

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.9.08

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中三氯苯哒唑及其代谢物残留量的研究

李小桥, 欧阳吴莉, 武 焯, 王永红

(重庆市动物疫病预防控制中心, 重庆 401120)

[收稿日期] 2017-04-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 09-0043-06 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了牛奶中三氯苯哒唑及其代谢物三氯苯唑酮残留量的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 测定方法。样品经乙酸乙酯提取后, 正己烷除脂, 经超高效液相色谱仪和 C18 色谱柱分离, 以乙腈和 5 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱。加热电喷雾负离子模式 (HESI⁻) 电离, 选择反应监测模式 (SRM) 检测, 外标法定量。结果表明: 三氯苯哒唑和三氯苯唑酮标准溶液在 5~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈现良好的线性关系, $r^2 > 0.99$, 方法检测限为 1 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。三氯苯哒唑和三氯苯唑酮在 2~10 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平范围内的回收率为 72.3%~110%, 批内和批间变异系数均小于 13.5%。该方法具有简便快捷、灵敏度高、准确度高等优点。

[关键词] 三氯苯哒唑; 三氯苯唑酮; 牛奶; 超高效液相色谱-串联质谱

Determination of Triclabendazole and Its Metabolites Residues in Milk by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Xiao-qiao, OU YANG Wu-li, WU Xuan, WANG Yong-hong

(Chongqing Animal Disease Control Center, Chongqing 401120, China)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determining of triclabendazole (TCB) and its metabolite ketotriclabendazole (KTO-TCB) in milk. The sample was extracted by ethyl acetate and purified by hexane, and then separated by a C18 column with gradient elution solvent of 5 mmol/L ammonium acetate and acetonitrile. The electrospray was operated in the negative ionization mode, TCB and KTO-TCB were identified under selected reaction monitoring (SRM). The method was quantified by external standard method. The results showed good linearity of TCB and KTO-TCB in the range of 5~500 $\mu\text{g/L}$ with correlation coefficients (r^2) above 0.99, The limit of detection was 1 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantification was 2 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries of TCB and KTO-TCB at 2~10 $\mu\text{g/kg}$ were 72.3%~110%, and the relative standard deviations of intra- and inter-batch were both less than 13.5%. The method is simple, rapid, sensitive and accurate.

Key words: triclabendazole; ketotriclabendazole; milk; UPLC-MS/MS

三氯苯哒唑属于新型的苯并咪唑类驱虫药,对牛、羊的肝片吸虫、大片形吸虫及前后盘吸虫均有良好的杀灭效果,在我国广泛应用于反刍动物肝片吸虫病治疗^[1-3]。为有效的控制其在动物性食品中的残留,我国农业部 235 号公告^[4]规定了三氯苯哒唑残留标志物三氯苯唑酮在牛羊的肌肉、肝脏、肾脏和脂肪组织的残留限量。2014 年 6 月 20 日,欧盟发布法规(EU) No676/2014^[5]增加了三氯苯哒唑及其代谢物三氯苯唑酮在牛奶中残留限量 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,目前我国还未见到牛奶中三氯苯哒唑及其代谢物残留检测方法的报道,因此,建立一种快速准确的检测方法十分必要。目前在动物性食品中提取三氯苯哒唑及其代谢物主要使用有机溶剂,如甲醇、乙腈、乙酸乙酯等^[1-3,6,7]。已报道检测动物性食品中三氯苯哒唑及其代谢物的方法有 HPLC-UV^[1,6,8]和 UPLC-MS/MS^[3,9-11]法,HPLC-UV 法前处理较为繁琐、灵敏度低且定性不够准确,UPLC-MS/MS 灵敏度高、定性准确,适合牛奶中三氯苯哒唑及其代谢物检测。本文旨在建立一种牛奶中三氯苯哒唑及其代谢物的 UPLC-MS/MS 检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪:TSQ Quantum,美国 Thermo Scientific 公司;色谱柱:Thermo Gold C18 色谱柱(100 mm $\times$ 4.6 mm,2.1 μm),美国 Thermo Scientific 公司;电子天平:AE250,瑞士 Mettler 公司;旋转蒸发仪:Labo-rotar4000 型,德国 Heidolf 公司;高速冷冻离心机:SIGMA-3K30,德国 SIGMA 公司;涡旋振荡仪:SIR4,德国 IKA 公司;空气摇床:KS260,德国 IKA 公司;氮吹仪:TTL-DCII 型,北京同泰联科技发展有限公司;甲醇、乙腈为色谱纯,均购自 Fisher 公司;正己烷、乙酸乙酯为分析纯,均购自重庆迈克公司。

