

HPLC-MS/MS 法测定猪肌肉、 肝脏及肾脏中双氯芬酸钠残留量

王 莉,倪莹莹,王 慧,王文艳

(烟台大学药学院,山东 烟台 264005)

摘要:建立了 HPLC-MS/MS 方法检测猪肌肉、肝脏及肾脏 3 种组织中非甾体抗炎药双氯芬酸钠的残留量。样品处理以萘普生为内标,先经乙酸乙酯液液提取,后经甲醇沉淀,Eclipse Plus C18 柱(100 mm×2.1 mm×3.5 μm)等度洗脱。在负离子模式下,采用 ESI 电离源选择性反应监测模式(SRM)对双氯芬酸及萘普生进行检测。结果表明:在 0.5~100 μg/kg 浓度范围内,双氯芬酸钠在猪肌肉、肝脏及肾脏组织中的线性关系均良好,相关系数均大于 0.99,各组织中的准确度 RE 及精密度 CV 均小于 15%。该方法快速、有效、可靠,可应用于市场出售的猪肌肉、肝脏及肾脏中双氯芬酸钠残留量的检测。

关键词:双氯芬酸钠;残留量;肌肉;肝脏;肾脏;高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)

中图分类号:O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2015)03-0237-06

doi:10.7538/zpxb.youxian.2015.0007

Determination of Diclofenac Sodium Residue in Swine Muscle, Liver or Kidney by HPLC-MS/MS

WANG Li, NI Ying-ying, WANG Hui, WANG Wen-yan

(Pharmaceutical School, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: The method for high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was established for the determination of diclofenac sodium (NSAIDs) in swine muscle, liver or kidney. Naproxen was adapted for internal standard. The samples were pretreated by liquid-liquid extraction, then methanol protein precipitation. Chromatographic separations were performed on an Eclipse Plus C18 column (100 mm×2.1 mm×3.5 μm) with an isocratic elution. Diclofenac and naproxen were ionized with an ESI source operated in negative ion mode, and were measured by selective reactions monitoring mode (SRM). The results show that the relationships of diclofenac sodium in the three tissues are well in the concentration of 0.5-100 μg/kg. The correlation coefficient are more than 0.99. The RE of accuracy and the CV of precisions are all less than 15%. The method is rapid, specific and reliable, which has been applied to determine the residue of diclofenac sodium in swine muscle, liver or kidney

收稿日期:2014-06-10;修回日期:2014-09-01

作者简介:王 莉(1989—),女(汉族),山东济宁人,硕士研究生,药学专业。E-mail: wlqwfy.163.com.ok@163.com

通信作者:王文艳(1976—),女(蒙古族),内蒙古赤峰人,副教授,从事药代动力学研究。E-mail: ytuwyy@163.com

网络出版时间:2015-01-30;网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20150130.1529.008.html

bought from markets.

Key words: diclofenac sodium; drug residue; muscle; liver; kidney; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

双氯芬酸钠(diclofenac sodium, DS)是一种常用的非甾体抗炎药(NSAIDs),其作用机制是通过与COX酶结合,阻断前列腺素E₂的合成过程,从而起到镇痛、消炎和解热的作用^[1-3]。NSAIDs的应用范围比较广泛,已被用来治疗疼痛、子宫炎、乳腺炎等疾病。但这类药物在抑制前列腺素生成的过程中会产生一些毒副作用,如对消化系统和肾脏的损害^[4],以及过敏反应,其中有0.2%~0.4%的致死率^[5]。据报道,NSAIDs具有抗凝血作用,不少不法商贩在肉中掺加NSAIDs以保持肉质鲜嫩^[6]。为了满足市场对肉类的需求,NSAIDs在养殖业上的使用逐渐增加,其在动物性食品中的药物残留对消费者健康的损害已引起广泛关注^[7-8]。2005年,山东省药品不良反应监测中心将塞来昔布、双氯芬酸、二氟尼柳等19种非甾体抗炎类药物列为重点监测品种,以加强安全性监测^[9]。

