

高效液相色谱-串联质谱联用测定蜂王浆中的 四种硝基呋喃类药物的代谢物

丁 涛¹, 徐锦忠¹, 沈崇钰¹, 吴 斌¹, 陈惠兰¹,
朱 春¹, 赵增运¹, 蒋 原¹, 刘 飞²

(1. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心 国家蜂产品基准实验室,
江苏 南京 210001; 2. 热电(上海)公司, 上海 201206)

摘要 :报道了高效液相色谱-串联质谱联用测定蜂王浆中呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃它酮4种硝基呋喃类药物的代谢物残留的方法。以三氯乙酸作为蜂王浆的蛋白质沉淀剂,同时提供衍生化反应所需的酸性环境;使用4种同位素内标,补偿了衍生化效率、衍生后样品溶液的pH值及光照对定量结果所产生的影响,极大地提高了定量的准确性。实验结果表明,呋喃它酮代谢物的检测下限可以达到0.03 μg/kg,其他3种硝基呋喃类药物的代谢物的检测下限可以达到0.05 μg/kg(*S/N*大于5);呋喃它酮代谢物的定量下限可以达到0.20 μg/kg,其他3种硝基呋喃类药物的代谢物的定量下限可以达到0.25 μg/kg(*S/N*大于10);线性范围为0.4~20 ng/mL,添加回收率为97.7%~104.8%(内标校正),相对标准偏差(RSD)为2.7%~9.7%。

关键词 :高效液相色谱;串联质谱;同位素内标;硝基呋喃类药物;代谢物;蜂王浆

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)05-0432-04 栏目类别 :研究论文

Determination of Metabolites of Nitrofurantoin Antibiotics in Royal Jelly by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

DING Tao¹, XU Jinzhong¹, SHEN Chongyu¹, WU Bin¹, CHEN Huilan¹,
ZHU Chun¹, ZHAO Zengyun¹, JIANG Yuan¹, LIU Fei²

(1. National Bee-Product Reference Laboratory, Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC)
of Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China;
2. Thermo Electron (Shanghai) Corporation, Shanghai 201206, China)

Abstract : Nitrofurans are a group of widely used veterinary antibiotics that have been banned in many countries. This has generated a great deal of interests and demands for assay of nitrofurans in animal food products. To our knowledge, this is the first time that a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method has been successfully developed for simultaneously analyzing the metabolites of four nitrofurantoin antibiotics (furalzolidone, furaltadone, nitrofurazone and nitrofurantoin) in royal jelly. Trichloroacetic acid solution was used both to precipitate proteins and to provide acidic reaction condition. Four isotope internal standards were utilized to improve the quantitative precision. The limits of detection (LODs) were 0.03 μg/kg for the metabolite of furaltadone and 0.05 μg/kg for the other three metabolites. The limits of quantitation were 0.20 μg/kg for the metabolite of furaltadone and 0.25 μg/kg for the other three metabolites. The linear range was 0.4–20 ng/mL for all the target analytes. The recoveries calibrated by internal standard were in the range of 97.7%–104.8% with the relative standard deviations (RSDs) of 2.7%–9.7%. It showed that this method could meet the requirements of national monitoring plan in China and the Minimum Required Performance Limits (MRPL) set by the European Union.

Key words : high performance liquid chromatography (HPLC); tandem mass spectrometry (MS/MS); isotope internal standard; nitrofurans; metabolites; royal jelly

蜂王浆是一种组成十分复杂的蜂产品,具有极高的营养和保健价值。但是抗生素的滥用,尤其是硝基咪唑类药物的使用,导致蜂王浆产品的质量受到了质疑。硝基咪唑类药物由于其对人体潜在的危害性^[1],已经被欧盟严令禁止使用^[2]。研究证明硝基咪唑类药物在脊椎动物体内会迅速分解,因此检测该类药物的稳定代谢物的方法已被广泛认可。目前,所报道的检测硝基咪唑类药物代谢物的方法均为液相色谱-质谱联用^[3-6]。由于王浆的基质复杂,无法采用国内外已公布的检测动物组织、水产品和蜂蜜产品的方法进行检测。

