

使用两性离子HILIC色谱柱通过LC-MS/MS测定食品中氨基糖苷类抗生素的确证方法开发和验证

Simon Hird, Claudia Rathmann, Jinchua Yang, Barbara Woyzek

Waters Corporation, LALLF M-V (Germany)

摘要

氨基糖苷类抗生素(AMG)是一种广谱抗生素,具有抗需氧菌感染的杀菌活性,作为兽药和人用药品广泛应用于食品动物和人类中。因此,我们必须监测食品中的残留以控制AMG的使用。许多国家/地区已经针对批准用于动物的氨基糖苷类抗生素规定了最大残留量(MRL)。出于控制和监测的目的,我们通常分析蜂蜜、鸡蛋、牛奶、食品动物的组织和生物体液中所含的AMG。AMG化合物的极性很强,在反相色谱柱中几乎不被保留。尽管在C₁₈色谱柱上使用离子对试剂成功地实现了AMG的色谱分离,但当与液相色谱串联四极杆质谱(LC-MS/MS)联用时,这种方法可能会产生离子抑制,并污染LC和MS/MS系统。亲水作用色谱(HILIC)的引入为极性化合物的分析提供了一种更兼容质谱的选择。本文展示了使用Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC色谱柱(具有磺基甜菜碱型两性离子填料)测定AMG的成功评估结果。牛奶、鸡蛋和蜂蜜样品使用含有10 mM乙酸铵、0.4 mM乙二胺四乙酸(EDTA)、0.5% NaCl和2%三氯乙酸(TCA)的溶液进行萃取,然后在Oasis™ HLB小柱上进行固相萃取(SPE),然后进行LC-MS/MS分析。方法性能已经根据欧盟委员会法规(EU) 2021/808号实施条例得到了成功验证。该方法适用于可靠确认残留,以全面检查MRL的合规性,以及在某些情况下被禁止使用的物质。

优势

- Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱可实现出色的色谱保留和分离性能,使用兼容MS的流动相,无需借助离

子对试剂

- 该方法适用于可靠测定残留，以检查MRL的合规性，以及在某些情况下被禁止使用的物质
- 该方法已根据欧盟委员会法规(EU) 2021/808号实施条例，使用三种样品类型成功得到验证

简介

氨基糖苷类抗生素(AMG)是一种广谱抗生素，对需氧细菌感染具有杀菌活性。它们被用作兽药、饲料添加剂，以及食品生产动物的生长促进剂。这些药物成本低廉，因此它们在商业化动物养殖中的过度使用令人担忧。食品中存在的AMG可能具有致敏性和/或组织毒性，对消费者的健康构成威胁，并且暴露于这些物质可能会导致抗生素耐药性的增加。误用兽药可能会导致动物组织中出现不合格的兽药残留。一些AMG在食品生产动物的一系列组织、鸡蛋和牛奶中设定了最大残留限量(MRL)¹。一些AMG未被批准在生产供人类食用的牛奶或鸡蛋的动物中使用，因此没有关于牛奶或鸡蛋中这些AMG的MRL规定。此外，由于蜂蜜中未获批使用AMG，因此未规定蜂蜜中AMG的MRL。

AMG具有弱碱性、水溶性，并且极性过强，因此无法包含在多残留方法的范围内，需要依赖单独的特定类别方法进行检测^{2,3}。此外，它们也不适合反相色谱分析，除非使用离子对试剂（例如HBFA），但这会导致离子抑制和LC-MS/MS系统污染。另外也可以使用亲水作用液相色谱法(HILIC)测定AMG，但使用酰胺或氨丙基HILIC固定相时，观察到这些化合物的分离选择性有限。本研究使用UniSpray™实施了之前开发的基于Atlantis™ Premier BEH™ Z-HILIC色谱柱的方法，并进一步评估了该方法在测定牛奶、鸡蛋和蜂蜜中八种AMG的性能^{4,5}。

