

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定牛奶中咪唑脲苯残留量

LCMSMS-307

摘要：本实验利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，参考《出口动物源性食品中咪唑脲苯残留量检测方法》(检验检疫行业标准 SN/T 4252-2015) 建立测定牛奶中咪唑脲苯残留量的分析方法。该方法在线性范围为 0.02-50 ng/mL 内，相关系数为 0.9999，线性良好。精密实验中，咪唑脲苯的保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.1-0.2% 和 1.5-5.4%，仪器精密度良好。加标回收率实验中，不同浓度基质加标量的回收率范围在 86.0~98.6% 之间。

关键词：三重四极杆质谱 咪唑脲苯 牛奶

咪唑脲苯属于均二苯基脲的衍生物，是一种动物专用的新型抗原虫的化学药物。临床上一般常用其二丙酸盐或双盐酸盐做成制剂，通过肌肉或皮下注射，用以治疗和预防各种巴贝西虫病、梨形虫病、锥虫病、附红细胞病、边缘虫病及泰勒虫病等。在肾脏中浓缩并以原型再吸收，在肝脏中解毒(代谢)，所以用量小且药效持久，刺激小。咪唑脲苯作为兽用专用药，具有用量小，使用方便，疗程短，耐药性低等特点。

研究表明，咪唑脲苯在动物体内代谢期长，残留水平较高。高浓度的药物残留会对人类健康造成威胁，CODEX、欧盟、日本、澳大利亚均制定了食品中咪唑脲苯最大残留限量(MRL)标准，其中，牛奶和牛脂肪

中的最大残留限量均为 50 µg/kg。

牛奶具有较高的营养成分，是人类最理想的天然食品。因此，对牛奶中咪唑脲苯残留量检测具有重要的意义。本实验参考《出口动物源性食品中咪唑脲苯残留量检测方法》(检验检疫行业标准 SN/T 4252-2015) 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 联用测定牛奶中咪唑脲苯残留量的方法。高效液相色谱-串联质谱联用技术具有高选择性和高灵敏度，强大的定性和定量能力，准确度高等特点，适合用于检验检疫行业对动物源性食品中的兽残检测的分析。

实验部分

1.1 仪器

本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-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2(输液泵)，DGU-20A_{SR}(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)，LabSolutionsLCMS DB Ver. 6.80(色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS 2.1 mm I.D.× 100 mm L.,
1.9 µm

流动相：A：0.1% 甲酸水溶液 B：甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：1 µL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 25%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

时间(min)	单元	处理命令	值
0.50	泵	B Conc.	25
1.00	泵	B Conc.	50
2.00	泵	B Conc.	50
2.10	泵	B Conc.	90
3.00	泵	B Conc.	90
3.10	泵	B Conc.	25
5.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8045

离子化模式: ESI(+)

加热气: 空气 10.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

接口电压: 0.2 kV

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

NO	化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
						Bias (V)	(V)	Bias (V)
1	咪唑脲苯	Imidocarb	27885-92-3	349.1	188.2*	-17	-30	-18
					162.2	-17	-25	-15

注: *表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

称取咪唑脲苯标准品适量, 用甲醇溶解, 配制成 1.0 µg/mL 的标准储备液, 置于 4°C 冰箱中保存。取标样储备液, 用初始比例流动相 (0.1% 甲酸水溶液: 甲醇 = 75:25, v/v) 分别配制成 0.02 ng/mL、0.1 ng/mL、1 ng/mL、10 ng/mL 和 50 ng/mL 浓度的标准工作液。

1.4 样品前处理

参考《出口动物源性食品中咪唑脲苯残留量检测方法》(检验检疫行业标准 SN/T 4252-2015) 牛奶提取及净化方法进行样品前处理。称取 5.00 g 试样 (精确至 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入提取液 (乙腈: 水 = 8:2, v/v) 定容至 25 mL, 涡旋混合 2 min, 以 4500 r/min 转速离心 8 min, 分取出 5 mL 样液于另一离心管中, 向样液中滴加氢氧化钠溶液调节 pH 约为 8.0, 然后以 4000 r/min 转速离心 5 min。将样液通过 WCX 固相萃取柱, 再依次用 2 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗, 弃去全部流出液, 用 5 mL 甲醇洗脱液进行洗脱, 收集洗脱液并用氮气吹干, 加入 1 mL 定容液 (0.1% 甲酸水溶液: 甲醇 = 75:25, v/v) 溶解, 过 0.22 µm 滤膜, 即得。

