

LC-MS/MS 检测水产品中镇静剂类药物残留

LCMSMS-838

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定水产品中的镇静剂类药物残留量的方法。8种镇静剂在0.2 µg/L~100.0 µg/L浓度范围内线性良好，相关系数 r 在0.999以上。在高、中、低三个浓度下，化合物的保留时间和峰面积的RSD%分别在0.01%~0.10%和0.42%~9.19%之间，仪器精密度良好。加标浓度为1~10 µg/kg的样品回收率在89.7%~103.6%之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于水产品中镇静剂类药物残留量的准确定量检测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 水产品 镇静剂类药物

技术特点：

- ❖ 相较《水产品中镇静剂类药物多残留的测定 液相色谱串联质谱法》征求意见稿，本方法检测镇静剂类药物的灵敏度更高。
- ❖ 标准曲线的线性范围更宽，可适用于不同残留水平的水产品分析。

镇静剂能使动物机能恢复安定，防止狂躁，也能降低动物运输途中死亡率，但由于在动物组织中的残留周期长，人体间接摄入后对组织器官危害大，因此包括我国在内的许多国家和组织对镇静剂类药物在动物性食品中的使用和限量值作出了规定。如2020年我国农业农村部第250号公告《食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》中明确禁止使用安眠酮；GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定地西洋仅允许使用治

疗剂量，但在动物源性食品中不得检出。

我国现行有效的动物源性食品中镇静剂类药物残留检测标准相对较少。为了保障人们的食品安全，我们参考标准《食品安全国家标准 水产品中镇静剂类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》征求意见稿，建立了水产品中镇静剂残留的检测方法。该方法快速、简单、灵敏度高，可实现对水产品中镇静剂的有效检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 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：	SCL-40	自动进样器：	SIL-40C X3
输液泵：	LC-40B	质谱仪：	LCMS-8045
柱温箱：	CTO-40S	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机：	DGU-405		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：InertSustain AQ-C18 (100 mm×2.1 mm I.D, 1.9 µm)
岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 5020-89939

流动相：A相-0.1%甲酸水溶液, B相-乙腈

柱温：40°C 流速：0.25 mL/min

洗脱方式：梯度洗脱, 初始浓度为B相15%, 进样体积：5 µL
时间程序见表1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	15
5.00	Pumps	Pump B Conc.	95
7.00	Pumps	Pump B Conc.	95
8.00	Pumps	Pump B Conc.	15
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源	: ESI, 正离子模式	DL 管温度	: 250°C
接口电压	: 1.0 kV	加热模块温度	: 400°C
雾化气	: 氮气 3.0 L/min	接口温度	: 300°C
干燥气	: 氮气 10 L/min	扫描模式	: 多反应监测 (MRM)
加热气	: 空气 10 L/min	MRM 参数	: 见表 2
碰撞气	: 氩气 (230 kPa)		

表 2 MRM 参数

No	化合物	化学分子式	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE(V)	Q3 Pre Bias (V)
1	艾司唑仑	C ₁₆ H ₁₁ ClN ₄	29975-16-4	295.1	205.1	-11.0	-40.0	-22.0
					267.0*	-11.0	-25.0	-18.0
2	奥沙西洋	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	604-75-1	288.0	103.9*	-11.0	-37.0	-19.0
					242.1	-21.0	-22.0	-26.0
3	硝西洋	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	146-22-5	282.1	180.1*	-11.0	-40.0	-17.0
					207.1	-21.0	-36.0	-20.0
4	阿普唑仑	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	28981-97-7	309.1	205.1	-11.0	-41.0	-14.0
					281.1*	-11.0	-27.0	-19.0
5	劳拉西洋	C ₁₅ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂	846-49-1	321.0	75.1*	-11.0	-55.0	-14.0
					102.0	-10.0	-53.0	-19.0
6	三唑仑	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄	28911-01-5	343.1	239.0*	-10.0	-41.0	-16.0
					308.1	-10.0	-27.0	-22.0
7	安眠酮	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O	72-44-6	251.2	132.1	-18.0	-26.0	-12.0
					91.1*	-18.0	-43.0	-30.0
8	地西洋	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	439-14-5	285.1	154.1*	-11.0	-27.0	-15.0
					193.1	-21.0	-32.0	-19.0

