



液相色谱-串联质谱联用技术用于牛奶中多残留四环素及其代谢物的检测

应用报告

食品

作者

Yanyan Fang, Hao Zhai, and Yun Zou
Agilent Technologies (Shanghai), Co.
412 Yin Lun Road 200131
China

Jerry Zweigenbaum
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19809
USA

摘要

四环素类抗生素最频繁地被用于畜牧行业中。本文介绍了液相色谱-串联质谱联用技术同时检测牛奶和动物组织中的 10 种抗生素残留，包括二甲胺四环素、差向土霉素、差向四环素、四环素、差向金霉素、去甲基金霉素、金霉素、甲烯土霉素、多西环素和土霉素。安捷伦固相萃取柱和反相 Agilent ZORBAX RX C8 column (5 μ m, 150 mm $\times$ 2.1 mm) 色谱柱在此方法中被用于样品的纯化和分离。各组分的检测限介于 0.5 至 10.0 μ g/kg 之间，定量限 (LOQ) 小于 50 μ g/kg。线性校正曲线的范围是 5 至 1000 μ g/kg。总回收率在 76.4% 至 101% 之间，相对标准偏差 (RSD, n = 6) 小于 8.4%。本方法快速、灵敏、方便、可靠，可以用于牛奶中多残留四环素及其代谢物的同时检测。



Agilent Technologies

前言

抗生素在世界范围内被广泛地用于控制细菌感染和促进健康家畜的奶产量。四环素类抗生素是一类广谱抗生素，因而被广泛使用。但是，在奶及奶制品中含有这些抗生素会影响奶的安全性。

美国食品药品监督管理局(FDA) 限定了四环素，包括土霉素和金霉素的日允许摄入量(ADI)和牛奶中允许限量。这些化合物总残留的日允许摄入量(ADI)是每天每千克体重 25 微克。日允许摄入量(ADI)的 60%是用于牛奶，40% 是可食组织。根据日允许摄入量 (ADI)，牛奶中四环素类，包括土霉素、金霉素和四环素的总残留限量不能

超过 300ppb。四环素的总残留限量被设定为 300ppb，三种四环素中每个组分的阈值为 300ppb 也能被接受。

在欧盟，根据欧盟 2377/90 号法令建立的牛奶中四环素的最大残留限量为 100 µg/kg (100 ppb)。在中国, 国标 (GB/T 21317-2007) 也设定了牛奶和动物组织中这些化合物的确定方法。该法规于 2008 年 4 月 1 日正式生效。

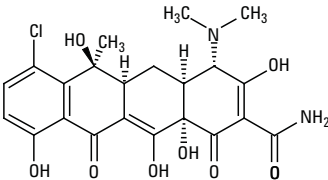
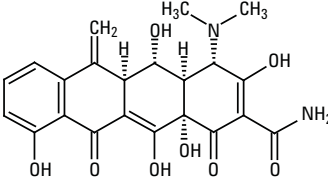
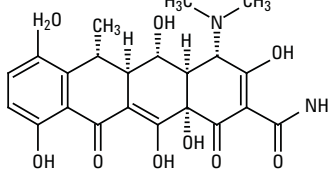
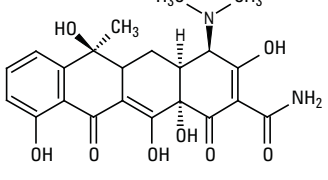
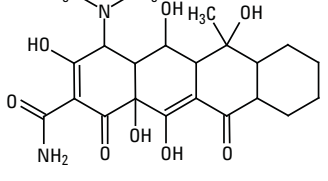
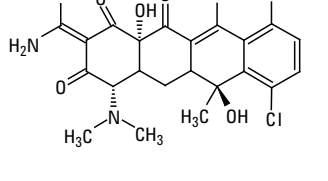
本研究的目的是建立利用 Agilent 6410 LC/MS/MS 系统检测牛奶中四环素及其代谢物的方法。本方法快速而易用。四环素及其代谢物的结构见表 1。

表 1. 本研究中的化合物

序号	化合物名称	CAS 号	结构图
1	二甲胺四环素	10118-90-8	
2	土霉素	6153-64-6	
3	四环素	60-54-8	
4	去甲基金霉素	127-33-3	

(续)

表 1. 本研究中的化合物

序号	化合物名称	CAS 号	结构图
5	金霉素	57-62-5	
6	甲烯土霉素	914-00-1	
7	多西环素	564-25-0	
8	差向四环素	64-75-5	
9	差向土霉素	35259-39-3	
10	差向金霉素	14297-93-9	

实验部分

化学试剂和化学品

液相色谱级的水和甲醇，以及甲酸全部购自 Fluka。标准品都购自 Sigma-Aldrich。

仪器参数

表 2. LC/MS/MS 条件

HPLC					
色谱柱	ZORBAX RX-C8, 2.1 mm × 150 mm, 5 μm (部件号 883700-906)				
流速	0.3 mL/min				
流动相	A: 水/0.1% 甲酸 B: 甲醇				
梯度	0–10 min, B 从 5% 到 30% 10–12 min, B 从 30% 到 40% 12.5–18 min, B 65% 18.5–25 min, B 95% 25.5 min, B 5.0%				
运行时间	28 min				
运行后时间	5 min				
柱温	30 °C				
进样量	5 μL				
质谱参数					
离子源	电喷雾				
离子化模式	正离子模式				
干燥气温度	350 °C				
干燥气流速	10 L/min				
雾化器压力	45 psi				
毛细管电压	4000 V				
MRM 参数设定					
化合物名称	碰撞诱导 解离电压(V)	母离子	子离子	碰撞能量	保留时间 (min)
二甲胺四环素	120	458	352 441	35 20	8.58
差向土霉素	120	445	410 427	20 10	8.60
差向四环素	120	461	426 444	20 15	9.47
四环素	120	445	410 427	20 15	9.90
土霉素	120	461	426 443	20 10	9.95
去甲基金霉素	120	465	430 448	25 15	11.25
差向金霉素	120	479	444 462	22 15	11.59
金霉素	120	479	444 462	22 15	12.95
甲烯土霉素	120	443	381 426	25 15	13.98
多西环素	120	445	154 428	30 15	14.08

