

LCMS-8045 检测鱼肉中大环内酯类抗生素

LCMSMS-513

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用快速测定鱼肉中大环内酯类抗生素的方法。鱼肉样品经处理后，经 LCMS-8045 分析，9 种大环内酯类抗生素在 1-1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.997 以上；对 1 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 250 $\mu\text{g/L}$ 混合基质标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02% ~0.20% 和 0.72% ~9.41 % 之间，仪器精密度良好。加标浓度在 5 $\mu\text{g/kg}$ 的鱼肉样品，回收率在 76.3%~96.7% 之间。

关键词：大环内酯类抗生素 三重四极杆质谱 兽药残留

大环内酯类抗生素 (Macrolide anti-biotics, MALs) 是由放线杆菌或小单孢菌产生的一类抗生素。MALs 已经成为全世界需求量和销售速度增长最快的抗生素之一。由于 MALs 具有广谱抗菌作用，可抵抗革兰氏阳性菌、支原体和部分革兰氏阴性菌，因此被广泛应用于治疗猪、牛、羊、虾及家禽的呼吸性和倡导传染性疾病，或在低剂量下作为饲料添加剂促进动物生长发育。大环内酯类药物残留可引起过敏反应和导致携带耐药因子的菌株扩散。和其他兽药一样，大环内酯类药物在动物源性食品中的残留监测与控制已经受到许多国家包括我国政府的高度重视。《GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定，

红霉素在鱼和其它动物组织中的最大残留限量 (MRL) 为 40~200 $\mu\text{g/kg}$ ；吉他霉素、螺旋霉素、替米考星和泰乐菌素在动物组织的 MRL 分别为 200 $\mu\text{g/kg}$ 、200~800 $\mu\text{g/kg}$ 、50-2400 $\mu\text{g/kg}$ 和 100-300 $\mu\text{g/kg}$ 。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用，参考《GB 31660.1-2019 水产品中大环内酯类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》建立了测定鱼肉中 9 种大环内酯类抗生素 (竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素) 的分析方法，该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40B X3

质谱仪：LCMS-8045

柱温箱：CTO-40S

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIS C18 (150 mm×2.1 mm I.D., 4 μm , 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30097-07)

流动相：A — 0.1 % 甲酸水溶液；B — 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：2 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	15
6.00	Pumps	Pump B Conc.	65
6.50	Pumps	Pump B Conc.	95
7.50	Pumps	Pump B Conc.	95
7.51	Pumps	Pump B Conc.	15
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式

离子源接口电压: 1.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

加热气: 空气 10 L/min

碰撞气: 氦气

DL 管温度: 250 °C

加热模块温度: 400 °C

接口温度: 300 °C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

驻留时间: 3~25 ms

表 2 MRM 参数

编号	名称	英文名称	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	螺旋霉素	Spiramycin	8025-81-8	843.5	174.1*	-24.0	-36.0	-12.0
					142.2	-24.0	-34.0	-15.0
2	替米考星	Tilmicosin	108050-54-0	869.6	174.2	-24.0	-45.0	-19.0
					696.6*	-24.0	-42.0	-26.0
3	竹桃霉素	Oleandomycin	7060-74-4	688.5	158.1	-20.0	-28.0	-17.0
					544.4*	-20.0	-17.0	-20.0
4	泰乐菌素	Tylosin	1401-69-0	916.6	174.2*	-26.0	-39.0	-12.0
					772.6	-26.0	-31.0	-30.0
5	克拉霉素	Clarithromycin	81103-11-9	748.5	158.1*	-32.0	-25.0	-12.0
					590.4	-32.0	-16.0	-20.0
6	阿奇霉素	Azithromycin	83905-01-5	749.5	158.1*	-22.0	-36.0	-30.0
					591.4	-22.0	-29.0	-22.0
7	红霉素	Erythromycin	114-07-8	734.4	158.2	-26.0	-32.0	-29.0
					576.3*	-26.0	-21.0	-28.0
8	交沙霉素	Josamycin	16846-24-5	828.5	109.1	-24.0	-35.0	-21.0
					174.2*	-24.0	-33.0	-18.0
9	吉他霉素	Sineptina	1392-21-8	772.5	109.1	-22.0	-41.0	-22.0
					174.1*	-22.0	-32.0	-12.0

* 表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

精密量取含竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌

素 9 种标准物质的 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准贮备液 1 mL, 于 10 mL 棕色量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大环内酯类药物混合标准工作液。

精密量取混合标准工作液适量, 用空白样品提取液溶解稀释, 配制成大环内酯类药物浓度为 1 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 的系列基质标准工作溶液, 现配现用。

样品前处理方法:

鱼肉样品的提取和净化参照《GB 31660.1-2019 食品安全国家标准 水产品中大环内酯类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