对照品:三氯苯哒唑对照品,批号 H0421108,含量 99.8%,购于中国兽医药品监察所;三氯苯唑酮对照品,批号 281527,含量 99.0%,购于德国 WITEGA 公司。

标准溶液配制:称取三氯苯哒唑和三氯苯唑酮

对照品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解定容,分别配制成 1 mg/mL 的标准储备液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存 3 个月。分别吸取三氯苯达唑和三氯苯唑酮标准储备液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存 7 d。分析时再用流动相稀释成适当浓度的混合标准工作液。

基质匹配标准工作曲线配制:将 7 份空白牛奶样品按照 1.2.3 项样品前处理得基质提取液,将浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作液用基质提取液稀释成浓度为 5、10、20、50、100、200、500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的基质匹配标准工作曲线。

1.2 仪器分析条件

1.2.1 液相色谱 色谱柱为 Thermo Hypersil Gold C18(100 mm $\times$ 2.1 mm,1.7 μm);流动相 A 相为乙腈;B 相为 5 mmol/L 乙酸铵溶液;流动相梯度洗脱程序:0~1.5 min,A 相由 55%变为 80%,1.5~4 min 为 80%,4.1~7 min 保持为 55%;流速为 0.25 mL/min;柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 10 μL 。

1.2.2 质谱条件 加热电喷雾负离子源(HESI⁻);喷雾电压-2500 V;离子传输管温度 350 $^{\circ}\text{C}$;蒸发气温度 280 $^{\circ}\text{C}$;鞘气压力:30 Arb;辅气压力:25 Arb。选择反应监测三氯苯哒唑和三氯苯唑酮定性离子对,透镜电压和碰撞能量见表 1,一级质谱图见图 1。

1.2.3 样品前处理 称取试样(5 $\pm$ 0.05)g 于 50 mL 塑料离心管中,加入乙酸乙酯 20 mL,涡旋混匀后,高速振荡 10 min,10000 r/min 离心 8 min,上清液转移至 100 mL 鸡心瓶中,重复提取一次,合并上清液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至干。向鸡心瓶中依次加入 1 mL 甲醇和 3 mL 甲醇饱和的正己烷,充分溶解,将溶解液转移至 15 mL 离心管中,重复一次,合并两次溶解液,中速振荡 5 min,5000 r/min 离心 5 min,弃掉上层溶液,下层溶液于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加入 1 mL 流动相(A:B=55:45)溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜后供 UPLC-MS/MS 分析。

表 1 三氯苯哒唑和三氯苯唑酮的定性、定量离子对、透镜电压和碰撞能量

Tab 1 Confirmation and quantification ions, Tube lens voltage and collision energy of Triclabendazole and Ketotriclabendazole

Drug	Confirmation ions(<i>m/z</i>)	Tube lens voltage/V	Collision energy/eV
Ketotriclabendazole(三氯苯唑酮)	326.6>181.8 *	-69	29
	328.7>181.9	-77	27
Triclabendazole(三氯苯哒唑)	356.7>341.8 *	-82	27
	358.6>343.7	-82	27

