微波辅助衍生-离子液体分散液液微萃取-高效液相色谱法检测牛奶中氨基糖苷类抗生素残留

王志兵[1]，高杨[2]，刘洋[1]，解耸林[1]，张凤清[1]
（1.长春工业大学化学与生命科学学院，吉林长春 130012）（2.阜新市科学技术局，辽宁阜新 123000）

摘要：将微波辅助衍生法与离子液体分散液液微萃取法相结合，建立了牛奶中链霉素、庆大霉素、卡那霉素、妥布霉、小诺霉素、阿米卡星和新霉素等7种氨基糖苷类抗生素（AGs）的快速萃取、衍生方法。本研究以氯甲酸芴甲酯（FMOC-Cl）为衍生试剂，1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐（Omim]PF_6）为提取剂，甲醇为分散剂，将微波辅助衍生和离子液体分散液液微萃取相结合，使目标化合物被衍生的同时被萃取和富集到离子液体中，并通过高效液相色谱荧光检测器进行定量检测。实验结果表明，各化合物在线性范围内具有较好的线性关系（r>0.9989），检出限为0.11~0.57 μg/L。加标样品回收率在91.95~106.33%之间，其RSD为1.39~5.92%。本法操作简单，灵敏度高，结果可靠，可广泛应用于牛奶样品中氨基糖苷类抗生素的检测。

关键词：微波衍生；离子液体；分散液液微萃取；氨基糖苷类抗生素；牛奶；高效液相色谱
文章篇号：1673-9078(2014)4-260-267

Determination of Aminoglycosides Residues in Milk by Microwave-assisted Derivatization and Ionic Liquid-based Dispersive Liquid-liquid Microextraction Coupled with HPLC

WANG Zhi-bing[1], GAO Yang[2], LIU Yang[1], XIE Song-lin[1], ZHANG Feng-qing[1]
(1.College of Chemistry and Life Science, Changchun University of Technology, Changchun 130012, China)
(2. Fuxin Science and Technology Bureau, Fuxin 123000, China)

Abstract: A new method based on simultaneous microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction was developed for the derivatization and extraction of aminoglycosides (AGs) including streptomycin (STR), gentamicin (GEN), kanamycin (KAN), tobramycin (TOB), micronomicin (MIC), amikacin (AMI) and neomycin (NEO) in milk samples. In the experiment, 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl), 1-octyl-3- methylimidazolium hexafluorophosphate ([Omim]PF_6) and methanol were used as derivatization reagent, extraction solvent and disperser, respectively. Aminoglycosides were simultaneously derivatized and extracted into ionic liquid phase by this method in a single step. Derivatives of the aminoglycosides were then determined by high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. The calibration curve had good linear relationship (r＞0.9989). The limits of detection (LODs) of analytes were in range of 0.11~0.57 μg/L. The recoveries were between 91.95% and 106.33% with the relative standard deviations of 1.39~5.92%. The proposed method has the advantages of simple operation, high sensitivity and reliable results and should be extensively applied for determination of aminoglycosides in milk samples.

Key words: microwave derivatization; ionic liquid; dispersive liquid-liquid microextraction; aminoglycosides; milk; highperformance liquid chromatography

氨基糖苷类抗生素（Aminoglycosides，AGs）是从链霉菌或小单胞菌培养液中提取，或以天然品为原料半合成制取而得到的一类水溶性碱性抗生素，它由一个或多个氨基糖分子与氨基环醇通过配糖键连接而成[1~5]。AGs 是一类广谱抗菌药，对多种革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌具有显著的杀菌效果，是目前我国畜牧业和水产业中常用的兽药之一，常添加到饲料中用于预防疾病和促进动物生长[5~7]。但其在动物性食品中残留可能会引起过敏、耳毒性和肾毒性，甚至会损害脑神经[7~8]，严重威胁消费者的饮食安全和身体健

收稿日期：2013-08-24
基金项目：吉林省青年科研基金项目（201215123）
作者简介：王志兵（1982-），男，博士，讲师，中药与食品分析，色谱与质谱分析

