

# 液相色谱-串联质谱法检测动物组织中阿布拉霉素

赵凤娟, 岳振峰\*, 肖陈贵, 叶刚, 吴卫东, 胡晓苑

(深圳出入境检验检疫局食品检验检疫技术中心, 深圳市食品安全检测技术研发重点实验室, 深圳 518045)

**摘要:** **目的** 建立动物源食品中阿布拉霉素的 LC-MS/MS 检测方法。**方法** 待测样品中的阿布拉霉素用 5% 的三氯乙酸溶液提取, 经 MCX 固相萃取柱净化、浓缩、定容后采用液相色谱-串联质谱法在正离子模式下检测。**结果** 该方法在 0~5 mg/L 范围内有良好的线性关系, 相关系数  $r > 0.995$ , 在不同基质中, 不同的添加水平下该方法的平均回收率范围在 80.9%~101%, 相对标准偏差为 1.17%~12.60%; 定量下限为 0.030 mg/kg。**结论** 此方法灵敏度高、准确、重现性好, 适用于动物组织中阿布拉霉素残留量的检测。

**关键词:** 阿布拉霉素; 高压液相色谱-串联质谱; 固相萃取; 动物组织

## Determination of apramycin residues in animal tissues by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Feng-Juan, YUE Zhen-Feng\*, XIAO Chen-Gui, YE Gang, WU Wei-Dong, HU Xiao-Yuan

(Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R&D on Food Safety, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of apramycin in animal tissues by LC-MS/MS. **Methods** The residues of apramycin in the test samples were extracted with 5% trichloroacetic acid solution. After being cleaned up with SPE column, concentrated and reconstituted, the residues were detected by liquid chromatography-mass spectrometry under multiple reaction monitoring (MRM) mode via positive-ion mode. **Results** The method showed a good linearity over the range of 0~5 mg/L for apramycin with  $r > 0.995$ . The average recoveries were 80.9%~101% at three or four spiked levels in animal tissues, and the relative standard deviations were 1.17%~12.6%. The limit of quantitation was 0.030 mg/kg. **Conclusion** This method is highly sensitive, accurate and reproducible, and it is suitable for the detection of apramycin in animal tissues.

**KEY WORDS:** apramycin; high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; animal tissues

## 1 引言

阿布拉霉素(apramycin), 又称安普霉素, 是一种从黑暗链霉菌中提取的氨基糖苷类兽用抗生素(图 1),

20 世纪 80 年代由美国开发成功, 主要通过干扰原核生物蛋白质的合成来抑制细菌的繁殖, 对畜禽感染的革兰氏阴性菌有较强的抗菌活性, 特别是对其他抗生素耐药的大肠杆菌和沙门氏菌等有强抗菌作用。

\*通讯作者: 岳振峰, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yuezhenfeng@163.com

\*Corresponding author: YUE Zhen-Feng, Professor, Food Inspection and Quarantine Center, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen Key Laboratory of Detection Technology R&D on Food Safety, No 1011, Fuqiang Road, Futian District, Shenzhen 518045, China. E-mail: yuezhenfeng@163.com

其特点是抗菌谱广, 不易产生抗药性, 可用于大肠杆菌、沙门氏杆菌和支原体引起的感染<sup>[1]</sup>。作为药物型饲料添加剂, 阿布拉霉素能明显促进增重和提高饲料转化率, 因此在畜禽养殖领域得到广泛应用<sup>[2]</sup>。阿布拉霉素在动物体内的吸收量同用量有关, 可随家畜年龄增长而减少, 药物以原药形式通过肾排泄。阿布拉霉素在我国动物性食品中允许使用, 不需要制定残留限量, 但在产蛋禽和产奶牛禁止使用, 农业部 235 号公告规定了其在猪肾中的最高残留限量为 0.1 mg/kg。各国对阿布拉霉素残留限量均有明确的规定(表 1), 因此建立阿布拉霉素的残留检测方法对我国进出口贸易、食品安全等方面都有重要意义。

