

# 猪肉和牛奶中的兽药检测

使用配备标准 ESI 离子源的 Ultivo LC/TQ



图 1. 配备 ESI 离子源的 Agilent Ultivo LC/TQ

## 作者

Theresa Sosienki  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本应用简报重点介绍了一种 10 分钟的分析方法，用于精确定量猪肉和牛奶中 12 种受法规监管的兽药化合物。该方法将 Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱仪与配备 ESI 离子源的 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统结合使用。根据全球法规的规定，本方法选择用于评估的 12 种兽药化合物最大残留限量 (MRL) 高达 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，需要进行分析的浓度高达 MRL 的 5 倍。Ultivo 的直观设计和易维护性使该系统非常适合用于上述兽药的高通量检测。选择猪肉糜和牛奶代表脂肪和水含量较高的多种基质。该方法超出了全球法规规定的灵敏度要求，该方法中所有兽药化合物均表现出高精度 ( $\text{RSD}\% < 14\%$ )。

## 前言

兽药主要用于预防牲畜疾病和寄生虫，促进生长。畜牧业中兽药使用不当会导致这些药物在动物组织和其他动物源性食品（如牛奶或鸡蛋）中积聚。鉴于世界各地对人食用畜牧产品中存在兽药的关注，AOAC 工作组近期对大量兽药化合物提出了标准方法性能要求 (SMPR)，其中包括根据美国<sup>[1]</sup>、Codex<sup>[2]</sup>、中国<sup>[3]</sup> 和加拿大<sup>[4]</sup> 法规的肉类和牛奶中兽药残留的检测限。检测限要求规定为 MRL 的一半，始终将各监管机构中的最低 MRL 选为默认值。

该方法中包括的 12 种兽药代表一组兽药，其在牛奶和肉类中的 MRL 相对较高。每种兽药化合物都有目标检测浓度，定义为化合物 MRL 的 1/2。12 种研究化合物的目标检测浓度范围为牛奶中 22.5–100 µg/kg，肉中 50–500 µg/kg (表 1)。配备标准 ESI 离子源的 Ultivo 三重四极杆液质联用系统是用于这类测量的理想系统。

本应用简报展示将 1260 Infinity II Prime 液相色谱系统和配备 ESI 离子源的 Ultivo LC/TQ 联用，对猪肉和牛奶中 12 种受监管兽药化合物进行精确定量。Ultivo-ESI 具有与 Ultivo 系统相媲美的出色性能。

表 1. 牛奶和肉类中 12 种兽药的目标检测浓度

化合物	牛奶目标检测浓度 (µg/kg)	肉类目标检测浓度 (µg/kg)
头孢噻唑	50	500
金霉素	50	50
克罗散泰	22.5	500
双氢链霉素	62.5	250
三氮唑	75	250
芬苯达唑	50	50
林可霉素	75	50
新生霉素	25	500
土霉素	50	50
螺旋霉素	100	100
链霉素	62.5	250
四环素	50	50

## 实验部分

### 试剂与化学品

使用的所有试剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈和甲醇购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)，超纯水产自配有 LC-Pak Polisher 和 0.22 µm 膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸购自 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)，氟化铵（固体粉末）购自 Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)，配制 5 mol/L 储备液。兽药标准品购自 Sigma-Aldrich。

### 样品前处理

新鲜的 2% 巴氏杀菌有机牛奶和无抗生素猪肉（80% 瘦肉，20% 肥肉）购自当地商店。将 2 g 猪肉或牛奶样品在 50 mL 聚丙烯试管中称重，冷冻待分析。猪肉样品前处理步骤摘自 Zhao 等<sup>[5]</sup> 之前评估的方法。本方法进一步对牛奶萃取进行了改进，总结于图 2 中。使用 Heidolph Hei-MIX Multi Reax 系统对样品进行涡旋混合。使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱，6 mL，600 mg（部件号 5190-1004）进行猪肉萃取液的最终净化。Captiva EMR-Lipid 过滤柱可高效并选择性去除脂质，同时具有出色的疏水性分析物回收率。

