

分子印迹固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法 测定牛奶中 11 种氨基糖苷类抗生素

王 敏, 马颖清, 汪弘康, 张维谊, 陈美莲, 韩奕奕, 丰东升*

[上海市农产品质量安全中心, 农业农村部食品质量监督检验测试中心(上海), 上海 201708]

摘 要: 目的 建立分子印迹固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测牛奶中 11 种氨基糖苷类抗生素(巴龙霉素、妥布霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、安普霉素、链霉素、双氢链霉素、新霉素、壮观霉素、潮霉素 B)残留的测定方法。**方法** 样品经 5%三氯乙酸-乙腈提取, 氨基糖苷类分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)固相萃取柱净化, SiELC Obelisc R 色谱柱分离, 采用超高效液相色谱-串联质谱仪进行测定。**结果** 方法检出限为 1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 2.0~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。11 种氨基糖苷类药物在 1.0~500.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内关系良好($r^2 \geq 0.9911$), 牛奶中加标回收率为 70.7%~115.6%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs) ($n=6$)为 1.1%~9.8%。**结论** 本方法准确度高、灵敏度高, 可用于牛奶中 11 种氨基糖苷类抗生素的同时检测。

关键词: 氨基糖苷类抗生素; 分子印迹固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法; 牛奶

Determination of 11 kinds of aminoglycosides in milk by molecularly imprinted solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Min, MA Ying-Qing, WANG Hong-Kang, ZHANG Wei-Yi, CHEN Mei-Lian, HAN Yi-Yi, FENG Dong-Sheng*

[Shanghai Agri-products Quality and Safety Center, Food Quality Supervision and Inspection Center of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Shanghai), Shanghai 201718, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 11 kinds of aminoglycosides (paromomycin, tobramycin, gentamicin, kanamycin, amikacin, apramycin, streptomycin, dihydrostreptomycin, neomycin, spectinomycin, hygromycin B) in milk by molecularly imprinted solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with 5% trichloroacetic acid-acetonitrile, cleaned up by a molecularly imprinted polymers (MIPs) solid phase extraction column, and separated by a SiELC Obelisc R column using an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer. **Results** The limits of detection were 1.0–5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantitation were 2.0–10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The relationships of the 11 kinds of aminoglycosides were good within the range of 1.0–500.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($r^2 \geq$

基金项目: 上海市科技兴农项目[沪农科推字(2019)第 1-2 号]

Fund: Supported by the Special Foundation for Shanghai Agriculture Committee [Hu Nong ke tuizi No. 2019 (1-2)]

*通信作者: 丰东升, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: dosfeng@qq.com

*Corresponding author: FENG Dong-Sheng, Master, Senior Agronomist, Shanghai Center of Agri-products Quality and Safety, Shanghai 201708, China. E-mail: dosfeng@qq.com

0.9911), the recoveries of spiked milk were 70.7%–115.6%, and the relative standard deviations (RSDs) ($n=6$) were 1.1%–9.8%. **Conclusion** This method is accurate and sensitive, and can be used for the simultaneous determination of 11 kinds aminoglycosides in milk.

KEY WORDS: aminoglycosides; molecularly imprinted solid phase extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; milk

0 引言

氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides)是由氨基糖分子与氨基环醇通过醚键连接而成,属广谱抗生素,对革兰氏阴性和阳性菌均有很好的抑杀作用^[1-2],其广泛用于防治各种动物性疾病,可治疗细菌性肠炎、奶牛乳房炎等^[3]。氨基糖苷类抗生素在动物性食品中残留可能会引起其过敏,长期食用可能还会引起耳毒性和肾毒性、神经肌肉阻断以及变态反应等^[4-5],药物残留导致的细菌耐药性问题也不容忽视。目前,国内外对牛奶及其他动物源性产品中氨基糖苷类药物残留限量均有明确规定。我国 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中对于牛奶中 5 种氨基糖苷类药物残留限量为 150~1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

动物源性食品中氨基糖苷类抗生素的残留测定主要有微生物法、免疫分析法、液相色谱法和液相色谱-串联质谱法等^[2]。其中液相色谱-串联质谱法由于具有定性定量准确、灵敏度高、抗基质干扰能力强等特点而得到广泛应用。我国针对不同的基质类型,制定了相应的国家检测标准,如 GB/T 21330—2007《动物源性食品中链霉素残留量测定方法 酶联免疫法》、GB/T 21323—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》、GB/T 22969—2008《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》、GB/T 22995—2008《蜂蜜中链霉素、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》等。其中 GB/T 22969—2008 仅能检测奶粉和牛奶中 3 种氨基糖苷类药物,覆盖药物种类不全且检出限较高。鉴于此类物质的危害,亟需建立一套快速、高效、准确的同时检测牛奶中多种氨基糖苷类药物残留检测方法。