康。因此，建立一种简单、快速且灵敏的方法用于测定牛奶中的 AGs 是十分必要的。

目前，AGs 的检测方法主要有高效液相色谱法[9~10]，液相色谱质谱法[11~13]，离子色谱法[14]，免疫分析法[15~17]，表面等离子体共振传感器法[18]，微生物抑制法[19]，气相色谱-质谱法[20]、胶体金免疫层析法[21]和离子交换-脉冲积分安培法[22]。近年来，用于萃取 AGs 的新兴方法不断发展起来。分散液液微萃取（Dispersive liquid-liquid microextraction，DLLME）是 Assadi 等于 2006 年提出的一种用于处理液体样品的新型微萃取技术，具有萃取时间短、操作简便和试样消耗低等诸多优点[23~24]，在牛奶样品分析中具有广泛的应用[25]。分散液液微萃取技术建立于三相溶剂体系，在分散剂的作用下，萃取剂以微小液滴的形式分散在样品溶液中，形成乳浊液，从而对样品溶液中的分析物进行微萃取[26]。因此，选择合适的提取溶剂是非常重要的，提取剂应满足密度大于水、萃取能力高及良好的色谱行为，氯苯、四氯化碳、三氯乙烯及氯仿为常用的提取溶剂[26~27]，但这些溶剂毒性大且环境不友好。离子液体（Ionic liquid，IL）作为一种“绿色溶剂”，是由有机阳离子和有机（无机）阴离子组成的在室温下呈现液态的熔融盐[28~29]。它对许多无机物和有机物有良好的溶解性，具有不挥发、不可燃、导电性强、性质稳定等诸多优点，其在电化学、有机合成和分离等领域被广泛应用[30]。

本研究采用氯甲酸芴甲酯为衍生试剂，以 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐（[Omim]PF_6）为提取剂，甲醇为分散剂，将微波辅助衍生和离子液体分散液液微萃取相结合，实现提取、衍生、富集同时完成，并且结合高效液相色谱-荧光检测法对牛奶中的 7 种氨基糖苷类抗生素进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

链霉素（streptomycin，STR）、庆大霉素（gentamicin，GEN）、卡那霉素（kanamycin，KAN）、妥布霉素（tobramycin，TOB）、小诺霉素（Micronomicin，MIC）、阿米卡星（amikacin，AMI）和新霉素（neomycin，NEO），均购于 Sigma 公司，纯度均大于 99%。1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐（[Bmim]PF_6）、1-己基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐（[Hmim]PF_6）和 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐（[Omim]PF_6）购于上海思域化工科技有限公司，纯度均大于 98%；氯甲酸芴甲酯（FMOC-Cl），纯度大于 98%，购于百灵威科技有限公司；色谱级乙腈和甲醇购于美国 Fisher 公司；二次蒸馏水由 Milli-Q 水纯化系统（美国 Millipore 公司）制得；其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

LC-20AB 高效液相色谱仪，日本岛津；RF-10AXL 荧光检测器，日本岛津；SB-C18 色谱柱（5 μm，4.6 mm×150 mm I D），美国安捷伦；Allegra 64R 高速离心机，美国贝克曼；MSP-100 型微波消解系统，北京雷明科技有限公司；KQ-100DE 超声波清洗器，江苏昆山市超声仪器有限公司。

1.3 标准溶液的配制

分别准确称取链霉素、庆大霉素、卡那霉素、妥布霉素、小诺霉素、阿米卡星和新霉素 5 mg 对照品于容量瓶中，用甲醇-水（1:1，*V/V*）溶液溶解并定容至 10 mL，配制成浓度为 500 μg/mL 的标准储备液，于 4 ℃冰箱中避光保存，备用。混合标准品溶液是由各标准储备液经甲醇-水（1:1，*V/V*）稀释得到的。

1.4 空白样品及加标样品的制备

空白样品的制备：不同品牌的牛奶样品，包括全脂牛奶（样品 1~2）、脱脂牛奶（样品 3~4）、强化牛奶（样品 5~6）和风味牛奶（样品 7~8），均购自当地超市。准确称取 10 mL 样品于 25 mL 离心管中，加入 5%三氯乙酸 2 mL，混合均匀后，放入超声仪中超声 10 min，然后于 10000 r/min 下离心 10 min，收集上清液，调节 pH 值至 9，过 0.45 μm 滤膜，所得溶液即为样品溶液。

加标样品的制备：准确称取 10 mL 样品于 25 mL 塑料离心管中，加入一定浓度的混合标准品溶液，其余操作同上。

1.5 微波辅助衍生-离子液体分散液液微萃取

准确量取 5 mL 样品溶液于 10 mL 离心管中，然后将 80 μL 离子液体（提取剂），400 μL 甲醇（分散剂）和 70 μL 浓度为 2.0 mmol/L 的 FMOC-Cl（衍生剂）的混合溶液快速注入到样品溶液中，随即形成乳浊液，用手轻轻振摇并混合均匀后，置于微波萃取仪中，在 300 W 微波功率下辐照 60 s。然后，将此乳浊液在 10000 r/min 条件下离心 5 min，弃去上清液，将离心管底部的离子液体用微量进样器取出，并用甲醇定容至 200 μL，所得溶液即为分析溶液，过 0.22 μm 滤膜，

进行 HPLC 分析。

1.6 色谱条件

流动相组成和流速、进样量及检测温度等因素极大地影响目标化合物的分离度、峰形和分析速度，因此本实验对色谱条件进行了优化。

在流动相的选择方面，选用安捷伦 SB-C18（5 μm，4.6 mm×150 mm）色谱柱，分别采用不同梯度的流动相进行色谱分离。结果表明，流动相为 0.1%乙酸水溶液（A）-甲醇（B），梯度洗脱条件为：0~10 min，90% B；10~18 min，90~95% B；18~28 min，95% B；28~35 min，95~90% B 时，分离效果最佳。流动相中加入 1%乙酸不仅能改善色谱峰形，还能减轻色谱峰拖尾现象。

