

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的四环素类抗生素残留

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动物源性食品中 7 种四环素类抗生素残留的方法。样品经处理后，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 20 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/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 0.014%~0.122% 和 2.459%~3.987% 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 牛奶

四环素类抗生素 (Tetracyclines, TCs) 为广谱抗生素，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、强力霉素等。在畜禽生产中四环素类抗生素被广泛作为药物添加剂，用于防治肠道感染和促进生长。在奶牛业中四环素用来治疗乳腺炎等广科疾病，但容易诱导耐药菌株。许多国家对 TCs 残留实施例行监控，如欧盟的限量规定牛奶中最高残留量为 0.1 mg/kg。

高效液相色谱-串联质谱联用技术是近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 联用测定牛奶中的四环素类抗生素的方法。

1. 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℃

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(+)

加热模块温度: 400℃

离子喷雾电压: 4.5 kV

扫描模式: 多反应监测(MRM)

雾化气: 氮气 3.0 L/min

驻留时间: 15 ms

干燥气: 氮气 15 L/min

延迟时间: 3 ms

碰撞气: 氩气

MRM 参数: 见表 2

DL 温度: 250℃

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(1/19, V/V)稀释成不同浓度的混合标准工作液。

1.4 样品前处理方法

参照国标《GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法》

表 2 MRM 优化参数

| 化合物名称 | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|--------|-------|--------|----------------|-------|----------------|
| 二甲胺四环素 | 458.2 | 441.2* | -18 | -20 | -24 |
| | | 283.1 | -11 | -44 | -20 |
| 土霉素 | 461.2 | 426.0* | -14 | -18 | -23 |
| | | 443.1 | -14 | -14 | -24 |
| 四环素 | 445.2 | 410.2* | -11 | -22 | -30 |
| | | 427.0 | -11 | -16 | -23 |
| 去甲基金霉素 | 465.1 | 448.0* | -12 | -16 | -24 |
| | | 154.2 | -12 | -32 | -18 |
| 金霉素 | 479.2 | 444.1* | -12 | -24 | -23 |
| | | 154.1 | -12 | -28 | -12 |
| 甲烯土霉素 | 443.2 | 426.2* | -11 | -20 | -23 |
| | | 201.2 | -11 | -30 | -22 |
| 强力霉素 | 445.2 | 428.2* | -11 | -16 | -23 |
| | | 154.1 | -11 | -34 | -17 |

*表示定量离子

2. 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。

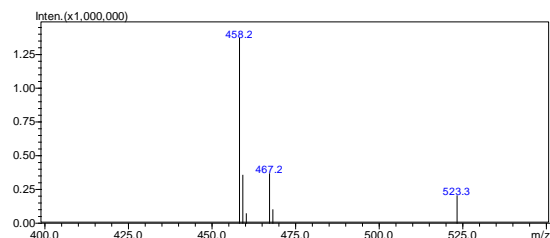


图1 二甲胺四环素的一级质谱图

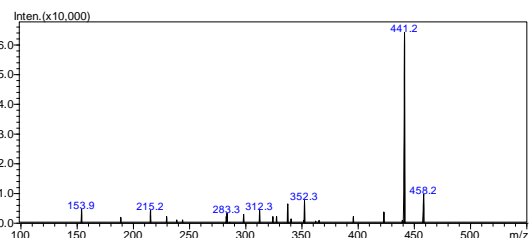


图2 二甲胺四环素的产物离子扫描图
(CE值-22V)

土霉素的一级质谱图见图 3，产物离子扫描质谱图见图 4。

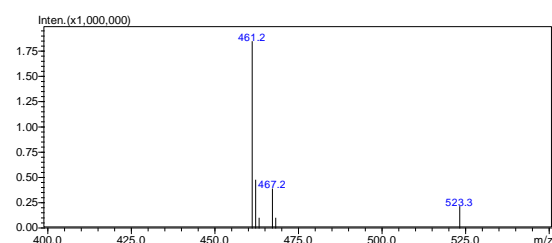


图3 土霉素的一级质谱图

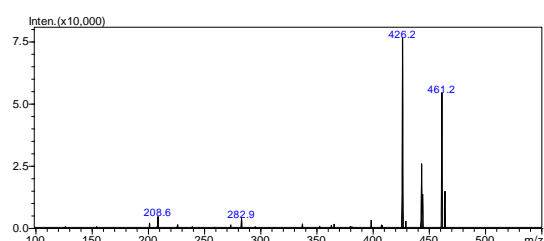


图4 土霉素的产物离子扫描图(CE值
-25V)

