

LCMS-8050 测定原料乳中的残留兽药

Nitin Shukla¹, Sujit Patil¹, Durvesh Sawant¹, AseemWagle¹, Jitendra Kelkar¹, Pratap Rasam¹
 1 Shimadzu Analytical (India) Pvt.Ltd, A/B Rushabh Chambers, Makwana Road, Marol, Andheri East, Mumbai-400059

特点描述

- ◆ 改良的 QuEChERS 和 SPE 与 LCMS-8050 超快速技术相结合，用于定量检测痕量兽药残留。
- ◆ 方法涵盖具有不同化学性质的药物种类
- ◆ 分析时间更短，更高通量分析。

简介

在奶牛养殖中使用兽药对于奶牛疾病的预防和治疗非常重要。然而，由于药物的滥用或停药期使用，兽药可能残留在生鲜乳中。因为牛奶是饮食中的重要食物，这可能使消费者产生健康问题，尤其是对于婴儿和儿童。因此，为了确保乳制品的安全，已加强对食品中兽药残留的安全监管。为了满足这些严格的监管要求，亟需一种高灵敏度的定量方法。本研究的目的是开发一种可涵盖各种不同兽药的高灵敏度分析方法。

基于这些要求，岛津使用 LCMS-8050 开发并验证了 4 种简单、灵敏、高通量的牛奶中多兽药残留的检测方法。（总共 69 种化合物）。用改良 QuEChERS^[1] 方法和 SPE 进行萃取。方法 I 涵盖 44 种化合物，方法 II 涵盖 15 种化合物，方法 III 涵盖 4 种化合物，方法 IV 涵盖 6 种化合物。不同法规涵盖的兽药数量见表 1。

表 1 各法规涵盖的兽药

合规性 / 法规	受监管的药物数量	本方法涵盖的药物数量
FSSAI	97	48
EU	82	30

材料和方法

对照品购自 Sigma。

牛奶样品购自当地市场，用于制备基质匹配的校准曲线及加标样品。



图 1 Shimadzu LCMS-8050

在表 2 给出的范围内制备校准曲线。

表 2 校准曲线范围

方法 I	方法 II	方法 III	方法 IV
1 至 50 ug/L	2 至 50 ug/L	1 至 50 ug/L	2 至 50 ug/L

通过外标法和 $1/C^2$ 的加权回归绘制标准曲线。各 LOQ 和 $2 \times LOQ$ 制备六份平行的加标样品，达到的 LOQ 低于 MRL（参见表 4）。

使用 Nexera X3 和 Shimadzu LCMS-8050（图 1，岛津制作所）定量测定牛奶样品中的兽药残留。

岛津用于兽药测定的 LC-MS/MS 方法包（第 2 版）和用于氨基糖苷类抗生素测定的 LC-MS/MS 方法包可实现快速仪器方法优化，从而提高通量。对于大多数化合物，方法中包括 1 个定量和 2 个定性 MRM 通道。

岛津的数据处理软件 LabSolutions Insight™ 用于数据处理，这有助于轻松评价验证参数。

样品制备

本研究使用了 4 种不同的萃取方法，其中采用了改良的 QuEChERS 方法和 SPE。方法 I：样品用乙腈去蛋白，加入无水 $MgSO_4$ 和 $NaCl$ 进行分离并离心。使用 C18 进行 dSPE 净化，用氮气吹干溶液后，用流动相复溶进样。

