

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定有机肥中多种抗生素残留

LCMSMS-277

**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-8045 联用测定有机肥中四环素类、青霉素类、喹诺酮类、磺胺类等 15 种抗生素的方法。该方法在 12 min 内完成 15 种抗生素的分析，校准曲线的相关系数均在 0.995 以上，线性良好；低、中、高不同浓度抗生素的混合标准溶液平行测试 6 次，15 种抗生素的保留时间和峰面积相对标准偏差 (RSD) 分别在 0.01~0.46% 和 0.29~7.09% 之间，表明仪器精密度良好；灵敏度考察结果表明，15 种抗生素的定量限在 0.004~0.135 ng/mL 的范围内；加标浓度为 0.5 ng/mL 和 5 ng/mL 的样品进样检测，加标回收率在 82.2~104.8% 之间。该方法具有分析速度快、重复性好、灵敏度高的特点，在满足新国标 (GB/T32951-2016) 中四环素类抗生素残留检测的同时，可用于有机肥中青霉素类、喹诺酮类、磺胺类等抗生素残留检测。

**关键词：**有机肥抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

随着养殖业的快速发展，抗生素被广泛用作畜禽饲料添加剂，用于预防和治疗畜禽疾病，促进畜禽生长。研究表明，动物体内的抗生素以母体或代谢物的形式随尿或粪便排出体外的量，约占用药量的 40%~90%，以畜禽粪便为主要肥料的有机肥因含有丰富的有机质及氮、磷元素广泛用于农业生产。然而由于处理技术的有限性，有机肥生产过程中并不能有效降解去除抗生素，含有抗生素有机肥的施用会直接造成土壤污染，尤其是含有易吸附的四环素类抗生素畜禽粪便施用于农田时，会与土壤颗粒紧密结合形成稳定的化合物长期存在，对农田土壤造成污染，并诱发和传播各类抗生素耐药细菌，威胁着人类的健康与生存环境。

目前，我国现行的有机肥标准主要为《有机肥料》(NY525-2012) 和《生物有机肥》(NY884-2012)，该类标准中规定了有机质、总养分、重金属含量等技术指标，

但未将抗生素的残留指标列入其中。针对我国目前缺少有机肥中抗生素含量检测方法标准，2016 年 8 月，国家质量监督检验检疫总局、国家标准化管理委员会批准发布了《有机肥料中土霉素、四环素、金霉素的含量测定高效液相色谱法》(GB/T32951-2016)，该标准于 2017 年 3 月 1 日起实施，这不仅为有机类肥料产品标准中设定四环素类抗生素残留限值指标提供了一种重要的检测方法，也为畜禽粪便加工企业优化处理工艺提供了检测技术支撑。

本文参考《有机肥料中土霉素、四环素、金霉素的含量测定高效液相色谱法》(GB/T32951-2016) 中样品前处理方法，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统，测定有机肥料中 15 种抗生素残留。

## 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-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵)，DGU-20A<sub>SR</sub>(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-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

液相色谱条件

柱温：40°C

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

进样量：10 μL

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 - 乙腈

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，洗脱程序见表 1

流速：0.3 mL/min

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
3.00	Pumps	Pump B Conc.	35
5.50	Pumps	Pump B Conc.	90
8.00	Pumps	Pump B Conc.	90
8.10	Pumps	Pump B Conc.	10
12.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI

加热模块温度：400°C

雾化气流速：3.0 L/min

干燥气流速：10.0 L/min

加热气流速：10.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

接口温度：300°C

驻留时间：8 ms

DL 温度：250°C

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

名称	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
阿莫西林	Amoxicillin	26787-78-0	366.2	114.00*	-26.0	-22.0	-20.0
				349.20	-26.0	-10.0	-17.0
林可霉素	Lincomycin	154-21-2	407.3	126.10*	-20.0	-40.0	-17.0
				359.30	-20.0	-20.0	-27.0
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	68-35-9	251.0	156.00*	-30.0	-15.0	-29.0
				92.10	-30.0	-25.0	-17.0
氨苄西林	Ampicillin	69-53-4	350.2	106.10*	-17.0	-23.0	-11.0
				114.10	-17.0	-30.0	-19.0
磺胺噻唑	Sulfathiazole	72-14-0	256.0	156.00*	-30.0	-14.0	-30.0
				92.10	-30.0	-28.0	-17.0
环丙沙星	Ciprofloxacin	85721-33-1	332.2	314.10*	-13.0	-16.0	-24.0
				231.00	-13.0	-44.0	-18.0
左氧氟沙星	Levofloxacin	100986-85-4	362.1	318.10*	-11.0	-20.0	-21.0
				261.10	-11.0	-28.0	-17.0
磺胺吡啶	Sulfapyridine	144-83-2	250.0	156.00*	-30.0	-16.0	-29.0
				92.10	-30.0	-27.0	-17.0
土霉素	Oxytetracyclin	79-57-2	461.2	426.00*	-14.0	-18.0	-23.0
				443.10	-14.0	-14.0	-24.0