* quantification ions

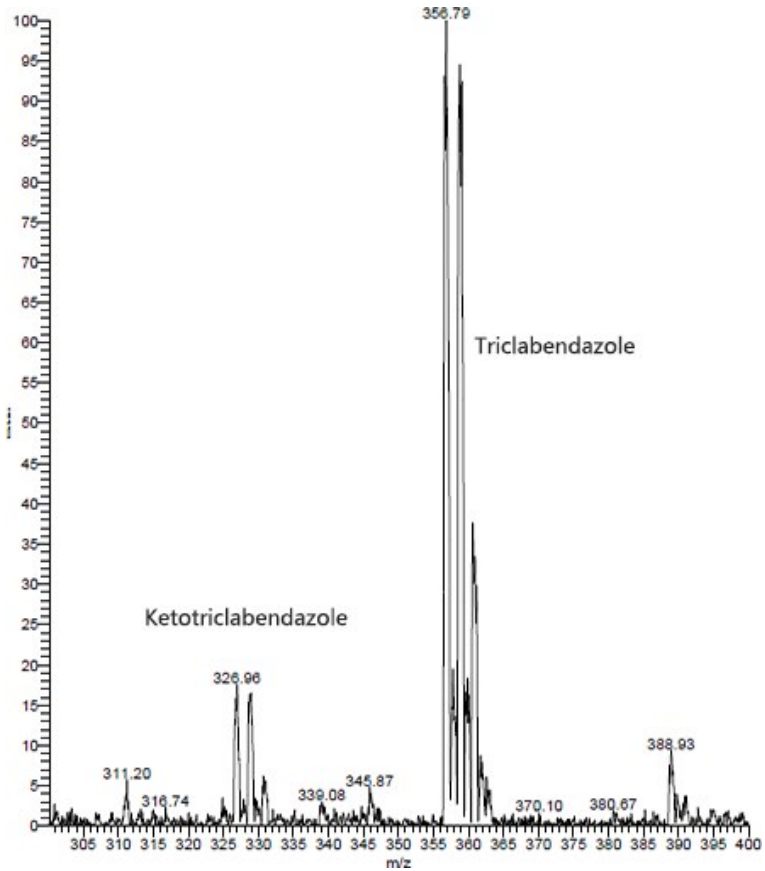


图 1 三氯苯哒唑和三氯苯唑酮在 ESI⁻ 条件下一级质谱图

Fig 1 the Q1 Mass Spectrometry of Triclabendazole and Ketotriclabendazole in negative ion mode

2 结果和分析

2.1 线性范围 将 1.1 项中配制的线性范围为 5~500 μg/L 基质匹配标准工作曲线上机测定,以定量离子质量色谱峰面积为纵坐标,对照溶液的质量浓度为横坐标来绘制标准曲线,获得外标法标准曲线 $A_{\text{三氯苯哒唑}} = 21462.5 + 8481.61C$, 相关系数 $r = 0.9971$, $A_{\text{三氯苯唑酮}} = 1264.63 + 620.622C$, 相关系数 $r = 0.9938$ 。

2.2 方法回收率与精密度 采用标准添加法,在空白牛奶中添加 2、5、10 μg/kg 浓度的三氯苯哒唑及三氯苯唑酮进行加标回收率实验,考察方法的准确性和精密度,每批次同一浓度做 5 次平行实验,重复 3 次,结果见表 2。本方法在空白牛奶中的平均回收率为 72.3%~110%, 批内、批间相对标准偏差均 ≤13.5%。

表 2 牛奶中三氯苯哒唑和三氯苯唑酮回收率试验结果 (n=5)

Tab 2 Spiked recoveries and RSD of Triclabendazole and Ketotriclabendazole in milk (n=5)				
Drug	Spiked w/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Average Recovery R/%	Intra-RSD Sr/%	Inter-RSD Sr/%
Triclabendazole (三氯苯哒唑)	2	110.0,105.3,99.5	13.5	9.7,10.3,11.8
	5	72.3,78.5,88.2	10.2	7.6,8.4,5.1
	10	77.9,82.5,85.6	9.4	8.4,4.3,7.5
Ketotriclabendazole (三氯苯唑酮)	2	105.6,98.2,102.3	11.3	8.8,9.9,11.2
	5	86.5,89.1,87.3	8.5	6.2,8.5,7.0
	10	97.6,89.5,90.6	9.2	7.5,5.2,4.5

