

超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中的甲硝唑含量

王春民*, 张秋萍, 吴春霞

(苏州市疾病预防控制中心, 苏州 215004)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测蜂蜜中的甲硝唑含量。**方法** 取混合均匀的蜂蜜样品加入饱和氯化钠溶液混合, 再经乙酸乙酯提取, 经阳离子交换小柱净化。采用 UPLC-MS/MS 技术, 以多反应监测模式检测, 以外标法定量。**结果** 甲硝唑在 1~10.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.999, 回收率为 76%, 检出限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 相对标准偏差为 3.4% ($n=6$)。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 可用于蜂蜜中甲硝唑的检测。**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 蜂蜜; 甲硝唑

Determination of residues of metronidazole in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Chun-Min*, ZHANG Qiu-Ping, WU Chun-Xia

(Suzhou Center for Disease Control and Prevention, Suzhou 215004, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of metronidazole in honey samples by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (UPLC-MS/MS). **Methods** Honey samples were mixed with saturated sodium chloride and extracted with ethyl acetate, and then purified by cation exchange column. The metronidazole residues in the extracts were detected using UPLC-MS/MS (ESI+) with multiple reactions monitoring (MRM), and quantitated with external standard method. **Results** Metronidazole had a good linear relationship in the range of 1~10.0 $\mu\text{g/L}$ with the linear correlation coefficient larger than 0.999. The recovery was 76%, the limits of detection (LOD) was 0.1 $\mu\text{g/kg}$, and the relative standard deviation (RSD) was 3.4% ($n=6$). **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of metronidazole residues in honey samples.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric; honey; metronidazole

1 引言

甲硝唑(metronidazole, MTZ), 别名甲硝唑、灭滴灵, 化学名称 2-甲基-5-硝基咪唑-1-乙醇, 结构式见图 1, 是具有抗菌和抗原虫活性的硝基咪唑类抗菌药物(nitroimidazoles)。

MTZ 常用于预防、治疗家禽原虫病, 也用作促进牛、猪等动物生长的饲料药物添加剂^[1-5], 动物体内及相关产品中常有残留现象。硝基咪唑类对厌氧菌及原虫有独特的杀灭作用, 与其他抗生素联合应用于临床的各个领域^[6-8]。在目前情况下, 抗生素是控制动物细菌感染性疾病的主要手段。动物源

*通讯作者: 王春民, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: chunminwang@163.com.

*Corresponding author: WANG Chun-Min, Senior Engineer, Suzhou Center for Disease Control and Prevention, Suzhou 215004, China. E-mail: chunminwang@163.com

性食品抗生素残留,主要来源于治病、防病和饲料添加。从食品安全尤其是抗生素耐药性产生和传播的角度看,限制或者最终禁止在饲料产品中添加抗生素是未来发展趋势。1998年欧盟禁止MTZ使用于食品动物^[9],2002年美国食品与药物监督管理局禁止在进口动物源性食品中使用MTZ^[10]。2002年中华人民共和国农业部第193号公告^[11]规定,甲硝唑允许作治疗用,但不得在动物性食品中检出。蜂农在养蜂时会使用抗生素来防止蜜蜂生虫,保证蜜蜂健康。在农业部颁发的《无公害食品 蜜蜂饲养兽药使用准则》^[12]中规定,甲硝唑片禁止在采蜜期使用。有些蜂农在蜜蜂临近产蜜期,仍然使用抗生素,导致蜂蜜中残留甲硝唑。

常见的甲硝唑检测方法包括气相色谱法^[13,14]、液相色谱法^[15-18]、气质联用法^[19]以及液质联用法^[20-22]。本研究建立甲硝唑的超高效液相色谱-质谱法测定甲硝唑的方法,从而为蜂蜜中甲硝唑的监管提供技术支持。

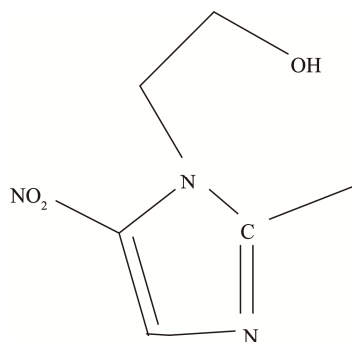


图1 甲硝唑结构式

Fig. 1 The structure of metronidazole

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UPLC-TQD 超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司); Multi Reax 振荡器(德国 Heidolph 公司); HHS 型电热恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);减压浓缩系统: RE-85C 旋转蒸发器(上海青浦沪西仪器厂); V-700 真空泵、V-855 真空控制系统(瑞士 Buchi 公司); Biofuge Stratos 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); N-EVAP-24 氮吹仪(美国 Organomation 公司)