另外，本实验还考察了柱温（25~40 ℃）和流速（0.3~1.0 mL/min）对目标化合物分离效果的影响。结果表明，柱温越高，流速越快，分离时间越短，峰形越好，但温度过高，流速过快，会损伤色谱柱，降低柱效和分离度。综合考虑，本实验选择柱温 30 ℃，流动相流速 0.5 mL/min，进样量 20 μL，荧光激发和发射波长分别为 265 nm 和 310 nm。

1.7 数据分析

回收率的计算公式如下：

$$回收率/\% = \frac{检出量 - 初始量}{加标量} \times 100$$

本研究方法的精密度以相对标准偏差（RSD）表示，所有实验数据用 Origin 8.0 软件进行统计分析。

2 结果与讨论

2.1 条件优化

为了提高氨基糖苷类抗生素的衍生和萃取效率，本文对影响微波辅助衍生和离子液体分散液液微萃取的各种条件进行了优化，包括样品溶液的 pH 值、提取剂的种类和体积、分散剂的种类和体积、衍生试剂的体积、微波功率和辐照时间。在条件优化过程中，以加标牛奶（样品 1）为样品进行优化实验，每个条件重复三次，加标样品溶液中各氨基糖苷类抗生素的浓度为 2.0 μg/L。

2.1.1 样品溶液 pH 的影响

样品溶液的 pH 值影响目标化合物的存在形式和衍生速率，进而对目标物的回收率产生重要的影响。由于氨基糖苷类抗生素的衍生是在碱性条件下完成的，因此，本实验考察了样品溶液在碱性条件下（7.5~10.0）的化合物的回收率。实验结果如图 1 所示，当样品溶液 pH 为 9 时，各目标化合物的回收率最高，这与文献报道的氨基糖苷类抗生素的衍生 pH 值一致。因此，本实验选择样品溶液的 pH 值为 9。

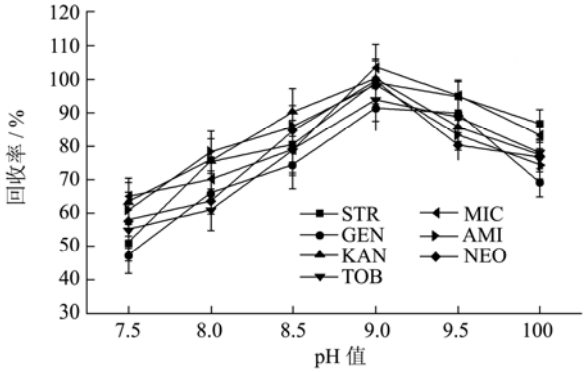


图 1 样品溶液的 pH 值对回收率的影响

Fig.1 Effect of pH value on recovery

2.1.2 提取剂的种类和体积

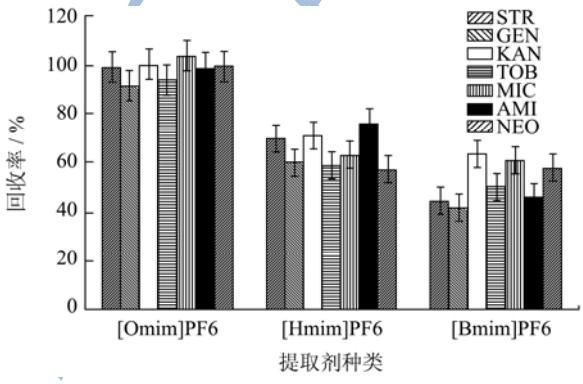


图 2 提取剂种类对回收率的影响

Fig.2 Effect of extraction solvent type on recovery

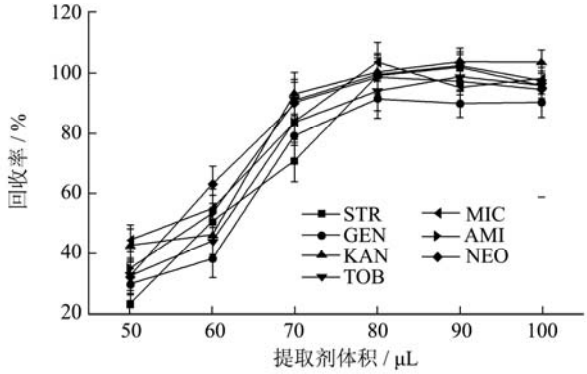


图 3 提取剂体积对回收率的影响

Fig.3 Effect of the extraction solvent volume on recovery

提取剂的种类是离子液体分散液液微萃取中的一个重要参数。合适的提取剂需满足一定的要求：密度应大于样品溶液，在样品溶液中有较低的溶解度，且对目标化合物有较好萃取效果和良好的色谱行为[23~24]。为了找到最合适的提取剂，本实验考察了[Bmim]PF_6、[Hmim]PF_6和[Omim]PF_6对目标化合物萃取效果的影响。

