1-利用 DPX 枪头式分散固相微萃取柱（DPX tips®）及色谱-质谱/质谱联用法进行氨基糖苷类抗生素的高通量分析

1-Multiresidue Analysis of Aminoglycoside Antibiotics using Disposable Pipette Extraction and LC-MS/MS

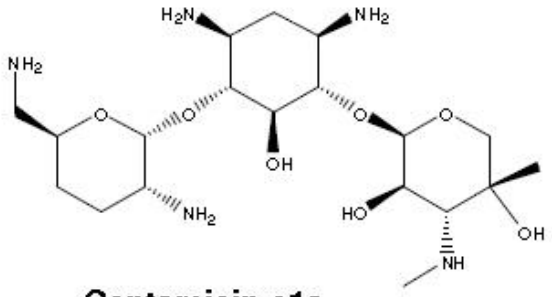
概述

目前，氨基糖苷类药物在兽用抗生素中广泛应用。美国农业部食品安全和检验机构用半定量方法检测动物组织中氨基糖苷类（包括其他抗生素）的含量。此方法用管式固相萃取（SPE）准备样品，再用色谱-质谱/质谱联用分析。此研究目的在于形成氨基糖苷类反向质谱分析的流水操作，包括提供短式余晖荧光屏，去除微生物实验，SPE 萃取，蒸干。样品准备包括阳离子交换树脂填充的枪头式分散固相微萃取柱提取溶液。DPX 将少量吸附材料填充进一次性移液枪头与溶液混合，加速固相萃取过程，减少材料消耗和溶剂使用，更易实现自动化。DPX 洗脱后，12 种氨基糖苷用高效液相色谱-质谱/质谱联用，以反向萃取柱 BEH C18 (50 x2.1 mm, 1.7 µmBEH C18 （50 x2.1 mm, 1.7 µm）获得高位电极。在色谱-质谱/液质联用发展史上，液相分离氨基糖苷时，不同的正向色谱条件如填柱化合物（氰化物二氧化硅 C18 柱，亲水作用色谱柱）尺寸，流动相组分都已得到检测。

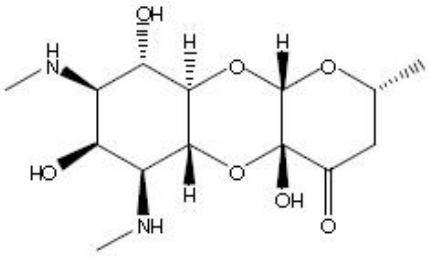
引言

氨基糖苷类抗体：

氨基糖苷类和氨基环醇类都是极性的，其结构包含一个氨基环醇与氨基糖相连，结构如下图所示：



Gentamicin c1a



Spectinomycin

目前 USDA-FSIS 分析方法：

LC-MS/MS 确定阳性样品之后进行半定量微生物抑制实验。

验证性 LC-MS/MS 主要包括：

-提取 2 g 样品（胎牛，猪或鸟的肾脏，肝脏或肌肉），加入 2×10 mL 水解液（10 mM KH_2PO_4, 0.4 mM EDTA and 2% (*w/v*) TCA）

-调节 pH 值 7.5-8.0

-阳离子交换柱（500 mg CBX）装填进枪头

-3 mL 10%乙酸甲醇溶液洗脱

-提取物置于 0.5 mL 5 mM HFBA 中

-20 mM HFBA 作为水相和有机相离子配对剂进行 LC-MS/MS 分析（运行时间=35 分钟）

实验目的：

发明一种以 LC-MS/MS 为基础的流水线方法代替微生物抑制试验并使氨基糖苷的反向筛选和鉴定过程加快。

方法

样品提取

（1）称取 5 g 匀浆后胎牛肾脏样品置于 50 mL 一次性聚丙烯管

（2）加入 10 mL 提取缓冲液（10 mM KH2PO4, 0.4 mM EDTA 和 2% (w/v) TCA 水溶液）。

（3）加入妥布霉素作为内标，涡旋振荡 10 分钟。3450 rcf 离心 5 min。

（4）将上清倒入一个干净的 50 mL 管中。加入 10mL 提取缓冲液，涡旋振荡 10 分钟。3450 rcf 离心 5 分钟。

（5）收集上清，1M NaOH.调节 pH 值至 6.5。

枪头式分散固相微萃取柱（DPX）：

（1）1 mL DPX 枪头（DPX Labs, LLC;Columbia, SC, USA)填充 50 mg 阳离子交换（WCX）吸附剂（颗粒大小 30-70μm），加入 1 mL 甲醇和 1mL 水。

