

LC-MS/MS 法测定鸡蛋中阿维菌素类药物残留量

LCMSMS-969

摘要：使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用系统建立了鸡蛋中阿维菌素类药物残留量的分析方法。鸡蛋样品经 1% 甲酸乙腈溶液提取，HLB 固相萃取小柱净化，使用 C18 色谱柱进行分离。采用正离子模式进行电离，通过多反应监测模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用外标法定量，阿维菌素 B1a、22, 23- 二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素 B1a 和莫昔克丁在 0.1 µg/L ~ 100 µg/L 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.999 以上，各校准点准确度在 89.9%~109.9% 之间，且精密度和不同浓度水平的加标回收率实验结果良好。

关键词：三重四极杆质谱 鸡蛋 阿维菌素类药物

技术特点：

- ❖ 一针进样完成鸡蛋中 5 种阿维菌素类药物同时定量分析；
- ❖ 阿维菌素类药物使用 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+H]^+$ 加合离子，相比 $[M+Na]^+$ 离子具有更高的稳定性。

阿维菌素 (avermectins, AVMs) 是带双糖支链的大环内酯类化合物，常见的阿维菌素类药物有阿维菌素 B1a、22, 23- 二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素 B1a 和莫昔克丁等。由于阿维菌素类药物具有优异的驱虫性和较高的安全性，被认为是目前应用最优良的广谱、高效的抗寄生虫药。阿维菌素类药物具有神经毒性和发育毒性，如果在动物源性食品中残留，会对食品安全构成威胁。

目前，阿维菌素类药物的检测方法主要有免疫亲和色谱法、酶联免疫吸附法、高效液相色谱法和高效液相色谱 - 串联质谱法等。免疫亲和色谱法需要选择合适的抗体固定方式，试验成本较昂贵；酶联

免疫吸附法的结果重复性较差；高效液相色谱技术是检测阿维菌素类药物常用的分析技术，其中液相色谱紫外检测法 (HPLC-UV) 灵敏度较低，液相色谱荧光检测法 (HPLC-FLD) 具有良好的检测灵敏度和选择性，但样品处理比较复杂。

液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS) 检测阿维菌素类药物具有选择性好、灵敏度高的优势，且无需对样品进行衍生化处理。本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，通过优化分析条件，建立了鸡蛋中 5 种阿维菌素类药物的测定方法。该方法可在 9 min 内完成多种阿维菌素类药物的定性定量分析，可供相关检测人员参考使用。

■ 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 _{SR}
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. 5.113		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 µm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30048-02)

流动相：A相 - 含 10 mM 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液；B相 - 0.1% 甲酸乙腈溶液
 流速：0.40 mL/min
 进样体积：5 μ L
 柱温：40°C
 洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为 50%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	50
4.00	泵	B.Conc	90
8.00	泵	B.Conc	90
8.50	泵	B.Conc	50
9.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI+	接口温度：300°C
接口电压：4.0 kV	DL 温度：250°C
雾化气流速：氮气 3.0 L/min	加热块温度：400°C
加热气流速：空气 10 L/min	驻留时间：30 ms
干燥气流速：氮气 10 L/min	扫描模式：多反应监测 (MRM)
碰撞气：氮气 230 kPa	MRM 参数：见表 2

1.3 样品前处理方法

称取试样 5.0 g，于 50 mL 离心管中，加入 5 mL 纯水并涡旋混合 30 s 后，加入 10 mL 1% 甲酸乙腈溶液，振荡提取 15 min 后，加入盐析包，剧烈涡旋混合 1 min 后，4000 r/min 离心 10 min，取上清液作为备用液。取 2 mL 备用液过 HLB (3 mL/150 mg) 固相萃取小柱，用 1 mL 乙腈淋洗固相萃取小柱，收集流出液和淋洗液，于 40°C 下氮吹至近干，加入 50% 乙腈溶液 1 mL 复溶，涡旋混匀，经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后，供液相色谱 - 串联质谱测定。

表 2 阿维菌素类药物的 MRM 采集参数

No.	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais (V)	CE(V)	Q3 Pre Bais (V)
1	乙酰氨基阿维菌素 B1a	914.50	186.10*	-34	-21	-20
			330.00	-14	-16	-18
2	阿维菌素 B1a	890.50	305.15*	-32	-29	-16
			567.30	-32	-13	-30
3	多拉菌素	916.70	331.10*	-22	-27	-24
			593.25	-34	-15	-24
4	莫昔克丁	640.40	528.25*	-24	-8	-30
			498.20	-12	-13	-16
5	22, 23- 二氢阿维菌素 B1a	892.60	569.25*	-20	-13	-18
			307.15	-14	-26	-12

