

动物组织中苯并咪唑类药物检测的 LC-MS/MS 法研究

郭 强, 常孝勇

(广东温氏食品集团有限公司 安徽分公司, 安徽 合肥 231200)

摘要: 建立了可食性动物组织中阿苯达唑、阿苯达唑-2-氨基砷、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、噻苯咪唑、5-羟基噻苯咪唑、奥芬达唑砷等 7 种苯并咪唑类药物及其代谢物的多残留检测的高效液相色谱-串联质谱法。分析过程中以保留时间和 2 个 MRM 离子对(母离子和 2 个子离子)进行定性, 以峰形好和响应值高的离子进行定量。结果表明, 该方法检测苯并咪唑类药物残留的检测限为 2 ng/mL, 定量限为 10 ng/mL。建立的方法灵敏、可靠, 7 种苯并咪唑类药物在 2.0~500 ng/mL 范围内具有良好的线性, 准确度和精密度都能满足残留检测的要求, 可作为动源性食品中苯并咪唑类药物残留的定量检测和确证方法。

关键词: 兽药; 苯并咪唑类药物; 高效液相色谱-二级质谱联用; 多残留检测; 动物组织

中图分类号: S859 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)02-0152-05

Method for the Determination of Benzimidazoles Residues in Edible Tissues by HPLC-MS/MS

GUO Qiang, CHANG Xiao-yong

(Anhui Branch of Guangdong Wens Foodstuff Group, Hefei 231200, China)

Abstract: A liquid chromatographic/tandem mass spectrometric (LC/MS/MS) multiresidue method for the simultaneous determination of 7 benzimidazoles and metabolites residues in muscle and liver was established in this paper. Benzimidazoles and metabolites were extracted from tissues by ethyl acetate, purified by hexane and waters MCX cartridge. The LC separation was performed on a reversed-phase C18 column using gradient elution. The benzimidazoles and metabolites analytes were detected with a quadrupole mass spectrometer using positive ion electrospray ionisation. MS data acquisition was generally performed in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with the mobile phase of water-acetonitrile-formic acid. The limit of detection (LOD) of the method was 2 ng/mL and the limit of quantification (LOQ) was 10 ng/mL.

Key words: veterinary drug; benzimidazoles; HPLC-MS/MS; detection of multi-residue; animal tissues

阿苯达唑是一种广谱、高效、低毒抗蠕虫药, 在消化道内被吸收, 对动物体内各种寄生线虫、绦虫具有很强的驱杀作用, 目前在兽医临床上应用广泛。但是阿苯达唑及其代谢物在试验动物安全评价试验中表现出致畸和肝脏毒性, 因此, 目前使用的阿苯达唑药物是动物性食品兽药残留监控的重要对象, 各

国均规定了其在动物性食品中的最高残留限量, 动物组织中阿苯达唑药物的最高残留限量一般为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

国外报道的苯并咪唑类药物残留分析方法很多, 主要有高效液相色谱法^[1-2]、液-质联用法^[3-4]和免疫测定法, 国内文献报道较少^[5-7]。本试验在国内外相

收稿日期: 2011-09-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(20090470)

作者简介: 郭 强(1981-), 男, 河南桐柏人, 硕士, 主要从事动物药理学与毒理学研究。E-mail: guoqiangs600@163.com

关文献的基础上,用超高效液相色谱质谱法同时测定动物肌肉组织中 7 种苯并咪唑类药物残留量,并采用多反应监测模式进行定性和定量分析,建立了阿苯达唑、阿苯达唑-2-氨基砜、阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜、噻苯咪唑、5-羟基噻苯咪唑、奥芬达唑砜等 7 种苯并咪唑类药物及其代谢物的多残留检测的高效液相色谱-串联质谱法。本研究建立的方法灵敏、可靠,前处理过程简单易操作,检测限低,准确度和精密度都能满足残留检测的要求,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪:美国 Waters 公司,配备四元泵、脱气泵、自动进样器、柱温箱等;电喷雾-串联四极杆质谱仪:Waters UPLC-MS/MS,配置分析软件;Waters HLB 固相萃取柱(SPE),规格为每 3 毫升 60 mg。

