

超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中 9种氨基糖苷类抗生素

肖志明¹, 王钦钦^{1,2,3}, 尤艳莉², 李彦伸², 杨建中⁴, 贾铮¹, 王石¹, 樊霞^{1*}

[1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081; 2. 烟台大学生命科学学院, 烟台 264005; 3. 通标标准技术服务(青岛)有限公司, 青岛 266101; 4. 新疆维吾尔自治区兽药饲料监察所, 乌鲁木齐 830063]

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中9种氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides, AGs)的分析方法。**方法** 样品采用10 mmol/L磷酸二氢钾缓冲液作为提取液, 酶探针超声提取1 min, 通过阳离子交换固相萃取柱净化, 在电喷雾电离正离子模式下使用超高效液相色谱-串联质谱仪进行检测, 外标法定量。**结果** 经方法学验证, 在5~1000 $\mu\text{g/L}$ 范围内, 9种AGs均呈现良好的线性关系, 方法的检出限为5~20 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为20~80 $\mu\text{g/kg}$ 。在20~400 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内, 饲料中9种AGs的平均回收率为76.2%~113.2%; 日内变异系数为1.1%~8.4%, 日间变异系数为1.1%~11.6%。**结论** 该方法稳定、灵敏, 可同时实现饲料中9种AGs的检测, 满足饲料中AGs日常监测应用需求。

关键词: 饲料; 氨基糖苷类抗生素; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 9 kinds of aminoglycosides in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Zhi-Ming¹, WANG Qin-Qin^{1,2,3}, YOU Yan-Li², LI Yan-Shen², YANG Jian-Zhong³, JIA Zheng¹, WANG Shi¹, FAN Xia^{1*}

(1. Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; 2. College of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China; 3. SGS-CSTC Standards Technical Services Co., Ltd., Qingdao Branch, Qingdao 266101, China; 4. Veterinary Medicine and Feed Supervision Institute of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi 830063, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of 9 kinds of aminoglycosides (AGs) in feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with 10 mmol/L potassium phosphate buffer solution using enzyme probe ultrasound for 1 min, and purified by cation exchange solid phase extraction column. The samples were detected by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in electrospray ionization positive ion mode, and quantified by external standard method. **Results** Verified by square law, the linear relationships of the 9 kinds of AGs were good in the range of 5–1000 $\mu\text{g/L}$, with the detection limits of 5–20 $\mu\text{g/kg}$ and the quantitation limits of 20–80 $\mu\text{g/kg}$. The average

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目(2019YFE0103800)、中国农业科学院创新工程项目

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of the 13th Five-Year Plan (2019YFE0103800), and the Agriculture Science and Technology Innovation Program

*通信作者: 樊霞, 博士, 研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及检测技术。E-mail: fanxia@caas.cn

*Corresponding author: FAN Xia, Ph.D, Professor, Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products of CAAS, No.12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: fanxia@caas.cn

recoveries of 9 kinds of AGs in feed ranged from 76.2% to 113.2% at the concentration of 20–400 $\mu\text{g}/\text{kg}$; the intra-day coefficients of variation were 1.1%–8.4%, and the intra-day coefficients of variation were 1.1%–11.6%.

Conclusion This method is stable and sensitive, and can simultaneously detect 9 kinds of AGs in feed, thus meeting the daily monitoring application requirements of AGs in feed.

KEY WORDS: feed; aminoglycosides; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

氨基糖苷类抗生素(aminoglycosides, AGs)是由氨基环醇和氨基糖通过氧桥连接而成的苷类化合物^[1-3], 对大多数革兰氏阴性菌和一些革兰氏阳性菌具有抑菌作用^[4-5], 是一类重要的人畜共用抗生素^[6-7]。在兽医和畜牧业应用中, AGs 广泛应用于治疗细菌感染^[8-10], 且可以以亚治疗剂量作为生长促进剂使用, 特别是在年幼的动物和家禽中^[11-13]。然而, 氨基糖苷类抗生素的使用会给动物带来强烈的不良反应, 会导致听觉毛细胞的破坏, 造成永久不可逆转的听觉丧失, 同时 AGs 也是导致药源性肾衰竭最常见的原因, 即耳毒性和肾毒性^[14-17], 因此, AGs 即使在作为治疗药物使用时, 也应谨慎。基于对 AGs 毒性的考虑, 无论是 2020 年前批准的允许在饲料生产环节添加的药物饲料添加剂, 还是 2020 年以来饲料行业全面禁抗背景下批准的允许在商品饲料和养殖过程中使用的抗球虫和中药类药物中, 均未包括 AGs。但 AGs 并未被列为禁用药物, 在之前的饲料质量安全监测过程中, 通过预警监测发现大量将 AGs 非法添加于饲料中的行为。

