

LC-MS/MS结合离子色谱电解再生膜抑制器技术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

关键词

TSQ Fortis, 抑制器, 氨基糖苷类抗生素

摘要

本文在Thermo Scientific™全新液相色谱串联三重四极杆质谱平台Thermo Scientific™ TSQ Fortis™上联用离子色谱电解再生膜抑制器技术,建立了快速检测动物源性食品中14种氨基糖苷类抗生素(AGs)残留的方法。流动相中加入了七氟丁酸(HFBA)和三氟乙酸(TFA)等离子对试剂,采用Thermo Scientific™ Acclaim AmG C18 氨基糖苷类专用柱,14种氨基糖苷类抗生素保留良好,分离快速。通过赛默飞离子色谱专利的电解再生膜抑制器技术,将HFBA和TFA酸根离子在进质谱前去除掉,降低污染,提高灵敏度;通过柱后加入氨水,进一步提高响应。14种AGs在相应浓度范围内线性关系良好($R^2 > 0.99$),LOD及LOQ超出相关国标规定的检测要求,其中LOQ连续6针的RSD均小于14%,重复性良好,本方法优于国标方法。

前言

氨基糖苷类抗生素(Aminoglycoside antibiotics,AGs)是一类广谱高效的抗生素,用于治疗革兰氏阴性菌引起的感染,在农业、养殖业及医疗等领域均有广泛应用。此类抗生素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^[1],极性大,易溶于水,脂溶性差,人体和禽畜的胃肠道不易吸收,通过肌肉注射后大部分以原药经肾排泄,通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^[2]。由于此类化合物极性极大,常规色谱保留弱,无紫外吸收或紫外吸收弱,业内目前也没有特别成熟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》中使用了100mM七氟丁酸(HFBA,离子对试剂)结合常规的C18柱即可实现对这类化合物的很好保留。但HFBA和TFA(三氟乙酸)这类离子对试剂

负离子响应极强,进到质谱中极易残留且不容易洗掉。残存在离子源区后,会长期影响负离子化合物的检测灵敏度。业内质谱应用中,一般不建议在流动相中添加这类离子对试剂。此国标中,检测的10种氨基糖类抗生素分别为壮观霉素、双氢链霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、妥布霉素、庆大霉素、新霉素、潮霉素B、安普霉素,线性范围中的线性低点为50ppb(前7种,LOQ为20 μg/kg)和300ppb(后3种,LOQ为100 μg/kg),灵敏度不高。

本文基于Thermo Scientific™ Vanquish™ Binary Horizon与Thermo Scientific™ TSQ Fortis™三重四极杆质谱仪联用技术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。此方法也在流动相中添加了HFBA和TFA等离子对试剂以增强这些化合物的保留性质,结合Thermo Scientific™ Acclaim™ AmG C18 氨基糖苷类抗生素检测的专用柱(可耐pH范围0.5~10),再通过电解再生膜抑制器技术可有效去除流动相中的三氟乙酸根和七氟丁酸根,从而避免污染质谱,并显著提高响应。应用此方案,测试了猪肉中14种氨基糖苷类抗生素(包含国标中的10种),样品前处理方式与国标一致,灵敏度满足国标要求,且LOQ连续6针的RSD均小于14%,说明本方案可靠、稳定、灵敏。

实验方法

1. 仪器与试剂

1.1 Thermo Scientific™ Vanquish™ Binary Horizon超高效液相色谱仪

1.2 Thermo Scientific™ TSQ Fortis™三重四极杆质谱仪

1.3 Thermo Scientific™ Aquion离子色谱，带CSRS300 4mm抑制器及电导检测器

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25g，SIGMA），TFA（色谱纯100mL，SIGMA）

2. 实验方法

2.1 色谱方法

色谱柱：Thermo Scientific™ Acclaim™ AmG C18 column (150 mm*2.1 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5mM 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
1	0.5	100	0
12	0.5	85	15
15.0	0.5	85	15
15.1	0.5	100	0
21	0.5	100	0

