

HPLC - APC I(+)MS /MS 分析动物源性食品 中的硝基咪唑类药物残留量

殷居易, 谢东华, 李佐卿, 倪梅林, 章再婷,
房科腾, 陈树兵

(宁波出入境检验检疫局技术中心 食品安全分中心, 浙江 宁波 315012)

摘要: 运用高效液相色谱 - 大气压电离串联四极杆质谱 (HPLC - APC I(+)MS/MS) 内标法分析动物源性食品中多种硝基咪唑类 (nitroimidazoles) 药物——甲硝唑 (MNZ)、地美硝唑 (DMZ)、替硝唑 (TNZ)、洛硝唑 (RNZ) 的含量。样品添加氘代标示物 HMMN I- D³、IPZ - OH - D³ 后, 用乙腈提取, 通过 OASIS HLB C₁₈ SPE 柱净化, Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱分离, 采用梯度洗脱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈溶液; 大气压电离源正离子 MRM 模式检测: MNZ *m/z* 172.0/82.1, 172.0/128.0; DMZ *m/z* 142.0/81.1, 142.0/96.1; TNZ *m/z* 248.0/121.0, 248.0/93.1; RNZ *m/z* 201.0/140.0, 201.0/110.0; IPZ - OH - D³ *m/z* 189.0/125.0, 189.0/171.0; HMMN I- D³ *m/z* 161.0/58.0, 161.0/143.1。方法定量下限 (LOQ, S/N > 10) 0.2 μg/kg, 在质量浓度 0.2 ~ 25.0 μg/L 范围内, 峰面积与质量浓度成良好线性 (*r* > 0.999 1)。

关键词: 高效液相色谱串联四极杆质谱; 大气压电离源; 硝基咪唑类药物; 动物源性食品; 甲硝唑; 地美硝唑; 替硝唑; 洛硝唑

中图分类号: O657.63; S767.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)03 - 0385 - 04

Determination of Nitroimidazole Residues in Animal Food by Liquid Chromatography - Atmospheric Pressure Chemical Ionisation/ Tandem Quadrupole Mass Spectrometry

YN Ju-yi, XIE Dong-hua, LI Zuo-qin, NI Mei-lin, ZHANG Zai-ting,
FANG Ke-teng, CHEN Shu-bing

(Food Safety Testing Subsection, Inspection and Quarantine Technology Center, Ningbo Entry - Exit
Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Ningbo 315012, China)

Abstract: A method for the determination of nitroimidazoles including metronidazole (MNZ), dimetridazole (DMZ), tindazole (TNZ), ronidazole (RNZ) in animal food by HPLC - atmospheric pressure chemical ionisation/tandem quadrupole mass spectrometry has been developed. The sample was extracted with ethyle acetate after adding deuterium - marker (HMMN I- D³; IPZ - OH - D³), and was then clean-up through the OASIS HLB C₁₈ SPE column. The Waters Sunfire ODS C₁₈ was used as the chromatographic column, and a mixture of 0.1% aqueous formic acid and 0.1% formic acid in acetonitrile was used as the mobile phase in gradient elution. APC I in positive ion mode was used. The linear range of the calibration curve for nitroimidazoles was 0.2 - 25.0 μg/L with correlation coefficient of 0.999 1. The limit of quantification was 0.2 μg/kg.

Key words: HPLC - MS/MS; APC I; Nitroimidazoles; Animal foods; Metronidazole; Dimetridazole; Tindazole; Ronidazole

硝基咪唑类 (nitroimidazoles) 药物^[1-3] 是一类对厌氧菌和原虫有独特杀灭作用的化合物, 较普遍地用于畜禽等动物养殖领域。该类化合物主要包括甲硝唑 (metronidazole, MNZ)、地美硝唑 (dimetridazole, DMZ)、替硝唑 (tindazole, TNZ) 以及洛 (罗) 硝唑 (ronidazole, RNZ) 等 (见图 1)。由于该类化合物具有细胞诱变性、动物致癌毒性等潜在严重危害性的问题, 美国、欧盟以及日本等国家和组织早已将其列入动物源食品中禁止使用化合物清单^[4]。