目前,国内对动物性食品中NSAIDs的检测主要参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准(SN/T 2190—2008)^[10]以及欧盟标准(2002/657/EC)^[11]。对DS的检测方法主要有高效液相色谱法^[12]、液相色谱-质谱联用法^[13-14]、气相色谱-质谱联用法^[15-16]等,检测的样品基质主要为血浆^[17]、尿液^[18],而关于动物组织中含有的DS残留量检测的报道很少。本研究通过建立HPLC-MS/MS方法对猪肌肉、肝脏及肾脏中的DS残留量进行测定,旨在猪肉食品中DS残留量的测定提供方法依据。

1 实验部分

1.1 药物与试剂

双氯芬酸钠(批号:100334-200302),萘普生(批号:100198-200403):纯度均为98%,由中国食品药品检定研究院提供;甲醇、乙腈(色谱纯):德国Merck公司产品;其余试剂均为分析纯;实验用水为去离子水。

1.2 仪器

TSQ Quantum Access型三重四极杆串联质谱仪:美国Thermo-Fisher公司产品,配有

ESI源以及Xcalibur数据处理软件;Agilent 1100自动进样液相色谱系统:美国Agilent公司产品,包括四元输液泵、自动进样器、柱温箱;高速匀浆机:德国Fluko公司产品;XW-80A涡旋混合器:上海精科实业有限公司产品;HSC-24A氮吹仪:天津恒奥科技发展有限公司产品;TGL-16G高速台式离心机:上海安亭科学仪器厂产品。

1.3 储备液及工作液的配制

精密称取10 mg双氯芬酸钠及萘普生(内标),分别溶于水及甲醇中,配制成10 g/L储备液,置于4℃冰箱中,备用。取适量体积的双氯芬酸钠储备液,用流动相稀释成0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5、10 mg/L系列浓度的标准工作液,待用。精密量取内标储备液,用流动相逐级稀释成500 μg/L内标工作液,所有储备液以及工作液均置于4℃冰箱中,备用,保存1个月。

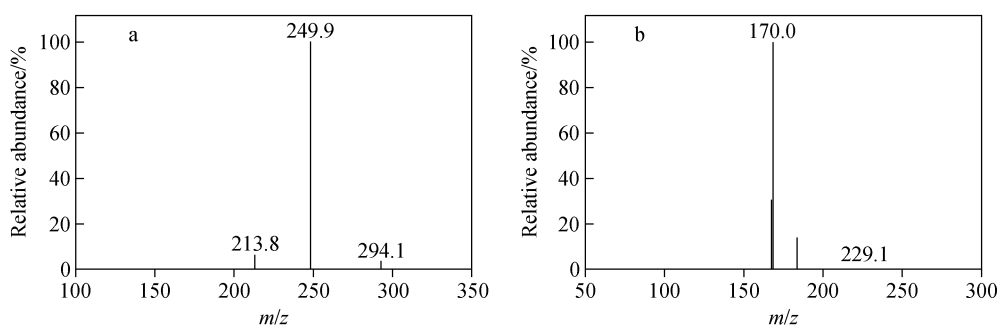
1.4 HPLC-MS/MS条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Eclipse Plus C18柱(100 mm×2.1 mm×3.5 μm);流动相:乙腈-甲醇-水溶液(45:25:30, V/V/V),含0.2 mmol/L醋酸铵和0.1%乙酸;流速0.2 mL/min;柱温35℃。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子化电离源(ESI),负离子模式下采用选择性反应监测模式(SRM);喷雾电压3 000 V;离子传输毛细管温度350℃;鞘气压力207 kPa;辅助气压力34.5 kPa;双氯芬酸及萘普生的碰撞诱导解离电压均为15 eV,检测离子对分别为 m/z 294.0→249.9和 m/z 229.1→170.1,扫描周期为0.1 s,代表性图谱示于图1;采用Xcalibur工作站对实验数据进行采集及处理。

1.5 样品处理

精密称取1 g猪肌肉(或肝、肾)组织,按1:3加入水进行匀浆,取组织匀浆液于10 mL离心管中,加入10 μL内标(500 μg/L萘普生)、100 μL 1%甲酸,涡旋混合30 s,加入5 mL乙酸乙酯提取剂,涡旋混合3 min,以3 600 r/min离心10 min,将上层有机相转移至另一10 mL玻璃管中,置于40℃水浴空气流吹干后,加入300 μL甲醇,混合涡

