

LCMS-8045 测定饲料中 4 种硝基咪唑类药物含量

LCMSMS-537

摘要：本文参考《农业农村部公告第 197 号 -1-2019 饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了饲料中甲硝唑、二甲硝唑、洛硝达唑和替硝唑的分析方法。样品中的硝基咪唑类药物经磷酸缓冲液提取，以 HLB 固相萃取柱净化后，吹干复溶过滤后进样分析。以保留时间和离子对相对丰度比为定性依据；空白样品处理后，加入不同浓度的标样，制作校准曲线，外标法定量。结果表明：方法定量限低于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，满足标准要求；在 10-5000 ng/mL 的线性范围内，各目标组分标点浓度准确度均在 88.9-111.6% 之间，R 不低于 0.9967；残留考察结果表明 5000 ng/mL 样品进样后无明显系统残留；空白样品添加不同浓度各目标组分后进行处理，检测结果满足标准关于定性和定量结果的要求。该方法灵敏度和准确度高，适合饲料中 4 种硝基咪唑化合物检测。

关键词：LCMS-8045 饲料 硝基咪唑

硝基咪唑类有机化合物是一类具有硝基咪唑环结构的药物，包括甲硝唑 (MNZ)、二甲硝咪唑 (DMZ)、异丙硝唑 (IPZ)、塞可硝唑 (SCZ)、奥硝唑 (ONZ)、替硝唑 (TNZ) 和洛硝哒唑 (RNZ) 等。

硝基咪唑类药物具有致突变性和潜在的致癌性，被许多国家列为违禁药物。2019 年 12 月 27 日，《中华人民共和国农业农村部第 250 号文》将硝基咪唑列入

食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单。

本文参照《农业农村部公告第 197 号 -1-2019 饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了饲料中 4 种硝基咪唑的分析方法。该方法灵敏度和准确度高，适合饲料中该类化合物的检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40B X3

质谱仪：LCMS-8045

柱温箱：CTO-40S

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99 SP2

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18, 50 mm \times 2.1 mm I.D., 1.8 μm (岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-02)

流动相：A-0.1% 甲酸水溶液；B-0.1% 甲酸乙腈溶液

流速：0.30 mL/min

柱温：25 $^{\circ}\text{C}$

进样量：2 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	5
6.00	Pumps	Pump B Conc.	90
6.10	Pumps	Pump B Conc.	5
8.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8045

加热模块温度: 300°C

离子源: ESI⁺

DL 温度: 250°C

雾化气流速: 3.0 L/min

离子源温度: 400°C

加热气流速: 10.0 L/min

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

干燥气流速: 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

序号	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE	Q3 Pre Bias (V)
1	甲硝唑 (MNZ)	172.20	128.10*	-12.0	-17.0	-13.0
			82.10	-12.0	-25.0	-30.0
2	二甲硝唑 (DMZ)	142.20	96.10*	-13.0	-16.0	-17.0
			81.10	-29.0	-28.0	-29.0
3	洛硝达唑 (RNZ)	201.20	140.20*	-10.0	-12.0	-28.0
			55.05	-10.0	-30.0	-10.0
4	替硝唑 (TNZ)	248.20	121.10*	-12.0	-17.0	-25.0
			82.10	-12.0	-35.0	-15.0

* 定量离子对

1.3 样品前处理

(1) 试样提取: 参照《农业农村部公告第 197 号 -1-2019 饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》中“7.1 提取”部分, 称取 2 g 样品于 50 mL 离心管中 (平行 2 份), 准确加入 1 mol/L 磷酸盐缓冲液, 涡旋 1 min, 300 r/min 振荡 30 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液至另一离心管种。下层残渣加入 1 mol/L 磷酸盐缓冲液 5 mL 重复提取一次, 8000 r/min 离心 10 min。合并 2 次提取液, 备用

(2) 试样净化: 参照《农业农村部公告第 197 号 -1-2019 饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》中“7.2 净化”部分, 将 HLB 固相萃取小柱 (500 mg/6 mL) 依次用 5 mL 乙腈、35 mL 的 1 mol/L 磷酸盐缓冲液活化, 将提取液全部加载于 HLB 柱上, 用 5 mL 的 5% 乙腈溶液淋洗, 抽干, 用 5 mL 乙腈洗脱, 收集洗脱液, 30°C 氮吹至干, 用 1 mL 的 20% 乙腈溶液溶解, 过 0.22 μm 尼龙材质滤膜后上机测定。