对照品为阿苯达唑: CAS 号 54965218,纯度 98% 以上;阿苯达唑亚砜: CAS 号 10065400,纯度 98% 以上;阿苯达唑-2-氨基砜: CAS 号 80983-34-2,纯度 98% 以上;阿苯达唑砜: CAS 号 75184-71-3,纯度 98% 以上;奥芬达唑砜: CAS 号 54029-20-8,纯度 98% 以上;噻苯咪唑: CAS 号 17450000,纯度 98% 以上;5-羟基噻苯咪唑: CAS 号 17450500,纯度 98% 以上。甲醇、乙腈均为色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司生产;乙酸乙酯等其他试剂均为分析纯。

表 2 7 种苯并咪唑类药物的选择反应监测的优化参数

药物名称	相对保留时间/min	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能/V
5-羟基噻苯咪唑	1.21	218/191	218/191	35	25
		218/147			35
噻苯咪唑	1.57	202/175	202/175	40	25
		202/131			30
阿苯达唑-2-氨基砜	1.60	240/198	249/133	35	20
		240/133			30
阿苯达唑亚砜	2.13	282/240	282/240	25	15
		282/208			25
阿苯达唑砜	3.08	298/266	298/159	35	20
		298/159			40
奥芬达唑砜	4.08	332/300	332/300	35	22
		332/159			30
阿苯达唑	4.35	266/234	266/234	30	20
		266/159			30

1.5 标准曲线的绘制

取 7 种苯并咪唑类药物的混合标准储备液,用甲醇在离心管中依次稀释成 5、10、50、100、200、500、1000 ng/mL 的系列质量浓度,按照 1.3 所述的条件下测定,将测得的各种苯并咪唑类药物峰面积的平均值(Y)与所对应的药物质量浓度(X)做线性回归,求得标准曲线回归方程和相关系数(r)。每个药物质量浓度做 3 个重复,共做 3 个批次。

1.2 供试动物组织

供试动物组织为鸡、猪、牛等动物的肌肉组织。

1.3 对照品贮备液的配制

准确称取阿苯达唑、阿苯达唑-2-氨基砜、阿苯达唑亚砜等适量(约 0.005 0 g),分别溶于 100 mL 甲醇中,配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的贮备液,各取 20 mL 放入同一个 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,配制成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合贮备液。

1.4 仪器条件

液相色谱条件为色谱柱:C18 柱,100 mm \times 2.1 mm(内径),粒径 1.7 μm ;流动相:乙腈+0.1%甲酸,梯度洗脱程序见表 1;流速:0.3 mL/min;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL 。

表 1 流动相的梯度洗脱条件和流速

时间/min	流速/(mL/min)	乙腈(A相)	0.1%甲酸(B相)
0	0.30	15	85
2.1	0.30	30	70
5	0.30	50	50
6	0.30	15	85

质谱条件为电喷雾电离正离子模式(ESI+);质谱扫描方式:多反应监测(MRM);毛细管电压:3.2 kV;锥孔电压:25V;源温:110 $^{\circ}\text{C}$;雾化气:400 $^{\circ}\text{C}$;倍增电压:650 V;碰撞气:氩气;7 种苯并咪唑类药物和代谢物的定性离子对、定量离子对及相关的质谱参数见表 2。

1.6 样品提取

称取 5.00 g 动物组织匀浆样品,置于 100 mL 聚丙烯离心管中,依次加入 4 mL 2 mol/L 的碳酸钠溶液和 20 mL 乙酸乙酯,涡动混合 1 min,振荡 10 min,4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移入 50 mL 鸡心瓶中;再向离心管中加入 20 mL 乙酸乙酯,涡动混合,振荡 10 min,4 000 r/min 离心,重复提取 1 次,合并 2 次提取的上清液,40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下减压浓缩

近干。立即向鸡心瓶加入 3 mL 酸性乙醇(乙醇:0.2 mol/L 盐酸=2:1, V/V)溶解残渣, 涡动 30 s, 超声 2 min, 转移入 15 mL 离心管中, 再向鸡心瓶加入 5 mL 正己烷, 涡动 30 s, 转移入 15 mL 离心管中, 涡动 1 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃去上层正己烷, 再向 15 mL 离心管加入 5 mL 正己烷, 涡动, 4 000 r/min 离心, 弃去上层正己烷, 下层作为样品提取液备下一步净化。

