

超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中克霉唑的残留量

胡贝贞¹, 董文洪¹, 林 斌², 饶桂维³, 王石磊³, 韩 超^{3*}

(1. 绍兴海关综合技术服务中心, 绍兴 312000; 2. 浙江省标准化研究院, 杭州 310012;
3. 浙江树人大学 生物与环境工程学院, 杭州 310015)

摘 要: **目的** 建立 QuEChERS 提取和净化、超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等畜禽肉和猪肝、猪肾、羊肝、鸡心等畜禽内脏中克霉唑残留的分析方法。**方法** 样品经正己烷饱和的乙腈提取, 提取液经乙腈饱和的正己烷液分配除脂, 并经含 PSA 和 C₁₈ 粉末的净化管进一步净化。采用 0.1% 甲酸和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)测定, 同位素内标法定量。**结果** 本方法在 7 min 内完成分离分析, 方法在 0.2~20.0 µg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 r 为 0.9999。在 0.2、2.0 和 20 µg/kg 添加水平下的回收率为 78.5%~111.9%, 相对标准偏差小于 11.1%, 方法定量限为 0.2 µg/kg。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合动物源食品中克霉唑残留量的测定。

关键词: 克霉唑; 液相色谱-串联质谱法; 动物源食品; 残留测定

Determination of clotrimazole residue in food of animal origin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HU Bei-Zhen¹, DONG Wen-Hong¹, LIN Bin², RAO Gui-Wei³, WANG Shi-Lei³, HAN Chao^{3*}

(1. Comprehensive Technical Service Center of Shaoxing Customs, Shaoxing 312000, China; 2. Zhejiang Institute of Standardization, Hangzhou 310012, China; 3. College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Hangzhou 310015, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of clotrimazole residues in pork, beef, mutton, chicken and other livestock and poultry meat and in pig liver, pig kidney, sheep liver, chicken heart and other livestock and poultry viscera by UPLC-MS/MS after QuEChERS extraction and purification. **Methods** The sample was extracted by n-hexane saturated acetonitrile, the extract was degreased by acetonitrile saturated n-hexane liquid-liquid distribution, and further purified by a purification tube containing PSA and C₁₈ powder. Using 0.1% formic acid and acetonitrile as mobile phase for gradient elution, multi-reaction monitoring mode (MRM) determination and isotope internal standard method were carried out. **Results** The separation and analysis were completed within 7 min with a good linear relationship in the range of 0.2–20.0 µg/L, and the correlation coefficient r was 0.9999. The recoveries ranged from 78.5% to 111.9% at spiked levels 0.2, 2.0 and 20 µg/kg, the relative standard

基金项目: 浙江树人大学人才引进专项(2019R024)

Fund: Supported by Special Fund for Talent Introduction of Zhejiang Shuren University (2019R024)

*通讯作者: 韩超, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全及环境中有毒有害物质的检测。E-mail: hanchao96@163.com

*Corresponding author: HAN Chao, Ph.D, Professor, College of Biology and Environmental Engineering, Zhejiang Shuren University, Zhoushandonglu 19#, Gongshu District, Hangzhou 310015. E-mail: hanchao96@163.com

deviation was less than 11.1%, and the quantitative limit was 0.2 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for detecting clotrimazole residue in animal muscles and viscera.

KEY WORDS: clotrimazole; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; food of animal origin; residue determination

1 引言

克霉唑属于治疗真菌感染疾病的咪唑类广谱抗真菌药,主要外用于皮肤、黏膜、腔道等真菌感染部位,对多种真菌尤其是白色念珠菌具有较好的抗菌作用^[1]。但目前已发现包括克霉唑在内的多数抗真菌药存在细胞毒性较强的问题^[2]。另有研究指出^[3],部分羊肉中存在包括克霉唑在内的抗真菌药物残留。但是目前国内外已发布的标准和法规未对食品中克霉唑在内的此类化合物做出规定,我国最新发布的 GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》^[4]也未对克霉唑作出限量规定。因此,建立动物源食品中快速、简便、准确的克霉唑残留检测方法,可以从源头控制其不当使用,减少其残留带来的食品安全问题。

