

DOI: 10.3724/SP.J.1096.2010.00318

## 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱同时检测 动物源性食品中 76 种兽药残留

郭德华<sup>1</sup> 邓晓军\*<sup>1</sup> 赵善贞<sup>1</sup> 朱坚<sup>1</sup> 夏崇菲<sup>2</sup> 陈舜胜<sup>2</sup> 宋越<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(上海出入境检验检疫局,上海 200135) <sup>2</sup>(上海海洋大学,上海 200433)

<sup>3</sup>(中国药科大学,南京 211198)

**摘要** 建立了固相萃取-高效液相色谱/串联质谱(SPE-HPLC/MS)同时测定动物源性食品中 76 种兽药残留的检测方法。样品采用乙腈和含  $Mg^{2+}$  的柠檬酸缓冲液进行提取,去除有机相后以缓冲液重溶,聚合物和阳离子交换固相萃取柱串联净化,用甲醇和甲醇-氨水(95:5, V/V)分步洗脱,液相色谱-串联质谱进行测定,基质曲线外标法定量。方法的定量下限为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\beta$ -受体激动剂类和三苯甲烷类)、1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (苯二氮卓类和硝基咪唑类)、5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (苯并咪唑类)和 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (磺胺类)。76 种兽药在虾、猪肉、猪肝、鸡蛋和牛奶中的基质溶液标准曲线线性相关系数( $r$ )大于 0.907,回收率在 59.4%~115.3%之间,相对标准偏差在 2.6%~27.3%之间。采用本方法对市场样品进行筛选,发现 2 例阳性样品中含有莱克多巴胺和地西洋残留,测定值分别为 0.92 和 6.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

**关键词** 兽药;残留;高效液相色谱-串联质谱;动物源性产品

### 1 引言

近 20 年来,兽药(包括饲料药物添加剂)在畜牧业中的应用日益广泛,而动物性食品中的兽药残留问题也逐渐成为人们普遍关注的社会焦点。目前非法使用违禁药物、滥用抗菌药和药物添加剂等,已经是造成我国动物源性食品中兽药残留超标,引起畜禽产品消费安全和食品贸易争端的主要原因<sup>[1]</sup>。由于兽药性质差别较大,现有的残留分析一般按照化学结构类似的同族药物来开发相应的方法如分别针对  $\beta$ -受体激动剂<sup>[2]</sup>、磺胺类<sup>[3]</sup>、硝基咪唑类<sup>[4]</sup>、苯并咪唑类<sup>[5]</sup>及苯二氮卓<sup>[6]</sup>等不同类药物建立的检测方法,而这些分析方法所能同时分析的药物种类较少,不能满足目前兽药种类不断增加,分析通量不断提高的需求。在现代农药检测领域,不同类别的农药多残留同时检测方法应用日趋成熟<sup>[7-9]</sup>,但是有关兽药残留多类残留的同时检测的报道较少。随着液相色谱-串联质谱技术的快速发展,动物源性复杂食品基质中的兽药多残留检测范围已逐步从单一类别发展为多种不同类别兽药的同时定性定量分析。已有采用串联四级杆<sup>[10]</sup>或飞行时间质谱检测器<sup>[11]</sup>同时完成液态奶中 70~100 种兽药残留的测定方法的报道,但关于其它类型食品基质中的报道较少。本研究采用固相萃取-液相色谱/串联质谱法同时检测猪肉、猪肝、虾、牛奶和鸡蛋中 6 类共 76 种兽药残留,方法测定限等技术指标满足相关法规规定。本方法已应用于口岸动物源性食品中兽药残留的筛选和检测。

### 2 实验部分

#### 2.1 仪器与试剂

API4000 型四级杆串联质谱仪(美国 AB 公司),配 UFLC XR 高效液相色谱仪(日本岛津公司); Thermo Aquasil  $C_{18}$  色谱柱(150 mm  $\times$  4.6 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , 美国热电公司); Allegra X-22R 高速离心机(美国 Beckman 公司); 固相萃取仪(美国 Suplco 公司); 旋转浓缩仪(德国 Buchi 公司); N-EVAP111 型氮吹浓缩仪(美国 Organomation 公司); 聚苯乙烯-二乙烯基苯固相萃取小柱(60 mg, 3 mL, 安谱公司); 阳离子交换固相萃取小柱(60 mg, 3 mL, 德国 CNW 公司); 移液器(0.5~10  $\mu\text{L}$ , 20~200  $\mu\text{L}$ , 200~1000  $\mu\text{L}$ ,