图1 双氯芬酸(a)及萘普生(b)的 $[M-H]^-$ 二级全扫描质谱图Fig. 1 Full-scan product ion spectra of $[M-H]^-$ for diclofenac (a) and naproxen (b)

旋1 min,转移至1.5 mL EP管中,以13 000 r/min离心10 min,取上清液于另一洁净试管中,吹干,用100 μ L流动相复溶,离心后进样于HPLC-MS/MS系统,进样体积10 μ L。

1.6 应用

通过已建立的方法对购买于烟台市某些超市以及农贸市场的新鲜猪肌肉、肝脏及肾脏中非甾体抗炎药双氯芬酸钠的药物残留量进行监测,按1.5节处理后,进行HPLC-MS/MS分析。

2 实验结果

2.1 方法特异性

空白样品中,除不加内标外,其他按1.5节方法处理样品,筛选得到的空白肌肉、肝脏及肾脏样品的SRM色谱图,空白组织加入标准溶液及实际样品处理后进样分析的代表性图谱示于图2。双氯酚酸和萘普生的出峰时间分别为3.3 min和2.3 min,色谱峰峰型良好,且不受内源性物质的干扰。

2.2 线性范围

取数只玻璃离心管,分别加入3 mL(相当于1 g组织样品)空白猪肌肉、肝脏或肾脏样品匀浆液和10 μ L不同浓度的标准工作液,使最

终浓度分别为0.5、1、2、5、10、20、50、100 μ g/kg,对8个浓度点的标准曲线进行线性考察。同时制备空白样品,按1.5节方法处理后,进行HPLC-MS/MS分析测定。以浓度 x (μ g/kg)为横坐标,以待测物峰面积与内标峰面积的比值 y 为纵坐标,以加权($W=1/x^2$)最小二乘法进行回归计算。在0.5~100 μ g/kg范围内,双氯芬酸钠在猪肌肉、肝脏及肾脏组织样品中均呈现出良好的线性关系。其中,代表性的标准曲线方程如下: $y_{肌肉}=0.272\ 0x+0.021\ 84(r=0.993\ 0)$, $y_{肝}=0.238\ 9x+0.058\ 51(r=0.998\ 0)$, $y_{肾}=0.278\ 9x+0.071\ 29(r=0.994\ 7)$ 。

2.3 准确度和精密度

配制低、中、高浓度(0.5、5、50 μ g/kg)双氯芬酸钠的肌肉、肝脏及肾脏样品,按1.5节方法进行操作,每一浓度平行测定5样本,连续3天,以考察方法的准确度和精密度。准确度以相对偏差(RE)表示,精密度以变异系数(CV)表示,结果列于表1。从数据可以看出,该方法的准确度RE和精密度CV均小于15%,说明该方法可以满足猪肌肉、肝脏、肾脏样品中双氯芬酸钠残留量的测定。在3种组织中,方法的定量下限均为0.5 μ g/kg。

