

使用 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统对猪肉和鸡蛋中的兽药进行多类别残留分析

作者

Tony Zhang、
Dan-Hui Dorothy Yang
安捷伦科技公司

前言

主要成分为抗菌剂和激素的兽药已广泛用于疾病防治、促进生长和提高饲料转化率。动物源性产品中，能够引发过敏反应和抗生素耐药性的兽药残留已成为全球消费者在购买产品时关注的问题。为保护公共健康，US FDA 于 2015 年 6 月通过 *兽药饲料指令* 颁布了管控抗微生物药物使用的最终规定¹。欧盟法规请参见立法提案 2014/0257(COD)²，该法规将废止并替代指令 2001/82/EC。新法规旨在达成影响评估所确定的目标，并解决抗生素耐药性带来的公共健康风险问题。在中国，为设定动物源食品中兽药含量的最大限值³，农业部发布了第 235 号公告³。根据分析物和基质的不同，实现准确定量要求的范围为 ppt 至 ppb 级。基质的复杂性加上不同类别兽药的特性（如不同 pH 条件下的疏水性和稳定性），导致难以在一次运行中检测多个类别的分析物。常用标准方法可涵盖一个类别或一小组相似类别的兽药。为有效监测兽药并保护公共健康，迫切需要能够在一次运行中检测多个类别的分析物。

Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统十分符合这一要求。Ultivo 专门设计用于解决以环境和食品安全领域为代表的常规生产实验室所面临的许多挑战。该系统融入了多项革命性创新，体积远小于上一代三重四极杆系统，但性能丝毫不打折扣。双六极杆设计使系统拥有卓越的离子传输效率。硬件和电子元件方面的提升使极性切换速度更快。此外，Ultivo 减少了用户对系统维护的干预，使非专业质谱用户也能够通过 VacShield 真空盾和可拆卸检测器从容应对系统运行和维护。

本应用简报展示了一种分析筛查方法，能够将 Ultivo 三重四极杆液质系统与 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 联用，分析猪肉和鸡蛋中 27 个类别的 151 种兽药。我们还证明了 Agilent EMR-Lipid 样品前处理试剂盒具有广泛的应用范围。EMR-Lipid 能够有效去除动物源基质中的高脂成分，并提供优异的兽药回收率。

实验部分

标准品和试剂

兽药标准品购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH、WITEGA laboratorien Berlin-Adlershof GmbH、Toronto Research Chemicals (TRC) 或 AccuStandard, Inc。表 1 列出了该溶液中含有的 151 种化合物。在流动相配制中使用超纯水 (> 18.2 MΩ, Milli-Q 水系统)、乙腈 (LC-MS 级, Fluka) 和甲酸 (98% 左右, 质谱用, Fluka)。在样品前处理中使用乙腈 (HPLC 级, Sigma-Aldrich)、二甲基亚砜 (DMSO, > 99.9%, Aldrich)、乙酸铵 (≥ 98%, Sigma-Aldrich) 和甲酸 (98% 左右, HPLC 级, Fluka)。

表 1. 分析的 151 种兽药

分类	名称	CAS	
β-激动剂	西马特罗	54239-37-1	
	克仑特罗	21898-19-1	
	氯丙那林	3811-25-4	
	喷布洛尔	38363-40-5	
	普奈洛尔	318-98-9	
	莱克多巴胺	90274-24-1	
	沙丁胺醇	18559-94-9	
	特布他林	23031-32-5	
	妥洛特罗	56776-01-3	
	雄激素	醋酸甲孕酮	595-33-5
甲睾酮		58-18-4	
诺龙/19-去甲睾酮		434-22-0	
睾酮		58-22-0	
苯并咪唑类	2-氨基氟苯达唑	82050-13-3	
	5-羟基甲苯咪唑	60254-95-7	
	阿苯达唑	54965-21-8	
	阿苯达唑砷	75184-71-3	
	阿苯达唑亚砷	54029-12-8	
	阿苯达唑-2-氨基砷	80983-34-2	
	坎苯达唑	26097-80-3	
	苯硫氨酯	58306-30-2	
	芬苯达唑	43210-67-9	
	氟苯咪唑	31430-15-6	
	甲苯咪唑	31431-39-7	
	甲苯达唑胺	52329-60-9	
	奥吩达唑	53716-50-0	
	奥芬那唑砷/芬苯达唑砷	54029-20-8	
	奥苯达唑	20559-55-1	
	噻菌灵	148-79-8	
	5-羟基噻菌灵	948-71-0	
	三氯苯达唑	68786-66-3	
	氯霉素类	氯霉素	56-75-7
		氟甲砷霉素	73231-34-2
甲砷霉素		15318-45-3	

