

LCMS-8030 测定水产品中硝基咪唑类的兽药残留

LCMSMS-047

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中硝基咪唑兽药残留的方法。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 在 6 min 内实现快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。对 5 种硝基咪唑兽药残留的线性、精密度、检出限 (LOD)、定量限 (LOQ) 进行了验证。洛硝哒唑、2-甲基-5-硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 内线性良好，相关系数均大于 0.999；分别用浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液进行了精密度实验，实验结果表明连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.07~1.37% 和 0.66~2.52% 间，仪器精密度良好；LOD 为 0.17~0.40 $\mu\text{g/L}$ 与 LOQ 为 0.59~1.21 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词：硝基咪唑 兽药残留 水产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

硝基咪唑类 (5-nitroimidazoles) 药物是一类具有 5-硝基咪唑环结构的药物，包括洛硝哒唑、2-甲基-5-硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑等。硝基咪唑类药物是畜禽饲料中常用的抗原虫感染及抗菌药，并具有促生长作用，但是该类物质及其某些代谢物对哺乳动物具有致癌、致畸、致突变作用和遗传毒性。饲料中硝基咪唑类药物的不合理使用造成可食性动物组织中药物残留问题危害到人类的食品安全。

对硝基咪唑在水产品、畜产品中残留的检测方法国内外均有报道，液相色谱法和气相色谱法不能满足欧盟 2002/657/EC 决议的要求，气质联用法的前处理过程复杂需进行衍生化处理，液质联用法可有效减少背景干扰，提高灵敏度，将是硝基咪唑类药物残留检测的首选方法。此外，我国针对硝基咪唑类药物残留的检测颁布了相关法规，例如《GB/T 21318-2007 动物源性食品中硝基咪唑残留量检验方法》。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用，参考 GB/T 21318-2007，建立了测定水产品中硝基咪唑类 (洛硝哒唑、2-甲基-5-硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑和异丙硝唑) 兽药残留的方法，供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.42 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D. \times 75 mmL., 2.2 μm

流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液；B - 甲醇

流速：0.25 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 4.50 | Pumps | Pump B Conc. | 100 |
| 5.00 | Pumps | Pump B Conc. | 100 |
| 5.01 | Pumps | Pump B Conc. | 15 |
| 9.50 | Controller | Stop | |

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：35 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

| 编号 | 名称 | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bias(V) | CE(V) | Q3 Pre Bias(V) |
|----|-------------|-------|--------|----------------|-------|----------------|
| 1 | 洛硝哒唑 | 201.0 | 139.7* | -22.0 | -10 | -29.0 |
| | | 201.0 | 54.6 | -11.0 | -25 | -24.0 |
| 2 | 2-甲基-5-硝基咪唑 | 128.0 | 41.9* | -20.0 | -30 | -19.0 |
| | | 128.0 | 81.9 | -10.0 | -20 | -16.0 |
| 3 | 甲硝唑 | 172.0 | 81.8* | -14.0 | -25 | -16.0 |
| | | 172.0 | 127.7 | -14.0 | -15 | -26.0 |
| 4 | 4-硝基咪唑 | 114.0 | 67.9* | -14.0 | -20 | -27.0 |
| | | 114.0 | 41.1 | -21.0 | -15 | -16.0 |
| 5 | 异丙硝唑 | 170.1 | 124.1* | -14.0 | -20 | -27.0 |
| | | 170.1 | 109.1 | -14.0 | -25 | -22.0 |

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

标准物质: 洛硝哒唑、2-甲基-5-硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑。

分别称取 10 mg 5 种物质的标准品, 用甲醇溶解并定容至 1000 $\mu\text{g/L}$ 。

用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准溶液, 用甲醇 + 水 (15+85) 逐级稀释成浓度为 100、50、20、10、5 和 2 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。

样品前处理方法:

参考《GB/T 21318-2007 动物源性食品中硝基咪唑残留量检验方法》。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

