

液相色谱-串联质谱法快速测定蜂蜜中3种硝基咪唑类药物残留

刘永明*, 曹彦忠, 李金, 吴艳萍, 张进杰, 李学民, 葛娜

(秦皇岛出入境检验检疫局, 河北 秦皇岛 066004)

摘要 :建立了液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)快速测定蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑和二甲硝咪唑3种硝基咪唑类药物残留的分析方法。蜂蜜样品用水溶解后,直接上样至 Oasis HLB 固相萃取柱净化,依次用水和甲醇-水溶液(1:9, v/v)淋洗,用乙酸乙酯洗脱。洗脱液经浓缩、溶解、过滤后进行 LC-MS/MS 检测,外标法定量。在添加水平为 0.05 ~ 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均添加回收率为 76.6% ~ 89.7%,相对标准偏差($n = 8$)为 5.2% ~ 9.9%。甲硝唑的检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,洛硝哒唑、二甲硝咪唑的检出限均为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。应用所建立的方法对出口蜂蜜样品进行了测定,结果表明该方法操作简单、快速,结果准确、可靠,灵敏度和准确度满足现在日本和欧盟对蜂蜜中3种硝基咪唑类药物残留量的检测要求。

关键词 :液相色谱-串联质谱法;甲硝唑;洛硝哒唑;二甲硝咪唑;蜂蜜

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)06-0596-05

Rapid determination of 3 nitromidazole residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Yongming*, CAO Yanzhong, LI Jin, WU Yanping, ZHANG Jinjie, LI Xuemin, GE Na

(Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao 066004, China)

Abstract : A method was developed for the rapid determination of 3 nitromidazole residues in honey, including metronidazole, ronidazole and dimetridazole, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The honey sample was dissolved in water, and the solution was cleaned up with an Oasis HLB cartridge. The cartridge was washed with water and methanol-water solution (1:9, v/v) in turn, and eluted with ethyl acetate. The solution was concentrated and then analyzed by LC-MS/MS. External calibration was used for quantitative determination. The recoveries and relative standard deviations ($n = 8$) were from 76.6% to 89.7% and 5.2% to 9.9%, at the spiked levels of 0.05 - 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The limits of detection were 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for metronidazole, and 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ronidazole and dimetridazole. The method was successfully applied for the inspection of exported honey. With simple and fast sample preparation, the method is sensitive and specific for the determination. The sensitivity and accuracy of the method meet the requirements of the inspection for the 3 nitromidazole residues in honey in Japan and European Union.

Key words : liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); metronidazole; ronidazole; dimetridazole; honey

硝基咪唑类药物主要包括甲硝唑(metronidazole, MNZ, CAS: 443-48-1)、洛硝哒唑(ronidazole, RNZ, CAS: 7681-76-7)和二甲硝咪唑(dimetridazole, DMZ, CAS: 551-92-8)。其分子结构式见图1。它们的共同点是咪唑环上都有5-硝基取代基,但每种药物的N-1位或C-2位上的取代基

不同。

硝基咪唑类药物是抗菌素和抗原虫药,主要用于治疗牛、猪和火鸡组织中滴虫病、锥虫病、贾第鞭毛虫和巴贝西虫病等。特别是MNZ,在兽医学上用作抗锥虫病、抗滴虫病和抗阿米巴病药,也常用于治疗人的滴虫病。研究表明,MNZ具有致癌作用并可

* 通讯联系人:刘永明,研究员,主要从事食品检测技术研究。Tel: (0335)5308698, E-mail: qhdciqlm@yahoo.com.cn.

基金项目:国家质量监督检验检疫总局国家标准制定项目。

收稿日期:2009-12-19

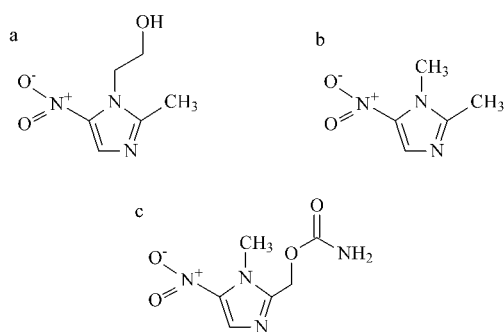


图 1 3 种硝基咪唑类药物的分子结构式

Fig. 1 Molecular structural formulae of 3 nitroimidazoles

a. metronidazole; b. dimetridazole; c. ronidazole.