注：* 表示定量离子对

1.4 校准曲线的制备

精密量取混合标准工作液适量，使用经过提取净化后的鸡蛋空白样品溶液稀释配制成阿维菌素类药物浓度为 0.1 µg/L、0.5 µg/L、1 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 的系列基质匹配标准溶液，供液相色谱 - 串联质谱测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

通过优化液相色谱分离条件，阿维菌素 B1a、22, 23- 二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素 B1a 和莫昔克丁有较好地分离。5 种阿维菌素类药物的 MRM 色谱图见图 1。

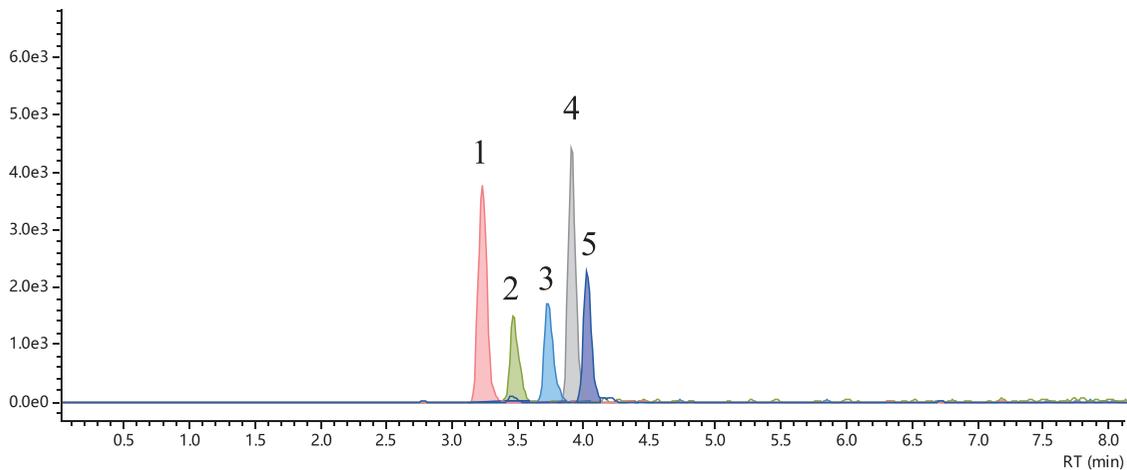
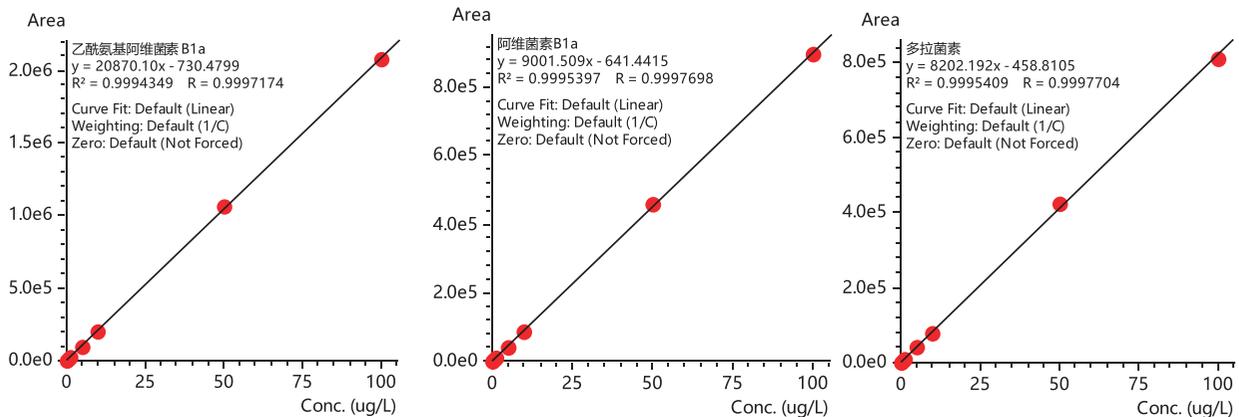


图 1 阿维菌素类药物 (1 µg/L) 的 MRM 色谱图

(1: 乙酰氨基阿维菌素 B1a; 2: 阿维菌素 B1a; 3: 多拉菌素; 4: 莫昔克丁; 5: 22, 23- 二氢阿维菌素 B1a)