AGs 属强极性化合物, 易溶于水, 缺乏发色基团和荧光基团, 对于这类化合物的检测, 要获得较高的检测灵敏度, 质谱法无疑是最优选的方法。BABIN 等^[18]采用 Nucleosil C₁₈ 柱, 以乙腈和 100 mmol/L 七氟丁酸为流动相, 建立了采用液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定动物性食品中的双氢链霉素(dihydrostreptomycin, DSTP)、庆大霉素(gentamicin, GEN)和新霉素(neomycin, NEO)的分析方法, 定量限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。HONG 等^[19]建立了 LC-MS/MS 法测定水产品中的新霉素和链霉素, 以乙腈和 5 mmol/L 七氟丁酸为流动相, 采用 Shim-pack FC-ODS 色谱柱进行梯度洗脱, 定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。赵凤娟等^[20]以混合模式的 Obelisc R 色谱柱, 结合反相和阳离子交换机制, 以乙腈和 1%甲酸水为流动相, 分析猪肉中 13 种 AGs, 检出限可低至 1~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前, 已有的饲料中 AGs 的分析方法通常在流动相中使用七氟丁酸等离子对试剂, 这会对质谱仪器产生不良影响。本研究旨在建立一种准确、快速、灵敏测定饲料中 9 种 AGs[链霉素、双氢链霉素、卡那霉素(kanamycin, KAN)、新霉素、妥布霉素(tobramycin, TOB)、安普霉素(纯度 72.2%)、庆大

霉素、潮霉素 B 和丁胺卡那霉素(amikacin, AMK)]的超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS), 以期对 AGs 的非法添加情况进行有效控制, 为饲料企业合规生产及政府监管提供必要的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与耗材

9 种氨基糖苷类抗生素标准品: 链霉素(纯度 96.4%)、双氢链霉素(纯度 94.4%)、卡那霉素(纯度 98.4%)、新霉素(纯度 80.0%)、妥布霉素(纯度 90.0%)、安普霉素(纯度 72.2%)、庆大霉素(纯度 90.8%)、潮霉素 B (hygromycin B, HYG, 纯度 90.0%)、丁胺卡那霉素(纯度 99.0%)(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 七氟丁酸(heptafluorobutyric acid, HFBA)(色谱纯)、乙酸、氨水、乙酸铵、磷酸二氢钾、乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium, EDTA)、三氯乙酸(trichloroacetic acid solution, TCA)、氢氧化钠(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 试验用水为 Milli-Q 制备的超纯水; PCX SPE 柱(500 mg, 6 cc)(美国 Agilent 公司); WCX SPE 柱(500 mg, 6 cc)(美国 Waters 公司)。

试验样品由国家饲料质量监督检验中心(北京)从全国范围内的饲料生产企业随机抽取并按规定要求制备而成。

1.1.2 仪器与设备

1290-6495 型液相色谱-串联质谱仪(美国 Agilent 公司); BS 210S 分析天平(德国 Sartorius 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Milli-Q 公司); MS2 Minishaker 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); 3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); N-EVAP 112 氮吹仪(美国 Organomation 公司); ZM 100 旋风磨(德国 Retsch 公司); HD 2200 酶探针超声仪(德国 Bandelin 公司); ZM-CQ-12Y 固相萃取装置(日本岛津公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制

分别准确称取 50 mg 链霉素、双氢链霉素、卡那霉素、新霉素、妥布霉素、安普霉素、庆大霉素、潮霉素 B 和丁胺卡那霉素 9 种 AGs 标准品, 置于 50 mL 容量瓶中, 分别用超纯水配制成质量浓度为 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单标储备溶液。

考虑到 AGs 为弱碱性化合物, 易吸附于玻璃制品^[21], 因此, 将 AGs 标准溶液置于聚丙烯瓶中储存。再分别准确移取 9 种 AGs 单标储备液 100 μ L, 置于 10 mL 容量瓶中, 用超纯水配制成 10 μ g/mL 的标准中间液。准确移取一定量上述标准中间液, 逐级稀释成一系列标准工作液, 此工作液应临用现配。

磷酸二氢钾缓冲液(10 mmol/L): 分别称取 1.36 g 磷酸二氢钾、20 g 三氯乙酸和 0.15 g 乙二胺四乙酸二钠, 用水溶解并定容至 1 L。

1.2.2 样品前处理

准确称取经粉碎过 40 目筛(0.45 mm 孔径)的饲料样品 1.0 g(精确至 0.001 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 提取液(10 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液), 涡旋 1 min, 酶探针超声提取 1 min, 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液备用。取 5 mL 上清液过经预先分别用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化的 PCX 柱, 分别用 5 mL 水和甲醇淋洗, 5 mL 氨水-甲醇-水(2:6:2, V:V:V)溶液洗脱; 另取 5 mL 上清液用 3 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH=7.5 \pm 0.1 后, 过经甲醇和水活化过的 WCX 柱净化, 5 mL 水淋洗, 5 mL 乙酸-甲醇-水(1:7:2, V:V:V)溶液洗脱。洗脱液于 40 $^{\circ}$ C 下氮吹至约 0.2 mL, 加入 10 μ L 的 HFBA 后用水定容至 1 mL, 过 0.22 μ m 滤膜至聚丙烯进样小瓶中, 待上机测定。

