

LCMS-8060 测定猪肉基质中的 3 种多肽类抗生素

LCMSMS-238

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-8060 联用检测猪肉基质中 3 种多肽类抗生素残留量的检测方法。通过优化的 UHPLC-MS/MS 条件分析 3 种多肽物质，采用基质加标曲线定量，在 0.5~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好，相关系数均大于 0.999，定量限为 0.40~0.70 $\mu\text{g/kg}$ ，检出限分别为 0.14~0.24 $\mu\text{g/kg}$ ；加标回收率在 72.9~82.0% 之间，日内精密密度不超过 12.7%，日间精密密度不超过 13.9%。本方法灵敏度高、准确度高，适用于猪肉中 3 种多肽类抗生素的测定。

关键词：多肽类抗生素 猪肉 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

多肽类抗生素常用于治疗细菌感染，被广泛用于家禽、猪、牛等饲料添加剂和兽药。随着多肽类抗生素的广泛使用，滥用及不遵守休药期等现象时有发生。药物可能通过食物链的传递进入人体，危害人体健康。目前，糖肽类抗生素万古霉素被农业部第 560 号公告例为禁用兽药。另外，对于万古霉素，国内使用较多的多为其去甲基化的形式，需同时考虑去甲万古霉素的残留影响。而杆菌肽对革兰氏阳性菌具有杀菌作用，是几种结构相似的小分子肽类混合物，以杆菌肽 A 的活性最高。长期摄入低剂量药物残留的产品，会导致药物在人体内的缓慢蓄积而引起器官的功能紊乱。目前我国关于杆

菌肽的残留限量规定猪、牛、禽和牛奶等可食用组织中 MRLs 为 500 $\mu\text{g/kg}$ 。关于可食用动物组织中多肽类抗生素残留的控制也逐渐被关注。

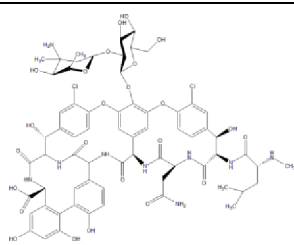
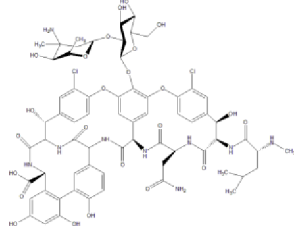
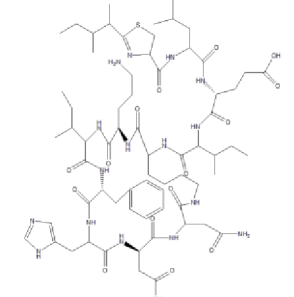
本方法结合正压驱动的 SPE 前处理方法，在不进行氮吹复溶的情况下进行液质分析，减少了氮吹造成损失并且缩短了样品前处理时间，尤其是提高了杆菌肽回收率，对猪肉中去甲万古霉素、万古霉素和杆菌肽进行同时检测，方法定量限为 0.40~0.70 $\mu\text{g/kg}$ ，具有较好的选择性、高灵敏度和回收率，为实际猪肉样品的提供了很好的参考。

实验部分

1.1 化合物信息

目标化合物及内标化合物信息见表 1。

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
去甲万古霉素	Norvancomycin	91700-98-0	C ₆₅ H ₇₂ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	
万古霉素	Vancomycin	1404-90-6	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	
杆菌肽 A	Bacitracin A	1405-87-4	C ₆₆ H ₁₀₂ N ₁₇ O ₁₆ S	

1.2 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵), DGU-20A5R(在线脱气机), SIL-30ACMP(自动进样器), CTO-30AC(柱温箱), CBM-20A 系统控制器, LCMS-8060 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.82 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相色谱条件

流速: 0.40 mL/min

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 C18(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)

柱温: 40°C

流动相: A 相: (0.01% 甲酸) 水,

进样体积: 5 μL

B 相: (0.01% 甲酸) 乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始比例 5%B

表2 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	15
6.00	Pumps	Pump B Conc.	90
7.00	Pumps	Pump B Conc.	90
7.10	Pumps	Pump B Conc.	5
8.50	Controller	Stop	

