

高效液相色谱-串联质谱测定奶粉中 3 种苯并咪唑类药物残留

汤娟¹, 吴斌², 景苏¹, 蒋原², 陈惠兰², 丁涛², 沈崇钰²

(1. 南京工业大学理学院, 江苏 南京 210009;

2. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 江苏 南京 210001)

摘要:建立了高效液相色谱-串联质谱测定全脂和脱脂奶粉中奥芬达唑, 阿苯达唑和芬苯达唑 3 种苯并咪唑类杀虫剂残留的方法。通过比较不同溶液的提取效率, 最终选择含 1% 乙酸的甲醇作为提取溶液, 正己烷和阳离子固相萃取两步净化, 有效去除奶粉基质中的抑制干扰物。以乙腈和含 0.5 mmol/L 醋酸铵及 0.1% 甲酸的水溶液为流动相, C₁₈ 作为分析色谱柱, 采用梯度洗脱方式进行液相色谱分离。脱脂奶粉和全脂奶粉 3 个添加水平的回收率范围为 70.0%~85.8%, 相对标准偏差均小于 7.5%, 在 2~100 μg/L 浓度范围内, 线性相关系数大于 0.997 3, 方法检测限为 10 μg/kg, 能满足现有各国残留限量要求。

关键词:高效液相色谱-串联质谱; 奥芬达唑; 阿苯达唑; 芬苯达唑; 奶粉

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-2997(2012)01-0013-05

Determination of Three Benzimidazole Residues in Milk Powder Using HPLC-MS/MS

TANG Juan¹, WU Bin², JING Su¹, JIANG Yuan²,
CHEN Hui-lan², DING Tao², SHEN Chong-yu²

(1. *Science of College, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China;*

2. Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC) of

Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of oxfendazole, albendazole and fenbendazole residues in milk powder was developed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). By comparison the extraction effect of different solutions, 1% acetic acid-methanol was finally selected as the extracting solution. Two consecutive steps of *N*-hexane and cationic solid phase extraction were used to remove the interferences in milk powder. Gradient elution programme was performed on a C₁₈ column using a mobile phase consisting of acetonitrile and 0.5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid solution. Recoveries of skim milk and whole milk powder are in the range of 70.0%—85.8%. The correlation coefficient is greater than 0.997 3 in the 2—100 μg/L.

收稿日期: 2011-04-26; 修回日期: 2011-10-12

基金项目: 科技部质检公益项目(养殖与屠宰环境中污染物检测技术研究 No. 200810099)资助

作者简介: 汤娟(1986~), 女(汉族), 江苏金坛人, 硕士研究生, 有机化学专业。E-mail: yoki9603446@163.com

通信作者: 丁涛, 高级工程师。E-mail: dingt@jsciq.gov.cn

The method detection limit is 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and it can be meet all the requirements of national residues level.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); oxfendazole; albendazole; fenbendazole; milk powder

苯并咪唑类驱虫剂是一类化学合成的抗蠕虫药物,它具有驱虫广谱、驱虫效果好、毒性低等特点,不仅对成虫,而且对幼虫也有效。目前已经商品化的苯并咪唑类驱虫药有阿苯达唑(Albendazole, AB)、奥芬达唑(Oxfendazole, OF)、芬苯达唑等(Fenbendazole, FB),其结构式示于图 1。虽然苯并咪唑类药物毒性较低,但有文献报道,阿苯达唑和奥芬达唑高剂量或长时间使用会对多种动物的胎儿有致畸作用和胚胎毒性。世界卫生组织,中国和欧盟规定了动物源性食品中苯并咪唑类驱虫药的最大残留限量。国际食品法典委员会规定其在牛奶中的残留限量为:阿苯达唑,芬苯达唑和奥芬达唑均为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$;欧盟规定的残留限量为:阿苯达唑 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,芬苯达唑 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,奥芬达唑 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$;我国农

业部规定的残留限量与国际食品法典委员会的规定相同^[1]。

目前,测定苯并咪唑类药物的方法包括高效液相色谱-紫外检测法^[2-3]、气相色谱-质谱联用法和高效液相色谱-质谱联用法^[4-5]等,由于液质联用法具有定性准确、检测限低和无须衍生化等特点,是苯并咪唑类药物的首选检测方法。针对血液基质^[6-9],生物组织样品^[10-12]和禽肉类产品^[13-14],使用有机溶剂直接提取或缓冲溶液稀释反相固相萃取净化的方法不能完全适用于奶粉基质。本研究针对奶粉基质中含有大量蛋白和脂肪干扰物的特点,利用 1%乙酸的甲醇作为提取溶液,正己烷和阳离子固相萃取两步净化,有效去除全脂奶粉中的抑制干扰物,取得了良好的效果。