2009-08-16 收稿; 2009-10-25 接受

本文系上海市科委技术标准专项(No. 08DZ0505200)和上海出入境检验检疫局科技专项(No. HK004-2007)资助

\* E-mail: dengxj@shciq.gov.cn

500~5000  $\mu\text{L}$ , 美国 Brand 公司), 0.45  $\mu\text{m}$  ( $\Phi 25$  mm) 和 0.22  $\mu\text{L}$  ( $\Phi 13$  mm) 移液器(美国 Millipore 公司)。

甲醇(HPLC 纯, J. T. Baker 公司); 乙腈(HPLC 纯, Promptar 公司); 异丙醇(HPLC 纯, Promptar 公司); 甲酸(ACS 纯, J. T. Baker 公司); 乙酸铵、氯化钠、氨水、一水合柠檬酸( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、六水合氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 购于中国医药上海化学试剂公司; 乙酸铵(ACS 纯, Fisher 公司)。 $\beta$ -受体激动剂类标准物质(12种)、苯并咪唑类标准物质(14种)、硝基咪唑类标准物质(10种)、磺胺类标准物质(19种)和三苯甲烷类标准物质(2种)纯度 $\geq 95\%$ , 1.0 g/L 苯二氮卓类标准物质(19种)的甲醇溶液。

柠檬酸缓冲液(pH=2.5): 称取 10.5 g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  和 10.2 g  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 溶解于 450 mL 水中, 用氨水调节至 pH 2.5, 水稀释定容至 500 mL。

## 2.2 色谱/质谱条件

柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 0.6 mL/min; 进样量 20  $\mu\text{L}$ ; 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的乙腈, 流动相 B 为含 0.1% 甲酸的水溶液与甲醇体积比为 95:5 的混合液; 梯度顺序: 0~3 min, 0~25% A; 3~4 min, 25%~40% A; 4~7 min, 40%~50% A; 7~9 min, 50% A; 9~13 min, 50%~100% A; 13~18.5 min, 100% A; 18.5~23 min, 100% B。

离子化方式为电喷雾离子化正模式(ESI+); 雾化气压力(GS1): 0.448 MPa; 离子源温度: 550  $^{\circ}\text{C}$ ; 气帘气压力(CUR): 0.207 MPa; 辅助气压力(GS2): 0.483 MPa; 电喷雾电压(IS): 4500 V; 目标化合物检测离子对碰撞电压(CE)、去簇电压(DP)见表1(详表见 <http://www.analchem.cn/table/090818.pdf>)。碰撞室入口电压(EP): 10 V; 碰撞室出口电压(CXP): 13 V;  $\beta$ -受体激动剂类和三苯甲烷类为离子驻留时间: 20 ms; 苯并咪唑类、磺胺类、硝基咪唑类、苯二氮卓类离子驻留时间: 5 ms。

表1 76种兽药中代表性化合物的多反应监测离子对及质谱相关参数表(简表)

Table 1 Multiple reaction monitoring transition and mass spectrometry parameters of representative compounds within 76 veterinary drugs (brief table)

化合物名称 Compound	化学文摘编号 CAS No.	分子式 Molecular formula	母离子 Precursor ion ( $m/z$ )	子离子 Product ion ( $m/z$ )	碰撞电压 Collision voltage (V)	去簇电压 Declustering potential (V)
<b>苯二氮卓类 Benzodiazepine(19种)</b>						
地西洋 Diazepam	439-44-5	$\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}$	285.2	193.2 154.2*	37 38	80 84
利眠宁 Chlordiazepoxide	58-25-3	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}$	300.2	227.2 282.2*	32 33	42 66
阿普唑仑 Alprazolam	28981-97-7	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4$	309.1	274.3* 205.1	37 34	100 98
$\alpha$ -羟基阿普唑仑 $\alpha$ -Hydroxyalprazolam	37115-43-8	$\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClN}_4\text{O}$	325.1	297.2* 176.1	34 38	84 90
<b>磺胺类 Sulfonamide(19种)</b>						
磺胺喹噁啉 Sulfaquinolaxaline	59-40-5	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	301.1	156.0* 108.0	23 39	108 98
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	68-35-9	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$	251.1	92.1 156.0*	41 23	64 70
磺胺甲氧吡嗪 Sulfamethoxypridazine	80-35-3	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$	281.1	156.0* 215.0	24 25	60 70
<b>苯并咪唑类 Benzimidazole(14种)</b>						
阿苯达唑 Albendazole	54965-21-8	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$	266.2	234.2* 191.2	30 48	88 88
苯硫胍 Febantel pestanal	58306-30-2	$\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$	447.3	383.2* 280.2	27 44	90 90
奥芬达唑 Oxfendazole	53716-50-0	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$	316.2	191.2* 159.2	31 48	100 100
<b><math>\beta</math>-受体激动剂类 <math>\beta</math>-agonist(12种)</b>						
莱克多巴胺 Ractopamine	97825-25-7	$\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_3$	302.2	164.2* 107.1	24 51	66 66
沙丁胺醇 Salbutamol	18559-94-9	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	240.2	148.2* 16	27 16	66 66
克伦特罗 Clenbuterol	37148-27-9	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}$	277.1	203.1* 132.1	25 42	75 75

