

高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量

黎翠玉, 吴敏*, 严丽娟, 曾三妹, 徐敦明, 周昱

(厦门出入境检验检疫局, 厦门 361026)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-电喷雾电离串联四级杆质谱测定动物源性食品中甲硝唑(MNZ)、地美硝唑(DMZ)、洛硝哒唑(RNZ) 3种硝基咪唑类化合物及2种代谢物羟基甲硝唑 MNZOH(甲硝唑代谢物)、1-甲基-5-硝基-2-羟甲基咪唑 HMMNI(地美硝唑代谢物)残留量的检测方法。**方法** 样品采用乙酸乙酯提取, 甲醇和正己烷分配除脂, 再经 HLB 固相萃取柱净化, 采用高效液相色谱-串联质谱法在选择离子监测(MRM)正离子模式(ESI⁺)下检测。**结果** 该方法在 0.1~100.0 μg/L 范围内具有良好的线性关系, 相关系数 $r > 0.99$ 。在添加水平为 0.1、0.5、10.0 μg/kg 时, 方法的回收率在 61.1%~108.0%之间, 相对标准偏差为 1.9%~6.3%; 定量下限(S/N=10)为 0.1 μg/kg。**结论** 该方法适合动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量的检测。**关键词:** 硝基咪唑; 高效液相色谱-串联质谱; 甲硝唑; 地美硝唑; 洛硝哒唑; 羟基甲硝唑; 1-甲基-5-硝基-2-羟甲基咪唑

Determination of nitroimidazoles and their metabolites in animal-borne food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Cui-Yu, WU Min*, YAN Li-Juan, ZENG San-Mei, XU Dun-Ming, ZHOU Yu

(Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen 361026, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple quadrupole tandem mass spectrometric (HPLC-MS/MS) method for the determination of metronidazole (MNZ), dimetridazole (DMZ), ronidazole (RNZ), hydroxyl metronidazole (MNZOH) and 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole (HMMNI) in animal-borne food. **Methods** Animal tissue samples were extracted by ethyl acetate, and the fat was removed by methanol-hexane distribution. The extract was cleaned-up by HLB SPE cartridge. Identification of nitroimidazoles and their metabolites was achieved by electrospray ionization tandem mass spectrometer under multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The calibration curves showed a good linearity in the range of 0.1~100.0 μg/kg with $r > 0.99$. The average recoveries of spiked samples at three spiked levels of 0.1, 0.5 and 10.0 μg/kg were between 61.1% to 108.0% with the relative standard deviations (RSDs) of 1.9%~6.3%. The limits of quantitation (LOQs) were 0.1 μg/kg for MNZ, DMZ, RNZ, MNZOH and HMMNI. **Conclusion** The method could be used to simultaneously confirm the multi-residue of nitroimidazoles and their metabolites in animal-borne food.

基金项目: 质检公益性行业科研专项课题(200910145); 厦门市科技计划项目(3502Z20092009、3502Z20112017)

*通讯作者: 吴敏, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测。Tel: 0592-3269943, E-mail: wum@xmciq.gov.cn

KEY WORDS: nitroimidazole; high performance liquid chromatography-electrospray ionization triple-quadruple tandem mass spectrometric; metronidazole; dimetridazole; ronidazole; hydroxyl metronidazole; 2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole

硝基咪唑类药物是一类抗菌素和抗原虫药(分子结构见图1),具有抗菌和抗原虫作用。主要用于预防和治疗特定病菌和原生动动物疾病,作为饲料添加剂广泛应用于畜牧业生产中。但由于硝基咪唑类药物含有的硝基杂环类化合物具有细胞诱变性,因此硝基咪唑类药物及其代谢产物具有潜在的动物致癌、致

畸、致突变作用和遗传毒性,其残留对动物源性食品安全构成了直接威胁,被许多国家列为违禁药物。美国和欧盟等国家都禁止硝基咪唑类作为饲料添加剂使用,中国也对硝基咪唑类药物进行了严格的控制,农牧发[2002]1号文件中就规定了在食品动物中禁用DMZ和MNZ^[1-2]。