由图 2 可知，[Omim]PF_6对 AGs 衍生物的萃取效

果明显优于[Bmim]PF_6和[Hmim]PF_6。这可能与离子液体在水中的溶解性有关，随离子液体咪唑基烷基链的逐渐减少，离子液体在水中的溶解性不断增加，从而导致回收率有所下降。因此，烷基链最长的[Omim]PF_6对 AGs 衍生物具有较好的萃取效果。此外，随提取剂（[Omim]PF_6）用量的逐渐增加，目标化合物的回收率也不断增加，当[Omim]PF_6体积为 80 μL 时，AGs 回收率达到最大值（见图 3），此后，随[Omim]PF_6体积不断增加，目标化合物回收率基本不变。因此，本实验选择 80 μL [Omim]PF_6作为提取剂。

2.1.3 分散剂的种类和体积

在分散液液微萃取中，分散剂起着桥梁作用。分散剂不仅对提取溶剂有良好的溶解性而且还能与样品溶液互溶，从而使提取溶剂能在水相中分散成细小的液滴，增大其与待测物的接触面积，从而提高萃取效率[23~24]。因此，本实验考察了甲醇、乙腈、乙醇和丙酮作为分散剂对目标化合物的萃取效果。实验结果表明，以甲醇作为分散剂时，AGs 可获得更高的回收率，结果见图 4。

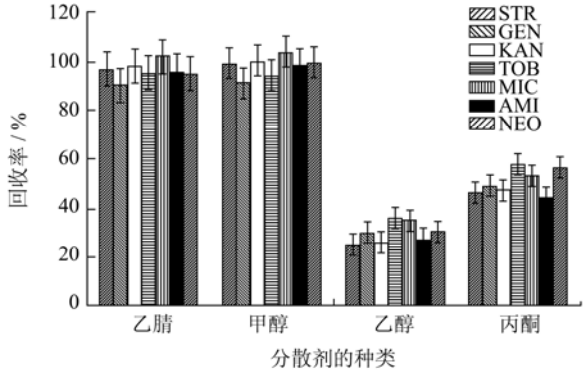


图 4 分散剂种类对回收率的影响

Fig.4 Effect of disperser type on recovery

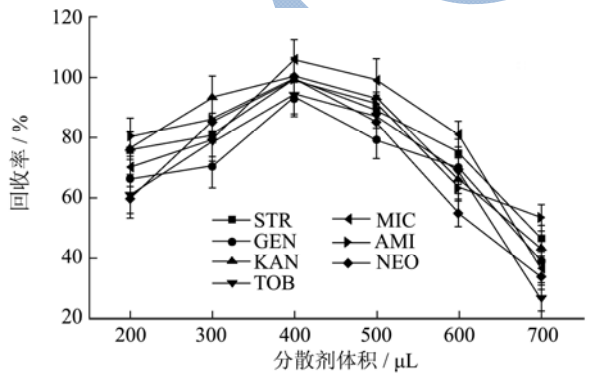


图 5 分散剂体积对回收率的影响

Fig.5 Effect of disperser volume on recovery

另外，分散剂的体积直接影响提取剂在样品溶液中的溶解度和离子液体相的体积，进而影响 AGs 衍生物的提取效率。为了获得较好的萃取效果，本实验研究了分散剂体积对 AGs 回收率的影响。实验结果如图 5 所示，当甲醇体积从 200 μL 增加到 400 μL 时，AGs 回收率逐渐增加；当甲醇体积从 400 μL 增加到 700 μL 时，回收率明显下降，这可能是因为过量的甲醇增加了离子液体在样品溶液中的溶解度，从而降低了离子液体相的体积和目标化合物的回收率。因此，本实验选择 400 μL 甲醇作为分散剂。