能具有致畸作用。由于结构上相似,其他硝基咪唑类药物也能产生类似的作用。20 世纪 80 年代末以来,美国已经禁止硝基咪唑类药物用于食用动物的治疗^[1]。欧盟在其理事会指令 96/23/EC 和 EC 2377/90 中,也将硝基咪唑类药物列为 A 类禁用药^[2]。在随后颁布的规定中,规定了 DMZ 在所有食物产品中的最大残留限量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3],而 MNZ 和 RNZ 均不得被检出^[4,5]。2006 年 5 月 30 日,日本在食品检测中引入农业化学品残留物肯定列表制度,其中特别提到有 15 种农业化学品不得在任何食品中检出,而上述 3 种硝基咪唑类药物均在其中^[6]。日本和欧盟随后在蜂产品中都规定 MNZ 的最大残留限量为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,RNZ 和 DMZ 最大残留限量为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国农业部在 1999 年发布通告,禁止硝基咪唑类药物用于食用动物的治疗。国家质量监督检验检疫总局 2002 年发布的《关于加强出口蜂蜜残留物质监督检验的紧急通知》中,将 MNZ、RNZ 和 DMZ 3 种硝基咪唑类药物列入严格检验的项目。

丁涛等^[7]采用乙酸乙酯作为提取溶剂,浓缩后直接用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定了蜂蜜中 DMZ、MNZ、RNZ 残留,方法的检出限为 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Zhou 等^[8]同样用乙酸乙酯作为提取溶剂,浓缩后用乙酸乙酯和正己烷溶解,过氨基柱,高效液相色谱-紫外法测定了蜂蜜中 DMZ、MNZ、RNZ、TNZ (tinidazole, 替硝唑)、HMMNI (2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole, DMZ 的主要代谢物)残留,方法的检出限为 1.0 ~ 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前,在日常检验工作中我们采用的是国家标准分析方法^[9],即蜂蜜样品经乙酸乙酯提取后,过 BAKERBOND Carboxylic Acid 固相萃取柱净化,LC-MS/MS 测定蜂蜜中 MNZ、RNZ、DMZ 残留,方法的检出限为 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

以上几种方法均采用乙酸乙酯作为提取溶剂对蜂蜜中的硝基咪唑残留进行提取,在实际操作中,提取和浓缩步骤占用和消耗了大量的分析时间和有机溶剂。本文在以前研究的基础上,简化了样品的提取步骤,方法的检出限同样达到 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

3200 Q Trap 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(美国 Applied Biosystems 公司); M63210-33 漩涡混合器(美国 Thermolyne 公司); KDC-40 低速离心机(中国科大创新股份公司中佳分公司); N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司)。

MNZ、RNZ 和 DMZ 标准品(纯度 $\geq 98.5\%$,德国 Dr. Ehrenstorfen GmbH),甲醇、乙腈、乙酸乙酯(色谱纯,迪马公司),纯净水由 Millipore 公司的 Milli-Q 纯水系统制得。Oasis HLB 固相萃取柱(500 mg, 6 mL, 美国 Waters 公司)。

1.2 标准工作液的制备

MNZ、RNZ 和 DMZ 的标准储备液:准确称取适量的 MNZ、RNZ 和 DMZ 标准品,分别用甲醇配成质量浓度为 1.0 g/L 的标准储备液。储备液在低于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存 12 个月。

MNZ、RNZ 和 DMZ 混合标准工作溶液 A 和 B:根据需要吸取适量的 MNZ、RNZ 和 DMZ 标准储备液混合,用甲醇稀释成 MNZ 的质量浓度为 1.0 mg/L、RNZ 和 DMZ 的质量浓度均为 2.0 mg/L 的混合标准工作溶液 A。再吸取适量的混合标准工作溶液 A,用甲醇稀释成 MNZ 的质量浓度为 0.010 mg/L、RNZ 和 DMZ 的质量浓度均为 0.020 mg/L 的混合标准工作溶液 B。混合标准工作溶液 A 和 B 在低于 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存 6 个月。

MNZ、RNZ 和 DMZ 混合基质标准工作溶液:根据需要吸取适量的 MNZ、RNZ 和 DMZ 混合标准工作溶液 A 和 B,用空白样品提取液稀释成 MNZ 的质量浓度分别为 0.25、0.50、1.00、5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$,RNZ 和 DMZ 的质量浓度分别为 0.50、1.00、2.00、10.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合基质标准工作溶液。混合基质标准工作溶液现用现配。

