

## 使用液相色谱-质谱联用技术同时分离和定量氨基糖苷类抗生素

---

Fadi L. Alkhateeb, Adam Bengtson, Paul D. Rainville

Waters Corporation

---

### 摘要

对氨基糖苷类抗生素进行色谱分析和检测可能十分棘手并且耗时。这是因为这种分析物具有很强的极性，不挥发，并且不含发色团。本文将介绍如何开发用于分析氨基糖苷类抗生素的快速、简单且直接的液相色谱/质谱法。最终方法为使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱在配备ACQUITY QDa质谱检测器的ACQUITY UPLC系统上分析。本研究开发出的方法在定量氨基糖苷类抗生素中表现出良好的线性，对于所有分析物，在比较大的浓度范围内，线性回归相关系数大于0.99。此方法能够非常灵敏地检测氨基糖苷类抗生素，检测限有时可低至0.5 µg/mL。

### 优势

- 此单一HILIC检测法将Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与ACQUITY QDa质谱检测器进行了结合，可以替代多种传统检测法分析多种氨基糖苷类抗生素，并且可显著减少时间和成本
- 该方法无需进行任何衍生化或无需使用氟化离子对试剂
- 通过ACQUITY QDa检测器可以轻松、快速地分离和定量氨基糖苷类抗生素
- 使用QDa的选择离子监测(SIR)功能定量氨基糖苷类抗生素

---

## 简介

氨基糖苷类抗生素是一种治疗革兰氏阴性细菌感染的抗生素<sup>1-3</sup>。这种化合物具有很强的极性，不挥发，并且不含吸收性比较强的发色团。因此，对此类化合物进行定量分析颇为棘手，通常需要进行衍生化，以及使用专用检测器和/或氟化离子对试剂<sup>4,5</sup>。反相液相色谱已成功用于分析氨基糖苷类抗生素。然而，该方法并没有被广泛使用，因为它需要使用离子对试剂，而这可能会对分离产生负面影响，例如延长平衡时间。为了解决该问题，业内也使用亲水作用色谱(HILIC)搭配氨丙基HILIC固定相对氨基糖苷类抗生素进行分析<sup>6</sup>。虽然这种固定相已证明能够成功分离一些氨基糖苷类抗生素，但选择性有限。最近，Waters报告称可以使用全新两性离子磺烷基甜菜碱固定相 (Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱) 通过电喷雾串联质谱法(ESI-MS/MS)分析氨基糖苷类抗生素<sup>7</sup>。虽然该方法很有用，并且能够非常准确、灵敏地测定多种氨基糖苷类抗生素，但由于MS设备难以维护、操作复杂并且需要进行冗杂的数据分析，因此它并未在制药企业质量控制(QC)实验室中得到广泛使用。另外，高端质谱仪非常昂贵，很难在全球QC应用中得到普及。因此，检查我们能否使用稳定、易用的小型质谱检测器分析非发色化合物 (如氨基糖苷类抗生素) 不仅很有趣，而且也很重要。

本应用纪要介绍了使用ACQUITY QDa分析和定量混标中的氨基糖苷类抗生素的方法。ACQUITY QDa是一种带有电喷雾电离源的单四极杆质谱检测器。与传统高端质谱仪相比，QDa可有效节省成本且非常易于操作和维护。本研究采用UPLC方法，将新推出的Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱与ACQUITY QDa质谱检测器进行了结合，以证明该系统对氨基糖苷类抗生素进行常规分析的适用性和动态范围。图1显示了在本研究中检测的氨基糖苷类抗生素的化学结构。