2.1.4 衍生试剂（FMOC-Cl）体积的影响

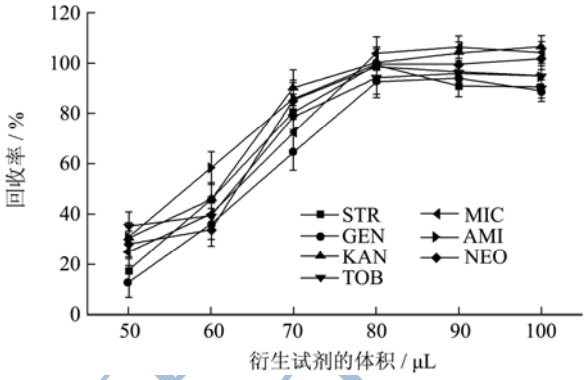


图 6 衍生试剂体积对回收率的影响

Fig.6 Effect of derivatization reagent volume on recovery

由于氨基糖苷类抗生素不具有特征的紫外和可见光吸收基团，一般采用柱前衍生。在 AGs 测定中，常用 FMOC-Cl 作为衍生试剂，以荧光标记初级和次级胺[31]，AGs 与 FMOC-Cl 的反应如图 7 所示。为了获得最佳的衍生效果，本实验考察了不同体积（40~90 μL）的衍生试剂的影响。实验结果如图 6 所示，当 FMOC-Cl 体积从 40 μL 增加到 70 μL 时，AGs 回收率显著增加，而当衍生试剂的体积从 70 μL 增加到 90 μL 时，AGs 回收率趋于平稳。所以，选择 70 μL FMOC-Cl 为衍生试剂。

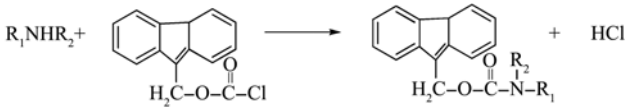


图 7 AGs 与 FMOC-Cl 的反应机理

Fig.7 The derivatization mechanism of AG with FMOC-Cl

2.1.5 微波功率和辐照时间的影响

温度对 AGs 衍生物的提取效果具有双重影响，一方面，升高温度有利于提高离子液体的传质速率和化合物的衍生速率，从而提高目标化合物的回收率；另一方面，升高温度增加了离子液体在样品溶液中的溶解度，进而降低目标化合物的回收率。因此，本实验考察了微波功率（选择辐照时间为 60 s 时进行测定）和辐照时间（选择微波功率为 300 W 时进行测定）对 AGs 衍生物提取效果的影响。如图 8 和 9 所示，当微波功率为 300 W，辐照时间为 60 s 时 AGs 的回收率最高。因此，本实验选择微波功率为 300 W，辐照时间为 60 s。

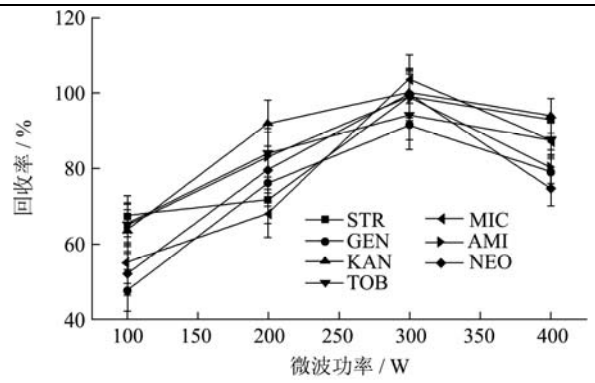


图 8 微波功率对回收率的影响

Fig.8 Effect of microwave power on recovery

2.2 方法验证

2.2.1 线性关系、检出限和定量限

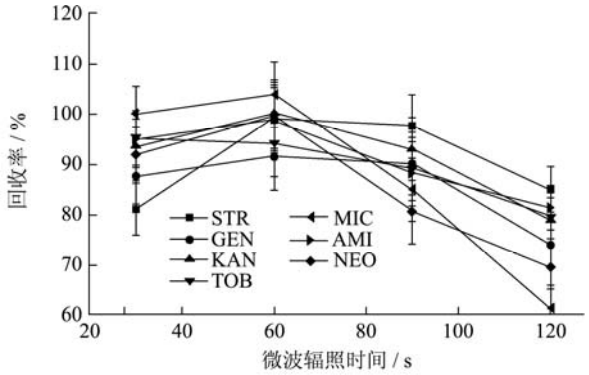


图 9 微波辐照时间对回收率的影响

Fig.9 Effect of microwave irradiation time on recovery

表 1 目标化合物的工作曲线、检出限及定量限

Table 1 Linear regressions, limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) of analytes

化合物	回归方程	线性范围/(μg/L)	相关系数/r	LODs/(μg/L)	LOQs/(μg/L)
STR	A=33431.91c+31230.02	0.97~50.00	0.9995	0.29	0.97
GEN	A=120194.14c+20147.20	1.91~50.00	0.9989	0.57	1.91
KAN	A=164606.88c+37270.59	1.57~50.00	0.9990	0.47	1.57
TOB	A=1094123.60c+21737.04	0.37~50.00	0.9998	0.11	0.37
MIC	A=980412.93c-1012.26	0.43~50.00	0.9997	0.13	0.43
AMI	A=415611.03c-1402.77	0.86~50.00	0.9991	0.26	0.86
NEO	A=555713.21c+12186.17	0.74~50.00	0.9998	0.22	0.74

