

三重四极杆质谱测定动物肌肉中 16 种苯并咪唑类药物残留量

LCMSMS-141

摘要: 本文建立了岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定动物肌肉中 16 种苯并咪唑类药物残留量的分析方法。样品用乙酸乙酯提取, MCX 固相萃取柱净化, 采用多反应监测串联质谱进行定性定量分析。配制标准工作溶液, 采用外标法定量, 16 种苯并咪唑类药物在各自线性范围内线性良好, 系统精密度良好。同时考察猪肉样品分析及加标实验, 16 种苯并咪唑类药物的回收率范围为 80.9%~118.5%。

关键词: 苯并咪唑 猪肉 三重四极杆质谱

苯并咪唑类药物是一类含有两个氮原子的苯并杂环化合物, 自 20 世纪 80 年代初问世以来, 相继合成了许多广谱、高效、低毒的抗蠕虫药, 其中主要的药物有甲苯咪唑、阿苯达唑、噻苯达唑、氟苯达唑、芬苯达唑等。它们的作用基本相似, 主要对线虫有较强的驱杀作用, 有的不仅对成虫, 而且对幼虫也有效。本类药物一般毒性低, 安全范围较大。但本类药物具有一定的致畸作用, 随着苯并咪唑类药物在兽医临床上的广泛应用, 其产生的毒副作用还会通过食物链对人体产生危害, 因而苯并咪唑类药物在可食性动物组织中的残留问题已经日益引起人们的关注。

由于一些苯并咪唑类药物及其代谢物在动物和靶动物安全评价实验中表现出致畸和致突变的作用, 许多苯并咪唑类药物在体内很快代谢, 一些代谢物, 如亚砷化物、羟化产物等仍具有胚胎毒性, 因此许多国家已将苯并咪唑类药物和其代谢物同时作为监控对象。美国、日本等国家和组织都将苯并咪唑类药物列入限制使用的兽药药物中, 并制订出各种苯并咪唑类驱虫药物(包括其某些代谢物)在不同动物体内(包括肌肉、组织等)的最高残留限量 MRL, 在不同的动物和不同的组织中最大残留限量从 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 到 5 mg/kg 不等, 大多数限量是 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本文使用 LCMS-8040, 参考《GB/T 21324-2007 食用动物和肝脏中苯并咪唑类药物残留量检测方法》, 建立了动物肌肉中 16 种苯并咪唑类药物残留量的分析方法, 此方法简单、快速和灵敏度高, 供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为: LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-30AC

自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODSIII 2.0
mmI.D. \times 50 mmL., 1.6 μm

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 20 μL

柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$

流动相: A-0.1% 甲酸水; B- 乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度 5%, 梯度洗脱见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	B.Conc.
3.50	80
4.00	80
4.01	5
6.00	Stop

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氦气

脱溶剂管温度: 200 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度: 350 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 10 ms

延迟时间: 1 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
芬苯达唑	300.10	268.05 *	-15.0	-21.0	-18.0
		159.05	-15.0	-36.0	-30.0
阿苯达唑亚砷	282.00	240.10 *	-14.0	-12.0	-17.0
		208.05	-14.0	-23.0	-22.0
噻苯咪唑	202.00	175.10 *	-30.0	-24.0	-18.0
		131.15	-30.0	-31.0	-25.0
5-羟基噻苯咪唑	218.00	191.05 *	-30.0	-23.0	-13.0
		147.10	-30.0	-32.0	-27.0
奥芬达唑	316.20	159.15 *	-11.0	-34.0	-30.0
		191.15	-11.0	-22.0	-20.0
阿苯达唑	266.30	234.10 *	-30.0	-19.0	-25.0
		191.10	-30.0	-33.0	-20.0
阿苯达唑-2-氨基砷	240.30	133.20 *	-15.0	-27.0	-24.0
		198.10	-15.0	-18.0	-21.0
阿苯达唑砷	298.30	159.10 *	-13.0	-37.0	-30.0
		224.05	-13.0	-27.0	-23.0
甲苯咪唑	296.30	264.15 *	-13.0	-21.0	-27.0
		105.25	-13.0	-35.0	-19.0
2-氨基-5-苯并咪唑	238.30	105.20 *	-15.0	-26.0	-20.0
		133.20	-15.0	-36.0	-25.0
5-羟甲基苯基苯并咪唑	298.30	266.10 *	-30.0	-22.0	-18.0
		160.15	-30.0	-35.0	-30.0
氟苯达唑	314.30	282.15 *	-14.0	-22.0	-19.0
		123.15	-14.0	-35.0	-24.0
2-氨基氟苯达唑	256.30	123.20 *	-16.0	-26.0	-22.0
		95.20	-16.0	-41.0	-18.0
坎苯达唑	303.20	217.15 *	-30.0	-28.0	-23.0
		261.10	-30.0	-17.0	-28.0
丙氧咪唑	250.30	218.15 *	-30.0	-17.0	-23.0
		176.15	-30.0	-27.0	-18.0
奥芬达唑砷	332.20	300.10 *	-15.0	-22.0	-21.0
		159.05	-15.0	-39.0	-30.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 样品前处理方法