1.2.3 仪器分析

色谱条件: Agilent Poroshell 120 EC-C₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 进样体积 5.0 μ L; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水(含 0.5 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B 为乙腈, 流速 0.3 mL/min, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution condition

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	98	2
2.0	98	2
2.1	92	8
6.0	60	40
6.5	10	90
7.5	98	2

质谱条件: 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI), 正离子扫描, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 干燥气为高纯氮气, 温度为 350 $^{\circ}$ C; 雾化气为高纯氮气, 雾化器压力为 40 psi; 毛细管电压: 3500 V; 喷嘴电压: 0 V; 待测化合物定性、定量离子对及碰撞能量见表 2。

1.3 数据处理

本研究中所有质谱数据采用 MassHunter 软件(美国 Agilent 公司)处理, 统计分析采用 OriginPro 2019b(美国 OriginLab 公司)进行处理。

表 2 氨基糖苷类抗生素的定性、定量离子及碰撞能量
Table 2 Qualitative and quantitative ion and collision energy of AGs

待测化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
STP	582.4	245.8	38	180
		263.3*	34	180
DSTP	584.4	245.8	38	180
		263.2*	34	180
KAN	485.4	163.1*	20	150
		374.4	14	150
NEO	615.4	161.1*	30	175
		292.9	24	175
TOB	468.3	162.9	20	25
		324.0*	12	25
APR	540.3	377.9	18	140
		217.1*	22	140
GEN	478.4	157.0	20	105
		322.0*	16	105
HYG	528.3	177.1*	29	170
		424.9	21	170
AMI	586.3	162.9*	23	170
		424.9	17	170

注: *为定量离子。

2 结果与分析

2.1 样品前处理条件的优化

2.1.1 提取溶液的选择

AGs 属于强极性化合物, 易溶于水, 难溶于有机溶剂^[20], 因此从样品中提取 AGs 宜使用水做溶剂的缓冲液。试验比较了磷酸二氢钾和乙酸铵 2 种缓冲液, 结果显示 2 种盐缓冲溶液对于 AGs 的提取效果差异不大, 但磷酸二氢钾缓冲溶液对于 NEO 的提取效果较乙酸铵缓冲溶液的提取效果好。此外, 在提取溶液中加入三氯乙酸以沉淀蛋白可有效降低基质效应。三氯乙酸的浓度过高或过低均会影响目标物的回收率, 且由于较高浓度的三氯乙酸使离子强度升高, 导致在固相萃取柱中的回收率较低, 三氯乙酸的浓度应限制在 10% 以内^[22]。试验进一步比较提取液中添加 1%、2%、5% 和 10% 的三氯乙酸对 AGs 回收率的影响, 发现当三氯乙酸浓度为 1% 时, 离心后溶液仍然浑浊, 导致 SPE 柱易阻塞, 且回收率较低。当三氯乙酸浓度为 2%、5%、10% 时, 各目标分析物的回收率相差不大, 因此本研究选择浓度为 2% 的三氯乙酸用来沉淀蛋白。此外,

AGs 的氨基易与带电离子结合而形成螯合物,可在提取液中加入少量 EDTA 来抑制,其作用是作为一种螯合剂对金属离子的亲和力高于 AGs,较小浓度的 EDTA 就可以提高 AGs 的回收率^[8]。

2.1.2 提取方式的选择

本研究首先选择超声提取,提取时间为 30 min,结果发现 7 种 AGs 的回收率均在 70%以上,但链霉素和双氢链霉素的回收率仅为 50%。查阅文献过程中发现,已有在蜂王浆中加入胰蛋白酶进行酶解释放 AGs 的方法^[6],并且获得了较好的回收率。然而,传统酶解提取效率较低、耗时较长,根据 FERNANDEZ-TORRES 等^[23]报道的酶与超声波能量的结合使用,超声波探头提供的能量是普通超声波水浴的 200 倍,使用酶探针超声提取可大大节省提取时间,本研究选择超声探针酶解提取 9 种 AGs,获得较高回收率,且大大节约了提取时间。

2.1.3 净化条件的选择

本研究比较了 MCX、WCX、SCX 及 PCX 等 4 种常用 SPE 柱对 AGs 的净化效果,试验发现,MCX 柱和 SCX 柱对于 9 种 AGs 均具有强的保留作用,无法洗脱,WCX 和 PCX 柱都只对部分 AGs 有一定的保留作用,因此选择对 WCX 柱和 PCX 柱进行研究。

WCX 柱经常用于洗脱强碱性化合物,但在目标物过 SPE 柱之前需调整 pH 以确保目标物质的质子化。为了使目标化合物被保留,上样溶液的 pH 应至少低于链霉素和双氢链霉素的 pKa 7.8。在此 pH 下,超过 99%的目标化合物带电荷,同时满足固相萃取柱上与 AGs 交换位点的去质子化。在中性至碱性条件下,WCX 柱的羧基带负电荷以保留 AGs。使用 3 mol/L 氢氧化钠调节溶液 pH 为 6.5、7.5、8.5,观察链霉素和双氢链霉素的保留情况。因此,为了提高净化效率,本研究选择试液净化前的溶液 pH 为 7.5。