本研究利用三氯乙酸溶液作为蜂王浆中蛋白质的沉淀剂,加入4种同位素内标以提高定量的准确性,采用高效液相色谱-串联质谱测定了4种硝基咪唑类药物的代谢物。该法完全可以满足目前所有国家对该类药物的检测要求。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Thermo Finnigan Surveyor 液相色谱系统和 TSQ Quantum Ultra AM 串联质谱仪。甲醇(色谱纯)、三氯乙酸(分析纯)、乙酸乙酯(分析纯)、醋酸铵(色谱纯)、磷酸氢二钾(分析纯)、二甲基亚砜(分析纯)、邻硝基苯甲醛(NBA)(分析纯)。

标准工作溶液:咪唑啉酮代谢物(AOZ)、咪唑西林代谢物(SEM·HCl)、咪唑它酮代谢物(AMOZ)和咪唑妥因代谢物(AHD·HCl)均购买自 Sigma-Aldrich 公司(纯度 $\geq 98\%$),用甲醇配制成 1 mg/mL 的单标储备液,按实际检测需求,用流动相稀释为相应的混合标准工作溶液。

内标溶液:AHD-¹³C₃, AMOZ-D₅, AOZ-D₄, SEM-HCl-(¹³C,¹⁵N₂)质量浓度均为 100 μg/mL,均购买自 WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH 公司(纯度 $\geq 98\%$),用超纯水配制成 50 ng/mL 的混合标准溶液。

1.2 样品的前处理

称取 2.00 g 试样(精确到 0.02 g),置于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μL 50 ng/mL 的内标混合溶液、4 mL 水、2 mL 25% (质量分数)三氯乙酸溶液,于液体混匀器上快速混合 1 min,静置 10 min;以 2 500 r/min 的速率离心 5 min,转移上层清液于干净的 50 mL 玻璃离心管中,加入 150 μL NBA 溶液,置于 37 °C 水浴中振荡过夜(16 h)。取出样品,冷却到室温后,加入 4 mL 磷酸氢二钾(1 mol/L)缓冲溶液,调节样品溶液的 pH 至 7~7.5。加入 8 mL 乙酸乙酯,涡旋 30 s,以 2 500 r/min 的速率离心 5

min,取上层乙酸乙酯溶液到 10 mL 玻璃试管中,在 40 °C 水浴中用氮气吹干。用甲醇-0.5 mmol/L 醋酸铵水溶液(体积比为 5:95)定容到 1.0 mL,过 0.45 μm 的滤膜到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。系列标准溶液按照样品前处理方法同时和样品进行衍生化和提取。

1.3 液质联用测定条件

色谱条件 色谱柱:Agilent Extended C₈(5 μm, 150 mm × 2.1 mm i. d.)。流动相:A,0.5 mmol/L 醋酸铵水溶液;B,甲醇。梯度洗脱程序:0~6.0 min 20% A~60% A;6.0~8.0 min 60% A~60% A;8.0~9.0 min 60% A~80% A;9.0~9.1 min 80% A~20% A;9.1~10.5 min 20% A。流速:0.25 mL/min。柱温:室温。进样体积 20 μL。

质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测;源内诱导解离电压(SID):10 V。4种硝基咪唑类药物的质谱条件见表1。

表1 4种硝基咪唑类药物的质谱条件

Table 1 ESI MS/MS conditions of nitrofurans drugs

Metabolite ¹⁾	Parent ion(<i>m/z</i>)	Daughter ion(<i>m/z</i>) ²⁾	Collision energy/eV
AOZ	236.0	<u>134.0</u>	22
		104.0	14
AOZ-D ₄	240.0	<u>134.0</u>	23
SEM	209.0	<u>166.0</u>	18
		192.0	22
SEM-(¹³ C, ¹⁵ N ₂)	212.0	<u>168.0</u>	19
AHD	249.0	<u>134.0</u>	25
		178.0	16
AHD- ¹³ C ₃	252.0	<u>134.0</u>	24
AMOZ	335.0	<u>291.0</u>	18
		262.0	21
AMOZ-D ₅	340.0	<u>296.0</u>	20

1) AOZ: 3-amino-2-oxazolidinone, metabolite of furazolidone; SEM: semicarbazide, metabolite of nitrofurazone; AHD: 1-aminohydantoin, metabolite of nitrofurantoin; AMOZ: 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, metabolite of furaltadone. 2) Ions underlined represent the most abundant ions.