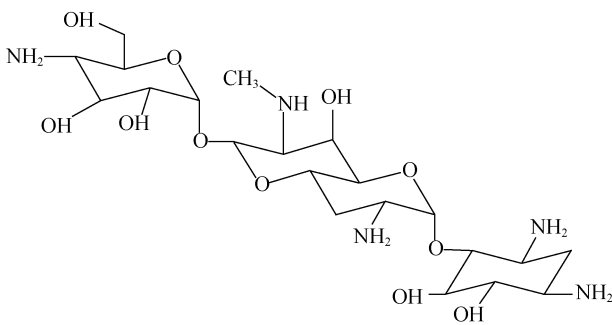


图 1 阿布拉霉素的分子结构

Fig. 1 Molecular structure of apramycin

目前国外对氨基糖苷类药物中的链霉素、新霉素及庆大霉素等研究较多<sup>[3-6]</sup>, 但对阿布拉霉素检测的研究很少, 只有少数的几篇文献<sup>[3,5]</sup>。氨基糖苷类药物水溶性好、极性大、分子量高, 特别适合于液相色谱分析, 但其缺少发色基团, 且亲水性强, 因此在用

反相 HPLC 分析时, 为改善其可检测性、增强分离效果, 常在柱前和柱后对其进行衍生化, 并使用离子对试剂改善分离效果, 但对复杂样品仍难以得到理想的分析效果。目前国内外对氨基糖苷类药物残留检测多采用高灵敏度和高选择性的液相色谱-质谱/质谱法<sup>[3-6]</sup>, 利用离子对试剂改善分离, 但离子对试剂对仪器的检测灵敏度有较大的影响。采用 HILIC 亲水液相色谱柱进行检测时, 复杂样品基质对检测信号和重现性等均有较大的影响。本研究在对阿布拉霉素进行单残留分析时, 采用三氯乙酸溶液进行提取, 经 MCX 固相萃取柱净化, 在碱性条件下进行液相色谱-质谱/质谱分析, 外标法定量。前处理步骤简单, 又能针对阿布拉霉素的性质进行充分的净化, 保证了方法有较高的回收率, 分离中不需要添加离子对试剂, 仪器的检测灵敏度高。该方法简便、快速、稳定, 检测限低、重复性好, 适合于动物源食品中阿布拉霉素的检测分析。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器和试剂

API4000QTrap 型液相色谱串联四极杆质谱仪, 带电喷雾离子源(美国 AB 公司), 配 Agilent 1200 HPLC 高压液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(美国 Agilent 公司); Oasis MCX 小柱(美国 Waters 公司); 离心机(德国 Sigma 公司); 固相萃取真空装置(美国 Agilent 公司); 氮吹浓缩仪(美国 Caliper 公司)。

表 1 世界主要国家和组织阿布拉霉素药物的最大残留限量

Table 1 MRLs of apramycin of some countries

食品名	残留限量(mg/kg)			
	日本	美国	欧盟	中国
牛肉	0.5		1	
猪肉、猪脂肪、肝脏	0.06			
其他陆生哺乳动物肉、脂肪	0.05			
牛脂肪	1		1	
牛肝脏	6		10	
其他陆生哺乳动物肝脏、肾脏	2			
牛肾脏	10		20	
猪肾脏	0.06	0.1		0.1
牛可食用下水(肝和肾除外)	2			
马可食用下水(肝和肾除外)	0.06			
其他陆生哺乳动物可食用下水(肝和肾除外)	2			

标准物质阿布拉霉素(apramycin, CAS No.: 65710-07-8)购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度 95.5%; 乙腈(Merck 公司)、甲醇(Merck 公司)、乙酸铵(Sigma 公司)为均色谱纯; 三氯乙酸、氨水为分析纯。

5%三氯乙酸溶液: 准确称取 50 g 三氯乙酸, 加 950 mL 水溶解, 混合均匀。

50 mmol/L 乙酸铵溶液(pH 9.2): 准确称取 3.854 g 乙酸铵, 加 900 mL 水溶解, 用氨水调节 pH 至 9.2, 转移到 1000 mL 容量瓶, 水定容至刻度, 混合均匀。