续表 1(Continued to Table 1)

化合物名称 Compound	化学文摘编号 CAS No.	分子式 Molecular formula	母离子 Precursor ion ( <i>m/z</i> )	子离子 Product ion ( <i>m/z</i> )	碰撞电压 Collision voltage (V)	去簇电压 Declustering potential (V)
三苯甲烷类 Triphenylmethane(2 种)						
隐色孔雀石绿 Leucomalachite Green	129-73-7	C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub>	331.2	239.2* 315.2	39 37	104 113
隐色结晶紫 Leucoecrystal Violet	603-48-5	C <sub>25</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub>	374.3	358.4* 238.3	39 35	104 110
硝基咪唑类 Nitroimidazole(10 种)						
甲硝唑 Metronidazole	443-48-1	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	172.0	128.2* 82.1	21 35	55 51
二甲硝咪唑 Dimetridazole	551-92-8	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	142.0	96.0* 81.0	23 36	60 59
洛硝哒唑 Ronidazole	7681-76-7	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	201.1	140.2* 110.2	17 25	37 38

\* 定量离子(Quantitative transition)。

### 2.3 样品预处理

**2.3.1 样品提取** 准确称取 5 g 试样于 50 mL 塑料离心管中,加入 30 mL 乙腈、2 mL 异丙醇和 10 mL 柠檬酸缓冲溶液,以 2000 r/min 转涡旋混合提取 5 min,以 4000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 250 mL 梨形瓶中。重复上述提取操作,合并提取液,加入 6 mL 异丙醇后在不高于 40 °C 的温度下旋转浓缩至约 5 mL,转移浓缩液至 50 mL 塑料离心管中,并用 5 mL 柠檬酸缓冲液润洗梨形瓶,合并洗液,4 °C 下以 8500 r/min 冷冻离心 10 min,过 0.45 μm 滤膜后待净化。

**2.3.2 样品净化** 将聚合物柱和阳离子交换柱按照从上到下顺序装好,依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 柠檬酸缓冲液活化。转移样液至固相萃取柱的顶部,以 0.5 mL/min 流速过柱。用 3 mL 柠檬酸缓冲液、3 mL 水、3 mL 水-甲醇溶液(5:95, V/V)淋洗柱,抽干 5 min 后,依次用 4 mL 甲醇和 6 mL 甲醇-氨水溶液(95:5, V/V)洗脱柱上的待分析成分,合并收集洗脱液,在氮吹浓缩装置上不高于 40 °C 的温度下蒸干。加入 1.0 mL 含 0.1% 甲酸水-甲醇(9:1, V/V)溶液振荡溶解残渣后,过 0.22 μm 滤膜后待测。

## 3 结果与讨论

### 3.1 提取与净化条件的选择

**3.1.1 提取方式的选择** 对于多残留检测,目标化合物的前处理方式是方法的关键。本方法所检测的 76 种兽药的化学结构中大多含有氨基和亚氨基等功能团,易溶于乙腈、甲醇等极性溶剂,在水溶液中多呈弱碱性。但由于取代基团的影响,化合物之间的性质差别较大,即使属于同族药物,其 pKa 值也存在较大的差异。如硝基咪唑类化合物,其 pKa 值分布范围为 2.8 ~ 11.4,表明存在部分中性和偏酸性药物,这增加了样品前处理的难度。实验中比较了甲醇、乙腈、乙酸乙酯和不同浓度的柠檬酸缓冲液的提取效率,确定采用乙腈和 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH = 2.5)进行复合提取,发现 Mg<sup>2+</sup> 的存在可提高部分偏酸性药物的提取效率,与文献[12]相符。因此,本实验最终确定采用含 MgCl<sub>2</sub> 的柠檬酸缓冲液-乙腈为提取液。

