

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定水产品中 5 种四环素类抗生素的残留

LCMSMS-072

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定鱼肉中 5 种四环素类抗生素残留的方法。鱼肉样品中的四环素类抗生素经固相萃取富集后，使用超高效液相色谱 LC-30A 在 4 min 内实现快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。以外标法绘制 5 种四环素类抗生素的校准曲线，四环素、去甲基金霉素和强力霉素的校准曲线线性范围在 0.1~100 μg/L 间，土霉素和金霉素的线性范围在 0.1~50 μg/L 间；相关系数均在 0.9977 以上。对 1 μg/L、10 μg/L 和 100 μg/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的相对标准偏差分别在 0.64%~0.81% 和 0.70%~2.90% 之间，系统精密度良好。其检出限为 0.035~0.057 μg/L，定量限为 0.138~0.226 μg/L，样品加标回收率在 105~120% 之间，满足四环素类抗生素的检测需求。

关键词：四环素 抗生素 三重四极杆质谱 水产品

近年来，我国水产养殖业发展迅猛。但随着养殖业集约化程度提高，养殖病害日益严峻，各类药物在生产中广泛使用，药物残留问题日益突出。四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 是临床上广泛应用的广谱抗生素，但其并不能被动物完全吸收，有相当部分以原形或代谢物形式进入食物链和环境中，间接对人体健康造成影响。

高效液相色谱 - 串联质谱联用技术是近年来发展很快的分析技术，具有高的选择性和灵敏度，对复杂基体

中的药物残留具有准确的定性能力。本文主要参考《GB/T 21317-2007 动物源食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱 - 质谱 / 质谱法与高效液相色谱法》，使用岛津超快速液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了测定水产品中四环素类兽药残留量的方法，此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，供相关检测人员参考。

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×2 输液泵，DGU-20A5 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-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm I.D. × 75 mm L., 1.6 μm 粒径。

流动相：A - 0.1% 甲酸的水溶液；B - 甲醇

流速：0.5 mL/min

柱温：30℃

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
3.00	Pumps	Pump B Conc.	95
3.01	Pumps	Pump B Conc.	15
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI(+)

离子喷雾电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
四环素	445.10	410.15*	-16	-20	-28
		427.25	-16	-14	-21
土霉素	461.10	426.15*	-22	-19	-30
		443.15	-22	-12	-22
去甲基金霉素	465.10	448.10*	-17	-17	-30
		430.05	-17	-21	-30
金霉素	479.05	444.10*	-23	-22	-30
		462.15	-16	-14	-21
强力霉素	445.05	428.25*	-16	-19	-30
		410.05	-16	-38	-29

注: *表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制: 称取适量五种标准物质, 分别为四环素、土霉素、去甲基金霉素、金霉素和强力霉素, 用甲醇配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液溶液, 用流动相初始比例稀释成浓度为 0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。

样品前处理方法: 鱼肉样品的制备、净化、提取参照《GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法液相色谱 - 质谱 / 质谱法与高效液相色谱法》。

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

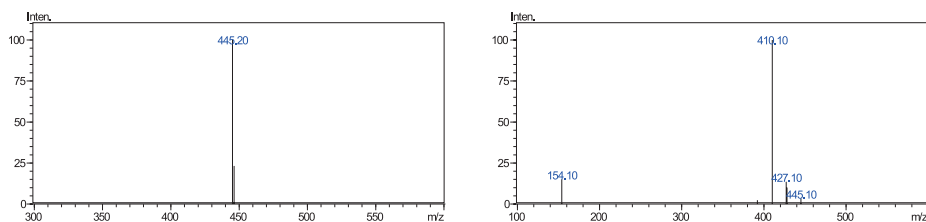


图1 四环素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-18V)

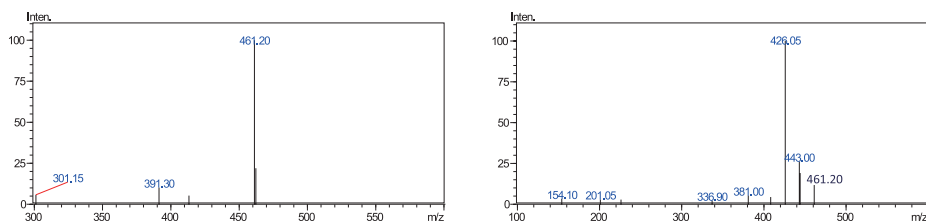


图2 土霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-19V)

