

# 超高效液相色谱串联质谱检测牛奶中林可胺类和大环内酯类抗生素残留

## LCMSMS-330

**摘要：**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-8050 联用测定牛奶中林可胺类和大环内酯类抗生素 (螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素和泰乐菌素) 残留的方法。采用外标法快速、准确地测定 6 种抗生素, 其线性良好, 相关系数均大于 0.9995; 配制 0.5、1 和 5  $\mu\text{g/L}$  的混合标准溶液进行精密度测试, 实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.14% 和 0.42~5.35% 之间, 仪器精密度良好; 6 种物质的检出限在 0.0003~0.0064  $\mu\text{g/L}$  之间, 定量限 0.0008~0.0083  $\mu\text{g/L}$  之间; 样品加标回收率在 74.3~113.8% 间。

**关键词：**牛奶大环内酯类林可霉素类超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪

吡利霉素属于最新研制的林可霉素类抗菌药物, 常作为奶牛乳房注入剂使用。临床试验表明该药对金黄色葡萄球菌、无乳球菌、停乳链球菌、乳房链球菌等致的临床及亚临床型乳腺炎效果明显。大环内酯类药物具有抗革兰氏阳性菌和抗支原体活性, 兽医临床常见的有红霉素、泰乐菌素、螺旋霉素、替米考星、竹桃霉素等。动物源食品中林可胺类药物残留可引起肾功能障碍和革兰氏阳性菌的耐药性增加; 大环内酯类药物残留可引起过敏反应和导致携带耐药因子的菌株扩散。因此, 欧盟和我国都对动物源食品中这两类药物的最大残留限量做了严格规定。美国和欧盟规定吡利霉素在上市牛奶中的最大残留限量 (MRL) 为 100  $\mu\text{g/L}$ 。欧盟规定牛奶中泰乐

菌素、替米卡星的最高残留限量为 50 $\mu\text{g/kg}$ , 红霉素为 40 $\mu\text{g/kg}$ 。

本文参考国标《GB/T 22988-2008 牛奶和奶粉中螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素、泰乐菌素残留量的测定液相色谱-串联质谱法》, 用乙腈提取牛奶中的目标物, HLB 固相萃取柱净化, 建立了超高效液相色谱串联质谱检测牛奶中林可胺类和大环内酯类抗生素残留量的方法, 方法的检出限小于为 0.006  $\mu\text{g/L}$ , 远远低于, 国内外有关法规的要求, 可为牛奶中林可胺类及大环内酯类药物残留的监督检验和国内的残留监控提供技术支持。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2(输液泵), DGU-20A5R 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8050 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Inertsil Ph-3 (2.1 mm I.D. $\times$ 150 mm L., 3  $\mu\text{m}$ )

流动相: A-0.1% 甲酸水溶液; B- 甲醇

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积: 10  $\mu\text{L}$

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
8.00	Pumps	Pump B Conc.	80
8.01	Pumps	Pump B Conc	15
12.00	Controller	Stop	

## 质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI(+)

雾化气: 氮气 2.0 L/min

加热气: 氮气 10 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 350°C

脱溶剂管温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

编号	名称	英文名	CAS 号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)	接口电压 (kV)
1	螺旋霉素	Spiramycin	8025-81-8	843.50	174.20*	-28.0	-38.0	-17.0	1.0
					540.30	-28.0	-30.0	-38.0	
2	吡利霉素	Pirlimycin	79548-73-5	411.20	112.10*	-14.0	-27.0	-20.0	1.5
					363.20	-14.0	-18.0	-25.0	
3	竹桃霉素	Oleandomycin	7060-74-4	688.50	158.20*	-22.0	-29.0	-29.0	1.0
					544.40	-22.0	-17.0	-38.0	
4	替米卡星	Tilmicosin	108050-54-0	869.60	174.20*	-28.0	-46.0	-30.0	0.5
					156.10	-28.0	-49.0	-15.0	
5	红霉素	Erythromycin	114-07-8	734.50	158.20*	-24.0	-31.0	-28.0	1.0
					576.40	-24.0	-20.0	-40.0	
6	泰乐菌素	Tylosin	1401-69-0	916.50	174.20*	-20.0	-40.0	-17.0	1.5
					772.40	-20.0	-31.0	-38.0	

\*表示定量离子

## 1.3 样品制备

## 1.3.1 标准溶液配制:

用甲醇配制 1000 mg/L 螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米考星、红霉素和泰乐菌素储备液。取牛奶阴性样品, 按 1.3.2 样品前处理方法, 得到空白基质溶液。取混合储备液, 用空白基质溶液稀释, 得到 0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL 的混合基质标准校准溶液, 上机测定。