样品前处理

提取步骤:

1. 称 5 克牛奶样品（精确至 0.01 g）加入到 50 毫升比色管中，溶于 0.1 M/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液，定容至 50 毫升
2. 涡旋震荡 1 分钟，提取液在冰水混合液中超声 10 分钟
3. 将样品转移至 50 毫升聚丙烯离心管中并冷却至 0 °C ~ 4 °C
4. 样品在 15 °C 下，5000 r/min 离心 10 分钟
5. 快速滤纸过滤

净化:

1. 取 10 毫升提取液（相当于 1g 样品），倒入安捷伦 SampliQ OPT 型固相萃取柱（部件号 5982-3036），速度为每秒一滴
2. 当它完全洗脱后，用三氟乙酸调节 3 mL 水至 pH 4.5 清洗固相萃取柱，然后丢弃所有流出物
3. 在 2.0 kPa 的负压下，抽固相萃取柱 5 分钟
4. 用 10 mL 的 10 mmol 乙二酸的甲醇溶液洗脱
5. 收集洗脱液，在 40 °C 下氮气吹至干
6. 用 1 mL 的初始流动相溶解残留物
7. 用 0.45 µm 的滤膜过滤，然后进样

结果与讨论

优化和分离

碰撞诱导解离电压和碰撞能量(CE)优化

众所周知，三重串联四极杆液质联用系统是识别、确认和定量食品基质中目标化合物的最佳工具。为了获得最高的响应，仅仅每个组分的两个参数被用于质谱优化，即碰撞诱导解离电压和碰撞能量。合适的碰撞诱导解离电压是为了将母离子最大化地传输至质量分析器。合适的碰撞能量提供合格子离子的最高丰度的定量。

一种优化方法是在一次运行中设定不同的碰撞诱导解离电压段多次进样。图 1 是二甲胺四环素采用该方法的图示。结果表明，对于二甲胺四环素，随着电压增加，母离子响应增加很少。采用同样的方式优化碰撞能量，四环素的结果见图 2。

最近安捷伦公司推出了方法自动优化 (Optimizer) 程序, 它可以自动进行碰撞诱导解离电压和碰撞能量的优化, 最后将最优值存于 Optimizer 数据库中。利用这个程序和带色谱柱或不带色谱柱的流动进样模式, 用户只要输入要优化的化合物名称和分子式即可。表面质量会根据分子式自动被计算出来。用户需要指定正模式或负模式下可能的加合物、小质量去除、任何需要排除的离子以及需要采用的方法 (流动相条件等)。一旦开始运行, 程序通过用户选择的一次进样增加量开始进样, 确定母离子并利用步进式的电压梯度进行碰撞诱导解离电压的优化。然后程序选择电压产生最高丰度的母离子。图 3 是四环素采用该方法的结果。

随后二次进样开始进行子离子扫描, 然后选择四个最高丰度的子离子。重复进样并运行 MRM 采集每个离子的最优碰撞能量。那些生成最强信号子离子响应的碰撞能量会自动确定并存入数据库。对于四环素最优的碰撞能量的结果列于图 4, 图 5 是离子碎裂曲线。带子离子的化合物会直接被导入用户的现有分析方法中。