2 结果与讨论

2.1 影响因素的考察及内标的使用

在蜂王浆的前处理过程中,有3个因素会影响最后结果的准确性,实验中对其进行了考察。

2.1.1 衍生化反应效率

由于硝基咪唑类药物代谢物的相对分子质量相对较小,离子化效率低,特征离子碎片少,因此无法直接进行质谱测定,必须进行衍生化。一般采用 NBA 衍生化试剂,但是4种硝基咪唑类药物代谢物的衍生化效率不同(衍生化效率为 68%~75%),且相对不稳定($\pm 7.2\%$)^[3]。因此,在每批样品的处理

过程中,标准品和样品衍生化效率的不一致将会对定量结果的稳定性产生影响。4 种硝基咪唑类代谢物的衍生化示意图见文献[3,5]。

2.1.2 pH 值

在衍生化完成后进行萃取操作的时候,样品溶液的 pH 值对萃取效率有很大的影响(见图 1)。实验发现 pH 值为 7~7.5 时,AHD、AOZ、SEM 和 AMOZ 代谢物的衍生产物提取效率最高,分别为 92.1%、95.1%、91.4% 和 94.3%。在不同的 pH 条件下,4 种代谢物的衍生产物的萃取效率影响不一样。对于 AHD 而言,当 pH 为 8~10 时,萃取效率极低;对于 AMOZ 而言,当 pH 值为 3~5 时,完全不能将其从水相中提取至有机相中。AOZ 和 SEM 对 pH 的敏感程度不是很高,但是在弱碱性条件下(pH 7~7.5),提取效率最高。因此,在进行提取步骤的时候,需要进行比较准确的 pH 调节,才可以最大程度地提取 4 种代谢物的衍生产物。在进行大批量样品处理时,由于蜂王浆样品本身的酸度具有差异性,不可能做到对每一个样品的 pH 值进行精确调节。而且在萃取过程中有可能出现部分乳化的现象,影响整体萃取效率,对最后的定量结果产生影响。

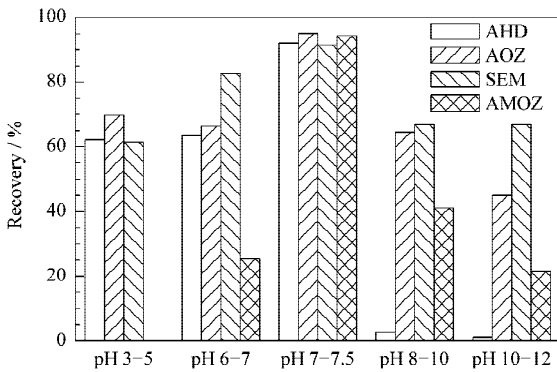


图 1 不同 pH 值范围对萃取效率的影响 (n = 10)
Fig.1 pH effect on extraction (n = 10)

2.1.3 光照的影响

硝基咪唑类药物代谢物的衍生产物对光敏感,因此在正常情况下需要在避光的条件下进行前处理。本研究将衍生化后的标准溶液(质量浓度为 10 ng/mL)放在室温正常灯光条件下,每隔一定时间,进行测定(n = 10),结果见图 2。实验发现 4 种代谢物的衍生产物对光的敏感程度不一。AHD 对光线最不敏感,在 0.5 h 到 7 h,AHD 的含量基本没有变化。而 AMOZ 对光线最为敏感,在暴露于灯光下 1.5 h 后,分解量接近于三分之一;而到 5 h 以后基本完全分解。AOZ 和 SEM 相对稳定,但是在放置不同时间后也出现了分解现象。因此在前处理过程中需要进行必要的避光处理。日常前处理过程中无

法对实验室进行完全避光处理,因此暴露在光照情况下进行前处理对最后的定量结果会产生影响。

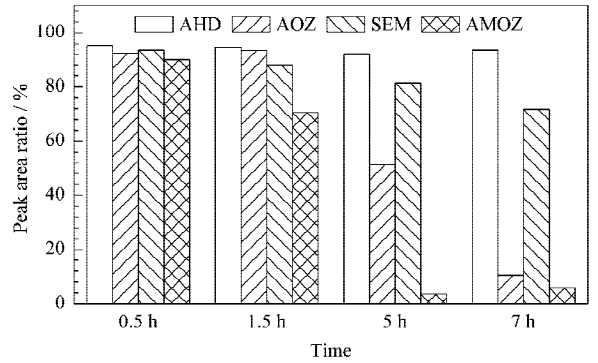


图 2 光照对标准溶液的影响 (n = 10)
Fig.2 Variation of standard solution under light (n = 10)