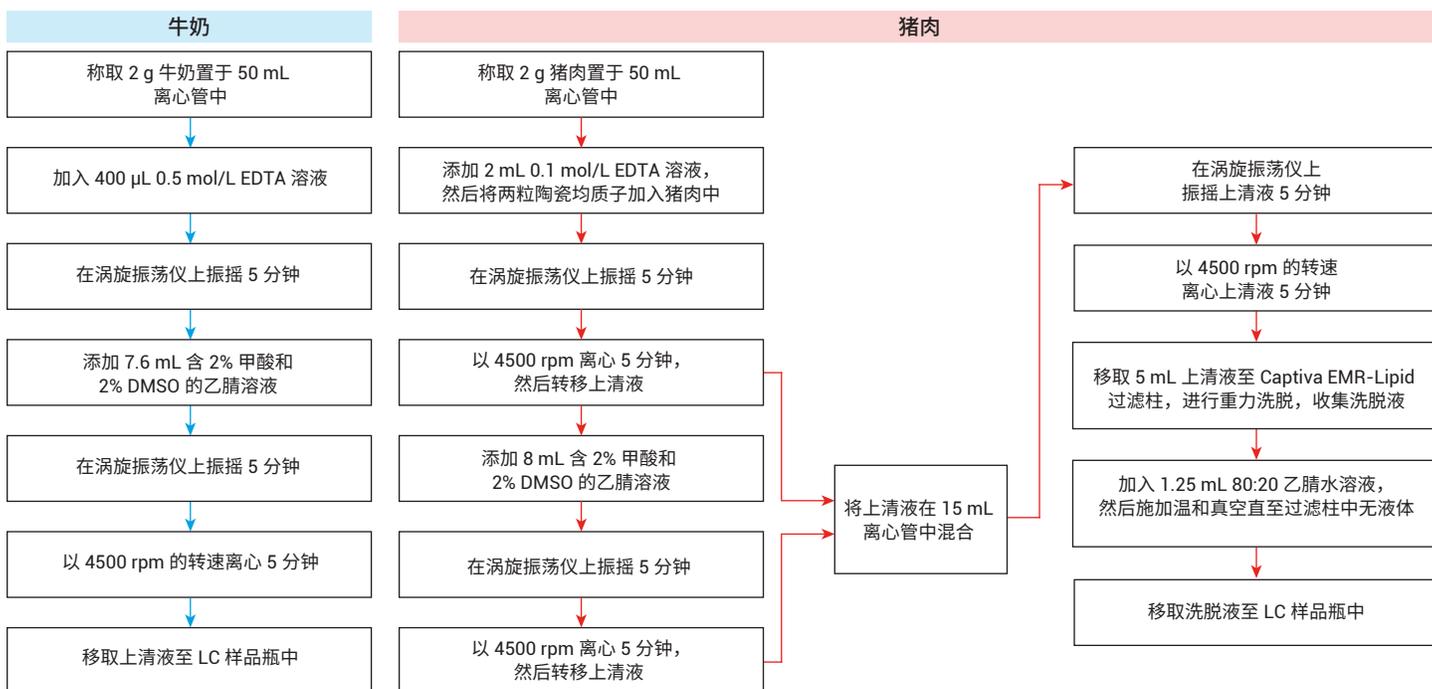


图 2. 猪肉和牛奶中兽药的样品前处理流程

## 仪器

Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱仪

- 1260 Infinity II Prime 全能泵 (G7104C)
- 1260 Infinity II Multisampler, 配备冷却装置 (G7167A)
- 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)

Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统

- 电喷雾离子源 (G1948B)

## 方法

表 2 总结了 1260 Infinity II Prime 液相色谱条件, 表 3 总结了 Ultivo 离子源和仪器参数。表 4 显示了目标化合物的优化 MS 参数。动态多反应监测 (dMRM) 用于数据收集。MassHunter 定量分析软件 B.09 具有 Quant-My-Way 功能, 用于加速和简化数据分析和审查过程。

表 2. Agilent 1260 Infinity II Prime 液相色谱仪参数

色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C8, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-906)	
柱温	40 °C	
色谱柱反压检测范围	170–370 bar	
进样量	4 μL	
流动相	A) 0.2% 甲酸水溶液 B) 0.5 mmol/L 氟化铵甲醇溶液	
流速	0.350 mL/min	
梯度	时间 (min)	%B
	0	2
	1.5	2
	2.5	70
	5.0	100
	7.0	100
	7.1	2
9.0	2	
停止时间	9.0 min	
后运行时间	1.0 min	