* 表示定量离子

■ 样品前处理

称取试料 5 g (精确至 ± 0.05 g) 置于 50 mL 离心管中, 加入 1% 乙酸乙腈溶液 20 mL, 涡旋 30 s, 35°C 超声提取 10 min, 加入无水硫酸钠 5 g, 涡旋 1 min, 8000 r/min 离心 10 min, 移取上清液于 20 mL 离心管中, 40°C 氮气吹至近干, 加入乙腈 0.5 mL 溶解残渣, 加入水 5 mL, 备用。

HLB 固相萃取小柱 (60 mg, 3 mL) 用甲醇 5 mL、水 5 mL 活化, 取备用液过柱, 控制流速不超过 1 mL/min, 水 5 mL 淋洗, 乙腈 10 mL 洗脱。收集洗脱液, 40°C 氮气吹干。加入定溶液 0.50 mL (60% 乙腈水溶液含 0.1% 甲酸) 复溶, 加入 PSA 吸附剂 0.15 g, 涡旋 1 min, 8000 r/min 离心 10 min, 上清液过膜后供液相色谱 - 串联质谱仪分析。

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

1 $\mu\text{g/L}$ 镇静剂类药物的 MRM 色谱图如图 1 所示, 色谱峰分离良好, 通道无干扰。

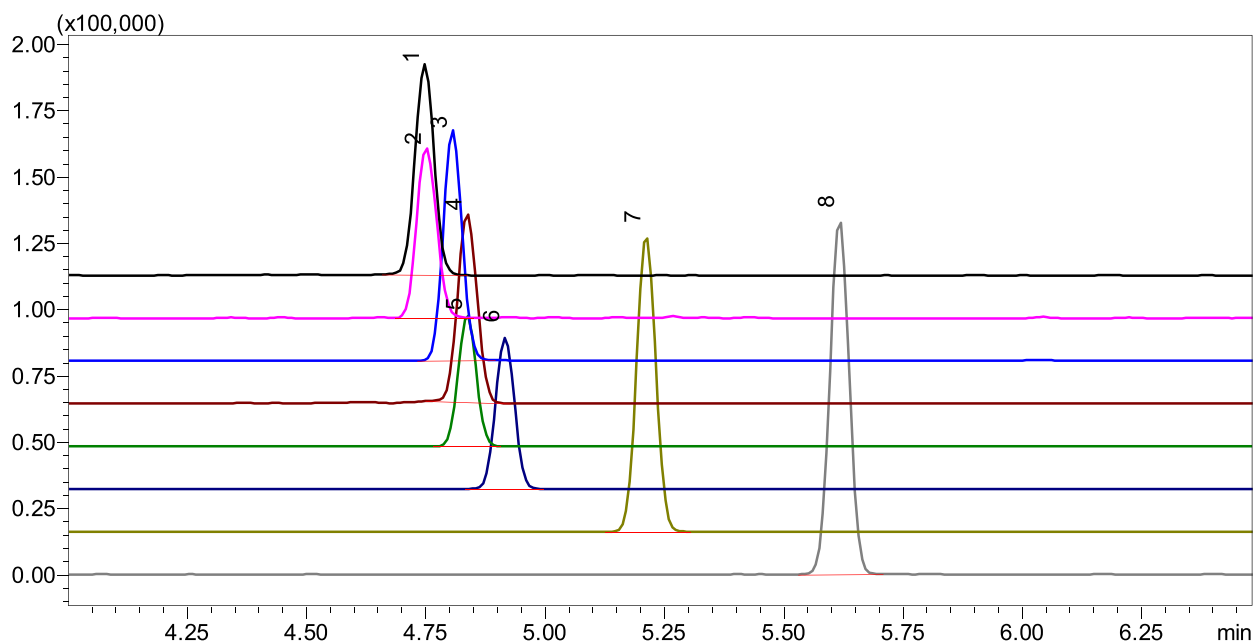


图 1 镇静剂类药物 MRM 色谱图 (1 $\mu\text{g/L}$)

