

LC-MS/MS 检测牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量

LCMSMS-871

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的方法。10种氨基糖苷类药物在 0.1 µg/L~3.0 µg/L（以 A 组计）浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.993 以上。在高、中、低三个浓度下，化合物的保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.03%~0.09% 和 1.41%~8.38% 之间，仪器精密度良好。加标浓度在 20~100 µg/kg 的样品，其回收率在 74.8~103.3% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的准确定量检测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 牛羊奶 氨基糖苷类药物

技术特点：

- ❖ 相较《牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的测定 液相色谱串联质谱法》征求意见稿，本方法检测的灵敏度更高。
- ❖ 自动进样器同时注入功能，去除溶剂效应，峰形尖锐无分叉。

氨基糖苷类药物（AGs）是通过氨基糖和氨基环醇以苷键结合而构成，主要作用是阻碍细菌的蛋白质合成，使细菌细胞壁的通透性发生变化，从而发挥抗菌作用。近年来，有文献报道 AGs 对人体具有显著的耳毒性、肾毒性且会损害前庭神经功能，严重时会导致休克，甚至死亡。

2019 年，农业农村部、卫健委和国家市场监督管理总局联合发布的 GB 31650-2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》对奶中的庆大霉素、卡那霉素、新霉素 B、大观霉素、链霉素和双氢链霉

素的残留限量做出了相关规定。

我国现行有效的动物源性食品中氨基糖苷类药物残留检测标准相对较少。为了保障人们的食品安全，我们参考标准《食品安全国家标准 牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》征求意见稿，建立了牛羊奶中氨基糖苷类药物残留的检测方法。该方法覆盖畜禽养殖行业常用的 10 种 AGs，无需使用离子对试剂和高浓度盐溶液，结果准确、可靠，杂质干扰小，可实现对牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的有效检测。

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-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	自动进样器：	SIL-40C X3
输液泵：	LC-40 X3 ×2	质谱仪：	LCMS-8050
柱温箱：	CTO-40C	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机：	DGU-405		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：	BEH amide (100 mm×2.1 mm I.D, 1.7 µm)	流速：	0.3 mL/min
流动相：	A 相 -1% 甲酸水溶液 (含 2 mM 乙酸铵)，B 相 - 乙腈	进样体积：	2 µL
柱温：	40°C		
预处理程序：	同时注入，2 µL 乙腈		
洗脱方式：	梯度洗脱，初始浓度为 B 相 80%，时间程序见表 1		

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	80
3.50	Pumps	Pump B Conc.	35
5.50	Pumps	Pump B Conc.	10
6.70	Pumps	Pump B Conc.	10
7.50	Pumps	Pump B Conc.	80
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI, 正离子模式

DL 管温度：150°C

接口电压：1.0 kV

加热模块温度：500°C

雾化气：氮气 2.5 L/min

接口温度：300°C

干燥气：氮气 10 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

加热气：空气 3 L/min

MRM 参数：见表 2

碰撞气：氩气 (230 kPa)

喷雾针位置：+3 mm

表 2 MRM 参数

No	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	庆大霉素 C1	25876-10-2	478.3	157.2*	-13.0	-21.0	-10.0
				322.2	-13.0	-14.0	-22.0
2	庆大霉素 C1a	26098-04-4	450.3	322.2*	-12.0	-13.0	-22.0
				160.2	-12.0	-22.0	-16.0
3	新霉素 B	4146-30-9	615.3	161.2*	-30.0	-32.0	-16.0
				293.1	-20.0	-24.0	-14.0
4	双氢链霉素	5490-27-7	584.3	263.2*	-22.0	-31.0	-18.0
				246.2	-22.0	-39.0	-17.0
5	大观霉素	21736-83-4	333.2	98.1*	-10.0	-28.0	-17.0
				98.1*	-17.0	-23.0	-27.0
6	链霉素	3810-74-0	582.3	263.2*	-34.0	-32.0	-30.0
				221.2	-38.0	-40.0	-25.0
7	庆大霉素 C2+C2a	287916-51-2	464.3	160.2*	-15.0	-22.0	-16.0
				322.2	-15.0	-15.0	-22.0
8	潮霉素 B	31282-04-9	528.3	177.2*	-32.0	-28.0	-18.0
				352.1	-30.0	-22.0	-25.0
9	卡那霉素 A	25389-94-0	485.2	163.2*	-15.0	-24.0	-10.0
				324.2	-29.0	-18.0	-15.0
10	安普霉素	65710-07-8	540.2	217.2	-34.0	-28.0	-22.0
				378.2*	-34.0	-18.0	-18.0

