

InertSep HLB-UHPLC-MS/MS 检测猪肉中多种兽药残留

SGLC-LC/MS-015

摘要: 本研究建立了猪肉中 53 个兽药残留的测定方法。采用岛津 InertSep HLB 产品对猪肉样品进行净化, Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分离, 岛津串联质谱 LCMS-8050 检测分析。对空白样品 0.1 µg/kg 和 10.0 µg/kg 浓度加标后, 按照上述前处理方法处理后上机, 平行 3 份样品考察回收率和 RSD, 结果显示, 0.1 µg/kg 加标浓度的加标回收率为 58.43%-107.42%, RSD 为 0.35%-13.87%; 10 µg/kg 加标浓度的加标回收率为 54.23%-108.97%, RSD 为 0.30%-13.39%, 回收率高, 重现性好。该方法适用于猪肉中喹诺酮类、磺胺类、四环素类、硝唑类、大环内酯类、糖皮质激素类、氯霉素类、唑乙醇代谢物等 8 类兽药残留的测定。

关键词: InertSep HLB 多兽残 动物源性食品 LC-MSMS

1. 实验部分

1.1 实验仪器及耗材

仪器配置: Shimadzu LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统;

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 100×2.1 mm, 2 µm (P/N: 227-30001-04);

固相萃取小柱: InertSep HLB 200 mg/6mL (P/N: 5010-81976) ;

SHIMSEN Arc Disc HPTFE 针式过滤器 (P/N: 380-00341-05) ;

LC/MS 认证样品瓶 LabTotal Vial (P/N: 227-34001-01) ;

SHIMSEN Pipet 移液枪: SHIMSEN Pipet PMII-10 (P/N: 380-00751-02) ;

SHIMSEN Pipet PMII-100 (P/N: 380-00751-04) ;

SHIMSEN Pipet PMII-1000 (P/N: 380-00751-06) 。

1.2 分析条件

UHPLC 条件

1) 氯霉素类和糖皮质激素类

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 100×2.1 mm, 2 µm (P/N: 227-30001-04)

流 速: 0.3 mL/min

进样量: 5 µL

柱 温: 40 °C

流动相: A: 水 B: 甲醇

梯度洗脱程序如下:

时间 (Min)	0	2	3.5	3.6	6
A (%)	50	25	25	50	50
B (%)	50	75	75	50	50

2) 其他类

色谱柱: Shim-pack GIST C18, 100×2.1 mm, 2 μm (P/N: 227-30001-04)

流 速: 0.3 mL/min

进样量: 5 μL

柱 温: 40 °C

流动相: A: 0.1%甲酸水 B: 甲醇

梯度洗脱程序如下:

时间 (Min)	0	3	8	11	12	15
A (%)	90	80	65	5	90	90
B (%)	10	20	35	95	10	10

质谱条件

离子化模式: ESI, 正/负离子扫描

扫描模式: 多反应监测(MRM)

碰撞气: 氩气

加热气: 氮气 10 L/min

雾化气: 氮气 3 L/min

干燥气: 氮气 10 L/min

接口温度: 300°C

DL 温度: 250 °C

加热模块温度: 400 °C

各化合物 MRM 参数见下表

序号	兽药	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
1	磺胺醋酰	215.0	156.0	-10	-11	-27
		215.0	92.2	-11	-24	-14
2	甲硝唑	172.0	128.1	-11	-16	-20
		172.0	82.1	-11	-25	-30
3	地美硝唑	142.0	96.1	-12	-17	-15
		142.0	95.2	-12	-23	-15
4	磺胺异嘧啶	279.0	124.1	-13	-22	-19
		279.0	186.0	-13	-17	-17
5	磺胺嘧啶	251.0	156.1	-12	-16	-26
		251.0	108.1	-12	-23	-17
6	磺胺噻唑	255.9	156.0	-12	-15	-26
		255.9	108.1	-12	-23	-16
7	替硝唑	247.9	121.1	-12	-16	-18
		247.9	128.1	-11	-21	-20
8	磺胺吡啶	249.9	156.0	-12	-16	-26
		249.9	108.1	-11	-25	-17

