

高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中 9 种化学合成类抗球虫药多残留

施祖灏¹, 张小燕^{1,2}, 卜士金², 陈大伟¹, 蒲俊华¹, 高玉时^{1*}, 唐修君¹

(1. 中国农业科学院家禽研究所 农业部家禽品质监督检验测试中心(扬州), 江苏 扬州 225125;

2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 建立了鸡肉中氯羟吡啶、二硝托胺、4,4'-二硝基均二苯胺(尼卡巴嗪代谢物)、磺胺氯吡嗪、磺胺喹恶啉、地克珠利、妥曲珠利、妥曲珠利砒和妥曲珠利亚砒 9 种化学合成类抗球虫药多残留的高效液相色谱-串联质谱分析方法。样品采用 2% 乙酸酸化的乙腈/二甲亚砜(4:1, v/v) 提取, 150 mg 二甲基十八碳硅烷粉(octadecylsilyl, ODS)、100 mg 石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB) 和 100 mg 弗罗里硅土(Florisil) 吸附剂分散固相萃取净化, 经 Hyper-sil GOLD C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 分离, 电喷雾串联四极杆质谱多反应离子监测方式测定。9 种分析物在 20 ~ 150 μg/kg 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.995。样品基质中 9 种分析物在 20、50 和 150 μg/kg 加标水平下, 平均回收率为 81.5% ~ 103.6%, 相对标准偏差为 4.5% ~ 14.5%。该方法稳定、可靠, 可满足鸡肉中化学合成类抗球虫药多残留的检测与确证。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 化学合成抗球虫药; 多残留; 鸡肉

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)09-0883-06

Simultaneous extraction and determination of nine chemically synthetic anticoccidial drug multi-residues in chicken meat using high performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry

SHI Zuhao¹, ZHANG Xiaoyan^{1,2}, BU Shijin², CHEN Dawei¹,

PU Junhua¹, GAO Yushi^{1*}, TANG Xiujuan¹

(1. Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Supervision, Inspection and Testing

Center of Poultry Quality, Ministry of Agriculture (Yangzhou), Yangzhou 225125, China;

2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (HPLC-MS/MS) method was developed for the simultaneous extraction and determination of multi-residues of nine chemically synthetic anticoccidial drugs in chicken meat. Toltrazuril-D₃ was used as the internal standard. The sample was extracted by 15 mL acetonitrile/dimethyl sulfoxide (4:1, v/v, containing 2% acetic acid), cleaned-up by a QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) clean-up tube with 150 mg octadecylsilyl (ODS), 100 mg Florisil and 100 mg graphitized carbon black (GCB). After the concentration, the extract was analyzed by HPLC-MS/MS. The results showed that good linearity in the range of 20 – 150 μg/L for each target compound. The recoveries were between 81.5% and 103.6% with the relative standard deviations lower than 15%. The method is simple, rapid, and suitable to detect the chemically synthetic anticoccidial drug residues with high throughput.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); chemically synthetic anticoccidial drugs; multi-residues; chicken meat

* 通讯联系人: 高玉时, 研究员, 研究方向为禽产品品质与安全. E-mail: gaoy100@sina.com.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAD39B04-3)、江苏省自然科学基金项目(BK2010299)和扬州市社会发展项目(2008040).

收稿日期: 2012-05-14

自 1939 年发现磺胺类药物具有抗球虫作用以来,抗球虫药物的开发与应用取得了迅猛发展,已证实具有不同程度抗球虫作用的药物达百余种,其中用于预防鸡球虫病的药物有 30 多种。抗球虫药物总体上可分为两大类,即聚醚类抗生素和化学合成类抗球虫药物^[1-3]。常用的化学合成类抗球虫药物有氯羟吡啶、二硝托胺、尼卡巴嗪、磺胺类药物(包括磺胺二甲基嘧啶、磺胺喹恶啉、磺胺氯吡嗪等)和均三嗪类药物(主要包括地克珠利和妥曲珠利)。

