

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中林可胺类抗生素残留

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-8030 联用快速测定水产品中林可胺类抗生素的方法。水产品经处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行分析。盐酸林可霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$; 盐酸克林霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 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 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 林可霉素、克林霉素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 0.31%和 3.95%以下,系统精密度良好。

关键词: 林可胺类抗生素 林可霉素 克林霉素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

林可胺类抗生素(Lincomycin)又叫洁霉素,是由放线杆菌或小单孢菌产生的一类抗生素。主要对革兰阳性菌、某些厌氧菌和霉形体有较强抗菌作用,抗菌谱较红霉素窄。金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎球菌及猪肺炎霉形体、鸡败血霉形体对本品敏感,但肠球菌一般对本品耐药;厌氧菌如拟杆菌、破伤风杆菌、梭状芽孢杆菌、魏氏梭菌、消化球菌等对本品敏感。主要用治疗革兰阳性菌特别是耐青霉素的革兰阳性菌所引起的各种感染,霉形体引起的家禽慢性呼吸道病、猪喘气病,厌氧菌感染如鸡的坏死性肠炎等,也用于治疗猪密螺旋体

痢疾、弓形体病和狗、猫的放线菌病。

《GB/T2020762-2006.20 畜禽肉中林可霉素竹桃霉素红霉素替米考星泰乐菌素克林霉素螺旋霉素吉它霉素交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》规定,林可霉素的最大残留限量(MRL)为 1.0 $\mu\text{g/kg}$;克林霉素的最大残留限量(MRL)为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。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-8030 联用,建立了一种测定水产品中林可霉素和克林霉素的方法,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-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2(输液泵), DGU-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-8030(三重四极杆质谱仪), 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 II (2.0 mm I.D.×75 mm L., 2.2 μm)

流 动 相：A—0.1 %甲酸水溶液；B—甲醇

流 速：0.2 mL/min

进样体积：10 μL

柱 温：40℃

洗脱方式：等度洗脱，B 相:80%。

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

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：100 ms

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	林可霉素	407.3	126.1*	-20	-40	-17
			359.3	-20	-20	-27
2	克林霉素	425.3	126.1*	-21	-50	-10
			377.3	-21	-20	-28

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 1

表 1. MRM 参数

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：准确称取适量林可霉素、克林霉素标准物质，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、5、10、20、50、100 μg/L 的标准工作液。

样品前处理方法：水产品的制备、净化、提取参照《GB/T2020762-2006.20 畜禽肉中林可霉素竹桃霉素红霉素替米考星泰乐菌素克林霉素螺旋霉素吉它霉素交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

