

分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱测定 肉制品中 5 类药物残留

刘冬虹, 吴玉銮, 王斌, 董浩, 王莉, 罗海英

(广州质量监督检测研究院, 国家加工食品质量监督检验中心(广州), 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广东广州 510000)

摘要: 建立了同时测定肉制品中 16 种 β -激动剂、6 种头孢菌素类、6 种青霉素类、3 种氟喹诺酮类和 2 种糖肽类药物的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)方法。样品经酶解后,以 0.1%甲酸-乙腈(体积分数)提取,分散固相萃取净化,串联质谱ESI正、负模式电离,多反应监测(MRM)模式检测,以保留时间和子离子丰度比定性,外标法定量。结果表明,33 种目标物在 1.0~300 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.996, β -激动剂和氟喹诺酮类药物的方法检出限(LOD, $S/N=3$)为 0.5 $\mu\text{g/kg}$,其他目标物的 LOD 为 3.0 $\mu\text{g/kg}$;加标水平为 2.0~100 $\mu\text{g/kg}$ 时($n=6$),平均回收率为 74.9%~112%,相对标准偏差为 2.2%~10.8%。方法准确、灵敏,适用于肉制品中 β -激动剂、头孢菌素类、青霉素类、氟喹诺酮类和糖肽类等药物残留的高通量测定。

关键词: β -激动剂; 抗生素; 肉制品; 超高效液相色谱串联质谱法

文章编号: 1673-9078(2016)10-290-296

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.043

Analysis of Five Types of Veterinary Drug Residues in Meat Products by Dispersive Solid Phase Extraction-UPLC-MS/MS

LIU Dong-hong, WU Yu-luan, WANG Bin, DONG Hao, WANG Li, LUO Hai-ying

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, National Centre for Quality Supervision and Testing of Processed Food(Guangzhou), Guangzhou Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou Research centre of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou 510000, China)

Abstract: A high-throughput method was established for simultaneous determination of 33 β -agonists, six cephalosporins, six penicillins, three fluoroquinolones, and two glycopeptides in meat products by dispersive solid phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). After enzymolysis treatment, the sample was extracted with 0.1% formic acid-acetonitrile (volume fraction), and purified with dispersive solid phase extraction. The resultant sample was analyzed by positive and negative electrospray ionization (ESI+/-) tandem mass spectrometry under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The qualitative analysis was performed using retention time and ion abundance ratio, and the quantitative analysis was performed using external standard method. The results showed that the 33 target compounds displayed a good linearity in the concentration range of 1.0~300 $\mu\text{g/L}$, with correlation coefficients larger than 0.996. The limits of detection (LOD, $S/N=3$) were 0.5 $\mu\text{g/kg}$ for β -agonists and fluoroquinolones and 3 $\mu\text{g/kg}$ for the others. At spiked levels of 2.0~100 $\mu\text{g/kg}$, the average recoveries were in the range of 74.9~112%, and the RSDs ranged from 2.2% to 10.8%. The developed method is accurate, sensitive, and suitable for the high-throughput quantitative and qualitative analysis of β -agonist, cephalosporin, penicillin, fluoroquinolone, and glycopeptide multi-residues in meat products.

Key words: β -agonist; antibiotic; meat products; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

兽药在防治疾病、促进生长等方面起着重要作用,但在禽畜养殖过程中由于不合理使用和滥用抗生素、

收稿日期: 2016-03-03

基金项目: 国家科技部港澳台科技合作专项基金资助(2013DFH30070)

作者简介: 刘冬虹(1966-),女,高级工程师,研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 罗海英(1976-),女,博士,高级工程师(教授级),研究方向:

食品安全检测

β -激动剂等药物,不遵守休药期等行为,导致动物源性食品中药物残留问题不断增加,成为影响肉制品质量安全的主要因素,对食用者的身体健康造成潜在危害。国际食品法典委员会(CAC)已对动物组织及产品中兽药残留的最高残留限量(MRL)作出了规定^[1],国内外多个国家和地区亦制定了多类药物在禽畜生产中的使用及残留限量的相关规定^[2-5]。其中, β -激动剂、

头孢菌素、青霉素、氟喹诺酮和糖肽类抗生素均是上述通告规定中禁限用的药物。

目前国内外已有检测动物源性食品中 β -激动剂^[6,7]、头孢菌素^[8-10]、青霉素^[11]、氟喹诺酮^[12-14]、糖肽类^[15]等药物残留的标准或文献报道,但根据报道的方法,检测上述 5 类药物残留至少需要 5 种不同的方法,不利于大批量样品的检测。因此,开发肉制品中多药物残留的高通量检测方法,有利于提高检测效率,降低检测成本。