分类	名称	CAS
糖皮质激素类	倍氯米松	4419-39-0
	倍他米松	378-44-9
	地塞米松	50-02-2
	氟米松	2135-17-3
	氢化可的松	50-23-7
	甲基泼尼松	83-43-2
	泼尼松龙	50-24-8
	泼尼松	53-03-2
	去炎松	124-94-7
	曲安奈德	76-25-5
大环内酯类	乙酰异戊酰泰乐菌素/泰乐菌素	63409-12-1
	红霉素	59319-72-1
	吉他霉素/柱晶白霉素	1392-21-8
	竹桃霉素	7060-74-4
	替米考星	108050-54-0
硝基咪唑类	泰乐菌素	74610-55-2
	二甲硝咪唑	551-92-8
	羟基迪美唑 (HMMNI)	936-05-0
	甲硝唑	443-48-1
肽段	羟基甲硝唑	4812-40-2
	罗硝唑	7681-76-7
	维吉尼霉素 M1	211411-53-0
喹诺酮类	环丙沙星	85721-33-1
	达氟沙星	112398-08-0
	二氟沙星	98106-17-3
	依诺沙星	74011-58-8
	恩诺沙星	93106-60-6
	氟罗沙星	79660-72-3
	氟甲喹	42835-25-6
	洛美沙星	98079-51-7
	萘啶酸	389-08-2
	诺氟沙星	70458-96-7
	氧氟沙星	82419-36-1
	奥比沙星	113617-63-3
	奥索利酸	14698-29-4
	培氟沙星	70458-92-3
	沙氟沙星	98105-99-8
	司帕沙星	110871-86-8

分类	名称	CAS
磺胺类	磺胺苯甲酰胺	127-71-9
	磺胺醋酰	144-80-9
	磺胺氯吡嗪	80-32-0
	磺胺氯吡嗪	102-65-8
	磺胺嘧啶	68-35-9
	磺胺地托辛	122-11-2
	磺胺多辛	2447-57-6
	磺胺胍	57-67-0
	磺胺甲噁啉	127-79-7
	磺胺对甲氧嘧啶	651-06-9
	磺胺二甲嘧啶	57-68-1
	磺胺甲二唑	144-82-1
	磺胺甲恶唑	723-46-6
	磺胺甲氧吡嗪	80-35-3
	磺胺间甲氧嘧啶	1220-83-3
	磺胺二甲唑	729-99-7
	磺胺苯吡唑	526-08-9
	磺胺吡啶	144-83-2
	磺胺噻恶啉	59-40-5
	磺胺噻唑	72-14-0
磺胺素噁啉	515-64-0	
磺胺异恶唑	127-69-5	
甲氧苄啶	738-70-5	
四环素类	金霉素	57-62-5
	多西环素	564-25-0
	四环素	60-54-8
三苯甲烷类	结晶紫/碱性紫 3	548-62-9
	隐性孔雀石绿	129-73-7
	孔雀石绿	569-64-2
二萜	沃尼妙林	133868-46-9
吩噻嗪类	氯丙嗪	50-53-3
	塞拉嗪	7361-61-7
喹啉类	喹乙醇	23696-28-8
抗吸虫药	硝磺酚腈	1689-89-0
抗球虫药	氯羟吡啶	2971-90-6
	地克珠利	101831-37-2
	乙氧酰胺苯甲酯	59-06-3
	卤夫酮	55837-20-2
	尼卡巴嗪	330-95-0
	氯苯胍	25875-50-7
	妥曲珠利	69004-03-1
	妥曲珠利磺	69004-04-2
	妥曲珠利亚磺	69004-15-5
球痢灵	148-01-6	