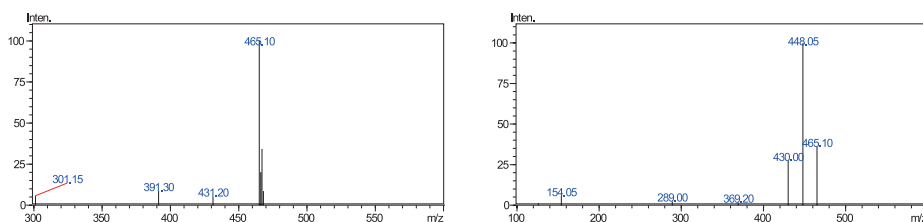


图3 去甲金霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-19V)

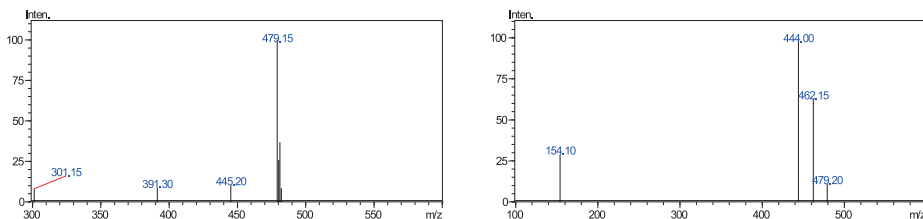


图4 金霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-23V)

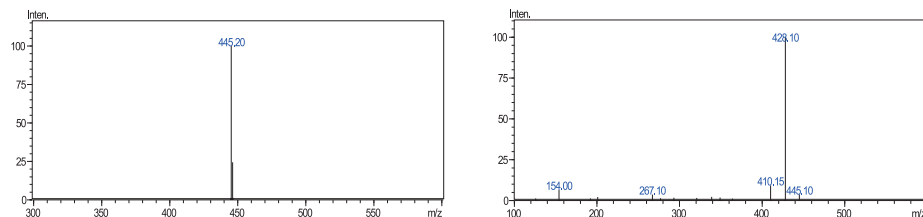


图5 强力霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-25V)

2.2 标准样品的MRM 色谱图

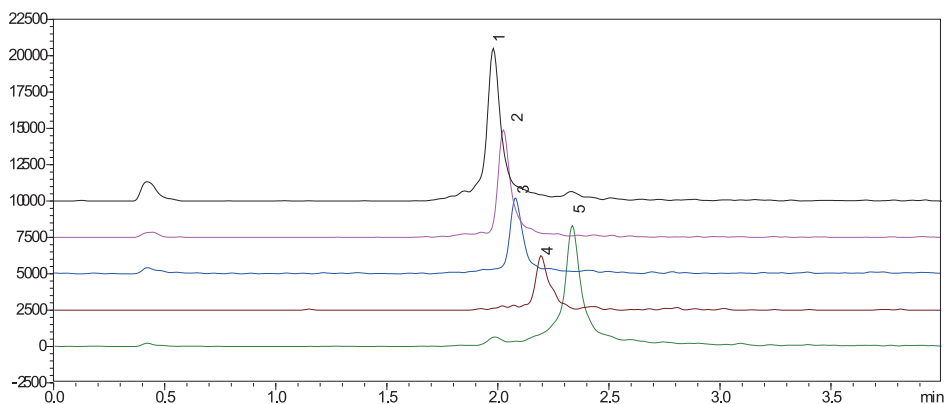


图6 标准样品的MRM色谱图(1 µg/L)

(1、四环素;2、土霉素;3、去甲基金霉素;4、金霉素;5、强力霉素)

2.3 线性范围

将0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 µg/L不同浓度的混合标准工作液按1.2中的分析条件进行测定,外标法定量。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制校准曲线如图7~11所示;所得校准曲线线性关系良好,线性方程及相关系数见表3。