（2）枪头吸入 1mL 提取物，

（3）1 mL 水洗枪头。

（4）枪头用 1 mL10%甲酸水溶液洗脱（手动洗脱，洗脱液流入聚丙烯进样瓶，并用枪头吸打 5 次）

液相色谱-质谱/液质联用条件：

（a）液相色谱-质谱/液质联用仪器：

Waters 超高效液相色谱结合 Waters TQD 检测器；分析软件为 MassLynx

（b）色谱柱：Waters BEH C18（50 x 2.1 mm, 1.7 μm）

（c）柱温：40℃

（d）自动进样器温度：7℃

（e）加样体积：5 μL（局部溢针循环）

（f）分流阀程序：0-0.7 min 弃去 0.7-2.5 min 上质谱，2.5-3.0 min 弃去

（g）流动相：

A: 20 mM HFBA 水-乙腈(95:5, v/v)

B: 20 mM HFBA 乙腈

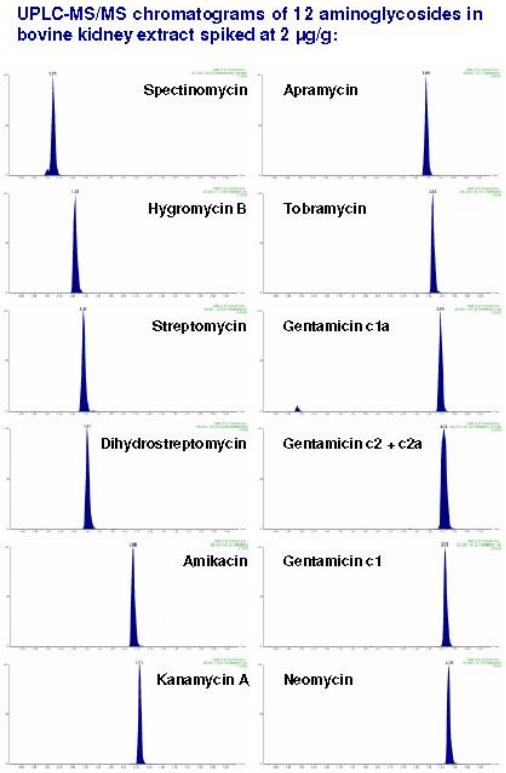
（h）流速：500 μL/min

（i）流动相线性梯度：

Time	%A	%B
Initial	100	0
0.50	80	20
1.00	80	20
2.00	60	40
2.05	10	90
2.50	10	90
2.55	100	0
3.00	100	0

（j）液质联用条件：ESI+, 5 ms 保留时间

Analyte	Precursor *m/z*	Product *m/z*	Cone (V)	Coll (V)
Spectinomycin	351.2	333.3 100.2	40	20 30
Gentamicin c1a	450.4	160.2 322.4	25	25 15
Gentamicin c2+c2a	464.4	322.4 160.2	25	15 25
Tobramycin	468.4	163.2 324.3	30	25 15
Gentamicin c1	478.4	157.2 322.4	30	30 15
Kanamycin A	485.4	163.2 324.3	30	20 15
Hygromycin B	528.4	177.2 352.4	45	30 25
Apramycin	540.4	217.2 378.3	35	25 15
Streptomycin	582.4	263.3 221.3	65	35 40
Dihydrostreptomycin	584.4	263.3 246.3	55	35 40
Amikacin	586.4	163.2 425.3	35	35 20
Neomycin	615.4	161.2 163.2	45	35 35