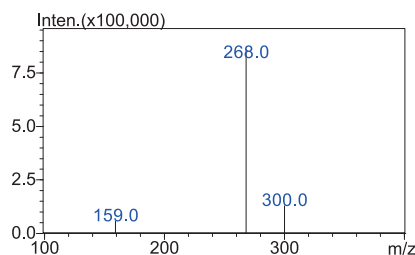
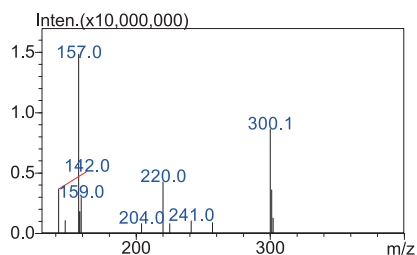
参考《GB/T 21324-2007 食用动物和肝脏中苯并咪唑类药物残留量检测方法》前处理方法。

1.3.2 标准溶液配制

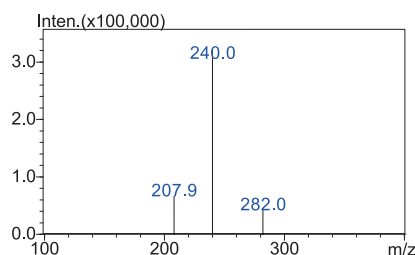
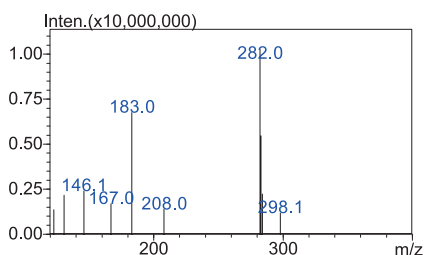
用乙腈配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用乙腈和水 (1/9, v/v) 溶液稀释成浓度为 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 µg/L 标准工作液。

■ 结果讨论

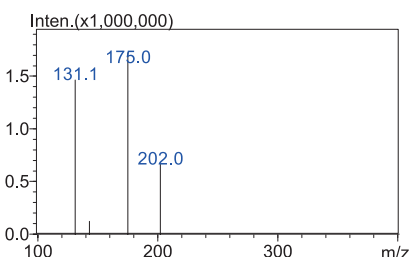
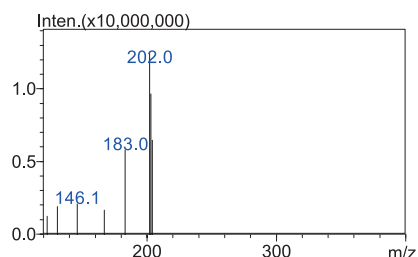
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



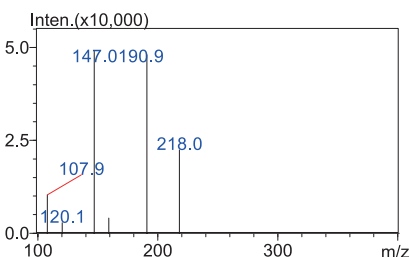
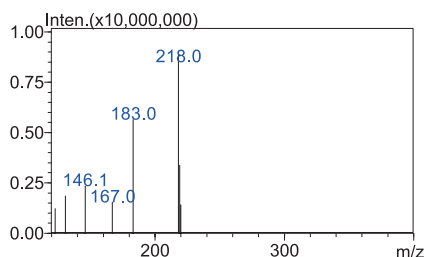
1 芬苯达唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-20V）（右图）



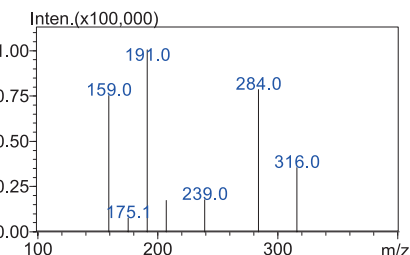
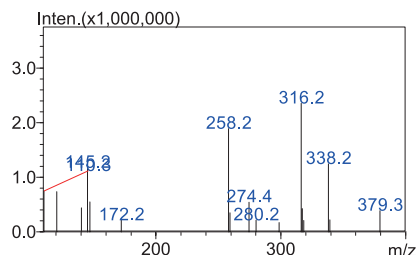
2 阿苯达唑亚砜的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-13V）（右图）



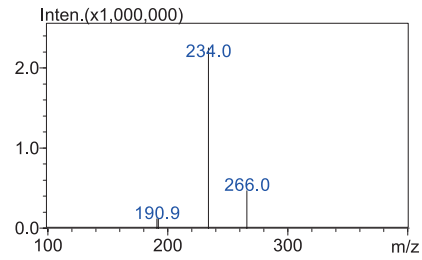
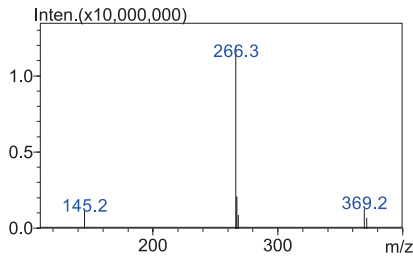
3 噻苯咪唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-30V）（右图）



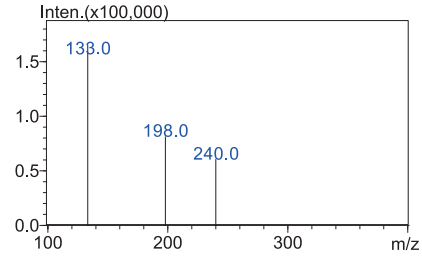
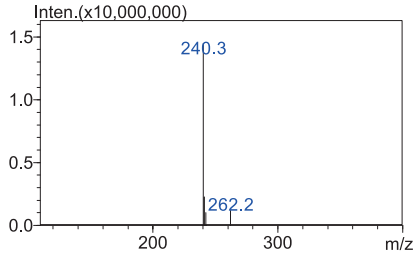
4 5-羟基噻苯咪唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-30V）（右图）



