

“守护粮食食品安全，全球携手在行动”特约专栏文章之六

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.06.006

LIDIJA K, MICHAEL S, ALEXANDRA M, 等. 液相色谱质谱联用测定多种兽药残留方法中标准品稳定性的挑战[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(6): 93-99.

LIDIJA K, MICHAEL S, ALEXANDRA M, et al. The challenge of standard stability in LC-MS based multi-analyte approaches for veterinary drugs[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(6): 93-99.

液相色谱质谱联用测定多种兽药残留方法中标准品稳定性的挑战

Lidija Kenjeric¹, Michael Sulyok², Alexandra Malachova¹, David Steiner⁴,
Rudolf Krska^{2,3}✉, Brian Quinn³, Brett Greer³, Christopher T. Elliott³

(1. 奥地利饲料和食品质量、安全 and 创新能力中心, 奥地利 图尔恩 3430;

2. 奥地利维也纳自然资源与生命科学大学, 生物分析与农业代谢组学研究所,
农业生物技术系, 奥地利 图尔恩 3430;

3. 英国贝尔法斯特女王大学, 生物科学学院, 全球食品安全研究所,
英国 北爱尔兰 贝尔法斯特 BT9 5DL;

4. 奥地利 Romer 实验室诊断有限公司, 分析服务部, 科技园 5, 奥地利 图尔恩 3430)

摘要: 采用等时测量法对可用于食品和饲料链中兽药检测的标准品混合溶液和中间混合液进行了短期和长期稳定性研究。其中短期稳定性实验考察了混合标准曲线在-20 (作为基线)、4 和 23 °C (避光和不避光保存) 条件下存储 1、2、4 和 7 d 的稳定性, 而长期稳定性实验考察了中间混合液在-20、4、23 °C (避光和不避光保存) 和-80 °C 储存条件下 2、4、8 和 12 周的稳定性。结果表明, 使用不含酸溶剂配制的混合标准曲线在 4 °C 下建议储存 1~2 d, 中性储存条件即使在室温也可短期储存 1~2 d。对于含有 β-内酰胺和头孢菌素类标准品的中间混合液在 4 °C 和室温下储存超过 1 个月会损失近 90%。对于含有青霉素 V 和 G 的混和标准品中间储备液, 在-20 °C 不含酸的条件下可储存 2 周。其他类别的兽药标准品对长期储存条件要求较少。整体而言, 兽药标准品中间混合液长期储存的最佳储存条件为-20 °C。

关键词: 兽药; 长期稳定; 短期稳定性; 等时测量; 液相色谱质谱联用 (LC-MS/MS)

中图分类号: TS207.3; S859.84 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)06-0093-07

网络首发时间: 2021-11-02 16:04:32

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20211101.2010.030.html>

收稿日期: 2021-08-30

基金项目: 本研究工作由奥地利饲料和食品质量、安全与创新能力中心 (FFoQSI) 共同资助。能力中心 FFoQSI COMET-K1 由奥地利部门 BMVIT 和 BMDW 以及奥地利尼德罗斯特省、上奥地利和维也纳卓越能力技术中心资助。该 COMET 项目由奥地利研究促进机构 FFG 负责。

Supported by: This work was co-funded by the Austrian Competence Centre for Feed and Food Quality, Safety and Innovation (FFoQSI). The COMET-K1 competence center FFoQSI is funded by the Austrian ministries BMVIT and BMDW and the Austrian provinces Niederösterreich, Upper Austria, and Vienna within the scope of COMET—Competence Centers for Excellent Technologies. The program COMET is handled by the Austrian Research Promotion Agency FFG.

作者简介: Lidija Kenjeric, 女, 1995 年出生, 博士研究生。研究方向为多毒素分析方法开发、验证和应用。E-mail: kenjeric.lidija@students.boku.ac.at. 作者详细介绍见 C25。

通讯作者: Rudolf Krska, 男, 1964 年出生, 教授, 原国际真菌毒素学会主席, 所长, 研究方向为生物分析与食品安全, 食品过敏源检测和污染物分析。E-mail: rudolf.krska@boku.ac.at. 作者详细介绍见 C12-C27。本文英文原文详见 P100-P105。

The Challenge of Standard Stability in LC-MS Based Multi-Analyte Approaches for Veterinary Drugs

