

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法检测猪肉中大环内酯类抗生素

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-8040 联用快速测定猪肉中大环内酯类抗生素的方法。猪肉样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行分析。8 种大环内酯类抗生素在 4 分钟内得到快速分离和检测。螺旋霉素、替米考星在 5- 200 $\mu\text{g/L}$ ；竹桃霉素、泰乐菌素、北里霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素在 1-500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9996 以上；对 5 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 1.87% 和 5.04% 以下，系统精密度良好。

关键词：大环内酯类抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

大环内酯类抗生素(Macrolide antibiotics, MALs)是由放线杆菌或小单孢菌产生的一类抗生素。MALs 已经成为全世界需求量和销售速度增长最快的抗生素之一。由于 MALs 具有广谱抗菌作用，可抵抗革兰氏阳性菌、支原体和部分革兰氏阴性菌，因此被广泛应用于治疗猪、牛、羊、虾及家禽的呼吸性和倡导传染性疾病，或在低剂量下作为饲料添加剂促进动物生长发育。食品中的大环内酯类抗生素残留易引起过敏河携带耐药因子菌株的扩散。和其他兽药一样，大环内酯类药物在动物源性食品中的残留监测与控制已经受到许多国家包括我国政府的高度重视。农业部公告第 235 号规定，红霉素在动物组织、奶和蛋中的最大残留限量(MRL)为 40-200 $\mu\text{g/kg}$ ；替米考星在动物组织和奶中的 MRL 为 50-1500 $\mu\text{g/kg}$ ；泰乐菌素在动物组织、奶和蛋中的 MRL 为 50-200 $\mu\text{g/kg}$ 。

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-8040 联用，建立了一种快速测定猪肉中 8 种大环内酯类抗生素（螺旋霉素、替米考星、竹桃霉素、泰乐菌素、北里霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素）的方法，该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 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-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2(输液泵)，DGL-20A₅（在线脱气机），SIL-30AC（自动进样器），CTO-30AC（柱温箱），CBM-20A（系统控制器），LCMS-8040（三重四极杆质谱仪）和 LabSolutions Ver. 5.41（色谱工作站）。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色 谱 柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III
(2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm)

流 动 相：A—0.1 % 甲酸水溶液；B—乙腈

流 速：0.4 mL/min

进样体积：20 μL

柱 温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	40
2.01	Pumps	Pump B Conc.	80
2.20	Pumps	Pump B Conc.	80
2.30	Pumps	Pump B Conc.	15
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，正离子扫描
离子源接口电压：ESI(+), 4.5kV
雾化气：氮气 3.0 L/min
干燥气：氮气 15 L/min
碰撞气：氩气
脱溶剂管温度：250℃
加热模块温度：400℃
扫描模式：多反应监测(MRM)
驻留时间：20 ms
延迟时间：2 ms
MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	螺旋霉素	843.5	174.15 [*]	-26	-45	-19
			540.25	-26	-35	-20
2	替米考星	869.5	174.10 [*]	-28	-50	-20
			696.55	-28	-40	-28
3	竹桃霉素	688.4	158.15 [*]	-22	-30	-18
			544.35	-22	-15	-30
4	秦乐菌素	916.5	174.15 [*]	-30	-45	-20
			722.45	-30	-30	-30
5	北里霉素	772.3	174.10 [*]	-24	-35	-21
			109.05	-24	-45	-23
6	红霉素	734.3	158.15 [*]	-40	-35	-18
			576.35	-40	-20	-32
7	交沙霉素	828.4	174.15 [*]	-26	-35	-20
			229.15	-26	-30	-17
8	罗红霉素	837.5	158.15 [*]	-26	-40	-18
			679.4	-26	-25	-36

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

准确称取适量螺旋霉素、替米考星、竹桃霉素、泰乐菌素、北里霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素 8 种标准物质, 用甲醇配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液, 用流动相稀释成浓度为 1、2、5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。

样品前处理方法:

猪肉样品的制备、净化、提取参照《SN/T 1777.2-2007 动物源性食品中大环内酯类抗生素残留测定方法—第 2 部分: 高效液相色谱串联质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的产物离子扫描