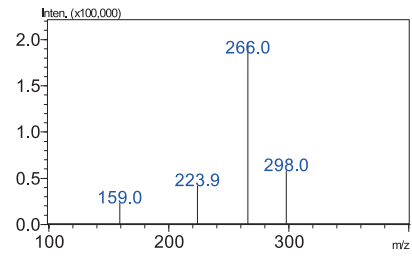
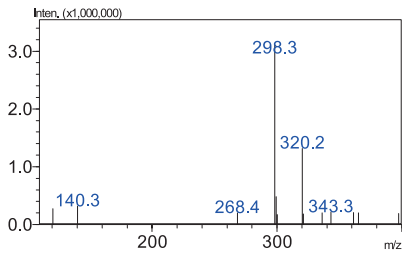
5 奥芬达唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-21V）（右图）



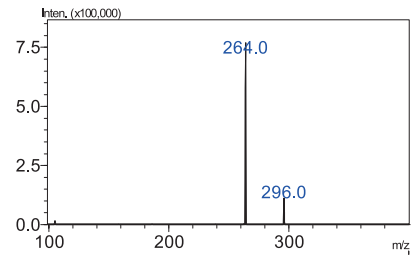
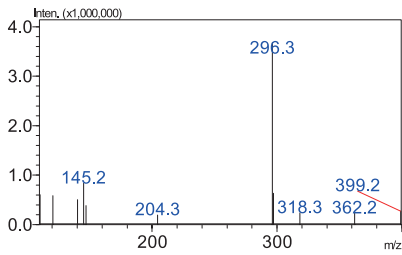
6 阿苯达唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为-18V) (右图)



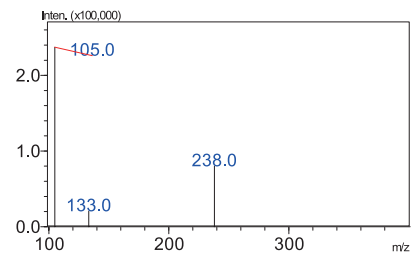
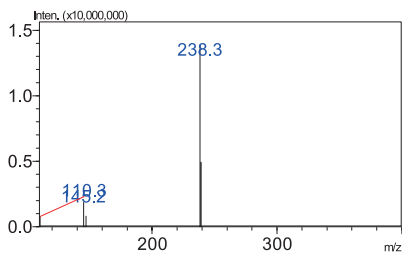
7 阿苯达唑-2-氨基砒的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为-21V) (右图)



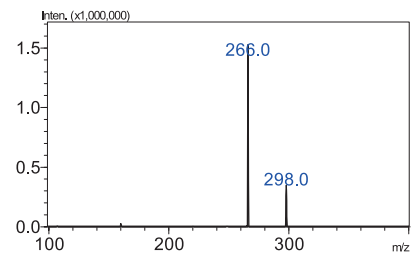
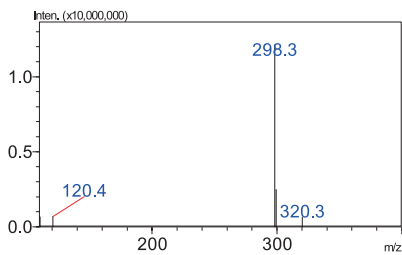
8 阿苯达唑砒一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为-20V) (右图)



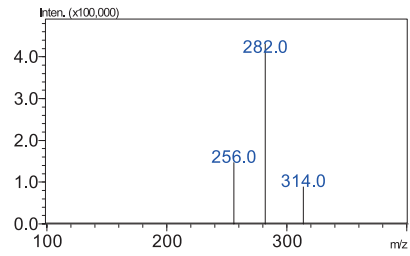
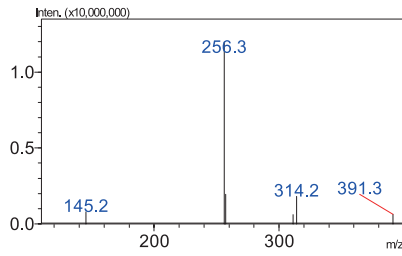
9 甲苯咪唑一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为-20V) (右图)



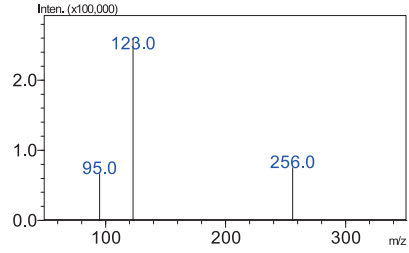
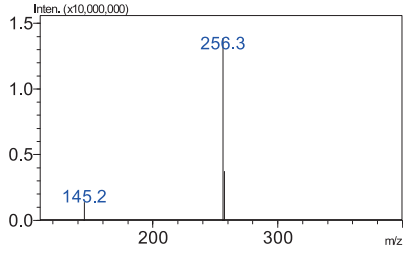
10 2-氨基-5-苯并咪唑一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为-28V) (右图)