本实验采用分散固相萃取净化,超高效液相色谱-串联质谱多反应监测模式,同时测定肉制品中 β -激动剂(特布他林、沙丁胺醇、西马特罗、丙卡特罗、非诺特罗、赛布特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、妥布特罗、克伦特罗、溴代克伦特罗、溴布特罗、马布特罗、马喷特罗、苯乙醇胺 A、喷布特罗),头孢菌素(头孢匹林、头孢唑啉、头孢洛宁、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢呋辛),青霉素(氨苄青霉素、苯氧甲基青霉素、阿莫西林、苯唑青霉素、阿洛西林、双氯青霉素),氟喹诺酮(诺氟沙星、麻保沙星、奥比沙星),糖肽类抗生素(去甲万古霉素、万古霉素)共 33 种药物残留。并对市售肉制品进行测定,分析目前市售肉制品药物残留相关问题。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY™ 超高效液相色谱和 Waters Xevo™ TQ MS 三重四极杆串联质谱仪(UPLC-MS/MS, Waters 公司); 5418 高速离心机(德国 Eppendorf 公司); T18 均质器、MS3 basic 漩涡混合器(德国 IKA 公司); N-EVAP 112 水浴氮吹仪(美国 OA 公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

特布他林、沙丁胺醇、西马特罗、丙卡特罗、非

诺特罗、赛布特罗、莱克多巴胺、氯丙那林、妥布特罗、克伦特罗、溴代克伦特罗、溴布特罗、马布特罗、马喷特罗、苯乙醇胺 A、喷布特罗、头孢匹林、头孢唑啉、头孢洛宁、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢呋辛、氨苄青霉素、苯氧甲基青霉素、阿莫西林、苯唑青霉素、阿洛西林、双氯青霉素、诺氟沙星、麻保沙星、奥比沙星、去甲万古霉素、万古霉素,纯度均大于 98.0% (Dr. Ehrenstorfer 公司,德国)。 β -葡糖醛酸苷肽酶(98000 unit/mL, 美国, Sigma 公司); 甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, 美国, ThermoFisher 公司); C18, PSA, Carbon-GCB (CNW 公司); 乙酸、乙酸钠、无水硫酸镁(分析纯, 中国, 广州化学试剂厂)。

33 种目标物用甲醇配成单标标准储备液, -18 °C 恒温避光保存; 分别吸取适量的单标标准储备液, 用甲醇逐级稀释成 1.0 mg/L 的混合标准溶液, 置于 4 °C 恒温避光保存, 临用时, 用 0.1% 甲酸-乙腈溶液(体积分数) 稀释成所需浓度的混合标准工作液。

1.2 样品的处理

称取已均质的试样 2.0 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 塑料离心管中, 分别加入 8 mL 乙酸-乙酸钠缓冲液(0.2 mol/L, pH=5.2) 和 50 μ L β -葡糖醛酸苷肽酶, 涡旋混匀, 于 37 °C 振荡酶解 16 h。取出冷却至室温后, 加入 15 mL、0.1% 甲酸-乙腈(体积分数), 涡旋振荡 3 min, 8000 r/min 离心 5 min, 转移上清液。提取液中加入 C18 100 mg、PSA 50 mg、GCB 20 mg、MgSO₄ 500 mg, 涡旋振荡 5 min、8000 r/min 离心 5 min, 上清液于 40 °C 水浴氮吹至近干, 0.1% 甲酸-乙腈溶液(体积分数) 复溶残渣并定容至 1 mL, 过 0.22 μ m 滤膜, 供 UPLC-MS/MS 测定。

1.3 仪器条件

表 1 32 种待测物的保留时间和质谱分析条件

Table 1 Retention time and MS parameters for the analysis of 32 target compounds

NO.	Compound	Formula	Mode	Retention time/min	Confirmation ion/(m/z)	Cone voltage/V	Collision energy/eV
1	Terbutaline	C ₁₂ H ₁₉ NO ₃	ESI+	1.75	225.9>125.1	20	25
					225.9>152.0*		17
2	Salbutamol	C ₁₃ H ₂₁ NO ₃	ESI+	1.71	239.9>148.0*	17	20
					239.9>222.1		10
3	Cimaterol	C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O	ESI+	1.96	219.9>160.0*	12	17
					219.9>202.1		10