2.2 质谱方法

电喷雾离子源（ESI），正离子模式；监测模式：选择反应监控（SRM）；喷雾电压：4000V；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；选择反应监测离子对信息见表2。Cycle time为2 s，Chromatographic Peak Width为40 s，Q1和Q3分辨率分别为0.7和1.2。

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	528.288	177.083*	27.83	122	23
CMS	528.288	352.054	22.52	122	23
AMKX	586.3	264.179	25.56	134	0
AMKX	586.3	425.226*	18.1	134	0
KNMS	485.2	163.095*	24.17	167	0
KNMS	485.2	324.071	15.83	167	0
LMS	600.25	263.125	34.78	Calibrated TF	5
LMS	600.25	582.196*	17.89	Calibrated TF	5
SQLMS	584.35	246.196	37.6	112	0
SQLMS	584.35	263.071*	30.36	112	0
DGMS	351.18	207.11	22	Calibrated TF	5
DGMS	351.18	333.11*	19	Calibrated TF	5
APMS	540.275	217.113*	26.57	145	8
APMS	540.275	378.19	16.58	145	8
TBMS	468.238	163.167*	22.61	127	0
TBMS	468.238	323.905	13.68	127	0
XSMX	448.3	254.196*	20.29	160	0
XSMX	448.3	322.113	12.12	160	0
XMS	615.375	293.042*	23.45	128	29.4
XMS	615.375	323.042	21.39	128	29.4
BLMS	308.388	161.333*	10.48	52	0
BLMS	308.388	163.149	18.65	52	0

NTMX	476.3	299.208*	19.24	141	5
NTMX	476.3	458.25	13.26	141	5
YTMX	478.338	191.042	23.53	Calibrated TF	5
YTMX	478.338	350.196*	14.48	Calibrated TF	5
QDMS	478.35	157.161	21.18	125	14.7
QDMS	478.35	322.054*	13.47	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5g(精确至0.01g)试样于50 mL聚丙烯离心管中，加入10 mL磷酸盐缓冲液均质2min，于平板振荡器上振荡提取10min，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1mol/L的盐酸调pH值为3.5±0.2，加入2mL七氟丁酸溶液，涡旋混匀。

净化：C18固相萃取柱用3mL甲醇，3mL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3mL七氟丁酸溶液淋洗，再用每次3mL水淋洗两次，弃去淋洗液，抽干5min。用5mL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℃氮气流挥去部分溶剂，用七氟丁酸溶液定容至1mL，涡旋混匀后，过0.2μm微孔滤膜，上机测定

4. 基质标曲配制

用初始流动相即5mM HFBA&100 mM TFA 水溶液分别配制100ppm的14种化合物（潮霉素、阿米卡星、安普霉素、巴龙霉素、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1mL备用，各取5μL（14个）加到930μL上述配制而得的空白基质中，获得500ppb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0.5ppb、1ppb、2ppb、5ppb、10ppb、20ppb、50ppb、100ppb、200ppb、500ppb系列标曲点。

5. 数据采集与处理软件

液相控制软件：Thermo Foundation3.1，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-置换出流动相中的TFA-和HFBA-，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

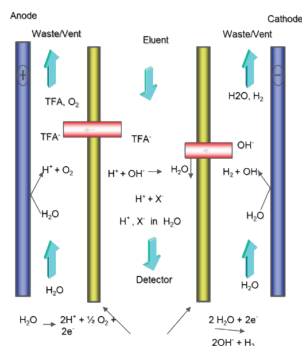


图2 电解再生膜抑制器的工作原理图

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. 14种氨基糖苷类抗生素化合物LOD, RT, 线性范围、相关系数及线性方程

