

LCMS-8045 测定饲料中的盐酸沃尼妙林和泰妙菌素

LCMSMS-512

摘要： 本文建立了使用岛津液相色谱串联质谱 LCMS-8045 测定饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的方法。饲料用甲醇提取，经混合型阳离子固相萃取小柱净化后，用超高效液相色谱 LC-40 进行分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 进行定性和定量分析。盐酸沃尼妙林和泰妙菌素在 2 $\mu\text{g/L}$ ~500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数 r 大于 0.9994；对 2.0、20 和 200 $\mu\text{g/L}$ 低中高不同浓度的标准工作液连续测定 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18%~0.26% 和 1.11%~2.86% 之间；添加浓度为 80 和 400 $\mu\text{g/kg}$ 饲料样品（上机浓度为 2 和 10 ng/mL ），回收率在 73.4~88.5% 之间，该方法可适用于饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的测定。

关键词： 饲料 盐酸沃尼妙林 泰妙菌素 三重四极杆质谱

沃尼妙林和泰妙菌素是截短侧耳素类的衍生物，属于双萜类半合成抗生素，主要用于防治猪、牛、羊及家禽的支原体病和革兰氏阳性菌感染，对支原体和螺旋体属有特效，被广泛使用在畜禽和水产养殖业以及饲料添加剂中。但动物长期食用此类抗生素体内会产生蓄积，而后该抗生素通过食物链进入人体，对人类健康构成严重威胁。我国 2020 年 4 月 1 日实施的《GB 31650 食品中兽药最大残留限量》规定了不同动物种类及靶组织中泰妙菌素的最大残留限量，如猪、兔的肌肉为 100 $\mu\text{g/kg}$ ，肝脏为 500 $\mu\text{g/kg}$ 。由于饲料添加

是沃尼妙林和泰妙菌素主要的用药方式，饲料中此类药物的检测有助于对药物残留进行控制。

沃尼妙林和泰妙菌素为二萜类化合物，紫外吸收弱，如采用高效液相色谱只能在远紫外检测，而饲料基质复杂，在远紫外区杂质干扰多，难以满足残留分析要求。本文参照农业农村部公告第 197 号 -2-2019，建立了液相色谱串联质谱检测饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的方法，该方法前处理简单、灵敏度高，分析时间短，可用于饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的快速检测。

■ 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-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

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (50 mm \times 2.1 mm I.D., 1.9 μm , 岛津 (上海) 实验器材有限公司, , P/N: 227-30048-01)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸乙腈

流速：0.50 mL/min

进样体积：1 μL

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	80
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.80	Pumps	Pump B Conc.	90
4.00	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式	DL 管温度: 250 °C
离子源接口电压: 0.5 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: 72 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
沃尼妙林	Valnemulin	101312-92-9	565.4	263.1*	-20.0	-17.0	-30.0
				164.1	-20.0	-32.0	-17.0
泰妙菌素	Tiamulin	55297-95-5	494.3	192.1*	-18.0	-22.0	-20.0
				119.0	-18.0	-40.0	-20.0

* 表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制及样品前处理

标准储备溶液 (1000 µg/mL) :

依次称取盐酸沃尼妙林和泰妙菌素各 0.05 g, 用乙腈溶解并定容至 50 mL 棕色容量瓶中, 混匀, -20°C 以下保存。

混合标准溶液 (250 µg/mL) :

准确移取 1000 µg/mL 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标准储备溶液各 25 mL 于 100 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈稀释并定容至刻度, 混匀。此溶液临用现配。

标准系列工作溶液:

准确称取适量的混合标准溶液, 用 0.1% 甲酸乙腈水溶液 (甲酸: 乙腈: 水 = 0.1: 20: 80, v/v/v) 稀释成 2、10、20、100、200 和 500 µg/L 不同浓度的标准工作液, 此溶液临用现配。

饲料前处理:

称取饲料 5 g (精确至 0.0001 g), 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 于 5000 r/min 离心 10 min, 收集上清液于 100 mL 棕色容量瓶中, 并向残渣中加入 20 mL 甲醇, 重复提取 2 次。合并上清液于容量瓶中, 并用甲醇定容至刻度, 摇匀, 备用。

依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水, 5 mL 2% 甲酸溶液活化 MCX 固相萃取小柱 (150 mg/6 mL)。准确移取 1 mL 提取液至离心管中, 加入 1 mL 0.1% 甲酸溶液混匀后过柱, 用 2 mL 0.1% 甲酸溶液洗涤离心管, 洗涤液一并过柱。依次用 5 mL 5% 甲酸溶液、5 mL 甲醇淋洗固相萃取小柱, 抽干淋洗液, 用 5 mL 5% 氨水 - 甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液于 50°C 氮气吹干, 准确加入 2 mL 0.1% 甲酸 - 乙腈水溶液溶解残渣, 过 0.22 µm 滤膜后上机测定。