四环素	Tetracycline	60-54-8	445.2	410.20*	-11.0	-22.0	-30.0
				427.00	-11.0	-16.0	-23.0
金霉素	Aureomycin	57-62-5	479.2	444.10*	-12.0	-24.0	-23.0
				154.10	-12.0	-28.0	-12.0
强力霉素	Doxycycline	564-25-0	445.1	428.05*	-16.0	-18.0	-30.0
				154.05	-11.0	-32.0	-30.0
磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	57-68-1	279.0	186.00*	-30.0	-17.0	-20.0
				92.10	-30.0	-31.0	-17.0
氯霉素	Chloramphenicol	56-75-7	321.00	152.10*	22.0	17.0	27.0
				257.10	22.0	11.0	26.0
苯唑西林	Oxacillin	66-79-5	400.1	259.10*	29.0	13.0	19.0
				356.25	30.0	8.0	14.0

注：\*表示定量离子对

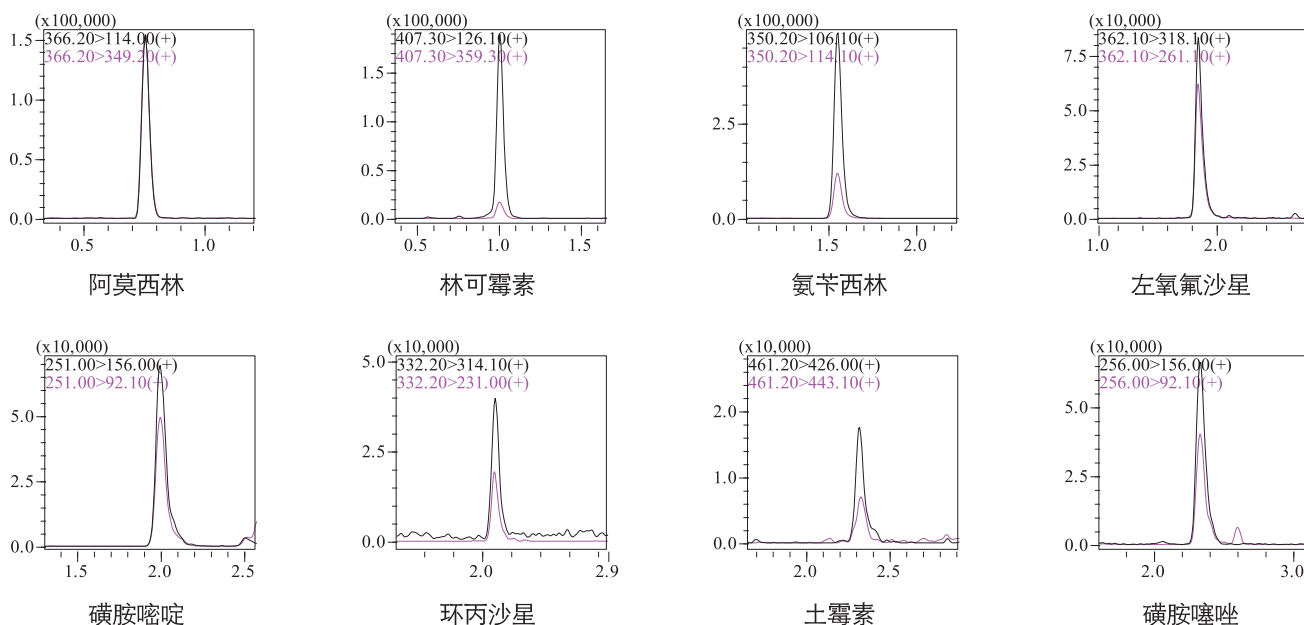
### 1.3 标准溶液的配制

精确称取适量标准品，用甲醇溶解配制成浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的 15 种抗生素混合标准品储备液，使用空白基质稀释成浓度为 0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 的混合标准溶液（以土霉素的标准曲线浓度为例）。样品前处理方法：参照 GB/T 32951-2016《有机肥料中土霉素、四环素、金霉素与强力霉素的含量测定》中的样品提取和净化方法，进样检测。

