

QuEChERS 结合气质联用法测定猪肉中 苯巴比妥残留量

赵瑛博¹, 关丽², 周艳明^{1,2}

(1. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866) (2. 辽宁省水产品质量安全检验检测局, 辽宁沈阳 110034)

摘要: 本文建立了猪肉中苯巴比妥残留的 QuEChERS 气质联用检测方法。样品用乙腈、MgSO₄、醋酸钠提取溶液提取, MgSO₄+PSA+GCB+C18 净化, 采用毛细管气相色谱柱 DB-17 (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 分离, 电子轰击电离源 (EI), 在选择离子扫描 (SIM) 模式下测定, 定量离子 204 m/z、参考离子 232 m/z, 外标法定量。实验对提取剂是否酸化、提取盐种类以及吸附剂种类等条件的选择进行了讨论, 并以加标回收率作为考察指标, 优化了 QuEChERS 的前处理条件。同时, 讨论了方法的衍生条件及基质效应。实验表明, 苯巴比妥在 0.05 μg/mL~0.5 μg/mL 范围内线性关系良好, 最低检出限为 0.003 μg/mL、定量限为 0.01 μg/mL; 在 0.01、0.05、0.1 μg/g 添加水平下回收率在 75.4%~88.3% 之间, 相对标准偏差 (RSD%) 介于 4.66%~5.77% 之间。该方法操作简单、方便, 为肉类基质中的安眠药类残留检测提供了参考。

关键词: QuEChERS; GC-MS; 苯巴比妥

文章编号: 1673-9078(2015)8-329-333

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.8.051

Detecting Phenobarbital Residue in Pork via the Combination of Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) with Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-and-Safe (QuEChERS)

ZHAO Ying-bo¹, GUAN Li², ZHOU Yan-ming^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China)

(2. Liaoning Province Aquatic Products Quality and Safety Inspection and Testing Bureau, Shenyang 110034, China)

Abstract: A novel method for the detection of phenobarbital residue in pork using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) combined with the "Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe" (QuEChERS) was established here. The analytes were extracted using acetonitrile, MgSO₄, and NaAc solutions and purified with MgSO₄+PSA+GCB+C₁₈ adsorbents. The samples were then separated on a DB-17 capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) and the ion source was electron ionization (EI). The target compound was detected in the selected ion monitoring (SIM) mode; the quantitative ion was 204 m/z, the reference ion was 232 m/z, and external standard calibration was used for the quantitative analysis of phenobarbital. To optimize the pretreatment for QuEChERS, conditions such as acidification of the extraction solution, choices of extraction salts, and adsorbent type were discussed using the spike-recovery rate as the evaluation index. The derivative conditions and matrix effects were discussed as well. The results indicated that phenobarbital had satisfactory linearity from 0.05 to 0.5 μg/mL. The limit of detection (LOD) was 0.003 μg/mL and the limit of quantitation (LOQ) was 0.01 μg/mL. The recovery rates at three spiking levels (0.01, 0.05, and 0.1 μg/g) were 75.4% to 88.3%, and the relative standard deviations were 4.66% to 5.77%. The QuEChERS method combined with GC-MS was simple and convenient, which may provide a reference method for detecting hypnotic residues in meat matrix.

Key words: "quick-easy-cheap-effective-rugged-and-safe" method; gas chromatography-mass spectrometry; phenobarbital

苯巴比妥 (Phenobarbital) 为镇静安眠类药物, 属于巴比妥类药物。在畜牧业生产中经常被添加在饲

收稿日期: 2014-09-12

基金项目: 质检公益性行业专项资助项目 (201110207)

作者简介: 赵瑛博 (1979-), 女, 讲师, 博士研究生, 从事食品质量安全研

究。料中, 以减少动物的运动量和营养消耗, 达到快速增肥增重的效果。在现实中, 由于苯巴比妥具有蓄积性, 长期在动物饲料中添加会使其在动物体及人体内蓄积, 长期或一次性超剂量服用, 会引起中毒甚至致死。目前, 我国已禁止其在饲料和动物饮用水中使用, 在动物源性食品中苯巴比妥被列为不得检出的项目^[1]。