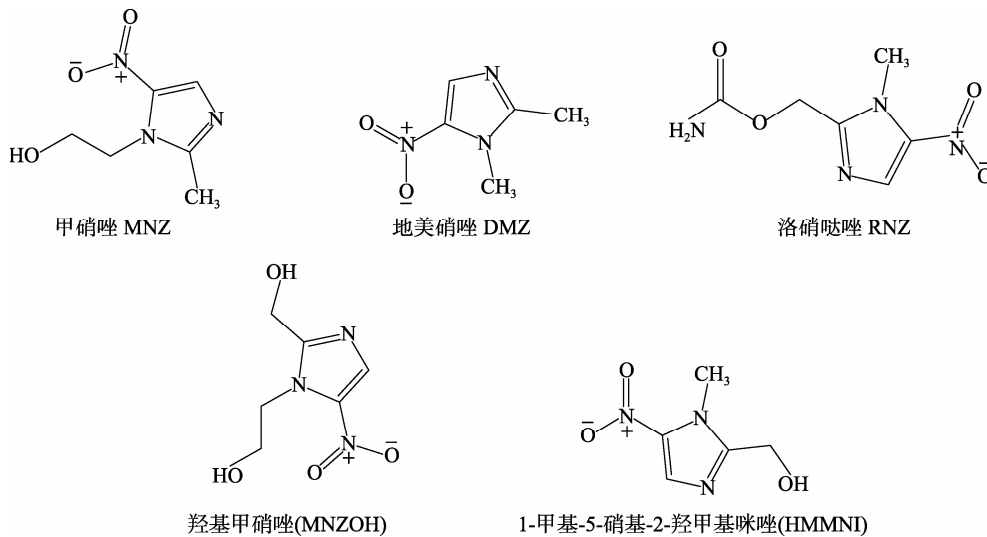


图1 MNZ、DMZ、RNZ、MNZO和HMMNI的分子结构式

Fig. 1 Molecular structures of MNZ, DMZ, RNZ, MNZO and HMMNI

目前,关于硝基咪唑类药物的检测方法主要有高效液相色谱法^[3-5]、液相色谱-质谱或串联质谱联用法^[6-9]、气相色谱法^[10]、气相色谱-质谱^[11]等。我国也制定了一些相关的检测标准^[12-14]。但大多检测限都相对较高,且仅检测其中一种或少数几种,同时测定上述5种化合物的方法鲜见报道。在各国都对硝基咪唑严格控制甚至不得检出的背景下,对方法的检测限有更高的要求。本文以3种经常在动物源性食品生产使用的硝基咪唑原药及其代谢物为目标分析物,以罗非鱼、冻猪肉、鸡肉为样品基质,建立了快速检测动物源性食品中的硝基咪唑类药物及其代谢物残留的高效液相色谱-串联质谱的方法,优化了前处理方法,较好地排除了样品的基质干扰。通过添加回收等途径来实现有效化学测量,从而表明该方法的有效性和可靠性。该方法检出限低、重复性好、定性可靠、定量准确,适合于生产过程的监控和进出口把关

检测的高灵敏度确证和定量分析。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

API5000型串联四级杆质谱仪(美国AB公司),配Agilent 1200 HPLC高效液相色谱仪(美国Agilent公司); Atlantis®T3色谱柱(2.1×150 mm, 3 μm)(美国Waters公司); Waters Oasis HLB小柱(美国Waters公司); 电动吸引器(天津市利迈豪工贸有限公司); 固相萃取装置(美国Supelco公司); 氮吹仪(美国Caliper公司)。

标准品甲硝唑(Metronidazole, MNZ)、地美硝唑(Dimetridazole, DMZ)、洛硝哒唑(Ronidazole, RNZ)、羟基甲硝唑(hydroxyl Metronidazole, MNZO)、1-甲基-5-硝基-2-羟甲基咪唑(2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole, HMMNI)均购自Dr. Ehrenstorfer, 纯

度 99 %。

乙酸乙酯、甲醇和正己烷均为色谱纯; 其他试剂为分析纯; 超纯水由 Milli Q 系统(美国 Millipore 公司)制得。

0.1 mol/L 磷酸缓冲液: 取 3.4 mL 磷酸于 1 L 容量瓶中, 用水定容至刻度并混匀。

市售鸡肉、罗非鱼和冻猪肉。

1.2 液相色谱与质谱条件

1.2.1 色谱条件

Atlantis®T3 色谱柱(2.1×150 mm, 3 μm)。流动相: 水(A)-乙腈(B); 梯度洗脱程序: 0~3 min, 流动相 B 由 0 线性增至 30%; 3~5 min, B 由 30%线性增至 80%; 5~7 min, B 由 80%线性降至 30%, 并保持 10 min; 流速为 0.25 mL/min。柱温: 30 °C; 进样量: 2 μL。