表 3. Ultivo 离子源和质谱分析仪参数

气体温度	325 °C
气体流速	8 L/min
雾化器压力	40 psi
毛细管电压	2000 V (+)
循环时间	500 ms

## 实验设计

在萃取流程后对猪肉和牛奶进行加标（后加标），用于灵敏度、精度和线性研究。对于回收率评估，将猪肉和牛奶在萃取前加标至兽药储备液（预加标），并与后加标猪肉和牛奶萃取物进行比较，以便在分析后进行回收率（%）计算。

## 结果与讨论

### 方法灵敏度和精度

所有兽药均可在 1/2 MRL 下准确定量，大多数兽药可在 1/10 MRL 下进行定量，后者是本研究中检测的最低浓度。图 3 显示了猪肉萃取液中目标检测浓度下所有分析物的出色信号响应。兽药在最低检测浓度下也表现了出色的精度，所有化合物的 RSD% 均低于 14%，每种化合物采用最低检测浓度，如表 5 所示。最低检测浓度下的准确定量是指六次重复进样中四次精度达到 80%–120%，且定量离子和定性离子的信噪比 (S/N) 大于 10。多种兽药化合物在 1/10 MRL 下具有极强的信号响应，表明定量限远低于 1/10 MRL (图 4 中包括一些示例)。

表 4. 动态 MRM 模式下兽药检测的优化离子对

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	RT (min)	RT 窗口 (min)	碎裂电压 (V)	CE (V)	极性
双氢链霉素	584.3	204	0.67	0.89	100	44	正离子
双氢链霉素	584.3	200	0.67	0.89	100	32	正离子
链霉素	599.3	582.3	0.67	0.69	160	12	正离子
链霉素	599.3	263	0.67	0.69	160	32	正离子
三氮唑	282.2	254.1	4.5	0.77	90	0	正离子
三氮唑	282.2	118.9	4.5	0.77	90	12	正离子
林可霉素	407.2	126	4.78	1.1	150	28	正离子
林可霉素	407.2	82.2	4.78	1.1	150	80	正离子
四环素	445.2	427.1	4.86	0.81	130	4	正离子
四环素	445.2	410.1	4.86	0.81	130	8	正离子
土霉素	461.2	443.1	4.88	1.05	130	0	正离子
土霉素	461.2	426	4.88	1.05	130	12	正离子
螺旋霉素	422.2	100.9	5	0.93	70	20	正离子
螺旋霉素	422.2	83	5	0.93	70	20	正离子
金霉素	479.1	444.1	5.09	1.1	140	12	正离子
金霉素	479.1	260.1	5.09	1.1	140	60	正离子
头孢噻唑	524	241	5.21	0.97	140	8	正离子
头孢噻唑	524	124.9	5.21	0.97	140	68	正离子
芬苯达唑	300.1	268.1	5.98	1.05	140	16	正离子
芬苯达唑	300.1	159	5.98	1.05	140	36	正离子
新生霉素	613.2	133.1	6.6	0.85	120	68	正离子
新生霉素	613.2	132.5	6.6	0.85	120	72	正离子
克罗散泰	662.9	264	7.29	0.8	180	28	正离子
克罗散泰	662.9	194.1	7.29	0.8	180	80	正离子