实验

样品描述

牛奶、鸡蛋和蜂蜜购自当地零售商，然后交由德国梅克伦堡-西波美拉尼亚州国家农业、食品安全与渔业办公室的实验室进行制备和分析。样品经均质化处理后，使用含10 mM乙酸铵、0.4 mM乙二胺四乙酸(EDTA)、0.5% NaCl和2%三氯乙酸(TCA)的溶液进行萃取，使用Oasis HLB进行SPE纯化后，进行LC-MS/MS分析。完整详情请参阅下方图1。



图1.牛奶、鸡蛋和蜂蜜中氨基糖苷类抗生素的样品萃取和纯化过程概述

在之前为空白样的牛奶和鸡蛋中制备0.1、0.5、1、1.5和2倍目标浓度（通常为MRL（如有），如果没有则进行外推）的加标样品。蜂蜜中没有规定AMG残留的MRL，因此在蜂蜜中不允许AMG存在。此类未经批准物质的目标水平设定为EURL规定的最低方法性能要求(MMPR)，并制备1、1.5、2和3倍MMPR(20 µg/kg)的加标样品⁶。制备相同浓度范围的基质匹配标准品。整个实验中一直使用妥布霉素作为内标(IS)。目标浓度水平的浓度请参见下表1。

	目标浓度 (MRL或MMPR; µg/kg)		
	牛奶	鸡蛋	蜂蜜
安普霉素	200*	200*	20
双氢链霉素	200	200*	20
庆大霉素	100	100*	20
卡那霉素	150	200*	20
新霉素B	1500	500	20
巴龙霉素	200*	200	20
大观霉素	200	200*	20
链霉素	200	100*	20

表1.目标浓度 (MRL和MMPR[蜂蜜], µg/kg) 。

*该商品中的这些分析物没有规定MRL，因此目标浓度根据本验证计划中加标浓度的其他MRL外推而得

液相色谱条件

液相色谱系统：	配备FTN SM的ACQUITY I-Class UPLC
色谱柱：	Atlantis Premier BEH Z-HILIC (2.5 µm, 2.1 × 150 mm) P/N: 186009987
柱温：	50 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	5 µL
流动相A：	20 mM甲酸铵水溶液(pH 3.0)

流动相B：含0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.60	10	90	初始
1.0	0.60	75	25	6
5.0	0.60	85	15	6
8.0	0.60	85	15	6
8.1	0.60	10	90	6
10.0	0.60	10	90	6

质谱条件

质谱系统：Xevo TQ-XS

电离模式：UniSpray（正离子模式）

撞击器电压：3.0 kV

离子源温度：150 °C

脱溶剂气温度：500 °C

脱溶剂气流速：1000 L/h

锥孔气流速：150 L/h

化合物	保留时间 (min)	MRM	CV (V)	CE (eV)
大观霉素	1.47	351.2>207.2	30	22
		351.2>333.2	30	18
双氢链霉素	1.73	584.3>246.2	70	32
		584.3>263.1	70	35
链霉素	1.75	582.3>246.2	70	35
		582.3>263.2	70	40
卡那霉素	2.17	485.3>163.1	50	28
		485.3>324.2	50	15
巴龙霉素	2.80	616.3>163.0	70	35
		616.3>293.2	70	20
庆大霉素C1	2.81	478.3>160.0	25	15
		478.3>322.2	25	22
安普霉素	2.87	540.3>217.2	50	30
		540.3>378.2	50	18
庆大霉素C2	2.89	464.3>160.0	25	15
		464.3>322.2	25	22
庆大霉素C1a	2.99	450.3>160.0	25	15
		450.3>322.2	25	25
新霉素B	4.20	615.3>161.0	70	20
		615.3>163.0	70	20
妥布霉素(IS)	3.11	468.3>163.0	50	20

