

动物肌肉、内脏和牛奶中咪唑脲苯残留量的高效液相色谱测定及液相色谱-串联质谱确证

李晓娟^{1*}, 李 玮², 陈冬东¹, 艾连峰², 郭春海², 陈瑞春², 王凤池²

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123; 2. 河北出入境检验检疫局, 石家庄 050051)

摘要: **目的** 建立固相萃取净化-高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定动物组织和牛奶中咪唑脲苯残留量的分析方法。**方法** 残留的咪唑脲苯采用 1%三氟乙酸-乙腈(1:4, v/v)提取, Oasis WCX 固相萃取柱净化, 高效液相色谱外标法定量, 并经液相色谱-串联质谱确证。**结果** 咪唑脲苯检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 3$), 定量限为 25 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 10$); 在 LOQ、MRL 和 2MRL 三个添加水平下重复分析 6 次, 回收率为 72.7%~101%, 相对标准偏差为 1.2%~6.9%。**结论** 该方法稳定、可靠, 适用于动物组织和牛奶中咪唑脲苯的测定。

关键词: 咪唑脲苯; 动物组织; 牛奶; 固相萃取; 高效液相色谱法; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of imidocarb residue in animal tissues and milk by HPLC and HPLC-MS/MS

LI Xiao-Juan^{1*}, LI Wei², CHEN Dong-Dong¹, AI Lian-Feng², GUO Chun-Hai²,
CHEN Rui-Chun², WANG Feng-Chi²

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China;

2. Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT: Objective A method for determination of imidocarb in animal tissues and milk by SPE-HPLC-MS/MS confirmation was developed. **Methods** The sample was extracted by 1% trifluoroacetic acid-acetonitrile(1:4, v/v), purified by SPE, detected by HPLC and quantified by the external standard. **Results** The LOD and LOQ of imidocarb were 10 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 3$) and 25 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 10$). The average recoveries range of imidocarb at three levels of LOQ, MRL and 2MRL was 72.7%~101% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.2%~6.9%. **Conclusion** This method is convenient, accurate and sensitive so it can be applied to determinate imidocarb residues in animal tissues and milk.

KEY WORDS: imidocarb; animal tissues; milk; solid-phase extraction(SPE); high performance liquid chromatography(HPLC); high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS)

1 引言

咪唑脲苯(imidocarb)又称咪唑苯脲、双脲苯脲,

化学名为 *N,N*-二[3-(4,5-双氢-1H-咪唑-2-基)苯基]脲, 属于二苯基脲衍生物, 是一种高效低毒的抗巴贝虫和边虫药剂, 20 多年来广泛用于预防和治疗食用动

基金项目: 国家质检总局公益性行业科研项目(201010073)、国家认监委检验检疫行业标准项目(2007B889)

Fund: Supported by the Public Welfare Project of AQSIQ (201010073) and Inspection and Quarantine Standard Project of CNCA(2007B889)

*通讯作者: 李晓娟, 副研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: lixiaojuan2003@163.com

*Corresponding author: LI Xiao-Juan, Professor, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.3, Gaobeidian Beijia Road, Chaoyang District, Beijing 100123, China. E-mail: lixiaojuan2003@163.com

物原虫病的治疗。研究表明, 咪唑脲苯在动物体内代谢期长, 残留水平较高^[1-3]。鉴于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 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 牛肉的 MRL 在澳洲为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在其余国家均为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 对牛肝和牛肾的 MRL 欧盟分别为 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 日本分别为 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 欧盟对羊肉、羊肝和羊肾的 MRL 分别为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前, 国内外咪唑脲苯残留检测方法主要有紫外分光光度法^[1, 4-6]和高效液相色谱法^[7-14], 前处理方法主要采用酶解、碱化及液-液萃取等技术。方法操作复杂, 回收率不稳定, 不适于大批量样品检测。研究者尝试采用固相萃取法简化样品前处理过程, 如采用离子交换柱(CBA)净化牛肾样品^[10], 采用固相萃取技术净化血浆样品^[15], 虽然简化了净化步骤, 但提取方法复杂且样品适用范围有限, 对于阳性样品缺乏确证分析技术。