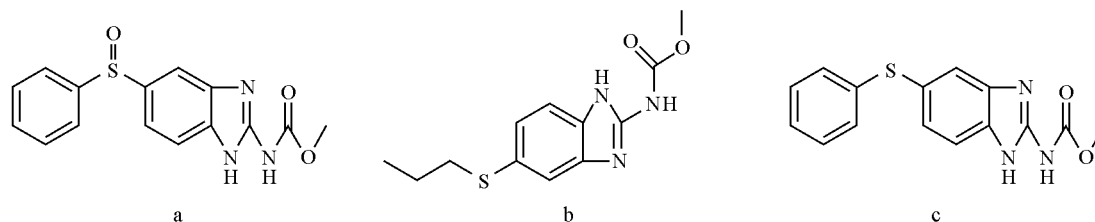


图 1 奥芬达唑(a),阿苯达唑(b)和芬苯达唑(c)化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of Oxfendazole(a), Albendazole(b) and Fenbendazole(c)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 液相色谱系统:美国 Agilent 公司产品;API 4000 Q-Trap 串联质谱仪:美国 AB Sciex 公司产品;甲酸和乙酸(分析纯):南京化学试剂有限公司产品;甲醇和乙腈(色谱纯):德国 Merck 公司产品;水为去离子水;奥芬达唑,芬苯达唑和阿芬达唑(98%)标准品:德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 产品;阳离子固相萃取柱(PCX, 60 mg/3 mL):美国 Agela 公司产品。

标准储备液:分别称取适量奥芬达唑,芬苯达唑和阿苯达唑的标准物,用含 1%甲酸的甲醇溶液作为溶剂溶解上述 3 种标准物质,并配制成 100 mg/L 单标储备液,置于-4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 色谱柱:Phenomenex Kinetex(100 mm \times 4.6 mm \times 2.7 μm);流动相:A 为含 0.5 mmol/L 醋酸铵和 0.1%甲酸的水溶液, B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~3.0 min, 10%B; 3.0~4.0 min, 10%~90%B; 4.0~9.0 min, 90%B; 9.0~9.5 min, 90%~10%B; 9.5~12 min, 10%B。流速:600 $\mu\text{L}/\text{min}$;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:5 μL ;分析时间:12 min。

1.2.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子化源(ESI);扫描模式:正离子扫描;检测方式:多反应监测;电喷雾电压:5 000 V;雾化气压力(GS1):320 kPa;气帘气压力(CUR):160 kPa;辅助气流速(GS2):310 kPa;离子源温度

(TEM); 500 °C; 3 种苯并咪唑类化合物的相关检测信息列于表 1。

表 1 3 种苯并咪唑类化合物的质谱测定参数

化合物	母离子/ (<i>m/z</i>)	子离子/ (<i>m/z</i>)	碰撞电 压/eV
奥芬达唑	316.2	284.2*	27
		299.3	29
		159.2	43
		234.0*	25
阿苯达唑	266.1	191.0	46
		159.1	52
		268.1*	30
		190.4	45
芬苯达唑	300.0	159.1	49

注: * 表示定量离子

1.3 样品前处理

1.3.1 提取 称取 1.0 g(精确到 0.01 g)样品于 50 mL 塑料具塞离心管中,加入 15 mL 含 1%乙酸的甲醇溶液,涡旋 1 min,50 °C 水浴超声 10 min,以 8 000 r/min 高速离心,通过滤纸(中速定性)过滤。重复上述提取步骤,合并提取液

于 200 mL 玻璃圆底烧瓶中,加入 30 mL 正己烷,振荡 10 min,静置待完全分层,去除上层正己烷后,静置过夜沉淀。将静置过夜后的溶液过滤,于 40 °C 水浴旋转蒸发至干,加入 20 mL 水溶解残渣(pH 约 2.5)。

1.3.2 净化 分别用 3 mL 甲醇和水先后活化 PCX 小柱,将滤液过柱,并用水和甲醇先后淋洗小柱,最后用 6 mL 含 5%氨水的甲醇溶液洗脱,洗脱液氮气吹干,用 1.0 mL *V*(乙腈):*V*(水)=2:8 的溶液定容,过 0.22 μm 膜,供高效液相色谱-串联质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理

2.1.1 提取溶液的选择 由于奥芬达唑、芬苯达唑和阿苯达唑均含有碱性疏水基团,所以它们相对易溶于极性有机溶液。由于甲醇和乙腈均有一定的蛋白沉淀效果,具有碱性基团的奥芬达唑、芬苯达唑和阿苯达唑在适当的酸性条件下有更好的溶解性。在空白脱脂奶粉和全脂奶粉中分别添加浓度为 10 μg/kg 奥芬达唑、芬苯达唑和阿苯达唑的标准溶液,比较了 4 种提取溶液,即乙腈、甲醇、含 1%乙酸的乙腈溶液和含 1%乙酸的甲醇溶液的提取回收率,结果列于表 2。

