

# LC-MS/MS 法测定土壤中四环素类抗生素的含量

LCMSMS-778

**摘要：**本文利用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了一种土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素的测定方法。结果表明，5种抗生素各组分线性关系良好，土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素检测限为 0.25 µg/kg，定量限为 1 µg/kg（远低于标准要求的检测限 2.5 µg/kg，定量限 10 µg/kg）。标准溶液重复进样 6 针，保留时间和峰面积重复性良好。加标回收实验中，各组分回收及精密度良好，可满足检测要求。

**关键词：**三重四极杆液质联用仪 四环素类抗生素 土壤

## 技术特点：

- ❖ 可应对 DB 13/T 5221-2020 《土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素的测定 高效液相色谱-串联质谱法》。
- ❖ 检出限和定量限均优于标准要求。

土霉素、四环素、金霉素、美他霉素和多西环素统称为四环素类抗生素。此类抗生素常用作兽药，广泛应用于畜禽养殖业。过量四环素类抗生素会伴随畜禽代谢产物累积在土壤中，严重破坏生态系统。因此对土壤中的抗生素进行监测是必要的。

本法采用 Na<sub>2</sub>EDTA-Mellvaine 缓冲溶液+乙腈 (7:3)

进行超声、振荡提取，经净化及过滤后上机测定，具有高精度，高效率，重现性好等特点。

本文利用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050，通过液体超声、振荡提取法，建立了土壤中的 5 种四环素类抗生素的检测方法，供检测人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器配置

本文使用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，配置信息如下：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A <sub>5R</sub>
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	质谱检测器：	LCMS-8050
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 6.102		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：	XBridge BEH C18, (3 mm x 100 mm I.D., 2.5 µm)		
流动相：	A 相 -0.1% 甲酸水；B 相 - 乙腈		
流速：	0.5 mL/min	进样量：	10 µL
柱温：	35°C		
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，详见表 1。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
5.00	泵	B.Conc	30
5.10	泵	B.Conc	60
8.00	泵	B.Conc	60
8.10	泵	B.Conc	20
10.00	泵	B.Conc	20
10.00	控制器	Stop	

质谱条件:

离子源: ESI(+)	接口电压: 4.5 kV
雾化气流速: 3 L/min	加热模块温度: 400°C
加热气流速: 10.0 L/min	D L 温度: 250°C
干燥气流速: 10.0 L/min	接口温度: 300°C
扫描模式: 多反应监测 (MRM)	MRM 参数: 详见表 2

表 2 抗生素 MRM 参数

No.	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1PreBias(V)	CE(V)	Q3PreBias(V)
1	土霉素	461.0	426.0*	-13.0	-19.0	-16.0
			443.0	-17.0	-13.0	-23.0
2	四环素	445.0	410.0*	-10.0	-20.0	-21.0
			427.0	-17.0	-13.0	-22.0
3	金霉素	479.0	444.0*	-11.0	-21.0	-17.0
			462.0	-11.0	-18.0	-24.0
4	美他霉素	443.0	426.0*	-17.0	-17.0	-22.0
			381.0	-17.0	-24.0	-28.0
5	多西环素	445.0	428.0*	-17.0	-19.0	-21.0
			154.0	-10.0	-28.0	-17.0

注: \* 表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配制

#### 1.3.1 标准储备液 (100 µg/mL)

准确称取土霉素、四环素、金霉素、美他霉素和多西环素各 10.0 mg, 分别用甲醇溶解并定容至 100 mL, 4°C 保存于密封棕色瓶中。

#### 1.3.2 混合标准中间液 (1000 ng/mL)

准确吸取各标准储备液 (1.3.1) 1 mL 于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 4°C 保存于密封棕色瓶中。

#### 1.3.3 混合标准使用液

准确吸取混合标准使用液 (1.3.2) 适量, 于 6 个 100 mL 容量瓶中, 用乙腈: 0.1% 甲酸水 (2:8) 定容, 此标准系列中各抗生素的浓度分别为: 1 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL。

### 1.4 样品前处理

参照 DB 13/T 5221-2020 《土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素的测定 高效液相色谱-串联质谱法》。