2.1.4 洗脱条件的优化

WCX 柱和 PCX 柱均为离子交换柱,在洗脱目标物时应使用高离子强度洗脱,以中和带电离子。据文献报道^[24],WCX 柱在 pH≤2.8 时,吸附剂的电荷被中和,且双氢链霉素的定量洗脱依赖于有机溶剂和高 pH,因此 WCX 柱的洗脱液选择乙酸酸化的甲醇溶液对目标物进行洗脱。试验比较了洗脱液中乙酸含量为 5%和 10% 2 个不同浓度下对于链霉素和双氢链霉素的洗脱情况,研究发现乙酸浓度为 10%时回收率较优;进一步对甲醇含量进行优化,分别设置 50%、60%、70%、80%和 90%甲醇对 STP 和 DSTP 回收率的影响。试验数据表明使用 70%甲醇时,链霉素和双氢链霉素的回收率最高。

PCX 柱极性高,吸附剂的羟基化聚合物表面完全不含氨基,对于能够与 AGs 结合的内源性物质,如蛋白质和脂类,没有结合位点,因此需采用碱性溶液洗脱保留在 PCX 柱上的 NEO、APR、HYG、KAN、SPC、TOB 和 GEN。

氨化甲醇是洗脱碱性化合物使用最多的溶剂,试验选择 20%氨水,分别采用 20%、30%、40%、50%、60%、70%和 80%甲醇对 7 种 AGs 进行洗脱。综合考虑 7 种 AGs 的回收率,当甲醇含量为 60%时效果最佳。

2.2 液相色谱-串联质谱条件的优化

2.2.1 色谱条件优化

AGs 作为一类强极性的碱性化合物,其有效分离一直是分析领域的难点所在,通常的解决办法是在流动相中加入一定量的离子对试剂,例如三氟丁酸、七氟丁酸等^[25-26],以增加目标化合物在色谱柱上的保留。但离子对试剂的使用产生了新的问题,如与质谱不兼容或产生离子抑制效应等,进而对仪器造成较大损伤。本研究旨在建立一种有效的检测方法,在流动相中不使用离子对试剂,进而减轻对仪器的不良影响。

试验选择 4 种不同的 UPLC 柱进行比较研究。首先选用 CORTECS HILIC 色谱柱,这是市场上新推出的针对不易在反相色谱柱上保留的强极性化合物而设计的一款色谱柱。试验发现:9 种 AGs 类药物均在 2 min 内出峰完毕,峰型宽且信号响应较低,该色谱柱不适合 AGs 的分离。鉴于 AGs 在反相色谱柱上几乎不保留,据徐飞^[27]试验发现,当色谱柱的碳载量越低时,AGs 在色谱柱上的保留越强,出峰时间越靠后。对比了实验室中 3 种不同碳载量的色谱柱,分别为 Eclipse Plus C₁₈ RRHD、ZORBAX SB-C₁₈ 和 Poroshell 120 EC-C₈,碳含量分别为 12%、10%、5%,以新霉素的保留行为作参照物,最终确定使用 Poroshell 120 EC-C₈ 色谱柱进行试验。此结论与徐飞^[27]的结论相同。此类低密度键合的 C₈ 色谱柱可以使目标分析物更多地进入到颗粒缝隙中进而增强保留,适用于亲水模式和反相模式,表明低配体密度的 C₈ 色谱柱可以作为弱 HILIC 柱实现对强极性化合物的分离。

2.2.2 质谱条件优化

AGs 一般采用正离子模式检测。分别配制 1 μg/mL 的 9 种 AGs 单标,在正离子模式下首先进行全扫描,检测到目标离子存在后进行二次碎裂寻找特征离子对,在多反应监测模式下选择离子丰度最高的 2 个碎片离子分别作为定性离子和定量离子。通过比较母离子的信号强度来优化锥孔电压,比较子离子的信号强度优化碰撞能量,进而得到 9 种 AGs 的质谱条件,结果如表 2 所示。

2.3 标准曲线、线性范围

基质效应是液相色谱-串联质谱联用 ESI 接口最常见的问题,基质效应以离子抑制现象居多,离子增强则较为少见。样品前处理难以把基质完全去除,因而在上机液中往往还存在大量的杂质,且其含量要远大于目标化合物的量。在 ESI 电离时,这些杂质与目标化合物竞争电荷,使得目标物不能完全电离,甚至被基质所淹没而完全没有信号,导致提

取液中目标物的响应值与标准溶液相比明显降低, 从而影响方法的定量。通过比较 AGs 在超高效液相色谱-串联质谱上的相对响应值(基质添加标准溶液值/标准溶液值), STP 在猪配合饲料、鸡浓缩饲料中的相对响应值分别为 45.2%和 36.4%, DSTP 为 69.5%和 60.8%, KAN 为 58.2%和 54.3%, NEO 为 77.4%和 66.7%, TOB 为 80.3%和 75.5%, APR 为 62.7%和 58.2%, GEN 为 84.0%和 82.1%, HYG 为 72.6%和 69.9%, AMI 为 79.5%和 75.6%, 表明 9 种 AGs 均存在离子抑制现象。因此, 本研究采用基质匹配标准曲线进行定量分析。