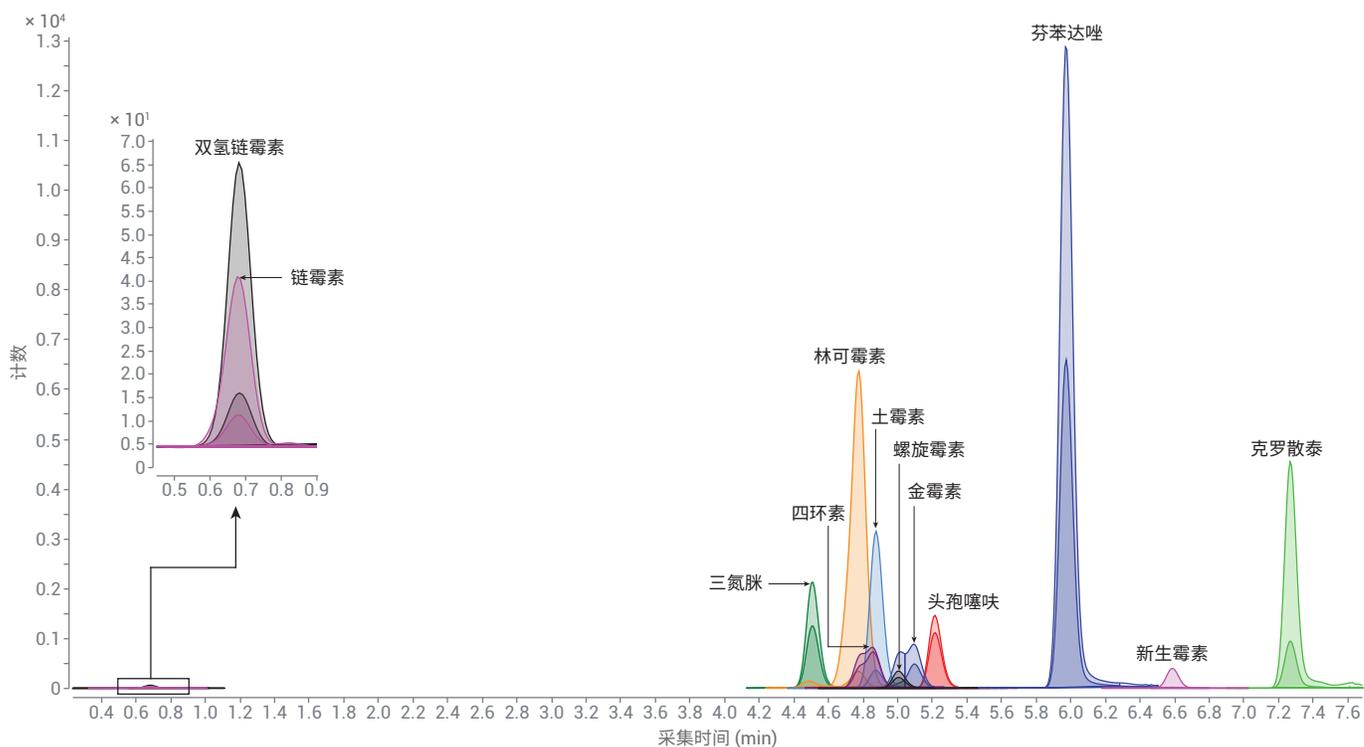


图 3. 以目标检测浓度 (1/2 MRL) 加标至猪肉萃取液中的兽药分析物色谱图

表 5. 猪肉和牛奶萃取物中所有兽药的最低检测浓度和精度。所有兽药化合物均可在目标检测浓度 (1/2 MRL) 或低于目标检测浓度下得到准确定量

化合物	牛奶			猪肉		
	最低检测浓度 (µg/kg)	RSD% (n = 6)		最低检测浓度 (µg/kg)	RSD% (n = 6)	
链霉素	1/2 MRL	62.5	13.74	1/5 MRL	100	6.92
双氢链霉素	1/2 MRL	62.5	7.76	1/5 MRL	100	6.52
三氮唑	1/10 MRL	15	5.79	1/10 MRL	50	3.74
林可霉素	1/10 MRL	15	2.02	1/10 MRL	10	0.83
四环素	1/10 MRL	10	3.26	1/10 MRL	10	3.48
土霉素	1/10 MRL	10	4.16	1/10 MRL	10	3.60
螺旋霉素	1/10 MRL	20	4.34	1/10 MRL	20	5.39
金霉素	1/10 MRL	10	3.38	1/10 MRL	10	3.46
头孢噻唑	1/10 MRL	10	11.56	1/10 MRL	100	2.22
芬苯达唑	1/10 MRL	10	1.10	1/10 MRL	10	1.26
新生霉素	1/5 MRL	10	10.93	1/10 MRL	100	4.13
克罗散泰	1/10 MRL	4.5	4.75	1/10 MRL	100	3.60