1.3 样品前处理

称取 5.00 g 试样,置于 50 mL 具塞玻璃离心管中,加入 25 mL 水,在漩涡混合器上混匀,于 3000 r/min 转速下离心 5 min。将 Oasis HLB 柱依次用 5 mL 甲醇和 10 mL 水预处理后,上接筒形漏斗,筒

形漏斗口用脱脂棉塞住以防杂质通过。将样品溶液倒入筒形漏斗中,控制样液以 ≤ 3 mL/min 的流速通过 Oasis 固相萃取柱。用 5 mL 水洗涤离心管两次,均移至筒形漏斗中过柱。移去筒形漏斗,再用 10 mL 甲醇-水(1:9, v/v)分两次洗 Oasis HLB 柱,弃去全部流出液。在 65 kPa 的压力下抽干 60 min。之后用 10 mL 乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液于 15 mL 样品管中,用氮吹仪吹干。最后用 1 mL 水溶解,过 0.20 μm 滤膜,滤液供 LC-MS/MS 测定。

1.4 LC-MS/MS 条件

色谱柱:Atlantis T3(150 mm \times 2.1 mm, 3 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸水溶液(3:7, v/v);流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 20 μL 。

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压 5 500 V;雾化气压力:0.069 MPa;气帘气压力:0.069 MPa;辅助气流速 6 L/min;离子源温度:700 $^{\circ}\text{C}$;定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量见表 1。

表 1 3 种硝基咪唑药物的 MS/MS 参数

Table 1 MS/MS parameters of 3 nitromidazoles

Drug	Qualification ion (m/z)	Quantification ion (m/z)	Declustering potential/V	Collision energy/eV
Metronidazole	172.1/128.1	172.1/128.1	30	19
	172.1/82.1		30	34
Ronidazole	201.1/140.2	201.1/140.2	26	14
	201.1/110.1		26	20
Dimetridazole	142.2/96.1	142.2/96.1	40	22
	142.2/81.2		40	40

2 结果与讨论

2.1 提取及净化条件的优化

Oasis HLB 固相萃取柱填充了以聚苯乙烯/二乙烯苯为基质、含有亲水作用的吡咯烷酮基团的填料,其表面同时具有亲水性和疏水性基团,从而对各类极性和非极性化合物都具有一定的吸附作用。实验发现,蜂蜜样品用水溶解后,不需用乙酸乙酯提取,直接采用 Oasis HLB 固相萃取柱对蜂蜜中的硝基咪唑残留进行吸附和净化,净化效果同样可以满足 LC-MS/MS 测定硝基咪唑残留的要求,方法的检出限同样达到 0.1 ~ 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

由于蜂蜜的种类不同,所含的糖分和花粉区别很大,因此蜂蜜样品与水的体积比要恰当,并且在过柱前需要离心,且筒形漏斗口需用脱脂棉塞住,以免溶液过浓或花粉和其他杂质造成萃取柱堵塞,影响蜂蜜溶液通过固相萃取柱的速度。蜂蜜溶液过柱

后,需要对萃取柱进行淋洗以去除杂质和干扰物。

本方法对淋洗剂和洗脱剂的类型和用量进行了考察。在 4 个装有 20 mL 水的试管中分别添加 100 μL 质量浓度为 0.1 mg/L 的 3 种硝基咪唑的混合标准溶液,过已活化的 Oasis HLB 固相萃取柱。分别用 10 mL 甲醇-水(5:95, v/v)、10 mL 甲醇-水(10:90, v/v)、10 mL 甲醇-水(20:80, v/v)和 10 mL 甲醇-水(30:70, v/v)对固相萃取柱进行淋洗,收集淋洗液并对其进行 LC-MS/MS 测定。实验发现,只在甲醇-水(30:70, v/v)的淋洗液中检出少量的 MNZ,这说明低含量的甲醇水溶液是很好的淋洗剂。经过对各种不同品质的蜂蜜进行试验,本方法最终采用 10 mL 水和 10 mL 甲醇-水溶液(10:90, v/v)依次对萃取柱进行淋洗以除去糖分和水溶性杂质。对比了以甲醇和乙酸乙酯为洗脱剂的洗脱效果。实验选用颜色较深、干扰较多的荞麦蜜进行试验。在 2 个离心管中分别称量 5.00 g 荞麦蜜,均添加 100 μL 质量浓度为 0.1 mg/L 的 3 种硝基咪唑的混合标准溶液。上柱后,依次用 10 mL 水和 10 mL 甲醇-水溶液(10:90, v/v)洗脱柱后,抽干,Oasis HLB 固相萃取柱的颜色仍呈现棕色。然后分别用 10 mL 甲醇和 10 mL 乙酸乙酯洗脱。实验发现,用甲醇洗脱,柱中的棕色被洗脱下来,用氮气吹干后,试管中的颜色较为明显;而用乙酸乙酯洗脱下来的颜色很少,用氮气吹干后,试管中的颜色较浅。两者分别用 1 mL 水溶解并过滤膜后,对滤液进行 LC-MS/MS 测定,结果发现,以乙酸乙酯作洗脱剂时测定的干扰较少。另外,对乙酸乙酯的用量也进行了考察。先用 5 mL 洗脱剂洗脱,收集洗脱液;再分别用两个 5 mL 洗脱剂洗脱,收集洗脱液。实验发现,在第二个 5 mL 洗脱液中只检出少量的 3 种硝基咪唑类药物。故本文最终确定用 10 mL 乙酸乙酯洗脱萃取柱。