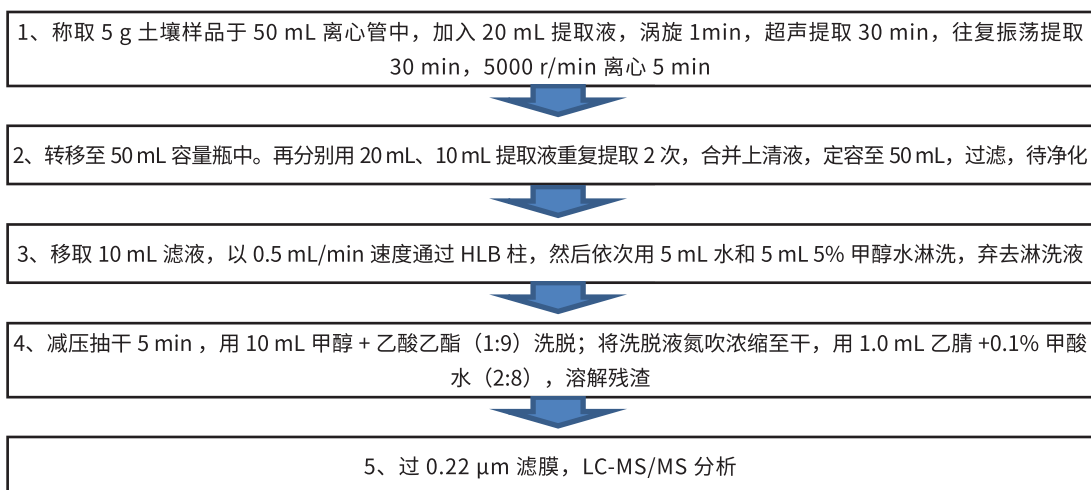


图 1 前处理流程图

## ■ 结果与讨论

### 2.1 标准溶液色谱图

表 3 5 种抗生素信息

No.	中文名称	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	土霉素	Oxytetracycline	6153-64-6	1.579
2	四环素	Tetracycline	60-54-8	1.875
3	金霉素	chlortetracycline	57-62-5	3.234
4	美他霉素	methacycline	914-00-1	3.444
5	多西环素	doxycycline	564-25-0	3.790

5 种抗生素的标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示，相关化合物信息见表 3。

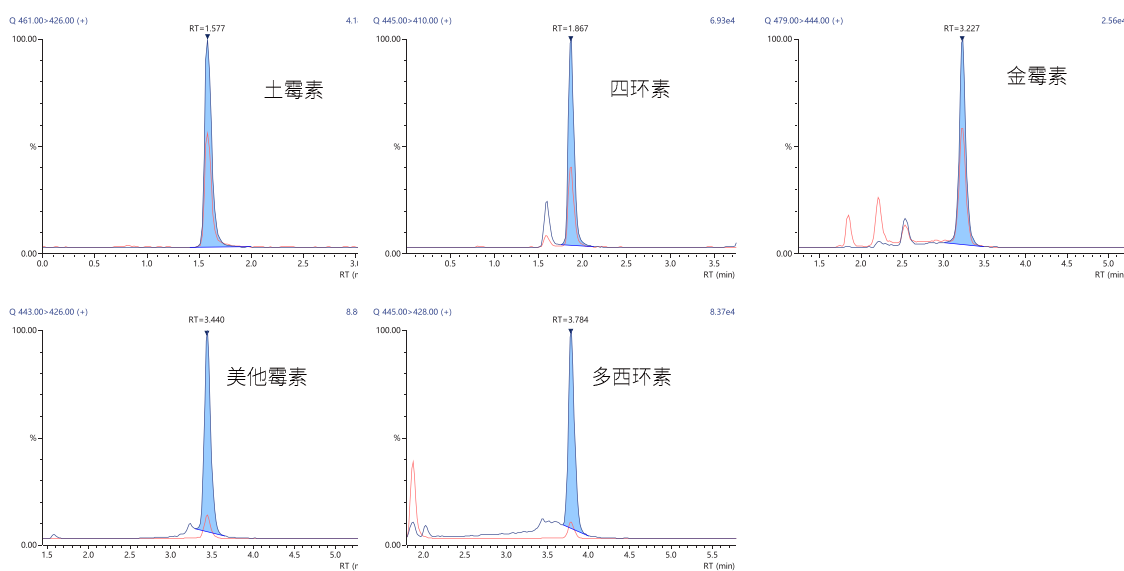


图 2 5 种抗生素标准溶液 MRM 色谱图

## 2.2 线性范围、检测限和定量限

按照 1.3 配制成各浓度标准溶液，以各目标物浓度为横坐标，目标物峰面积为纵坐标，以外标法绘制标准曲线，所得校准曲线线性关系良好，线性相关系数大于 0.999。曲线结果如下图 3 所示。线性方程及相关系数如下表 4 所示。