样品定容液: 取 95 mL 50 mmol/L 乙酸铵溶液(pH 9.2)与 5 mL 甲醇混合均匀。

市售猪肉、猪肝、猪肾、牛肉、牛肾。

## 2.2 液相色谱与质谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub>(3.5 μm, 100 mm×2.1 mm)。流动相 A: 50 mmol/L 乙酸铵溶液(pH 9.2); 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序: 0~4 min, 5%流动相 B; 4~5 min, 流动相 B 线性增至 70%, 保持 1 min; 6~6.5 min 流动相 B 线性降至 5%, 并保持 7 min。流速为 0.25 μL/min; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。

电喷雾电离正离子模式(ESI<sup>+</sup>); 多反应监测(MRM); 分辨率: 单位分辨率; 气帘气压力(CUR): 16.00 psi(氮气); 电喷雾电压(IS): 4000 V; 离子源温度(TEM): 550 °C; 雾化气压力 22 psi(氮气); 辅助气压力 65 psi(氮气); 定量离子对: 540.3/217.0, 碰撞能量 37 eV; 定性离子对: 540.3/378.2, 碰撞能量 26 eV; 参考保留时间 1.8 min。

## 2.3 样品前处理

### 2.3.1 样品提取

称取均质试样 2 g(精确到 0.01 g), 置于 15 mL 具螺旋盖聚丙烯离心管中, 加入 8 mL 5%三氯乙酸溶液, 旋涡混合 1 min, 超声提取 5 min。4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于一干净离心管中。离心后的残渣用 8 mL 5%三氯乙酸溶液重复上述提取步骤 1 次, 合并上清液, 混匀。

### 2.3.2 固相萃取净化

将提取液过 MCX 固相萃取柱(预先用甲醇:水 1:1 活化), 流速控制在约 1 滴/s。依次用 5 mL 水、5 mL 甲醇:水(1:1, v/v)淋洗柱子, 淋洗液完全通过小柱后, 抽真空 5 min 以上。以 5 mL 甲醇:氨水(4:1, v/v)溶液洗脱, 洗脱液用干净的 15 mL 具刻度试管

收集, 50 °C 下氮气吹干, 用样品定容液定容至 1 mL, 充分震荡混匀后用 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液可直接用于液相色谱-质谱/质谱仪测定。

## 3 结果

### 3.1 提取和净化的选择

阿布拉霉素是有多个羟基和氨基基团的碱性药物, 采用强阳离子交换树脂固相萃取柱 Oasis MCX 对样品提取溶液进行净化, 在酸性条件下, 阿布拉霉素完全保留在固相萃取填料上, 用水、甲醇:水(1:1, v/v)淋洗去除杂质, 在碱性条件下, 采用甲醇:氨水(4:1, v/v)可以充分洗脱。实验证明可以得到满意的净化效果, 回收率达到 90%以上。

### 3.2 pH 的选择

实验中考察了 pH 5.2、6.2、7.2、8.2、9.2、10.2 时的峰形、重现性及检测信号, 发现在 pH 大于 9.2 时可以得到满意结果, 因此采用 50 mmol/L 的乙酸铵(pH 9.2)和甲醇作为流动相进行梯度洗脱, 获得了灵敏度高、重现性好的检测结果。

### 3.3 质谱测定条件的优化

首先采用 1 mg/L 待测化合物的标准溶液分别以流动注射的方式在正离子模式下进行母离子全扫描, 确定阿布拉霉素的分子离子, 然后分别以其分子离子为母离子, 对其子离子进行全扫描(图 2), 选取丰度较强、干扰较小的子离子为定性离子。最后以多反应监测(MRM)正离子模式优化各种质谱参数。优化得到最佳质谱条件见 2.2 节, 其多反应监测谱图见图 3。