目前国内外对克霉唑的测定主要集中在人用药品中克霉唑含量的分析^[5-10]、化妆品中克霉唑残留的分析^[11,12]、人体血浆和尿液中克霉唑残留的分析^[13],关于食品中克霉唑残留含量测定的研究很少,仅张凯等^[3]报道了采用超高效液相色谱-串联质谱 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 法测定了羊肉中包括克霉唑在内的 8 种抗真菌药的残留。

QuEChERS 法具有所用溶剂少、操作简便快速等优点,已普遍用于食品中药物残留的提取和净化^[14-16],液相色谱-串联质谱法 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 结合同位素内标定量将色谱高效的分离效能和质谱的高灵敏度、强抗干扰的监测能力相结合,实现了在复杂基质背景下对目标物的准确测定^[17-19]。

畜禽肉和内脏等动物源食品具有脂肪和蛋白质含量高的特点,为此,本研究对 QuEChERS 方法的提取和净化步骤进行了改进,提取溶剂改用正己烷饱和的乙腈,净化步骤增加液液分配除脂,采用同位素内标法定量校正回收率和基质效应,建立了猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等畜禽肉和猪肝、猪肾、羊肝、鸡心等畜禽内脏中克霉唑残留量的 UPLC-MS/MS 测定方法,以期对畜禽肉和畜禽内脏中克霉唑残留量的检测和确证提供技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

SHIMADZU 8060 超高效液相色谱-串联质谱仪(日本岛津公司); GM300 组织捣碎机(德国莱驰公司); T18 型均

质器(德国 IKA 公司); ST16 R 离心机(美国 Thermo 公司); Q-POD Element 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

克霉唑标准品(CAS No. 23593-75-1, 99.9%纯度,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH); 克霉唑-d5(99.0%纯度,加拿大 CDN 公司)。

QuEChERS 盐析包(内含 4 g 硫酸镁、1 g 柠檬酸钠 Na Citrate、0.5 g 柠檬酸钠半水合物、1 g 氯化钠)、QuEChERS 净化管(2 mL 规格,内含 150 mg 硫酸镁、50 mg PSA 粉末、50 mg C_{18} 粉末)[月旭科技(上海)股份有限公司]。乙腈、正己烷(色谱纯,美国 TEDIA 公司提供);猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等畜禽肉和猪肝、猪肾、羊肝、鸡心等畜禽内脏样品购自当地超市。

2.2 标准溶液配制

称取克霉唑标准品 10 mg,用乙腈溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,制得 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑标准储备液;称取克霉唑-d 5 标准品 1 mg,用乙腈溶解并转移至 10 mL 容量瓶中,用乙腈定容,制得 100 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑-d 5 标准储备液。

取 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑标准储备液 0.1 mL,用乙腈稀释定容至 100 mL,制得 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑标准使用液。取 100 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑-d 5 标准储备液 0.1 mL,用乙腈稀释定容至 10 mL,制得 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑-d 5 标准使用液。

于 10 mL 容量瓶中各加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑-d 5 标准使用液 20 μL ,再分别加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑标准使用液 2、5、20、50、200 μL ,并用乙腈定容至 10 mL,制得浓度为 0.2、0.5、2.0、5.0、20.0 $\mu\text{g/L}$ 的克霉唑标准曲线,内标克霉唑-d 5 的浓度均为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3 样品前处理

2.3.1 试样的制备

抽取有代表性的样品约 500 g,用组织捣碎机捣碎均匀,装入自封袋中,-18 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻,备用。

2.3.2 提取

称取 10 g(精确至 0.001 g)捣碎的于 50 mL 离心管中,加入 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的克霉唑-d 5 标准溶液 20 μL ,准确加入 10 mL 正己烷饱和的乙腈,15000 r/min 高速均质提取 2 min,加入含 4 g 硫酸镁、1 g 柠檬酸钠 Na Citrate、0.5 g 柠檬酸钠半水合物、1 g 氯化钠的盐析包,10000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

2.3.3 净 化

转移全部上清液中于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷, 于涡旋混匀器上涡旋 1 min, 10000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层, 再加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷重复 1 遍以上操作。