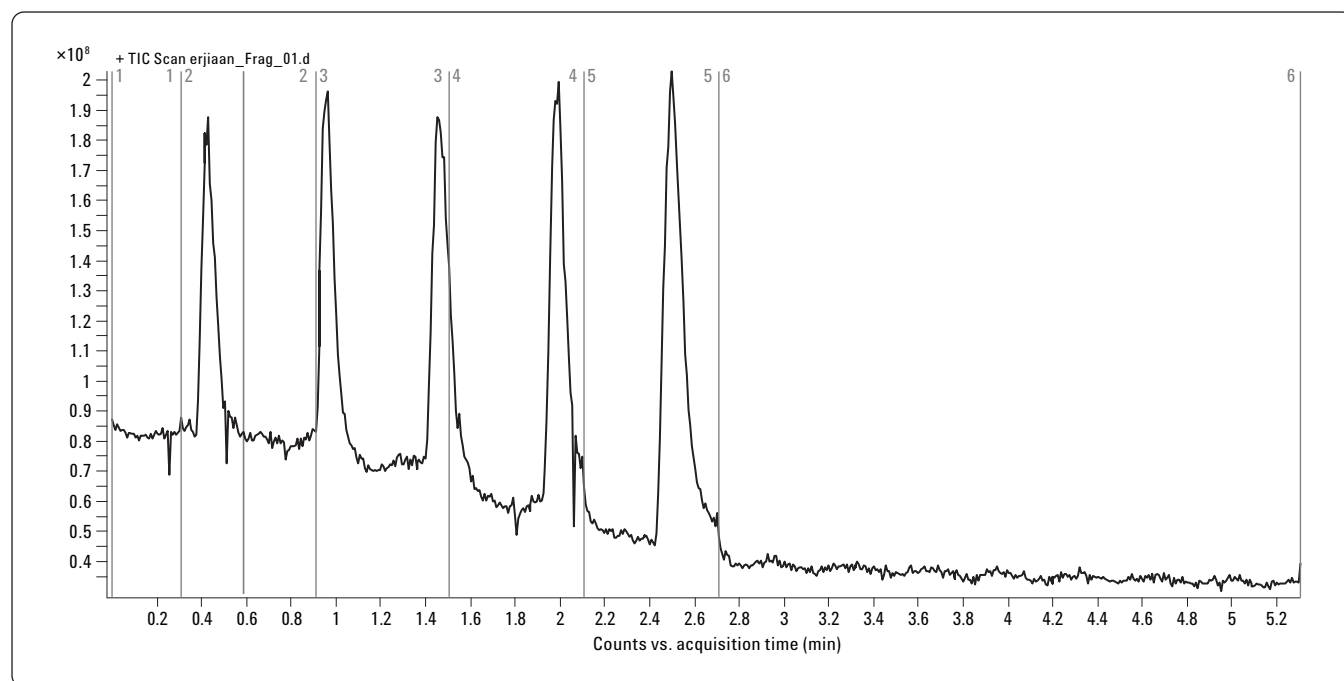


图 1. 对于二甲胺四环素, 碰撞电压从 60 至 120, 每步 20V 的优化结果

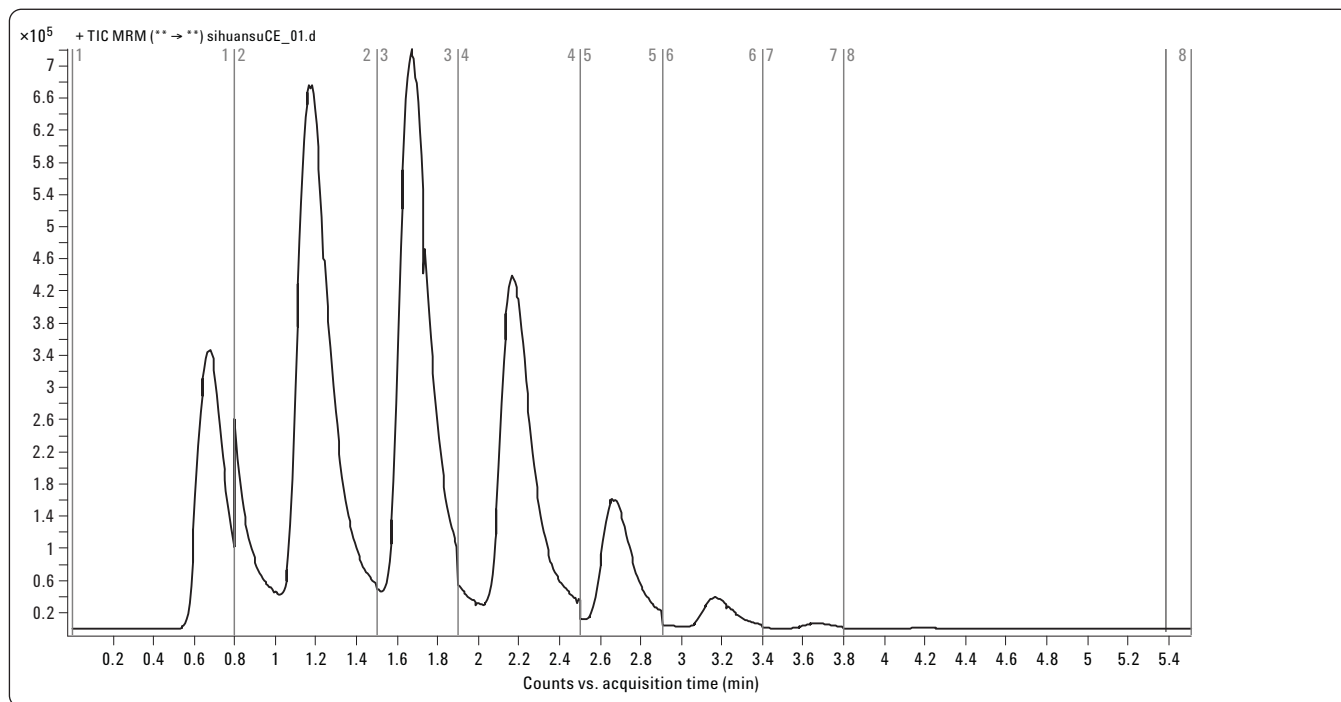


图2. 四环素最佳碰撞能量的手动优化

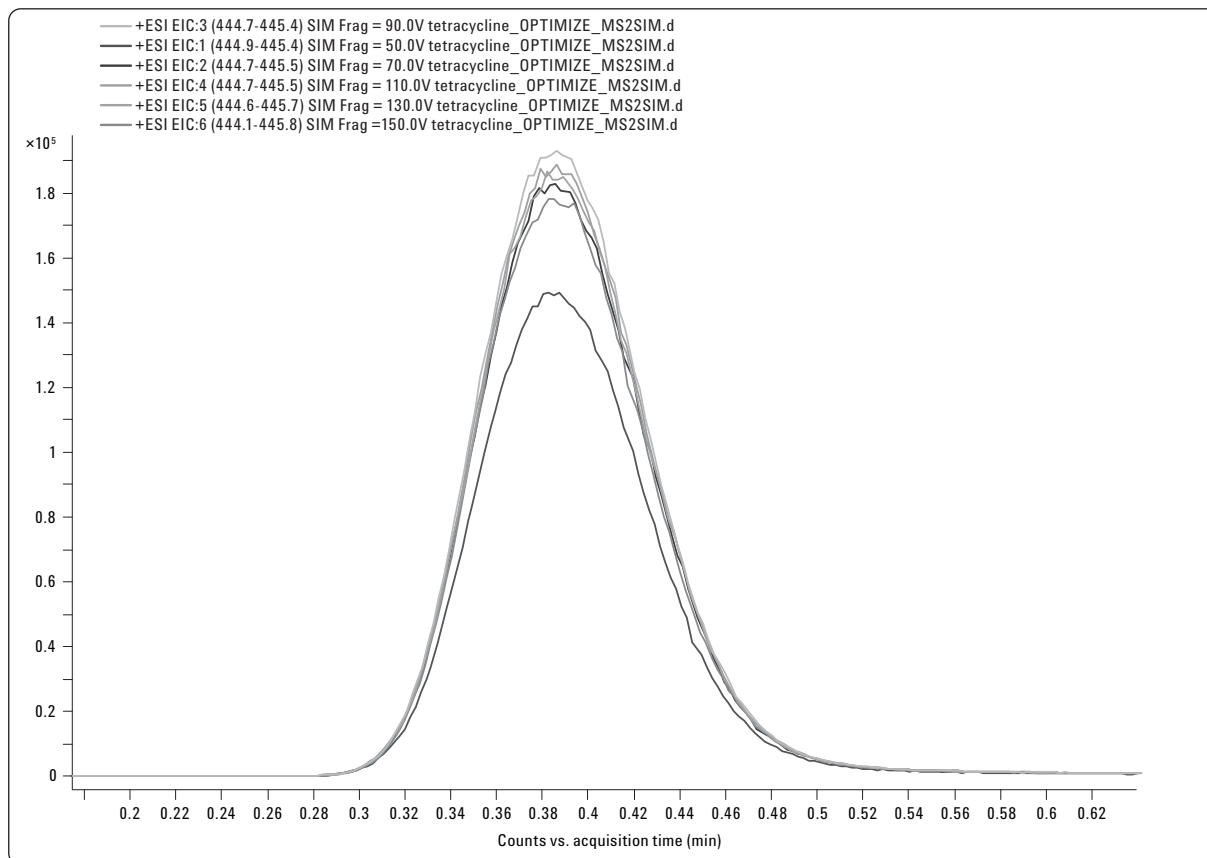


图3. 使用自动优化 (Optimizer) 程序自动确定四环素一次进样的碰撞诱导解离电压

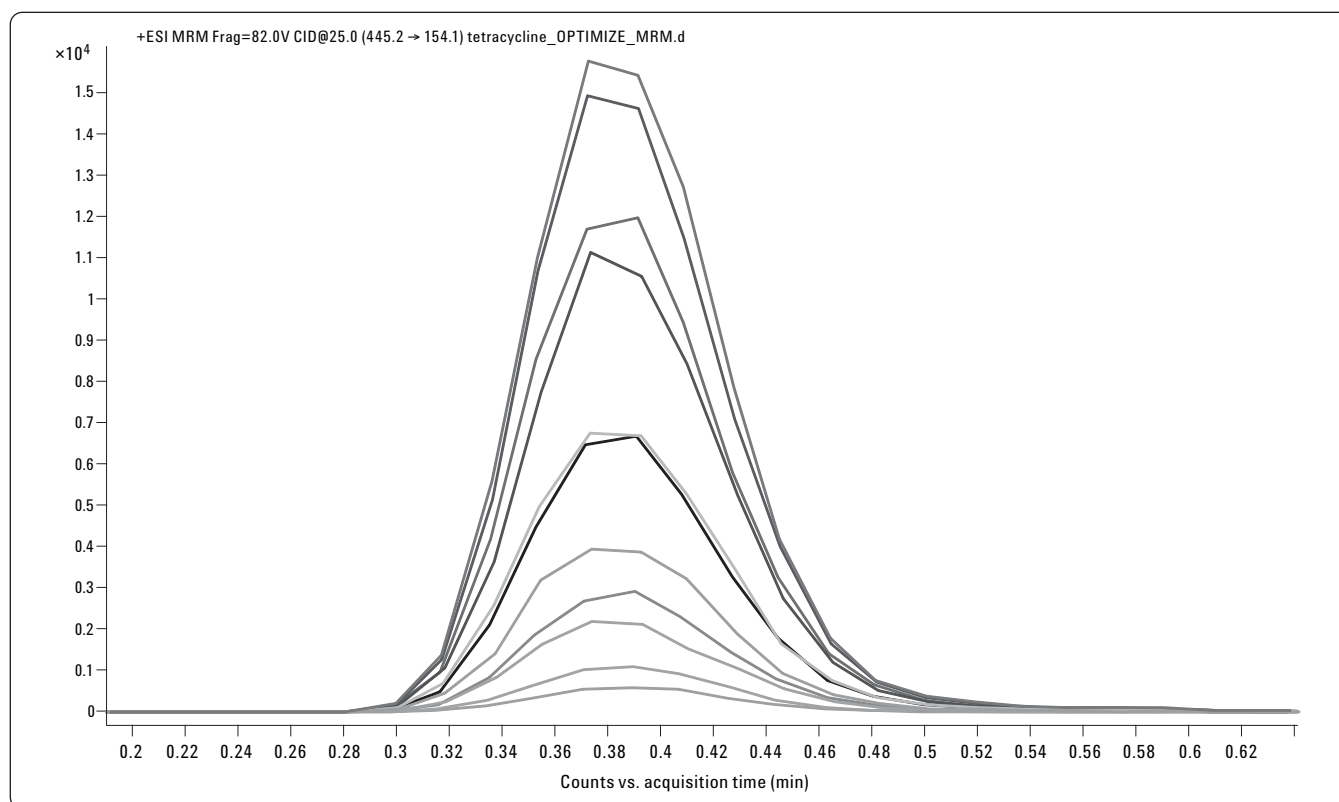