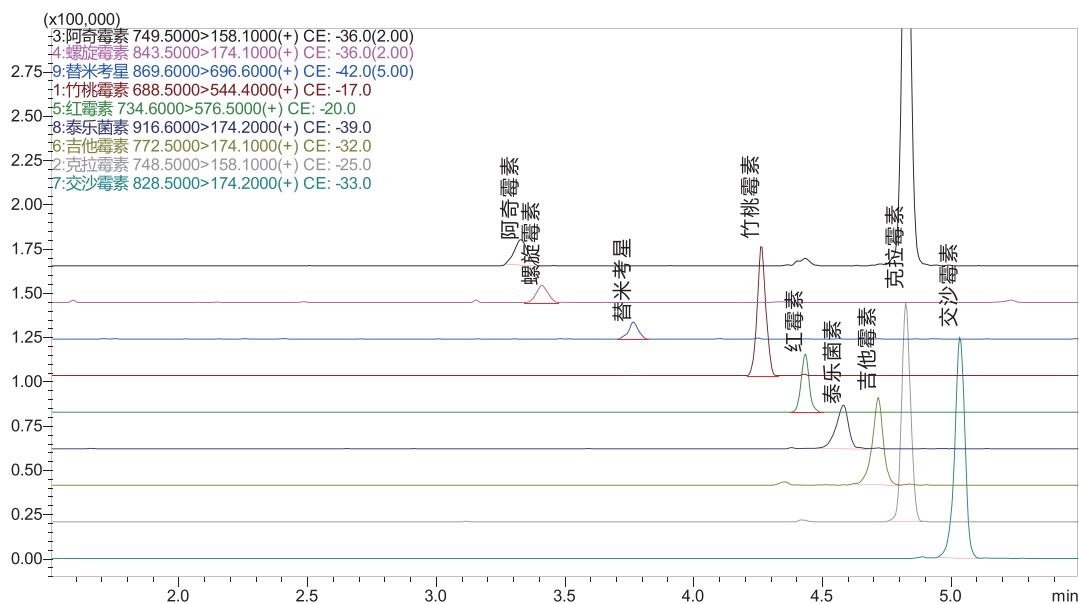
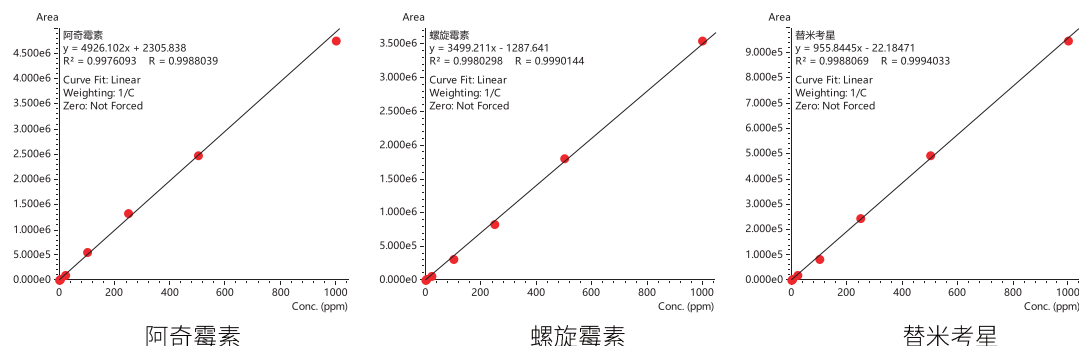


图 1 大环内酯类抗生素基质标准样品的 MRM 色谱图 (5 ng/mL)

2.2 线性关系

精密量取混合标准工作液适量, 用空白样品提取液溶解稀释, 配成浓度为 1、5、20、100、250、500 和 1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作溶液, 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, 绘制校准曲线如图 2 所示。9 种大环内酯化合物在 1-1000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好, 线性方程、相关系数见表 3。以 1 ng/mL 大环内酯类抗生素的 MRM 色谱图结果, 根据检出限 $\text{MDL} = 3.3 \text{ S/N}$, 定量限 $\text{LOQ} = 10 \text{ S/N}$, 计算检出限和定量限, 结果见表 3。



