

超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱 高分辨质谱快速筛查与确证猪尿中 74种抗生素及其他化合物

张 婧, 贡松松, 吴剑平, 潘 娟, 王 博, 严 凤*

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

摘要: 采用超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap)建立了猪尿中74种抗生素及其他化合物的快速筛查与确证方法。猪尿样品经高速离心并稀释后, 以Agilent SB C₁₈色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm)分离, 0.1%甲酸水溶液和0.1%甲酸乙腈溶液为流动相进行梯度洗脱。结合精确分子质量数、保留时间和二级特征碎片离子对目标化合物进行筛查与确证。74种目标药物在各自的浓度范围内呈良好线性($r^2 > 0.99$), 检出限(LOD)为10 ng/mL, 在检出限加标浓度下, 回收率集中在55.8%~120%, 相对标准偏差(RSD)为1.3%~21%。该方法简便、快速、灵敏、准确, 适用于猪尿中多种抗生素及其他化合物的定性确证, 有利于掌握养殖业用药情况。

关键词: 超高效液相色谱 - 四极杆 - 静电场轨道阱高分辨质谱(UPLC-Q-Exactive Orbitrap); 猪尿; 抗生素及其他化合物; 快速筛查

中图分类号: O657.7; R978.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)08-0905-08

Rapid Screening and Confirmation of 74 Antibiotics and Other Compounds in Swine Urine by Ultra Performance Liquid Chromatography - Quadrupole - Exactive Orbitrap Mass Spectrometry

ZHANG Jing, GONG Song-song, WU Jian-ping, PAN Juan, WANG Bo, YAN Feng*

(Shanghai Municipal Supervisory Institute of Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography - quadrupole - exactive orbitrap mass spectrometry(UPLC-Q-Exactive Orbitrap) was developed for the rapid screening and confirmation of 74 antibiotics and other compounds in swine urine. The samples were high-speedily centrifuged, then diluted with solvent, and finally separated on an Agilent SB C₁₈(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm) column using a binary solvent system composed of 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid acetonitrile solution by gradient elution. Under the optimal conditions, the analytes were precisely screened and confirmed with the precision mass, retention time and two-stage ion mass spectra. There were good linear relationships for 74 analytes in their respective concentration ranges with correlation coefficients(r^2) larger than 0.99 and limits of detection(LOD) of 10 ng/mL. The recoveries for 74 compounds in swine urine at LOD spiked level mainly ranged from 55.8% to 120%, with relative standard deviations(RSD) of 1.3% - 21%. The method was convenient, rapid, sensitive and accurate, and was quite effective for the screening and confirmation of 74 antibiotics and other compounds in swine urine, which was beneficial to the investigation on drugs situation in husbandry.

Key words: ultra performance liquid chromatography - quadrupole - exactive orbitrap mass spectrometry(UPLC-Q-Exactive Orbitrap); swine urine; antibiotics and other compounds; rapid screening

现代畜牧养殖业的发展离不开抗生素。兽用抗生素的合理使用可以预防、治疗动物疾病,促进和维持动物的健康生长^[1]。但一些不法商贩受经济利益驱使,在饲料中蓄意添加禁用抗生素等风险物质,不仅影响畜禽的正常生长,而且给畜禽产品质量带来了安全隐患^[2]。多年来,农业农村部一直强调建立以质量安全为核心的饲料工业标准体系,强化饲料兽药等投入品的风险管控,提升畜产品质量安全的保障能力。自2002年起陆续颁布了农业部第176号公告《禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录》,第193号公告《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》以及第1519号公告《禁止在饲料和动物饮水中使用的物质》等^[3-5]。因此,各类公告中禁止或限量使用的各种抗生素及其他化合物的检测一直是畜产品质量安全的重要保障。

目前,畜禽组织及其排泄物等样品中抗生素及其他化合物的检测方法日渐多样化,主要有高效液相色谱法(HPLC)^[6]、气相色谱法(GC)^[7]、色谱-质谱联用法^[8-9]、生物传感器法^[10]和酶联免疫法^[11]。上述方法在靶向目标定性、定量检测方面应用极为广泛,并且已有的国家标准多数仅针对某一类抗生素进行检测^[12-14]。但在日趋复杂的样品情况下,这种模式存在无法获取样品中非靶向目标结构信息的局限^[15-16],为实现高通量筛查,基于高分辨质谱技术的全扫描质谱分析方法逐渐进入研究者的视野^[17-20]。液相色谱-串联高分辨质谱技术可在单次进样分析中迅速筛选数百种不同化合物,具有高灵敏度和准确性的优势。因此,本文利用高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术(UPLC-Q-Exactive Orbitrap),建立了猪尿中10类74种常见抗生素及其他化合物的快速筛查和确证方法,通过一级全扫描+自动触发二级质谱扫描(Full scan+dd MS²)模式,可在一个分析周期(21 min)内完成对样品的高精度一级、二级扫描,并得到准确的质量数和碎片离子信息。本方法能同时筛查并确证磺胺类、四环素类、喹诺酮类、大环内酯类、林可胺类、氯霉素类、 β -内酰胺类、硝基咪唑类、苯并咪唑类、喹噁啉类共10类74种药物,大大提高了检验效率和准确率,为及时掌握兽用抗菌药物的使用情况提供了技术和数据支撑。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