为了控制抗球虫药物在动物源性食品中的残留,减少其对消费者健康的损害,从 1999 年始,欧盟禁止了在动物饲料中使用氯氟苯腺嘌呤、二硝甲苯酰胺、异丙硝哒唑和氯羟吡啶等抗球虫药物。2006 年,欧盟全面禁止抗生素类促生长添加剂在饲料中使用,其中包括抗球虫药物盐霉素和莫能菌素。日本和欧盟等发达国家对鸡肉中的抗球虫药物残留均制定了相应的最大残留限量(MRLs)^[4,5]:氯羟吡啶(clopidol) 20 mg/kg(日本),二硝托胺(dinitolmide) 0.1 mg/kg(日本、欧盟),尼卡巴嗪(nicarbazin)(以 4,4'-二硝基均二苯脲(4,4'-dinitrocarbanilide)计) 0.2 mg/kg(日本),磺胺氯吡嗪(sulfachloropyrazine) 0.1 mg/kg(日本、欧盟),磺胺喹恶啉(sulfaquinoxaline) 0.05 mg/kg(日本)、0.1 mg/kg(欧盟),地克珠

利(diclazuril) 0.5 mg/kg(日本、欧盟),妥曲珠利(toltrazuril)(以妥曲珠利磺(toltrazuril sulfone)计) 0.9 mg/kg(日本)、0.1 mg/kg(欧盟)。因球虫对抗球虫药物易产生耐药性,在养殖生产中一般均采用多种药物联合使用和交替使用以达到较好的预防效果并减少耐药性的产生^[2,3],但这种用药方式也意味着鸡体内可能同时残留有多种药物,所以建立抗球虫药物多残留同时快速检测方法具有重要的意义。

QuEChERS(quick、easy、cheap、effective、rugged and safe)是用于高含水量食物中农药多残留检测的一种样品处理和净化技术^[6,7]。该技术面世后大受欢迎^[8-10]。该技术经历了多次的改进。这些改进主要是为了提高某些特定农药的回收率^[10-14]。从最初用于水果和蔬菜的分析,QuEChERS 方法还用于其他一些食物如蜂蜜、坚果、肉类、豆类、动物饲料、茶叶等分析前的样品处理^[14-20]。

本研究采用 QuEChERS 技术进行样品前处理,然后利用高效液相色谱-串联质谱法进行检测,建立了氯羟吡啶、二硝托胺、4,4'-二硝基均二苯脲、磺胺氯吡嗪、磺胺喹恶啉、地克珠利、妥曲珠利、妥曲珠利磺和妥曲珠利亚磺(toltrazuril sulfoxide) 9 种化合物(化学结构式见图 1)在鸡肉组织中多残留的同时检

