

使用 QuEChERS 结合 HPLC-MS/MS 快速测定饲料和鸭肉粉中四环素类药物残留量

作者

吴翠玲, 安娟
安捷伦科技(中国)有限公司

前言

四环素类抗生素是一类人工合成或从链霉菌属微生物中提取的具有广谱抗菌活性的化合物。常用的四环素类抗生素包括土霉素、四环素、金霉素、强力霉素等, 作为治疗药物被广泛用于畜禽养殖中。四环素类药物在畜牧养殖业中的滥用和不遵从停药期规定可能导致药物残留, 从而经过食物链进入人体, 沉积于人体骨骼及牙组织内, 与新形成的骨骼和牙齿中所沉积的钙相结合, 导致牙齿呈持久黄色, 俗称“四环素牙”; 四环素类药物还可能在人体肝组织中富集造成肝损害, 引起过敏反应、二重感染和致畸胎作用等; 另外, 四环素类药物残留易诱导耐药菌株, 给人体健康带来隐患。

为了更好地保证人民群众食品安全, 规范四环素药物使用, 我国国家兽药最大残留限量标准 GB 31650-2019 中规定, 不同动物源食品中四环素的残留限量为 100–1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。饲料中则不允许添加四环素类药物。农业农村部公告 282 号-2-2020 液相色谱串联质谱法检测饲料中四环素抗生素的相关检测限为 0.01–0.1 mg/kg ^[1]。本方法采用 Agilent Bond Elut QuEChERS 基质分散样品前处理净化技术, 方法简单快速, 与标准方法的固相萃取前处理相比, 简单、快速, 在满足标准要求的准确度和灵敏度的基础上, 大大提高了分析效率, 同时降低了由于操作烦琐和时间较长而造成的药物不稳定风险。

实验部分



* EDTA-McIlvaine 溶液：称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)，加入 1625 mL McIlvaine 缓冲液中，摇匀，使其充分溶解
McIlvaine 缓冲液的制备：将 1000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 625 mL 0.2 mol/L 磷酸二氢钠溶液混合，然后用 NaOH 或 HCl 将 pH 调节至 4.0 ± 0.05

图 1. 样品前处理过程

表 1. 色谱条件

色谱柱	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm
流动相 A	含 0.1% 甲酸的 2 mmol/L 乙酸铵水溶液
流动相 B	含 0.1% 甲酸的乙腈溶液
梯度	0.0–6.0 min, 10%–40% B; 6.0–7.0 min, 40%–100% B; 7.0–9.0 min, 100% B; 9.1 min, 10% B
后运行时间	2 min
流速	0.4 mL/min

表 2. 质谱条件

电离模式	ESI ⁺
离子源温度	250 °C
干燥气流速	7 L/min
雾化器压力	35 psi
鞘气温度	325 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 (+)
喷嘴电压	300 V

表 3. 质谱参数表

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	裂解电压 (v)	碰撞能量 (eV)
金霉素	479.15	462	130	16
		444	130	19
		154	145	38
土霉素	461.15	443.1	130	8
		426.0	130	16
		154.1	95	40
四环素	445.15	427.1	125	8
		410		16
多西四环素	445.1	428	130	15
		321		33

表 4. 化合物线性范围和相关系数 R^2

化合物名称	线性范围 (ng/mL)	线性相关系数 R^2
土霉素 (OTC)	1~1000	0.9972
金霉素 (CTC)	1~1000	0.9961
四环素 (TC)	1~1000	0.9982
多西四环素 (DTC)	1~1000	0.9991

本文所述方法适用于饲料和鸭肉粉中四环素类药物残留量的检测。通过所得数据推算金霉素、土霉素、四环素和多西四环素在饲料样品中的定量限均为 10 μg/kg，检测限分别为 1、1、5 和 5 μg/kg；在鸭肉粉样品中的定量限均为 10 μg/kg，检测限分别为 2、1、1 和 5 μg/kg。溶剂标准曲线在 1–1000 ng/mL 范围内表现出良好的线性， $R^2 > 0.99$ (见表 4)。金霉素、土霉素、四环素和多西四环素在饲料样品中的平均回收率分别为 72.4%–98.6%、76.9%–92.2%、72.1%–90.7% 和 86.6%–117.7%，且 $\text{RSD} \leq 10.6\%$ ；在鸭肉粉样品中的平均回收率分别为 63.9%–104.3%、61.5%–95.7%、67.9%–77.1% 和 63.5%–111.2%，且 $\text{RSD} \leq 9.5\%$ (回收率均用基质标进行校正)，如表 5 所示。

