

采用 LC/MS/MS 结合改进的 QuEChERS 方法对动物源食品中的 36 种兽药进行筛查

应用简报

食品检验和农业

作者

Jin-Lan Sun, Chang Liu, Yue Song

安捷伦科技（中国）有限公司，

上海，200131，中国

Jian-Zhong Li

安捷伦科技（中国）有限公司，

北京，100102，中国

摘要

本应用简报介绍了一种改进的 QuEChERS 方法，可对食品中的四类兽药——磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类和氟喹酮进行筛查。改进的 QuEChERS 方法包括一个萃取盐包（4 g Na_2SO_4 + 1 g NaCl）和一个分散 SPE 试剂盒（50 mg PSA、150 mg C18EC 和 900 mg Na_2SO_4 ）；萃取溶剂采用含 1% 乙酸的乙腈。采用该方法萃取这四类兽药均可获得满意的回收率。采用 LC/ESI/MS/MS，在动态多反应监测（DMRM）模式下对这些兽药进行定量分析。方法得到的检出限符合这四类兽药的各项 MRL 要求，并且平均回收率超过 50%，因此满足常规分析的需要。



Agilent Technologies

前言

QuEChERS 方法最初用于水果和蔬菜中的农药萃取 [1]。QuEChERS 操作分为两个步骤，萃取/分配和分散 SPE (d-SPE)。在第一步中，乙腈作为萃取溶剂；使用硫酸镁和盐促进分配/萃取。在第二步中，采用 d-SPE 去除萃取物中的基质干扰。d-SPE 的材料一般包括 N-丙基乙二胺 (PSA)、封端 C18 (C18EC) 和石墨化碳黑 (GCB)。

通过验证，QuEChERS 方法已被用于多种样品基质的处理。相比于水果和蔬菜，本文涉及到的动物源食品样品需要在 d-SPE 过程中采用 PSA 和 C18EC 去除这类样品中增加的蛋白质和脂类干扰。本文分析的兽药不需要使用 QuEChERS 缓冲盐，即原 AOAC 或 EN QuEChERS 方法系用于萃取 pH 不稳定农药的盐。本方法由于其高选择性和高灵敏度，在分析复杂食品基质中痕量级的目标农药时非常耐用和快速。

与固相萃取 (SPE) 相比，QuEChERS 方法会带来更多的基质干扰，因为它是一种“刚好够用”的样品制备技术。因此，需要高选择性的仪器，如使用带 DMRM 检测模式的 LC/MS/MS 对兽药进行简便准确的分析。

采用本文描述的 LC/MS/MS 方法，动物源食品中的 36 种兽药可以在 9 min 内实现有效的分离。本法联用快速 QuEChERS 萃取，减少了大量操作步骤和分析人员的时间，为常规工作中兽药的筛查提供了一个可靠的方法。

实验部分

试剂与标准品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或者分析纯。甲醇 (MeOH) 和乙腈 (ACN) 购自 Honeywell 公司 (马斯基根, 密歇根州, 美国)。甲酸 (FA) 和乙酸购自 Sigma-Aldrich 公司 (圣路易斯, 密苏里州, 美国)。

溶液和标准溶液

将 1 mL 甲酸加入 100 mL ACN 中，混匀，制备 1% 甲酸 ACN 溶液，每天新鲜配制。将 1 mL 乙酸加入 100 mL ACN 中，混匀，制备 1% 乙酸 ACN 溶液，每天新鲜配制。

标准溶液制备的浓度为 10 µg/mL (磺胺类和大环内酯类)、5 µg/mL (氯吡多) 和 1 µg/mL (喹诺酮类)。

仪器与材料

配备二极管阵列检测器的 Agilent 1260 HPLC (安捷伦科技有限公司, 加利福尼亚州, 美国)。

带有 AJST 电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统 (安捷伦科技有限公司, 加利福尼亚州, 美国)。

Agilent Bond Elut QuEChERS 硫酸镁 (部件号 5982-8082)

Agilent Bond Elut 氯化钠 (部件号 5982-5750)

Agilent Bond Elut PSA (部件号 5982-8382 或 5982-5753)

Agilent Bond Elut C18EC (部件号 5982-1382 或 5982-5752)

Agilent Bond Elut SAX (部件号 12213042)

Agilent Bond Elut NH2 (部件号 12213021)

药物残留分析用 Agilent Bond Elut d-SPE (部件号 5982-4956)

Agilent Bond Elut QuEChERS 不带缓冲盐萃取试剂盒 (部件号 5982-5550)