## 1.3.2 样品前处理方法:

称取 4 g 牛奶于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20 mL 乙腈振荡提取 2 min 后, 3000 r/min 离心 10 min, 移取上清液至鸡心瓶中。再用 10 mL 乙腈重复提取一次, 合并上清液于同一鸡心瓶中。将提取液于 45°C 下旋转蒸发至约 4 mL 左右, 加入 2 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH8.0), 混匀后, 转移至已用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 磷酸盐缓冲溶液活化的 HLB 固相萃取柱 (500 mg, 6 mL) 上。接着依次用 3 mL 水和 2 mL 甲醇水溶液 (甲醇 / 水 = 3/7, v/v) 淋洗并抽干, 最后用 6 mL 乙腈洗脱。洗脱液在 45°C 水浴上氮吹至干, 用 0.1 mol/L 甲酸铵溶液定容至 2 mL, 涡旋混合后, 过 0.45 μm 滤膜供 HPLC-MS/MS 分析。

## 结果与讨论

### 2.1 标准溶液的 MRM 色谱图

0.1 ng/mL 混合标准溶液的 MRM 色谱如图 1 所示。

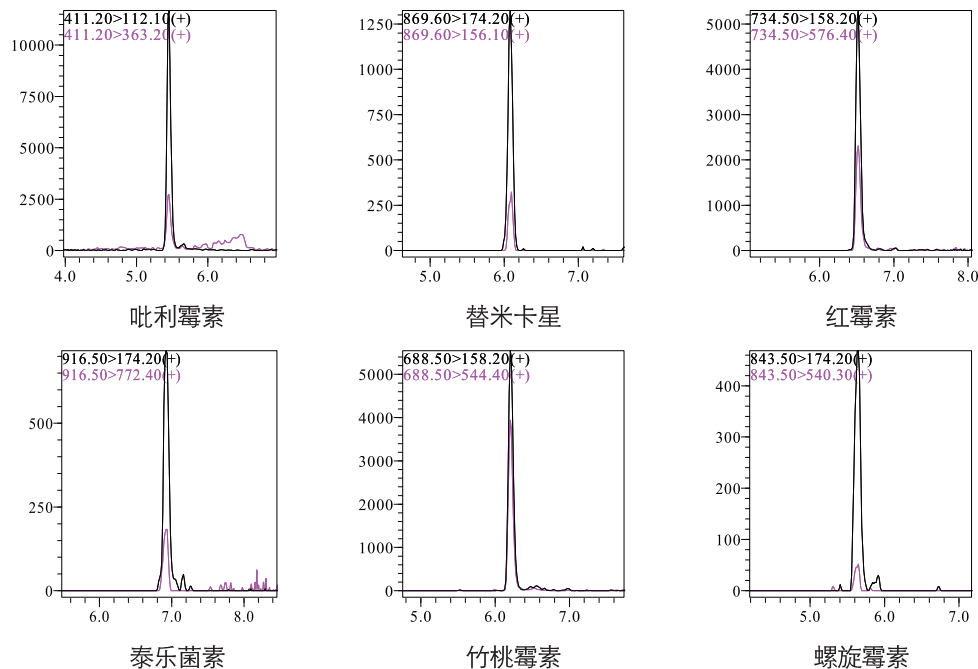


图1 0.1 ng/mL标样的MRM图

### 2.2 线性关系与检出限、定量限

将混合标准工作液,按 1.2 中的分析条件进行测定,外标法制作校准曲线,如图 2~7 所示。根据检出限 MDL=3.3 S/N,定量限 LOQ=10S/N 计算检出限和定量限,结果如表 3 所示。