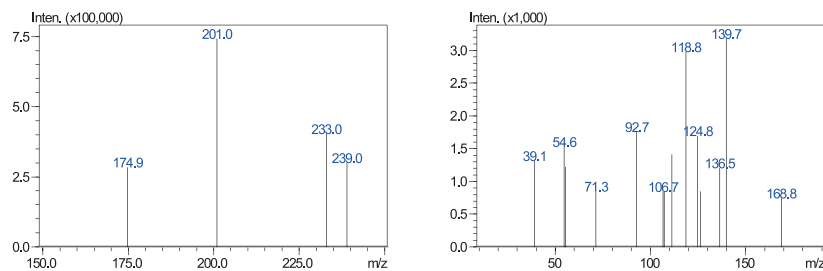


图 1 洛硝哒唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (右图)

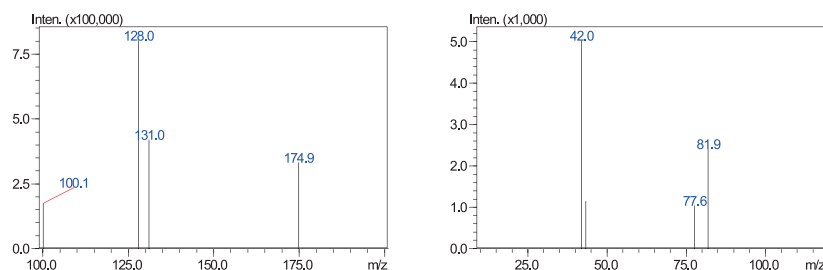


图 2 2-甲基-5-硝基咪唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (右图)

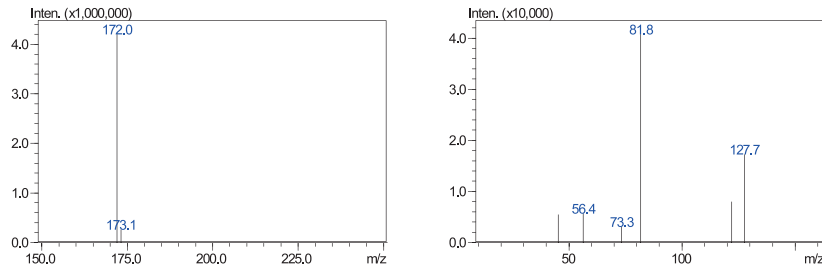


图3 甲硝唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（右图）

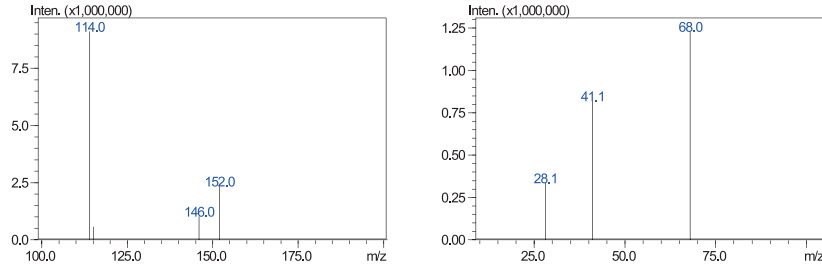


图4 4-硝基咪唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（右图）

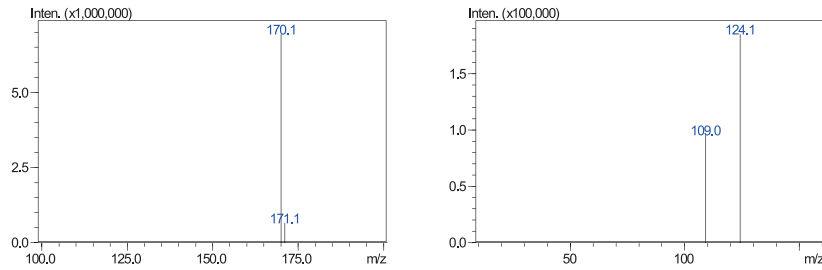


图5 异丙硝唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱如图 6 所示。

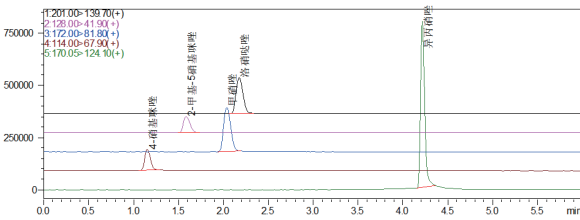


图6 50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 2, 5, 10, 20, 50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 7~11 所示。5 种硝基咪唑物质在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数见表 3。

