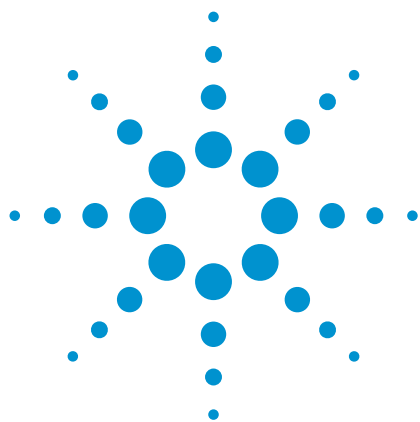




依据日本肯定列表使用 SPE 柱及 LC-MS/MS 对肉类样品中的兽药 (I) 和 (II) 进行多残留分析

应用报告

食品与农业

作者

Eugene Chang, Kazuyuki Yamashita 和
Ritu Arora
安捷伦科技有限公司
25200 Commercentre Drive
Lake Forest, CA 92630
美国

引言

相当于美国 FDA 的日本厚生劳动省 (MHLW) 于 2006 年 5 月 29 日起开始实施日本肯定列表制度, 用以限定食品中的农业化学品 [1]。此项法规的颁布旨在禁止含有超过最大残留限量 (MRL) 农业化学品的化学污染食品流入市场。农业化学品包括农药、饲料添加剂和兽药。该法规适用于所有国产和进口食品, 涉及近 800 种化学品。由于日本是西太平洋 / 大洋洲地区的最大进口国, 所以大多数食品出口国必须遵守此准则。此法规的检验方案采用经典的 SPE 柱和 LC/MS 或 GC/MS 技术, 要求农业化学品的残留量不超出 MRL (通常为 0.01 ppm)。

本文描述了不同肉类基质中 45 种中性、碱性和酸性兽药的分析, 残留量均低于日本肯定列表规定的 MRL (0.01 ppm)。通过采用 Hydromatrix 硅藻土 Bond Elut Plexa SPE 柱、Pursuit C18 HPLC 色谱柱及 MS 检测, 安捷伦提供了肉中兽药测定的完整解决方案。



Agilent Technologies

材料与方法

为了便于检测和分离, 将药物分为两组。组 1 主要由碱性化合物组成, 而组 2 由酸性和碱性化合物组成。两组药物使用不同的 LC 和 MS/MS 条件 (方法 (I) 和方法 (II)), 见表 1) 进行分析, 但采用相同的样品前处理方法。

表 1. 方法 (I) 和 (II) 中的分析物

方法 (I)	方法 (II)
2-氨基-5-丙磺酰基苯并咪唑	林可霉素
噻菌灵	磺胺醋酰
左旋咪唑	达氟沙星
磺胺嘧啶	赛拉嗪
磺胺噻唑	克伦特罗
甲氧苄啶	敌百虫 (DEP)
磺胺吡啶	替米考星
奥美普林	息疟定
磺胺甲基噻唑	氟苯尼考
甲砒氯霉素	2-乙酰氨基-5-硝基噻唑
磺胺二甲噻唑	氯舒隆
磺胺甲氧噻嗪	氨磺磷
磺胺莫托辛	氢化可的松
磺胺氯噻嗪	泰妙菌素
磺胺多辛	地塞米松
磺胺地托辛	波尼松龙
磺胺甲基异噻唑	仲丁威 (BPMC)
乙氧酰胺苯甲酯	埃玛菌素
磺胺喹噁啉	双硫磷 (Abate)
磺胺硝苯	丙烯菊酯
β -群勃龙	莫能菌素
α -群勃龙	
醋酸美仑孕酮	
玉米赤霉醇	

材料与试剂

基质	鸡肉、猪肉和牛肉
过滤器	Hydromatrix (部件号 198003)
SPE 柱	Bond Elut Plexa, 3 mL, 60 mg (部件号 12109603)
色谱柱	Pursuit C18, 3.0×150 mm, 3 μ m (部件号 A3001150X030)
标准品	含碱性、酸性和中性分析物的药物混合溶液, PL-2-1 及 PL-1-3 (Wako, Japan)
浓度	每种药物浓度为 20 μ g/mL, 溶于甲醇中
泵	Agilent 212-LC
检测器	Agilent 320-MS LC/MS