转下页

接上页							
4	Procaterol	$C_{16}H_{22}N_2O_3$	ESI+	2.01	290.9>231.0	20	20
					290.9>273.1*		15
5	Fenoterol	$C_{17}H_{21}NO_4$	ESI+	2.79	303.9>107.1*	25	35
					303.9>135.0		18
6	Cimbuterol	$C_{13}H_{19}N_3O$	ESI+	2.71	234>160.0*	15	15
					234>216.1		10
7	Ractopamine	$C_{18}H_{23}NO_3$	ESI+	4.19	301.9>107.1*	20	32
					301.9>164.1		17
8	Clorprenaline	$C_{11}H_{16}ClNO$	ESI+	4.27	213.9>154.0*	17	17
					213.9>196.1		12
9	Tulobuterol	$C_{12}H_{18}ClNO$	ESI+	4.67	227.8>154.0*	20	17
					227.8>172.0		12
10	Clenbuterol	$C_{12}H_{18}Cl_2N_2O$	ESI+	4.70	276.9>202.9*	17	17
					276.9>259.0		12
11	Bromchlorbuterol	$C_{12}H_{18}BrClN_2O$	ESI+	4.87	322.8>248.9*	17	18
					322.8>304.9		12
12	Brombuterol	$C_{12}H_{18}Br_2N_2O$	ESI+	5.04	366.7>292.8*	17	20
					366.7>348.8		13
13	Mabuterol	$C_{13}H_{18}ClF_3N_2O$	ESI+	5.30	310.8>217.0	20	25
					310.8>236.9*		17
14	Mapenterol	$C_{14}H_{20}ClF_3N_2O$	ESI+	5.78	324.9>216.9	22	25
					324.9>236.9*		17
15	Phenylethanolamine A	$C_{19}H_{24}N_2O_4$	ESI+	6.26	344.9>150.1*	15	22
					344.9>327.0		15
16	Penbutolol	$C_{18}H_{29}NO_2$	ESI+	7.34	292>133.0	25	25
					292>236.0*		17
17	Norvancomycin	$C_{65}H_{71}Cl_2N_9O_{24}$	ESI+	1.90	718.2>100.0*	17	27
					718.2>144.0		15
18	Vancomycin	$C_{66}H_{74}Cl_2N_9O_{24}$	ESI+	2.19	725.5>100.1*	17	40
					725.5>144.0		15
19	Norfloxacin	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	ESI+	3.88	319.9>276.1	27	17
					319.9>302.1*		22
20	Marbofloxacin	$C_{17}H_{19}FN_4O_4$	ESI+	3.75	363>72.1*	25	20
					363>345.1		22
21	Orbifloxacin	$C_{19}H_{20}F_3N_3O_3$	ESI+	4.37	396>295.1*	27	25
					396>352.2		18
22	Cephapiriin	$C_{17}H_{17}N_3O_6S_2$	ESI+	2.25	423.9>152*	20	25
					423.9>292.1		15
23	Cefazolin	$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$	ESI+	4.10	454.8>156*	17	17
					454.8>322.9		10
24	Cefalonium	$C_{20}H_{18}N_4O_5S_2$	ESI+	3.55	459>152*	15	20
					459>337.1		10

转下页

接上页							
25	Ceftiofur	C ₁₉ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₃	ESI+	5.27	523.9>210	25	22
					523.9>241*		17
26	Cefoperazone	C ₂₅ H ₂₇ N ₉ O ₈ S ₂	ESI+	4.63	646>143.1*	15	35
					646>530.1		12
27	Ampicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₄ S	ESI+	3.65	349.9>106.1*	17	20
					349.9>192		17
28	Penicillin V	C ₁₆ H ₁₈ N ₂ O ₅ S	ESI+	6.18	350.9>160*	12	15
					350.9>192		12
29	Amoxicillin	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	ESI+	1.78	365.9>114*	12	20
					365.9>349		9
30	Proctaphlin	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	ESI+	6.38	402>160.1	15	12
					402>243		12
31	Azlocillin	C ₂₀ H ₂₃ N ₅ O ₆ S	ESI+	5.17	462>218.1*	20	22
					462>246.1		12
32	Dicloxacillin	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₅ S	ESI+	7.09	469.9>160*	17	15
					469.9>310.9		15
33	Cefuroxim	C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₈ S	ESI-	4.33	422.8>207*	12	15
					422.8>318		7