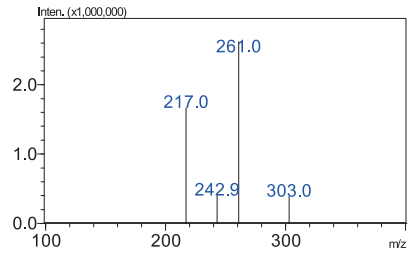
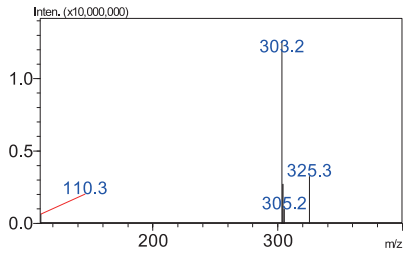
11 5-羟甲基苯基苯并咪唑一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值为-20V) (右图)



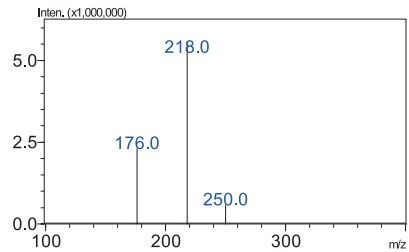
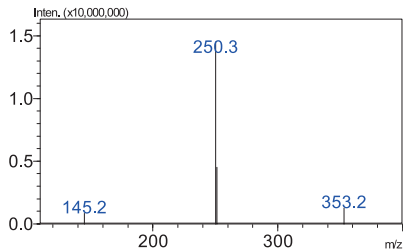
12 氟苯达唑一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-20V）（右图）



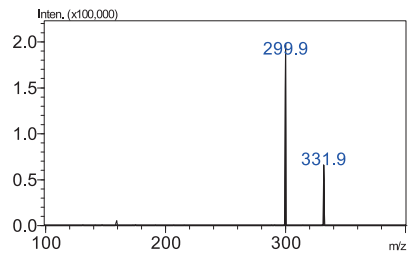
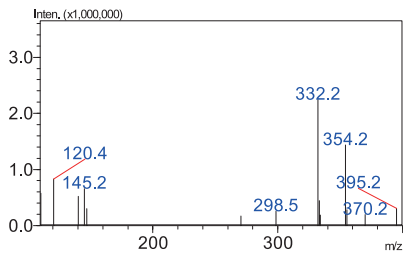
13 2-氨基氟苯达唑一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-28V）（右图）



14 坎苯达唑一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-20V）（右图）



15 丙氧咪唑一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-20V）（右图）



16 奥芬达唑酮一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值为-20V）（右图）

图1 16种苯并咪唑类药物的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准溶液的 MRM 色谱图

标准溶液 MRM 色谱图如图 2 所示。

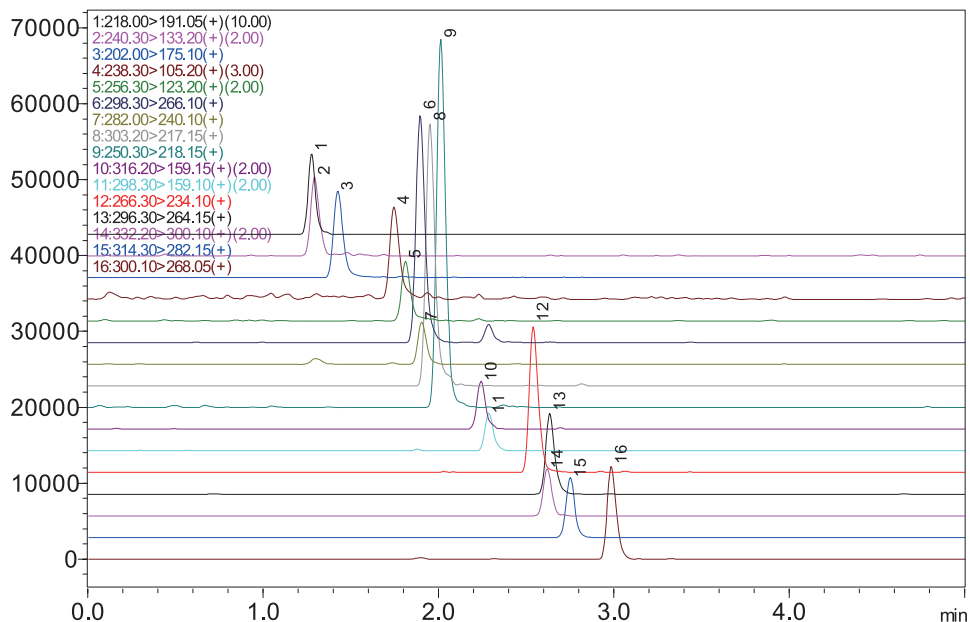


图2 1 µg/L标准溶液的MRM色谱图

(1:5-羟基噻苯咪唑;2:阿苯达唑-2-氨基砒;3:噻苯达唑;4:2-氨基-5-苯并咪唑;5:2-氨基氟苯咪唑;6:5-羟基甲基苯基苯并咪唑;7:阿苯达唑亚砒;8-坎苯达唑;9:丙氧咪唑;10:奥芬达唑;11:阿苯达唑砒;12:阿苯达唑;13:甲苯咪唑;14:奥芬达唑砒;15:氟苯咪唑;16:芬苯达唑)