两种方法共同的样品前处理步骤

1. 称取 5 g 肉类样品
2. 加入 100 mL 乙腈 / 甲醇 / 0.2% 偏磷酸 (1:1:3) 溶液, 搅匀。并经含 2-3 mm 厚 Hydromatrix 硅藻土的滤纸减压过滤。用 20 mL 乙腈 / 甲醇 / 0.2% 偏磷酸 (1:1:3) 溶液冲洗硅藻土层。经含硅藻土的滤纸减压过滤
3. 合并滤液, 并蒸发至 20 mL
4. 用 5 mL 甲醇、5 mL 2% 氨水活化 Bond Elut Plexa 柱, 上样, 用 5 mL 2% 氨水淋洗, 然后用 5 mL 甲醇洗脱样品
5. 40 °C 蒸干溶剂
6. 用 1 mL 乙腈: 水 (1:9) 溶液复溶样品

与日本肯定列表配合的动物产品中兽药的标准分析方法尚未发布。但是, 已有政府推荐使用的检测方法, 经过少许修改即为以下给出的方法 (I) 和方法 (II)。样品用 Hydromatrix 硅藻土过滤, 随后采用 Bond Elut Plexa SPE 柱进行前处理, 可以有效消除基质干扰。当用乙腈 / 甲醇 / 偏磷酸混合溶液处理肉类样品时会使蛋白质变性, 故必须使用 Hydromatrix 等硅藻土产品来消除浑浊。用甲醇和 2% 的氨水活化 Bond Elut Plexa 柱, 与通常使用甲醇和水活化不同, 用氨水活化能够带来更高的回收率。

两种方法中大多数化合物均采用供应商提供的分析证书中的 MRM 离子对进行分析, 但有些情况下为了获得更好的灵敏度, 采用了不同的监测离子。

所有分析物使用的 MS/MS 离子对详细列于表 2 和 3 中。由于一些化合物在高温时不稳定, 所以两种方法中均包括了干燥气的温度控制程序。

方法 (I) LC 条件

流动相 A	乙腈 + 0.1% 甲酸溶液
流动相 B	水 + 0.1% 甲酸溶液
柱温	40 °C
梯度程序	

时间 (min)	%A	%B	流速 (μL/min)
0	5	95	200
2	5	95	200
30	80	20	200
34	80	20	200
35	5	95	200
40	5	95	200

方法 (I) MS 条件

歧管温度	40 °C
API 外壳温度	65 °C
API 干燥气程序	400 °C 保持 19 min, 1 min 内降至 300 °C, 保持 15 min

表 2. 方法 (I) MS/MS 离子对详情

化合物	母离子	子离子	ESI 模式	碰撞能量
2-氨基-5-丙磺酰基苯并咪唑	240.1	133.1	(+)	21.5
噻菌灵	202.1	175.1	(+)	8.0
左旋咪唑	205.1	178.0	(+)	16.0
磺胺嘧啶	251.1	92.1	(+)	15.0
磺胺噻唑	256.0	156.0	(+)	6.0
甲氧苄啶	291.1	230.1	(+)	10.5
磺胺吡啶	250.0	156.2	(+)	13.5
奥美普林	275.1	123.1	(+)	14.0
磺胺甲基嘧啶	265.1	155.9	(+)	11.5
甲砒氯霉素	356.0	308.0	(+)	8.0
磺胺二甲嘧啶	279.1	92.1	(+)	19.0
磺胺甲氧吡嗪	281.1	156.1	(+)	14.5
磺胺莫托辛	281.1	156.1	(+)	14.5
磺胺氯吡嗪	286.1	157.1	(+)	8.0
磺胺多辛	311.1	156.2	(+)	17.5
磺胺地托辛	311.1	156.2	(+)	17.5
磺胺甲基异噁唑	254.0	155.9	(+)	12.0
乙酰酞胺苯甲酯	238.2	136.0	(+)	15.0
磺胺喹噁啉	301.0	155.9	(+)	12.0
磺胺硝苯	336.1	134.1	(+)	19.5
β-群勃龙	271.1	165.1	(+)	38.0
α-群勃龙	271.1	165.1	(+)	38.0
醋酸美仑孕酮	397.2	279.1	(+)	14.0
玉米赤霉醇	321.1	277.1	(+)	21.0