注: *为定量离子对。

色谱柱: BEH C18 色谱柱, 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm; 流动相: A, 0.1%甲酸(体积分数), B, 乙腈。梯度洗脱程序: 0.0~2.0 min, 90%~85% A; 2.0~9.0 min, 85%~10% A; 9.0~10.0 min, 10% A; 10.0~10.1 min, 10%~90% A; 10.1~13.0 min 90% A; 进样量: 2 μL; 柱温: 35 °C。33 种待测物的保留时间见表 1。

质谱条件: ESI 正、负模式, 毛细管电压 1.0 kV; 离子源温度 150 °C; 去溶剂气温度 400 °C; 去溶剂气: 氮气, 800 L/h; 锥孔气: 氮气, 50 L/h; 碰撞气: 高纯氩气, 0.15 mL/min; 检测模式: 多反应监测(MRM)模式; 33 种待测物监测离子对(*m/z*)及锥孔电压、碰撞能等参数见表 1, 每个离子对的驻留时间均为 0.01 s。

2 结果和讨论

2.1 质谱条件的优化

头孢菌素(除头孢呋辛)、氟喹诺酮、青霉素和 β-激动剂在 ESI⁺下可获得较高响应的[M+H]⁺峰, 2 种糖肽类抗生素在 ESI⁺下产生双电荷离子[M+H]²⁺, 形成 *m/z*=725.5 和 *m/z*=718.2 离子峰, 头孢呋辛在 ESI⁺下产生[M-H]⁻离子峰。对确定的母离子进行二级质谱扫描, 每种化合物均选择 2 个主要特征碎片离子作为定性与定量离子, 通过优化碰撞电压, 使特征碎片离子强度达到最高, 经优化的质谱条件见表 1。头孢菌素的二级质谱裂解包括 C-O 键断裂引起的 NH₂COOH 和

CH₃COOH 中性丢失, 以及 β 内酰胺环发生开环断裂失去噻嗪环及侧链; 氟喹诺酮类药物的二级质谱中主要碎片离子峰是脱水峰、脱羧峰以及脱羧后噻嗪环断裂发生结构重排失去 C₂H₄NR 的产物离子; 青霉素类药物主要发生 CO₂ 的丢失、β-内酰胺环的断裂及侧链上 C-N 键的断裂; β-激动剂的二级质谱碎片包括与羟基、叔丁基、异丙基、异丙氨基等基团相关的中性丢失碎片, 产生[M+H-18]⁺、[M+H-56]⁺、[M+H-74]⁺等碎片离子。

2.2 液相条件的优化

甲醇含有羟基, 会加速青霉素降解为青霉素噻唑酸酯, 选择乙腈为有机相, 各目标物的响应和分离效果比甲醇更理想。水相中加入适当浓度的甲酸(体积分数 0.1%), 可促进色谱柱填料中残留硅醇基质子化, 降低其对含碱基基团的氟喹诺酮和 β-激动剂的吸附, 此外, 在保证头孢呋辛(ESI 模式电离)响应值的前提下, 有利于经 ESI⁺模式电离的目标物离子化, 改善峰型、增加分离度和响应强度。

本实验同时考察了 Waters BEH C18 色谱柱和 Agilent Eclipse Plus C18 色谱柱对目标物的色谱分离效果和响应值的影响, 结果显示, 使用 Eclipse Plus C18 色谱柱测定时, 沙丁胺醇、特布他林等含酚羟基的药物保留较弱, 且青霉素类和糖肽类药物的峰型拖尾, 响应值明显低于 BEH C18 色谱柱。通过优化梯度洗脱