9	磺胺甲基嘧啶	265.0	108.1	-12	-26	-17
		265.0	156.0	-12	-17	-13
10	甲氧苄啶	291.0	230.1	-10	-24	-22
		291.0	123.1	-10	-24	-19
11	麻保沙星	363.0	320.1	-10	-16	-13
		363.0	345.2	-10	-22	-21
12	氟罗沙星	369.9	326.3	-18	-19	-29
		369.9	269.2	-18	-27	-23
13	磺胺甲噻二唑	270.8	156.0	-12	-15	-25
		270.8	108.1	-13	-25	-17
14	强力霉素	444.9	428.1	-10	-20	-18
		445.2	321.1	-10	-31	-20
15	四环素	444.9	410.1	-13	-20	-26
		444.9	410.2	-16	-20	-26
16	氧氟沙星	361.9	318.2	-10	-20	-30
		361.9	261.1	-10	-28	-25
17	伊诺沙星	321.0	303.1	-11	-22	-30
		321.0	232.1	-11	-36	-22
18	培氟沙星	334.0	316.1	-15	-22	-30
		334.0	290.2	-15	-19	-28
19	磺胺甲氧哒嗪	281.0	156.0	-13	-17	-26
		281.0	108.1	-13	-26	-16
20	磺胺二甲嘧啶	279.0	186.0	-13	-18	-17
		279.0	124.1	-13	-24	-19
21	奥硝唑	219.8	128.1	-10	-16	-20
		219.8	82.1	-11	-30	-30
22	土霉素	461.0	426.1	-10	-21	-18
		461.0	443.1	-13	-15	-19
23	诺氟沙星	319.9	302.1	-11	-22	-30
		319.9	276.1	-10	-18	-27
24	环丙沙星	331.9	314.1	-11	-22	-30
		331.9	231.1	-11	-37	-22
25	磺胺对甲氧嘧啶	280.9	156.0	-10	-17	-14
		280.9	108.1	-10	-26	-16
26	磺胺氯哒嗪	284.9	156.1	-10	-15	-14
		284.9	108.1	-13	-25	-17
27	恩诺沙星	360.0	316.2	-10	-20	-30
		360.0	342.1	-10	-23	-21
28	达氟沙星	357.9	340.1	-10	-24	-21
		357.9	82.1	-10	-44	-30

29	洛美沙星	352.0	265.1	-10	-24	-25
		352.0	308.2	-10	-18	-30
30	磺胺甲恶唑	254.0	156.0	-12	-16	-25
		254.0	108.1	-12	-24	-17
31	奥比沙星	396.0	352.1	-11	-19	-22
		396.0	295.0	-11	-25	-29
32	双氟沙星	399.9	382.1	-11	-23	-24
		399.9	356.1	-11	-21	-15
33	磺胺间甲氧嘧啶	281.0	156.0	-13	-18	-14
		281.0	108.1	-13	-27	-17
34	磺胺甲基异恶唑	268.0	156.0	-13	-14	-26
		268.0	113.1	-12	-16	-18
35	沙拉沙星	386.0	368.1	-11	-23	-23
		386.0	342.1	-11	-20	-21
36	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	189.1	143.2	-10	-17	-29
		189.1	145.3	-10	-15	-13
37	磺胺间二甲氧嘧啶	310.9	156.1	-11	-21	-26
		310.9	108.1	-11	-29	-17
38	磺胺邻二甲氧嘧啶	310.9	156.0	-14	-18	-25
		310.9	108.1	-11	-27	-17
39	金霉素	479.0	444.0	-13	-23	-28
		479.0	462.1	-13	-18	-30
40	斯帕沙星	393.0	349.1	-11	-21	-22
		393.0	292.1	-11	-26	-28
41	螺旋霉素	843.2	174.2	-22	-35	-29
		843.2	142.1	-22	-35	-12
42	磺胺苯吡唑	315.0	158.1	-11	-29	-14
		315.0	160.1	-11	-22	-14
43	替米考星	869.4	696.4	-20	-42	-32
		869.4	174.1	-20	-45	-30
44	磺胺喹恶林	300.8	156.0	-10	-17	-14
		300.8	108.0	-13	-26	-17
45	恶奎酸	262.0	244.0	-12	-20	-23
		262.0	216.0	-11	-29	-20
46	吉他霉素	772.2	109.0	-22	-42	-17
		772.2	174.1	-22	-31	-15
47	交沙霉素	828.3	109.0	-20	-45	-17
		828.3	174.2	-20	-33	-16
48	氟甲喹	261.9	244.1	-12	-20	-23
		261.9	202.0	-12	-33	-18