本研究采用 1%三氟乙酸-乙腈提取, 采用 Oasis WCX 固相萃取柱净化, 高效液相色谱/二极管阵列检测器定量检测, 液相色谱-串联质谱确证。建立了简便、灵敏且适用于多种动物组织和牛奶中咪唑脲苯残留量的定性定量确证分析方法。

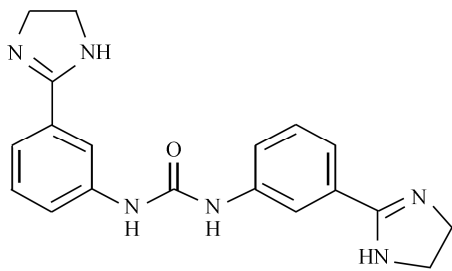


图 1 咪唑脲苯化学结构式
Fig. 1 The chemical structural formula of imidocarb

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1200 型高效液相色谱仪, 配二极管阵列检测器(美国 Agilent 公司); Agilent 6460 高效液相色谱-串联质谱仪, 配电喷雾离子源(美国 Agilent 公司); HITACHI 离心机(日本 HITACHI 公司); VORTEX-2

GENE 涡旋混合器(美国 Scientific 公司); Polytron PT 3100 型均质器(瑞士 Polytron 公司); Turbo Vap 型氮气吹干仪(美国 Zymark 公司); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); Oasis WCX 固相萃取柱(60 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司)。

咪唑脲苯(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, Fluka); 三氟乙酸、氢氧化钠、乙酸铵、甲酸和乙酸均为分析纯; 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

称取 5 g 动物组织样品于 50 mL 离心管中, 加 15 mL 1%三氟乙酸溶液-乙腈 (1:4, v/v)提取液, 均质 1 min, 于 6000 r/min 离心 5 min, 取出上清液。残渣再用 10 mL 提取液重复提取 2 次, 合并提取液并定容至 35 mL。取 7 mL 上清液于另一离心管中, 用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 8, 离心后将上清液转移至 WCX 固相萃取柱(使用前用 3 mL 乙腈活化), 依次用 2 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗, 再用 5 mL 5%三氟乙酸甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液并氮吹浓缩至干, 用 1 mL 乙腈-0.1%甲酸溶液(3:7, v/v)定容, 过滤膜, 供仪器测定。

称取 5 g 牛奶样品, 加入提取液定容至 25 mL, 涡旋混合 2 min, 于 6000 r/min 离心 5 min。分取 5 mL 上清液于另一离心管中, 用 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 值至 8, 离心后取上清液并采用与动物组织样品相同的方法净化, 供仪器测定。

2.2.2 液相色谱条件

色谱柱 CLOVER-C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1%三氟乙酸; 流动相 B 为乙腈; 流速 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL ; 检测波长 240 nm; 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱法梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elutions of liquid chromatography(LC)

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	84	16
4	84	16
4.1	10	90
9.0	10	90
9.1	84	16

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

色谱部分: 色谱柱 Agilent XDB-Phenyl 柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相 A 为 0.1%乙酸-0.5 mmol/L 乙酸铵溶液; 流动相 B 为甲醇; 流速 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 2 μL; 梯度洗脱条件见表 2。

表 2 液相色谱-串联质谱梯度洗脱条件
Table 2 Gradient elutions of LC-MS

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10
1	90	10
2	20	80
5	20	80
5.1	90	10

质谱部分: 电喷雾电离正离子模式(ESI+); 毛细管电压 4500 V; 干燥气温度 350 ℃; 流量 11 L/min; 雾化器压力 35 psi; 碰撞气为氮气; 多反应监测模式(MRM)检测: 监测离子对(*m/z*): 349.2/188.1(27 eV)、349.2/162.1(21 eV)。

