

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定地表水中的四环素类抗生素残留

LCMSMS-055

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地表水中 7 种四环素类抗生素残留的方法。地表水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 快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用外标法内绘制 7 种四环素类抗生素的校准曲线，线性范围宽，校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 混合标准溶液进行精密实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.021% ~ 0.208% 和 1.165% ~ 3.731% 之间，系统精密度良好。

关键词：四环素类抗生素 三重四极杆质谱 地表水

四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 是临床上重要的一类抗感染药物，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、强力霉素等。在畜禽生产中四环素类抗生素被广泛作为药物添加剂，这对环境造成潜在威胁。由于残留的抗生素可导致耐药菌，引起了人们对抗生素在环境中的分布、转归及对环境生物、生态系统和人类健康产生的危害等一系列问题的关注。由于环境介质的复杂性和多样性，目前尚无环境中抗生素类污染物的标准分析方法。

高效液相色谱 - 串联质谱联用技术是近些年来发展很快的分析技术，具有很高的选择性和灵敏度，对复杂基体中的药物残留具有很强的定性能力，而且准确度高。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 联用测定地表水中的四环素类抗生素的方法。

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-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-C8 2.0 mm I.D. × 100 mm L., 2.2 µm

流动相：A - 10 mM 三氟乙酸的水溶液；
B - 甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：35°C

进样量：20 µL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
1.00	Pumps	Pump B Conc.	50
3.00	Pumps	Pump B Conc.	65
3.50	Pumps	Pump B Conc.	65
3.60	Pumps	Pump B Conc.	10
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：10 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

1.3 标准品溶液的配制

标准物质：共 7 种，分别为二甲胺四环素、土霉素、四环素、去甲基金霉素、金霉素、甲烯土霉素和强力霉素。

标准工作溶液配制：用甲醇配制 20 mg/L 的混合标

准中间溶液，用甲醇 + 三氟乙酸水溶液 (V/V, 1:19) 稀释成不同浓度的混合标准工作液。

1.4 样品前处理方法

固相萃取：分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 去离子水活化 HLB 固相萃取小柱 (200 mg, 6 mL)，流量为 5 mL/min。水样上样速度为 4 mL/min，上样量为 100 mL，3 mL 5% 甲醇淋洗，6 mL 甲醇洗脱。氮吹仪浓缩至近干，用甲醇 -10 mM 三氟乙酸的水溶液 (1/9, v/v) 溶解定容至 1.0 mL，0.22 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

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)
二甲胺四环素	458.2	441.2*	-22	-21	-30
		283.1	-22	-48	-29
土霉素	461.2	426.1*	-22	-19	-30
		443.1	-22	-12	-22
四环素	445.2	410.2*	-22	-19	-29
		427.2	-22	-12	-30
去甲基金霉素	465.1	448.1*	-23	-18	-30
		430.1	-23	-23	-29
金霉素	478.9	444.1*	-24	-21	-30
		462.1	-24	-18	-23
甲烯土霉素	443.2	426.1*	-21	-18	-30
		201.1	-21	-36	-21
强力霉素	445.2	428.2*	-22	-19	-30
		154.1	-22	-32	-30

注：*表示定量离子

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

二甲胺四环素的一级质谱图见图 1，产物离子扫描质谱图见图 2。

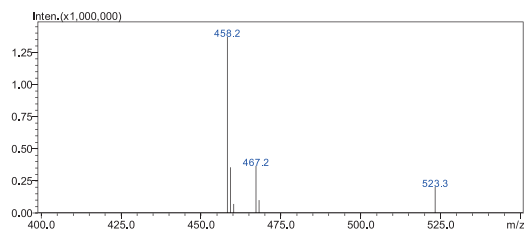


图1 二甲胺四环素的一级质谱图

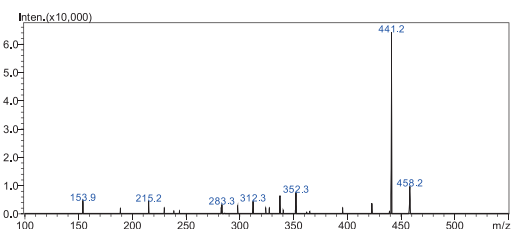


图2 二甲胺四环素的产物离子扫描图值 (CE-22V)