程序使各目标物的峰型和响应值满足检测要求。各分析物混合标准溶液(50 μg/L)的提取离子色谱图见图1。

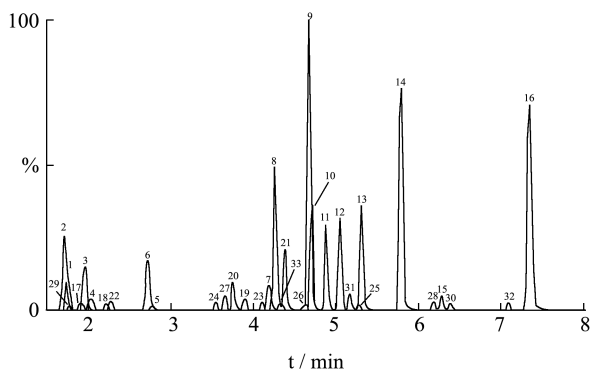


图1 各目标物的提取离子色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of 33 targets

注: 各色谱峰序号所代表物质参见表1。

2.3 提取条件的选择

目标物中, 沙丁胺醇、莱克多巴胺等苯酚型结构

表2 不同溶剂对各类目标物的提取效率

Table 2 Extraction efficiencies of targets extracted by different solvents

	Extraction efficiency/%			
	Acetonitrile	0.1% Formic acid-acetonitrile	0.5% Formic acid-acetonitrile	1% Formic acid-acetonitrile
<i>β</i> -agonists	86~92	85~112	75~91	82~95
Cephalosporins	88~108	86~92	82~89	72~88
Penicillins	89~103	79~91	82~83	55~69
Fluoroquinolones	65~81	82~93	83~91	86~99
Glycopeptides	38~46	75~82	81~88	78~85

2.4 净化条件的选择

肉制品基质复杂, 提取液中含有脂肪、蛋白水解物、色素等杂质, 若净化不干净会引起较强的基质效应, 本实验考察了不同 C18、PSA、GCB 和 MgSO₄ 的配比组合对阴性腊肠加标样品 (50 μg/kg) 的净化回收效果 (见图3, 其中: ①为 100 mg C18 和 50 mg PSA, ②为 100 mg C18、50 mg PSA、50 mg GCB 和 500 mg MgSO₄, ③为 100 mg C18、50 mg PSA、20 mg GCB 和 500 mg MgSO₄)。C18 固相分散剂能去除提取液中的亲脂性杂质, GCB 可有效吸附色素, PSA 可去除有机酸类杂质, MgSO₄ 的加入可除去提取液中的水分, 降低大部分水溶性杂质在提取液中的溶解度。实验显示, 经组合①净化后, 提取液浓缩后仍有明显的色素残留; 加入 50 mg GCB 和 500 mg MgSO₄ 后 (组合②), 提取液澄清易浓缩, 但 *β*-激动剂、青霉素类等含苯环的目标物回收率明显降低; 减少 GCB 用量 (组合③), 能有效吸附色素, 同时保证具苯环结构的

的 *β*-激动剂, 与蛋白结合率较高, 采用 *β*-葡萄糖苷酶酶解样品, 使目标物游离^[16]。样品酶解后, 比较了乙酸乙酯和乙腈的提取效果, 结果显示, 乙酸乙酯提取时, 提取液中油脂含量较大, 不利于后续的净化; 乙腈作提取液时, 可与酶解用的乙酸钠缓冲液因盐析作用实现良好的分层, 样品中的盐类物质及色素等极性较强的物质保留在水相中不被提取, 此外, 乙腈具有沉淀蛋白的作用, 有利于后续的净化和浓缩。实验比较了乙腈及 0.1%、0.5%、1%甲酸 (体积分数) -乙腈作提取液时, 对阴性加标 (50 μg/kg) 腊肠样品中各类目标物的提取效率 (表2)。结果显示, 乙腈中加入甲酸后, 氟喹诺酮类和糖肽类药物的提取效率有所提高, 但对于青霉素类药物, 其 *β*-内酰胺环在酸性条件下不稳定, 易发生分解, 提取效率随甲酸浓度的增加而降低, 因此, 综合考虑, 选择 0.1%甲酸-乙腈作提取溶剂, 各目标物提取效率为 75%~112%。

目标物的净化回收率。

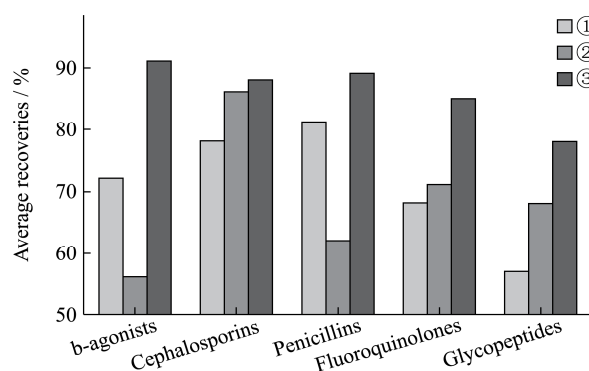


图3 不同配比组合的分散固相萃取对5类目标物的平均回收率的影响

Fig.3 Effects of different combinations of dispersive solid phase extraction agents on the average recoveries of the five kinds of analysts

