

乳制品中吡喹酮残留的高效液相色谱-串联质谱测定方法研究

吴映璇, 欧阳少伦, 林峰, 邵琳智, 林海丹

(广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623)

Determination of Praziquantel Residues in Milk Products by HPLC-MS/MS

WU Ying-xuan, OU YANG Shao-lun, LIN Feng, SHAO Lin-zhi, LIN Hai-dan

(Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A method was developed with high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS) for simultaneous detection of praziquantel residues in milk products. The praziquantel residues were extracted with acetonitrile-dichloromethane or ethylacetate, separated by C₈ column and analyzed using HPLC-MS/MS in positive mode. Extraction solvent and matrix effects of the praziquantel were discussed. The average recoveries are 81.8%-108.2% with the relative standard deviations of 2.6%-12.7%.

Key words: praziquantel; high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS); milk products

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0142-03

吡喹酮是一种新的广谱抗寄生虫药, 对各种血吸虫、肺吸虫、姜片虫等均有杀灭效力, 用于动物及水生动物养殖业中。2007年日本政府对日本肯定列表制度中各种动物源性食品中吡喹酮的残留做出了修改, 大部分食品中的吡喹酮残留限量加严了, 奶中的吡喹酮残留限量从 $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 修订为一律标准, 即 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。中国规定吡喹酮仅可用于非泌乳绵羊。目前对国内外吡喹酮残留量检测方法的报道极少^[1-2], 未检索到有关乳制品中吡喹酮残留的检测。因此, 建立一种灵敏、简便、准确, 适用于乳制品中吡喹酮残留量检验的方法, 对于填补这一空白有重要的现实意义。

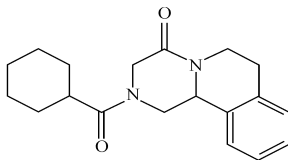


图1 吡喹酮的结构式

Fig.1 Structure of praziquantel

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200液相色谱仪; API 4000 QTRAP质谱仪, 配有电喷雾离子源 (ESI); Milli-Q超纯水器: 美国Millipore公司产品; 旋涡振荡器: 德国IKA公司产品; 离心机 (Eppendorf 5810R); 超声波振荡器。乙腈、甲酸为液相色谱级; 其他试剂均为分析纯: 广州化学试剂厂产品; 海砂为化学纯,

粒度0.65~0.85 mm, SiO₂含量为99%; 吡嗪酮标准品(纯度≥98%): 由sigma公司提供。准确称取一定量的标准品, 用甲醇溶解定容为100 mg·L⁻¹储备液。

1.2 色谱条件

Intersil C₈-3色谱柱(150 mm×4.6 mm×5 μm)或同等条件的色谱柱; 流动相: V(0.1%乙腈): V(乙酸)=6:4; 柱温40 °C; 流速0.80 mL·min⁻¹; 进样量10 μL; 以外标法峰面积定量。

1.3 质谱条件

离子化模式: ESI(+); 检测方式为多反应监测(MRM); 母离子 *m/z* 313, 监测离子 *m/z* 203、83, 定量离子 *m/z* 203; 雾化气 448 kPa, 气帘气 138 kPa, 辅助加热气 517 kPa, 碰撞气 Media; 辅助加热气温度 500 °C, 电离电压 5.0 kV, 去簇电压(DP) 70 V, 碰撞能(CE)分别为 23 V、40 V, 延时时间 200 ms; Q1 和 Q3 均为单位分辨率。

1.4 实验方法

1.4.1 液态奶、酸奶 称取 1~2 g 试样加入 5 mL 饱和氯化钠溶液, 混匀, 加入 7.5 mL 乙腈-二氯甲烷, 混匀离心分层; 再加入 7.5 mL 乙腈-二氯甲烷, 重复提取 1 次, 合并上清液, 45 °C 下氮气吹干。残渣加入 2.0 mL 乙腈、2.0 mL 水充分溶解后, 乙腈饱和正己烷去除脂肪, 过滤膜后上机测定。