结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

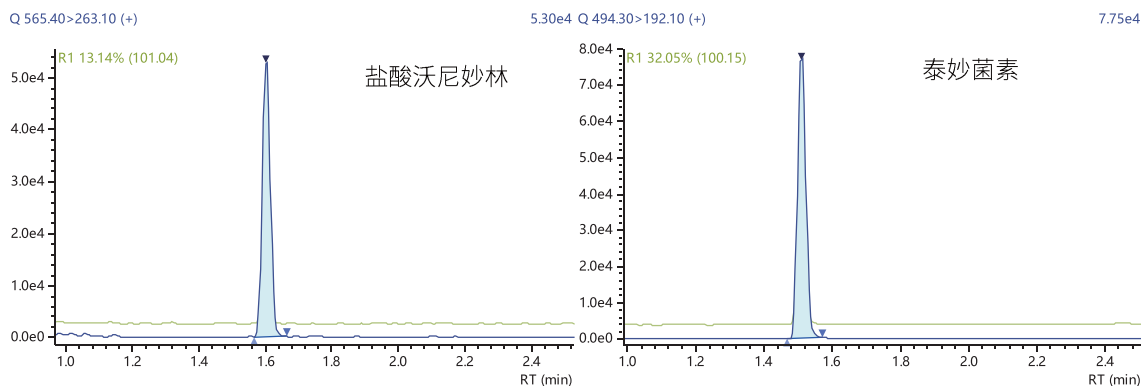


图 1 2 µg/L 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标准样品的色谱图

2.2 线性关系

将 2、10、20、100、200 和 500 µg/L 不同浓度的标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，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。

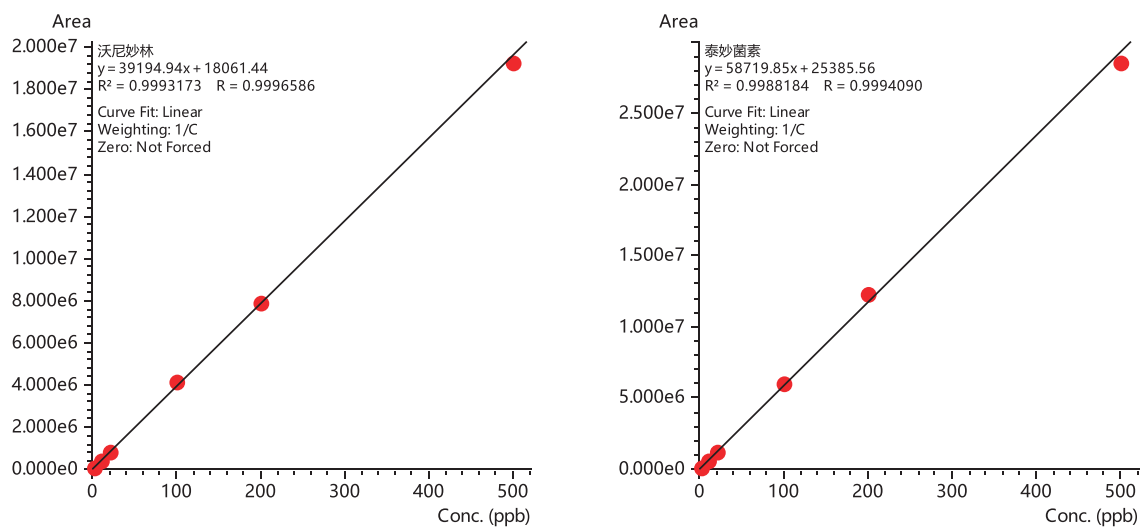


图 2 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

化合物	校准曲线	R	线性范围 (µg/L)	准确度	定量限 (µg/L)	检出限 (µg/L)
盐酸沃尼妙林	$Y=39194.94X+18061.44$	0.9997	2.0~500	91.8-106.2%	0.06	0.02
泰妙菌素	$Y=58719.85X+25385.56$	0.9994	2.0~500	91.5-105.3%	0.04	0.01

2.3 灵敏度实验

图 3 为 0.1 µg/L 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的 MRM 色谱图。根据检出限 MDL = 3.3 S/N，定量限 LOQ=10 S/N 计算检出限和定量限，结果见表 3。