取乙腈层溶液 1 mL, 加入到含 150 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA 粉末、50 mg C₁₈ 粉末的 2 mL 净化管中, 涡旋振荡后 10000 r/min 离心 5 min, 上清液过 0.22 μm 的尼龙滤膜后供 UPLC-MS/MS 测定。

2.4 色谱、质谱测定条件

2.4.1 色谱条件

岛津 Shim-pack GIST 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm), 流动相: 0.1%甲酸(A)-乙腈(B), 流速: 0.3 mL/min, 进样体积: 1 μL, 柱温: 40 °C。梯度洗脱程序: 0~3.0 min, 20%~80% B; 3.0~7.0 min, 80% B; 7.0~9.5 min, 80%~20% B。

2.4.2 质谱条件

电喷雾离子(ESI)源: 正离子扫描, 离子源接口电压: 4.0 kV; 雾化气(氮气/空气): 3.0 L/min, 加热气(空气): 10 L/min, 干燥气(氮气): 10 L/min, 碰撞气(氩气): 270 pka; 接口温度: 300 °C, DL 温度: 250 °C, 加热模块温度: 400 °C; 检测器电压: 2.12 kV; 扫描模式: 多反应监测模式, 具体条件见表 1。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的优化

分别考察了甲醇-水、乙腈-水溶剂体系为流动相以及流动相中分别添加 0.1%甲酸、5 mmol/L 乙酸铵等溶液对克霉唑的色谱行为和离子化程度的影响。结果发现, 甲酸体系比乙酸铵体系能获得更好的质谱响应, 乙腈体系比甲醇体系能获得更好的峰型且柱压更低, 故本研究选用以 0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相。比较了岛津公司的 Shim-pack GIST 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)和 InertSustain AQ-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.9 μm), 发现前者峰型更好, 出峰时间合适, 克霉唑出峰处无杂质干扰, 故选择 Shim-pack GIST 色谱柱。

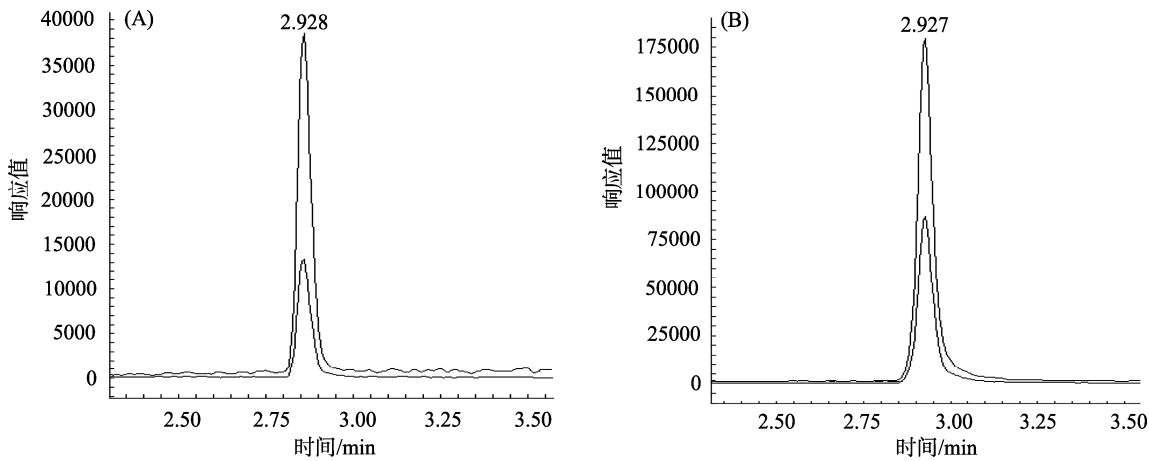
3.2 质谱条件的优化

取 100 μg/L 克霉唑和克霉唑-d 5 标准品溶液, 分别在电喷雾电离源的正离子和负离子模式下进行扫描。结果表明, 在 ESI 源的正离子模式下, 克霉唑和克霉唑-d 5 均呈现最佳响应。在不同碰撞能量下, 对目标物的母离子分别进行二级质谱扫描, 并优化母离子电压和碰撞电压, 得到每个母离子的碎片离子, 优化后的质谱参数见表 1, 标准溶液 MRM 色谱图见图 1。