1.7 样品净化

将 Waters MCX 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化, 加入样品提取液, 以 1 mL/min 的速度流过后, 依次加入 3 mL 的水和 1 mL 的甲醇淋洗, 吹干柱内滞留的液体。用 6 mL 5% 氯化甲醇洗脱药物至 10 mL 试管中, 50 °C 氮气吹干。

1.8 灵敏度的测定

用甲醇将 7 种苯并咪唑类药物的混合标准储备液分别稀释成 2.5、5、10、25、50 ng/mL 的质量浓度。准确称取 5 g 组织样品, 分别添加 0.1 mL 刚稀释的不同质量浓度的苯并咪唑类药物混合标准工作液, 制得 0.5、1、2、5、10 ng/mL 添加水平, 每个质量浓度做 3 个重复。按照上述方法处理样品, 按上述条件进行检测, 以最低检出质量浓度计算, 3 倍信噪比定为检测限, 10 倍信噪比定为定量限。

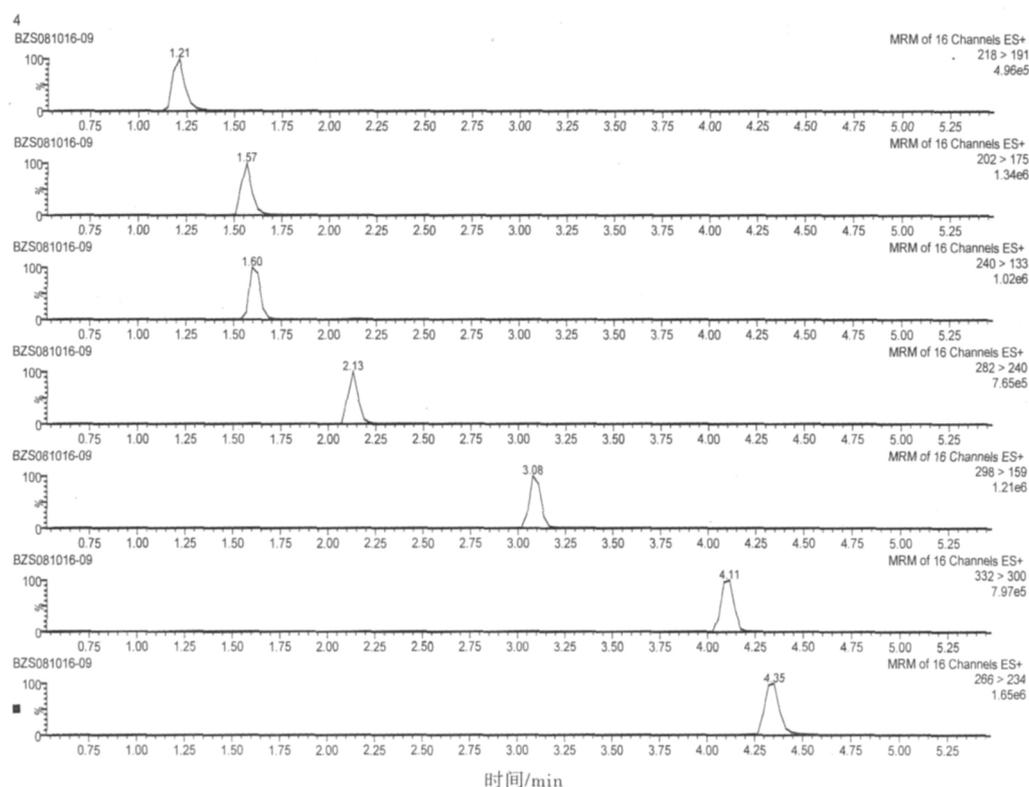
1.9 回收率的测定

准确称取 5 g 组织样品, 分别加入质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、250 $\mu\text{g/mL}$ 的苯并咪唑类药物混合标准工作液 0.1 mL, 制得 10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 添加水平, 涡旋混匀, 静置 30 min 以上, 按照 1.5—1.6 处理样品, 按 1.3 条件进行检测, 每个质量浓度做 5 个重复, 共做 3 批。将所测得的药物峰面积分别按回收率计算公式和变异系数计算公式计算, 得出回收率和变异系数。

