

LC-MS/MS 法分析水产品中四环素类药物 残留

LCMSMS-623

摘要： 本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了水产品中 5 种四环素类抗生素残留量的测定方法。样品经 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液提取，固相萃取柱净化，液相色谱 - 串联质谱法测定。结果显示该方法在 5~200 ng/mL 浓度范围内建立标准曲线，线性相关系数均大于 0.999，线性良好；精密度考察中各物质保留时间 RSD 分布在 0.13%~0.21% 之间，峰面积 RSD 分布在 1.06%~2.82% 之间；5 种四环素类抗生素物质的检出限在 0.03~0.37 μg/kg 范围之内，定量限在 0.08~1.13 μg/kg 之间，表明仪器灵敏度良好，50 μg/kg 加标回收率 70.4%~105.1% 之间。该方法分析速度快，灵敏度高，准确度高，适用于鱼虾等水产品中 5 种四环素类抗生素的含量测定，也可为相关从业人员分析检测提供参考。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 水产品 四环素类抗生素

四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 为广谱抗生素，青霉素类抗生素因结构含有 β 内酰胺环，也称 β 内酰胺类抗生素。对革兰氏阳性和阴性细菌、立克次氏体等均有抑菌作用，其作用机理主要是和 30S 核糖体的末端结合，干扰细菌蛋白质的合成。常用的四环素类抗生素有：四环素、金霉素、土霉素、强力霉素、去甲基金霉素等。四环素类药物进入兽用领域已有多多年，病原菌对四环素类已产生耐药性，且耐药性严重程度不容忽视。此类抗生素的不合理使用，为食品安全带来隐患。GB 31650-2019 《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定，在鱼虾中土霉素、四环素、金霉素最大残留限量 (MRLs) 200 μg/kg，强力霉素 MRLs 100 μg/kg。

此前，GB/T 22961-2008 《河豚鱼、鳎鱼中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定 液相色谱 -

紫外检测法》规定了河豚鱼和鳎鱼中 4 种青霉素类化合物残留的测定方法。近期，《GB 31656.11-2021 食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定》对 GB/T 22961-2008 标准进行了更新，修改了标准适用范围，修改了方法的检测器，由紫外检测器改为荧光检测器；增加了增加液相色谱 - 串联质谱测定方法。

四环素类抗生素易光解，且易与金属离子反应生产不溶性络合物，在前处理和三重四极杆液相色谱质谱联用仪测定方面面临诸多挑战，本文参照《GB 31656.11-2021 食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定》，增加了去甲基金霉素，解决了四环素类化合物系统残留问题，建立了水产品中 5 种四环素类抗生素残留的检测方法。该方法快速、准确、灵敏度高，可以用于水产品中四环素类抗生素药物的准确测定。

■ 实验部分

1.1 仪器配置

岛津超高效液相色谱与三重四极杆质谱仪联用系统 LCMS-8045。具体配置为

输液泵 :LC-20AD _{XR} × 2	系统控制器 :CBM-20A
自动进样器 :SIL-30ACMP	三重四极杆质谱仪 :LCMS-8045
柱温箱 :CTO-20AC	色谱工作站 :LabSolutions Ver. 5.97

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS[Metal free] (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm) ，
岛津 (上海) 实验器材有限公司，P/N:227-30924-02

流动相：A 相 -0.1 % 甲酸水溶液；B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min 进样量：5 μL

柱温：40°C 洗针模式：R0→R3, 均为 0.1% 甲酸水：甲醇：乙腈：异丙醇 (1: 1: 1: 1)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

样品瓶：PP 材质样品瓶或采用惰性化处理的玻璃样品瓶

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	Pumps	Pump B Conc.	35
5.60	Pumps	Pump B Conc.	90
6.50	Pumps	Pump B Conc.	90
6.60	Pumps	Pump B Conc.	20
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

质谱仪: LCMS-8045 脱溶剂管温度: 250°C
 离子源: ESI+ 加热模块温度: 400°C
 雾化气: 氮气 3 L/min 接口温度: 300°C
 干燥气: 氮气 10 L/min 扫描模式: MRM
 加热气: 空气 10 L/min MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

序号	化合物	保留时间 (min)	前体离子 (m/z)	产物离 (m/z)	CE (V)
1	去甲金霉素 DMCTC	2.67	465.00	154.10*	-31.0
			465.00	448.00	-18.0
2	金霉素 CTC	3.52	479.20	444.10*	-24.0
			479.20	154.10	-28.0
3	强力霉素 DC	4.08	445.20	428.20*	-16.0
			445.20	154.10	-34.0
4	四环素 TC	2.08	445.20	410.20*	-22.0
			445.20	427.00	-16.0
5	土霉素 OTC	1.77	461.20	426.00*	-18.0
			461.20	443.10	-14.0

