

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定鸡肉中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量

LCMSMS-589

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用系统同时测定鸡肉中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量的方法。泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式进行电离，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用外标法定量，泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素在各自线性范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度分别在 93.7% ~ 104.0% 和 91.2% ~ 110.0% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词： 三重四极杆质谱 鸡肉 泰万菌素 3-乙酰泰乐菌素

泰万菌素 (Tylvalosin) 是一种新型大环内酯类畜禽专用的抗生素。它能与敏感细菌的核蛋白体 50S 亚基结合，通过对转肽作用和对 mRNA 位移的阻断，抑制肽链的合成和延长，影响细菌蛋白质的合成从而抑制细菌的繁殖，其在中国已被注册批准用于治疗猪、鸡支原体感染和猪赤痢螺旋体以及其他敏感细菌的感染。在实际生产中，由于对用量、使用次数和休药期认识不足或忽视，容易导致泰万菌素在畜禽可食性下游产品中残留。泰万菌素经过代谢后以原药和 3-乙酰泰乐菌素 (3-O-acetyltylosin) 的形式残留在畜禽体内。我国《GB 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最

大残留限量》规定：泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素在猪和家禽肌肉、皮脂、肝和肾中的最大残留限量 (MRL) 之和不得超过 50 µg/kg。

近年来，高效液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 法由于具有检测灵敏度高、结果选择性好的特点，已成为食品类复杂基质中痕量物质检测的主流方法。本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，建立了同时测定鸡肉中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量的方法。该方法样品前处理过程简单，且准确度高，可用于鸡肉中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量的快速测定，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

检测器：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 2 µm) (P/N: 227-30001-04, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液； B 相 - 乙腈

流速：0.35 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 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.10	Pumps	Pump B Conc.	20
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式	脱溶剂管温度: 200°C
离子源接口电压: 4.0 kV	加热模块温度: 400°C
雾化气: 氮气 3.0 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 10 L/min	MRM 参数: 见表 2
碰撞气: 氩气	驻留时间: 100 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
泰万菌素	Tylvalosin	63409-12-1	1042.6>109.1*	-16.0	-55.0	-26.0
			1042.6>174.1	-16.0	-46.0	-18.0
3-乙酰泰乐菌素	3-Acetyltylosin	63409-10-9	958.5>174.1*	-18.0	-43.0	-30.0
			958.5>772.3	-30.0	-32.0	-14.0

注: * 表示定量离子对

1.3 样品前处理方法

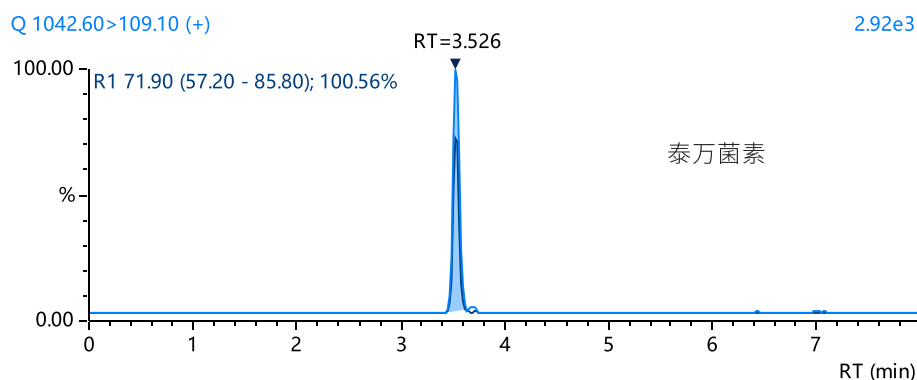
取试样 2 g (准确至 ± 0.02 g) 于 50 mL 离心管, 加水 5.0 mL、乙腈 5.0 mL, 涡旋混匀。加入正己烷 10 mL, 振荡 5 min, 再加入无水硫酸镁与氯化钠各 2 g, 振荡 5 min, 8000 r/min 离心 5 min, 移取中间乙腈层清液于另一离心管, 备用。准确移取备用液、0.02 mol/L 酒石酸溶液各 0.5 mL, 再加入酸性氧化铝 0.2 g, 涡旋混匀 30 秒, 10000 r/min 离心 5 min, 取上层清液, 过 0.22 μ m 微孔滤膜, 置于棕色进样瓶, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.4 基质标准曲线的制备

取空白试样 2 g (准确至 ± 0.02 g) 于 50 mL 离心管, 按 1.4 样品前处理方法操作后获得空白试样的基质溶液。精密量取标准工作液适量, 用空白试样基质溶液配制成泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素浓度为分别 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 ng/mL 的系列标准工作液, 上机测定。以定量特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图