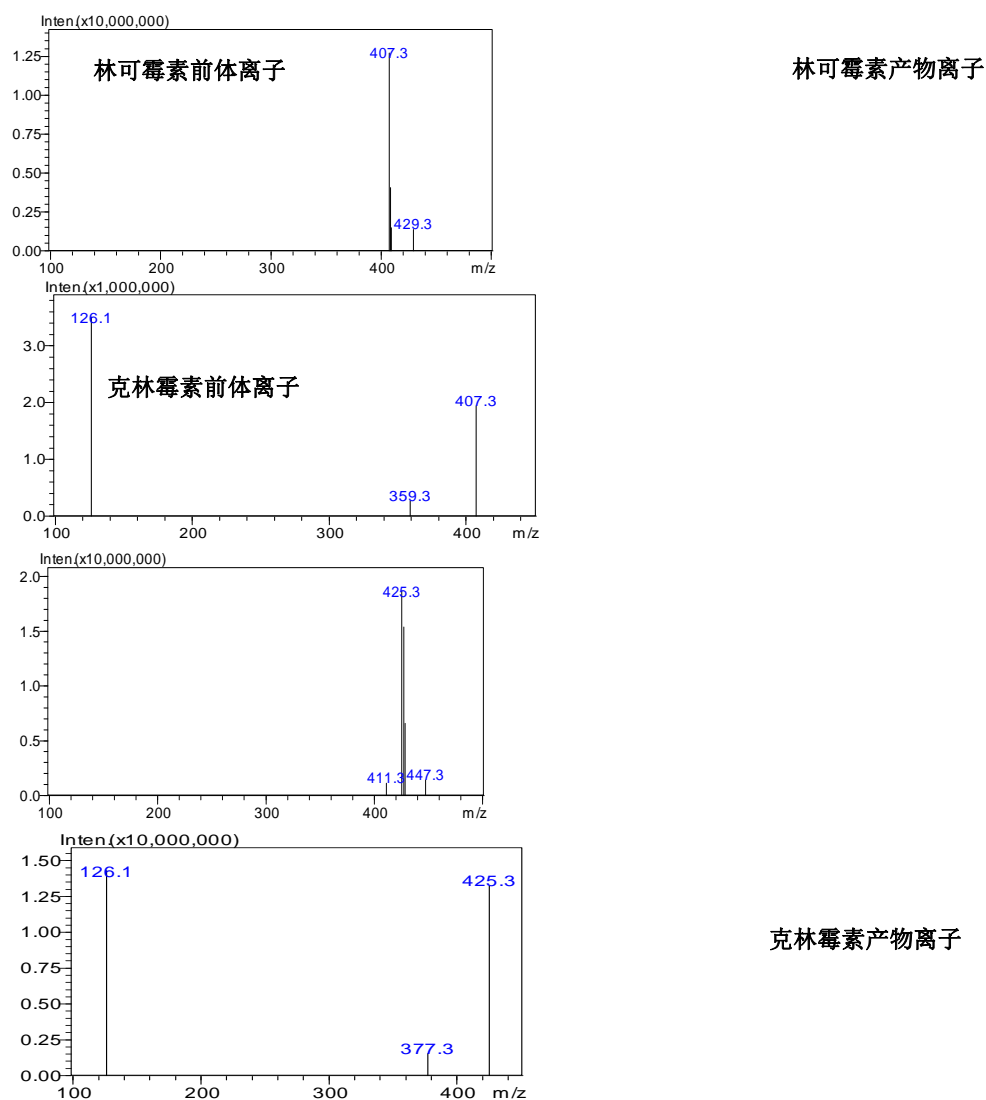


图 1. 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 2 为 50 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱，林可霉素、克林霉素在 6 分钟内得到了快速检测。

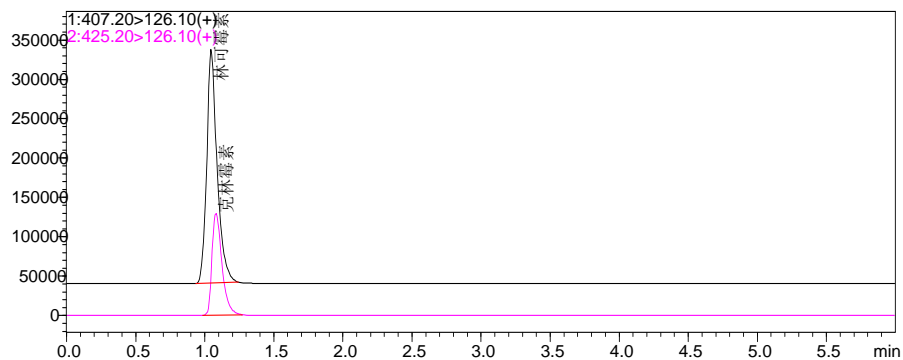


图 2. 林可胺类抗生素 50 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 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。林可霉素在 1~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好；克林霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数见表 2。

