

LC-MS/MS 法测定鸡肉中氯苯胍残留量

LCMSMS-699

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用系统建立了一种测定鸡肉中氯苯胍残留量的方法。该方法可在 7 min 快速完成样品的分析检测，氯苯胍在 5~500 ng/mL 浓度范围内均具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.996，各校准点准确度为 89.9~111.2%，所有组分保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.066~0.083% 和 0.717~1.314% 之间，加标回收率在 85.4%~91.0% 之间。氯苯胍残留物的 LOD 为 0.02 ng/mL，LOQ 为 0.07 ng/mL。该方法操作简捷、灵敏度高、分析速度快，满足动物性食品中氯苯胍残留物的定性定量分析。

关键词： 三重四极杆串联质谱 鸡肉 氯苯胍

氯苯胍 (Robenidine) 是一种人工合成的抗球虫病药，分子式为 $C_{15}H_{14}Cl_3N_5$ ，属胍基衍生物，临床上主要使用的是其盐酸盐—盐酸氯苯胍 (Robenidine hydrochloride)。盐酸氯苯胍能有效抑制球虫病和促进畜禽生长，且毒性小，具有促进营养吸收的作用，被广泛用于治疗和预防畜禽球虫病及弓形虫病。目前，中国允许盐酸氯苯胍在动物饲料中添加使用，要求休药期 5~7 天，产蛋禽禁用。然而，部分养殖户不遵守规定，长期滥用药、误用药，导致寄生虫产生了较严重的耐药性，使其疗效大受影响。并且，若长期食用含药物残留的动物源性食品，还会危害人类的身体健康。

中国农业农村部第 235 号公告，明确规定了氯苯胍的最大残留限量：鸡脂肪和皮为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，可食组织为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。而欧盟对鸡、火鸡和兔子中氯苯胍的最大残留限量要求更为严格：肝脏、肾脏、脂肪和皮为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，禽蛋为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，其他可食组织为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此，为保障畜禽产品的质量安全和资源环境的可持续发展，有必要对动物源性食品中氯苯胍及其代谢物的残留进行严格监管。

本文参考食品安全国家标准 GB 31658.13-2021《动物性食品中氯苯胍残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，以期为动物源食品中氯苯胍类药物残留的风险评估提供参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆液质联用仪，具体配置为：

输液泵：LC-30 AD×2

系统控制器：CBM-20 A

脱气机：DGU-20 A_{5R}

检测器：LCMS-8050 三重四极杆质谱仪

自动进样器：SIL-30 AC

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

柱温箱：CTO-20 A

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST-HP C18-AQ 2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm ,

(P/N: 227-30807-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸 / 水, B 相 - 乙腈

进样体积：5 μL

流速：0.3 mL/min

柱温：30°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
5.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.00	Pumps	Pump B Conc.	80
6.10	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI (+)	接口温度：300°C
接口电压：+3.0 kV	DL 温度：250°C
雾化气：氮气 3.0 L/min	加热块温度：400°C
干燥气：氮气 10.0 L/min	扫描模式：MRM
加热气：空气 10.0 L/min	MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 优化参数

中文名	英文名	CAS. No.	离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
氯苯胍	Robenidine hydrochloride	25875-50-7	334.2>110.8*	-17.0	-44.0	-18.0
			334.2>137.8	-17.0	-24.0	-14.0
氯苯胍 -D ₈	Robenidine-D ₈ hydrochloride	1173097-77-2	342.0>115.0*	-13.0	-45.0	-12.0
			342.0>142.0	-26.0	-25.0	-29.0

注：* 表示定量离子对

1.3 标准品与材料

氯苯胍和氯苯胍 -D₈ 标准品：购于上海安谱，于 -20°C 冰箱保存，备用；

HLB 固相萃取柱：200 mg/6 mL，购于岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 380-00855-10；

中性氧化铝固相萃取柱：500 mg/3 mL，购于岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 380-00865-02。

1.4 标准品配制

氯苯胍标准储备液：称取标准品适量，用甲醇溶解稀释成 100 µg/mL，-18°C 以下保存，有效期 6 个月；

氯苯胍标准工作液：将氯苯胍标准储备液用甲醇溶解稀释成 10 µg/mL，2~8°C 保存，有效期 3 个月；

氯苯胍 -D₈ 内标储备液：称取标准品适量，用甲醇溶解稀释成 100 µg/mL，-18°C 以下保存，有效期 6 个月；

氯苯胍 -D₈ 内标中间溶液：将氯苯胍 -D₈ 内标储备液用甲醇溶解稀释成 10 µg/mL，2~8°C 保存，有效期 1 个月；

氯苯胍 -D₈ 内标工作溶液：将氯苯胍 -D₈ 内标中间溶液用甲醇溶解稀释成 1 µg/mL，现用现配；

标准溶液：精密量取氯苯胍标准工作溶液、氯苯胍 -D₈ 内标工作溶液适量，用 50% 乙腈甲酸水溶液稀释，配制成氯苯胍浓度为 5、10、20、50、100、200、500 ng/mL 和氯苯胍 -D₈ 内标均为 100 ng/mL 的系列标准溶液，供液相色谱 - 串联质谱测定。

1.5 样品前处理

1.5.1 提取

取试样 2 g（准确至 ±0.02 g），于 50 mL 离心管，准确加入氯苯胍 -D₈ 内标工作液 100 µL，加 0.1% 甲酸乙腈溶液 5 mL，涡旋混匀，中速振荡 10 min，8000 r/min 离心 10 min，取上清液，再加水 1 mL，混匀，作为备用液 1。

