

液相色谱-串联质谱-同位素稀释法同时测定猪肉中 54 种药物残留

侯建波^{1,2}, 谢文^{1,2}, 陈笑梅^{1,2},
钱艳³, 奚君阳³, 王峰³, 何建敏³, 刘海山^{1,2}

(1. 浙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 浙江 杭州 310016;

2. 浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江 杭州 310016;

3. 浙江立德产品技术有限公司, 浙江 杭州 310016)

摘要:建立了应用固相萃取技术和液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)对猪肉中磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡嗪酮共 54 种药物残留同时测定的方法。样品经乙腈提取, C₁₈ 固相萃取柱净化, 液相色谱-串联质谱法检测(正离子方式, 多反应监测模式), 同位素内标稀释法进行定量。方法的定量限: 磺胺类和硝基咪唑类药物为 1.0 μg/kg, 喹诺酮类和林可酰胺类药物为 2.0 μg/kg, 大环内酯类药物为 3.0 μg/kg, 吡嗪酮为 0.3 μg/kg; 线性良好, 相关系数大于 0.991; 总体回收率为 20.9%~121%; 相对标准偏差为 2.0%~19.8%。

关键词:猪肉; 固相萃取; 液相色谱-串联质谱法; 多类药物残留; 同位素稀释

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2012)01-0042-13

Simultaneous Determination of 54 Drugs Residues in Pork by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Isotopes Dilution Technique

HOU Jian-bo^{1,2}, XIE Wen^{1,2}, CHEN Xiao-mei^{1,2},
QIAN Yan³, XI Jun-yang³, WANG Feng³, HE Jian-min³, LIU Hai-shan^{1,2}

(1. *The Technic Center of Zhejiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou 310016, China;*

2. *Zhejiang Academy of Science and Technology for Inspection and Quarantine, Hangzhou 310016, China;*

3. *Zhejiang Lead Product Technic Co. Ltd., Hangzhou 310016, China)*

Abstract: A simultaneous method for the determination of 54 drugs residues (sulfonamides, nitroimidazoles, quinolones, macrolide antibiotics, lincosamides and praziquantel) in pork was developed and validated by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) following solid phase extraction (SPE). The extracts were dissolved and distilled with acetonitrile. After that the supernatant solution was extracted with *n*-hexane to remove the fat, and then cleaned up with SPE C₁₈ cartridges. The quantitative

收稿日期: 2011-07-14; 修回日期: 2011-10-18

基金项目: 国家质检总局科研资助项目(No. 2008IK130)

作者简介: 侯建波(1983~), 男(满族), 内蒙古人, 工程师, 从事动物源食品中药物残留检测研究。E-mail: houjb@ziq.gov.cn

通信作者: 谢文(1966~), 女(满族), 辽宁人, 研究员, 从事食品中药物残留检测研究。E-mail: xw@ziq.gov.cn

detection was performed on LC-MS/MS by multiple reaction monitoring (MRM) mode under positive electrospray ionization (ESI⁺). The one precursor/two product ion transitions were used for each compound. Isotopes dilution internal standard method was used to determine the residue contents in pork. The limits of quantification (LOQs) are 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (sulfonamides and nitroimidazoles), 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (quinolones and lincosamides), 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (macrolide antibiotics) and 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (praziquantel), respectively. Validation parameters are determined as follow correlation coefficients, which are more than 0.991, and the recovery for each analyte ranges of 20.9%—121% with relative standard deviations (RSDs) between 2.0% and 19.8%.

Key words: pork; solid phase extraction; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; multi-class drugs residues; isotope dilution

兽药是用于预防、治疗和诊断家畜、家禽、鱼类、蜜蜂、蚕以及其他人工饲养的动物疾病,有目的地调节其生理机能,并规定其作用、用途、用法和用量的物质。药物残留是指动物产品的任何可食部分所含药物的母体化合物及/或其代谢物,以及与药物有关的杂质残留。近年来,磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡喹酮等药物分别在抑制革兰氏阳性菌等各种病菌、抗原虫病和抗寄生虫等方面表现出良好的效果,且价格低廉,因此大量地在动物体上使用。药物的不正确使用造成了它们在动物机体组织中残留,致使人食用动物组织后对该药物产生严重耐药性,对人体的生命安全造成严重危害^[1]。长期以来,猪肉及其制品在人们的生产生活中一直有着不可替代的位置,也是各国在食品安全中主要的监控产品之一,中国、欧盟、美国及日本等主要经济体纷纷制定相应的法律法规来限制药物的滥用^[2-5],对猪肉中药物残留进行严密的监控已成为当务之急。

目前对猪肉中药物残留的分析方法主要按照化学结构相类似的同族药物开发。已有报道可以通过筛选法^[6-7]、毛细管电泳法^[8-9]、气相色谱法^[10-12]、气相色谱-质谱联用法^[13-16]、液相色谱法^[17-20]和液相色谱-串联质谱法^[21-26]等检测技术对肉制品中各类药物残留情况进行测定。随着液相色谱-串联质谱和飞行时间质谱检测技术的快速发展,药物残留检测正逐步从单一类别向多种不同类别药物的同时定性与定量分析方向发展^[27-34],以更好的满足目前药物种类不断增加、分析要求不断提高的需求。

本研究通过有机溶剂提取、固相萃取净化和液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中磺胺类、

硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡喹酮等 54 种药物残留。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

API 4000 液相色谱-串联质谱仪:美国 AB 公司产品,配有电喷雾离子源;C₁₈ 柱(500 mg/3 mL),固相萃取装置:美国 Supelco 公司产品;台式离心机:美国 Thermo 公司产品;BuCHI Rotavapor R-210 旋转蒸发仪:瑞士 BuCHI 公司产品。

1.2 主要材料与试剂

乙腈,正己烷,甲醇和甲酸(色谱纯):美国 Tedia 公司产品;实验用水:Milli-Q 高纯水;无水硫酸钠(分析纯):上海国药集团产品;磺胺类药物(16 种),硝基咪唑类药物(10 种),喹诺酮类药物(15 种),大环内酯类药物(9 种),林可酰胺类药物(3 种)和喹诺酮,以及同位素内标物标准品(分析纯,纯度 $\geq 98\%$):德国 Dr Ehrenstorfer GmbH 公司产品。储备液用甲醇配制,浓度 1.0 g/L,贮存在 0~4 °C 冰箱中,根据需要用 V(甲醇):V(水)=3:7 的溶液稀释为适当浓度的标准工作液。