1.2.2 质谱条件

电喷雾电离源(ESI); 正离子扫描, 多反应监测(MRM); 离子源温度: 500 °C; 去簇电压 70 V, 入口电压 10 V, 出口电压 13 V; 锥孔反吹气流量: 350 L/h; 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂气流量: 750 L/h。其他质谱参数见表 1。

表 1 多反应监测扫描模式的质谱参数
Table 1 Multi-reaction monitoring scanning mode of mass spectrometry parameters

	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压 (DP)	碰撞电压 (CE)
甲硝唑 (MNZ)	172.2	128.0	30	18.4
		81.9	30	34.0
地美硝唑 (DMZ)	142.1	81.1	30	36.0
		96.1	30	22.6
洛硝哒唑 (RNZ)	201.2	140.2	25	16.5
		55.2	25	30.8
羟基甲硝唑 (MNZOH)	188.2	123.0	60	18.6
		126.1	60	24.9
羟甲基甲硝唑 (HMMNI)	158.2	55.0	60	24.7
		140.1	60	17.3

1.3 标准工作液的配制

分别准确称取各硝基咪唑类标准品 0.0100 g, 先用适量甲醇溶解, 再分别移入 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制成质量浓度为 0.1 mg/mL 的储备液, 将 MNZ、RNZ、DMZ、MNZOH、HMMNI 五种标准液按比例配制成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、100.0 ng/mL 的混标标准液, 于 4 °C 下避光保存。

1.4 样品前处理

1.4.1 提取

称取 10.00 g 已绞碎混匀的动物源性食品可食用部分, 加入 5 mL 磷酸缓冲液(pH=8.8)涡旋片刻后加入 20 mL 乙酸乙酯, 均质 1 min, 4000 r/min 离心 5 min 后, 收集上清液。试样残渣中再加入 20 mL 乙酸乙酯均质离心重复提取一次, 合并上清液, 于 45 °C 水浴中旋转蒸干。蒸馏瓶中加入 1 mL 甲醇溶解残渣, 再加入 5 mL 正己烷, 取下层液体(甲醇层)过 HLB 柱净化。

1.4.2 净化

HLB 柱用前依次用 3.0 mL 三氯甲烷、3.0 mL 甲醇、3.0 mL 磷酸溶液(pH=2.0)活化。活化好后, 取上述提取好的样品, 加 5 mL(pH=2.0)磷酸溶液溶解后, 直接加入 HLB 小柱中, 以自然滴速通过 HLB 柱, 待溶液全部流出后, 用真空泵抽干小柱。用 3.0 mL 乙腈洗脱, 收集洗脱液于离心管中, 氮吹至干, 用甲醇定容至 1 mL, 经涡旋后, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 滤液供 HPLC-MS-MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 提取和净化条件的优化

常用于硝基咪唑类药物的提取剂主要有甲醇、乙酸乙酯、乙腈以及一些混合提取剂。本研究分别采用乙酸乙酯和乙腈/氯仿/异丙醇(3 : 57 : 40, v : v : v)的混合液作为提取剂, 进行对比实验。结果表明: 采用乙腈/氯仿/异丙醇的混合液为提取剂时, 由于其极性很强, 会提取出较多的基体杂质, 给后续的净化与分析带来较多的干扰, 加标回收率比较低; 而乙酸乙酯作为提取剂效果最好, 回收率高, 杂质干扰少。由于硝基咪唑类药物对热有一定的敏感性, 在旋转蒸发步骤中过高的水浴温度将导致回收率偏低, 因此应尽可能在研究中利用低沸点的有机溶剂, 使旋转蒸发去除溶剂方便快捷, 最终确定乙酸乙酯为提取剂。因动物源性食品样品含有大量的脂肪等杂质, 试液最后用正己烷脱脂。