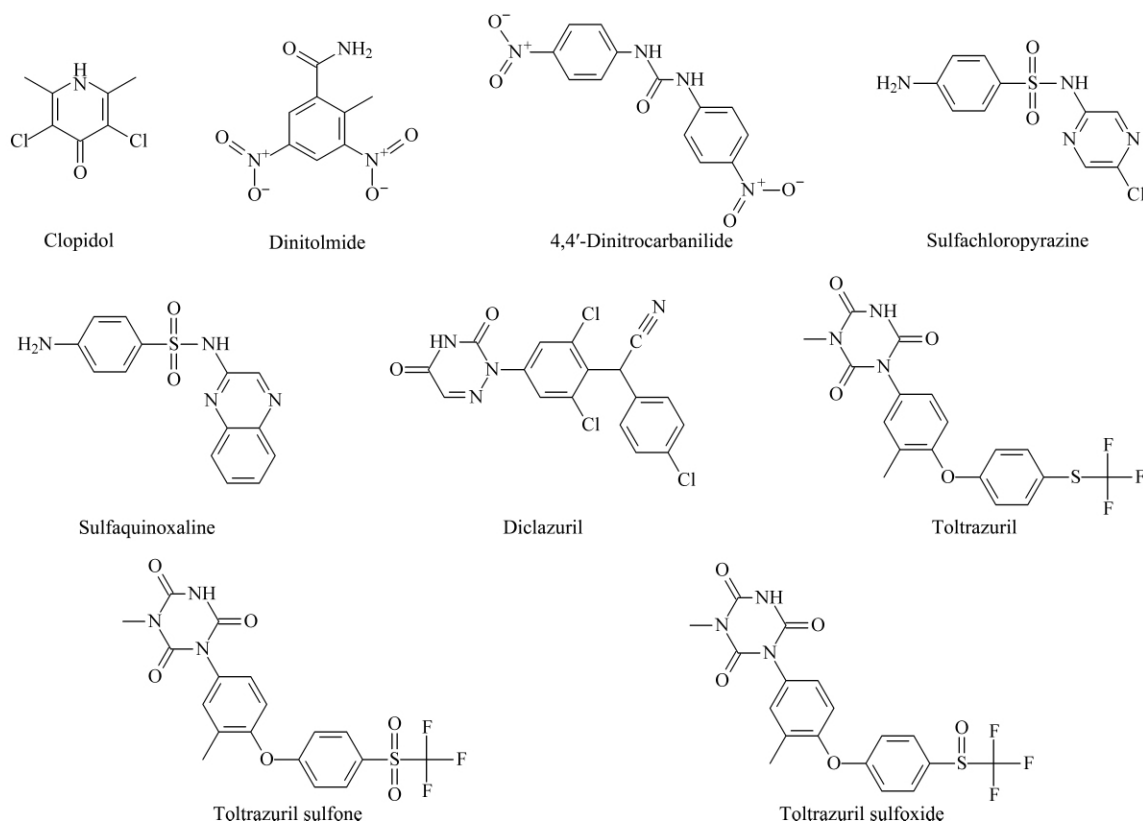


图 1 9 种化学合成类抗球虫药物的分子结构

Fig. 1 Molecular structures of nine chemically synthetic anticoccidial drugs

测方法。方法步骤简单,可操作性强,具有良好的准确度和精密度。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo Fisher TSQ Quantum Access Max 液相色谱-串联质谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);Mettler 十万分之一天平(瑞士 Mettler 公司);IKA T25 均质器、IKA MS1 振荡器(德国 IKA 公司);Sigma 33K 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司);N-EVAP-111 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

氯羟吡啶(纯度 98.0%)、二硝托胺(纯度 99.9%)、磺胺氯吡嗪(纯度 98.7%)、磺胺喹噁啉(纯度 99.5%) 标准品(Dr. Ehrenstorfer 公司);4,4'-二硝基均二苯胺(纯度 97.0%)、地克珠利(纯度 98.3%)、妥曲珠利(纯度 99.8%)、妥曲珠利砒(纯度 98.0%)、妥曲珠利亚砒(纯度 99.2%) 标准品和内标 D₃-妥曲珠利(纯度 99.8%) (Sigma-Aldrich 公司);乙腈、甲醇、二甲亚砜、甲酸(色谱纯,Merck 公司),水为 Milli-Q 超纯水;无水硫酸镁、中性 Al₂O₃ 粉(层析用)、N-丙基乙二胺粉(primary secondary amine, PSA)、二甲基十八碳硅烷粉(ODS)、弗罗里硅土(Florisil)、石墨化炭黑粉(GCB)、氨丙基粉(NH₂) (Sepax Technologies 公司)。

1.2 标准溶液的配制

准确称取氯羟吡啶、二硝托胺、4,4'-二硝基均二苯胺、磺胺氯吡嗪、磺胺喹噁啉各 10 mg,分别用乙腈溶解、稀释、定容至 100 mL;地克珠利、妥曲珠利、妥曲珠利砒、妥曲珠利亚砒各 10 mg,分别用 5 mL 四氢呋喃溶解,乙腈稀释并定容至 100 mL;分别得到质量浓度为 100 mg/L 的单标准储备液;内标 D₃-妥曲珠利用乙腈溶解、稀释为 200 µg/L 的工作液,避光于 4 °C 下保存。使用时用基质空白提取液稀释成适当浓度的标准工作液。为了避免分析物分

解,应采用棕色器皿保存,现用现配。

1.3 样品处理

准确称取 5.0 g 样品,置于 50 mL 塑料离心管中,加入 100 µL 内标、5.0 g 无水硫酸镁、2% 乙酸酸化乙腈/二甲亚砜(4:1, v/v) 15 mL,于均质机上高速均质 2 min 左右,于 10 000 r/min 下离心 10 min,取上清液 10 mL,转入含有 150 mg ODS、100 mg 石墨化炭黑和 100 mg 弗罗里硅土吸附剂的离心管中,涡旋混匀 2 min,离心后取 5 mL 上清液,氮吹至干,用 1 mL 初始流动相复溶,供测定。