**3.1.2 固相萃取方式的选择和优化** 离子交换模式因其高选择性是固相萃取净化中首选的方式之一。本研究中的目标化合物大多为偏碱性,因此首选阳离子交换模式进行净化。同时对于一些弱酸性药物和中性药物,可采用 pH = 2.5 缓冲液重溶后,利用反相作用机制进行保留。实验中将两种作用机制的固相萃取柱串联使用,可一次完成对 76 种兽药的全部净化。比较了 1%、3%、5% 和 10% 不同浓度氨水-甲醇溶液的洗脱效率,发现采用甲醇与 5% 氨水-甲醇依次洗脱方式即可将在聚合物和离子交换柱上所有的药物全部洗脱,而且洗脱下来的杂质较少。

实验尝试过制备聚合物和阳离子交换填料混装的复合固相萃取小柱,实验结果表明,其回收率低于串联固相萃取柱所得的结果。

### 3.2 质谱与色谱条件的选择

**3.2.1 色谱柱和流动相的选择** 考察了3种不同类型的色谱 Thermo Aquasil C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm i. d. 3.0 μm)、Sunfire C<sub>18</sub> (150 mm × 2.1 mm i. d. , 3.0 μm) 和 Xbridge C<sub>8</sub> (150 mm × 2.1 mm i. d. , 5.0 μm) 对76种兽药的分析结果,并考察了2.0, 5.0和10 mmol/L 乙酸铵(含0.1%甲酸)、0.1%甲酸-乙腈、0.1%甲酸-甲醇等流动相体系和流速。其中 Thermo Aquasil C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm i. d. 3.0 μm) 分析柱由于采用的亲水性基团封端的填料,对磺胺胍、沙丁胺醇等极性药物具有较好的保留。采用在乙腈和乙酸铵溶液的流动相体系中加入5%甲醇,可以实现对磺胺甲氧吡嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺-6-甲氧嘧啶(281/156);磺胺间二甲氧嘧啶和磺胺邻二甲氧嘧啶(311/156);磺胺胍和磺胺醋酰(215/156);5-羟基-甲苯咪唑和阿苯达唑磺(298/266)这些母离子和子离子完全相同的药物的较好分离,如图1所示。

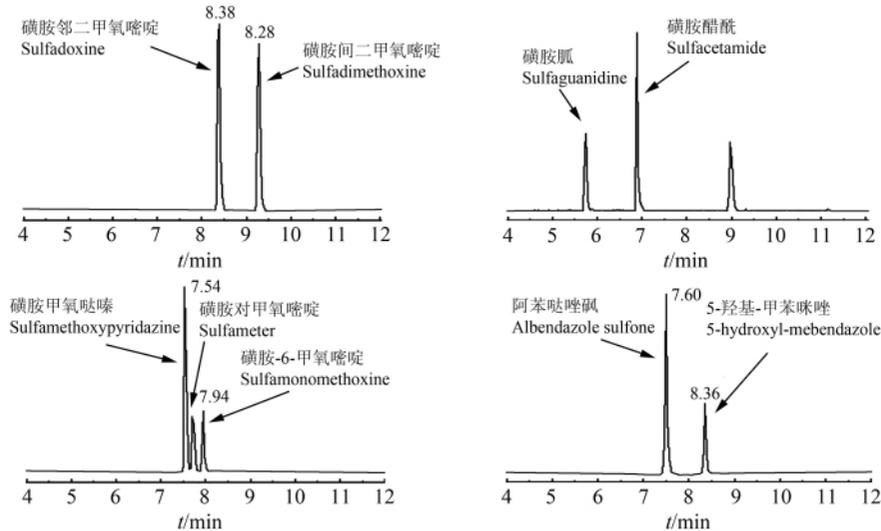


图1 母离子和子离子完全相同的药物的多反应监测色谱图

Fig. 1 MRM chromatogram of compounds with identical precursor and product ions

**3.2.2 质谱条件的优化** 参照CAC和EU第657/2002/EEC号决议中有关规定<sup>[13]</sup>,选择两对离子进行MRM监测即可满足,同时子离子的选择主要考虑其中母离子和子离子按照每种化合物的质谱图和结构特性选取,并且在实际样品分析中基质干扰较少。确定各种物质的分子离子,然后分别以各种化合物的分子离子为母离子,对其子离子进行全扫描选取丰度较强、干扰较小的两对子离子为定性离子。最后以多反应监测(MRM)正离子模式优化各种质谱参数。在多残留检测中,离子驻留时间(Dwell time)对灵敏度和定量分析影响较大,由于本方法为筛选法,灵敏度优先,因此最终经过优化后β-受体激动剂类和三苯甲烷类为20 ms;苯并咪唑类、磺胺类、硝基咪唑类、苯二氮卓类为5 ms,详细的质谱条件见表1。

