

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱检测水产品中的大环内酯类抗生素的残留

LCMSMS-073

**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水产品中 5 种大环内酯类抗生素的方法。样品经提取后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。5 种大环内酯类抗生素在 3 分钟内得到快速分离和检测。螺旋霉素在 0.5~100 μg/L，北里霉素和泰乐菌素在 0.2~50 μg/L，红霉素和替米考星在 0.2~100 μg/L 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9951 以上；对 2 μg/L、20 μg/L 和 50 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相对标准偏差分别在 0.05~1.13% 和 0.85~2.43% 之间，系统精密度良好；检出限为 0.016~0.11 μg/L，定量限为 0.063~0.38 μg/L，加标回收率介于 84.0~104.0% 之间，适合水产品中大环内酯类抗生素的检测。

**关键词：** 水产品 大环内酯类抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

近年来，我国水产养殖业发展迅猛，由于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，水产品药物残留问题日益突出。大环内酯类抗生素 (Macrolide Antibiotics) 是一类用量大、使用范围广且容易进入环境水体的抗生素，在水体中多以痕量存在，因此检测难度较大。本文主要参考《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内酯类抗生素残留检

测方法 第 2 部分：高效液相色谱串联质谱法》，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水产品中 5 种常见大环内酯类抗生素(螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素、北里霉素、红霉素)的方法，并采用所建立的方法对市售鱼肉的该类抗生素污染状况进行了检测，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. × 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℃  
 洗脱方式：梯度洗脱；B 相初始浓度为 15%，时间

程序见表 1。

#### 质谱条件

分析仪器： LCMS-8040  
 离子源： ESI，正离子扫描  
 离子源接口电压： ESI(+), 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  
 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： 30 ms  
 延迟时间： 3 ms  
 MRM 参数： 见表 2

表1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	60
1.01	Pumps	Pump B Conc.	85
1.30	Pumps	Pump B Conc.	90
1.40	Pumps	Pump B Conc.	15
3.00	Controller	Stop	

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	843.6	174.15*	30	-41	-18
			101.10	-30	-48	-11
2	北里霉素	772.45	109.15*	-22	-45	-22
			174.15	-22	-34	-18
3	红霉素	734.50	158.10*	-40	-31	-17
			576.35	-40	-20	-28
4	替米考星	869.65	174.10*	-24	-49	-18
			696.50	-24	-51	-25
5	秦乐菌素	916.60	174.10*	-20	-43	-18
			101.50	-20	-51	-11

\*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、秦乐菌素、北里霉素、红霉素 5 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 0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 μg/L 的标准工作液。

样品前处理方法：具体参考出入境检验检疫行业标准《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内脂类抗生素残留检测方法 第 2 部分：高效液相色谱串联质谱法》。

## 结果讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描

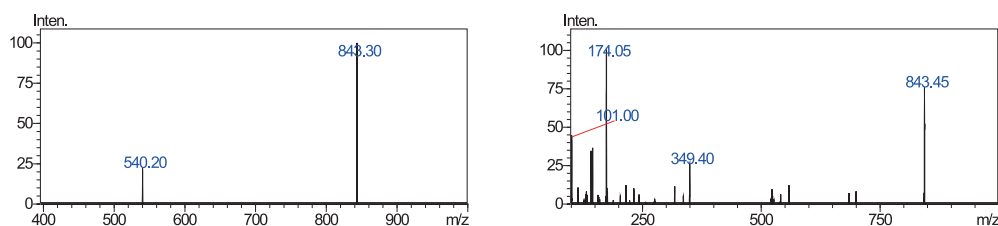


图1 螺旋霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-20V)

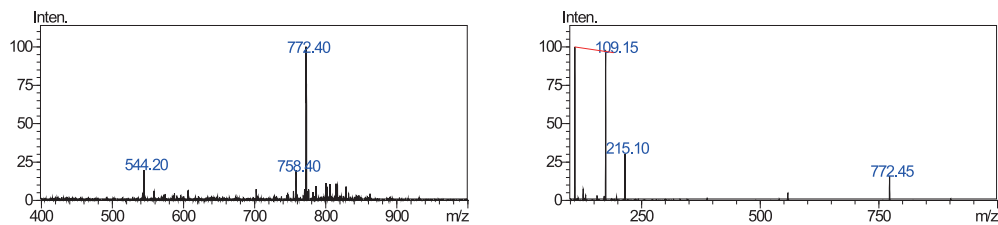


图2 北里霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-32V)

