

# 使用 LCMS-8045 测定牛奶中氮氨基菲啉 残留量

## LCMSMS-456

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定牛奶中氮氨基菲啉残留量的方法。结果表明：该方法在 4 min 内完成对氮氨基菲啉的检测。氮氨基菲啉在 20 ng/mL ~1000 ng/mL 浓度范围内线性良好，校准曲线线性相关系数  $r$  在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。此方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，且操作简单，可用于牛奶中氮氨基菲啉残留量的快速检测。

**关键词：**三重四极杆质谱 牛奶 氮氨基菲啉

氮氨基菲啉 (isometamidium, ISM) 是目前国内外应用最广泛的治疗锥虫感染的药物之一。由于氮氨基菲啉可有效抑制锥虫细胞内的 RNA 和 DNA 聚合酶活性，干扰锥虫核酸的合成，常被用于牛羊等动物寄生虫病的预防和治疗。在养殖过程中，由于对治疗用量、使用次数和休药期认识不足或忽视，容易导致氮氨基菲啉药物在动物可食性下游产品中残留，进而随着食物链进入人体，对公众的健康造成潜在威胁。近年来，食品安全问题引起了全社会的广泛关注，而兽药残留问题是影响动物源食品安全的主要因素之一。我国《GB 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定：牛肉和牛奶中氮氨基菲啉的最大残留限量值为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前，国内外关于氮氨基菲啉残留检测的报道较少，主要测定方法有高效液相色谱法 (HPLC) 和高效液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。其中，LC-MS/MS 法具有很高的选择性和灵敏度，适合于复杂基体中的痕量物质分析，且准确度高。本文参照国家标准检测方法 GB 31660.8—2019《食品安全国家标准 牛可食性组织及牛奶中氮氨基菲啉残留量的测定》，采用乙腈和甲酸铵 - 甲醇溶液提取，正己烷脱脂，使用岛津超高效液相色谱与 LCMS-8045 质谱仪联用系统对牛奶中氮氨基菲啉残留量进行测定。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于牛奶中氮氨基菲啉残留量的快速测定。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：SHIMADZU Shim-pack GISS-HP C18 (50 mm $\times$ 2.1 mm I.D., 1.9  $\mu\text{m}$ ) (P/N: 227-30048-01)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸乙腈溶液

流速：0.50 mL/min

进样体积：1  $\mu\text{L}$

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	90
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.60	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Controller	Stop	

**质谱条件**

离子源：ESI，正离子模式

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

加热气：空气 10 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

接口温度：300°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

驻留时间：100 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
氮氨菲啶	4174-69-0	460.2>298.1*	-34	-54	-22
		460.2>313.1	-34	-45	-24

注：\* 表示定量离子对

**1.3 样品前处理方法**

参考 GB 31660.8—2019《食品安全国家标准 牛可食性组织及牛奶中氮氨菲啶残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》。

**1.4 基质标准溶液的配制**

精密量取 10 μg/mL 氮氨菲啶标准工作溶液适量，于经提取蒸干后的空白牛奶样品残余物中，用适量 80% 甲醇溶液溶解并稀释至 2.0 mL，使氮氨菲啶浓度为 20、50、100、250、500、1000 ng/mL，滤过，制成系列基质匹配标准工作溶液，供液相色谱 - 串联质谱仪测定。以定量离子峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

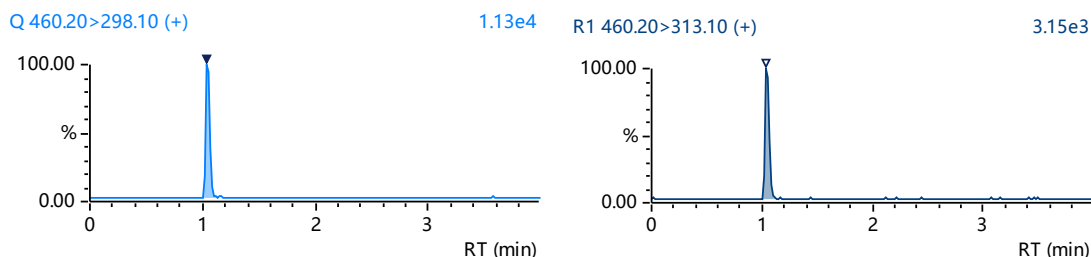
**结果与讨论**
**2.1 标准样品的 MRM 色谱图**


图 1 氮氨菲啶基质匹配标准样品的 MRM 色谱图 (20 ng/mL)