1.4 HPLC-MS/MS 分析条件

1.4.1 HPLC 条件

色谱柱: Hypersil GOLD C18 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 µm);柱温: 35 °C;进样量: 10 µL;流动相: A 相为乙腈, B 相为 0.1% 甲酸水。梯度洗脱程序: 0 ~ 2.5 min, 80% B; 2.5 ~ 6 min, 80% B ~ 10% B; 6 ~ 9 min, 10% B; 9 ~ 9.1 min, 10% B ~ 80% B; 平衡 2 min。流速: 350 µL/min。

1.4.2 MS/MS 条件

电离源: 电喷雾离子源(ESI),负离子模式(-);扫描方式: 选择反应监测(SRM)模式;传输毛细管温度: 350 °C;干燥气温度: 150 °C;鞘气压力: 310.26 kPa;辅助气流速: 12 L/min;离子扫描气体压力: 13.79 kPa;电子倍增器电压: 2 500 V;碰撞气: 高纯氩气(纯度为 99.999%)。9 种化合物的质谱检测参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

9 种目标化合物中除了氯羟吡啶外均属于中等或弱极性物质,在水中的溶解度低,其中地克珠利只溶于四氢呋喃,在其他溶剂中溶解度低,但依据“相似相溶”的原则,对于痕量的残留检测而言,可以采用中等极性的甲醇、乙腈作为提取溶剂对地克珠利

表 1 9 种化学合成类抗球虫药的保留时间和质谱检测参数

Table 1 Retention times and MS/MS parameters of nine chemically synthetic anticoccidial drugs

Analyte	Retention time/min	SRM transition (m/z)	Collision energy/eV
Clopidol	4.80	190 > 190 [*] , 192 > 192	10, 10
Dinitolmide	5.97	224.1 > 151.3 [*] , 224.1 > 181.2	20, 14
4,4'-Dinitrocarbanilide	8.05	301.2 > 107.3, 301.2 > 137.3 [*]	22, 18
Sulfachloropyrazine	6.24	283.1 > 107.3, 283.1 > 156.2 [*]	22, 26
Sulfaquinoxaline	6.43	299.3 > 142.3 [*] , 299.3 > 144.3	42, 37
Diclazuril	8.22	405.4 > 334.2 [*] , 405.4 > 335.2	21, 20
Toltrazuril	8.31	424.4 > 424.4 [*]	10
Toltrazuril sulfone	7.71	456.4 > 456.4 [*]	10
Toltrazuril sulfoxide	7.43	440.4 > 371.4 [*] , 440.4 > 383.1	18, 14

* Quantitative ion.

进行提取,我们在前期研究^[21-23]中已验证了乙腈对地克珠利和妥曲珠利的提取效果。本实验中采用乙腈作为提取溶剂进行提取,结果显示乙腈对其他 7 种物质也获得了良好的提取效果。但使用乙腈作为提取剂,因地克珠利和妥曲珠利在 C18 上具有强保留性,经 C18 吸附剂 QuEChERS 净化后,其回收率只能达到 15%~20%,难以满足检测要求;而鸡蛋和鸡肉样品中含有大量的脂肪,只有使用 C18 作为吸附剂才能达到较好的净化效果。为了获得对 9 种物质均有较高回收率的 QuEChERS 净化方法,实验中比较了乙腈/四氢呋喃、乙腈/二甲基甲酰胺、乙腈/二甲亚砆、乙腈/乙酸乙酯等混合溶剂对 9 种化合物在 C18 上保留性能的影响,最终选择了 2% 乙酸酸化的乙腈/二甲亚砆(4:1, v/v) 作为提取溶剂。该混合溶剂既能有效地提取组织中的 9 种目标化

物,又能有效地沉淀蛋白质,减少杂质干扰,同时也利于下一步用 QuEChERS 技术进行净化。

2.2 各种吸附剂净化对回收率的影响

为了选择合适的吸附剂,首先考察了各种吸附剂(见表 2)对 9 种目标物回收率的影响。取 2 mL 乙酸酸化的乙腈/二甲亚砆(4:1, v/v)溶解的质量浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的 9 种药物的混合标准溶液,分别加入 150 mg 不同的吸附剂,经振荡、离心后,取上清液 1 mL 进行测定,重复 5 次试验,计算平均回收率,结果见表 2。由表 2 可以看出,ODS、弗罗里硅土和石墨化炭黑对所有目标化合物吸附均较少。实验中发现使用混合的吸附剂能够得到更好的净化效果,特别是对于含有色素的样品,因此我们选择使用 150 mg ODS、100 mg 石墨化炭黑和 100 mg 弗罗里硅土共同作为净化吸附剂。