注: ①100 mg C18 和 50 mg PSA; ②100 mg C18、50 mg PSA、50 mg GCB 和 500 mg MgSO₄; ③100 mg C18、50 mg PSA、20 mg GCB 和 500 mg MgSO₄。

2.5 基质效应

本实验依据 Matuszewski 等建立的基质效应确认方法^[17], 配制浓度为 5.0~200 $\mu\text{g/L}$ 的系列基质匹配校准工作液和纯溶剂标准溶液进行测定, 分别绘制标准曲线, 计算基质校准曲线与纯溶剂曲线的斜率比值, 结果显示 β -激动剂、糖肽类抗生素的斜率比值均大于 1.5,

氟喹诺酮、青霉素类目标物的比值为 1.2~1.4, 头孢菌素类药物的比值为 0.8~1.1, 说明除头孢菌素类药物外, 其它目标物存在一定基质增强效应, 本实验采用阴性基质匹配校准曲线进行校正补偿, 以减小基质对检测结果的影响。

2.6 线性关系与检出限

表 3 33 种目标物的线性范围、相关系数、检出限、回收率和精密度

Table 3 Regression relationship, detected limits, recoveries, and RSDs of the 33 target analytes

Compound	Linear range/ $\mu\text{g/L}$	Regression equation	r^2	LOD/ $\mu\text{g/kg}$	Spiked/ $\mu\text{g/kg}$	Average recoveries/%	RSD/%
Terbutaline	1.0~200.0	$y=956.2x+243.4$	0.9992	0.5	2.0, 5.0, 20.0	78.6, 86.4, 95.3	5.7, 3.2, 2.6
Salbutamol	1.0~200.0	$y=1608.3x+456.1$	0.9995	0.5	2.0, 5.0, 20.0	82.6, 93.5, 90.8	6.5, 3.8, 4.3
Cimaterol	1.0~200.0	$y=1178.1x+386.4$	0.9996	0.5	2.0, 5.0, 20.0	86.4, 92.8, 102	4.9, 5.1, 4.1
Procaterol	1.0~200.0	$y=335.3x+182.7$	0.9983	0.5	2.0, 5.0, 20.0	88.7, 98.5, 94.6	6.3, 4.8, 3.2
Fenoterol	1.0~200.0	$y=324.8x+126.4$	0.9978	0.5	2.0, 5.0, 20.0	83.8, 104, 95.4	5.8, 7.2, 4.4
Cimbuterol	1.0~200.0	$y=1342.8x+572.1$	0.9998	0.5	2.0, 5.0, 20.0	108, 88.3, 91.4	8.5, 5.4, 3.7
Ractopamine	1.0~200.0	$y=902.3x+277.0$	0.9990	0.5	2.0, 5.0, 20.0	91.7, 112, 98.5	6.3, 7.4, 5.5
Clorprenaline	1.0~200.0	$y=3502.1x+729.3$	0.9996	0.5	2.0, 5.0, 20.0	85.2, 88.9, 107	3.6, 4.7, 2.9
Tulobuterol	1.0~200.0	$y=4401x+913.4$	0.9995	0.5	2.0, 5.0, 20.0	91.4, 96.4, 86.9	4.4, 6.3, 3.7
Clenbuterol	1.0~200.0	$y=2680.3x+624.7$	0.9994	0.5	2.0, 5.0, 20.0	92.6, 89.6, 103	4.2, 3.8, 3.3
Bromchlorbuterol	1.0~200.0	$y=1787.1x+543.4$	0.9995	0.5	2.0, 5.0, 20.0	89.3, 85.9, 94.5	5.4, 6.4, 4.7
Brombuterol	1.0~200.0	$y=2025.5x+642.8$	0.9991	0.5	2.0, 5.0, 20.0	93.8, 91.9, 111	4.2, 3.8, 5.1
Mabuterol	1.0~200.0	$y=2432.6x+716.8$	0.9995	0.5	2.0, 5.0, 20.0	89.6, 95.8, 106	6.2, 5.3, 2.2
Mapenterol	1.0~200.0	$y=3887.5x+824.0$	0.9992	0.5	2.0, 5.0, 20.0	86.7, 86.4, 95.3	4.7, 3.6, 5.3
Phenylethanolamine A	1.0~200.0	$y=543.4x+189.9$	0.9983	0.5	2.0, 5.0, 20.0	91.8, 103, 95.7	10.8, 7.2, 3.5
