

LC-MS/MS 检测猪肉中硝基咪唑类药物残留量

LCMSMS-888

摘要： 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定猪肉中的硝基咪唑类药物残留量的方法。4 种硝基咪唑类药物在 2~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上；8 $\mu\text{g/L}$ 基质加标溶液重复测定 6 次，各目标物的保留时间和峰面积的 RSD 值分别在 0.04%~0.09% 和 0.64%~3.41% 之间，仪器精密度良好；加标浓度为 4 $\mu\text{g/kg}$ 的样品，各目标物回收率在 82.8%~92.4% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于猪肉中硝基咪唑类药物残留量的准确定量检测。

关键词： 硝基咪唑 三重四极杆液质联用仪 猪肉

技术特点：

- ❖ 本方法检测硝基咪唑类药物的定量限不超过 0.31 $\mu\text{g/kg}$ ，低于 GB 31658.23-2022 要求的 1 $\mu\text{g/kg}$ ，灵敏度高。
- ❖ 相较于标准中 10 μL 的进样体积，本方案仅需 5 μL 进样即可实现高灵敏度分析，并且可减少了对仪器的污染。

硝基咪唑 (Nitroimidazoles) 类药物是一种抗厌氧菌和抗原虫的广谱抗生素，在养殖业中主要用于预防和治疗禽类的滴虫病和球虫病、猪的出血性下痢及动物的各种厌氧菌感染等。

据报道，硝基咪唑类药物及其代谢物对哺乳动物具有潜在的致癌、致畸和致突变性，因此在 2019 年 12 月 27 日，硝基咪唑在中国被列入食品动物中

禁止使用的药品及其他化合物清单。

本文参照食品安全国家标准 GB 31658.23-2022 《动物性食品中硝基咪唑类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了猪肉中硝基咪唑类药物残留量的检测方法。该方法快速、简单、灵敏度高，可实现对猪肉中硝基咪唑类药物的有效检测。

■ 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，配置为：

系统控制器：	SCL-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. 5.114
在线脱气机：	DGU-40S		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：	Shim-pack GISS (50 mm \times 2.1 mm I.D, 1.9 μm) 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-30048-01		
流动相：	A 相 -0.1% 甲酸水溶液, B 相 -0.1% 甲酸乙腈溶液		
柱温：	30 $^{\circ}\text{C}$	流速：	0.3 mL/min
洗脱方式：	梯度洗脱, 初始浓度为 B 相 5%,	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.	5
2.00	Pumps	Pump B Conc.	15
3.00	Pumps	Pump B Conc.	100
3.10	Pumps	Pump B Conc.	5
4.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI, 正离子模式

DL 管 温 度：150°C

接口温度：200°C

加热模块温度：400°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

加 热 气：空气 10 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

扫 描 模 式：多反应监测 (MRM)

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 Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	甲硝唑	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	443-48-1	172.1	128.2*	-12.0	-14.0	-22.0
					82.1	-29.0	-24.0	-28.0
2	甲硝唑 -D3	C ₆ H ₆ D ₃ N ₃ O ₃	83413-09-6	175.0	131.0	-12.0	-13.0	-23.0
3	羟基甲硝唑	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	4812-40-2	188.2	123.2*	-13.0	-13.0	-21.0
					126.2	-13.0	-16.0	-22.0
4	羟基甲硝唑 -D2	C ₆ H ₇ D ₂ N ₃ O ₄	-	190.0	125.2	-13.0	-13.0	-12.0
5	地美硝唑	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	551-92-8	142.0	96.0*	-10.0	-17.0	-16.0
					81.2	-10.0	-26.0	-28.0
6	地美硝唑 -D3	C ₅ H ₄ D ₃ N ₃ O ₂	64678-69-9	145.0	99.0*	-10.0	-18.0	-17.0
7	羟基地美硝唑	C ₅ H ₇ N ₃ O ₃	936-05-0	158.0	140.3	-11.0	-12.0	-26.0
					55.2*	-11.0	-19.0	-20.0
8	羟基地美硝唑 -D3	C ₅ H ₄ D ₃ N ₃ O ₃	1015855-78-3	161.0	143.0*	-11.0	-13.0	-25.0

* 表示定量离子

■ 样品前处理

2.1 提取

称取试料 2 g (精确至 ±0.05 g) 置于 50 mL 离心管中, 加 1 μg/mL 混合内标工作液 10 μL, 涡旋 30 s 混匀, 静置 10 min。加入乙酸乙酯 15 mL, 涡旋 2 min, 10000 r/min 离心 5 min。取上清液于另一 50 mL 离心管中, 残渣中加入乙酸乙酯 15 mL, 重复提取一次, 合并 2 次提取液, 于 25°C 水浴氮气吹干。