2.2.4 标准曲线的绘制

准确称取咪唑脲苯标准品 10 mg (精确至 0.1 mg), 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 配置成浓度为 100 mg/L 的储备液, 于 4 ℃ 以下避光保存。分析时, 用甲醇稀释成浓度为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L 的标准溶液工作溶液, 以咪唑脲苯色谱峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线并用于定量。

3 结果与讨论

3.1 提取条件的选择

在酸性条件下, 动物体内的咪唑脲苯可转化为盐形态, 易于与动物组织分离, 有利于提高提取效率。乙腈沉淀蛋白效果优于甲醇, 因此本研究选择乙腈作为提取溶液, 比较了乙腈中添加不同酸溶液(盐酸、乙酸、三氟乙酸)的提取效果。结果表明: 采用乙酸-乙腈溶液提取, 由于乙酸的酸性较弱, 咪唑脲苯提取效率低于 40%; 采用盐酸-乙腈溶液提取, 除对肝脏中咪唑脲苯的提取效率低于 60%外, 其他样品提取效率较高, 但提取液中杂质含量也较高; 采用三氟乙酸-乙腈提取, 三氟乙酸是强有机酸, 是有机

化合物的良好溶剂并且能溶解蛋白质, 与乙腈混合使用提取效果较好, 比较了 0.5%、1%、5%和 10%不同三氟乙酸含量对提取效果的影响, 发现 1%三氟乙酸-乙腈(1:4, v/v)的提取效率最高(80%以上), 且提取杂质少, 因此选择 1%三氟乙酸-乙腈(1:4, v/v)作为提取液。

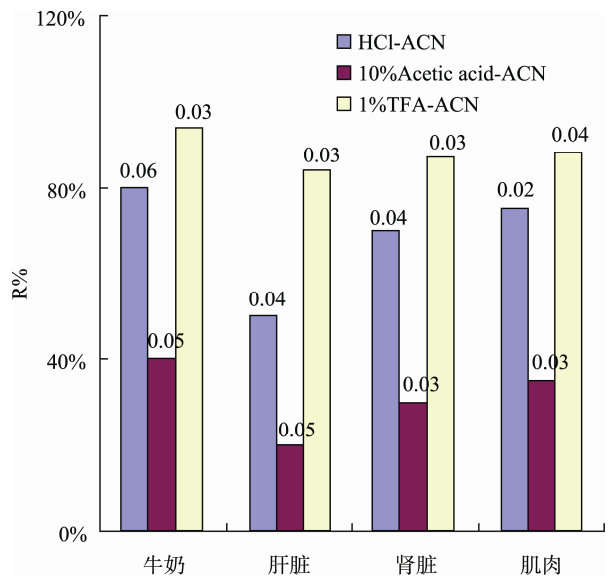


图 2 不同提取溶剂对不同基质提取效率的影响

Fig. 2 The effects of different extracting solvents on extraction rate of different matrixes

3.2 净化条件的选择

现有研究报道多采用液-液萃取净化方法, 由于动物组织样品油脂含量高, 反复萃取对目标物损失较大且操作复杂。本研究尝试采用固相萃取法净化, 根据咪唑脲苯的性质, 选择了 C₁₈ 柱、MCX(混合型阳离子交换柱)柱和 WCX(混合型弱阳离子交换柱)固相萃取柱。结果表明, C₁₈ 柱对目标物的保留不强; MCX 柱对咪唑脲苯保留极强, 用 10%氨水-乙腈洗脱的回收率低于 30%; WCX 柱含有羧酸官能团, 改变体系 pH 值可对咪唑脲苯产生较好的选择性, 在 pKa 值大于 4.8 时, 官能团带负电荷, 对阳离子产生保留, 降低 pH 值至 2.8, 使其官能团呈电中性, 此时可以将分析物洗脱。研究表明, 上样溶液的 pH=8.0 时 WCX 柱可以较好的保留咪唑脲苯, 再用甲醇、水淋洗去除杂质, 最后用三氟乙酸-甲醇溶液可将咪唑脲苯从固相萃取柱中洗脱出来, 本研究最终选择洗脱溶液为 5%三氟乙酸甲醇溶液。