将 AGs 混合标准溶液加入到牛奶样品（样品 1）中，配置一系列不同浓度的 AGs 工作溶液（加标样品溶液），按 1.4 和 1.5 节所述方法，在最佳条件下制备和分析样品。以工作溶液（样品溶液）中 AGs 浓度 *c* 为横坐标，以峰面积 A 为纵坐标，绘制工作曲线，得到线性回归方程。7 种氨基糖苷类抗生素的线性范围、回归方程和相关系数见表 1。以信噪比（S/N）分别为 3 和 10 时实验方法所能检出和定量的目标化合物的最低浓度定义为各化合物的检出限（LOD）和定量限（LOQ），结果列于表 1 中。

2.2.2 精密度

表 2 化合物的日内精密度、日间精密度和回收率

Table 2 The intra- and inter-day precision and recoveries of the analytes

化合物	加标浓度/μg/L	日内精密度		日间精密度	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
STR	0.97	96.73	2.50	97.12	3.52
	5.00	100.54	2.62	99.32	4.60
GEN	1.91	93.73	3.82	92.40	5.85
	5.00	93.44	3.66	93.00	4.55
KAN	1.57	102.85	2.52	102.11	2.51
	5.00	100.90	1.96	99.98	2.43
TOB	0.37	94.59	4.71	92.33	5.90
	5.00	96.46	4.14	94.67	4.74
MIC	0.43	102.08	1.30	99.99	2.38
	5.00	105.66	2.05	103.45	2.64
AMI	0.86	96.97	2.57	96.50	4.01
	5.00	100.32	3.36	98.95	3.21
NEO	0.74	101.02	3.60	97.30	3.22
	5.00	104.11	2.50	97.12	3.13

对不同浓度的加标牛奶样品（样品 1）进行分析。日内精密度是通过 1 d 之内平行分析 5 次加标样品所得到回收率的相对标准偏差（RSD）。日间精密度是通过每天分析 1 次加标样品，连续分析 5 d 所得到回收率的相对标准偏差。实验结果如表 2 所示，日内精密度（RSD）和日间精密度（RSD）分别为 1.30~4.71%和 2.38~5.90%之间。

2.2.3 样品分析

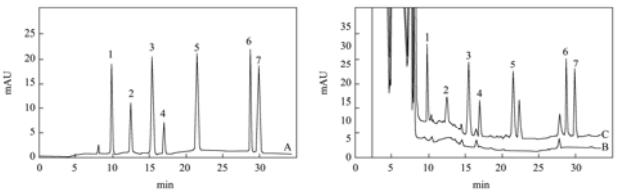


图 10 标准溶液（A）、空白样品（B）和加标样品（C）色谱图

Fig.10 Chromatograms of standard solution (A), blank (B) and spiked samples (C)

注：1.链霉素；2.庆大霉素；3.卡那霉素；4.妥布霉素；5.小诺霉素；6.阿米卡星；7.新霉素。

为考察本法的适用性，本实验分析了全脂牛奶、脱脂牛奶、强化牛奶和风味牛奶等 8 种样品。加标样品的回收率和相对标准偏差见表 3，空白和加标牛奶样品（样品 1）的色谱图见图 10，加标样品溶液中各

氨基糖苷类抗生素的浓度分别为 5.0 μg/L。实验结果表明，各牛奶样品中无氨基糖苷类抗生素检出，样品加标回收率和相对标准偏差（RSD）分别在91.95~106.33%和 1.39~5.92%之间，结果令人满意。