硝基咪唑类药物具有酸碱两性性质, 即在弱碱性条件下呈游离分子状态; 在弱酸性状态下呈质子化状态, 故在提取前向肌肉组织中加入弱碱性的磷酸盐缓冲溶液, 研究对比了 pH 范围从 6~10, 比较发现, 加入 pH=8.8 的弱碱性磷酸盐缓冲溶液的样品回收率最高, 远高于中性状态。

进一步应用固相萃取法对样品进行净化浓缩实验,比较 SCX 小柱和 Oasis HLB 小柱进行净化实验,结果发现,两种小柱均能起到较好的净化作用,但 SCX 小柱的回收率较低,最后选用了 Oasis HLB 固相萃取小柱,为了保持药物的稳定性,用酸调节溶液的 pH 值。本研究同时对洗脱液乙腈的体积进行了优化,当乙腈的体积为 3 mL 时即可完全洗脱,加大体积对回收率无明显改变。

2.2 色谱及质谱条件的优化

本研究选择电喷雾(ESI)离子源,在正离子模式下对 3 种原药及其代谢物,甲硝唑的内标进行一级质谱分析,确定了三种硝基咪唑类药物及其两种代谢物、一种同位素丰度较高的母离子,再对母离子进行二级质谱碎片离子扫描,得到碎片离子信息,获得二级质谱图。结果见下图 2。将质谱仪与液相色谱串联,对喷雾电压、离子源温度、碰撞气、入口电压、出口

电压、锥孔电压及碰撞能量等参数进行优化,以获得分子离子与特征碎片离子最大的灵敏度。图 2 显示优化条件下三种硝基咪唑类药物及两种代谢物混标提取离子图。从图 2 可以看出硝基咪唑类药物及两种代谢物出峰时间快,能够与干扰基质充分分离,有效地减轻了基质效应的影响,得到的离子流峰基本上没有基质干扰。

为在获得良好分离效果的前提下使出峰时间提前,对色谱柱的选择和流动相的配比及梯度条件进行了优化。按“1.2.1”梯度洗脱程序,样品的分离效果得到有效改善。本研究采用液相色谱-质谱联用,因此选择流速时必须考虑样品的离子化和离子化效率。理论上 ESI 源可承受 1 mL/min 的流速,且在低流速是离子化效果更好,因此在控制分析时间的条件下,经过研究比较,选择流速为 0.25 mL/min,有效地分离了杂质和目标物,空白样品的离子提取图见下图 3。

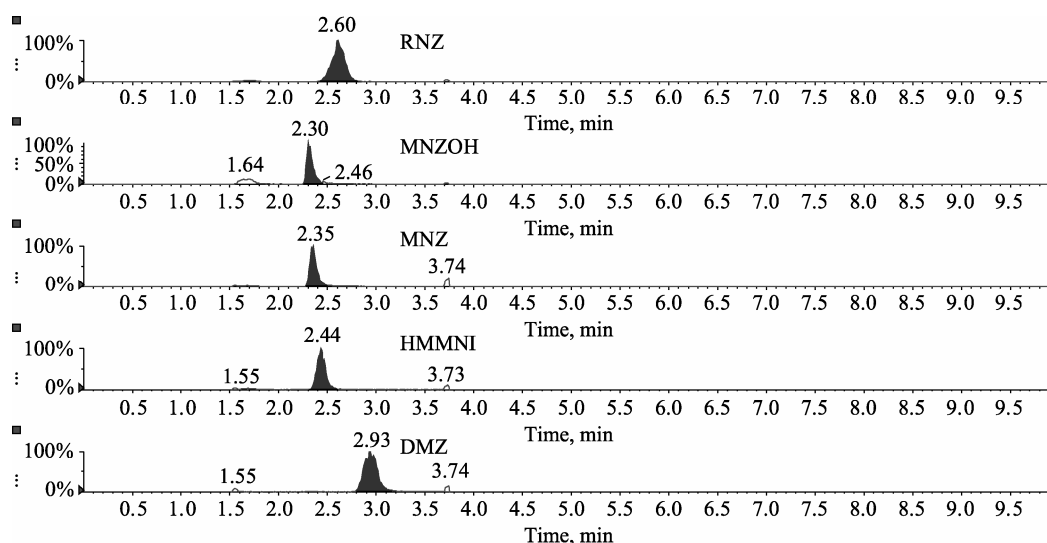


图 2 MNZ、DMZ、RNZ、MNZO 和 HMMNI 标准溶液的提取色谱图(5 $\mu\text{g/L}$)