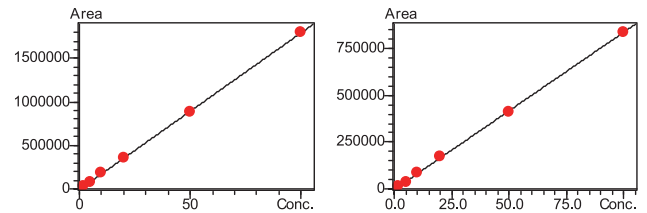


图7 洛硝哒唑的标准工作曲线 图8 2-甲基-5-硝基咪唑的标准工作曲线

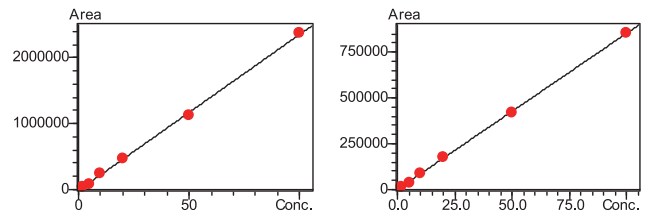


图9 甲硝唑的标准工作曲线 图10 4-硝基咪唑的标准工作曲线

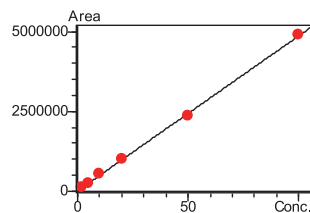


图11 异丙硝唑的标准工作曲线

表3 5种硝基咪唑的校准曲线参数

| 编号 | 名称 | 校准曲线 | 相关系数 R |
|----|-------------|-------------------------------|--------|
| 1 | 洛硝哒唑 | $Y = (18033.6)X + (-7926.56)$ | 0.9999 |
| 2 | 2-甲基-5-硝基咪唑 | $Y = (8405.32)X + (-3629.04)$ | 0.9999 |
| 3 | 甲硝唑 | $Y = (23695.8)X + (-13207.9)$ | 0.9996 |
| 4 | 4-硝基咪唑 | $Y = (8511.96)X + (1085.90)$ | 0.9999 |
| 5 | 异丙硝唑 | $Y = (48457.1)X + (16721.6)$ | 0.9998 |

2.4 检出限和定量限

配制浓度为 2 μg/L 标样 7 份，直接进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 LOD=3.3 S，定量限 LOQ=10 S。测定结果如表 4 所示：

表4 5种硝基咪唑的检出限和定量限

| No. | 名称 | 标准偏差(S) | 检出限(μg/L) | 定量限(μg/L) |
|-----|-------------|---------|-----------|-----------|
| 1 | 洛硝哒唑 | 0.06 | 0.19 | 0.59 |
| 2 | 2-甲基-5-硝基咪唑 | 0.09 | 0.29 | 0.87 |
| 3 | 甲硝唑 | 0.08 | 0.25 | 0.77 |
| 4 | 4-硝基咪唑 | 0.12 | 0.40 | 1.21 |
| 5 | 异丙硝唑 | 0.05 | 0.17 | 0.52 |

2.5 精密度实验

平行制备浓度为 5 μg/L、20 μg/L 和 100 μg/L 标样各 6 份，依次进样。5 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07–1.37% 和 0.66 ~ 2.52% 之间，仪器精密度良好。