2.3 方法比较

表 3 牛奶样品的加标回收率

Table 3 Analytical results of milk samples

化合物	加标浓度/μg/L	全脂牛奶（样品 1）		全脂牛奶（样品 2）		脱脂牛奶（样品 3）		脱脂牛奶（样品 4）		强化牛奶（样品 5）		强化牛奶（样品 6）		风味牛奶（样品 7）		风味牛奶（样品 8）	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
STR	0.97	96.22	2.00	97.10	1.92	96.90	2.43	97.79	2.68	98.12	2.12	98.45	2.97	100.09	2.24	99.44	1.99
	5.00	100.53	2.65	100.86	2.19	101.11	2.69	98.41	2.17	101.68	3.09	99.97	2.03	98.44	2.56	100.13	2.22
	20.00	99.35	2.35	98.45	2.90	98.51	2.18	101.32	2.49	97.54	2.00	96.21	2.02	101.01	2.94	99.76	2.09
GEN	1.91	92.31	4.61	92.81	3.09	93.19	5.89	92.16	4.36	92.81	3.24	92.21	5.09	95.41	3.43	92.19	3.60
	5.00	93.42	3.62	92.76	3.96	94.63	3.43	94.53	3.19	92.16	4.10	93.52	3.54	93.35	2.81	94.37	3.60
	20.00	91.95	5.31	93.33	4.11	92.44	4.63	93.91	4.40	93.63	3.66	94.65	4.74	91.96	4.00	95.95	4.41
KAN	1.57	101.74	1.90	99.31	2.18	101.81	1.95	101.52	2.35	101.30	2.78	104.72	2.94	99.71	2.95	100.74	1.88
	5.00	100.98	1.90	100.20	3.43	103.58	3.15	99.30	1.88	105.21	3.13	102.49	2.06	103.37	1.50	104.87	1.55
	20.00	100.97	3.29	102.13	1.91	98.12	2.05	103.06	2.99	102.17	2.72	103.03	3.14	103.63	2.19	102.86	3.32
TOB	0.37	93.15	3.31	94.49	5.92	94.11	3.89	95.29	3.66	95.39	4.90	93.80	3.92	95.19	3.79	93.22	3.31
	5.00	96.40	4.13	96.21	4.41	93.74	4.04	93.32	4.56	94.23	3.40	95.11	4.27	96.22	4.47	94.37	4.13
	20.00	94.10	4.55	95.05	3.22	95.80	4.01	94.41	4.20	96.41	4.62	97.75	3.33	92.31	4.11	95.78	4.34
MIC	0.43	101.98	1.39	103.77	2.08	103.11	1.73	105.22	1.59	104.72	1.89	99.58	1.93	106.33	2.85	101.82	2.16
	5.00	105.66	2.01	104.19	2.04	104.52	2.12	103.10	2.31	101.71	2.12	104.64	2.10	104.11	2.13	105.85	2.62
	20.00	103.84	1.73	99.85	2.76	102.05	1.67	104.50	3.33	100.85	2.45	102.17	1.70	102.61	2.03	103.84	1.79
AMI	0.86	98.72	2.16	98.78	1.82	98.01	2.33	100.99	2.50	98.98	2.22	100.08	2.90	100.00	2.43	99.59	2.50
	5.00	100.32	3.35	99.48	3.10	97.51	3.17	96.23	3.79	100.34	3.62	97.43	2.57	100.31	3.97	100.32	3.46
	20.00	98.73	3.56	100.35	2.62	96.45	2.73	98.82	2.71	98.65	2.50	98.26	1.99	98.93	2.04	100.32	3.12
NEO	0.74	101.54	3.45	102.00	2.89	102.38	3.28	104.25	3.42	102.04	3.09	100.03	3.20	104.32	3.03	101.25	3.08
	5.00	104.13	2.58	103.16	3.13	105.75	2.49	103.32	3.01	99.30	4.13	103.65	2.38	101.43	3.10	104.13	4.11
	20.00	99.60	3.09	99.03	4.03	105.17	3.76	101.77	3.66	103.61	3.61	101.44	3.67	100.44	3.59	101.44	3.11

表 4 方法比较

Table 4 Comparison of the proposed method with other methods

化合物	提取与检测方法	基质	提取时间/min	LOD/(μg/L)	回收率/%	参考文献
NEO,DIH[a]	双柱固相萃取净化-液相色谱-串联质谱法	牛奶和奶粉	>40	4~30	80~86	[13]
GEN	ELISA法	牛奶	40	10	93.5~110.2	[17]
STR,KAN	表面等离子体共振传感器法	水	>30	25~34	-	[18]
TOB,NEO,SIS[b]	离子交换-脉冲积分安培法	牛奶	70	8~47	85.0~98.5	[22]
STR,GEN,KAN,TOB,MIC,AMI,NEO	微波辅助衍生-离子液体分散液液微萃取-高效液相色谱法	牛奶	6	0.11~0.57	91.95~106.33	本研究

注：[a]双氢链霉素，[b]西梭霉素。

与其他方法相比，本法的提取时间更短，检测灵敏度和回收率更高（见表 4）。本法实现了氨基糖苷类抗生素的衍生、萃取和富集的一步完成，大大缩短了提取时间，简化了操作步骤，荧光检测器的应用使目标化合物的检出限更低。另外，本法使用离子液体作为提取剂，减少了有机溶剂的消耗，提高了样品回收率。结果表明，本法适合复杂基质牛奶中氨基糖苷类抗生素的测定。

3 结论

本文建立了微波辅助衍生-离子液体分散液液微萃取-高效液相色谱法检测牛奶中 7 种 AGs 的方法。通过微波辅助衍生和离子液体分散液液微萃取结合，AGs 被氯甲酸芴甲酯衍生同时被萃取和富集到离子液体中。微波加热有利于分析物从水相向离子液体相转移，并且加速了衍生反应的进行。本法预处理过程简单，检测灵敏度高，结果可靠。方法回收率在 91.95~106.33%之间，各化合物检出限为 0.11~0.57 μg/L。实验结果表明，本法已成功应用于牛奶样品中氨基糖苷类抗生素的检测。

参考文献

[1] Ge S L, Tang W R, Han R B, et al. Sensitive analysis of aminoglycoside antibiotics via hyphenation of transient moving substitution boundary with field-enhanced sample injection in capillary electrophoresis [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1295: 128-135

[2] Cai Y Q, Cai Y, Cheng J, et al. Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection [J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1085(1): 124-130