2.2 净化

残余物中甲 0.1 mol/L 盐酸溶液 5 mL, 涡旋 1 min 充分溶解, 加正己烷 5 mL, 振摇 1 min, 5000 r/min 离心 5 min, 弃正己烷层。下层再加正己烷 5 mL 重复除脂一次, 弃正己烷层, 备用。

混合型强阳离子交换反相相萃取小柱 (60 mg, 3 mL) 依次用甲醇 2 mL 和 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL 活化, 取备用液过柱, 依次用 0.1 mol/L 盐酸溶液 2 mL、甲醇 1 mL 和 2% 氨水 1 mL 淋洗, 用洗脱液 (甲醇 + 水 + 氨水 = 85+15+5) 2 mL 洗脱。收集洗脱液, 35°C 水浴氮气吹干, 残留物中加水 0.5 mL 涡旋 1 min, 滤膜过滤待测。

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

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

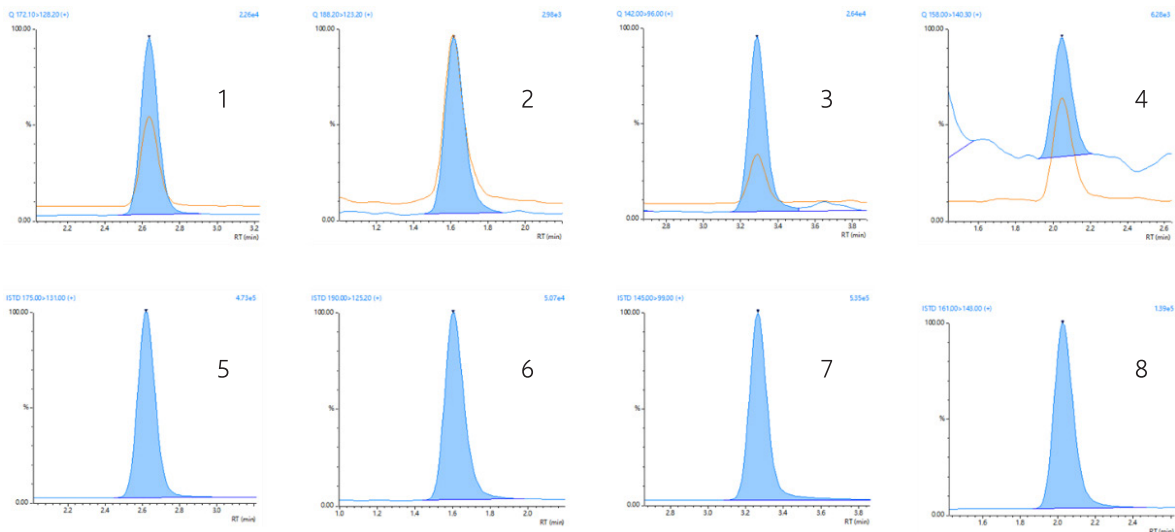


图 1 硝基咪唑类药物 MRM 色谱图 (目标物: 1 $\mu\text{g/L}$, 内标物: 20 $\mu\text{g/L}$)

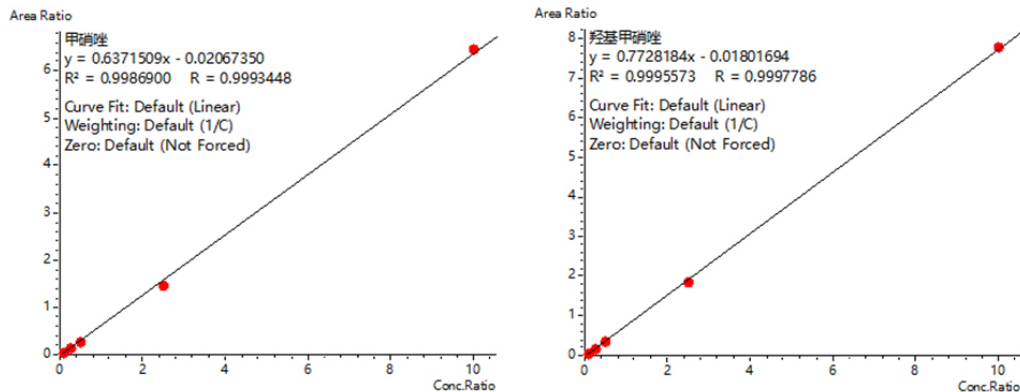
(1、甲硝唑; 2、羟基甲硝唑; 3、地美硝唑; 4、羟基地美硝唑;