质谱条件
分析仪器：LCMS-8060
离子源：ESI+
雾化气流速：3.0 L/min
加热气流速：15.0 L/min
接口温度：250°C

DL 温度：250°C
加热模块温度：300°C
喷针偏移距离：+1.0mm
干燥气流速：5.0 L/min
扫描模式：多反应监测 (MRM)，MRM 参数见表 3

表3 化合物信息及MRM参数

化合物	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	Q1 预电压 (V)	碰撞能量 CE(V)	Q3 预电压 (V)
去甲万古霉素 Norvancomycin	718.80	144.05* 100.00	-26.0 -26.0	-15.0 -33.0	-25.0 -18.0
万古霉素 Vancomycin	725.75	100.00* 144.05	-26.0 -26.0	-41.0 -16.0	-18.0 -26.0
杆菌肽 A Bacitracin A	712.05	199.00* 85.90	-26.0 -26.0	-45.0 -43.0	-21.0 -15.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液的配制

分别准确称取万古霉素、去甲万古霉素、杆菌肽 A 标准品，用纯水溶液配制成 1 mg/mL 的标准储备液，4 °C 冰箱保存。根据需要空白样品基质溶液配制成 0.5、1.0、5.0、10、50、100 ng/mL 的系列基质匹配标准工作液。

样品前处理方法

提取：称取已均质的样品 5.0 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中，加入 5 mL 0.1% 甲酸水 - 乙腈 (7:3, v/v)，涡漩 3 min，超声 10 min，5000 r/min 离心 5 min，重复提取一次，合并上清液，定容至 10 mL。取 5 mL 提取液加入 5 mL 正己烷，涡漩 2 min，12000 r/min 离心 3 min，弃去正己烷层，重复用正己烷脱脂 1 次。净化：吸取 2 mL 提取液，加入 4 mL 0.1% 甲酸水溶液，混匀后上样至 Pharma FF 固相萃取小柱，2 mL 0.1% 甲酸水 / 乙腈 (9:1, v/v) 淋洗，2 mL 0.1% 甲酸水 / 乙腈 (4:6, v/v) 洗脱，定容至 2 mL，样品经 0.22 μm 滤膜过滤。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

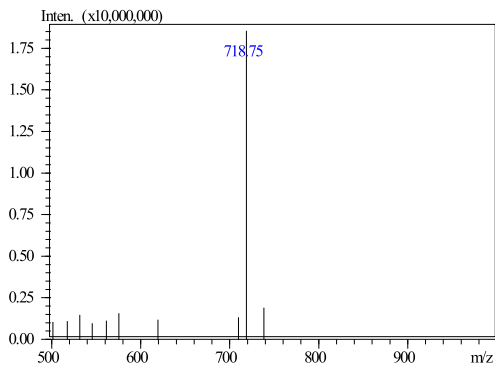


图1 去甲万古霉素的一级质谱图

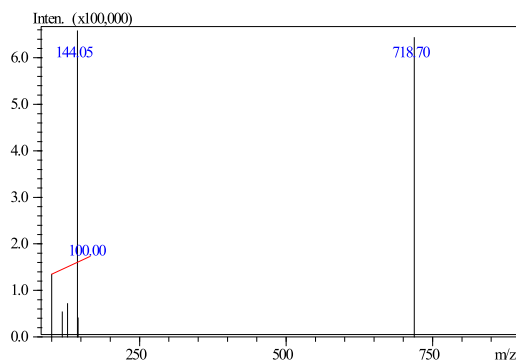


图2 去甲万古霉素的产物离子扫描图(CE值-15 V)

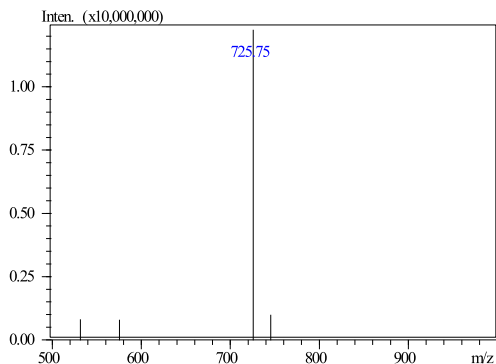


图3 万古霉素的一级质谱图

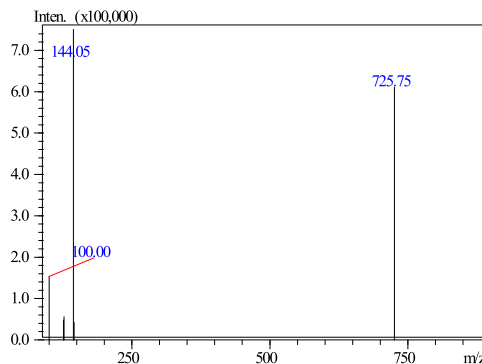


图4 万古霉素的产物离子扫描图(CE值-15 V)

