

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡肝中 残留的四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物

郭黎明¹, 朱 奎¹, 江海洋^{1,2}, 李建成^{1,2}, 李晓薇^{1,2}, 丁双阳^{1,2*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 国家兽药残留基准实验室, 北京 100094)

摘要 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)在正离子模式下通过多反应监测(MRM)方式同时测定了鸡肝脏组织中3种四环素类药物、10种磺胺类药物以及8种喹诺酮类药物的残留。试样由McIlvaine缓冲液-乙腈(体积比为1:4)、乙腈提取,合并上清液并用氮气吹干,用0.05 mol/L磷酸三乙胺缓冲液-乙腈(体积比为85:15)溶解残余物,经正己烷脱脂后,采用UPLC-MS/MS进行定性、定量分析。该方法对测定的21种药物的检出限均为2 μg/kg,定量限均为5 μg/kg。在添加水平分别为5,10和50 μg/kg时,21种药物的加标回收率为66.8%~128.5%,日内测定的相对标准偏差(RSD)为0.8%~20.2%,日间测定的RSD为2.2%~15.3%。该方法可作为动物源性食品中这3类药物残留检测的确认方法。

关键词 超高效液相色谱-串联质谱法;四环素;磺胺;喹诺酮;多残留;鸡肝

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)04-0412-05 栏目类别:研究论文

Simultaneous determination of tetracyclines, sulfonamides and quinolones residues in chicken livers by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

GUO Liming¹, ZHU Kui¹, JIANG Haiyang^{1,2}, LI Jiancheng^{1,2},
LI Xiaowei^{1,2}, DING Shuangyang^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. National Reference Laboratory for Veterinary Drug Residue, Beijing 100094, China)

Abstract: An analytical method for the simultaneous determination of 3 tetracyclines, 10 sulfonamides and 8 quinolones in chicken livers by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM) has been developed and validated. A total of 2 g homogenized sample of chicken livers was placed in a 50 mL polypropylene tube, and 1 mL of McIlvaine buffer and 4 mL of acetonitrile were added. After stirring and centrifuging for 5 min at 4 000 r/min, the supernatant was collected and the remains was extracted by 5 mL acetonitrile. The supernatant was merged together and evaporated to dryness under a steam of nitrogen at 60 °C. The residue was dissolved with 4 mL of phosphoric acid-triethylamine buffer-acetonitrile (85:15, v/v) and 4 mL of *n*-hexane. After stirring for 1 min and centrifuging for 5 min at 4 000 r/min, the under layer solution was analyzed using UPLC-MS/MS. The satisfactory recoveries (66.8% - 128.5%) of all the veterinary drugs were demonstrated at spiked levels of 5, 10 and 50 μg/kg with the overall relative standard deviations (RSDs) for intra-day and inter-day of the 21 analytes less than 20.5%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) were 2 μg/kg and 5 μg/kg, respectively for each drug. This method has good stability, lower detection limits and can be used as a conclusive evidence method of these drug residues in chicken livers.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); tetracyclines; sulfonamides; quinolones; multiresidue; chicken livers

* 通讯联系人: 丁双阳, 博士, 研究员. Tel: (010) 62732802, E-mail: dingsy@cau.edu.cn.

基金项目: “十一五”国家科技支撑项目(No. 2006BAK02A09).

收稿日期: 2009-02-24

喹诺酮类药物(QNs)、四环素类药物(TCs)和磺胺类药物(SAs)是畜牧养殖中常用到的三类药物。它们具有抗菌、抗支原体、抗球虫等作用,常用来治疗或预防鸡的细菌、支原体和球虫感染^[1]。动物饲养过程中不科学地使用这些药物会导致其在动物源性食品中的残留超标,影响人类健康,并且会使细菌的耐药性增强,从而影响这几类药物在人类疾病治疗上的作用。因此,许多国家对鸡肝中这几类药物的最高残留限量(MRL)都做了规定^[2-5],这些规定中以日本“肯定列表”最为详尽和严格,例如对强力霉素、恩诺沙星和磺胺甲恶唑的规定分别是50、100和20 μg/kg,均要严于我国和欧盟的标准(我国和欧盟的标准分别是300、300和100 μg/kg)。