图 4. 使用自动优化 (Optimizer) 程序自动确定四环素一次进样的碰撞能量

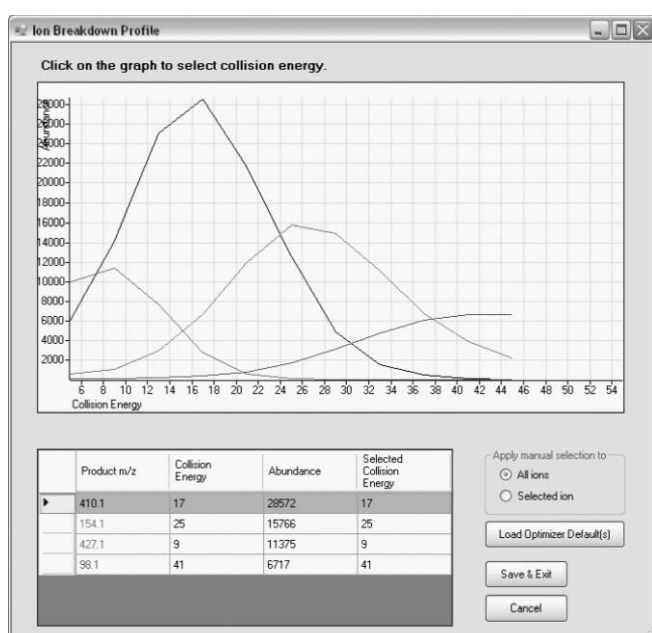


图 5. 自动优化 (Optimizer) 程序得到的离子裂解曲线

分离

四环素、土霉素和金环素的样品处理和分离是非常重要的。这类化合物分离的难点是它们在弱酸、强酸、强碱以及加热的条件下容易发生降解，非对映异构体转化为它的差向异构体。

典型的转化过程参见四环素：