LIDIJA Kenjeric¹, MICHAEL Sulyok², ALEXANDRA Malachova¹, DAVID Steiner⁴,
RUDOLF Krška^{2,3}✉, BRIAN Quinn³, BRETT Greer³, CHRISTOPHER T. Elliott³

(1. FFoQSI GmbH, FFoQSI Austrian Competence Centre for Feed & Food Quality, Safety and Innovation, 3430 Tulln, Austria; 2. Institute of Bioanalytics and Agro-Metabolomics, Department of Agrobiotechnology (IFA-Tulln), University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna, 3430 Tulln, Austria; 3. Institute for Global Food Security, School of Biological Sciences, Queens University Belfast, University Road, Belfast, BT7 1NN, Northern Ireland, United Kingdom; 4. Romer Labs Diagnostic GmbH, Analytical Service Department, Technopark 5 3430 Tulln)

Abstract: The short- and long-term stability of multi-component mixtures and intermediate mixtures of analytical standards of veterinary drugs, which can potentially occur in food and feed chains, was examined by an isochronous measurement approach. Short-term stability testing of calibrants included storage for 1, 2, 4, and 7 days at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (as a baseline) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, and $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ (with and without exposure to sunlight), respectively. Long-term stability testing conditions of intermediate mixes were $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ (with and without exposure to sunlight), and control temperature at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ while the testing period was 2, 4, 8, and 12 weeks, respectively. Results indicated that calibration standards should ideally be stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for only 1~2 days, without the presence of acid. Neutral storage conditions were acceptable even at room temperature. Storage of intermediate mixtures containing β -lactams and cephalosporins for longer than 1 month under $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ and room temperature resulted in a loss of almost 90%. When it comes to the intermediate mixtures with penicillin V and G, acceptable storage conditions were 2 weeks at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, without the presence of acid. Other classes of veterinary drugs were less critical as considers long-term stability. Overall, storage conditions at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ were considered optimal for long-term storage of intermediate mixes of veterinary drug standards.

Key words: veterinary drugs; long-term stability; short-term stability; isochronous measurement; LC-MS/MS

不同类型兽药极性、溶解性和稳定性方面差别极大,在多种兽药残留同时检测方法开发时应特别关注^[1]。大多数兽药标准品是固体形式,需准确称重和溶解。对于溶解而言,实验时必须确保所使用的溶剂能够溶解标准品并不会使标准品发生降解。因此,SANTE指南^[2]和欧盟委员会决议 2002/657/EC 文件^[3]均指出标准品的稳定性是方法验证的先决条件之一。当开发溶解在不同溶剂中的不同亚类的兽残同时分析方法时,需寻找一种简便的标液配制操作方法。目前解决方案为将溶解在同一溶剂中的所有化合物分成一组配制成中间混合液^[4-5],然后将这些不同中间混合液配制成最终的混合储备液,并通过逐级稀释获得外标标准曲线溶液。因此需要确定中间混合液和最终的混合储备液的长期稳定性以及标准曲线溶液的短期稳定性。然而目前只有 Desmarchelier 等

报道了大量兽药标准品的稳定性^[6]。本文考察了 150 种以上不同类别的兽药标准品的稳定性,超过 120 种兽药标准品在混合储备液中的稳定性为一周,在中间混合液的稳定性为 12 周。这些稳定性结果有望为液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)多兽药残留分析方法中标准品的正确管理和使用提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

HPLC 级乙腈和甲醇以及 MS 级冰醋酸(p.a.)、乙酸铵:Sigma-Aldrich(奥地利,维也纳);兽药残留标准品:Sigma-Aldrich(奥地利,维也纳)、Dr. Ehrenstorfer(德国,奥格斯堡)、欧盟标物研制实验室(德国,柏林)或不同研究团队赠送。本研究所检测的兽药标准品(>CL)根据其化学

性质分为 18 类, 具体如下:

(1) 驱虫剂: 芬苯达唑、芬苯达唑砒、三苯达唑砒、三氯苯达唑亚砒、三苯达唑、阿苯达唑、阿苯达唑-2-氨基砒、亚苯砒、阿苯达唑、氯苯达唑、羟氯唑唑、氯苯达唑、奥昔苯达唑、左苯咪唑、氟苯达唑、甲苯达唑胺、莫兰特、硝基硝酸吡兰替唑、噻苯达唑