表5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

| No. | 样品名称 | RSD% (5 μg/L) | | RSD% (20 μg/L) | | RSD% (100 μg/L) | |
|-----|-------------|-----------------|------|------------------|------|-------------------|------|
| | | R.T | Area | R.T | Area | R.T | Area |
| 1 | 洛硝哒唑 | 1.23 | 1.53 | 0.82 | 1.25 | 1.16 | 0.64 |
| 2 | 2-甲基-5-硝基咪唑 | 1.03 | 2.52 | 0.69 | 1.34 | 0.93 | 1.22 |
| 3 | 甲硝唑 | 1.14 | 1.72 | 0.76 | 1.37 | 1.08 | 0.76 |
| 4 | 4-硝基咪唑 | 0.75 | 2.16 | 0.51 | 1.10 | 0.97 | 0.86 |
| 5 | 异丙硝唑 | 0.15 | 1.85 | 0.07 | 0.91 | 0.10 | 0.66 |

2.6 基质加标实验

为了考察方法的灵敏度，在按照 1.3 中样品制备方法提取净化的空白鱼肉基质样品中添加混合标样，加标含量为 2 μg/L (0.1 μg/kg)，水产品基质空白色谱图如图 12 所示，基质加标样品色谱图如图 13 所示。从图中可以看到，2 μg/L 基质加标样品有很好的响应。

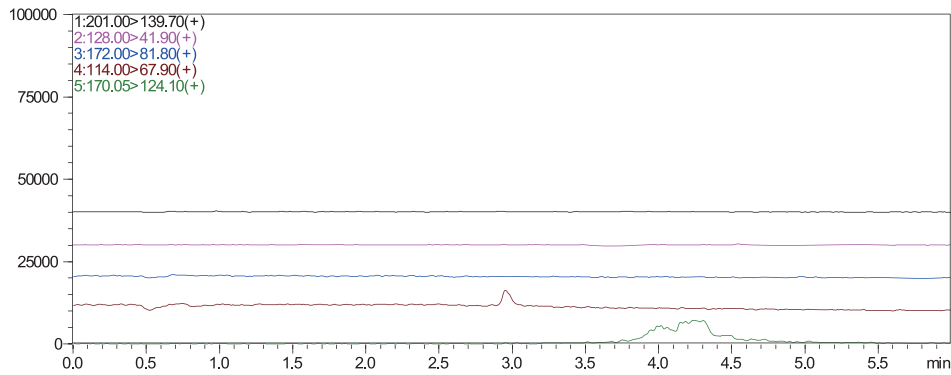


图12 鱼肉样品空白基体色谱图

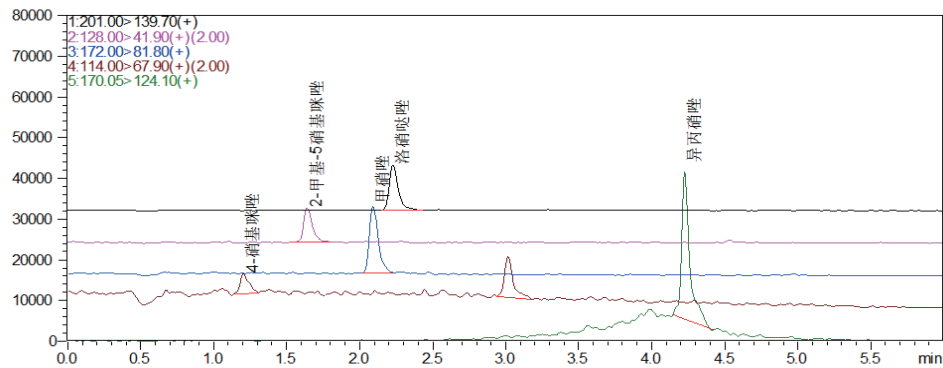


图13 样品基质加标样色谱图

结论

参考 GB/T 21318-2007，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中 5 种硝基咪唑兽药残留量。洛硝哒唑、2-甲基-5-硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑这 5 种硝基咪唑类兽药在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数均大于 0.999。检出限为 0.17~0.40 $\mu\text{g/L}$ ；定量限为 0.59~1.21 $\mu\text{g/L}$ 。在经样品前处理后的鱼肉基体中添加标液，0.1 $\mu\text{g/kg}$ 基质加标样有很好的响应，能满足《GB/T 21318-2007 动物源性食品中硝基咪唑残留量检验方法》标准中的测定低限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 的要求，并且比标准要求的更低。