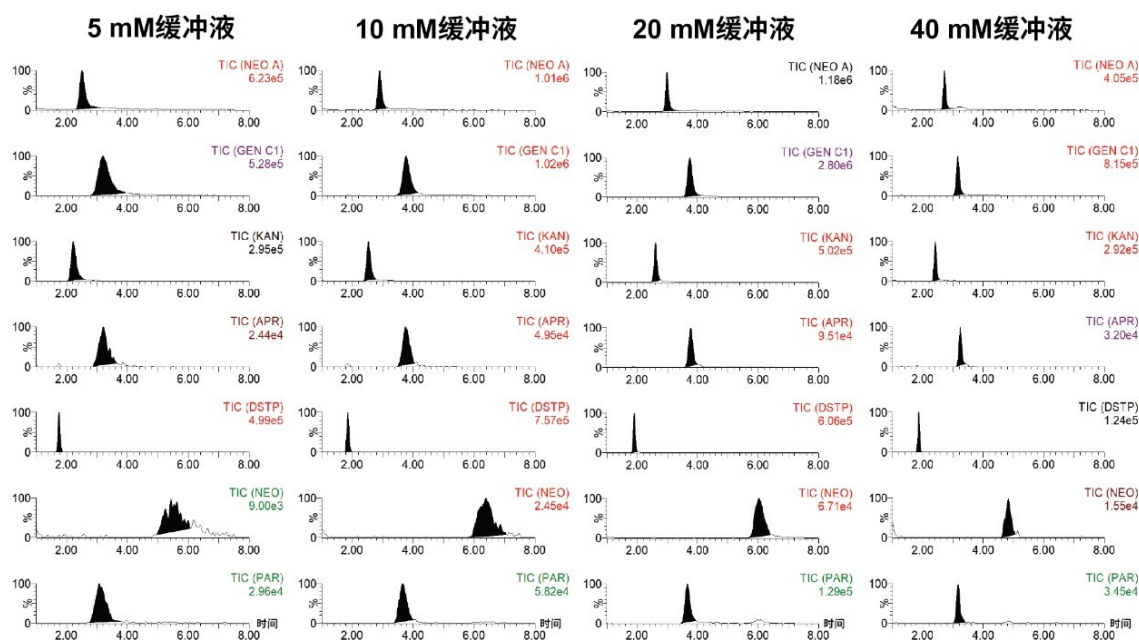


图5.水性流动相(pH 3.0)中的甲酸铵浓度对选定AMG在Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱上的峰强度和分离度的影响

## 1.4 其他因素

其他因素（例如柱温和流动相B中的甲酸浓度）对峰强度、峰形和色谱分离度的影响有限。不同粒径（1.7  $\mu\text{m}$ 和2.5  $\mu\text{m}$ ）的Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱在各种色谱条件（流动相组成、pH、缓冲液浓度等）下表现出相同的趋势。2.5  $\mu\text{m}$ 粒径的色谱柱(2.1  $\times$  150 mm)比1.7  $\mu\text{m}$ 粒径的色谱柱(2.1  $\times$  100 mm)在相应梯度洗脱条件下(0.2 mL/min)下支持更高的流速(0.7 mL/min，有助于缩短运行时间。最终优化方法采用2.5  $\mu\text{m}$ 粒径的色谱柱(2.1  $\times$  150 mm)。

## 2. 分析选择性

在空白肌肉样品中发现SPC干扰峰。最初使用的MRM通道为351>98和351>207，其他报告中也使用这些通道<sup>9</sup>。本研究发现空白肌肉样品在RT 1.62 min处有一个未知峰，与SPC峰(RT 1.56 min)重叠。该未知峰的离子丰度比也与SPC有所不同。为避免该未知峰可能产生的干扰，我们的方法中使用了SPC的备选MRM通道（351>333和333>140），未发现来自空白样品的干扰峰。

此外，还优化了DSTP的MRM通道，以减少同位素取代STP的干扰。STP（分子量581 Da）和DSTP（分子量583

Da) 的化学结构相似，并且它们的碎裂模式相同。STP具有与DSTP质量数相同的同位素峰，相对丰度为5.8%（相对于581  $m/z$ 处的单同位素峰），该同位素峰会干扰DSTP的定量。DSTP的备选MRM通道涉及同位素取代DSTP的质子加合物（MRM为585>263和586>247），可将STP对DSTP的干扰降至1%以下，同时保持对DSTP具有足够高的灵敏度。难以完全消除STP同位素物质的干扰。