* 表示定量离子

■ 样品前处理方法和标准溶液配制

2.1 样品前处理

称取试料 5 g (精确至 ± 0.05 g) 于 50 mL 离心管中, 加 5% 三氯乙酸溶液 20 mL, 涡旋 1 min, 振荡提取 15 min, 4°C 下 10000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 用氨水调节 pH 至 7.5, 备用。

HLB 固相萃取小柱 (200 mg, 6 mL) 用甲醇 5 mL、水 5 mL 活化, 取备用液过柱, 依次用水、5% 甲醇溶液各 3 mL 淋洗, 抽干。用洗脱溶液 (甲酸: 异丙醇: 2 mM 乙酸铵 = 2:1:17, 甲酸调至 pH=0.8) 2.0 mL 进行洗脱, 收集洗脱液, 抽干, 涡旋, 尼龙微孔滤膜过滤, 供液相色谱 - 串联质谱仪分析。

2.2 标准溶液配制

混合标准中间液: 准确移取潮霉素 B、安普霉素、链霉素、庆大霉素 C1、庆大霉素 C1a、庆大霉素 C2+C2a 的标准储备液 (1 mg/mL) 各 0.1 mL 于 10 mL 聚丙烯容量瓶, 用水稀释至刻度, 配制成 A 组混合标准中间液 (各化合物浓度均为 10 $\mu\text{g/mL}$)。同样方法用水配制 B 组 (大观霉素、双氢链霉素、卡那霉素 A、新霉素 B) 混合标准中间液, 各化合物浓度均为 40 $\mu\text{g/mL}$ 。

混合标准工作液: 准确移取混合标准中间液适量, 用洗脱溶液稀释, 配制成 A 组浓度分别 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 和 3.0 $\mu\text{g/mL}$, B 组浓度分别为 0.4、0.8、2.0、4.0、8.0 和 12.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合标准工作液。

■ 结果与讨论

3.1 溶剂效应与消除方式

在液相分离时, 如果存在化合物出峰时间早、保留弱或是进样量大的情况, 可能会发生溶剂效应。在本例的前处理步骤中, SPE 的洗脱液 (甲酸: 异丙醇: 2 mM 乙酸铵 = 2:1:17, 甲酸调至 pH=0.8) 过滤后直接注入 LC-MS/MS 系统, 该洗脱液在亲水作用色谱下, 相对于初始流动相为强溶剂, 因此出峰时间靠前的庆大霉素 C1、大观霉素容易得到变形的、展宽的峰。在实验中我们采取了同时注入模式 (图 1), 同等比例的注入乙腈溶液, 可有效的减少溶剂效应, 对比实际样品采用同时注入功能前后大观霉素色谱图改善明显 (图 2)。



图 1 同时注入模式设置

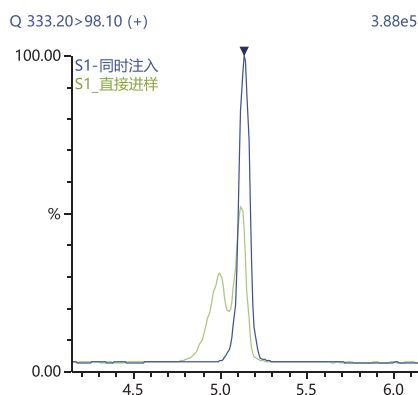


图 2 大观霉素在同时注入模式设置前后对比色谱图

3.2 基质标样色谱图

氨基糖苷类药物的基质标样经共同注入模式进样的 MRM 色谱图如图 3 所示，峰号为 1-10 的化合物分别为大观霉素、庆大霉素 C1、双氢链霉素、庆大霉素 C2+C2a、潮霉素 B、链霉素、庆大霉素 C1a、卡那霉素 A、安普霉素、新霉素 B，色谱峰分离良好，通道无干扰。