49	甲砒霉素	353.9	185.1	17	21	12
		353.9	290.1	17	13	14
50	氟苯尼考	355.9	336.1	18	11	12
		355.9	185.1	17	20	12
51	氯霉素	320.8	152.1	16	17	15
		320.8	257.1	16	11	12
52	氢化可的松	407.1	331.2	20	19	16
		407.1	297.2	20	32	20
53	地塞米松	437.1	361.2	22	19	17
		437.1	307.2	22	33	20

1.3 样品前处理

1.3.1 样品提取

精密称取样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中，加 8 mL Mcllvaine- Na₂EDTA 缓冲液*，涡旋 1 min，超声 20 min，8000 r/min 离心 2 min，取出上清液至于另一 50 mL 离心管中，向下层残渣继续加入 8 mL Mcllvaine- Na₂EDTA 缓冲液*按上述步骤重复提取 1 次。合并 2 次上清液于 50 mL 离心管中，混匀，加 5 mL 正己烷，涡旋 1 min，8000 r/min 离心 2 min，弃去正己烷层，下清液待净化。流程图见图 1。

Mcllvaine- Na₂EDTA 缓冲液*：称取磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄ · 12H₂O) 10.9 g、柠檬酸 (C₆H₈O₇ · H₂O) 12.9 g、乙二胺四乙酸二钠盐 37.2 g，用水溶解后稀释并定容至 1000 mL，用 1 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 4.0。

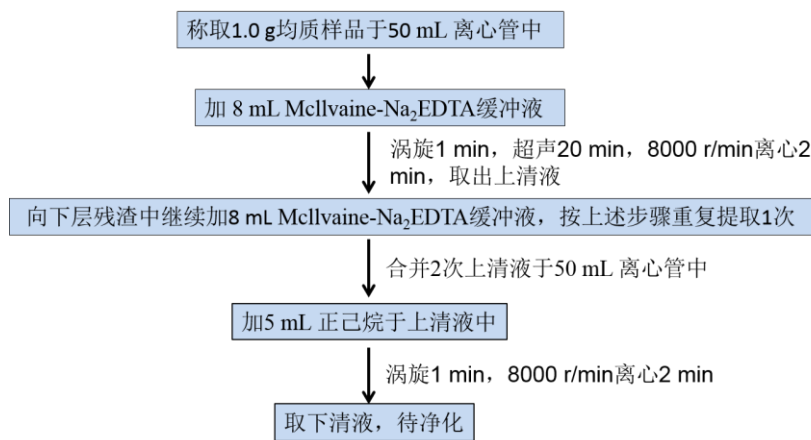


图 1 样品提取流程图

1.3.2 样品净化

InertSep HLB 200 mg/6 mL

5 mL 甲醇、5 mL 水活化，弃去流出液；待净化液上样，弃去流出液；5 mL 水、5 mL 20%甲醇水淋洗，弃去流出液；减压抽干小柱 5 min；5 mL 甲醇-乙酸乙酯-氨水 (50: 50: 2) 洗脱，收集流出液；将收集的洗脱液于 35℃ 下氮吹至干，用 20%甲醇水溶液定容至 1 mL，涡旋混匀，8000 r/min 离心 2