(1、艾司唑仑; 2、奥沙西泮; 3、硝西泮; 4、阿普唑仑; 5、劳拉西泮; 6、三唑仑; 7、安眠酮; 8、地西洋)

3.2 校准曲线和检出限

选取空白样品按照 2 样品前处理步骤处理至氮气吹干, 分别加入系列标准工作溶液溶解残渣, 加入 PSA 吸附剂 0.15 g, 涡旋 1 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 制成浓度为 0.2、1、5、10、20、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的系列基质匹配标准溶液, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。以待测物特征离子峰面积为纵坐标, 相应的基质匹配标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 求回归方程和相关系数。根据 0.2 $\mu\text{g/L}$ 标样数据, 以 3 倍信噪比计算镇静剂类药物的方法检出限, 其结果如表 3 所示。

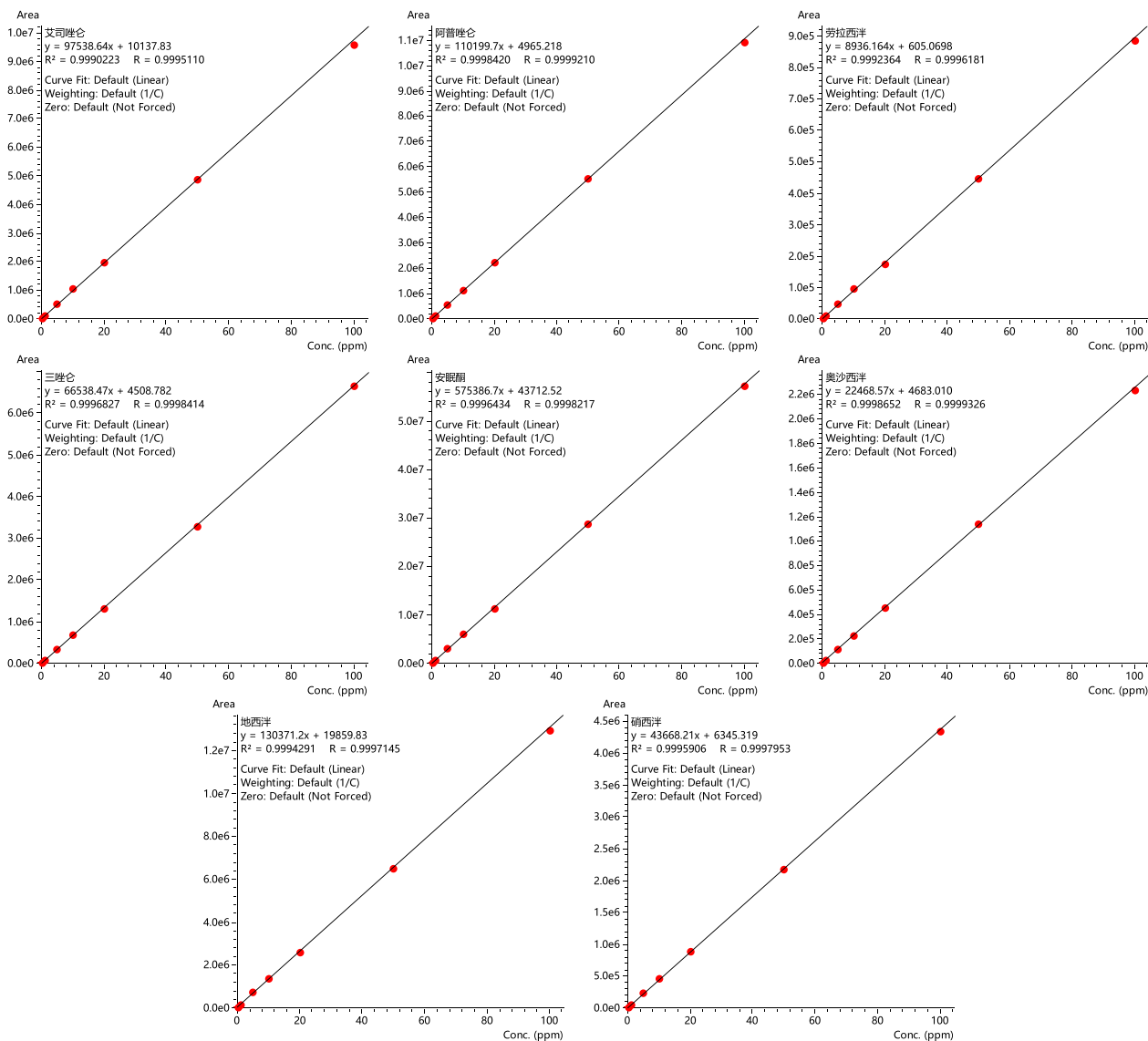


图 2 镇静剂类药物标准曲线

表 3 镇静剂类药物校准曲线及检出限

#	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	艾司唑仑	$Y = (97538.6)X + (10137.8)$	0.9995	75.2~108.8	0.02	0.06
2	奥沙西泮	$Y = (22468.6)X + (4683.01)$	0.9999	80.4~105.6	0.06	0.20
3	硝西泮	$Y = (43668.2)X + (6345.32)$	0.9998	82.7~110.5	0.02	0.07
4	阿普唑仑	$Y = (110200)X + (4965.22)$	0.9999	90.6~105.3	0.02	0.06
5	劳拉西泮	$Y = (8936.16)X + (605.070)$	0.9996	85.1~107.9	0.06	0.18
6	三唑仑	$Y = (66538.5)X + (4508.78)$	0.9998	87.1~108.7	0.02	0.07
7	安眠酮	$Y = (575387)X + (43712.5)$	0.9998	86.8~107.0	0.01	0.02
8	地西泮	$Y = (130371)X + (19859.8)$	0.9997	84.3~108.8	0.01	0.03

3.3 重复性实验

取 0.2、10 和 50 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 4。

表 4 镇静剂类药物保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No	化合物	RSD% (0.2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	艾司唑仑	0.02	2.44	0.09	0.90	0.08	0.44