氨基糖苷类抗生素的结构中含有多个氨基和羟基基团,具有较强的极性和弱碱性,易与样品基质结合,给提取带来困难,另外由于其强极性,使其无法在传统的反相色谱柱上得以保留。已建立的液相色谱-串联质谱检测方法通常是通过向流动相中添加七氟丁酸等离子对试剂来增加其在色谱柱中的保留^[6-8],但离子对试剂的长期使用会造成离子源污染、抑制电喷雾离子化效果、降低仪器灵敏度,尤其是对负离子模式的抑制更为明显。

本研究选用专属的氨基糖苷类分子印迹聚合物(molecular imprinted polymers, MIPs)固相萃取柱进行样品

前处理净化,采用一种新型的亲水性 Obelisc R 色谱柱,选择乙腈-甲酸水溶液作为流动相对氨基糖苷类药物进行分离,建立牛奶中巴龙霉素(paromomycin)、妥布霉素(tobramycin)、庆大霉素(gentamicin)、卡那霉素(kanamycin)、阿米卡星(amikacin)、安普霉素(apramycin)、链霉素(streptomycin)、双氢链霉素(dihydrostreptomycin)、新霉素(neomycin)、壮观霉素(spectinomycin)和潮霉素 B(hygromycin B) 11 种氨基糖苷类药物的超高效液相色谱-串联质谱测定方法,以期为保障乳品质量安全及残留监管提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

标准品巴龙霉素(纯度 85.0%)、妥布霉素(纯度 90.0%)、庆大霉素(纯度 90.8%)、卡那霉素(纯度 90.1%)、阿米卡星(纯度 98.3%)、安普霉素(纯度 87.6%)、链霉素(纯度 93.3%)、双氢链霉素(纯度 93.2%)、新霉素(纯度 80.0%)、壮观霉素(纯度 89.4%)、潮霉素 B(纯度 92.6%)(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 甲醇、乙腈(色谱级,德国 Merck KGaA 公司); 甲酸(色谱级,上海安谱实验科技股份有限公司); 三氯乙酸、氨水、磷酸二氢钾、七氟丁酸(分析纯,中国医药上海化学试剂公司); 实验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

SCIEX Qtrap 6500 超高效液相色谱-串联质谱仪,配电喷雾离子源(美国 SCIEX 公司); SiELC Obelisc R 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 5 μm , 美国 SIELC Technologies 公司); Supel MIP SPE-Aminoglycosides 固相萃取小柱(50 mg/3 mL, 美国 Supelco 公司); MS105 电子分析天平(精度为 0.01 mg)、ML802 电子分析天平(精度为 0.01 g)(瑞士梅特勒-托利多公司); vortex-230 v 涡旋振荡器(500~2500 r/min, 美国 Talboys 公司); SBEQ-CR1824 固相萃取装置、DC-12 水浴氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司); Thermo Heraeus X1R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.3 标准溶液的配制

准确称取适量 11 种氨基糖苷类药物标准品(需折算硫酸盐或是水合物),分别用水溶解并定容至 10 mL 塑料容量

瓶中, 配制标准贮备液, 4 °C 避光储存。

混合标准溶液以单标储备液稀释配制而成, 各组分质量浓度为: 妥布霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、安普霉素、链霉素、双氢链霉素为 1.0 µg/mL, 巴龙霉素、新霉素、潮霉素 B、壮观霉素为 5.0 µg/mL。

基质标准工作曲线的绘制: 准确移取一定量的混合标准溶液, 加入到空白基质试样中, 经样品前处理后, 得到基质标准工作曲线质量浓度为: 妥布霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、安普霉素、链霉素、双氢链霉素为 1.0~100.0 µg/kg, 巴龙霉素、新霉素、潮霉素 B、壮观霉素为 5.0~500.0 µg/kg。

1.4 实验方法

1.4.1 样品前处理

准确称取 2.00 g(精确到 0.01 g)牛奶, 加入 6 mL 5% 三氯乙酸溶液和 2 mL 乙腈, 涡旋 1 min, 超声 30 min, 于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min。取全部离心后的上清液于另一干净离心管中, 用氨水调节 pH 至 7.0~7.5, 于 4 °C、10000 r/min 离心 10 min, 取上清液待净化。