由于巴比妥类药物的安全隐患,使得包括苯巴比妥在内的该类药物的残留检测成为需要常规监测的项目之一。目前用于苯巴比妥残留量检测的方法有很多,包括液相色谱法^[1-2]、液质联用法^[3-5]、气相色谱法^[6]、气质联用法^[7-11]、酶联免疫法等^[12],其中液质联用法应用最多。由于苯巴比妥分子中包含苯环,中等极性,所以在液相色谱柱上有较好的保留,在检测器上有较高响应。与气相色谱法相比,液相方法的分离效率(柱效)较低,得到的色谱峰形较差。在使用气相色谱法测定时,由于苯巴比妥极性较高,气化困难,需要 CH_3I 等衍生剂进行衍生,而衍生剂价格较高,且衍生效率通常不高。Kanju Saka等人^[7]的文章指出,使用甲酸的乙酸乙酯溶液作溶剂,溶解苯巴比妥,再用气相色谱仪测定,获得了较高的衍生效率,降低了实验成本。本文也使用该方法检测苯巴比妥残留量。

目前,苯巴比妥残留量的测定主要集中在人体血浆、尿液等样本中^[3-4,6,9-11],针对动物源性食品的检测方法较少。在前处理过程中,采用的方法主要是液液萃取、固相萃取等方法。液液萃取的方法需要消耗大量的有机溶剂,操作繁琐,耗时较长,对目标物的损失较大。采用固相萃取的方法会使提取净化的效率有所提高,但实验成本较高,有时需要专用的设备,耗时较长。QuEChERS方法是近年来发展的一种高效、廉价、快速的前处理方法,与液液萃取和固相萃取方法相比其处理速度更快^[13]。

本文采用QuEChERS方法对猪肉组织中的苯巴比妥残留进行前处理,用气相色谱质谱联用的方法测定,提出了一种适合于常规检测苯巴比妥残留量的定性定量方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苯巴比妥(Phenobarbital, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)标准溶液,百灵威公司;N-丙基乙二胺(PSA)、石墨化炭黑(GCB)、 C_{18} 吸附剂,迪马公司;乙腈、甲醇(色谱纯),Fisher公司;乙酸乙酯、甲酸(分析纯),沈阳化学试剂厂;硫酸镁(MgSO_4)、醋酸钠(NaAc)(分析纯),国药集团化学试剂有限公司。

猪肉样品购自沈阳市三百利农贸市场。

1.2 主要仪器设备

气相色谱质谱联用仪,Agilent 7890A/5973C带自动进样器,Agilent Technologies Inc;DB-17毛细管气相色谱柱(30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$),Agilent

Technologies Inc;SHZ-D(III)循环水式真空泵,上海予正科技有限公司;HSC-12B氮吹仪,天津市恒奥科技发展有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 标准工作溶液的配制

精密量取100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的苯巴比妥标准溶液1 mL,转移至10 mL容量瓶中,用甲醇(色谱纯)稀释定容,得到10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液。分别移取50、100、200、500 μL 上述10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液于10 mL刻度试管,40 $^\circ\text{C}$ 氮气吹干,以3%甲酸-乙酸乙酯溶液定容,得到浓度为0.05、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准工作液。

1.3.2 样品前处理

提取:猪肉样品以绞肉机打成肉馅,称取15 g样品,加入50 mL离心管。向其中加入15 mL乙腈,4 g MgSO_4 以及1.5 g醋酸钠,剧烈震荡2 min,4000 r/m离心10 min。

净化:取8 mL上清液转移至另一离心管,加入1.2 g MgSO_4 、0.4 g PSA、0.4 g GCB、0.4 g C_{18} ,剧烈震荡2分钟,4000 r/m离心10 min。上清液用 N_2 吹干,残渣用3%甲酸-乙酸乙酯溶液1 mL溶解,过0.22 μm 滤膜,待测。

1.3.3 色谱质谱条件

色谱柱为DB-17毛细管色谱柱(30 $\text{m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$),载气为高纯氮,流速20 mL/min,进样量1 μL ,不分流。进样口温度300 $^\circ\text{C}$ 。采用程序升温模式,初始温度60 $^\circ\text{C}$,保持1 min,10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 升温至180 $^\circ\text{C}$,再以20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速率升至290 $^\circ\text{C}$,保持3 min。

传输线温度250 $^\circ\text{C}$,四级杆温度150 $^\circ\text{C}$,离子源温度230 $^\circ\text{C}$,电子轰击电离源(EI),电子能量70 eV,质量扫描范围50~500 m/z。定量离子204 m/z,参考离子232 m/z。选择离子扫描(SIM)模式测定。

1.3.4 数据分析

为了考察方法的灵敏度、准确度和精密度,进行加标回收率实验。

方法的灵敏度用最低检出限(LOD)和定量限表示。在空白样品中添加0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液1毫升,测定其信噪比,计算最低检出限($\text{S}/\text{N}=3$)及定量限($\text{S}/\text{N}=10$)。