方法 (II) LC 条件

流动相 A	乙腈 + 0.1% 甲酸溶液
流动相 B	水 + 0.1% 甲酸溶液
柱温	40 °C
梯度程序	

时间 (min)	%A	%B	流速 (μL/min)
0	5	95	200
28	99	1	200
33	99	1	200
34	5	95	200
40	5	95	200

方法 (II) MS 条件

歧管温度	40 °C
API 外壳温度	65 °C
API 干燥气程序	275 °C 保持 19 min, 1.25 min 内升至 400 °C, 保持 16 min

表 3. 方法 (II) MS/MS 离子对详情

化合物	母离子	子离子	ESI 模式	碰撞能量
林可霉素	407.2	126.1	(+)	19.5
磺胺醋酐	215.0	156.0	(+)	11.0
达氟沙星	358.1	340.1	(+)	18.5
赛拉嗪	221.1	90.1	(+)	10.5
克伦特罗	278.2	204.1	(+)	9.5
敌百虫 (DEP)	259.0	109.1	(+)	9.5
替米考星	435.6	143.0	(+)	14.0
息疟定	249.1	177.1	(+)	19.0
氟苯尼考	355.9	184.9	(-)	18.0
2-乙酰氨基-5-硝基噻唑	186.0	138.9	(-)	13.0
氯舒隆	379.9	343.9	(-)	10.5
氨磺磷	326.0	93.1	(+)	20.5
氢化可的松	363.1	121.1	(+)	14.5
泰妙菌素	494.3	192.1	(+)	12.0
地塞米松	393.2	373.1	(+)	5.0
波尼松龙	361.2	147.0	(+)	13.0
仲丁威 (BPMC)	208.1	95.1	(+)	10.5
埃玛菌素	887.5	158.1	(+)	19.0
双硫磷 (Abate)	467.0	419.3	(+)	19.5
丙烯菊酯	303.0	135.0	(+)	7.0
莫能菌素	693.4	675.2	(+)	30.5

结果与讨论

图 1 和图 3 显示了方法 (I) 和方法 (II) 中标准品 LC-MS/MS 分析的总离子流和 MRM 色谱图。Pursuit C18 色谱柱使方法 (I) 中三对同分异构体均达到基线分离。这表明 LC 的强大性能已经使 MS 检测能力显得捉襟见肘。两种方法使用相同的色谱柱进行分离。总之，该色谱柱非常适用于兽药多残留分析。



图 1. 使用 Agilent Pursuit C18 色谱柱进行方法 (I) 中标准品的 LC-MS/MS 分析的总离子流色谱图和 MRM 色谱图

图 2 和图 4 是方法 (I) 和 (II) 中标准品的 10 ppb 混合物和加标基质 (鸡肉、猪肉和牛肉) 的总离子流色谱图。每种肉类基质净化后谱图差异极小，显示出 Bond Elut Plexa 柱拥有极佳的净化能力。

使用 Bond Elut Plexa 柱对加标 10 ppb 的鸡肉、猪肉和牛肉进行前处理，两种方法所涉及的所有分析物的回收率及 RSD 值列于表 4 和表 5 中。该方法的重现性良好，大多数化合物的 RSD 值小于 1%，最大的 RSD 值也仅为 3.6%。所有药物的回收率在 65%-115% 之间，大多数药物的回收率在 75%-100% 范围内。这些回收率结果均符合 EU 和 CDFA 的要求 [2]。