2.3 线性关系

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，以 0.5,1,2,5,10,20,50 µg/L 线性浓度点，采用外标法建立校准曲线，如图 3~18 所示 16 种苯并咪唑类药物在各自的线性浓度范围内，线性相关性良好，相关系数均在 0.9993~0.9999 之间。

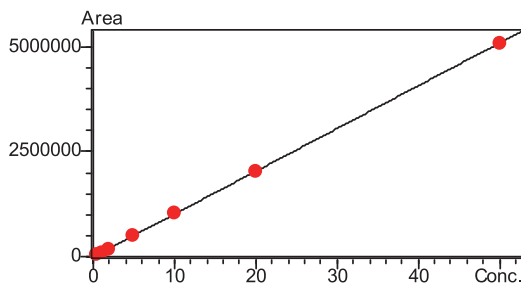


图3 芬苯达唑工作曲线

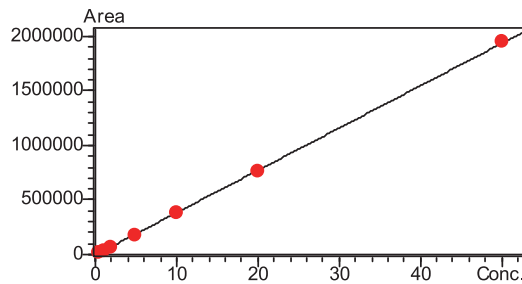


图4 阿苯达唑亚砒工作曲线

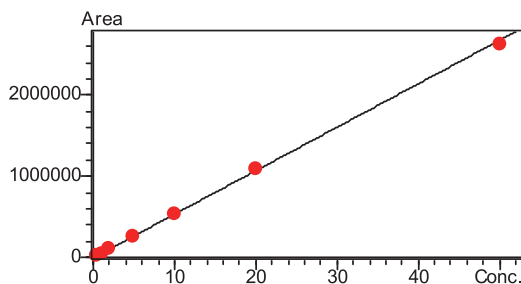


图5 噻苯达唑的标准工作曲线

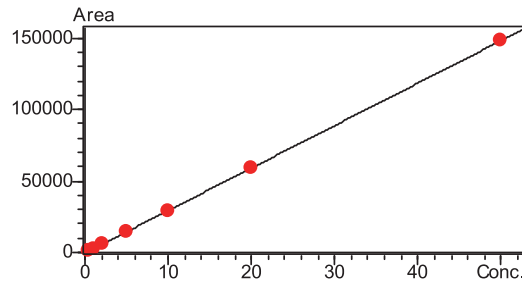


图6 5-羟基噻苯咪唑的标准工作曲线

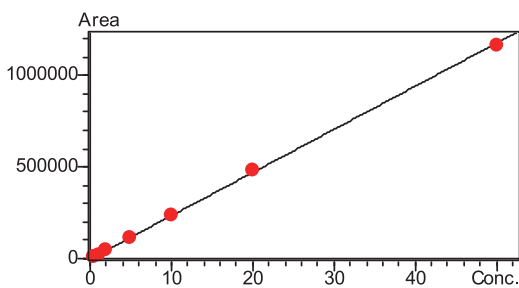


图7 奥芬达唑的标准工作曲线

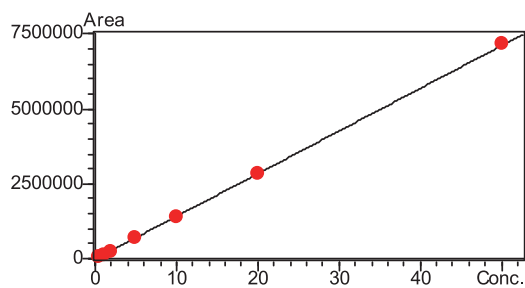


图8 阿苯达唑的标准工作曲线

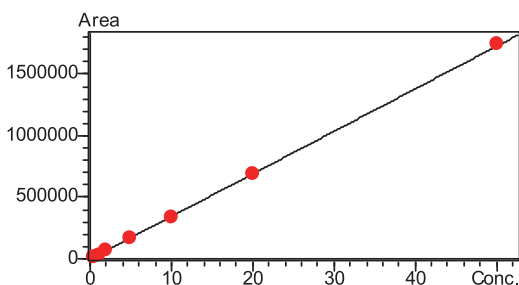


图9 阿苯达唑-2-氨基砒的标准工作曲线

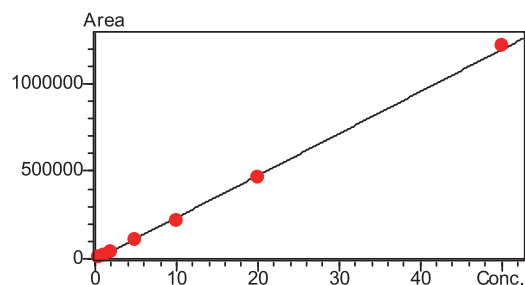


图10 阿苯达唑砒的标准工作曲线

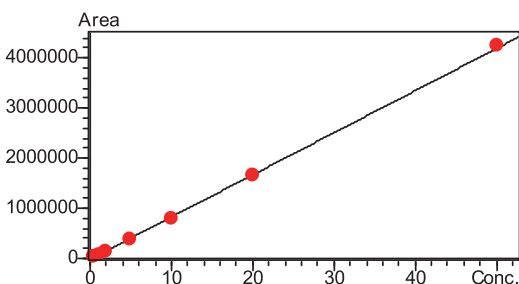


图11 甲苯咪唑的标准工作曲线

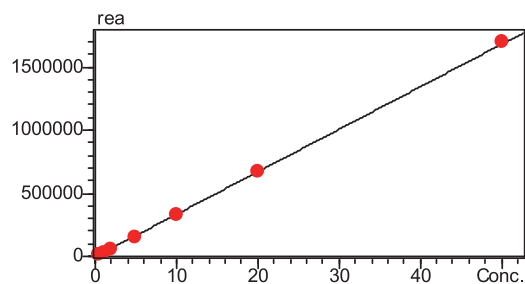


图12 2-氨基-5-苯并咪唑的标准工作曲线

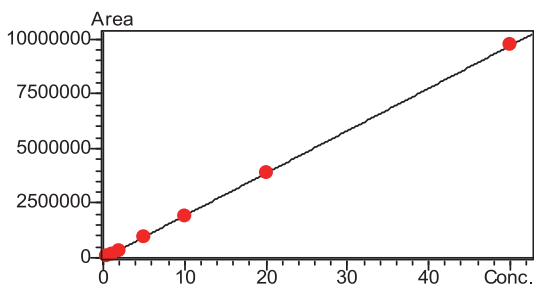


图13 5-羟基甲基苯基苯并咪唑的标准工作曲线

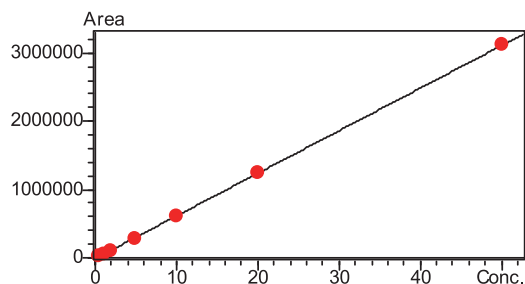


图14 氟苯咪唑的标准工作曲线

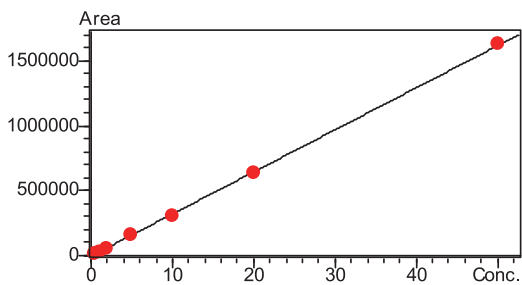


图15 2-氨基氟苯咪唑的标准工作曲线

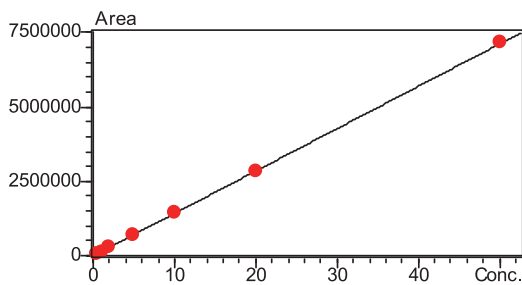


图16 坎苯达唑的标准工作曲线