乙腈、甲醇(色谱纯,美国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司);实验用水为超纯水(Milli-Q 超纯水系统自制)。

74种抗生素及其他化合物的标准品购自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司、德国 Witega 公司、美国 Sigma 公司、中国药品生物制品检定所、中国兽医药品监察所和天津阿尔塔有限公司。标准品纯度为88.6%~99.8%,相关信息如表1所示。

Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱配 H-ESI II 源、Ultimate 3000 液相色谱系统及 Trace Finder 数据处理系统(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.2 标准溶液的配制

称取10 mg 标准品(根据纯度折算质量),用甲醇或50%乙腈等合适的溶剂溶解并定容至10 mL,制成1 mg/mL 的单标储备液。对于每类化合物,将单标溶液混合配制成50 μ g/mL 或100 μ g/mL 的混合标准溶液,使用时再根据需要混合或稀释。所有标准储备液均置于4 $^{\circ}$ C 下避光保存。

1.3 仪器条件

1.3.1 液相色谱条件 色谱柱:Agilent SB C₁₈柱(3.0 mm \times 100 mm, 1.8 μ m),流动相 A 为0.1% 甲酸水溶液, B 为0.1% 甲酸乙腈溶液。梯度洗脱程序:0~15.0 min, 5%~95% B; 15.0~17.0 min, 95% B; 17.0~17.5 min, 95%~5% B; 17.5~21.0 min, 5% B; 流速:0.3 mL/min; 柱温:30 $^{\circ}$ C, 进样量:10 μ L。

1.3.2 质谱条件 可加热的电喷雾离子源(HESI-II),离子传输管温度:325 $^{\circ}$ C,毛细管电压:3 200 V(正、负离子切换模式),气化温度:350 $^{\circ}$ C,鞘气(N₂):40 L/min,辅助气(N₂):10 L/min,一级质谱驻留时间:100 ms,二级质谱驻留时间:50 ms,一级全扫描范围: m/z 100~1 200,分辨率(R):70 000,扫描模式:Full scan+dd MS²,碰撞裂解气:高纯氮气,碰撞能量:20、40、60 eV。母离子及子离子的精确分子量见表1。

1.4 样品前处理

猪尿样品经 9 000 r/min 离心 3 min 后, 精密移取 200 μ L, 用 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈溶液(95:5, 体积比)稀释至 1 mL, 待测定。

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的优化

待测药物种类多, 且各药物的理化特性各异。因此, 样品前处理方法需具有普适性, 且尽量简化前处理步骤, 以减少目标化合物的损失。PRiME HLB 和 EMR-Lipid 固相萃取法均为通过式固相萃取法, 萃取柱无需活化和平衡, 样品净化过程简单、快速、有效, 近几年被逐渐应用于兽药残留检测领域^[21-22]。由于尿样基质相对简单, 实验对比了直接稀释法、乙腈提取后经 PRiME HLB 固相萃取和 EMR-Lipid 固相萃取 3 种前处理方法。其中, 直接稀释法是将样品经高速离心后直接用初始流动相稀释 5 倍进样分析。后两种固相萃取法是取 2 mL 尿样加入 18 mL 乙腈提取, 过 PRiME HLB(3 mL) 或 EMR-Lipid(3 mL) 固相萃取柱后, 取 1 mL 以氮气吹干, 用 0.5 mL 初始流动相复溶后上机测定。结果表明, 直接稀释法对 74 种药物的提取效果最好, 尤其是对四环素类及喹诺酮类药物提取时损失很小。因此, 选用直接稀释法对猪尿样品进行前处理。同时, 为减少药物过滤膜时的损失, 样品经高速离心并稀释后直接进样。