* 定量离子对

1.3 样品前处理

准确称取样品 2.0 g, 置于 50 mL 离心管中, 准确加入 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液 6 mL, 醋酸铅溶液 2 mL, 涡旋 60 s, 分散均匀, 超声提取 10 min, 再以 8000 r/min 转速离心 5 min, 吸取上清液于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液重复提取 2 次, 合并三次上清, 待用。上清液加正己烷 10 mL, 混匀, 静置, 取下层溶液, 加入 Na₂EDTA-McIlvaine 定容至 20.0 mL, 取 10.0 mL 过 HLB 小柱净化, 甲醇-乙酸乙酯 5 mL 洗脱, 氮吹至近干, 初始流动相定容至 1.0 mL, 上机。

1.4 标准溶液制备

基质标准系列工作液的配制: 取空白样品, 按照前处理净化, 氮吹至近干, 分别准确加入混合标准中间工作液适量, 初始流动相定容至 1.0 mL, 配制成浓度为 5、10、20、50、100、200 ng/mL 的标准工作曲线, 待上机分析。

■ 结果与讨论

2.1 色谱柱筛选

已有研究表明，四环素类化合物分析时，流动相中添加三氟乙酸，可有效抑制二次保留，改善峰形，但三氟乙酸易在质谱系统残留，抑制负离子模式信号。为避免出现此不良情况，本试验采用了内壁涂层为 PEEK 材质的色谱柱，Shim-pack GISS+PEEK (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm) 色谱柱进行分析，在甲酸做添加剂的条件下，获得了更加对称的峰形，色谱峰无拖尾，同时避免了柱上残留。5 种四环素在 Shim-pack GISS (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm) 和 Shim-pack GISS+PEEK (100 mm x 2.1 mm I.D., 3 μm) 色谱柱上保留行为如图 1 所示，以土霉素 OTC 为例，同等条件下 GISS 色谱柱上拖尾因子为 1.45，而 GISS+PEEK 色谱柱上拖尾因子为 1.05，色谱峰形良好，通道无干扰。因此，最终以 Shim-pack GISS+PEEK 作为色谱柱进行分析。

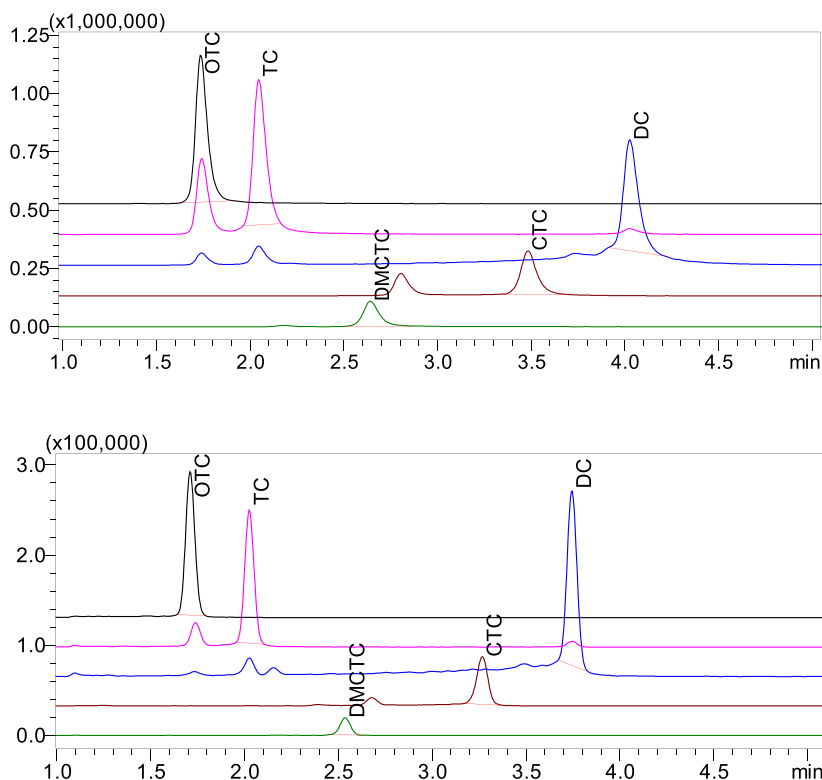


图 1 5 种四环素类抗生素标准溶液的 MRM 色谱图

2.2 标准曲线线性范围

按照 1.4 方法配制标准系列溶液，上机分析得出各化合物的线性范围和线性关系，对比了普通玻璃样品瓶、pp 材质样品瓶和惰性化处理玻璃样品瓶的吸附情况。结果表明，普通玻璃瓶配制的标准曲线，判定系数 <0.99，而 pp 材质样品瓶和惰性化处理玻璃样品瓶线性良好，详见表 3。5 种四环素类抗生素在 5~200 ng/mL 范围内，线性良好，判定系数 R² 均 >0.999，准确度 95.4%~106.5% 之间。5 种四环素类抗生素标准曲线见图 2。