表 1 克霉唑和克霉唑-d5 的多反应监测条件
Table 1 MRM conditions of clotrimazole and d5-clotrimazole

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	保留时间/min	Q1 电压/V	碰撞电压/V	Q3 电压/V
克霉唑	277.0	165.1*	2.928	-20	-22	-17
		241.1		-20	-28	-17
克霉唑-d5	282.1	170.2*	2.927	-20	-23	-18
		246.2		-28	-22	-17

注: *为定量离子。



注: (A)0.2 μg/L 克霉唑, (B)2.0 μg/L 克霉唑-d₅。

图 1 标准溶液的 MRM 谱图

Fig.1 MRM chromatograms of standard solution

3.3 样品提取条件的优化

动物肌肉和内脏等动物源样品含有一定量的脂肪和蛋白质。本研究采用乙腈提取、高速离心,可以去除蛋白质的影响。对所含的脂肪,采取改进的 QuEChERS 方法进行提取和净化。本研究采用 3 个步骤来去除脂肪:第 1 步样品提取的时候采用正己烷饱和的乙腈,以减少脂肪溶解在乙腈中;第 2 步采用乙腈饱和的正己烷液分配 2 次去除脂肪,第 3 步净化管中含有 C₁₈粉,可用于进一步去除脂肪。此外,净化管中的 PSA 粉能显著去除肝脏、肾脏等颜色较深样品中的色素。经以上净化步骤后的加标样品在 LC-MS/MS 上的 MRM 谱图目标物出峰处无杂质干扰,满足检测要求。

3.4 方法学验证

3.4.1 线性关系与定量限

取“2.2”中制备的 0.2、0.5、2.0、5.0、20.0 μg/L 系列标准工作溶液供 LC-MS/MS 测定,其中克霉唑-d5 同位素内标溶液浓度均为 2.0 μg/L。以克霉唑与克霉唑-d5 的峰面积比值为纵坐标(Y),克霉唑的质量浓度为横坐标(X, μg/L)绘制标准曲线。结果表明,在 0.2~20.0 μg/L 浓度范围内,

克霉唑线性关系良好,回归方程为 $Y=3.1504X-0.00936710$,相关系数(r^2)为 0.9999。定量限(limit of quantitation, LOQ)采用在空白样品中逐级降低加标浓度的方法来确定,得到克霉唑 LOQ($S/N\geq 10$)为 0.2 μg/kg。

3.4.2 回收率与精密度

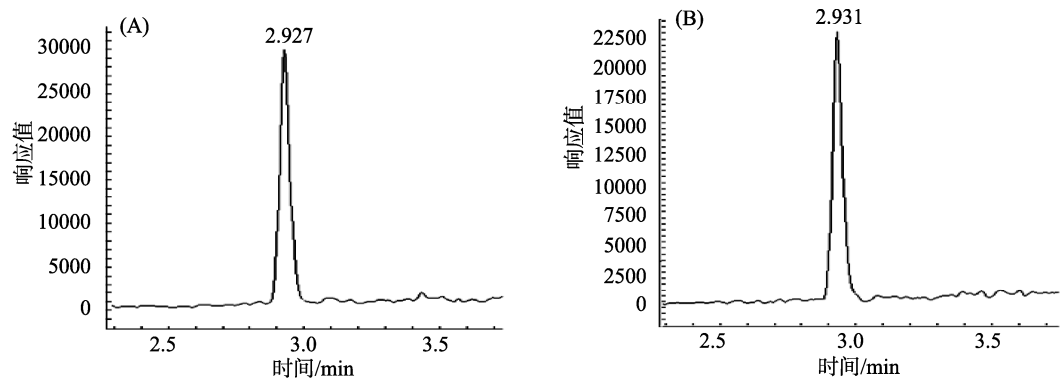
取代表性的样品牛肉、鸡心、羊肝、猪肾阴性样品,在 0.2、2.0 和 20 μg/kg 3 个水平下进行加标回收实验,每个水平重复测定 6 次,通过同位素内标法计算其回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表 2。代表性样品加标的定量离子对谱图见图 2,阴性样品定量离子对的空白谱图见图 3。采用同位素内标法定量技术,能校正目标物在前处理过程的损失,并补偿在质谱上的“离子抑制”效应,提高了测量结果的稳定性和重复性,测得克霉唑的回收率在 78.5%~111.9%之间,相对标准偏差为 5.3%~11.1%,说明该方法的准确度和精密度良好。

