

高效液相色谱-质谱联用法测定

羊奶及羊奶粉中达唑含量

郝果*, 董梅, 李璐

(富平县检验检测中心(陕西省羊乳产品质量监督检验中心), 陕西 富平 711700)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-质谱法测定羊奶及羊奶粉中阿苯达唑、芬苯达唑、噻苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯含量的分析方法。**方法** 样品采用乙腈提取, ESI+模式电离, 多反应监测(MRM)模式进行测定。**结果** 该方法阿苯达唑在(11.68~584) ng/mL范围内, 芬苯达唑在(10.08~504) ng/mL范围内, 噻苯达唑在(11.14~557) ng/mL范围内, 奥芬达唑在(10.25~512.5) ng/mL范围内, 苯硫氨酯在(11.445~572.25) ng/mL范围内, 相关性良好(R^2 均大于0.999), 平均加标回收率为72.1%~112.8%, 重复性、精密度均符合要求。**结论** 该方法准确、灵敏, 能有效、快速地测定羊奶及羊奶粉中的达唑含量。

关键词: 羊奶; 羊奶粉; 高效液相色谱-质谱联用法; 多反应监测(MRM)模式; 达唑

1 引言

达唑是一类无臭, 无味, 不溶于水, 微溶于丙酮或氯仿的白色或类白色粉末。主要分为噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯, 是一类合成的抗寄生虫药物, 由于其高效性和广谱性, 在农业和水产养殖中被广泛用于治疗吸虫和线虫感染。但是不正确的使用会使其在食用动植物产品中残留, 并通过食物链在人体中累积, 对人体健康构成潜在的危害。动物实验证明, 某些达唑具有致畸和致突变的作用, 因此, 达唑被中国、美国和欧盟等多个国家和地区列为兽药残留的重要监控对象, 并制定了最大残留限量。达唑对人体的毒性与血清白蛋白的储运功能密切相关。血清白蛋白作为人和动物血浆中重要的载体蛋白, 可以与多种外源性物质结合, 影响其在生物体中的储存、分布、代谢和毒性。GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中对噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯的残留限量标准有规定, 不同靶组织残留限量不一, 在奶中的限量均为100ug/kg。

快速、准确的检测方法能对达唑的限量能提供强有力的技术支撑。达唑常用的检测方法有很多, 主要包括气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法、气相色谱法、免疫分析

法、电化学法、荧光检测法等,其中高效液相色谱-质谱联用法因普及率高、准确性好因而被广泛应用。

GB/T 22972-2008《牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨基酯残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》样品前处理较复杂耗时,本研究参照 GB/T 22972-2008,称取 10g 羊奶或奶粉经溶解复原后的羊奶复原乳至于 100mL 离心管中,加入 30mL 乙腈,涡旋混匀,超声提取 30min, 4000r/min 离心 5min, 取上清液至于 40°C 水浴上旋转蒸发至尽干,然后用碳酸盐缓冲溶液定容至 10mL,过 0.22 μ m 滤膜上高效液相色谱-质谱联用仪进行检测,同时确定了检测器条件,建立了一种准确、快速、灵敏度高的羊乳及羊奶粉中达唑含量的检测方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

液相色谱-质谱联用仪 1290-6460 (配 ESI 源) (美国安捷伦科技有限公司);

十万分之一天平 (德国赛多利斯仪器有限公司);

百分之一电子天平 (德国赛多利斯仪器有限公司);

旋涡混合器 Vortex-6 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司);

离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司);

数控超声波清洗器 KQ2200DE (昆山市超声仪器有限公司);

旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂)。

噻苯达唑标品 (21070925, 纯度 99.9%, 坛墨质检); 阿苯达唑标品 (2502008, 纯度 97.2%, 坛墨质检); 芬苯达唑标品 (21090304, 纯度 99.7%, 坛墨质检); 奥芬达唑标品 (1371801, 纯度 88.0%, 坛墨质检); 苯硫氨基酯标品 (21090311, 纯度 99.9%, 坛墨质检)。

C₁₈ 色谱柱 (5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, 150 A, 美国安捷伦科技有限公司)、甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 sigma 公司);