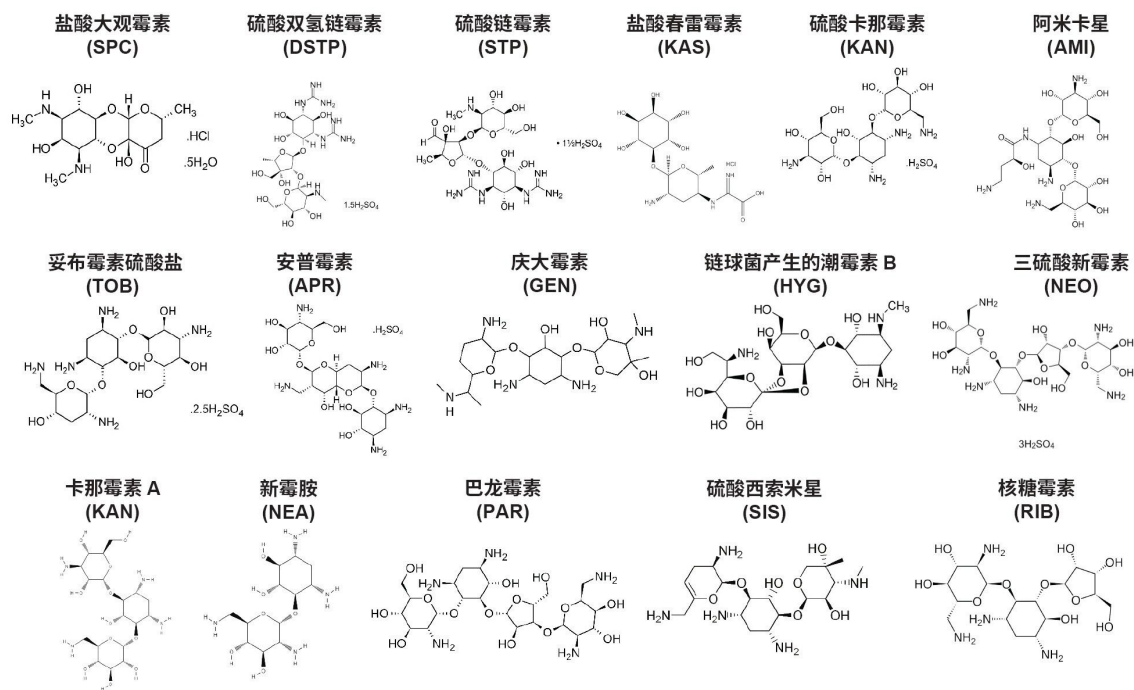


图1.在本研究中检测的16种氨基糖苷类抗生素的化学结构。

## 实验

### 参比物质和标准品制备

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）。准确称量所需量的各标准品并将其溶于去离子水中，制备上述化合物的储备液。然后，使用储备液制备包含所有氨基糖苷类抗生素的测试混合物。使用去离子水(>18.2 Mohm·cm)作为样品溶剂稀释各种标准品的储备液，制备测试混合物。测试混合物中每种分析物的最终浓度约为0.01 mg mL<sup>-1</sup>。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容器中并储存在冷冻柜(-20 °C)中。

### 液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC H-Class系统, 配备四元溶剂管理器(rQSM)、样品管理器(rFTN)、色谱柱管理器、一台CM Aux、PDA检测器、QDa质谱检测器
检测:	PDA和QDa
色谱柱:	1.7 $\mu$ m, 2.1 x 100 mm Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱 (pH值范围: 2-10)
柱温:	50 $^{\circ}$ C
样品温度:	5 $^{\circ}$ C
进样体积:	3 $\mu$ L
流速:	0.5
流动相A:	0.1% (v/v)甲酸铵水溶液 (未调整pH值, pH值: ~7.3)
流动相B:	0.1% (v/v)甲酸的乙腈溶液

## 质谱条件

质谱系统:	ACQUITY QDa质谱检测器
电离模式:	ESI+
采集范围:	300-630 Da
毛细管电压:	0.8 kV

离子源温度：400 °C

锥孔电压：15 V

## 数据管理

色谱软件：Empower™ 3 色谱数据系统

---

## 结果与讨论

### 基于QDa的方法开发

在这部分研究中，目标是优化色谱条件和QDa MS设置，以准确分离和检测氨基糖苷类抗生素。如前所述，关于这些氨基糖苷类抗生素的分离先前已有报道<sup>7</sup>。该方法使用的是Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱(2.1 x 2.5 μm x 15 cm)，其pH值为3.0、缓冲液浓度为20 mM（甲酸铵）、柱温为50 °C、流速为0.7 mL/min<sup>-1</sup>、梯度时间为10分钟。使用Empower中的方法转换计算器工具根据我们的仪器和色谱柱尺寸调整梯度配置后，将这些条件作为起始条件进行了检查。表1详细描述了起始条件和调整后条件。