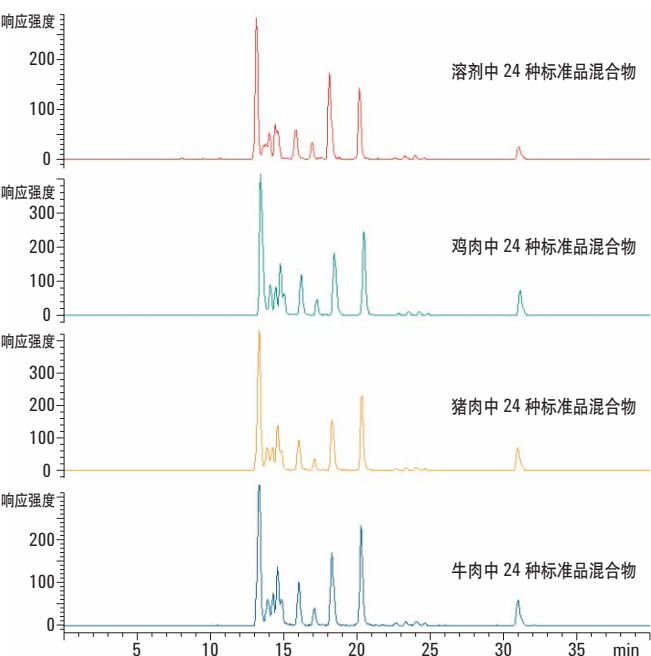


图 2. 对方法 (I) 中 10 ppb 标准品混合物和加标基质 (鸡肉、猪肉和牛肉) 进行定量分析的总离子流色谱图

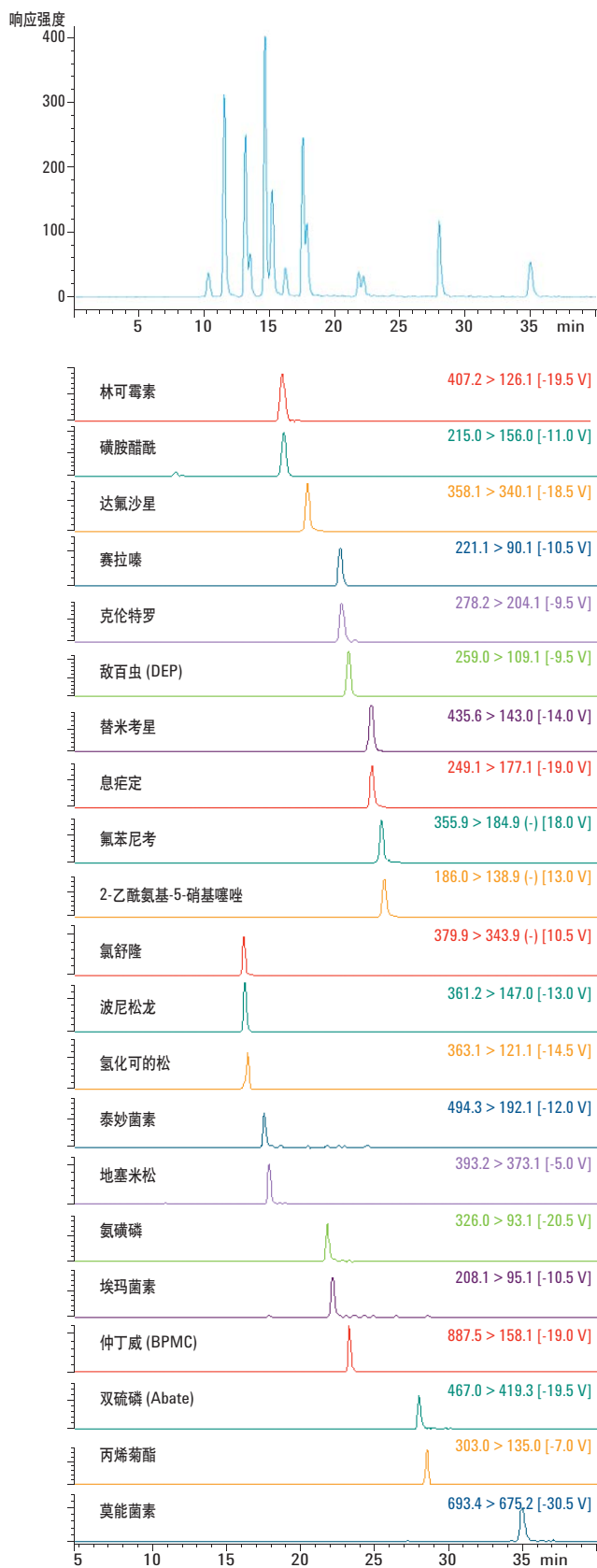


图 3. 使用 Agilent Pursuit C18 色谱柱进行方法 (II) 中标准品的 LC-MS/MS 分析的总离子流色谱图和 MRM 色谱图

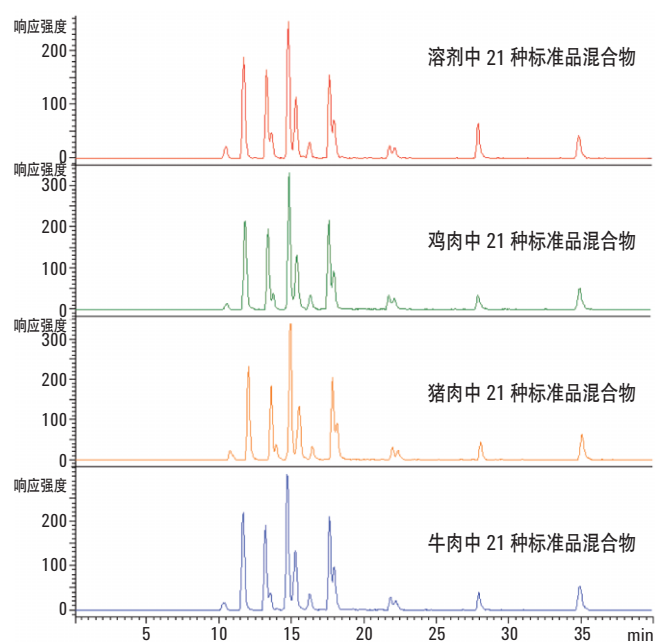


图 4. 对方法 (II) 中 10 ppb 标准品混合物和加标基质 (鸡肉、猪肉和牛肉) 进行定量分析的总离子流色谱图

表 4. 方法 (I): 使用 Agilent Bond Elut Plexa 柱对鸡肉、猪肉和牛肉中的兽药进行多残留萃取, 于 10 ppb 检测限计算回收率

化合物	鸡肉			猪肉			牛肉		
	C (ppb)	RSD	回收率 (%)	C (ppb)	RSD	回收率 (%)	C (ppb)	RSD	回收率 (%)
2-氨基-5-丙磺酰基苯并咪唑	10.0	0.8	100	8.4	0.5	84	8.6	0.2	86
噻菌灵	11.5	0.3	115	8.6	0.5	86	10.1	0.9	101
左旋咪唑	7.5	0.2	75	6.5	0.6	65	6.5	0.6	65
磺胺嘧啶	10.8	1.0	108	9.6	0.4	96	10.0	0.1	100
磺胺噻唑	7.8	0.3	78	7.8	0.9	78	7.0	0.5	70
甲氧苄啶	8.7	0.2	87	7.0	0.3	70	7.5	0.3	75