目前测定动物源性食品中喹诺酮类药物、四环素类药物和磺胺类药物残留的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]和液相色谱-质谱法(LC-MS/MS)^[9-15]。液相色谱法多使用紫外或者荧光检测器,但该方法很容易产生杂质干扰现象,因此样品前处理方法和色谱条件都需要仔细的调试。液相色谱法中比较有特色的是Schneider等^[6,7]和李存^[8]所报道的方法。Schneider等^[6,7]使用柱上衍生化-荧光检测法同时检测QNs和TCs;李存^[8]使用紫外检测器与荧光检测器串联的方法检测QNs和SAs;另外,李存报道的方法中样品前处理方法也比较有特点,他使用了免疫亲和方法净化样品。近年来,有关这三类药物残留检测的液相色谱-质谱法的报道也越来越多,这些研究的共同特点是灵敏度高、涉及的药物种类远比液相色谱法多,特别是Kaufmann等^[10]使用高分辨的飞行时间质谱对近百种兽药残留进行了同时检测。但上述检测方法分析的对象多为肌肉组织和牛奶。由于肝脏组织基质较为复杂,报道的方法还较少。本文建立的超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)可同时检测喹诺酮类、四环素类和磺胺类药物在鸡肝中的残留量,且具有灵敏度高、前处理简单和分析耗用时间短的特点。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Quattro/Premier超高效液相色谱-质谱仪(Waters公司);R23型离心机(上海力康公司);Organomation氮吹仪(Organomation公司);JZ-II型均质器(天津四方公司)。甲酸、甲醇、乙腈和正己烷均为色谱纯(Dikmapure公司);实验用水均为超纯水(电阻率为18.2 MΩ·cm);McIlvaine缓冲液(11.8 g柠檬酸、27.6 g磷酸氢二钠、33.6 g乙二醇四乙酸二钠溶解于水中,定容至1000 mL,pH

4.2)0.05 mol/L磷酸三乙胺缓冲液(pH 3.0)-乙腈(体积比为85:15)。

标准品:麻保沙星(marbofloxacin,MBF)、氧氟沙星(ofloxacin,OFL)、诺氟沙星(norfloxacin,NOR)、盐酸环丙沙星(ciprofloxacin hydrochloride,CIP)、恩诺沙星(enrofloxacin,ENR)、土霉素(oxytetracycline,OTC)、四环素(tetracycline,TC)、强力霉素(doxytetracycline,DC)、磺胺嘧啶(sulfadiazine,SD)、磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine,SM2)、磺胺对甲氧嘧啶(sulfamethoxydiazine,SMD)、磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine sodium,SMM)、磺胺甲基异恶唑(sulfamethoxazole,SMZ)、磺胺喹恶啉(sulfaquinoxaline,SQX)和磺胺甲嘧啶(sulfamerazine,SM1)均购自Dr. Ehrenstorfer公司;磺胺吡啶(sulfapyridine,SP)、磺胺噻唑(sulfathiazole,ST)、磺胺苯酰(sulfabenzamide,SBM)、盐酸二氟沙星(difloxacin hydrochloride,DIF)购自Sigma公司;氟甲喹(flumequine,FLU)、恶喹酸(oxolinic acid,OXO)购自中国兽药监察所。

标准储备液及工作液的配制:分别称取标准品各10.0 mg,用乙腈溶解后转移至100 mL棕色容量瓶中,用乙腈定容,于-20℃条件下保存。使用时将上述标准储备溶液混合,用乙腈稀释成不同浓度的标准工作液。