氯化钠、乙酸乙酯、水硫酸钠、盐酸、氨水(分析纯,国药集团); 甲酸(HPLC 级,美国 ACS 公司); 甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司); 甲硝唑标准品(纯度>99%,购自中国计量科学研究院); 实验用水为超纯水; OASIS MCX 阳离子交换小柱(60 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司)

2.2 材料

样品来源为市售蜂蜜样品。将蜂蜜搅拌均匀,若过于粘稠可用不超过 60℃ 的水浴温热后再搅拌均匀,备用。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

准确称取约 10 g 蜂蜜样品(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 饱和氯化钠,振荡混匀,加入 15 mL 乙酸乙酯,振荡提取 20 min,超声 5 min,5000 r/min 离心 5 min,经无水硫酸钠柱收集上清液于 100 mL 鸡心瓶中。再加入 15 mL 乙酸乙酯重复提取,合并上清液于以上鸡心瓶中,50℃ 的水浴旋转蒸发至干。加入 4 mL 水溶解残渣,待上柱。

MCX 柱使用前依次用 3 mL 甲醇、3 mL 0.1 mol/L 盐酸、3 mL 纯水活化,保持柱体湿润;上样结束后,依次用 3 mL 0.1 mol/L 盐酸、2 mL 2% 甲酸:甲醇(95:5, V:V)、3 mL 水淋洗,抽干小柱 2 min,用 3 mL 甲醇:水:氨水(80:20:2, V:V:V)进行洗脱,洗脱液在 45℃ 下氮吹至近干,残留物用 5 mmol/L 甲酸:甲醇(9:1, V:V)定容至 1 mL,10000 r/min 离心 5 min 后上机测定。

2.3.2 标准溶液配制

标准储备液(0.10 mg/mL):准确称取甲硝唑 10.0 mg,用甲醇溶解并定容至 100 mL。

基质匹配标准工作液,以不含甲硝唑的蜂蜜样品基质溶液配制适当浓度的标准工作液。根据各点浓度,取适量 0.10 mg/mL 标准溶液于容器中,用氮气小心吹干,以样品基质溶液溶解定容,并使工作液系列浓度分别为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0 μg/L。该工作液应当天配制。

2.3.3 仪器条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇和水,流速 0.3 mL/min,柱温 35℃。梯度洗脱程序见表 1。进样量为 5 μL。

表1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	甲醇/%	水/%	曲线变化模式
0	35	65	6
1.5	80	20	6
1.6	35	65	6
1.9	35	65	6

(2)质谱条件: 采用 ESI+电喷雾电离源模式,毛细管电压(capillary)3.5 kV; 萃取锥孔电压(extractor)3.0 V; 源温度(source temp)150℃; 脱溶剂温度(desolvation temp)350℃; 脱溶剂气流速(desolvation gas flow)800 L/h; 四极杆低端分辨率(LM resolution): LM 1=LM 2=10.0, 四极杆高端分辨率(HM resolution): HM 1=14.4, HM 2=14.8; 扫描方式为多反应监测扫描模式(multiple reaction monitoring, MRM)。

3 结果与分析

3.1 前处理条件优化

3.1.1 样品制备过程优化

蜂蜜产品种类繁多,实验中样品粘度不一,有的蜂蜜

产品粘度很高, 不易混匀, 有的样品粘度较低, 相对容易混匀; 冬天温度较低时部分样品还会出现结晶。样品检测前, 应保证样品均匀。实验时, 可不断搅拌样品再取样, 也可用不超过 60 ℃ 的水浴温热搅拌均匀, 再取样。

3.1.2 样品净化过程优化

使用阳离子交换固相萃取小柱净化样品, 上样前小柱需用甲醇、甲酸溶液和水活化, 上样后流速不可太快, 可使样液自然滴下, 然后用酸、水淋洗, 最后用 3 mL 洗脱液洗脱, 洗脱时流速不可太快, 亦可用保持洗脱液自然流下, 以保证充分洗脱。洗脱液用 50 ℃ 砂浴吹干, 残留物中加入 1 mL 5 mmol/L 甲酸: 甲醇(9: 1, V: V), 涡旋 1 min, 以 10000 r/min 离心 5 min 后上机测定。若通过滤膜过滤需验证滤膜对待测组分的影响, 不同材质滤膜对不同化合物作用不同, 实验中需考虑溶质吸附溶剂溶解等情况。通常高速离心可以满足超高效液相上样要求, 本实验采用直接离心上样。