### 3. 基质效应

图6显示了AMG的LC-MS/MS分析中的基质效应。本研究利用SPE净化后加标1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准品的空白样品提取物与SPE洗脱溶液中1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准品的峰面积比评估了基质效应。在这些AMG中观察到不同程度的基质效应，从强离子抑制（比率低至20%以下）到强离子增强（比率高达170%以上）皆有。AMG定量分析需要进行基质匹配校准。

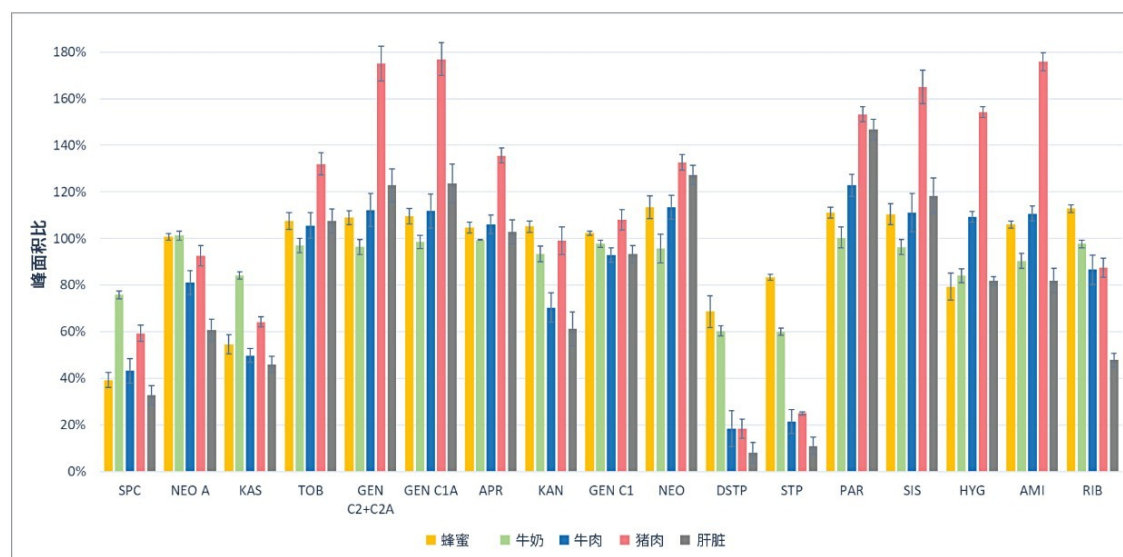


图6.基质效应用加标1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的空白食品样品（SPE净化后）与SPE洗脱溶液中1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标准品的峰面积比表示。误差条表示 $\pm SD$  ( $n = 4$ )。

### 4. SPE回收率

利用样品前处理开始时加标的空白样品与SPE净化后加标的空白样品的峰面积比计算回收率（见图7）。加标浓度为1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。所有五个样品（蜂蜜、牛奶、牛肉、猪肉和肝脏）中大多数AMG（KAS除外）的回收率在约40%~100%之间，与类似食品基质中报告的结果相当<sup>7,9</sup>。KAS的回收率不佳，这与它的 $pK_a$ 值较低（ $pK_{a1}$ 为3.23）有关，其他AMG的 $pK_a$ 值均为大约7或更高。KAS以离子化形式存在于SPE上样溶液中（pH调节至6.75  $\pm$