3.5 样品测定

应用本方法对市场上采购的猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉等畜禽肉和猪肝、猪肾、羊肝、鸡心等畜禽内脏进行检测,克霉唑均未检出。

表 2 加标回收率和相对标准偏差结果(n=6)
Table 2 Results of recovery and RSD (n=6)

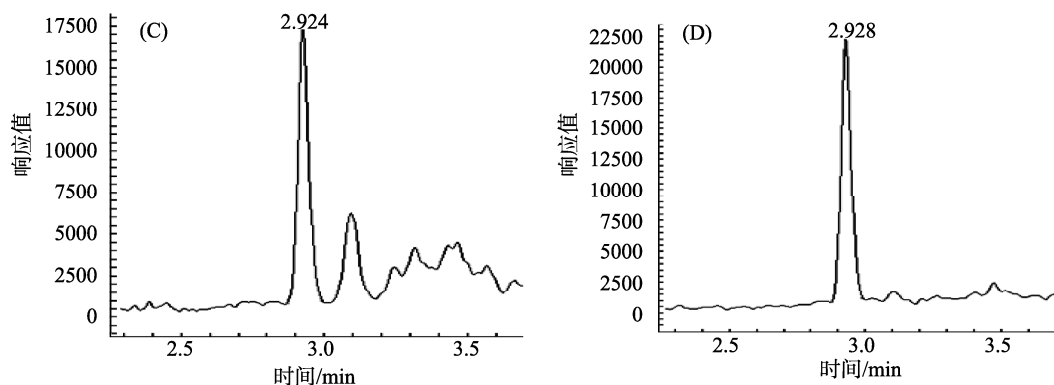
样品	加标量/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%	样品	加标量/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
牛肉	0.2	80.0	8.2	羊肝	0.2	88.2	10.3
	2.0	96.5	6.4		2.0	96.7	9.4
	20.0	96.0	5.3		20.0	111.9	6.7
鸡心	0.2	81.1	9.1	猪肾	0.2	78.5	11.1
	2.0	95.2	7.6		2.0	88.8	8.9
	20.0	109.6	5.8		20.0	107.5	7.4