3.2 基质效应分析

由于蜂蜜样品基质复杂, 不同品种蜂蜜基质也不同, 进样后离子抑制效应明显, 且待测组分降低显著, 可以通过以下方法改善结果: (1) 增加保留时间。通过延长样品中待测组分在色谱柱上的保留, 使得干扰组分与其分离, 在离子化时干扰降低。(2) 稀释。采用稀释的方法降低干扰组分和待测物质的浓度, 从而避免严重的基质干扰, 但要以满足方法检出限为前提。(3) 同位素内标法。明显的离子抑制效应有时使得外标法不能准确定量, 同位素内标与待测组分性质相似, 色谱行为接近, 有条件时可选择同位素内标法校正结果。(4) 基质加标回收率曲线法。因不同

基质样品产生的基质效应不尽相同, 甚至相差悬殊, 此时可考虑采用基质加标回收率曲线法, 需要收集相同基质的空白样品, 在空白样品中加入标准溶液, 与样品一起前处理, 并做系列基质工作曲线。(5) 基质匹配加标法。用处理好的相同的空白样品基质溶液配制标准曲线, 因考虑本研究实验的可操作性, 本实验采用该方法处理。

3.3 扫描离子的选择

采用自动调谐模式, 调谐仪器参数, 找出最佳定性定量离子及锥孔电压碰撞能量等参数条件。用手动调谐方式确认并优化各项参数, 调谐结果见表 2。

表 2 MRM 检测参数
Table 2 Parameters of MRM

离子对	驻留时间(s)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
1: 172.0 > 82.0	0.146	31.0	25.0
2: 172.0 > 128.0*	0.146	31.0	13.0

3.4 线性范围、方法检出限和空白试验

当工作曲线各点浓度为 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 和 10.0 μg/L 时, 以外标面积法定量, 校正曲线方程为 $Y=821.668X+103.714$, 相关系数大于 0.999, 线性关系良好。在空白蜂蜜样品中加入适量甲硝唑, 并按 2.3.1 前处理, 按 2.3.3 仪器条件进行检测, 以 3 倍信噪比计算检出限为 0.1 μg/kg。空白实验时, 除不取样品外, 其他同样品处理, 在甲硝唑出峰处无干扰。

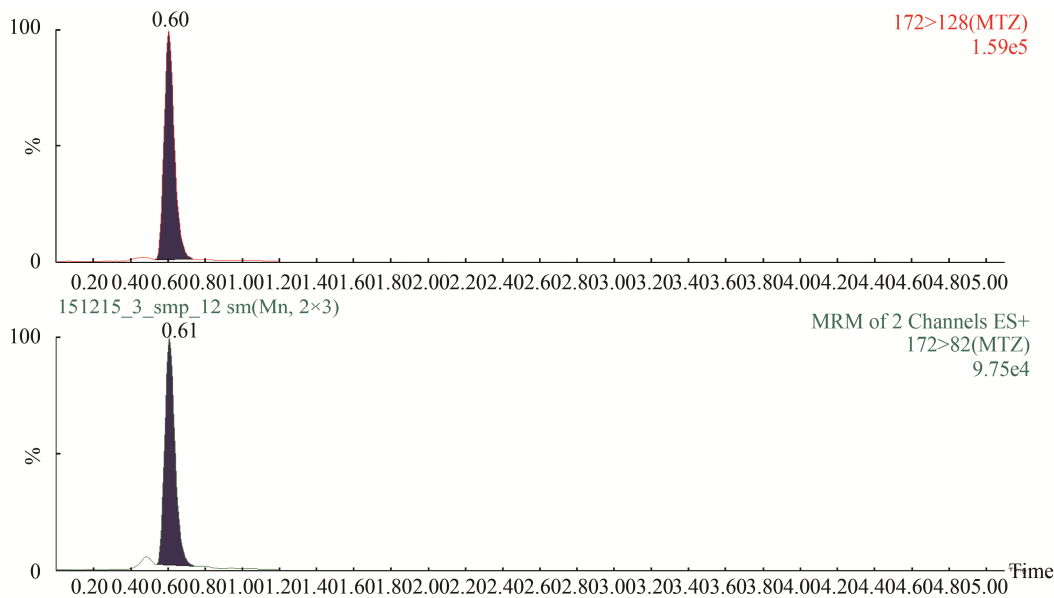


图 2 检出甲硝唑的蜂蜜样品的 MRM 质谱图
Fig. 2 MRM mass spectrums of metronidazole detected in honey samples
(上部分图谱 172>128 为甲硝唑定量离子对 0.60 min, 下部分图谱 172>82 为甲硝唑定性离子对 0.61 min)