表 2 不同提取溶液的回收率(*n*=6)

Table 2 Recoveries of different extraction solutions (*n*=6)

提取溶液	平均提取率/%					
	脱脂奶粉			全脂奶粉		
	AB	FB	OF	AB	FB	OF
乙腈	30.8	14.8	83.3	8.4	1.9	85.9
甲醇	39.3	24.9	88.7	7.5	3.7	88.7
含 1%乙酸的乙腈	56.1	48.6	88.6	17.7	5.5	86.9
含 1%乙酸的甲醇	51.6	41.2	85.4	15.5	6.5	83.8

以乙腈和甲醇作为提取溶液时,阿苯达唑和芬苯达唑的回收率均很低,而使用另外两种酸性提取溶液时,提取率有所提高,说明少量酸可以提高这 3 种苯并咪唑类药物的提取效率。含 1%乙酸的乙腈溶液与含 1%乙酸的甲醇溶液的提取效率相差不大,但含 1%乙酸的乙腈提取溶液的重复性和重现性相对较差,因此最终选择含

1%乙酸的甲醇为提取溶液。阿苯达唑和芬苯达唑在全脂和脱脂奶粉中的回收率较低,尤其在全脂奶粉基质中,可能存在基质抑制效应。

2.1.2 样品基质对阿苯达唑和芬苯达唑抑制效应的确定和去除 奶粉成分较为复杂,其中包括蛋白质、脂肪、糖类、矿物质和维生素等,脱脂奶粉与全脂奶粉相比,只是脂肪含量较低,其他成

分差别不大。以空白全脂奶粉为样品,通过两步除基质干扰过程确定可能存在的基质抑制效应,即加入正己烷和阳离子交换柱(PCX)净化。向分离出的正己烷层和含 1%乙酸的甲醇提取液中分别加入一定质量的 3 种混合标准溶液,浓缩近干后定容测定。在正己烷层中阿苯达唑和芬苯达唑中被测物被抑制了约 49%和 38%;而在含 1%乙酸的甲醇提取液中,阿苯达唑和芬苯达唑的回收率约为 68%和 45%,表明存在基质抑制效应,而正己烷能够除去部分基质抑制物,且对待测物几乎没有影响。由于在 3 种苯并咪唑类药物结构中都含有伯胺基团,属弱碱性物质,PCX 固相萃取柱具有阳离子交换和反相保留混合机理,通过 PCX 柱进一步净化后,阿苯达唑和芬苯达唑的回收率可提高到 70%以上。

2.2 标准曲线的建立

配制浓度为 2~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 6 点混合标准溶液,进样 5 μL ,绘制标准曲线。奥芬达唑,阿苯达唑和芬苯达唑的线性回归方程分别为: $y = 43\ 700x - 25\ 200$, $y = 136\ 000x - 87\ 600$, $y = 14\ 100x + 344$;线性方程系数(r)分别为:0.999 9, 0.999 9 和 0.997 3。

2.3 检测限、回收率和精密度

在阴性脱脂奶粉和全脂奶粉基质中添加奥芬达唑、阿苯达唑和芬苯达唑的混合标准工作液,添加水平分别为 10、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,重复测定 6 次,计算回收率和精密度,结果列于表 3,谱图示于图 2 和图 3。在 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上,3 种苯并咪唑类化合物的信噪比(S/N)大于 10,该方法的检测限至少可达到 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 3 脱脂奶粉和全脂奶粉的加标回收率($n=6$)
Table 3 Recoveries in skim milk powder and whole milk powder($n=6$)

样品	检测物	添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测平均值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	RSD/%
脱脂奶粉	OF	10	8.58	85.8	4.7
		50	41.52	83.0	3.8
		100	81.05	81.1	2.5
	AB	10	8.37	83.7	5.2
		50	40.33	80.7	7.5
		100	85.20	85.2	2.8
	FB	10	7.08	70.8	5.2
		50	35.13	70.3	4.6
		100	72.92	72.9	5.4
全脂奶粉	OF	10	8.12	81.2	3.1
		50	42.03	84.1	3.8
		100	80.77	80.8	3.2
	AB	10	7.97	79.7	5.1
		50	40.87	81.7	5.5
		100	81.27	81.3	4.6
	FB	10	7.00	70.0	5.3
		50	35.21	70.4	2.8
		100	71.78	71.8	5.2

