

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定鸡肉和牛肉中五种常用抗球虫药

李 丹, 孙 雷, 毕言锋, 徐 倩, 王鹤佳, 徐士新

(中国兽医药品监察所 国家兽药残留基准实验室, 北京 100081)

[收稿日期] 2012 - 12 - 10 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2013) 04 - 0038 - 04 [中图分类号] S859. 84

[摘 要] 建立了鸡肉和牛肉中五种常用抗球虫药物残留检测的超高效液相色谱 - 串联质谱方法 (UPLC - MS/MS)。样品用乙腈提取, 吹干后用 50% 甲醇溶解, 正己烷去脂后, 供液相色谱 - 串联质谱法分析。液相色谱条件为: 色谱柱为 Waters BEH C18 柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为乙腈 - 20 mmol/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱; 柱温 30 °C; 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL。质谱条件为: 电喷雾离子源 (ESI⁺), 多反应监测 (MRM) 方式采集。结果表明: 在 10 ~ 500 μg/L 的系列浓度范围内, 五种抗球虫药物的相关系数 $R^2 > 0.990$; 方法检测限为 5 μg/kg, 定量限为 10 μg/kg; 从 100、200、500 μg/kg 三个添加浓度检测结果可以看出, 方法的平均回收率为 75.4% ~ 109%, 批内、批间 RSD 均 < 15%。本方法简便快捷、定性准确, 可以满足兽药残留分析的要求。

[关键词] 抗球虫药物; 鸡肉; 牛肉; 超高效液相色谱 - 串联质谱法

Determination of Five Coccidiostats in Chicken and Beef by UPLC - MS/MS

LI Dan, SUN Lei, BI Yan - feng, XU Qian, WANG He - jia, XU Shi - xin

(National Reference Laboratory of Veterinary Drugs Residues, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: A UPLC - MS/MS method was established for the determination of five coccidiostats in chicken and beef tissues. The samples were extracted by acetonitril, dissolved by 50% methanol after evaporation, degreasing by hexane and determined on UPLC - MS/MS. UPLC condition: the chromatography column was Waters BEH C18 column of 50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm; mobile phase was acetonitril and water (containing 20 mmol/L ammonium acetate); column temperature was 30 °C; flow rate was 0.3 mL/min; injection volume was 10 μL. Mass spectrometry condition: ESI⁺ and MRM mode. The calibration curves were good linear between the peak areas and concentrations from 10 ~ 500 μg/L, the correlation coefficient $R^2 > 0.990$. The detection limit of the method was 5 μg/kg, and the limit of quantification was 10 μg/kg. The average recoveries from spiked chicken and beef at the three concentrations of 100, 200 and 500 μg/kg ranged from 75.4% ~ 109% ($n = 6$), and intra - and inter - batch variation coefficients were less than 15%. The method was simple and rapid, and it was satisfied to detect veterinary drug residues in animal derived food.

Key words: coccidiostat; chicken; beef; UPLC - MS/MS

球虫病是由一种单细胞原虫进入肠道而引起的一类流行病, 在畜禽球虫病中, 以鸡、兔、牛和羊

的球虫病危害最大^[1]。氯苯胍、常山酮、氯羟吡啶、氨丙啉均属于化学合成类抗球虫药物 (结构式见图

1),乙氧酰胺苯甲酯属于抗球虫药增效剂,与多种抗球虫药联合使用,这五种药物对于多种球虫病均有良好的治疗效果。由于不规范使用,抗球虫药若长期、持续添加在饲料中,极易造成药物在肉及蛋品中出现残留,危害人体健康。我国农业部 235 号公告中严格规定此五种抗球虫药在牛、鸡肌肉中的最高残留限量范围为 10~500 μg/kg。文献中,采用 HPLC 及 LC-MS/MS 测定动物性组织中氨丙啉、常山酮、氯苯胍等单一药物的报道较多,但对动物性组织中氨丙啉、氯羟吡啶、乙氧酰胺苯甲酯、常山酮和氯苯胍五种药物同时检测的残留检测方法报道文献较少。本研究拟采用 LC-MS/MS 方法建立鸡、牛肌肉中氨丙啉、氯羟吡啶、乙氧酰胺苯甲酯、常山酮和氯苯胍五种药物的多残留检测方法,以为该类药物的残留监控提供科学依据。