收稿日期: 2006 - 04 - 04; 修回日期: 2006 - 10 - 30

基金项目: 宁波出入境检验检疫局科技资助项目 (甬 K07 - 2004)

作者简介: 殷居易 (1978 -), 男, 河北唐山人, 工程师, 硕士; 李佐卿, 联系人, Tel: 0574 - 81199698, E - mail: yinjuji@126.com

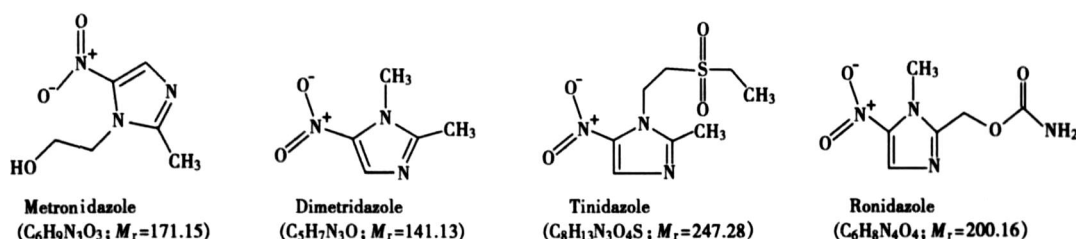


图 1 硝基咪唑类主要化合物的结构式

Fig. 1 The chemical structures of representative nitroimidazoles

目前,我国关于硝基咪唑类化合物的检测标准均采用 HPLC法。由于动物源性食品基质状况非常复杂, HPLC方法^[5]存在干扰。为排除干扰,提高鉴定的准确性,有必要采用 HPLC-MS法。

国内外学者采用液质联用^[6-9]对这类化合物所作工作并不多,且主要为电喷雾电离(ESI)源。采用液相色谱-串联质谱法同时测定家禽以及猪肌肉、蛋、蜂王浆中的硝基咪唑类药物残留最多为4种(DMZ, MNZ, RNZ和 HMMN I)。文献中很少有采用液相色谱配大气压电离源质谱法报道,仅 SAMSM J等^[10]作了一些工作。

本文运用 HPLC-APCI(+)MS/MS分析动物源性食品中硝基咪唑类药物残留量; APCI源是相对ESI源更温和的电离方式,非常适合硝基咪唑类多物质残留的测定,国内研究工作运用较少。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100液相色谱仪(安捷伦科技公司,美国),串联 APB000大气压电离源-三级四极杆质谱仪检测器系统(应用生物系统公司,美国);电子天平(PL2002型,中国上海),冷冻离心机(Sigma 3K30, Sigma公司),氮吹仪(Organomation Associates, 美国 Jnc 公司),台式分散仪(PTMR2100型,瑞士),真空旋转浓缩仪(BÜCHI公司,瑞士),超纯水器 Milli-Q (Millipore公司,美国),旋涡混合仪(Vortexgenie-2型,德国)。

甲醇、乙腈、正己烷、甲酸、乙酸均购于迪马公司(Dima Technology Inc.),分别为农残级和液相色谱纯;实验用水为去离子水;无水硫酸钠、中性氧化铝购于国药集团化学试剂公司,分析纯;固相萃取柱购于 Waters公司消耗品部(Oasis HLB; 500 mg/6 cc);甲硝唑(MNZ; CAS No. 443-48-1)、地美硝唑(DMZ; CAS No. 551-92-8)、替硝唑(TNZ; CAS No. 19387-91-8)、洛硝唑(RNZ; CAS No. 7681-76-7),以及内标物 HMMN I-D³(纯度不低于98%)、IPZ-OH-D³(纯度不低于98%)均购于北京百灵威化学消耗品公司。

1.2 储备液配制

准确称取 10.00 ± 0.01 mg各标准物质,用甲醇溶解于 10 mL棕色容量瓶中(可放置于超声波清洗器数分钟促进溶解),定容后配成 1.0 g/L的标准储备液;将储备液置于 0 °C 可调冰箱中保存备用。使用时用乙腈稀释至所需浓度,临用现配。

