

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用测定牛奶中维吉尼霉素 M1 含量

LCMSMS-310

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定牛奶中维吉尼霉素 M1 含量的方法。方法采用梯度洗脱，外标法定量，线性范围为 0.01~20 ng/mL，相关系数 0.9998，仪器定量限 0.01 ng/mL，对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06 ~ 0.30% 和 0.49 ~ 6.57% 之间。该方法灵敏度高、重复性好，能够满足牛奶中维吉尼霉素 M1 残留量检测要求。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 牛奶 维吉尼霉素 M1

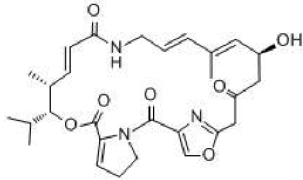
维吉尼霉素 M1 (Virginiamycin M1) 对革兰氏阳性菌有抑制作用，其可抑制细菌对氨基酸、蛋白质等营养物质的消耗，增强动物对营养物质的消化和吸收，有明显的促进生长作用，故在畜禽养殖中大量使用。但有研究表明，人类长期食用含维吉尼霉素的动物性食品会对其

产生抗药性，危害人体健康。因此，对动物性食品中维吉尼霉素 M1 含量的监测非常必要。本实验参照 GB/T 22991-2008，使用 LCMS-8050 建立了测定牛奶中维吉尼霉素 M1 残留量的方法，供有关人员参考。

实验部分

1.1 化合物信息

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
维吉尼霉素 M1	Virginiamycin M1	21411-53-0	C ₂₈ H ₃₅ N ₃ O ₇	

1.2 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{SR} 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 Column
(2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm)

流动相：A 相 -3 mM 甲酸铵水溶液；
B 相 - 乙腈 / 甲醇 =1:1

流速：0.5 mL/min

柱温：40℃

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	Pump	B.Conc	50
1.10	Pump	B.Conc	95
2.10	Pump	B.Conc	95
2.20	Pump	B.Conc	50
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 1.0 kV

雾化气: 氮气 2.0 L/min

加热气: 空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 150°C

加热模块温度: 400°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 3

表3 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
维吉尼霉素 M1	526.30	355.10*	-40.0	-18.0	-24.0
		337.10	-40.0	-22.0	-23.0

注: *表示定量离子

1.4 标准品配制与样品前处理

标准样品的配制: 精密称取维吉尼霉素 M1 标准品适量, 加入甲醇溶解后, 用流动相稀释配制标准曲线, 浓度分别为 0.01 ng/mL、0.02 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL。

样品前处理: 以提取液 (甲醇 / 乙腈 =1:1, v/v) 涡旋提取样品中的维吉尼霉素 M1 后, 离心, 取上清液以磷酸二氢铵缓冲溶液稀释, 然后以 C18 固相萃取柱净化, 洗脱液以三氯甲烷分离萃取, 氮吹三氯甲烷至干, 用甲酸铵缓冲溶液与甲醇混合液溶解并定容后, 进样分析。具体操作步骤和细节请参考 GB/T 22991-2008 中章节 “7.1-7.2”。