### 3.4 样品基质效应的消除

大气压喷雾电离离子源(ESI)容易受样品基质的影响。实验发现, 样品基质对离子化有非常强的抑制作用, 不同样品基质对阿布拉霉素离子化的抑制情况存在显著差异。为消除样品基质效应, 以空白样品提取液作为标准溶液的稀释溶液, 可使标准和样品溶液具有同样的离子化条件, 从而消除了样品基质效应。

### 3.5 方法的检出限、线性范围及回收率

在上述优化的实验条件下, 取一系列空白样品提取液配制的标准溶液, 以峰面积(Y)对相应的阿布拉霉素的浓度(X)绘制标准曲线, 得到线性回归方

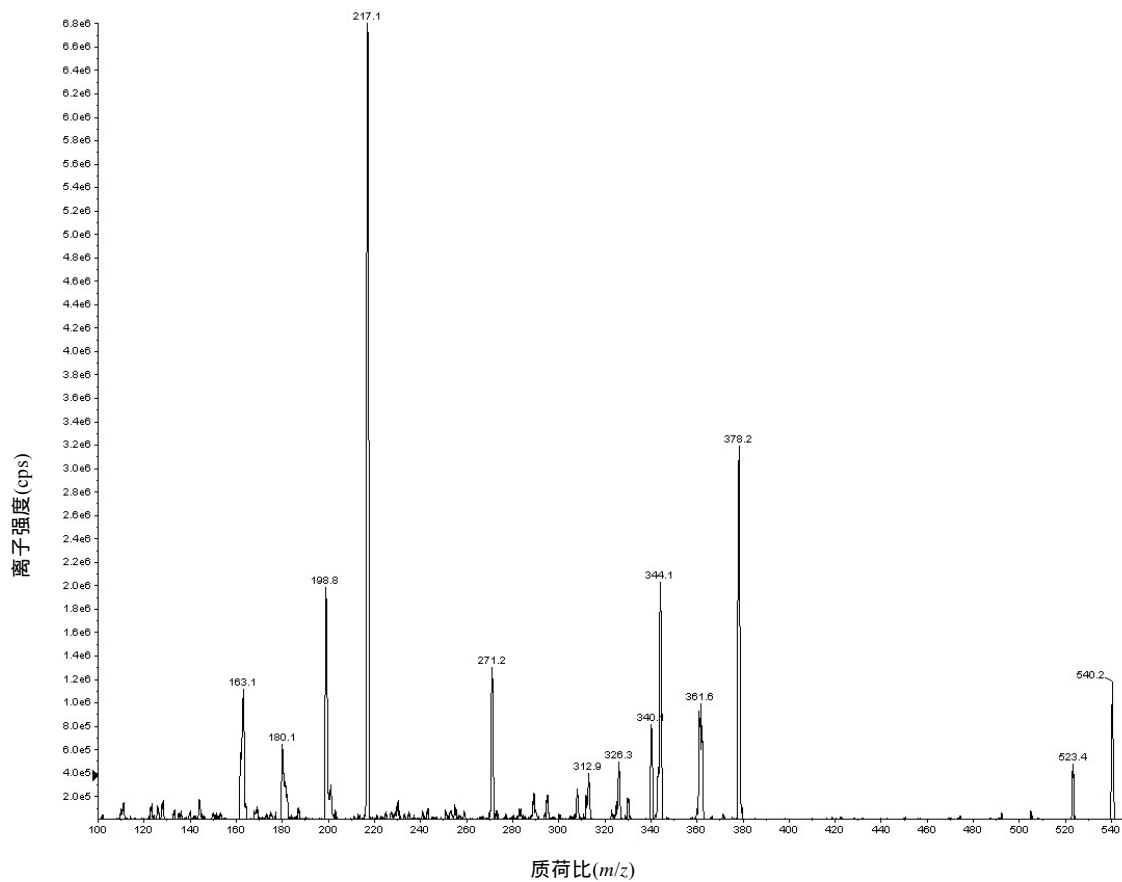


图2 阿布拉霉素的二级质谱图

Fig. 2 The ESI-MS/MS spectra of apramycin

程及相关系数,结果见表2,由表2可以看出本方法具有较宽的线性范围,线性关系良好。

经过测定方法的室内实验,确定本方法对猪肉、猪肝、猪肾、牛肉和牛肾中阿布拉霉素的测定低限均为0.030 mg/kg。

对猪肉、猪肝、猪肾、牛肉和牛肾样品分别进行3到4个浓度水平的空白加标回收率实验,每个浓度水平进行6次平行测试,测得各种阿布拉霉素的平均回收率和精密度见表3。