1.3 样品处理

称取约 5.0 g左右的动物组织样品(包括畜禽类猪、鸡肉样品;出口水产品小龙虾去壳肉等)于 50 mL离心管中,依次加入无水硫酸钠 1 g左右、中性氧化铝 2 g左右,用 20 mL乙腈经台式分散仪打浆处理;旋涡混合仪充分混匀 2 min,放入高速冷冻离心机离心 10 min(转速 5 000 r/min),吸取有机层,重复操作 1次,合并提取液,于旋转蒸发器浓缩近干,加入 0.1 mol/L的盐酸溶液 15 mL,充分混匀转溶(1 mol/L氢氧化钠和 0.1 mol/L盐酸调节 pH至 7.0~7.3)后用 OASIS C₁₈ SPE柱净化(先用 5 mL水、5 mL甲醇活化,上样后 10 mL水淋洗),经乙酸乙酯洗脱,收集至 15 mL离心管中,于氮吹仪挥干,加入 1 mL流动相,充分旋涡混合,经 0.45 μm滤膜过滤,直接 HPLC-MS/MS分析。

1.4 液相色谱与质谱条件

色谱柱: Waters Sunfire ODS C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 柱温: 25 °C; 流动相: 0.1% 甲酸水

溶液与 0.1%甲酸乙腈液, 初始体积比 98 : 2, 经 10 min过渡到 2 : 98, 保持 2 min, 再经 2 min恢复至初始比例, 保持 3 min; 流速 800 $\mu\text{L}/\text{min}$, 进样量 10 μL 。

MS/MS条件: 大气压电离 (APCI)源; 离子模式: 正离子化; 离子源雾化温度 (TEM) 450 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞气 CAD、气帘气 CUR、雾化气 NEB 流量分别为 6、6、12 mL/min ; 其他条件如表 1。

表 1 各化合物的测定条件

Table 1 Determination conditions of compounds

Compound	Retention time t/min	Parent ion/ Daughter ion	MRM ion abundance ratio	CE(碰撞能电压) V/V	DP(去簇电压) V/V	FP(聚焦电压) V/V	EP(吸入电压) V/V	CXP(碰撞电荷吸出电压) V/V
MNZ	7.59	172.0/82.1	1:3	35	39	200	10	15
		172.0/128.0*		22	39	200	10	15
HMMNI - D ³	7.82	161.0/58.0	1:4	32	34	100	12	13
		161.0/143.1*		24	34	100	12	13
RNZ	8.27	201.0/110.0	1:40	25	40	200	9	11
		201.0/140.0*		8	40	200	9	11
TNZ	8.87	248.0/93.1	1:5	28	48	200	14	25
		248.0/121.0*		25	48	200	14	25
DMZ	8.34	142.0/81.1	1:5	37	45	200	10	18
		142.0/96.1*		25	45	200	10	18
IPZ - OH - D ³	9.09	189.0/125.0	4:9	35	35	100	8	16
		189.0/171.0*		25	35	100	8	16

* quantification ion pair

2 结果与讨论

2.1 样品的提取、净化与色谱分离

目前在硝基咪唑类化合物的研究中, 对于该类化合物在动物体内的动力学代谢以及组织残留的研究不多, 国际上的相关测定要求中还没有明确规定该类药物需要监控的具有毒理作用的靶标代谢物。因此, 本实验不考虑因代谢物组织结合情况而需要酶促或酸、碱水解处理, 样品预处理过程较为简捷; 称取的动物样品量因此也可以允许较大量 (约 5.0 g)。样品在加入氘代内标物后经过如“1.3 的样品处理后可直接 LC - MS/MS 分析。分析结果见图 2。