四环素的一级质谱图见图 5，产物离子扫描质谱图见图 6。

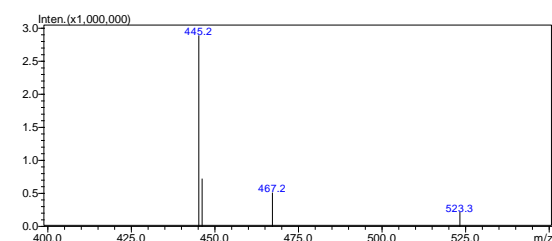


图5 四环素的一级质谱图

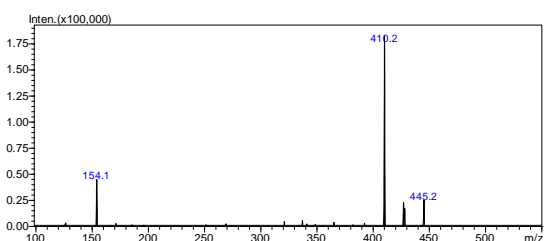


图6 四环素的产物离子扫描图(CE值
-20V)

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。

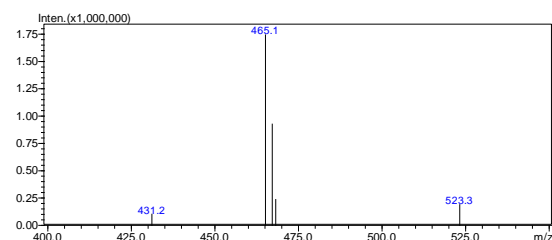


图7 去甲基金霉素的一级质谱图

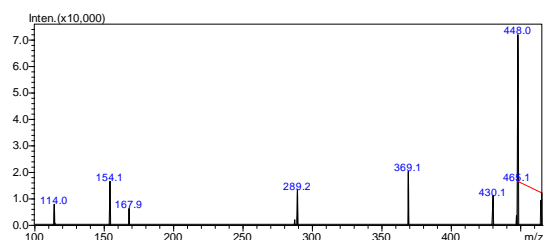


图8 去甲基金霉素的产物离子扫描图
(CE值-20V)

金霉素的一级质谱图见图 9，产物离子扫描质谱图见图 10。

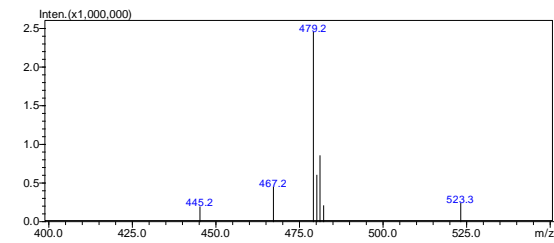


图9 金霉素的一级质谱图

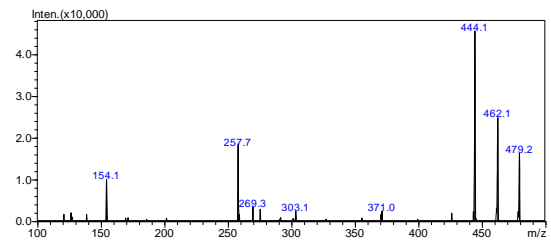


图10金霉素的产物离子扫描图(CE值
-20V)

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。

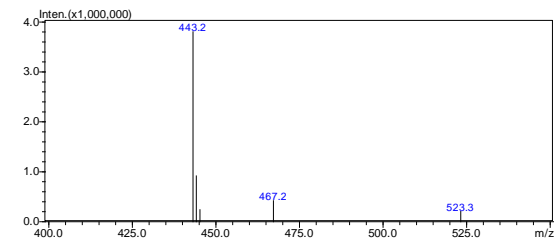


图11 甲烯土霉素的一级质谱图

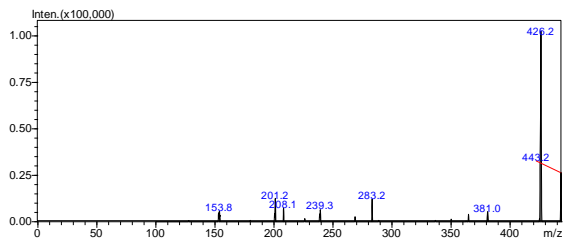


图12 甲烯土霉素的产物离子扫描
图(CE值-20V)

