

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.04.06

液相色谱-串联质谱法测定阿维菌素粉中 非法添加非泼罗尼的研究

杨修镇, 陈 玲, 尹伶灵, 刘少宁, 牛华星, 张呈军

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 济南 250022)

[收稿日期] 2017-09-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 04-0032-06 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 建立了阿维菌素粉中非法添加非泼罗尼的液相色谱-串联质谱检测方法, 色谱柱为 C18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), 以水-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾离子源负离子检测模式 (ESI-) 和多反应监测 (MRM) 模式测定, 外标法定量。结果表明, 非泼罗尼进样浓度在 0.025 ~ 20 ng/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系 ($r^2 = 0.9995$); 检出限和定量限分别为 0.04 mg/g 和 0.1 mg/g; 在 0.1、1、30 mg/g 三个添加水平下, 回收率在 84.6% ~ 112.6% 之间, 相对标准偏差为 1.0% ~ 7.7%。本方法简便、准确、快速、灵敏, 适用于阿维菌素粉中非法添加非泼罗尼的检测。

[关键词] 阿维菌素粉; 非泼罗尼; 液相色谱-串联质谱

Determination of Fipronil Illegally Adulterated in Avermectin Powder by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

YANG Xiu-zhen, CHEN Ling, YIN Ling-ling, LIU Shao-ning, NIU Hua-xing, ZHANG Chen-jun

(Shandong Provincial Veterinary Medicine Supervision Institute, Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province,
Jinan 250022, China)

Abstract: A detection method of fipronil illegally adulterated in avermectin powder was established by liquid chromatography-tandem mass spectrometric. The isolation was performed on a C18 column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), gradient elution was carried out with water-acetonitrile as mobile phase. Electrospray negative ion source (ESI-), multiple reaction monitoring mod (MRM), external standard method were applied to samples analysis. The results showed that there was a good linear correlation between the peak areas and the concentrations of fipronil at the range of from 0.025 to 20 ng/mL ($r^2 = 0.9995$). The limit of detection and limit of quantification was 0.04 mg/g and 0.1 mg/g. The method validation was carried out at 0.1, 1, 30 mg/g, the recoverys were from 84.6% to 112.6%, and the RSDs were from 1.0% to 7.7%. This method was simple, accurate, quick and sensitive. It was suitable for detection of fipronil illegally adulterated in avermectin powder.

Key words: avermectin powder; fipronil; liquid chromatography-tandem mass spectrometric

阿维菌素粉收载于《兽药国家标准》(化学药品、中药卷)第一册,为兽用杀虫、杀螨剂,通过促进 γ -氨基丁酸(GABA)释放,增强神经膜对 Cl^- 通透性,阻断神经信号传递,使肌肉细胞失去收缩能力而致虫体死亡,对寄生于动物体内的线虫和节肢动物有极强的驱杀作用^[1]。非泼罗尼(fipronil)是一种新型高效杀虫剂,有触杀、胃毒及内吸作用,对跳蚤、螨、鳞翅目、同翅目、半翅目等害虫有效,但环境毒理学发现其对生态环境具有潜在的危险性^[2],我国于 2009 年 10 月起禁用于农业和畜牧业。2017 年 8 月初,荷兰爆出“毒鸡蛋”事件,鸡蛋受杀虫剂非泼罗尼大范围污染,持续发酵的欧洲“毒鸡蛋”事件影响欧洲多国。阿维菌素粉是畜牧业临床应用广泛的驱虫药,部分养殖场夏季常用于防治蝇蛆,为防止不法厂家为增强阿维菌素粉的效果在其中添加非泼罗尼给畜禽产品带来安全隐患,农业部紧急发布了 2571 号公告^[3],公布了兽药中非法添加非泼罗尼检查方法标准。该标准主要适用于阿维菌素粉,采用高效液相色谱法测定,紫外光谱匹配定性。目前尚无采用液相色谱-串联质谱法测定阿维菌素粉中非法添加非泼罗尼的报道。

1 仪器与材料

Waters Xevo TQ-S 高效液相-串联质谱仪;电

子天平(感量 0.01 g、0.00001 g);非泼罗尼对照品,批号 20170328,含量 98.5%,国家标准物质中心;阿维菌素粉(批号 20170301,山东天宇生物科技有限公司提供)。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 液相色谱条件 色谱柱为 C18 (100 mm×2.1 mm,1.7 μm),流动相 A:水;流动相 B:乙腈;流速 0.2 mL/min;进样量 2 μL ;柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ 。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

