

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定蜂蜜中链霉素和双氢链霉素

LCMSMS-101

**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链霉素和双氢链霉素的方法。样品经处理后, 用超高效液相色谱 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用进行定量分析。使用外标法绘制链霉素和双氢链霉素的校准曲线, 线性范围宽, 校准曲线的相关系数均在 0.999 以上。对 1.25 μg/kg、5 μg/kg 和 50 μg/kg 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 0.37% 和 4.73% 以下, 系统精密度良好。

**关键词:** 三重四极杆质谱 蜂蜜 链霉素 双氢链霉素

链霉素 (streptomycin) 是一种氨基葡萄糖型抗生素。1943 年美国 S.A. 瓦克斯曼从链霉菌中分离得到, 是继青霉素后第二个生产并用于临床的抗生素。这类抗生素在蜂业市场上广为销售, 养蜂生产者长期以来存在一种传统的错误观念, 认为抗生素是万能药。因此, 不分时间和病原种类, 蜜蜂感染疾病后就首选应用抗生素治疗, 有的蜂场常年不断用药, 从而造成蜂蜜中抗生素严重超标。过量的摄入链霉素和双氢链霉素会造成皮疹、发热等过敏反应, 耳毒性, 肾脏损害, 以及其他不良反应。许多国家如欧盟、日本等对蜂蜜中抗生素含量

要求非常严格。日本要求蜂蜜中抗生素含量不能超过 0.05 mg/kg, 而欧盟成员国中, 德国对蜂蜜的治疗要求最严格, 对链霉素残留量不得超过 0.02 mg/kg。因此, 我国目前对蜂蜜的质量安全检测十分重要。

高效液相色谱 - 串联质谱联用技术具有很高的选择性和灵敏度, 适合于复杂基体中的有机物痕量分析, 且准确度高。本文建立了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 联用测定蜂蜜中链霉素 (Streptomycin, CAS No. 57-92-1) 和双氢链霉素 (Dihydrostreptomycin, CAS No. 128-46-1) 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. 5.50 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件

流动相: A 相—0.1% 甲酸水溶液; B 相—甲醇

总流速: 0.4 mL/min

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

进样体积: 5 μL

柱温: 45°C

洗脱方式: 梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 5%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	35
2.50	Pumps	Pump B Conc.	35
2.55	Pumps	Pump B Conc.	5
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器:	LCMS-8040	离子源电压:	4.0 kV
离子源:	ESI, 正离子模式	扫描模式:	多反应监测 (MRM)
加热模块温度:	400°C	驻留时间:	50 ms
DL 温度:	280°C	延迟时间:	3 ms
雾化气流速:	3.0 L/min	MRM 参数:	见表 2
干燥气流速:	10 L/min		

表 2 链霉素和双氢链霉素 MRM 优化参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
链霉素	582	263*	-28.0	-31.0	-27.0
		246	-28.0	-39.0	-27.0
双氢链霉素	584	263*	-30.0	-33.0	-28.0
		246	-30.0	-41.0	-25.0

注: \*表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制

标准物质: 链霉素和双氢链霉素。

标准工作溶液配制: 称取适量的链霉素、双氢链霉素标准物质, 分别用 0.3% 乙酸水溶液溶解并配制成 1.0 mg/mL 的标准储备溶液。避光保存于 -18°C 冰柜中。吸取适量链霉素、双氢链霉素标准储备溶液, 用 0.3% 乙酸水溶液稀释成 0.1 µg/mL 的混合标准溶液, 避光保存于 -18°C 冰柜中

1.4 样品前处理方法

参照《GB/T 22995-2008 蜂蜜中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》中样品前处理方法。

**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

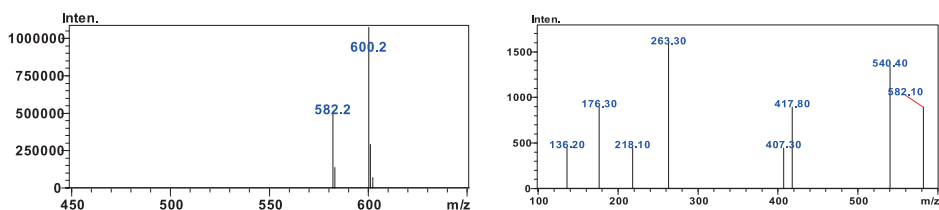


图1 链霉素的一级质谱图和产物离子扫描图 (CE值-35V)

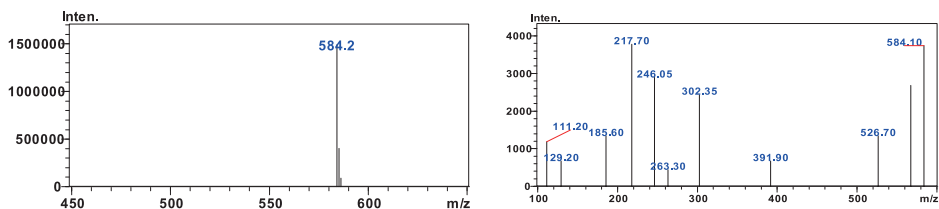


图2双氢链霉素的一级质谱图和产物离子扫描图(CE值-35V)

