

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定蜂蜜中 5 种四环素类抗生素的残留

LCMSMS-060

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蜂蜜中 5 种四环素类抗生素残留的方法。蜂蜜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。使用外标法绘制 5 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 0.9996 以上。对 5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 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 0.20% ~ 1.14% 和 0.62% ~ 3.79% 之间, 系统精密度良好。其检出限为 31.9~63.4 ng/L, 定量限为 127~254 ng/L, 样品加标回收率在 86.9 ~ 98.1% 之间。

关键词: 四环素 抗生素 三重四极杆质谱 蜂蜜

四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 是临床上广泛应用的广谱抗生素。然而, 不合理地使用该类药物, 如用药剂量过大、用药时间过长、滥用药物及不遵守休药期提前屠宰等, 导致该类药物及其代谢产物残留于动物的肌肉、蛋、奶、脏器组织及分泌物中。四环素类抗生素并不能被动物完全吸收, 有相当部分以原形或代谢物形式进入食物链和环境中, 间接对人体健康造成影响。

近年来, 蜂蜜产业发展迅速。我国蜜蜂大多是从国外引进的, 发病率比较高, 虽然国家提倡生物防治, 但还是有一部分人用化学药物、抗生素来给蜜蜂治病, 导致蜂蜜中抗生素含量较高。因此, 迫切需要建立高效灵敏的蜂蜜中四环素的检测方法。

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, 具有高的选择性和灵敏度, 对复杂体系中的药物残留具有准确的定性能力。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 联用测定蜂蜜中的五种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 \times 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. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II, 2.0 mm I.D. \times 100 mm L., 2.2 μm 粒径。

流动相: A - 0.1% 甲酸的水溶液;
B - 甲醇

流速: 0.25 mL/min

柱温: 室温。

进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.00	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	95
6.01	Pumps	Pump B Conc.	20
8.00	Pumps	Pump B Conc.	20
8.00	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 $^{\circ}\text{C}$

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 样品制备

标准溶液配制：称取适量五种标准物质，分别为四环素、土霉素、去甲基金霉素、金霉素和强力霉素，用甲醇配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液溶液，用甲醇 +0.1 甲酸水溶液 (V/V, 1:4) 稀释成不同浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：蜂蜜样品的制备、净化、提取参照《GB/T 23409-2009 蜂王浆中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留量的测定液相色谱 - 质谱 / 质谱法》。

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)
四环素	445.20	410.10 *	-22	-20	-29
		427.15	-22	-14	-30
土霉素	461.20	426.10 *	-23	-19	-30
		443.20	-23	-14	-21
去甲基金霉素	465.10	448.10 *	-23	-19	-30
		430.10	-23	-22	-30
金霉素	479.15	444.20 *	-24	-22	-30
		462.15	-24	-18	-22
强力霉素	445.15	428.25 *	-22	-19	-30
		154.20	-22	-34	-28

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

四环素的一级质谱图见图 1，产物离子扫描质谱图见图 2。

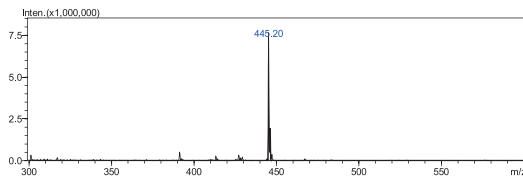


图 1 四环素的一级质谱图

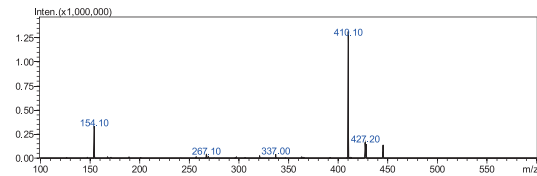


图 2 四环素的产物离子扫描图 (CE值-20V)

土霉素的一级质谱图见图 3，产物离子扫描质谱图见图 4。

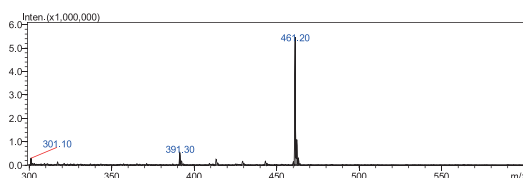


图 3 土霉素的一级质谱图

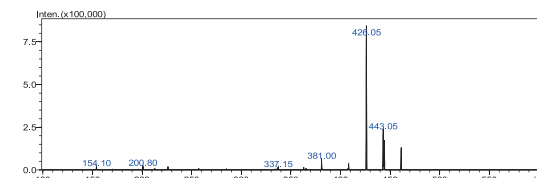


图 4 土霉素的产物离子扫描图 (CE值-19V)