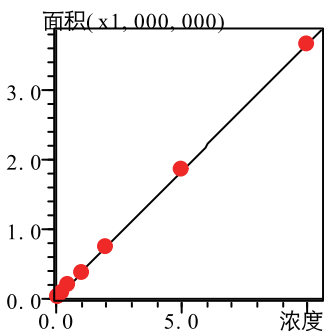


图2 吡利霉素标准工作曲线

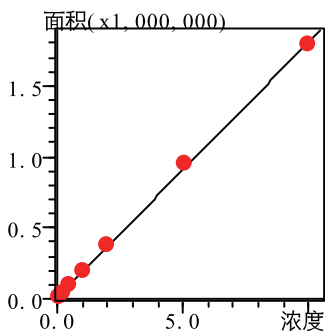


图3 替米卡星标准工作曲线

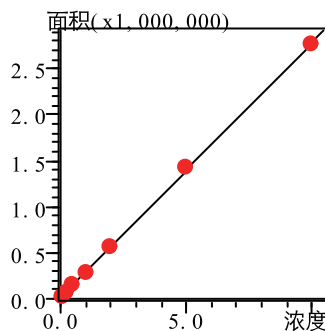


图4 红霉素标准工作曲线

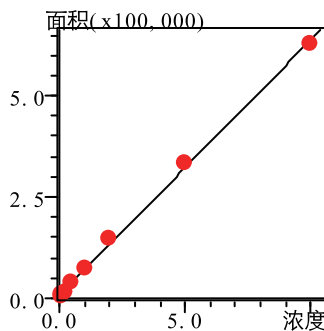


图5 泰乐菌素标准工作曲线

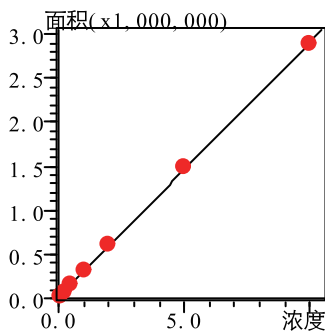


图6 竹桃霉素标准工作曲线

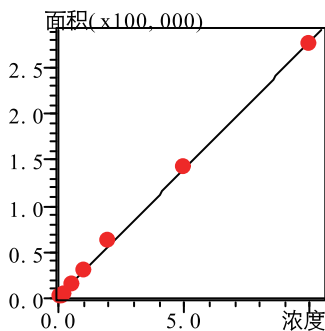


图7 螺旋霉素标准工作曲线

表3 6种物质的校准曲线参数与检出限、定量限

No.	名称	线性范围 ( $\mu\text{g/L}$ )	校准曲线	相关系数 R	准确度 (%)	检出限 ( $\mu\text{g/L}$ )	定量限 ( $\mu\text{g/L}$ )
1	吡利霉素	0.05~10	$Y = (366795)X + (7945.78)$	0.9999	97.1~114.1	0.0064	0.0021
2	替米考星	0.05~10	$Y = (180014)X + (8929.64)$	0.9998	86.4~104.4	0.0003	0.0008
3	红霉素	0.05~10	$Y = (180014)X + (8929.64)$	0.9999	86.3~103.9	0.0005	0.0015
4	泰乐菌素	0.05~10	$Y = (63173.3)X + (6049.23)$	0.9995	87.5~110.6	0.0014	0.0043
5	竹桃霉素	0.05~10	$Y = (289676)X + (14860.8)$	0.9999	94.6~103.6	0.0011	0.0034
6	螺旋霉素	0.05~10	$Y = (27691.0)X + (1829.53)$	0.9997	86.2~113.5	0.0027	0.0083

### 2.3 精密度实验

配制 0.5、1 和 5 mg/L 混合标液，重复进样 6 次。6 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.14% 和 0.42~5.35% 之间，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.	名称	RSD% (0.05 $\mu\text{g/L}$ )		RSD% (0.5 $\mu\text{g/L}$ )		RSD% (5 $\mu\text{g/L}$ )	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	吡利霉素	0.10	2.38	0.09	1.25	0.08	0.82
2	替米考星	0.10	3.62	0.08	1.80	0.09	0.42
3	红霉素	0.09	1.46	0.03	1.25	0.07	1.45
4	泰乐菌素	0.10	4.14	0.05	2.67	0.06	1.72
5	竹桃霉素	0.09	1.85	0.06	1.33	0.08	1.52
6	螺旋霉素	0.14	5.35	0.04	2.84	0.09	1.73

### 2.4 基质加标实验

按照 1.3.2 中样品制备方法，进行加标回收实验，加标含量为 0.5 和 1 ng/g。测试结果显示：牛奶样品的加标回收率在 74.3~113.8% 之间；具体结果如表 5。

表5 加标样的回收率结果

No.	名称	牛奶样品 浓度 (ng/g)	加标样			
			加标浓度 (ng/g)	加标回收率 (%)	加标浓度 (ng/g)	加标回收率 (%)
1	吡利霉素	N.D	0.5	79.6	1	74.3
2	替米考星	N.D	0.5	98.9	1	104.5
3	红霉素	N.D	0.5	113.8	1	110.5
4	泰乐菌素	N.D	0.5	76.4	1	76.5
5	竹桃霉素	N.D	0.5	107.6	1	96.8
6	螺旋霉素	N.D	0.5	83.6	1	93.8

注：N.D表示未检出；

## ■ 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定牛奶中林可胺类和大环内酯类抗生素 (螺旋霉素、吡利霉素、竹桃霉素、替米卡星、红霉素和泰乐菌素) 残留, 线性良好, 相关系数均大于 0.9995; 牛奶样品加标的回收率在 74.3~113.8% 之间; 其检出限在 0.0003~0.0064  $\mu\text{g/L}$  之间, 定量限 0.0008~0.0083  $\mu\text{g/L}$ ; 远远低于国内外有关法规的要求, 可为牛奶中林可胺类及大环内酯类药物残留的监督检验和国内的残留监控提供技术支持。