2.2 线性范围

将浓度分别为 0.1 µg/L、0.5 µg/L、1 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 不同浓度阿维菌素类药物的混合标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量，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。



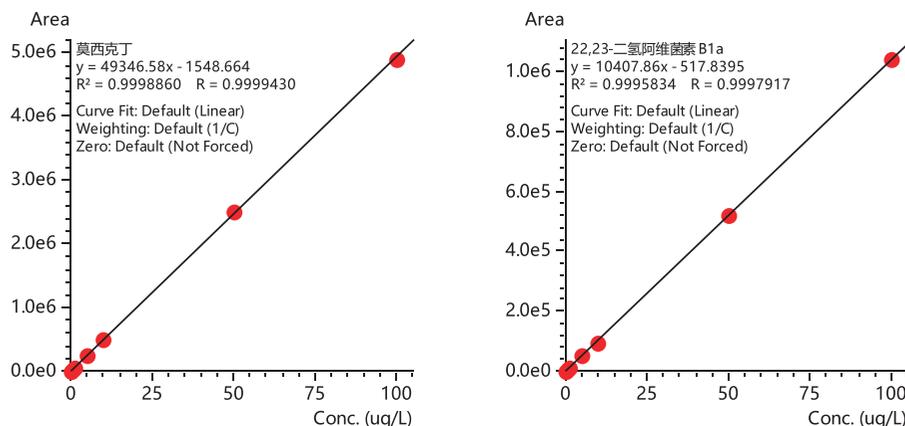


图 2 阿维菌素类药物校准曲线

表 3 标准曲线信息

No.	化合物名称	校准曲线	相关系数 R	准确度 (%)	检出限 (µg/kg)
1	乙酰氨基阿维菌素 B1a	$Y = (20870.1)X + (-730.480)$	0.9997	92.7~116.6	0.2
2	阿维菌素 B1a	$Y = (9001.51)X + (-641.442)$	0.9997	92.4~119.4	0.2
3	多拉菌素	$Y = (8202.19)X + (-458.810)$	0.9997	91.0~113.7	0.2
4	莫昔克丁	$Y = (49346.6)X + (-1548.66)$	0.9999	91.9~111.6	0.2
5	22, 23- 二氢阿维菌素 B1a	$Y = (10407.9)X + (-517.839)$	0.9997	92.2~105.4	0.2

2.3 精密度实验

对 1 µg/L、5 µg/L 和 10 µg/L 不同浓度阿维菌素类药物混合标准工作溶液连续测定 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：阿维菌素类药物的保留时间和峰面积相对标准偏差并不高于 0.16% 和 7.73%，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	化合物	1 µg/L		5 µg/L		10 µg/L	
		R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%
1	乙酰氨基阿维菌素 B1a	0.13	5.69	0.15	4.81	0.09	2.00
2	阿维菌素 B1a	0.14	5.97	0.16	2.00	0.13	3.47
3	多拉菌素	0.16	7.73	0.09	2.23	0.10	3.86
4	莫昔克丁	0.06	2.62	0.10	2.36	0.09	1.70
5	22, 23- 二氢阿维菌素 B1a	0.08	2.99	0.10	4.40	0.09	2.88

2.4 加标回收率实验

取空白鸡蛋样品，加入适量阿维菌素类药物的混合标准储备溶液，使鸡蛋试样中添加浓度为分别为 4 µg/kg 和 40 µg/kg，平行做 3 份。按照 1.3 样品前处理方法完成处理后上机分析，测定阿维菌素类药物的添加回收率，各化合物的平均加标回收率结果为 89.9% ~ 109.9% 之间（见表 5）。

表 5 阿维菌素类药物加标回收率结果 (n=3)

No.	化合物名称	添加浓度水平	
		4 µg/kg	40 µg/kg
1	乙酰氨基阿维菌素 B1a	108.4%	109.5%
2	阿维菌素 B1a	109.9%	107.5%
3	多拉菌素	100.3%	98.6%
4	莫昔克丁	105.1%	103.2%
5	22, 23- 二氢阿维菌素 B1a	89.9%	93.1%

■ 结论

本文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 联用系统建立了测定鸡蛋中阿维菌素类药物残留量的分析方法。阿维菌素 B1a、22, 23- 二氢阿维菌素 B1a、多拉菌素、乙酰氨基阿维菌素 B1a 和莫昔克丁药物可在 9 min 内完成分析周期。该方法灵敏度高、精密度好、结果准确，且杂质干扰少，可为禽蛋中阿维菌素类药物的监管提供有效的技术手段。

岛津应用云