结果与讨论

2.1 标准品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

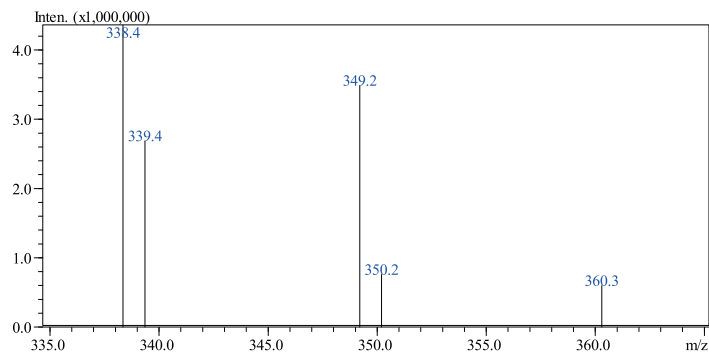


图1 咪唑脲苯一级质谱图

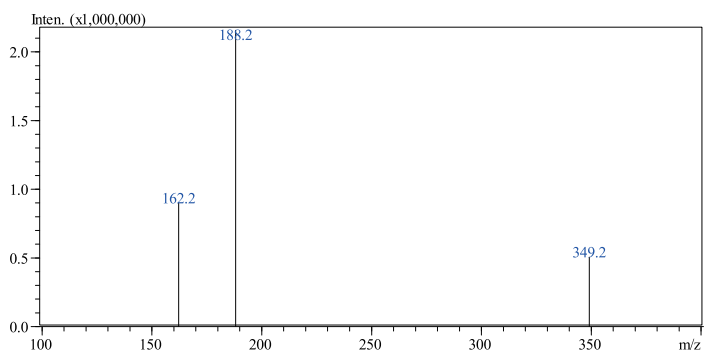


图2 咪唑脲苯产物离子扫描质谱图(CE值-25V)

2.2 咪唑脲苯标准溶液 MRM 色谱图 (0.02 ng/mL)

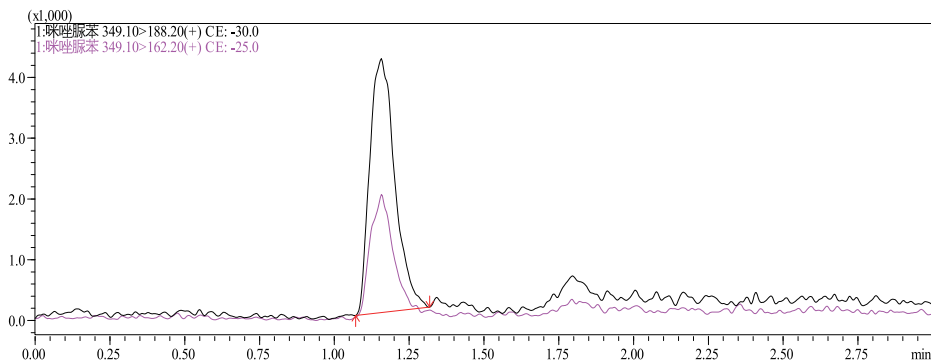


图3 0.02 ng/mL咪唑脲苯标准溶液MRM色谱图

2.3 线性范围

按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积比为纵坐标，采用外标法建立标准曲线，结果如图 4 所示，咪唑脲苯在 0.02-50 ng/mL 线性浓度范围内，相关系数均大于 0.9999，线性相关性良好，具体结果见表 3。

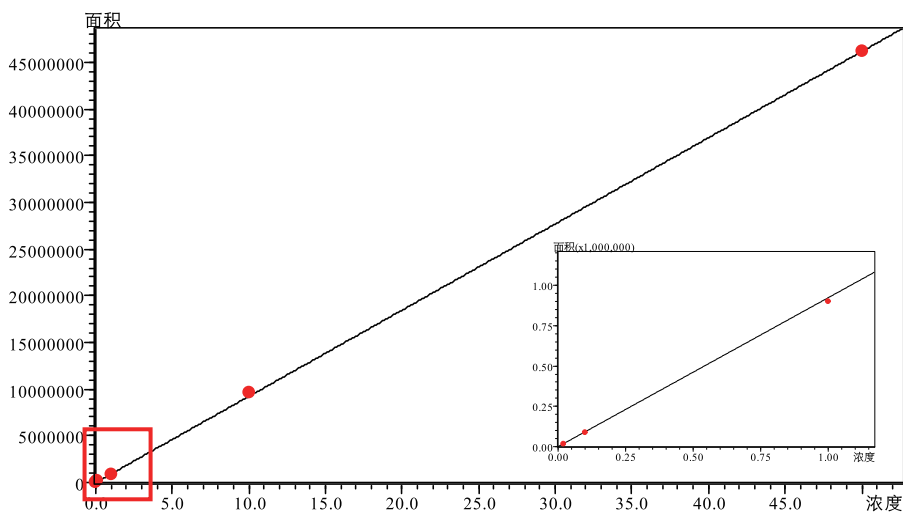


图4 咪唑脲苯标准曲线

表3 校准曲线参数

名称	线性方程	相关系数	曲线浓度点 (ng/mL)	准确度%
咪唑脲苯	Y=923549X	0.9999	0.02	92.8
			0.1	94.6
			1	99.4
			10	103.3
			50	99.9

2.4 精密度实验

按照 1.2 分析条件测定，选择 0.02 ng/mL，1 ng/mL 及 50 ng/mL 的咪唑脲苯标准溶液依次进样，平行测定 6 次。咪唑脲苯的保留时间相对标准偏差在 0.1-0.2% 范围内；峰面积的相对标准偏差范围为 1.5-5.4% (具体结果见表 4)。结果表明该仪器具有良好的精密度。