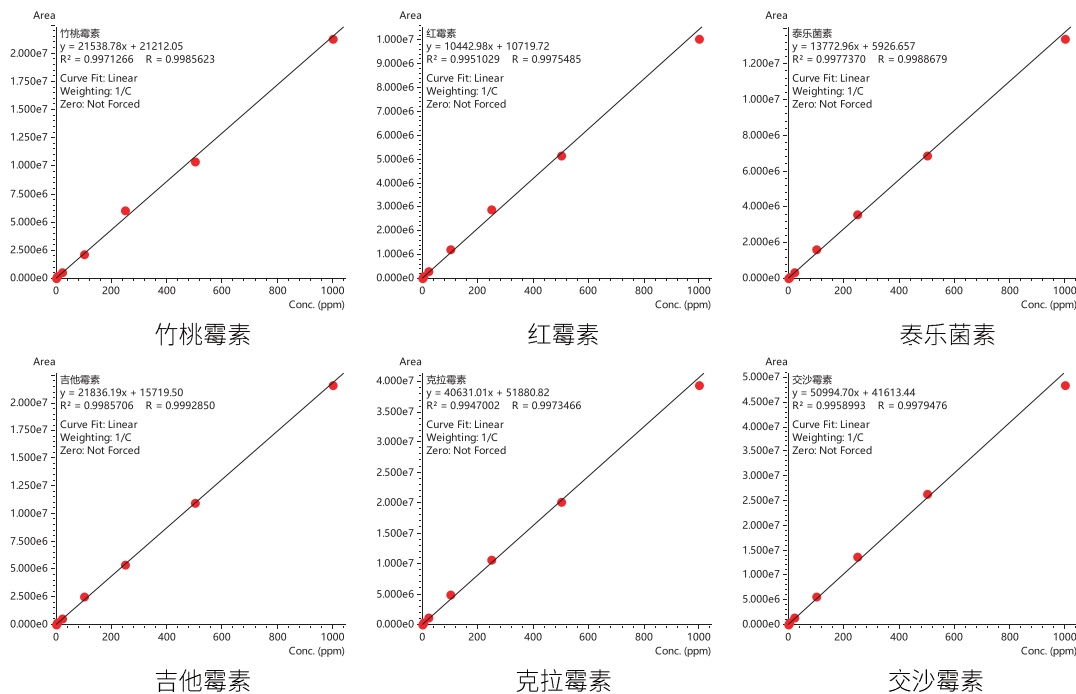


图 2 9 种大环内酯类抗生素的标准工作曲线

表 3 9 种大环类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	准确度 %	检出限 (μg/L)	定量限 (μg/L)
1	阿奇霉素	$Y = (4926.10)X + (2305.84)$	0.9988	77.9~112.3	0.081	0.271
2	螺旋霉素	$Y = (3499.21)X + (-1287.64)$	0.9990	82.6~115.7	0.193	0.642
3	替米考星	$Y = (955.844)X + (-22.1847)$	0.9994	88.4~114.7	0.235	0.784
4	竹桃霉素	$Y = (21538.8)X + (21212.1)$	0.9986	71.8~117.4	0.002	0.005
5	红霉素	$Y = (10443.0)X + (10719.7)$	0.9975	75.3~116.7	0.020	0.067
6	泰乐霉素	$Y = (13773.0)X + (5926.66)$	0.9989	79.0~115.5	0.029	0.096
7	吉他霉素	$Y = (21836.2)X + (15719.5)$	0.9993	77.6~114.3	0.025	0.083
8	克拉霉素	$Y = (40631.0)X + (51880.8)$	0.9973	74.6~119.4	0.005	0.017
9	交沙霉素	$Y = (40631.0)X + (51880.8)$	0.9979	85.6~124.7	0.011	0.037

2.3 精密度实验

对 1 μg/L、20 μg/L 和 250 μg/L 混合基质标准溶液连续 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 0.02% ~0.20% 和 0.72% ~9.41 % 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% (1 mg/L)		RSD% (20 mg/L)		RSD% (250 mg/L)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
阿奇霉素	0.18	7.84	0.07	3.82	0.06	1.52
螺旋霉素	0.20	7.20	0.07	2.42	0.07	1.57
替米考星	0.09	9.41	0.06	4.40	0.05	1.98
竹桃霉素	0.04	6.13	0.05	4.01	0.09	1.46

红霉素	0.05	5.01	0.03	1.22	0.06	0.72
泰乐霉素	0.11	3.35	0.02	2.04	0.06	1.95
吉他霉素	0.06	5.04	0.04	1.64	0.05	0.97
克拉霉素	0.04	6.68	0.05	2.62	0.06	1.66
交沙霉素	0.04	4.59	0.04	1.63	0.05	1.03

2.4 实际样品分析及基质加标实验

取市售鱼肉样品，平行制备两份，上机测定，样品未检出大环内酯类抗生素。为了考察方法的准确度，在空白鱼肉基质中加标，加标浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行测定 3 次，然后再按照 1.3 中样品制备方法提取净化的鱼肉基质样品后分析，其回收率在 76.3%~96.7% 之间，具体数据见表 5。