2.2 LC-MS/MS 条件的优化

MS 条件的优化采用注射泵直接进样方式,以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速将 MNZ、RNZ、DMZ 标准溶液分别注入离子源中,在正离子检测方式下进行一级质谱分析,得到每种硝基咪唑类药物的分子离子峰;对分子离子峰进行二级质谱分析(子离子扫描),得到碎片离子信息,获得二级质谱图。然后对去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)进行优化,使分子离子与特征碎片离子对强度达到最佳。将质谱仪与液相色谱联机,优化雾化气、气帘气、辅助加热气、离子源温度和电喷雾电压等参数,使每种硝基咪唑类药物离子化效率达到最佳。经过优化,MNZ 和 DMZ 选择的两个

离子对的灵敏度较高,定性结果的判定依据保留时间和两个离子对之间的比值;而RNZ的二级质谱图只有一个离子对 m/z 201.1/140.2 的灵敏度较高,定性离子对 m/z 201.1/110.1 的信噪比较低,对于低浓度如检出限水平的RNZ的确证主要依据保留时间和离子对 m/z 201.1/140.2。

2.3 线性关系和检出限

由于蜂蜜基质对3种硝基咪唑类药物的测定有基质减弱效应,对于它们的定量测定和线性范围的确,需要采用基质匹配标准曲线进行校正。根据每种硝基咪唑类药物的灵敏度,用蜂蜜样品的空白溶液配成一系列基质标准工作溶液,在选定的色谱条件和质谱条件下进行测定,进样量 $20 \mu\text{L}$,以峰面积(Y)对基质标准工作溶液中被测组分的质量浓度($X, \mu\text{g/L}$)作图,其线性范围、线性方程和线性相关系数见表2。

表2 3种硝基咪唑类药物的线性范围、线性方程和相关系数
Table 2 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients of 3 nitromidazoles

Drug	Linear range/ng	Linear equation	Correlation coefficient
Metronidazole	0.005 - 0.1	$Y = 6770X + 424$	0.9999
Ronidazole	0.010 - 0.2	$Y = 3380X + 644$	0.9994
Dimetridazole	0.010 - 0.2	$Y = 7150X + 341$	0.9999

Y : peak area; X : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

根据最终样液所代表的试样量、定容体积、进样量和进行测定时所受的干扰情况,以信噪比大于5为原则,确定MNZ的检出限为 $0.1 \mu\text{g/kg}$,RNZ和DMZ的检出限均为 $0.2 \mu\text{g/kg}$ 。蜂蜜基质中检出限水平的3种硝基咪唑在MRM检测模式下的色谱图见图2。

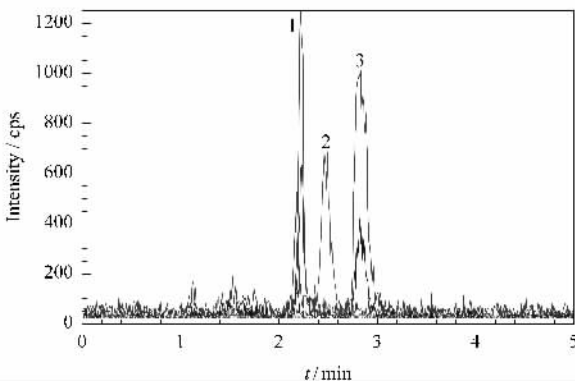


图2 蜂蜜基质中检出限水平的3种硝基咪唑类药物在MRM检测模式下的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of 3 nitromidazoles at the concentration of limits of detection in honey matrix in MRM mode

Peaks: 1. metronidazole; 2. ronidazole; 3. dimetridazole.