Fig. 2 Chromatograms of MNZ, DMZ, RNZ, MNZO and HMMNI standard solution(5 $\mu\text{g/L}$)

2.3 线性关系和检出限

取一系列硝基咪唑类的标准工作溶液,在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定。以峰面积 Y 和对应的质量浓度 X ($\mu\text{g/L}$)绘制标准曲线。结果表明,在 0.1~100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内具有良好的线性关系,其线性方程和线性相关系数见下表 2。在空白样品中添加标准溶液,按信噪比(S/N)等于 10 计算,本方法的定量下限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.4 回收率和精密度

向空白组织中添加 0.1、0.5、10.0 $\mu\text{g/kg}$ 水平的

分析物,每个样品按上述方法重复测定 6 次,结果见下表 3。

表 2 线性方程和线性相关系数
Table 2 Linear equation and correlation coefficient

药物名称	线性方程	相关系数 r
洛硝咪唑(RNZ)	$Y=2.86e+0.05X$	0.9972
甲硝唑(MNZ)	$Y=7.33e+0.05X$	0.9905
地美硝唑(DMZ)	$Y=8.41e+0.05X$	0.9998
羟甲基甲硝咪唑(HMMNI)	$Y=2.41e+0.05X$	0.9949
羟甲基硝咪唑(MNZO)	$Y=2.77e+0.05X$	0.9982

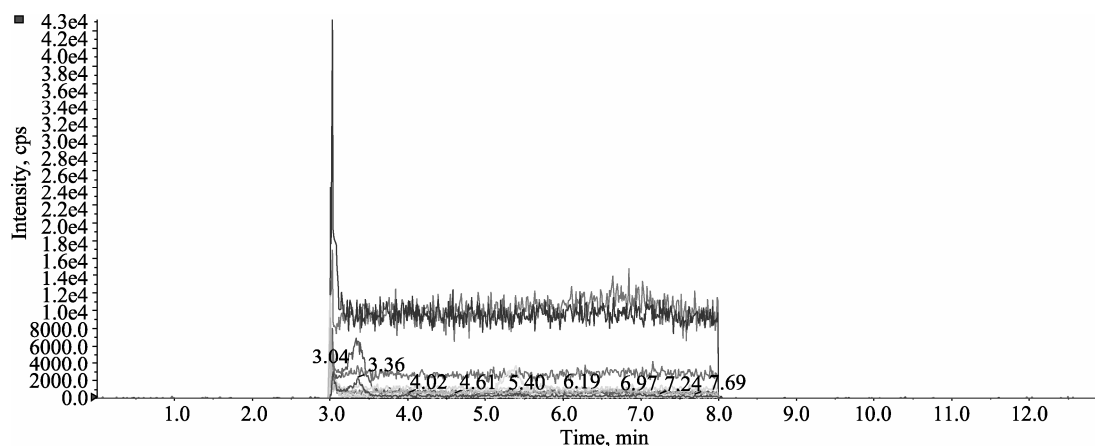


图 3 空白离子提取图

Fig. 3 Mass spectrogram for blank

表 3 方法的加标回收率和精密度

Table 3 Spiked recovery and relative standard deviation for the method ($n=6$)

药物名称	添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	猪肉		鱼肉		鸡肉	
		平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
洛硝哒唑 (RNZ)	0.1	63.6	5.4	68.3	6.3	64.2	5.1
	0.5	80.0	4.7	82.1	4.3	80.6	3.8
	10.0	98.1	3.8	95.8	3.0	92.2	5.5
甲硝唑 (MNZ)	0.1	61.1	5.8	63.8	5.0	67.9	5.7
	0.5	87.4	5.0	87.2	5.8	88.3	4.5
	10.0	92.0	4.7	95.5	3.2	91.3	3.7
地美硝唑 (DMZ)	0.1	65.2	6.1	67.4	6.3	64.3	5.9
	0.5	93.6	5.8	91.2	5.7	89.6	4.7
	10.0	95.7	4.4	108.0	4.2	97.3	2.4
羟甲基甲硝咪唑 (HMMNI)	0.1	70.4	5.8	70.2	4.8	69.7	4.1
	0.5	83.6	4.2	85.7	3.6	92.4	3.8
	10.0	90.0	3.1	95.9	2.6	99.9	2.7
羟基甲硝唑 (MNZOH)	0.1	70.1	6.2	72.2	5.7	68.2	4.9
	0.5	87.1	5.1	85.4	4.8	97.8	3.4
	10.0	97.4	3.8	93.5	3.4	102.4	1.9