结果

液相色谱-质谱/液质联用最佳方法：

氨基糖苷类在反向色谱（RP）条件下没有残留，因此检测两种策略：

（1）标准水相分离：

（a）1 个氢化二氧化硅结合的 C18 柱

（b）HPLC 柱

（2）反向分离离子系统（HFBA）

ANP 液相色谱用乙腈和甲酸水溶液作为流动相，因此间隔运行 RP 和 ANP 模式进行其他抗生素和兽药的电位分析。

HFBA 反向色谱能提供粗略和可靠的结果。

高效液相色谱使用 1.7 µm 色谱柱可减少液质联用 10 倍分析时间（35 min vs. 3 min）。

DPX 过程优化：

优化参数包括：吸附剂类型；颗粒大小和数量；洗脱溶液组成和体积；装填步骤前提取液 pH 调节。

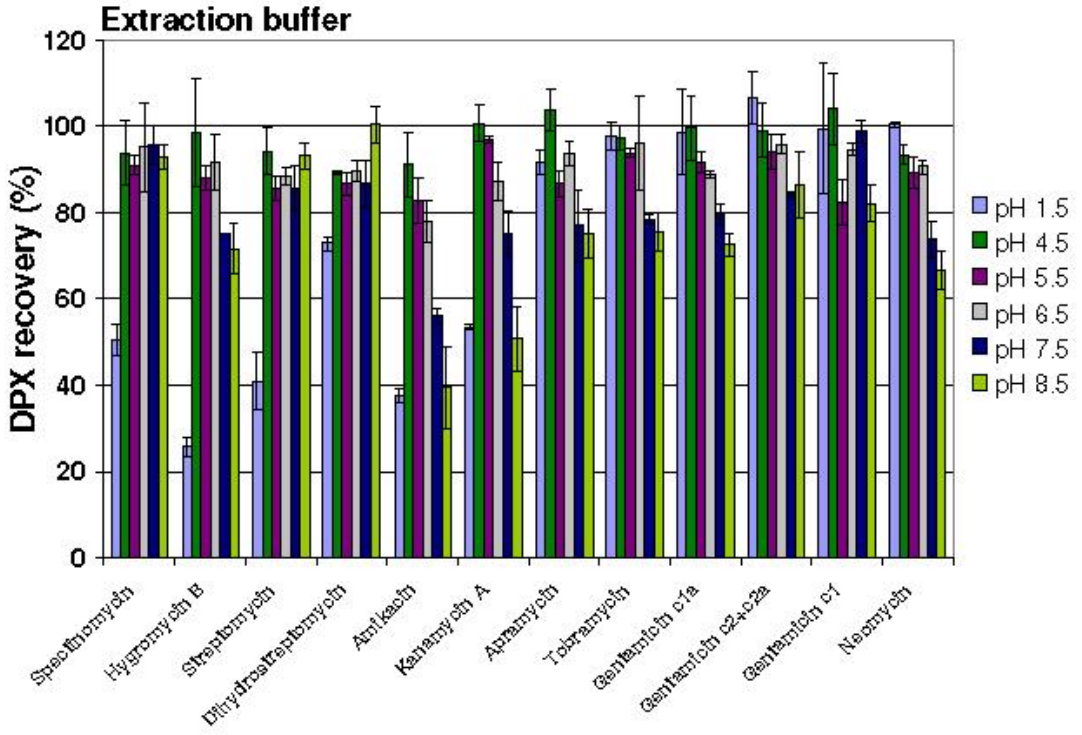
弱阳离子交换柱（30-70 µm 颗粒大小）提供了胎牛肾脏样品最全面的结果。

（a）DPX 从不同 pH 提取液中的回收率

5 mL 加入标准物的提取液不调 pH（pH~1.5），另外调 pH4.5-8.5，吸入装填吸附剂的枪头（50 mg）并用 2x1 mL of 10%甲酸水溶液洗脱。