方法 II：样品加入磷酸氢二钠缓冲液后，用乙腈去蛋白。加入无水 Na_2SO_4 和 $NaCl$ 进行分离并离心。

使用 C18 进行 dSPE 净化。用氮气吹干溶液后，用流动相复溶进样。

方法 III：样品用三氯乙酸去蛋白并离心。上清液通过 HLB 柱，用甲醇洗脱并用流动相稀释后上样。

方法 IV：样品用离子对试剂稀释，过滤后上样。所有样品分别在表 3 所示的条件下进行分析。

分析条件

表 3 仪器配置和分析条件: LC-MS/MS

系统配置	
LC-MS/MS	: LCMS-8050
自动进样器	: Nexera X3 和 SIL -40C
色谱柱	: Shim-pack™ Velox C18, P/N 227-32010-03 (3.0 mm i.d. × 100 mm, 2.7 μm)
方法 I 和 II	
流速	: 0.3 mL/min
流动相 A	: 0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	: 甲醇
梯度程序	: 5%B (0.0 min 至 1.0 min) → 5-80%B (1.0 min 至 6.5 min) → 80-80%B (6.5 min 至 7.5 min) → 80-100%B (7.5 min 至 9.0 min) → 100-100%B (9.0 min 至 12.5 min) → 100-5%B (12.5 min 至 13.0 min)
运行时间	: 17 min
进样量	: 10 μL (与水同时注入)
柱温箱温度	: 40°C
方法 IV	
流速	: 0.3 mL/min
流动相 A	: 0.2% HFBA 水溶液
流动相 B	: 甲醇
梯度程序	: 10-95%B (0.0 min 至 6.0 min) → 95- 95%B (6.0 min 至 7.0 min) → 95- 10%B (7.0 min 至 8.0 min) → 10- 10%B (8.0 min 至 12.0 min)
运行时间	: 17 min
进样量	: 10 μL
柱温箱温度	: 40°C
方法 III	
流速	: 0.3 mL/min
流动相 A	: 0.1% 甲酸水溶液
流动相 B	: 甲醇
梯度程序	: 5%B (0.0 min 至 1.0 min) → 5-80%B (1.0 min 至 6.5 min) → 80-80%B (6.5 min 至 7.5 min) → 80-100%B (7.5 min 至 9.0 min) → 100-100%B (9.0 min 至 12.5 min) → 100-5%B (12.5 min 至 13.0 min)
运行时间	: 17 min
进样量	: 10 μL (与水同时注入)
柱温箱温度	: 40°C
MS	
离子化	: ESI
雾化气流量	: 3 L/min
加热气流量	: 8 L/min
干燥气流量	: 8 L/min
接口温度	: 250°C
DL 温度	: 200°C
加热模块温度	: 350°C

结果与讨论

我们根据 SANTE 指南研究了其专属性、线性、回收率和精密度等方法学参数^[2]。得到的结果如表 4 所示。FSSAI 和 EU 管制的化合物分别用 # 和 * 标记。

系统精密度和专属性

10 μg/L 的兽药混合溶剂标样，重复进样 6 次，计算方法峰面积和保留时间的 RSD% 来评价系统精密度。

所有化合物的峰面积的 RSD% 小于 20%，保留时间在 ±0.1 min 的容许限度内。通过将空白样品（试剂和基质）的响应值与报告水平进行比较，确定方法的专属性。试剂 / 基质空白样品的响应值在报告限度的 30% 以内，符合可接受标准。

校准曲线

我们在研究中使用的是基质匹配校准曲线。根据 SANTE 指南，所有校准点的准确度均在 80% 至 120% 之间。部分代表性化合物的线性曲线如图 2 所示。

回收率

通过分析 LOQ 和 2×LOQ（每个水平六份重复样品）的加标样品与基质匹配校准曲线的响应来评价回收率。大多数化合物的平均回收率在 70-120% 范围内。根据 SANTE 指南，所有化合物在 LOQ 水平下重现性良好。

精密度

对于精密度，进行了重复性和实验室内重现性研究。根据基质匹配标准曲线计算加标样品的浓度。

重复性 (RSDr) :

LOQ 和 2×LOQ 浓度水平的兽药标准品混样，重复进样 6 次考察重复性。各 LOQ 水平 6 次进样的重复性 RSD% 均 ≤ 20%。（见表 4）

重现性 (RSDR) :

