

LCMS-8050 测定进出口食用动物中新霉素药物的残留量

LCMSMS-490

摘要： 本文利用岛津 LCMS-8050 液质联用仪，建立了进出口食用动物中新霉素药物残留的超快速分析检测方法。该方法在 5 min 内完成样品的分析检测，目标物和其他组分色谱峰分离效果良好，在 0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内建立标准曲线，线性关系良好，相关系数 R^2 大于 0.999；在 0.6 $\mu\text{g/g}$ 、1.2 $\mu\text{g/g}$ 和 2.4 $\mu\text{g/g}$ 的加标量下，新霉素的回收率分布在 83.78% ~ 89.60% 之间，该方法适用于食用动物尿液中新霉素药物的准确定量分析；连续 6 针进样，新霉素保留时间的 RSD 分布在 0.14%~0.26% 的范围，峰面积的 RSD 分布在 2.26%~3.53% 的范围，仪器精密度良好；新霉素物质的灵敏度 $\text{LOD}=0.055 \mu\text{g/mL}$ (11.0 ng/g)， $\text{LOQ}=0.170 \mu\text{g/mL}$ (34.0 ng/g)，测试结果表明仪器灵敏度良好，满足《进出口食用动物中新霉素药物残留测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》灵敏度 $\text{LOQ}=100 \text{ ng/g}$ 的要求。经验证该方法操作简捷、灵敏度高、分析速度快，适合大批量样品的定性定量分析，也可为相关从业人员分析兽药残留提供参考。

关键词： LCMS-8050 液质联用仪 食用动物 新霉素

新霉素属于氨基糖苷类抗生素，是畜牧养殖常用兽药。它由弗氏链霉菌产生，对革兰氏阳性和阴性菌类皆有效，其中对葡萄球菌、棒状杆菌属、大肠埃希菌、克雷伯菌、变形杆菌等肠杆菌科细菌有着良好的抗菌作用；但是新霉素对人体有着显著的肾毒性和耳毒性副作用。滥用兽药极易造成动物源食品中有害物质的残留，这不仅会对人体健康造成直接危害，而且对畜牧业的发展和生态环境也会造成极大破坏。兽药残留是影响动物源性食品安全的重要因素之一。动物饲养过程中大量、频繁地使用抗生素，可使食用动物机体中存在药物残留，而且抗生素药物的残留会使人体中的细菌产生耐药性，这种毒副作用将会扰乱人体的微生态系统。随着人们对动物源食品由需求型向质量型的转变，动物源食品中的兽药残留已逐渐成为全世界

关注的焦点。食品添加剂和污染物联合专家委员会从 20 世纪 60 年代起就开始评价有关兽药残留的毒性问题，为中国人民认识兽药残留的危害及其控制提供了科学的依据。如今为了增大市场的监管力度及范围，2019 年 9 月 3 日，由中华人民共和国海关总署发布了进出口食用动物中新霉素药物残留的检测方法，并规定了采用高效液相色谱串联质谱法对食用动物中新霉素药物残留量进行分析测定。

本文采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，参照中华人民共和国海关总署发布的《进出口食用动物中新霉素药物残留测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》，建立了食用动物中新霉素残留量的检测方法。该方法快速准确、灵敏度高，可以用于食用动物中新霉素药物的筛查和准确测定。

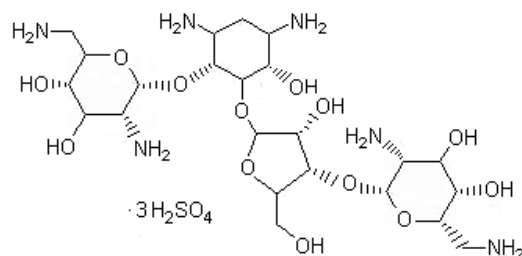


图 1 新霉素物质结构式

■ 实验部分

1.1 仪器配置

岛津 LCMS-8050 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-20A₅

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

检测器：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.97



图 2 岛津 LCMS-8050 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：InertSustain AQ-C18 色谱柱（2.1 mm I.D.×100 mm L，1.9 μm，
岛津（上海）实验器材有限公司 P/N：5020-89939）