Agilent ZORBAX Solvent Saver HD Eclipse Plus C18, 3.0 × 100 mm, 1.8 µm 色谱柱 (部件号 959757-302)

仪器条件

HPLC 条件

色谱柱:	安捷伦 ZORBAX Solvent Saver HD Eclipse Plus C18, 3.0 × 100 mm, 1.8 μm		
流速:	0.5 mL/min		
柱温:	30 °C		
进样量:	5 μL		
流动相:	A: H ₂ O 0.1% 甲酸 B: ACN		
梯度程序:	时间	%A	%B
	0.0	90	10
	0.5	90	10
	1.0	80	20
	4.0	75	25
	8.0	40	60
	9.0	5	95
	12.0	5	95
	12.1	90	10
	15.0	90	10

MS 条件

极性:	正极
干燥气温度:	300 °C
干燥气流量:	7 L/min
雾化器压力:	50 psi
毛细管电压:	3000 V
鞘气温度:	350 °C
鞘气流量:	10 L/min
扫描模式:	DMRM

样品制备

样品匀浆

空白的猪肉、牛奶、蜂蜜和鸡蛋样品购自当地一家杂货店。样品洗净并剁碎（视需要），然后于 -20 °C 保存。

萃取

取 2 克 (±0.05 g) 各样品（视需要匀浆），置于 50 mL 离心管中。向样品中加入 200 μL 兽药标准溶液，使浓度分别为 10 ng/g（磺胺类和大环内酯类）、5 ng/g（氯吡多）和 1 ng/g（喹诺酮类）。加入 4 mL 水，涡旋样品 1 min。每管中加入 10 mL

1% 乙酸 ACN 溶液。盖上离心管并涡旋 1 min。将萃取盐（4 g Na₂SO₄, 1 g NaCl）加入各管中。样品管加盖并且剧烈振摇 1 min。在 4 °C 下以 5000 rpm 的速度离心 5 min，放置 30 min。

分散 SPE

取 6 mL 上层 ACN 相，转移至装有 50 mg PSA、150 mg C18EC 和 900 mg 无水 Na₂SO₄ 的 15 mL 试管中。将试管盖紧，涡旋 1 min，然后以 5000 rpm 的速度离心 5 min。将 4 mL 上层 ACN 相转移至另一试管中，40 °C 下氮气吹干。用 1 mL ACN/H₂O 溶液（2 : 8）复溶样品残渣，然后以 10000 rpm 的速度离心 10 min。将上层相溶液转移至自动进样瓶中。

结果与讨论

色谱条件优化

Agilent 1260 Infinity 二元液相色谱系统在 600 bar 的最高压力下可快速获得极高质量的数据结果。结合使用 Eclipse Plus C18 亚 2 μm 填料色谱柱，该分析系统可以改善分离度，缩短分析时间，提高检测灵敏度，这些改进对于兽药筛查都极为重要。Agilent 6460 MS/MS 系统具有高检测灵敏度，先进的六极杆碰撞池可以消除背景噪音和交叉污染，并且创新的动态多反应监测（DMRM）方法在 LC 分离过程中即可根据每个分析物的保留时间窗建立离子对列表。

基质标准溶液中 36 种兽药（磺胺类和大环内酯类 10 ng/g、氯吡多 5 ng/g 和喹诺酮类 1 ng/g）的 LC/MS/MS 分离状况见图 1。每种化合物的 MS 条件见表 1。