min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 供 LC-MS/MS 分析。流程图见图 2。

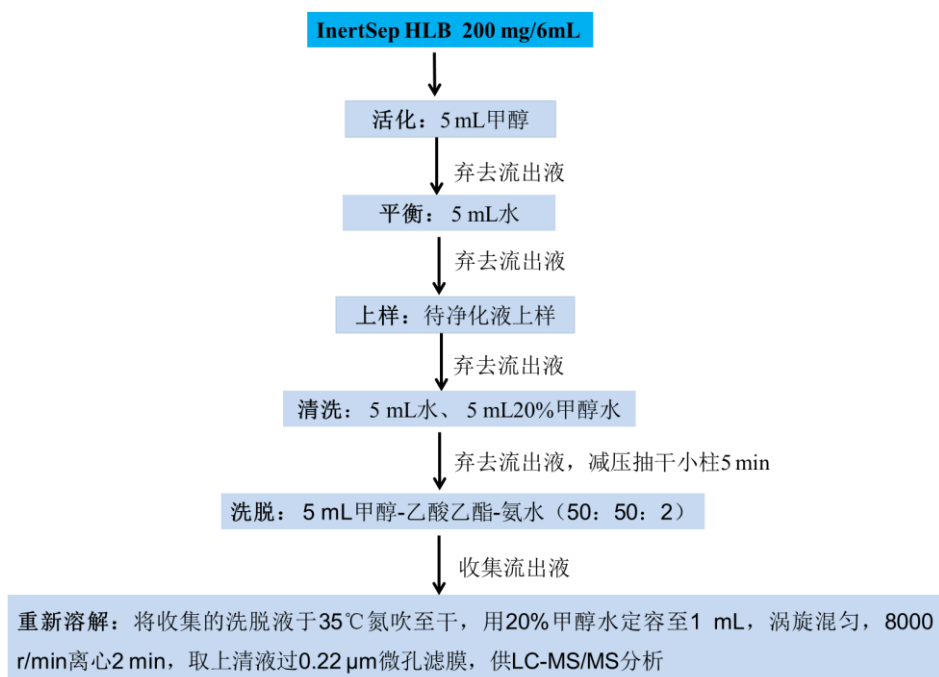
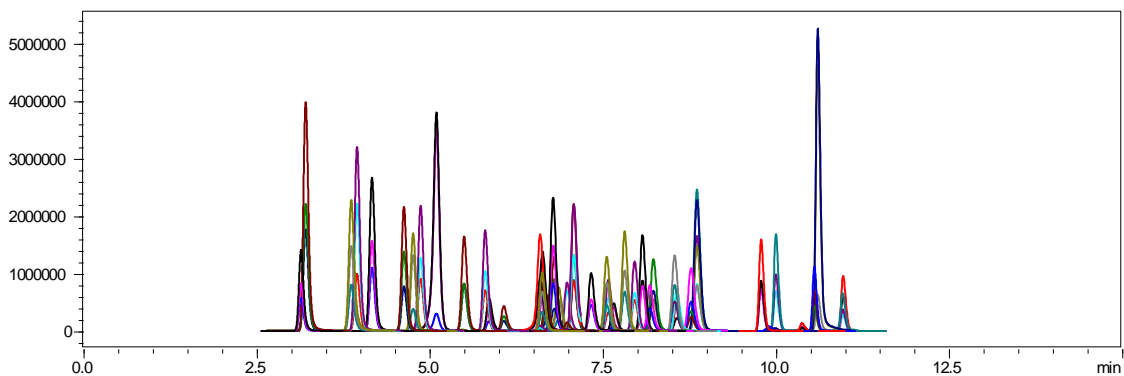


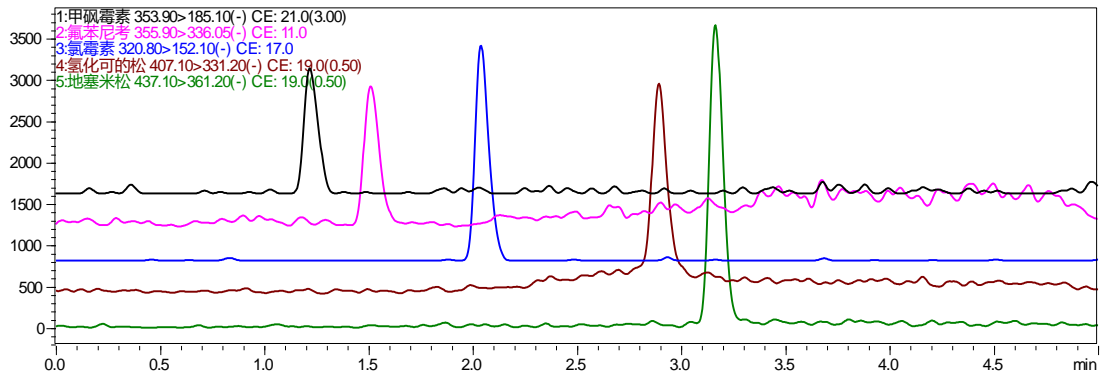
图 2 样品净化流程图

2. 结果及讨论

2.1 标准品的 MRM 色谱图



48 种兽药的 MRM 色谱图 (10 μg/L)



氯霉素和糖皮质激素类兽药的 MRM 色谱图 (0.1 $\mu\text{g/L}$)

2.2 猪肉中 34 种兽药的 LC-MS/MS 检测添加回收结果

将猪肉空白样品进行 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 和 10.0 $\mu\text{g/kg}$ 浓度加标后, 按照上述前处理方法处理后上机, 平行 3 份样品考察回收率和 RSD, 具体结果如下: 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 加标浓度的加标回收率为 58.43%-107.42%, RSD 为 0.35%-13.87%; 10 $\mu\text{g/kg}$ 加标浓度的加标回收率为 54.23%-108.97%, RSD 为 0.30%-13.39%。