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。

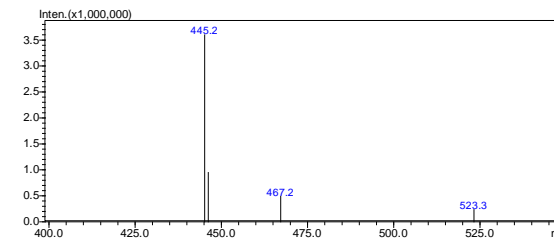


图13 强力霉素的一级质谱图

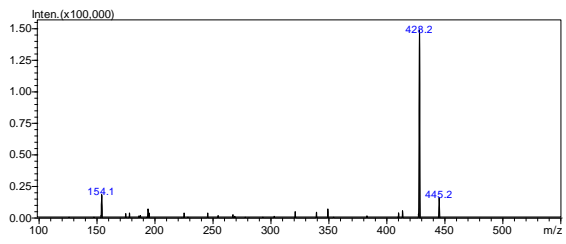


图14 强力霉素的产物离子扫描
图(CE值-21V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

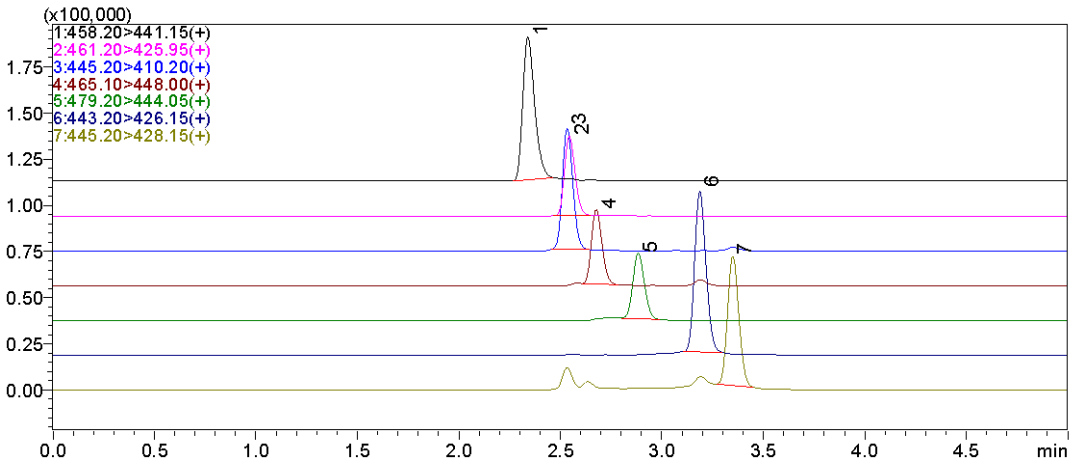


图 15 标准样品的 MRM 色谱图(500 µg/L)

(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、5 µg/L、10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L、100 µg/L、200 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。