净化: 取 MIP 固相萃取柱, 使用前用 1 mL 甲醇、1 mL 50 mmol/L 磷酸二氢钾溶液(pH 7.0~8.0)活化。将上清液全部过已活化的 MIP 固相萃取柱, 用 3 mL 水淋洗小柱并抽干, 再用 3 mL 乙腈淋洗小柱并抽干, 弃去流出液。向 MIP 柱中加入 3 mL 80%乙腈(含 1%甲酸和 0.1%七氟丁酸)洗脱, 收集全部洗脱液于 15 mL 塑料离心管中, 于 45 °C 下氮吹至干, 加入 1.0 mL 80%乙腈(含 0.25%甲酸)溶解, 涡旋混匀, 用 0.22 µm 有机相滤膜过滤至塑料进样瓶中, 供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

1.4.2 液相色谱条件

色谱柱: SiELC Obelisc R (100 mm×2.1 mm, 5 µm); 流动相 A: 1%甲酸水溶液(含 2 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B: 90%乙腈水; 流速: 0.4 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 95% B; 0.5~3.0 min, 95%~55% B; 3.0~4.0 min, 55% B; 4.0~6.0 min, 55%~5% B; 6.0~8.0 min, 5% B; 8.0~8.2 min, 5%~95% B; 8.2~12.0 min, 95% B; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 µL。

1.4.3 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 正离子扫描, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 离子源温度: 450 °C; 离子化电压: 5500 V; 气帘气压力: 30 psi; 雾化气压力: 55 psi; 辅助加热气: 60 psi; 碰撞气: Medium; 11 种氨基糖苷类化合物的质谱参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

本研究考察了 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 µm)、Waters ACQUITY UPLC BEH Hilic (100 mm×2.1 mm, 1.7 µm)和 SiELC Obelisc R (100 mm×2.1 mm, 5 µm) 3 款色谱柱的分离效果。采用 T3 色谱柱时, 在流动相中

不添加离子对试剂的情况下, 只有少数化合物可以出峰且峰形较差; 采用 Hilic 色谱柱时, 11 种氨基糖苷类药物未能全部分离, 且壮观霉素无色谱峰; Obelisc R 色谱柱采用液相分离池技术, 使其色谱柱同时具有离子交换、亲水性及疏水性能力^[9]。因此, 对于氨基糖苷这类强极性化合物, 在 Obelisc R 色谱柱上各组分均能有效分离且峰形较好, 响应较高, 最终选择 Obelisc R 色谱柱为本研究的色谱柱。

2.2 流动相的选择

本研究在流动相中分别添加 0.1%、0.5%、1.0%和 2.0% 的甲酸, 考察其对峰形及响应的影响。结果表明, 添加 1% 甲酸时, 除新霉素和壮观霉素外, 各组分响应较高且峰形最佳。为提高新霉素和巴龙霉素的响应, 在流动相中分别添加不同浓度的乙酸铵(2、5、10、15 mmol/L), 结果表明, 当乙酸铵浓度为 2 mmol/L 时各组分响应最高, 随着乙酸铵质量浓度增加会产生拖尾现象。最终采用 1%甲酸水(含 2 mmol/L 乙酸铵)和 90%乙腈水作为流动相。

表 1 11 种氨基糖苷类化合物的质谱参数
Table 1 Mass spectrometry parameters of 11 kinds of aminoglycosides

化合物	分子式	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇 电压/V	碰撞 能量/V
巴龙霉素	C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O ₁₄	308.4	161.1*	40	13
			163.2	40	22
妥布霉素	C ₁₈ H ₃₇ N ₅ O ₉	468.3	163.1*	160	30
			324.2	160	19
庆大霉素	C ₂₁ H ₄₃ N ₅ O ₇	478.3	322.2*	170	19
			157.2	170	26
卡那霉素	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	485.3	163.1*	150	31
			324.3	150	22
阿米卡星	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃	586.3	425.1*	170	34
			264.1	170	26
安普霉素	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁	540.3	217.1*	180	35
			378.2	180	23
链霉素	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	582.3	263.3*	240	49
			246.2	240	42
双氢链霉素	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	584.3	263.2*	250	48
			246.2	250	40
新霉素	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	615.4	161.2*	90	38
			163.2	90	40
壮观霉素	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇	333.0	140.0*	150	29
			189.0	150	24
潮霉素 B	C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃	528.3	352.1*	180	36
			177.2	180	31