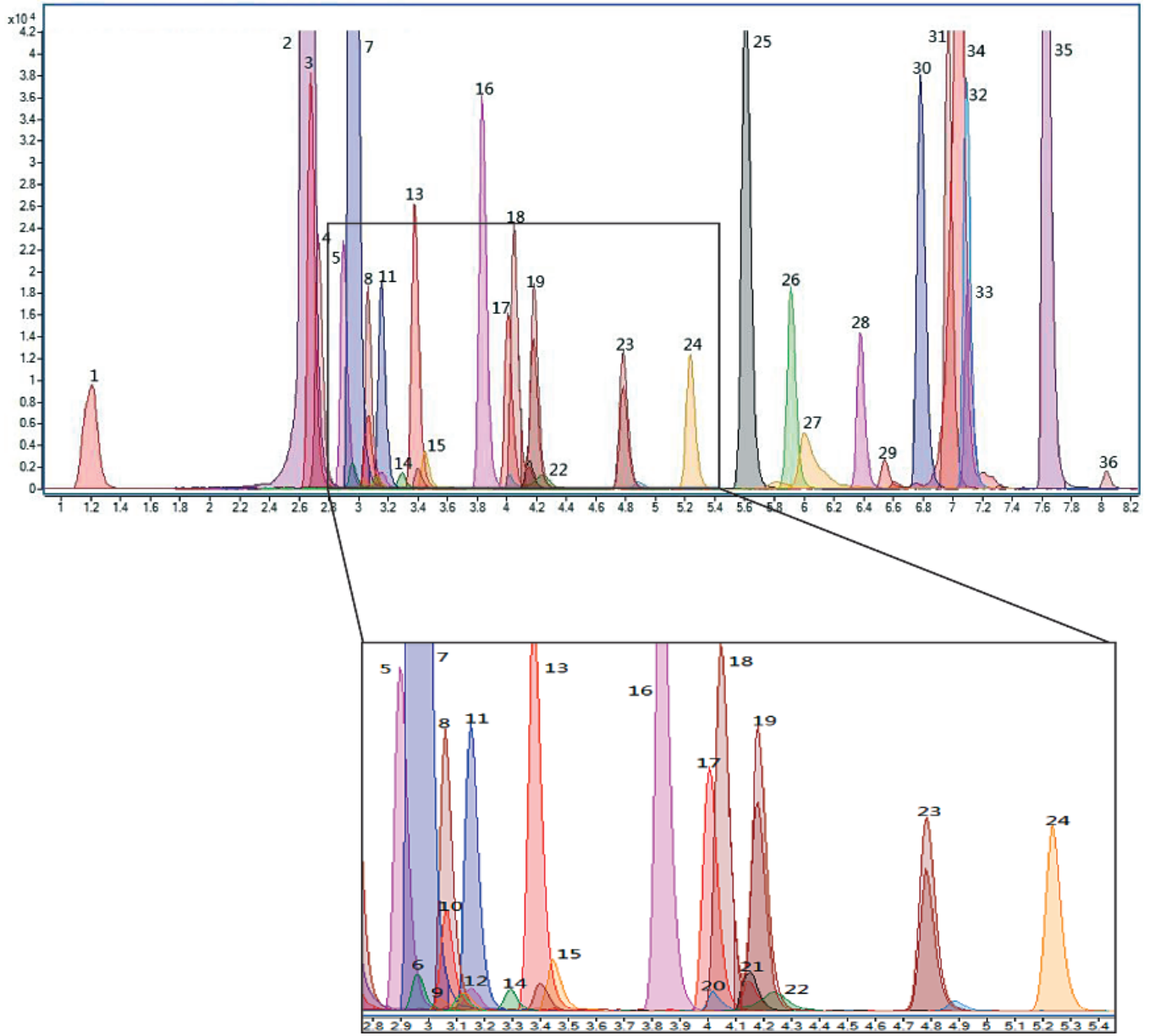


图 1. 兽药的 MRM 提取离子流图

表 1. MRM transitions 和 MS 操作参数

编号	保留时间	化合物名称	母离子	碎裂电压 (V)	定量离子	定量碰撞能量 (V)	定性离子	定性碰撞能量 (V)
1	1.24	磺胺脒	215.0	80	108.0	20	156.0	9
2	2.75	林可霉素	407.2	150	126.0	30	359.0	15
3	2.68	氯吡多	192.1	110	101	25	87	30
4	2.78	磺胺醋酰	215.0	70	92.0	19	156.0	3
5	2.97	磺胺嘧啶	251.1	100	108.0	22	156.0	10
6	3.1	马波沙星	363.0	120	320.1	9	345.1	17
7	3.11	甲氧苄啶	291.2	150	123.0	22	230.1	22
8	3.15	磺胺噻唑	256.0	100	108.0	21	156.0	9
9	3.23	诺氟沙星	320.0	140	276.1	13	302.1	17
10	3.26	氧氟沙星	362.0	140	261.1	26	318.1	14
11	3.27	磺胺吡啶	250.1	100	156.0	10	184.0	14
12	3.36	环丙沙星	332.1	130	231.0	42	314.1	18
13	3.52	磺胺磺胺甲噁啶	265.1	120	92.0	30	172.0	13
14	3.57	达氟沙星	358.2	140	255.0	46	340.1	22
15	3.76	恩氟沙星	360.0	130	316.2	18	342.1	18
16	4.05	磺胺二甲噁啶	279.1	120	124.0	18	186.0	14
17	4.2	磺胺甲二唑	271.0	100	108.0	22	156.0	10
18	4.27	磺胺甲氧嗪	281.1	125	108.0	22	156.0	14
19	4.38	磺胺对甲氧嘧啶	281.1	120	108.0	26	156.0	14
20	4.43	沙氟沙星	386.1	140	342.1	14	368.1	18
21	4.57	二氟沙星	400.0	140	356.1	18	382.1	18
22	4.91	螺旋霉素	843.5	200	101.0	46	174.0	42
23	5.07	磺胺间甲氧嘧啶	281.1	120	108.0	26	156.0	14
24	5.54	磺胺氯吡酮	285.0	100	108.0	22	156.0	10
25	6	磺胺多辛	311.1	120	92.0	30	156.0	14
26	6.21	磺胺甲噁唑	254.1	100	92.0	26	156.0	10
27	6.45	替米考星	869.6	250	174.0	50	696.4	45
28	6.65	磺胺异噁唑	268.1	100	113.0	10	156.0	10
29	6.83	奥索利酸	262.1	100	216.0	30	244.0	13
30	7.12	红霉素	734.5	170	158.1	30	576.3	14