针对以上对最后定量结果产生影响的因素,实验中加入 4 种不同的同位素内标,可以很好地补偿上述 3 种因素对最后定量结果带来的偏差。

2.2 蛋白沉淀剂的使用

硝基咪唑类代谢物容易和动物组织中的蛋白发生键合作用,只有在酸性条件下才可以从蛋白组织中解离出来。目前所报道的方法[3-5]都是利用盐酸提供解离所需的酸性环境,但是添加回收实验证明盐酸无法将蜂王浆中的硝基咪唑类药物代谢物解离出来,4 种代谢物的回收率均不大于 5%。三氯乙酸是一种很好的蛋白沉淀剂,同时其较强的酸性又可以提供合适的酸性反应环境。实验中量取不同体积的 25% 三氯乙酸进行添加回收实验(硝基咪唑类药物代谢物的添加水平为 1 μg/kg),测定其绝对回收率(n = 5)(见表 2)。结果表明 2~4 mL 三氯乙酸可以较好地解决蜂王浆中的蛋白沉淀,同时将绝对回收率提高到 50% 以上,考虑到较少的三氯乙酸利于下一步调节样品溶液的 pH 值,因此将三氯乙酸用量定为 2 mL。

表 2 4 种硝基咪唑类药物代谢物在三氯乙酸用量不同时的回收率
Table 2 Effect of amount of trichloroacetic acid on recoveries of 4 nitrofurans metabolites

V(Trichloro-acetic acid)/mL	Recovery/%			
	AHD	AOZ	SEM	AMOZ
1	20 - 32	26 - 41	36 - 46	34 - 58
2	50 - 65	54 - 69	60 - 69	50 - 66
3	51 - 63	55 - 63	55 - 67	53 - 68
4	48 - 62	51 - 66	58 - 69	52 - 64

2.3 线性范围、检测限和定量限

配制质量浓度为 0.4~20 ng/mL 的系列标准溶液,按照样品的前处理方法进行衍生化和提取后,利用高效液相色谱-串联质谱进行测定。AHD, AOZ, SEM 和 AMOZ 的线性相关系数(r)分别为

0.993, 0.992, 0.996 和 0.994。在阴性蜂王浆基质中添加 4 种标准溶液(AMOZ 的添加水平为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AHD, AOZ 和 SEM 的添加水平为 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 经测定信噪比(S/N) 大于 5, 表明 AMOZ 的检测下限可以达到 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AHD, AOZ 和 SEM 的检测下限可以达到 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在阴性蜂王浆基质中添加 4 种标准溶液(AMOZ 的添加水平为 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AHD, AOZ 和 SEM 的添加水平为

0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) , 经测定信噪比(S/N) 大于 10, 表明 AMOZ 的定量下限可以达到 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AHD, AOZ 和 SEM 的定量下限可以达到 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4 回收率和精密度试验

选取阴性蜂王浆样品, 添加 4 种硝基呋喃类代谢物标准品和相应内标, 添加水平为 0.50 和 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 测定 3 d, 每 d 重复测定 6 次, 经内标校正后结果见表 3。色谱图见图 3。

表 3 回收率和精密度试验结果
Table 3 Results of recovery and precision test

Compound	Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Found/($\mu\text{g}/\text{kg}$ \bar{X} $n=6$)			Intra-day precision(RSD $n=6$)/%			Inter-day precision (RSD $n=3$)/%	Recovery/%
		day 1	day 2	day 3	day 1	day 2	day 3		
AHD	0.50	0.49	0.55	0.49	8.0	5.9	8.6	8.7	101.6
	1.00	1.06	1.06	1.02	3.2	3.8	4.5	4.2	104.8
AOZ	0.50	0.50	0.50	0.52	7.9	6.9	8.7	7.4	101.0
	1.00	1.02	1.04	1.04	3.1	5.4	5.1	4.6	102.4
SEM	0.50	0.48	0.49	0.49	8.3	9.7	9.3	8.4	97.7
	1.00	1.06	1.03	1.03	2.7	4.9	5.0	4.5	103.1
AMOZ	0.50	0.50	0.49	0.51	8.2	8.6	9.3	8.1	100.2
	1.00	1.02	1.02	1.02	4.7	3.8	5.2	4.3	101.6