取空白基质溶液将 AGs 配制包含定量限在内的由高到低 6 个浓度的混合基质加标溶液, STP 质量浓度为 20、50、100、200、500、1000 $\mu\text{g/L}$, 其余 8 种 AGs 质量浓度均为 5、10、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$, 经超高效液相色谱-串联质谱测定分析。以基质中分析物的浓度为横坐标, 以各个分析物定量离子峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 结果如表 3、4 所示, 9 种 AGs 线性关系良好。

2.4 方法的检出限与定量限

准确称取适量空白饲料样品, 按照优化的前处理方法进行处理, 用超高效液相色谱-串联质谱进行测定分析, 测定基线噪音。检出限(limit of detection, LOD)以 $S/N=3$ 计算, 定量限(limit of quantification, LOQ)以 $S/N=10$ 计算, 结果见表 3。饲料中双氢链霉素、新霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素、安普霉素、妥布霉素、潮霉素 B 和庆大霉素的检出限为 5 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 20 $\mu\text{g/kg}$; 链霉素的检出限为 20 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 80 $\mu\text{g/kg}$ 。9 种 AGs 的检出限和定量限均满足国际分析方法性能的要求。

2.5 选择性、准确度和精密度

称取 1.00 g(精确至 0.01 g)空白饲料样品, 按照 1、2、5 倍 LOQ 的 3 个浓度水平, 进行添加回收试验。每个浓度制备 6 个平行, 连续重复 3 d, 计算添加回收率、日内及日间变异系数, 结果见表 5、6。

表 3 猪配合饲料基质匹配标准曲线的线性方程和相关系数

Table 3 Linear equations and correlation coefficients of matrix matching standard curve of pig compound feed

待测化合物	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$	定量限/ $(\mu\text{g/kg})$
STP	20~1000	$Y=1814.1X-33669$	0.9932	20	80
DSTP	5~500	$Y=989.4X-21047$	0.9952	5	20
KAN	5~500	$Y=1402.8X-30609$	0.9929	5	20
NEO	5~500	$Y=1814.1X-33669$	0.9932	5	20
TOB	5~500	$Y=2020.8X-53143$	0.9923	5	20
APR	5~500	$Y=1556X-30501$	0.9957	5	20
GEN	5~500	$Y=858.64X+1306.2$	0.9966	5	20
HYG	5~500	$Y=817.91X-20230$	0.9945	5	20
AMI	5~500	$Y=4629.1X-75507$	0.9969	5	20

表 4 鸡浓缩饲料基质匹配标准曲线的线性方程和相关系数

Table 4 Linear equations and correlation coefficients of matrix matching standard curve of chicken compound feed

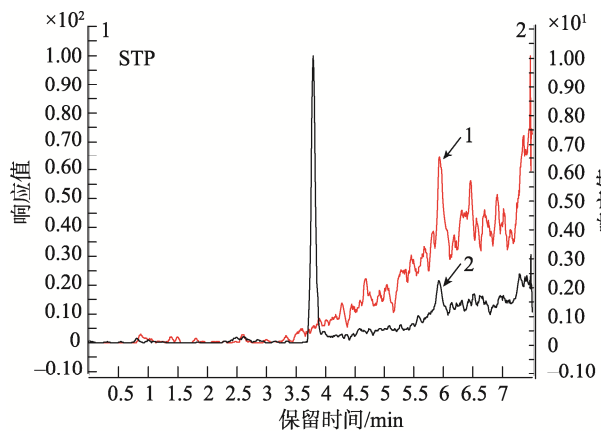
待测化合物	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$	定量限/ $(\mu\text{g/kg})$
STP	20~1000	$Y=102.67X-1806.8$	0.9948	20	80
DSTP	5~500	$Y=1054.5X-3449.4$	0.9993	5	20
KAN	5~500	$Y=3337.2X-17583$	0.9989	5	20
NEO	5~500	$Y=989.1X-7311$	0.9918	5	20
TOB	5~500	$Y=1228.6X-11438$	0.9948	5	20
APR	5~500	$Y=1106.1X-9380.7$	0.9958	5	20
GEN	5~500	$Y=1007.2X-7458.5$	0.9967	5	20
HYG	5~500	$Y=1027.6X-7068.5$	0.9936	5	20
AMI	5~500	$Y=1024.3X-7561.2$	0.9966	5	20

表5 猪配合饲料添加氨基糖苷类抗生素的平均回收率和变异系数

Table 5 Average recovery rates and coefficients of variation of aminoglycosides added to pig compound feed