### 3.6 方法的特异性

采用本方法对空白和加标猪肉、猪肝、猪肾、牛肉、牛肾、牛奶和鸡蛋进行分析,在目标化合物出峰位置没有杂质峰干扰测定,方法的特异性可以满足检测要求。图4为空白猪肾及加标猪肾样品的多反应监测(MRM)色谱图。

## 4 讨论

阿布拉霉素属于碱性药物,结构中含有多种亲水性基团,与组织中蛋白结合能力较强,因为其在酸性条件下不稳定性,所以采用三氯乙酸水解样品中的待测物,分别实验了不同浓度三氯乙酸溶液对提取效率的影响,使用5%到10%的三氯乙酸可以充分提取,同时可以较好地沉淀蛋白,但使用高浓度的三氯乙酸可能对随后的质谱检测造成一定的影响,因而采用5%三氯乙酸溶液作为提取溶液。

本研究选择一种可以承受pH高达11.2的Agilent ZORBAX Extend-C<sub>18</sub>色谱柱,其使用一种独特的双配位C<sub>18</sub>-C<sub>18</sub>的键合技术,使得硅胶基质的柱子可用于高pH值时的分离。在高pH值时,不带电荷的碱性化合物将不与硅胶发生相互作用,能实现高效地分离和出色的峰形<sup>[7]</sup>。在碱性条件下,阿布拉霉素的亲水性降低,使其在反相色谱柱上有一定的保