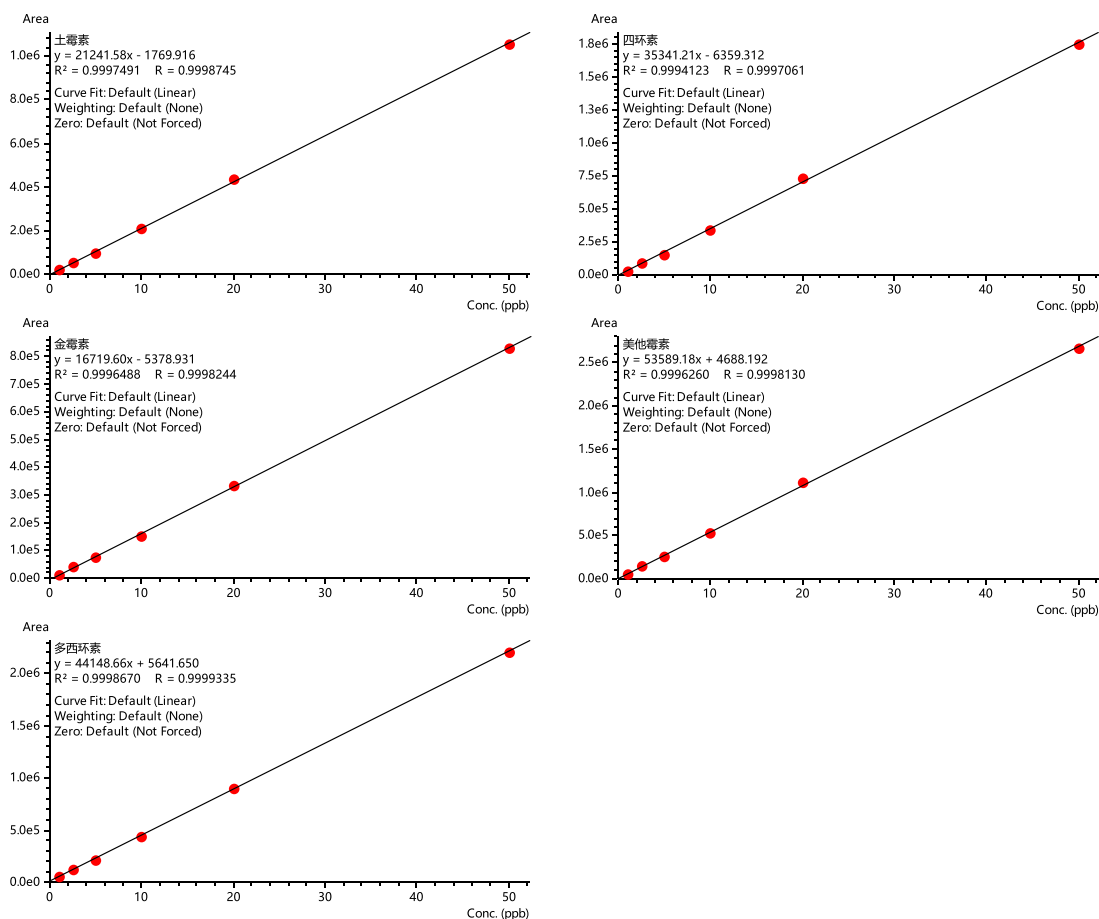


图 3 化合物校准曲线

表 4 校准曲线参数

No.	化合物名称	线性范围 (ng/mL)	相关系数 (r)	准确度 (%)	检测限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
1	土霉素	1.0~50.0	0.9998	92.1-102.9	0.25	1.0
2	四环素	1.0~50.0	0.9997	91.1-105.0	0.25	1.0
3	金霉素	1.0~50.0	0.9998	97.2-107.7	0.25	1.0
4	美他霉素	1.0~50.0	0.9998	92.1-102.9	0.25	1.0
5	多西环素	1.0~50.0	0.9999	96.6-105.1	0.25	1.0

## 2.3 重复性考察

配制浓度为 1 ng/mL 标准溶液，连续进样 6 次，考察分析方法保留时间和峰面积的重复性。结果表明：保留时间的 RSD% 均小于 1.0%；峰面积的 RSD% 均小于 10.0%，方法重复性良好，仪器精密度良好。结果见表 5。

表 5 重复性测试 (n=6)

No.	化合物名称	峰面积 RSD (%)	保留时间 RSD (%)
1	土霉素	2.40	0.12
2	四环素	1.92	0.06
3	金霉素	4.86	0.07
4	美他霉素	1.39	0.05
5	多西环素	2.06	0.04

#### 2.4 加标回收实验

按照 1.4 步骤中制备样品和加标样品, 三个水平加标浓度如下表 6 所示。结果显示: 各水平的加标平均回收率在 85.2~101.3% 之间, 相对标准偏差 RSD% 在 1.17~3.74% 之间。

表 6 样品加标实验结果 (n=6)

No.	化合物名称	样品量 (ng/mL)	0.25 µg/kg		1 µg/kg		5 µg/kg	
			回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	土霉素	N.D.	97.7	1.61	85.2	2.17	89.4	3.06
2	四环素	N.D.	99.8	2.51	92.3	1.57	94.6	1.17
3	金霉素	N.D.	101.3	2.64	99.0	3.74	99.4	1.39
4	美他霉素	N.D.	93.4	4.19	92.3	1.49	95.5	2.71
5	多西环素	N.D.	92.2	2.46	90.1	2.35	89.4	2.93

N.D.: 表示未检出。

## ■ 结论

本文利用岛津公司的 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪, 参照 DB 13/T 5221-2020 《土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素的测定 高效液相色谱-串联质谱法》, 建立了土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素的测定方法。本方法灵敏度较高、重现性较好, 能有效检测土壤中土霉素、金霉素、四环素、多西环素、美他霉素含量。

岛津应用云