3.5 方法的回收率和精密度

在蜂蜜样品中进行加标回收和精密度实验, 加入 10 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液 100 μL 时, 按照按 2.3.1 前处理, 按 2.3.3 仪器条件进行检测, 加标回收率为 76%。当蜂蜜样品中加入 10 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液 100 μL 重复 6 次测定, RSD 为 3.4%。

3.6 样品测定

按照本法共检测市售蜂蜜样品 65 份, 将样品按照 3.1.1 步骤制备均匀, 备用。按照按 2.3.1 前处理, 按 2.3.3 仪器条件进行超高效液相色谱/质谱联用仪检测。其中 6 个样品检出甲硝唑, 含量为 0.12~1.8 $\mu\text{g/kg}$, 检出率为 9.2%。实际蜂蜜样品中甲硝唑检出的 MRM 质谱图见图 2。

4 结 论

本研究采用超高效液相色谱-质谱联用技术能比较准确地快速地检测蜂蜜中甲硝唑的含量, 但不同蜂蜜样品基质效应使甲硝唑在质谱中存在不同程度的基质抑制效应。若使用外标法定量应尽量使用与待测样品基质相同样品作基质匹配工作曲线。还可以考虑将样品最终定容体积适当增大, 以降低基质浓度, 减少基质对甲硝唑在质谱上响应干扰, 且工作曲线做相同处理; 也可使用同位素内标法减少消除基质效应影响^[22]。蜂蜜样品粘度大, 用饱和氯化钠水溶液混匀, 再用乙酸乙酯提取, 有利于增加提取效率。本方法快速、准确、灵敏, 可以应用于蜂蜜样品中甲硝唑残留检测。

参考文献

- [1] 韩庆功, 崔艳红, 赵玉军. 免疫增强剂在鸡疫病防治中的应用[J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(2): 19-22.
- [2] 上官京, 雒秋江, 陈勇, 等. 添喂甲硝唑对绵羊瘤胃微生物区系和消化代谢的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2011, 34(4): 275-284.
- [3] 陈均, 樊家朋. 鸡盲肠炎肝病和大肠杆菌混合感染诊治浅析[J]. 农技服务, 2015, 32(6): 184.
- [4] 尹皓, 马晓平, 胡元雪, 等. 甲硝唑和替硝唑对幼犬肝功能的影响研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(6): 2459-2463, 2493.
- [5] 张要齐, 王俊丽, 孙雪峰, 等. 一种治疗母畜子宫内炎症凝胶剂的研制[J]. 中国动物保健, 2012, 14(1): 24-27.
- [6] 王小梅, 王雪梅, 戚桂杰, 等. 甲硝唑片联合苦参凝胶治疗细菌性阴道炎的临床疗效分析[J]. 中国生化药物杂志, 2015, (7): 128-132.
- [7] 刘亚丽. 甲硝唑联合莫西沙星治疗肺脓肿的临床探析[J]. 中国卫生标准管理, 2015, (5): 254-256.
- [8] 蒋新华. 甲硝唑栓联合倍美力治疗老年性阴道炎 49 例[J]. 中国药业, 2015, 24(21): 226-227.
- [9] EC. Commission Regulation No 613/98 [Z].
- [10] 晓林. FDA:进口动物食品禁用 11 种药物[J]. 中国家禽, 2002, 24(14): 47.
- [11] 中华人民共和国农业部第 193 号公告 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[Z].
- [12] 中华人民共和国农业行业标准 NY 5138-2002 无公害食品蜜蜂饲养兽药使用准则[Z].
- [13] 韩学静, 宋更申, 张毅, 等. 甲硝唑及注射液 2-甲基-5-硝基咪唑的 GC 测定[J]. 中国药事, 2009, 23(6): 535-537.
- [14] 刘波, 黄为红, 王金中. 气相色谱-电子捕获检测器同时测定硝基咪唑类药物[J]. 分析科学学报, 2008, 24(5): 586-588.
- [15] 艾霞, 王大菊. 蛋、奶中甲硝唑残留检测的高效液相色谱法研究[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(3): 266-269.
- [16] 罗文婷, 吴青, 简伟明, 等. 超高效液相色谱法测定水产品中违禁兽药氯霉素、呋喃唑酮和甲硝唑残留[J]. 分析化学, 2009, 37(6): 877-880.
- [17] Zhang YQ, Wang JL, Sun XF, et al. Preparation of gelata used to treat the endometritis in dam [J]. China Anim Health, 2012, 14(1): 24-27.
- [18] Wang XM, Wang XM, Qi GJ, et al. Curative efficacy analysis for metronidazole tablets combined with sophora gel in treatment of bacterial vaginitis [J]. Chin J Biochem Pharm, 2015, (7): 128-132.
- [19] Liu YL. Clinical study on metronidazole combined with moxifloxacin in treatment of lung abscess [J]. China Health Stand Manag, 2015, (5): 254-256.
- [20] Jiang XH. Metronidazole suppositories combined with premarin for treating senile vaginitis in 49 cases [J]. China Pharm, 2015, 24(21): 226-227.
- [21] Xiao L. FDA: 11 kinds of drugs to ban the import of animal food [J]. China Poultry, 2002, 24(14): 47.
- [22] Announcement No. 193rd of the Ministry of agriculture of the people's Republic of China. List of veterinary drugs and other compounds disabled in food animals [Z].
- [23] Republic of China on the use of non polluted food bees NY 5138-2002 Standard for the use of the people's Republic of China on the use of the standard of the people's [Z].
- [24] Han XJ, Song GS, Zhang Y, et al. Determination of 2-Methyl-5-nitroimidazole in metronidazole and its injection by GC [J]. Chin Pharm Aff, 2009, 23(6): 535-537.
- [25] Liu B, Huang WH, Wang JZ. Simultaneous determination of nitroimidazole by gas chromatography-electron capture detector [J]. J Anal Sci, 2008, 24(5): 586-588.
- [26] Ai X, Wang DJ. Development of a high-performance liquid chromatographic method for detection of metronidazole residues in eggs and milk [J]. J Huazhong Agric Univ, 2006, 25(3): 266-269.
- [27] Nuo WT, Wu Q, Jian WM, et al. Simultaneous Determination of illegal