2 结果与分析

2.1 7 种苯并咪唑类药物的质量色谱图

取 7 种苯并咪唑类药物的标准工作储备液, 分别用甲醇稀释至 10 ng/mL, 按照 1.4 条件将单个标准溶液注入质谱仪全扫描, 获得的准分子离子峰均为 $[M+H]^+$ 峰。再将准分子离子打碎进行二级全扫描, 得到碎片离子。按照 1.6—1.7 方法进行前处理, 得到 7 种药物对照品溶液的 HPLC-ESI-MS/MS 色谱图(图 1)。5-羟基噻苯咪唑、噻苯咪唑、阿苯达唑-2-氨基砷、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、奥芬达唑砷和阿苯达唑, 保留时间依次为 1.21、1.57、1.60、2.13、3.08、4.11、4.35 min, 各种药物之间基本上都能达到基线分离。不同批次间保留时间会有细微的差异, 但总体比较稳定。



由上至下分别为 5-羟基苯并咪唑、噻苯咪唑、阿苯达唑-2-氨基砷、阿苯达唑亚砷、阿苯达唑砷、奥芬达唑砷、阿苯达唑

图 1 10 ng/mL 的 7 种苯并咪唑类药物混合标准溶液的质量色谱

2.2 7 种苯并咪唑类药物标准曲线

7 种苯并咪唑类药物的标准曲线与线性范围见表 3。由表 3 可见,7 种苯并咪唑类药物在 5~500 ng/mL 范围内线性良好,各种药物的相关系数均在 0.99 以上,满足残留检测的要求。

2.3 添加回收率与精密度

由表 4 可见,7 种苯并咪唑类药物的回收率、批内变异系数和批间变异系数,5-羟基噻苯咪唑为 79.76%~98.00%、2.59%~8.55%、2.74%~5.92%,噻苯咪唑为 82.52%~94.57%、3.48%~

8.39%、3.75%~6.92%,阿苯达唑-2-氨基砜为 78.96%~98.34%、1.89%~6.11%、1.23%~3.57%,阿苯达唑亚砜为 78.80%~94.52%、3.81%~8.65%、2.36%~5.81%,阿苯达唑砜为 85.18%~97.94%、2.97%~10.92%、1.15%~6.90%,奥芬达唑砜为 81.83%~92.22%、3.13%~8.88%、2.73%~4.97%,阿苯达唑为 69.58%~85.96%、1.73%~7.56%、2.21%~5.54%。7 种苯并咪唑类药物在动物肌肉中的回收率高和变异系数小,说明本试验建立的方法比较稳定。

表 3 7 种苯并咪唑类药物的标准曲线与线性范围

药物	特征碎片离子对	线性范围/(ng/mL)	批次	标准曲线方程	相关系数(r)
5-羟基噻苯咪唑	218/191	5~500	1	$Y=890.536X+2130.56$	0.9903
			2	$Y=770.677X-344.496$	0.9967
			3	$Y=687.463X+1146.45$	0.9964
噻苯咪唑	202/175	5~500	1	$Y=1694.18X+107.868$	0.9986
			2	$Y=1716.6X-3129.07$	0.9975
			3	$Y=1751.03X+2297.2$	0.9969
阿苯达唑-2-氨基砜	240/133	5~500	1	$Y=1032.26X-252.182$	0.9989
			2	$Y=881.271X+706.072$	0.9973
			3	$Y=946.044X-446.252$	0.9995
阿苯达唑亚砜	284/240	5~500	1	$Y=970.609X+1142.38$	0.9963
			2	$Y=748.661X-978.298$	0.9989
			3	$Y=780.35X-211.452$	0.9991
阿苯达唑砜	298/159	5~500	1	$Y=1627.6X-803.985$	0.9987
			2	$Y=1377.94X-1912.42$	0.9988
			3	$Y=1322.71X-588.646$	0.9989
奥芬达唑砜	332/300	5~500	1	$Y=1713.79X-1053.5$	0.9987
			2	$Y=1295.81X-3438.31$	0.9963
			3	$Y=1226.35X-160.236$	0.9987
阿苯达唑	266/234	5~500	1	$Y=3197.42X-7559.83$	0.9901
			2	$Y=3063.19X-6336.29$	0.9973
			3	$Y=2941.58X+1637.95$	0.9991