在 LOQ 和 2×LOQ 浓度水平下，对六份不同的加标样品进行了回收率重现性实验。各 LOQ 水平加标样品的回收率 RSD% 均 ≤ 20%。（见表 4）

表 4 结果汇总

化合物名称	保留时间 (min)	定量离子通道 (m/z)	CE	检测方法	LOQ (mg/kg)	LOQ 下的回 收率 (%)	EU MRL (mg/kg)	FSAAI MRL (mg/kg)	精密度	
									RSDr% (n=6)	RSDr% (n=6)
* 阿苯达唑 -2- 氨基砜	4.29	240.00>132.95	-27	I	0.002	82.8	0.1	NA	7.67	3.52
* 阿苯达唑砜	6.26	298.00>158.90	-37	I	0.002	88.56	0.1	NA	4.53	6.39
* 阿苯达唑亚砜	6.04	282.20>239.90	-14	I	0.002	87.19	0.1	NA	12.33	6.82
** 氨苄西林	5.14	350.10>106.00	-22	I	0.002	52.7	0.004	0.01	14.4	16.57
# 氨丙啉	1.57	242.95>150.00	-12	I	0.002	75.56	NA	0.01	10.68	8.63
** 头孢噻吩	6.39	524.00>241.00	-16	I	0.005	80.84	0.1	0.1	15.43	6
# 氯羟吡啶	4.69	192.10>100.90	-26	I	0.005	101.13	NA	0.01	10.59	11.73
** 氯唑西林	6.01	435.50>98.90	-22	I	0.002	76.76	0.03	0.01	18.88	14.01
* 双氯西林	7.76	470.10>159.90	-16	I	0.002	88.56	0.03	NA	10.62	11.28
# 三氮唑	6.04	282.20>239.85	-14	I	0.002	86.98	NA	0.15	7.13	6.76
** 恩诺沙星	4.92	360.05>315.95	-19	I	0.005	41.37	0.1	0.01	19.1	5.39
* 红霉素 A	6.88	734.35>158.05	-30	I	0.002	70.27	0.04	NA	4.08	4.62
# 乙氧酰胺苯甲酯	6.83	237.90>135.95	-26	I	0.002	83.8	NA	0.01	15.35	6.58
** 非班太尔	8.05	447.10>198.90	-20	I	0.002	80.01	0.01	0.1	10.47	4.97
* 芬苯达唑砜	6.8	332.20>299.85	-22	I	0.002	78.51	0.01	0.1	7.21	6.7
** 氟尼辛	6.27	297.60>158.90	-35	I	0.002	102.42	0.04	0.01	8.57	13.9
# 常山酮	6.26	414.00>100.00	-22	I	0.002	62.54	NA	0.01	17	6.21
** 林可霉素	4.51	407.10>126.00	-30	I	0.002	51.21	0.15	0.15	6.88	3.6
# 美吡拉敏	5.63	286.30>120.95	-22	I	0.002	109.33	NA	0.01	9.45	23.91
甲硝唑	3.8	172.30>127.90	-16	I	0.002	88.67	NA	NA	8.12	4.56
* 莫仑太尔	5.11	221.10>77.00	-41	I	0.002	82.73	0.05	NA	11.65	13.62
# 尼美舒利	7.76	306.80>121.95	36	I	0.002	72.5	NA	0.01	12.2	8.52
** 硝磺酚腈	7.23	288.70>162.15	22	I	0.002	91.48	0.02	0.01	9.84	15.21
** 奥芬达唑	6.67	316.10>158.90	-32	I	0.002	79.66	0.01	0.1	5.56	3.89
** 氯羟柳胺	4.87	398.10>380.85	-12	I	0.005	44.48	0.01	0.01	19.43	19.88
苯基丁氮酮	1.52	309.10>152.80	-21	I	0.002	58.31	NA	NA	3.6	2.39
# 吡嗪酮	8.11	313.10>203.00	-17	I	0.002	79.14	NA	0.01	8.81	7.25
# 丙嗪	6.76	285.10>85.95	-19	I	0.002	46.9	NA	0.01	18.99	6.21
* 螺旋霉素 I	5.51	422.20>101.00	-18	I	0.002	75.75	0.2	NA	19.67	11.51
# 磺胺嘧啶	3.94	251.15>155.95	-15	I	0.002	96.04	NA	0.01	18.98	14.49
磺胺二甲氧嘧啶	4.97	279.00>185.90	-17	I	0.002	70.69	NA	NA	14.81	19.77
# 磺胺二甲嘧啶	1.54	215.15>137.20	-10	I	0.002	94.22	NA	0.025	7.26	6.77
磺胺胍	4.5	265.00>155.90	-16	I	0.002	57.35	NA	0.01	1.89	0.65
磺胺甲嘧啶	5.31	254.15>91.95	-26	I	0.005	75.03	NA	NA	12.81	18.56
磺胺甲恶唑	5.06	281.15>155.90	-17	I	0.002	72.35	NA	NA	16.13	19.87
# 磺胺甲氧嘧啶	4.16	255.80>155.90	-14	I	0.002	79.99	NA	NA	11.57	14.44
# 磺胺吡啶	6.18	311.20>155.95	-20	I	0.002	84.29	NA	NA	7.25	10.51
磺胺噻唑	4.3	250.15>107.95	-26	I	0.002	81.52	NA	0.01	19.91	16.78
# 泰妙菌素	6.72	494.25>192.00	-21	I	0.002	79.19	NA	0.01	5.95	1.82
* 替米考星 (异构体)	6	869.40>173.95	-45	I	0.002	76.68	0.05	NA	6.4	9.09
替硝唑	4.55	248.00>120.90	-16	I	0.002	93.27	NA	NA	19.42	9.21