1.2 仪器分析条件

1.2.1 超高效液相色谱条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH Shield-RP18柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);柱温:30℃;样品室温度:10℃;进样体积:10 μL。流动相A为甲醇;流动相B为0.1%(体积分数)甲酸水溶液;梯度洗脱程序:0→4 min,7% A→13.4% A;4→6 min,13.4% A→21.4% A;6→9 min,21.4% A→70% A;然后瞬间由70% A降到7% A,并保持2.5 min;流速为0.3 mL/min。

1.2.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI),正离子模式;毛细管电压:0.75 kV;萃取电压:4 V;离子源温度:110℃;脱溶剂气温度:380℃;脱溶剂气流量:600 L/h;碰撞气(氩气)压力:0.331 Pa。溶剂延迟:使流动相在3 min时切入质谱仪,在9.9 min时切出质谱仪。采用多反应监测(MRM)模式,各种药物的采集参数见表1。

1.3 样品前处理

将空白鸡肝剪成小块,搅拌(12000 r/min)粉碎匀浆。称取2 g匀浆好的鸡肝试样,置于50 mL

离心管中,加入 McIlvaine 缓冲液 1 mL 和乙腈 4 mL,振荡 5 min,于 4 000 r/min 条件下离心 5 min,将上清液置于另一离心管中,残余物再用 5 mL 乙腈提取一次。合并 2 次提取上清液,于 60 °C 下用氮气吹干。残余物中加入 4 mL 0.05 mol/L 磷酸三乙胺缓冲液-乙腈(体积比为 85:15),4 mL 正己烷,振荡 1 min,于 4 000 r/min 条件下离心 5 min,取下层液体过 0.22 μm 滤膜,滤液用于 UP-LC-MS/MS 测定。

1.4 基质标准曲线的绘制

取空白鸡肝按 1.3 节的方法进行处理,在合并后的提取液中加入适当体积的混合标准溶液,使其质量浓度分别为 2.5,5.0,10.0,25.0,50.0 μg/L。

以基质添加标准溶液的质量浓度(X , μg/L)为横坐标,各药物量子离子的峰面积(Y)为纵坐标,绘制基质标准曲线。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 线性关系

测定各药物质量浓度均为 2.5,5.0,10.0,25.0,50.0 μg/L 的基质混合标准溶液,得到的线性回归方程见表 1。各药物均在 2.5~50.0 ng 进样质量范围内与其峰面积呈线性关系,相关系数均大于 0.99。其中 10.0 μg/L 基质混合标准溶液的 MRM 图见图 1。

表 1 21 种药物的 MRM 采集参数及标准曲线
Table 1 MRM parameters and linear equations for 21 drugs