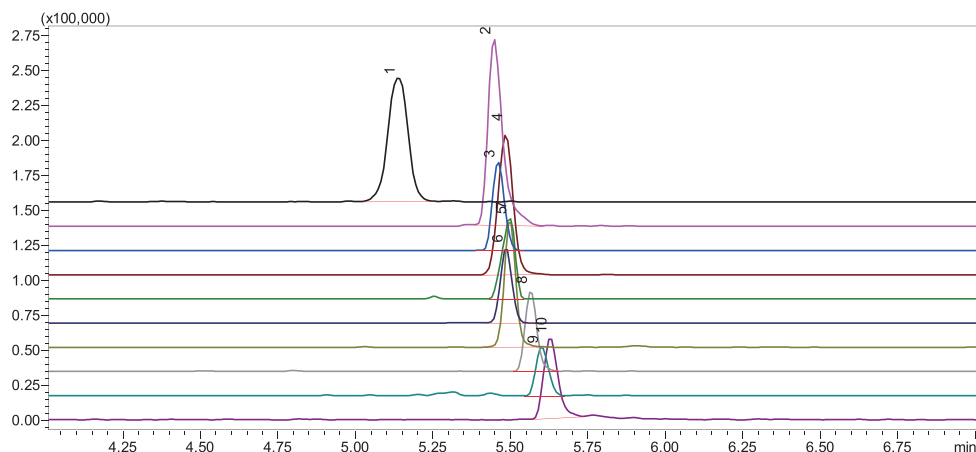
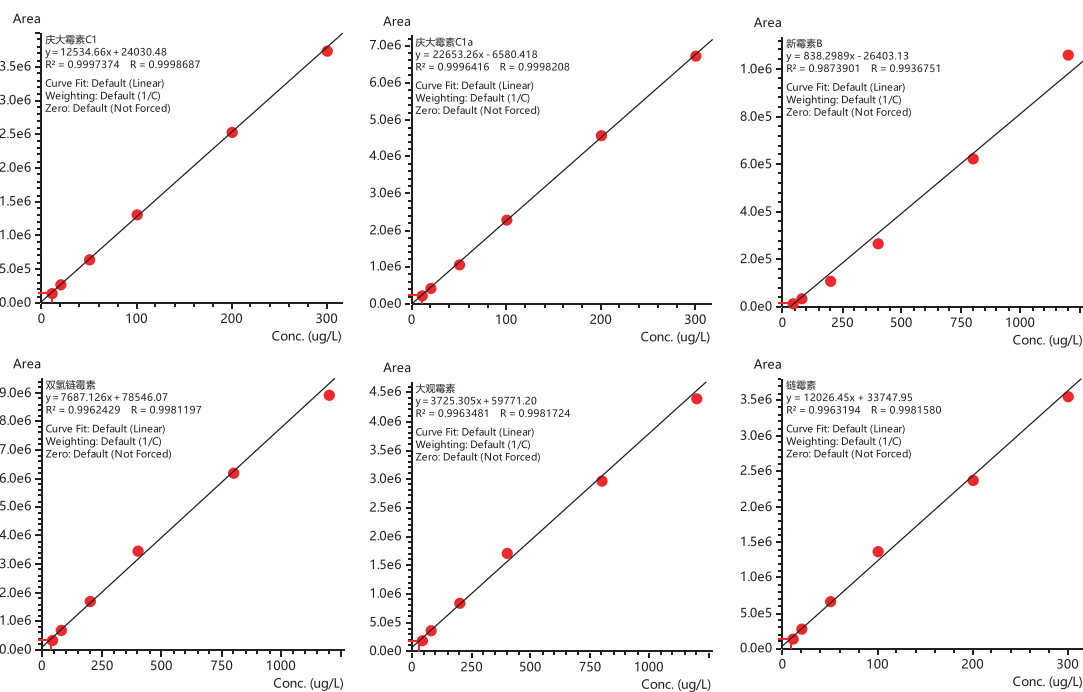