分类	名称	CAS
抗病毒药物	金刚烷胺	768-94-5
农药	克百威	1563-66-2
	杀虫脒	6164-98-3
	蝇毒磷	56-72-4
	敌敌畏	62-73-7
	倍硫磷亚砷	3761-41-9
	马拉硫磷	121-75-5
	五氯酚 (PCP)	131-52-2
	胺丙畏	31218-83-4
	敌百虫	52-68-6
林可胺类	林可霉素	7179-49-9
氨苯砷类	氨苯砷	80-08-0
	N-乙酰氨苯砷	565-20-8
有机酸类	十七氟辛烷磺酸 (PFOS)	1763-23-1
	全氟辛酸 (PFOA)	335-67-1
硝基类	4,6-二硝基邻甲酚 (DNOC)	534-52-1
	硝呋烯腙	2315-20-0
	复硝酚钠/4-硝基苯酚	100-02-7/63317-67-9
镇静剂	阿扎哌醇	2804-05-9
	阿扎哌隆	1649-18-9
非甾体抗炎药 (NSAID)	4-乙酰氨基安替比林	83-15-8
	4-甲酰氨基安替比林	1672-58-8
	氟灭酸	530-78-9
	氟尼辛	42461-84-7
	吲哚洛芬	31842-01-0
	酮洛芬	22071-15-4
	甲芬那酸	61-68-7
	美洛昔康	71125-38-7
	吡罗昔康	36322-90-4
	舒林酸	38194-50-2
	替诺昔康	59804-37-4
	托美汀	26171-23-3
驱虫剂	左旋咪唑	14769-73-4
喹乙醇	3-甲基喹啉啉-2-羧酸	74003-63-7
	喹啉-2-羧酸	879-65-2

样品前处理

1. 称取 5 ± 0.05 g 均质样品置于 50 mL 离心管中（加入标准品作为校准标样和质量控制样品）
2. 加入 1.0 mL 水和两粒陶瓷均质子（部件号 5982-9313），然后在机械振荡器中混合样品（分析鸡蛋时请跳过该步骤）
3. 加入 10 mL 5% 甲酸的乙腈溶液，手动剧烈振摇使样品分散，然后用机械振荡器混合 5 分钟 (2000 rpm)
4. 以 4000 rpm 的转速离心 5 分钟
5. **EMR 活化：**将 5.0 mL 5 mM 乙酸铵缓冲液（分析鸡蛋时加入 3.0 mL）加入 15 mL EMR-Lipid dSPE 增强型脂质去除净化管（部件号 5982-1010）中，然后立即涡旋混合至少 30–60 秒 (2000 rpm)。确保所有 EMR 吸附剂均已完全水合（形成乳浊液）
6. 转移 5.0 mL（分析鸡蛋时转移 7.0 mL）上清液至完成活化的 EMR-Lipid dSPE 增强型脂质去除净化管中
7. 立即涡旋混合 2 分钟 (2000 rpm)
8. 以 4000 rpm 的转速离心 5 分钟
9. 向新 50 mL 离心管中加入两粒陶瓷均质子（部件号 5982-9313），将所有提取物倒入该离心管并加入 Polish 除脂萃取盐包（部件号 5982-0102）内容物，然后剧烈振摇
10. 立即涡旋混合 2 分钟 (2000 rpm)
11. 以 4000 rpm 的转速离心 5 分钟
12. 将 2.0 mL 上层液体转移至玻璃试管中，加入 50.0 μ L DMSO，然后氮吹浓缩定容（40 $^{\circ}$ C，约 50 μ L）
13. 用 0.950 mL 15% 乙腈水溶液复溶，然后涡旋混合 1 分钟 (2000 rpm)
14. 将溶液转移至 2.0 mL 离心管，在 10000 rpm 下离心 5 分钟，然后将上清液转移至进样样瓶，供 LC/MS 分析使用