1.3 实验方法

1.3.1 样品的提取 称取 5 g 试样(精确到 0.01 g),置于 50 mL 具塞离心管中,加入同位素内标溶液(8 ng 磺胺类同位素内标、40 ng 硝基咪唑类同位素内标、30 ng 喹诺酮类同位素内标),20 mL 乙腈,混匀,以 3 000 r/min 离心 3 min,上清液转移至另一 50 mL 具塞离心管中,残渣中再加入 15 mL 乙腈,重复上述操作,合并乙腈提取液,以 7 000 r/min 离心 5 min。乙腈

上清液加入 15 mL 正己烷,混匀,以 4 000 r/min 离心 3 min,弃去正己烷层,重复上述操作,乙腈提取液过无水硫酸钠柱进行干燥,在 40 °C 以下水浴中减压浓缩至近干,加入 4 mL 甲醇溶解残渣,待净化。

1.3.2 样品的净化 将上述溶液定量转移至 C₁₈ 固相萃取小柱中(3 mL 甲醇预洗活化),控制流速 1~2 mL/min,同时接收甲醇溶液,再分批加入 6 mL 甲醇进行洗脱,收集洗脱液,在 40 °C 以下水浴中减压浓缩至近干,用 2.0 mL V(甲醇):V(水)=3:7 的溶液定容,混匀,溶液过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3.3 液相色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₈(150 mm × 4.6 mm × 5 μm);流动相:甲醇(A)体积比 20% 保持不变,乙腈(B),0.15% 甲酸水溶液(C);梯度洗脱程序:0~4.0

min,乙腈(B)的体积比从 2% 线性增加至 5%,4.0~8.0 min,乙腈(B)的体积比从 5% 线性增加至 10%,8.0~10.0 min,乙腈(B)的体积比从 10% 线性增加至 38%,10.0~16.0 min,乙腈(B)的体积比保持 38% 不变,16.0~16.5 min,乙腈(B)的体积比从 38% 线性下降至 2%,16.5~23.0 min,乙腈(B)的体积比保持 2% 不变,进行系统平衡;流速 0.8 mL/min;进样量 50 μL。

1.3.4 质谱条件 离子源:电喷雾离子化源;扫描模式:正离子扫描;检测方式:多反应监测模式(MRM);电喷雾电压:5 500 V;雾化气压力(GS1):358.28 kPa;气帘气压力(CUR):172.25 kPa;辅助气流速(GS2):378.95 kPa;离子源温度(TEM):550 °C;碰撞气(CAD):6。其它质谱条件列于表 1。

表 1 药物基本信息及质谱测定条件

Table 1 Standard information and optimized mass spectrometric parameters of drugs

序号	化合物	CAS 编号	离子对 <i>m/z</i>	去簇 电压/ V	碰撞 能/V	碰撞室 出口电 压/V	同位素内标物	保留时 间/min
1	磺胺嘧啶	68-35-9	251.1/156.3* 251.1/108.2	65	22 33	10	磺胺嘧啶-D ₄	4.35
2	磺胺噻唑	72-14-0	255.8/156.3* 255.8/108.2	70	22 30	10	磺胺噻唑-D ₆	4.90
3	磺胺吡啶	144-83-2	249.9/156.2* 249.9/184.4	70	24	10	磺胺吡啶-D ₆	5.29
4	磺胺甲基嘧啶	127-79-7	265.1/156.3* 265.1/172.2	65	25 23	10	磺胺嘧啶-D ₄	6.06
5	磺胺二甲基嘧啶	57-68-1	279.2/156.3* 279.2/186.1	70	26	10	磺胺二甲基嘧啶-D ₄	7.78
6	磺胺-5-(对)甲氧嘧啶	651-06-9	281.2/156.3a* 281.2/215.4a	70	25 26	10	磺胺二甲基嘧啶-D ₄	8.35
7	磺胺甲噻二唑	144-82-1	271.0/156.2* 271.0/108.2	70	24 32	10	磺胺二甲基嘧啶-D ₄	8.75
8	磺胺甲氧哒嗪	80-35-3	281.2/156.3b* 281.2/215.4b	70	25 26	10	磺胺二甲基嘧啶-D ₄	9.29
9	磺胺氯哒嗪	80-32-0	285.0/156.3* 285.0/108.2	70	22 35	10	磺胺二甲氧嘧啶-D ₄	11.5
10	磺胺-6-(间)甲氧嘧啶	1220-83-3	281.2/156.3c* 281.2/215.4c	70	25 26	10	磺胺二甲基嘧啶-D ₄	11.9