表 4 7 种苯并咪唑类药物在动物肌肉中的回收率和变异系数

药物名称	添加量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%			批内变异系数/%			批间变异 系数/%
		重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	
5-羟基噻苯咪唑	10	86.04±4.89	79.76±6.01	87.35±4.88	6.36	7.82	5.35	4.81
	20	97.82±2.50	86.93±5.02	91.64±4.34	3.26	6.53	5.65	5.92
	50	98.00±1.99	92.90±6.57	94.48±3.18	2.59	8.55	4.14	2.74
噻苯咪唑	10	87.08±3.66	80.20±6.45	86.51±4.13	4.77	8.39	5.38	4.51
	20	86.92±2.75	94.57±3.34	82.52±2.67	3.58	4.35	3.48	6.92
	50	90.81±3.66	84.62±4.26	85.91±2.89	4.77	5.54	3.76	3.75
阿苯达唑-2-氨基砜	10	81.84±1.82	81.35±4.69	78.96±3.23	2.37	6.11	4.21	1.91
	20	98.34±1.45	95.92±1.23	93.41±1.83	1.89	1.60	2.38	3.57
	50	90.66±3.72	89.33±4.64	91.54±3.33	4.84	6.04	4.33	1.23
阿苯达唑亚砜	10	85.73±3.75	78.80±2.93	85.06±3.31	4.88	3.81	4.31	4.59
	20	90.69±3.98	81.24±6.65	83.14±3.91	5.18	8.65	5.09	5.87
	50	93.08±4.03	90.23±1.19	94.52±3.77	5.24	1.55	4.91	2.36
阿苯达唑砜	10	85.18±2.09	85.71±6.12	88.21±3.13	2.72	7.96	4.07	1.87
	20	97.94±3.50	85.78±8.39	89.16±3.77	4.56	10.92	4.91	6.90
	50	93.81±4.61	92.61±2.28	94.57±4.00	6.00	2.97	5.21	1.15
奥芬达唑砜	10	81.83±2.40	86.29±4.21	86.14±2.79	3.13	5.48	3.63	3.76
	20	89.42±3.59	90.35±6.82	82.40±3.40	4.67	8.88	4.42	4.97
	50	92.22±3.99	87.51±4.02	91.15±4.09	5.19	5.23	5.33	2.73
阿苯达唑	10	69.58±3.63	77.39±5.81	74.99±4.06	4.73	7.56	5.29	5.40
	20	85.96±1.33	77.34±5.79	79.49±1.34	1.73	6.54	2.75	5.54
	50	83.08±3.39	81.55±2.78	83.44±4.02	4.41	3.62	5.23	2.21

2.4 灵敏度测定结果

按照上述方法处理样品,得出苯并咪唑类药物残留的检测限为 2 ng/mL;定量限为 10 ng/mL,说明本试验建立的检测方法灵敏度较高。

3 讨论

3.1 质谱分析条件的确定

将浓度为 1 的单个苯并咪唑类药物标准溶液用针泵连续注射的方式直接注入质谱仪。对每个离子对的质谱条件参数,包括去簇电压、碰撞能等进行优化,获得多反应监测(MRM)质谱检测条件^[8-10]。然后将液相系统连接好,不接柱子,自动进样器和液相泵直接与电喷雾离子源相连,在液相流动注射模式下,对响应值比较弱的离子对进行离子源参数优化,包括雾化气压力、辅助气流速、喷雾电压、离子源温度和碰撞室压力等,从而确定最佳条件。

苯并咪唑类药物都有苯并咪唑母核,呈弱碱性,选用 C18 键合硅胶色谱柱,能对该类药物进行良好的分离^[4]。本研究采用 C18 柱,规格为 100 mm×2.1 mm(内径),粒径 1.7 μm,由于填料粒径小,分离效果非常好,它内径窄,使流速大大降低,减少电喷雾离子源的喷雾压力,又可节省流动相。

3.2 样品前处理条件的选择

苯并咪唑类药物多残留分析的高效液相色谱法前处理过程比较复杂,有的还需要 100 °C 水浴加热处理,所需时间比较长,操作过程繁琐。本试验从样品的提取、净化、测定的各个环节入手,力求建立一种前处理步骤简便、操作快捷、结果比较稳定可靠的方法来同时检测苯并咪唑类药物。

本试验选择乙酸乙酯作为提取溶剂,取 5 g 组织样品,先用 10 mL 乙酸乙酯萃取组织样品,再用 10 mL 乙酸乙酯重复萃取,能够把组织中的药物有效提取出来。