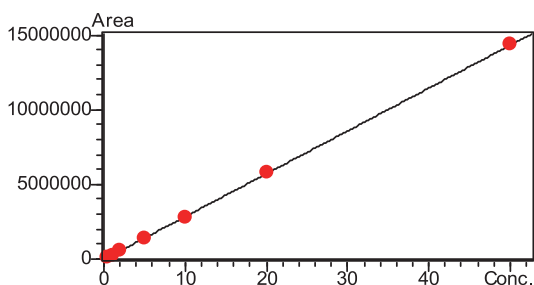


图17 丙氧咪唑的标准工作曲线

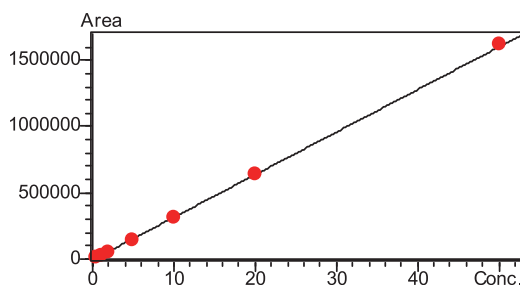


图18 奥芬达唑砒的标准工作曲线

表3 16种苯并咪唑类药物的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)	相关系数 (R)
1	芬苯达唑	$Y = (102039)X + (-7593.07)$	0.5-50	0.9998
2	阿苯达唑亚砒	$Y = (38800.7)X + (-4459.85)$	0.5-50	0.9997
3	噻苯达唑	$Y = (53627.3)X + (-3487.00)$	0.5-50	0.9998
4	5-羟基噻苯咪唑	$Y = (2973.34)X + (-440.410)$	0.5-50	0.9999
5	奥芬达唑	$Y = (23538.4)X + (-1100.32)$	0.5-50	0.9998
6	阿苯达唑	$Y = (142614)X + (-13971.5)$	0.5-50	0.9999
7	阿苯达唑-2-氨基砒	$Y = (34559.0)X + (-955.132)$	0.5-50	0.9999
8	阿苯达唑砒	$Y = (23955.4)X + (-4298.89)$	0.5-50	0.9993
9	甲苯咪唑	$Y = (84042.3)X + (-13036.9)$	0.5-50	0.9994
10	2-氨基-5-苯并咪唑	$Y = (33655.4)X + (-3836.79)$	0.5-50	0.9998
11	5-羟基甲基苯基苯并咪唑	$Y = (194310)X + (-16084.6)$	0.5-50	0.9998
12	氟苯咪唑	$Y = (62373.4)X + (-9909.01)$	0.5-50	0.9997
13	2-氨基氟苯咪唑	$Y = (32407.1)X + (-3788.73)$	0.5-50	0.9997
14	坎苯达唑	$Y = (142537)X + (-7435.31)$	0.5-50	0.9999
15	丙氧咪唑	$Y = (286670)X + (-22334.3)$	0.5-50	0.9999
16	奥芬达唑砒	$Y = (32103.3)X + (-5116.31)$	0.5-50	0.9998