2.2 筛查与确证方法研究

根据欧盟法规 2002/657/EC^[23], 以识别分(IPs)为指标对化合物进行定性分析, 对于不同法规要求的残留物, 确证所需的 IPs 各不相同。确证指令 96/23/EC^[24] 附录 I-A 组所列的物质(即违禁化合物), 最少需要 4 个识别点; 确证附录 I-B 组所列的物质(即限用化合物), 最少需要 3 个识别点。不同质谱技术的 IPs 亦各不相同, 针对高分辨质谱(分辨率大于 10 000), 需要 1 个母离子与 1 个子离子即可满足 4 个识别点, 其中 1 个母离子为 2.0 IPs, 对应的 1 个子离子为 2.5 IPs。此外, 美国食品药品监督管理局(FDA)陆续发布了关于兽药残留检测的指导准则 FDA-CVM GFI #118 号法规^[25], 针对兽药残留的筛查确证指南^[26], 以及关于食品和饲料中农药残留分析的质量控制和方法验证程序导则 FDA-SANTE/11813/2017^[27]。其中对精确质量数偏差作出了规定, 确证条件为至少需要 1 对合适的母离子与子离子, 母离子的精确质量数偏差 ≤ 5 ppm, 子离子的精确质量数偏差 ≤ 10 ppm。

按照上述原则和仪器方法, 对目标药物单标溶液进样测定并建库分析, 获得母离子的精确质量数、保留时间及其二级碎片离子的全扫描图谱, 找出丰度最高的子离子和母离子作为确证所需的定性离子对。以 74 种药物的保留时间、母离子及子离子的精确质量数作为定性依据, 具体见表 1。

表 1 74 种目标药物的保留时间(RT)、母离子及子离子的精确质量数
Table 1 Retention times(RT), parent ions and fragment informations of 74 targeted compounds

No.	Category	Chinese name	English name	RT (min)	Parent ion (<i>m/z</i>)	Fragment 1 (<i>m/z</i>)	Fragment 2 (<i>m/z</i>)	Fragment 3 (<i>m/z</i>)
1	Sulfonamides (磺胺类, 25 种)	酞磺胺噻唑	Phthalylsulfathiazole	6.94	404.036 94	92.049 48	149.023 30	156.011 40
2		苯甲酰磺胺	Sulfabenzamide	8.17	277.064 14	156.011 38	108.044 39	92.049 48
3		磺胺醋酰	Sulfacetamide	4.60	215.048 49	173.037 92	156.011 38	108.044 39
4		磺胺二甲基嘧啶	Sulfachloropyridazine	6.99	285.020 75	156.011 38	108.044 39	92.049 48
5		磺胺嘧啶	Sulfadiazine	4.93	251.059 72	156.011 38	108.044 39	92.049 48
6		磺胺二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	8.24	311.080 85	156.011 38	108.044 39	92.049 48
7		磺胺邻二甲氧嘧啶	Sulfadoxine	7.23	311.080 85	156.011 38	140.045 45	108.044 39
8		磺胺胍	Sulfaguandine	2.60	215.059 72	60.055 62	92.049 48	108.044 40
9		磺胺甲氧吡嗪	Sulfalen	6.80	281.070 29	156.011 38	108.044 39	92.049 48
10		磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	5.56	265.075 37	190.028 09	156.011 38	108.044 39
11		磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	6.27	281.070 29	215.092 74	156.011 38	126.066 19
12		磺胺二甲基嘧啶	Sulfamethazine	6.01	279.091 02	156.011 38	124.086 92	108.044 39
13		磺胺甲噻二唑	Sulfamethizole	6.07	271.031 79	156.011 38	108.044 39	92.049 48
14		磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	7.37	254.059 39	156.011 38	108.044 39	- *
15		磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxyppyridazine	6.10	281.070 29	215.092 74	156.011 38	126.066 19
16		磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	6.60	281.070 29	215.092 74	156.011 38	126.066 19
17		磺胺二甲唑	Sulfamoxol	5.71	268.075 04	156.011 38	140.016 46	113.070 94

(续表1)