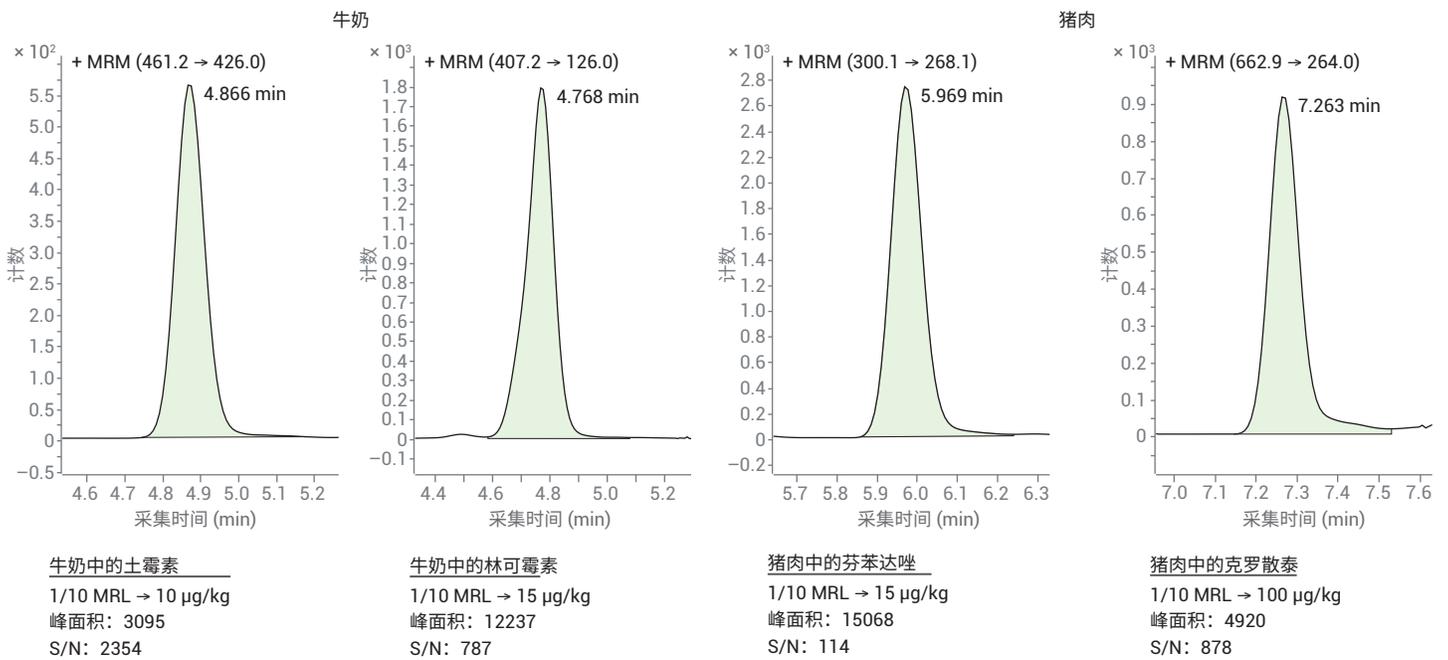


图 4. 选择在 1/10 MRL 下具有极强信号响应的兽药化合物，表明定量限远低于 1/10 MRL

### 方法线性

所有兽药均显示出良好的线性（采用 1/x 加权），所有校准曲线的  $R^2$  值均大

于 0.98。所有分析物的校准浓度范围为 1/10 MRL 至 5 倍 MRL。图 5 显示了一些校准曲线示例。

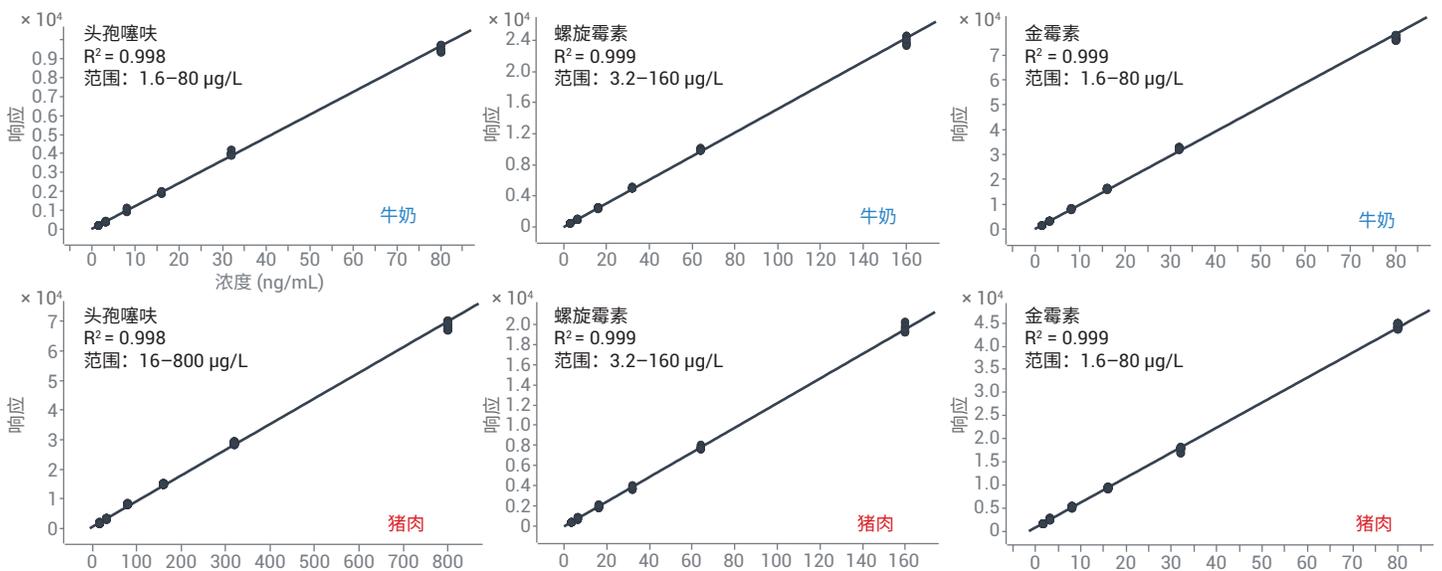


图 5. 选择以浓度范围 1/10 MRL 至 5 倍 MRL 加标至猪肉和牛奶基质的兽药校准曲线

## 方法回收率

所有兽药的回收率均在牛奶和猪肉的三个浓度下进行评估：1/2 MRL、MRL 和 2 倍 MRL。在回收率研究中对每个加标浓度进行六次重复评估。对于 10 种化

合物，两种基质中各浓度下的回收率在 60%–120% 之间（图 6）。使用这种萃取方法，二氢链霉素和链霉素的回收率较差，但可在加标后基质中目标检测浓度 (1/2 MRL) 或低于目标检测浓度下检出。