表 2 不同吸附剂净化处理对 9 种药物回收率的影响($n=5$)

Table 2 Effects of different adsorbents used in purification of samples on recoveries of nine analytes ($n=5$)

%

Analyte	ODS	NH ₂	GCB	Neutral aluminium oxide	PSA	Florisil
Clopidol	98.4	78.5	93.1	17.6	12.7	97.3
Dinitolmide	92.8	61.0	85.2	84.5	49.5	86.9
4,4'-Dinitrocarbanilide	85.7	83.2	92.5	28.5	15.9	91.2
Sulfachloropyrazine	88.3	56.7	99.5	54.2	27.8	98.8
Sulfaquinoxaline	75.4	45.3	84.7	73.1	26.8	100.5
Diclazuril	95.9	38.8	90.3	29.7	34.9	94.7
Toltrazuril	89.5	47.2	87.4	62.6	37.1	98.5
Toltrazuril sulfone	90.8	49.1	89.8	52.9	42.1	99.2
Toltrazuril sulfoxide	94.6	57.2	91.5	35.4	40.5	95.3

ODS: octadecylsilyl; NH₂: aminopropyl; GCB: graphitized carbon black; PSA: primary secondary amine.

2.3 HPLC-MS/MS 条件的优化

在寻找目标物离子子的过程中,由于分子结构的原因,妥曲珠利和妥曲珠利砆在 ESI 负离子模式下,无论在何种碰撞能下都无法得到合适的子离子,故只能利用选择反应监测(SRM)模式对母离子进行检测,其信噪比可以满足要求。而氯羟吡啶、4,4'-二硝基均二苯脲和磺胺类物质在正、负离子模式下均可以获得良好的检测灵敏度,但仪器在正、负离子模式切换过程中会导致个别目标物丢失,所以对本文所有目标物均采用了负离子监测。鸡肉样品和添加 9 种药物(0.02 mg/kg)的鸡肉样品的 SRM 谱图见图 2。

2.4 线性范围、检出限、定量限、回收率与精密度

2.4.1 线性范围

用基质提取液配制一系列不同质量浓度的 9 种药物混合标准溶液,依次进样分析,以目标物峰面积和内标峰面积的比值 Y 为纵坐标、目标物质量浓度

X (mg/L) 为横坐标制作校准曲线。9 种分析物在 5~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.995。

2.4.2 检出限与定量限

取 10 个鸡肉样品,按 1.4 节的方法处理样品,以信噪比(S/N)=3 时的目标物浓度作为检出限(LOD)。同理,以 $S/N=10$ 时的目标物浓度为定量限(LOQ)。计算结果表明,9 种药物的 LOD 为 0.005~0.010 mg/kg,LOQ 均小于 0.020 mg/kg,能满足日本、欧盟等规定的 MRLs 检测要求。

2.4.3 回收率与精密度

用鸡肉样品中添加标准样品的方法进行回收率和精密度试验。分别对鸡肉样品进行 3 个不同加标水平的回收率测定,每个水平平行测定 5 次,计算回收率和相对标准偏差(RSD)。9 种药物在 20、50、150 $\mu\text{g/kg}$ 加标水平的回收率为 81.5%~103.6%,RSD 为 4.5%~14.5%(见表 3)。