方法的准确度和精密度分别用回收率和相对标准偏差(RSD)表示。分别在15 g空白猪肉样品中加入定量限、5倍定量限和10倍定量限三个水平的苯巴比妥标准溶液,按前述前处理方法和气相色谱质谱条件测定。每个添加水平做5个平行样品,计算方法回收

率和精密度。

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

QuEChERS 方法是 2003 年由 Anastasiades 和 Lehotey 共同创立的,最初的方法是采用乙腈作为提取剂, $MgSO_4$ 和 $NaCl$ 作为提取盐类,但是在针对农兽药的提取过程中,由于很多农兽药分子属于两性物质,其在不同的 pH 环境中解离状态不同,稳定性不同,所以提取时的 pH 条件对提取的效果会有较大的影响,本实验分别针对是否使用酸化提取剂和提取盐的种类进行了讨论。

2.1.1 提取剂的酸化

分别使用乙腈和 1% 乙酸-乙腈溶液作提取剂做加标回收率实验,添加的标样浓度为 $0.5 \mu g/mL$,添加量为 1 mL。

得到的回收率为 87.01% 和 80.15%,使用乙腈做提取剂的回收率较使用酸化乙腈的回收率更高,选择乙腈作为提取剂。

2.1.2 提取盐类的选择

采用乙腈作为提取剂,分别使用 $MgSO_4/NaAc$ 和 $MgSO_4/NaCl$ 柠檬酸钠/柠檬酸氢二钠作为提取盐做加标回收率实验,添加的标样浓度为 $0.5 \mu g/mL$,添加量为 1 mL。两种提取盐处理方法得到的回收率分别为 87.01% 和 84.18%。

$MgSO_4/NaAc$ 作为提取盐回收率更高,选择 $MgSO_4/NaAc$ 作为提取盐作为提取盐。

2.2 净化条件的选择

在净化步骤中,通常使用的吸附剂是 $MgSO_4$ 和 PSA,其中 $MgSO_4$ 的主要作用是去除样品基质中的水分,PSA 的主要作用是吸附基质中的碳水化合物、脂肪酸、有机酸、酚类和少量色素。在很多以农药为研究对象的方法中使用这两种盐和吸附剂就可以获得较好的效果;另外在一些色素含量高的样品中加入石墨化炭黑(GCB)的效果也很好。但是在本实验中研究对象为兽药(苯巴比妥),基质为猪肉,其脂肪和油脂的含量较高,所以本实验在净化过程中考虑将 C_{18} 也加入其中,用来去除基质中的脂肪等非极性干扰物。图 1 是使用各种吸附剂净化得到的 TIC 图。

从图 1 中可以看出,使用三种组合的吸附剂做净化,都有一定的净化效果,比较而言,处理 a 的杂质最多,处理 c (使用 $GCB+C_{18}$) 的净化效果最好,这种处理将与苯巴比妥最接近的杂质去除,在低浓度范

围内的定量结果将更准确。

本实验也对使用 3 种净化剂时苯巴比妥的回收率情况作出考查,结果如图 2 所示。

在回收率结果中可以看到,3 种吸附剂组合的回收率均能达到 80% 以上,但 b 和 c 两种吸附剂的回收率较 a 更高,在 84% 以上,且 b、c 之间差别不大,结合其净化效果,选择使用 $1.2 g MgSO_4+0.4 g PSA+0.4 g GCB+0.4 g C_{18}$ 作为净化吸附剂。