待测化合物	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	日内		日间	
		平均回收率/%	变异系数/% ($n=6$)	平均回收率/%	变异系数/% ($n=18$)
STP	80	82.1	4.2	79.4	4.1
	160	91.3	2.3	84.5	7.6
	400	90.2	7.1	83.4	9.1
DSTP	20	91.2	2.1	86.2	7.1
	40	98.1	3.0	88.2	9.7
	100	96.3	5.6	92.6	8.9
KAN	20	101.3	6.2	94.4	5.7
	40	107.3	2.2	102.5	1.8
	100	104.8	4.2	99.5	9.4
NEO	20	110.2	4.8	102.3	2.1
	40	113.1	2.2	105.2	3.2
	100	103.2	5.4	99.4	7.8
TOB	20	93.2	1.1	85.3	2.8
	40	96.4	5.6	91.4	2.6
	100	89.3	2.3	84.4	7.8
APR	20	106.1	1.8	103.2	1.1
	40	102.3	3.2	98.4	4.6
	100	101.4	5.4	97.2	3.2
GEN	20	81.2	3.2	76.4	9.6
	40	98.4	7.6	92.1	5.4
	100	94.2	1.3	87.4	8.7
HYG	20	113.2	7.2	105.4	3.2
	40	102.5	7.8	94.2	11.2
	100	112.1	4.7	97.4	11.6
AMI	20	107.3	3.5	104.4	2.1
	40	101.2	5.6	97.3	3.1
	100	98.3	1.5	94.1	4.0

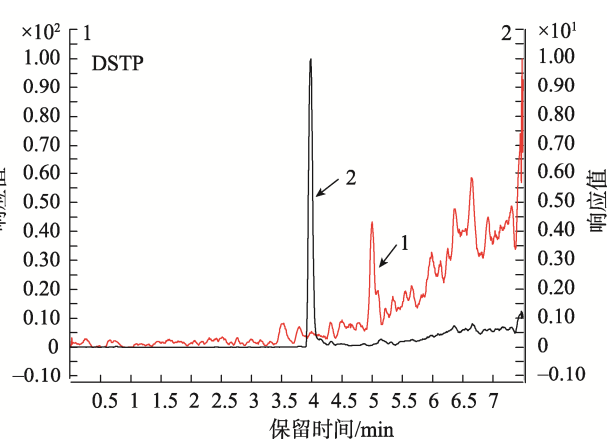
结果表明,在3个浓度添加水平下,9种AGs的平均回收率为76.2%~113.2%,日内变异系数 $\leq 8.4\%$,日间变异系数 $\leq 11.6\%$,满足检测方法的要求。代表性的空白及添加样



品色谱图如图1所示,各待测化合物出峰状况良好,且在待测化合物的保留时间处无杂峰干扰,表明方法选择性良好,能满足国内外抗生素残留检测分析方法性能的要求。

表6 鸡浓缩饲料添加氨基糖苷类抗生素的回收率和变异系数
Table 6 Average recovery rates and coefficients of variation of aminoglycosides added to chicken compound feed