## 结果讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱图如图 1 所示。



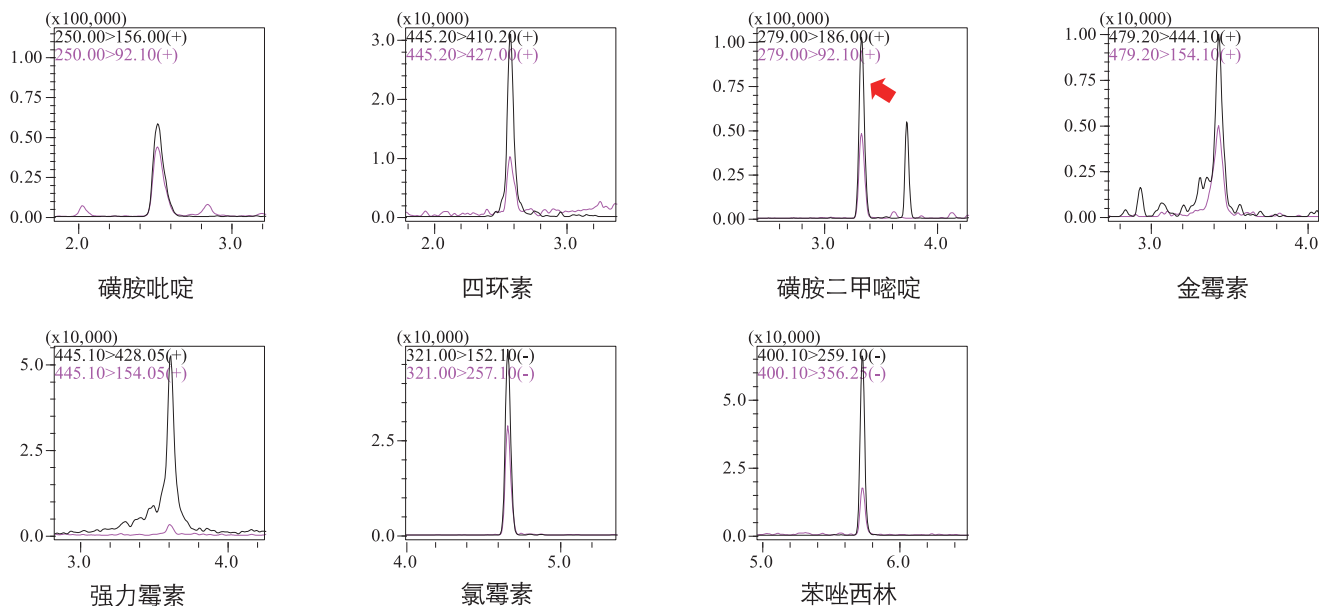


图1 浓度为1 ng/mL(以土霉素的校准曲线浓度为例)标准品的MRM色谱图

## 2.2 线性关系

样品经提取和净化方法处理后，得到空白基质提取液，使用该基质溶液稀释储备液，配制成不同浓度的标准工作液，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，外标法制作校准曲线，线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

表3 校准曲线参数(线性回归，权重为1/C<sup>2</sup>)

序号	化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
1	阿莫西林	$Y = (31256.8)X + (5907.03)$	1~200	93.8~113.7	0.9967
2	林可霉素	$Y = (373554)X + (186159)$	0.1~50	94.0~110.4	0.9976
3	氨苄西林	$Y = (151576)X + (-9683.21)$	1~500	91.2~107.0	0.9984
4	左氧氟沙星	$Y = (107361)X + (215994)$	0.2~50	90.4~111.7	0.9963
5	磺胺嘧啶	$Y = (263530)X + (26112.5)$	0.1~50	88.6~110.1	0.9965
6	环丙沙星	$Y = (45160.1)X + (95808.1)$	0.2~50	91.3~109.4	0.9972
7	土霉素	$Y = (41615.1)X + (16467.2)$	0.1~50	92.1~105.4	0.9989
8	磺胺噻唑	$Y = (276746)X + (27313.8)$	0.1~20	93.1~104.6	0.9988
9	磺胺吡啶	$Y = (237308)X + (30237.9)$	0.1~20	90.5~107.7	0.9979
10	四环素	$Y = (97960.6)X + (4577.06)$	0.1~50	95.6~107.4	0.9987
11	磺胺二甲嘧啶	$Y = (314461)X + (10821.7)$	0.1~50	94.3~109.6	0.9984
12	金霉素	$Y = (24763.0)X + (9419.09)$	0.1~50	86.7~111.0	0.9955
13	强力霉素	$Y = (114771)X + (30987.1)$	0.2~50	91.5~109.1	0.9976
14	氯霉素	$Y = (11132.6)X + (1469.11)$	1~100	92.2~108.0	0.9971
15	苯唑西林	$Y = (15531.9)X + (-1257.09)$	1~500	95.5~106.2	0.9993

### 2.3 精密度实验

使用空白基质配制不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样 (以土霉素的 标准曲线浓度为 例), 考察仪器的精密度, 结果如表 4 所示, 保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.01~0.46% 和 0.29~7.09% 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)

