

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定动物源性食品中阿维菌素类药物残留

LCMSMS-050

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用仪测定动物源性食品中4种阿维菌素类药物残留的方法。样品经前处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用外标法绘制4种阿维菌素类药物的标准曲线，线性范围为1~200 ng/mL，标准曲线的相关系数均在0.995以上。对10 ng/mL、50 ng/mL和100 ng/mL混合标准溶液进行精密密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.10~0.54%和1.03~5.62%之间，系统精密密度良好。

关键词：阿维菌素 猪肉 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

阿维菌素类药物是从链霉菌的发酵产物中分离出来的大环内酯类杀虫剂，对动植物的寄生线虫和节肢动物均有高效的驱杀作用，这类药物包括阿维菌素、埃普利诺菌素、多拉菌素、伊维菌素等，其与有机磷农药的毒性相仿，均属高毒农药。美国、欧盟、日本等均制定了阿维菌素类药物的最高残留限量。阿维菌素类药物的相对分子质量大，难气化，这类药物的检测方法主要有酶联免疫筛选法、液相色谱-荧光法，近年来，国内外有关阿维菌素类药物残留的高效液相色谱-串联质谱分析方法已有较多的研究报道，国标《GB/T 21320-2008 动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》中对阿维菌素、埃普利诺菌素、多拉菌素、伊维菌素4种阿维菌素类药物的方法检出限要求为1.5 μg/kg。本文参考国标《GB/T 21320-2008 动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用仪快速测定了猪肉样品中的4种阿维菌素类药物的残留量。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵)，DGU-20A₅ (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-30AC (柱温箱)，CBM-20A (系统控制器)，LCMS-8040 (三重四极杆质谱仪)，LabSolutions Ver. 5.42 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. × 50 mmL, 1.6 μm

流动相：A相 - 2 mM 醋酸铵 - 0.02% 甲酸混合水溶液；B相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为80%，时间程序见表1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	100
4.40	Pumps	Pump B Conc.	100
4.50	Pumps	Pump B Conc.	80
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 2.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

DL 温度：250°C

加热模块温度：450°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表2

表2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	阿维菌素	895.60	327.40*	-34.0	-54.0	-11.0
			449.30	-34.0	-51.0	-12.0
2	埃普利诺菌素	936.60	352.00*	-26.0	-60.0	-13.0
			490.00	-26.0	-55.0	-15.0
3	多拉菌素	921.55	353.20*	-34.0	-58.0	-23.0
			449.00	-34.0	-53.0	-30.0
4	伊维菌素	897.50	329.10*	-34.0	-56.0	-15.0
			753.30	-34.0	-45.0	-34.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

用乙腈配制 1 μg/mL 的混合标准储备溶液, 用乙腈稀释成浓度为 1、5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 的系列标准工作液。

样品前处理方法:

参照国标《GB/T 21320-2008 动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。

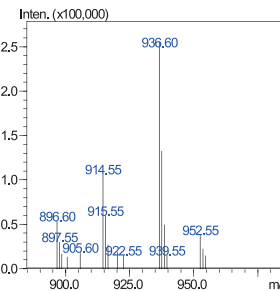


图4 埃普利诺菌素一级质谱图

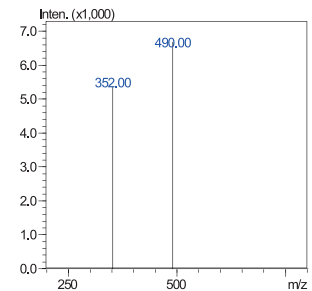


图5 埃普利诺菌素 MRM 质谱图

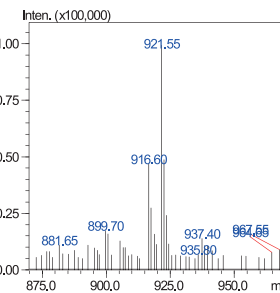


图6 多拉菌素一级质谱图

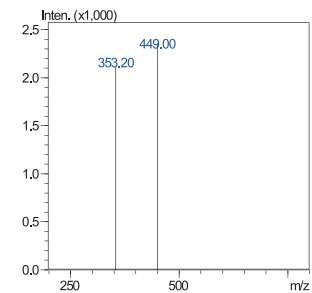


图7 多拉菌素 MRM 质谱图

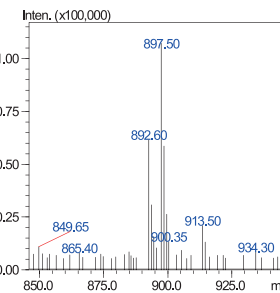


图8 伊维菌素一级质谱图

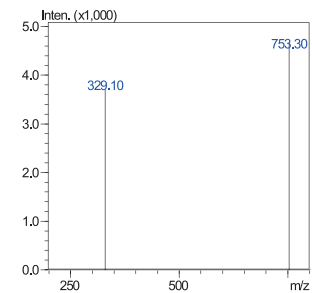


图9 伊维菌素 MRM 质谱图

结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

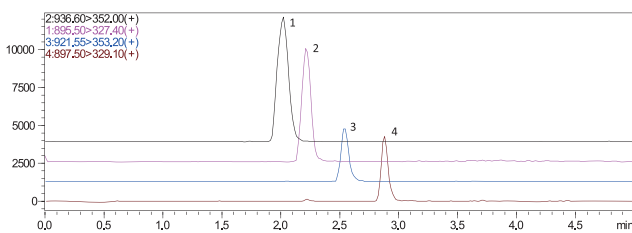


图1 50 ng/mL 的四种阿维菌素类药物标准样品的 MRM 色谱图

(1.埃普利诺菌素 2.阿维菌素 3.多拉菌素 4.伊维菌素)

2.2 标准样品的一级质谱图和 MRM 质谱图

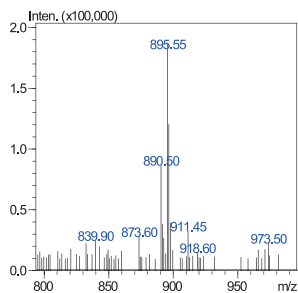


图2 阿维菌素一级质谱图

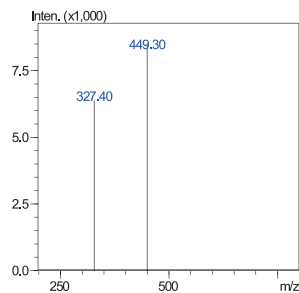


图3 阿维菌素 MRM 质谱图

2.3 标准曲线

将浓度为 1、5、10、20、50、100 和 200 ng/mL 的系列标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作标准曲线，如图 10–13 所示。4 种阿维菌素类药物在 1 ~ 200 ng/mL 浓度范围内线性良好。线性方程和相关系数见表 3。

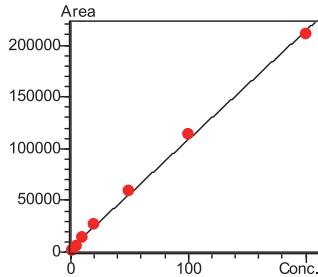


图 10 阿维菌素的标准曲线

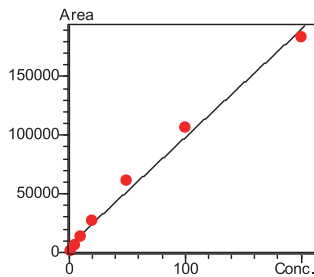


图 11 埃普利诺菌素的标准曲线

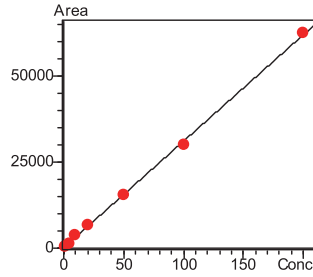


图 12 多拉菌素的标准曲线

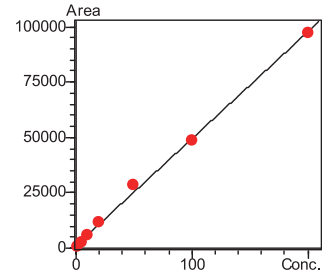


图 13 伊维菌素的标准曲线

表 3 4 种阿维菌素类药品的标准曲线参数

编号	名称	标准曲线	相关系数 r
1	阿维菌素	$Y = (1050.65)X + (3738.91)$	0.9990
2	埃普利诺菌素	$Y = (917.875)X + (6294.14)$	0.9954
3	多拉菌素	$Y = (309.253)X + (126.834)$	0.9996
4	伊维菌素	$Y = (481.796)X + (1258.76)$	0.9992