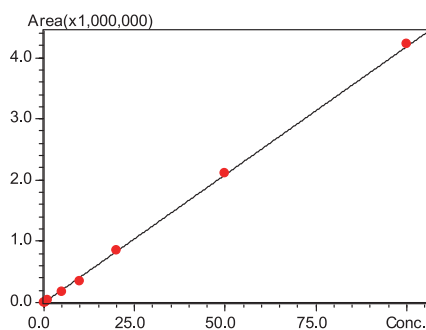


图7 四环素校准曲线

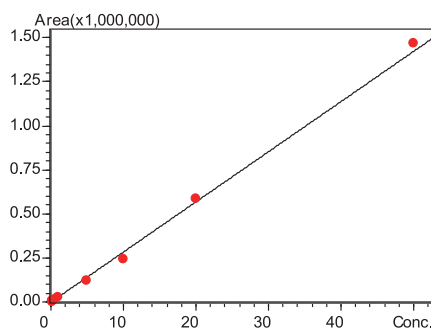


图8 土霉素标准曲线

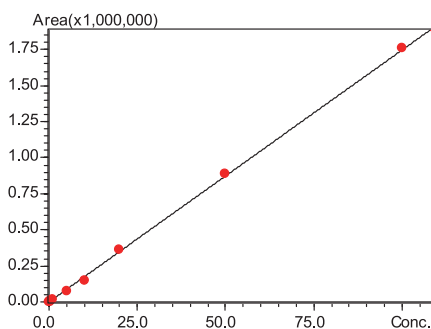


图9 去甲金霉素标准曲线

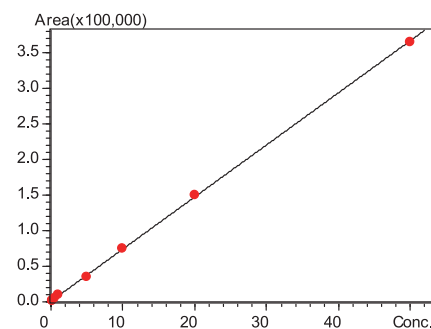


图10 金霉素标准曲线

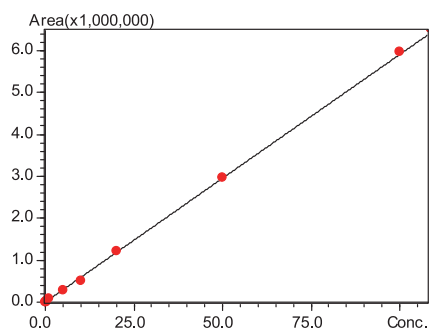


图11 强力霉素标准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围(μg/L)	相关系数 r
1	四环素	$Y = (41813.3)X + (-1335.28)$	0.1~100	0.9990
2	土霉素	$Y = (28472.3)X + (-1268.34)$	0.1~50	0.9977
3	去甲基金霉素	$Y = (17475.7)X + (-7.52695)$	0.1~100	0.9989
4	金霉素	$Y = (7312.66)X + (984.523)$	0.1~50	0.9989
5	强力霉素	$Y = (59025.7)X + (1741.35)$	0.1~100	0.9993

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，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。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.64% ~0.81% 和 0.70% ~ 2.90% 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 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
四环素	0.81	2.1	0.65	1.6	0.74	0.70
土霉素	0.79	1.5	0.65	1.6	0.73	0.89
去甲基金霉素	0.81	2.0	0.64	1.8	0.73	0.84
金霉素	0.79	2.4	0.65	1.6	0.73	1.16
强力霉素	0.81	2.9	0.65	2.0	0.73	1.40

2.5 检出限

配制浓度为 0.1 µg/L 标样, 直接进样 7 针分析, 对上述结果剔除利群值后将各自的 7 次测定结果计算标准偏差 S, 此时检出限 MDL = 3.14 × S, 定量下限 LOQ=4 × MDL。测定结果如表 5 所示。

表 5 四环素类抗生素的检出限和定量下限

No.	名称	标准偏差(SD)	检出限(µg/L)	定量下限(µg/L)
1	四环素	0.011	0.035	0.14
2	土霉素	0.013	0.041	0.16
3	去甲基金霉素	0.012	0.038	0.15
4	金霉素	0.018	0.057	0.23
5	强力霉素	0.014	0.044	0.18