Tab 1 HPLC Gradient Elution			
时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	A/%	B/%
0	0.2	10	90
3.5	0.2	90	10
4	0.2	10	90
5	0.2	10	90

2.2 质谱条件 根据参考文献^[4]方法,电喷雾离子源;负离子扫描(ESI⁻);多反应监测(MRM);离子源温度:150 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂温度:400 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂氮气流速:900 L/h;毛细管电压:3 kV;测试药物定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量经调谐确定,具体见表 2。

表 2 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量

Tab 2 The qualitative and quantitative ion pair and the corresponding cone voltage and collision energy				
名称	定量离子对	定性离子对	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
非泼罗尼	435.1>329.9	435.1>329.9	8	18
		435.1>249.9		26

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液制备 精密称取非泼罗尼照品 25 mg 置 25 mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,即得 1 mg/mL 的非泼罗尼对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液,加 20%乙腈水溶液逐级稀释成 5 ng/mL 的非泼罗尼对照品溶液,即得。

2.3.2 供试品溶液制备 称取阿维菌素粉约 1.0 g,

精密称定,置 200 mL 容量瓶中,加乙腈约 150 mL,振摇 5 min,加乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 1 mL 置 100 mL 容量瓶中,加 20%乙腈稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL 置 100 mL 容量瓶中,加 20%乙腈稀释至刻度,摇匀,滤过,作为供试品溶液。

2.3.3 阴性样品溶液制备 取不含非泼罗尼的阿

维菌素粉(批号 20170301,山东天宇生物科技有限公司提供),按供试品溶液制备方法制备阴性样品溶液。

2.3.4 阳性样品溶液制备 取不含非泼罗尼的阿维菌素粉(批号 20170301,山东天宇生物科技有限公司提供),每 1 g 添加非泼罗尼 10 mg 后,按供试

品溶液制备方法制备阳性样品溶液。

2.4 专属性试验 精密吸取对照品溶液、阳性样品溶液、阴性样品溶液各 2 μ L,注入液相色谱-串联质谱仪,在上述液相色谱条件和质谱条件下进行测定,阳性样品溶液色谱中在与对照品色谱相应的位置出相同的峰,阴性样品无干扰,结果见图 1~图 3。