Drug	Precursor ion(m/z)	Product ions (m/z)	Cone voltage/V	Collision energies/eV	Dwell time/ms	Retention time window/min	Linear equation	r^2
SD	251	156*,108	31	16*,25	0.3	3.3-3.8	$y = 125.559x + 32.8834$	0.9948
SP	250	156*,108	34	14*,14	0.3	3.8-4.3	$y = 212.309x + 53.8245$	0.9962
ST	256	108*,156	28	26*,16	0.15	4.2-4.6	$y = 42.7061x + 4.26114$	0.9951
SM1	265	156*,110	30	18*,28	0.22	4.52-5.2	$y = 137.879x + 43.2844$	0.9980
MBF	363	320*,345	38	16*,20	0.2	5.2-5.8	$y = 277.888x - 33.9791$	0.9948
SM2	279	186*,108	33	18*,30	0.1	5.72-6.15	$y = 496.673x + 66.9983$	0.9974
OTC	445	410*,154	26	21*,28	0.1	5.73-6.16	$y = 232.534x + 63.8885$	0.9974
TC	461	426*,443	28	18*,15	0.18	6.1-6.5	$y = 144.148x + 8.60245$	0.9950
OFL	362	318*,261	40	18*,26	0.1	6.4-6.69	$y = 961.405x + 78.2899$	0.9990
SMD	281	156*,108	32	18*,27	0.15	6.5-7	$y = 121.327x + 18.0071$	0.9971
NOR	320	276*,233	36	16*,23	0.15	7-7.27	$y = 285.24x - 122.736$	0.9973
CIP	332	288*,254	38	18*,26	0.1	7.19-7.5	$y = 217.469x - 93.8187$	0.9971
ENR	360	316*,245	39	19*,27	0.08	7.21-7.55	$y = 726.578x + 79.7041$	0.9982
DIF	400	382*,356	38	22*,20	0.02	7.5-7.8	$y = 420.849x - 19.3396$	0.9963
SMZ	254	156*,108	30	18*,24	0.08	7.8-8.05	$y = 67.4418x - 5.36228$	0.9919
SMM	281	156*,108	33	17*,25	0.08	7.98-8.3	$y = 73.9055x - 2.02225$	0.9973
SBM	277	156*,108	20	12*,20	0.08	8.45-8.85	$y = 94.8314x - 61.833$	0.9925
DC	445	428*,154	30	19*,29	0.12	8.5-8.85	$y = 230.108x + 25.4353$	0.9942
OXO	262	244*,216	36	20*,32	0.1	8.9-9.2	$y = 1096.99x - 129.757$	0.9989
SQX	301	156*,108	29	15*,24	0.15	9.2-9.5	$y = 129.534x - 6.04945$	0.9971
FLU	262	202*,244	30	28*,22	0.1	9.5-10	$y = 333.426x + 65.2248$	0.9985

The parameters with * are for quantitative ions. y : peak area; x : mass concentration, μg/L.

2.1.2 检出限和定量限

在 2 μg/kg 添加水平时,各药物峰的信噪比均大于 3,故将其定为检出限。在 5 μg/kg 添加水平时,各药物峰的信噪比均大于 10,且回收率、相对标准偏差(RSD)满足条件,故将其定为定量限。