表4 精密度的结果(n=6)

名称	0.02 ng/mL		1 ng/mL		50 ng/mL	
	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积	保留时间 (min)	峰面积
咪唑脲苯	1.158	22343	1.147	688961	1.143	40201400
	1.162	21251	1.148	697204	1.141	40360042
	1.155	24061	1.152	690845	1.141	40507473
	1.156	24457	1.152	718771	1.143	40860853
	1.156	22054	1.147	711057	1.142	41454168
	1.160	22913	1.147	718038	1.145	41716697
平均值	1.157	22846	1.149	704146	1.143	40850106
RSD%	0.2	5.4	0.2	1.9	0.1	1.5

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将低浓度 0.02 ng/mL 咪唑脲苯标准溶液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutionsLCMS DB Ver. 6.80 软件计算仪器信噪比，检测限和定量限，结果如下表 5 所示。

表5 信噪比(S/N)和方法检出限以及定量限

名称	浓度 (ng/mL)	S/N	检测限 (ng/mL)	定量限(ng/mL)
咪唑脲苯	0.02	19.2	0.003	0.01

2.6 加标回收率

取 1.4 制备得到的牛奶样品溶液进样测试，得到图 5 样品色谱图。取牛奶样品 5.00 g，加入咪唑脲苯标准溶液，按照 1.4 预处理方法处理样品，最终定容体积为 1.0 mL。SN/T 4252-2015 中规定咪唑脲苯的测定下限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，样品中未检测到咪唑脲苯。采用样品前加标的方法，使最终加标浓度为 0.02 ng/mL (0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，1 ng/mL(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 和 50 ng/mL(50 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，每个加标样品连续进样 6 针。样品加标色谱图见图 6，加标回收率如表 6 所示。由表 6 可知，基质中咪唑脲苯添加水平为 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，回收率范围为 82.0-92.0%；添加水平为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，回收率范围为 86.8-90.9%；添加水平为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，回收率范围为 97.7-99.5%。加标样品在定量限以上有良好响应，能够满足样品定量分析要求。

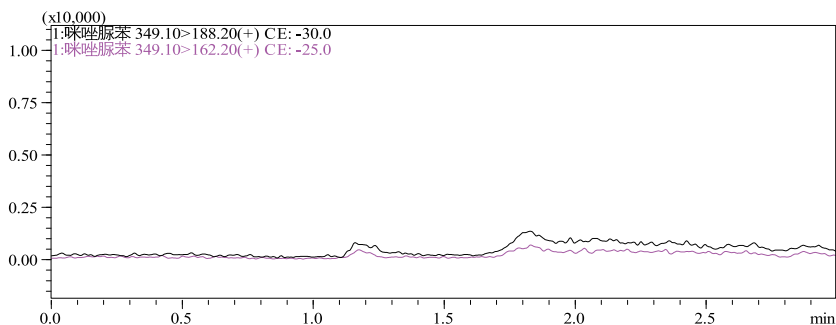


图5 牛奶样品色谱图

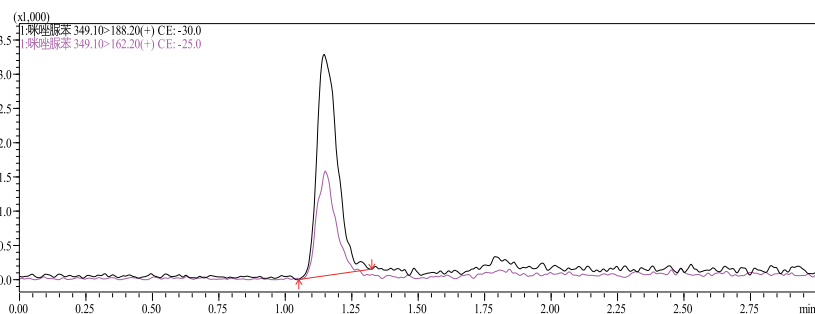


图6 牛奶样品加标0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 色谱图

表6 加标回收率(n=6)

名称/ 加标量	检出浓度		加标回收率 (%)	
	μg/kg	0.02 μg/kg	1 μg/kg	50 μg/kg
咪唑脲苯	N.D.	92.0	89.0	99.0
		83.5	90.9	97.7
		82.0	87.5	99.8
		85.5	86.8	97.9
		89.5	87.9	99.5
		85.5	88.7	97.7
平均回收率 (%)		86.0	88.5	98.6
RSD%		5.0	1.6	0.9

(N.D.: Not Detected)

结论

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 联用测定牛奶中咪唑脲苯残留量的分析方法。该方法在线性范围为 0.02-50 ng/mL 内，相关系数为 0.9999，线性良好。精密度实验中，咪唑脲苯的保留时间和峰面积的 RSD% 分别为 0.1-0.2% 和 1.5-5.4%，仪器精密度良好。加标回收率实验中，不同浓度基质加标量的回收率范围在 86.0-98.6% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势，适用于检验检疫及相关行业部门对咪唑脲苯残留量的检测分析。