No.	Category	Chinese name	English name	RT (min)	Parent ion (<i>m/z</i>)	Fragment 1 (<i>m/z</i>)	Fragment 2 (<i>m/z</i>)	Fragment 3 (<i>m/z</i>)
18		磺胺硝苯	Sulfanitran	9.33	336.064 87	294.054 30	198.021 94	156.011 37
19		磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	8.42	315.091 02	222.033 17	158.071 27	108.044 39
20		磺胺吡啶	Sulfapyridine	5.24	250.064 47	184.086 92	156.011 38	108.044 39
21		磺胺喹噁啉	Sulfaquinolaxine	8.22	301.075 37	156.011 38	108.044 39	92.049 48
22		磺胺噻唑	Sulfathiazole	5.11	256.020 89	156.011 38	108.044 39	92.049 48
23		磺胺二甲基异噻啶	Sulfisomidine	4.25	279.091 02	156.011 38	124.086 92	108.044 39
24		磺胺异噻唑	Sulfisoxazole	7.61	268.075 04	156.011 38	113.070 94	108.044 39
25		甲氧苄啶	Trimethoprim	4.98	291.145 17	275.113 87	261.098 22	245.103 30
26	Tetracyclines	4-差向脱水四环素	4-Epianhydrotetracycline	7.10	427.149 98	98.060 04	239.070 30	321.075 70
27	(四环素类, 8种)	4-差向四环素盐酸盐	4-Epitetracycline hydrochloride	5.10	445.160 54	410.123 43	201.091 01	98.060 04
28		金霉素	Chlortetracycline	6.60	479.121 57	462.095 02	444.084 46	154.049 87
29		去甲基金霉素	Demeclocyclin	5.59	465.105 92	448.079 37	430.068 81	154.049 87
30		多西环素	Doxycycline	6.32	445.160 54	428.133 99	321.075 75	267.065 18
31		土霉素	Oxytetracycline	5.15	461.155 46	426.118 34	337.070 66	283.060 10
32		四环素	Tetracycline	5.50	445.160 54	410.123 43	154.049 87	98.060 04
33		美他环素	Methacycline	6.56	443.144 89	426.118 34	201.054 62	-
34	Quinolones	西诺沙星	Cinoxacin	7.27	263.066 25	235.071 33	217.060 77	207.040 03
35	(喹诺酮类, 15种)	环丙沙星	Ciprofloxacin	5.17	332.140 50	288.150 67	245.108 47	231.092 82
36		达氟沙星	Danofloxacin	5.00	358.156 15	314.166 32	283.124 12	257.107 50
37		双氟沙星	Difloxacin	5.70	400.146 72	356.156 89	299.099 05	-
38		依诺沙星	Enoxacin	4.60	321.135 75	277.145 92	257.139 69	234.103 72
39		恩诺沙星	Enrofloxacin	5.66	360.171 80	316.181 97	245.108 47	203.061 50
40		氟罗沙星	Fleroxacin	4.80	370.137 30	326.147 47	269.089 62	-
41		氟甲喹	Flumequine	9.40	262.087 40	244.076 83	220.040 45	-
42		洛美沙星	Lomefloxacin	5.00	352.146 72	308.156 90	265.114 70	251.099 05
43		麻保沙星	Marbofloxacin	4.60	363.146 31	320.104 11	72.080 78	-
44		萘啶酸	Nalidixic acid	9.22	233.092 07	205.060 77	187.050 20	-
45		诺氟沙星	Norfloxacin	4.70	320.140 50	276.150 67	233.108 47	256.144 44
46		氧氟沙星	Oflxacin	4.80	362.151 06	318.161 23	261.103 38	-
47		培氟沙星	Pefloxacin	4.80	334.156 15	290.166 32	233.108 47	-
48		沙拉沙星	Sarafloxacin	6.20	386.131 07	342.140 30	299.098 10	322.133 30
49	Macrolide	交沙霉素	Josamycin	8.92	828.474 00	174.112 47	109.064 79	600.337 84
50	(大环内酯类, 6种)	吉他霉素	Kitasamycin	8.60	786.463 43	558.327 27	174.112 47	109.064 79
51		替米考星	Tilmicosin	6.20	869.573 32	174.112 47	88.075 69	126.127 40
52		罗红霉素	Roxithromycin	9.10	837.531 85	679.437 55	158.117 56	116.106 99
53		泰妙菌素	Tiamulin	9.00	494.329 86	192.105 28	119.016 13	-
54		泰乐菌素	Tylosin	7.50	916.526 43	772.447 78	174.112 47	88.075 69
55	Lincosamides	林可霉素	Lincomycin	4.00	407.221 03	126.127 73	359.217 66	-
56	(林可胺类, 2种)	克林霉素	Clindamycin	6.00	425.187 15	126.127 72	377.183 78	-
57	Chloramphenicols	氟苯尼考	Florfenicol	7.40	355.993 19	335.986 96	185.027 79	119.050 24
58	(氯霉素类, 3种)	甲砒霉素	Thiamphenicol	5.70	353.997 52	290.025 93	185.027 79	119.050 24
59		氯霉素	Chloramphenicol	7.60	321.005 05	257.033 46	194.045 88	176.035 32
60	β -Lactam	阿莫西林	Amoxicillin	3.58	366.111 82	208.042 67	134.060 04	114.000 81
61	(β -内酰胺类, 2种)	苯唑西林	Oxacillin	9.76	402.111 82	243.076 42	160.042 68	144.044 39
62	Nitroimidazoles	甲硝唑	Metronidazole	4.24	172.071 67	128.045 45	82.028 74	-
63	(硝基咪唑类, 2种)	羟基甲硝唑	Metronidazole-hydroxy	3.70	188.066 58	144.040 37	126.029 80	123.055 29
64	Benzimidazoles	阿苯达唑	Albendazole	7.90	266.095 77	234.069 56	191.014 78	159.042 71
65	(苯并咪唑类, 7种)	阿苯达唑亚砒	Albendazole sulfoxide	5.82	282.090 69	240.043 74	208.017 52	191.014 78
66		奥吩达唑	Oxfendazole	6.80	316.075 04	284.048 82	223.057 60	191.032 54
67		氟苯达唑	Flubendazole	8.70	314.093 55	282.067 33	123.024 70	-
68		2-氨基氟苯咪唑	2-Amino-flubendazole	6.60	256.088 07	123.024 07	113.039 72	133.063 45
69		甲苯达唑	Mebendazole	8.30	296.102 97	264.076 75	105.033 49	95.049 14
70		噻苯达唑	Thiabendazole	4.40	202.043 34	175.032 44	131.060 37	-
71	Quinoxalines (喹噁啉类, 4种)	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	3-Methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid	6.63	189.065 85	145.076 02	118.065 13	92.049 48
72		乙酰甲喹	Mequindox	6.00	219.076 42	143.060 37	185.070 94	160.063 11
73		喹乙醇	Olaquindox	3.82	264.097 88	246.087 32	202.061 10	177.065 85
74		喹烯酮	Quinocetone	9.77	307.107 72	103.054 23	131.049 41	143.060 37