表2. AMG的MRM参数（定量通道以粗体显示）。

数据管理

质谱软件：MassLynx v4.2

信息学软件：TargetLynx™ XS

方法验证

根据欧盟委员会实施法规(EU) 2021/808号实施条例的要求，使用代表性加标样品对牛奶、鸡蛋和蜂蜜进行了验证⁷。通过检查保留时间、离子丰度比和鉴定点来评估鉴定结果。使用实测回收率评价正确度、重复性(RSD_r)、实验室内重现性(RSD_R)和决定限度(CCα)，根据三个不同日期分析重复加标样品的数据得出。与传统验证方法不同，替代验证方法验证的是一个浓度范围，而不是离散的浓度水平。因此，在验证用的样品中添加的浓度不需要严格对应欧盟委员会实施法规(EU) 2021/808号实施条例附件I中给出的确切浓度水平。但是，所选的验证浓度范围必须足以覆盖所需的浓度水平。对于MRL和未获批准的物质，所有计算均基于InterVAL 3.4.0.4，CD 2002/657（替代方法）进行。

结果与讨论

Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱采用带有两性离子磺烷基甜菜碱固定相的BEH颗粒填充。两性离子磺基甜菜碱键合相同时具有正电荷和负电荷的基团，且比率为1:1，因此整体上呈现中性。磺基甜菜碱键合能够提供独特的选择性，并形成强亲水性表面。表面上致密/厚重的富水层可进一步增强极性分析物的保留性。磺烷基甜菜碱硅胶基质固定相要求流动相中含有高浓度缓冲液，而BEH磺烷基甜菜碱固定相采用中等浓度(20 mM)的缓冲液就可以使分析物实现理想分离。有关HILIC方法开发的更多详细信息，请参阅之前的应用纪要和最近的出版物^{4,5}。

即使是极性最强的分析物，Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱也能提供足够的保留性，满足欧盟委员会实施法规(EU) 2021/808号实施条例的要求：检测分析物的最低可接受保留时间应为色谱柱死体积对应保留时间的两倍。所有峰均在1.5~4.2分钟之间洗脱，总运行时间为10分钟。色谱分析结果稳定，分析批次之间的保留时间无显著变化(RSD为0.01%~0.91%；在各种基质中n = 57)。该方法为所有AMG提供了优异的保留性和峰形，流动相中无需使用离子对试剂或高浓度缓冲液，从而减少了流动相相关的离子抑制现象，从而提高了灵敏度。

由牛奶、鸡蛋和蜂蜜提取物制备的基质匹配标准品分析表现出了优异的灵敏度。图2展示了为分析牛奶中1倍目标浓度的基质匹配标准品得到的AMG色谱图（见表1）。图中所示代表了这三种商品的色谱图、灵敏度和选择性，表明该方法在经过适当验证后，能够用于检查法规合规性。所有AMG的响应在评估的范围内呈线性，图表使用1/x加权创建。决定系数值(R^2) > 0.99。