流动相：A 相 0.1% 甲酸水溶液，B 相 乙腈

流速：0.2 mL/min

柱温：40°C

进样量：5 μL

洗脱方式：洗脱方式：

洗脱方式：B 相初始浓度为 3.0 %

时间程序：见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 2.00 | Pumps | Pump B Conc. | 50 |
| 4.00 | Pumps | Pump B Conc. | 90 |
| 4.10 | Pumps | Pump B Conc. | 3 |
| 5.00 | Controller | Stop | |

LCMS-8050 质谱条件：

离子源：ESI (+)

雾化气流速：3.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

干燥气流速：10.0 L/min

接口温度：300°C

DL 温度：250°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

表 2 新霉素 MRM 参数

| 名称 | CAS# | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|-----|-----------|--------|---------|----------------|-------|----------------|
| 新霉素 | 1405-10-3 | 615.50 | 161.15* | -32 | -32 | -17 |
| | | | 163.20 | -32 | -33 | -30 |
| | | | 293.20 | -32 | -24 | -14 |

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配置

标准储备液的配制: 精确称取新霉素标准品 10 mg 至 10 mL 容量瓶中, 加入纯水溶解并定容至刻度, 得到 1.0 mg/mL 的新霉素储备液。

基质匹配标准曲线的配制: 取 1 mL 标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用纯水定容至刻度, 得到 100 µg/mL 混合标准中间液; 用 1.4 前处理后的样品基质空白为溶剂, 将混合标准中间液逐级稀释成浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 µg/mL 的基质匹配标准工作溶液, 待上机分析。

1.4 样品前处理方法

准确称取 5.0 g 食用动物的尿液样品至 50 mL 离心管中, 加入 12 mL 提取液 1*, 混匀震荡 15 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 将上清液移至另一新的 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 正己烷, 振荡混匀 10 min, 再以 8000 r/min 离心 5 min, 弃去上层液体, 准确移取全部下层提取液至一新的 50 mL 离心管中, 用提取液 2* 调节 pH= 4.0~4.5, 待过柱净化。

提前用 5 mL 甲醇和 5 mL 纯水活化 SPE 柱, 再将调节好 pH 的提取液加入贮液器中以小于等于 3 mL/min 的流速过 SPE 柱, 待液体完全流出后, 用 5 mL 水淋洗小柱, 弃去所有流出液, 正压吹干, 最后用 5 mL 甲醇洗脱小柱, 收集洗脱液至 15 mL 聚四氟乙烯圆底离心管, 40°C 水浴氮气吹干, 用 1 mL 流动相定溶后, 过 0.22 µm 滤膜至进样小瓶, 待上机分析测定。

注: * 提取液 1: 磷酸盐缓冲液 (含 50mM 庚烷磺酸钠、25mM 磷酸钠), 磷酸调至 pH=2.0。

* 提取液 2: 磷酸盐缓冲液 (含 50mM 庚烷磺酸钠、25mM 磷酸钠)。

■ 结果与讨论

2.1 线性范围

如图 3 所示, 为新霉素标准物质的 MRM 色谱图。将新霉素按照 1.3 配制标准溶液, 再以新霉素目标物的浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 以外标法绘制标准曲线, 新霉素标准曲线如图 4 所示, 该标准曲线线性关系良好, 相关系数 R² 大于 0.999。线性方程情况见表 3。

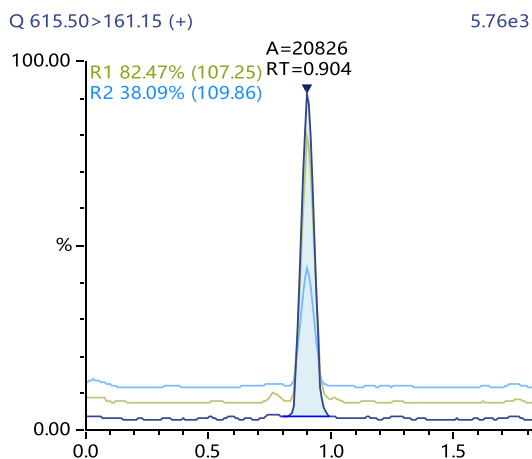


图 3 新霉素标准品色谱图 (0.5 µg/mL)