* no data

2.3 方法的线性关系

高分辨质谱可以提供待测组分可能的元素组成, 仅需采用全扫描并提取精确质量数色谱图即可完成定性定量, 利用自动触发的二级质谱采集完成准确性^[28]。因此, 在检出限浓度下, 只要保证多种药物能够全部检出并能准确性即可, 样品基质效应基本可以忽略。本实验采用溶剂标准曲线法或单点法进行定性定量。

将混合标准中间液用初始流动相稀释成质量浓度为2、5、10、20、50、100、500、1 000、2 000 ng/mL的标准曲线工作溶液, 按照本方法进行检测, 以待测物的分子离子峰面积对其质量浓度(ng/mL)进行线性回归, 获得各目标化合物的标准曲线。结果表明, 74种化合物在各自区间内线性良好, 相关系数 $r^2 > 0.99$ (见表2)。

表2 74种目标药物的相关系数、线性范围及在检出限加标浓度下的回收率与相对标准偏差(RSD)
Table 2 Correlation coefficients, linear ranges, recoveries and relative standard deviations(RSD) at LOD spiked level of 74 targeted compounds

Compound	r^2	Linear range (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
2-Amino-flubendazole	0.999 5	2~500	69.9	6.4
3-Methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid	0.999 6	2~1 000	56.0	5.4
4-Epianhydrotetracycline	0.997 2	2~100	82.7	8.1
4-Epitetracycline hydrochloride	0.993 5	2~500	33.7	20
Albendazole	0.997 7	2~500	92.3	4.4
Albendazole sulfoxide	0.998 6	2~500	113	16
Amoxicillin	0.997 9	2~500	55.8	14
Chloramphenicol	0.991 3	2~100	98.0	6.0
Chlortetracycline	0.990 9	2~500	120	1.4
Cinoxacin	0.996 3	2~500	93.1	3.6
Ciprofloxacin	0.994 8	2~500	56.5	9.6
Clindamycin	0.996 3	2~1 000	81.4	11
Danofloxacin	0.991 4	2~1 000	104	16
Demeclocyclin	0.990 3	2~1 000	92.1	5.7
Difloxacin	0.993 0	2~1 000	75.1	9.7
Doxycycline	0.993 2	2~500	86.7	2.4
Enoxacin	0.997 2	2~500	71.0	8.9
Enrofloxacin	0.994 1	2~1 000	70.3	14
Fleroxacin	0.994 2	2~500	74.1	10
Florfenicol	0.990 2	2~100	75.8	12
Flubendazole	0.998 4	2~1 000	90.2	4.2
Flumequine	0.995 2	2~500	97.2	2.0
Josamycin	0.996 1	2~1 000	59.5	15
Kitasamycin	0.998 2	2~1 000	66.7	17
Lincomycin	0.997 6	2~500	105	5.0
Lomefloxacin	0.995 1	2~500	66.9	8.9
Marbofloxacin	0.997 7	2~500	67.2	6.5
Mebendazole	0.999 3	2~1 000	107	5.5
Mequindox	0.997 8	2~1 000	70.8	15
Methacycline	0.992 4	2~200	96.0	6.1
Metronidazole	0.995 8	2~500	77.3	5.0
Metronidazole-hydroxy	0.998 8	2~500	65.9	5.8
Nalidixic acid	0.998 2	2~500	103	3.2
Norfloxacin	0.996 8	2~500	63.5	14
Ofloxacin	0.998 0	2~500	96.5	1.8
Olaquinox	0.997 8	2~1 000	94.2	20
Oxacillin	0.998 3	2~500	71.6	8.5
Oxfendazole	0.998 3	2~1 000	97.3	5.5
Oxytetracycline	0.991 8	2~500	122	1.3
Pefloxacin	0.990 7	2~500	80.6	6.6
Phthalylsulfathiazole	0.995 4	2~1 000	72.3	10
Quinocetone	0.998 9	2~1 000	93.6	4.6
Roxithromycin	0.991 7	2~500	78.6	18