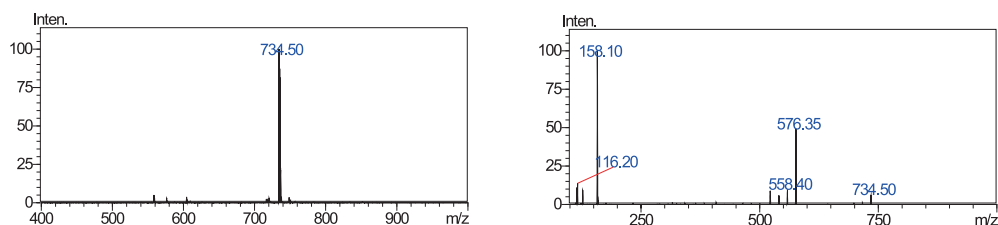


图3 红霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-25V)

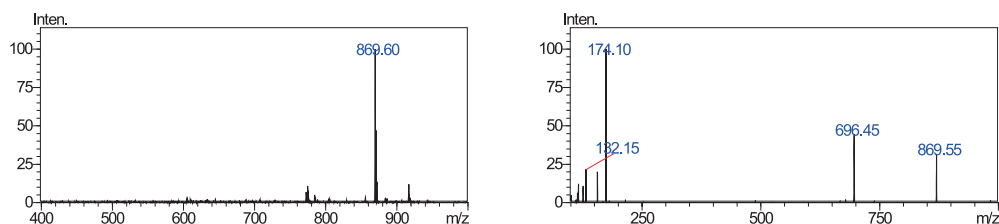


图4 替米考星一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-45V)

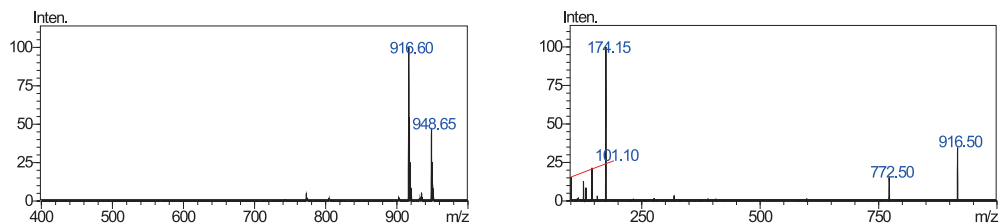


图5 泰乐霉素一级质谱图(左)和产物离子扫描图(CE值-35V)

## 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 6 为混合标准样品的 MRM 色谱图，5 种大环内酯类抗生素在 3 分钟内得到了快速检测。

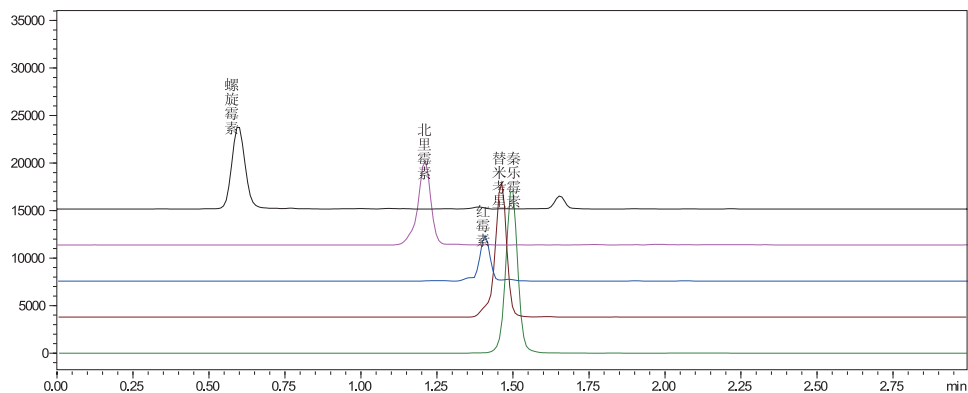


图6 大环内酯类抗生素标准样品的MRM色谱图(1 $\mu$ g/L)