不调 pH 溶液，洗脱时(安普霉素到新霉素) 回收率高但 pH 增加。

pH 4.5-6.5 时回收率在接受范围内 (78-104%) 。

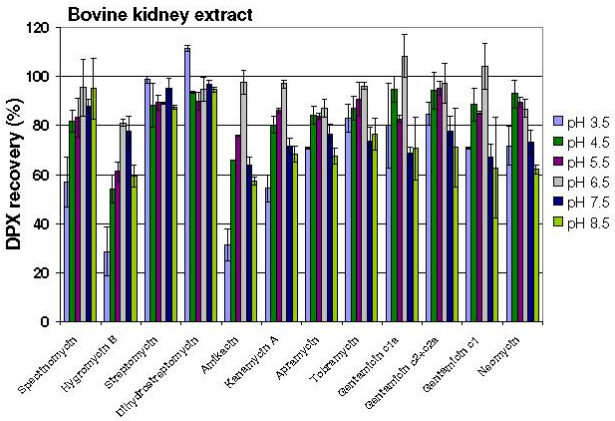


（b）不同 pH 时胎牛肾脏样品回收率

调节 5 mL 胎牛肾脏提取物 (2μg/g) pH 至 3.5-8.5，吸入 DPX 枪头(50 mg)用 2x1 mL10%甲酸水溶液洗脱。

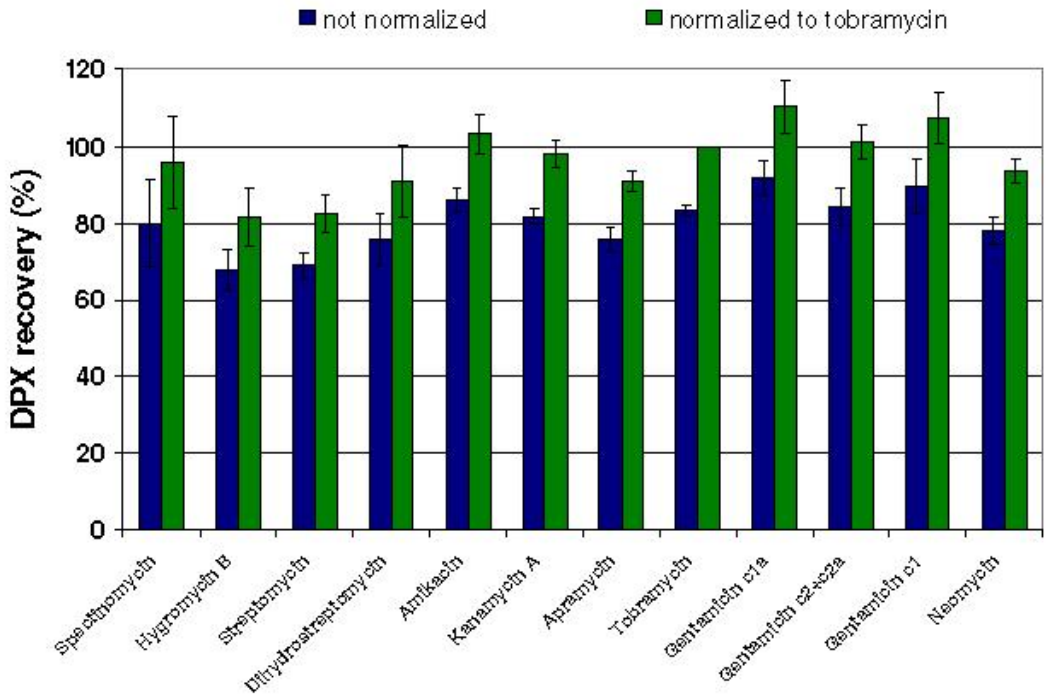
除 pH 调至 4.5-8.5 外，缓冲液 pH 也调至 3.5

pH6.5 (81-108%)回收率最高：



(c) pH 6.5 时提取物回收率

5 mL 提取物(at 2 µg/g)调 pH6.5，吸入装填吸附剂的 DPX(50mg)只用 1 mL10%甲酸水溶液洗脱。1 mL 提取物中氨基糖苷类回收率与内标物妥布霉素标准化后在 82-110% (不标准化为 68-92%)



结论

目前 USDA-FSIS 证实氨基糖苷类反向色谱可利用以下流程化：

超高效液相色谱-质谱/液质联用可减少 10 倍的分析时间。

DPX 加快固相萃取过程，减少材料和吸附剂使用，较易实现自动化。

未来计划:

将 DPX 半自动杠杆提取器同时使用 24 个 DPX 5 mL 枪头实现半自动化。

将 DPX 系统实现自动化(为 1 mL DPX 枪头设计)。