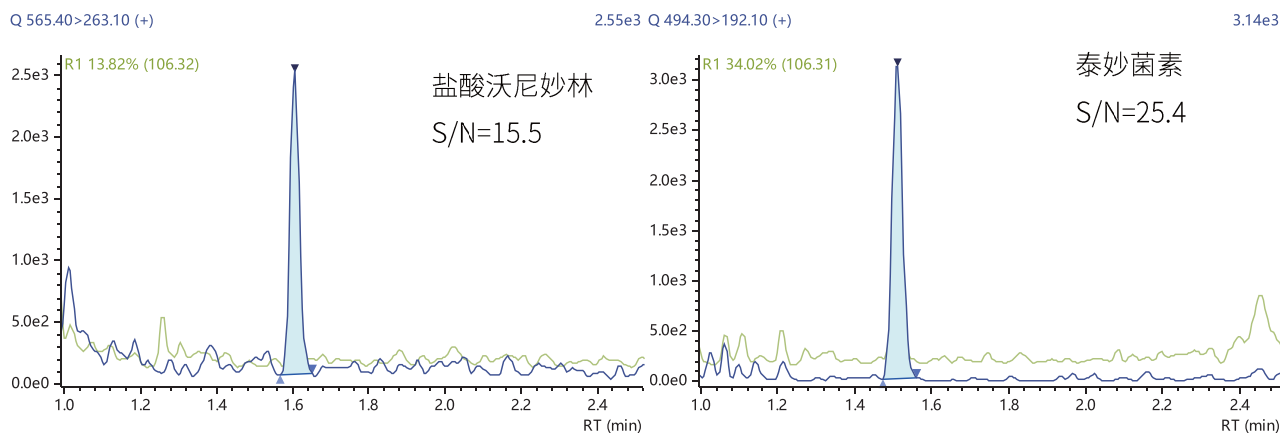


图3 0.1 µg/L 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标样

2.4 精密度试验

对 2 µg/L、20 µg/L 和 200 µg/L 三个浓度标准工作液连续测定 6 次，考察仪器精密度。结果显示：不同浓度盐酸沃尼妙林和泰妙菌素保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18%~0.26% 和 1.11%~2.86% 之间，仪器精密度良好。

表 4 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

	2 µg/L		20 µg/L		200 µg/L	
	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
盐酸沃尼妙林	0.18	2.86	0.19	2.86	0.25	1.40
泰妙菌素	0.20	1.67	0.20	1.22	0.26	1.11

2.5 基质加标实验

取空白饲料 5 g，加入少量盐酸沃尼妙林和泰妙菌素标准工作液，使加标浓度为 80 和 400 µg/kg（上机浓度为 2 和 10 ng/mL），样品经提取与净化后，按照 1.2 中的分析条件测定盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的加标回收率，回收率在 73.4~88.5% 之间。图 4 为空白饲料和加标饲料（上机浓度为 2 ng/mL）的 MRM 色谱叠加图。

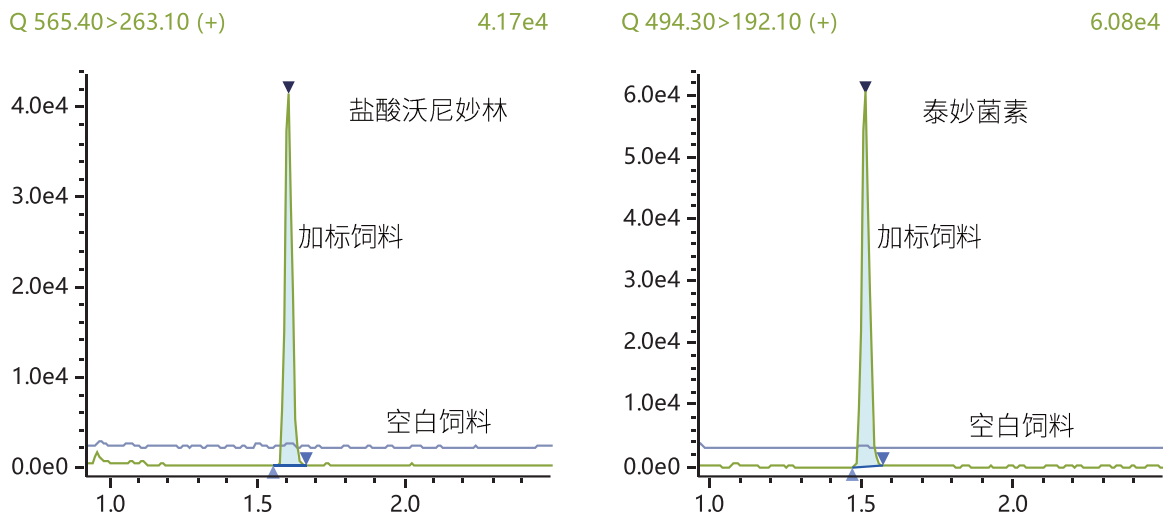


图 4 空白饲料和加标饲料样品（上机浓度为 2 ng/mL）MRM 色谱叠加图

表 5 盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的回收率 (%) 及 RSD 结果 (n=3)

	平均回收率 (RSD)	
	80 µg/kg	400 µg/kg
盐酸沃尼妙林	73.4 (5.69)	84.2 (1.74)
泰妙菌素	75.8 (2.82)	88.5 (2.60)

■ 结论

建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 测定饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的方法。饲料样品经提取和净化后, 用超高效液相色谱 LC-40 进行分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 进行定性和定量分析。沃尼妙林和泰妙菌素在 2 µg/L~500 µg/L 浓度范围内线性良好; 对不同浓度的标准工作液连续测定 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.18%~0.26% 和 1.11%~2.86% 之间。饲料加标样品 (上机浓度为 2 和 10 ng/mL) 的回收率在 73.4~88.5% 之间。本方法操作简单, 可用于饲料中盐酸沃尼妙林和泰妙菌素的快速高灵敏度检测。

岛津应用云