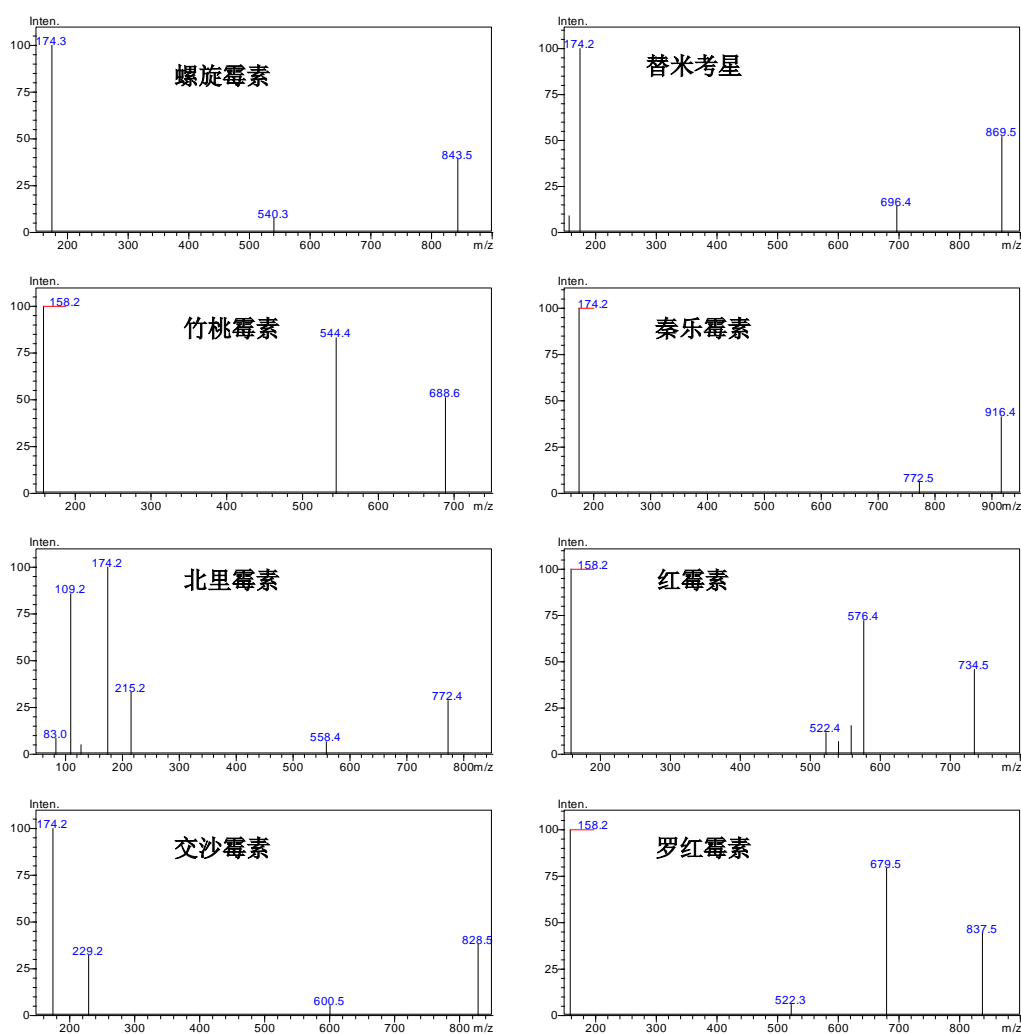


图 1 标准样品产物离子扫描结果

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 2 为 500 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱, 8 种大环内酯类抗生素在 4 分钟内得到了快速检测。