注: *代表定量离子(quantitative ion)。

2.3 提取试剂的选择

根据氨基糖苷类药物极性较大、易溶于水等性质,考虑到牛奶中主要杂质为蛋白质和脂肪,尝试使用酸性溶液和添加有机试剂使蛋白质变性沉淀的方式去除蛋白质。试样中的弱极性脂类杂质则尝试使用低温高速离心去除。实验比较了 1%三氯乙酸、3%三氯乙酸、5%三氯乙酸、1%三氯乙酸-乙腈(3:1, V:V)、3%三氯乙酸-乙腈(3:1, V:V)、5%三氯乙酸-乙腈(3:1, V:V)作为提取液。实验发现使用 5%三氯乙酸-乙腈(3:1, V:V)作为提取试剂时沉淀蛋白效果最好,使用其他几种提取试剂时提取液较浑浊,不容易通过固相萃取柱,所以最终选择 5%三氯乙酸-乙腈(3:1, V:V)作为提取试剂。

2.4 固相萃取柱的选择

目前,大多数标准和文献对于氨基糖苷类药物的净化多采用 C₁₈、N-乙基哌啶咯烷酮和二乙烯基苯亲水亲脂平衡型固相萃取柱(hydrophile-lipophile balance, HLB)和阳离子交换柱^[10-14],且洗脱液和复溶液中需添加较高浓度的离子对试剂。分子印迹聚合物是人工合成的模拟自然界中酶与底物或受体与抗体之间的相互作用,对印迹分子具有特异性识别和选择性吸附的聚合物^[15-20]。MIPs 对特定化合物具有特异选择性,因此以 MIPs 作为固相萃取吸附剂可达到净化、富集特定目标化合物的目的。故本研究选用 Supel MIP SPE-Aminoglycosides 固相萃取柱来净化、富集牛奶中的氨基糖苷类药物。

2.5 线性范围和检出限

在优化的实验条件下,在不含待测物的牛奶样品基

质中添加一系列质量浓度的混合标准溶液,经前处理后经 UPLC-MS/MS 分析测定。以定量离子峰面积为纵坐标(Y),化合物质量浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)为横坐标(X),进行回归分析,绘制标准曲线。以基线噪音的 3 倍($S/N=3$)确定方法检出限(limits of detection, LODs)为 1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,以基线噪音的 10 倍($S/N=10$)确定方法定量限(limits of quantification, LOQs)为 2.0~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果显示,11 种氨基糖苷类药物在 1.0~500.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性良好,相关系数(r^2)均大于等于 0.9911,具体结果见表 2。

2.6 方法的准确度和精密度

在不含待测物的牛奶基质中添加低、中、高 3 个不同浓度水平的混合标准溶液,按本方法进行分析测定,每个加标水平重复测定 6 次,计算目标化合物的回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs),结果见表 3。结果表明,本方法对牛奶中 11 种氨基糖苷类药物的测定具有良好的准确度和精密度,11 种氨基糖苷类药物平均加标回收率在 70.7%~115.6%之间,RSDs 在 1.1%~9.8%之间,方法准确度和精密度可满足残留分析的要求。

2.7 实际样品检测

随机选取 50 批次牛奶样品,采用本方法对样品中 11 种氨基糖苷类药物进行测定,50 批次样品中均未检出氨基糖苷类药物。图 1 为空白牛奶加标样品中 11 种氨基糖苷类药物提取离子色谱图,目标物峰形良好,且与牛奶基质峰有效分离。

表 2 11 种氨基糖苷类化合物的回归方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, LODs and LOQs of 11 kinds of aminoglycosides

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	线性方程	相关系数(r^2)	LODs/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	LOQs/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
妥布霉素	1.0~100.0	$Y=4794.66023X-3063.59589$	0.9992	1.0	2.0
庆大霉素	1.0~100.0	$Y=30170.3X-5314.83777$	0.9956	1.0	2.0
卡那霉素	1.0~100.0	$Y=7348.55379X-6775.53373$	0.9979	1.0	2.0
阿米卡星	1.0~100.0	$Y=2339.07881X-2038.78547$	0.9987	1.0	2.0
安普霉素	1.0~100.0	$Y=1295.76499X-386.31041$	0.9911	1.0	2.0
链霉素	1.0~100.0	$Y=3452.66129X+13010.04411$	0.9935	1.0	2.0
双氢链霉素	1.0~100.0	$Y=23258.03329X+34888.2$	0.9939	1.0	2.0
巴龙霉素	5.0~500.0	$Y=4420.54692X-2382.56775$	0.9917	5.0	10.0
新霉素	5.0~500.0	$Y=1669.71274X-417.81840$	0.9936	5.0	10.0
壮观霉素	5.0~500.0	$Y=787.18295X+12815.43424$	0.9963	5.0	10.0
潮霉素 B	5.0~500.0	$Y=1027.23086X-1052.53417$	0.9989	5.0	10.0