2.1.3 回收率和精密度

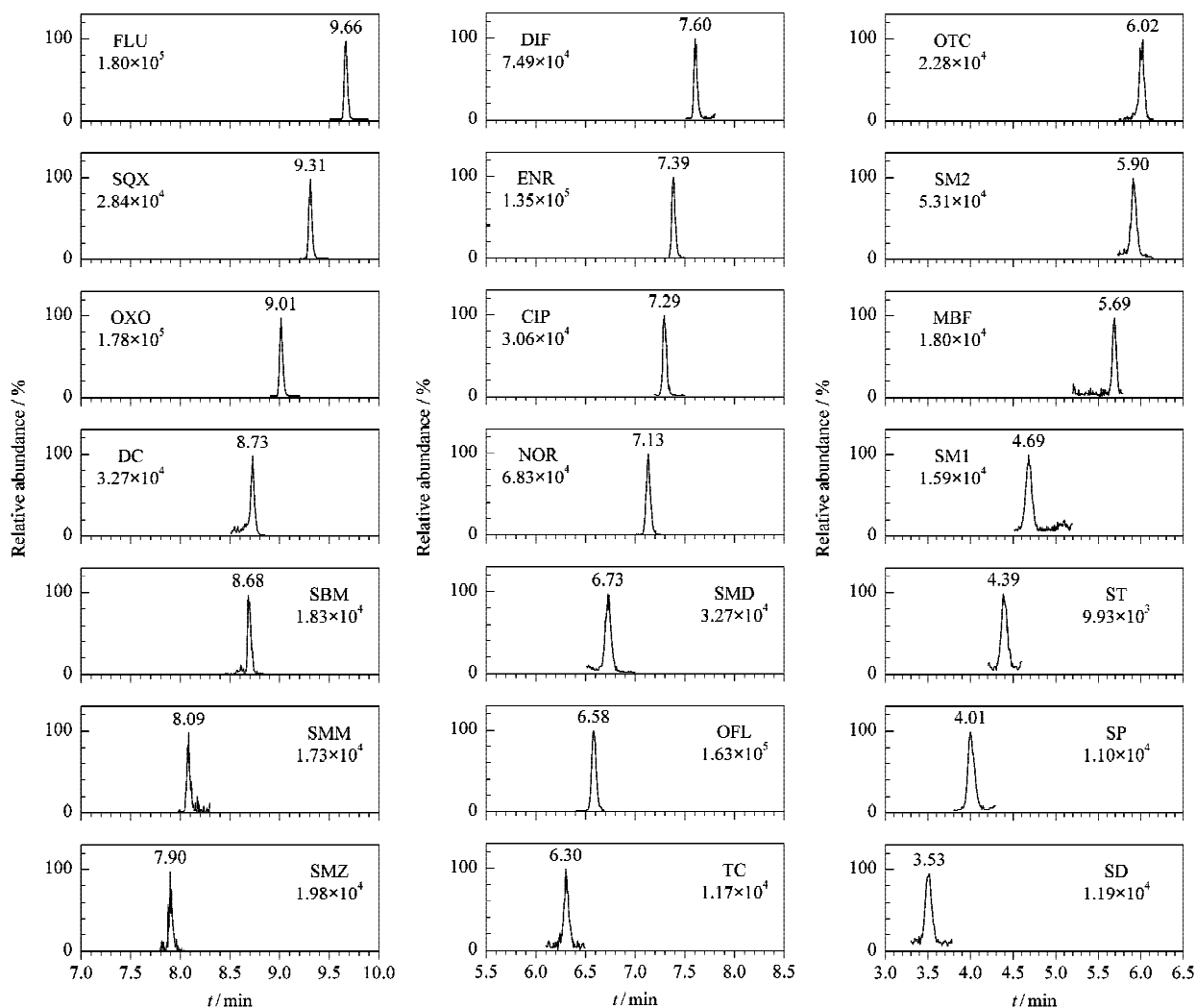
称取 2 g 空白试样,添加混合标准溶液,使加标水平分别达到 5,10 和 50 ng/g,充分混匀,按照本文建立的方法进行测定,每个添加水平作 6 份平行测定,连续测定 3 d。由表 2 可见回收率稳定,日内测定的 $RSD_{intra}(n=6)$ 在 0.8%~20.2% 之间,日间测定的 $RSD_{inter}(n=3)$ 在 2.2%~15.3%。

2.2 讨论

2.2.1 色谱-质谱条件的优化

实验中比较了 BEH C18 和 BEH Shield-RP18 这两种色谱柱,发现大多数药物在这两种色谱柱上的分离效果是一致的,但对 OFL 与 NOR 的分离, BEH Shield-RP18 柱要明显好于 BEH C18 柱,这可能与两种色谱柱的细微差别有关, BEH Shield-RP18 的键合相是嵌入极性基团的 C16 链,而 BEH C18 就是 C18 链。

在正离子 ESI 模式下,药物的准分子离子峰均以 $[M+H]^+$ 为主,因此选择各药物的 $[M+H]^+$ 作为碰撞诱导解离的母离子,然后使用 Masslynx 4.1

图 1 10.0 $\mu\text{g/L}$ 基质混合标准溶液的 MRM 图Fig. 1 MRM chromatograms of 10.0 $\mu\text{g/L}$ matrix-mixed standard solution

工作站的“AutoTurn”功能对不同药物的碰撞能量进行优化,各药物的特征离子和碰撞能量见表 1。

实验中将溶剂延迟时间设为 3 min 进入质谱仪 9.9 min 切出质谱仪,确保了极性较强和极性较弱的杂质都在 3 min 之前和 9.9 min 之后被洗脱在质谱仪之外,这样能大大地减轻对质谱仪的污染。