2.3 检测限与定量限 采用空白组织中添加目标化合物的方法,以特征离子质量色谱峰信噪比S/N>3为方法检测限,S/N>10 为方法定量限。牛奶中三氯苯哒唑和三氯苯唑酮检测限均为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,空白牛奶及其添加检测限浓度色谱图见图2。

3 讨论与小结

3.1 前处理方法优化 三氯苯哒唑属于弱碱性药物,溶于甲醇、乙醇、乙腈和乙酸乙酯等有机溶剂。本实验选择乙腈和乙酸乙酯作为提取溶剂,二者回收率相当,虽然乙腈提取牛奶时油脂较少,但由于牛奶中水分较多,需要在牛奶中加氯化钠等进行盐析分层,否则乙腈提取液在旋转蒸发过程中很难蒸发至干,步骤较为繁琐,因此选择乙酸乙酯作为提取液。三氯苯哒唑及其代谢物常用净化方法有液液萃取和液固萃取法,李丹^[6]等发现三氯苯哒唑和三氯苯唑酮极性差异较大,在C18、HLB、MCX、氰基柱(CN-E)和硅胶柱等固相萃取柱上保留效果均不理想。仲锋^[1]等在羊肌肉、肝脏、肾脏中使用乙酸乙酯作为提取溶剂,脂肪组织使用乙腈进行提取。净化方法目前有液液萃取和液-固萃取,李丹^[6]等发现三氯苯哒唑和三氯苯唑酮极性差异较大,常用固相萃取柱对二者回收率不能兼顾。因此,本研究采用液液萃取法,利用甲醇饱和的正己烷进行净化除脂,简便快捷,回收率和净化效果均比较理想。

3.2 基质效应考察 称取5份空白样品按1.2.3

项方法处理后,加入10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准溶液制成基质匹配标准溶液,再与对应浓度标准溶液上机进行测定。比较发现两种药物均为基质减弱效应,其中,三氯苯唑酮峰面积降低约50%,三氯苯哒唑降低约20%,这是本方法选择基质匹配标准溶液作为校准结果的目的。

3.3 液相色谱条件优化 在HESI⁻条件下,一般选择乙酸铵溶液或纯水作为流动相,本方法在乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液条件下,两种化合物灵敏度和峰形最好。由于三氯苯哒唑和三氯苯唑酮极性差异较大,本实验考察了两种化合物在C18 色谱柱上保留情况,经研究发现,三氯苯哒唑极性较小,当有机相高达80%时才能较快地将三氯苯哒唑洗脱。

3.4 质谱条件的优化 Cai^[3]等报道在ESI⁺条件下,三氯苯哒唑及其代谢物三氯苯唑砒、三氯苯唑亚砒和三氯苯唑酮均能获得较高响应值。本实验分别注射1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三氯苯哒唑和三氯苯唑酮标准工作液,在加热电喷雾正离子HESI⁺条件下,三氯苯哒唑响应值可达E⁶,但是,三氯苯唑酮响应值较差,两者相差近1000倍,这与Cai等研究结果差异较大。但在加热电喷雾负离子源HESI⁻条件下,三氯苯哒唑和三氯苯唑酮均能获得较高响应值,与Jedzi niak P^[12]等报道结果一致。分析原因可能是三氯苯唑酮分子中含有三个氯离子,在负离子模式下响应值增强。