图 3 氨基糖苷类药物 MRM 色谱图 (A 组 10 μg/L, B 组 40 μg/L)

3.3 校准曲线和检出限

选取空白样品按照 2.1 样品前处理步骤得到空白基质溶液，准确移取混合标准工作液各 100 μL，用空白基质溶液稀释至 1 mL，制成 A 组浓度为 10、20、50、100、200 和 300 μg/L，B 组浓度为 40、80、200、400、800、1200 μg/L 的系列基质匹配标准溶液，供液相色谱 - 串联质谱测定。以定量离子对质量色谱峰面积为纵坐标、相对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，求回归方程和相关系数。根据最低点标样数据，以 3 倍信噪比计算氨基糖苷类药物的仪器检出限，其结果如表 3 所示。



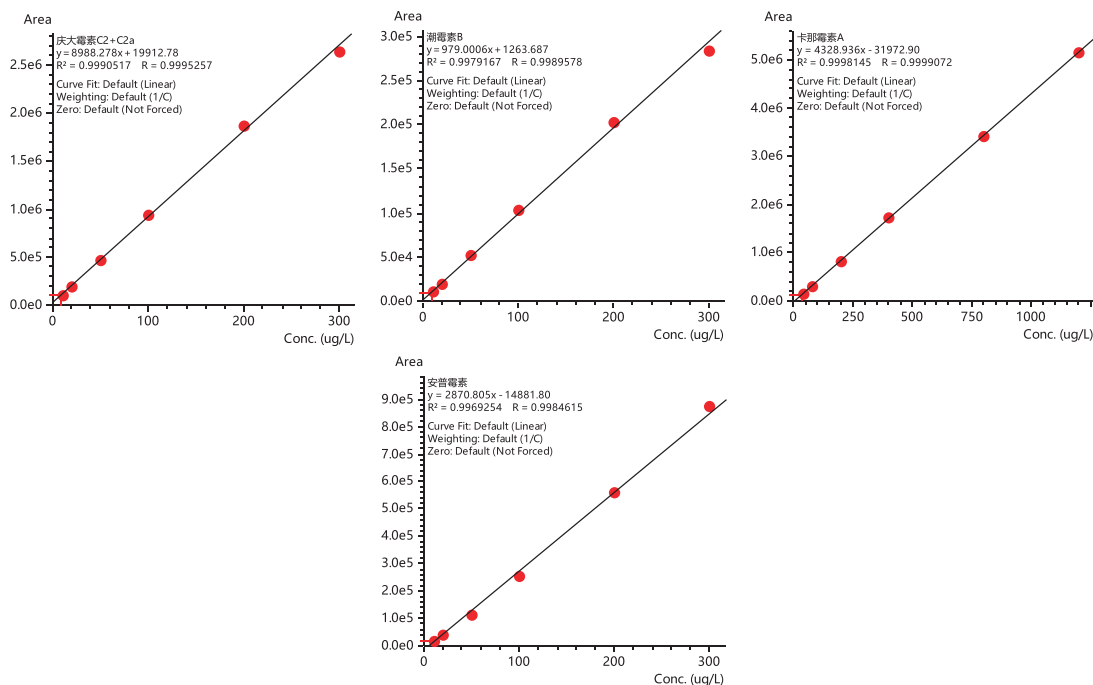


图4 氨基糖苷类药物校准曲线

表3 氨基糖苷类药物校准曲线及检出限

#	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	庆大霉素 C1	$Y = (12534.7)X + (24030.5)$	0.9999	95.5~103.2	0.05	0.14
2	庆大霉素 C1a	$Y = (22653.3)X + (-6580.42)$	0.9998	93.7~107.3	0.07	0.21
3	新霉素 B	$Y = (838.299)X + (-26403.1)$	0.9937	82.8~126.0	4.49	13.62
4	双氢链霉素	$Y = (7687.13)X + (78546.1)$	0.9981	86.1~112.7	0.14	0.43
5	大观霉素	$Y = (3725.31)X + (59771.2)$	0.9982	95.0~110.8	0.93	2.82
6	链霉素	$Y = (12026.5)X + (33748.0)$	0.9982	86.0~111.6	0.06	0.19
7	庆大霉素 C2+C2a	$Y = (8988.28)X + (19912.8)$	0.9995	94.5~107.4	0.05	0.14
8	潮霉素 B	$Y = (979.001)X + (1263.69)$	0.9990	85.4~106.8	0.68	2.05
9	卡那霉素 A	$Y = (4328.94)X + (-31972.9)$	0.9999	94.2~107.6	1.93	5.85
10	安普霉素	$Y = (2870.80)X + (-14881.8)$	0.9985	87.7~120.1	0.82	2.48

3.4 重复性实验

浓度为 10、50 和 200 μg/L (以组 A 成分浓度计) 的基质标准工作液连续测定 6 次, 考察仪器的精密度。不同浓度样品中待测物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03%~0.09% 和 1.41%~8.38% 之间, 仪器精密度良好。

表4 氨基糖苷类药物保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No	化合物	RSD% (10 μg/L)		RSD% (50 μg/L)		RSD% (200 μg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	庆大霉素 C1	0.05	2.73	0.06	2.96	0.08	2.48