表 3 牛奶中 11 种氨基糖苷类药物的添加水平、回收率及 RSDs ($n=6$)
 Table 3 Spiked levels, recoveries and RSDs of 11 kinds of aminoglycosides in milk samples ($n=6$)

化合物	添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%						平均加标回收率/%	RSDs/%
		1	2	3	4	5	6		
巴龙霉素	2.0	113.93	112.78	104.38	115.10	113.18	110.85	111.7	3.4
	20	103.19	108.13	103.69	103.56	105.97	108.16	105.4	2.2
	50	93.90	89.26	93.49	89.69	92.12	93.79	92.0	2.3
妥布霉素	2.0	117.83	111.53	110.05	108.20	112.85	107.90	111.4	3.3
	20	93.55	104.77	91.38	96.25	95.09	89.74	95.1	5.6
	50	89.86	84.60	92.34	90.38	92.83	92.34	90.4	3.4
庆大霉素	2.0	106.55	110.70	113.50	113.23	115.35	112.83	112.0	2.7
	20	108.25	114.67	103.12	103.40	114.77	108.78	108.8	4.7
	50	113.08	109.85	111.49	109.45	105.37	112.15	110.2	2.5
卡那霉素	2.0	105.68	112.90	103.78	109.63	106.03	113.03	108.5	3.6
	20	94.03	90.57	86.15	84.68	84.17	83.69	87.2	4.8
	50	96.94	92.90	95.52	94.48	95.12	93.59	94.8	1.5
阿米卡星	2.0	109.48	106.03	92.43	109.00	106.43	101.73	104.2	6.1
	20	96.82	96.78	96.28	88.43	90.84	90.54	93.3	4.0
	50	89.29	88.94	90.92	94.37	92.26	93.79	91.6	2.5
安普霉素	2.0	111.55	112.15	110.35	92.65	96.75	99.00	103.7	8.3
	20	97.60	94.31	93.68	89.05	94.54	99.18	94.7	3.7
	50	119.35	111.71	114.52	111.09	111.35	118.06	114.3	3.2
链霉素	2.0	93.05	88.55	83.53	84.45	77.80	84.60	85.3	6.0
	20	110.81	106.13	115.34	105.20	108.32	111.98	109.6	3.5
	50	94.40	87.47	89.54	80.39	78.05	75.45	84.2	8.8
双氢链霉素	2.0	90.65	87.95	73.15	92.33	86.10	93.60	87.3	8.5
	20	110.17	107.48	108.90	109.77	110.95	109.24	109.4	1.1
	50	74.17	72.47	70.43	67.44	71.42	68.52	70.7	3.5
新霉素	2.0	101.28	116.03	88.75	99.05	99.30	99.73	100.7	8.7
	20	111.19	111.85	110.85	109.51	113.38	112.56	111.6	1.2
	50	106.17	106.32	110.38	115.00	109.60	112.00	109.9	3.1
壮观霉素	10	75.44	90.59	91.30	73.77	78.94	75.46	80.9	9.8
	100	118.89	119.16	113.81	115.38	114.36	111.76	115.6	2.5
	250	108.06	110.77	102.08	107.53	113.00	104.12	107.6	3.8
潮霉素 B	10	107.39	100.93	84.98	111.23	107.95	107.13	103.3	9.3
	100	98.63	97.36	94.51	95.18	92.04	89.61	94.6	3.5
	250	92.03	95.32	96.01	95.77	94.89	92.33	94.4	1.9