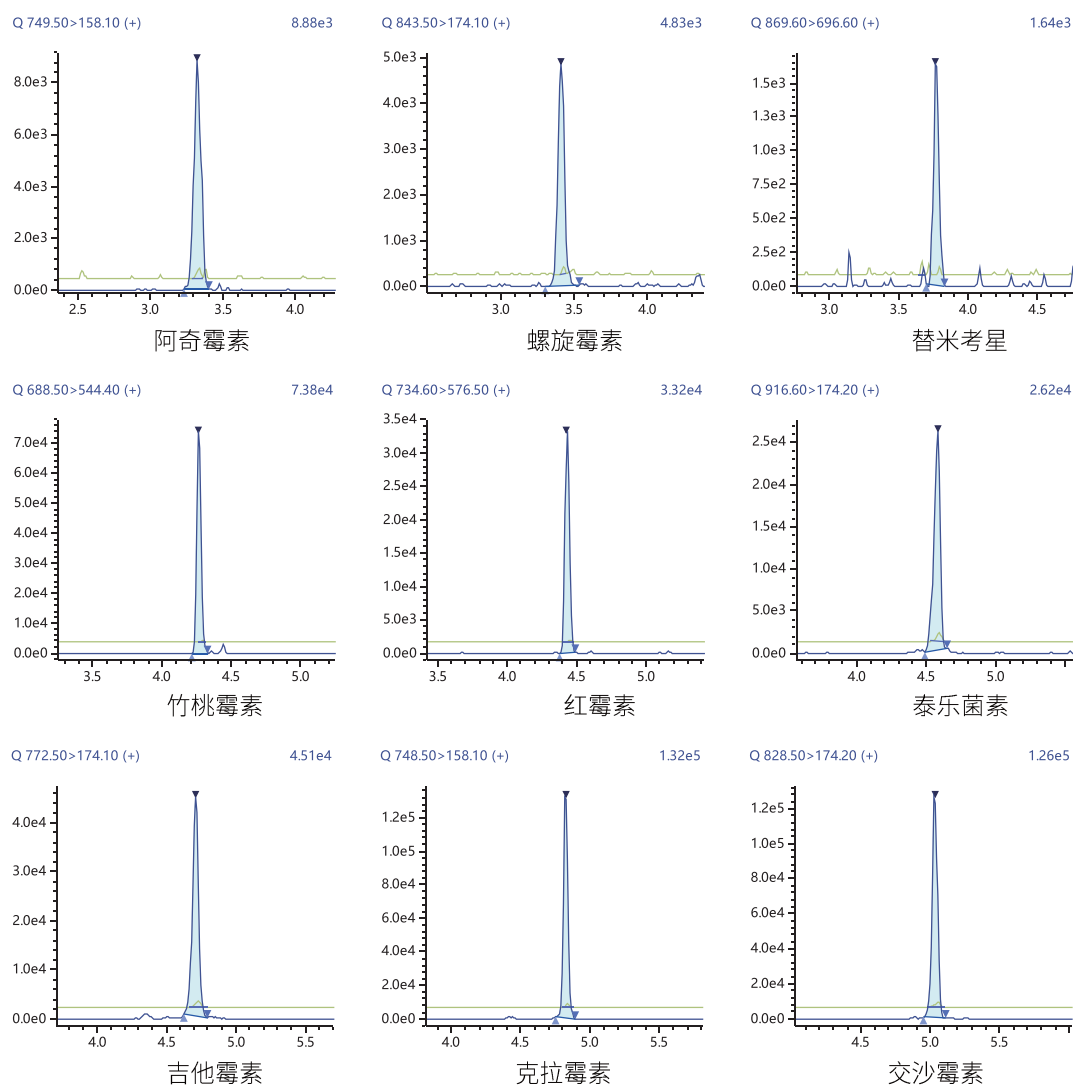


图 3 实际空白鱼肉样品及加标样品 MRM 重叠色谱图 (绿线和蓝线分别为空白鱼肉和加标鱼肉样品)

表 5 鱼肉加标回收率结果 (n=3)

	阿奇霉素	螺旋霉素	替米考星	竹桃霉素	红霉素	泰乐霉素	吉他霉素	克拉霉素	交沙霉素
回收率 %	84.5	82.7	76.3	93.0	89.6	79.5	95.4	94.3	96.7
重复性 %	8.65	9.77	11.44	4.37	8.46	7.87	6.83	6.40	5.49

■ 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-40 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定鱼肉中 9 种大环内酯类抗生素的方法。该方法分析速度快，灵敏度高，精密度良好；竹桃霉素、红霉素、克拉霉素、阿奇霉素、吉他霉素、交沙霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素在 1-1000 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.997 以上。对 1 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 250 $\mu\text{g/L}$ 混合基质标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02% ~0.20% 和 0.72% ~9.41 % 之间，加标浓度为 5 $\mu\text{g/kg}$ 的鱼肉样品，其回收率在 76.3%~96.7% 之间。

岛津应用云