3.3 色谱条件的优化

比较了 Cloversil C₁₈、Agilent HC-C₁₈ 和 Hypersil GOLD 色谱柱对咪唑脲苯的分离选择性, 研究发现使用 Cloversil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱可以获得较好的色谱保留。比较了 0.1%三氟乙酸-乙腈、0.1%甲酸-乙腈、0.2%乙酸-乙腈和 5%乙酸-乙腈四种流动相, 发现采用 0.1%三氟乙酸水溶液-乙腈为流动相, 色谱峰呈现正态分布且响应值较高。采用梯度洗脱的方法, 使目标物与干扰峰完全分离, 增强方法的特异性和定性定量分析的准确度。

3.4 线性范围和定量限

浓度范围在 0.01~2.0 mg/L 范围内, 以咪唑脲苯的色谱峰面积(Y)对相应浓度(X)绘制标准曲线, 得到线性回归方程的相关系数大于 0.999。以 3 倍信噪比(S/N≥3)确定方法检出限(LOD)为 10 μg/kg, 以 10 倍信噪比(S/N≥10)确定方法定量限(LOQ)为 25 μg/kg, 满足国内外现有咪唑脲苯残留限量要求。

3.5 回收率和精密度

用不含咪唑脲苯的牛奶、牛肉、牛肝、牛肾、羊肉、羊肝和羊肾 7 种样品分别进行添加水平的回收试验, 每个添加水平平行测定 6 次, 方法的回收率和精密度见表 3, 回收率和精密度满足残留分析要求。牛奶、羊肉、羊肝和牛肾空白样品及样品添加回收色谱图见图 3(样品中咪唑脲苯的最低添加水平为 25 μg/kg)。

3.6 液相色谱-串联质谱确证

样品中检出咪唑脲苯残留时, 可采用液相色谱-

串联质谱进一步确证分析。在上述液相色谱-串联质谱条件下, 咪唑脲苯的特征定性离子对为 *m/z* 349.2/188.1 和 *m/z* 349.2/162.1, 当特征离子对均出现并且相对丰度在允许变化范围之内时, 可以判断样品中存在咪唑脲苯残留, 确证分析的检出限为 5 μg/kg。图 4 为咪唑脲苯液相色谱-串联质谱 MRM 谱图。

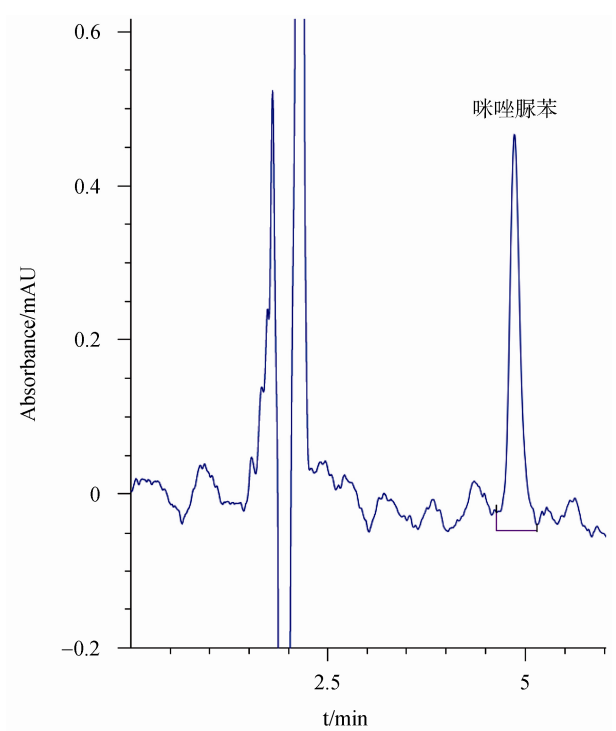


图 3 咪唑脲苯标准品的液相色谱图(25 ng/mL)
Fig. 3 The liquid chromatograph of imidazole urea benzene standard products(25 ng/mL)