### 3.3 方法学验证

**3.3.1 定量下限(LOQ)** 在虾、猪肉、猪肝、鸡蛋和牛奶基质空白样品中,添加一定浓度标准溶液,测定定量下限。按照色谱峰面积信噪比大于10( $S/N > 10$ )时进行计算,76种药物的定量下限分别为:0.1~0.5 μg/kg(β-受体激动剂类)、0.2~0.5 μg/kg(三苯甲烷类)、0.2~1.0 μg/kg(苯二氮卓类)、0.5~1.0 μg/kg(硝基咪唑类)、1.0~5.0 μg/kg(苯并咪唑类)和5.0~20.0 μg/kg(磺胺类),均满足我国残留监控和欧盟、美国对上述兽药检测的要求(表2)。

**3.3.2 基质标准曲线及线性范围** 液相色谱-质谱进行检测时,由于基质效应的影响,导致目标化合物发生离子增强或抑制作用,通常采用优化色谱分离和样品前处理以及使用同位素内标来降低基质效应对定量准确度的影响<sup>[14]</sup>。采用不含待测药物的虾、猪肉、猪肝、鸡蛋和牛奶基质空白溶液配制梯度混合对照品溶液:稀释标准品至浓度分别为0.5~10.0 μg/L(β-受体激动剂类和三苯甲烷类);2.0~50.0 μg/L(苯二氮卓类和硝基咪唑类);10.0~200.0 μg/L(磺胺类)和5.0~50.0 μg/L(苯并咪唑类)。按照上述选定的分析条件进行测定,平行进样3次,以峰面积对浓度进行线性回归。在上述浓度

表 2 部分兽药在虾、猪肉、猪肝、牛奶和鸡蛋 5 种基质中的测定下限、添加回收率和相对标准偏差及基质添加曲线线性相关系数的变化范围(简表)

Table 2 LOQ, range of recovery, relative standard deviation, linear correlation coefficient of representative compounds within 76 veterinary drugs in spiked sample matrix regarding shrimp, pork, liver, milk and egg( Brief table)

化合物名称 Compound	测定下限 LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	添加浓度 Spiked ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 Recovery ( % )	RSD ( % , $n = 6$ )	线性相关系数 $r$
苯二氮卓类 Benzodiazepine					
地西洋 Diazepam	0.2	1.0, 2.0, 4.0	75.0 ~ 92.1	3.0 ~ 10.8	0.963 ~ 0.999
利眠宁 Chlordiazepoxide	1.0	1.0, 2.0, 4.0	74.7 ~ 94.5	3.4 ~ 8.2	0.946 ~ 0.992
阿普唑仑 Alprazolam	0.2	1.0, 2.0, 4.0	68.5 ~ 94.0	4.6 ~ 10.6	0.997 ~ 0.999
$\alpha$ -羟基阿普唑仑 $\alpha$ -Hydroxyalprazolam	0.5	1.0, 2.0, 4.0	69.7 ~ 94.6	3.3 ~ 8.3	0.984 ~ 1.000
磺胺类 Sulfonamide					
磺胺喹噁啉 Sulfaquinoxaline	20.0	20.0, 40.0, 80.0	67.8 ~ 91.2	2.9 ~ 7.9	0.9929 ~ 0.9999
磺胺嘧啶 Sulfadiazine	5.0	20.0, 40.0, 80.0	69.6 ~ 91.9	3.6 ~ 10.6	0.967 ~ 1.000
磺胺甲氧吡嗪 Sulfamethoxypyridazine	5.0	20.0, 40.0, 80.0	72.5 ~ 97.6	3.3 ~ 7.8	0.960 ~ 0.999
苯并咪唑类 Benzimidazole					
阿苯达唑 Albendazole	1.0	5.0, 10.0, 20.0	63.1 ~ 94.7	5.2 ~ 9.6	0.915 ~ 0.997
苯硫胍 Febantel pestanal	5.0	5.0, 10.0, 20.0	71.8 ~ 94.3	2.6 ~ 13.1	0.938 ~ 0.998
奥芬达唑 Oxfendazole	2.0	5.0, 10.0, 20.0	74.5 ~ 96.8	4.6 ~ 12.4	0.944 ~ 0.995
$\beta$ -受体激动剂类 $\beta$ -Agonist					
莱克多巴胺 Ractopamine	0.3	0.5, 1.0, 2.0	64.4 ~ 101.4	3.9 ~ 11.9	0.937 ~ 0.997
沙丁胺醇 Salbutamol	0.2	0.5, 1.0, 2.0	65.9 ~ 107.9	5.1 ~ 20.8	0.910 ~ 0.999
克伦特罗 Clenbuterol	0.1	0.5, 1.0, 2.0	66.7 ~ 100.4	4.5 ~ 12.7	0.938 ~ 0.997
三苯甲烷类 Triphenylmethane					
隐色孔雀石绿 Leucomalachite Green	0.2	0.5, 1.0, 2.0	69.2 ~ 101.1	7.9 ~ 16.5	0.919 ~ 0.984
隐色结晶紫 LeucoCrystal Violet	0.5	0.5, 1.0, 2.0	68.8 ~ 95.3	9.3 ~ 19.5	0.950 ~ 0.997
硝基咪唑类 Nitroimidazole					
甲硝唑 Metronidazole	0.5	1.0, 2.0, 4.0	71.1 ~ 90.3	5.8 ~ 18.8	0.932 ~ 0.992
二甲硝咪唑 Dimetridazole	0.5	1.0, 2.0, 4.0	70.4 ~ 92.4	3.2 ~ 16.3	0.943 ~ 0.999
洛硝哒唑 Ronidazole	0.5	1.0, 2.0, 4.0	64.9 ~ 89.6	9.8 ~ 15.3	0.917 ~ 0.982