(2) 抗原虫类: 罗硝唑、双甲硝唑、奥硝唑、卡硝唑、异丙唑

(3) 大环内酯类: 多粘菌素、异粘菌素、莫粘菌素

(4) 磺胺类药物: 磺胺吡啶、磺胺乙氧嘧啶、氨砒、磺胺乙酰胺、磺胺胍、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺嘧啶、磺胺恶唑、磺胺米特、磺胺甲噁、磺胺甲唑、磺胺甲恶唑、磺胺洛嗪、磺胺苯唑、酞基磺胺噻唑、甲氧苄氨嘧啶(抗叶酸抗菌剂-与磺胺类协同作用)、磺胺氯噻嗪、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺多辛、磺胺甲氧噻嗪、磺胺间甲氧嘧啶

(5) 氨基糖苷类药物: 链霉素、阿帕霉素、二汗链霉素、卡那霉素、新霉素 B、紫苏霉素

(6) 大环内酯类: 螺旋霉素、油甘霉素、交沙霉素、林可霉素、克林霉素、红霉素 A、罗红霉素、替米可霉素、泰乐菌素

(7) 四环素: 脱环素、甲环素、甲环素、二诺环素、氯四环素、氧四环素、强力环素

(8) 喹诺酮类药物: 马博沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、奥比沙星、双氟沙星、萘啶酸、氟甲喹、恶喹酸、全氟沙星、氟罗沙星、洛美沙星、沙氟沙星、哌啶酸、西诺沙星

(9) 硝基咪唑类: 甲硝唑

(10) 侧耳菌素: 粘菌素

(11) 截短侧耳素: 沃尼秒林、泰妙菌素

(12) β -内酰胺类: 阿莫西林、氨苄西林、双氯西林、苯唑西林、他唑巴坦、哌拉西林、替卡西林、舒巴坦、克拉维酸

(13) 青霉素: 青霉素 G、青霉素 V、邻氯青霉素、阿斯泊西林(aspxicilin) 不确定没查到

(14) 头孢菌素类: 头孢氨苄、头孢噻肟、头孢曲松、头孢呋辛、地氟头孢噻肟、头孢匹林、

头孢氯铵、头孢唑林、头孢哌酮、头孢噻呋、头孢曲利、头孢喹诺、头孢氨苄

(15) 球菌类: 克拉珠利、地克珠利、尼卡巴星、氯吡氯吡醇、氟富甲酮、乙氧巴坦、罗本尼丁、德奎宁、莫能菌素、沙林霉素、拉沙洛啉、马杜拉明、奈奎宁、氨丙利铵、二硝基哌利特

(16) 抗生素类: 甲砒霉素、氟芬尼考、氯霉素

(17) 非甾体抗炎药: 酮洛芬、萘普生、美洛昔康、氟尼辛、卡洛芬、双氯芬酸、布洛芬、甲芬氨酸、托芬氨酸、非罗昔布、塞来昔布

(18) 糖皮质类固醇: 地塞米松、氟沙松、甲基抢的松龙、倍他米松、泼尼松龙、曲安奈德。

1.2 仪器与设备

安捷伦 1290 超高效液相: Agilent Technologies, 沃尔德布朗, 德国; 配有 TurboV 电喷雾电离(ESI)源的 Q Trap 5500 MS/MS: Sciex, 福斯特市, 加州, 美国; C18 保护柱: Phenomenex, 托伦斯, 加州, 美国; 超纯水系统制备: ELGA Lab Water, 塞勒, 德国。

1.3 标准储备液的配制

参考 Desmarchelier 等论文, 根据分析物在特定溶剂中的溶解性制备标准储备液^[6]。固体标准品称量(最小称量为 1 mg), 选择合适的溶剂定容, 配制目标浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的单标标准储备液, 将单标标准储备液超声直到固体完全溶解。由于化合物的溶解性不同, 最终使用了六种不同的溶剂: 水、甲醇、甲醇+水(1:1)、甲醇+二甲亚砜(DMSO)(1:1)、水+乙腈(1:1)、含 1 mM 氢氧化钠的甲醇。最终, 除用水配制的中间混合液存于 15 mL falcon 离心管中外, 其余 5 种中间混合液配制于 10 mL 容量瓶, 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。将相同溶剂的单标储备液混合并用对应的溶剂定容, 配制混合标准品中间混合液。所有标准品溶液全部保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。附件列明了 174 个单标储备液和混合标准品中间储备液的详细信息。

