

# LC-MS/MS快速检测动物尿液兽药残留

## Rapid detection of veterinary drug residues in animal urine by LC-MS / MS

刘青<sup>1</sup>, 陈情<sup>2</sup>, 黄文杰<sup>2</sup>, 李荷香<sup>2</sup>, 杨总<sup>1</sup>, 刘冰洁<sup>1</sup>, 郭立海<sup>1</sup>

Liu Qing<sup>1</sup>, Chen Qing<sup>2</sup>, Huang Wenjie<sup>2</sup>, Li Henxiang<sup>2</sup>, Yang Zong<sup>1</sup>, Liu Bingjie<sup>1</sup>, Guo Lihai<sup>1</sup>

SCIEX Application Support Center, China<sup>1</sup>

Jiangxi Huaxing Testing Co., Ltd<sup>2</sup>

**Keywords:** Veterinary drug; urine;

### 引言

随着畜牧业生产中兽药及促生长剂的广泛使用,动物性食品中兽药残留问题日益成为关注的焦点。针对动物尿液的标准目前较少,但是随着监管的前移,动物尿液的检测逐渐成为一种手段。农业农村部、国家卫生健康委员会和国家市场监督管理总局公告2019年第114号,《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019,代替农业部公告第235号中的相应部分)食品安全国家标准实施并制定了部分动物尿液的相关标准。本文采用高效液相色谱串联质谱建立了对于新颁布实施标准中的动物尿液检测标准进行了前处理和方法学验证工作。本文采用高效液相色谱串联质谱建立动物尿液兽药残留的相关标准的方法,该方法的优势和特点:

- 1、方法全面:覆盖GB 31658.3-2021、GB 31658.9-2021中动物尿液的2个相关标准所有的化合物;
- 2、方法灵敏度高:所有化合物灵敏度足以满足以上标准的量限要求;
- 3、紧扣标准:动物尿液的前处理方法均与标准保持一致,方法实用性;

## 1 实验方法

### 1.1 样品前处理

**方法1:** 本方法适用于(GB 31658.3-2021)猪尿中巴氯芬残

留量的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。取试料2.0 mL,于50 mL离心管中,加巴氯芬-D4工作液10  $\mu$ L,用10%盐酸溶液调节pH值至2.0以下,旋涡混匀,8000 r/min离心5min,备用。取固相萃取柱,依次用甲醇3 mL、水3 mL活化。备用液全部过柱,用水3 mL、甲醇3mL依次淋洗,抽干2 min,用5%氨水甲醇溶液6 mL洗脱,收集洗脱液,于50 $^{\circ}$ C水浴氮气吹干,用0.2%甲酸-乙腈溶液1.0mL溶解,滤过,液相色谱-串联质谱测定。

**方法2:** 本方法适用于(GB 31658.9-2021)猪尿和牛尿中雌激素类药物(雌三醇、雌酮、炔雌醇、17 $\alpha$ -雌二醇、17 $\beta$ -雌二醇、己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚)残留量的测定。取试样5.00 mL于50 mL离心管,用乙酸调节pH值至5.2,准确加混合内标工作液50  $\mu$ L,混合15 s,加乙酸铵溶液10 mL、 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶50 $\mu$ L,涡旋1 min,盖盖,37  $^{\circ}$ C  $\pm$  1  $^{\circ}$ C振荡酶解12 h。取出,冷却至室温,加氯化钠4 g,振摇溶解,加乙腈20 mL,涡旋1 min,10000 r/min离心5 min,取乙腈层,加乙腈15 mL,重复提取。合并两次提取液,加正己烷10 mL,涡旋1 min,10000 r/min离心2 min,取乙腈层,40 $^{\circ}$ C氮吹至干,用甲醇1 mL溶解,再加水9 mL,备用。取HLB固相萃取柱,依次用二氯甲烷-甲醇6 mL、甲醇6 mL和水6 mL活化,取备用液,过柱,控制流速不超过2 mL/min,依次用甲醇-水3 mL、水3 mL淋洗小柱,抽干,再将活化过的氨基柱串联在HLB固相萃取柱下方,用二氯甲烷-甲醇8 mL洗脱,收集洗脱液,取下HLB柱,再用二氯甲烷-甲醇2 mL洗氨基柱,合并洗脱液,40  $^{\circ}$ C水浴氮气吹干,用40%乙腈溶液1.0 mL溶解残渣,涡旋混匀,过0.22  $\mu$ m滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

## 1.2 液相色谱条件

液相系统: SCIEX ExionLC™ 系统

色谱柱: Phenomenex C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)

流动相: A为0.1%的甲酸(5 mmol/L乙酸铵溶液), B为乙腈

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

洗脱程序: 梯度洗脱

## 1.3 质谱条件

质谱系统: SCIEX三重四极杆质谱系统

扫描模式: 多反应监测MRM离子源: ESI源; 喷雾电压(IS): 5500/-4500 V; 离子源温度(TEM): 550 °C; 气帘气(CUR): 35 psi; 碰撞气(CAD): Medium; 雾化气(GS1): 55 psi; 辅助雾化气(GS2): 55psi. MRM离子对见(表1)