范围内, 76 种兽药在 5 种基质溶液中的标准曲线的线性相关系数( $r$ ) 大于 0.907(表 2)。对上述不同基

质标准曲线的斜率进行归一化处理:  $A(\%) = \frac{\text{Slope}_s}{\text{Slope}_{\max}} \times 100$  其中  $\text{Slope}_s$  为药物在某基质中的标准曲线

斜率,  $\text{Slope}_{\max}$  为药物在 5 种不同基质中标准曲线斜率最大值。由于基质差异, 相同化合物在不同基质中测定的标准曲线的斜率有显著差异, 存在较强的基质效应。其中 21 种化合物归一化后的斜率变化相对标准偏差(RSD) 超过 50%, 如图 2 所示。这些药物主要为一些强极性化合物, 如磺胺胍、乙酰磺胺、特布他林等。因此, 最终确定采用基质曲线进行定量分析。

**3.3.3 回收率和精密度** 在不含待测药物的空白基质添加不同浓度标准, 按 2.3.1 及 2.3.2 项的方法进行样品制备, 测定方法回收率及精密度。本方法分别测定虾、猪肉、猪肝、奶和蛋基质添加回收率, 添加水平为: 1.0, 2.0 和 4.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (硝基咪唑类和苯二氮卓类); 5.0, 10.0 和 20.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (苯并咪唑类); 0.5, 1.0 和 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ( $\beta$ -受体激动剂类和三苯甲烷类); 20.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 40.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 80.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ (磺胺类)。一些代表性化合物的数据如表 2 所示(详表见 <http://www.analchem.cn/table/090818.pdf>)。76 种药物的总体回收率在 59.4% ~ 111.6% 之间; 相对标准偏差在 2.6% ~ 27.3% 之间( $n = 6$ )。同时本方法经过国内 5 家具有分析资质的检测机构进行室间验证, 各项指标均满足相关法规的要求。

### 3.4 实际样品检测

在本实验设定的检测步骤和仪器条件下, 对当前日常检测和市场抽查的猪肉(23 例) 和牛奶(19 例) 进行 76 种药物的筛选, 测出 1 例日常检测猪肉样品中含有莱克多巴胺残留, 1 例超市购买的猪肉样品中含有地西洋残留, 其含量分别为 0.92 和 6.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该样品的多反应监测色谱图如图 3 所示。