31	7.21	磺胺苯酰	277.1	80	108.0	22	156.0	6
32	7.34	磺胺地索辛	311.1	125	108.0	26	156.0	17
33	7.36	磺胺噻沙啉	301.1	110	92.0	29	156.0	11
34	7.37	泰洛星	916.5	240	101.0	54	174.0	42
35	7.96	罗红霉素	837.5	170	158.0	38	679.4	18
36	8.28	氟甲喹	262.0	150	216.0	30	244.0	13

萃取和分散 SPE 参数的改进

在初始评价阶段，我们使用安捷伦 Bond Elut 无缓冲盐和用于药物残留的 Bond Elut QuEChERS d-SPE 试剂盒。在方法开发期间，我们发现有必要改进操作步骤。这些改进可以使回收率满足常规分析的要求，详情如下所述。这个方法已成功应用于如下样品基质的处理：肉类、蜂蜜、蛋类和奶类。

萃取步骤的优化

首先，药物残留的 d-SPE 过程（150 mg C18，900 mg MgSO₄）在方法 1、2、3 和 4（表 2）中使用，以评价萃取步骤改进的效果。

萃取盐包

QuEChERS 方法使用 MgSO₄ 去除样品中的水分。实验表明，MgSO₄ 的使用对许多化合物的回收率有负面影响，尤其是磺胺类和大环内酯类药物。用 Na₂SO₄ 替代 MgSO₄，并且离心后将样品静置 30 min，可以有效地吸收水分 [2]。结果表明，用 Na₂SO₄ 替代 MgSO₄，可以提高磺胺类和大环内酯类药物的回收率（表 2 中的方法 1 和方法 2）。

萃取溶剂

在萃取步骤中，还对水/乙腈的比例进行了评价。结果表明，萃取步骤中，采用比例为 1:2 的水/乙腈时，其回收率较比例为 1:1 时的好（表 2 中的方法 2 和方法 3）。

肉类基质的许多样品制备技术中常用酸去切断化合物-蛋白质的结合，这会直接影响其回收率。通常用于这种目的的酸是甲酸和乙酸 [3]。经比较表明，采用含 1% 乙酸的乙腈溶液处理样品的回收率大于采用含 1% 甲酸的乙腈溶液的处理效果。（表 2 中的方法 3 和方法 4）。

在四个方法的评价中，林可霉素的回收率都很低。推测是由于林可霉素具有强极性（log P = 0.56），限制了乙腈对它的萃取。

表 2. 萃取步骤的不同方法优化结果

方法	1	2	3	4
萃取盐	MgSO ₄ +NaCl	Na ₂ SO ₄ +NaCl	Na ₂ SO ₄ +NaCl	Na₂SO₄+NaCl
分散 SPE 混合物	C18EC+MgSO ₄	C18EC+Na ₂ SO ₄	C18EC+Na ₂ SO ₄	C18EC+Na₂SO₄
萃取溶剂	1% 甲酸乙腈溶液	1% 甲酸乙腈溶液	1% 甲酸乙腈溶液	1% 乙酸乙腈溶液
水	8 mL	8 mL	4 mL	4 mL
大环内酯类药物的平均回收率	22.95%	43.66%	45.12%	70.46%
磺胺类药物的平均回收率	10.86%	25.96%	33.25%	54.35%
喹诺酮类药物的平均回收率	86.79%	47.69%	62.69%	64.44%
氯吡多的平均回收率	55.12%	38.02%	49.89%	65.37%