Penbutolol	1.0~200.0	$y=3787.8x+892.4$	0.9997	0.5	2.0, 5.0, 20.0	95.6, 98.5, 103	3.7, 4.2, 3.6
Norvancomycin	5.0~300.0	$y=321.4x-128.7$	0.9962	3.0	10.0, 20.0, 100.0	75.4, 83.8, 79.6	7.8, 8.9, 6.6
Vancomycin	5.0~300.0	$y=210.8x-131.3$	0.9974	3.0	10.0, 20.0, 100.0	83.6, 79.8, 82.5	8.5, 5.9, 8.8
Norfloxacin	1.0~200.0	$y=558.0x+124.5$	0.9987	0.5	2.0, 5.0, 20.0	82.6, 91.8, 88.5	3.8, 5.4, 2.9
Marbofloxacin	1.0~200.0	$y=882.1x+241.8$	0.9991	0.5	2.0, 5.0, 20.0	86.4, 89.5, 92.4	5.3, 4.4, 6.1
Orbifloxacin	1.0~200.0	$y=1489.3x+473.5$	0.9989	0.5	2.0, 5.0, 20.0	96.5, 88.6, 85.4	5.8, 2.9, 3.1
Cephapirin	5.0~300.0	$y=311.2x+121.4$	0.9975	3.0	10.0, 20.0, 100.0	85.4, 79.8, 92.7	7.3, 5.6, 3.3
Cefazolin	5.0~300.0	$y=406.1x+187.6$	0.9981	3.0	10.0, 20.0, 100.0	86.3, 92.4, 93.5	6.2, 7.8, 3.9
Cefalonium	5.0~300.0	$y=387.4x+179.2$	0.9990	3.0	10.0, 20.0, 100.0	79.4, 88.5, 95.7	3.6, 7.4, 6.3
Ceftiofur	5.0~300.0	$y=514.4x+223.3$	0.9988	3.0	10.0, 20.0, 100.0	77.5, 89.6, 85.3	5.5, 3.8, 4.9
Cefoperazone	5.0~300.0	$y=418.8x+210.4$	0.9972	3.0	10.0, 20.0, 100.0	84.7, 92.4, 88.5	5.2, 6.4, 4.8
Ampicillin	5.0~300.0	$y=513.0x+248.6$	0.9993	3.0	10.0, 20.0, 100.0	92.5, 88.3, 82.6	3.5, 8.4, 7.1
Penicillin V	5.0~300.0	$y=559.7x+302.4$	0.9989	3.0	10.0, 20.0, 100.0	91.3, 87.5, 92.4	8.3, 3.9, 4.2
Amoxicillin	5.0~300.0	$y=514.3x+266.7$	0.9993	3.0	10.0, 20.0, 100.0	79.2, 88.5, 91.4	7.7, 6.5, 5.2
Proctaphlin	5.0~300.0	$y=426.4x+172.4$	0.9995	3.0	10.0, 20.0, 100.0	86.4, 95.3, 98.9	5.3, 4.2, 3.7
Azlocillin	5.0~300.0	$y=880x+582.2$	0.9996	3.0	10.0, 20.0, 100.0	103, 89.9, 95.4	9.1, 8.5, 2.2
Dicloxacillin	5.0~300.0	$y=515.2x+318.7$	0.9990	3.0	10.0, 20.0, 100.0	92.4, 89.3, 91.5	10.3, 7.2, 5.5
Cefuroxim	5.0~300.0	$y=285.4x+192.5$	0.9977	3.0	10.0, 20.0, 100.0	88.6, 74.9, 97.3	6.3, 5.2, 7.8

用阴性腊肠样品基质提取液配制系列基质匹配标准工作液, 其中 β -激动剂、氟喹诺酮类药物浓度梯度为1.0、5.0、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g/L}$, 其它药物分别配制5.0、10.0、50.0、100.0、200.0、300.0 $\mu\text{g/L}$ 。按本实验优化的仪器条件进行检测, 以质量浓度为横坐标(x), 以目标物定量离子对峰面积为纵坐标(y)作标准曲线, 得到各目标物的线性方程和相关系数(r^2), 并计算方法检出限(LOD, $S/N=3$), 对阴性样品进行3个水平的加标回收实验, 6次平行实验的结果见表2。结果显示, 各目标物在相应的浓度范围内, 线性相关系数为0.9962~0.9998, 线性关系良好, 在2.0~100.0 $\mu\text{g/kg}$ 的加标水平下, 平均回收率为74.9%~112%, 相对标准偏差为2.2%~10.8%。