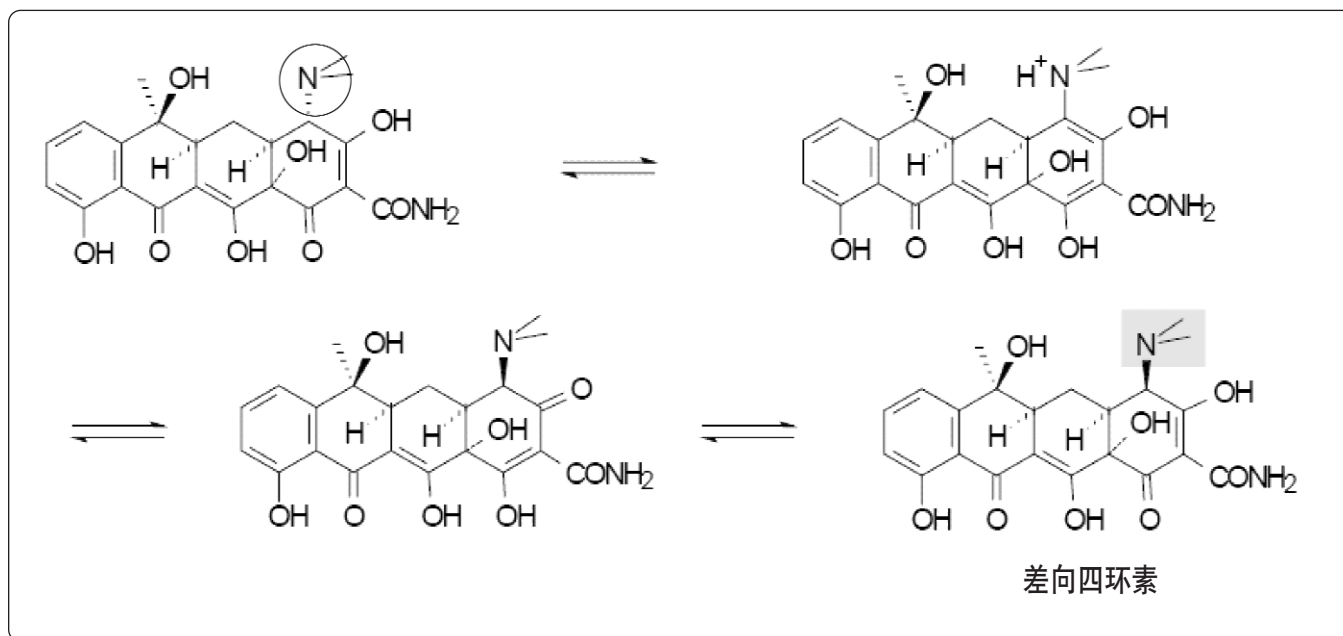


图 6. 四环素到差向四环素的降解过程

四环素及其降解物非对映异构体，它们在串联质谱上具有同样的分子式和同样的碎片离子。因而它们具有相同的母离子、定性离子和定量离子。为了在高分离度快速液相色谱仪(RRLC)上识别和确认它们，组分的分离对该分析是重要的。色谱柱采用 ZORBAX Rx-C8, 2.1 mm × 150 mm, 5- μ m 和简单的梯度洗脱，结果表明三个异构体得到了很好地分离。参数设置及保留时间见表 2。图 7 是四环素和它的非对应异构体分离的色谱图。