表 3 不同样品基质中咪唑脲苯的回收率及相对标准偏差(n=6)
Table 3 The recovery and the relative standard deviation of imidazole urea benzene from different matrixes (n=6)

样品	添加水平/(μg/kg)	回收率(%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差(%)
牛奶	25	73~81	78	3.9
	50	85~97	90	5.5
	100	82~86	83	1.7
牛肉	25	74~90	82	6.9
	1000	83~93	88	3.4
	2000	96~99	97	1.2

续表 3

样品	添加水平/(μg/kg)	回收率(%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差(%)
牛肝脏	25	75~84	80	3.7
	2000	96~100	98	1.3
	4000	90~95	93	2.2
牛肾脏	25	73~83	79	4.5
	2000	93~100	97	2.4
	4000	87~91	89	2.3
羊肉	25	82~92	86	4.6
	300	88~98	94	5.1
	600	96~102	98	1.9
羊肝脏	25	80~90	86	4.7
	2000	88~91	90	1.2
	4000	84~90	87	2.6
羊肾脏	25	75~86	79	4.8
	1500	87~101	91	5.9
	3000	80~87	84	2.8

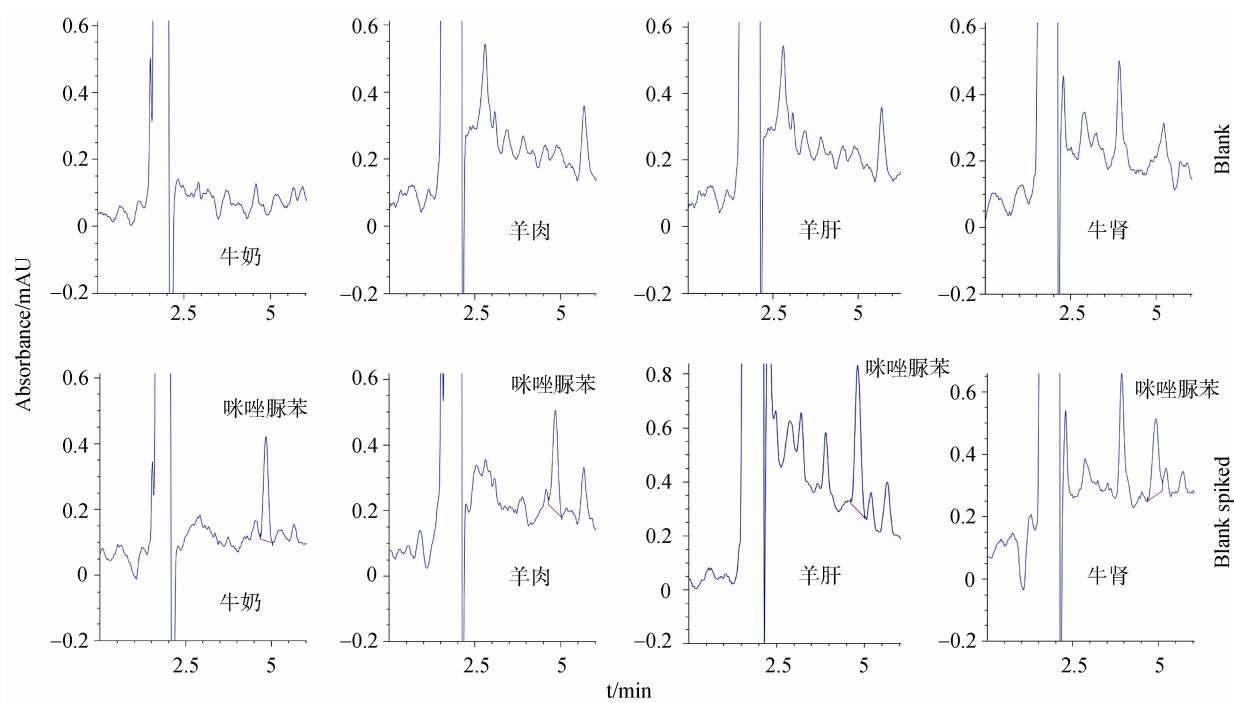


图 4 空白样品(牛奶、羊肉、羊肝、牛肾)和空白样品加标(25 μg/kg)色谱图

Fig. 4 The liquid chromatograms of blank samples (milk, mutton, goat liver, bovine kidney) and spiked bland samples (25 μg/kg)