2	庆大霉素 C1a	0.04	6.27	0.06	4.32	0.08	2.47
3	新霉素 B	0.03	4.24	0.06	1.59	0.08	1.41
4	双氢链霉素	0.04	3.48	0.06	2.39	0.09	2.77
5	大观霉素	0.05	3.92	0.06	2.45	0.08	1.87
6	链霉素	0.04	2.97	0.06	4.21	0.08	1.88
7	庆大霉素 C2+C2a	0.03	6.72	0.06	4.09	0.08	1.87
8	潮霉素 B	0.03	8.38	0.08	5.45	0.09	4.38
9	卡那霉素 A	0.04	5.51	0.06	2.10	0.08	3.42
10	安普霉素	0.04	8.23	0.07	4.05	0.08	4.02

3.5 加标回收率

取未检出氨基糖苷类药物的牛奶 5 g，加入混标工作液，使浓度分别为 20 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （以 A 组计），样品经提取及净化后，按照 1.2 中的分析条件测定 10 种氨基糖苷类药物的加标回收率，平行测定 3 次，其回收率在 74.8~103.3% 之间，具体结果见表 5。

表 5 氨基糖苷类药物回收率结果 (n=3)

No.	化合物	加标浓度 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标浓度 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	庆大霉素 C1	91.3	1.93	89.8	4.59
2	庆大霉素 C1a	74.8	4.12	75.8	7.09
3	新霉素 B	81.7	1.23	83.4	1.48
4	双氢链霉素	103.3	3.07	86.3	4.47
5	大观霉素	83.4	8.41	89.5	7.14
6	链霉素	79.6	8.84	79.4	1.27
7	庆大霉素 C2+C2a	80.2	3.35	88.2	8.07
8	潮霉素 B	78.0	9.64	79.4	10.09
9	卡那霉素 A	79.9	11.30	82.1	8.06
10	安普霉素	83.4	9.56	88.0	8.60

■ 结论

依据食品安全国家标准《牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》征求意见稿建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定牛奶中氨基糖苷类药物残留的方法。10 种药物在 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~3.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.993 以上。加标浓度为 20~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品，回收率在 74.8~103.3% 之间。该方法无需使用离子对试剂和高浓度盐溶液，分析时间短，灵敏度高、结果准确，可用于牛羊奶中氨基糖苷类药物残留量的准确检测。

岛津应用云