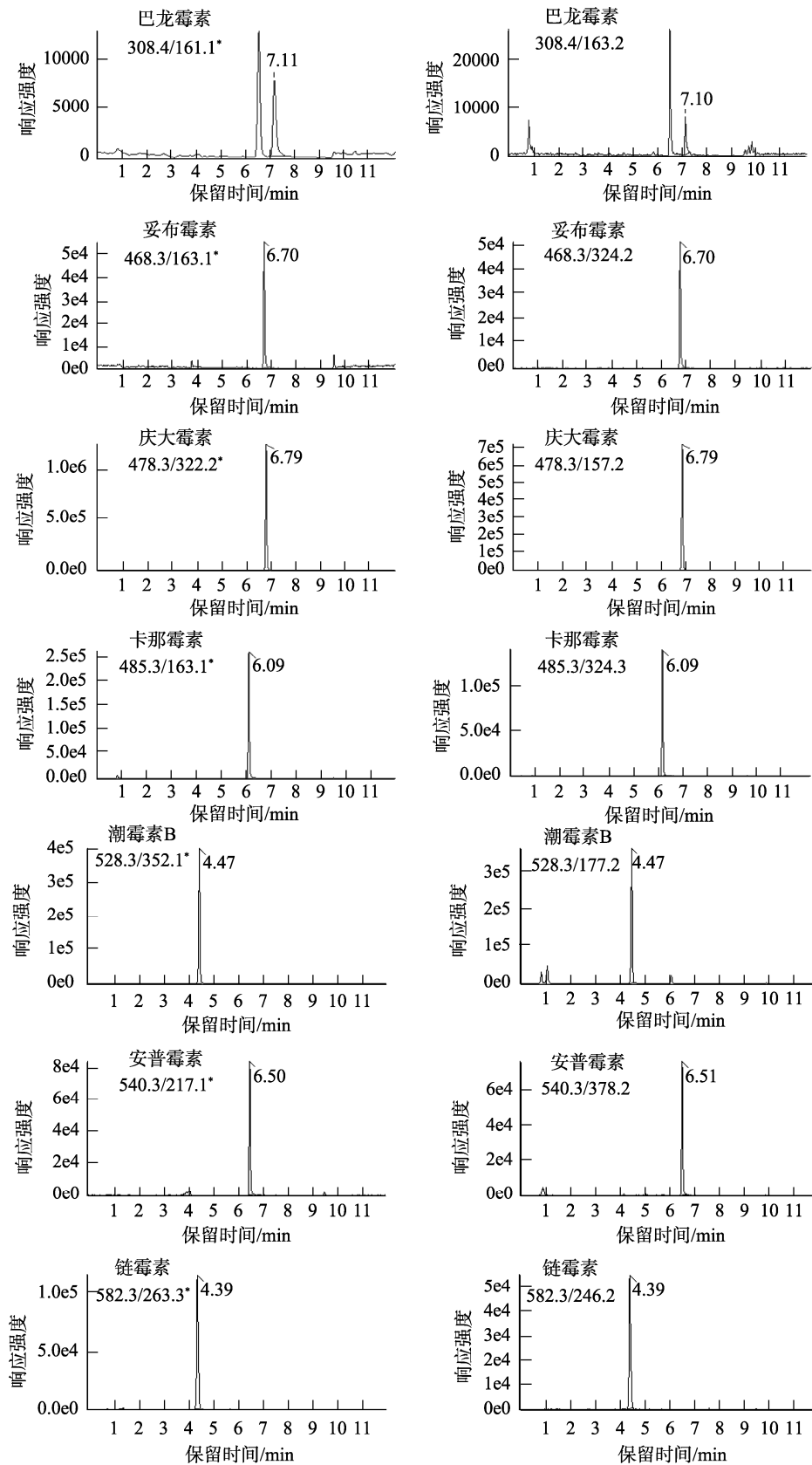


图1 空白牛奶加标样品中11种氨基糖苷类药物提取离子色谱图

Fig.1 Extraction ion chromatograms of 11 kinds of aminoglycosides in blank milk spiked samples