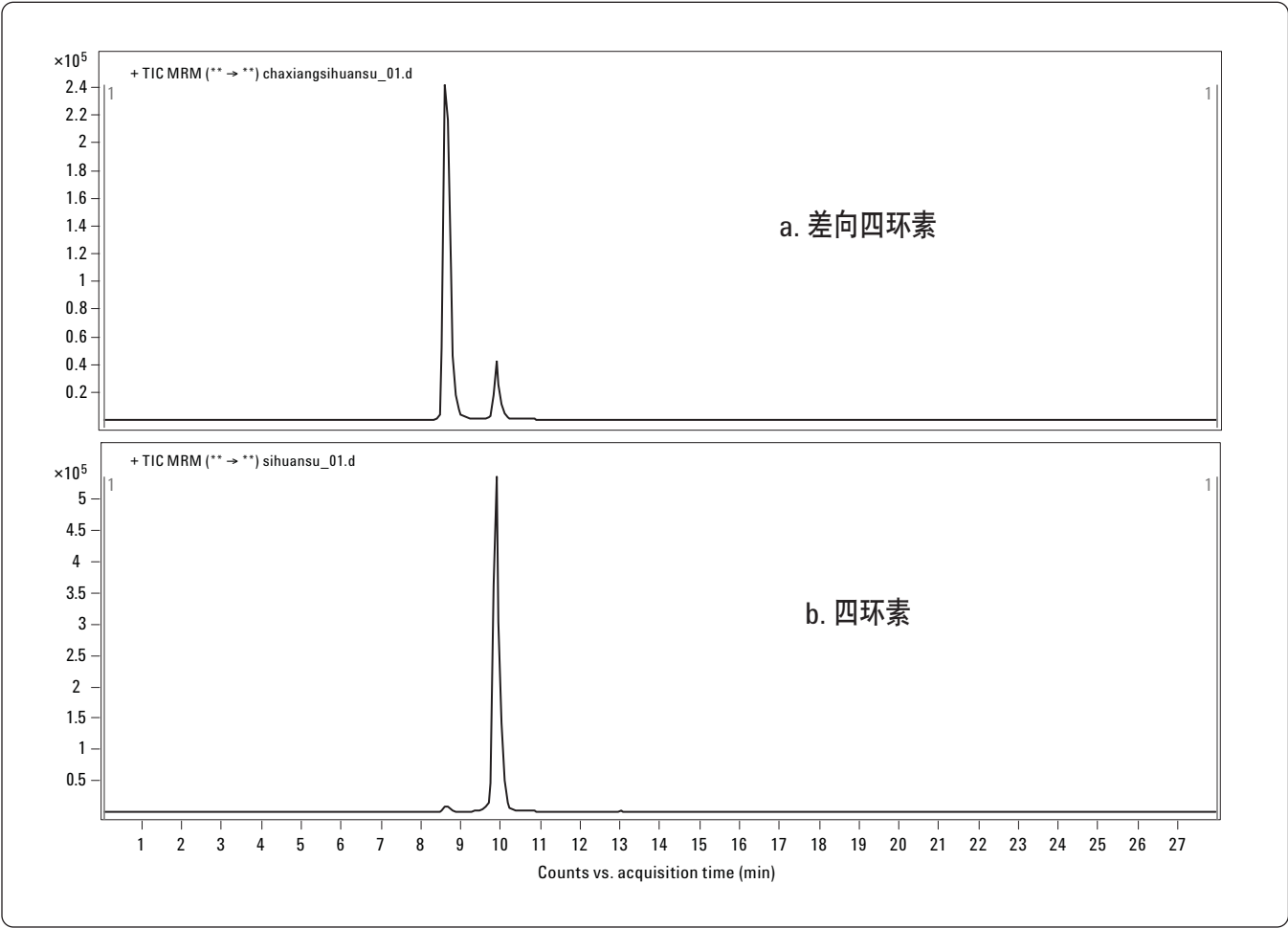


图 7. 四环素和它的降解产物差向四环素的分离色谱图

线性, 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

利用标准溶液和牛奶基质考察了线性范围、检测限和定量限。结果列于表 3 中。结果表明标准溶液和牛奶基质的线性相似，线性系数一般都大于 0.99。四环素类化合物在电喷雾离子条件下的离

子化不是太好，但仍然可以获得柱上低皮克级水平的检测限灵敏度。定量限是根据信噪比为 10:1 定义的。二甲胺四环素的校正曲线见图 8。

表 3. 溶剂和牛奶基质中四环素的定量结果

化合物	标准溶液 *			牛奶基质的标准液 *	
	R ²	定量限 (LOQ, S/N=20) 柱上 pg 级	检测限 (LOD S/N=3) 柱上 pg 级	R ²	检测限 (LOD, S/N=3) 柱上 pg 级
二甲胺四环素	0.999	41.5	6.2	0.990	16.3
差向土霉素	0.991	10.8	1.6	0.994	8.7
差向四环素	0.996	14.7	2.2	0.996	12.8
四环素	0.998	9.4	1.4	0.994	10.2
土霉素	0.996	10.7	1.6	0.991	8.6
去甲基金霉素	0.999	22.8	3.4	0.993	8.1
差向金霉素	0.986	38.2	5.7	0.987	11.9
金霉素	0.986	8.1	1.2	0.994	7.6
甲烯土霉素	0.999	20.8	3.1	0.994	12.3
多西环素	0.999	32.2	4.8	0.995	11.2