利用 20 μg/kg 基质标样的峰面积除以 20 μg/kg 溶剂标样的峰面积的百分比，考察四环素类药物在不同组织中基质效应。结果表明，金霉素、土霉素、四环素、多西四环素在饲料中的基质效应分别为 82.4%、67.4%、63.8% 和 48.5%，在鸭肉粉中的基质效应分别为 39.4%、182.1%、117.2% 和 88.9%。

表 5. 在饲料和鸭肉粉基质中标回收率和稳定性 (RSD)

基质	添加浓度 (ng/g)	金霉素		土霉素		四环素		多西四环素	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
饲料	10	98.6	4.5	92.2	7.7	90.7	10.6	86.6	2.8
	20	84.6	8.3	76.9	5.4	72.1	5.0	91.3	2.5
	50	72.4	4.3	84.7	4.7	77.6	4.6	117.7	1.7
鸭肉粉	10	104.3	9.5	95.7	8.7	77.1	8.0	111.2	8.1
	20	63.9	4.5	64.9	1.8	67.9	7.6	63.5	4.9
	50	74.6	4.0	61.5	1.5	70.6	6.4	102.2	4.8

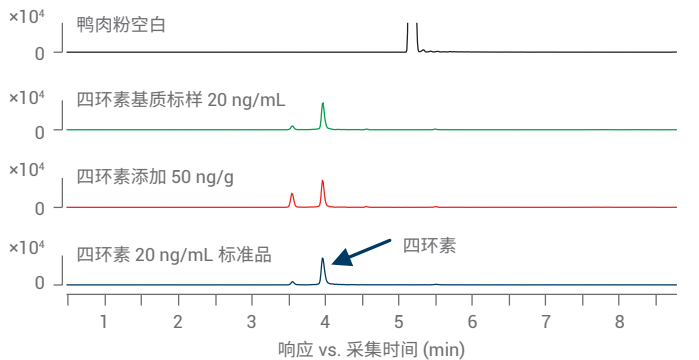
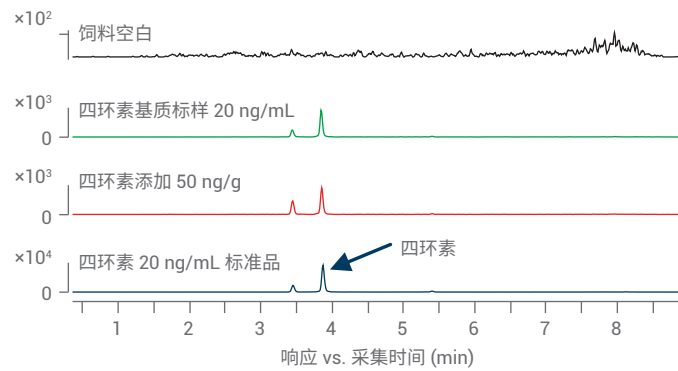
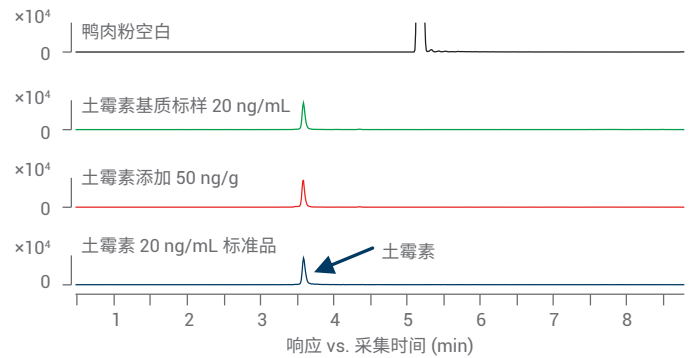
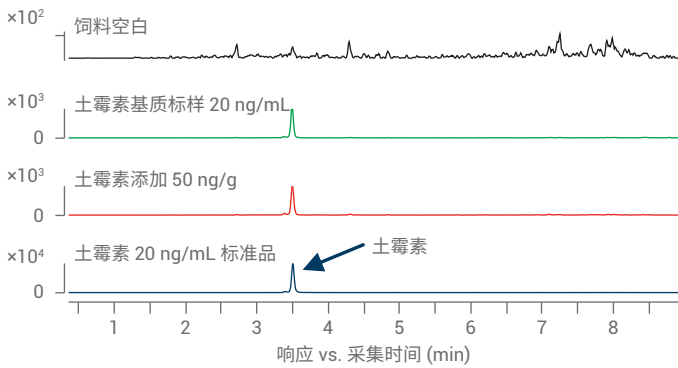
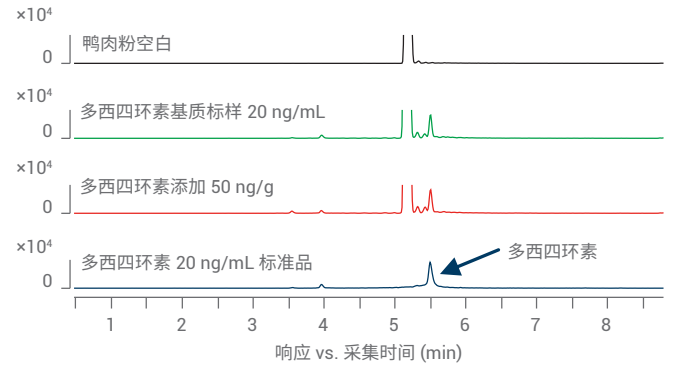
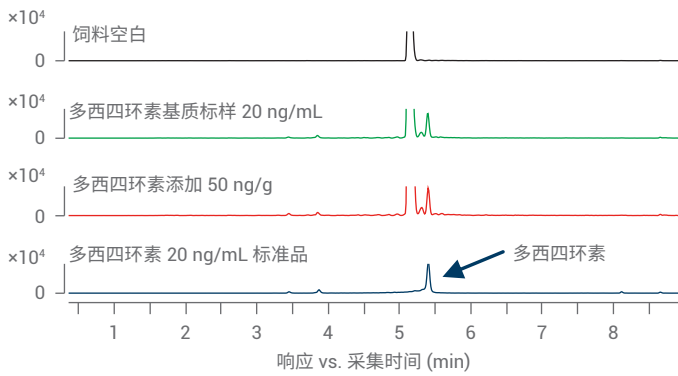
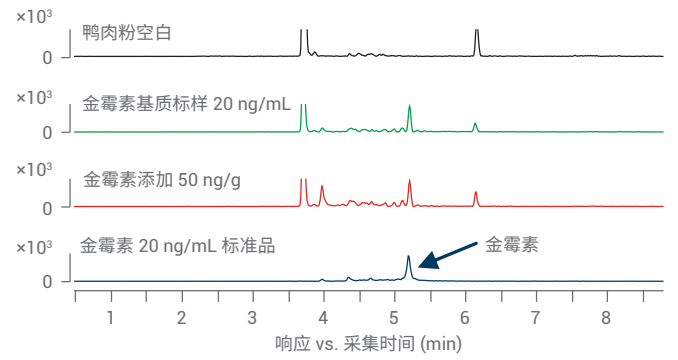
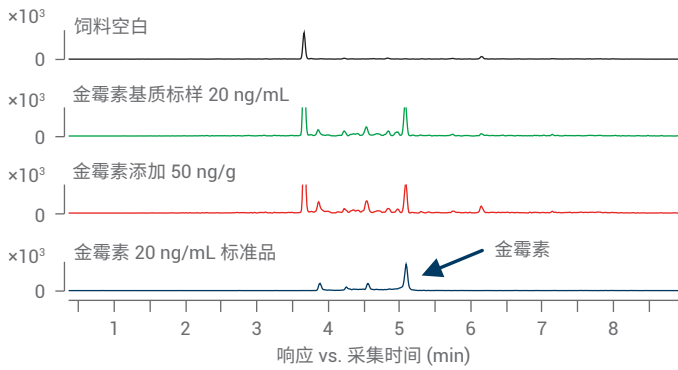