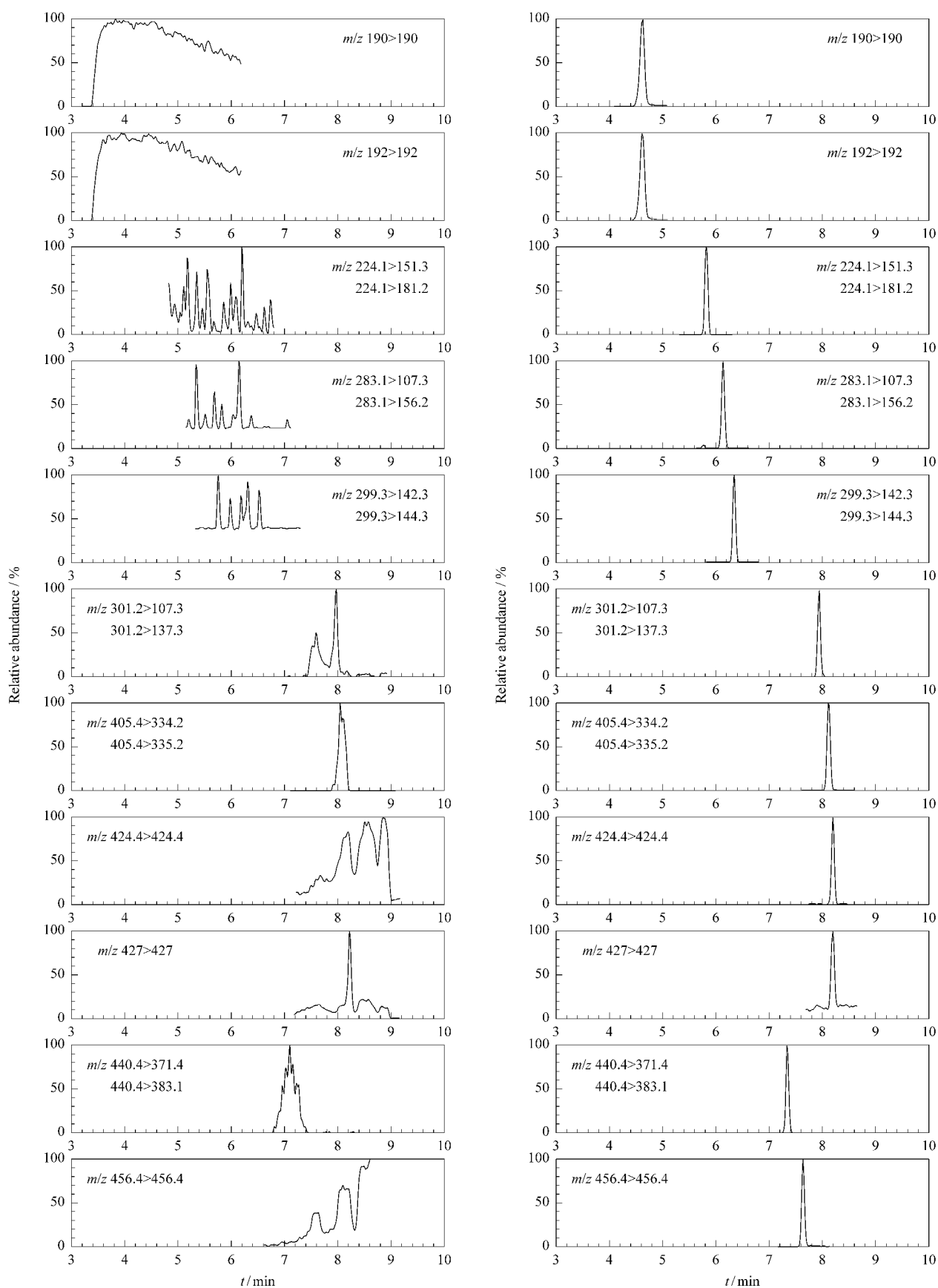


图2 (a) 鸡肉样品和(b) 添加9种化学合成类抗球虫药物(0.02 mg/kg)的鸡肉样品的SRM谱图

Fig. 2 SRM chromatograms of (a) a chicken meat sample and (b) a chicken meat sample spiked with nine analytes at 0.02 mg/kg

表 3 鸡肉样品中 9 种药物的加标回收率及相对标准偏差 ($n=5$)
Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of nine analytes
spiked in a chicken meat sample ($n=5$)