去甲基金霉素的一级质谱图见图 5, 产物离子扫描质谱图见图 6。

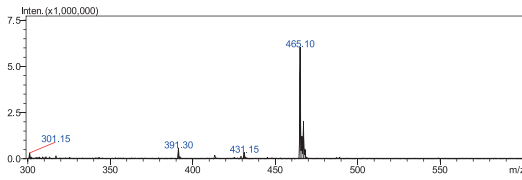


图 5 去甲基金霉素的一级质谱图

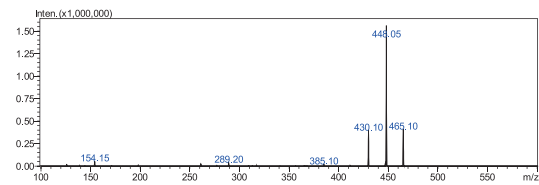


图 6 去甲基金霉素的产物离子扫描图 (CE值-19V)

金霉素的一级质谱图见图 7, 产物离子扫描质谱图见图 8。

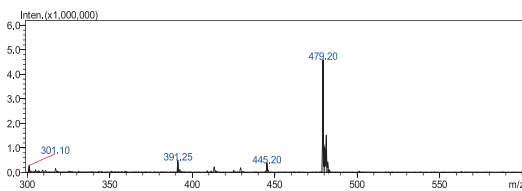


图 7 金霉素的一级质谱图

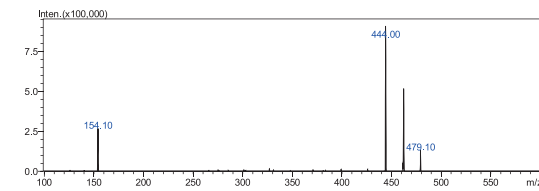


图 8 金霉素的产物离子扫描图 (CE值-22V)

强力霉素的一级质谱图见图 9, 产物离子扫描质谱图见图 10。

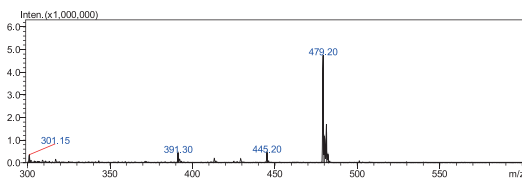


图 9 强力霉素的一级质谱图

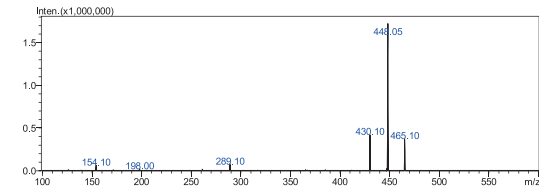


图 10 强力霉素的产物离子扫描图 (CE值-19V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

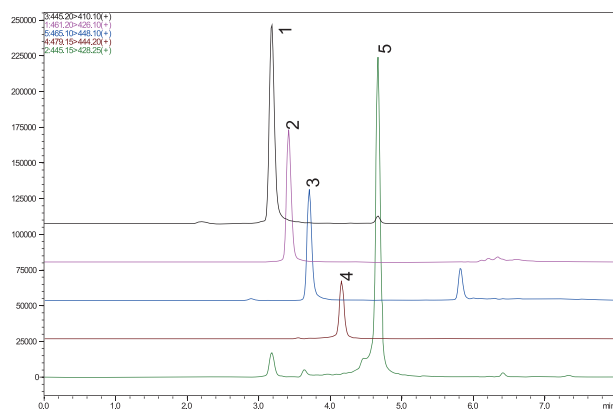


图 11 标准样品的 MRM 色谱图 (100 µg/L)

(1、四环素; 2、土霉素; 3、去甲基金霉素;
4、金霉素; 5、强力霉素)

2.3 线性范围

将 0.2 µg/L、0.5 µg/L、1 µg/L、2.5 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L、100 µg/L 和 200 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 12~16 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。