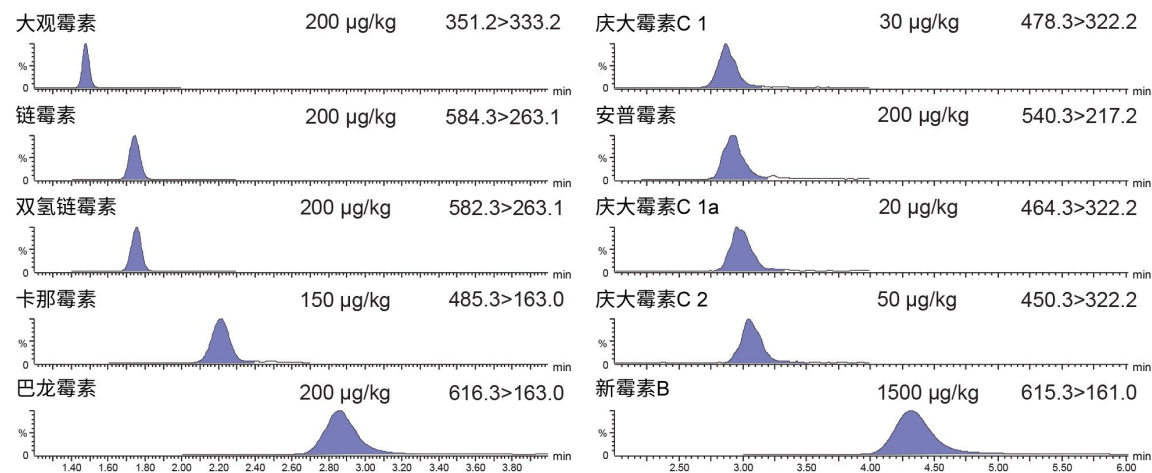


图2.分析牛奶中1倍目标浓度的基质匹配标准品得到的一系列氨基糖苷类抗生素色谱图。

欧盟委员会实施法规(EU) 2021/808号实施条例规定：“对于特定药理活性物质，若验证0.1倍MRL的浓度无法合理实现，则可以替换为0.1倍到0.5倍MRL之间可以合理实现的最低浓度。”初步评估显示，0.1倍目标浓度加标的分析精确度不可接受，因此在进一步计算中移除了这些数据，最终以0.5倍目标浓度的加标浓度成为最低浓度。

使用分析加标样品得到数据评估正确度，通过实测回收率进行确定。三种商品中所有加标浓度的AMG实测回收率平均值均在87%~106%的范围内，处于为最低正确度设置的偏差范围内（以实测回收率表示时为80%~120%）。欧盟委员会实施法规(EU) 2021/808号实施条例规定了在实验室内重现性条件下，重复分析加标样品的精密度限值，具体取决于加标浓度。除了牛奶和鸡蛋中一个案例在0.5倍至2倍目标水平加标时未达标外，其他所有情况均满足重现性（对于>120~1000 $\mu\text{g/kg}$, $\text{RSD}_{\text{WR}} \leq 22\%$ ，或对于10~120 $\mu\text{g/kg}$, $\leq 25\%$ ），和重复性（对于>120~1000 $\mu\text{g/kg}$, $\text{RSD}_r \leq 15\%$ ，或对于10~120 $\mu\text{g/kg}$, $\leq 17\%$ ）的标准。对于加标0.5~2倍目标浓度的牛奶和鸡蛋样品，所有化合物均通过了重现性和重复性限值标准（ RSD_{WR} 和 RSD_r 分别为10%~19%和1.6%~16%）。在以较低浓度(20~60 $\mu\text{g/kg}$)加标的蜂蜜中，所有化合物均通过了重现性限值标准(11%~22% RSD_{WR})。加标浓度为20 $\mu\text{g/kg}$ 时，重复性在3.5%~19% RSD_r 范围内，只有一种化合物不满足重复性可接受标准($\leq 17\% \text{RSD}_r$)。