1.4.2 奶粉、奶酪和奶油 称取 0.5~2 g 试样用乙酸乙酯超声提取 2 次, 离心分层, 合并上清液, 45 °C 下氮气吹干。残渣加入等量的乙腈和水, 充分溶解后, 乙腈饱和正己烷去除脂肪, 过滤膜后上机测定。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

吡嗪酮是弱极性药物, 在乙酸乙酯、乙腈等有机溶剂中有较好的溶解度, 文献[2]提出采用乙酸乙酯作为动物源性食品中吡嗪酮残留物的提取溶剂, 并报告添加回收试验结果良好, 在动物组织中吡嗪酮残留检测方法研究中也采用了类似的提取方法^[1]。

对于液态奶样品, 由于样品含水量大, 且富含蛋白质, 直接采用乙酸乙酯提取易引起乳化, 单一使用乙腈虽对沉淀液态奶中蛋白质有所帮助, 但无法与水相有效分离, 尝试采用 V(乙腈):V(二氯甲烷)=4:1 和 V(乙酸乙酯):V(二氯甲烷)=4:1 作为提取溶剂, 实验结果证明, 采用 V(乙腈):V(二氯甲烷)=4:1 效果较好, 加入饱和氯化钠溶液有助于改善有机相与水相的分离。对于酸奶样品, 由于样品稠度高, 需先用水分散后方可按照上述方法提取。

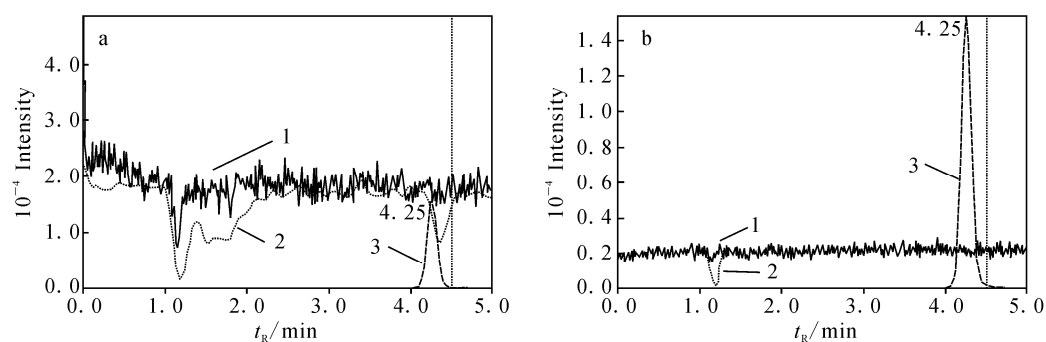
对于奶粉类样品, 由于样品呈极细的粉状, 直接采用乙酸乙酯作为提取溶剂即可。

对于奶油和奶酪这类样品, 尤其是奶酪基质, 直接采用乙酸乙酯提取, 样品结块得不到有效的分散, 因此样品的分散溶解是最重要的步骤, 选用海砂研磨样品, 待样品分散附着在海砂上形成很薄的样品膜层, 再采用乙酸乙酯作为提取溶剂使其更好地溶解。实验结果证明, 此方法可获得理想的回收率。

因此本研究采用乙腈-二氯甲烷作为液态奶和酸奶的提取溶剂, 用乙酸乙酯作为奶粉、奶油和奶酪的提取溶剂。

2.2 样品基质效应的消除

大气压喷雾电离离子源质谱分析容易受样品基质的影响。样品基质(以奶粉为例)对离子化有非常强的抑制作用, 示于图1a。为消除样品基质效应, 以空白样品提取液为标准溶液的稀释溶液, 可使吡嗪酮标准溶液和样品溶液具有同样的离子化条件, 从而消除样品基质效应, 示于图1b。本实验确认基质效应采用的方法是利用柱后灌注技术进行测定。柱后灌注法是将空白样品的提取液和空白溶剂分别进样进行液质分析, 同时利用注射泵将含相同浓度待测物的标准溶液通过色谱柱和质谱间的三通注入到色谱柱流出液中。其中图1a, 图1b为相同浓度的标准溶液, 图1a实验时流动注射泵中的标准溶液用乙腈配成, 图1b实验时流动注射泵中的标准溶液用空白基质配成。