d-SPE 的优化

当考察改进的 d-SPE 过程提高基质干扰去除的效果时，使用的盐包括了吸附基质中的蛋白质和脂类的 C18EC 吸附剂 [4]，和去除水分的无水 Na_2SO_4 。改进参数包括 PSA（方法 1 和 2）、SAX（方法 3）和 NH_2 （方法 4）。在 QuEChERS 方法中，PSA、 NH_2 和 SAX 因其阴离子交换特性已被用做 d-SPE 材料。它们与基质中的极性有机酸、糖类和脂肪酸等酸性干扰有强烈的相互作用。

表 3. 分散 SPE 参数优化结果

方法	1	2	3	4	5
萃取盐	$\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$	$\text{Na}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$
分散 SPE 混合物	50 mg PSA+ 150 mg C18EC+ 900 mg Na_2SO_4	100 mg PSA+ 150 mg C18EC+ 900 mg Na_2SO_4	50 mg SAX+ 150 mg C18EC+ 900 mg Na_2SO_4	100 mg NH_2 + 150 mg C18EC+ 900 mg Na_2SO_4	300 mg C18EC+ 900 mg Na_2SO_4
萃取溶剂	1% 乙酸乙腈溶液	1% 乙酸乙腈溶液	1% 乙酸乙腈溶液	1% 乙酸乙腈溶液	1% 乙酸乙腈溶液
水	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL
大环内酯类药物的平均回收率	54.57%	42.23%	59.87%	33.70%	66.10%
磺胺类药物的平均回收率	64.37%	63.27%	77.35%	51.71%	71.80%
喹诺酮类药物的平均回收率	73.88%	88.34%	76.82%	97.03%	84.66%
氯吡多的平均回收率	85.12%	100.11%	71.57%	70.27%	91.17%

表 3 的结果表明, 方法 1 和 5 实现了最好的回收率, 它们分别采用了添加或不添加 PSA 的 C18EC。我们的目的是可以找到一个适用于我们所有样品基质的 d-SPE 处理方法。因此, 在 d-SPE 过程中使用 PSA 非常重要, 因为它可以去除蜂蜜基质中普遍存在的有机酸和糖。最终选择的 d-SPE 参数为 50 mg PSA、150 mg C18EC 和 900 mg Na₂SO₄。

其它样品基质

除了肉类基质, 本方法也成功用于蛋类、奶类和蜂蜜基质样品的处理。这些基质样品的回收率良好, 满足常规兽药定量分析要求(附录 I)。

结论

采用改进的 QuEChERS 方法, 结合使用 LC/MS/MS, 可以成功实现省时的动物源基质样品中磺胺类、大环内酯类、喹诺酮类和氯吡多兽药的筛查。本文优化的最佳 QuEChERS 组成为: 4 g Na₂SO₄、1 g NaCl 作为萃取盐, 乙腈(1% 乙酸)作为萃取溶剂, d-SPE 过程中使用 50 mg PSA、150 mg C18EC 和 900 mg Na₂SO₄。改进的 QuEChERS 方法回收率满足常规兽药筛查的要求。

参考文献

1. M. Anastassiades, S. J. Lehotay, "Fast and Easy Multiresidue Method Employment Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce", *J. AOAC Int.*, 86, 412-431 (2003).
2. George Stubbings & Timothy Bigwood, "The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach", *Analytica Chimica Acta*, 637, 68-78 (2009).
3. Jerry Zweigenbaum, *et al.*, "使用三重串联四极杆液质联用仪和动态多反应监测功能(DMRM)进行复杂样品中农药多残留的快速定性定量分析, 采用安捷伦分析方法包和农药化合物参数数据库进行快速而高效的方法开发", 安捷伦科技有限公司, 应用简报, 版本号 5990-4253CHCN
4. Angelika Wilkowska & Marek Biziuk "Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology," *Food Chemistry*, 125, 803-812 (2011).