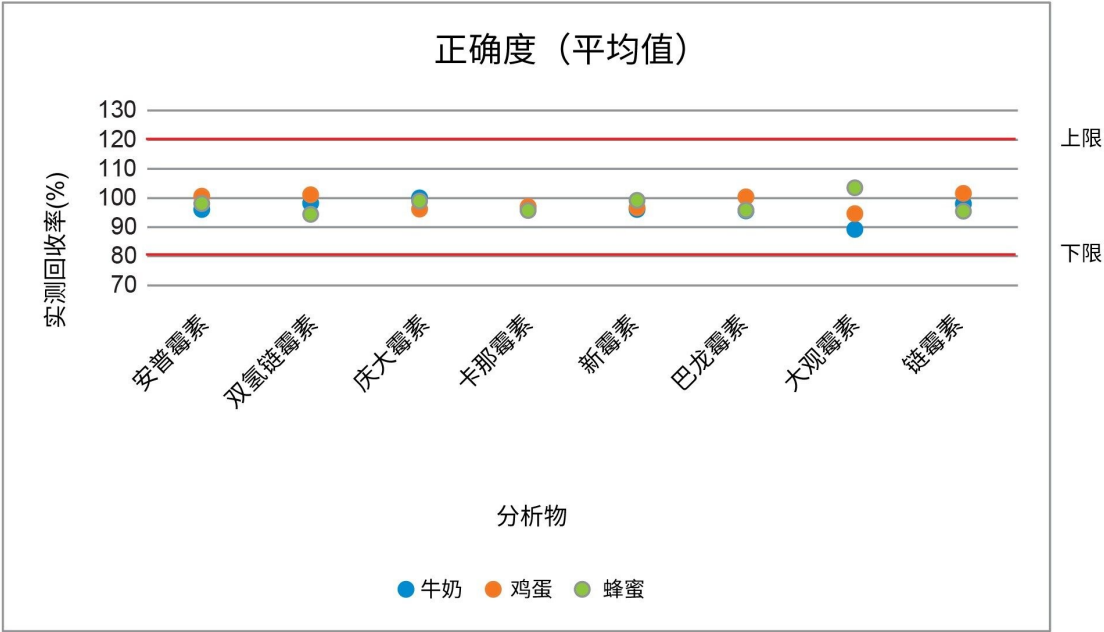


图3.牛奶、鸡蛋和蜂蜜分析的正确度平均值（实测回收率）汇总。

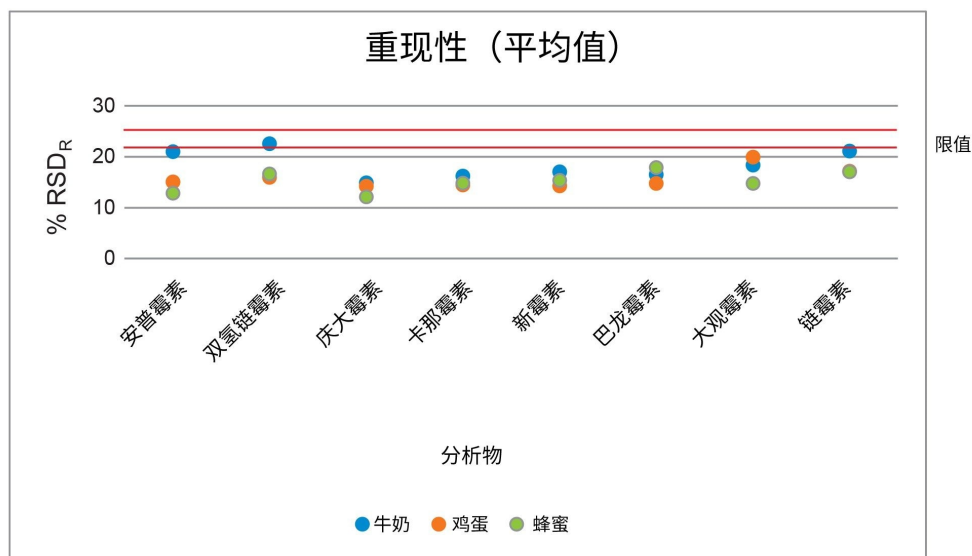


图4.牛奶、鸡蛋和蜂蜜分析的重现性平均值汇总。

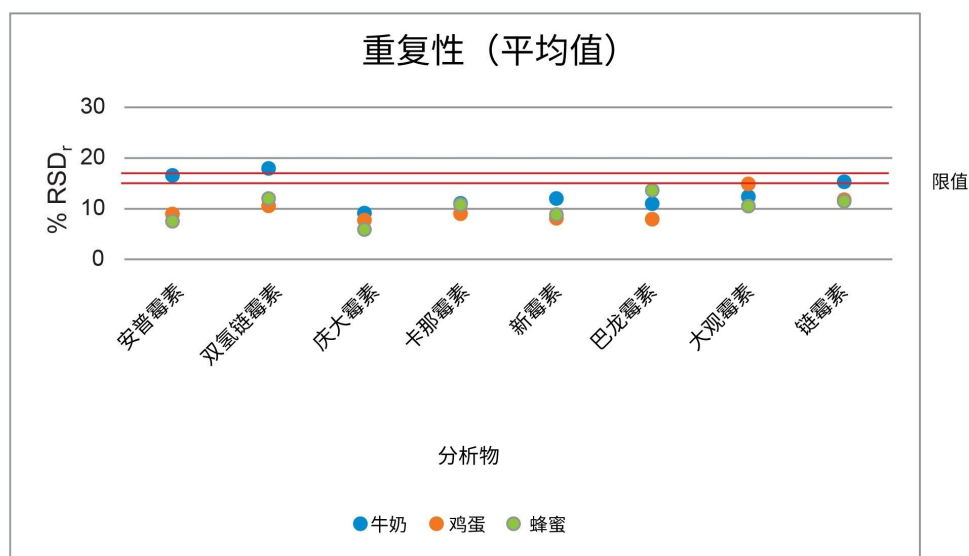


图5.牛奶、鸡蛋和蜂蜜分析的重复性平均值汇总。

确认批准物质的决定限度(CCa)必须高于但尽可能接近MRL，而对于禁用和未批准的AMG，其决定限度必须为分析

技术所能实现的最低水平。表2、表3和表4提供了包括CC α 值在内的关键验证参数汇总。

分析物	MRL ($\mu\text{g/kg}$)	加标浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	实测回收率 (%)	% RSD _r	% RSD _{wR}	CC α
安普霉素	无	100	96	14	17	53
		200	96	8.1	13	
		300	96	5.8	12	
		400	96	4.6	12	
双氢链霉素	200	100	97	16	19	254
		200	96	8.9	14	
		300	96	6.4	13	
		400	96	5.1	13	
庆大霉素	100	50	99	8.6	13	123
		100	98	5.3	12	
		150	97	4.0	12	
		200	97	3.2	11	
卡那霉素	150	75	95	10	14	185
		150	94	6.2	12	
		225	93	4.6	11	
		300	93	3.7	11	
新霉素	1500	750	96	11	15	1854
		1500	95	6.5	12	
		2250	95	4.8	12	
		3000	95	3.9	11	
巴龙霉素	无	100	96	10	15	40
		200	95	6.3	13	
		300	95	4.8	12	