表 3 5 种四环素类抗生素的线性关系

序号	化合物	线性方程	判定系数 R ²	准确度 (%)
1	去甲金霉 DMCTC	Y = (32669.2)X + (23923.6)	0.9996	95.6~106.5
2	金霉素 CTC	Y = (10303.5)X + (5181.24)	0.9993	95.6~108.8
3	强力霉素 DC	Y = (29940.6)X + (19922.0)	0.9995	95.4~104.8
4	四环素 TC	Y = (39566.6)X + (26427.0)	0.9995	97.2~104.3
5	土霉素 OTC	Y = (33009.4)X + (11861.2)	0.9996	96.3~104.2

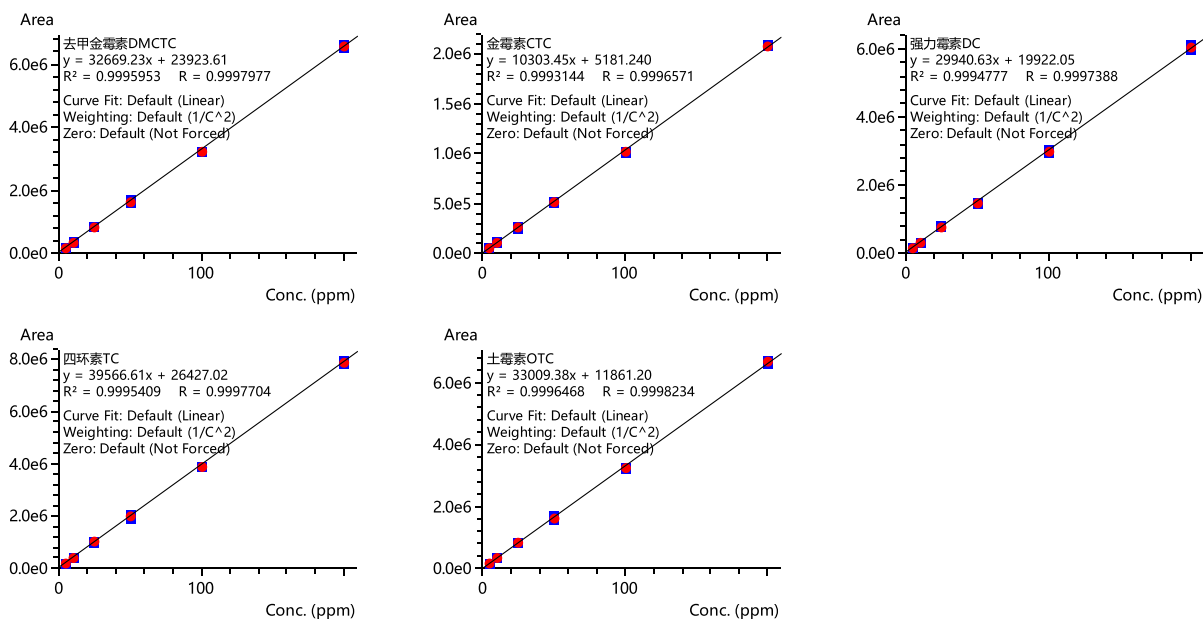


图 2 5 种四环素类抗生素的校准曲线

2.3 精密度考察

取 10 ng/mL 的基质标准溶液，注入液相色谱串联质谱仪，平行测定 6 次，计算保留时间 (R.T.) 和峰面积 (Area) 的 RSD%。结果显示各物质的保留时间 (R.T.) 的 RSD 在 0.13%~0.21% 之间，峰面积 (Area) 的 RSD 在 1.06%~2.82% 之间，实验结果表明精密度满足实验需求。具体结果详见表 4。

表 4 精密度考察结果 (n=6)

序号	化合物	RSD%	
		R.T.	Area
1	去甲金霉 DMCTC	0.21	1.86
2	金霉素 CTC	0.13	2.72
3	强力霉素 DC	0.15	2.82
4	四环素 TC	0.19	1.06
5	土霉素 OTC	0.15	1.32

2.4 检出限和定量限

取 5 ng/mL 的基质标准溶液，注入液相色谱串联质谱仪，根据信噪比，计算其检出限 (S/N=3) 和定量限 (S/N=10)。结果如表 5 显示，5 种四环素类抗生素的检出限在 0.03~0.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围之间。5 种四环素类抗生素的定量限在 0.08~1.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围之间。检出限、定量限符合 MRLs 和标准的要求。

表 4 精密度考察结果 (n=6)