土霉素的一级质谱图见图 3，产物离子扫描质谱图见图 4。

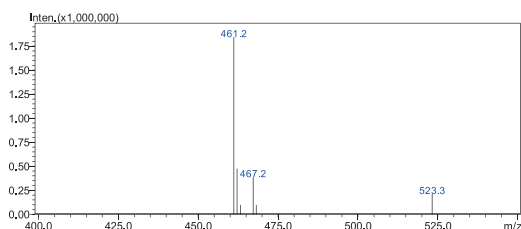


图3 土霉素的一级质谱图

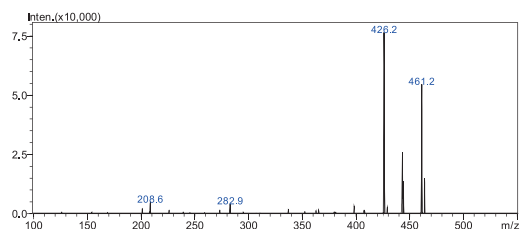


图4 土霉素的产物离子扫描图值 (CE-25V)

四环素的一级质谱图见图 5, 产物离子扫描质谱图见图 6。

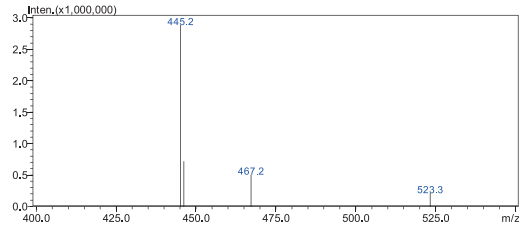


图 5 四环素的一级质谱图

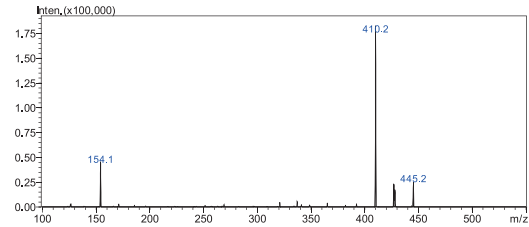


图 6 四环素的产物离子扫描图值(CE -20V)

去甲基金霉素的一级质谱图见图 7, 产物离子扫描质谱图见图 8。

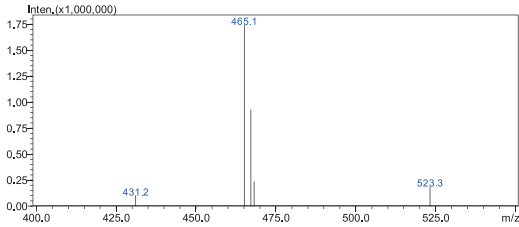


图 7 去甲基金霉素的一级质谱图

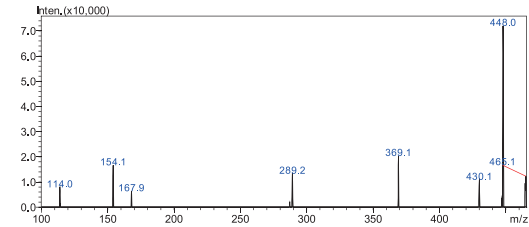


图 8 去甲基金霉素的产物离子扫描图值(CE -20V)

金霉素的一级质谱图见图 9, 产物离子扫描质谱图见图 10。

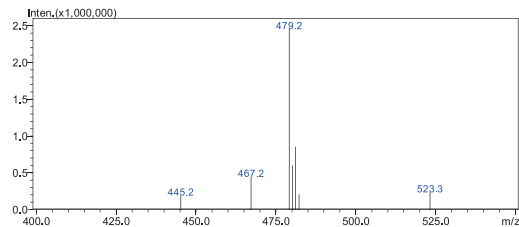


图 9 金霉素的一级质谱图

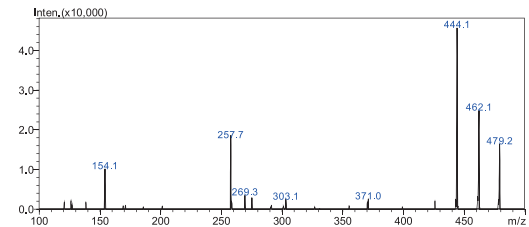


图 10 金霉素的产物离子扫描图值 (CE -20V)