[3] Turnipseed S B, Clark S B, Karbiwnyk C M, et al. Analysis of aminoglycoside residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry after derivatization with phenyl isocyanate [J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(14-15): 1487-1493

[4] Gong Q, Ding L, Zhu S H, et al. Determination of ten aminoglycoside residues in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(11): 1143-1147

[5] Long C Y, Xu X M. Determination of aminoglycosides veterinary residues in animal foods [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2006, 18(2): 148-152

[6] Zhu W X, Yang J Z, Wei W, et al. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1207(1-2): 29-37

[7] Liu X D, Lin H, Jiang J. Detection technology for aminoglycosides in animal origin foods [J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2010, 38(8): 4128-4132

[8] Ma W, Xu C L. Research progress on multi-residue immunoassay of aminoglycosides in animal foods [J]. Food Science, 2009, 30(11): 289-292

[9] Tawa R, Matsunaga H, Fujimoto T. High-performance liquid chromatographic analysis of aminoglycoside antibiotics [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 812(1-2): 141-150

[10] Megoulas N C, Koupparis M A. Enhancement of evaporative light scattering detection in high-performance liquid chromatographic determination of neomycin based on highly volatile mobile phase, high-molecular-mass ion-pairing reagents and controlled peak shape [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1057(1-2): 125-131

[11] Kaufmann A, Butcher P, Maden K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 711: 46-53

[12] Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, 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]. Journal of Chromatography A, 2005, 1067(1-2): 93-100

[13] Liu X M, Zhang J J, Zhang S J, et al. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk and milk powder using dual solid-phase extraction clean up-liquid chromatography -tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2010, 29(10): 40-44

[14] Guan B, Yuan D X. Determination of neomycin residue in milk by solid-phase extraction and ion-exchange chromatography [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2007, 26(7): 1-4

[15] Haasnoot W, Cazemier G, Koets M, et al. Single biosensor immunoassay for the detection of five aminoglycosides in reconstituted skimmed milk [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 488(1): 53-60

[16] Shalev M, Kandasamy J, Skalka N, et al. Development of generic immunoassay for the detection of a series of aminoglycosides with 6′-OH group for the treatment of genetic diseases in biological samples [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 75: 33-40

[17] Wang D, Xu Y, He Q H, et al. Establishment of elispot assay for detection of gentamicin in milk [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 23(5): 74-76

[18] Liu J, Wang W, Zhang W J, et al. Detection of antibiotic residues using signal amplification assay based on SPR sensors [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 31(11): 5-9

[19] Wang Z Q, Hu G Y, Li Z Y, et al. Determination of antibiotics residues in raw milk by microbial inhibition method [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2008, 20(2): 139-141

[20] Preu M, Guyo D, Petz M. Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions [J]. Journal of Chromatography A, 1998, 818(1): 95-108

[21] Liu S H, He F Y, Feng C W, et al. Development of colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of neomycin residue in milk [J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(6): 73-76

[22] Cai Y E, Cai Y Z, Mu S F, et al. Separation of several aminoglycoside antibiotics with ion- exchange column following with pulsed integrated amperometric detection [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2006, 25(8): 7-9

[23] Kocúrová L, Balogh I S, Šandrejová J, et al. Recent advances in dispersive liquid–liquid micro- extraction using organic solvents lighter than water. A review [J]. Microchemical Journal, 2012, 102: 11-17

[24] Andruch V, Kocúrová L, Balogh I S, et al. Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV-vis spectrophotometry and related detection techniques [J]. Microchemical Journal, 2012, 102: 1-10

[25] Gao S Q, Yang X, Yu W, et al. Ultrasound-assisted ionic liquid/ionic liquid-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in infant formula milk powder using high-performance liquid chromatography [J]. Talanta, 2012, 99: 875-882

[26] Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M R, et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1116(1-2): 1-9

[27] Xu H, Song D D, Cui Y F, et al. Analysis of hexanal and heptanal in human blood by simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction then LC-APCI-MS-MS [J]. Chromatographia, 2009, 70(5-6): 775-781

[28] Xiao Y, Zhang H Q. Homogeneous ionic liquid microextraction of the active constituents from fruits of Schisandra chinensis and Schisandra sphenanthera [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 712: 78-84

[29] Li N, Zhang R, Nian L, et al. Extraction of eight triazine and phenylurea herbicides in yogurt by ionic liquid foaming-based solvent floatation [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1222: 22-28

[30] Duan M H, Luo M, Zhao C J, et al. Ionic liquid-based negative pressure cavitation-assisted extraction of three main flavonoids from the pigeonpea roots and its pilot-scale application [J]. Separation and Purification Technology, 2013, 107: 26-36

[31] Stead D A, Richards R M E. Sensitive fluorimetric determination of gentamicin sulfate in biological matrices using solid-phase extraction, pre-column derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate and reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 1996, 675(2): 295-302