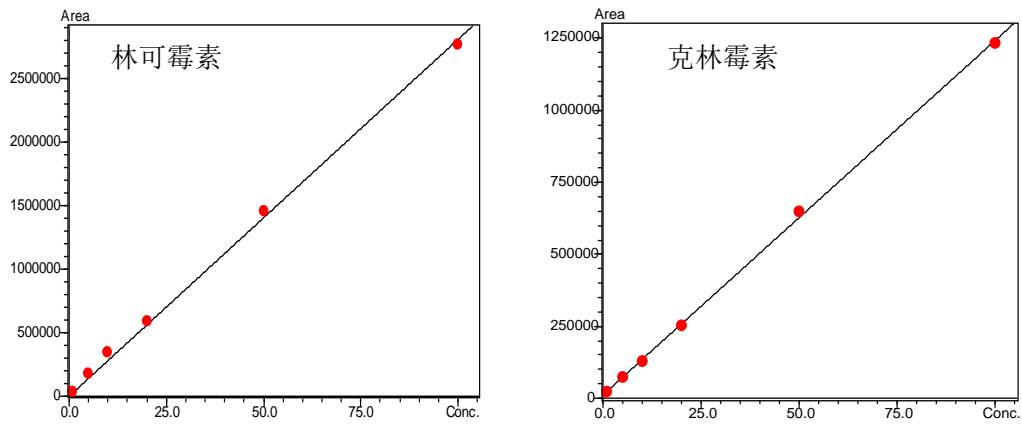


图 3. 林可霉素和克林霉素的标准工作曲线

表 2. 林可霉素和克林霉素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围
1	林可霉素	$Y = 28070.0X$	0.9996	1-100
2	克林霉素	$Y = 12478.9X$	0.9997	1-100

2.4 检出限和定量限

配制浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 标样 7 份，直接进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 $\text{LOD} = 3.3S$ ，定量限 $\text{LOQ} = 10S$ 。测定结果如表 3 所示：

表 3 林可霉素和克林霉素的检出限和定量限

No.	名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
1	林可霉素	0.07	0.22	0.68
2	克林霉素	0.04	0.13	0.39

2.5 精密度实验

对 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 林可霉素、克林霉素混合标准溶液连续 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% (1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
林可霉素	0.31	3.01	0.11	2.37	0.17	2.82
克林霉素	0.26	3.95	0.19	3.26	0.16	3.21

2.6 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浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的林可霉素、克林霉素混合标样，水产品基质空白色谱图如图 4 所示，水产品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。

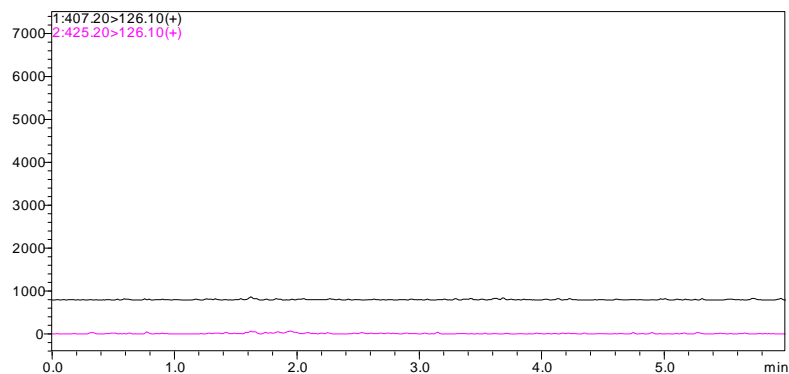


图 4. 水产品空白基质色谱图

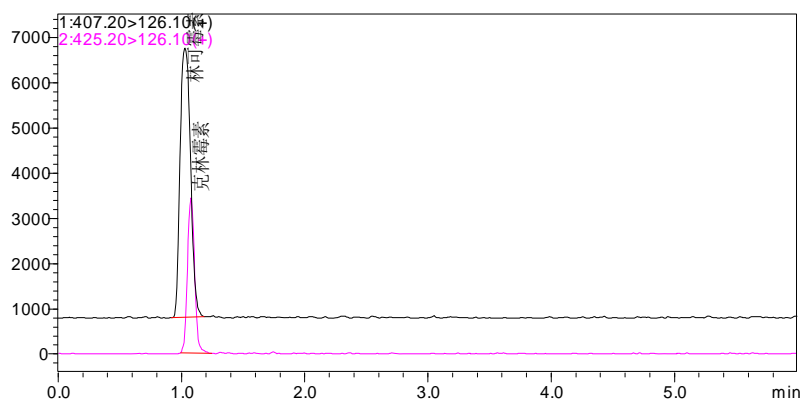


图 5. 水产品空白基质加标样品的色谱图

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-8030 联用测定水产品中林可霉素、克林霉素的方法。该方法灵敏度高，精密度良好；林可霉素、克林霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9996 以上。在经样品前处理后的水产品空白基质中添加混合标样，基质加标样品有很好的响应，满足标准检测要求。