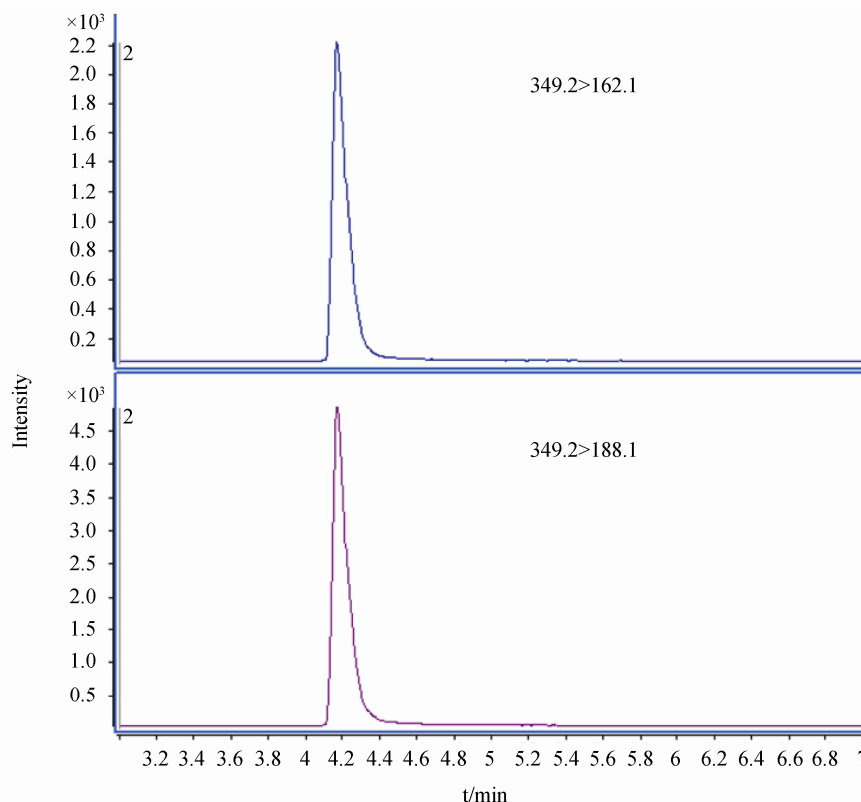


图5 咪唑脲苯液相色谱-串联质谱分析的 MRM 谱图(25 ng/mL)

Fig. 5 The MRM spectrums of imidazole urea benzene detected by LC-MS/MS(25 ng/mL)

3.7 结 论

本研究建立了动物组织和牛奶中咪唑脲苯残留量的液相色谱测定和液相色谱-串联质谱确证方法。该方法克服了传统分析方法的缺点,简化了样品前处理流程,提高了分析灵敏度和准确度,方法技术指标满足残留分析和日常检测要求。

参考文献

- [1] 何宏轩,张西臣,王静敏,等.咪唑苯脲缓释剂在黄牛体内的药代动力学及组织残留量测定[J].中国兽医科技,2000,30(7):10-13.
He HX, Zhang XC, Wang JM, *et al.* Imidocarb release agent pharmacokinetics and tissue residues in vivo determination of cattle [J]. Chin J Vet Sci Technol, 2000, 30(7): 10-13.
- [2] Coldham NG, Moore AS, Dave M, *et al.* Imidocarb residues in edible bovine tissues and in vitro assessment of imidocarb metabolism and cytotoxicity [J]. Drug Metab Dispos, 1995, 23(4): 501-505.
- [3] 赵蕾蕾,杨娟,刘义明,等.动物专用抗原虫药咪唑苯脲研究

进展[J].中国畜牧兽医,2012,39(2):151-155.