仪器参数

表 2. 液相色谱参数

液相色谱参数			
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse plus C18, 3.0 \times 150 mm, 1.8 μ m (部件号 959759-302)		
进样量	15 μ L		
柱温	40 $^{\circ}$ C		
流速	0.5 mL/min		
流动相	A) 0.2% 甲酸水溶液 B) 0.2% 甲酸乙腈溶液		
梯度	时间 (min)	%A	%B
	0	98	2
	0.5	98	2
	1.8	85	15
	3.5	80	20
	6	75	25
	7	70	30
	11	65	35
	16	0	100
	26	0	100
运行时间	26 分钟		
后运行时间	4 分钟		
进样针清洗	清洗模式：清洗口 针清洗溶剂：95% 乙腈/水 针清洗时间：至少 15 秒		
质谱参数			
电离模式	正离子/负离子		
扫描类型	动态 MRM		
干燥气温度	200 $^{\circ}$ C		
干燥气流速	11 L/min		
雾化器	35 psi		
鞘气温度	275 $^{\circ}$ C		
鞘气流速	11 L/min		
毛细管电压	3000 (正离子)；3500 (负离子)		
喷嘴电压	200 (正离子)；1500 (负离子)		

结果与讨论

检测灵敏度

对一组九种浓度基质加标校准标样（0.1 ng/g、0.2 ng/g、0.5 ng/g、1.0 ng/g、2.0 ng/g、5.0 ng/g、10 ng/g、20 ng/g 和 40 ng/g）进行连续分析。采用线性拟合生成每种分析物的校准曲线，其中猪肉样品中校准曲线 R^2 值 ≥ 0.990 的化合物占 87%，而鸡蛋样品中 R^2 值 ≥ 0.990 的占 89%。