续表

序号	化合物	CAS 编号	离子对 m/z	去簇 电压/ V	碰撞 能/V	碰撞室 出口电 压/V	同位素内标物	保留时 间/min
11	磺胺邻二甲氧嘧啶	2447-57-6	311.2/156.3a* 311.2/108.2a	70	30 37	10	磺胺二甲氧嘧啶-D ₄	12.1
12	磺胺甲基异恶唑	723-46-6	254.1/156.3* 254.1/108.2	65	22 36	10	磺胺甲基异恶唑-D ₆	12.1
13	磺胺二甲异恶唑	127-69-5	268.0/156.3* 268.0/113.2	70	22	10	磺胺二甲氧嘧啶-D ₄	12.5
14	苯酰磺胺	127-71-9	277.0/156.2* 277.0/92.0	68	19 41	7 8	磺胺二甲氧嘧啶-D ₄	12.8
15	磺胺二甲氧嘧啶	122-11-2	311.2/156.3b* 311.2/108.2b	70	3037	10	磺胺二甲氧嘧啶-D ₄	13.1
16	磺胺噻唑啉	59-40-5	301.2/156.3* 301.2/108.2	55	24 37	139	磺胺噻唑啉-D ₆	13.1
	磺胺嘧啶-D ₄		255.2/160.3	56	22	12		
	磺胺噻唑-D ₆		262.0/97.9	72	39	8		
	磺胺吡啶-D ₆		256.2/97.9	70	38	7		
	磺胺二甲基嘧啶-D ₄		283.1/186.3	63	29	10		
	磺胺甲基异恶唑-D ₆		260.2/162.3	75	22	20		
	磺胺二甲氧嘧啶-D ₄		315.3/156.3	65	29	10		
	磺胺噻唑啉-D ₅		307.3/162.3	80	24	12		
17	羟基甲硝唑	4812-40-2	188.1/123.0* 188.1/126.0	53	19 26	10	羟基二甲硝唑-D ₃	3.34
18	2-甲基-5-硝基咪唑	88054-22-2	128.0/82.0* 128.0/42.0	60	26 51	10		3.59
19	羟基二甲硝唑	936-05-0	158.0/140.1* 158.0/55.0	48	16 31	10	羟基二甲硝唑-D ₃	4.14
20	甲硝唑	443-48-1	172.0/128.2* 172.0/82.1	62	21 35	11 14	羟基二甲硝唑-D ₃	4.07
21	二甲硝唑	551-92-8	142.0/96.0* 142./81.0	62	23 36	8 14	二甲硝唑-D ₃	4.83
22	洛硝哒唑	7681-76-7	201.1/140.2* 201.1/110.2	37	17 25	8	洛硝哒唑-D ₃	4.65
23	氯甲硝唑	4897-25-0	162.0/116.0* 162.0/145.0	68	26 24	10		7.09
24	苯硝唑	94-52-0	164.0/118.0* 164.0/91.0	64	32 52	10		7.51
25	羟基异丙硝唑	35175-14-5	186.3/168.1* 186.3/122.3	45	19 29	9 5	羟基异丙硝唑-D ₃	10.5
26	异丙硝唑	14885-29-1	170.2/109.0* 170.2/124.1	63	37 26	10	异丙硝唑-D ₃	12.5

续表

序号	化合物	CAS 编号	离子对 m/z	去簇 电压/ V	碰撞 能/V	碰撞室 出口电 压/V	同位素内标物	保留时 间/min
	羟基二甲硝咪唑-D ₃		161.2/143.1	51	18	6		
	二甲硝咪唑-D ₃		145.2/99.0	85	25	10		
	洛硝咪唑-D ₃		204.2/143.3	50	17	10		
	羟基异丙硝咪唑-D ₃		189.2/171.2	60	20	9		
	异丙硝咪唑-D ₃		173.1/127.2	67	28	6		
27	麻保沙星	115550-35-1	363.2/320.2* 363.2/345.3	63	23 25	10		5.58
28	伊诺沙星	74011-58-8	321.2/303.1* 321.2/234.4	67	29 32	10	伊诺沙星-D ₈	6.38
29	氧氟沙星	82419-36-1	362.2/318.3* 362.2/261.2	75	27 39	8 6	氧氟沙星-D ₈	6.76
30	诺氟沙星	70458-96-7	320.0/233.3* 320.0/276.3	74	35 25	11 14	诺氟沙星-D ₅	7.51
31	环丙沙星	86393-32-0	332.1/288.3* 332.1/230.9	85	27 50	7 12	环丙沙星-D ₈	8.00
32	达氟沙星	119478-55-6	358.2/340.3* 358.2/283.1	65	35 33	9 9		8.17
33	恩诺沙星	93106-60-6	360.2/316.2* 360.2/245.4	76	29 35	7 9	恩诺沙星-D ₅	8.38
34	洛美沙星	98079-52-8	352.3/265.1* 352.3/308.2	80	35 24	10 10		8.70
35	奥比沙星	113617-63-3	396.0/352.0* 396.0/295.0	76	27 35	9 9		8.92
36	双氟沙星	98106-17-3	400.0/356.0* 400.0/299.0	76	29 42	9	双氟沙星-D ₄	10.6
37	沙拉沙星	98105-99-8	386.1/342.4* 386.1/299.2	87	27 39	8 7	沙拉沙星-D ₈	11.2
38	司帕沙星	111542-93-9	393.2/292.2* 393.2/349.2	94	36 28	10 10		11.7
39	噁唑酸	14698-29-4	262.0/244.4* 262.0/216.3	75	25 40	18 18		12.9
40	萘啶酸	389-08-2	233.2/215.0* 233.2/187.0	53	21 35	10 10		14.1
41	氟甲唑	42835-25-6	262.1/244.0* 262.1/202.1	73	27 49	10 10		14.3
	依诺沙星-D ₈		329.4/311.2	66	28	7		
	氧氟沙星-D ₈		365.2/321.4	65	26	8		
	诺氟沙星-D ₅		325.4/281.2	65	25	9		
	环丙沙星-D ₈		340.1/296.5	90	27	10		

续表

序号	化合物	CAS 编号	离子对 m/z	去簇 电压/ V	碰撞 能/V	碰撞室 出口电 压/V	同位素内标物	保留时 间/min
	恩诺沙星-D ₃		365.1/321.5	70	28	8		
	双氯沙星-D ₄		404.3/360.2	76	28	9		
	沙拉沙星-D ₈		394.1/376.5	70	30	8		
42	螺旋霉素	8025-81-8	843.6/174.3* 843.6/318.5	110	50 40	14 9		11.8
43	替米考星	108050-54-0	869.7/174.4* 869.7/156.6	120	58 68	15 12		12.1
44	竹桃霉素	7060-74-4	688.6/158.4* 688.6/544.6	65	40 23	13 19		12.6
45	泰乐菌素	74610-55-2	916.5/174.2* 916.5/772.7	96	53 41	15		12.7
46	红霉素	59319-72-1	734.6/158.5* 734.6/576.5	80	40 27	13 17		12.7
47	罗红霉素	80214-83-1	837.6/679.6* 837.6/158.4	90	48 30	14 22		13.3
48	交沙霉素	16846-24-5	828.8/174.3* 828.8/229.3	105	45 42	14		13.6
49	吉他霉素	1392-21-8	772.7/174.3* 772.7/109.0	115	47 63	8 10		13.0
50	泰妙菌素	55297-95-5	494.3/192.5* 494.3/119.2	60	26 54	10		12.9
51	林可霉素	859-18-7	407.2/126.3* 407.2/359.4	90	26 28	10 9		5.15
52	氯林可霉素	21462-39-5	425.9/126.1* 425.9/378.2	90	48 28	10		12.4
53	吡利霉素	79548-73-5	411.2/112.1* 411.2/363.1	90	44 24	10		12.3
54	吡唑酮	55268-74-1	313.5/203.2* 313.5/83.2	74	25 39	4 6		17.1