2.2 MS 实验中 APCI 离子源的选择与应用

若使用 ESI 源则总离子流较弱, 一级质谱全扫描特征母离子响应不明显。通过改变方式, 将连续推注针阀 PEEK 管端与 HPLC 接色谱柱的 PEEK 管端以三通的连接方式共同导入所使用的 APCI 源 LC 入口, 设定 HPLC 四元泵以 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 且适合硝基咪唑化合物等度分离的流动相比例运行, 同时, 配吸有硝基咪唑类各主要分析物含量 $(5 \sim 10) \times 10^{-6}$ (w) 的单标, 连续推注针阀仍按常规方式以 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的速率工作。由于解决了单标药物溶液的持续供给 (ESI 方式不存在这个矛盾), 并通过提供适量且连续流动液, 再辅助以 150 $^{\circ}\text{C}$ 左右的雾化加热, 使得 APCI 电离方式得到较好应用。

2.3 LC - MS/MS 方法及参数优化

笔者认为由于离子化期间不可避免存在离子竞争和抑制, 故 LC 过程的充分分离对 MRM 过程离子对选择通过时的稳定和分析方法灵敏度的提高是有利的。实验表明, 0.1% 甲酸水溶液与 0.1% 甲酸乙腈液初始体积比 98 : 2, 经 10 min 过渡到 2 : 98, 能将性质很相近的替硝唑和洛硝唑较好分离。实验还对 LC 进样体积的变化 (10、20、50 μL) 对分析结果影响作了观察: 分别 10、20、50 μL 进样后, 各物质响应峰峰形严重变宽, 故 10 μL 为最优。

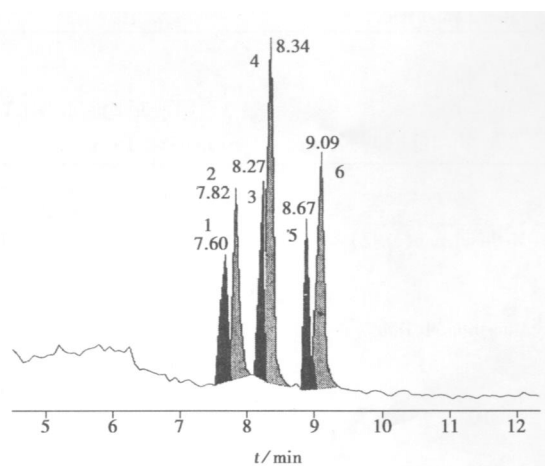


图 2 硝基咪唑类主要化合物 LC - APCI(+)MS/MS 总离子流色谱图

Fig. 2 The LC - APCI(+)MS/MS total ion chromatogram of representative nitroimidazoles

1. MNZ; 2. HMMNI - D³; 3. RNZ; 4. TNZ; 5. DMZ; 6. IPZ - OH - D³

在 APCI(+)模式下, 采用 MRM 多级反应监测采集数据, 得到各定性、定量离子及质谱参数, 如表 1 所示。

2.4 方法灵敏度、线性范围和回收率实验

由于液相色谱串联质谱仪分析中样品基质效应的存在, 以基质阴性样品加标处理分析后, 再以 $S/N = 3$ 求得该类化合物方法检出限 (LOD) 为 $0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$, 以 $S/N = 10$ 时求得该类化合物方法定量下限 (LOQ) 为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

取标准物质及氘代内标物储备液适量, 加入到样品 (分别添加 0.2 、 0.5 、 1.0 、 5.0 、 10.0 、 $25.0 \text{ ng}/\text{g}$) 后按“1.3 样品处理过程操作”。实验结果表明硝基咪唑类化合物在 $0.2 \sim 25.0 \mu\text{g}/\text{L}$ 范围内各物质的峰面积 (Y) 与质量浓度 (X , $\mu\text{g}/\text{L}$) 线性相关性良好。线性范围、线性方程以及相关系数见表 2。猪、鸡肉样品, 出口水产品小龙虾去壳肉基质样品的添加水平在 $0.2 \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 平均回收率为 $73\% \sim 93\%$, 日内、日间相对标准偏差小于 10% , 结果见表 3。

表 2 硝基咪唑类化合物的线性范围和线性方程
Table 2 Linear ranges and regression equations for Nitroimidazoles

