

气相色谱-离子阱二级质谱法测定猪肉中的氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松残留

丁罡斗^{1,2}, 许秀丽¹, 仲维科¹, 贺银凤², 李翔¹, 张 垚¹, 孙毅之¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025 ; 2. 内蒙古农业大学食品科学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要 建立了固相萃取-气相色谱-离子阱二级质谱(GC-MS/MS)测定猪肉中氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松残留量的分析方法。待测药物用乙腈提取, C₁₈柱净化, K₂Cr₂O₇氧化, GC-MS/MS测定。采用 DB-5 毛细管柱分离, 电子轰击电离源二级质谱监测模式检测, 外标法定量。方法的线性关系良好, 线性相关系数均大于 0.99, 线性范围为 2 ~ 50 μg/kg。氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的回收率为 56% ~ 84%。两种药物的检测限和定量限均分别为 1 μg/kg 和 2 μg/kg。

关键词 气相色谱-离子阱二级质谱(GC-ion-trap MS/MS) 固相萃取(solid phase extraction) 氢化泼尼松(prednisolone) 甲基氢化泼尼松(methylprednisolone) 氧化(oxidization) 猪肉(pork)

中图分类号 O658 文献标识码 B 文章编号 1000-8713(2007)04-0602-02 栏目类别 技术与应用

氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松是动物临床和饲料添加的常用药物, 可经动源性食品转移在人体内蓄积, 引起人体亢奋、代谢紊乱等不良反应, 可采用气相色谱(GC)^[1,2]、高效液相色谱(HPLC)^[3]、气相色谱-质谱(GC-MS)^[4,5]和液相色谱-质谱(LC-MS)^[6-9]等方法检测, 但这些方法多用于尿、粪中目标物的检测。另外, GC和HPLC灵敏度较低, 已不能满足残留限量的要求, 并容易出现假阳性。LC-MS灵敏度虽高, 但仪器昂贵, 不易普及。GC-MS中所用硅烷化衍生法^[2]和氯铬酸吡啶盐氧化法^[5]耗时长, 且操作条件苛刻。本实验采用 C₁₈柱固相萃取, K₂Cr₂O₇酸性条件下快速氧化, GC-MS/MS法检测, 简化了前处理步骤, 方法的检测限能满足国内外对猪肉中上述两种药物的检测要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Finnigan 公司气质联用仪, 配有 Polaris Q 质谱检测器、电子轰击电离源(EI)、AS 300 自动进样器和 Xcalibur 工作站; 色谱柱 DB-5 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 高纯 He 为载气; 振荡器(Yamato SA 300); 离心机(Sigma 2-16); 氮吹仪(日本 Eyela 公司)。C₁₈固相萃取柱(3 mL, 500 mg; 美国 Supelco 公司)。

氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松标准品(Sigma 公司); 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.6, 0.2 mol/L); 酸性 K₂Cr₂O₇溶液; 酶解汁(含 β-葡萄糖醛苷酶, Sigma 公司); 甲醇、乙腈、丙酮、正己烷、二氯甲烷、

乙酸乙酯均为农残级(瑞士 Fluka 公司), 其他试剂为分析纯试剂。

1.2 分析条件

气相色谱: 程序升温 70 °C (1 min) $\xrightarrow{25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 270 °C $\xrightarrow{15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 310 °C (2 min); 进样口温度 280 °C; 不分流进样 1 μL; 载气流量 1.0 mL/min。

质谱: 离子源温度 200 °C; 传输线温度 280 °C; 溶剂延迟 11 min; 二级质谱监测模式检测氢化泼尼松母离子 m/z 160, 子离子 m/z 131、145, 碰撞诱导解离(CID)电压 1.0 V; 甲基氢化泼尼松母离子 m/z 174, 子离子 m/z 131、159, CID 电压 1.25 V。电离方式 EI, 电离电压 70 eV。

1.3 样品前处理

提取: 称取 10 g 猪肉样品置于离心管内, 加入 15 mL 醋酸-醋酸钠缓冲溶液, 再加入 200 μL 酶解汁, 振荡 10 min、超声 15 min 后于 60 °C 水浴中加热 2 h。冷却后加入 20 mL 乙腈并振荡 30 min, 以 7 500 r/min 离心分离 20 min, 将上清液转移至另一离心管内, 加入 8 mL 正己烷、2 mL 二氯甲烷后轻微振荡, 再以 4 500 r/min 离心 5 min, 然后移取中间层至比色管内用氮气吹干。将吹干后的药物用 1 mL 乙醇涡动溶解, 加入 9 mL 水混匀, 备用。

净化: C₁₈柱分别用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化, 5 mL 水-乙醇(体积比 9:1)平衡。加入上样溶液后, 依次用 5 mL 水、5 mL 水-丙酮(体积比 9:1)、3 mL 水-甲醇(体积比 6:4)和 5 mL 正己烷淋洗, 用 2 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液并用氮气吹干。

收稿日期 2006-12-26

第一作者: 丁罡斗, 男, 硕士研究生, Tel: (010) 85767344, E-mail: dinggangdou@163.com.