5、甲硝唑-D3; 6、羟基甲硝唑-D2; 7、地美硝唑-D3; 8、羟基地美硝唑-D3)

3.2 校准曲线和检出限

取经提取和净化的空白试料溶液, 加入适量的混合标准工作液和 1 $\mu\text{g/mL}$ 混合内标工作液 10 μL , 35°C 水浴氮气吹干, 加水 0.5 mL 涡旋 1 min, 配制成浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 、4 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准溶液, 过滤后进样分析。以硝基咪唑类药物及其对应内标的特征离子峰面积之比为纵坐标, 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 1 $\mu\text{g/L}$ 基质加标样品数据, 以 10 倍信噪比计算硝基咪唑类药物的定量限, 其结果如表 3 所示。



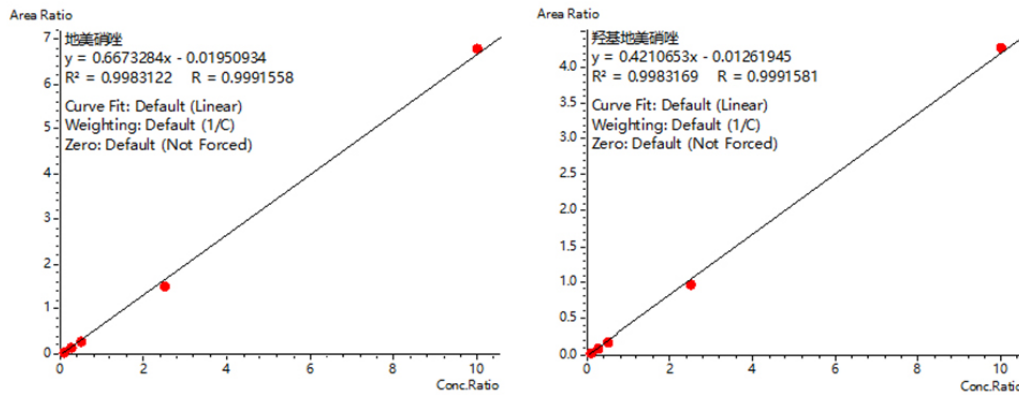


图 2 硝基咪唑类药物标准曲线

表 3 硝基咪唑类药物校准曲线及定量限

No.	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	仪器定量限 (µg/L)	方法定量限 (µg/kg)
1	甲硝唑	$Y = (0.6372)X - (0.0207)$	0.9993	93.5~105.9	0.11	0.03
2	羟基甲硝唑	$Y = (0.7728)X - (0.0180)$	0.9998	96.6~107.1	0.62	0.16
3	地美硝唑	$Y = (0.6673)X - (0.0195)$	0.9992	92.2~106.0	0.55	0.14
4	羟基地美硝唑	$Y = (0.4211)X - (0.0126)$	0.9992	91.8~108.8	1.25	0.31

3.3 重复性实验

取 8 µg/L 基质加标溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 4。

表 4 硝基咪唑类药物保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No	化合物	RSD(%)	
		R.T	Area
1	甲硝唑	0.04	1.95
2	羟基甲硝唑	0.05	1.73
3	地美硝唑	0.05	0.64
4	羟基地美硝唑	0.09	2.41

3.4 加标回收率

取未检出硝基咪唑的猪肉 2 g，加入混标工作液，使加标浓度为 4 µg/kg，样品经提取及净化后，按照 1.2 中的分析条件测定 4 种硝基咪唑的加标回收率，平行测定 3 次，其回收率在 82.8%~92.4% 之间，具体结果见表 5。

表 5 硝基咪唑类药物回收率结果 (n=3)

No.	化合物	加标浓度 4 µg/kg	
		回收率 (%)	RSD(%)
1	甲硝唑	82.8	4.04
2	羟基甲硝唑	89.8	3.72
3	地美硝唑	92.4	6.98
4	羟基地美硝唑	89.5	3.84

■ 结论

依据食品安全国家标准 GB 31658.23-2022《动物性食品中硝基咪唑类药物残留量的测定 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猪肉中硝基咪唑类药物残留量的方法。4种硝基咪唑类药物在 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上。加标浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品，回收率在 82.8%~92.4% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于猪肉中硝基咪唑类药物残留量的准确检测。

岛津应用云