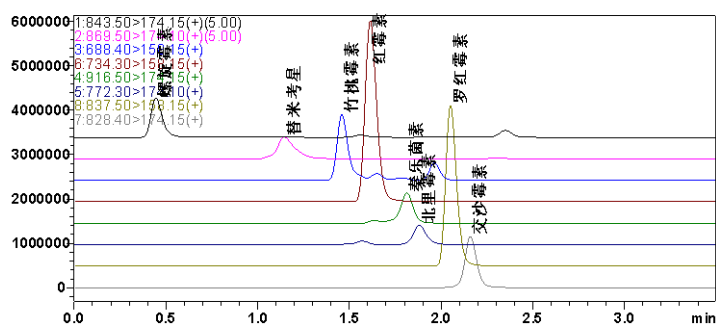
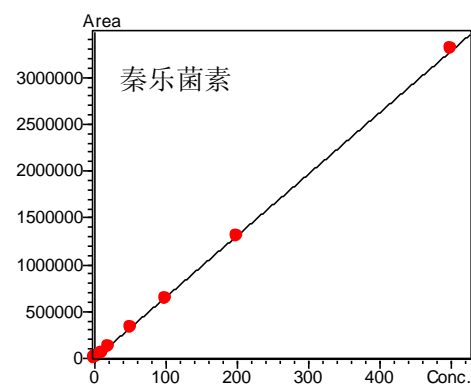
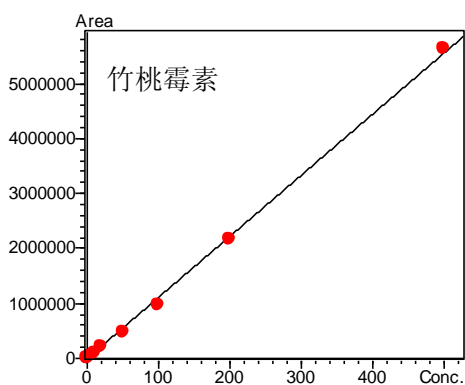
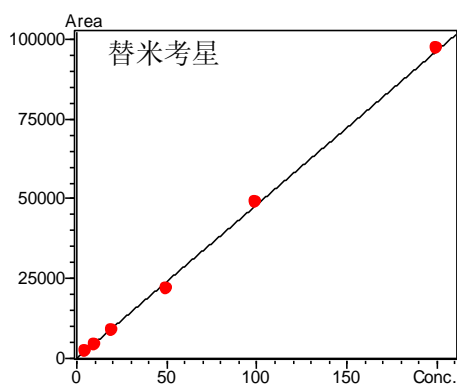
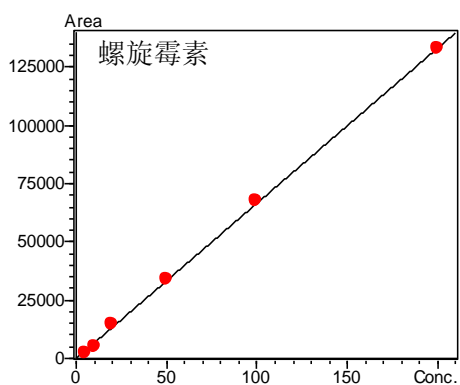


图2 大环内酯类抗生素标准样品的MRM色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 1、2、5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示。螺旋霉素、替米考星在 5 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ ；竹桃霉素、秦乐菌素、北里霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素在 1-500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。