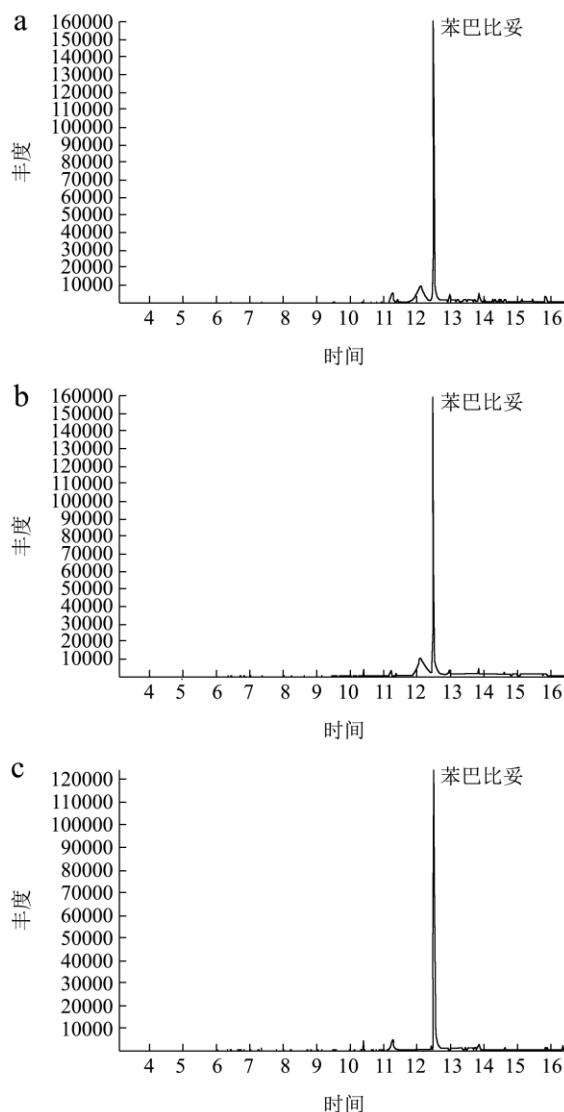


图 1 3 种净化吸附剂的净化效果

Fig.1 Effects of the 3 adsorbents

注: a. $1.2 g MgSO_4+0.4 g PSA$ 作为吸附剂净化的 TIC 图; b. $1.2 g MgSO_4+0.4 g PSA+0.4 g GCB$ 作为吸附剂净化的 TIC 图; c. $1.2 g MgSO_4+0.4 g PSA+0.4 g GCB+0.4 g C_{18}$ 作为吸附剂净化的 TIC 图。

2.3 基质效应

基质效应是在色质联用分析法中经常发生的现象,会影响定量结果的准确性,应对其大小进行评估。

基质效应(ME)按以下公式计算:

$$ME(\%) = \frac{|A_2 - A_1|}{A_1} \times 100$$

注: A_1 为溶剂配制的标准溶液的峰面积, A_2 为基质溶液配制的标准溶液峰面积。如果结果在 20% 以下, 认为基质效应不明显, 定量结果可以不做校正。

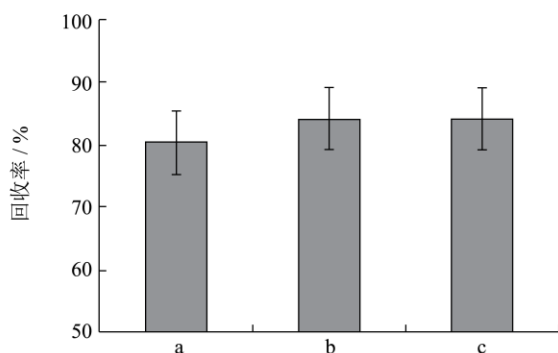


图 2 3 种净化吸附剂的苯巴比妥回收率

Fig.2 Recovery of phenobarbital for the 3 adsorbents

注: a. 1.2 g $MgSO_4$ +0.4 g PSA; b. 1.2 g $MgSO_4$ +0.4 g PSA+0.4 g GCB; c. 1.2 g $MgSO_4$ +0.4 g PSA+0.4 g GCB+0.4 g C_{18}

将猪肉样品按 1.3.2 的步骤处理, 得到的上清液作为基质溶液配制标样, 浓度分别为 0.05 $\mu g/mL$ 、0.1 $\mu g/mL$ 和 1 $\mu g/mL$, 测定其峰面积, 同时配制对应浓度的甲醇溶剂标准溶液, 计算基质效应。计算结果表明, 各浓度下的基质效应均小于 12%, 基质效应影响不显著。

2.4 3% 甲酸-乙酸乙酯的作用

有文章在测定苯巴比妥残留时不经过衍生直接测定, 本文也尝试采用这种方法测定, 但发现苯巴比妥响应极低, 不能满足残留测定的要求, 后采用 3% 甲酸-乙酸乙酯溶液作为溶剂溶解后测定, 苯巴比妥响应显著增加, 同时我们还对空白的 3% 甲酸-乙酸乙酯溶液进行了测定, 结果如图 3。

由图 3 可以看出, 仅使用甲醇作为溶剂时苯巴比妥的响应很低, 其色谱峰湮没在其它共存杂峰中, 很难分辨; 使用 3% 甲酸-乙酸乙酯作溶剂时, 因为甲基的加入使苯巴比妥的极性降低, 能够在色谱柱上更好的保留, 其响应有很大提高; 同时将 3% 甲酸-乙酸乙酯溶剂进样分析后发现其对苯巴比妥的测定并无干扰。