0.25)，不会被Oasis HLB吸附剂保留。

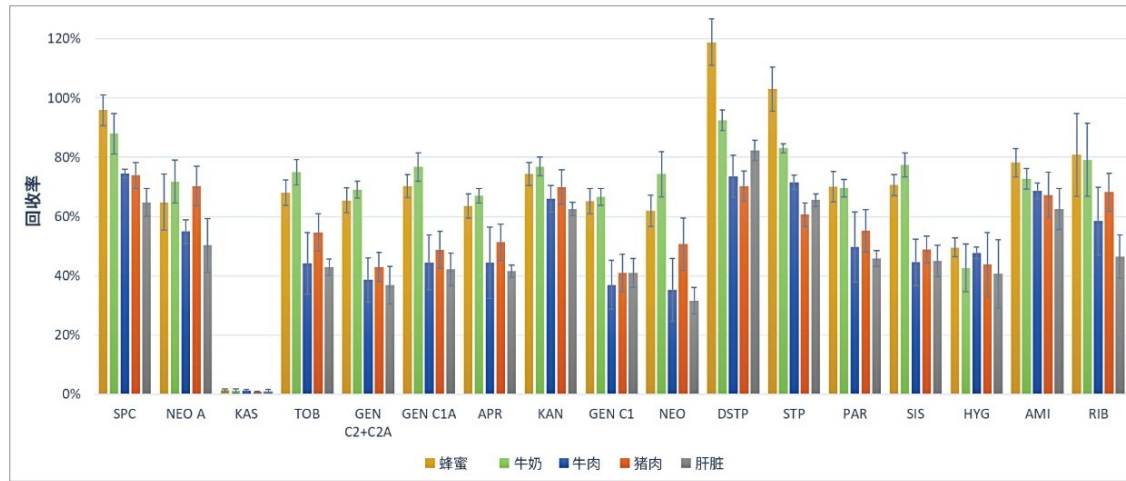


图7.加标浓度为1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的空白样品经Oasis HLB小柱萃取和净化后得到的AMG的回收率。误差条表示 $\pm SD$  ( $n = 6$ )。

## 5. LC-MS/MS方法性能特征

本研究利用牛奶、牛肉、肝脏和蜂蜜样品评估了优化后LC-MS/MS方法的性能。各种食品基质的定量限(LOQ)、决定系数( $R^2$ )、线性范围、RT和RT精密度见表3。使用以信噪比(S/N)至少为10的低浓度加标(SPE后加标)的空白样品或校准曲线中的最低浓度(以较高者为准)估算LOQ值。这些食品中的LOQ值远低于主要市场中规定的MRL(如表1所示)。使用4-6个浓度水平的基质匹配标准品(SPE后加标)获得 $R^2$ 值,在大多数食品基质中获得了优异的线性( $R^2 > 0.99$ )。使用溶剂标准品、基质匹配标准品和加标样品获得RT的相对标准偏差(RSD;  $n = 57$ , 日内精密度),所有AMG均表现出优异的RT重现性(RSD小于1.0%)。图8所示为以2500 g/kg加标的空白牛奶样品中17种AMG的叠加色谱图,最早洗脱的峰(KAS)的容量因子( $K'$ )为2.6。

通过测量加标浓度为200 g/kg的空白蜂蜜、牛奶、牛肉、猪肉和肝脏样品评估了方法准确度。准确度计算为实测浓度与加标浓度之间的比率(图9)。使用AMI作为内标。利用加标浓度为1000 g/kg的空白样品作为相应基质中的校准品(单点校准)。图9还展示了5个样品中各AMG的平均准确度和标准偏差(SD)。平均准确度范围为86%~122%,SD范围为4%~23%。这些结果与类似食品基质报告的结果一致<sup>7,9</sup>。本研究分析了8个食品样品,在这些样品中均未检出AMG。

	RT <sup>1</sup> (min)	RT RSD <sup>1</sup> (%)	LOQ (μg/kg)				线性 <sup>2</sup> (R <sup>2</sup> )				线性范围(μg/kg)			
			牛奶	牛肉	肝脏	蜂蜜	牛奶	牛肉	肝脏	蜂蜜	牛奶	牛肉	肝脏	蜂蜜
KAS	1.490	0.00%	10	25	25	100	0.9956	1.0000	1.0000	0.9996	10-2500	25-2500	25-2500	100-2500
SPC	1.558	0.24%	10	10	25	100	0.9999	1.0000	0.9999	0.996	10-2500	10-2500	25-2500	100-2500
HYG	1.848	0.48%	100	100	100	100	0.9993	0.9998	0.9997	0.9999	100-2500	100-2500	100-2500	100-2500
DSTP	1.886	0.41%	25	25	100	25	0.982	0.9986	0.9998	0.98	25-2500	25-2500	100-2500	25-2500
STP	1.906	0.35%	10	25	25	10	0.989	0.9993	1.0000	0.98	10-2500	25-2500	25-2500	10-2500
AMI	2.201	0.91%	10	10	10	10	0.9987	0.9998	1.0000	0.997	10-2500	10-2500	10-2500	10-2500
KAN	2.578	0.29%	10	10	10	10	0.9997	0.9996	0.9999	0.9994	10-2500	10-2500	10-2500	10-2500
RIB	2.852	0.26%	10	10	10	10	0.9997	0.9996	0.998	0.9995	10-2500	10-2500	10-2500	10-2500
NEO A	2.945	0.28%	10	10	10	10	0.9997	0.9997	0.9992	0.9999	10-2500	10-2500	10-2500	10-2500
PAR	3.623	0.53%	25	25	25	25	0.9998	0.9998	0.9996	0.9997	25-2500	25-2500	25-2500	25-2500
GEN (C1)	3.703	0.42%	10	25	25	25	0.995	0.995	0.996	0.992	10-2500	25-2500	25-2500	25-2500
APR	3.724	0.50%	25	25	25	25	0.996	0.997	0.997	0.999	25-2500	25-2500	25-2500	25-2500
GEN (C2/C2A)	3.852	0.42%	10	25	25	25	0.997	0.997	0.997	0.994	10-2500	25-2500	25-2500	25-2500
SIS	3.888	0.44%	25	25	25	25	0.998	0.997	0.997	0.995	25-2500	25-2500	25-2500	25-2500
GEN (C1A)	3.964	0.49%	25	25	25	25	0.998	0.998	0.998	0.996	25-2500	25-2500	25-2500	25-2500
TOB	4.130	0.42%	10	25	25	10	0.9992	0.9992	0.9995	0.998	10-2500	25-2500	25-2500	10-2500
NEO	6.023	0.60%	25	25	25	25	0.9991	0.9985	0.998	0.997	25-2500	25-2500	25-2500	25-2500