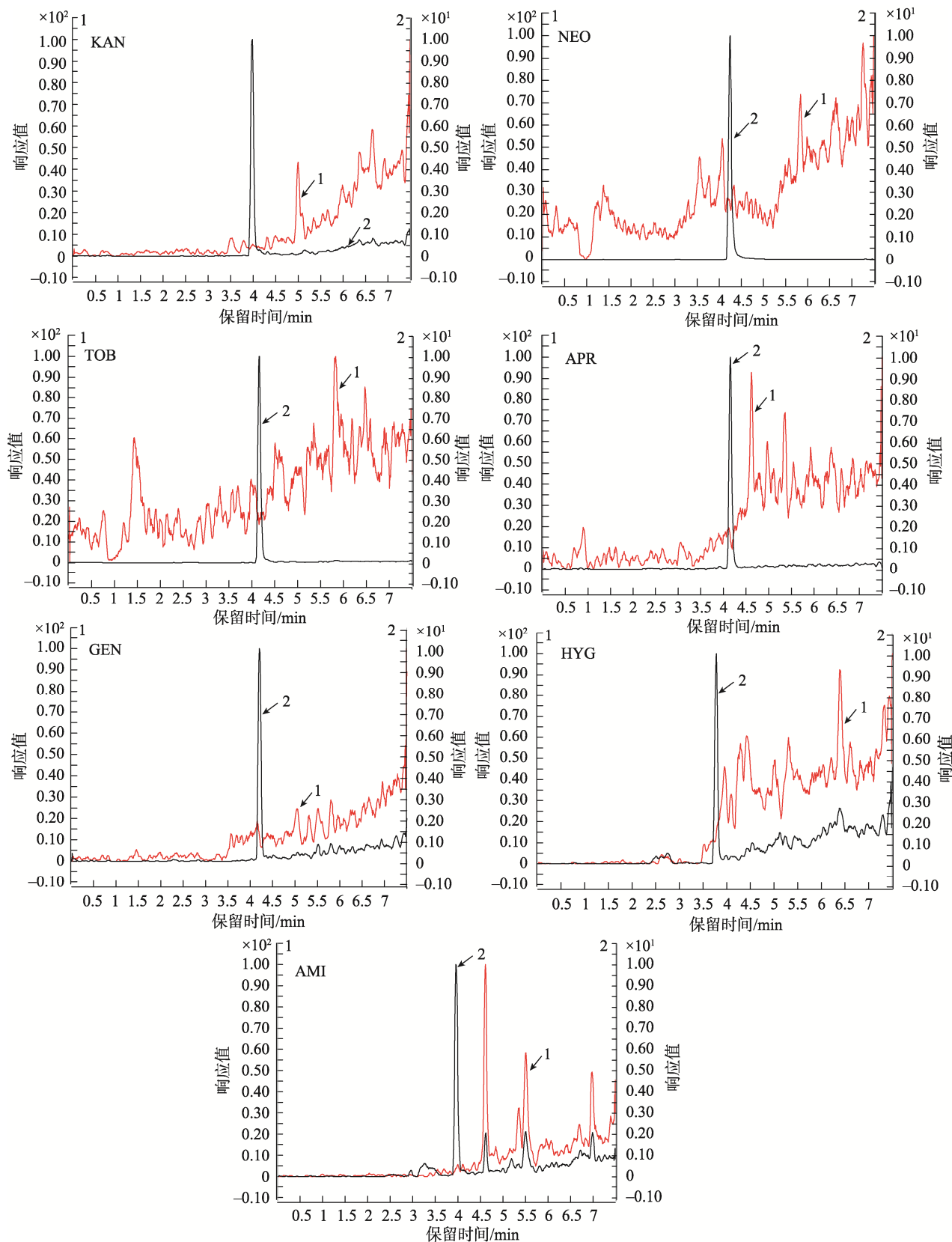
待测化合物	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	日内		日间	
		平均回收率/%	变异系数/% ($n=6$)	平均回收率/%	变异系数/% ($n=18$)
STP	80	81.6	2.1	79.4	4.3
	160	89.3	6.4	84.3	6.3
	400	83.2	3.2	79.4	9.6
DSTP	20	91.4	6.3	87.2	7.6
	40	93.9	2.9	88.2	4.8
	100	88.6	5.1	85.6	3.9
KAN	20	89.4	8.4	87.4	2.7
	40	86.9	3.9	83.5	3.5
	100	90.3	4.2	87.8	5.4
NEO	20	104.5	2.5	97.4	8.1
	40	102.3	5.3	98.4	2.6
	100	110.4	7.3	99.4	10.3
TOB	20	93.2	1.1	85.3	2.8
	40	87.4	2.2	82.4	5.6
	100	89.3	2.5	78.4	7.8
APR	20	102.3	3.5	93.9	9.2
	40	98.4	6.1	94.2	7.8
	100	94.2	2.1	92.3	3.9
GEN	20	84.2	2.4	81.3	4.5
	40	87.3	6.4	82.1	6.1
	100	79.4	3.1	76.2	5.1
HYG	20	108.4	3.4	103.2	5.7
	40	98.4	5.2	93.5	4.2
	100	103.2	4.2	94.2	9.7
AMI	20	97.4	3.2	92.1	4.1
	40	91.4	7.2	83.5	7.8
	100	89.4	6.7	85.1	3.1



注:1为空白猪浓缩饲料基质;2为基质加标。

图1 空白样品和基质加标标准品定量离子色谱图

Fig.1 Quantitative ion chromatograms of blank samples and matrix spiked standard



注: 1 为空白猪浓缩饲料基质; 2 为基质加标。

图 1(续) 空白样品和基质加标标准品定量离子色谱图

Fig.1 Quantitative ion chromatograms of blank samples and matrix spiked standard

2.6 实际样品测定

为验证方法的可靠性,应用本研究中优化、建立的方法,使用超高效液相色谱-串联质谱对随机抽取的饲料样品中 9 种 AGs 的含量进行测定,结果发现,其中部分鸡浓缩饲料和酒糟蛋白饲料样品中检测到新霉素,含量约为 22.5~180.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,猪浓缩饲料和豆粕中分别检测到庆大霉素和安普霉素,含量分别为 27.1 和 23.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 结 论

本研究建立了饲料中 9 种 AGs 的超高效液相色谱-串联质谱法。饲料中双氢链霉素、新霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、潮霉素 B 和庆大霉素的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$;链霉素的检出限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。双氢链霉素、新霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素、妥布霉素、安普霉素、潮霉素 B 和庆大霉素在 20~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,链霉素在 80~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,饲料中 9 种 AGs 的平均回收率为 76.2%~113.2%;日内变异系数 \leq 8.4%,日间变异系数 \leq 11.6%,准确度、精密度均满足方法要求。另外,该方法检测 AGs 时流动相中无需使用离子对试剂,很大程度上降低了使用离子对试剂对质谱仪器造成的不良影响。与其他方法相比,该方法操作方便、结果准确可靠,适用于饲料中 AGs 的定性筛查和定量检测,方法的建立为做好非法添加物筛查和饲料质量安全监测提供技术支持。