## 2.3 线性关系

将浓度为 0.2、0.5、1、5、10、20、50、100  $\mu$ 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 7 至图 11 所示。螺旋霉素在 0.5~100  $\mu$ g/L，北里霉素和泰乐菌素在 0.2~50  $\mu$ g/L，红霉素和替米考星在 0.2~100  $\mu$ g/L 范围内线性良好。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

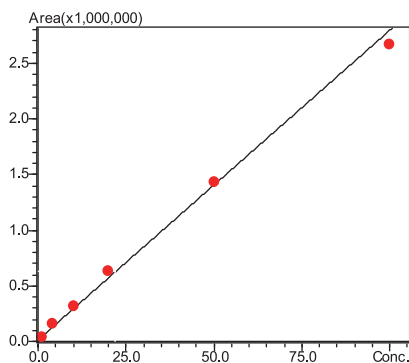


图 7 螺旋霉素校准曲线

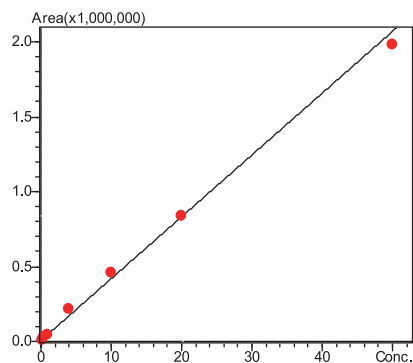


图 8 北里霉素校准曲线

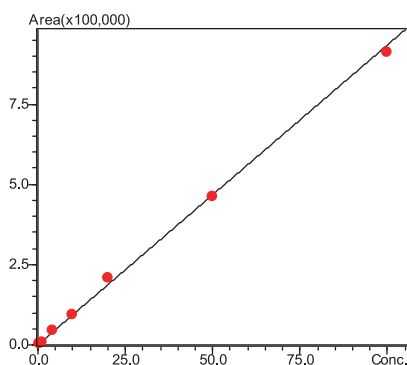


图 9 红霉素校准曲线

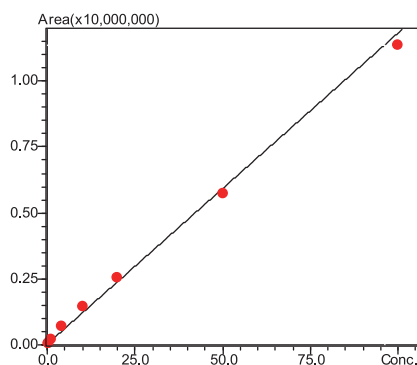


图 10 替米考星校准曲线

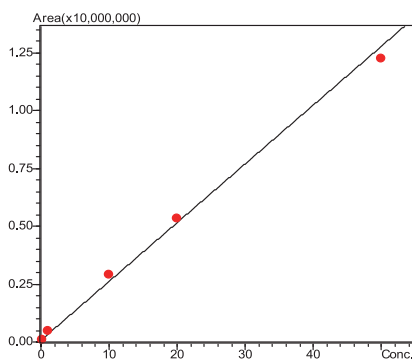


图 11 秦乐菌素校准曲线

表3 5种大环内酯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
1	螺旋霉素	$Y = (28081.2)X + (6171.18)$	0.9970	0.5-100
2	北里霉素	$Y = (41302.3)X + (6801.93)$	0.9969	0.2-50
3	红霉素	$Y = (9338.55)X + (522.514)$	0.9988	0.2-100
4	替米考星	$Y = (117967)X + (27799.9)$	0.9951	0.2-100
5	秦乐菌素	$Y = (254080)X + (75500.2)$	0.9959	0.2-50

#### 2.4 精密度实验

对 2 μg/L、20 μg/L 和 50 μg/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 0.05~1.13% 和 0.85~2.43 % 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% (2 μg/L)		RSD% (20 μg/L)		RSD% (50 μg/L)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
螺旋霉素	1.13	2.01	0.67	1.37	0.42	1.10
北里霉素	0.13	1.35	0.11	0.85	0.19	0.88
红霉素	0.10	2.12	0.08	1.88	0.08	1.78
替米考星	0.08	2.43	0.05	2.01	0.08	2.22
秦乐菌素	0.05	2.11	0.07	1.28	0.07	1.20