1.5.2 净化

称取中性氧化铝固相萃取柱，用乙腈 2 mL 活化，取备用液 1 过柱，收集全部流出液于 10 mL 试管中，用 85% 乙腈溶液 2 mL 淋洗，合并流出液，于 40 °C 氮气吹至体积小于 2 mL，再加水 8 mL，混匀，作为备用液 2。

取 HLB 固相萃取柱，依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 活化，取备用液 2 过柱，用水 3 mL 淋洗，抽干 30 s，正己烷 3 mL 淋洗，抽干 10 min，甲醇 5 mL 洗脱，收集洗脱液，于 40 °C 氮气吹干，用 50% 乙腈甲酸水溶液 1.0 mL 溶解残余物，涡旋，尼龙微孔滤膜过滤，供液相色谱 - 串联质谱测定。

■ 结果与讨论

2.1 标准溶液 MRM 色谱图

按照 1.2 分析条件，分析浓度为 5 ng/mL 的标准溶液，色谱图如图 1 所示。

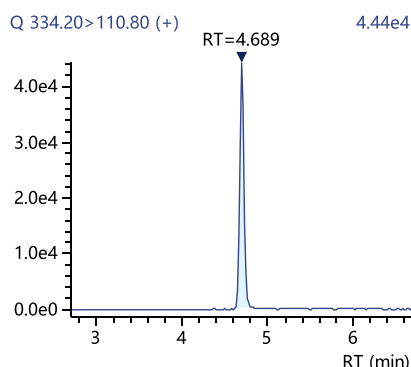


图 1 氯苯胍标准溶液色谱图 (5 ng/mL)

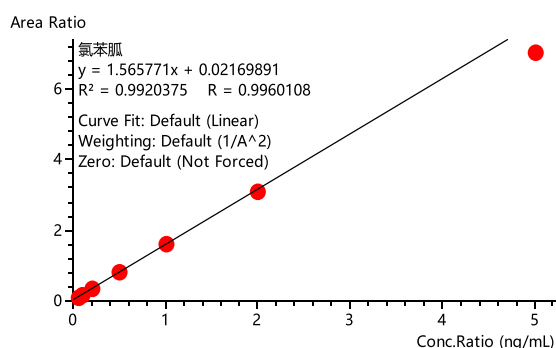


图 2 氯苯胍校准曲线

2.2 线性范围和灵敏度

将不同浓度的标准系列溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，所有化合物均采用内标法定量，以标准系列溶液中目标组分与内标物的质量浓度 (ng/mL) 比值为横坐标，以其对应的峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标，绘制校准曲线。绘制校准曲线。结果如图 2 所示，氯苯胍在 5~500 ng/mL 浓度范围内，具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.996，具体结果见表 3。

表 3 校准曲线参数

化合物	标准曲线	相关系数 r	准确度 (%)	线性范围 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
氯苯胍	$Y = 1.56577X + 0.0216989$	0.996	89.9~111.2	5~500	0.02	0.07

2.3 精密度实验

将浓度分别为 5 ng/mL、50 ng/mL 和 500 ng/mL 的标准溶液参照分析条件连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果见表 4。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.066~0.083% 和 0.717~1.314% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物	RSD% (5 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)		RSD% (500 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
氯苯胍	0.077	1.314	0.066	0.717	0.083	0.982

2.4 样品测试和加标回收实验

按照 1.3 中样品前处理方法对某农贸市场购买的新鲜鸡肉样品进行处理，上机分析，鸡肉待测样品中未检测到氯苯胍残留。对空白样品进行加标回收实验，加标量为 5、25、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，按照 1.2 分析条件进行测试，重复实验 3 次，计算平均回收率。空白溶液和基质前加标色谱图如下图 3 所示。计算结果显示，氯苯胍的平均回收率在 85.4%~91.0% 之间，具体结果见表 5。

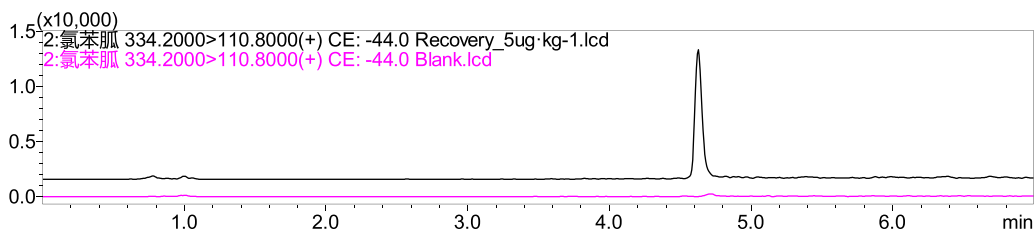


图 3 空白溶液和基质前加标样品色谱图 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

表 5 回收率结果 (n=3)

化合物	某鸡肉样品浓度 (mg/kg)	加标量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均加标回收率 (%)
氯苯胍	N.D.	5	91.0
		25	95.4
		250	85.4

注：N.D. 代表未检出。

■ 结论

本文参照食品安全国家标准 GB 31658.13-2021，采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪建立了鸡肉中氯苯胍的定量分析方法。结果表明，氯苯胍在 5~500 ng/mL 浓度范围内均具有较好的线性关系，线性相关系数大于 0.996，准确度在 89.9~111.2%。选 5、50 和 500 ng/mL 三个浓度水平，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.066~0.083% 和 0.717~1.314% 之间，系统精密度良好。同时考察了空白基质加标，回收率在 85.4%~91.0% 之间。该方法准确可靠，灵敏度高，重现性强，满足食品安全国家标准 GB 31658.13-2021 的检测需求，可供相关分析人员参考。

岛津应用云