甲烯土霉素的一级质谱图见图 11, 产物离子扫描质谱图见图 12

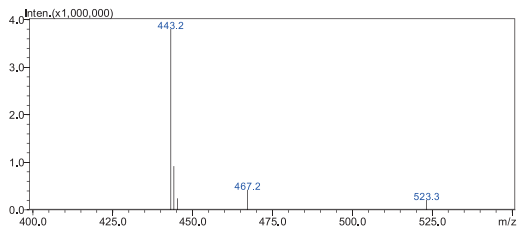


图 11 甲烯土霉素的一级质谱图

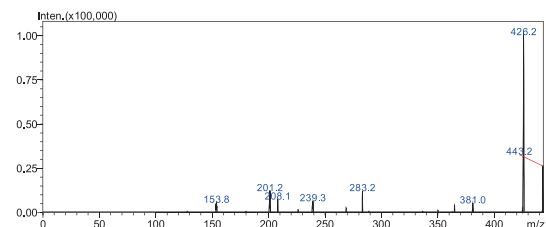


图12 甲烯土霉素的产物离子扫描图值(CE -20V)

强力霉素的一级质谱图见图 13, 产物离子扫描质谱图见图 14。

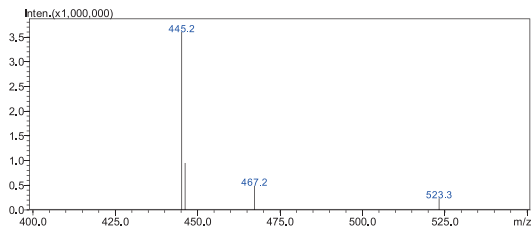


图 13 强力霉素的一级质谱图

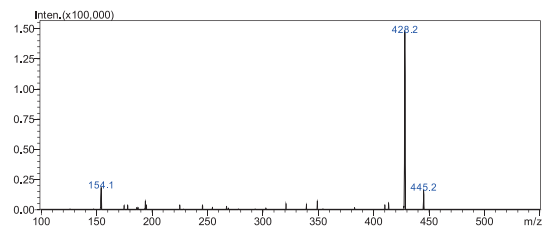


图 14 强力霉素的产物离子扫描图值(CE -21V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

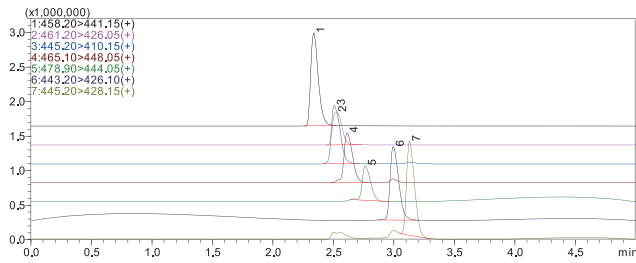


图15 标准样品的 MRM 色谱图 (500 µg/L)

(1、二甲胺四环素; 2、土霉素; 3、四环素; 4、去甲基金霉素;
5、金霉素; 6、甲烯土霉素; 7、强力霉素)

2.3 线性范围

将 1 µg/L、3 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L、100 µg/L 和 500 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 16~22 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。