■ 结果讨论

2.1 专属性和灵敏度

空白样品和 5 μg/kg (方法定量限) 加标样品处理后进样的 MRM 色谱图如图 1 所示, 空白样品无干扰。4 个目标组分该浓度色谱峰 S/N 均大于 10, 满足灵敏度要求。

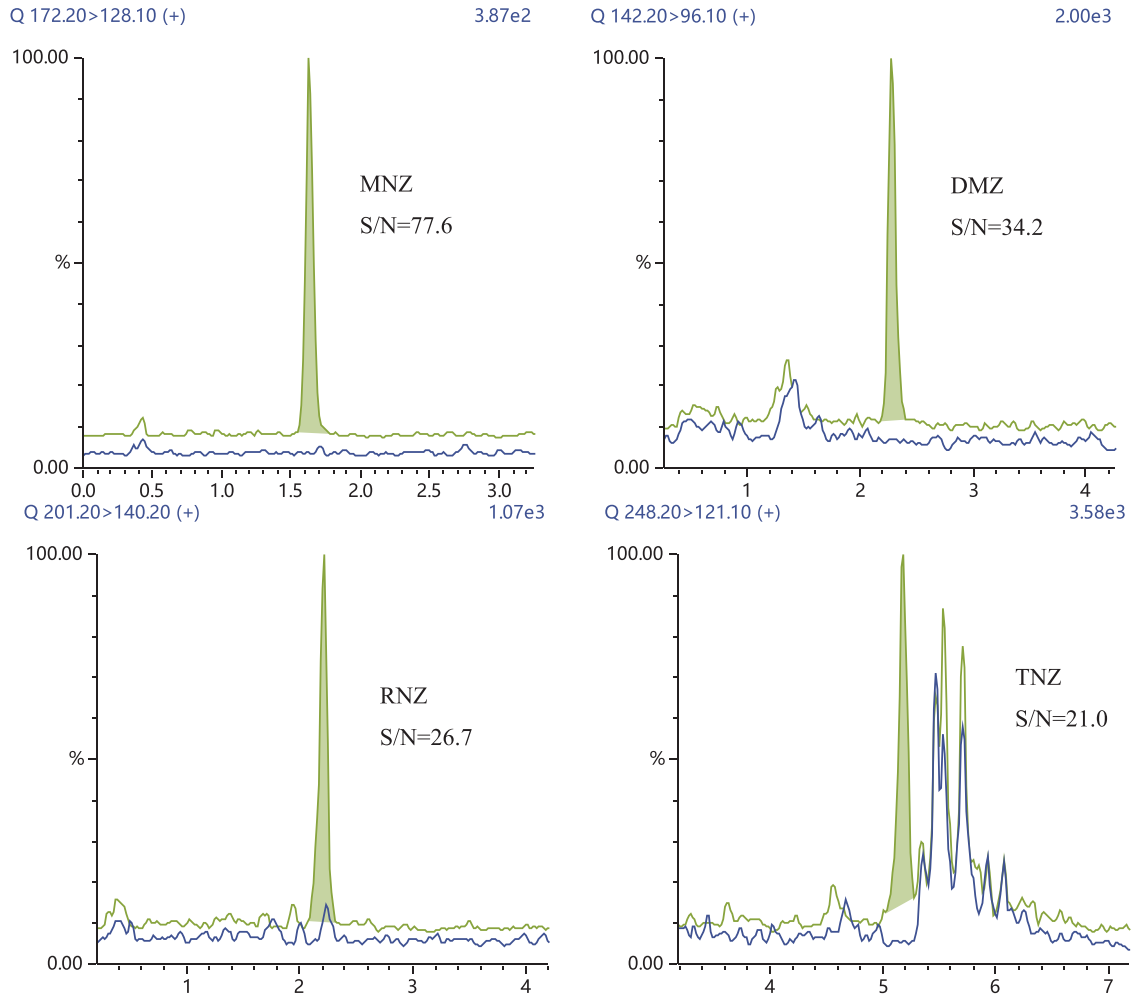
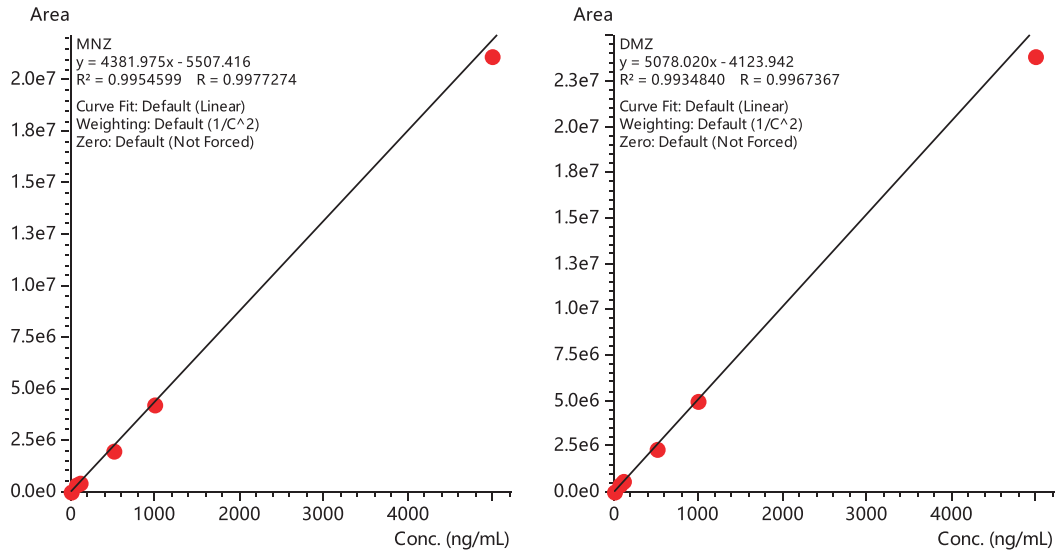