2.7 实际样品的检测

采用本方法测定了广州市内销售的午餐肉、火腿肠、腊肠、腊肉各5例, 每例样品平行测定2次, 均未检出上述33种目标化合物。

3 结论

本实验建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)同时测定肉制品中16种 β -激动剂、6种头孢菌素类、6种青霉素类、3种氟喹诺酮类和2种糖肽类抗生素残留的方法, 样品经酶解后, 以0.1%甲酸-乙腈提取, 分散固相萃取净化, 通过优化色谱、质谱条件, 获得较高的灵敏度和准确度, 本方法回收率和精密度良好, 适用于肉制品中 β -激动剂和多种抗生素残留的同时测定。

参考文献

- [1] CODEX Alimentarius. Veterinary Drug Residues in Food [Z]. 2013
- [2] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第176号[Z]. 2002
Ministry of Agriculture. No. 176 bulletin of the ministry of agriculture of the people's republic of China [Z]. 2002
- [3] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第560号[Z]. 2005
Ministry of Agriculture. No. 560 bulletin of the ministry of agriculture of the people's republic of China [Z]. 2005
- [4] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第1519号[Z]. 2010
Ministry of Agriculture. No. 1519 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [Z]. 2010
- [5] European Community. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on Measures to Monitor Certain Substances and Residues thereof in Live Animals and Animal Products and Repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC [EB/OL]. (1996-5-23). <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0023:EN:HTML>
- [6] GB/T 22286-2008, 动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定 液相色谱串联质谱法[S]
GB/T 22286-2008, Determination of β -agonists Residues in foodstuff of animal origin- liquid chromatography with tandem-mass spectrometric method [S]
- [7] D Mauro, S Ciardullo, C Civitareale, et al. Development and validation of a multi-residue method for determination of 18 β -agonists in bovine urine by UPLC-MS/MS [J]. Microchemistry Journal, 2014, 115: 70-77
- [8] Rocío Cazorla-Reyes, Roberto Romero-González, Antonia Garrido Frenich, et al. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, 89: 203-212
- [9] GB/T 22960-2008, 河豚鱼和鳗鱼中头孢唑啉、头孢匹林、头孢氨苄、头孢洛宁、头孢喹肟残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]
GB/T 22960-2008, Determination of cefazolin, cefapirin, cephalexin, cefalonium, cefquinome residues in fugu and Eel-LC-MS-MS method [S]
- [10] Xiao-dan Liu, Ying-jia Yu, Mei-yan Zhao, et al. Solid phase extraction using magnetic core mesoporous shell microspheres with c18-modified interior pore-walls for residue analysis of cephalosporins in milk by LC-MS/MS [J]. Food Chemistry. 2014, 150: 206-212
- [11] Marta Piatkowska, Piotr Jedzinizk, Jan Zmudzki. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2016, 197, 571-580
- [12] GB/T 22985-2008, 牛奶和奶粉中恩诺沙星、达氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、奥比沙星、二氟沙星和麻保沙星残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S]
GB/T 22985-2008, Determination of enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin, orbifloxacin, difloxacin and marbofloxacin in milk and milk powder-LC-MS-MS method [S]
- [13] Katerina Bousova, Hamide Senyuva, Klaus Mittendorf. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013,

- 1274: 19-27
- [14] Luca Chiesa, Maria Nobile, Francesco Arioli, et al. Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry. 2015, 185: 7-15
- [15] 洗燕萍,陈立伟,罗海英,等.UPLC-MS/MS 法测定猪肉中万古霉素与去甲万古霉素[J].分析测试学报,2013,32(2):162-167
- XIAN Yan-ping, CHEN Li-wei, LUO Hai-ying, et al. Quantitative determination of vancomycin and norvancomycin in pork by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(2): 162-167
- [16] B Damien, O K Michael, R S Malcolm. Matrix solid-phase dispersion as a multiresidue extraction technique for β -agonists in bovine liver tissue [J]. Analyst, 1994, 119: 1467-1470
- [17] B K Matuszewski, M L Constanzer, C M Chavez-Eng. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. Analytical Chemistry, 2003, 75(13): 3019-3030