

高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中 左旋咪唑的残留量

汤 芳*

(石嘴山市检验检测中心, 石嘴山 753000)

摘 要: 目的 建立高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中左旋咪唑的残留量。**方法** 牛奶样品用碱性乙酸乙酯提取, 经振荡、离心、旋转蒸发后, 再经盐酸提取, 上清液经 MCX 固相萃取柱净化, 氨化甲醇洗脱, 氮气吹干, 乙腈水定容, 过 0.22 μm 有机滤膜, 高效液相色谱-串联质谱测定, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 外标法定量。**结果** 左旋咪唑在 0~20 ng/mL 的浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.995, 牛奶中左旋咪唑检出限为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 加标回收率为 82.33%~104.49%, 相对标准偏差均小于 7%。

结论 该方法前处理简便快速, 灵敏度高, 适用于牛奶中左旋咪唑残留量的检测。

关键词: 牛奶; 左旋咪唑; 高效液相色谱串联质谱法

Determination of levamisole residues in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

TANG Fang*

(Shizuishan City Inspection and Testing Center, Shizuishan 753000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of levamisole residues in milk by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** Milk samples were extracted with alkaline ethyl acetate and shaken, centrifuged and rotary evaporated. After extraction with hydrochloric acid, the supernatant was purified by MCX solid phase extraction column, eluted with ammoniated methanol, and dried by nitrogen, then made up to volume with acetonitrile water, and passed through an organic filter of 0.22 μm . It was determined by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring (MRM), and quantified by external standard method. **Results** The linear relationship of levamisole in the concentration range of 0–20 ng/mL was good, the correlation coefficient was 0.995, the detection limit of levamisole in milk was 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the recoveries of standard addition were 82.33%–104.49%. The relative standard deviations were less than 7%. **Conclusion** The pretreatment of this method is simple, rapid, sensitive and suitable for the determination of levamisole residue in milk.

KEY WORDS: milk; levamisole; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 汤芳, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测技术。E-mail: 396731481@qq.com

*Corresponding author: TANG Fang, Senior Engineer, Shizuishan City Inspection and Testing Center, Shizuishan City 753000, China. E-mail: 396731481@qq.com

1 引 言

左旋咪唑作为一种广谱型抗线虫药, 药源丰富, 广泛应用于禽畜养殖企业, 效果良好。而据有关研究报道称, 左旋咪唑还具有一定免疫调节功能, 可以提高机体的免疫能力, 对某些慢性疾病也有一定的辅助作用, 因此, 在临床治疗方面也有一定的应用^[1-3]。但实验发现, 人体摄入过量左旋咪唑可引起畸变、癌变等症状, 严重危害人类健康, 因此, 对于左旋咪唑相关性、检测技术等方面的研究也越来越受到学者、专家的关注。目前牛奶已经成为人类的必需品, 国家规定对左旋咪唑在泌乳期牛乳中是不得检出^[4], 因此对牛奶源头环节的管控越来越成体系, 越来越严格。但是在奶牛饲养过程中, 通常会使用左旋咪唑驱虫, 因此左旋咪唑有可能会搅拌于饲料或周围驱虫的饲草, 奶牛食用后通过牛体代谢中进入牛奶, 从而危害了人体的健康, 因此加强对牛奶中左旋咪唑的监测具有十分重要的意义。

目前国内外对左旋咪唑的检测方法主要有液相色谱法、气相色谱法, 酶联免疫法等^[5,6]检测手段。液相方法有的检出限较高, 同时气相法需要衍生操作比较繁琐, 酶联免疫法受机体干扰不能作为仲裁的方法。

本研究采用高效液相色谱串联质谱法检测牛奶中的左旋咪唑, 对比了乙酸乙酯和盐酸提取的方式, 优化提取条件, 在结果计算时使用阴性空白降低了基质的干扰, 达到快速、定性筛查左旋咪唑残留的检测目的, 为正确指导原奶源头质量的控制, 牧场正确使用兽药做指导。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

乙酸乙酯、盐酸、氢氧化钠(分析纯、天津福晨化学试剂厂); 左旋咪唑(纯度在 98%以上, 北京希凯创新科技有限公司); 乙腈(色谱纯, 美国默克公司), 甲酸(质谱级, 美国默克公司); MCX 阳离子交换柱(3cc 60 mg, 美国沃特世公司)。