初始方法				调整后的方法			
时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B
0.00	0.7	10	90	0.00	0.6	10	90
1.0	0.7	10	90	0.44	0.6	10	90
5.0	0.7	75	25	1.22	0.6	75	25
8.0	0.7	85	15	4.33	0.6	85	15
8.1	0.7	85	15	6.67	0.6	85	15
10.0	0.7	10	90	6.74	0.6	10	90

表1.报告的方法（参考资料7）与基于仪器及色谱柱尺寸和形状调整后的方法。

对ACQUITY QDa质谱检测器的设置也进行了优化，以提高灵敏度。比如，对各种ESI探头温度和锥孔电压进行了筛选，以减少其对信号和峰强度的影响。在探头温度为400 °C以及锥孔电压为15 V的条件下获得了最佳信号。该实验结果表明，在这些条件下，可以对混合物中所有16种氨基糖苷类抗生素进行分离和检测，如图2所示。然而，由于其中某些分析物的信号不是很强，因此我们决定只对ACQUITY QDa检测器上显示响应信号比较强的分析物做进一步实验。这些分析物包括盐酸大观霉素、硫酸链霉素、阿米卡星、硫酸卡那霉素、新霉素和硫酸西索米星。

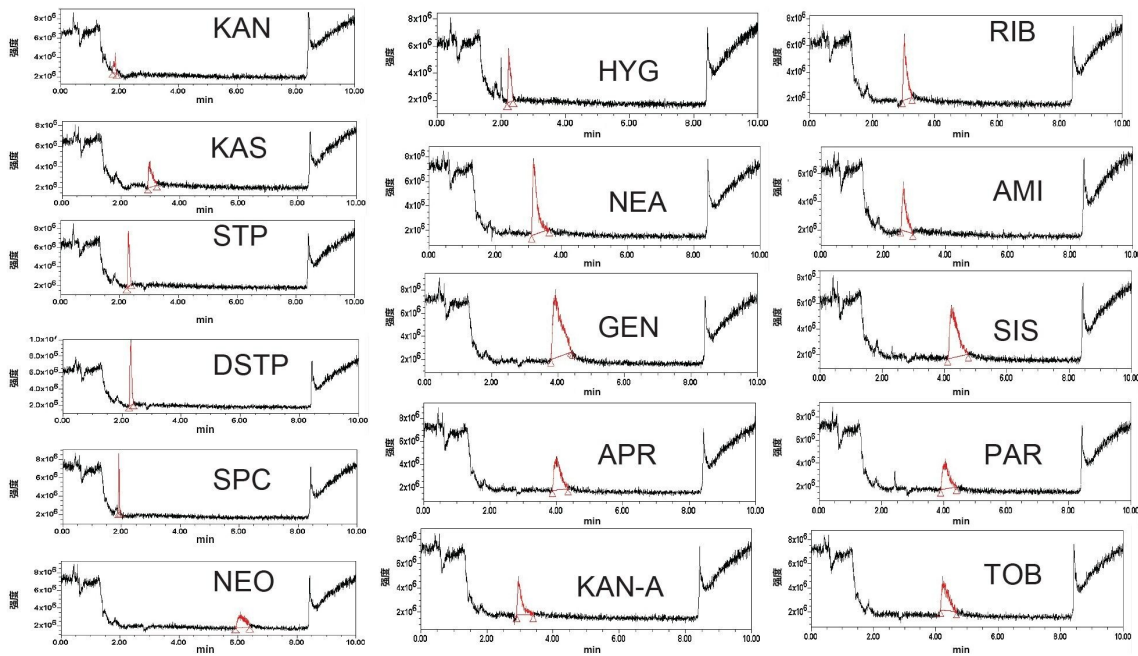


图2.图1所示16种氨基糖苷类抗生素各标准品的总离子流色谱图(TIC)。色谱条件为： $pH$ 值为7.3，缓冲液浓度为20 mM（甲酸铵），柱温为50 °C，流速为0.5 mL/min，梯度时间为10分钟，使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱(2.1 x 2.5  $\mu$ m x 10 cm)。

## 选择离子监测(SIR)

为了提高灵敏度并直接输出结果，使用QDa的SIR功能对特定峰进行了监测和定量。在该检测模式下，用户可以在色谱图中的每个时间点记录单个用户定义质荷比( $m/z$ )值，而所有其他离子均被排除。此功能很有用，它能提高分析灵敏度和特异性。图3A显示了从先前实验中选择的六种氨基糖苷类抗生素SIR图的重叠图，图3B显示了这六种化合物的总离子流色谱图(TIC)。TIC色谱图显示这六种氨基糖苷类抗生素分离得很干净且效果出色，SIR则提供了更清晰的峰外形。另外，由于大幅减弱了背景信号，提高了信噪比，因此SIR的灵敏度也得到了显著提升。需要在