Zhao LL, Yang J, Liu YM, *et al.* Research progress in animal-specific antiprotozoal drug imidocarb [J]. Chin Animal Husbandry Vet Med, 2012, 39(2): 151-155.

- [4] 王兆学,毕可东,高光平,等.紫外系数倍率法测定盐酸咪唑苯脲缓释剂在健康奶牛中的血药浓度[J].畜牧与兽医,2008,40(6):73-76.

Wang ZX, Bi KD, Gao GP, *et al.* Determination of imidocarb hydrochloride sustained release drug concentration in the blood of healthy cows by ultraviolet coefficient ratiomethod [J]. Animal Husbandry & Vet Med, 2008, 40(6): 73-76.

- [5] 戴国华,李德昌,沈春岚,等.丙酸咪唑苯脲的研制及其对梨形虫病的治疗试验[J].中国兽药杂志,2000,34(3):15-18.

Dai GH, Li DC, Shen CL, *et al.* Preparation and efficacy of the new anti-babesial drug imicocarb [J]. Chin J Vet Drug, 2000, 34(3): 15-18.

- [6] 沈春岚,吴弋麓,宁鲁敏,等.国产咪唑苯脲二丙酸盐在牛体内的药代动力学及组织残留[J].兽医大学学报,1987,7(2):115-119.

Shen CL, Wu GL, Ning LM, *et al.* The pharmacokinetics of imicocarb dipropionate and its tissue-residue in cattle [J]. Bull Vet

- College of PLA, 1987, 7(2): 115–119.
- [7] 于慧敏, 黄显会, 钟家林, 等. 高效液相色谱法测定猪组织中残留的咪唑苯脲[J]. 色谱, 2011, 29(8): 750–754.
- Yu HM, Huang XH, Zhong JL, *et al.* Determination of imidocarb residue in swine tissues by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(8): 750–754.
- [8] Lai O, Belloli C, Crescenzo G, *et al.* Depletion and bioavailability of imidocarb residues in sheep and goat tissues [J]. Vet Human Toxicol, 2002, 44(2): 79–83.
- [9] Wang ZJ, Li XB, Su D, *et al.* Residue depletion of imidocarb in swine tissue [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(6): 2324–2328.
- [10] Tarbin JA, Shearer G. High-performance liquid chromatographic determination of imidocarb in cattle kidney with cation-exchange clean-up [J]. J Chromatogr, 1992, 577(2): 376–381.
- [11] Crescenzo G, Lai OR, Belloli C, *et al.* Validation of analytical methods for the determination of imidocarb in tissues and milk of cattle, sheep and goats [J]. Ital J Food Sci, 2002, 14(2): 99–111.
- [12] Coldham NG, Moore AS, Sivapathasundaram S, *et al.* Imidocarb depletion from cattle liver and mechanism of retention in isolated bovine hepatocytes [J]. Analyst, 1994, 119: 2549–2552.
- [13] Aliu YO, Davis RH, Camp BJ, *et al.* Absorption, distribution, and excretion of imidocarb dipropionate in sheep [J]. Am J Vet Res, 1977, 38(12): 2001–2007.
- [14] 于慧敏, 黄显会, 杨刚, 等. 高效液相色谱法测定牛奶及牛可食性组织中咪唑苯脲 [J]. 华南农业大学学报, 2012, 33(2): 239–243.
- Yu HM, Huang XH, Yang G, *et al.* Determination of imidocarb residues in bovine edible tissues by high-performance liquid chromatography [J]. J South China Agric Univ, 2012, 33(2): 239–243.
- [15] 苏丹, 许剑琴, 吴文学. 二丙酸咪唑苯脲在猪体内的药代动力学及其残留研究[D]. 中国农业大学, 2007.
- Su D, Xu JQ, Wu WX. The Pharmacokinetics and Residue Research of Imidocarb Dipropionate Injection in Swine[D]. China Agricultural University, 2007.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



李晓娟, 副研究员, 主要研究方向为食品中有毒有害物质检测技术研究。
E-mail: lixiaojuan2003@163.com