10 件纯牛奶样品来源内蒙古呼和浩特、包头、通辽、巴盟、乌兰浩特等地区的超市。

2.2 仪器设备

1290II-6460 TQD 三重四级杆液相色谱-质谱/质谱联用仪、Waters ACQUITY UPLC Hilic 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); 固相萃取装置(北京艾杰尔公司); 32R 高速离心机(美国 Heal Force 公司); MS 3 basic 涡流混合器(德国 IKA 公司); N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organamation Associates.Jnc 公司)。

2.3 方 法

2.3.1 标准曲线制备

标准储备液: 分别适量称取标准品(精确至 0.0001 g)左旋咪唑用甲醇配制成 100 μg/mL 的标准储备液。标准工

作液: 根据需要, 吸取一定量的标准储备液, 用空白样品提取液稀释至所需浓度, 现用现配。

2.3.2 样品制备

牛奶样品称取 2.5 g 试样(精确到 0.001 g)于 50 mL 具塞塑料离心管中, 准确加入 10 mol/L 氢氧化钠 0.1 mL, 氯化钠约 5 g 和乙酸乙酯 20 mL 涡旋混匀 1 min, 振荡 10 min, 以 8000 r/min 离心 10 min。取上清液于鸡心瓶中, 再加入 20 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并 2 次上清液于同鸡心瓶中 40 °C 旋转蒸发至近干, 加入 0.2 mol/L 盐酸 10 mL 洗涤鸡心瓶于 15 mL 离心管中。

2.3.3 样品净化

提取液加入到经 3 mL 甲醇, 3 mL 水和 3 mL 0.2 mol/L 盐酸活化的 MCX 固相萃取小柱, 在依次用 3 mL 水, 1 mL 0.2 mol/L 盐酸和 3 mL 甲醇淋洗, 用氨化甲醇 4.0 mL 洗脱。用氮气吹干洗脱液, 用乙腈水(3:17, V:V)定容至 1 mL, 过 0.22 μm 有机滤膜, 供液相色谱-质谱联用仪进行测定。

2.3.3 液相条件

柱温: 30 °C。流动相: A: 乙腈, B: 0.1% 甲酸水。流速: 0.3 mL/min。进样体积: 10 μL。流动相梯度见表 1^[7-9]。

表 1 流动相洗脱条件
Table 1 Mobile phase elution conditions

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%	曲线
/	0.2	50	50	/
5	0.2	50	50	6

2.3.4 质谱条件

电离方式: ESI(+)。电离电压: 3.0 kV。源温度: 120 °C。去溶剂气温度: 350 °C。去溶剂气流量: 500 L/hr。

采集方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 具体的被测物的参考离子对及裂解能量见表 2。

表 2 被测物的参考监测离子对和裂解能量
Table 2 Reference monitoring ion transition and cleavage energy of the analyte

化合物名称	监测离子对(m/z)	锥孔电压/V	裂解能量/eV
左旋咪唑	205.1/99.7	39	26
	205.1/177.8a	39	21

注: a 为定量离子对, 对于不同质谱仪器, 仪器参数可能存在差异, 测定前应将质谱参数优化到最佳。

3 结果与分析

3.1 前处理方法的选择

本实验采用 2 种前处理方式并进行了对比^[10-12]: 第 1

种前处理方式样品经碱性乙酸乙酯提取后直接加入盐酸进行萃取, 后吸取盐酸层过固相萃取柱; 第 2 种前处理方式提取时用碱性乙酸乙酯提取经旋转蒸发至近干后用盐酸溶液溶解后过固相萃取柱两者前处理导致回收率差异如下表 3。从上述测得回收率结果可以得出, 左旋咪唑易溶于乙酸乙酯中, 同时左旋咪唑在酸性条件下形成左旋咪唑盐酸盐, 因此在使用第 1 种方式前处理时两者均溶解左旋咪唑, 因此回收率偏低。第 2 种前处理是在碱性乙酸乙酯中进行提取, 旋转蒸发至近干后, 用盐酸进行溶解, 有易于接下来阳离子交换色谱柱的净化, 因此使用乙酸乙酯和盐酸溶液萃取没有达到很好的提取效果。

3.2 色谱柱的选择

左旋咪唑类药物在测定时分别使用普通 C₁₈ 色谱柱及

Hilic 色谱柱, 发现使用普通 C₁₈ 色谱柱, 色谱峰的峰形存在分叉现象, 而使用 Hilic 色谱柱后避免此现象产生, 并且同等浓度下响应值高, 如图 1, 亲水色谱是一种用来改善在反相色谱中保留较差的强极性物质保留行为的色谱技术, 它通过采用强极性固定性, 并且结合高比例有机相/低比例水相组成的流动相来实现这一目的。而这样的流动相组成尤其有利于提高电喷雾离子化质谱的灵敏度。左旋咪唑的极性较强因此选用此色谱柱灵敏度高, 峰形较好。