注 *: 校正曲线的范围是 1 ppb-1 ppm，进样量 5 uL

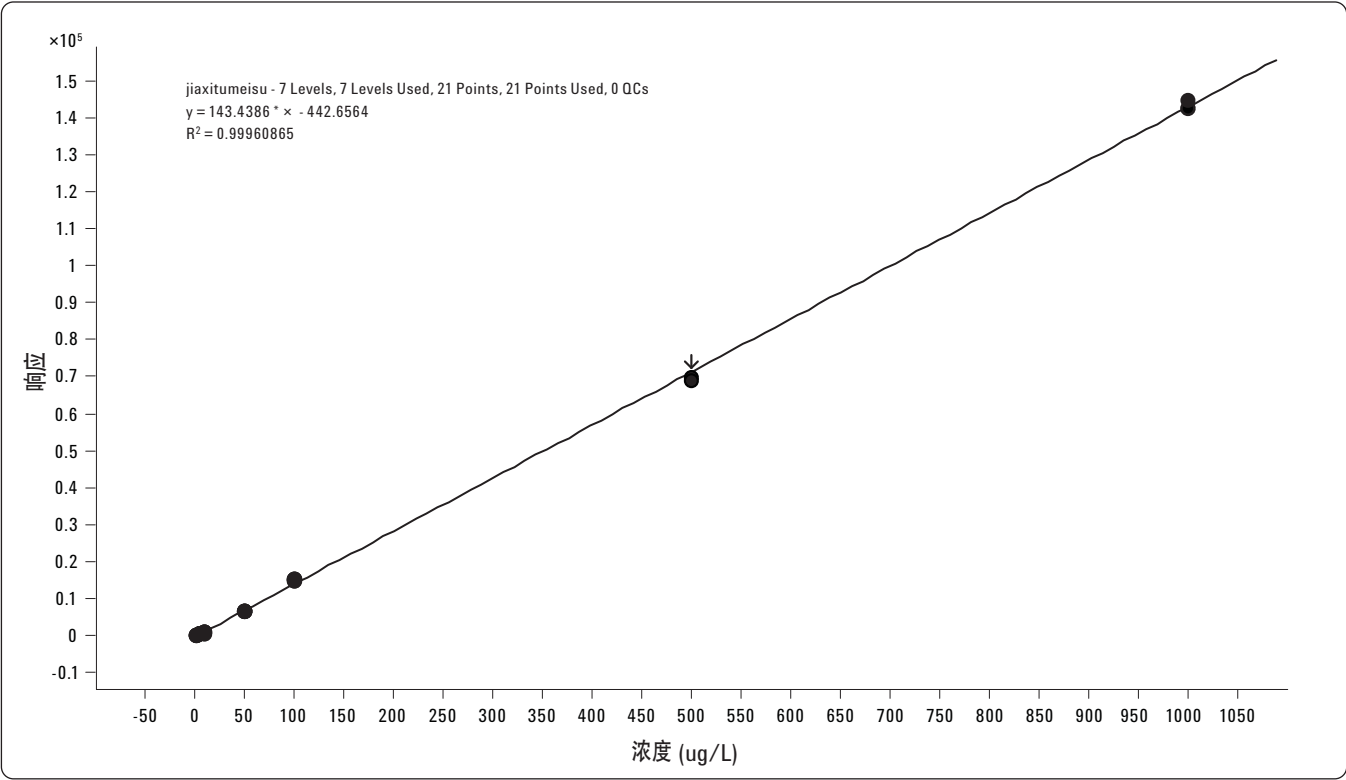


图 8. 四环素的校正曲线，范围是 1 ppb 至 1000 ppb

回收率和重现性

表 4 是方法回收率和重现性考察的结果。所有组分的回收率都大于 80%，这是可以充分接受的。另外表中的精密度在低浓度下一般优于 5%，高浓度下优于 2%。用于化合物确认的离子比例也是非

常性能标准，结果显示具有优异的重现性。图 9 是甲烯土霉素离子比例的结果。离子比例和相应的保留时间为化合物的确认提供了必要证据。

表 4. 牛奶基质中样品回收率和重现性

化合物	牛奶基质中的回收率 (浓度 50 ppb n=6)	RSD % (信号响应 n=6)	RSD % (离子比例 n=6)	牛奶基质中的回收率 (浓度 100 ppb n=6)	RSD % (信号响应 n=6)	RSD % (离子比例 n=6)
二甲胺四环素	96.5	4.9	2.1	101.4	1.6	1.0
差向土霉素	89.2	3.8	1.5	96.3	1.6	0.9
差向四环素	84.4	5.4	1.3	88.2	0.9	0.6
四环素	86.1	2.5	1.2	90.7	1.1	1.2
土霉素	77.6	3.8	1.6	82.5	1.2	0.9
去甲基金霉素	79.2	2.0	3.1	84.7	0.9	0.6
差向金霉素	76.4	5.5	5.4	84.3	1.1	0.5
金霉素	94.3	4.5	1.5	100.9	1.8	1.1
甲烯土霉素	86.3	1.0	1.9	91.2	1.2	0.8
多西环素	78.7	3.6	6.7	82.4	1.0	0.8