结果表明 本方法适用于动物源性食品中兽药残留的筛选和检测。

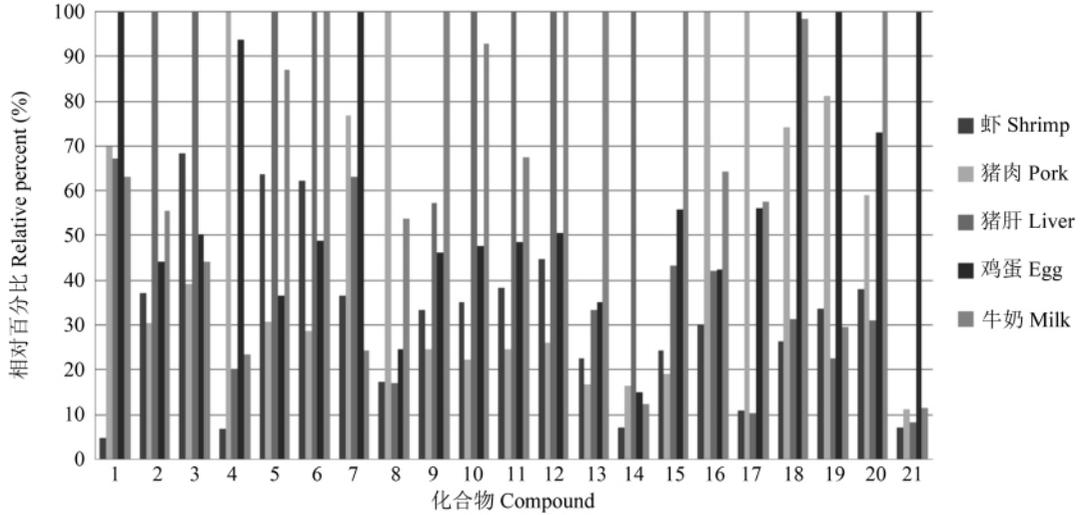


图 2 21 种代表性兽药在虾、猪肉、肝、蛋、奶中基质曲线相对斜率变化

Fig.2 Relative slope of sample matrix for 21 representative compounds in shrimp meat liver egg and milk

1. 磺胺胍( Sulfaguanidine); 2. 磺胺喹噁啉( Sulfaquinoxaline); 3. 苯酰磺胺( Sulfabenzamide); 4. 磺胺醋酰( Sulfacetamide); 5. 溴西洋( Bromazepam); 6. 地西洋( Diazepam); 7. 硝西洋( Nitrazepam); 8. 奥沙西洋( Oxazepam); 9. 阿苯达唑( Albendazole); 10. 氟苯达唑( Flubendazole); 11. 芬苯达唑砒( Fenbendazole sulfone); 12. 甲苯咪唑( Mebendazole); 13. 沙米特罗( Salmeterol); 14. 特布他林( Terbutaline); 15. 喷布特罗( Penbutolol); 16. 氯丙那林( Clorprenaline); 17. 羟基甲硝唑( 1-(2-Hydroxyethyl)-2-hydroxy-methyl-5-nitroimidazol); 18. 2-甲硝咪唑( Dimetridazole); 19. 甲硝唑( Metronidazole); 20. 洛硝哒唑( Ronidazole); 21. 氯甲硝咪唑( 5-Chloro-1-methyl-4-nitroimidazole )。