表 4 结果汇总 (续)

化合物名称	保留时间 (min)	定量离子通道 (m/z)	CE	检测方法	LOQ (mg/kg)	LOQ 下的回 收率 (%)	EU MRL (mg/kg)	FSAAI MRL (mg/kg)	精密度	
									RSDr% (n=6)	RSDr% (n=6)
*# 甲氧苄啉	4.51	290.95>230.00	-24	I	0.002	82.86	0.05	0.01	5.71	3.9
* 泰乐菌素	6.82	916.50>174.00	-39	I	0.002	81.73	0.05	NA	12.67	11.62
# 甲苯噻嗪	5.11	220.90>89.95	-22	I	0.002	83.69	NA	0.01	7.79	2.31
*# 金霉素	5.95	479.10>443.85	-21	III	0.02	58.06	0.1	0.1	8.84	14.37
强力霉素	6.56	445.10>427.90	-19	III	0.02	56.67			9.26	15.74
*# 土霉素	5.21	461.10>425.95	-20	III	0.02	95.17	0.1	0.1	8.6	16
*# 四环素	6.45	445.05>427.90	-20	III	0.02	51	0.1	0.1	6.38	18
*# 阿苯达唑	7.67	266.20>233.90	-19	II	0.005	64.47	0.1	0.1	7.76	7.51
# 布帕伐醌	11.21	325.00>186.00	33	II	0.01	37.63	NA	0.01	8.03	5.23
# 布舍瑞林	6.51	620.50>592.20	-16	II	0.005	63.32	NA	0.01	18.30	10.03
# 卡前列素氨丁三醇	8.45	367.00>323.15	20	II	0.01	66.90	NA	0.01	18.72	17.00
# 氯前列醇钠	8.25	422.90>126.90	27	II	0.01	71.02	NA	0.01	14.66	9.62
# 乙胺嗪	1.60	200.00>99.95	-16	II	0.01	99.04	NA	0.01	11.91	7.58
# 伊维菌素	11.29	892.40>307.00	-22	II	0.005	101.80	NA	0.01	19.97	11.94
# 马杜霉素	11.17	915.20>613.25	25	II	0.005	52.80	NA	0.01	19.81	17.36
*# 美洛昔康	7.99	352.20>115.05	-22	II	0.01	71.11	0.015	0.01	6.26	8.19
# 氯硝柳胺	10.31	324.70>171.00	26	II	0.005	58.84	NA	0.01	14.26	12.90
# 帕苯达唑	7.53	247.90>216.00	-21	II	0.005	62.11	NA	0.01	8.02	7.02
# 丙泊酚	1.57	179.00>101.00	-10	II	0.01	43.35	NA	0.01	5.37	3.65
# 盐霉素	11.30	773.30>431.05	-52	II	0.005	66.81	NA	0.01	14.54	16.03
# 磺胺氯吡嗪	5.41	284.80>155.95	-15	II	0.005	61.55	NA	0.01	7.18	10.79
# 磺胺喹恶啉	6.48	301.00>155.85	-16	II	0.005	69.10	NA	0.01	14.37	10.57
# 安普霉素	4.10	540.00>217.00	-28	IV	0.01	107.27	NA	0.01	9.57	6.81
*# 二氢链霉素	4.03	584.00>263.05	-32	IV	0.01	103.65	0.2	0.02	6.09	4.76
* 庆大霉素	4.14	464.00>322.10	-16	IV	0.01	87.50	0.1	NA	2.79	11.65
* 卡那霉素	4.06	485.00>163.00	-26	IV	0.01	105.21	0.15	NA	2.99	4.05
*# 新霉素	4.14	615.00>163.00	-36	IV	0.02	75.14	1.5	1.5	16.26	13.53
*# 大观霉素	3.94	351.00>98.30	-20	IV	0.01	116.11	0.2	0.2	3.59	5.68