(续表 2)

Compound	r^2	Linear range (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)
Sarafloxacin	0.998 1	2~500	66.6	8.0
Sulfabenzamide	0.996 7	2~1 000	84.9	6.9
Sulfacetamide	0.996 8	2~500	98.1	15
Sulfachloropyridazine	0.999 2	2~1 000	74.4	11
Sulfadiazine	0.997 6	2~1 000	102	9.0
Sulfadimethoxine	0.998 2	2~1 000	99.6	5.1
Sulfadoxine	0.999 4	2~1 000	90.0	11
Sulfaguanidine	0.999 0	2~500	39.8	11
Sulfalen	0.999 4	2~1 000	86.0	20
Sulfamerazine	0.998 7	2~1 000	145	9.4
Sulfameter	0.996 5	2~1 000	64.7	20
Sulfamethazine	0.999 2	2~1 000	112	10
Sulfamethizole	0.999 1	2~1 000	65.8	12
Sulfamethoxazole	0.999 3	2~1 000	65.3	6.4
Sulfamethoxyipyridazine	0.995 3	2~1 000	84.0	2.6
Sulfamonomethoxine	0.999 0	2~1 000	115	7.9
Sulfamoxol	0.997 5	2~1 000	119	3.7
Sulfantran	0.997 8	2~1 000	76.1	5.9
Sulfaphenazole	0.998 5	2~1 000	108	4.9
Sulfapyridine	0.997 6	2~1 000	95.8	4.4
Sulfaquinolaxaline	0.998 6	2~1 000	87.8	4.9
Sulfathiazole	0.996 0	2~1 000	123	4.9
Sulfisomidine	0.995 1	2~200	120	5.0
Sulfisoxazole	0.999 1	2~1 000	75.4	5.4
Tetracycline	0.991 4	2~500	106	8.3
Thiabendazole	0.996 2	2~200	75.2	9.2
Thiamphenicol	0.990 5	2~50	69.4	13
Tiamulin	0.997 5	2~1 000	71.1	9.2
Tilmicosin	0.990 6	5~500	66.0	21
Trimethoprim	0.992 3	2~100	63.7	9.4
Tylosin	0.993 4	2~1 000	91.5	9.0

2.4 假阴性率与检出限

根据 FDA-SANTE/11813/2017, 定性筛选法的检出限是在至少 95% 的样品中检测到分析物的最低含量水平^[27]。基于检出限的筛查方法验证应分析至少 20 个检出限加标量的样品。经实验考察, 在 10 ng/mL 加标量下, 20 个平行样品中 74 种药物均能检出, 满足假阴性率 < 5% 的要求, 因此确定检出限为 10 ng/mL。空白样品在检出限加标量下的回收率见表 2, 74 种药物的回收率集中在 55.8%~120%, 相对标准偏差为 1.3%~21%。由于本方法仅用于定性分析, 因此对分析物的回收率无要求^[27]。

2.5 实际样品的检测

应用本方法对上海市 8 个区各养殖场共 511 份猪尿样品进行了筛查确证, 均未检出在食品动物中禁用的药物甲硝唑、氯霉素、洛美沙星、诺氟沙星、培氟沙星; 检出率较高的药物依次为土霉素 (10.6%)、3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (9.8%)、喹乙醇 (9.4%)、金霉素 (4.1%)、阿莫西林 (2.5%)、甲氧苄啶 (2.0%) 和阿苯达唑亚砷 (2.0%), 其提取离子色谱图如图 1 所示。对检出率较高的前 5 种药物进行暴露值分析。结果显示, 土霉素、3-甲基喹噁啉-2-羧酸、喹乙醇、金霉素和阿莫西林的检出浓度分别主要分布在 100~500 ng/mL、50~100 ng/mL、50~100 ng/mL、100~500 ng/mL 和 50~200 ng/mL。因此, 该猪尿样品中残留药物以四环素类及喹噁啉类药物为主。上述检出率较高的药物中 3-甲基喹噁啉-2-羧酸为喹乙醇的代谢物, 土霉素、喹乙醇和金霉素是农业部第 168 号公告^[29]附录 1 中可以用来作饲料添加剂的药物, 在猪尿样品中检出属于正常情况; 其余药物均为兽医处方用药, 推测抽样时可能猪正处于治疗状态。