2.4 精密度实验

对 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 μg/L 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 1.03~5.62% 和 0.10~0.54% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	Area	R.T	Area	R.T	Area	R.T
阿维菌素	3.48	0.37	3.47	0.17	2.68	0.10
埃普利诺菌素	2.12	0.54	2.20	0.11	1.03	0.10
多拉菌素	5.62	0.40	5.15	0.13	3.97	0.12
伊维菌素	3.03	0.13	3.68	0.11	4.14	0.08

2.5 灵敏度实验

为考察仪器灵敏度，向空白猪肉基质中加入 4 种阿维菌素类药物的混合标准溶液，加标量为 2 μg/kg，以 1.3 中样品前处理方法处理后，按 1.2 方法进样分析。猪肉空白基质的 MRM 色谱图如图 14 所示，猪肉加标样品的 MRM 色谱图如图 15 所示。

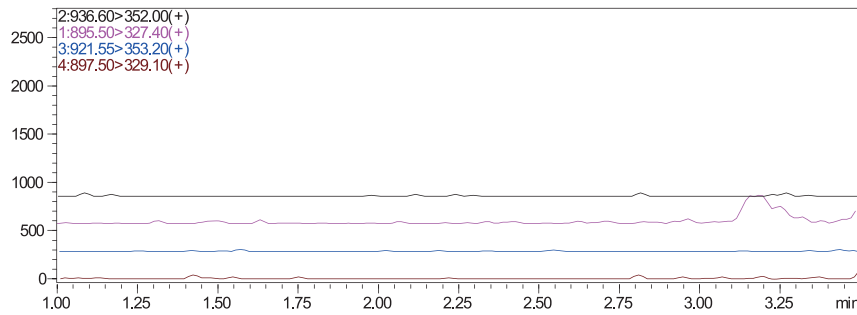


图 14 猪肉空白基质的MRM色谱图

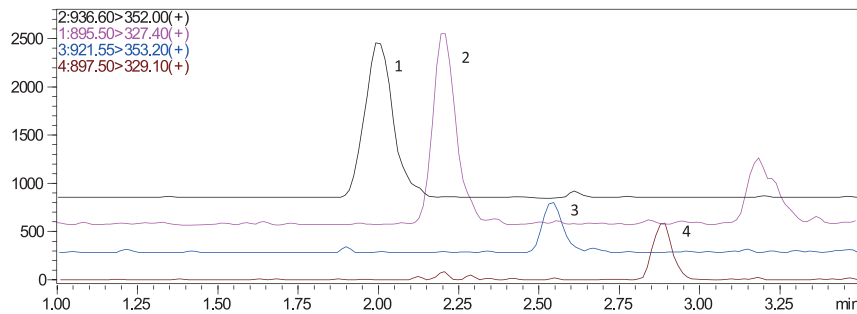


图 15 猪肉加标样品的 MRM 色谱图

(1.埃普利诺菌素 2.阿维菌素 3.多拉菌素 4.伊维菌素)

取猪肉加标样品按 1.2 所列方法连续进样 7 次分析, 对上述测定结果计算其标准偏差 S, 检出限 $LOD = 3.14 \times S$, 定量限 $LOQ = 4 \times LOD$ 。测定结果如表 4 所示。

表 4 4 种阿维菌素类药品的检出限和定量限

编号	名称	标准偏差 (S)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	阿维菌素	0.13	0.40	1.61
2	埃普利诺菌素	0.11	0.35	1.42
3	多拉菌素	0.09	0.29	1.18
4	伊维菌素	0.14	0.44	1.74

结论

使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱 LCMS-8040 联用仪测定猪肉中 4 种阿维菌素类药物残留的定量方法分析速度快, 重复性和精密度良好; 阿维菌素、埃普利诺菌素、多拉菌素和伊拉菌素均在 $1 \sim 200 \text{ ng/mL}$ 浓度范围内线性良好, 方法检出限 $0.29 \sim 0.44 \mu\text{g}/\text{kg}$ 优于国标《GB/T 21320-2008 动物源食品中阿维菌素类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》中的要求, 可以用于动物源性食品中阿维菌素类药物残留量的测定。