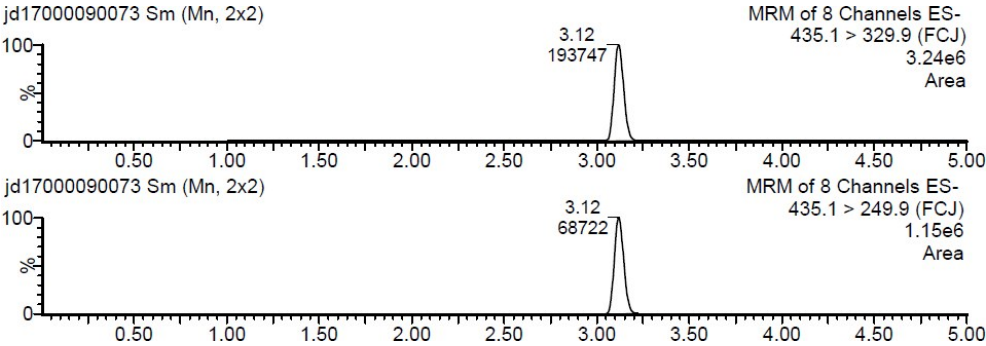


图 1 非泼罗尼对照品溶液色谱图

Fig 1 Chromatographic trace of fipronil standard solution

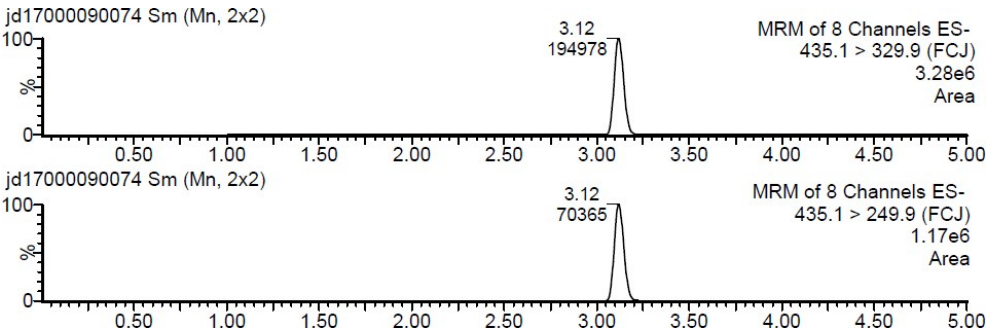


图 2 阳性样品溶液色谱图

Fig 2 Chromatographic trace of positive sample solution

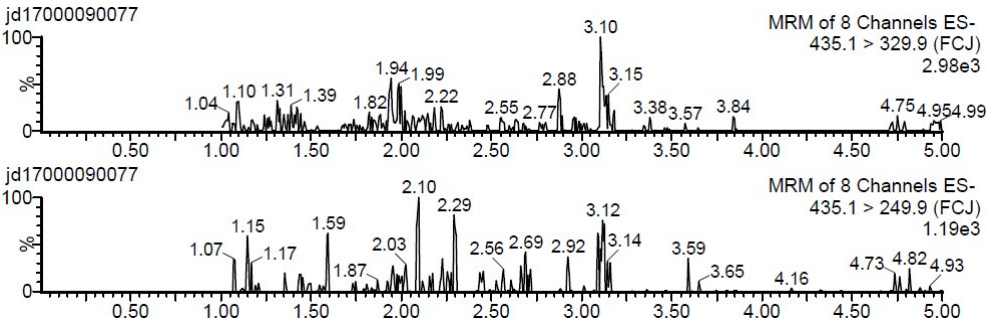


图 3 阴性样品溶液色谱图

Fig 3 Chromatographic trace of negative sample solution

2.5 线性关系考察 精密量取非泼罗尼对照品贮备液,用 20%乙腈水溶液逐级稀释成 0.025、0.05、0.5、5、10、20 ng/mL 的系列溶液,注入液相色谱-串联质谱仪,在上述液相色谱条件和质谱条件下进行测定,以定量离子峰面积(y)为纵坐标,浓度为横坐标(x ,ng/mL),进行线性回归分析。回归方程为: $y=53349x-6170.7(r^2=0.9995)$,结果表明非泼罗尼进样浓度在 0.025~20 ng/mL 范围内与定量离子峰面积呈良好的线性关系。

2.6 基质效应试验 精密量取非泼罗对照品贮备液,用阴性样品溶液逐级稀释成 0.025、0.05、0.5、5、10、20 ng/mL 的系列溶液,注入液相色谱-串联质谱仪,在上述液相色谱条件和质谱条件下进行测定,与线性关系考察项相应浓度所得的色谱图进行比较,相对偏差均小于 3%,说明阿维菌素粉基质不会对非泼罗尼产生显著的影响,故采用直接外标法定量。

2.7 检出限与定量限 取不含非泼罗尼的阿维菌素粉(批号 20170301,山东天宇生物科技有限公司

提供),添加一定量非泼罗尼,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,在上述液相色谱条件和质谱条件下进行测定。满足欧盟 657 号决议^[5]规定的定性条件的最低添加量为本方法的检出限,大于检出限且定量离子色谱峰的信噪比(S/N)满足在 10:1 以上,并且回收率满足 80%~120%之间的最低添加量为本方法的定量限^[6]。本方法的检出限为 0.04 mg/g,定量限为 0.1 mg/g。

2.8 精密度与回收率试验 取不含非泼罗尼的阿维菌素粉(批号 20170301,山东天宇生物科技有限公司提供),每 1 g 分别添加非泼罗尼 0.1、1、30 mg(低量添加系采用加入一定量的对照品贮备液来实现,例如每 1 g 用移液器加入 100 μ L 的 1 mg/mL 的非泼罗尼对照品贮备液来实现 0.1 mg/g 添加),各平行 5 份,按供试品溶液制备方法制备样品溶液,分别注入液相色谱-串联质谱仪,在上述液相色谱条件和质谱条件下进行测定,0.1、1、30 mg/g 三个添加水平下,回收率在 84.6%~112.6%之间,相对标准偏差为 1.0%~7.7%。,结果见表 3。