另外,本试验对比了 Waters 公司的 Oasis HLB 柱和 Oasis MCX 柱 2 种固相萃取小柱的净化效果,2 种小柱的操作都比较简单,对柱子是否干涸没有严格的要求,即使在干涸的情况下,对各种化合物都具有良好的保留能力,保证了回收率的稳定性,使用 MCX 小柱的回收率明显比 HLB 小柱的高,因此,本试验选择 MCX 柱进行固相萃取。

比较甲醇、乙腈和氨化甲醇的洗脱效果,在甲醇中添加氨水可以使溶液呈碱性,对于碱性药物,使用碱性洗脱液能使药物在洗脱时呈游离态,防止盐的形成,洗脱效果更好^[11-15]。经比较,5%的氨化甲醇洗脱效果较好,故本试验选择 5%的氨化甲醇为固相萃取的洗脱液。

本研究建立了动物肌肉组织中 7 种苯并咪唑类驱虫药(BMZs)残留的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定方法。利用该仪器多反应监测模式进行定性和定量分析等特点,7 种苯并咪唑类药物在 2.0~500 ng/mL 范围内具有良好的线性,建立的方法灵敏、可靠,前处理过程简单易操作,检测限低,准确度和精密性都满足残留检测的要求,可作为动源性食品中苯并咪唑类药物残留的定量检测和确证方法,符合国内外对苯并咪唑类药物残留的最大允许限量要求。

参考文献:

- [1] Su S C, Chang C L, Chang P H, *et al.* Simultaneous determination of albendazole, thiabendazole, mebendazole and their metabolites in livestock by high performance liquid chromatography[J]. *Food Drug Anal*, 2003(4):307-319.
- [2] Brandon D L, Holland K P, Dreas J S, *et al.* Rapid screening for benzimidazole residues in bovine liver[J]. *J Agri Food Chem*, 1998, 46(9):3653-3656.
- [3] Arenas R V, Rahman H R, Johnson N A. Determination of thiabendazole residues in white and sweet potatoes by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *J AOAC Int*, 1995, 78(6):1455-1458.
- [4] Morovjan G, Csokan P, Makranszki L, *et al.* Determination of fenbendazole, praziquantel and pamoate in dog plasma by high-performance liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 1998, 797:237-244.
- [5] 陈莹, 吴文凡. 超高效液相色谱-质谱联用法快速检测苯并咪唑类药物在组织中的多组分残留[J]. *生命科学*, 2007, 5(4):26-28.
- [6] 张素霞, 沈建忠, 丁双阳, 等. 牛肝中苯并咪唑类药物残留的高效液相色谱检测方法[J]. *中国兽医杂志*, 2005, 39(6):18-21.
- [7] 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.
- [8] 贺利民, 刘祥国, 曾振灵. 气相色谱分析农药残留的基质效应及其解决方法[J]. *色谱*, 2008, 26(1):98-104.
- [9] 徐维海, 张干, 邹世春, 等. 固相萃取-液相色谱/串联质谱法分析水体中痕量抗生素[J]. *环境化学*, 2006, 25(2):232-233.
- [10] 杨芳, 李耀平, 李小晶. 高效液相色谱法动物性食品中甲苯咪唑残留[J]. *中国卫生检验杂志*, 2004, 14(5):545-546.
- [11] 刘玉芳, 朱万燕, 吴淑秀, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定盐渍羊肠衣中硝基咪唑类残留量[J]. *现代农业科技*, 2010(19):14-15.
- [12] 张攀, 刘梅, 付建, 等. 高效液相色谱法检测肉制品中 L-抗坏血酸与 D-异抗坏血酸[J]. *现代农业科技*, 2010(17):353, 355.
- [13] 丁磊, 蒋俊树, 顾亮, 等. 高效液相色谱串联质谱法快速测定水产品中硝基咪唑类代谢物研究[J]. *现代农业科技*, 2010(11):366-367.
- [14] 张武, 张强, 曹宗兴, 等. 50% 异菌脲可湿性粉剂的高效液相色谱定量分析[J]. *天津农业科学*, 2010, 16(5):91-93.
- [15] 连翠飞, 蒋继志, 李社增, 等. 利用高效液相色谱筛选植物激素细菌[J]. *华北农学报*, 2006, 21(2):66-69.