2.6 回收率实验

在按照 1.3 中样品制备方法, 样品中添加 0.1 µg/kg 混合标样, 空白鱼肉基质色谱图和基质加标色谱图如图 12、图 13 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。

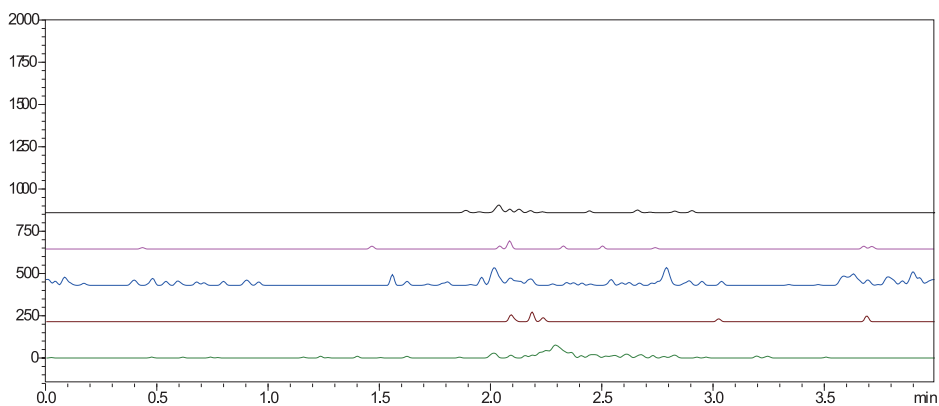


图 12 鱼肉样品的 MRM 色谱图

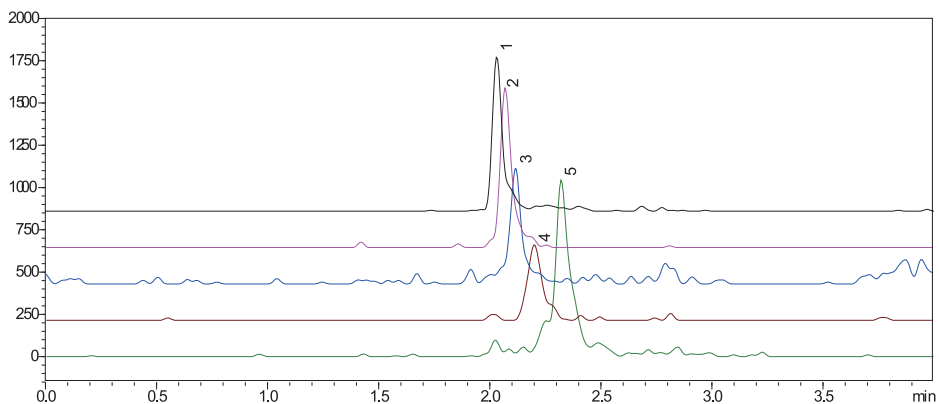


图13 鱼肉加标0.1 μg/kg样品的MRM色谱图
 (1、四环素;2、土霉素;3、去甲基金霉素;4、金霉素;5、强力霉素)

表6 四环素类抗生素加标回收率结果

No.	名称	样品1 实测浓度(μg/kg)	样品2 实测浓度(μg/kg)	平均回收率 (%)
1	四环素	0.10	0.11	105
2	土霉素	0.13	0.11	120
3	去甲基金霉素	0.11	0.11	110
4	金霉素	0.11	0.09	100
5	强力霉素	0.12	0.11	115

结论

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 联用测定鱼肉样品中的四环素类抗生素残留量的检测方法。该方法在 4 min 之内完成 5 种四环素的分离分析, 四环素、去甲基金霉素和强力霉素的校准曲线线性范围在 0.1~100 μg/L 间, 土霉素和金霉素的线性范围在 0.1~50 μg/L 间; 五种四环素相关系数均在 0.9977 以上。对 1 μg/L、10 μg/L 和 100 μg/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的相对标准偏差分别介于 0.64%~0.81% 和 0.70%~2.90% 之间, 系统精密度良好。其检出限为 0.035~0.057 μg/L, 定量限为 0.138~0.226 μg/L, 样品加标回收率在 105~120% 之间。该方法具有分析速度快、重复性好、灵敏高的特点, 适合鱼肉中四环素、土霉素、去甲基金霉素、金霉素和强力霉素的检测。