Compound Name		RT/min	linear range	LOD	Curve Equation
Tetracycline hydrochloride	潮霉素	2.5	5-500ppb	2ppb	$Y = 8.162e1X + 1.375e2$; $R^2: 0.9961$; W: 1/X; Area
Kanamycin	卡那霉素	3.9	5-500ppb	1ppb	$Y = 1.633e3X - 1.094e3$; $R^2: 0.9918$; W: 1/X; Area
Streptomycin	链霉素	3.9	20-500ppb	10ppb	$Y = 1.386e1X - 1.063e2$; $R^2: 0.9926$; W: 1/X; Area
Spectinomycin	大观霉素	5.4	10-500ppb	2ppb	$Y = 8.78e1X + 1.023e3$; $R^2: 0.9962$; W: 1/X; Area
Apramycin	安普霉素	8.8	5-500ppb	1ppb	$Y = 1.86e2X + 1.395e2$; $R^2: 0.9985$; W: 1/X; Area
Neomycin Sulfate	新霉素	12	5-200ppb	1ppb	$Y = 2.204e2X + 2.805e2$; $R^2: 0.9959$; W: 1/X; Area
Paromomycin Sulfate	巴龙霉素	12	10-200ppb	2ppb	$Y = 1.605e2X - 9.405e1$; $R^2: 0.9957$; W: 1/X; Area
Sisomicin	西索米星	12	1-200ppb	0.5ppb	$Y = 1.635e4X + 2.145e3$; $R^2: 0.9972$; W: 1/X; Area
Gentamicin	庆大霉素	15	5-500ppb	2ppb	$Y = 6.959e1X + 1.692e2$; $R^2: 0.9942$; W: 1/X; Area
Amikacin	阿米卡星/丁胺卡那霉素	3.1	10-500ppb	5ppb	$Y = 8.666e1X - 6.675e1$; $R^2: 0.9929$; W: 1/X; Area
Netilmicin	奈替米星	14	5-500ppb	2ppb	$Y = 2.66e2X + 5.723e2$; $R^2: 0.9984$; W: 1/X; Area
Dihydrostreptomycin	双氢链霉素	5.5	5-500ppb	2ppb	$Y = 1.453e2X + 3.03e2$; $R^2: 0.9940$; W: 1/X; Area
Tobramycin	妥布霉素	9.6	2-500ppb	0.5ppb	$Y = 3.258e2X + 2.346e2$; $R^2: 0.9983$; W: 1/X; Area
Etimicin	依替米星	15	5-500ppb	0.5ppb	$Y = 1.466e2X + 6.768e2$; $R^2: 0.9949$; W: 1/X; Area