1.4 标准曲线配制

使用乙腈: 水(体积比为 1:1)作为溶剂 1:1、1:3、1:10、1:30、1:100 逐级稀释配制净溶液外标准曲线溶液。使用 MultiQuant2.0.2

软件 (Sciex, Foster City, CA, USA) 采用 1/x 权重对峰面积绘制标准曲线, 考察净溶液标准曲线的线性。

1.5 检测方法

本实验在 Malachová 等^[7]的分析方法基础上, 通过质谱条件优化增加新化合物的 MRM 离子对。检测仪器: 安捷伦 1290 超高效液相串接配备 TurboV 电喷雾电离 (ESI) 源的 Q Trap 5500 MS/MS。色谱柱: Gemini C18, (150×4.6 mm, 5 μm), C18 保护柱 (4×3 mm), 柱温 25 °C。流动相: 5 mM 乙酸铵, 甲醇: 水: 乙酸=10: 89: 1 (v/v/v; 洗脱液 A) 和 97: 2: 1 (v/v/v; 洗脱液 B), 超纯水由实验室超纯水系统制备, 流速 1 mL/min。梯度洗脱程序: 初始流动相 100A% 并保持 2 min, 在 3 分钟内 B 相线性增加到 50%, 在 9 分钟内继续线性增加到 100% B, 保持 4 min, 然后在 2.5 分钟内回到流动相初始比例。进样量 5 μL, ESI-MS/MS 是在两个单独色谱条件下, 分正负极, 分段多反应监测 (sMRM) 模式下进行采集。ESI 源参数: 源温度为 550 °C, 气帘气为 30 psi (最大压力为 99.5% 氮气 206.8 kPa)、离子源气体 1 (鞘气) 80 psi (氮气 551.6 kPa)、离子源气 2 (干燥气体) 80 psi (氮气 551.6 kPa)、离子喷雾电压分别为 -4 500 V 和 +5 500 V、碰撞气体 (氮气) 为中度。在正离子和负离子 ESI 模式下, 目标化合物循环周期为 1 000 ms, MS 暂停时间为 3 ms, 检测窗口宽度分别为 40 s (ESI+) 和 52 s (ESI-)。根据 SANTE 指南^[2], 每个分析物选择两个 MRM 离子对来进行定性确证。

1.6 稳定性研究

兽药标准品的稳定性研究采取等时测量法, 即在不同的温度下储存不同时间的标准品, 必须同时进行测量以考察兽药标准品的稳定性^[8]。等时测量法首先将所有兽药标准品储存在 -80 °C 和 -20 °C 条件下, 以防止发生降解, 然后根据实验方案将兽药标准品转移到不同的温度下进行不同时间段的稳定性测试。

1.6.1 短期稳定性研究

将不同种类的混合标准品中间储备液分别取 30 μL (总体积 180 μL) 混合, 用等体积的提取溶

剂 (乙腈: 水: 乙酸, 79: 20: 1, v/v/v) 和稀释溶剂 (乙腈: 水: 乙酸, 20: 79: 1, v/v/v) 混合溶剂定容至 1 mL, 配制成混合标准品溶液。将混合标准品溶液分别移取 50 μL 于 13 个进样小瓶内, 用 450 μL 的溶剂稀释配制成浓度为 30 ng/mL 的混合标准溶液。

分别使用溶剂乙腈: 水 (1: 1, v/v)、乙腈: 水: 乙酸 (79: 20: 1, v/v/v), 用同样的方法配制含酸和不含酸的混合标准品溶液。短期稳定性考察以 -20 °C 为参照条件、+4 °C (冰箱) 和室温 (避光或不避光) 为不同温度储存条件, 将混合标准溶液存储 1、2、4 和 7 d, 在最后一个时间点后的第二天, 将所有不同储存条件下及参照条件 (-20 °C) 下混合标准溶液取出并恢复至室温后进行随机序列检测, 以避免因检测引起的任何趋势 (表 1)。

表 1 短期稳定性—每个条件 1 个混合标准品溶液
(混合标准品溶液 (30 ng/mL))

Table 1 Short term stability—1 multi-component mix
(30 ng/mL) per point

条件	1/d	2/d	4/d	7/d
-20 °C	对照瓶 (1.)			
+4 °C	2.	5.	8.	11.
+23 °C, 光	3.	6.	9.	12.
+23 °C, 暗	4.	7.	10.	13.