参考文献

- CRISTINA D, GUILLARME D, ALINE SS, *et al.* Aminoglycoside analysis in food of animal origin with a zwitterionic stationary phase and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 882: 127-139.
- HUONG NL, HOANG NH, HONG SY, *et al.* Characterization of fortimicin aminoglycoside profiles produced from *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868 by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap-mass spectrometry [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(6): 1-12.
- 张元, 周昱, 周伟娥, 等. 食品中氨基糖苷类残留前处理及分析方法研究进展[J]. *食品工业*, 2016, 37(4): 223-227.
ZHANG Y, ZHOU Y, ZHOU WER, *et al.* Research progress on pretreatment technologies and detection methods of aminoglycosides residues in food [J]. *Food Ind*, 2016, 37(4): 223-227.
- 黄原飞. 水产品及渔用饲料中 11 种氨基糖苷类药物超高效液相色谱-串联质谱检测方法的建立及应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
HUANG YF. The establishment and application of ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for determination of eleven aminoglycosides in aquatic products and fishery feed [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- 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 Pharma Anal*, 2016, 36(2): 301-305.
- WANG X, YANG S, LI Y, *et al.* Optimization and application of parallel solid-phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 11 aminoglycoside residues in honey and royal jelly [J]. *J Chromatogr A*, 2018, 1542: 28-36.
- YAN S, LAI XX, DU GR, *et al.* Identification of aminoglycoside antibiotics in milk matrix with a colorimetric sensor array and pattern recognition methods [J]. *Anal Chim Acta*, 2018, 1034: 153-160.
- KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 711: 1-53.
- DANEZIS GP, ANAGNOSTOPOULOS CJ, LIAPIS K, *et al.* Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography-MS/MS in various food matrices [J]. *Anal Chim Acta*, 2016, 942: 121-138.
- FAROUK F, AZZAZY HM, NIESSEN WM. Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 890: 21-43.
- PROKHOROVA I, ALTMAN RB, DJUMAGULOV M, *et al.* Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome [J]. *Proc Nat Acad Sci United States America*, 2017, 114(51): 10899-10908.
- MCGLINCHEY T A, RAFTER PA, REGAN F, *et al.* A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 624(1): 1-15.
- LEE HS, LOH YX, LEE JJ, *et al.* Antimicrobial consumption and resistance in five Gram-negative bacterial species in a hospital from 2003 to 2011 [J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2015, 48(6): 647-654.
- MCKAY SL, PORTNOY DA. Ribosome hibernation facilitates tolerance of stationary-phase bacteria to aminoglycosides [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 345(43): 1532-1539.
- LIANG C, PEDERSEN JA, BALSER TC. Aminoglycoside antibiotics may interfere with microbial amino sugar analysis [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(27): 5296-5301.
- ZHANG L, PENG J, TANG J, *et al.* Description and validation of coupling high performance liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering in aminoglycosides determination [J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 706(2): 190-204.
- 刘莉治, 黄聪, 于桂兰, 等. 挥发性离子对试剂应用于固相萃取超高效液相串联质谱法检测动物性食品中的壮观霉素, 链霉素, 二氢链霉素和新霉素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(10): 2296-2298.
LIU LZ, HUANG C, YU GL, *et al.* Application of volatile ion pair solvent in determination of four aminoglycosides in animal foods by SPE-UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2012, 22(10): 2296-2298.
- BABIN Y, FORTIER S. A high-throughput analytical method for determination of aminoglycosides in veal tissue by liquid/tandem mass spectrometry with automated clean up [J]. *J AOAC Int*, 2007, 90(5): 1418-1426.
- HONG Y, LEE S, KIM H, *et al.* Simultaneous analytical method for the

- neomycin, gentamicin residues in seafood [J]. *J Appl Bio Chem*, 2010, 53(1): 25–30.
- [20] 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.
- [21] 龚强, 丁利, 朱绍华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测乳制品中 10 种氨基糖苷类抗生素残留[J]. *色谱*, 2012, 30(11): 1143–1147.
- GONG Q, DING L, ZHU SH, *et al.* Determination of ten aminoglycoside residues in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(11): 1143–1147.
- [22] 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, 356(7): 143–152.
- 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 Prev Med*, 2017, 356(7): 143–152.
- [23] FERNANDEZ-TORRES R, LOPEZ MAB, CONSENTINO MO, *et al.* Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 675(2): 156–164.
- [24] TAO Y, CHEN D, YU H, *et al.* Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2012, 135(2): 676–683.
- [25] LU CY, FENG CH. On-line concentration of neomycin and screening aminoglycosides in milk by short capillary column and tandem mass spectrometry [J]. *J Separat Sci*, 2006, 29(14): 2143–2148.
- [26] HORIE M, SAITO H, NATORI T, *et al.* Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Liq Chromatogr*, 2004, 27(5): 12–16.
- [27] 徐飞. 氨基糖苷类药物残留检测筛选和确证方法的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- XU F. Study on screening and validation methods for determination of aminoglycoside drugs residue [D]. Beijing: China Agricultural University, 2014.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



肖志明, 博士, 副研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及检测技术。
E-mail: xiaozhiming@caas.cn



樊霞, 博士, 研究员, 主要研究方向为饲料质量安全及检测技术。
E-mail: fanxia@caas.cn