		400	95	3.9	12	
大观霉素	200	100	89	12	17	259
		200	88	7.7	15	
		300	87	5.9	14	
		400	87	4.9	13	
链霉素	200	100	97	13	16	254
		200	96	7.0	14	
		300	96	4.9	13	
		400	95	3.8	13	

表3. 牛奶分析计算出的关键验证参数汇总。

分析物	MRL (µg/kg)	加标浓度 (µg/kg)	实测回收率 (%)	% RSD _r	% RSD _{wR}	CC _α
安普霉素	无	100	100	7.0	12	41
		200	100	3.7	11	
		300	99	2.6	11	
		400	99	2.0	11	
双氢链霉素	无	100	100	10	14	42
		200	99	5.8	12	
		300	99	4.3	11	
		400	99	3.4	11	
庆大霉素	无	50	96	6.1	12	18
		100	97	3.3	11	
		150	97	2.3	11	
		200	97	1.8	11	
卡那霉素	无	100	97	8.0	13	37
		200	97	4.8	11	
		300	97	3.6	11	
		400	97	2.9	10	
新霉素	500	250	97	6.2	12	601
		500	97	3.3	11	
		750	97	2.3	10	
		1000	97	1.8	10	
巴龙霉素	200	100	101	5.9	12	242
		200	101	3.1	11	
		300	102	2.1	11	
		400	102	1.6	11	
大观霉素	无	100	95	14	18	44
		200	95	9.3	15	
		300	95	7.3	14	
		400	96	6.1	14	
链霉素	无	50	101	10	14	22
		100	100	6.1	12	
		150	100	4.5	12	
		200	100	3.6	12	