1.6.2 长期稳定性研究

长期稳定性考察的标准品为在六种不同溶剂中配制的混合标准品中间储备液, 共有 17 组 (6 个小瓶)。长期稳定性考察条件为 -20 °C、冰箱 (4 °C) 和室温 (避光或者不避光保存)。对照组温度为 -80 °C, 实验周期为 2、4、8、12 周。对照组在最后一天取出, 将混合标准品中间储备液 (10 μg/mL) 混合并采用加酸或不加酸溶剂稀释, 使最终分析物浓度为 200 ng/mL。即从每一个条件下的六个混合标准品中分别取出 20 μL 到新的进样小瓶, 然后加入 880 μL 溶剂, 定容至 1 mL。在最后一个时间点后的第二天, 将不同储存条件下以及对照瓶 (-80 °C) 的混合标准品中间储备液取出恢复至室温并配制成混合标准溶液进行随机序列检测, 以避免因检测引起的任何趋势 (表 2)。

表 2 长期稳定性—每个条件 1 个混合标准品溶液
(混合标准品中间储备液)

Table 2 Long term stability—1 intermediate mixture set per point

条件	12/周	8/周	4/周	2/周
80 °C				
-20 °C	17.	13.	9.	5.
4 °C	16.	12.	8.	4.
23 °C, 光	15.	11.	7.	3.
23 °C, 暗	14.	10.	6.	2.

1.7 数据分析

使用 MultiQuant2.0.2 软件积分并构建标准曲线。用 Microsoft Excel 2013 软件进行进一步的数据处理。结果显示,通过将在测试温度下储存的标准品的峰面积和在对照温度下保存的标准品的峰面积(短期为-20 °C,长期为-80 °C)相除得到(公式 1)。

$$YR(\%) = \frac{\text{峰面积(实验组或瓶)}}{\text{峰面积(对照组或瓶)}} \times 100 \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 短期稳定性研究

为评估标准品在液相自动进样器中的稳定

性,我们进行了短期稳定性实验。

结果表明+4 °C下存储 1~2 d 是混合标准品溶液的最佳存储条件。进一步考虑标准品溶剂发现加酸的溶剂相比于没有加酸的溶剂对部分兽药标准品稳定性影响较大。其中,青霉素、聚醚离子载体和喹诺酮类药物(图 1,具体值见补充材料)明显在没有加酸的溶剂中更稳定。 β -内酰胺在甲醇作为溶剂的混合标准品溶液中的稳定性良好,这与其他作者的报道相反^[4-6]。此外,所有使用中性溶剂避光保存的混合标准品溶液即使在室温下也能保持较好的稳定性(见补充材料),这表明当检测较大数量样品时,虽然需要几天的分析时间,但中性溶剂配制的混合标准品溶液是相对稳定的。

2.2 长期稳定性研究

长期稳定性研究证明酸性溶剂比中性溶剂更不利于青霉素、头孢菌素、大环内酯、聚醚离子载体(图 2,具体值见补充材料)等化合物的储存。实验发现青霉素只能在-20 °C中性溶剂下储存 2 周,这与 Berendsen 等^[9]报道的“青霉素 V 在甲醇中至少有 2 个月的稳定性”不一致。因此,