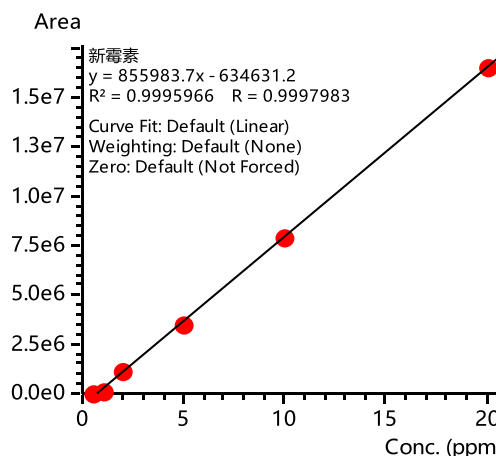


图 4 新霉素标准曲线

表 3 新霉素标准曲线参数

| 名称 | 校准曲线 | 线性范围 (µg/mL) | 相关系数 R ² | 精确度 % |
|-----|----------------------|--------------|---------------------|------------|
| 新霉素 | Y=855983.7X-634631.2 | 0.5~20 | 0.9996 | 90.7~102.9 |

2.2 精密度实验

取低、中、高三个浓度的标准溶液，连续进样 6 次，考察分析方法保留时间和峰面积的重复性。结果表明，新霉素保留时间的 RSD 在 0.14%~0.26% 的范围，峰面积的 RSD 在 2.26%~3.53% 的范围，以上数据表明仪器的精密度良好。

表 4 标准品溶液精密度测试的结果 (n=6)

| 序号 | 1 µg/mL | | 5 µg/mL | | 10 µg/mL | |
|------|---------|--------|---------|---------|----------|---------|
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |
| 1 | 0.891 | 101742 | 0.873 | 3758733 | 0.871 | 8375753 |
| 2 | 0.891 | 102079 | 0.876 | 3582612 | 0.873 | 8342098 |
| 3 | 0.886 | 103143 | 0.874 | 3930733 | 0.869 | 8755579 |
| 4 | 0.888 | 109864 | 0.874 | 3932204 | 0.868 | 8749644 |
| 5 | 0.887 | 108445 | 0.874 | 3806734 | 0.871 | 8647376 |
| 6 | 0.891 | 104651 | 0.873 | 3896736 | 0.870 | 8751999 |
| RSD% | 0.26 | 3.25 | 0.14 | 3.53 | 0.18 | 2.26 |