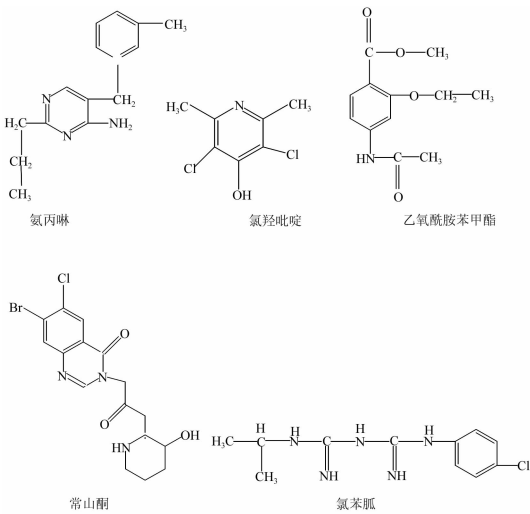


图 1 氨丙啉、氯羟吡啶、乙氧酰胺苯甲酯、常山酮和氯苯胍的化学结构式

1 材料与方法

1.1 仪器 ACQUITY UPLC-Quattro Premier XE™ 质谱联用仪, Waters 公司; AE260 电子天平, Mettler Toledo 公司; Biofuge Strators 高速冷冻离心机, 贺利氏公司; Organomation Associates 氮吹仪, Jnc 公司; SIR4 漩涡混合器, IKA 公司。

1.2 试剂与材料 对照品:氨丙啉、氯羟吡啶、乙氧酰胺苯甲酯、常山酮和氯苯胍,纯度均大于 95.0%, Dr. Ehrenstorfer EmbH 公司;乙腈、甲醇为色谱纯, Fisher 公司;乙酸铵为分析纯;正己烷为分析纯;所用水为超纯水。

1.3 标准储备液和工作液的配制 称取氨丙啉、氯羟吡啶、乙氧酰胺苯甲酯、常山酮和氯苯胍对照品适量,精密称定,分别置于 10 mL 棕色量瓶中,甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液;分别精密量取五种标准储备液适量,置同一 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇逐步稀释成适宜浓度的混合标准工作液。

1.4 标准曲线绘制 精密量取适量混合标准工作液,用 50% 甲醇稀释成浓度均为 10、50、100、200、500 ng/mL 的系列混合对照溶液,量取 5 种浓度的混合对照溶液各 1.0 mL,分别用于溶解预先按提取净化吹干后的残留物,按照样品前处理方法处理后作为基质匹配系列混合对照溶液,从低浓度到高浓度测定,每一浓度进样 3 针,以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.5 UPLC-MS/MS 分析条件 色谱条件:色谱柱为 BEH C18 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 相为乙腈, B 相为 20 mmol/L 乙酸铵水溶液,梯度洗脱:0~4 min, 5% A 线性变化至 100% A; 4~5 min, 100% A 线性变化至 5% A; 5~6.5 min, 维持 5% A。流速 0.3 mL/min, 柱温 30℃, 进样量 10 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI⁺),毛细管电压为 3.2 kV,萃取电压为 3V, RF 透镜电压为 1V, 源温 110℃, 脱溶剂温度 350℃, 脱溶剂气速 650 L/h, 锥孔反吹气速 50 L/h。多反应监测各药物离子对及对应的锥孔电压、碰撞能量见表 1。

表 1 5 种药物的定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

药物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 /V	碰撞 能量/eV
氨丙啉	243.4>149.9	243.4>149.9	20	15
	243.4>121.8			25
氯羟吡啶	192.0>100.9	192.0>100.9	45	25
	192.0>86.8			30
乙氧酰胺苯甲酯	238.3>135.8	238.3>135.8	15	35
	238.3>163.9			25
常山酮	416.3>137.9	416.3>137.9	25	30
	416.3>120.9			40
氯苯胍	334.3>154.8	334.3>154.8	30	25
	334.3>137.8			30

1.6 样品前处理 准确称取绞碎后的(2±0.05)g 试料,置于 50 mL 离心管内,加乙腈 8 mL,涡旋混合

30 s, 中速振荡 5 min, 8000 r/min 离心 5 min 后, 上清液置于另一 50 mL 离心管内, 残渣重复提取一次。合并两次上清液, 混匀后取出 8 mL 置于玻璃管中, 于 50 ℃ 水浴中氮气吹干。残余物用 50% 甲醇水溶液 1.0 mL 溶解, 再加 50% 甲醇水溶液饱和的正己烷 1.0 mL, 涡旋混合 30 s, 静置分层后, 转移下层溶液至 1.5 mL 塑料离心管内, 于 -4 ℃ 下 13000 r/min 离心 10 min 后, 吸适量下层溶液过 0.2 μm 滤膜后, 供液相色谱-串联质谱仪分析。

1.7 方法学考察

1.7.1 方法灵敏度确定 将适量混合标准溶液加入到空白组织中, 经上述方法进行前处理后, 用 UPLC-MS/MS 检测, 观察药物特征离子质量色谱峰信噪比(S/N) 和对应药物浓度, S/N > 3, 定为方法的检测限; S/N > 10, 定为方法的定量限。