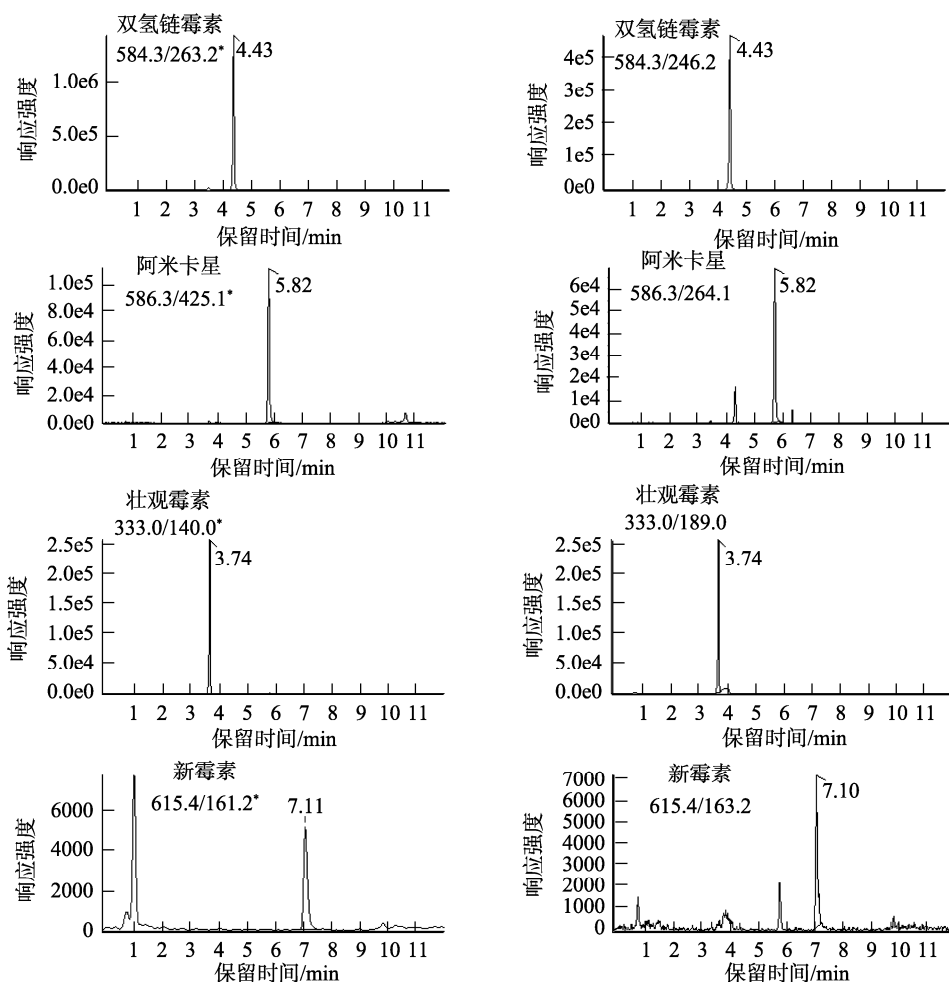


图 1(续) 空白牛奶加标样品中 11 种氨基糖苷类药物提取离子色谱图

Fig.1 Extraction ion chromatograms of 11 kinds of aminoglycosides in blank milk spiked samples

3 结论与讨论

本研究建立了分子印迹固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 11 种氨基糖苷类药物的残留分析方法。样品采用 5%三氯乙酸溶液沉淀蛋白并提取, MIP 固相萃取柱净化, Obelisc R 色谱柱分离, 在流动相中不使用离子对试剂的条件下实现了 11 种氨基糖苷类药物的同时分离检测。本方法灵敏高, 准确可靠, 适用于牛奶中 11 种氨基糖苷类药物的残留分析。

参考文献

- [1] 李佩佩, 龙举, 方益, 等. 液相色谱法检测动物源食品中氨基糖苷类药物残留的研究进展[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(11): 1356-1364. LI PP, LONG J, FANG Y, *et al.* Research progress on detection of residual amounts of aminoglycosides in animal-originated foods by LC [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2019, 55(11): 1356-1364.
- [2] 梁飞燕, 曾坚, 韦植元, 等. 食品中氨基糖苷类残留检测技术难点及解决对策研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3258-3265. LIANG FY, ZENG J, WEI ZY, *et al.* Research progress on technical

difficulties and countermeasures of detection of aminoglycoside residues in food [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(8): 3258-3265.

- [3] 王炼, 刘少琼, 杨碧霞, 等. 基质固相分散-亲水交互作用色谱-串联质谱法测定牛奶中 5 种氨基糖苷类抗生素残留量[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(3): 222-226. WANG L, LIU SQ, YANG BX, *et al.* Determination of 5 aminoglycoside residues in milk by matrix solid phase dispersion-hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2019, 31(3): 222-226.
- [4] 王帅兵, 曲斌, 耿士伟, 等. 亲水作用色谱-高分辨质谱测定生鲜牛乳中 7 种氨基糖苷类药物残留[J]. 动物医学进展, 2017, 38(9): 64-72. WANG SB, QU B, GENG SW, *et al.* Determination of seven aminoglycosides residues in raw cow milk by HILIC-HRMS [J]. Prog Vet Med, 2017, 38(9): 64-72.
- [5] 吕方, 李英, 沈媛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鲟鱼中庆大霉素和新霉素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 234-239. LV F, LI Y, SHEN Y, *et al.* Determination of gentamycin and neomycin residues in sturgeon by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 234-239.