2.2.2 样品前处理过程的确定

在质谱 MRM 模式下,样品基质对测定的干扰较小,另外仪器具备溶剂延迟功能,故在实验设计时考虑采用较为简单和经济的液-液分配方法进行样品前处理。

本文分别考察了以乙腈、冰醋酸-乙腈(体积比为 1:9)、McIlvaine 缓冲液-乙腈作为提取剂的提取效果,发现这 3 种提取剂均不能很好地将所要测定的三类药物提取出来。仅以乙腈作为提取剂时,一部分氟喹诺酮类药物和四环素类药物的回收率不高;以冰醋酸-乙腈作为提取剂时,喹诺酮类药物和磺胺类药物的回收率可达 80%~110%,但是四环素

类药物的回收率很低,仅为 20%~30%;以 McIlvaine 缓冲液-乙腈为提取剂可以很好地将四环素类药物和氟喹诺酮类药物提取出来,但部分磺胺类药物的回收率仅为 50% 左右。故本文考虑采用复合的提取方法,即用 McIlvaine 缓冲液-乙腈进行第一遍提取,用乙腈进行第二遍提取。

本文考察了 McIlvaine 缓冲液-乙腈的体积比分别为 1:4 和 2.5:2.5 的提取效果,发现比例为前者时,喹诺酮类药物和四环素类药物的回收率略高于后者,且前者的相对含水量要低于后者,便于后续的氮吹操作。

Tousaint 等^[14]报道喹诺酮类药物在甲酸水溶液中不能完全溶解,即使调节乙腈、甲醇等有机溶剂的比例,也不能增加其溶解度;如果使用初始流动相作为复溶液,在一定程度上会影响喹诺酮类药物检测的灵敏度和方法的稳定性。赵思俊^[15]研究了磷酸盐缓冲液对喹诺酮类药物响应信号的影响,发现以 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液作为复溶液时的响应

信号最强,而且缓冲液的 pH 值对响应信号的影响不大。本文对 0.1% 甲酸水溶液-甲醇、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液以及磷酸三乙胺缓冲液-乙腈作为复溶液时的响应信号进行了比较,发现喹诺酮类药物和四环素类药物以磷酸三乙胺缓冲液-乙腈为复溶

液时的响应信号较强,而磺胺类药物则是以磷酸盐缓冲液和 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为复溶液时的响应信号要稍强。综合考虑,本文选择以 0.05 mol/L 磷酸三乙胺缓冲液-乙腈(体积比为 85:15)作为复溶液,结果令人满意。

表 2 21 药物在空白鸡肝中的添加回收率和日内、日间测定的相对标准偏差(RSD)

Table 2 Recoveries and intra-day and inter-day RSDs of 21 drugs spiked in blank chicken livers