注:1)“*”表示定量离子对;

2) a、b、c 分别表示具有相同离子对的化合物,分子离子峰为 281.2 对应的 a:磺胺-5-(对)甲氧嘧啶;b:磺胺甲氧嘧啶;c:磺胺-6-(间)甲氧嘧啶;
分子离子峰 311.2 对应的 a:磺胺邻二甲氧嘧啶;b:磺胺二甲氧嘧啶

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

药物残留的提取方法多种多样,一般依据药物的酸碱性、脂溶性和稳定性分别采用单一有机溶剂提取、混合有机溶剂提取、酸性或碱性溶液加有机溶剂提取等。由于磺胺类药物、硝基咪唑

类药物和喹诺酮类药物属于两性物质,大环内酯类药物和林可酰胺类药物属于弱碱性物质,各类药物的 pKa 值差异较大,为兼顾全部药物具有较好的提取效率,对比了乙腈、1%甲酸乙腈溶液、乙酸乙酯、1%甲酸乙酸乙酯溶液等 4 种不同试剂对猪肉中待测药物的提取情况,结果示于图

1~4。实验结果表明,除硝基咪唑类药物在 4 种溶剂中的提取效率差异不大外,其他多数药物乙腈的提取效率好于乙酸乙酯的提取效率,而 1% 甲酸的加入对各类药物提取效率的影响并不具有一致性。已有文献报道酸性乙腈对喹诺酮类药物的提取效果更好^[35-36]。本研究对喹诺酮类药物阳性猪肉样品通过目前实验室采用的标准测定方法进行前处理^[37],对比乙腈和酸性乙腈的提取效果,示于图 5。由图 5 可知,诺氟沙星(30)、环丙沙星(31)和恩诺沙星(33)在两种提取条件下的测定值并没有明显变化,与图 4 中添加实验结果相一致。红霉素(46)采用 1% 甲酸乙腈溶液提取后,回收率明显下降,由乙腈提取的 60% 降低到 3%,可能是由于在酸性条件下,苷键易发生水解所致^[1,27]。综合考虑提取溶剂对各类药物提取效率和去除蛋白质等影响因素,特别是在酸性条件下对药物稳定性的影响,本研究

采用乙腈对各类药物进行提取,而不加入 1% 的甲酸。

2.2 净化条件的选择

动物源性食品中药物残留的检测方法仅采用单一的液-液萃取方法处理样品,色谱图显示背景干扰大,而固相萃取可以有效的净化样品,对减少基质背景的影响具有重要的作用。本研究尝试采用相同的固相萃取条件,比较考察 C₁₈、Oasis (HLB)、MCX3 种类型的固相萃取柱的净化效果和保留行为。研究结果表明,MCX 净化过程中,甲醇作为洗脱剂喹诺酮类药物拖尾严重;HLB 固相萃取柱净化,水溶液上样并淋洗,甲醇洗脱定容后溶液浑浊;C₁₈ 固相萃取柱,甲醇溶液上样并洗脱,定容溶液澄清,各类化合物的回收率在 30%~110% 之间,因此最终选择 C₁₈ 固相萃取柱对提取溶液进行净化。