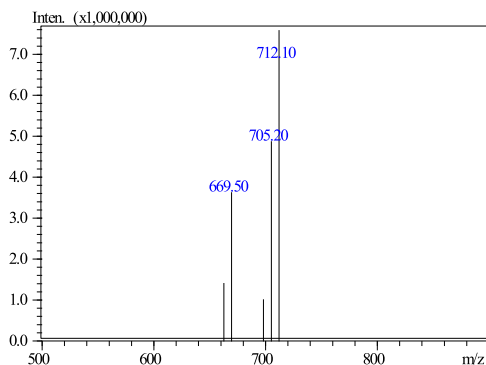


图5 杆菌肽A的一级质谱图

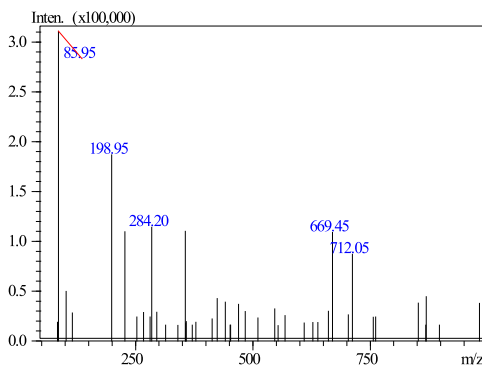


图6 杆菌肽A的产物离子扫描图(CE值-30 V)

2.2 空白基质和加标样品的典型 MRM 色谱图

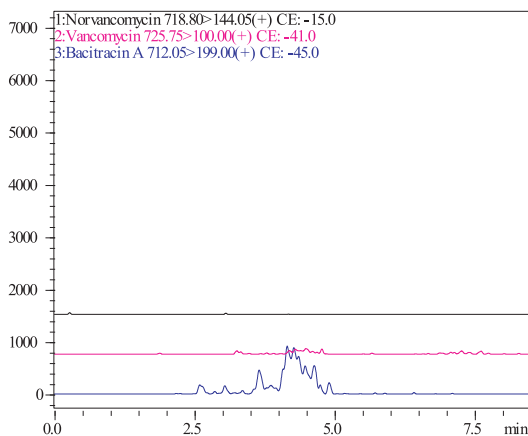


图7 空白猪肉基质样品的MRM色谱图

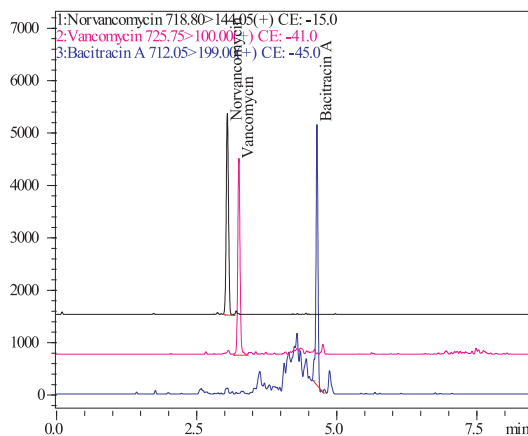


图8 基质加标样品的MRM色谱图(5 ng/mL)

2.3 进样方式优化

由于本文中所采用的改良固相萃取方法，样品直接从萃取小柱上淋洗后上机，淋洗液采用 0.1% 甲酸水 / 乙腈 (4:6, v/v) 对万古霉素和去甲万古霉素的峰形产生了较为明显的溶剂效应，见图 9(b); 为获得较好的色谱峰形，实现准确定量，利用自动进样器的溶剂共进样功能，通过柱头富集效应，实现不稀释样品解决溶剂效应问题，过程见图 9(a)。对共进样溶剂类型和比例进行优化，最终稀释溶剂采用 0.1% 甲酸水溶液，比例 1: 1(样品体积: 稀释溶液, v/v) 进行分析，色谱峰形得到显著改善，见图 9(c)。