Analyte	Spiked at 20.0 $\mu\text{g/kg}$		Spiked at 50.0 $\mu\text{g/kg}$		Spiked at 150.0 $\mu\text{g/kg}$		%
	Recovery	RSD	Recovery	RSD	Recovery	RSD	
Clopidol	82.3	14.5	84.6	11.7	87.2	11.9	
Dinitolmide	96.4	9.4	92.5	10.3	97.7	8.5	
4,4'-Dinitrocarbanilide	100.5	5.7	103.6	6.2	102.9	4.5	
Sulfachloropyrazine	88.8	8.7	89.2	6.7	93.9	5.9	
Sulfaquinoxaline	81.5	12.9	87.4	10.4	95.9	9.8	
Diclazuril	98.6	7.6	99.3	6.9	95.5	7.3	
Toltrazuril	96.7	13.7	99.5	13.7	92.1	12.8	
Toltrazuril sulfone	86.3	13.1	91.7	12.7	94.5	12.8	
Toltrazuril sulfoxide	83.0	10.6	85.4	9.1	88.7	8.7	

3 结论

本文将应用于农药多残留分析的 QuEChERS 技术引入化学合成类抗球虫药多残留分析的样品前处理过程,采用高效液相色谱-串联质谱法同时检测确证鸡肉中残留的 9 种抗球虫药物及其代谢物。该方法具有适用性强、简单快速、经济等特点,各项技术指标均能满足日常检测分析的要求,可用于鸡肉中抗球虫药物的高通量检测。

参考文献:

- [1] Li J S, Qiu Y M, Wang C. Veterinary Drug Residues Analysis. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers (李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析. 上海: 上海科学技术出版社), 2002: 538
- [2] Chen Z L. Veterinary Pharmacology. Beijing: China Agriculture Press (陈杖榴. 兽医药理学. 北京: 中国农业出版社), 2002: 291
- [3] Shen J Z. Veterinary Pharmacology. Beijing: China Agricultural University Press (沈建忠. 兽医药理学. 北京: 中国农业大学出版社), 2000: 158
- [4] European Medicines Agency. Maximum Residue Limit Reports. [2012-04-29]. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/vet_mrl_search.jsp&mid=WC0b01ac058006488e
- [5] WTO/TBT-SPS Notification and Enquiry of China. Query Database of Japan Positive List (中国技术性贸易措施网. 日本肯定列表查询数据库). [2012-04-29]. <http://www.tbtsps.com/foodsafety/bz/Pages/japan.aspx>
- [6] Belmonte Valles N, Retamal M, Martínez-Uroz M A, et al. Analyst, 2012, 137(10): 2513
- [7] Xu Y, Shou L F, Wu Y L. J Chromatogr A, 2011, 1218(38): 6663
- [8] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412
- [9] Payá P, Anastassiades M, Mack D, et al. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(6): 1697
- [10] Lehotay S J, de Kok A, Hiemstra M, et al. J AOAC Int, 2005, 88(2): 595
- [11] Li J, Dong F, Xu J, et al. Anal Chim Acta, 2011, 702(1): 127
- [12] Riedel M, Speer K, Stuke S, et al. J AOAC Int, 2010, 93(6): 1972
- [13] Schenck F J, Hobbs J E. Bull Environ Contam Toxicol, 2004, 73(1): 24
- [14] Nguyen T D, Lee B S, Lee B R, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(18): 3115
- [15] Lehotay S J, Mastovska K, Lightfield A R, et al. J AOAC Int, 2010, 93(2): 355
- [16] Rouvière F, Buleté A, Cren-Olivé C, et al. Talanta, 2012, 93: 336
- [17] Lombardo-Agüí M, García-Campaña A M, Gámiz-Gracia L, et al. Talanta, 2012, 93: 193
- [18] Lopes R P, Reyes R C, Romero-González R, et al. Talanta, 2012, 89: 201
- [19] Gratz S R, Ciolino L A, Mohrhaus A S, et al. J AOAC Int, 2011, 94(5): 1601
- [20] Wiest L, Buleté A, Giroud B, et al. J Chromatogr A, 2011, 1218(34): 5743
- [21] Shi Z H, Zhu L Q, Lu Y Z, et al. Chinese Journal of Veterinary Science (施祖灏, 朱良强, 卢运战, 等. 中国兽医学报), 2009, 29(1): 79
- [22] Qi K Z, Shi Z H, Peng K S, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (祁克宗, 施祖灏, 彭开松, 等. 分析化学), 2007, 35(11): 1601
- [23] Shi Z H, Ge Q L, Lu J X, et al. Chinese Journal of Chromatography (施祖灏, 葛庆联, 陆俊贤, 等. 色谱), 2009, 27(3): 303