- veterinary drugs of chloramphenicol, furazolidone and metronidazole in aquatic product using ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(6): 877–880.
- [17] 陆军, 庞燕军, 李彦博. 高效液相色谱法同时测定祛痘产品中6种抗生素及甲硝唑[J]. *色谱*, 2012, 30(6): 641–646.
- Lu J, Pang YJ, Li YB. Simultaneous determination of 6 antibiotics and metronidazole in acne removal products by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(6): 641–646.
- [18] 王虹, 刘克明, 支秀珍, 等. 高效液相色谱法测定口腔卫生用品中甲硝唑[J]. *环境与健康杂志*, 2001, 18(2): 108–110.
- Wang H, Liu KM, Zhi XZ, *et al.* Determination of metronidazole in articles for oral health by high performance liquid chromatography [J]. *J Environ Health*, 2001, 18(2): 108–110.
- [19] 陈琴华, 张进锋, 李鹏. 气相色谱-质谱联用测定复方口腔溃疡贴膜剂中甲硝唑含量[J]. *医药导报*, 2012, 31(8): 1065.
- Chen QH, Zhang JF, Li P. Determination of metronidazole in complex oral ulcer paster by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Her Med*, 2012, 31(8): 1065.
- [20] 王浩, 杨红梅, 郭启雷, 等. 液相色谱-串联质谱法快速同时测定婴幼儿配方乳粉中氯霉素、三聚氰胺、甲硝唑和洛硝达唑[J]. *分析化学*, 2013, 41(2): 283–287.
- Wang H, Yang HM, Guo QL, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, melamine, metronidazole, ronidazole in infant milk powder by LC-MS/MS [J]. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41(2): 283–287.
- [21] 刘华良, 李放, 杨润, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法分析化妆品中的常见抗生素及甲硝唑[J]. *色谱*, 2009, 27(1): 50–53.
- Liu HL, Li F, Yang R, *et al.* Determination of common antibiotics and metronidazole in cosmetics by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2009, 27(1): 50–53.
- [22] 张璐, 孔祥虹, 王茵, 等. 在线净化-超高效液相色谱同位素稀释串联质谱法检测蜂蜜中硝基咪唑类及其代谢物的残留[J]. *分析化学*, 2014, (12): 1735–1742.
- Zhang L, Kong XH, Wang H, *et al.* Determination of nitroimidazoles and their metabolites residues in honey by turboflow online purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isotopes dilution technique [J]. *Chin J Anal Chem*, 2014, (12): 1735–1742.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



王春民, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: chunminwang@163.com