## 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

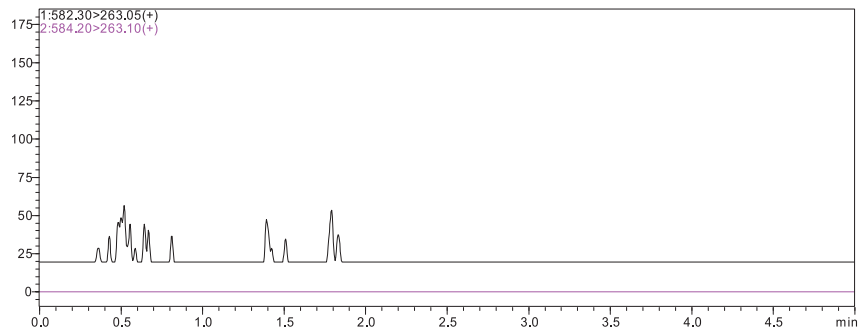


图 3 链霉素和双氢链霉素蜂蜜空白基质 MRM 色谱图

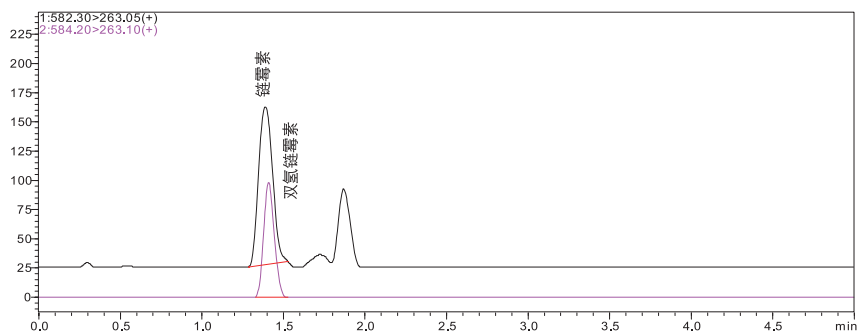


图 4 链霉素和双氢链霉素基质加标样品的 MRM 色谱图(2.5 µg/kg)

## 2.3 线性范围

将 1.25 µg/kg、2.50 µg/kg、5.00 µg/kg、10.00 µg/kg、50.00 µg/kg 和 100.00 µg/kg 不同浓度的混合基质标准工作液按 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 5 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。

根据 GB/T 22995-2008《蜂蜜中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》中测定方法个样品浓度 6.25 ug/L 相当于 1.25 µg/kg、12.5 ug/L 相当于 2.50 µg/kg、25 ug/L 相当于 5.00 µg/kg、50 ug/L 相当于 10.00 µg/kg、250 ug/L 相当于 50.00 µg/kg、500 ug/L 相当于 100.00 µg/kg。

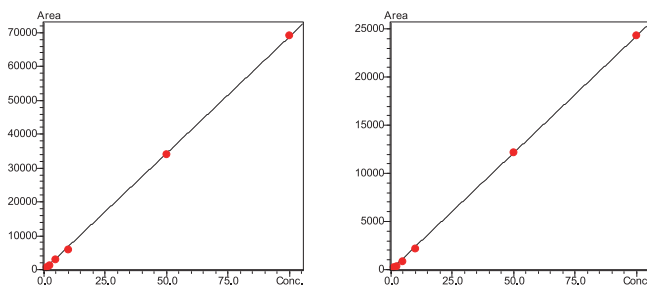


图 5 链霉素和双氢链霉素的校准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	相关系数 $r$	检出限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
1	链霉素	$Y = (688.129)X$	1.25~100.00	0.9996	0.33	1.00
2	双氢链霉素	$Y = (242.993)X$	1.25~100.00	0.9998	0.07	0.21

#### 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 0.04% ~ 0.37% 和 0.97% ~ 4.73% 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% (1.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		RSD% (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		RSD% (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
链霉素	0.26	2.15	0.19	1.59	0.27	1.29
双氢链霉素	0.09	4.49	0.04	4.37	0.09	4.38

#### 2.5 实际样品检测结果

以两种市售蜂蜜作为检测样品，检测其中的链霉素和双氢链霉素，检测结果两种市售蜂蜜中均未检出链霉素和双氢链霉素。如图 6 所示。

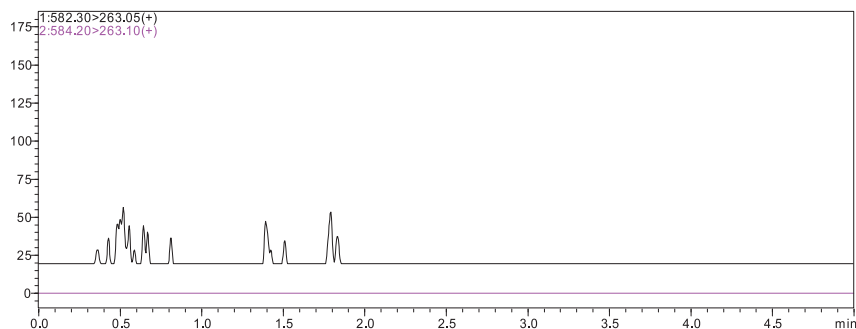


图 6 市售蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的检测

## 结果讨论

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 联用测定蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的方法。该方法在分析速度快，且线性范围宽，校准曲线的相关系数良好。对 1.25  $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5  $\mu\text{g}/\text{L}$  和 50  $\mu\text{g}/\text{L}$  混合基质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 0.04% ~ 0.37% 和 0.97% ~ 4.73% 之间，系统精密度良好。该方法具有分析速度快、灵敏高、重复性好的特点，适合蜂蜜中链霉素和双氢链霉素的检测。