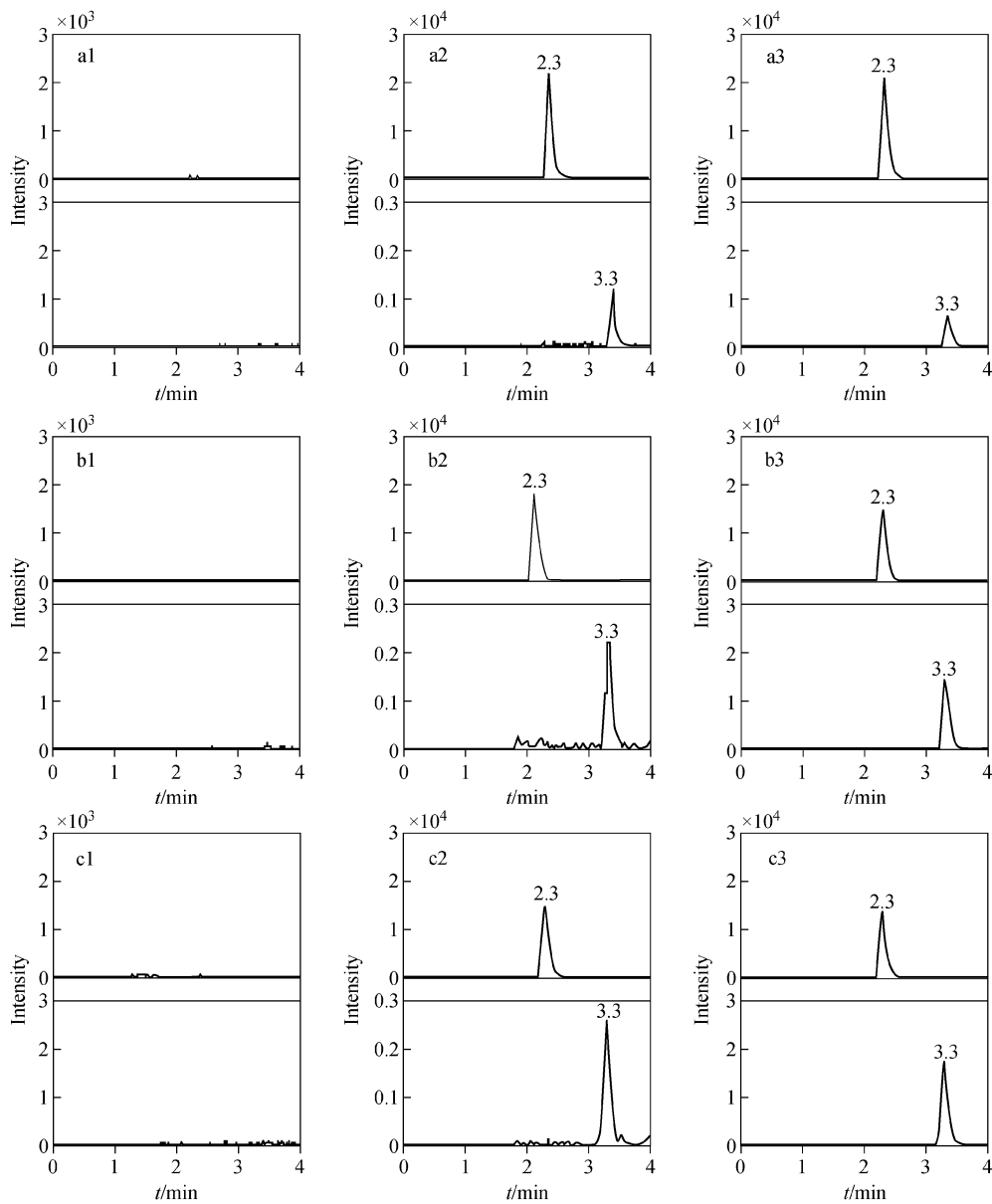
表1 HPLC-MS/MS法测定猪肌肉、肝脏及肾脏中双氯芬酸钠的准确度和精密度

Table 1 The accuracy and precision of diclofenac sodium in swine muscle, liver or kidney by LC-MS/MS

组织样品	添加值/ (μ g/kg)	日内($n=6$)			日间($n=3$)		
		测定值/ (μ g/kg)	准确度 RE/%	精密度 CV/%	测定值/ (μ g/kg)	准确度 RE/%	精密度 CV/%
肌肉	0.5	0.468±0.03	-6.4	5.7	0.479±0.04	-4.2	7.8
	5	4.78±0.22	-4.4	4.7	4.74±0.31	-5.2	6.5
	50	43.4±1.07	-13.2	4.6	43.3±2.77	-13.5	6.8

续表 1

组织样品	添加值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	日内 ($n=6$)			日间 ($n=3$)		
		测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	准确度 RE/%	精密度 CV/%	测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	准确度 RE/%	精密度 CV/%
肝脏	0.5	0.468 ± 0.06	-6.4	12.4	0.452 ± 0.05	-9.6	11.1
	5	4.74 ± 0.47	-5.2	10.0	4.97 ± 0.36	-0.7	7.2
	50	43.5 ± 4.1	-13.0	9.8	43.1 ± 4.0	-13.8	10.0
肾	0.5	0.477 ± 0.06	-4.6	13.5	0.50 ± 0.06	0.15	11.9
	5	4.94 ± 0.74	-1.2	15.0	5.24 ± 0.58	4.9	11.0
	50	44.4 ± 3.6	-11.2	8.2	44.9 ± 3.4	-10.2	7.5