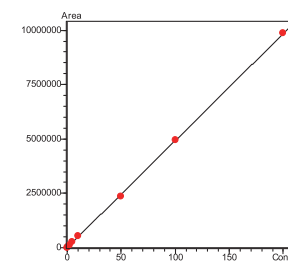


图 12 四环素校准曲线

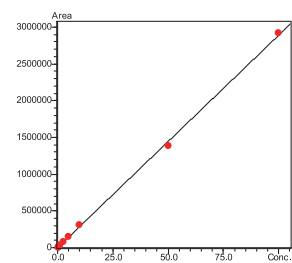


图 13 土霉素标准曲线

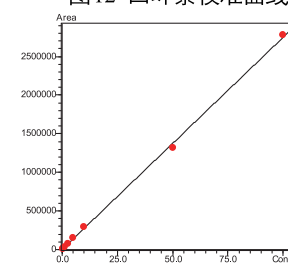


图 14 去甲金霉素标准曲线

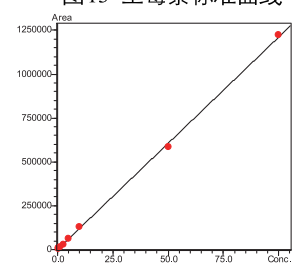


图 15 金霉素标准曲线

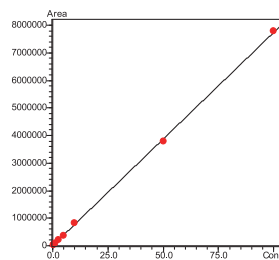


图 16 强力霉素标准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 r
1	四环素	$Y = (49259.9)X + (-1866.27)$	0.2~200	0.9999
2	土霉素	$Y = (28905.9)X + (-348.296)$	0.5~100	0.9997
3	去甲基金霉素	$Y = (27468.4)X + (1698.49)$	0.5~100	0.9996
4	金霉素	$Y = (12102.7)X + (571.906)$	0.5~100	0.9997
5	强力霉素	$Y = (77333.8)X + (5973.94)$	0.2~100	0.9998

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 0.20% ~ 1.34% 和 0.62% ~ 3.79% 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% (5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
四环素	1.14	3.21	0.93	2.65	1.10	1.42
土霉素	0.82	2.76	0.91	2.87	0.79	0.62
去甲基金霉素	0.88	3.27	0.78	3.04	0.70	2.90
金霉素	0.48	3.79	0.46	2.98	0.38	1.80
强力霉素	0.20	2.71	0.22	1.72	0.20	1.20

2.5 检出限

配制浓度为 200 ng/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 S, 此时检出限 $\text{MDL} = 3.14 \times S$, 定量下限 $\text{LOQ} = 4 \times \text{MDL}$ 。测定结果如表 5 所示。

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	四环素	14.9	46.8	187
2	土霉素	20.2	63.4	254
3	去甲基金霉素	17.8	55.9	224
4	金霉素	18.4	57.8	231
5	强力霉素	10.2	31.9	127

2.6 回收率实验

以蜂蜜为待测样品, 检测 5 种四环素类抗生素。在 2 g 蜂蜜样品中检出四环素, 浓度为 0.249 $\mu\text{g/kg}$ 。色谱图如图 17。为了研究该分析方法对蜂蜜样品中四环素类抗生素的实际检测效果, 向蜂蜜样品中加入浓度为 2 $\mu\text{g/kg}$ 的 5 种四环素类抗生素标准物质, 加标色谱图如图 18 所示, 加标回收率见表 6。

2.7 实际样品的 MRM 色谱图

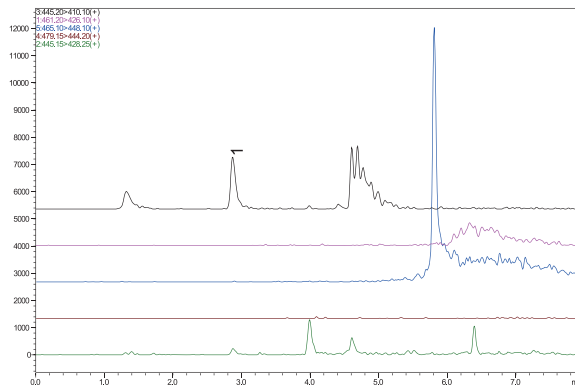


图17 蜂蜜样品的 MRM 色谱图 (检出1四环素)

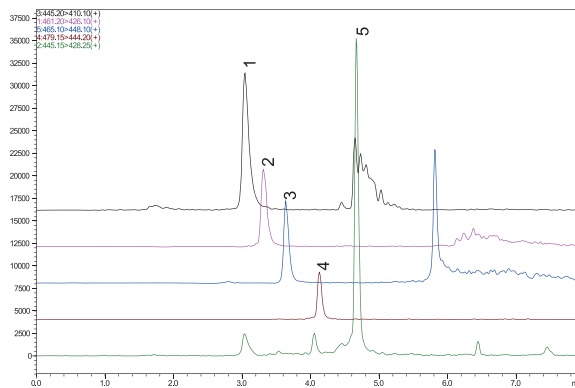


图18 蜂蜜加标 (2 µg/kg) 样品的 MRM 色谱图

(1、四环素; 2、土霉素; 3、去甲基金霉素; 4、金霉素; 5、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 (µg/kg)	样品 2 实测浓度 (µg/kg)	平均回收率 (%)
1	四环素	2.18	2.25	98.1
2	土霉素	1.93	1.87	95.2
3	去甲基金霉素	1.67	1.81	86.9
4	金霉素	1.78	1.76	88.3
5	强力霉素	1.89	1.92	98.1

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 联用测定蜂蜜样品中的四环素类抗生素残留量的检测方法。该方法灵敏度高, 精密度良好, 且线性范围宽, 相关系数在 0.9996 以上。通过对市售蜂蜜样品的测定, 能够检测出微量四环素, 对试剂样品进行低中高三水平加标分析, 得到样品加标回收率在 86.9 ~ 98.1% 之间, 证明该方法适合蜂蜜样品中衡量四环素的分析检测。