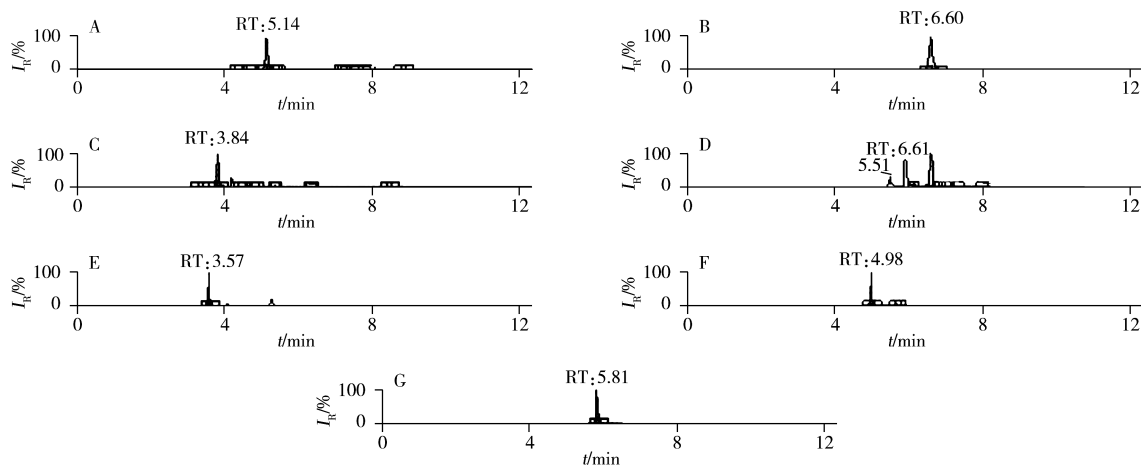


图1 实际样品中检出药物的提取离子色谱图

Fig. 1 Extract ion chromatograms of the detected compounds in real samples

A: oxytetracycline, B: 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid, C: olaquinox, D: chlortetracycline, E: amoxicillin, F: trimethoprim, G: albendazole sulfoxide

3 结 论

本文利用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱可在单次分析中迅速筛选数百种不同化合物的高分辨率优势,建立了猪尿中10类74种抗生素及其他化合物的UPLC-Q-Exactive Orbitrap快速筛查和确证方法。该方法快速简便、准确度高,有效提高了检测效率,适用于猪尿中多种抗生素及其他化合物的快速定性确证,为养殖业药物使用情况的监管提供了有力的技术支持。

参考文献:

- [1] Dai M H, Wang X R, Cui L Q, Zhao Y, Feng J W, Cheng G Y, Huang L L, Wang Y L, Peng D P, Wang X, Yuan Z H. *Chin. J. Vet. Drug* (戴梦红, 王湘如, 崔潞晴, 赵月, 冯家伟, 程古月, 黄玲利, 王玉莲, 彭大鹏, 王旭, 袁宗辉. 中国兽药杂志), **2019**, 53(1): 37-43.
- [2] Yang X H, Wang N, Ye B P. *Pharm. Biotechnol.* (杨晓洪, 王娜, 叶波平. 药物生物技术), **2014**, 21(6): 583-588.
- [3] Ministry of Agriculture. No. 176 Bulletin of the Ministry of the People's Republic of China (农业部. 中华人民共和国农业部公告第176号).
- [4] Ministry of Agriculture. No. 193 Bulletin of the Ministry of the People's Republic of China (农业部. 中华人民共和国农业部公告第193号).
- [5] Ministry of Agriculture. No. 1519 Bulletin of the Ministry of the People's Republic of China (农业部. 中华人民共和国农业部公告第1519号).
- [6] Chen H H, Dai J, Wang H X, Chen S W, Zhu S, Niu W M. *J. Instrum. Anal.* (陈辉华, 戴军, 王洪新, 陈尚卫, 朱松, 钮伟民. 分析测试学报), **2008**, 27(9): 951-955.
- [7] He G H, Ju Y T, Xia F. *Shandong Sci.* (何桂华, 鞠永涛, 夏芳. 山东科学), **2004**, 17(4): 10-14.
- [8] Liu J Y, Huang X, Jia H X. *J. Instrum. Anal.* (刘家阳, 黄旭, 贾宏新. 分析测试学报), **2017**, 36(3): 305-311.
- [9] Li J Y, Guo C F, Cui L H, Liu L P. *Food Res. Dev.* (李婧妍, 郭春锋, 崔立辉, 刘拉平. 食品研究与开发), **2016**, 37(22): 153-157.
- [10] Zhou C Y, Li L R, Liu R Y. *J. Food Saf. Qual.* (周从燕, 李丽蓉, 刘入源. 食品安全质量检测学报), **2017**, 8(1): 150-155.
- [11] Zhou Y R, Li D N, Gu X, Yan F, Wu J P, Zhang X. *Chin. J. Vet. Drug* (周悦榕, 李丹妮, 顾欣, 严凤, 吴剑平, 张鑫. 中国兽药杂志), **2015**, 49(8): 39-45.
- [12] GB/T 20366-2006. Method for the Determination of Quinolones in Animal Tissues—LC-MS/MS Method. National Standard of the People's Republic of China (动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [13] GB/T 20759-2006. Method for the Determination of Sixteen Sulfonamide Residues in Livestock and Poultry Muscles—LC-MS/MS Method. National Standard of the People's Republic of China (畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [14] GB/T 22259-2008. Determination of Oxytetracycline in Feeds—High Performance Liquid Chromatography. National Standard of the People's Republic of China (饲料中土霉素的测定 高效液相色谱法. 中华人民共和国国家标准).