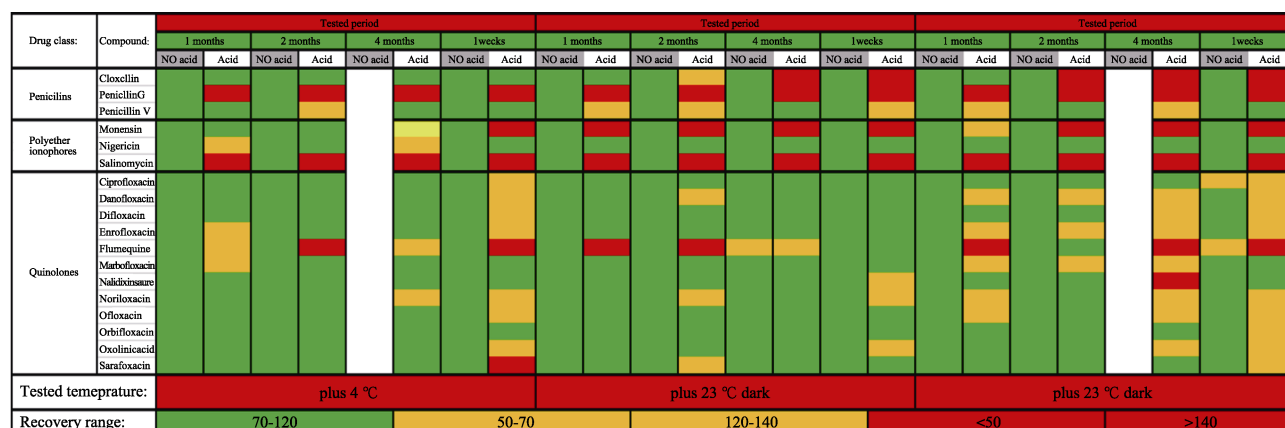


图 1 所选分析物短期稳定性研究结果

Fig.1 Results of short-term stability study for selected analytes

注:绿色表示回收率为 70%~120%,黄色表示回收率为 50%~70%至 120%~140%,红色代表表示回收率为小于 50%及大于 140%。白色柱表示由于仪器操作问题暂无数据。

Note: green color represents the recovery range of 70%~120%, yellow color between 50%~70% and 120%~140%, red color below 50% and above 140% of short-term stability study for selected analytes (Supplementary material), white columns indicate a lack of data due to system operation problem.

Drug class: 兽药类别; Penicillins: 青霉素类 (Cloxacillin 氯唑西林, Penicillin G 青霉素 G, Penicillin V 青霉素 V); Polyether ionophores: 聚醚离子载体类 (Monensin 莫能星, Nigericin 尼日利亚霉素, Salinomycin 沙利霉素); Quinolones: 喹诺酮类 (Ciprofloxacin 环丙沙星, Danofloxacin 达氟沙星, Difloxacin 二氟沙星, Enrofloxacin 恩氟沙星, Flumequine 氟甲喹, Marbofloxacin 麻保沙星, Nalidixinsure 纳利迪辛索, Norfloxacin 诺氟沙星, Ofloxacin 氧氟沙星, Orbifloxacin 奥比沙星, Oxolinic acid 恶喹酸, Sarafloxacin 沙拉沙星)

Tested tempeprature: Plus 4 °C +4 °C, Plus 23 °C dark +23 °C避光; Plus 23 °C light +23 °C见光;

Recovery range: 回收率范围, test period: 测试时间, NO acid: 无酸条件, acid: 含酸条件

Drug class:	Compound:	Tested period								Tested period								Tested period								Tested period															
		3 months		2 months		1 months		2 weeks		3 months		2 months		1 months		2 weeks		3 months		2 months		1 months		2 weeks		3 months		2 months		1 months		2 weeks									
		NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid	NO acid	Acid										
β-lactams	Tazobactam																																								
	Amoxicillin																																								
	Ampicillin																																								
	Dicloxacillin																																								
	Oxacillin																																								
Cephalosporins	Cefacetrile																																								
	Cefalonium																																								
	Cefapirin																																								
	Cefazolin																																								
	Cefoperazone																																								
	Cefquinome																																								
Macrolides	Erythromycin																																								
	Josamycin																																								
	Lincomycin																																								
	Spiramycin																																								
	Tilmicosin																																								
	Tylosin																																								
Penicillins	Penicillin V																																								
	Cloxacillin																																								
	Penicillin G																																								
Polyether ionophores	Monesin																																								
	Nigericin																																								
	Salinomycin																																								
Tested temperature:		minus 20 °C								plus 4 °C								plus 23 °C dark								plus 23 °C dark															
Recovery range:		70-120								50-70								120-140								<50								>40							

图 2 所选分析物（补充材料）的长期稳定性研究结果

Fig.2 Results of long-term stability study for selected analytes (Supplementary material)

注：绿色表示回收率为 70%~120%，黄色表示回收率为 (50%~70%)~(120%~140%)，红色表示回收率为小于 50%及大于 140%。

Note: green color represents the recovery range of 70%~120%, yellow color between 50%~70% and 120%~140%, red color below 50% and above 140%.