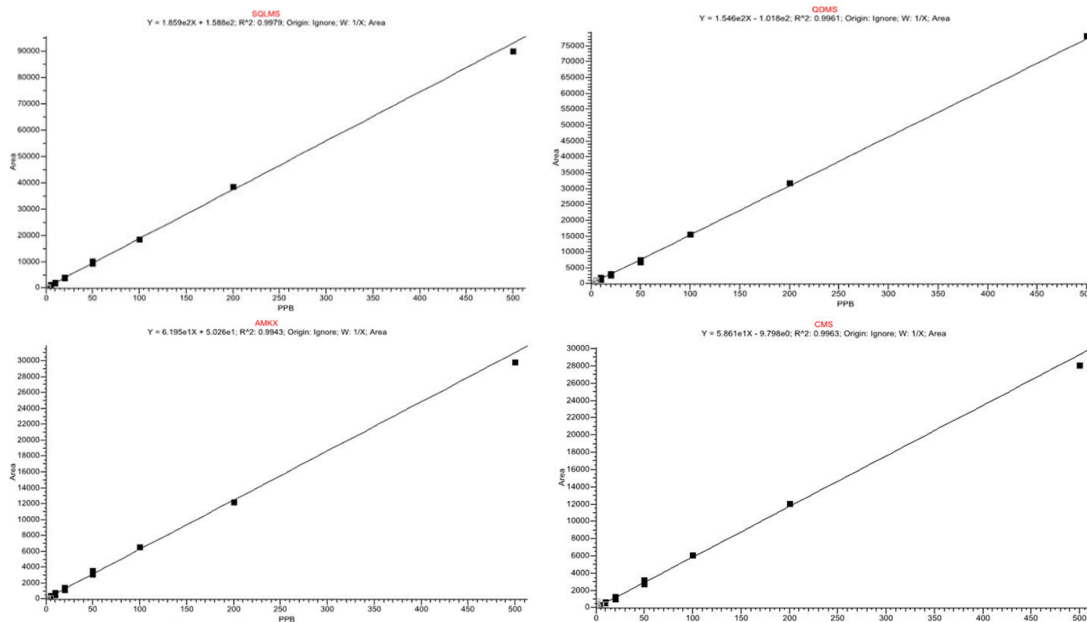


图3.部分氨基糖苷类抗生素化合物标准曲线图

3. 色谱图

采用上述仪器分析方法对 14 种氨基糖苷类抗生素化合物进行检测，浓度为 50 ppb，各化合物的提取离子流图见图4

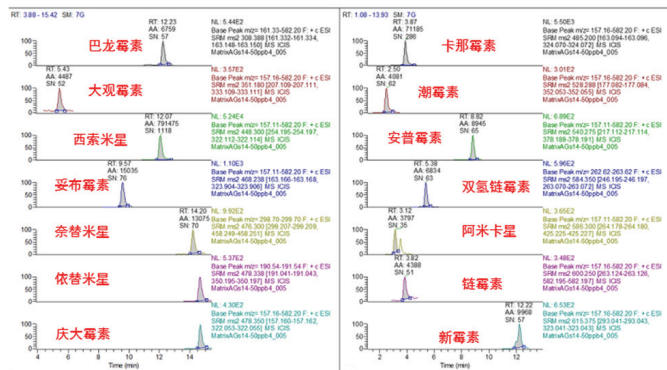


图4：14种氨基糖苷类抗生素化合物提取离子流图

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<11%，LOQ连续6针的RSD%均<14%，其中庆大霉素50ppb时连续6针RSD%为5.39%，其在LOQ的浓度水平连续6针的RSD%为13.96% (见图5)。14种氨基糖苷类抗生素在50ppb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。

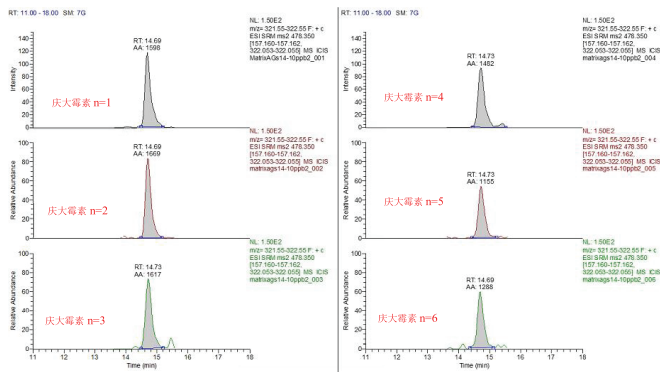


图5 庆大霉素提取离子流图 (n=6, c=10ppb)

表4.14种氨基糖苷类抗生素化合物50ppb和LOQ连续 6 针的 RSD%

Compound Name	RT/min	Res- ponse/ 50ppb	RSD%/ 50ppb	LOQ/ ppb	RSD%/ LOQ,N=6
Tetracycline hydrochloride	2.5	4405	3.3	5	9.93
Kanamycin	3.9	91222	10.94	5	11.34
Streptomycin	3.92	609	8.52	20	13.01
Spectinomycin	5.43	5022	5.12	10	5.3
Apramycin	8.82	10052	3.27	5	7.7
Neomycin Sulfate	12.22	11067	1.85	5	8.16
Paromomycin Sulfate	12.23	7813	4.28	10	7.7
Sisomicin	12.07	839034	3.6	1	2.53
Gentamicin	14.69	4076	5.39	5	13.96
Amikacin	3.12	4211	8.69	10	13.8
Netilmicin	14.2	13584	2.88	5	6
Dihydrostreptomycin	5.52	7437	6.01	5	7.7
Tobramycin	9.61	16843	2.56	2	5.27
Etimicin	14.65	8514	6.46	5	7.97

结论

本文基于LC-MS/MS结合离子色谱专利的电解再生膜抑制器技术平台建立了14种氨基糖苷类抗生素的检测方法。由实验结果可以看出，在此平台上建立的检测方法具有优异的灵敏度、稳定性和线性范围，可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.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com