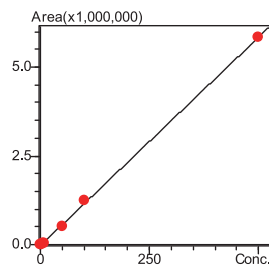


图16 二甲胺四环素的校准曲线

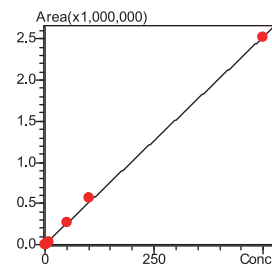


图17 土霉素的校准曲线

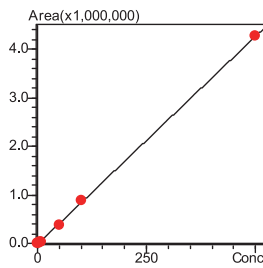


图18 四环素的校准曲线

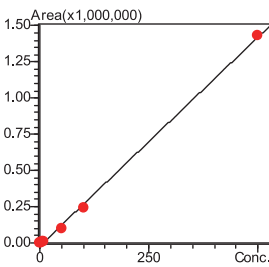


图19 去甲基金霉素的校准曲线

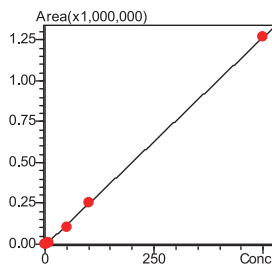


图20 金霉素的校准曲线

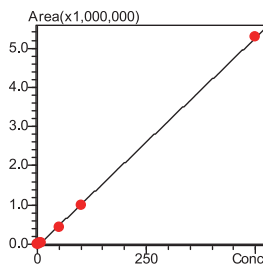


图21 甲烯土霉素的校准曲线

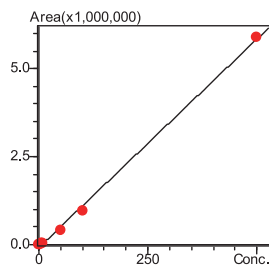


图22 强力霉素的校准曲线

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	二甲胺四环素	$Y = (11739.6)X + (-28443.4)$	1.0~500	0.9997
2	土霉素	$Y = (5044.19)X + (5932.37)$	1.0~500	0.9995
3	四环素	$Y = (8591.11)X + (-22142.1)$	1.0~500	0.9998
4	去甲基金霉素	$Y = (2883.03)X + (-20841.3)$	1.0~500	0.9994
5	金霉素	$Y = (2549.80)X + (-8631.14)$	1.0~500	0.9998
6	甲烯土霉素	$Y = (10613.5)X + (-50409.7)$	1.0~500	0.9998
7	强力霉素	$Y = (11844.3)X + (-82438.8)$	1.0~500	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0.021% ~ 0.208%和1.165% ~ 3.731%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% (10 µg/L)		RSD% (50 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
二甲胺四环素	0.068	1.469	0.147	2.017	0.031	1.750
土霉素	0.091	3.103	0.208	2.360	0.033	2.443
四环素	0.044	3.731	0.117	1.165	0.040	2.037
去甲基金霉素	0.117	3.552	0.161	1.560	0.021	2.673
金霉素	0.146	3.363	0.075	2.690	0.052	2.953
甲烯土霉素	0.069	1.769	0.136	2.305	0.056	1.858
强力霉素	0.030	3.361	0.110	1.319	0.042	1.682

2.5 检出限

为了考察仪器灵敏度，配制浓度为2.0 µg/L测试样品7份，平行进样7次分析结果，色谱图如图23所示。由7次进样测定的标准偏差(S)计算出检出限和最低定量浓度，此时检出限 MDL = 3.14 × S × 10，定量下限 LOQ=4 × MDL。测定结果如表5所示。