2.5 线性范围

将配制好的系列标准工作液按照色谱质谱条件测定, 根据溶液浓度与峰面积间的关系绘制标准曲线, 结果表明其线性关系良好, 线性范围、相关系数、曲

线方程见表 1。

表 1 线性范围、相关系数、曲线方程

Table 1 Linear range regression equation and correlation coefficient

目标物	线性范围 /($\mu g/mL$)	线性方程	相关系数 R
苯巴比妥	0.05~0.5	$y = 6.349 \times 10^5 - 2.103 \times 10^3$	0.9984

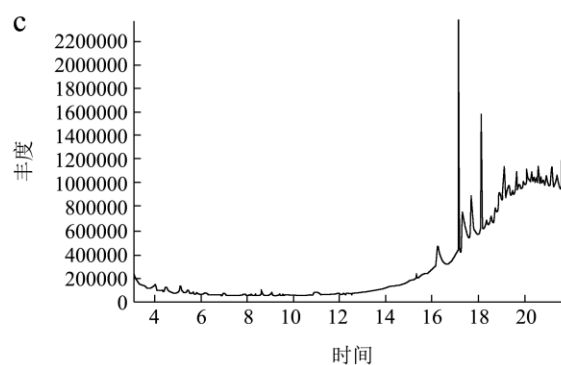
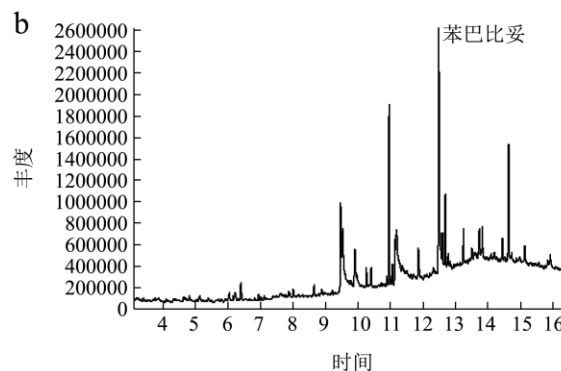
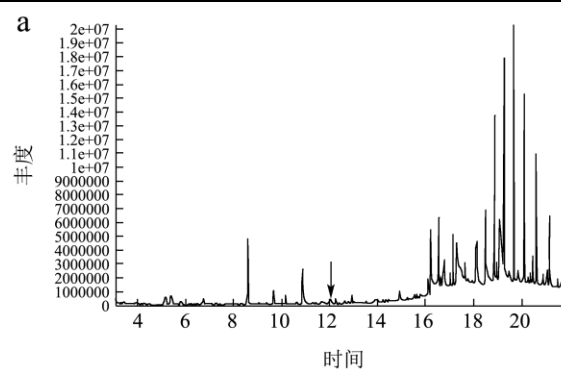


图 3 3%甲酸-乙酸乙酯的效果

Fig.3 Effect of 3% formic acid-ethyl acetate

注: a. 不使用衍生剂时 1 $\mu g/mL$ 苯巴比妥的甲醇标准溶液的 TIC 图; b. 3% 甲酸-乙酸乙酯作溶剂时 1 $\mu g/mL$ 苯巴比妥标准溶液的 TIC 图; c. 3% 甲酸-乙酸乙酯的 TIC 图。

2.6 检出限、回收率与精密度

根据 1.3.4 的实验方法, 在 0.05 $\mu g/mL$ 添加量的空白样品的总离子流图中测得信噪比 (S/N) 为 45.2, 进而计算出最低检出限为 0.003 $\mu g/mL$, 最低定量限为 0.01 $\mu g/mL$ 。方法的回收率和相对标准偏差结果如表

2。

从结果可以看出,在添加水平下,苯巴比妥的回收率在 75.4%~88.3%之间,相对标准偏差(RSD%)

介于 4.66%~5.77%之间,满足残留分析对于回收率和精密度的要求。

表 2 苯巴比妥的回收率

Table 2 Recovery of phenobarbital

添加水平 ($\mu\text{g/g}$)	回收率/%					平均回收率 /%	RSD /%
	1	2	3	4	5		
0.01	86.3	77.9	85.3	84.8	88.3	84.52	4.66
0.05	81.6	75.4	85.2	88.1	83.9	82.84	5.77
0.1	85.2	86.7	82.4	86.9	79.2	84.08	5.48