注: 1)在4种基质(牛奶、牛肉、肝脏和蜂蜜)中, n = 57, 日内重现性; 2) 4-6个浓度水平下的峰面积线性拟合;

表3.LC-MS/MS方法分析牛奶、牛肉、肝脏和蜂蜜样品的性能特征

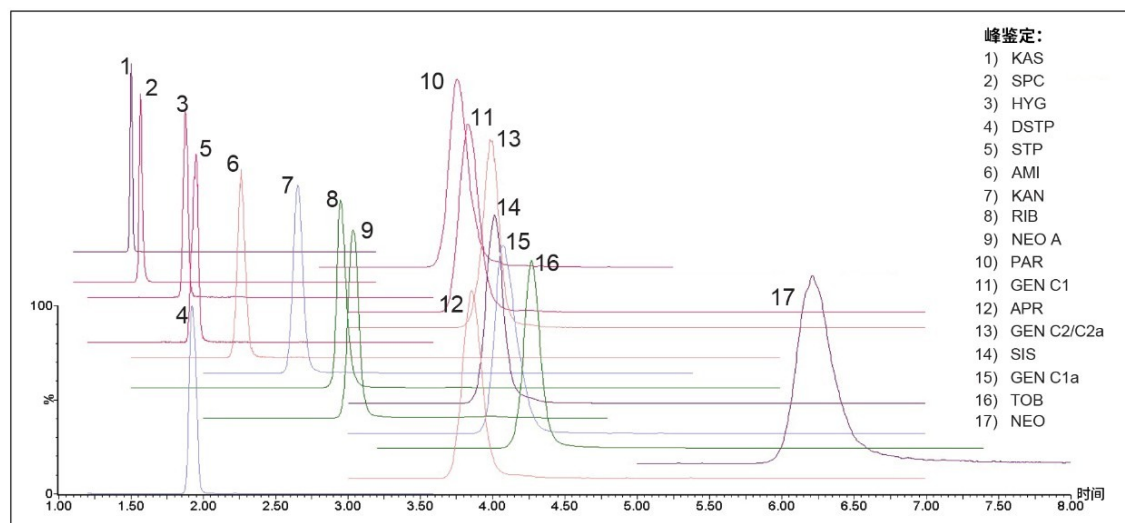


图8.在最终优化条件下获得的2500 μg/kg加标空白牛奶样品中17种氨基糖苷类抗生素的叠加色谱图



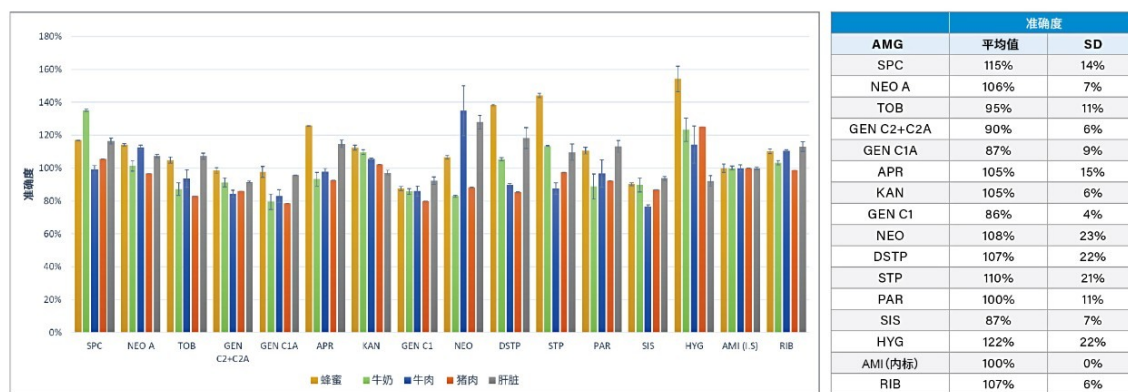


图9.使用单点校准和一种内标(AMI)测定加标空白样品(200 µg/kg)中AMG含量的准确度。(n = 2, 误差条表示与平均值的偏差)。

## 6. 讨论

各种AMG具有相似的结构,难以分离。Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱在优化的色谱条件(包括pH 3.0的20 mM甲酸铵水性流动相)下为17种AMG提供了良好的分离度。其他磺烷基甜菜碱固定相需要明显更高的缓冲液浓度(高达175 mM甲酸铵)<sup>9</sup>,该条件不适用于MS检测。理想缓冲液浓度差异的原因尚不清楚,但据称与BEH颗粒有关,该颗粒与硅胶颗粒相比具有更低的硅醇活性。最终方法中不包括KAS,因为该化合物在SPE过程中未得到充分保留。但是,可以在SPE净化之前使用提取物直接分析。

## 结论

本研究系统地考察了色谱条件(包括流动相组成、缓冲液浓度和pH)对Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱上AMG分离效果的影响。不同于需要甲酸铵浓度高达175 mM的其他两性离子磺烷基甜菜碱固定相,Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱使用pH 3.0的20 mM甲酸铵水溶液与0.1%甲酸的乙腈溶液进行梯度洗脱,只需10 min运行时间,17种常用AMG即获得充分分离和优异的灵敏度。Oasis HLB SPE小柱为16种AMG提供了令人满意的净化和回收率。本研究利用牛奶、肌肉、肝脏和蜂蜜样品评估了基于Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱和Oasis HLB小柱的优化后LC-MS/MS方法的性能,所有化合物均获得了优异的灵敏度、良好的准确度和精密度。证明该HILIC-MS/MS方法为筛查和定量食品中的AMG提供了一种良好的解决方案。

---

## 参考资料

1. Tolerances for Residues of New animal Drugs in Food.21 C.F.R. § 556 (2020) Code of Federal Regulations, revised as of April 1, 2020, 21CFR556.网站：  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556&showFR=1> <  
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=556&showFR=1>>  
.
2. Commission regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin.Official J. European Union L15, 20.1.2010.
3. 《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019), 2019年9月6日发布.2020年4月1日起实施 .中国农业农村部.
4. The Japan Food Chemical Research Foundation, Positive List System – Antibiotics.网站：  