通讯联系人: 仲维科, 男, 博士, 副研究员, Tel: (010) 85767344, E-mail: zwkzhong@21cn.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 20475051)。

氧化 将上述吹干物质用 100 μL 乙腈复溶,加 100 μL 酸性 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 氧化液并混匀,于 60 $^\circ\text{C}$ 水浴中加热 18 min,冷却后依次加入 200 μL 10% 碳酸钠溶液、1 mL 去离子水、3 mL 二氯甲烷,超声提取 10 min 后于 4 500 r/min 离心 5 min。将下层有机相转移并用氮气吹干,加乙酸乙酯定容至 1 mL,用于 GC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的确定

药物衍生采用酸性 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 快速氧化法,得到的最佳反应时间与文献[4]报道不同。当 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

浓度一定(18 mL 水,加入 2 mL 98% 的浓硫酸,再加 1.0 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)、反应温度为 60 $^\circ\text{C}$ 时,两种药物在反应时间为 18 min 时达到最大响应值。

实验中仅用 5 mL 水和 5 mL 正己烷淋洗、2 mL 乙酸乙酯洗脱时,两种药物回收率稳定,但基线噪声较大。再分别加入 5 mL 不同体积比(9:1,8:2,7:3,6:4)的水-丙酮及 3 mL 不同体积比(9:1,8:2,7:3,6:4,5:5)的水-甲醇淋洗,收集最终洗脱液测定。结果表明,在“1.3”节所述净化条件下,得到的洗脱液中干扰杂质最少。在“1.3”节前处理条件下得到的两种药物混合标准液、猪肉空白样品和加标猪肉样品的总离子流色谱图见图 1。

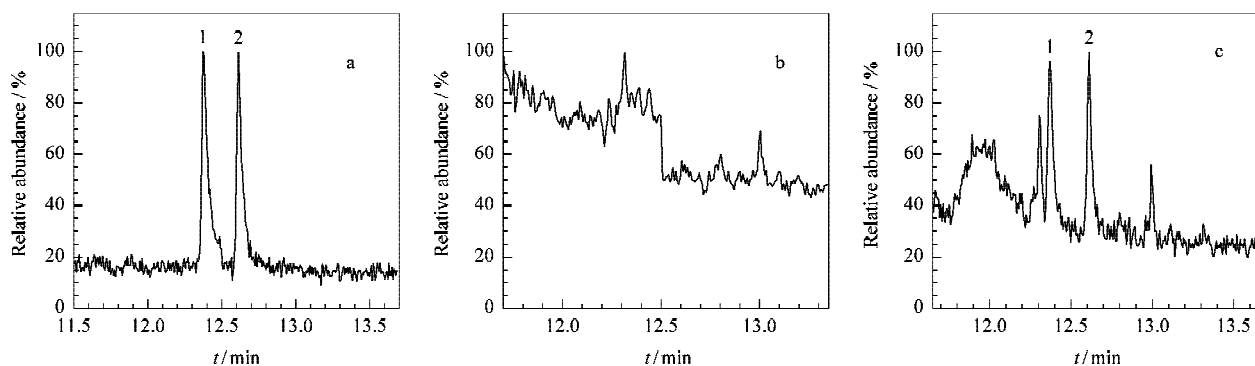


图 1 总离子流色谱图

a. 50 $\mu\text{g/L}$ 氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的混合标准液;b. 猪肉空白样品;c. 10 g 猪肉样品添加 50 ng 氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松。
1. 氢化泼尼松;2. 甲基氢化泼尼松。

2.2 质谱条件的确定

在 70 eV 电子轰击下,两种药物得到解离(图略)。将 m/z 为 160 和 174 两个基峰离子分别选作氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的母离子并优化 CID 电压使之解离,用 MS/MS 监测模式检测各自的两个子离子。将相对丰度最高的两个二级碎片离子(m/z 145,159)分别作为氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的最终定量离子。CID 电压为 0.5 V 和 0.75 V 时两种药物的母离子解离甚少,仍为基峰离子;当氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的 CID 电压分别增至 1.25 V 和 1.5 V 时两种药物的母离子却又完全解离。最终选定的 CID 电压:氢化泼尼松为 1.0 V,甲基氢化泼尼松 1.25 V。

2.3 标准曲线、检测限、精密度及回收率

在 10 g 猪肉样品中添加 2~50 $\mu\text{g/kg}$ 上述两种药物标准品,处理后用 GC-MS/MS 检测。以药物浓度($X, \mu\text{g/kg}$)对药物峰面积(Y)线性回归,得到氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的回归方程分别为 $Y = 255.69X - 145.39$ ($r = 0.9936$)和 $Y = 236.86X - 167.2$ ($r = 0.9976$)。两种药物的检测限($S/N \geq 3$)均为 1 $\mu\text{g/kg}$,定量限($S/N \geq 10$)均为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。在

高、中、低 3 种加标浓度(20,10,5 $\mu\text{g/kg}$)下,氢化泼尼松和甲基氢化泼尼松的平均回收率($n = 6$)为 56%~84%,相对标准偏差为 9.2%~18.1%。

2.4 实际样品的测定

用上述方法对北京地区购买的猪肉样品进行分析测定,未发现阳性样品。

参考文献:

- [1] Shimada K, Mitamura K, Higashi T. J Chromatogr A, 2001, 935:141
- [2] Yap B K, Johnston G A R, Kazlauskas R. J Chromatogr B, 1992, 573:183
- [3] Majid O, Akhlaghi F, Lee T, Holt D W, Trull A. Ther Drug Monit, 2001, 23:163
- [4] Courtheyn D, Vercammen J, Logghe M, Seghers H, de Wasch K, de Brabander H. Analyst, 1998, 123:2409
- [5] Delahaut P, Jacquemin P, Colemonts Y, Dubois M, de Graeve J, Deluykerl H. J Chromatogr B, 1997, 696:203
- [6] Antignac J P, Le Bizet B, Monteau F, Poulain F, Andre F. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14:33
- [7] Fluri K, Rivier L, Dienes-Nagy A, You C H, Maitre A, Schweizer C, Saugy M, Mangin P. J Chromatogr A, 2001, 926:87
- [8] 崔晓亮,邵兵,赵榕,孟娟,涂晓明. 色谱, 2006, 24(3):213
- [9] 郭继芬,钟大放,陈笑艳. 药学报, 1991, 34(12):928