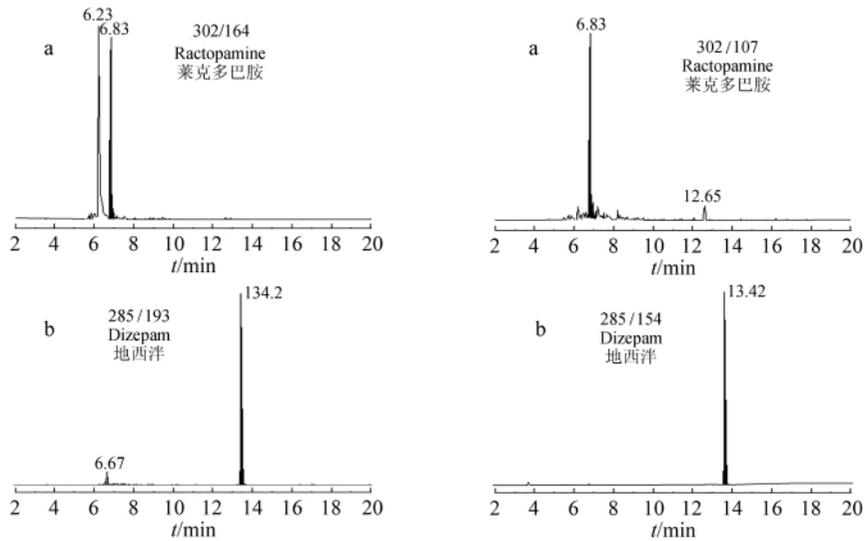


图 3 阳性猪肉样品的多反应监测色谱图

Fig.3 MRM chromatogram of positive sample

a. 日常检测样品( Regular inspection sample); b. 超市样品( Super market sample)。

References

1 Stolker A A M , Zuidema T , Nielen M W F. *TrAC Trends Anal. Chem.* ,2007 ,26( 10) : 967 ~ 979  
 2 Shao B ,Jia X F , Zhang J , Meng J , Wu Y N , Duan H J , Tu X M. *Food Chem.* ,2009 ,114( 3) : 1115 ~ 1121  
 3 Cai Z X , Zhang Y , Ran H F , Tie X W , Ren Y P. *J. Chromatogr. A* ,2008 ,1200( 2) : 144 ~ 155

- 4 Xia X, Li X, Zhang S, Ding S, Jiang H, Shen J. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 586(1-2): 394 ~ 398
- 5 Danaher M, De Ruyck H, Crooks S R H, Dowling G, O'Keefe M. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 845(1): 1 ~ 37
- 6 Smink B E, Brandsma J E, Dijkhuizen A, Lusthof K J, de Gier J J, Egberts A C G, Uges D R A. *J. Chromatogr. B*, **2004**, 811(1): 13 ~ 20
- 7 Pang G F, Cao Y Z, Zhang J J, Fan C L, Liu Y M, Li X M, Jia G Q, Li Z Y, Shi Y Q, Wu Y P, Guo T T. *J. Chromatogr. A*, **2006**, 1125(1): 1 ~ 30
- 8 LUO Wen-Ting(罗文婷), WU Qing(吴青), JIAN Wei-Ming(简伟明), ZHONG Xuan-Qiong(钟璇琼). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2009**, 37(6): 877 ~ 880
- 9 Soler C, Pic Y. *TrAC Trends Anal. Chem.*, **2007**, 26(2): 103 ~ 115
- 10 Leung G N W, Leung D K K, Wan T S M, Wong C H F. *J. Chromatogr. A*, **2007**, 1156(1-2): 271 ~ 279
- 11 Aguilera-Luiz M M, Jose Vidal L M, González R R, Frenich A G. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1205(1-2): 10 ~ 16
- 12 Yu N H, Ho E N M, Tang F P W, Wan T S M, Wong A S Y. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1189(1-2): 426 ~ 434
- 13 European Union(2002/657/EC), Official Journal of the European Union, L 221/8, **2002**, EN
- 14 XIANG Pin(向平), SHEN Ming(沈敏), ZHUO Xian-Yi(卓先义). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2009**, 28(6): 753 ~ 756

## Simultaneous Determination of 76 Veterinary Drug Residues in Foodstuffs of Animal Origin by Solid Phase Extraction– Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

GUO De-Hua<sup>1</sup>, DENG Xiao-Jun<sup>\*1</sup>, ZHAO Shan-Zhen<sup>1</sup>, ZHU Jian<sup>1</sup>, XIA Chong-Fei<sup>2</sup>, CHEN Shun-Sheng<sup>2</sup>, SONG Yue<sup>3</sup>

<sup>1</sup>(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135)

<sup>2</sup>(Shanghai Fishery University, Shanghai 200433)

<sup>3</sup>(China Pharmaceutical University, Nanjing 211198)

**Abstract** A method based on solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of 76 veterinary drugs in foodstuffs of animal origin was presented. The residues derived from pork, shrimp, milk, liver and egg were extracted by acetonitrile combined with citrate buffer containing magnesium cation. The extracts were distilled and redissolved with citrate buffer followed by a further cleanup procedure using polymer connected with cation exchange SPE column. The residues retained in column were rinsed with methanol and mixture of methanol and ammonium hydroxide(95:5, V/V). Sample matrix-matched calibration was used to determine the residue contents by external standard. The method provided a LOQ of 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ( $\beta$ -agonist and triphenylmethane), 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (benzodiazepine and nitroimidazole), 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (benzimidazole) and 20.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (sulfanilamide), linear relationship more than 0.907 and a recovery ranged from 59.4% to 115.3% with a RSD between 2.6% and 27.3% in sample matrix. The practical inspection using the method offered two positive samples for ractopamine and diazepam with a residual concentration of 0.92 and 6.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

**Keywords** Veterinary drug; Multiple residues; High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Foodstuffs of animal origin

(Received 16 August 2009; accepted 25 October 2009)