注: 1. 空白溶剂; 2. 空白样品; 3. 标准溶液

图1 空白溶剂、空白样品和标准溶液的吡喹酮MRM图

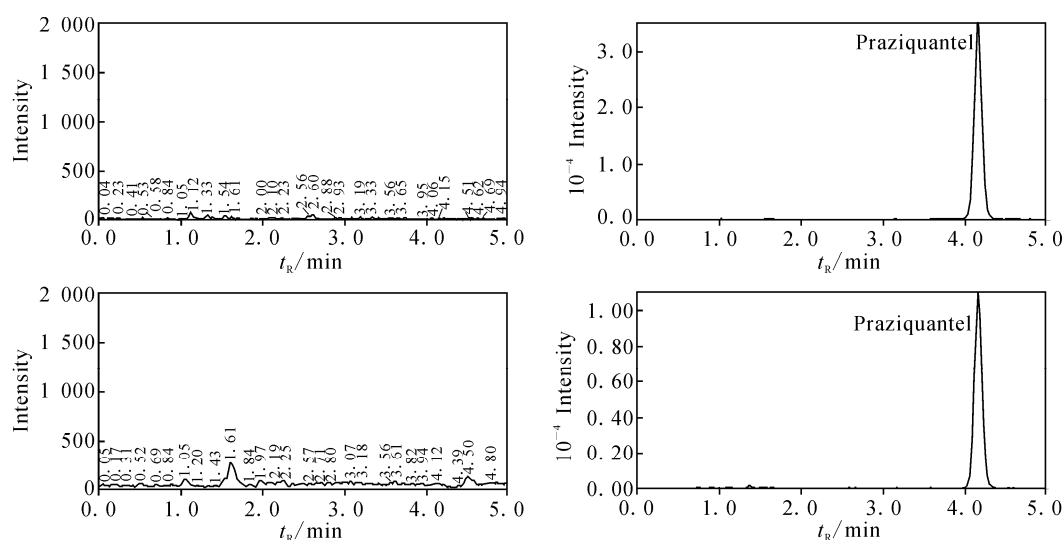


图2 空白样品及空白样品添加 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的MRM色谱图

2.3 线性关系、回收率与精密度实验

将一系列不同质量浓度的标准溶液进行HPLC-MS/MS分析, 质量浓度在 $0.5\sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内与对应的峰面积呈线性关系, 相关系数大于0.998, 检测限LOQ为 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。分别对5种经测定不含吡喹酮残留基质(液态奶、酸奶、奶粉、奶酪和奶油)的样品进行5、10、 $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 三种添加水平的回收实验, 每个添加水平平行测定10个样品, 平均回收率为81.8%~108.2%, 相对标准偏差为2.6%~12.7%。空白样品及空白样品加标的吡喹酮MRM色谱图示于图3。

2.4 二级质谱碎片的相对丰度比

质谱分析中同一分析物的质谱碎片离子间的相对丰度比是对分析物定性(确证)的重要依据, 欧盟《2002/657/EC》规定了样品中的某一分析物的质谱碎片离子间的相对丰度比与同一批次检验的标准样品(溶液)的质谱碎片离子间的相对丰度比的相对偏差。本工作对添加回收实验的样品进行碎片离子间的相对丰度比计算, 添加样品与标准溶液碎片离子间的相对丰度比分别为0.397和0.406, 相对偏差为2.2%。

参考文献:

- [1] 林峰, 林海丹, 吴映璇, 等. 动物源性食品中吡喹酮残留量的LC-MS/MS测定[J]. 分析测试学报, 2007, 26(5): 621.
- [2] WU X P, WANG L, SHI D W, et al. Chinese Journal of Chromatography. 2005, 23 (4): 434.