注: (A):牛肉; (B):鸡心。

图 2 不同基质中加标 0.2 μg/kg 的克霉唑定量离子对的谱图

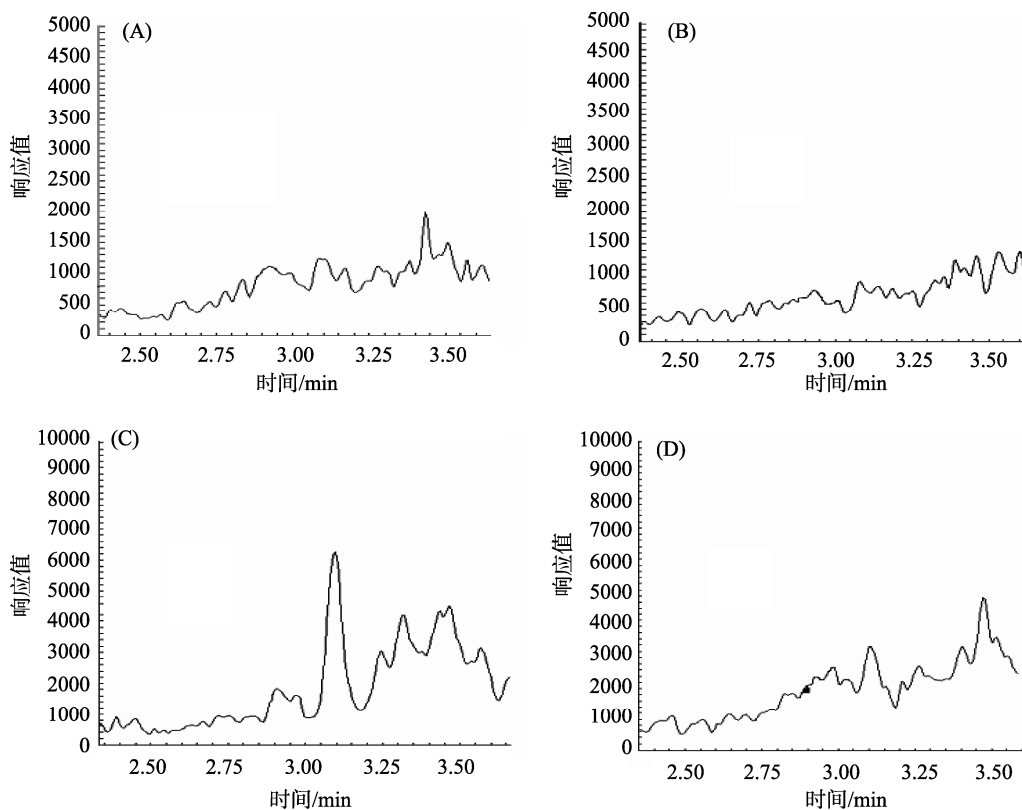
Fig.2 Chromatograms of quantitative ion pair of Clotrimazole in different sample matrices spiked at 0.2 μg/kg



注: (C):羊肝; (D):猪肾。

续图 2 不同基质中加标 0.2 µg/kg 的克霉唑定量离子对的谱图

Fig.2 Chromatograms of quantitative ion pair of Clotrimazole in different sample matrices spiked at 0.2 µg/kg



注: (A):牛肉; (B):鸡心; (C):羊肝; (D):猪肾。

图 3 不同阴性样品基质中克霉唑定量离子对的谱图

Fig.3 Chromatograms of quantitative ion pair of clotrimazole in different negative sample matrices

4 结 论

本研究建立了动物源食品中克霉唑残留量的超高效液相色谱-串联质谱测定方法。样品采用改进的 QuEChERS 方法进行提取和净化, 有效去除了脂肪杂质的干扰。采用同位素内标法定量, 校正了目标物的损失, 保证了方法的准确性。本方法快速、准确、灵敏, 适合动物源食品中克

霉唑残留量的测定。

参考文献

- [1] 厉娜, 于红燕, 姜爱霞. HPLC 法测定克霉唑阴道片含量的方法研究[J]. 药学研究, 2015, 34(5): 280-281.
- Li N, Yu HY, Jiang AX. Study on determination of clotrimazole vaginal tablets by HPLC [J]. J Pharm Res, 2015, 34(5): 280-281.
- [2] 张致平. 抗真菌药物研究进展[J]. 中国处方药, 2006, 13(3): 28-32.