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。

订购信息

种类	每包数量/规格	内容物	部件号
QuEChERS 萃取管	50 包与试管	4 g Na ₂ SO ₄ , 1 g NaCl	5982-4950
分散 SPE	50-15 mL 试管	50 mg PSA, 150 mg C18EC, 900 mg Na ₂ SO ₄	5982-0032

附录 1. 采用改进的 QuEChERS 方法处理四种基质中兽药的回收率和 LOQ

化合物	保留时间 (min)	肉类的回收率 (猪肉) %	肉类的 LOQ (猪肉) (ng/g)	蛋类的 回收率 (%)	蛋类的 LOQ (ng/g)	奶类的 回收率 (%)	奶类的 LOQ (ng/g)	蜂蜜的 回收率 (%)	蜂蜜的 LOQ (ng/g)
林可霉素	2.7	12.61	0.012	10.77	0.013	12.74	0.018	7.18	0.025
螺旋霉素	4.9	75.31	0.813	45.57	0.293	74.46	0.476	54.72	0.431
替米考星	6.5	99.43	0.085	106.67	0.130	161.03	0.144	66.40	0.184
红霉素	7.1	26.10	0.027	39.76	0.017	36.67	0.013	25.60	0.030
泰洛星	7.4	68.29	0.083	47.08	0.126	69.18	0.524	63.89	0.145
罗红霉素	8.0	86.83	0.015	95.17	0.008	96.42	0.007	71.19	0.017
磺胺脒	2.7	23.96	0.678	43.95	0.719	42.16	0.339	46.59	0.127
磺胺醋酰	2.7	50.15	0.500	75.50	0.293	72.04	0.289	70.66	0.457
磺胺嘧啶	2.9	50.78	0.420	75.14	0.025	65.35	0.043	66.62	0.060
甲氧苄啶	3.0	83.71	0.026	83.22	0.009	83.53	0.013	82.72	0.014
磺胺噻唑	3.1	37.41	0.133	59.15	0.094	57.37	0.116	53.09	0.113
磺胺吡啶	3.2	46.22	0.037	70.50	0.029	63.07	0.035	64.50	0.024
磺胺磺胺甲噁啶	3.4	54.98	0.373	68.24	0.106	63.83	0.052	66.89	0.060
磺胺二甲噁啶	3.9	45.70	0.206	69.76	0.044	61.04	0.024	69.42	0.035
磺胺甲二唑	4.1	33.43	0.460	64.39	0.136	58.59	0.081	54.69	0.228
磺胺对甲氧嘧啶	4.1	41.96	0.025	71.82	0.010	59.34	0.022	60.48	0.022
磺胺甲氧嗪	4.2	40.36	0.039	75.35	0.066	70.40	0.123	68.04	0.097
磺胺间甲氧嘧啶	4.9	50.13	0.113	74.10	0.077	64.10	0.089	71.37	0.101
磺胺氯吡酮	5.3	48.26	0.124	71.89	0.107	63.97	0.108	66.32	0.042
磺胺地索辛	5.8	58.76	0.029	76.94	0.013	48.33	0.015	69.93	0.020
磺胺多辛	5.8	50.91	0.032	74.45	0.074	64.35	0.060	69.93	0.032
磺胺甲噁唑	6.0	45.82	0.135	76.80	0.072	69.80	0.050	71.15	0.077
磺胺异噁唑	6.5	51.23	0.154	72.43	0.056	66.84	0.051	68.77	0.160
磺胺苯酰	7.1	55.37	0.035	73.00	0.038	47.34	0.020	62.96	0.040
磺胺喹沙啉	7.3	51.06	0.073	73.89	0.035	51.43	0.030	69.25	0.093
氯吡多	2.7	75.69	0.056	78.79	0.039	78.26	0.037	81.13	0.020
诺氟沙星	3.2	66.37	1.587	72.83	3.846	55.25	2.703	71.68	0.469
氧氟沙星	3.2	57.10	0.102	46.76	0.114	49.68	0.074	67.19	0.079
环丙沙星	3.3	107.17	1.370	38.30	0.082	48.53	0.007	59.34	0.110
达氟沙星	3.6	56.26	0.053	55.68	0.031	30.23	0.641	79.00	0.526
恩氟沙星	3.7	60.82	0.179	54.61	0.071	49.82	0.143	76.53	0.102
沙氟沙星	4.4	56.04	1.087	93.79	0.588	57.33	0.227	72.75	0.667
二氟沙星	4.5	69.74	0.340	60.40	0.065	62.27	0.157	85.53	0.222
氟甲喹	6.8	79.34	1.299	68.91	0.244	47.87	1.389	84.74	0.121
奥索利酸	8.2	72.96	2.000	76.20	1.333	56.73	0.518	86.55	0.382
马波沙星	7.3	56.81	0.546	39.71	0.455	53.80	0.333	106.56	10.000

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、说明及指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012年5月4日，中国印刷
5991-0013CHCN