Drug class: 兽药类别; β-lactams β-内酰胺类 (Tazobactam 他唑巴坦, Amoxicillin 阿莫西林, Ampicillin 氨苄青霉素, Dicloxacillin 双氯青霉素, Oxacillin 苯唑西林); Cephalosporins 头孢菌素类 (Cefacetrile 头孢氨苄, Cefalonium 头孢洛宁, cefapirin 头孢匹林, cefazolin 头孢唑啉, cefoperazone 头孢哌酮, cefquinome 头孢喹肟); Macrolides 大环内酯类 (Erythromycin 红 (赤) 霉素, Josamycin 交沙霉素, Lincomycin 林可霉素, Spiramycin 螺旋霉素, Tilmicosin 替米考星, Tylosin 泰乐菌素); Penicillins 青霉素类 (Penicillin V 青霉素 V, Cloxacillin P 氯唑西林, Penicillin G 青霉素 G); Polyether ionophores 聚醚离子载体 (Monesin 莫能菌素, Nigericin 尼日利亚菌素, Salinomycin 盐霉素)

Tested tempeprature: minus 20 °C (-20 °C); Plus 4 °C (+4 °C); Plus 23 °C dark (+23 °C 避光); Plus 23 °C light (+23 °C 见光);

Recovery range: 回收率范围, test period: 测试时间, NO acid: 无酸条件, acid: 含酸条件

较高温度或长时间储存不符合青霉素的储存标准。对于 β-乳胺或头孢菌素而言，除-20 °C以外的任何温度下储存 1 个月都会导致几乎完全损失 (90%)，这与 Okerman 等^[10]的研究结果一致。相比之下，大多数其他化合物在-20 °C和+4 °C下的稳定性良好，如磺胺类、球糖、糖皮质激素和非甾体抗炎药（补充材料）即使在室温下和光照下也较为稳定。以上结果表明长期储存青霉素、头孢菌素和 β-内乳胺应在-20 °C或-80 °C，这与 Desmarchelier 等^[6]推荐的储存条件一致。

3 结论

为了保证实验结果及科研成果的可靠性，对兽药混合标准品中间液和最终混合标准溶液的稳定性进行了测试。结果表明，最终混合标准溶液在+4 °C的中性溶剂储存条件下保存一周后其稳定性良好，而且室温下最终混合标准溶液的稳定性足够确保完成一个完整样品序列的采集。如果兽药标准品的中间混合液需要储存 1 个月或更长时间时，最好采用-20 °C或更低的温度。如果是包括青霉素类、头孢菌素类和 β-内乳胺类兽药的

混合标准品中间混合液在-20 °C下储存超过 1 个月，建议重新配制。

参考文献:

- [1] STEINER D, SULLYOK M, MALACHOVA A, et al. Realizing the simultaneous liquid chromatography-tandem mass spectrometry based quantification of >1200 biotoxins, pesticides and veterinary drugs in complex feed[J]. Journal of Chromatography A, 1629: 41502, 20020.
- [2] DG SANTE. EC Directorate-General Health and Food Safety: Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed[Z]. EC, 2019. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf [30.06.2021].
- [3] [EC] European Commission: Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results[Z]. EC, 2002.
- [4] MASTOVSKA K, DORWEILER K J, LEHOTAY S J, et al. Pesticide multiresidue analysis in cereal grains using modified QuEChERS method combined with automated direct sample introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS techniques[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 5959-5972.
- [5] CROUBELS S, DE BAERE S, DE BACKER P. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in

- biological matrices during storage[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483: 419-429.
- [6] DESMARCHELIER A, FEUERRIGEL P, FATHI AHMED H, et al. Stability study of veterinary drugs in standard solutions for LC-MS/MS screening in food[J]. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry Analysis Control Exposure Risk Assess*, 2018, 35: 695-705.
- [7] MALACHOVÁ A, SULYOK M, BELTRÁN E, et al. Optimization and validation of a quantitative liquid chromatography–tandem mass spectrometric method covering 295 bacterial and fungal metabolites including all regulated mycotoxins in four model food matrices[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1362: 145-156.
- [8] LAMBERTY A, SCHIMMEL H, PAUWELS J. The study of the stability of reference materials by isochronous measurements[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 360: 359-361.
- [9] BERENDSEN B J A, ELBERS I J W, STOLKER A A M. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection[J]. *Food Additives and Contaminants: Part A: Chemistry Analysis Control Exposure Risk Assess*, 2011, 28: 1657-1666.
- [10] OKERMAN L, VAN HENDE J, DE ZUTTER L. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 586(1-2): 284-8. 
- 备注: 本文的彩色图表详见本期 PC32, 也可从本刊官网(<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。该论文原始数据支撑材料链接: https://1drv.ms/x/s!AtdxT5jN_GZ7iymYGy2iV0HR7Rz2

英 译 中: 吴 宇 (国家粮食和物资储备局科学研究院质量安全研究所)
专业校对: 叶 金