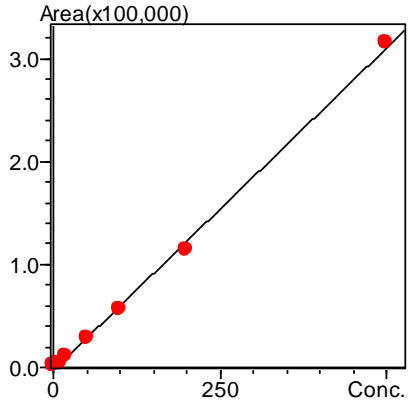


图 16 二甲胺四环素的校准曲线

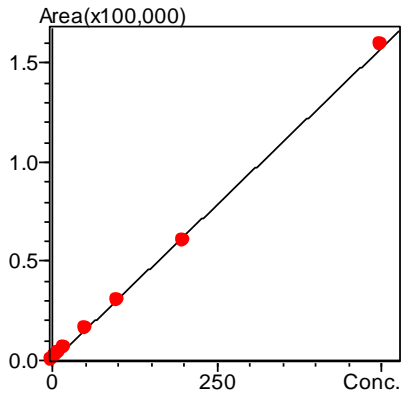


图 17 土霉素的校准曲线

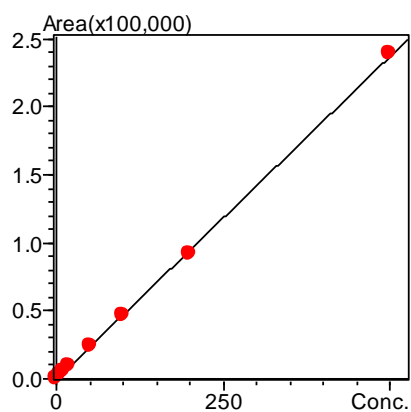


图 18 四环素的校准曲线

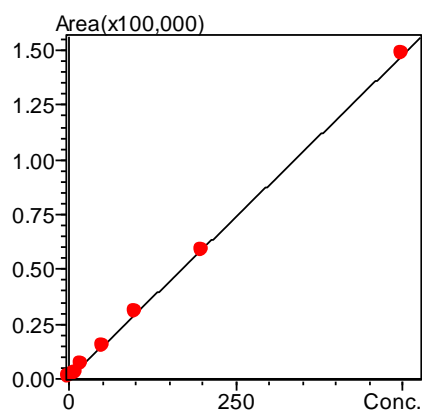


图 19 去甲基金霉素的校准曲线

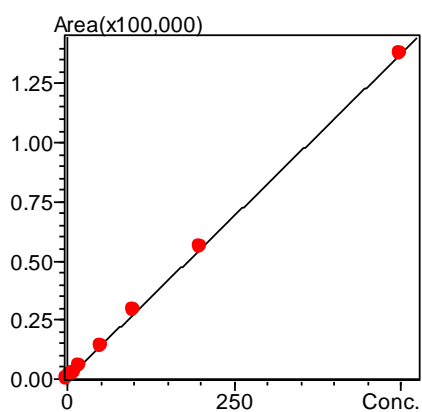


图 20 金霉素的校准曲线

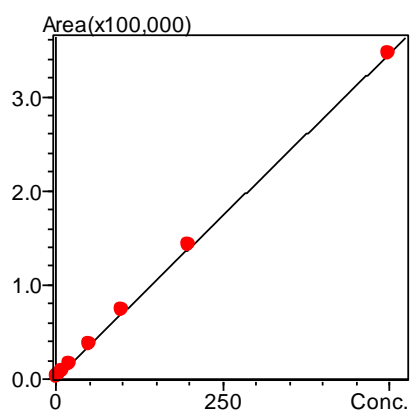


图 21 甲烯土霉素的校准曲线

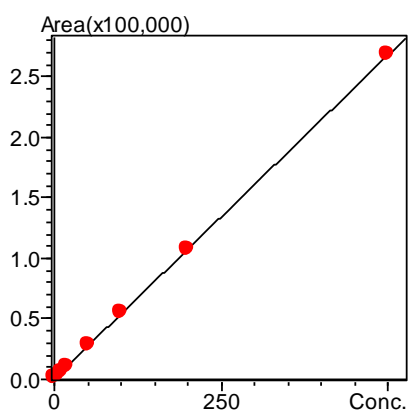


图 22 强力霉素的校准曲线

表 3 校准曲线参数

| No. | 名称 | 校准曲线 | 线性范围 ($\mu\text{g/L}$) | 相关系数 r |
|-----|--------|-------------------------------|-----------------------------|--------|
| 1 | 二甲胺四环素 | $Y = (629.649)X + (-3957.10)$ | 5.0~500 | 0.9994 |
| 2 | 土霉素 | $Y = (316.707)X + (-587.575)$ | 1.0~500 | 0.9998 |
| 3 | 四环素 | $Y = (475.028)X + (-451.185)$ | 1.0~500 | 0.9999 |
| 4 | 去甲基金霉素 | $Y = (295.352)X + (117.334)$ | 1.0~500 | 1.0000 |
| 5 | 金霉素 | $Y = (274.750)X + (288.032)$ | 1.0~500 | 0.9999 |
| 6 | 甲烯土霉素 | $Y = (688.518)X + (1657.78)$ | 1.0~500 | 0.9999 |
| 7 | 强力霉素 | $Y = (7119.28)X + (-7322.01)$ | 1.0~500 | 1.0000 |