1.7.2 准确度和精密度的测定 采用标准添加法, 在空白组织中添加低、中、高三个不同浓度混合组分进行回收率试验; 各浓度进行 6 个样品平行试验, 重复 3 次, 求批内、批间 RSD。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择 本研究通过优化流动相改善五种药物的分离效果。分别试验了甲醇-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、0.1% 甲酸乙腈-0.1% 甲酸水溶液、乙腈-20 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相, 结果表明, 含有乙腈的流动相均优于含有甲醇的流动相, 流动相中加入乙酸铵后,

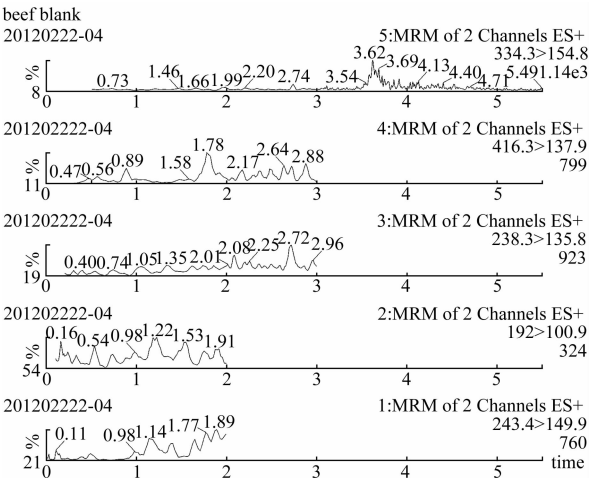
分离效果更好。因此, 本方法以乙腈-20 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相进行梯度洗脱。

2.2 前处理条件的优化 氨丙啉、氯羟吡啶、乙氧酰胺苯甲酯、常山酮和氯苯胍五种抗球虫药均属于弱碱性化合物, 易溶于酸性水溶液和极性有机溶剂。已报道的提取用溶剂有乙酸乙酯^[2]、磷酸盐缓冲液^[3]、乙腈等; 用液液萃取、固相萃取等方法净化, 用到的固相萃取柱有 HLB 柱^[4-5]、碱性氧化铝柱^[6-7]等。经过优化处理, 本方法采用乙腈进行提取, 再用正己烷去除脂肪等杂质, 使得这五种药物获得较高的回收率, 且前处理过程简单, 省去了采用固相萃取柱净化的步骤。

2.3 方法线性 5 种药物混合标准工作液在 10~500 μg/L 的系列基质校准标准溶液范围内, 呈良好线性关系, 标准曲线及相关系数见表 2。

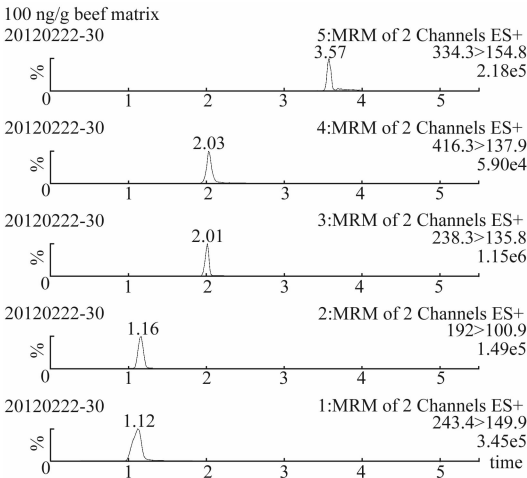
表 2 5 种药物的标准曲线及相关系数			
药物	浓度范围 /(μg·L ⁻¹)	线性方程	相关系数 (R ²)
氨丙啉	10~500	Y=934.5X+14771	0.9989
氯羟吡啶	10~500	Y=68.236X+7119.1	0.9903
乙氧酰胺苯甲酯	10~500	Y=790.21X+24914	0.9916
常山酮	10~500	Y=141.02X+2937.4	0.9958
氯苯胍	10~500	Y=498.9X+15393	0.9938

2.4 方法灵敏度、回收率和精密度 采用空白组织中添加目标化合物的方法, 得出 5 种药物在样品中的检测限均为 5 μg/kg, 定量限均为 10 μg/kg。



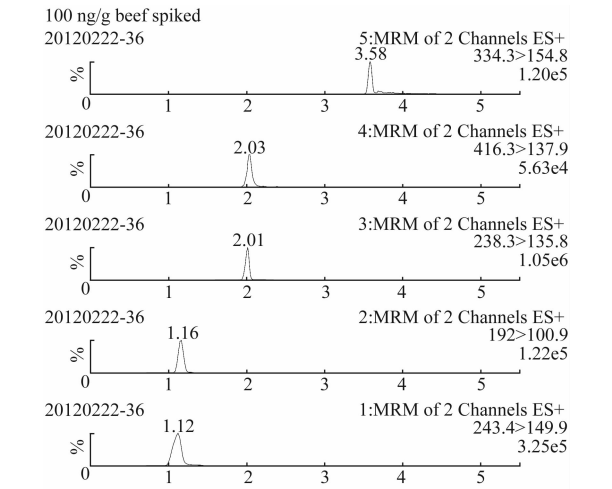
1. 氨丙啉; 2. 氯羟吡啶; 3. 乙氧酰胺苯甲酯; 4. 常山酮; 5. 氯苯胍