图 1 所示为实验获得的阿苯达唑、倍氯米松、氯霉素、四环素、竹桃霉素、依诺沙星、磺胺氯吡嗪和克仑特罗八个不同化学类别的八种化合物的校准曲线。

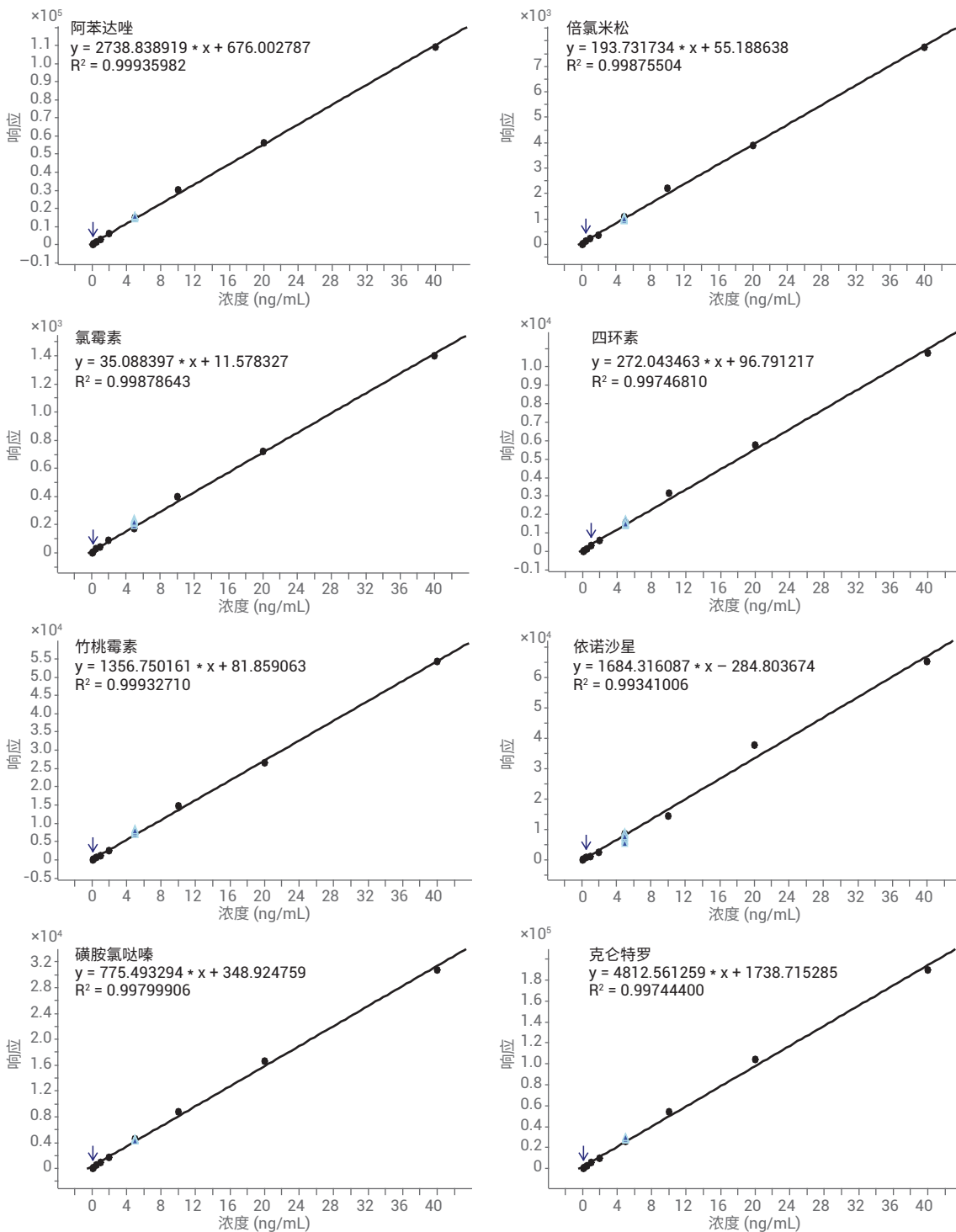


图 1. 鸡蛋中的阿苯达唑 (A)、倍氯米松 (B)、氯霉素 (C)、四环素 (D)、竹桃霉素 (E)、依诺沙星 (F)、磺胺氯吡嗪 (G) 和克仑特罗 (H) 在 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统上获得的校准曲线

Ultivo 表现出极高的分析灵敏度。多数化合物都可以在基质加标浓度为 2 ng/g 的条件下检出。例如，鸡蛋样品中有 93% 的化合物能够以信噪比 (S/N) 大于 10 的水平检出，对定性离子和定量离子均是如此。图 2 是加标浓度为 2 ng/g 的鸡蛋样品的样品色谱图。