表 3 精密度与回收率试验

Tab 3 Precision and recovery test

添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.1	0.0959	95.9	92.4	7.7
0.1	0.0914	91.4		
0.1	0.1026	102.6		
0.1	0.0876	87.6		
0.1	0.0846	84.6		
1	1.0011	100.1	100.4	1.0
1	1.0105	101.0		
1	1.0154	101.5		
1	0.9876	98.8		
1	1.0054	100.5		
30.12	32.572	108.1	107.7	2.7
29.87	31.573	105.7		
30.04	31.767	105.7		
29.92	33.702	112.6		
30.33	32.338	106.6		

2.9 供试品溶液稳定性试验 取同一阳性样品溶液,于制备后 0、2、4、6、12、24、48 h 注入液相色谱-串联质谱仪,在上述液相色谱条件和质谱条件下进行测定,非泼罗尼含量的 *RSD* 为 4.2%,表明样品溶液在 48 h 内稳定。

2.10 50 批样品检测结果 对从兽药 GSP 经营部随机购买的 50 批阿维菌素粉按照本研究建立的方法进行检测,结果均未检出非泼罗尼。

3 讨论与小结

目前家禽养殖场环境一般较差,粪便尚未完全做到无害化处理^[7],夏季蝇蛆滋生产生的传染病严重影响了经济效益。应将养殖场粪便及时清理,采用密封发酵处理等措施减少蝇蛆繁殖,而不是大量使用兽药来控制蝇蛆。兽药的大量使用除增加成本外,还会致使畜禽产品残留量超标危害食品安全。

我国已发布的农产品标准中非泼罗尼的残留检测较为常见,例如 SN/T 4039-2014 出口食品中萘乙酰胺、吡草醚、乙虫腈、氟虫腈残留量的测定方法液相色谱-质谱/质谱法,采用了乙腈提取、HLB 固相萃取柱净化的方法。阿维菌素粉中非法添加非泼罗尼是以治疗为目的,添加量较大,因此,参照农业部第 2571 号公告公布的兽药中非法添加非泼罗尼检查方法采取了直接溶解稀释法。

农业部第 2571 号公告公布的兽药中非法添加非泼罗尼检查方法采用紫外光谱匹配定性,物质的紫外吸收光谱是其分子中生色团及助色团的特征,而不是整个分子的特征,如果物质组成的变化不影响生色团和助色团,就不会显著地影响其紫外吸收光谱^[8]。本方法采用串联质谱的两对离子定性,大大排除了假阳性的可能,定性更为准确。非泼罗尼化学结构中含有 $-NH_2$ 等电负性较强的基团,易于失去 H 得到负离子峰,因此,采用负离子扫描 (ESI⁻) 模式。仪器在由正离子模式向负离子模式切换时应应对系统进行足够的平衡,少量甲酸的存在会严重影响离子化,必要时可对插入流动相的管线及吸头先进行清洗。非泼罗尼极性较小,在色谱柱上保留较强,如果采用水-甲醇为流动相进行梯度洗脱,分析时间较长,乙腈洗脱能力强,黏度较小,可有效

降低色谱系统压力,且在实际分析中能够获得良好的峰形,故采用水-乙腈为流动相进行梯度洗脱。

阿维菌素粉基质较为简单,基质效应试验证明基质不会对非泼罗尼产生显著的影响,因此,采用了直接外标定量的方法,且各添加浓度回收率能处于 80%~120% 之间,满足定量要求。

从兽药 GSP 经营部随机购买的 50 批阿维菌素粉均未检出非泼罗尼,这与农业部实施《兽医兽药经营质量管理规范》和以兽药“二维码”标识为核心的兽药追溯监管工作有关。目前有些养殖场通过互联网和物流渠道购买兽药,兽药管理部门难以对这种渠道的兽药进行有效监管,应加大这种兽药的检查力度。

本试验建立的阿维菌素粉中非法添加非泼罗尼检查方法简便、准确、快速、灵敏,适用于阿维菌素粉中非法添加非泼罗尼的检测。

参考文献:

- [1] 李卫平. 阿维菌素的研究进展[J]. 中国药学, 2012, 21(19): 108-110.
Li W P. Research progress of avermectin [J]. China Pharmaceuticals, 2012, 21(19): 108-110.
- [2] 徐广春, 顾中言, 杨玉清, 等. 氟虫腈的应用和风险研究进展[J]. 现代农药, 2008, 7(2): 1-5.
Xu G C, Gu Z Y, Yang Y Q, *et al.* Progress in Research on Risks of Pesticide Fipronil and Its Application [J]. Modern Agrochemicals, 2008, 7(2): 1-5.
- [3] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 2571 号[S].
The Ministry of agriculture. Ministry of agriculture Bulletin No. 2571[S].
- [4] 吴成, 任海雷, 赵志强, 等. 液相色谱-串联质谱法检测芹菜中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 福建分析测试, 2016, 5: 37-41.
Wu C, Ren H L, Zhao Z Q, *et al.* Determination of the fipronil and metabolites residues in celery by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Analysis of Fujian tested, 2016, 5: 37-41.
- [5] Commission Decision (EC) No 657/2002 of the European parliament and of the council[S].
- [6] 胡贝贞, 蔡海江, 宋伟华, 等. 茶叶中氟虫腈等 8 种农药残留的液相色谱-串联质谱法测定及不确定度评估[J]. 色谱, 2012, 30(9): 889-895.

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.04.07

氮源、碳源影响红色糖多胞菌发酵的研究

张 萍, 师文飞, 黄文福, 牛 春*

(宁夏泰瑞制药股份有限公司, 银川 750100)

[收稿日期] 2017-10-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 04-0037-09 [中图分类号] S859.796

[摘 要] 为进一步提高红色糖多胞菌发酵水平, 采用 Plackett-Burman 法、最陡爬坡实验和 Box-Behnken 设计, 针对不同氮源、碳源进行摇瓶发酵研究, 并利用 Minitab 15 软件进行二次回归分析。结果表明, 淀粉、糊精、玉米浆和黄豆饼粉对红霉素发酵效价影响较大, 通过响应面法得到优化发酵培养基最佳组成为: 淀粉 52.3 g/L、糊精 14.0 g/L、黄豆饼粉 45.3 g/L、玉米浆 14.6 g/L。在最优培养基下, 红霉素的产量达到 7764 U/mL, 比优化前提高了 12%。

[关键词] 红色糖多胞菌; 发酵培养基; 响应面法

Effects of Carbon Sources and Nitrogen Sources on Fermentation Titer of the *Saccharopolyspora erythraea*

ZHANG Ping, SHI Wen-fei, HUANG Wen-fu, NIU Chun*

(NingXia TaiRui Pharmaceutical Company Co Ltd, Yinchuan 750100, China)

Corresponding author: NIU Chun, E-mail: niuchun1974@163.com

Abstract: In order to improve the productive ferment level of the *Streptomyces erythraea*, Plackett-Burman, design, Steepest ascent design and Box-Behnken design were conducted to study the effects of different carbon sources and nitrogen sources on ferment titer based on shaking flask for fermentation. Minitab-15 software was used for a quadratic regression analysis. The results showed that starch, dextrin, corn steep liquor and soybean meal have great influences on the fermentation titer of erythromycin. optimum levels of starch, dextrin, soybean

作者简介: 张 萍, 兽医师, 从事微生物发酵研究。

通讯作者: 牛 春. E-mail: niuchun1974@163.com

Hu B Z, Cai H J, Song W H, et al. Determination of eight pesticide residues in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its uncertainty evaluation[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30 (9): 889-895.

[7] 朱凤连, 马友华, 周 静, 等. 我国畜禽粪便污染和利用现状 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(13): 48-50.

Zhu F L, Ma Y H, Zhou J, et al. Analysis on present situation of pollution of animal excrement in china [J]. Anhui Agri.Sci.

Bull, 2008, 14(13): 48-50.

[8] 孙恩玲. 药物分析中紫外光谱的定性定量方法及应用[J]. 光谱仪器与分析, 1991, 1: 5-8.

Sun E L. Analysis of qualitative and quantitative methods and applications of UV spectrum [J]. Spectronic Instrumentation and Analysis, 1991, 1: 5-8.

(编辑: 侯向辉)