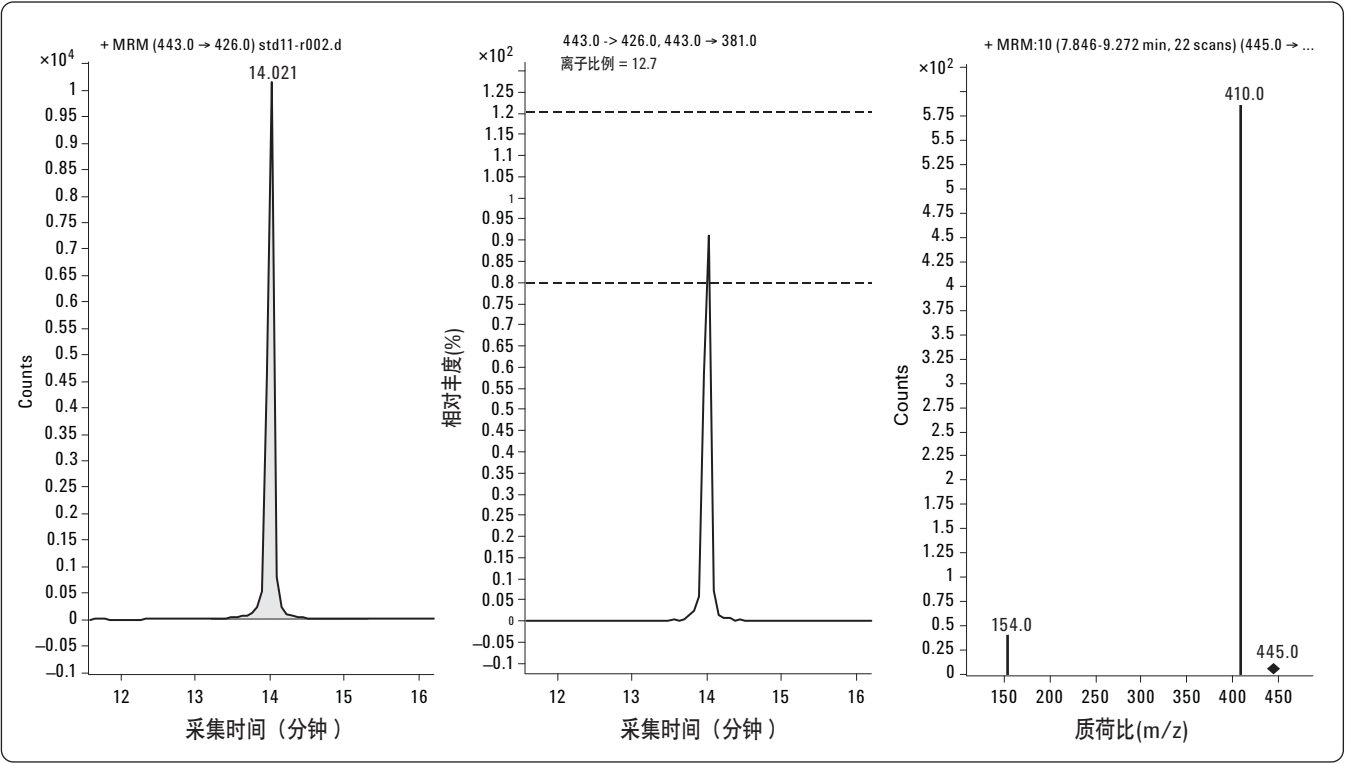


图 9. 甲烯土霉素合格离子和定量离子的离子比例

离子抑制效应的研究

通常串联质谱可以去除化学噪音，获得更“干净”的谱图，即使是分析高基体和复杂基体样品。然而，基体中含有的化合物可能会抑制分析物的离子化。图 10 为甲烯土霉素和四环素在溶剂和牛奶基质中的信号响应的比较。每条曲线斜率的差异表明牛奶基质导致的离子抑制效应。

由于观察到较强的离子抑制，采用外标定量法（ESTD）进行校正，因而与基质相匹配的标准溶液应在不含抗生素的牛奶，或者确定不含被分析物的牛奶中制备。这样可以得到与样品相同的基质效应的校正曲线。

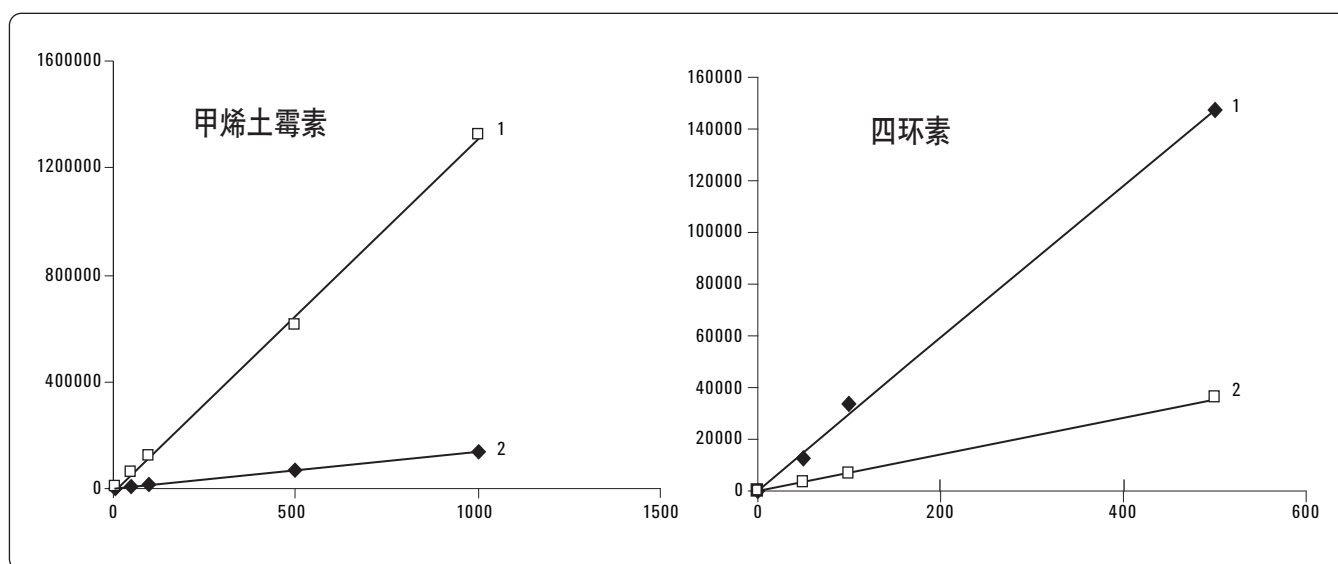


图 10. 牛奶基质中四环素离子抑制效应；1) 纯溶剂的组分响应 2) 牛奶基质中组分响应

结论

结果表明，安捷伦 6410 三重串联四极杆液质联用系统耐用，灵敏度和重复性好，它是牛奶中四环素类抗生素残留检测的理想仪器。中国的国标方法 (GB/T 21317-2007) 要求的检测限是 50 ppb (进样量 100 μ L)。本方法轻松满足这些要求。另外，这类抗生素在弱酸、碱性条件下容易降解。而现在采用的方法避免了此降解反应，液相色谱的分离方法将异构体进行分离，获得可靠的定性定量结果。最后，通过抗生素组分在纯溶剂和牛奶基质的信号响应的比较考察了离子抑制效应的影响。对于外标定量分析，即使样品制备的回收率大于 80%，也需要用基质配成的标准溶液建立校正曲线进行定量分析，这样可以获得更准确的结果。

更多信息

欲知更多有关我们产品和服务的信息，请浏览我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司版权所有，2009 年

中国印刷

2009 年 4 月 9 日

5990-3816CHCN



Agilent Technologies