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 0.014% ~ 0.122% 和 2.459% ~ 3.987% 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% (20 $\mu\text{g/L}$) | | RSD% (50 $\mu\text{g/L}$) | | RSD% (100 $\mu\text{g/L}$) | |
|--------|----------------------------|-------|----------------------------|-------|-----------------------------|-------|
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |
| 二甲胺四环素 | 0.099 | 2.669 | 0.050 | 3.136 | 0.062 | 2.459 |
| 土霉素 | 0.122 | 3.987 | 0.089 | 3.360 | 0.014 | 3.385 |
| 四环素 | 0.076 | 2.613 | 0.039 | 2.618 | 0.051 | 2.625 |
| 去甲基金霉素 | 0.099 | 3.836 | 0.052 | 3.392 | 0.059 | 3.113 |
| 金霉素 | 0.081 | 3.539 | 0.109 | 3.521 | 0.045 | 3.197 |
| 甲烯土霉素 | 0.065 | 3.489 | 0.037 | 3.074 | 0.040 | 2.864 |
| 强力霉素 | 0.054 | 2.971 | 0.057 | 3.513 | 0.023 | 2.490 |

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将 5 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。5 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液的色谱图见图 23。通过 LabSolutions Ver. 5.41 软件计算信噪比、仪器检测限(3 倍信噪比计算)，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的信噪比、检测限如表 5 所示。

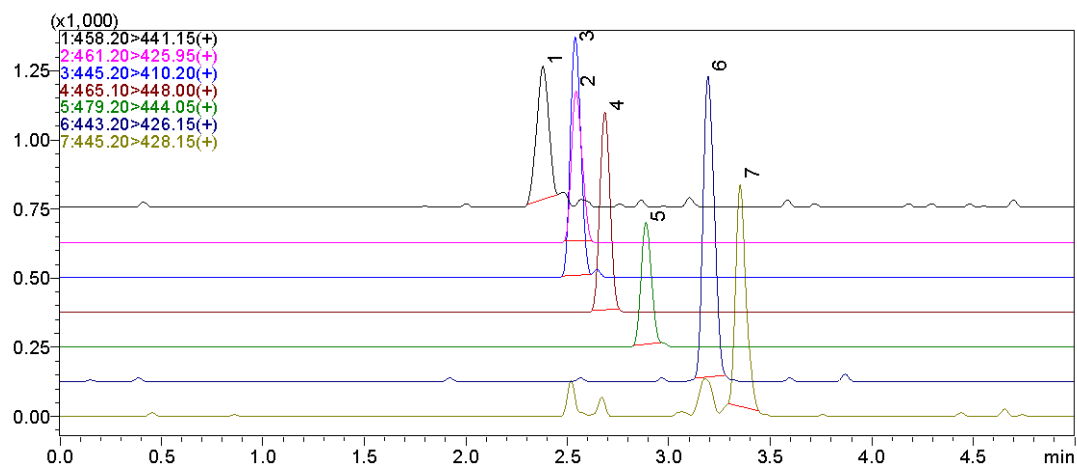


图 5 5 µg/L 混合标准工作液的色谱图

(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 信噪比(S/N)和检测限(LOD)

| 样品名称 | S/N | LOD(µg/L) |
|--------|--------|-----------|
| 二甲胺四环素 | 19.23 | 1.54 |
| 土霉素 | 162.35 | 0.13 |
| 四环素 | 105.35 | 0.18 |
| 去甲基金霉素 | 25.22 | 0.14 |
| 金霉素 | 57.15 | 0.26 |
| 甲烯土霉素 | 26.81 | 0.37 |
| 强力霉素 | 14.64 | 1.13 |

2.6 基质加标实验

选用不含 7 种四环素类抗生素的牛奶为空白样品，添加 50 µg/kg 的混合标准品，进行基质加标实验，牛奶样品的检测色谱图与加标样品色谱图如图 6 和图 7 所示。由表 6 结果可知该方法灵敏度高，对于牛奶样品中的四环素类抗生素检测的测定低限均优于国标《GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法》。