Drug	5 ng/g			10 ng/g			50 ng/g		
	recovery	RSD _{intra} (n = 6)	RSD _{inter} (n = 3)	recovery	RSD _{intra} (n = 6)	RSD _{inter} (n = 3)	recovery	RSD _{intra} (n = 6)	RSD _{inter} (n = 3)
SD	97.0	5.7	5.8	95.7	5.2	5.2	89.0	4.1	5.4
SP	94.3	4.3	4.5	92.4	5.5	7.0	93.6	2.6	2.6
ST	93.5	15.8	15.3	93.4	3.9	5.8	96.6	2.2	2.6
SM1	92.5	4.6	4.9	89.2	4.8	4.6	92.3	3.2	3.3
MBF	103.8	5.4	6.7	85.7	2.6	6.8	99.9	1.5	2.3
SM2	95.4	2.9	3.9	113.4	4.4	6.3	99.3	2.5	3.2
OTC	77.2	7.2	7.8	77.6	6.6	8.1	78.9	5.7	7.4
TC	70.1	7.3	7.5	69.4	5.8	8.9	73.3	3.0	4.1
OFL	91.8	5.7	6.1	90.6	5.5	11.8	95.7	2.3	2.4
SMD	97.5	5.2	7.4	99.0	6.8	7.2	95.7	6.1	6.6
NOR	121.6	6.0	6.3	73.7	3.2	3.4	76.6	2.7	3.5
CIP	104.1	8.6	9.3	81.9	4.9	5.5	76.9	5.4	6.5
ENR	100.5	7.2	7.1	104.3	5.5	5.9	96.1	2.1	2.2
DIF	95.1	6.6	6.6	105.4	6.9	6.8	97.3	3.9	4.0
SMZ	100.9	6.6	7.6	112.8	5.6	7.4	101.6	4.0	4.3
SMM	95.7	5.7	5.7	92.8	5.8	7.4	99.3	4.7	7.9
SBM	114.8	11.6	11.3	107.6	8.0	8.2	87.7	4.1	5.1
DC	86.8	5.7	5.8	76.5	6.4	8.7	76.2	3.2	3.2
OXO	108.1	5.7	5.7	110.1	7.2	7.6	97.0	2.7	2.9
SQX	104.2	4.2	4.7	104.4	4.1	6.9	93.5	2.2	7.4
FLU	95.8	8.3	11.5	95.0	4.0	5.1	96.0	3.1	9.7

3 结论

本文建立了鸡肝中喹诺酮类药物、四环素类药物和磺胺类药物(共 21 种)残留的 UPLC-MS/MS 测定方法。21 种药物在 0~50 μg/L 范围内具有良好的线性,回收率稳定,检出限低,可作为动物源性食品中这三类药物残留的确证检测方法。

参考文献:

[1] Shen J Z, Xie L J. Veterinary pharmacology. Beijing: China Agricultural University Press (沈建忠,谢联金. 兽医药理学. 北京:中国农业大学出版社), 2000

[2] Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号). (2002-12-24) [2009-04-15]. <http://yz.hz-agri.gov.cn/uploadFiles/2005-10/1130221564406.doc>

[3] European Commission. Regulation 99/508/EEC of 9 March 1999. Off J Eur Communities 1999, L60, 305

[4] FDA. FDA announces final decision about veterinary medicine. [2009-02-12]. <http://www.fda.gov/bbs/topics/news/2005/new01212.html>

[5] Editorial Board of the Residue Limits of the Agricultural Chemicals in Food. Residue limits of the agricultural chemi-

cals in food. Food volume: Japan positive list system. Beijing: China Standard Press (食品中农业化学品残留限量编委会. 食品中农业化学品残留限量. 食品卷:日本肯定列表制度. 北京:中国标准出版社), 2006

[6] Schneider M J, Darwish A M, Freeman D W. Anal Chim Acta, 2007, 586: 269

[7] Schneider M J, Braden S E, Reyes-Herrera I, et al. J Chromatogr B, 2007, 846: 8

[8] Li C. [PhD Dissertation]. Beijing: China Agricultural University (李存. [博士学位论文]. 北京:中国农业大学), 2008

[9] Liu P Y, Jiang N, Wang Y F, et al. Chinese Journal of Chromatography (刘芃岩,姜宁,王英峰,等. 色谱), 2008, 26 (3): 348

[10] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. J Chromatogr A, 2008, 1194: 66

[11] Li H, Kijak P J, Turnipseed S B, et al. J Chromatogr B, 2006, 836: 22

[12] Aguilera-Luiz M M, Vidal J L M, Romero-Gonzalez R, et al. J Chromatogr A, 2008, 1205: 10

[13] Koesukiwat U, Jayanta S, Leepipatpiboon N. J Chromatogr A, 2007, 1149: 102

[14] Toussaint B, Chedin M, Bordin G. J Chromatogr A, 2005, 1088: 32

[15] Zhao Sijun. [PhD Dissertation]. Beijing: China Agricultural University (赵思俊. [博士学位论文]. 北京:中国农业大学), 2007