表4. 鸡蛋分析计算出的关键验证参数汇总。

分析物	MMPR (µg/kg)	加标浓度 (µg/kg)	实测回收率 (%)	% RSD _i	% RSD _{WR}	CC _α
安普霉素	20	20	99	11	15	5.5
		30	98	8.0	13	
		40	98	6.5	12	
		60	98	4.9	12	
双氢链霉素	20	20	94	17	20	8.2
		30	94	13	17	
		40	94	10	15	
		60	94	7.6	14	
庆大霉素	20	20	99	8.9	14	6.0
		30	99	6.3	12	
		40	99	5.0	12	
		60	99	3.5	11	
卡那霉素	20	20	97	15	18	6.8
		30	96	12	15	
		40	95	9.5	14	
		60	95	7.3	12	
新霉素	20	20	99	13	17	6.4
		30	99	9.4	16	
		40	100	7.6	15	
		60	100	5.6	14	
巴龙霉素	20	20	96	19	22	8.5
		30	96	15	19	
		40	96	12	17	
		60	96	8.8	14	
大观霉素	20	20	101	17	20	11
		30	103	11	15	
		40	105	8.4	13	
		60	106	5.6	12	
链霉素	20	20	95	17	20	7.8
		30	95	12	17	
		40	96	9.8	16	
		60	96	7.2	15	

表5. 蜂蜜分析计算出的关键验证参数汇总。

此外，研究还评估了分析重复样加标所得数据是否符合所需的鉴定标准。每种分析物采用两个通道足以满足MRL和未批准物质所需的鉴定点（分别为四个和五个点），所得峰的离子丰度比和保留时间与标准品之间的偏差均在建议范围内。

结论

本应用纪要介绍了一种用于测定各种食品中AMG抗生素残留的方法。经过提取和纯化后，使用Atlantis Premier BEH Z-HILIC色谱柱通过LC-MS/MS方法测定AMG残留。方法性能已经根据欧盟委员会法规(EU) 2021/808号实施条例在三种动物产品中得到了成功验证。正确度、重复性和实验室内重现性标准均得到满足，但有少数例外。决定限度(CC α)值表明，该方法适用于残留确认，以检查这些物质是否符合EU MRL规定，在物质禁止使用的情况下还可以检查物质是否超出了其他主管部门规定的MRL限值。

参考资料

1. Luan Y *et al.* Advances in the Application of Aptamer Biosensors to the Detection of Aminoglycoside Antibiotics. *Antibiotics*. 2020.9:787.
2. Farouk F *et al.* Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review. *Anal. Chim. Acta*. 2015.890:21–43.
3. Glinka M *et al.* Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. *TrAC*. 2020.131:116034.
4. Yang J和Rainville P.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.沃特世应用纪要. [720007442ZH](#). 2022.
5. Yang J和Rainville P. Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Analysis of Aminoglycosides in Foods Using an Ethylene-Bridged Hybrid Zwitterionic Stationary Phase and Hydrophilic–Lipophilic-Balanced Solid-Phase Extraction Cartridges. *J. Agric. Food Chem.* (2023) 71(19):7593–7603.
6. EURL Guidance on Minimum Method Performance Requirements (MMPRs) For Specific Pharmacologically Active Substances in Specific Animal Matrices, v2.0 June 2022.
7. Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the Performance of Analytical Methods for Residues of Pharmacologically Active Substances Used in Food-Producing Animals and on the Interpretation of Results as Well as on the Methods to Be Used for Sampling and Repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC. OJ (2021) L 180:84–109.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

UniSpray离子源 <<https://www.waters.com/134891755>>

720008022ZH, 2023年9月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie Cookie 设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号