图 1 空白样品 (蓝) 和 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标样品 (绿) MRM 色谱图

2.2 校准曲线

空白样品加标后处理, 制得理论浓度分别为 10、50、100、500、1000、5000 ng/mL 的基质加标溶液, 外标法建立校准曲线如图 3 所示, 线性方程、相关系数及准确度如表 3 所示。



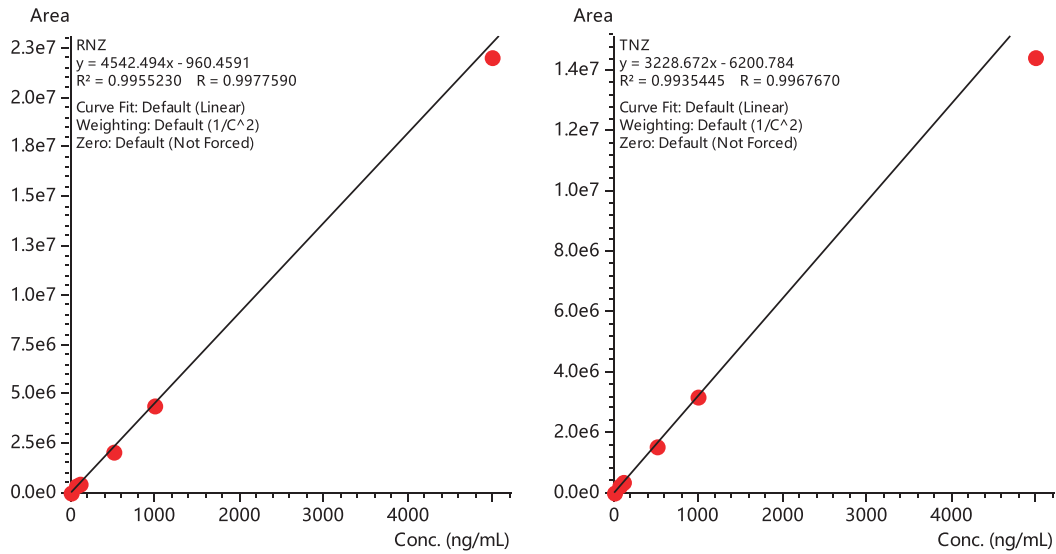


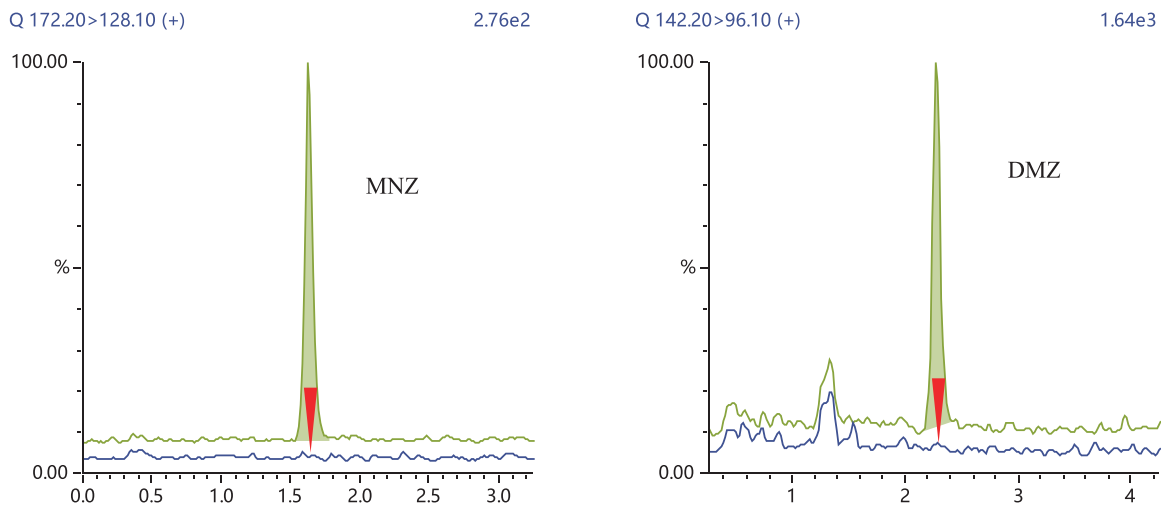
图 2 校准曲线

表 3 校准曲线参数

目标物	线性范围 (ng/mL)	线性方程	相关系数 r	准确度 (%)
MNZ	10-5000	$Y = (4381.97)X - (5507.41)$	0.9977	92.0-110.4%