2.4 检出限和定量限

配制 7 份标准溶液，进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 $MDL = 3.14 \times S$ ，定量限 $LOQ = 4 \times MDL$ 。测定结果如表 4 所示：

表4 16种苯并咪唑类药物的检出限和定量限

名称	浓度($\mu\text{g/L}$)	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
芬苯达唑	0.5	0.015	0.047	0.19
阿苯达唑亚砒	0.5	0.035	0.11	0.44
噻苯达唑	0.5	0.030	0.094	0.38
5-羟基噻苯咪唑	0.5	0.035	0.11	0.44
奥芬达唑	0.5	0.015	0.047	0.19
阿苯达唑	0.5	0.015	0.047	0.19
阿苯达唑-2-氨基砒	0.5	0.022	0.069	0.28
阿苯达唑砒	0.5	0.016	0.050	0.20

甲苯咪唑	0.5	0.020	0.063	0.25
2-氨基-5-苯并咪唑	0.5	0.022	0.069	0.28
5-羟基甲基苯基苯并咪唑	0.5	0.016	0.050	0.20
氟苯咪唑	0.5	0.026	0.082	0.33
2-氨基氟苯咪唑	0.5	0.019	0.060	0.24
坎苯达唑	0.5	0.024	0.075	0.30
丙氧咪唑	0.5	0.016	0.050	0.20
奥芬达唑砒	0.5	0.023	0.072	0.29

2.5 精密度实验

配制低中高浓度的混合标样依次平行测定 6 次（浓度见表 4），16 种苯并咪唑类药物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.058%~0.526% 和 0.34%~4.95% 之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (浓度级别 1)		RSD% (浓度级别 4)		RSD% (浓度级别 7)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
芬苯达唑	0.059	3.01	0.064	1.48	0.082	0.34
阿苯达唑亚砒	0.202	4.26	0.084	2.86	0.153	0.92
噻苯达唑	0.272	4.52	0.180	2.85	0.132	2.58
5-羟基噻苯咪唑	0.526	4.44	0.249	3.91	0.158	1.41
奥芬达唑	0.121	2.71	0.089	2.91	0.105	0.97
阿苯达唑	0.073	2.07	0.090	1.29	0.099	0.92
阿苯达唑-2-氨基砒	0.392	4.36	0.162	2.08	0.177	1.72
阿苯达唑砒	0.103	3.95	0.126	0.63	0.113	0.64
甲苯咪唑	0.093	4.95	0.095	1.69	0.094	0.74
2-氨基-5-苯并咪唑	0.363	3.95	0.149	2.72	0.243	0.94
5-羟基甲基苯基苯并咪唑	0.091	2.31	0.099	0.79	0.140	1.17
氟苯咪唑	0.107	4.22	0.058	1.52	0.091	1.00
2-氨基氟苯咪唑	0.339	4.30	0.177	2.53	0.166	1.43
坎苯达唑	0.150	4.90	0.123	3.38	0.121	1.87
丙氧咪唑	0.091	3.46	0.108	1.31	0.125	1.20
奥芬达唑砒	0.170	3.23	0.044	3.09	0.084	0.80

2.6 实际样品分析及回收率实验

将所建立的分析方法用于实际样品分析，检测市场购得猪肉样品，均未检测到这 16 种苯并咪唑类药物。图 19 为猪肉样品的 MRM 色谱图。在猪肉样品中添加浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的混合标准溶液，加标 MRM 色谱图如图 20 所示，加标回收率结果见表 5。