结果与讨论

2.1 标准样品色谱图

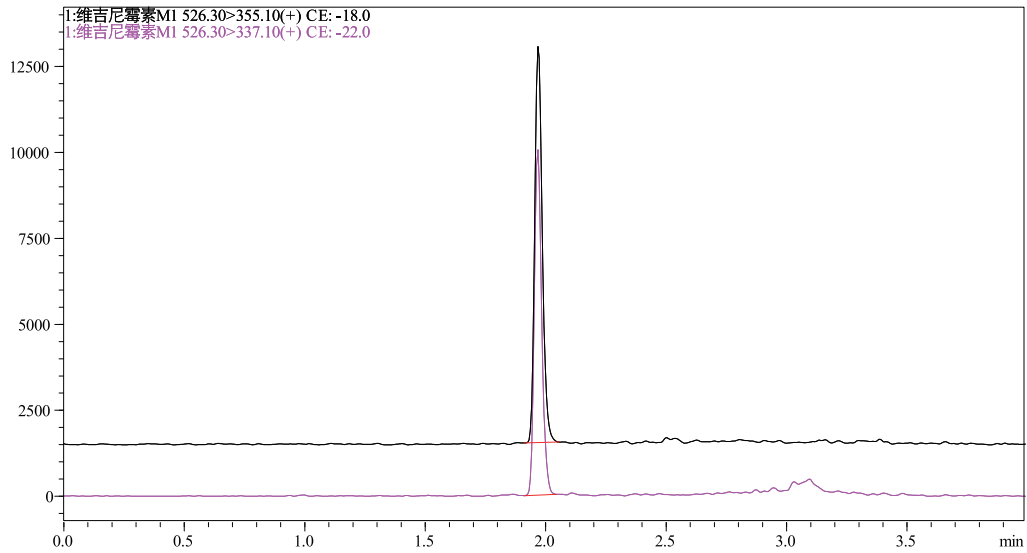


图1 0.1 ng/mL维吉尼霉素M1标准溶液MRM色谱图

2.2 标准曲线

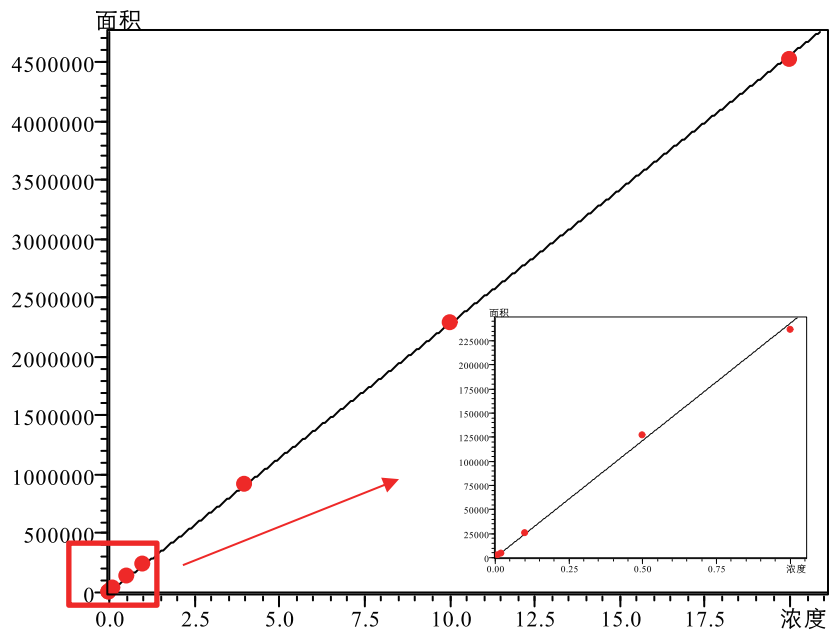


图2 校准曲线

Data#	数据文件名	样品类型	级别号	保留时间	面积	浓度 (ppb)	标准浓度	精确度%	校准点
1	std_0_01ppb	标准 (校准点)	1	1.976	2,534	0.008	0.01	80.9	✓
2	std_0_01ppb	标准 (校准点)	1	1.974	2,666	0.009	0.01	86.7	✓
3	std_0_02ppb	标准 (校准点)	2	1.972	4,766	0.018	0.02	89.6	✓
4	std_0_02ppb	标准 (校准点)	2	1.980	4,624	0.017	0.02	86.5	✓
5	std_0_1ppb_	标准 (校准点)	3	1.984	25,637	0.110	0.1	109.9	✓
6	std_0_1ppb_	标准 (校准点)	3	1.966	26,241	0.113	0.1	112.5	✓
7	std_0_5ppb_	标准 (校准点)	4	1.965	128,902	0.565	0.5	113.0	✓
8	std_0_5ppb_	标准 (校准点)	4	1.971	128,416	0.563	0.5	112.6	✓
9	std_1ppb_02	标准 (校准点)	5	1.985	235,325	1.034	1	103.4	✓
10	std_1ppb_01	标准 (校准点)	5	1.981	238,247	1.047	1	104.7	✓
11	std_4ppb_01	标准 (校准点)	6	1.989	904,918	3.984	4	99.6	✓
12	std_4ppb_02	标准 (校准点)	6	1.982	918,550	4.044	4	101.1	✓
13	std_10ppb_0	标准 (校准点)	7	1.980	2,276,079	10.026	10	100.3	✓
14	std_10ppb_0	标准 (校准点)	7	1.987	2,298,423	10.124	10	101.2	✓
15	std_20ppb_0	标准 (校准点)	8	1.989	4,485,651	19.762	20	98.8	✓
16	std_20ppb_0	标准 (校准点)	8	1.984	4,502,566	19.836	20	99.2	✓

图3 校准曲线各浓度点信息

将浓度为 0.01 ng/mL、0.02 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、4 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 的目标物标准工作液，按 1.3 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 2 和图 3 所示，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

表3 校准曲线参数

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	线性相关系数 R	准确度 (%)
维吉尼霉素 M1	$Y = (226939)X + 695.9$	0.01-20	0.9998	80.9-113.0%

2.3 灵敏度实验

由 0.01 ng/mL 标准样品色谱图信噪比，计算仪器检出限 (S/N=3) 和定量限 (S/N=10)，结果如表 4 所示。

表4 检出限和定量限

名称	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
维吉尼霉素 M1	0.003	0.010

2.4 精密度实验

配制目标物浓度分别为 0.02、0.5、10 ng/mL 的混合标样，平行测定各 6 次，考察仪器的重复性，保留时间和峰面积重复性结果如表 4 所示，仪器重复性良好。