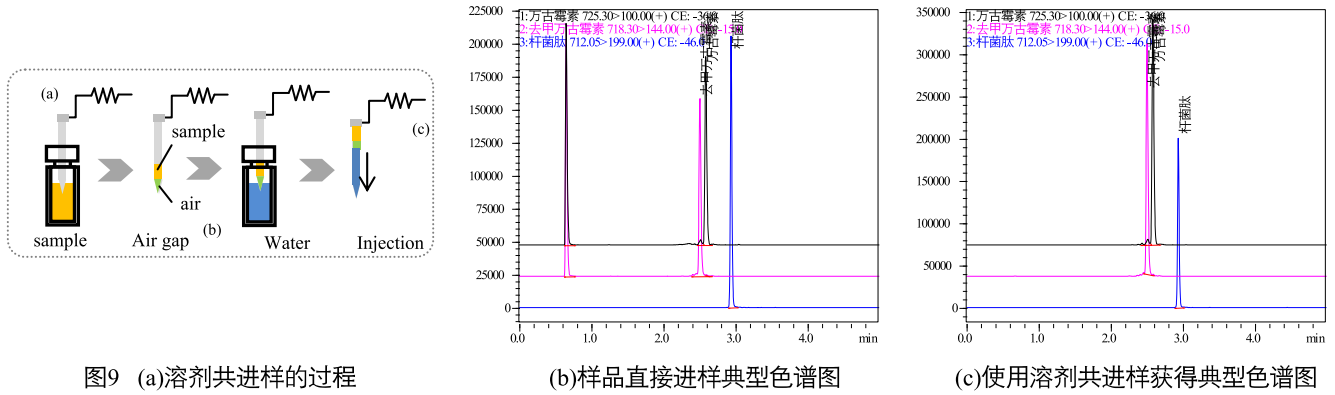


图9 (a)溶剂共进样的过程

(b)样品直接进样典型色谱图

(c)使用溶剂共进样获得典型色谱图

2.4 线性关系

比较空白基质匹配的标准溶液和纯溶剂标准曲线的响应值的差异，并用两者的比值来衡量基质效应。分别配制浓度范围为 0.5~100 $\mu\text{g/L}$ 基质匹配标准曲线和纯溶剂标准曲线，计算两者斜率的比值，去甲万古霉素、万古霉素的比值均接近 1，表明两者不受到基质效应的影响，杆菌肽的比值为 0.343，表明存在很强的基质抑制效应。因此本实验中采用空白基质匹配标准曲线进行定量。标准曲线见图 10，3 种多肽抗生素的线性方程、相关系数见表 4。3 种抗生素定量限 ($S/N=10$) 分别为 0.40、0.66、0.70 $\mu\text{g/kg}$ ，检出限 ($S/N=3$) 分别为 0.14、0.22、0.24 $\mu\text{g/kg}$ 。