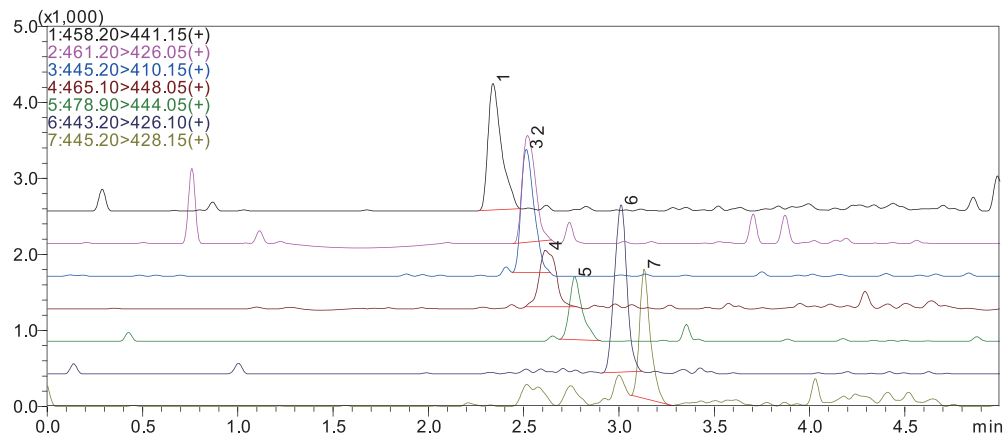


图23 测试样品(2.0 µg/L)的MRM色谱图

(1、二甲胺四环素；2、土霉素；3、四环素；4、去甲基金霉素；5、金霉素；6、甲烯土霉素；7、强力霉素)

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(S)	检出限(ng/L)	定量下限(ng/L)
1	二甲胺四环素	0.186	5.84	23.37
2	土霉素	0.183	5.76	23.02
3	四环素	0.120	3.77	15.10
4	去甲基金霉素	0.193	6.07	24.26
5	金霉素	0.199	6.24	24.98
6	甲烯土霉素	0.200	6.29	25.16
7	强力霉素	0.142	4.46	17.82

2.6 回收率实验

以地表水为待测样品，检测 7 种四环素类抗生素。在地表水样中未检出四环素类抗生素，色谱图如图 24。为了研究该前处理方法对地表水样中四环素类抗生素的提取效率，以 100 mL 水样为研究对象，加入 7 种四环素类抗生素标准物质，使最终浓度为 0.20 $\mu\text{g/L}$ ，加标色谱图如图 25 所示，加标回收率见表 6。

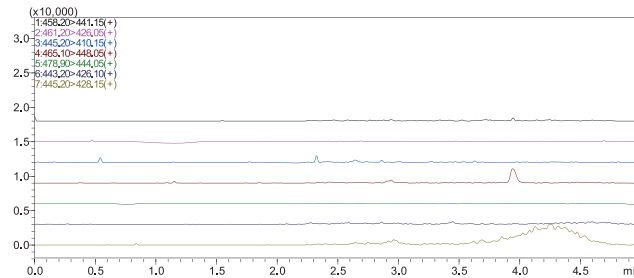


图24 地表水样的 MRM 色谱图（未检出）

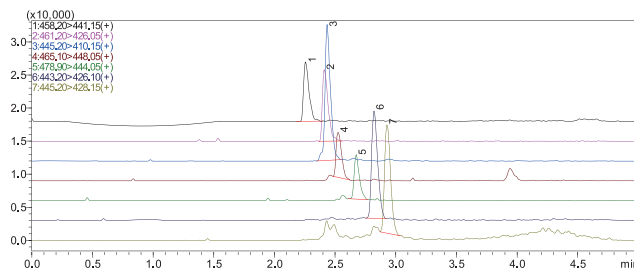


图25 地表水样加标 (0.20 $\mu\text{g/L}$) 的 MRM 色谱图

(1、二甲胺四环素；2、土霉素；3、四环素；4、去甲基金霉素；
5、金霉素；6、甲烯土霉素；7、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 ($\mu\text{g/L}$)	样品 2 实测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	平均回收率 (%)
1	二甲胺四环素	0.145	0.141	71.5
2	土霉素	0.126	0.153	69.8
3	四环素	0.141	0.155	74.1
4	去甲基金霉素	0.130	0.140	67.5
5	金霉素	0.111	0.127	59.4
6	甲烯土霉素	0.080	0.082	40.6
7	强力霉素	0.075	0.077	38.0

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 联用测定地表水中的四环素类抗生素残留量的检测方法。该方法在 5 min 之内完成 7 种目标物的分离分析，且线性范围宽，校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 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 0.021% ~ 0.208% 和 1.165% ~ 3.731% 之间，仪器精密度良好。该方法具有分析速度快、灵敏高的特点，适合大规模环境水体四环素类抗生素污染现状的调研工作。