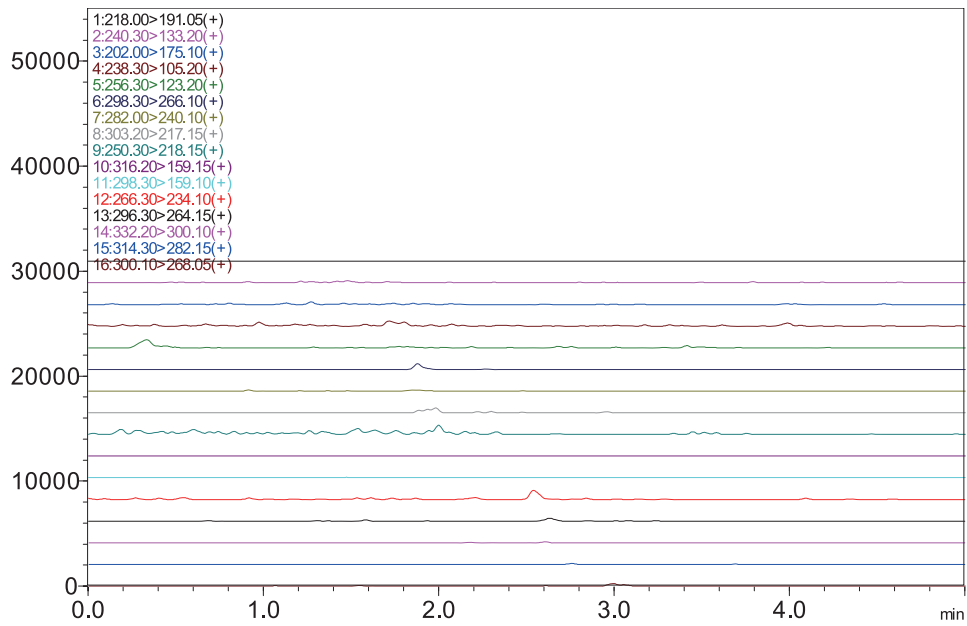


图19 猪肉样品的MRM色谱图

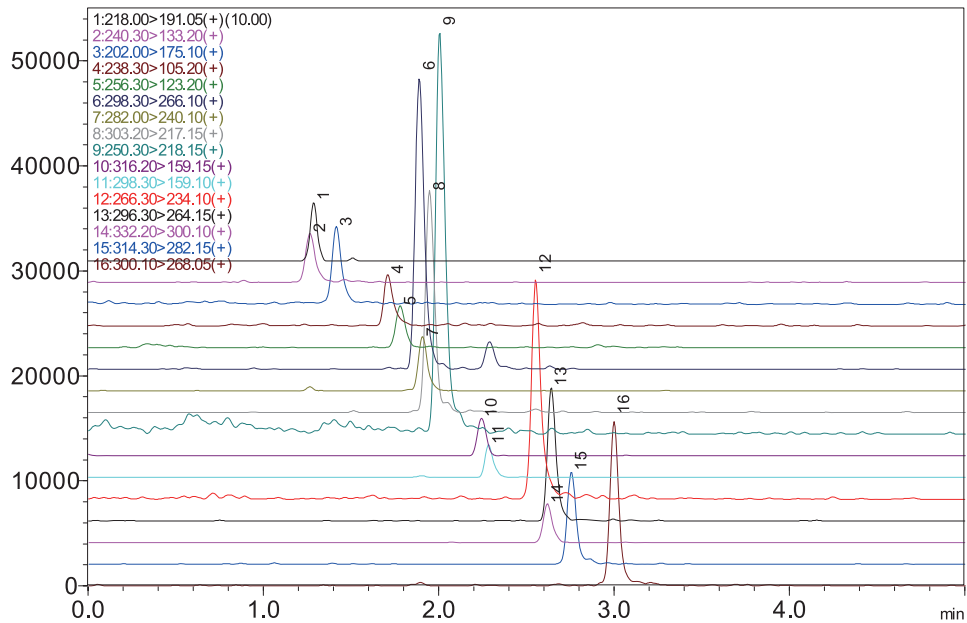


图20 猪肉样品10 µg/kg加标的MRM色谱图

(1:5-羟基噻苯咪唑;2:阿苯达唑-2-氨基砒;3:噻苯达唑;4:2-氨基-5-苯并咪唑;5:2-氨基氟苯咪唑;6:5-羟基甲基苯基苯并咪唑;7:阿苯达唑亚砒;8-坎苯达唑;9:丙氧咪唑;10:奥芬达唑;11:阿苯达唑砒;12:阿苯达唑;13:甲苯咪唑;14:奥芬达唑砒;15:氟苯咪唑;16:芬苯达唑)

表5 猪肉样品16中苯并咪唑类药物检测与加标回收结果

编号	名称	检测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	理论浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	芬苯达唑	N.D.	10.0	9.5	94.5
2	阿苯达唑亚砷	N.D.	10.0	8.1	80.9
3	噻苯达唑	N.D.	10.0	9.8	98.2
4	5-羟基噻苯咪唑	N.D.	10.0	10.0	99.8
5	奥芬达唑	N.D.	10.0	11.4	113.8
6	阿苯达唑	N.D.	10.0	9.6	96.3
7	阿苯达唑-2-氨基砷	N.D.	10.0	9.6	96.1
8	阿苯达唑砷	N.D.	10.0	11.8	118.5
9	甲苯咪唑	N.D.	10.0	11.3	112.8
10	2-氨基-5-苯并咪唑	N.D.	10.0	11.8	118.3
11	5-羟基甲基苯基苯并咪唑	N.D.	10.0	9.8	97.8
12	氟苯咪唑	N.D.	10.0	10.4	103.6
13	2-氨基氟苯咪唑	N.D.	10.0	9.3	92.6
14	坎苯达唑	N.D.	10.0	10.8	107.8
15	丙氧咪唑	N.D.	10.0	9.6	96.1
16	奥芬达唑砷	N.D.	10.0	9.1	90.7

注: N.D.表示未检出

结论

本文建立了一种使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 测定动物肌肉中 16 种苯并咪唑类药物残留量的分析方法。16 种苯并咪唑类药物线性范围宽, 在各自线性范围内线性良好, 相关系数在 0.9993~0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差 5% 以内, 仪器精密度良好。考察猪肉样品分析及加标实验, 16 种苯并咪唑类药物的回收率范围为 80.9%~118.5%, 可以满足动物肌肉中 16 种苯并咪唑类药物残留量的检测需求。