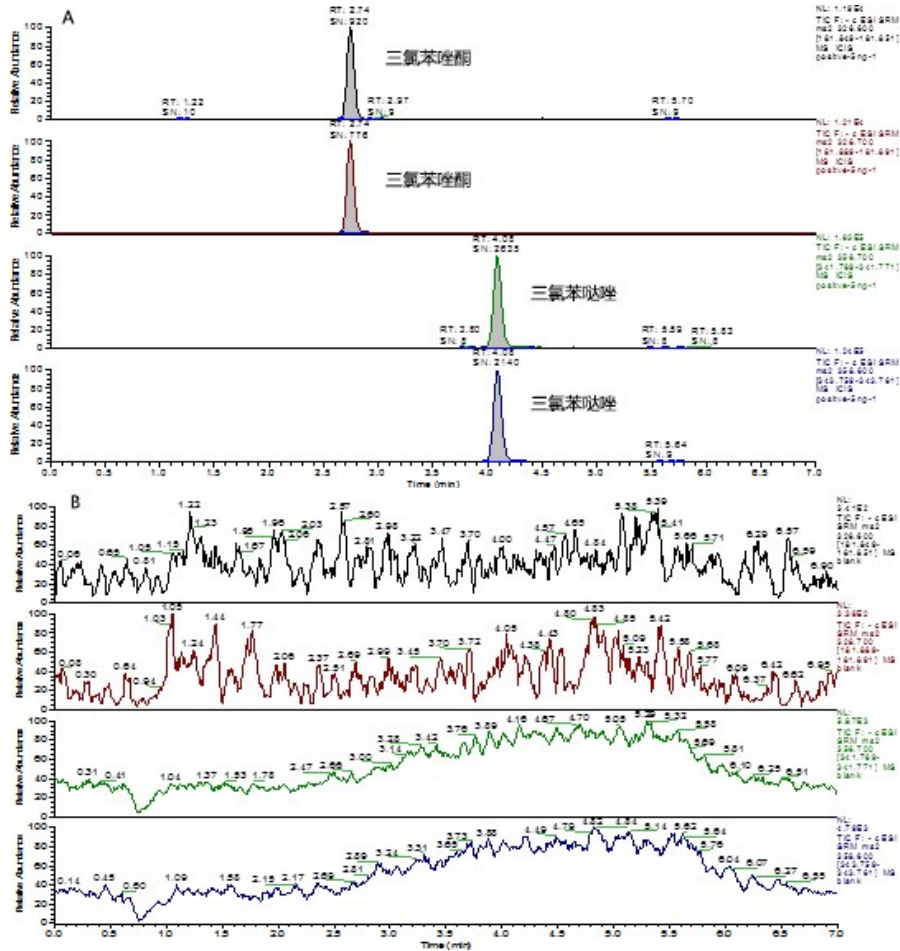


图 2 空白牛奶中添加 1 μ g/kg 浓度水平 (A) 和空白牛奶 (B) 中三氯苯哒唑和三氯苯唑酮色谱图

Fig 2 Chromatographic trace of Triclabendazole and Ketotriclabendazole in negative milk spiked at 1 μ g/kg (A) and negative milk (B)

三氯苯哒唑和三氯苯唑酮分子式中均含有三个氯离子,而氯元素在自然界有两种天然同位素³⁵Cl(75.77%)和³⁷Cl(24.23%)^[13],从三氯苯哒唑和三氯苯唑酮的一级质谱图可以看出,两种化合物母离子有几处相对丰度较高,因此本实验选择三氯苯哒唑 356.7 和 358.6 为母离子,通过二级质谱打碎后得 356.7>341.8 和 358.6>343.7,鉴定积分为 5,完全满足欧盟 2002/657/EC^[14]技术文件对兽药残留确证提出的鉴定积分要求。同理,三氯苯唑酮采用相同方法。

本文建立了牛奶中三氯苯哒唑及其代谢物的超高效液相色谱-串联质谱检测法。样品经乙酸乙酯提取,正己烷除脂,在 HESI⁻下选择反应监测模

式检测样品。三氯苯哒唑和三氯苯唑酮在 2、5、10 μ g/kg加标水平下平均回收率在 72.3%~110%之间,相对标准偏差 $\leq$ 13.5%,方法检测限为 1 μ g/kg,表明该方法灵敏度高,稳定可行,前处理过程简便快捷,满足我国有关食品检测法规要求。