磺胺吡啶	8.4	0.0	84	8.5	0.2	85	8.1	0.5	81
奥美普林	9.1	0.1	91	7.6	0.1	76	7.9	0.7	79
磺胺甲基嘧啶	8.7	0.7	87	8.7	0.3	87	8.5	0.2	85
甲砒氯霉素	11.1	1.4	111	7.9	3.5	79	9.6	3.3	96
磺胺二甲嘧啶	9.6	1.9	96	9.0	0.9	90	8.5	0.8	85
磺胺甲氧哒嗪	8.9	0.2	89	8.3	0.2	83	8.1	0.2	81
磺胺莫托辛	9.9	1.1	99	9.8	0.8	98	8.9	1.0	89
磺胺氯哒嗪	10.0	0.7	100	8.4	0.6	84	9.6	1.4	96
磺胺多辛	10.3	1.0	103	9.4	0.2	94	9.2	0.4	92
磺胺甲基异噻唑	10.1	0.5	101	8.6	1.0	86	8.8	0.6	88
乙氧酰胺苯甲酯	11.2	3.6	112	11.3	2.0	113	10.0	0.4	100
磺胺喹噁啉	11.5	0.5	115	10.3	0.2	103	10.0	0.2	100
磺胺地托辛	9.6	0.7	96	10.1	0.5	101	9.5	0.6	95
磺胺硝苯	10.7	0.8	107	11.3	0.5	113	10.7	0.3	107
β -群勃龙	10.7	1.5	107	9.7	1.8	97	9.0	0.9	90
α -群勃龙	9.8	0.1	98	8.5	0.0	85	8.6	0.9	86
醋酸美仑孕酮	9.7	0.2	97	8.5	1.2	85	7.9	0.6	79
玉米赤霉醇	9.7	2.1	97	9.4	0.3	94	9.1	0.2	91