图 2 空白牛肌肉特征离子质量色谱图



1. 氨丙啉; 2. 氯羟吡啶; 3. 乙氧酰胺苯甲酯; 4. 常山酮; 5. 氯苯胍

图 3 100 μg/kg 空白牛肌肉基质匹配试液中五种药物的特征离子质量色谱图



1. 氨丙啉;2. 氯羟吡啶;3. 乙氧酰胺苯甲酯;4. 常山酮;5. 氯苯胍

图4 100 μg/kg 空白牛肌肉添加试液中5种药物的特征离子质量色谱图

表3 空白牛肉、鸡肉中添加5种抗球虫药的回收率和精密度实验结果									
药物	添加浓度 /(μg·kg ⁻¹)	回收率/%		批内 RSD /% (n=6)		批间 RSD /%		检测限 /(μg·kg ⁻¹)	定量限 /(μg·kg ⁻¹)
氨丙啉	100	86.9	99.9	6.18	6.29	9.85	9.74	5	10
	200	86.7	99.5	6.08	3.14	10.2	6.28		
	500	97.9	78.2	9.50	4.33	13.4	6.79		
氯羟吡啶	100	84.1	102	6.00	5.59	8.08	12.0	5	10
	200	107	95.8	6.66	8.47	9.52	10.7		
	500	93.6	80.1	7.74	3.25	10.2	7.26		
乙氧酰胺 苯甲酯	100	91.4	99.2	4.80	8.07	7.86	10.8	5	10
	200	107	109	7.43	7.12	11.2	9.14		
	500	103	90.2	4.83	3.44	5.96	6.07		
常山酮	100	80.0	81.2	8.86	5.98	7.43	7.88	5	10
	200	96.5	81.6	8.29	5.15	8.82	8.15		
	500	83.7	80.6	4.97	8.02	11.2	11.3		
氯苯胍	100	78.0	89.2	6.93	7.21	10.9	9.28	5	10
	200	86.4	108	3.81	5.84	9.27	8.63		
	500	85.2	75.4	7.38	8.31	11.3	12.4		

参考文献:

[1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 283.

[2] 曹莹, 黄土新, 沈富林, 等. 高效液相色谱法测定鸡肝组织中的氢溴酸常山酮残留[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(4): 11-13.

[3] 李存, 江潇潇, 吴银良, 等. 液相色谱串联质谱法测定牛组织中氨丙啉残留量[J]. 分析化学, 2011, 39(4): 576-579.

[4] 刘勇军, 吴银良, 姜艳彬. 高效液相色谱法测定鸡组织与鸡蛋中氯苯胍的残留量[J]. 色谱, 2010, 28(9): 905-907.

[5] 吴秋侠, 李引乾, 曹玲玲, 等. 离子对反相高效液相色谱法测定盐酸氨丙啉在鸡肉中残留方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(3): 38-39.

[6] Fang B H, Su Y J, Ding H Z, et al. Determination of Residual Clopidol in Chicken Muscle by Capillary Gas Chromatography - Negative Chemical Ionization - Mass Spectrometry[J]. Analytical Sciences, 2009, 25(10): 1203.

[7] Liu X G, Su Y J, Fang B H, et al. Determination of clodipol residues in chicken muscle by gas chromatography - mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2009, 27(1): 86-90.

(责任编辑: 侯向辉)

牛肌肉基质空白色谱图见图2, 100 μg/kg 空白牛肉基质匹配试液和 100 μg/kg 空白牛肉添加试液中5种药物的特征离子质量色谱图见图3、图4。

在空白牛、鸡肌肉中添加 100、200、500 μg/kg 三个不同浓度的5种混合组分进行回收率试验, 结果汇总见表3。可以看出, 5种药物在空白牛、鸡肌肉中的平均添加回收率为 75.4% ~ 109%, 批内批间相对标准偏差均小于 15%。

3 结论

本研究利用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定鸡肉和牛肉中5种常用抗球虫药物, 方法线性、灵敏度、回收率和精密度等参数均能满足兽药残留分析方面的要求。