序号	化合物	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	去甲金霉 DMCTC	0.03	0.08
2	金霉素 CTC	0.06	0.19
3	强力霉素 DC	0.37	1.13
4	四环素 TC	0.06	0.17
5	土霉素 OTC	0.02	0.05

2.5 加标回收率

对市售南美白虾进行分析，未检出四环素抗生素成分，添加 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 四环素混合标准溶液，按照前述前处理方式处理，上机测定，以外标法定量，计算回收率。5 种四环素类加标回收率 70.4%~105.1% 之间，符合公示稿要求。

表 6 回收率

序号	化合物	回收率 (%)
1	去甲金霉素 DMCTC	95.5
2	金霉素 CTC	89.7
3	强力霉素 DC	73.8
4	四环素 TC	105.1
5	土霉素 OTC	70.4

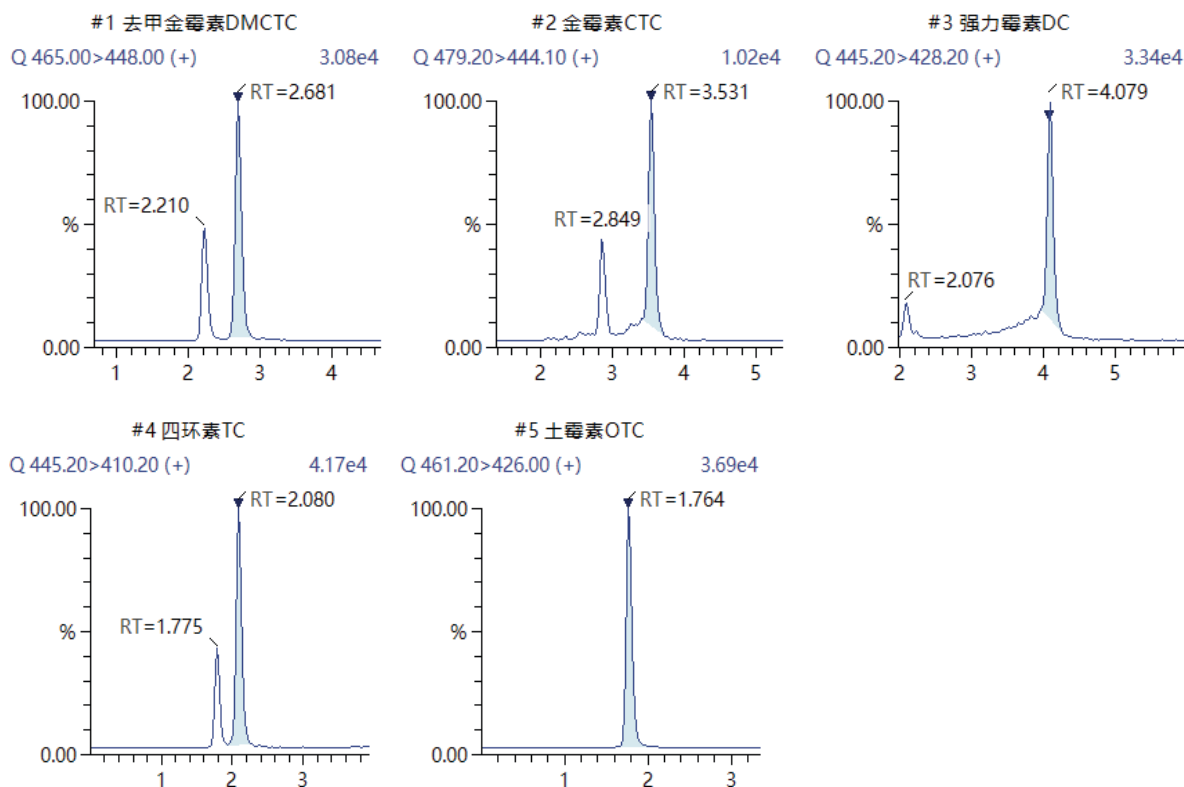


图 3 南美白虾质控样品（加标 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）的 MRM 色谱图

结论

本实验使用岛津 LCMS-8045 液质联用系统，参照《GB 31656.11-2021 食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定》，建立了南美白虾中 5 种四环素类抗生素含量的检测方法。实验结果表明，5 种四环素类抗生素在 5-200 ng/mL 的范围内线性良好；精密密度实验中，5 种四环素类抗生素保留时间的 RSD 分布在 0.13%~0.21% 之间，峰面积的 RSD 在 1.06%~2.82% 之间，仪器精密密度良好；并且 5 种四环素类抗生素物质的灵敏度 LOD 在 0.03~0.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围之间，LOQ 在 0.08~1.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间，测试结果表明仪器灵敏度良好；符合 GB 31650-2019 关于四环素类抗生素的 MRLs 要求，同时也符合标准的灵敏度 LOD=5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，LOQ=10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的要求。

岛津应用云