水为实验室自制超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 液相洗脱条件和质谱条件的选择

分离条件以 GB/T 22972—2008 为基础,依据仪器条件和色谱柱的不同进行调整,使 5 个组分能完全分离。

2.2.2 样品制备方式的选择

按照提取、净化、浓缩的步骤制备试样，以回收率考察方法的准确性。回收率的计算参考 GB/T 27417—2017 中回收率的计算。

2.2.3 定量限的测定

在羊奶和羊奶粉中添加目标化合物，做平行样，测基线噪音值，依据特征离子色谱峰 $r_{SN} > 10$ 为方法定量限，测定方法的定量限。

3 结果与分析

3.1 液相洗脱条件和质谱条件优化

3.1.1 色谱条件

色谱参考条件：

色谱柱：Agilent BEH C₁₈ 1.8 μ m, 50mm*2.1mm；柱温：40 $^{\circ}$ C；流动相：A:0.1%甲酸水溶液；B:甲醇；流速：0.2mL/min；进样量：1.0 μ L；流动相洗脱梯度见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	0.0	12.0	12.1	14
流动相 A%	95	10	95	95
流动相 B%	5	90	5	5

3.1.2 质谱条件

质谱参考条件：电离方式:ESI+；雾化器压力:30Psi；毛细管电压:3000V；干燥气温度:350 $^{\circ}$ C；干燥气流速:10.0L/min；多反应监测(MRM)模式;其他参数见表 2。

表 2 各组分质谱分析参数

项目	保留时 (min)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞电压
噻苯达唑	7.292	202.0	174.7	28
阿苯达唑	10.137	266.0	233.9	20
芬苯达唑	10.742	300.0	267.9	20
奥芬达唑	7.883	316.0	158.7	40
苯硫氨酯	11.135	447.0	382.9	16

3.2 净化条件的优化

由于羊奶及羊奶粉中含有大量的蛋白质以及脂类物质，容易形成基质干扰，因此必须对其进行净化处理，以减少基质效应。净化的方式主要有液液分配和固相萃取两种方式。研究分别比较了乙腈直接提取旋转蒸发后定容过滤膜上机测定和经 C₁₈固相萃取柱的净化氮吹定容过滤膜上机测定。结果显示，C₁₈固相萃取柱的回收率较低，没有提取旋转蒸发后定容直

接过滤膜的回收率高，因此，选择乙腈直接提取的方式。

3.3 样品处理

羊奶样品称样 10g（精确至 0.01g）于 100mL 具塞离心管中，加入 30mL 乙腈，涡旋混匀 3min，超声 30min，以 4000r/min 离心 5min，于 40°C 水浴旋转蒸发除去有机溶剂，用碳酸盐缓冲溶液定容至 10mL。过 0.22 μ m 滤膜供高效液相色谱质谱联用仪分析。同时做平行试验和空白试验。

羊奶粉样品称取 12.5g 于烧杯中，加适量 35°C~45°C 水将其充分溶解，待冷却至室温后，加水至 100g，混匀，其余步骤同羊奶。

3.4 线性范围、线性方程

以峰面积（y）为纵坐标，标准品质量浓度（x）为横坐标，进行线性回归，建立回归方程，各组分回归方程如表 3 所示。

表 3 各组分标准曲线回归方程

化合物名称	浓度范围（ng/mL）	回归方程	相关系数
阿苯达唑	11.68~584	$Y=514.712634X-364.612266$	0.9999
芬苯达唑	10.08~504	$Y=558.114976X-485.804322$	0.9997
噻苯达唑	11.14~557	$Y=84.348048X+156.047846$	0.9997
奥芬达唑	10.25~512.5	$Y=46.468471X-36.057012$	0.9996
苯硫氨酯	11.445~572.25	$Y=772.152510X+1838.794922$	0.9998

结果表明阿苯达唑、芬苯达唑、噻苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯在 10ng/mL~500ng/mL 范围内相关系数 $R^2 > 0.999$ ，浓度与峰面积呈线性关系，线性良好，符合要求。

3.5 重复性

平行称取 6 份羊奶样品和羊奶粉样品，加入同一水平的 5 组分标准物质，按照 2.3 进行样品处理，2.1 条件进行测定，计算变异系数。结果表明变异系数均在 1.76 到 5.08 之间，实验结果符合 GB/T 27404-2008、GB/T 22972-2008 中试样测试结果的重复性要求。

3.6 精密度

将混合标准系列 4 重复测定 6 次，计算相对标准偏差，变异系数在 2.23 到 6.40 之间，实验结果符合 GB/T 27404-2008、GB/T 22972-2008 中试样测试结果的重复性要求。