2.7 实际样品的测定

使用本文提出的方法,对从本地农贸市场购买的 5 个猪肉样品进行测定,均未发现有苯巴比妥残留。

3 结论

本文采用 QuEChERS 前处理方法,建立了猪肉中苯巴比妥残留的 GC-MS 检测方法。该方法前处理过程简单、快速,对猪肉中苯巴比妥残留的提取、净化效果较好;方法回收率、精密度、灵敏度等指标满足残留检测的要求,为肉类基质中安眠药物的检测提供了参考。

参考文献

- [1] 戴晓欣,朱新平,吴仕辉,等.固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中的苯巴比妥[J].食品科学,2012,33(18):232-235
DAI Xiao-xin, ZHU Xin-ping, WU Shi-hui, et al. Determination of phenobarbital residue in fishery products by SPE-HPLC [J]. Food Science, 2012, 33(18): 232-235
- [2] 王海娇,周艳明,牛森.高效液相色谱法测定猪肉中安定残留量[J].中国食品卫生杂志,2006,18(2):117-118
WANG Hai-jiao, ZHOU Yan-ming, NIU Sen. Determination of diazepam residue in pork by HPLC [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2006, 18(2): 117-118
- [3] Yasushi Hori, Manami Fujisawalurea, Kenji Shimada, et al. Method for screening and quantitative determination of serum levels of salicylic acid, acetaminophen, theophylline, phenobarbital, bromvaleryl, pentobarbital using liquid chromatography/electrospray mass spectrometry [J]. Biol. Pharm. Bull., 2006, 29(1): 7-13
- [4] Faqing Ye, Jianchun Pan, Guoxin Hu, et al. LC-APCI-MS simultaneous determination of barbital, amobarbital, phenobarbital and secobarbital in human plasma [J]. Chromatographia, 2010, 72(8): 743-746

- [5] 渠岩,路勇,冯楠,等.基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中残留的 13 种镇静药物[J].食品科学,2012,33(8):252-255
QU Yan, LU Yong, FENG Nan, et al. Determination thirteen sedative residues in meat by matrix solid phase dispersion-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2012, 33(8): 252-255
- [6] C Kim R Berg, J M Khanna. Rapid and sensitive gas chromatographic method for detection of barbital and pentobarbital in blood using flash heater methylation and nitrogen-specific detection [J]. Chromatographia, 1987, 23(4): 269-272
- [7] Kanju Saka, Koichi Uemura, Kaori Shintani-Ishida. Determination of barbital and phenobarbital in serum by gas chromatography-mass spectrometry with addition of formic acid to the solvent [J]. Journal of Chromatography B, 2008, 869(5): 9-15
- [8] U Staerk, W R K ülpmann. High-temperature solid-phase microextraction procedure for the detecton of drugs by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B, 2000, 745(5): 399-411
- [9] 张炳谦,王国强,孙桂进,等.GPC-GC/MS 法分析 20 种安眠镇静药物[J].中国法医学杂志,2013,28(4):327-330
ZHANG Bing-qian, WANG Guo-qiang, SUN Gui-jin, et al. GPC-GC/MS analyzed 20 kinds of hypnotic sedative drug ingredients in blood [J]. Chin. J. Forensic. Med., 2013, 28(4): 327-330
- [10] 陈建虎.固相萃取/离子阱气相色谱质谱联用对血液中多种安眠药物的同时测定[J].分析测试学报, 2010,29(1):84-87
CHEN Jian-hu. Simultaneously determination of varioshypnotics in human blood by solid phase extraction/ion trap gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2010, 29(1):84-87
- [11] 唐磊,应剑波.快速溶剂萃取-气相色谱-串联质谱法测定血中巴比妥类药物[J].理化检验-化学分册,2012,48(7): 845-

847

TANG Lei, YING Jian-bo. GC-MS/MS determination of barbiturate drugs in blood with accelerated solvent extraction [J]. *Ptca(Part B:Chem Anal)*, 2012, 48(7): 845-847

- [12] Yue N, Wu L, Li L, et al. Multi-residue detection of benzodiazepines by ELISA based on class selective antibodies [J]. *Food Agr Immunol*, 2009, 20(4): 281-293
- [13] Minaleshewa Atlabachew, Nelson Torto, Bhagwan Sigh Chandravanshi, et al. Determination of psychoactive phenylpropylamino alkaloids from khat (*catha edulis forsk*) chewing leaves [J]. *Chromatographia*, 2013, 76: 401-408