- [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氨基糖苷类药物[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 301-305.
XU LJ, LIU X, ZHANG XQ, *et al.* Determination of aminoglycoside residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(2): 301-305.
- [7] 徐飞, 王晓琳, 李小薇, 等. 基于 HILIC 模式的超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中 12 种氨基糖苷类药物[J]. 分析试验室, 2018, 37(4): 414-418.
XU F, WANG XL, LI XW, *et al.* Determination of 12 aminoglycoside antibiotics in milk by HILIC UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Anal Lab*, 2018, 37(4): 414-418.
- [8] 宓捷波, 张敏, 柴铭俊, 等. 亲水作用色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 10 种氨基糖苷类药物的残留量[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(19): 197-204.
MI JB, ZHANG M, CHAI MJ, *et al.* Determination of ten kinds of aminoglycosides residues in animal original food using hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(19): 197-204.
- [9] 赵凤娟, 方恩华, 韩瑞阳, 等. 亲水性 Obelisc R 液相色谱-串联质谱法测定猪肉样品中氨基糖苷类药物残留[J]. 质谱学报, 2018, 39(1): 76-84.
ZHAO FJ, FANG EH, HAN RY, *et al.* Determination of aminoglycosides residue in pork by hydrophilic Obelisc R column-HPLC-MS/MS [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2018, 39(1): 76-84.
- [10] 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.
LUAN FT, GONG L, ZHU L, *et al.* Determination of aminoglycoside residues in eggs and milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2021, 37(4): 1033-1042.
- [11] 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 种氨基糖苷类药物残留[J]. 饲料博览, 2019, (5): 1-6.
ZHONG MQ, HUANG T, WU WJ, *et al.* Simultaneous determination of six aminoglycosides residues in muscle tissue by UPLC-MS/MS [J]. *Feed Rev*, 2019, (5): 1-6.
- [12] 陶大利, 白鹤, 李琴. SPE 净化-液质联用测定氨基糖苷类药物残留[J]. 中国乳品工业, 2019, 2(47): 51-57.
TAO DL, BAI H, LI Q. Application research of aminoglycoside drug residues by SPE purification-UPLC-MS/MS in milk [J]. *Chin Dairy Ind*, 2019, 2(47): 51-57.
- [13] 吴云辉, 严丽娟, 沈鹭英, 等. 混合型离子交换液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 5 种氨基糖苷类抗生素残留[J]. 色谱, 2019, 5(37): 499-504.
WU YH, YAN LJ, SHEN LY, *et al.* Determination of five aminoglycoside residues in honey using mixed-mode ion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 5(37): 499-504.
- [14] 马凯, 蔡芳叶, 黄永桥, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中九种氨基糖苷类药物残留[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 203-208.
MA K, CAI FY, HUANG YQ, *et al.* Detection of nine aminoglycosides residues in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(18): 203-208.
- [15] AMELIN VG, BOL'SHAKOV DS. Rapid determination of aminoglycosides in milk by exact ion masses using ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Anal Chem*, 2019, 74: 24-32.
- [16] 黄原飞, 姜晓祎, 周哲, 等. 分子印迹聚合物固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中 11 种氨基糖苷类药物残留[J]. 分析化学, 2018, 46(3): 454-461.
HUANG YF, LOU XY, ZHOU Z, *et al.* Determination of 11 kinds of aminoglycosides in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with molecularly imprinted polymers solid phase extraction [J]. *Chin J Anal Chem*, 2018, 46(3): 454-461.
- [17] 李云辉. 分子印迹法-高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中的氨基糖苷类抗生素[J]. 现代食品, 2018, (19): 110-115.
LI YH. Determination of aminoglycoside antibiotics in milk by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with molecular imprinting [J]. *Mod Food*, 2018, (19): 110-115.
- [18] 蔡亚岐, 牟世芬. 分子印迹固相萃取及其在应用[J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 116-121.
CAI YQ, MOU SF. Advances in molecularly imprinted solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2005, 24(5): 116-121.
- [19] CAO XL, ZHANG Z, LIU GY, *et al.* Preparation of magnetic dummy template molecularly imprinted polymers for the determination of aminoglycosides antibiotics in milk [J]. *Food Anal Meth*, 2021, 14: 2111-2120.
- [20] 杨碧霞, 王炼, 骆春迎, 等. 分子印迹固相萃取 LC-MS/MS 法同时测定蜂蜜中 11 种氨基糖苷类抗生素[J]. 现代预防医学, 2017, 44(7): 1285-1298.
YANG BX, WANG L, LUO CY, *et al.* Simultaneous determination of 11 aminoglycoside residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with molecularly imprinted polymers solid phase extraction [J]. *Mod Pre Med*, 2017, 44(7): 1285-1298.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

作者简介



王 敏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为农产品质量安全检测与研究。
E-mail: wangmin_620@126.com



丰东升, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品质量安全。
E-mail: dosfeng@qq.com