

UHPLC 三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的四种大环内酯类抗生素残留

LCMSMS-109

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶中 4 种常见大环内酯类抗生素残留的检测方法。该方法在 1.3 min 内完成替米考星、红霉素、泰乐菌素、罗红霉素四种常见大环内酯类抗生素的分离。在牛奶基质中替米考星在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，红霉素、泰乐菌素、罗红霉素在 0.2~100 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.994 以上。用牛奶基质配制浓度为 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.23% 和 2.44~4.78% 之间，仪器精密度良好。牛奶中 4 种常见大环内酯类抗生素的定量限在 0.059~0.081 ng/mL 之间，检出限在 0.018~0.024 ng/mL 之间。

关键词： 三重四极杆质谱 牛奶 大环内酯类抗生素

大环内酯类抗生素 (macrolide antibiotics) 结构上以一个十四元或十六元大内酯环为母体，连有多个氨基和配糖基，具有较强的抗菌活性，被广泛应用于兽药和饲料添加剂，预防和治疗食源性动物的细菌性和支原体感染疾病。泰乐菌素、螺旋霉素等除具有抗感染能力之外在低浓度还具有显著的促生长作用。在畜牧和食品行业中大环内酯类化合物广泛的应用，必然导致大环内酯类抗生素的残留问题，其主要危害是引起过敏反应和导致携带耐药因子的菌株扩散。本文主要参考《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内酯类抗生素残留检测方法 第 2 部分：高效液相色谱串联质谱法》和国内外的相关文献方法，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了一种快速测定牛奶中的大环内酯类残留的方法，该方法前处理操作简单、灵敏度高，能够对低浓度的样品进行很好的定性确认，供相关行业人员参考。

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. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. × 50 mm L., 1.6 μm)

流动相：A: 0.1% 甲酸水溶液；B: 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，洗脱程序见表 1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	60
1.01	Pumps	Pump B Conc.	80
1.30	Pumps	Pump B Conc.	90
1.40	Pumps	Pump B Conc.	15
3.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子

加热模块温度：400°C

脱溶剂管温度：250°C

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：15.0 L/min

离子源电压：4.5 kV

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表2 样品MRM参数及信息

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)	英文名	CAS
替米考星	869.60	174.10*	-32.0	-48.0	-17.0	Tilmicosin	108050-54-0
		696.40	-32.0	-44.0	-32.0		
红霉素	734.70	158.20*	-28.0	-34.0	-29.0	Erythromycin	114-07-8
		576.30	-28.0	-22.0	-40.0		
泰乐菌素	916.60	174.10*	-34.0	-44.0	-30.0	Tylosin	1401-69-0
		101.10	-34.0	-54.0	-17.0		
罗红霉素	837.00	679.40*	-32.0	-24.0	-24.0	Roxithromycin	80214-83-1
		158.20	-32.0	-36.0	-29.0		

*表示定量离子

1.3 标准工作溶液的配制

标准物质: 共 4 种, 替米考星、红霉素、泰乐菌素、罗红霉素。

标准工作溶液配制: 用乙腈 - 水 (1:1) 配制 1 mg/mL 的标准贮备液, 用乙腈 - 水 (2:8) 溶液稀释成 1 µg/mL 的混合标准溶液。

1.4 标准曲线的配制

牛奶前处理液用氮气吹干后再用乙腈 - 水 (2:8) 溶液复溶, 该复溶液过 0.22 µm 有机滤膜后再用其将 1 µg/mL 的标准溶液稀释成 100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.2 ng/mL 系列浓度的混合标准工作液。

前处理方法采用出入境检验检疫行业标准《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内酯类抗生素残留检测方法 第 2 部分: 高效液相色谱串联质谱法》的第 7 部分和河北出入境检验检疫局技术中心发表的文章《液相色谱 - 串联质谱法测定牛奶和奶粉中 6 种大环内酯类药物的残留量》的第 2 部分。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