图3. 饲料基质中四环素标样（蓝色）在不同基质中的 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品（红色）、20 ng/mL 基质标样（绿色）、空白基质样品（黑色）的 MRM 色谱图

图4. 鸭肉粉基质中四环素标样（蓝色）在不同基质中的 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品（红色）、20 ng/mL 基质标样（绿色）、空白基质样品（黑色）的 MRM 色谱图

结论

本文采用 QuEChERS 快速基质分散净化技术结合 HPLC-MS/MS 建立了一种定量测定饲料和鸭肉粉中四环素类药物残留量的方法。该方法使用安捷伦含有 50 mg PSA, 150 mg C18 EC 和 900 mg Na₂SO₄ 的 15 mL 分散试剂盒, 可有效去除饲料中的基质干扰, 其优点在于分析快速且操作简单。通过基质标校正即可实现对饲料和鸭肉粉中 4 种四环素类药物快速定量分析的目的。从样品基质空白添加回收和基质标 MRM 谱图 (见图 3, 图 4) 可知, 4 种目标分析均无干扰, 可以准确定量。

消耗品订购信息

消耗品	部件号
Agilent Poroshell 120 EC-C18 色谱柱, 3.0 × 150 mm, 2.7 μm	693975-302
Agilent Bond Elut QuEChERS 兽药残留专用萃取盐包	5982-0032
Agilent Bond Elut QuEChERS 15 mL 基质分散净化试剂盒	5982-4950
Agilent Captiva 针头过滤器, PES, 0.2 μm, 13 mm	5190-5273



微信搜一搜

安捷伦售后服务

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2021
2021 年 5 月 18 日, 中国出版
5994-3615ZHCN