此提及的是，将甲酸铵缓冲液浓度从20 mM调整为了8 mM，以便更灵敏地检测所有分析物，同时在水性流动相中添加了甲酸，将其pH值降到了3.0。

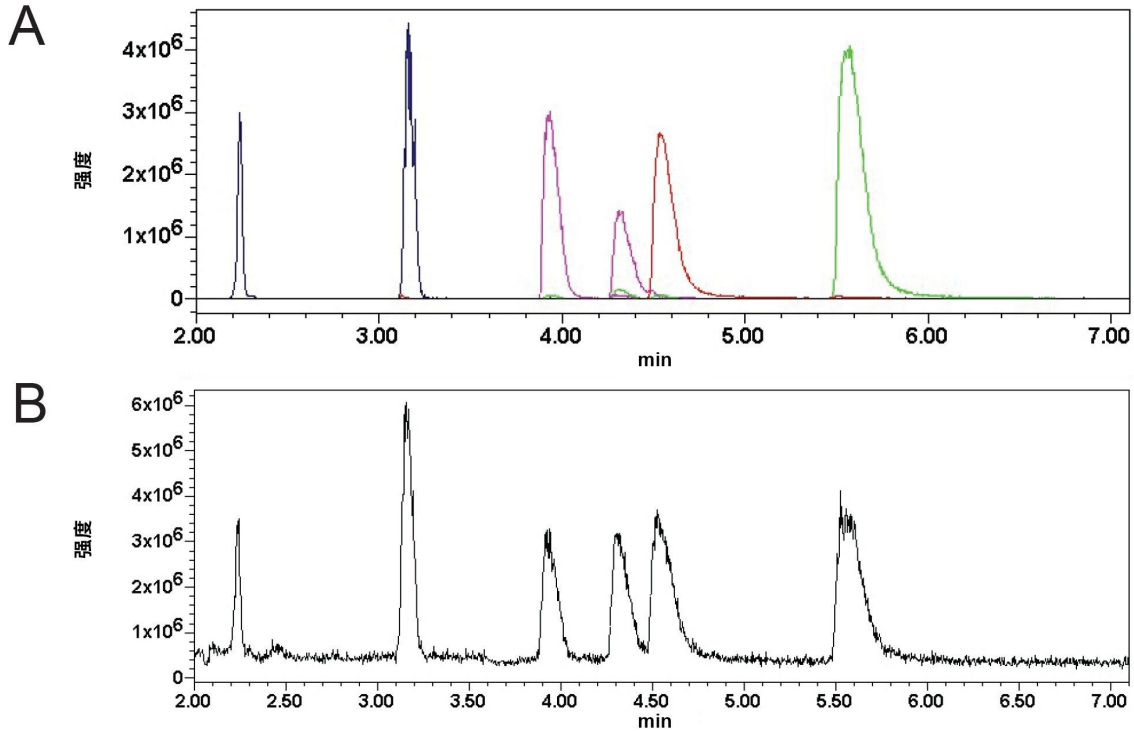


图3A.基于QDa的氨基糖苷类抗生素分析：A表示六种氨基糖苷类抗生素混合物的单独SIR图的重叠图，以及

图3B.表示这6种氨基糖苷类抗生素组成的相同混合物的TIC色谱图。根据洗脱顺序，色谱图中的峰依次为大观霉素峰、链霉素峰、阿米卡星峰、卡那霉素峰和西索米星峰。

要进一步推动基于QDa的LC方法在QC环境中的应用，重要的是评估该方法定量氨基糖苷类抗生素的效果。为此，对所开发方法的线性、检测限(LOD)和定量限(LOQ)进行了全面评估。针对0.5–250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内的8个浓度，评估了该方法定量六种氨基糖苷类抗生素的线性。所有分析物校准曲线的 $R^2$ 均大于0.99，这表明线性回归拟合良好。分别根据信噪比3和10计算LOQ和LOD。表2汇总了所开发方法的性能表征。

氨基糖苷类抗生素	线性 (R <sup>2</sup> )	范围 (µg/mL)	LOD (µg/mL) (S/N=3)	LOQ (µg/mL) (S/N=10)
新霉素	0.9987	5-250	0.1054	0.3513
大观霉素	0.9917	0.5-25	0.00988	0.0329
西索米星	9961	5-250	0.0646	0.2154
卡那霉素	9903	5-250	0.0883	0.2943
链霉素	0.983	5-250	0.05917	0.1972
阿米卡星	0.9872	5-250	0.05	0.173

表2. 仪器线性、范围、检测限(LOD)和定量限(LOQ)结果汇总。

## 结论

- 本文介绍了一种基于QDa的简单、快速的氨基糖苷类抗生素分析方法<sup>3</sup>。
- Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱能够很好地分离和保留高极性氨基糖苷类抗生素。
- 使用单一LC-MS方法同时分析各种氨基糖苷类抗生素<sup>2</sup>。
- QDa的SIR功能可准确、灵敏地定量氨基糖苷类抗生素。

## 参考资料

1. T. Hermann, Aminoglycoside antibiotics: Old Drugs and New Therapeutic Approaches, Cellular and Molecular Life Sciences 64(14) (2007) 1841-1852.