- Zhang ZP. Progress in research of antifungal agents [J]. China Presc Drug, 2006, 13(3): 28–32.
- [3] 张凯, 秦宇, 卞华, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测羊肉中 8 种抗真菌药[J]. 色谱, 2018, 36(10): 999–1004.
- Zhang K, Qin Y, Bian H, *et al.* Determination of eight antifungal drugs in mutton by QuEChERS coupled with ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(10): 999–1004.
- [4] GB 31650–2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S]. GB 31650–2019 National food safety standard–Maximum residue limits for veterinary drugs in foods [S].
- [5] 唐蕾, 江春霞, 朴淑娟, 等. 用 HPLC 法同时测定口腔溃疡膜中克霉唑和地塞米松磷酸钠的含量[J]. 药学服务与研究, 2016, 16(6): 457–459.
- Tang L, Jiang CX, Pu SJ, *et al.* Simultaneous determination of clotrimazole and dexamethasone sodium phosphate contents in oral ulcer film by HPLC method [J]. Pharm Care Res, 2016, 16(6): 457–459.
- [6] 唐杰. HPLC 法测定双唑啉药水中克霉唑与益康唑的含量[J]. 海峡药学, 2015, 27(1): 64–66.
- Tang J. Determination of clotrimazole and econazole in clotrimazole and econazole potion by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2015, 27(1): 64–66.
- [7] 李荣华, 李瑞明. 反相高效液相色谱法测定克霉唑阴道片中克霉唑的含量[J]. 中国药物经济学, 2015, 10(2): 12–14.
- Li RH, Li RM. Determination of clotrimazole in clotrimazole virgin tablets by RP–HPLC [J]. China J Pharm Econ, 2015, 10(2): 12–14.
- [8] 王旭, 徐颖, 高中华, 等. 复方克霉唑搽剂中醋酸氟轻松和克霉唑的含量测定[J]. 解放军药学报, 2018, 34(5): 427–429.
- Wang X, Xu Y, Gao ZH, *et al.* Determination of fluocinonide and clotrimazole in compound clotrimazole liniment by HPLC [J]. Pharm J Chin People's Liberation Army, 2018, 34(5): 427–429.
- [9] 李青翠, 田方, 任瑞莉, 等. HPLC 法测定克霉唑栓的含量[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1364–1366.
- Li QC, Tian F, Ren RL, *et al.* RP–HPLC determination of clotrimazole suppositories [J]. Chin J Pharm Anal, 2009, 29(8): 1364–1366.
- [10] 李青翠, 田方, 任瑞莉, 等. 高效液相色谱法测定克霉唑阴道泡腾片中克霉唑的含量[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(9): 2674–2676.
- Li QC, Tian F, Ren RL, *et al.* Determination of clotrimazole in clotrimazole effervescent tablets by HPLC [J]. China J Mod Med, 2008, 18(9): 2674–2676.
- [11] 杨娜, 叶磊海, 叶佳明, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中 20 种抗生素药物含量的方法研究[J]. 农产品加工, 2019, 4: 50–53.
- Yang N, Ye LH, Ye JM, *et al.* Simultaneous determination of 20 antibiotic drugs in cosmetics by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method of content study [J]. Farm Pro Process, 2019, 4: 50–53.
- [12] 孟茜, 郑荣, 王柯. 高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中 16 种抗真菌类和硝基咪唑类化合物[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 26(6): 784–788.
- Meng Q, Zheng R, Wang K. Determination of 16 anti-fungal and nitroimidazole compounds in cosmetics by HPLC–MS–MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2016, 26(6): 784–788.
- [13] Locatelli M, Kabir A, Innosa D, *et al.* A fabric phase sorptive extraction–High performance liquid chromatography–Photo diode array detection method for the determination of twelve azole antimicrobial drug residues in human plasma and urine [J]. J Chromatogr B, 2017, 1040: 192–198.
- [14] Silva JM, Azcárate FJ, Knobel G, *et al.* Multiple response optimization of a QuEChERS extraction and HPLC analysis of diclazuril, nicarbazin and lasalocid in chicken liver [J]. Food Chem, 2020, 311: 126014.
- [15] Yu CC, Hao DY, Chu Q, *et al.* A one adsorbent QuEChERS method coupled with LC–MS/MS for simultaneous determination of 10 organophosphorus pesticide residues in tea [J]. Food Chem, 2020, 321: 126657.
- [16] An J, Kim YY, Cho HD, *et al.* Development and investigation of a QuEChERS–based method for determination of phthalate metabolites in human milk [J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 181: 113092.
- [17] Campone L, Rizzo S, Piccinelli AL, *et al.* Determination of mycotoxins in beer by multi heart–cutting two–dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. Food Chem, 2020, 318: 126496.
- [18] Xing LJ, Zou LJ, Luo RF, *et al.* Determination of five Alternaria toxins in wolfberry using modified QuEChERS and ultra–high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2020, 311: 125975.
- [19] Wu SY, Yang BH, Yu HQ, *et al.* A rapid derivatization method for analyzing nitrofurans metabolites in fish using ultra–performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2020, 310: 125814.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



胡贝贞, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: hubeizhen_001@163.com



韩 超, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全及环境中有毒有害物质的检测。
E-mail: hanchao96@163.com