从表 3 看出加样回收率在 61.1%~108.0% 之间, 相对标准偏差为 1.9%~6.3%; 表明该方法具有良好的回收率和精密度, 均能满足残留分析的要求。

2.5 实际样品分析

应用本法测定了当地及周边地区市场常见的罗非鱼、鸡脯肉、冻猪肉、冻牛蛙腿等 100 个样品, 其中 2 个牛蛙腿样品检出 MNZOH, 1 个罗非鱼样品检出 HMMNI, 含量为 0.1~60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其余样品未检出硝基咪唑类药物。

3 结论

本研究建立了一种高效液相色谱-电喷雾电离串联四级杆质谱、梯度洗脱的方式测定动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物的残留。方法的定量下限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在加标水平为 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 回收率在 61.1%~108.0% 之间, 相对标准偏差为 1.9%~6.3%。该方法简便、准确、快速、重复性好, 灵敏度高, 且方法的回收率、灵敏度和检出限均能满足

目前大多数日常监控和检测的要求。

参考文献

- [1] 尚彬如, 张丽英. 硝基咪唑类药物检测技术研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(1): 61-64 .
- [2] 傅国, 李宁毅. 硝基呋喃类和硝基咪唑类药物的研究进展[J]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(4): 486-488 .
- [3] 建忠, 项新华, 张跃, 等. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱检测法研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 700-703 .
- [4] 胡海燕, 徐倩, 孙雷. 鸡肉组织中硝基咪唑类药物及代谢物多残留检测高效液相色谱法研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(8): 9-12.
- [5] 吴美香, 欧阳吉德, 谭智言. 高效液相色谱法同时检测 4 种硝基咪唑类药物的研究[J]. 国际医药卫生导报, 2009, 15(17): 66-69.
- [6] 杨成对, 宋莉晖. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留的液相色谱串联质谱测定[J]. 分析测试学报, 2006, 25(4): 101-103.
- [7] 丁涛, 徐锦忠, 沈崇钰, 等. 高效液相色谱-串联质谱联用测定蜂蜜中 3 种硝基咪唑类残留[J]. 色谱, 2006, 24(4): 331-334 .
- [8] 刘玉芳, 朱万燕, 吴淑秀, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定盐渍羊肠衣中硝基咪唑类残留量[J]. 现代农业科技, 2010, 19: 14-15 .
- [9] 殷居易, 谢东华, 李佐卿, 等. HPLC-APCI(+)MS/MS 分析动物源性食品中的硝基咪唑类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2007, 26(3): 385-388, 392.
- [10] 刘波, 黄为红, 王金中. 气相色谱-电子捕获检测器同时检测硝基咪唑类药物[J]. 分析科学学报, 2008, 24(5): 586-588 .
- [11] 汪纪仓, 马素英, 王大菊, 等. 气相色谱-离子阱串联质谱法同时测定猪肌肉中硝基咪唑类药物残留[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39(12): 1772-1778 .
- [12] GB/T 20744-2006. 蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑残留量的测定 液相色谱-串联质谱法.
- [13] SN/T 1626-2005. 进出口肉及肉制品中甲硝唑、替硝唑、奥硝唑、罗硝唑、二甲硝咪唑、塞克硝唑残留量测定方法 高效液相色谱法.
- [14] NY/T 1158-2006. 动物性食品中甲硝唑残留的检测方法 高效液相色谱法.
- [15] Polzer J, Gowik P. Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2001, 761: 47-60.
- [16] Gaugain M, Abjean JP. High-performance thin-layer chromatographic method for the fluorescence detection of three nitroimidazole residues in pork and poultry tissue [J]. J Chromatogr A, 1996, 737(2): 343-346.

(责任编辑: 孙媛媛)

作者简介



黎翠玉, 助理工程师, 研究方向: 食品安全检测。

E-mail: licy@xmciq.gov.cn



吴敏, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测。

E-mail: wum@xmciq.gov.cn