2. J.E. Davies, Aminoglycosides: Ancient and Modern, *J. Antibiot.* 59(9) (2006) 529-532.



3. R.R. Bailey, The Aminoglycosides, *Drugs* 22(4) (1981) 321–7.
  4. L. Šoltés, Aminoglycoside Antibiotics—Two Decades of Their Hplc Bioanalysis, *Biomed.Chromatogr.*13(1) (1999) 3–10.
  5. S. Joshi, HPLC Separation of Antibiotics Present in Formulated and Unformulated Samples, *J. Pharm.Biomed.Anal.*28(5) (2002) 795–809.
  6. C. Díez, D. Guillarme, A.S. Spörri, E. Cognard, D. Ortelli, P. Edder, S. Rudaz, Aminoglycoside Analysis in Food of Animal Origin With a Zwitterionic Stationary Phase and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry, *Anal.Chim.Acta* 882 (2015) 127–139.
  7. J. Yang.P.D. Rainville, 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, 2021.沃特世应用纪要, [720007442ZH](#).
- 

## 特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007558ZH, 2022年3月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

---

[使用条款](#)   [隐私](#)   [商标](#)   [网站地图](#)   [招聘](#)   [Cookie](#)   [Cookie](#)   [设置](#)  
[沪 ICP 备06003546号-2](#)   [京公网安备 31011502007476号](#)