3.3 标准曲线

左旋咪唑标准品质量浓度在 0~20 ng/mL 标准曲线相关系数达到 0.995, $Y = 72.596X + 25.1444$; 具体见图 2, 符合国标 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》^[13]中标准曲线要求。

表 3 前处理方式对回收率的影响
Table 3 Effect of pretreatment on recovery

序号	理论添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	第二种前处理回收率/%	第一种前处理回收率/%
1	0.32	98.00	25.44
2	0.32	101.91	38.17
3	0.32	104.49	37.65
4	0.32	100.11	30.59
5	1.6	95.61	45.44
6	1.6	88.26	43.23
7	1.6	88.27	50.69
8	1.6	82.33	48.02

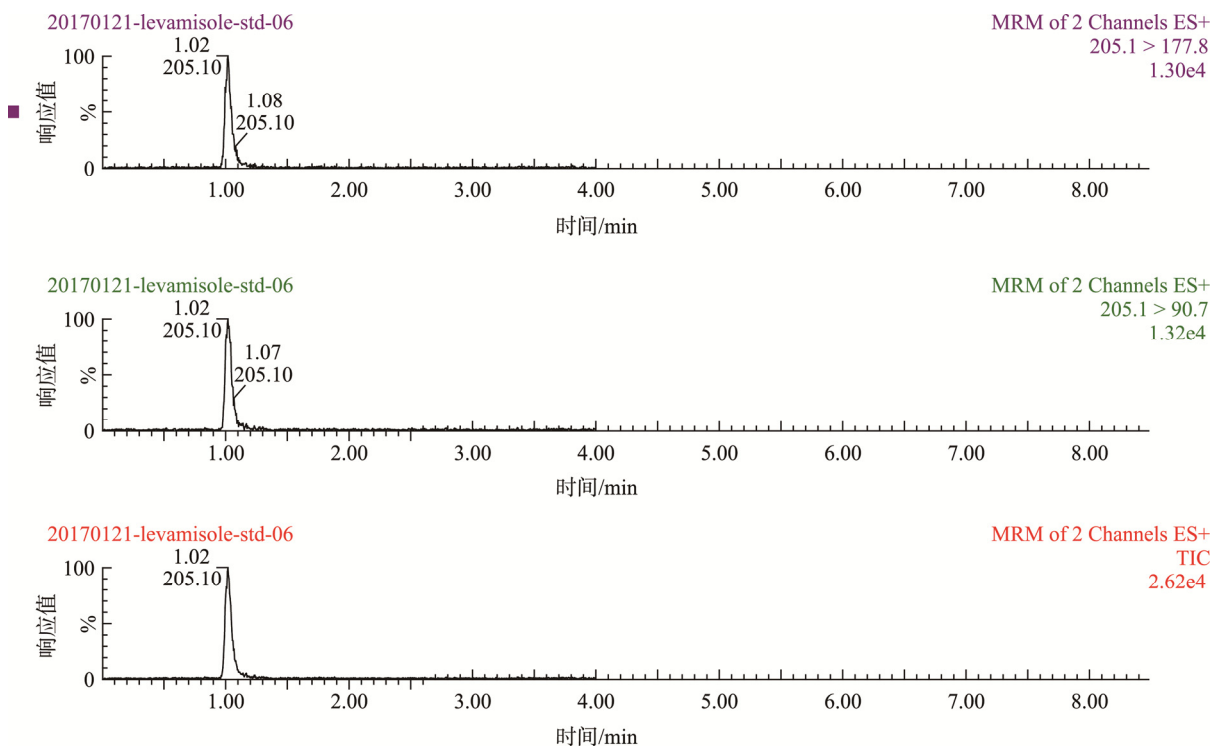


图 1 左旋咪唑残留质谱图

Fig.1 Levamisole residue mass spectrometry

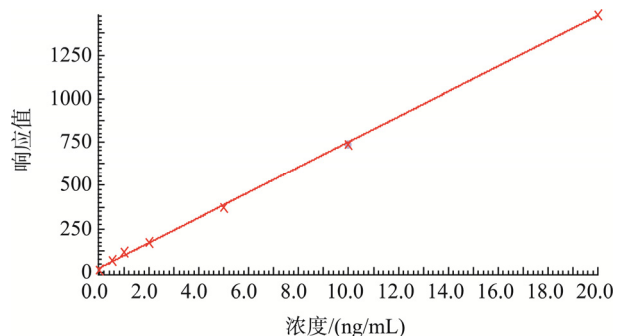


图 2 左旋咪唑标准曲线图
Fig.2 Standard curve of levamisole

3.4 回收率及精密度

添加浓度分别为 0.32、1.6 和 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的左旋咪唑, 每个浓度做 4 组平行, 如表 4, 样品的加标回收率为 82.33%~104.49%, 精密度为 2.97%~6.08%。结构的回收率和精密度符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》^[13]中回收率和精密度的要求。

3.5 检出限

对信噪比(S/N)进行测定, 添加量在 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 测试结果为 9.12, 大于 3 倍信号和噪音的比值, 具体结果见图 3。因此样品的检出限定为 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 4 左旋咪唑添加量及其回收率、精密度(n=4)

Table 4 Levamisole addition and recovery rate and precision (n=4)