表 5. 方法 (II): 使用 Agilent Bond Elut Plexa 柱对鸡肉、猪肉和牛肉中兽药进行多残留萃取, 于 10 ppb 检测限计算回收率

化合物	鸡肉			猪肉			牛肉		
	C (ppb)	RSD	回收率 (%)	C (ppb)	RSD	回收率 (%)	C (ppb)	RSD	回收率 (%)
林可霉素	8.8	1.5	88	7.3	1.6	73	9.7	0.5	97
磺胺醋酰	9.4	0.9	94	8.7	0.9	87	8.9	0.9	89
达氟沙星	11.3	1.5	113	10.2	1.5	102	10.5	1.1	105
赛拉嗪	10.8	0.5	108	10.6	1.3	106	9.6	0.8	96
克伦特罗	9.4	1.2	94	9.7	0.2	97	9.6	0.1	96
敌百虫 (DEP)	8.4	0.4	84	7.2	0.2	72	7.5	0.2	75
替米考星	9.3	1.0	93	9.4	1.3	94	9.1	0.9	91
息疟定	10.0	0.9	100	10.1	0.3	101	9.8	0.5	98
氟苯尼考	10.6	0.1	106	9.9	0.5	99	10.3	0.5	103
2- 乙酰氨基 -5- 硝基噻唑	9.5	0.5	95	9.8	1.0	98	9.7	0.7	97
氯舒隆	9.8	1.1	98	10.0	0.2	100	9.6	0.3	96
波尼松龙	10.2	1.0	102	9.9	1.0	99	9.9	0.6	99
氢化可的松	9.4	1.2	94	9.7	1.9	97	8.2	2.0	82
泰妙菌素	10.9	2.4	109	9.3	0.4	93	9.8	0.7	98
地塞米松	11.1	2.1	111	9.3	0.6	93	9.9	0.3	99
仲丁威 (BPMC)	11.3	3.3	113	8.5	0.7	85	9.9	0.6	99
埃玛菌素	7.1	2.3	71	8.7	1.7	87	10.5	1.8	105
双硫磷 (Abate)	9.1	1.3	91	9.1	1.3	91	9.8	0.2	98
氨磷磷	10.3	1.4	103	10.0	1.2	100	9.9	0.4	99
丙烯菊酯	10.8	1.5	108	9.6	2.2	96	9.2	1.2	92
莫能菌素	10.3	1.5	103	9.5	0.2	95	10.1	1.0	101

结论

本文开发了一种在多种肉类基质中, 根据日本肯定列表中要求的 MRL (0.01 ppm) 范围, 联合使用 SPE 和 HPLC 产品进行有挑战性的兽药多残留分析的全面解决方案。考查的肉类基质包括鸡肉、猪肉和牛肉。

采用两种方法, 使用 SPE 柱和 LC-MS/MS 对 45 种化合物进行分析。利用 Hydromatrix 硅藻土过滤消除浑浊。Bond Elut Plexa 柱净化样品基质得到了高重现性结果, 大多数化合物的 RSD 值均小于 1%。同时, 两种方法也表现出良好的回收率, 大多数化合物的回收率均在 75%-100% 范围内。

Pursuit C18 色谱柱使方法 (I) 中的三对同分异构体均达到基线分离, 表明 LC 的强大性能已经使 MS 检测能力显得捉襟见肘。Pursuit C18 色谱柱适用于兽药多残留分析。

本文开发的两种分析方法均满足或超过日本肯定列表设定的 10 ppb 检测限的要求。两种方法均表现出灵敏度高、结果可靠、成本效益好的特点。

参考文献

1. Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods. <http://www.ffcr.or.jp>.
2. Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis. SANCO/10232/2006, 24 March 2006. http://ec.europa.eu/food/plant/resources/qualcontrol_en.pdf

更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

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。

本资料中的信息、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, 2011
2011 年 9 月 27 日, 中国印刷
5990-8986CHCN



Agilent Technologies