表1. 离子对信息

母离子(m/z)	子离子(m/z)	化合物名称	去簇电压(V)	碰撞能量(eV)	标准编号
268.9	133.8	hexestrol 1	-86	-10	31658.9
268.9	118.7	hexestrol 2	-86	-10	31658.9
286.9	144.8	estriol-1	-128	-10	31658.9
286.9	170.9	estriol-2	-120	-10	31658.9
270.9	145	estradiol 1	-106	-10	31658.9
270.9	182.8	estradiol 2	-106	-10	31658.9
269	144.9	estrone 1	-130	-11	31658.9
269	159	estrone 2	-130	-11	31658.9
295	144.8	ethynyl estradiol 1	-130	-12	31658.9
295	268.8	ethynyl estradiol 2	-130	-13	31658.9
265.2	249	dienestrol 1	-115	-10	31658.9
265.2	235.1	dienestrol 2	-115	-10	31658.9
267.1	251.1	Diethylstilbestrol 1	-100	-10	31658.9
267.1	237.1	Diethylstilbestrol 2	-100	-10	31658.9
214.1	151	Accustandard 1	75	10	31658.3
214.1	179	Accustandard 2	75	5	31658.3

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化

该实验详细优化了色谱条件, 比较了不同品牌、不同型号的色谱柱以及流动相, 使得所有的化合物有较好的分离、尖锐的峰形, 同时有效的避开基质干扰, 定量结果更加准确。

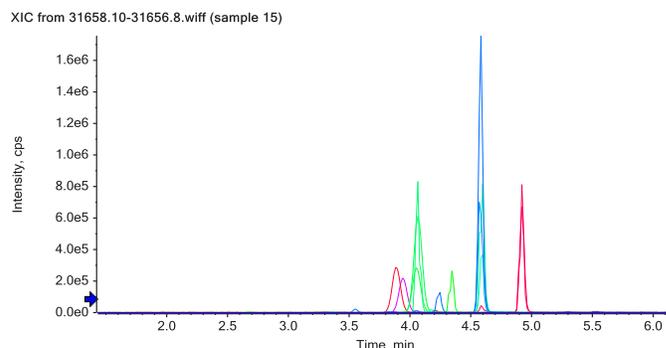


图1. 基质加标激素类药物提取离子流图(GB 31658.9-2021)

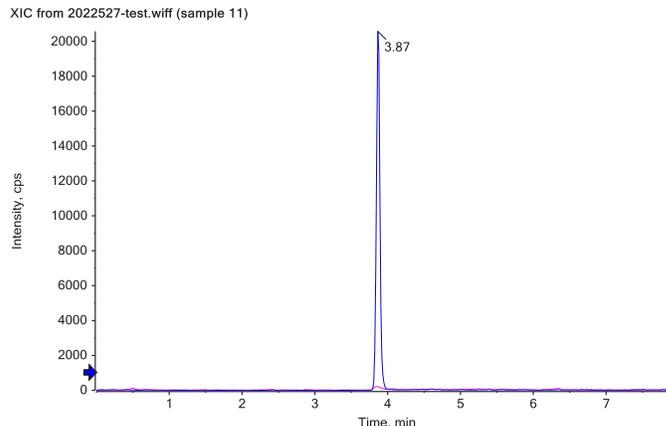


图2. 基质加标巴氯芬提取离子流图(GB 31658.3-2021)

### 2.2 方法考察了重复性、线性等

实验分别按照前述前处理方法, 选取猪尿空白基质添加1倍和5倍地定量限两个浓度, 每个浓度重复6次, 准确度在85.45%-105.32%之间(n=6), 相对标准偏差小于2.50%(表2), 实验结果表明该方法具有较好的准确度以及良好的稳定性。基质加标曲线相关系数均大于 $r > 0.995$ (图2), 表明线性良好。该实验方法完全满足标准定量检测的要求。

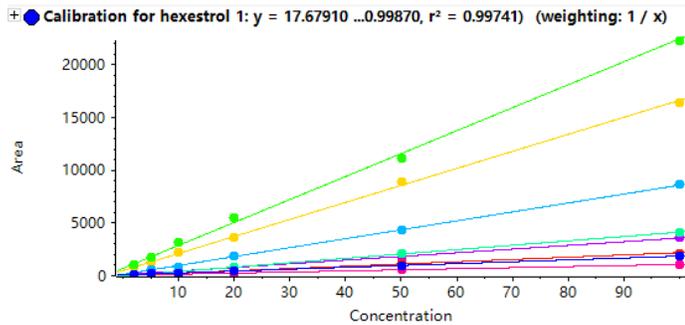


图2. 激素类药物空白基质线性回归曲线 (GB 31658.9-2021)

### 3 小结

本文建立了高效液相色谱-串联三重四极杆质谱快速定量分析检测动物尿液中两类兽药的检测方法。实验严格按照GB 31658.3-2021、GB 31658.9-2021标准进行，确保了实验结果的有效性，定量结果更准确。该方法足以满足《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019，代替农业部公告第235号中的相应部分)及9项兽药残留检测方法食品安全国家标准的定量要求，在动物尿液的分析检测具有重要的参考意义。

表2. 回收率及重复性实验 (n=6)

化合物名称	添加浓度 (µg/kg)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
雌三醇	1.0	96.56	1.13
	5.0	95.43	1.65
雌酮	1.0	89.35	2.21
	5.0	92.14	1.56
炔雌醇	1.0	99.19	1.76
	5.0	103.76	2.05
17α-雌二醇	1.0	102.45	1.97
	5.0	106.45	1.24
17β-雌二醇	1.0	105.32	1.87
	5.0	99.24	2.50
己烯雌酚	1.0	101.23	1.25
	5.0	98.76	1.76
己二烯雌酚	1.0	85.45	1.86
	5.0	92.67	2.04
己烷雌酚	1.0	101.42	1.98
	5.0	105.23	1.54
雌三醇	1.0	99.76	1.93
	5.0	93.65	1.17
巴氯芬	1.0	101.76	1.75
	5.0	103.54	1.95

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14906-ZH-A



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7200  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话: 020-8510-0200  
传真: 020-3876-0835  
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)