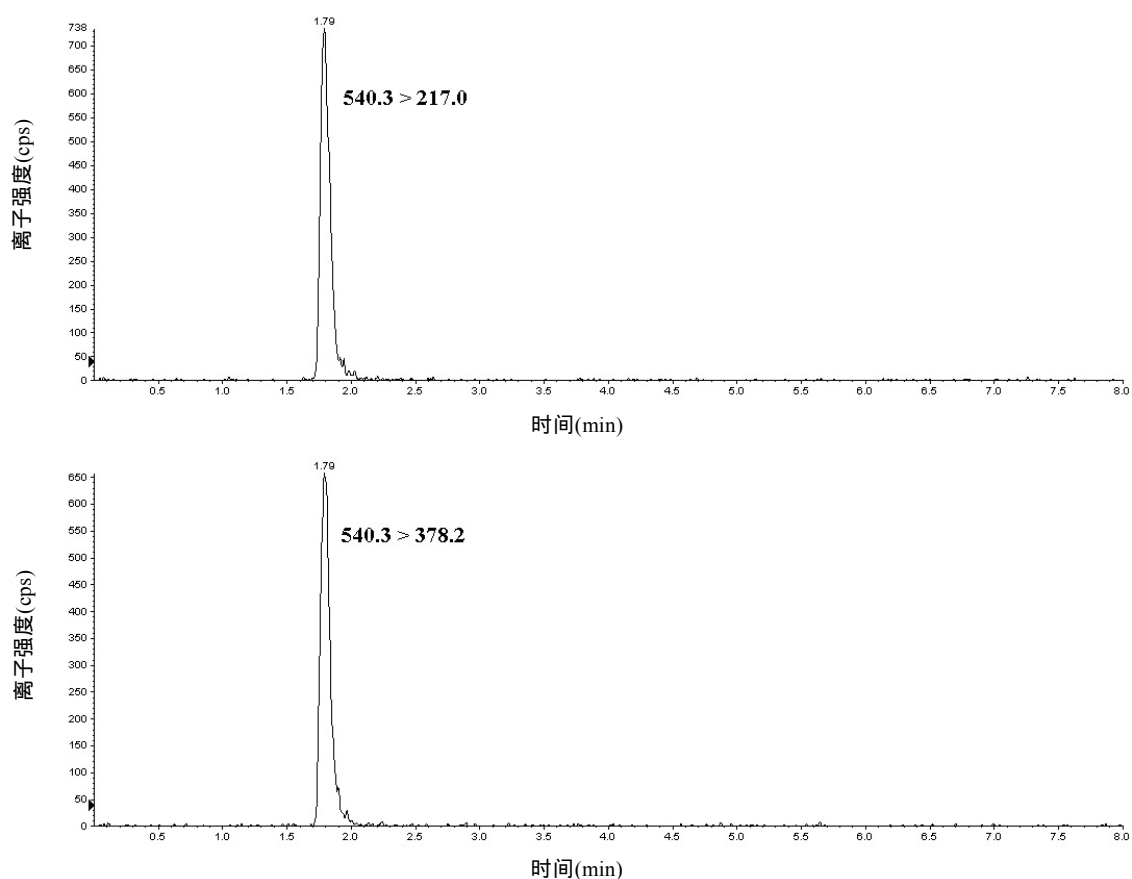


图 3 阿布拉霉素的多反应监测(MRM)色谱图(0.010 mg/kg)

Fig. 3 MRM chromatogram of standard solution of apramycin (0.010 mg/kg)

表 2 不同样品基质中阿布拉霉素药物的线性关系

Table 2 Regression equation, correlation coefficient and linear range of apramycin

基质	相关系数	线性方程	线性范围(ng/g)
猪肉	0.9998	$Y=58.2X-201$	0~500
猪肝	0.9987	$Y=59.5X+282$	0~500
猪肾	0.9997	$Y=64.6X-69.7$	0~500
牛肉	0.9989	$Y=2.13e5X-0.13$	0~5000
牛肾	0.9970	$Y=2.14e5X-0.354$	0~5000

表 3 阿布拉霉素的回收率及相对标准偏差(n=6)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of apramycin (n=6)

样品基质	添加浓度(mg/kg)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%) (n=6)
猪肉	0.030、0.060、0.120	92.3、91.3、89.2	3.76、2.87、1.56
猪肝	0.030、0.060、0.120	96.6、98.1、99.7	5.24、3.07、3.69
猪肾	0.030、0.060、0.120	98.9、101、98.6	1.17、3.17、3.11
牛肉	0.030、0.060、0.500、1.00	85.9、83.2、85.2、89.1	12.6、5.86、6.41、6.40
牛肾	0.030、10.0、20.0	80.9、86.1、93.6	10.6、5.68、3.92