Compound	Linear range $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	Regression equation	Correlation coefficient r
Metronidazole (MNZ)	0.2 ~ 25	$Y = 2.19 \times 10^3 X$	0.999 8
Dimetridazol (DMZ)	0.2 ~ 25	$Y = 3.51 \times 10^3 X$	0.999 6
Tinidazole (TNZ)	0.2 ~ 25	$Y = 1.76 \times 10^3 X$	0.999 1
Ronidazole (RNZ)	0.2 ~ 25	$Y = 4.14 \times 10^3 X$	0.999 7

表 3 提取平均回收率 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 和相对标准偏差 (RSD %) 数据

Table 3 Results of average recovery and repeatability for nitroimidazoles in the negative samples ($n = 9$)

Compound	Sample	Added $w/10^{-9}$	Average recovery	RSD
			$R/\%$	$s_r/\%$
Metronidazole (MNZ)	Chicken	0.2, 1.0, 5.0	79, 79, 86	4.2, 4.9, 4.9
	Pig	0.2, 1.0, 5.0	78, 84, 89	5.0, 4.7, 4.2
	Crayfish	0.2, 1.0, 5.0	74, 78, 90	4.9, 4.2, 4.1
Dimetridazol (DMZ)	Chicken	0.2, 1.0, 5.0	80, 76, 86	6.5, 6.5, 6.2
	Pig	0.2, 1.0, 5.0	76, 78, 87	6.3, 5.9, 5.8
	Crayfish	0.2, 1.0, 5.0	78, 80, 88	6.4, 6.3, 6.0
Tinidazole (TNZ)	Chicken	0.2, 1.0, 5.0	75, 81, 89	5.0, 5.1, 5.1
	Pig	0.2, 1.0, 5.0	73, 76, 88	6.0, 5.4, 5.1
	Crayfish	0.2, 1.0, 5.0	78, 86, 90	4.3, 4.8, 4.9
Ronidazole (RNZ)	Chicken	0.2, 1.0, 5.0	75, 77, 84	6.7, 6.2, 6.6
	Pig	0.2, 1.0, 5.0	73, 78, 87	5.9, 5.6, 5.1
	Crayfish	0.2, 1.0, 5.0	77, 77, 93	6.3, 6.0, 5.9

参考文献:

- [1] EIFEL P J, BROWN J M. Pharmacokinetics and toxicology of continuously infused nitroimidazoles[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1984, 10(8): 1311 - 1314.
- [2] VOOGD C E, VAN DER STEL J J, JACOBS J J. The mutagenic action of nitroimidazoles. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole and ronidazole[J]. Mutat Res, 1974, 26(6): 483 - 490.
- [3] 蔡芸, 陈志龙, 赵芳, 等. 硝基咪唑类抗肿瘤放射增敏剂研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2003, 12(4): 249 - 253.
- [4] Intermediary report - January 2003. Integrated approach for the control on residues of coccidiostats in eggs CP - 29 [EB/OL]. (2003 - 01) [2005 - 8] http://www.belspo.be/belspo/home/publ/pub_ostc/CP/CP29_en.pdf
- [5] HURTAUD - PESSER D, DELEPNE B, LAURENTIEM. Determination of four nitroimidazole residues in poultry meat by liquid chromatography - mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2000, 882(1 - 2): 89 - 98.
- [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, 刘飞, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱联用测定蜂王浆中的三种硝基咪唑类残留 [J]. 色谱, 2006, 24(4): 331 - 334.

(下转第 392 页)

表 2 杜仲叶、杜仲皮和杜仲保健品的分析结果 ($n=5$)Table 2 Analytical results of the ingredients in *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf, bark and related healthy food samples ($n=5$)

Ingredients	Leaf		Bark		Leaf tea		Bark tea		Health products	
	Found	RSD	Found	RSD	Found	RSD	Found	RSD	Found	RSD
	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$s_r/\%$	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$s_r/\%$	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$s_r/\%$	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$s_r/\%$	$w/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	$s_r/\%$
Rutin	1 150.0	3.9	24.0	2.2	440.0	3.0	1.3	2.1	11.0	3.5
Ascorbic acid	N. D. *		38.5	3.4	340.5	4.5	3.6	3.6	8.5	2.0
Hyperoside	90.5	3.2	12.0	3.6	90.2	2.6	0.22	4.7	1.75	3.9
Chlorogenic acid	6 346.8	1.7	976.0	2.9	20 810.0	4.2	21.5	2.6	57.0	2.6
Quercetin	56.8	2.0	N. D.		N. D.		N. D.		2.1	4.1