序号	兽药	添加水平 (0.1 $\mu\text{g/kg}$)		添加水平 (10 $\mu\text{g/kg}$)	
		回收率 (%)	RSD(%)	回收率 (%)	RSD(%)
1	磺胺醋酰	80.71	4.40	83.81	0.81
2	甲硝唑	86.78	8.11	91.2	0.65
3	地美硝唑	79.44	7.84	91.14	1.92
4	磺胺异噁啉	83.42	0.35	92.05	0.3
5	磺胺嘧啶	83.74	0.76	90.99	1.92
6	磺胺噻唑	83.40	2.33	85.56	0.97
7	替硝唑	88.57	9.68	108.97	1.8
8	磺胺吡啶	87.23	13.42	83.05	0.9
9	磺胺甲基噁啉	72.78	4.42	70.55	0.85
10	甲氧苄啶	83.99	5.91	90.67	3.43
11	麻保沙星	82.16	12.78	99.58	1.15
12	氟罗沙星	80.38	8.23	85.66	1.94
13	磺胺甲噻二唑	80.44	4.82	82.09	2.7
14	强力霉素	70.08	10.13	75.4	1.57
15	四环素	71.42	4.78	75.59	3.00
16	氧氟沙星	88.11	2.86	86.25	0.43
17	伊诺沙星	70.35	6.34	84.35	2.26
18	培氟沙星	90.70	10.15	90.47	0.31
19	磺胺甲氧哒嗪	90.74	7.34	88.02	0.68
20	磺胺二甲噁啉	95.34	2.38	107.92	7.00

21	奥硝唑	97.64	10.96	93.93	4.12
22	土霉素	107.42	3.71	96.22	13.39
23	诺氟沙星	80.86	11.86	90.17	6.88
24	环丙沙星	78.22	4.81	83.65	1.39
25	磺胺对甲氧嘧啶	70.11	2.08	88.17	0.83
26	磺胺氯哒嗪	77.74	13.87	76.13	2.23
27	恩诺沙星	90.43	9.10	80.53	2.9
28	达氟沙星	80.12	9.20	81.29	0.49
29	洛美沙星	87.15	1.17	86	1.18
30	磺胺甲恶唑	81.86	6.52	79.51	2.02
31	奥比沙星	89.57	3.95	95.24	1.73
32	双氟沙星	78.06	4.45	87.18	1.03
33	磺胺间甲氧嘧啶	88.82	4.12	92.78	3.08
34	磺胺甲基异恶唑	75.41	10.74	77.01	1.03
35	沙拉沙星	84.93	3.23	80.48	3.64
36	喹乙醇代谢物	88.04	5.47	88.82	1.13
37	磺胺间二甲氧嘧啶	78.83	2.69	80.64	0.32
38	磺胺邻二甲氧嘧啶	76.18	5.12	81.49	1.71
39	金霉素	62.67	6.33	64.77	5.43
40	斯帕沙星	72.79	10.33	78.43	4.66
41	螺旋霉素	83.04	13.84	75.23	3.09
42	磺胺苯吡唑	68.75	12.27	67.77	5.02
43	替米考星	68.17	4.38	68.21	2.29
44	磺胺奎恶啉	58.43	6.85	54.23	5.39
45	恶奎酸	78.08	4.83	80.78	2.21
46	吉他霉素	91.16	11.01	74.39	0.78
47	交沙霉素	78.59	8.41	78.94	4.85
48	氟甲奎	74.92	8.00	76.63	0.54
49	甲砒霉素	91.34	10.69	88.45	5.72
50	氟苯尼考	91.28	2.86	85.38	1.14
51	氯霉素	77.13	9.56	83.76	0.4
52	氢化可的松	72.11	7.27	79.17	1.16
53	地塞米松	70.48	25.65	71.74	2.91

3. 结论

综上，本研究采用岛津的 InertSep HLB 产品对猪肉样品进行净化，Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分离，岛津串联质谱 LCMS-8050 检测分析。对空白样品 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度加标后，按照上述前处理方法处理后上机，平行 3 份样品考察回收率和 RSD，结果显示，0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标浓度的加标回

收率为 58.43%-107.42%，RSD 为 0.35%-13.87%；10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标浓度的加标回收率为 54.23%-108.97%，RSD 为 0.30%-13.39%，回收率高，重现性好。该方法适用于猪肉中喹诺酮类、磺胺类、四环素类、硝唑类、大环内酯类、糖皮质激素类、氯霉素类、喹乙醇代谢物等 8 类兽药残留的测定。