2.4 精密度和回收率

用不含MNZ、RNZ和DMZ的洋槐蜂蜜样品进行添加回收和精密度试验。样品中添加不同浓度水平的标准溶液后,摇匀,按所建立的方法进行处理和测定,方法的回收率和精密度见表3。从表3中的数据可以看出,回收率和相对标准偏差(RSD)均在国际食品法典农药残留委员会规定的良好实验室规范导则^[10]的要求范围内。

表3 3种硝基咪唑类药物的添加回收率和精密度(RSD, $n=8$)
Table 3 Spiked recoveries and precisions (RSD) of 3 nitromidazoles ($n=8$)

Drug	Added/($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/%	RSD/%
Metronidazole	0.05	84.6	7.2
	0.10	83.1	5.2
	0.20	76.6	6.6
	1.00	78.6	9.4
Ronidazole	0.10	81.5	9.9
	0.20	85.6	8.9
	0.40	84.7	9.6
	2.00	86.3	9.8
Dimetridazole	0.10	89.7	8.6
	0.20	87.1	8.5
	0.40	80.6	5.8
	2.00	82.2	6.3

采用本方法与国标方法对不同浓度水平的蜂蜜阳性样品进行对比实验,从获得的实验结果分析,两种检验方法测定的结果无明显的差别。

3 结论

本文建立了液相色谱-串联质谱法快速测定蜂蜜中3种硝基咪唑类药物残留的分析方法。该方法在简化了传统的操作程序的同时,降低了成本,减少了有机溶剂对环境的污染,实验更加快速、简单,结果准确、可靠,适用于实验室日常大批量样品的检测。由于未购买到硝基咪唑同位素标记物,所以本方法采用外标法进行定量测定。在有合适的内标物的条件下,我们将开展内标法定量的研究。

参考文献:

- [1] Sherri B T, Austin R L. Analytical Procedures for Drug Residues in Food of Animal Origin. Fujian Province Import Foodstuff Guild, transl. Tianjin: Tianjin Science and Technology Translation Press (Sherri B T, Austin R L. 动物源性食品中药物残留分析方法. 福建省进口食品行业协会,译. 天津:天津科技翻译出版公司), 1999: 119
- [2] Council Regulation (EEC) No. 2377/90. Off J Eur Commun, L224/1. (1990-06-26) [2009-12-11]. http://ec.europa.eu/enterprise/pharmaceuticals/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf
- [3] Commission Regulation No. 3426/93. Off J Eur Commun, L312/15. (1993-12-4) [2009-12-11]. <http://ec.europa.eu/>

- enterprise/sectors/pharmaceuticals/files/mrl/regpdf/1993_12_14-3426_en.pdf
- [4] Commission Regulation No. 1798/95. Off J Eur Commun , L174/20. (1995-7-25) [2009-12-11]. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/pharmaceuticals/files/mrl/regpdf/1995_07_25-1798_en.pdf
- [5] Commission Regulation No. 613/98. Off J Eur Commun , L82/14. (1998-3-18) [2009-12-11]. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/pharmaceuticals/files/mrl/regpdf/1998_03_18-0613_en.pdf
- [6] Japanese Ministry of Health , Labour and Welfare. Maximum Residue Limits of Agricultural Chemicals in Food. Volume of Agricultural Chemicals : Positive List System in Japan. General Administration of Quality Supervision , Inspection and Quarantine of the People 's Republic of China , transl. Beijing : Standards Press of China (日本厚生省. 食品中农业化学药品残留限量. 药品卷 : 日本肯定列表. 中国国家质量监督检验检疫总局, 译. 北京 : 中国标准出版社), 2006 : 1281
- [7] Ding T , Xu J T , Shen C Y , et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (丁涛 , 徐锦忠 , 沈崇钰 , 等. 分析化学), 2006 , 34(8) : 1206
- [8] Zhou J , Shen J , Xue X , et al. J AOAC Int , 2007 , 90(3) : 872
- [9] GB/T 20744-2006
- [10] CAC/GL 40-1993 , Rev 1-2003. Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis. [2009-12-11]. http://www.codexalimentarius.net/download/standards/378/cxg_040e.pdf