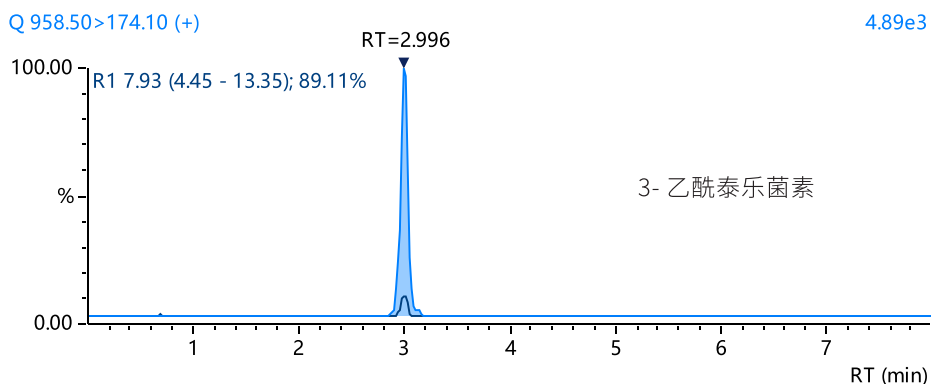


图1 泰万菌素和3-乙酰泰乐菌素(2 ng/mL)的MRM图谱

2.2 线性范围与检出限

将不同浓度的泰万菌素及3-乙酰泰乐菌素基质匹配标准工作液，按照1.2中的分析条件进行测定，使用外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图2所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表3。

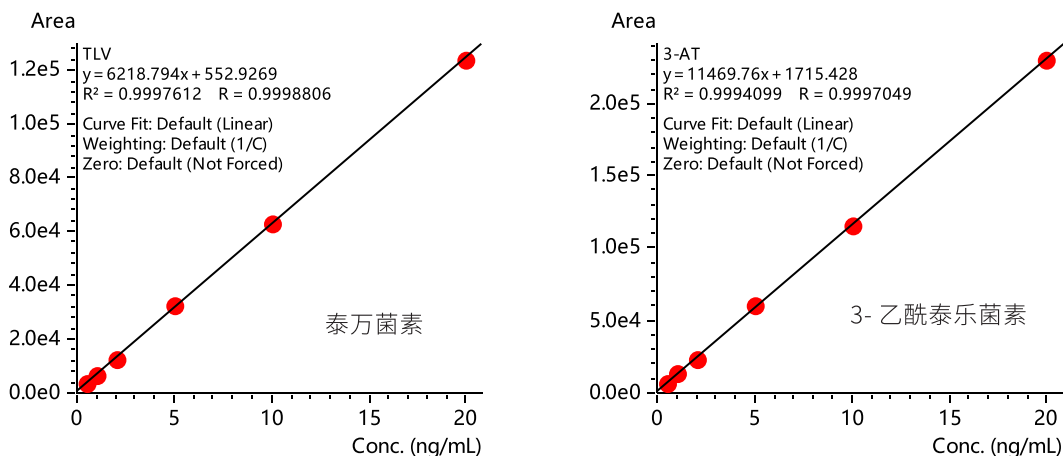


图2 泰万菌素和3-乙酰泰乐菌素的校准曲线

表3 标准曲线与检出限信息

化合物名称	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
泰万菌素	$Y=6218.8X+552.9$	0.9998	0.5~20	93.7~104.0	0.17
3-乙酰泰乐菌素	$Y=11469.8X+1715.4$	0.9997	0.5~20	91.2~110.0	0.17

2.3 精密度实验

对不同浓度的泰万菌素和3-乙酰泰乐菌素混合标准工作液连续测定6次，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。结果显示：不同浓度样品溶液中泰万菌素和3-乙酰泰乐菌素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在0.08%~0.19%和0.94%~3.29%之间，显示仪器精密度良好。

表4 保留时间(R. T.)和峰面积(Aera)重复性结果(n=6)

名称	Conc.(ng/mL)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
泰万菌素	2.5	0.19	3.05
	5	0.08	1.38
	10	0.10	1.22
3-乙酰泰乐菌素	2.5	0.19	3.29
	5	0.09	0.94
	10	0.09	2.62

2.4 加标回收率实验

准确称取 2 g 鸡肉样品，加入少量泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素的标准储备液，使得泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素加标浓度分别为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。加标样品经过 1.3 样品前处理操作后，测定泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素的加标回收率，加标回收率在 60% ~ 110% 之间，结果见表 5。由结果可知，该方法简便，且准确率高。

表 5 泰万菌素和 3-乙酰泰乐菌素的加标回收率结果 (n=3)

名称	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)
泰万菌素	5	103.2
	25	73.8
	50	79.6
3-乙酰泰乐菌素	5	90.4
	25	103.9
	50	101.3

■ 结论

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-8045 联用同时测定鸡肉中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量的方法。使用外标法定量，泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素在各自线性范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度分别在 93.7% ~ 104.0% 和 91.2% ~ 110.0% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。方法学结果表明，本方法操作简便，且准确度高，可用于鸡肉中泰万菌素及 3-乙酰泰乐菌素残留量的快速测定。

岛津应用云