2	奥沙西洋	0.04	9.19	0.10	2.08	0.08	0.76
3	硝西洋	0.02	4.70	0.09	1.10	0.08	0.81
4	阿普唑仑	0.02	5.22	0.09	1.43	0.07	0.70
5	劳拉西洋	0.08	4.59	0.09	3.32	0.07	1.89
6	三唑仑	0.02	4.13	0.09	1.33	0.07	0.57
7	安眠酮	0.01	3.89	0.09	1.00	0.07	0.44
8	地西洋	0.01	7.27	0.08	1.54	0.06	0.42

3.4 加标回收率

取未检出镇静剂虾肉 5 g，加入混标工作液，使加标浓度为 1、5 和 10 $\mu\text{g/kg}$ ，样品经提取及净化后，按照 1.2 中的分析条件测定 8 种镇静剂的加标回收率，平行测定 3 次，其回收率在 89.7%~103.6% 之间，具体结果见表 5。

表 5 镇静剂类药物回收率结果 (n=3)

No.	化合物	加标浓度 1 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 5 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 10 $\mu\text{g/kg}$	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	艾司唑仑	91.5	3.38	95.5	3.33	94.7	1.26
2	奥沙西洋	97.8	2.58	103.3	3.16	98.8	2.73
3	硝西洋	99.7	5.22	103.6	2.65	96.2	1.61
4	阿普唑仑	89.7	5.33	91.8	3.48	96.9	2.02
5	劳拉西洋	92.6	4.06	94.2	3.09	93.8	2.92
6	三唑仑	91.4	5.51	97.0	2.93	92.1	1.80
7	安眠酮	99.3	2.66	96.8	4.46	94.1	0.59
8	地西洋	96.2	3.39	98.5	5.06	102.6	5.84

■ 结论

依据食品安全国家标准《水产品中镇静剂类药物多残留的测定 液相色谱串联质谱法》建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定虾肉中镇静剂类药物残留的方法。8 种镇静剂在 0.2 $\mu\text{g/L}$ ~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.999 以上。加标浓度为 1~10 $\mu\text{g/kg}$ 的样品，回收率在 89.7%~103.6% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于水产品中镇静剂类药物残留量的准确检测。

岛津应用云