注: * 为 EU 管制化合物, # 为 FSSAI 管制化合物

在分析的所有化合物中, 48 种化合物的平均回收率在 70-120% 之间, 20 种化合物的平均回收率在 35-70% 之间。根据 SANTE 指南, 所有化合物回收率在 LOQ 水平下的 RSD% 均 ≤20%, 重现性良好 (参见表 4)。

该方法采用 LC-MS/MS 成功实现了 40 种化合物的 LOQ ≤2 μg/kg、14 种化合物的 LOQ ≤5 μg/kg、11 种化合物的 LOQ ≤10 μg/kg 和 5 种化合物的 LOQ ≤20 μg/kg (参见表 4)。图 2 显示了几种代表性化合物在其 LOQ 水平下的色谱图。

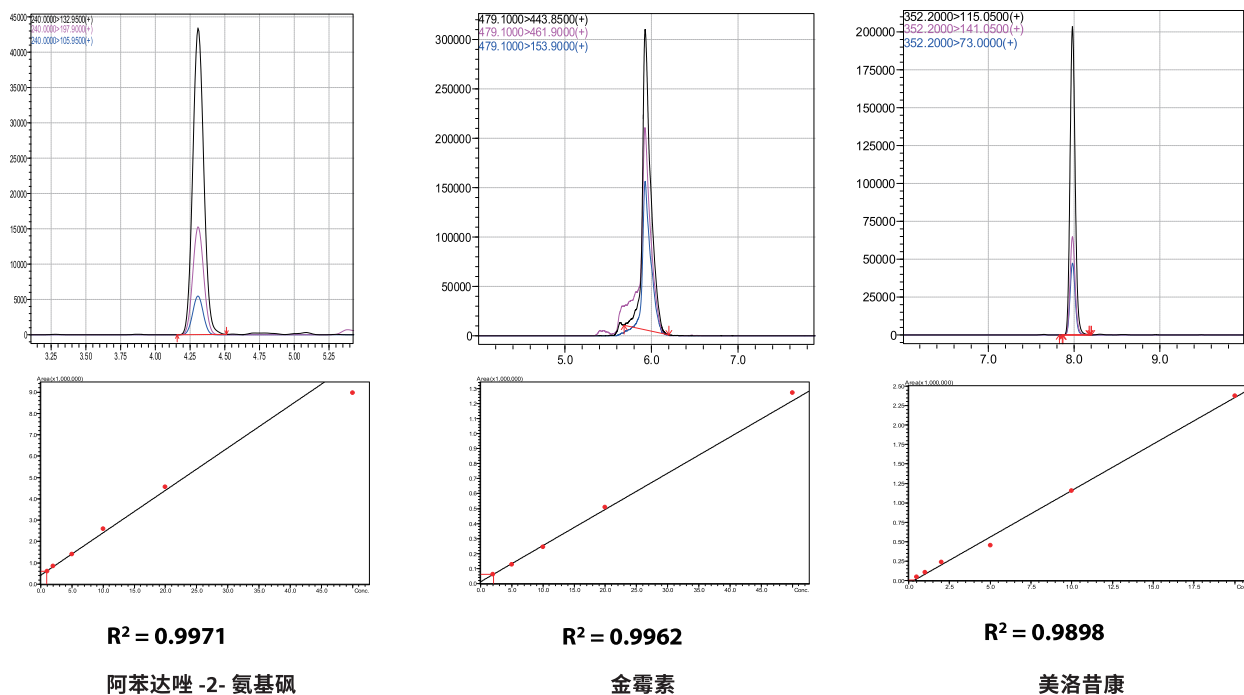


图 2 LOQ 水平下的代表性色谱图和线性曲线

结论

使用 LC-MS/MS 开发了一种简单、灵敏、快速的方法定量测定牛奶中的兽药残留。

基于 Shimadzu LC-MS/MS 开发的方法被证明具有高灵敏度及较好的重现性，大多数化合物在痕量水平下显示出良好的 RSD_p 和 RSD_R (根据 SANTE 指南 REF2)。

该方法稳定、可靠，能够根据 FSSAI 法规用于在实验室中检测牛奶样品。

参考文献

- 1.M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenck, Fast and Easy Multiresidue Method Employing acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, J. AOAC Int., 86; 412–431, 2003.
- 2.Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. SANTE/12682/2019.

岛津应用云



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

※本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
※本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2022年05月