图 3 所示为不同基质浓度条件下定性离子和定量离子 S/N > 10 的化合物所占的比例。

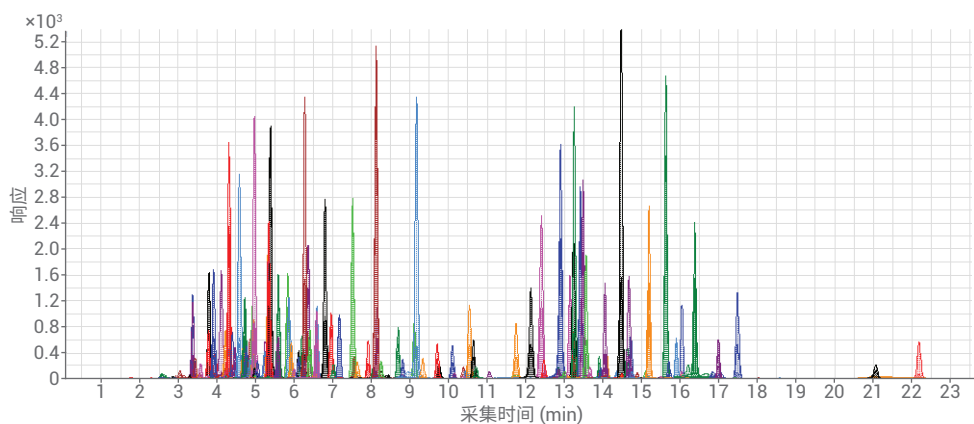


图 2. 以 2 ng/g 的浓度添加 151 种兽药的鸡蛋样品的示例色谱图

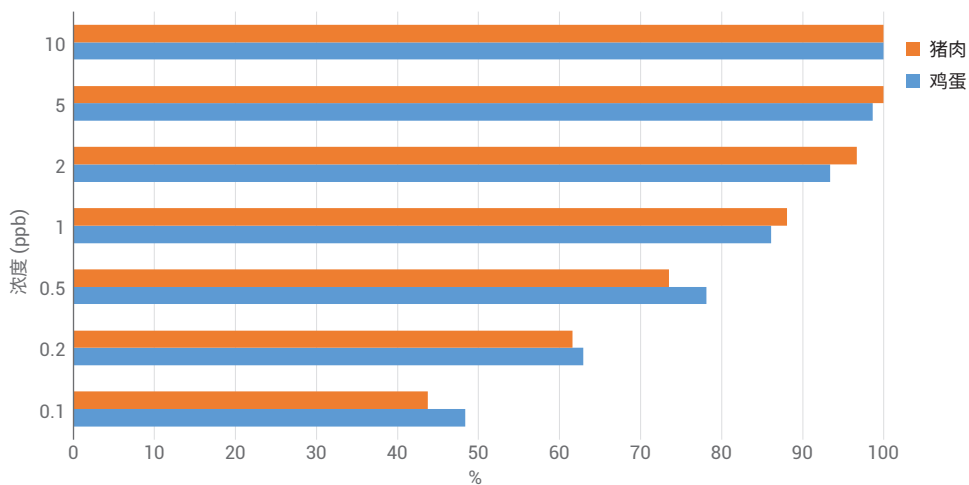
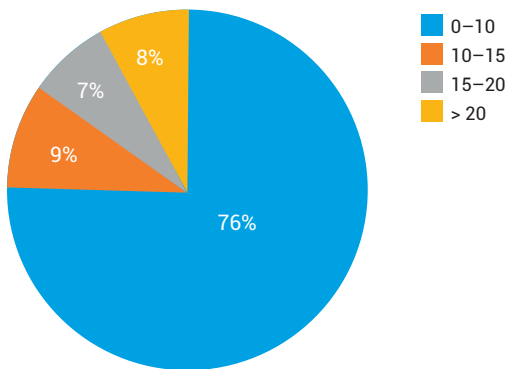


图 3. 不同基质浓度条件下定性离子和定量离子 S/N > 10 的化合物所占的比例

方法精度

通过七次重复测定对方法在加标浓度 5 ng/g 条件下的重现性进行研究。图 4 所示为猪肉和鸡蛋样品加标浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时分布比例的 %RSD ($n = 7$)。结果表明 %RSD 小于 20% 的化合物占 92%，重现性良好。

5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标浓度下鸡蛋样品的 %RSD



5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标浓度下猪肉样品的 %RSD

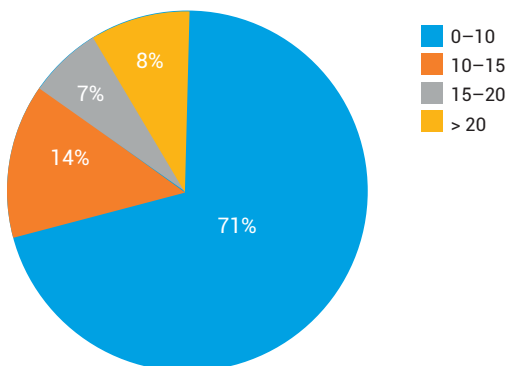


图 4. 猪肉和鸡蛋样品加标浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时的 %RSD 分布 ($n = 7$)

结论

本研究开发了一种能够分析猪肉和鸡蛋中 27 个类别的 151 种兽药的便捷分析方法。分析灵敏度、准确度和精度结果证明，Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用是兽药分析的可行解决方案。

参考文献

1. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 21 CFR Parts 514 and 558, FDA-2010-N-0155
2. Proposal for a regulation of the European parliament and of the council on veterinary medicinal products, European Commission, 2014/0257 (COD)
3. Maximum residue limits in animal derived foods, Announcement No. 235, Ministry of Agriculture, China, **2002**

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017年12月19日，中国出版
5991-8746ZHCN