对于这两种亲水性很强的化合物，可以使用其他萃取方法，但该分析方法适用于筛查。为进行准确定量，应使用内标来校正萃取过程中上述两种化合物的损失。

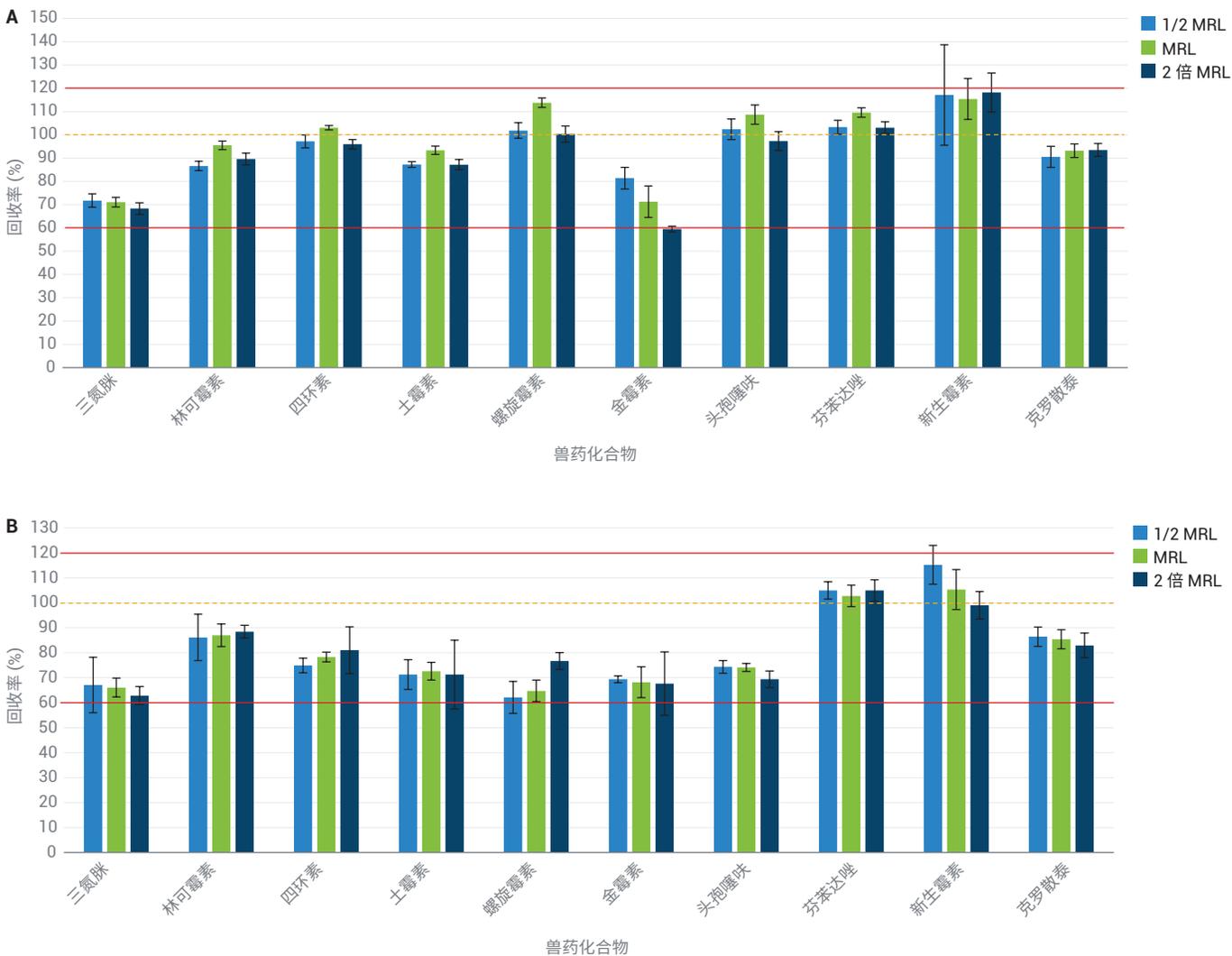


图 6. 1/2 MRL、MRL 和 2 倍 MRL 加标浓度下的牛奶 (A) 和猪肉 (B) 中兽药的回收率。误差线指示六次重复测定中得到的标准偏差。不包括二氢链霉素和链霉素

## 结论

使用配备 ESI 离子源的 Ultivo 三重四极杆液质联用系统超出了全球监管机构针对肉类和牛奶中兽药规定的 MRL 要求，具有出色的精度。Captiva EMR-Lipid 过滤柱为脂肪含量高的猪肉基质提供了足够的额外净化，有助于提高方法灵敏度。1260 Infinity II Prime 液相色谱系统对于本方法观察到的低反压而言，是完美的分离工具。在能够放宽灵敏度要求的应用中，配备 ESI 离子源的 Ultivo 配置是十分合适的选择。

## 参考文献

1. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 21 CFR Parts 514 and 558, FDA-2010-N-0155
2. Proposal for a regulation of the European Parliament and of the council on veterinary medicinal products, European Commission, **2014/0257 (COD)**
3. Maximum Residue Limits in animal derived foods, Announcement No. 235, Ministry of Agriculture, China, **2002**
4. List of Maximum Residue Limits (MRLs) for Veterinary Drugs in Foods, Health Canada, Government of Canada. August 2, **2017**. [https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt\\_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr\\_versus\\_new-nouveau-20170802-eng.pdf](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/migration/hc-sc/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr/mrl-lmr_versus_new-nouveau-20170802-eng.pdf)
5. Zhao, L.; Lucas, D. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化和 LC/MS/MS 分析牛肉中的多类别兽药多残留，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8598ZHCN，**2017**

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

**800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)**

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。