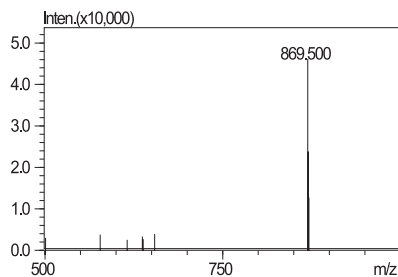


图1 替米考星一级质谱图

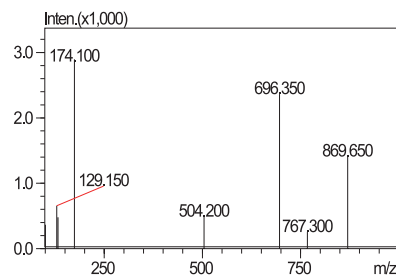


图2 替米考星产物离子扫描图(CE值-50 V)

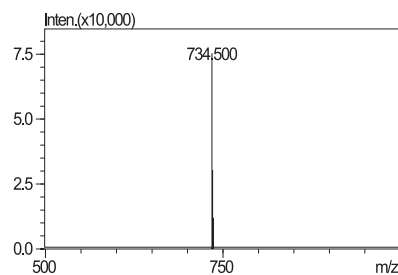


图3 红霉素一级质谱图

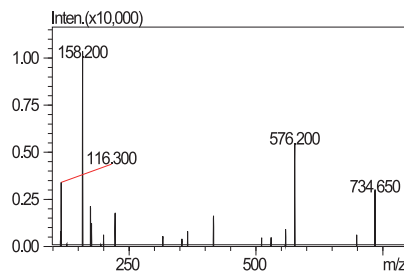


图4 红霉素产物离子扫描图(CE值-25 V)

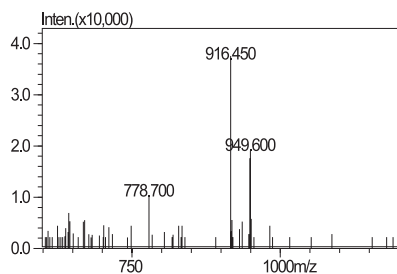


图5 泰乐菌素一级质谱图

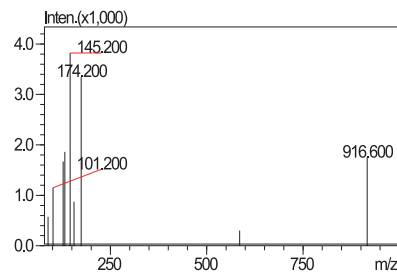


图6 泰乐菌素产物离子扫描图(CE值-40 V)

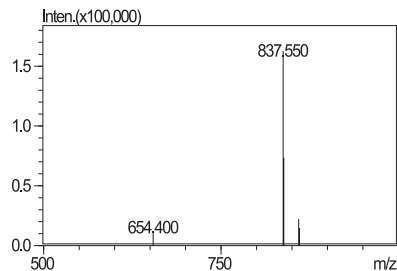


图7 罗红霉素一级质谱图

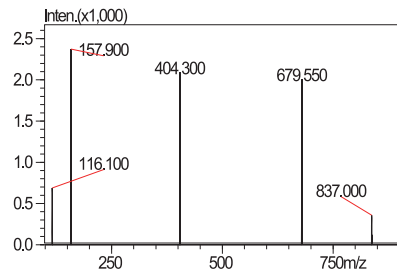


图8 罗红霉素产物离子扫描图(CE值-25 V)