* N. D.: not detected

采用标准加入法对杜仲药材进行了回收率实验 ($n=5$)，5次测得的杜仲叶提取液中芦丁、抗坏血酸、金丝桃甙、绿原酸和槲皮素 5组分的平均回收率及回收率的 RSD 分别为 102% (3.8%)、97% (2.9%)、100% (1.8%)、96% (1.9%) 和 99% (2.0%)。5次测得的杜仲皮提取液平均回收率及回收率的 RSD 分别为 97% (2.2%)、95% (1.3%)、103% (4.5%)、96% (4.2%) 和 95% (2.4%)。实验结果表明了在上述优化条件下本实验方法的可行性。

参考文献:

- [1] CHU Y K, CHANG X C, TAKESHID, et al Endothelium-dependent vasorelaxant effects of the aqueous extracts of the *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and bark: implications on their antihypertensive action[J]. Vascular Pharmacology, 2004, 40: 229 - 235.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (一部) [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 131 - 132
- [3] 赵玉英, 耿权, 程铁民. 杜仲化学成分研究概况 [J]. 天然产物研究与开发, 1995, 7(3): 46
- [4] 晏媛, 郭丹. 杜仲叶的化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中成药, 2003, 25(6): 491 - 492
- [5] 成军, 赵玉英, 崔育新, 等. 杜仲叶黄酮类化合物的研究 [J]. 中国中药杂志, 2000, 25(5): 284 - 286
- [6] 刘宗林, 回九珍, 彭义交. 杜仲叶有效成分的提取 [J]. 食品科学, 2003, 24(8): 62 - 64
- [7] 王巧, 毕开顺, 田菁, 等. 反相高效液相色谱法测定杜仲绿原酸的含量 [J]. 河北医科大学学报, 2001, 22(1): 33 - 34
- [8] 石少澜, 王祝举, 邵爱娟, 等. 高效液相色谱法测定杜仲皮中绿原酸的含量 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(9): 715 - 716
- [9] 张敏, 李国章, 曹庸, 等. 荧光分析法测定杜仲叶总黄酮含量的研究 [J]. 光谱实验室, 2005, 22(1): 54 - 57.
- [10] 王宝华, 高增平, 江佩芬. 杜仲叶绿原酸的提取分离 [J]. 北京中医药大学学报, 2000, 23(4): 46 - 47.
- [11] 耿立威, 刘宏. 火焰原子吸收光谱法测定杜仲叶中 8 种元素的含量 [J]. 吉林师范大学学报 (自然科学版), 2004, 5(2): 89 - 90
- [12] 楚清脆, 傅亮, 林森, 等. 地骨皮中生物活性成分的毛细管区带电泳 - 安培检测方法研究 [J]. 分析化学, 2005, 33(11): 1611 - 1614
- [13] 曹志广, 丁祥欢, 叶建农. 维生素片中水溶性维生素的毛细管电泳 - 电化学法测定 [J]. 分析测试学报, 1999, 18(5): 57 - 59
- [14] YE J N, BALDWIN R P. Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode [J]. Anal Chem, 1994, 66: 2669 - 2674
- [15] 邓良, 袁华, 喻宗沅. 绿原酸的研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2005, 7: 4 - 6

(上接第 388 页)

- [8] XIA X, LIX W, SHEN J Z. Determination of four nitroimidazoles in poultry and swine muscle and eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Journal of AOAC International, 2006, 89(1): 94 - 99.
- [9] DAESELEIRE E, DE RUYCK H, VAN RENTERGHEM R. Rapid confirmatory assay for the simultaneous detection of ronidazole, metronidazole and dimetridazole in eggs using liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Analyst, 2000, 125(9): 1533 - 1535.
- [10] SAMS J, STRUTT P R, BARNES K A, et al. Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolite in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry [J]. Analyst, 1998, 123(12): 2545 - 2549.