3 结论

本研究建立了采用高效液相色谱-串联质谱测定奶粉中 3 种驱虫剂(奥芬达唑、阿苯达唑和芬苯达唑)的检测方法。样品经含 1%乙酸的甲

醇提取,正己烷和阳离子交换柱两步净化,通过高效液相色谱-串联质谱法检测,该方法的回收率、精密度和检测限都能满足现有各国检测要求。

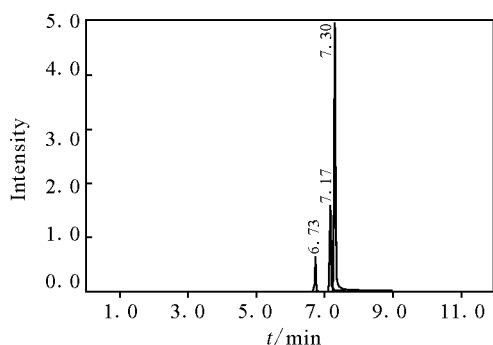


图 2 10 µg/L 标准品的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of 10 µg/L standard Oxfendazole ($t_R=6.73$ min), Albendazole ($t_R=7.17$ min), Fenbendazole($t_R=7.30$ min)

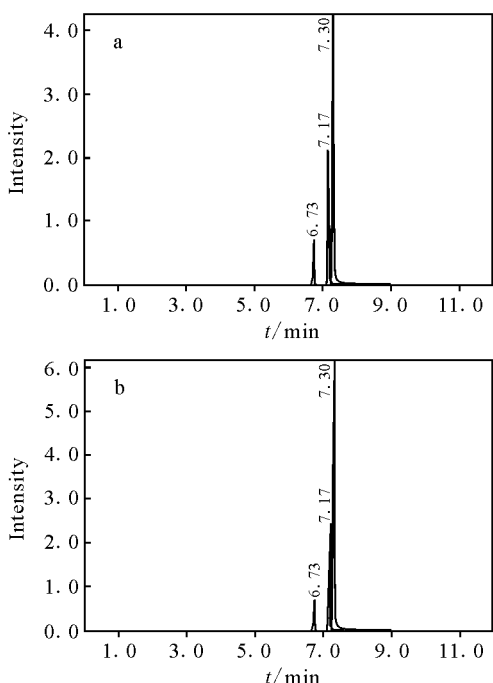


图 3 脱脂奶粉(a)和全脂奶粉(b)加标色谱图
Fig. 3 Chromatograms of spiked in skim milk powder (a) and whole milk powder(b)

参考文献:

- [1] 岳振峰. 食品中兽药残留检测指南[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010: 476-497.
- [2] CHIAP P, EVRARD B, BINAZUBUT M, et al. Determination of albendazole and its main metabolites in ovine plasma by liquid chromatography with dialysis as an integrated sample preparation technique [J]. J Chromatogr A, 2000, 870: 121-134.
- [3] GARCÍA J, BOLÁS-FERNÁNDEZ F, TORRADO J. Quantitative determination of albendazole and its main metabolites in plasma[J]. J Chromatogr B, 1999, 723: 265-271.
- [4] MOROVJÁN G, CSOKÁN P, MAKRANSZKI L, et al. Determination of fenbendazole, praziquantel and pyrantel pamoate in dog plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 1998, 97: 237-244.
- [5] LANCHOTE L, MARQUES M, TAKAYANAGUI O, et al. Simultaneous determination of albendazole sulfoxide enantiomers and albendazole sulfone in plasma[J]. J Chromatogr B, 1998, 709: 273-279.
- [6] 刘 琪, 朱馨乐, 孙 雷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测猪肝中苯并咪唑类药物及其代谢物的残留量[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(2): 1-6.
- [7] 林永辉, 李耀平, 陈祥明, 等. 固相萃取法和凝胶渗透色谱法测定鳗鱼中苯并咪唑类药物残留[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 177-181.
- [8] 张英宣. 高效液相色谱法测定牛肌肉中苯并咪唑类药物残留的研究[J]. 畜禽业, 2006, 198(5): 6-7.
- [9] GABOR. Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 1999, 727: 167-177.
- [10] 郭德华, 邓晓军, 赵善贞, 等. 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱同时检测动物源性食品中 76 种兽药残留 [J]. 分析化学, 2010, 38(3): 318-324.
- [11] JI Y H, LIU X Y, JIANG X M, et al. Oxidized multiwalled carbon nanotubes as an SPME fiber coating for rapid LC-UV analysis of benzimidazole fungicides in water[J]. Chromatographia, 2009, 70: 753-759.
- [12] 陈毓芳, 彭肖颜. 反相高效液相色谱法同时测定动物组织中苯并咪唑类兽药残留量[J]. 光谱实验室, 2001, 18(5): 674-678.
- [13] MENEZES FILHO A, DOS SANTOS F N, DE PAULA PEREIRA P A. Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes[J]. Talanta, 2010, 81: 346-354.
- [14] RAGNO G, RISOLI A, IOELE G, et al. Photo- and thermal-stability studies on benzimidazole anthelmintics by HPLC and GC-MS[J]. Chem Pharm Bull, 2006, 54(6): 802-806.