## 2.2 线性范围与检出限

将不同浓度的氮氨基菲啶基质匹配标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

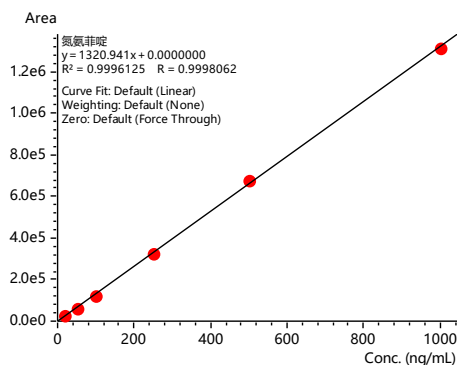


图 2 氮氨基菲啶校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

化合物	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度	定量限 (µg/kg)	检出限 (µg/kg)
氮氨基菲啶	Y = (1320.94)X	0.9998	20~1000	90.2-102.5%	8	2.5

## 2.3 精密度实验

对 50 ng/mL、100 ng/mL 和 200 ng/mL 不同浓度的氮氨基菲啶基质标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：不同浓度样品中氮氨基菲啶保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.24% ~ 0.39% 和 0.80% ~ 1.03% 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)

Conc.( ng/mL)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
50	0.37	0.80
100	0.24	1.03
200	0.39	0.92

## 2.4 回收率实验

称取空白牛奶样品，加入少量氮氨基菲啶标准溶液，使加标浓度分别为 10 µg/kg，40 µg/kg 和 80 µg/kg。按照 1.3 样品前处理方法提取净化后，测定氮氨基菲啶的加标回收率。空白牛奶样品 MRM 色谱图如 3 所示，10 µg/kg 加标样品 MRM 色谱图如 4 所示，加标回收率结果见表 5。由结果可知，该方法灵敏度高，准确率高，可以满足国家标准检测方法 GB 31660.8—2019《食品安全国家标准 牛可食性组织及牛奶中氮氨基菲啶残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》检测要求。

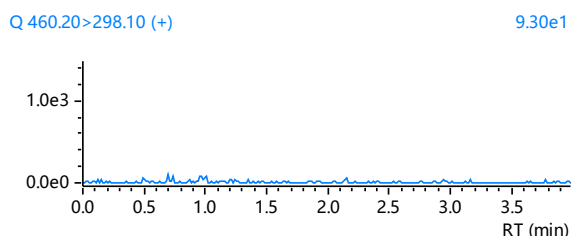


图3 空白牛奶样品 MRM 图谱

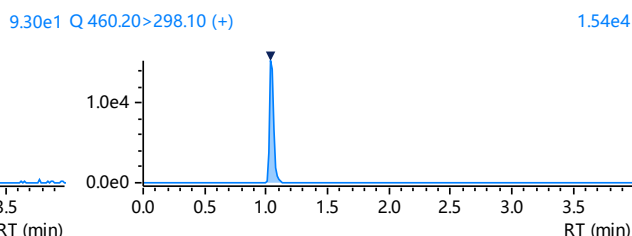


图4 氮氨基吡啶的加标样品 MRM 图谱 (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

表5 氮氨基吡啶的加标回收率结果 (n=3)

名称	加标水平 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率 %
氮氨基吡啶	10	103.4
	40	91.4
	80	88.2

## ■ 结论

采用 LC-MS/MS 法测定牛奶中氮氨基吡啶残留量，具有定性定量结果准确、灵敏度高的优点，在食品安全检测领域得到了越来越多的应用。本研究建立了一种使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定牛奶中氮氨基吡啶残留量的方法。该方法使用 Shim-pack GISS C18 色谱柱，在 4min 内完成对氮氨基吡啶的检测。氮氨基吡啶在 20 ng/mL~1000 ng/mL 浓度范围内线性良好，校准曲线线性相关系数  $r$  在 0.999 以上，且精密度和回收率实验结果良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，且操作简单，可用于牛奶中氮氨基吡啶的快速分析。

岛津应用云