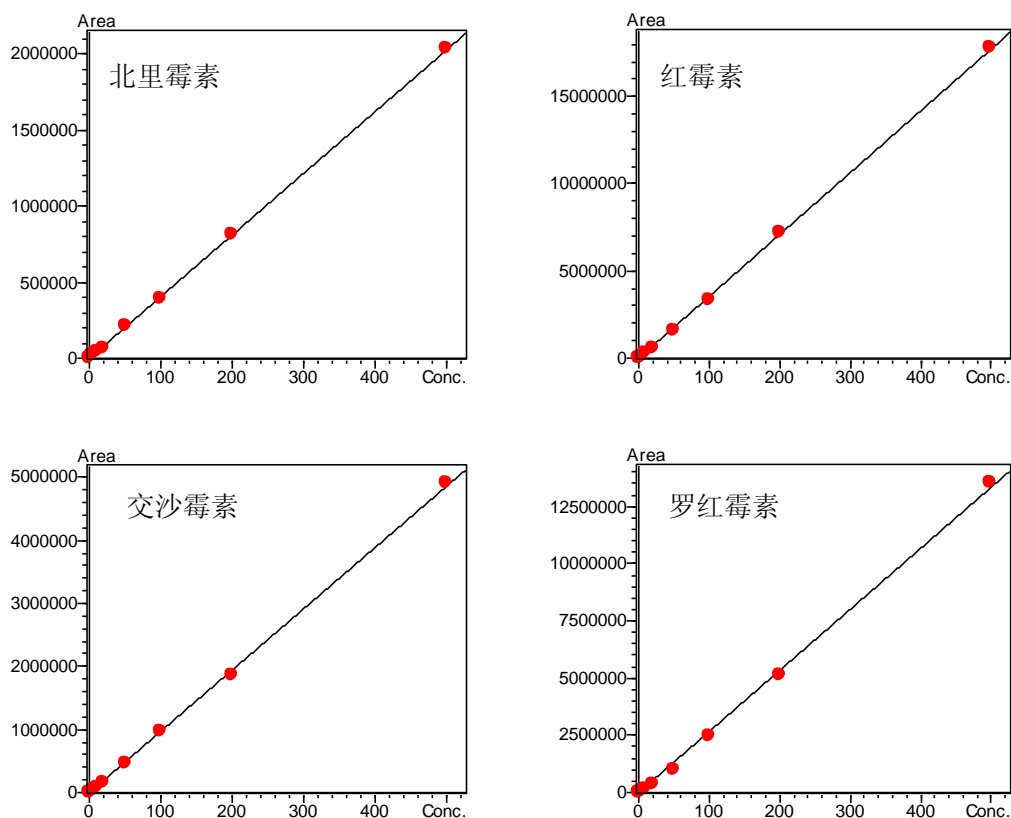


图 3 8 种大环内酯类抗生素的标准工作曲线

表 3 8 种大环类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	线性范围	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	螺旋霉素	$Y = 665.9713X$	0.9997	5-200	1.24	3.76
2	替米考星	$Y = 482.1126X$	0.9997	5-200	1.07	3.24
3	竹桃霉素	$Y = 11126.75 X$	0.9996	1-500	0.16	0.48
4	泰乐菌素	$Y = 6573.865 X$	0.9999	1-500	0.11	0.35
5	北里霉素	$Y = 4055.260X$	0.9999	1-500	0.19	0.57
6	红霉素	$Y = 35452.73X$	0.9999	1-500	0.13	0.39
7	交沙霉素	$Y = 9725.036X$	0.9998	1-500	0.18	0.54
8	罗红霉素	$Y = 26698.20X$	0.9996	1-500	0.13	0.4

2.4 精密度实验

对 5 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液连续 6 次进样，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。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02% ~1.87% 和 0.97% ~5.04 % 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)

样品名称	RSD% (5 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (200 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
螺旋霉素	1.87	3.82	0.17	1.67	0.20	1.22
替米考星	1.50	4.06	0.36	3.53	0.42	2.04
竹桃霉素	0.11	1.83	0.13	2.55	0.08	1.51
秦乐菌素	0.06	3.40	0.05	2.23	0.05	0.97
北里霉素	0.07	4.52	0.09	3.81	0.03	1.68
红霉素	0.10	5.04	0.08	4.41	0.08	1.24
交沙霉素	0.10	2.97	0.04	3.74	0.03	1.81
罗红霉素	0.08	5.00	0.05	4.16	0.02	1.06

2.5 基质加标实验

为了考察方法的灵敏度，在按照 1.3 中样品制备方法提取净化的空白猪肉基质样品中添加 1 µg/L 混合标样，猪肉基质空白色谱图如图 4 所示，猪肉基质加标样品色谱图如图 5 所示。从图中可以看到，基质加标样品在定量限上均有很好的响应。

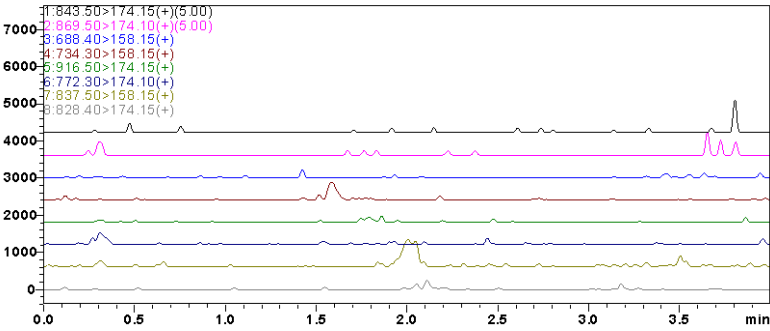


图 4 猪肉样品空白基质色谱图

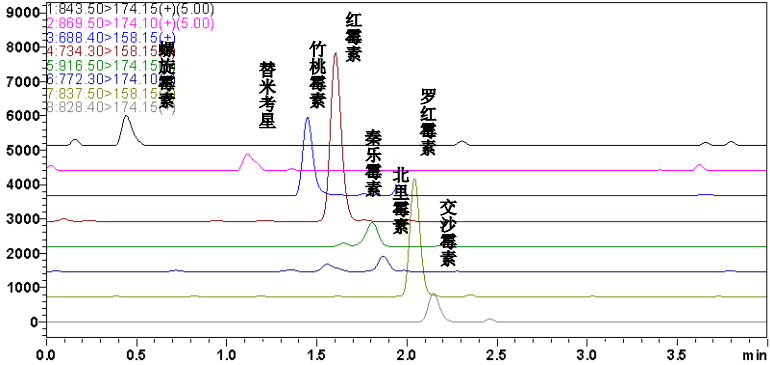


图 5 猪肉基质加标样品的色谱图

3. 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定猪肉中 8 种大环内酯类抗生素的方法。该方法分析速度快，灵敏度高，精密度良好；螺旋霉素、替米考星在 5 ~ 200 µg/L；竹桃霉素、秦乐菌素、北里霉素、红霉素、交沙霉素、罗红霉素在 1-500 µg/L 浓度范围内线性良好，所有样品的标准曲线的相关系数均在 0.9996 以上。在经样品前处理后的空白猪肉基质中添加混合标样，基质加标样品在定量限上均有很好的响应。