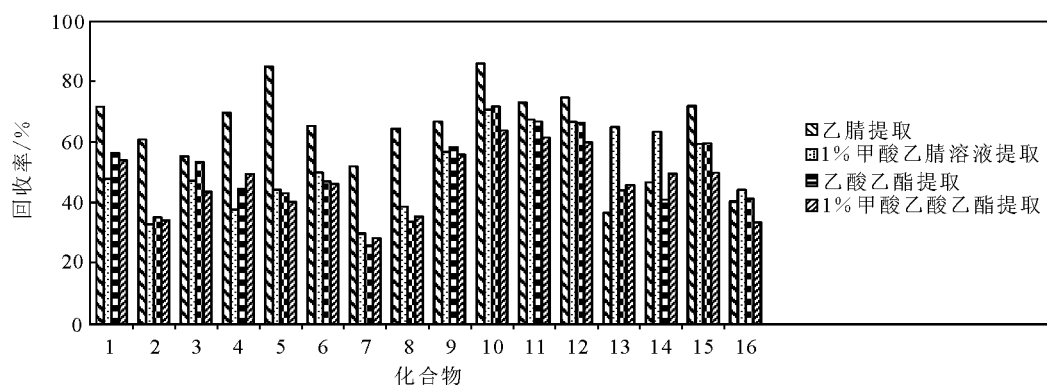


图 1 不同提取溶剂对磺胺类药物的提取效率对比图

Fig. 1 The extractive efficiency in different solvent for sulfanilamides

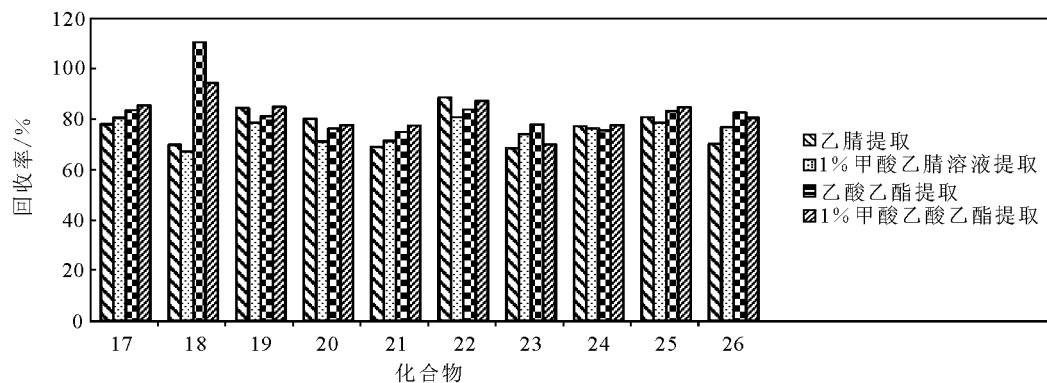


图 2 不同提取溶剂对硝基咪唑类药物的提取效率对比图

Fig. 2 The extractive efficiency in different solvent for nitroimidazoles

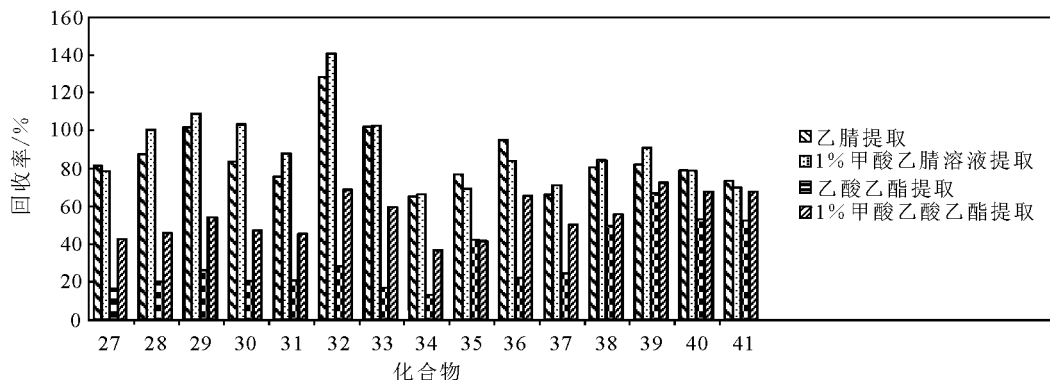


图 3 不同提取溶剂对喹诺酮类药物的提取效率对比图

Fig. 3 The extractive efficiency in different solvent for quinolones

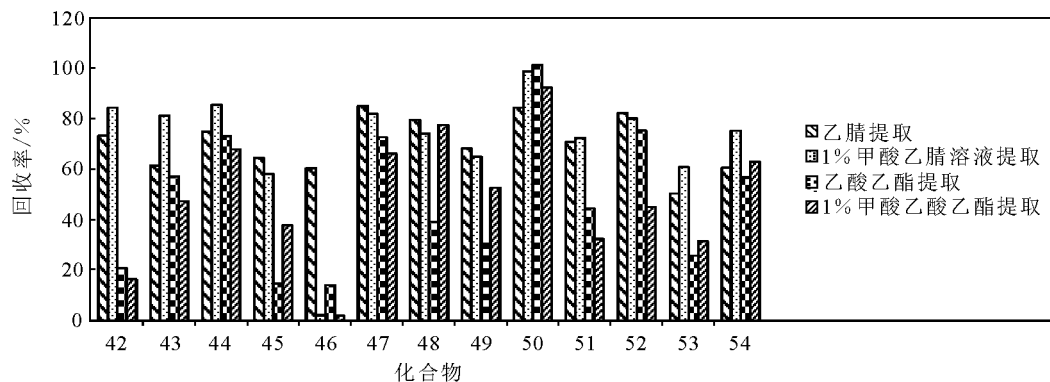


图 4 不同提取溶剂对大环内酯类(42~50)、林可酰胺类(51~53)和吡喹酮药物的提取效率对比图

Fig. 4 The extractive efficiency in different solvent for macrolide antibiotics(42—50), lincosamides(51—53) and praziquantel

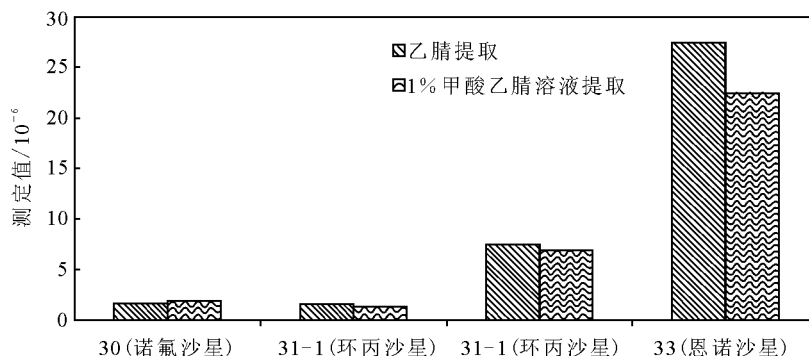
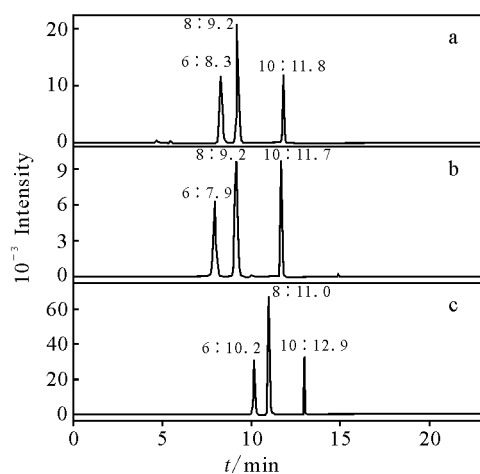


图 5 不同提取溶剂对阳性猪肉样品中喹诺酮类药物提取效率对比图

Fig. 5 The extractive efficiency in different solvent for quinolones in positive pork

2.3 液相色谱条件的考察

2.3.1 色谱柱的选择 通过 Agilent Eclipse XDB-C₈ 柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm), Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm × 5 μm)和 Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm × 2.6 μm)3 种色谱柱考察了 54 种化合物的分离度和灵敏度,尤其是具有相同离子对 m/z 281.2/156.3 和 m/z 281.2/215.4 的磺胺-5-(对)甲氧嘧啶(6),磺胺甲氧吡嗪(8)和磺胺-6-(间)甲氧嘧啶(10),以及相近离子对 m/z 262.0/244.4, m/z 262.0/216.3, m/z 262.1/244.0 和 m/z 262.1/202.1 的噻啉酸(39)和氟甲喹(41)。分离结果示于图 6 和图 7,从图中可以看出,化合物在各色谱柱中均具有很好的分离度,其中 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱的填充物颗粒较细,只有 2.6 μm,流速为 600 μL/min (因此保留时间较 Agilent Eclipse 长),已经具有较高的柱压。在 Agilent Eclipse XDB-C₈ 色谱柱中,各化合物的灵敏度较高,因此本实验最终选择的色谱柱为 Agilent Eclipse XDB-C₈。