参考文献:

[1] 仲 锋,李 丹,汪 霞,等.羊组织中三氯苯哒唑及其代谢物残留的 HPLC 检测方法[J].中国兽药杂志,2010,44(5):1-3.
Zhong F, Li D, Wang X, Zhang Y J, *et al.* Study on Detection Method for Triclabendazole and Metabolite Residues in Sheep Tissues by HPLC[J].Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010, 44(5):1-3.
[2] 张璐珊,刘云飞,张新忠,等.苯并咪唑类兽药残留分析研究进

- 展[J].中国畜牧兽医,2009,36(3):84-88.
- Zhang LS,Liu Y F,Zhang X Z,*et al.*Progress on Residue Analysis of Benzimidazole Veterinary Drugs [J]. China Animal Husbandry&Veterinary Medicine,2009,36(3):84-88.
- [3] Cai C,Zhang L,Xue F,*et al.* Simultaneous determination of triclabendazole and its metabolites in bovine and goat tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J].J.Chromatogr B Anal Tech Biomed Life Sci,2010,878(30):3106-3112.
- [4] 中华人民共和国农业部公告第 235 号[2008-06-29]. http://yz.hz-agri.gov.cn/uploadFiles/2005-10/1130221_564406.doc. Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [2008-06-29].
- [5] COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) No 676/2014.<http://www.foodmate.net/law/europa/183246.html>.
- [6] 李丹,李莉,张玉洁,等. 高效液相色谱法测定牛组织中三氯苯唑及其代谢物残留量的研究[J].中国兽药杂志,2015,49(6):53-57.
- Li D, Li L, Zhang Y J, *et al.* Study on Detection Method of Triclabendazole and Metabolite Residues in Cattle Tissues by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug. 2015, 49 (6): 53-57.
- [7] 范盛先,黄玲利,袁宗辉,等.猪牛羊可食性组织中阿苯达唑残留检测方法研究[J].中国农业科学,2004,37(8):1229-1234.
- Fan S X,Huang L L,Yuan Z H,*et al.* Determination of Albendazole Residues in Edible Tissues of Swine, Bovine and Goat [J].Scientia Agricultura Sinica,2004,37(8):1229-1234.
- [8] Takeba K,Fujinuma K,Sakamoto M,*et al.* Simultaneous determination of triclabendazole and its sulphoxide and sulphone metabolites in bovine milk by high-performance liquid chromatography [J].J Chromatogr A,2000,882(1/2):99-107.
- [9] Lourdes Mottier,Laura Moreno,Luis Alvarez,*et al.* Measurement of triclabendazole and its metabolites in liver flukes: method development and full validation[J].Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2004,(35):991-999.
- [10] Michelle Whelan,John Omahony,Mary Moloney,*et al.* Maximum residue level validation of triclabendazole marker residues in bovine liver,muscle and milk matrices by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry[J].Journal of Chromatography A,2013,(1275):41-47.
- [11] Kinsella B,Lehotay S J,Mastovska K,*et al.* New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J].Anal.Chim Acta,2009,637(1/2):196-207.
- [12] Jedziniak P,Szprengier-Juszkiewicz T,Olejniak M. Determination of benzimidazoles and levamisole residues in milk by liquid chromatography-mass spectrometry: screening method development and validation[J]. J Chromatogr A,2009,1216(46):8165-8172.
- [13] Sun H,Wang E,Ai L.Validated method for determination of ultra-trace closantel residues in bovine tissues and milk by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J].J. Chrom A,2007,1175(2):227-233.
- [14] Guidelines for the implementation of Decision 2002/657EC.SANCO/2004/2726-tev4-12.2008[Z].

(编辑:侯向辉)