注: a. 肌肉组织, b. 肝组织, c. 肾组织; 1. 空白组织, 2. 定量下限样品, 3. 实测组织样本; 上通道为咖啡因, 下通道为双氯芬酸

图 2 LC-MS/MS 法定测定猪肌肉、肝脏及肾脏中双氯芬酸钠的典型 SRM 色谱图

Fig. 2 Typical SRM chromatograms of diclofenac sodium in swine muscle, liver or kidney by LC-MS/MS

2.4 提取回收率

配制低、中、高(0.5、5、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 3种不同浓度双氯芬酸钠的肌肉、肝脏及肾脏组织样品,按1.5节方法进行操作,通过DS在组织样品中提取后的峰面积与相应浓度的纯净溶液的峰面积比值进行回收率测定。双氯酚酸钠在肌肉、肝脏及肾脏中的提取回收率分别为79.1%~84.2%、65.0%~72.2%和69.8%~75.6%;内标在肌肉、肝脏及肾脏中的提取回收率分别为71.0%、74.3%和64.6%。

2.5 方法学应用

对抽取的不同来源的猪肌肉、肝脏及肾脏样品平行测定2份,按1.5节方法进行操作,测得的结果列于表2。

表2 不同来源猪肉组织中双氯芬酸钠残留情况
Table 2 The residues of diclofenac sodium in swine tissues from different sources

不同来源猪肉组织/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	超市1	超市2	农贸市场
肌肉	2.44	ND	ND
	2.37	ND	ND
肝	3.45	ND	ND
	3.87	ND	ND
肾	4.41	ND	ND
	4.56	ND	ND

注:ND为未检出

3 结论

组织样品经乙酸乙酯提取吹干后仍有一定油脂的干扰,为保证HPLC-MS/MS的进样更洁净,采用甲醇进一步分离油脂,经两步处理后,可保证样品回收率符合分析要求,方法杂质干扰少、灵敏度高。本实验采用内标法进行DS含量的计算,考虑到内标物的化学结构、离子化效率、保留时间、提取回收率,再结合实验室已有的化合物,尝试了吲哚美辛、萘普生、五味子素作为内标进行考察。因萘普生的出峰稳定,在选择实验条件下可以达到分析要求,最终选取萘普生作为内标。

欧盟规定,猪可食性组织中双氯芬酸钠的标示残留物为双氯芬酸,其在猪肌肉、肝脏、肾脏的最大残留量(MRLs)应不超过5、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。据

此,抽检来自于超市以及农贸市场的猪肌肉、肝脏及肾脏,其双氯芬酸钠的残留量均低于限量,能够满足人们食用的要求。采用HPLC-MS/MS方法对猪肌肉、肝脏及肾脏3种生物基质中双氯芬酸钠的残留量进行测定,该方法快速、准确,其灵敏度可以满足国际上对动物性食品DS残留限量检测的要求,可为今后猪肉产品食用安全检验提供合理化的方法参考。

参考文献:

- [1] 宣云遐,王明伟. 非甾体抗炎药物的研究应用现状[J]. 生命科学,2005,17(1):10-14.
XUAN Yunxia, WANG Mingwei. Current status of non-steroidal anti-inflammatory drugs[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2005, 17(1): 10-14(in Chinese).
- [2] 缪海均,范国荣,刘皋林. 高效液相色谱法测定人血浆中双氯芬酸钠浓度[J]. 中国药房,2003,14(12):736-737.
MIAO Haijun, FAN Guorong, LIU Gaolin. Determination of diclofenac sodium in human plasma by HPLC[J]. China Pharmacy, 2003, 14(12): 736-737(in Chinese).
- [3] 张念森. 非甾体抗炎药的临床应用及不良反应[J]. 中国药物评价,2013,30(1):37-38.
ZHANG Niansen. Clinical application and adverse reaction of non-steroidal anti-inflammatory drug[J]. Chinese Journal of Drug Evaluation, 2013, 30(1): 37-38(in Chinese).
- [4] 王丽萍. 非甾体抗炎药的应用及其安全性[J]. 中国医疗前沿,2010,5(16):22-23.
WANG Liping. The application and safety of anti-inflammatory drugs[J]. National Medical Frontiers of China, 2010, 5(16): 22-23(in Chinese).
- [5] 康永锋,邹世文,段吴平,等. 鲫鱼中4种非甾体抗炎药残留的分析研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(1):286-288.
KANG Yongfeng, ZHOU Shiwen, DUAN Wuping, et al. Determination of four residues of NSAIDs in the Crucian[J]. Journal of Anhui Agri, 2011, 39(1): 286-288(in Chinese).
- [6] 康永锋,邹世文,段吴平,等. 超声波-微波辅助提取-高效液相色谱法同时检测羊肉组织中4种非甾体抗炎药物残留[J]. 色谱,2010,28(11):1056-1060.