## 2.5 检出限

配制浓度为 0.5 μg/L 标样 7 份，直接进样分析，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 SD，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 大环内酯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	螺旋霉素	0.030	0.095	0.38
2	北里霉素	0.025	0.078	0.31
3	红霉素	0.035	0.11	0.44
4	替米考星	0.0050	0.016	0.063
5	泰乐菌素	0.010	0.033	0.13

## 2.6 基质加标实验

在按照 1.3 中样品制备方法，样品中添加 0.5 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好的响应。

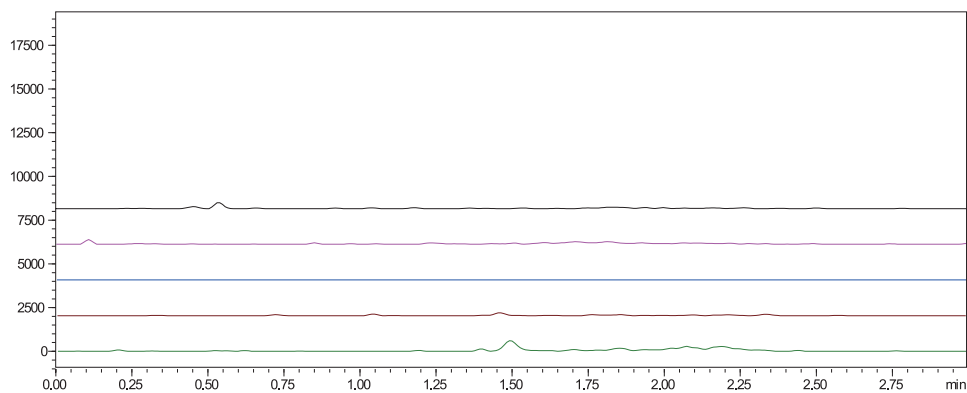


图12 鱼肉空白基质样品的色谱图

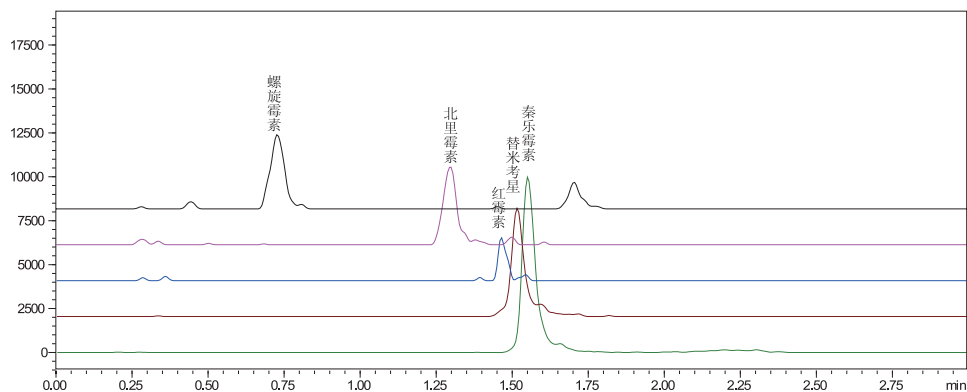


图13 鱼肉空白基质加标样品的色谱图

表6 大环内酯类抗生素加标回收率结果

No.	名称	样品1 实测浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	样品2 实测浓 度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率 (%)
1	螺旋霉素	0.42	0.47	89.0
2	北里霉素	0.41	0.50	91.0
3	红霉素	0.38	0.46	84.0
4	替米考星	0.53	0.51	104.0
5	秦乐菌素	0.44	0.48	93.0

## ■ 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 联用测定鱼肉 5 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;螺旋霉素在 0.5~100  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,北里霉素和秦乐菌素在 0.2~50  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,红霉素和替米考星在 0.2~100  $\mu\text{g}/\text{L}$  范围内线性良好,标准曲线的相关系数均在 0.9951 以上;检出限为 0.016~0.11  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,定量限为 0.063~0.38  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,加标回收率介于 84.0~104.0% 之间,适合水产品中螺旋霉素、替米考星、秦乐菌素、北里霉素和红霉素的检测。