表5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

名称	RSD (% , 0.02 ng/mL)		RSD (% , 0.5 ng/mL)		RSD (% , 10 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
维吉尼霉素 M1	0.30	6.57	0.21	1.73	0.06	0.49

2.5 回收率实验

将牛奶样品按照 1.4 对样品处理后进样分析，结果目标组分未检出，如图 4 所示。在牛奶中添加目标组分，计算加标回收率，结果如表 6 所示。

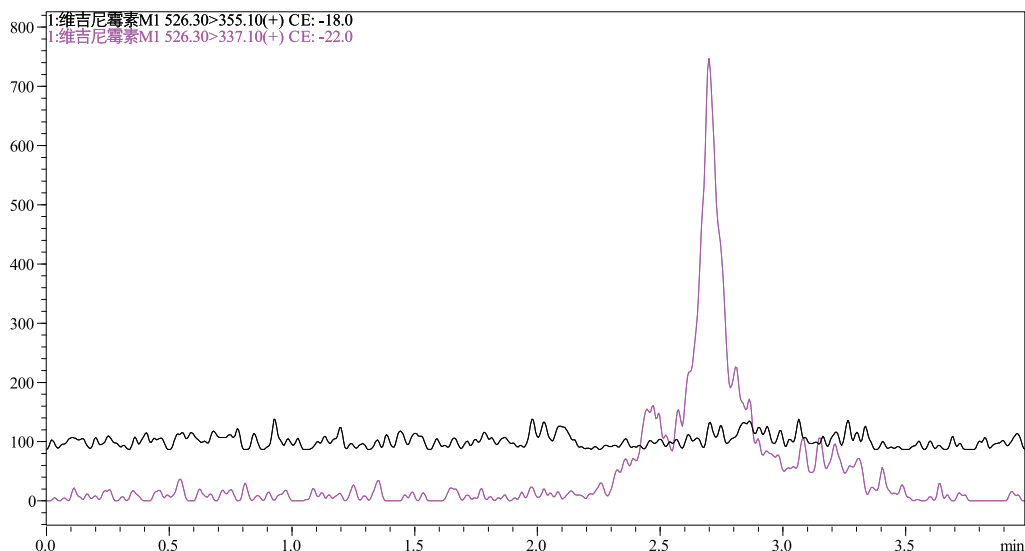


图4 空白牛奶样品色谱图

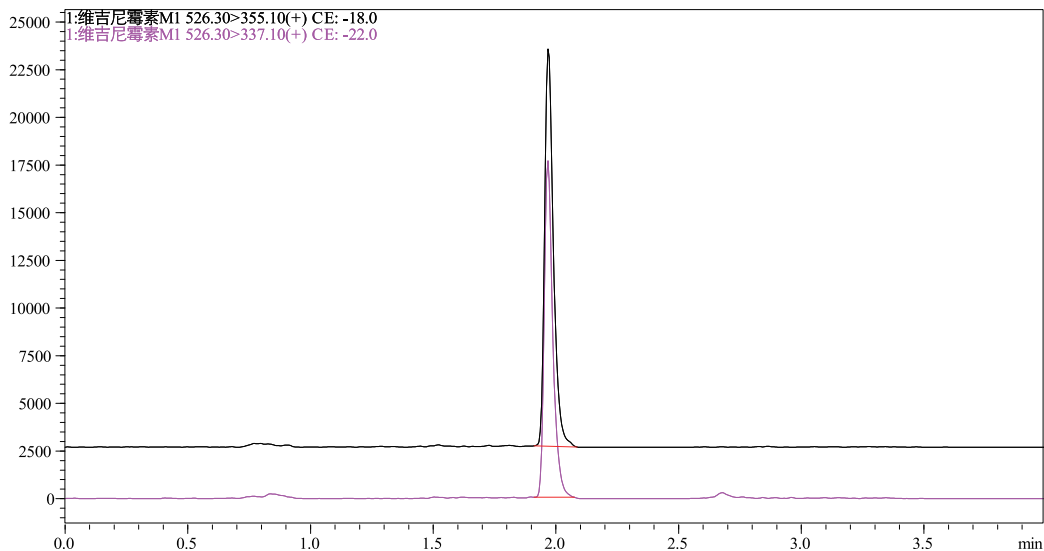


图5 空白基质加标0.4 ng/mL色谱图

表6 加标回收实验

名称	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)	加标浓度 (ng/mL)	平均回收率 (%)
维吉尼霉素 M1	0.4	88.6	4.0	86.4

结论

本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定牛奶中维吉尼霉素 M1 含量的方法。方法采用梯度洗脱，外标法定量，线性范围为 0.01~20 ng/mL，相关系数 0.9998，仪器定量限 0.01 ng/mL，对低、中、高不同浓度的样品平行测试 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.30% 和 0.49~6.57% 之间。该方法灵敏度高、重复性好，能够满足牛奶中维吉尼霉素 M1 残留量检测要求。