留,同时不受杂质出峰的影响。

本研究前处理步骤简单,又能针对阿布拉霉素的性质进行充分的净化,保证了方法有较高的回收

率;在液相分离中不需要添加离子对试剂,分析时间短,仪器的检测灵敏度高。经实验验证,方法具有灵敏度、回收率高、重复性好等特点,适合于动物源食

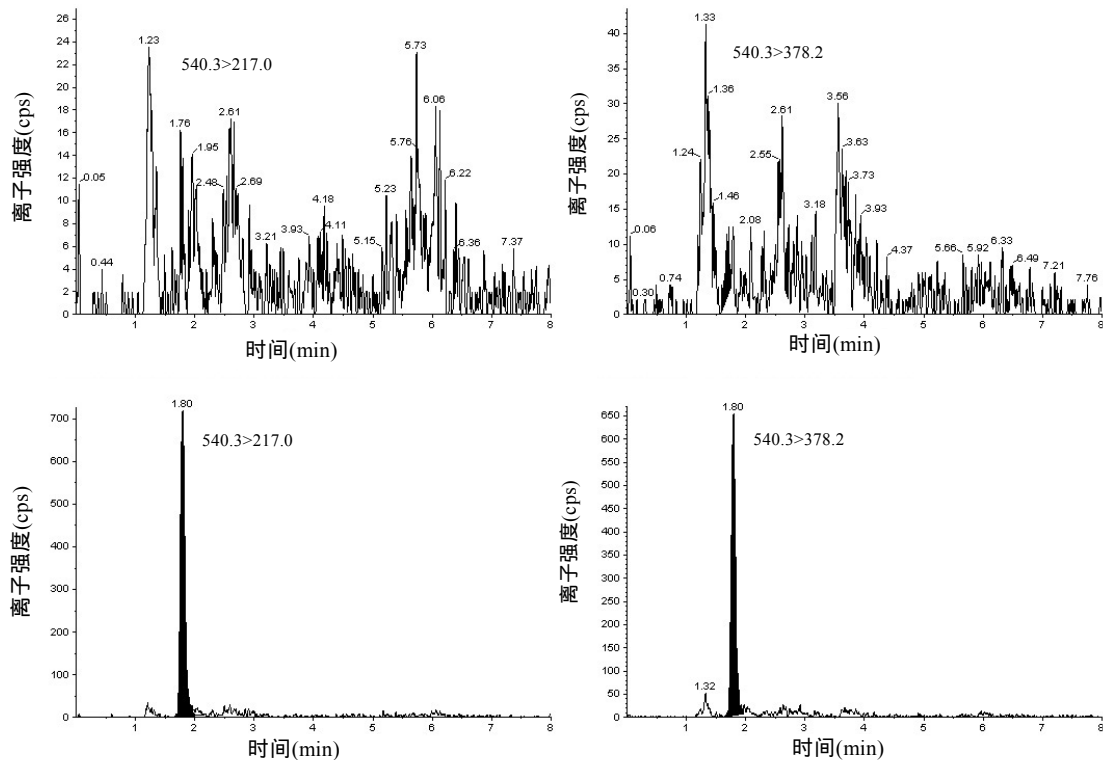


图4 空白猪肾和加标猪肾样品的多反应监测(MRM)色谱图(加标浓度 0.030 mg/kg)

Fig. 4 MRM chromatogram of blank kidney and spiked kidney sample (0.030 mg/kg)

## 品中阿布拉霉素的检测分析。

### 参考文献

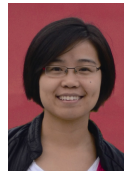
- [1] 杨艳坤, 吴金, 赵孝发, 等. 广谱抗菌素-安普霉素[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005, 4: 53.  
Yang YK, Wu J, Zhao XF, *et al.* Broad-spectrum antibiotics-apramycin [J]. *Sci Inform Anim Husb Vet Med*, 2005, 4: 53.
- [2] 贾呈印. 阿普拉霉素在兽医临床上的应用[J]. 国外兽医学(畜禽传染病), 1996, 16(4): 59-61.  
Jia CY. Application of apramycin in veterinarian clinical [J]. *Foreign Vet (livestocks contagion)*, 1996, 16(4): 59-61.
- [3] Bogialli S, Curini R, Corcia AD, *et al.* Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1067 (1-2): 93-100.
- [4] Löffler D, Ternes TA. Analytical method for the determination of the aminoglycoside gentamicin in hospital wastewater via liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1000: 583-588.
- [5] Kaufmann A, Maden K. Determination of 11 aminoglycosides in meat and liver by liquid chromatography with tandem mass

spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2005, 88(4): 1118-1125.

- [6] Oertel R, Neumeister V, Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1058: 197-201.
- [7] Guo MX, Wrisley L, Maygoo E. Measurement of tobramycin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 571(1): 12-16.

(责任编辑: 赵静)

### 作者简介



赵凤娟, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: zhaofj-1982@163.com



岳振峰, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品质量安全检测。

E-mail: yuezhenfeng@163.com