序号	样品质量/g	待测样品浓度/(ng/mL)	实际测定结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	理论添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	精密度/%
1	2.5924	0.813	0.31	0.32	98.00	
2	2.5023	0.816	0.33	0.32	101.91	2.97
3	2.5392	0.849	0.33	0.32	104.49	
4	2.5159	0.806	0.32	0.32	100.11	
5	2.5292	3.869	1.53	1.6	95.61	
6	2.562	3.618	1.41	1.6	88.26	6.08
7	2.5064	3.54	1.41	1.6	88.27	
8	2.5165	3.315	1.32	1.6	82.33	
9	2.5446	12.458	4.896	5	97.92	3.19
10	2.5049	11.469	4.579	5	91.58	
11	2.5137	12.397	4.932	5	98.64	
12	2.5262	12.052	4.771	5	95.42	

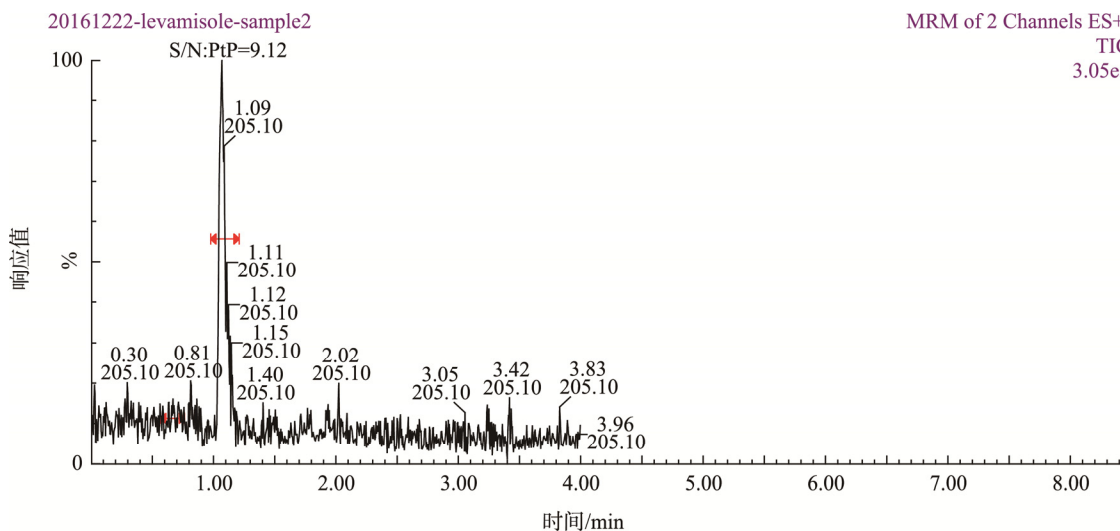


图 3 检出限测定结果
Fig.3 Detection limit determination results

3.6 样品检测

实验室采用本法对市售的 10 件纯牛奶样品进行测定, 结果均未检出(小于检出限 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。但对添加量为 0.8、4、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 盲样进行测定时(实验室质控), 结果的为 0.69、3.26、8.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率均能达到 80%以上, 同样符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》^[13]中回收率的要求。

4 结论

液相色谱串联质谱法由于高灵敏度, 低检出限, 准确性等优点在食品安全检测中发挥了越来越重要的作用^[14,15], 本方法前处理中的提取方法和色谱柱的选择, 使检测结果均优于使用乙酸乙酯和盐酸共同提取以及使用其他色谱柱的测定结果, 方法简便快速、低检出限、高回收率, 重复性好, 满足大批量样品的检测需求。