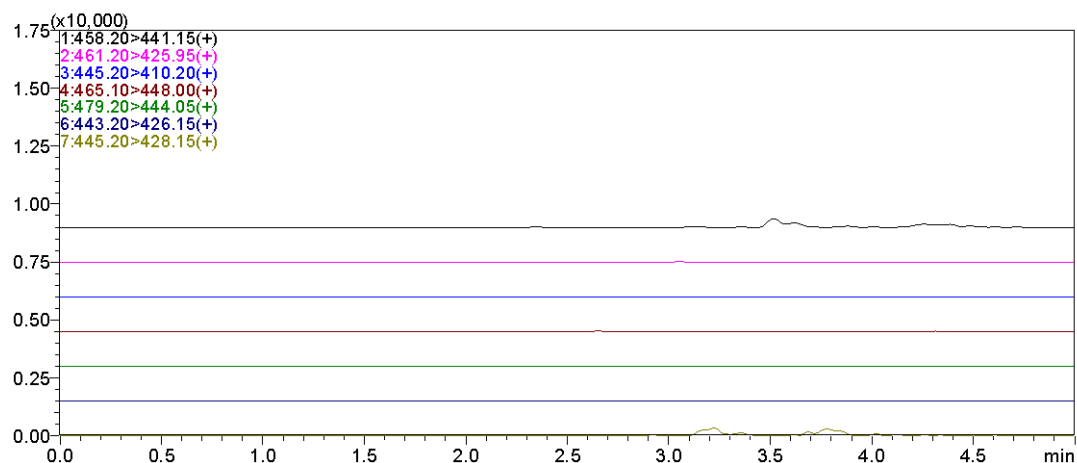


图 6 牛奶样品的 MRM 色谱图（未检出）

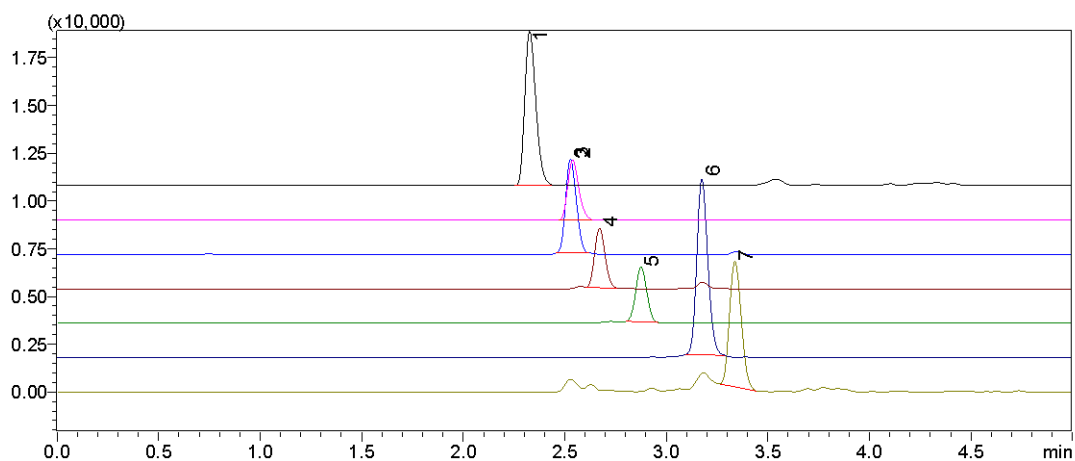


图 7 牛奶加标样品的 MRM 色谱图(50 µg/kg)

(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 加标样品信噪比(S/N)

| 样品名称 | 加标水平(µg/kg) | 信噪比(S/N) |
|--------|-------------|----------|
| 二甲胺四环素 | 50 | 199 |
| 土霉素 | 50 | 1895 |
| 四环素 | 50 | 1292 |
| 去甲基金霉素 | 50 | 243 |
| 金霉素 | 50 | 269 |
| 甲烯土霉素 | 50 | 220 |
| 强力霉素 | 50 | 143 |

3. 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 联用测定牛奶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 20 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/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 0.014%~0.122% 和 2.459%~3.987% 之间，系统精密度良好。该方法具有超快速、高灵敏的特点，适合动物食品、水产品中四环素类兽药残留量的快速检测。