2.3 样品加标实验

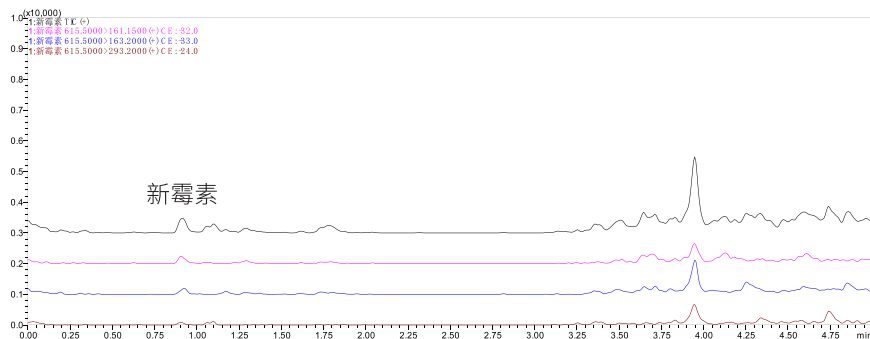


图 5 空白样品色谱图

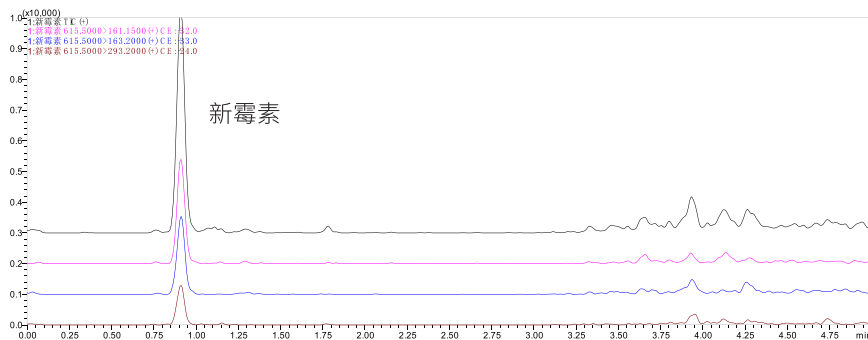


图 6 样品加标色谱图

取动物尿样，按照 1.4 步骤制备样品和加标样品，三个水平加标浓度如下表 5 所示，各样品平行测定 6 次。测试结果显示，新霉素成分的低中高三个梯度的加标回收率分别在 84.23% ~ 89.17%、83.78% ~ 89.60%、84.77% ~ 88.06% 之间，加标回收率 RSD 在 1.25% ~ 2.40% 之间，均满足该检测方法的条件要求。

表 5 样品加标实验结果

| 序号 | 物质名称 | 样品含量平均值 (µg/g) | 样品加标回收率 (%) | | |
|-------------|-------|----------------|-------------|----------|----------|
| | | | 0.6 µg/g | 1.2 µg/g | 2.4 µg/g |
| 1 | 0.891 | 0.873 | 84.23 | 87.22 | 84.77 |
| 2 | 0.891 | 0.876 | 87.90 | 85.98 | 86.01 |
| 3 | 0.886 | 0.874 | 87.87 | 84.82 | 85.92 |
| 4 | 0.888 | 0.874 | 84.60 | 87.48 | 85.68 |
| 5 | 0.887 | 0.874 | 85.40 | 83.78 | 88.06 |
| 6 | 0.891 | 0.873 | 89.17 | 89.60 | 86.20 |
| 回收率 RSD (%) | | | 2.36 | 2.40 | 1.25 |

2.4 灵敏度实验

将最低浓度为 0.5 µg/mL 的新霉素基质标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定。通过软件计算得检出限和定量限；新霉素的检出限和定量限如下表 6 所示。在上述条件下，新霉素物质的 LOD=0.055 µg/mL (11.0 ng/g)，LOQ=0.170 µg/mL (34.0 ng/g)，测试结果表明仪器灵敏度良好，满足《进出口食用动物中新霉素药物残留测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》的测定低限 LOQ=100 ng/g 的要求。

表 6 检出限和定量限

| 名称 | 检出限 (µg/mL) | 定量限 (µg/mL) |
|-----|-------------|-------------|
| 新霉素 | 0.055 | 0.170 |

■ 结论

本实验使用岛津 LCMS-8050 液质联用仪，参照中华人民共和国海关总署发布的《进出口食用动物中新霉素药物残留测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》，建立了针对食用动物产品中新霉素残留量的超快速检测方法。该检测方法表明，新霉素在 0.5~20 µg/mL 的范围内线性良好；精密度实验中，新霉素保留时间的 RSD 分布在 0.14%~0.26% 的范围，峰面积的 RSD 分布在 2.26%~3.53% 的范围，仪器精密度良好；样品三个梯度的加标回收率分布在 83.78% ~ 89.60% 之间，满足方法要求；新霉素物质的灵敏度 LOD=0.055 µg/mL (11.0 ng/g)，LOQ=0.170 µg/mL (34.0 ng/g)，测试结果表明仪器灵敏度良好，满足《进出口食用动物中新霉素药物残留测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》的灵敏度 LOQ=100 ng/g 的要求。岛津 LCMS-8050 液质联用仪具有分析速度快、稳定性好、结果准确度高等特点，满足《进出口食用动物中新霉素药物残留测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》的方法需求，也适用于多种相关行业的质量控制及分析检验工作。

岛津应用云