- KANG Yongfeng, ZHOU Shiwen, DUAN Wuping, et al. Simultaneous analysis of 4 non-steroidal anti-inflammatory drug residues in mutton muscle using high performance liquid chromatography assisted by ultrasonic-microwave extraction [J]. Chinese Journal of chromatography, 2010, 28(11): 1 056-1 060(in Chinese).
- [7] 傅德兴, 黄公怡. 非甾体抗炎药的不良反应及改进抗炎药物治疗的新发展[J]. 中国新药杂志, 2000, 9(9): 604-607.
- FU Dexing, HUANG Gongyi. The adverse drug reactions of NSAIDs and their new developments [J]. Chinese New Drugs Journal, 2000, 9(9): 604-607(in Chinese).
- [8] 徐士新. 新兽药安全评价与评审[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(11): 8-13.
- XU Shixin. New veterinary drug's safety assessment and evaluation[J]. Chinese Journal of Veterinary Drugs, 2009, 43(11): 8-13(in Chinese).
- [9] 胡婷, 彭涛, 邓晓军, 等. 非甾体抗炎残留检测方法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(8): 42-47.
- HU Ting, PENG Tao, DENG Xiaojun, et al. Development of analytical methods for non-steroidal anti-inflammatory drug residues [J]. Chinese Journal of Veterinary Drugs, 2010, 44(8): 42-47(in Chinese).
- [10] SN/T 2190—2008 进出口动物源性食品中非甾体抗炎药残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国农业出版社, 2009.
- [11] European Communities. Commission decision (2002/657/EC) of 12 August 2002 [R]. Brussels, Belgium; Official Journal of the European Communities, 2002.
- [12] MARIA R P, MIGUEL A B, LOPE Z, et al. Electromembrane extraction (EME) and HPLC determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in wastewater samples[J]. Talanta, 2011, 85(1): 394-399.
- [13] LARSSON E, AL-HAMIMI S, JONSSON J A. Behaviour of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and eight of their metabolites during wastewater treatment studied by hollow fibre liquid phase microextraction and liquid chromatography mass spectrometry[J]. Science of the Total Environment, 2014, (485/486): 300-308.
- [14] PENG T, ZHU A L, ZHOU Y N, et al. Development of a simple method for simultaneous determination of nine subclasses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2013, 933: 15-23.
- [15] 朱小红, 李涛, 马鹏飞, 等. 气象色谱-质谱检测方法快速筛查保健食品及中成药中 8 种非甾体抗炎药[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1 847-1 852.
- ZHU Xiaohong, LI Tao, MA Pengfei, et al. GC-MS rapid screening of eight non-steroidal anti-inflammatory drugs in health foods and traditional Chinese medicines[J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(10): 1 847-1 852(in Chinese).
- [16] RICHARDS N, HALL S, SCOTT K, et al. First detection of an NSAID, flunixin, in sheep's wool using GC-MS[J]. Environmental Pollution, 2011, 159(5): 1 446-1 450.
- [17] DAVARANI S S H, POURAHADI A, NOJAVAN S, et al. Electro membrane extraction of sodium diclofenac as an acidic compound from wastewater, urine, bovine milk, and plasma samples and quantification by high-performance liquid chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 722: 55-62.
- [18] KOLE P L, MILLERSHIP J, MCELNAY J C. Determination of diclofenac from paediatric urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE)-HPLC-UV technique[J]. Talanta, 2011, 85(4): 1 948-1 958.