参考文献

- [1] 谢体波, 龚维瑶, 钟新敏, 等. 动物源性食品检测磺胺类残留 ELISA 试剂盒的研制[J]. 食品与发酵工业, 2018, 44(12): 254-259.
Xie TB, Gong WY, Zhong XM, *et al.* Development of ELISA kit for detecting sulfonamide residues in animal-derived food [J]. Food Ferment Ind, 2018, 44(12): 254-259.
- [2] 李云飞, 杨玲春, 殷红, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查食品中 3 种杀菌剂[J]. 食品科技, 2018, 43(12): 341-345.
Li YF, Yang LC, Yin H, *et al.* Rapid screening of three fungicides in food by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry [J]. Food Sci Technol, 2018, 43(12): 341-345.
- [3] 李丹, 岳燕霞. 食品检测中的农药残留检测技术探讨[J]. 现代食品, 2018, (20): 23-24.
Li D, Yue YX. Exploration of pesticide residues detection technology in food detection [J]. Mod Food, 2018, (20): 23-24.
- [4] GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S].
GB 31650-2019 National food safety standard-Maximum residue limit of veterinary drugs in food [S].
- [5] 张丛兰, 王大菊. 猪、鸡、羊可食用组织中左旋咪唑残留检测气相色谱法的建立[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.
Zhang CL, Wang DJ. Development of a gas chromatographic method for detection of levamisole residues in swine, poultry and goat edible tissues [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004.
- [6] 江航, 孙鹏, 姜慧娇, 等. 左旋咪唑对金黄色葡萄球菌粘附素 ClfA 重组 DNA 疫苗免疫效果的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2014, (5): 11-14.
Jiang H, Sun P, Jing HJ, *et al.* Effect of levamisole on the immunogenicity of DNA vaccine of *Staphylococcus aureus* adhesin ClfA [J]. J Xinjiang Agric Univ, 2014, (5): 11-14.
- [7] 陈晓红, 姚浔平. 蜂蜜中 4 种氟喹诺酮残留的高效液相色谱-质谱测定[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(9): 572-585.

Chen XH, Yao XP. Determination of four fluoroquinolone residues in honey by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Health Inspect, 2007, 17(9): 572-585.

- [8] 李佐卿, 倪梅林, 俞雪钧, 等. 液相色谱串联质谱法检测水产品中磺胺类和喹诺酮类药物残留[J]. 分析测试学报, 2007, 26(4): 508-514.
Li ZQ, Ni ML, Yu XJ, *et al.* Determination of sulfonamides and quinolones residues in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Instr Anal, 2007, 26(4): 508-514
- [9] 张国文, 占春瑞, 倪永年. HPLC 测定鳗鱼中多种氟喹诺酮[J]. 食品科技, 2004, 30(11): 69-71.
Zhang GW, Zhan CR, Ni YN. Determination of fluoroquinolones in eels by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2004, 30(11): 69-71.
- [10] GB 29681-2013 食品安全国家标准 牛奶中左旋咪唑残留量的测定 高效液相色谱法[S].
GB 29681-2013 National food safety standard-Determination of levamisole residues in milk-High performance liquid chromatography [S].
- [11] SN 0349-1995 出口肉及肉制品中左旋咪唑残留量检验方法气相色谱法[S].
SN 0349-1995 Method for the determination of levamisole residues in meat and meat products for export [S].
- [12] GB/T 22994-2008 牛奶和奶粉中左旋咪唑残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 22994-2008 Determination of levamisole residues in milk and milk powder-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [13] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检验[S].
GB/T 27404-2008 Standard for laboratory quality control-Food physical and chemical inspection [S].
- [14] 范阳璇. 气质联用技术在食品农药残留测定中的应用[J]. 食品安全导刊, 2018, (30): 107.
Fan YX. Application of GC-MS in the determination of pesticide residues in food [J]. Chin Food Saf Magz, 2018, (30): 107.
- [15] 李照, 常建军, 喻东威, 等. 高效液相色谱串联质谱法检测液质联用检测液体乳中四环素类和喹诺酮类兽[J]. 食品安全质量学报, 2019, 10(3): 688-692.
Li Z, Chang JJ, Yu DW, *et al.* Determination of tetracyclines and quinolones in liquid milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(3): 688-692.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

汤芳, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测技术。

E-mail: 396731481@qq.com