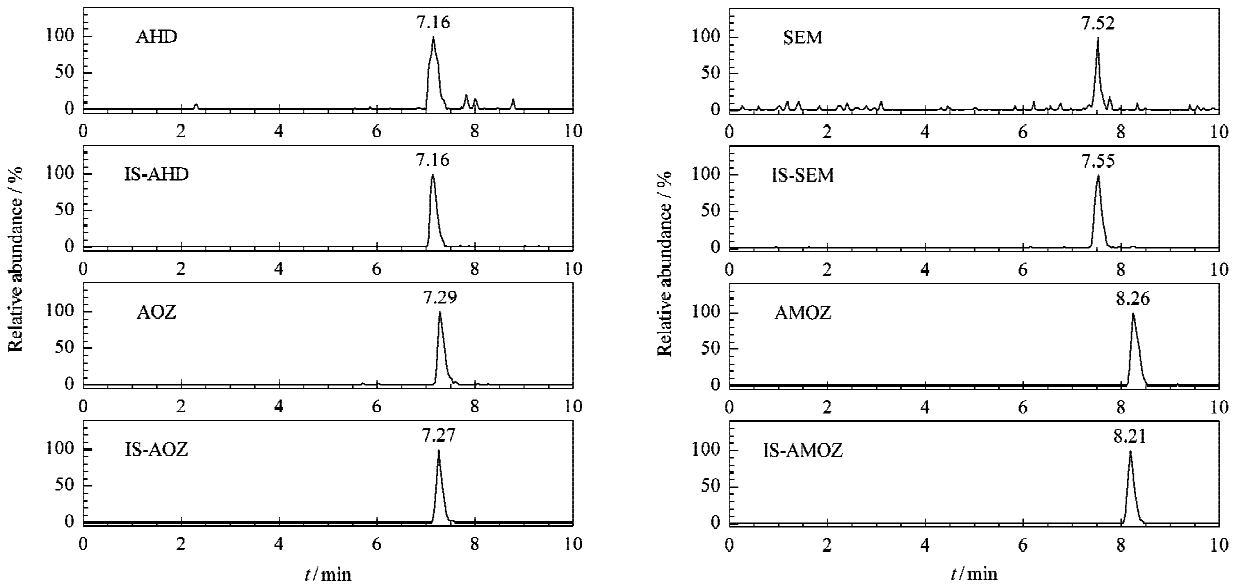


图 3 蜂王浆中添加 4 种硝基呋喃类药物代谢物及其相应内标的选择离子监测图

Fig.3 SRM chromatograms of a royal jelly sample spiked with 4 nitrofurantoin metabolites and their internal standards
Spiked level : 1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3 结论

建立了高效液相色谱-串联质谱测定蜂王浆中 4 种硝基呋喃类药物代谢物的检测方法。利用三氯乙酸沉淀蛋白和游离代谢物, 提供衍生化反应酸性环境。4 种同位素内标的使用补偿了前处理过程中对最后定量结果的影响。该方法完全可以满足目前国内外对该类药物的监控和检测要求。

参考文献:

- [1] George J D , Fall P A , Grizzle T B , Heindel J J. *Fundam Appl Toxicol* , 1996 , 34 : 56
- [2] Council Regulation (EEC) No. 2377/90. *Off J Eur Commun* , 1990 , L224/1
- [3] Leitner A , Zöllner P , Lindner W. *J Chromatogr A* , 2001 , 939 : 49
- [4] Khong S P , Gremand E , Richoz J , Delatour T , Guy P A , Stadler R H , Mottier P. *J Agric Food Chem* , 2004 , 52(17) : 5309
- [5] Jiang Yuan , Ding Tao , Shen Chongyu , Chen Huilan. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine* (蒋原, 丁涛, 沈崇钰, 陈惠兰. 畜牧与兽医) , 2005 , 37(3) : 12
- [6] Peng Tao , Chu Xiaogang , Yang Qiang , Li Gang , Li Jianzhong , Li Chongjiu. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (彭涛, 储晓刚, 杨强, 李刚, 李建中, 李重九. 分析化学) , 2005 , 33(8) : 1073