<https://www.ffcr.or.jp/en/zanryu/the-japanese-positive/positive-list-system---antibiotics.html> <  
<https://www.ffcr.or.jp/en/zanryu/the-japanese-positive/positive-list-system---antibiotics.html>> .
5. Maximum Residue Limits (MRLs) and Risk Management Recommendations (RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods CX/MRL 2-2018, Codex Alimentarius International Food Standards, Food and agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.网站：  
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/veterinary-drugs/en/> <  
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/vetdrugs/veterinary-drugs/en/>>
6. Screening for Aminoglycosides by LC/MS-MS, USDA Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health Science, CLG-AMG4.03, effective: Nov 2nd, 2020.
7. Glinka, M., Wojnowski, W., Wasik, A., Determination of Aminoglycoside Antibiotics: Current Status and Future Trends. *Trends in Analytical Chemistry* 131 (2020) 116034.
8. Dolan, J. Ion pairing – Blessing or Curse? LCGC Europe, 2008; Volume 21, Issue 5, pp 258-263.
9. Díez C, Guillarme D, Staub Spörri A, Cognard E, Ortelli D, Edder P, Rudaz S. Aminoglycoside Analysis in Food of Animal Origin With a Zwitterionic Stationary Phase and Liquid Chromatography-Tandem

Mass Spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2015; 882:127-39.

10. Young, M.S, van Tran, K., Goh, E., and Shia, J.C., UPLC/MS/MS测定肉类和乳品中的氨基糖苷类抗生素, 沃特世应用纪要 720004512ZH, 2012.

---

## 特色产品

Arc Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135083359>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007442ZH, 2021年12月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.