DMZ	10-5000	$Y = (5078.02)X - (4123.94)$	0.9967	89.8-111.1%
RNZ	10-5000	$Y = (4542.49)X - (960.46)$	0.9978	91.7-109.2%
TNZ	10-5000	$Y = (3228.67)X - (6200.78)$	0.9968	88.9-111.6%

2.3 残留考察

5000 ng/mL 样品进样后, 空白样品进样与加标浓度 LLOQ 样品色谱图如图 3 所示, 4 种目标组分保留时间处无明显色谱峰。



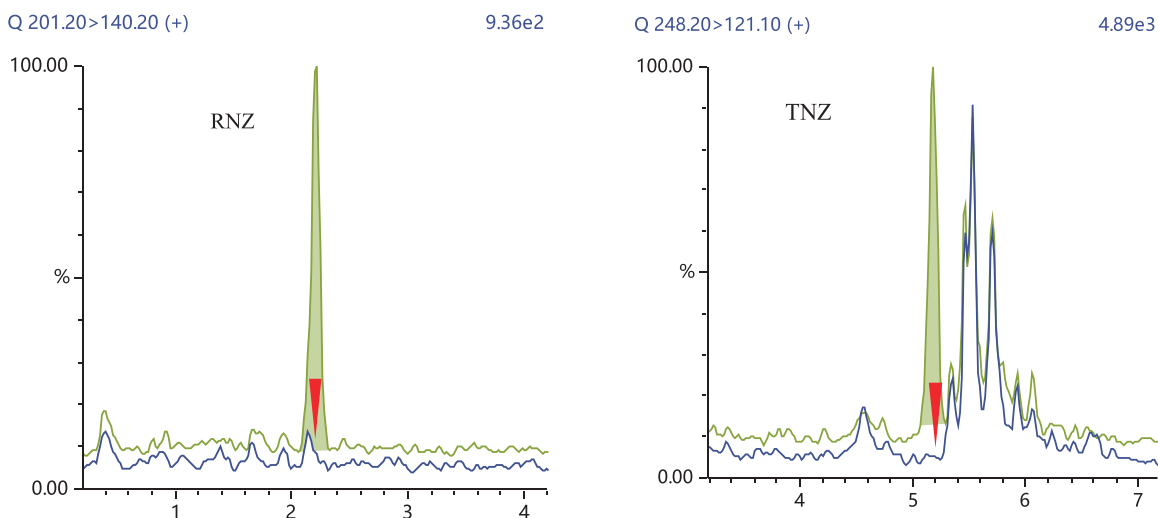


图3 残留考察 (蓝 - 空白样品, 绿 - LLOQ)

2.4 重复性考察

对不同浓度的加标样品分别连续分析 6 次, 计算保留时间和峰面积的 RSD. 结果见表 4, 保留时间 RSD 均不高于 0.19%, 峰面积 RSD 均不高于 6.19%.