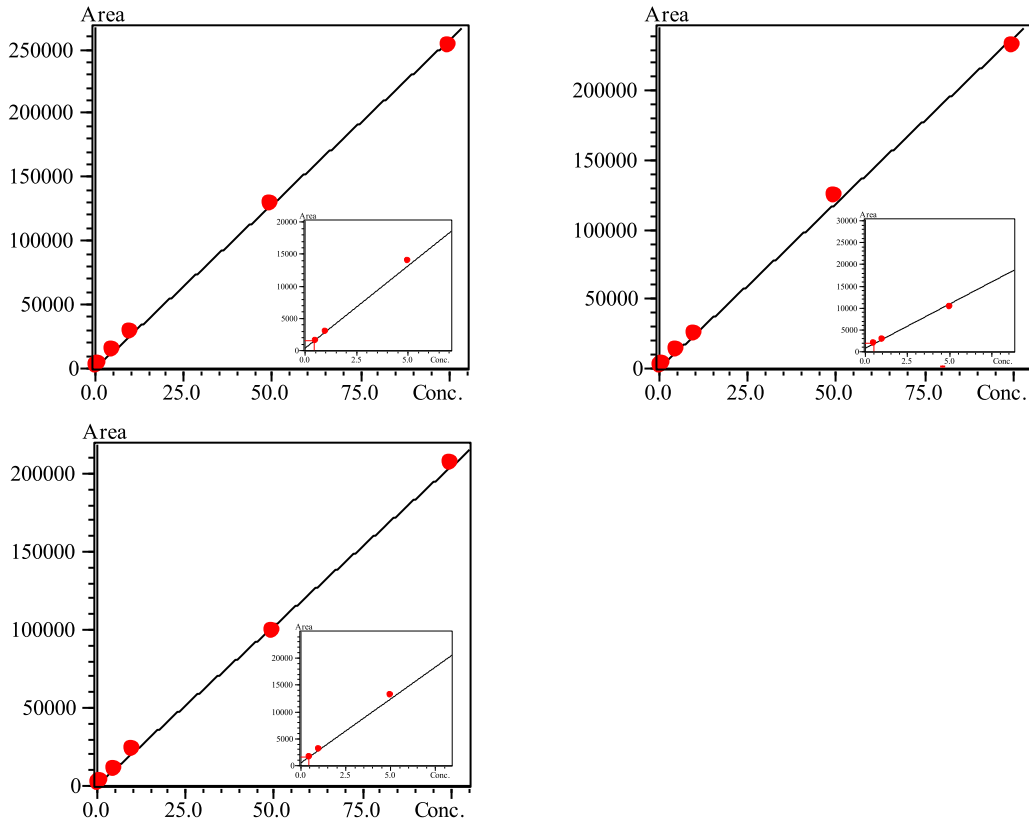


图10 标准工作曲线

表4 校准曲线参数

化合物	范围 (μg/L)	线性方程	相关系数 r^2	准确度范围 (%)
去甲万古霉素	0.5~100	$Y = (2564.90)X + (383.031)$	0.9995	86.1~109.5
万古霉素	0.5~100	$Y = (2376.55)X + (534.851)$	0.9995	85.4~106.2
杆菌肽 A	0.5~100	$Y = (2033.81)X + (804.551)$	0.9995	92.6~106.8

2.5 回收率和精密度实验

采用阴性猪肉样品作为空白基质,按照 1.3 部分所述的样品前处理过程分别考察 3 浓度水平 1 μg/kg、5 μg/kg、25 μg/kg(2 倍定量限、10 倍定量限、50 倍定量限)的回收率和精密度,每浓度水平重复提取 6 次,考察平均回收率、日内精密度和日间精密度,结果见表 5。3 物质的平均回收率在 72.9~82.0% 之间,回收率满足食品中痕量药物残留测试要求。日内精密度不超过 12.7%,日间精密度不超过 13.9%,方法精密度良好。

表5 猪肉中3种多肽类抗生素的回收率和精密度

化合物	添加浓度(μg/kg)	回收率%	日内精密度%	日间精密度%
去甲万古霉素	2	76.3	7.11	12.4
	10	80.3	7.59	9.33
	50	82.0	3.76	10.1
万古霉素	2	77.0	12.7	12.5
	10	75.6	8.53	12.0
	50	80.5	2.57	10.0
杆菌肽 A	2	72.9	10.9	13.9
	10	77.0	7.74	8.50
	50	79.6	7.30	7.85

2.6 实际样品分析实验

采用本方法测定市售猪肉,均未检出 3 种多肽类抗生素。

结论

利用正压驱动固相萃取法结合 UHPLC-MS/MS 建立了猪肉中去甲万古霉素、万古霉素和杆菌肽 3 种多肽类抗生素同时检测的方法。对样品前处理方法进行了充分的优化,改进了传统的负压 SPE 方法,避免了对回收率影响显著的氮吹过程,采用正压方式小体积洗脱目标物质,采用溶剂共进样方式直接分析,避免了样品稀释和溶剂效应问题。通过优化的 UHPLC-MS/MS 条件分析 3 种多肽物质,采用基质加标曲线定量,在 0.5~100 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999,定量限为 0.40~0.70 μg/kg,检出限分别为 0.14~0.24 μg/kg;加标回收率在 72.9~82.0% 之间,日内精密度不超过 12.7%,日间精密度不超过 13.9%。本方法灵敏度高、准确度好,适用于猪肉中 3 种多肽类抗生素的测定。