序号	样品名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	阿莫西林	0.09	3.62	0.08	2.65	0.03	1.61
2	林可霉素	0.26	3.56	0.25	1.73	0.10	1.41
3	氨苄西林	0.37	2.02	0.39	0.89	0.13	0.29
4	左氧氟沙星	0.45	3.51	0.46	1.34	0.16	0.79
5	磺胺嘧啶	0.17	4.13	0.26	2.82	0.08	0.88
6	环丙沙星	0.39	6.47	0.40	3.08	0.18	3.02
7	土霉素	0.33	4.53	0.34	5.43	0.16	2.29
8	磺胺噻唑	0.22	5.11	0.21	2.73	0.09	1.41
9	磺胺吡啶	0.13	3.35	0.21	1.98	0.09	1.96
10	四环素	0.29	6.96	0.23	3.68	0.09	1.08
11	磺胺二甲嘧啶	0.06	4.92	0.12	2.14	0.05	0.53
12	金霉素	0.13	5.45	0.14	5.70	0.06	5.40
13	强力霉素	0.07	5.93	0.10	4.01	0.06	4.39
14	氯霉素	0.04	3.75	0.05	2.77	0.01	1.12
15	苯唑西林	0.01	7.09	0.02	2.53	0.01	2.27

### 2.4 检出限和定量限

对有机肥样品按照 1.3 中处理方法得到浓度为 0.2 ng/mL(以土霉素的 标准曲线浓度为 例) 的加标样品进样分析, 通过软件计算得 15 种抗生素的最低检出限 (S/N=3)、最低定量限 (S/N=10) 结果如表 5 所示。

表5 15种抗生素的检出限和定量限

序号	化合物名称	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	阿莫西林	0.006	0.019
2	林可霉素	0.001	0.004
3	氨苄西林	0.003	0.009
4	左氧氟沙星	0.004	0.011
5	磺胺嘧啶	0.002	0.006
6	环丙沙星	0.023	0.068
7	土霉素	0.020	0.059
8	磺胺噻唑	0.044	0.135
9	磺胺吡啶	0.011	0.034
10	四环素	0.031	0.094
11	磺胺二甲嘧啶	0.001	0.004
12	金霉素	0.025	0.074
13	强力霉素	0.041	0.123
14	氯霉素	0.017	0.053
15	苯唑西林	0.006	0.017

## 2.5 基质加标实验

有机肥样品按 1.3 中处理方式得到空白基质，配制浓度为 0.5 ng/mL 和 5 ng/mL(以土霉素的标准曲线浓度为例)的加标样品进样检测，结果如表 6 所示，加标回收率在 82.2~104.8% 之间。

表6 加标样品的回收率结果

序号	名称	加标浓度 0.5 ng/mL		加标浓度 5 ng/mL	
		检测值 (ng/mL)	回收率%	检测值 (ng/mL)	回收率%
1	阿莫西林	4.72	94.4	46.66	93.3
2	林可霉素	0.51	101.8	4.13	82.6
3	氨苄西林	4.67	93.5	47.25	94.5
4	左氧氟沙星	0.42	83.9	4.34	86.9
5	磺胺嘧啶	0.48	96.6	4.11	82.2
6	环丙沙星	0.41	82.8	4.31	86.2
7	土霉素	0.49	98.4	4.98	99.5
8	磺胺噻唑	0.49	97.8	4.52	90.3
9	磺胺吡啶	0.48	96.5	4.34	86.7
10	四环素	0.47	93.0	4.39	87.8
11	磺胺二甲嘧啶	0.48	95.4	4.58	91.6
12	金霉素	0.45	89.7	5.24	104.8
13	强力霉素	0.43	86.3	4.52	90.4
14	氯霉素	4.85	96.9	46.43	92.9
15	苯唑西林	4.49	89.9	53.89	107.8

## 结论

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-8045 联用快速测定有机肥中 15 种抗生素的方法。该方法在 12 min 内完成 15 种抗生素的分析, 校准曲线的相关系数均在 0.995 以上, 线性良好; 低、中、高不同浓度抗生素的混合标准溶液平行测试 6 次, 15 种抗生素的保留时间和峰面积 RSD 值分别在 0.01~0.46% 和 0.29~7.09% 之间, 表明仪器精密度良好; 配制加标浓度为 0.5 ng/mL 和 5 ng/mL 的样品, 加标回收率在 82.2~104.8% 之间; 表明该方法具有分析速度快、重复性好的特点, 在满足新国标 (GB/T32951-2016) 中四环素类抗生素残留检测的同时, 拓宽了抗生素检测的范围, 可用于有机肥中多种抗生素残留检测。