- [15] Xiong C, Li Y W, Zheng Y J, Li W G, Li Y L, Zeng Y T. *Food Sci.* (熊岑, 李苑雯, 郑彦婕, 李卫岗, 黎永乐, 曾泳艇. 食品科学), **2015**, 36(13): 283–287.
- [16] He M L, Guo C C, Shi F, Jiang W. *Chin. J. Pharm. Anal.* (贺美莲, 郭常川, 石峰, 姜玮. 药物分析杂志), **2019**, 39(1): 105–110.
- [17] Wu J P, Zhang J, Zhou Y R, Yan F, Pan J. *Chin. J. Vet. Drug*(吴剑平, 张婧, 周悦榕, 严凤, 潘娟. 中国兽药杂志), **2018**, 52(11): 47–58.
- [18] Gong S S, Zhang J, Yan F, Wu J P, Pan J, Gu X. *J. Instrum. Anal.* (贡松松, 张婧, 严凤, 吴剑平, 潘娟, 顾欣. 分析测试学报), **2019**, 38(1): 22–30.
- [19] Yan F, Li D N, Wu J P, Zhou Z, Zhang X, Pan J, Zhang J. *Chin. J. Vet. Drug*(严凤, 李丹妮, 吴剑平, 周哲, 张鑫, 潘娟, 张婧. 中国兽药杂志), **2016**, 50(2): 29–36.
- [20] Guo C C, Sun H, Shi F, Xing S, Zhang X J, Li K, He M L, Jiang W. *J. Instrum. Anal.* (郭常川, 孙华, 石峰, 邢晟, 张迅杰, 李可, 贺美莲, 姜玮. 分析测试学报), **2018**, 37(3): 300–306.
- [21] Zhang J, Pan J, Yan F, Wu J P, Li D N. *Chin. J. Vet. Drug*(张婧, 潘娟, 严凤, 吴剑平, 李丹妮. 中国兽药杂志), **2018**, 52(3): 52–57.
- [22] Li D N, Yan F, Zhou Y R, Shen W Q, Tao J, Zhang J. *Chin. J. Vet. Drug*(李丹妮, 严凤, 周悦榕, 沈伟强, 陶军, 张婧. 中国兽药杂志), **2017**, 51(2): 29–34.
- [23] 2002/657/EC. Commission Decision Implementing Council Directive 96/23/EC Concerning the Performance of Analytical Methods and the Interpretation of Results(欧盟委员会标准. 欧盟委员会关于分析法和结果说明的表现结果的96/23/EC号理事会指令的实施决议).
- [24] Council Directive 96/23/EC. Commission Staff Working Document on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2010(理事会指令96/23/EC. 欧盟委员会关于2010年各成员国国家残留监测计划实施情况的工作文件).
- [25] FDA – CVM GFI #118. Guidance for Industry Mass Spectrometry for Confirmation of the Identity of Animal Drug Residues (兽药残留检测中质谱方法确证的指南).
- [26] FDA – Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues Using Exact Mass Data for the FDA Foods and Veterinary Medicine Program(FDA关于食品和兽药中化学物质残留的筛查确证指南).
- [27] FDA – SANTE/11813/2017. Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues and Analysis in Food and Feed(关于食品和饲料中农药残留分析的质量控制和方法验证程序导则).
- [28] Huang W W, Hu G H, Gou X L, Liu W L. *J. Food Saf. Qual.* (黄雯雯, 胡光辉, 勾新磊, 刘伟丽. 食品安全质量检测学报), **2016**, 7(11): 4289–4294.
- [29] Ministry of Agriculture. No. 168 Bulletin of the Ministry of the People's Republic of China(农业部. 中华人民共和国农业部公告第168号).

(责任编辑: 丁 岩)