2.2 牛奶基质加标样品的 MRM 色谱图

空白牛奶样品的色谱图如图 9 所示，加标样品色谱图如图 10 所示。

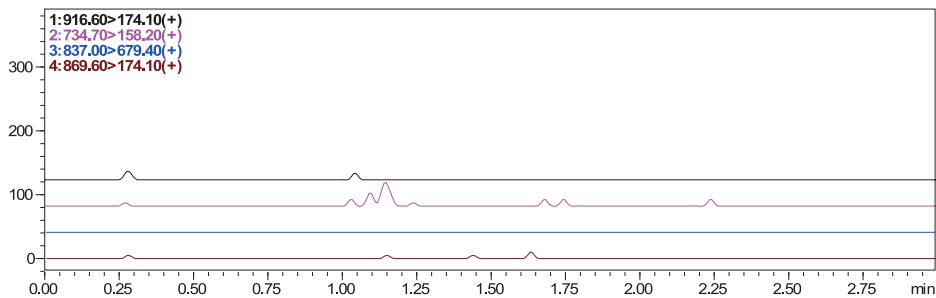


图9 牛奶空白基质样品的MRM色谱图

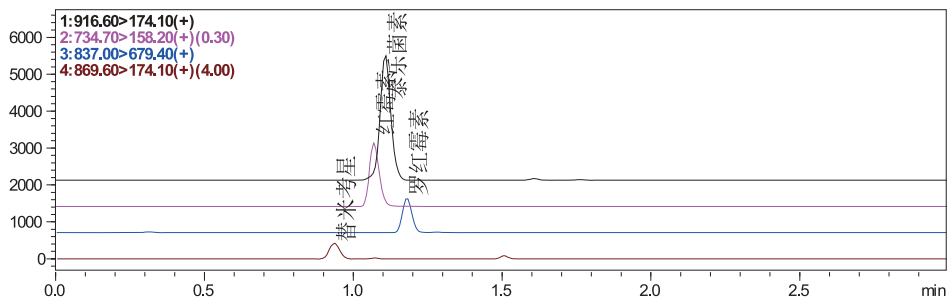


图10 基质加标样品的MRM色谱图 (1 ng/mL)

2.3 线性关系

将 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 系列浓度的标准溶液按 1.2 中的分析条件进行分析，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 11 至图 14 所示。替米考星在 0.5~100 ng/mL 范围内校准曲线线性关系良好，红霉素、泰乐菌素、罗红霉素在 0.2~100 ng/mL 范围内校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

表3 四种大环内酯类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r
1	替米考星	$Y = (369.574)X + (-58.7863)$	0.5~100	0.9942
2	红霉素	$Y = (12576.5)X + (567.112)$	0.2~100	0.9996
3	泰乐菌素	$Y = (7931.93)X + (261.239)$	0.2~100	0.9992
4	罗红霉素	$Y = (2126.15)X + (76.3701)$	0.2~100	0.9984

2.4 精密度实验

对 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.23% 和 2.44~4.78% 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% (5 ng/mL)		RSD% (20 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
替米考星	0.23	4.09	0.19	4.78	0.11	4.77
红霉素	0.10	4.17	0.09	4.39	0.10	3.64
泰乐菌素	0.11	3.26	0.12	3.79	0.04	2.44
罗红霉素	0.11	3.84	0.08	3.49	0.06	3.27

2.5 灵敏度分析

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后稀释混标得到浓度为 0.5 ng/mL 的溶液进样分析，四种大环内酯类抗生素的最低检出限 (S/N=3, LOD 表示)、最低定量限 (S/N=10, LOQ 表示) 结果如表 5 所示。

表5 四种大环内酯类抗生素的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	替米考星	61.35	0.024	0.081
2	红霉素	77.21	0.019	0.065
3	泰乐菌素	85.17	0.018	0.059
4	罗红霉素	72.94	0.021	0.069

2.6 基质加标实验

用牛奶基质按照 1.4 进行处理后加混标至 1 μg/kg，平行 3 份样品测定回收率。具体结果如表 6，样品加标回收率在 100.60 ~ 104.56% 之间。

表6 加标样的回收率结果 (n=3)

No.	样品名称	实测平均值 (μg/kg)	回收率 (%)
1	替米考星	1.0456	104.56
2	红霉素	1.0116	101.16
3	泰乐菌素	1.0060	100.60
4	罗红霉素	1.0080	100.80

■ 结论

本应用建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定牛奶中四种大环内酯类抗生素的方法。该方法在 1.3 min 内完成替米考星、红霉素、泰乐菌素、罗红霉素四种大环内酯类抗生素的分离，其中替米考星在 0.5~100 ng/mL 范围内线性良好，红霉素、泰乐菌素、罗红霉素在 0.2~100 ng/mL 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.994 以上。用处理过的牛奶基质配制 5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL 的标准溶液考察重复性，连续 6 次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08~0.23% 和 2.44~4.78% 之间，仪器精密度良好。牛奶中 4 种常见大环内酯类抗生素的定量限在 0.059~0.081 ng/mL 之间，检出限在 0.018~0.024 ng/mL 之间。该方法具有分析速度快、灵敏高、重复性好的特点，适合牛奶中大环内酯类抗生素的快速、高灵敏度检测。