3.7 定量限和检出限

称取 2 份羊奶空白样品，准确加入各组分标准溶液至检出限浓度，即 0.01mg/kg，按照 2.3 的操作，通过比较分析物样品与空白样品测量的信号，以验证标准给出的方法检出限，

可接受的信噪比在 3:1 以上,为可用检出限,按 2.3 操作,2.1 测定,信噪比值在 57.20 至 456.14 之间。经验证,羊奶中的噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯的检出限为 0.01mg/kg,满足 GB/T 22972-2008 对五种组分检出限的要求。

称取奶粉样品 12.5g,按照“2.3”处理样品方法加水溶解后,加入各组分标准溶液至检出限浓度,即 0.08mg/kg,通过比较分析物样品与空白样品测量的信号,以验证标准给出的方法检出限,可接受的信噪比在 3:1 以上,为可用检出限,按 2.3 操作,2.1 测定,信噪比值在 47.59 到 447.48 之间。经验证,羊奶及羊奶粉中的噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯的检出限为 0.08mg/kg,满足 GB/T 22972-2008 对五种组分检出限的要求。

3.8 回收率

称取羊奶空白试样 10.00g,加入低、中、高三个水平的 5 种标准物质,按照 2.3 处理样品,2.1 进行测定,计算回收率。称取奶粉样品 12.5g,按照 2.3 处理样品方法加水溶解后,加入低、中、高三个水平的 5 种标准物质,按照 2.3 操作,2.1 测定,计算回收率。回收率 (%) = (实测值 - 本底值) / 加标量 × 100%。

羊奶中三个浓度,回收率范围 61.06%~114.51%,羊奶粉中三个浓度的回收率范围 80.18%~115.72%,两者回收率结果符合 GB/T 27404-2008、GB/T 22972-2008 中对回收率的要求。

3.9 样品检测结果

按照前述的液相色谱-质谱联用方法对 2 份质控样品进行检测,结果均在范围内。制备加标羊乳样品进行分析,样品中五种组分能够完全分离,无干扰峰,且分析时间很短。说明该方法运用到实际样品的检测中可以得到较好的分离分析结果。样品分析色谱图见图 1。

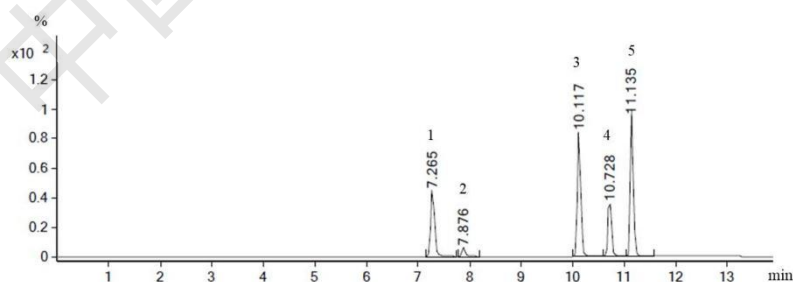


图 1 达唑类标准溶液的 TIC 色谱图

1-噻苯达唑; 2-奥芬达唑; 3-阿苯达唑; 4-芬苯达唑; 5-苯硫氨酯

4 结论

羊奶样品称样 10g 于 100mL 具塞离心管中,加入 30mL 乙腈,涡旋混匀 3min,超声 30min,以 4000r/min 离心 5min,移取上清液于 40°C 水浴旋转蒸发除去有机溶剂,用碳酸盐缓冲溶

液定容至 10mL，过 0.22 μ m 滤膜供高效液相色谱质谱联用仪分析。羊奶粉经水溶解复原后同羊奶。同时做平行试验和空白试验。经过优化选择，液相色谱条件：Agilent BEH C₁₈ 1.8 μ m，50mm*2.1mm；柱温：40 $^{\circ}$ C；流动相：A:0.1%甲酸水溶液；B:甲醇；流速：0.2mL/min；进样量：1.0 μ L；流动相洗脱梯度，质谱条件电离方式:ESI+；雾化器压力:30Psi；毛细管电压:3000V；干燥气温度:350 $^{\circ}$ C；干燥气流速:10.0L/min；多反应监测(MRM)模式,通过测定线性范围、重复性、精密度、加标回收实验以及检出限、定量限的验证，均得到了满意结果。本方法前处理简单，节约试剂耗材，用时短，优于国标方法，说明本检测方法灵敏度高、准确性好，能很好的测定乳粉中的达唑含量。

中国仪器仪表学会