注: a. Agilent Eclipse XDB-C₈;

b. Agilent Eclipse XDB-C₁₈; c. Phenomenex C₁₈;

6. 磺胺-5-(对)甲氧嘧啶; 8. 磺胺甲氧吡嗪;

10. 磺胺-6-(间)甲氧嘧啶

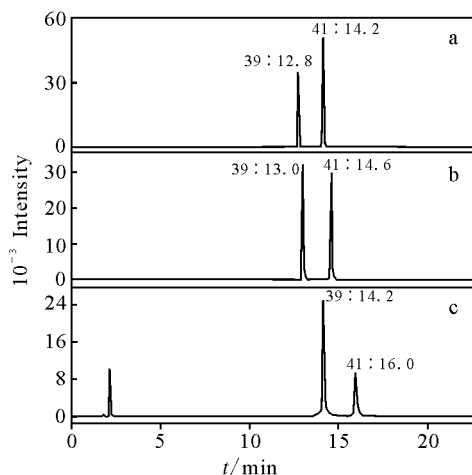
图 6 3 种色谱柱分离离子对 m/z 281.2/156.3 和 m/z 281.2/215.4 结果

Fig. 6 The separation result of

m/z 281.2/156.3 and m/z 281.2/215.4

2.3.2 样品稀释溶剂的确定 样品稀释溶剂的选择对待测药物的峰形、分离度和灵敏度有很大影响,一般采用流动相作为样品稀释溶剂,梯度

洗脱程序时,选用 0 时间的流动相比例。本实验分别选用 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=3:7$ 、 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=3:7$ 和 $V(\text{乙腈}):V(\text{甲醇}):V(0.15\% \text{甲酸水溶液})=2:20:78$ 的混合溶液作为样品稀释溶液进行测试。结果表明: $V(\text{乙腈}):V(\text{水})=3:7$ 的混合溶液作为样品稀释溶液时,噻啉类药物的色谱峰峰形较宽,林可霉素的色谱峰不尖锐、不对称;当 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=3:7$ 的溶液和 $V(\text{乙腈}):V(\text{甲醇}):V(0.15\% \text{甲酸水溶液})=2:20:78$ 的溶液作为定容溶剂时,各化合物的灵敏度和峰形无显著差异,考虑到大环内酯类药物在酸性溶剂中不稳定易水解^[1],最终采用 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})=3:7$ 的溶液作为样品稀释溶剂。



注: a. Agilent Eclipse XDB-C₈;

b. Agilent Eclipse XDB-C₁₈; c. Phenomenex C₁₈;

39. 噻啉酸; 41. 氟甲喹

图 7 3 种色谱柱分离离子对

m/z 262.0/244.4, m/z 262.0/216.3, m/z 262.1/244.0 和 m/z 262.1/202.1

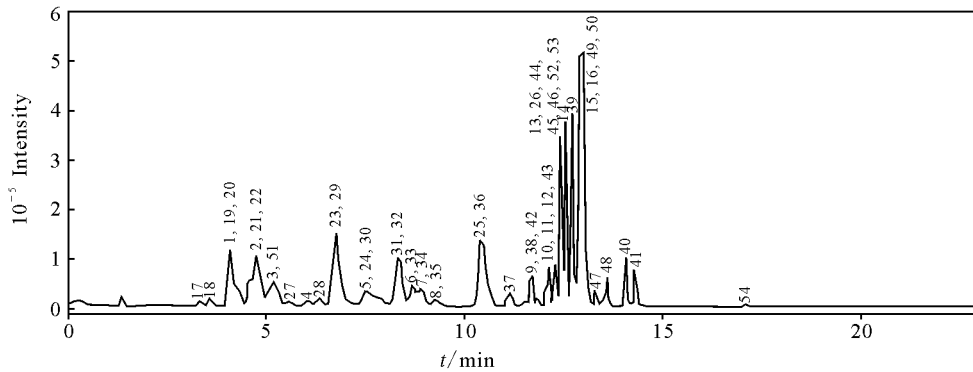
Fig. 7 The separation result of m/z 262.0/244.4, m/z 262.0/216.3, m/z 262.1/244.0 and m/z 262.1/202.1

2.4 质谱测定条件的考察

本研究采用流动注射的方式在正离子模式下对待测化合物的标准溶液分别进行稀释和母离子全扫描,确定分子离子峰,再分别以待测化合物的分子离子为母离子,对其子离子进行全扫描,选择 2 个特征子离子,其中以信噪比高、峰形好、干扰小的离子对作为定量离子对,该方法满足欧盟 EC/657 指令中利用质谱方法对药物残

留进行确证必须满足 4 个识别点的要求(母离子 1 点,特征子离子 1.5 点/个),同时特征离子的丰度比与标准物对比结果在欧盟 EC/657 允许范围内。以多反应监测正离子模式优化各种质

谱参数,获得的最佳质谱条件,在该条件下获得 54 种药物分离的总离子流图于图 8,最佳质谱条件的保留时间列于表 1。



注:磺胺类药物 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,硝基咪唑类药物 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,喹诺酮类药物 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,
大环内酯类药物 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,林可酰胺类药物 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,吡唑酮 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$

图 8 各类药物的总离子流图

Fig. 8 The TIC of drugs standard solution

2.5 方法的线性关系和定量限

采用液相色谱-串联质谱法测定食品中药物残留时,有时基质对离子对具有增强或抑制效应。通过添加同位素内标物和用空白样品提取液稀释配制标准工作溶液两种方式相结合,可以减弱离子化时的基质效应,减少定量结果的偏差。使用空白猪肉提取溶液作为标准工作溶液的稀释溶剂,在其中加入混合标准溶液,分别获得的溶液浓度列于表 2。