表 4 保留时间和面积 RSD

名称	浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD (%)
MNZ	10	0.16	2.17
	100	0.13	1.68
	1000	0.13	0.80
DMZ	10	0.10	4.21
	100	0.10	1.76
	1000	0.17	1.12
RNZ	10	0.19	4.58
	100	0.12	2.06
	1000	0.19	0.86
TNZ	10	0.14	6.19
	100	0.06	3.60
	1000	0.11	2.15

2.5 平行样考察

空白样品中添加不同浓度的目标组分后进行前处理, 各平行制备两份, 上机测定。

参照标准规定, 以保留时间 (与标曲样品保留时间平均值相对偏差不高于 2.5%) 和离子对相对丰度比 (范围由标曲样品离子丰度比平均值确定) 为定性依据, 定性结果如表 5 所示。保留时间以及离子丰度比相对偏差均未超出规定范围, 符合要求。

表 5 定性结果

化合物	样品	保留时间 (min)	保留时间相对偏差 (%)	离子丰度比	离子丰度比相对偏差 (%)
MNZ	标曲样品	1.631	-	90.10	-
	SA1- 平行 1	1.635	0.25	88.60	1.66
	SA1- 平行 2	1.634	0.18	85.44	5.17
	SA2- 平行 1	1.634	0.18	87.66	2.71
	SA2- 平行 2	1.634	0.18	89.73	0.41
DMZ	标曲样品	2.265	-	71.34	-
	SA1- 平行 1	2.277	0.53	73.19	2.59
	SA1- 平行 2	2.275	0.44	76.32	6.98
	SA2- 平行 1	2.278	0.57	76.90	7.79
	SA2- 平行 2	2.275	0.44	76.42	7.12
RNZ	标曲样品	2.211	-	26.11	-
	SA1- 平行 1	2.212	0.05	25.38	2.80
	SA1- 平行 2	2.210	0.05	27.84	6.63
	SA2- 平行 1	2.214	0.14	26.73	2.37
	SA2- 平行 2	2.215	0.18	27.07	3.68
TNZ	标曲样品	5.188	-	30.78	-
	SA1- 平行 1	5.188	0	25.69	16.54
	SA1- 平行 2	5.189	0.02	27.32	11.24
	SA2- 平行 1	5.187	0.02	32.41	5.30
	SA2- 平行 2	5.190	0.04	33.50	8.84

参照标准规定, 各待测样品均记录 2 份平行处理样品中目标物的含量, 按公式 $RD = (|C1 - C2| / C \text{ 平均}) * 100\%$ 计算相对相差, 结果应不超过 20%, 结果如表 5 所示, 实际样品的双平行处理样相对相差均不高于 20%, 符合要求。

表 6 定量结果及相对相差

化合物	样品	含量 (ng/g)			双样相对相差 (%)
		平行 1	平行 2	平均值	
MNZ	SA1	7.86	7.62	7.74	1.81
	SA2	127.86	136.07	131.97	3.11
DMZ	SA1	6.75	6.55	6.65	1.50
	SA2	122.92	126.88	124.90	1.59
RNZ	SA1	8.22	7.67	7.95	3.52
	SA2	123.55	129.03	126.29	2.17
TNZ	SA1	7.76	7.33	7.55	2.91
	SA2	125.33	132.28	128.81	2.69

■ 结论

本文参考《农业农村部公告第 197 号 -1-2019 饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪，建立了饲料中甲硝唑、二甲硝唑、洛硝达唑和替硝唑的分析方法。样品中的硝基咪唑类药物经磷酸缓冲液提取，以 HLB 固相萃取柱净化后，吹干复溶过滤后进样分析。以保留时间和离子对相对丰度比为定性依据；空白样品处理后，加入不同浓度的标样，制作校准曲线，外标法定量。结果表明：方法定量限低于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，满足标准要求；在 10-5000 ng/mL 的线性范围内，各目标组分标点浓度准确度均在 88.9-111.6% 之间，R 不低于 0.9967；残留考察结果表明 5000 ng/mL 样品进样后无明显系统残留；空白样品添加不同浓度各目标组分后进行处理，检测结果满足标准关于定性和定量结果的要求。该方法灵敏度和准确度高，适合饲料中 4 种硝基咪唑化合物检测。

岛津应用云