在确定实验条件下测试的结果中测定其峰

面积,以待测物质量浓度 $x(\mu\text{g}/\text{kg})$ 为横坐标,以标准品与同位素内标物峰面积比值 y 为纵坐标,绘制各类药物混合标准溶液工作曲线,各药物的线性方程相关系数 $r > 0.991$ 。在空白猪肉中添加各类药物混合标准溶液(添加水平:磺胺类和硝基咪唑类药物 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,喹诺酮类和林可酰胺类药物 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,大环内酯类药物 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,吡唑酮 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$),信噪比(S/N)大于 10,即该方法设定的定量限均符合要求。

表 2 各类药物定量限及工作曲线浓度

Table 2 The limits of quantification and concentration of working curve for drugs

化合物	定量限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	工作曲线溶液浓度/ $(\mu\text{g}/\text{L})$	工作曲线浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
磺胺类和硝基咪唑类药物	1.0	1.5, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0	0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0
喹诺酮和林可酰胺类药物	2.0	3.0, 5.0, 10.0, 20.0, 30.0	1.2, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0
大环内酯类药物	3.0	4.5, 7.5, 15.0, 30.0, 45.0	1.8, 3.0, 6.0, 12.0, 18.0
吡唑酮	0.3	0.45, 0.75, 1.5, 3.0, 4.5	0.18, 0.3, 0.6, 1.2, 1.8

2.6 方法回收率及精密度实验

选用不含各类待测药物的猪肉样品,进行 3 个浓度水平(磺胺类及硝基咪唑类药物 1.0、2.0 和 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,喹诺酮类及林可酰胺类药物 2.0、4.0 和 8.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,大环内酯类药物 3.0、6.0 和

12.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,吡唑酮 0.3、0.6 和 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)添加回收实验,每个浓度水平取 6 个平行样,方法的总体回收率为 20.9%~121%。其中螺旋霉素(42)在添加浓度为 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时的回收率处于 20%~30%;螺旋霉素(42)在添加浓度为 6.0 和

12.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,以及吉他霉素(49)和吡利霉素(53)的整体添加回收率处于 30~40% 之间;洛美沙星(34)、替米考星(43)、竹桃霉素(44)、泰乐菌素(45)、红霉素(46)、交沙霉素(48)、泰妙菌素(50)、林可霉素(51)、氯林可霉素(52)和吡喹酮(54)的回收率处于 40%~60% 之间,其它药物处于 60%~120% 之间;整体相对标准偏差为 2.0%~19.8%。

2.7 阳性样品分析

本实验室应用该方法对 30 批次猪肉样品进行测定,其中筛选阳性猪肉样品 3 批次(阳性药物分别为磺胺嘧啶(1)、磺胺甲基异恶唑(12)、伊诺沙星(28)、诺氟沙星(30)、环丙沙星(31)、恩诺沙星(33)、林可霉素(51)),示于图 9。与各类药物目前实验室采用的标准测定方法^[37-41]测定结果进行对比,未发现假阴性情况。

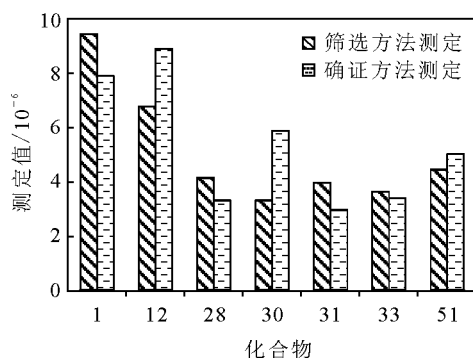


图 9 阳性猪肉样品测定结果对比图

Fig. 9 The test result of positive pork

3 结论

建立了猪肉中磺胺类、硝基咪唑类、喹诺酮类、大环内酯类、林可酰胺类和吡喹酮共 54 种药物同时测定的方法。样品经乙腈提取, C_{18} 固相萃取净化,液相色谱-串联质谱法测定,同位素内标稀释法定量。该方法前处理简单,选择性好,定量限能满足目前国内外对猪肉中相应药物最大残留限量的要求。应用该方法已对 30 批次猪肉样品中相应药物的残留情况进行筛选测定,其中 3 批阳性猪肉样品测定结果与标准方法测定结果相一致。

参考文献:

[1] 庞国芳,方晓明,余建新,等. 农药兽药残留现代分析技术[M]. 北京:科学出版社,2007:299-302,

353-354,366-368,427.

- [2] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号.
- [3] COUNCIL REGULATION (EEC) No 2377/90 [M].
- [4] 21 CFR Ch. I (4-1-09 Edition) PART 556-TOLERANCES FOR RESIDUES OF NEW ANIMAL DRUGS IN FOOD.
- [5] Maximum Residue Limits (MRLs) List of Agricultural Chemicals in Foods (Japan)[M].
- [6] HASANOOT W, BIENENMANN-PLOUM M, KONHEN F. Biosensor immunoassay for the detection of eight sulfonamides in chicken serum [J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 483: 171-180.
- [7] 张佳宜,张 燕,王 硕. 胶体金免疫层析法快速检测猪肉及牛奶中磺胺二甲嘧啶残留[J]. *中国食品学报*, 2010, 10: 181-185.
- [8] FUH M R S, CHU S Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis[J]. *Anal Chim Acta*, 2003, 499: 215-221.
- [9] LARA F J, GARCIA-CAMPANA A M, ALES-BARRERO F, et al. In-line solid-phase extraction preconcentration in capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the multiresidue detection of quinolones in meat by pressurized liquid extraction [J]. *Electrophoresis* 2008, 29: 2 117-2 125.
- [10] NEWKIRK D R, RIGHTER H F, SCHENCK F J, et al. Gas chromatographic determination of incurred dimetridazole residues in swine tissue [J]. *J Assoc Offic Anal Chem*, 1990, 73: 702-704.
- [11] 刘 波,黄为红,王金中. 气相色谱-电子捕获检测器同时测定硝基咪唑类药物[J]. *分析科学学报*, 2008, 24: 586-588.
- [12] 陶燕飞,于 刚,陈冬梅,等. 动物可食性组织中林可霉素和大观霉素残留检测方法-气相色谱法[J]. *中国农业科技导报*, 2008, 10(S2): 63-68.
- [13] TAKASUKI K, USHIZAWA I, SHOJI T. Gas-chromatographic mass-spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring [J]. *J Chromatogr*, 1987, 391: 207-217.
- [14] CARIGNAN G, CARRIER K. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS[J]. *J Assoc Offic Anal Chem*, 1991, 74: 479.
- [15] POLZER J, GOWIK P. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography-negative ion chemical ionization mass

- spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2001, 761: 47-60.
- [16] HO C, SIN D W M, WONG K M, et al. Determination of dimetridazole and metronidazole in poultry and porcine tissues by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 530: 23-31.
- [17] HORIE M, SAITO K, ISHII R, et al. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 812: 295-302.
- [18] HELA W, BRANDTNER M, WIDEK R, et al. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection[J]. *Food Chemistry*, 2003, 83: 601-608.
- [19] BAILAC S, BARRON D, BARBOSA J. New extraction procedure to improve the determination of quinolones in poultry muscle by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 580: 163-169.
- [20] TSAIA W H, CHUANG H Y, CHEN H H, et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 656: 56-62.
- [21] SHAO B, DONG D, WU Y N, et al. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 546: 174-181.
- [22] 殷居易, 谢东华, 陈杰, 等. SPE 净化 HPLC-APCI(+)-MS/MS 分析肉类食品中硝基咪唑类药物原药及代谢物残留量[J]. *质谱学报*, 2009, 30: 193-200.
- [23] HERMO M P, BARRON D, BARBOSA J. Development of analytical methods for multiresidue determination of quinolones in pig muscle samples by liquid chromatography with ultraviolet detection, liquid chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1104: 132-139.
- [24] 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: 621-624.
- [25] 杜振霞, 孙姝琦. 牛肉中三种氟喹诺酮类药物残留的 UPLC-MS/MS 分析方法[J]. *质谱学报*, 2007, 28: 219-223.
- [26] BERRADA H, MOLTO J C, MANES J, et al. Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33: 522-529.
- [27] 岳振峰, 陈小霞, 谢丽琪, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定动物组织中林可酰胺类和大环内酯类抗生素残留[J]. *分析化学*, 2007, 35: 1 290-1 294.
- [28] XIA X, LI X W, ZHANG S X, et al. Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1 208: 101-108.
- [29] CARRETERO V, BLASCO C, PICO Y. Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1 209: 162-173.
- [30] KAUFMANN A, BUTCHER P, MADEN K, et al. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr, A*, 2008, 1 194: 66-79.
- [31] ORTELLI D, COGNARD E, JAN P, et al. Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877: 2 363-2 374.
- [32] 彭涛, 于静, 邓晓军, 等. SN/T 2443—2010 进出口动物源性食品中多种酸性和中性药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [33] 邓晓军, 郭德华, 赵善贞, 等. SN/T 2624—2010 动物源性食品中多种碱性药物残留量的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [34] 郭德华, 邓晓军, 赵善贞, 等. 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱同时检测动物源性食品中 76 种兽药残留[J]. *分析化学*, 2010, 38: 318-324.
- [35] 岳振峰, 林秀云, 唐少冰, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物组织中的 16 种喹诺酮类药物残留[J]. *色谱*, 2007, 25: 491-495.
- [36] 孙雷, 朱馨乐, 刘琪, 等. 猪肉组织中 7 种氟喹诺酮类药物残留检测 高效液相色谱-串联质谱法研究[J]. *中国兽药杂志*, 2008, 42: 12-15.
- [37] 林黎明, 张鸿伟, 梁增辉, 等. GB/T 20366—2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

- [38] 庞国芳,曹彦忠,贾光群,等. GB/T 20759—2006 畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2006.
- [39] 荣会,牟峻,张代辉,等. SN/T 1928—2007 进出口动物源性食品中硝基咪唑残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [40] 林维宣,谢文,李一尘,等. SN/T 1777. 2—2007 动物源性食品中大环内酯类抗生素残留测定方法 第2部分:高效液相色谱串联质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [41] 林峰,林海丹,吴映璇,等. SN/T 1979—2007 进出口动物源性食品中吡啶酮残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

全国生物医药色谱及相关技术学术交流会(2012) (第一轮通知)

由中国化学会色谱专业委员会和北京色谱学会主办,重庆大学和重庆市色谱学会承办的“全国生物医药色谱及相关技术学术交流会(2012)”定于2012年4月20~22日在重庆召开。

会议将就生命科学、生物学、生物技术、医药、食品及环境相关领域中的色谱理论与技术进行学术研讨。会议将邀请院士、知名教授作大会报告,并热诚欢迎全国从事生物医药色谱工作的科研和技术人员与会交流。

本会热诚欢迎国内外分析仪器公司和厂商到会介绍和展出产品,有关具体事宜,请与会务组联系。

一 会议议题

色谱技术及相关技术,包括气相色谱、液相色谱、离子色谱、薄层色谱、毛细管电泳及芯片技术等,在生命科学、生物技术、医药、食品及环境相关领域应用中的理论、方法与技术等。

会议设大会报告、分会报告和墙报,供学者和科研人员研讨、交流。同时设仪器专场供仪器公司和厂商展出、宣讲新产品。

二 征文要求

(1)符合征文范围、未公开发表的论文均可应征;应征论文需提供1~2页A4纸,并附有英文摘要,同时接受英文稿件;

(2)论文摘要请于2012年3月20日前向会议网站投稿,或用E-mail投至biomedcq2012@yahoo.cn,邮件主题中须注明“全国生物医药色谱及相关技术学术交流会论文”或“biomedcq2012论文”字样;

(3)摘要格式:页边距均3.0厘米,题目三号黑体,作者、单位、地址以及摘要内容五号宋体,图标、表格及参考文献用小五号宋体,英文字体为Times New Roman,单倍行距。请注明论文通讯作者的详细通讯地址、通讯联系人简介、电话号码和E-mail地址;

(4)会议设青年优秀论文(或墙报)奖;

(5)请在投稿时注明拟采取的交流方式:口头报告、墙报等。

三 联系方式

北京理化分析测试技术学会

邮 编:100089 联系人:肖敏、于靖琦

Tel:010-88517114;13811048292; Fax:010-68471169

E-mail:xmlhxxiaomin@139.com

地 址:北京市海淀区西三环北路27号北科大厦

本次会议安排详见网站:<http://biomed2012.cqu.edu.cn>。