

HPLC-APCI(+)-MS/MS 内标法测定水产品中的 3种硝基咪唑类药物残留量

冷凯良¹ 孙伟红¹ 王志杰¹ 刘艳萍² 翟毓秀¹ 王瑜²

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海水产大学, 201306)

摘要 建立了水产品中3种硝基咪唑类残留量的 HPLC-APCI(+)-MS/MS 测定方法。以氘代二甲硝唑(DMZ-D3)作为内标,以乙酸乙酯提取水产品中残留的硝基咪唑类药物,采用 HPLC-MS/MS 多反应监测(MRM)正离子模式测定,可一次对水产品中的 MTZ、DMZ 和 RNZ 进行定性和定量。该方法简便快捷,适合大批量样品处理。方法简化了样品前处理过程,省去固相萃取步骤,具有操作简便和有机试剂消耗量少等优点。DMZ、MTZ 和 RNZ 的检出下限均为 0.5 μg/kg, DMZ、MTZ 和 RNZ 的定量下限均为 1.0 μg/kg。

关键词 高效液相色谱-串联质谱 大气压化学源(APCI) 内标法 甲硝唑 二甲硝唑
洛硝哒唑 残留 水产品

中图分类号 TS254.7 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2009)05-0088-06

Determination of three nitroimidazole residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-APCI(+)/tandem mass spectrometry with internal standard method

LENG Kai-liang¹ SUN Wei-hong¹ WANG Zhi-jie¹
LIU Yan-ping² ZHAI Yu-xiu¹ WANG Yu²

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Shanghai Fisheries University, 201306)

ABSTRACT The method for the determination of three nitroimidazole residues in aquatic products was developed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Deuterated dimetridazole (DMZ-D3) was added to the sample as internal standard before extraction. The sample was extracted with ethyl acetate. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring for qualitative and quantitative analysis of MTZ, DMZ and RNZ at the same time. The preliminary treatment included predigestion, and no solid phase extraction(SPE) procedure was adopted. The advantage of the method was simple operation, less organic chemicals consumed, and shorter operation

农业部行业专项(Nyhyzx07-046)、国家 863 计划项目(2008.AA100805)和中央级科研院所基本科研业务费(2007-gy-02)共同资助

收稿日期:2008-11-04;接受日期:2008-12-13

作者简介:冷凯良(1966-),男,高级工程师,主要从事水产品质量检验研究。E-mail:lengkai@ysfri.ac.cn, Tel:(0532)85836348

time. The limits of detection for DMZ, MTZ and RNZ were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limits of quantitation for DMZ, MTZ and RNZ were 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

KEY WORDS High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) Internal standard method
Metronidazole Dimetridazole Ronidazole Residues
Aquatic products

硝基咪唑类药物是一类具有5-硝基咪唑环结构的药物,包括甲硝唑(Metronidazole, MTZ)、二甲硝唑(Dimetridazole, DMZ)和洛哌硝唑(Ronidazole, RNZ)等(王志杰等 2008)。硝基咪唑类药物具有抗原虫和抗菌活性,同时也具有很强的抗厌氧菌作用,用于预防和治疗特定病菌和原生动物的疾病。但是研究发现,该类物质具有致突变性和潜在的致癌性,被许多国家列为违禁药物。在欧盟, RNZ、DMZ 和 MTZ 分别在 1993 年、1995 年和 1998 年被禁止用于食用动物,2002 年美国食品与药物管理局(FDA)公布了禁止在进口动物源性食品中使用的 11 种药物,其中包括 DMZ 及其他硝基咪唑类药物。我国农业部和国家药品监督管理局第 227 号公告规定 MNZ、DMZ 及其盐、酯及制剂不准以促进动物生长为目的在所有食品动物饲养过程中使用(汪纪仓等 2007)。

MTZ、DMZ 和 RNZ 在水产品、畜产品中残留的检测方法国内外均有报道,检测方法主要有薄层色谱法(Gaugain *et al.*, 1996)、酶联免疫法(Anne *et al.*, 2005)、高效液相色谱法(王建华等 2000; 艾霞等 2005)、气相色谱法(氮磷检测器)(Wang 2001)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)(Clare *et al.*, 2005)和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)等(殷居易等 2007; Dominique *et al.*, 2000; Jean *et al.*, 1992)。薄层色谱法、酶联免疫法应用分析硝基咪唑类药物的报道较少,方法不成熟,而且检出限较高,易出现假阳性。配备氮磷检测器的气相色谱法,检测限可达到 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但不是确证方法。高效液相色谱法检出限较高,达不到当今的低限量检测要求。根据欧盟委员会 2002/657/EC 决议的规定,禁用兽药的确证检测方法必须能提供结构方面的信息,且要达到法规规定的 4 个确证点,液相色谱法和气相色谱法不能满足这一要求,因此硝基咪唑类药物的确证检测方法主要为气质联用法和液质联用法。气质联用法的样品前处理过程复杂,需进行衍生化处理。液质联用法可有效减少背景干扰,提高灵敏度,将是硝基咪唑类药物残留检测的首选方法(王志杰等 2008)。但到目前为止,大多文献报道的是采用电喷雾电离(ESI)源,国内尚没有采用大气压化学源(APCI)测定水产品中硝基咪唑类药物残留的报道。APCI 源是相对于 ESI 源更温和的电离方式,更适合分析硝基咪唑类的小分子化合物。本试验建立了以氘代二甲硝唑为内标, HPLC-APCI(+)MS/MS 的检测方法,能校正提取、净化等过程中硝基咪唑类药物的损失引起的定量误差,并使定量和确证性分析一次性完成。实验结果表明,该方法完全可以达到目前各国出口限量要求。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与样品

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪,配有 APCI 源。超声波清洗仪,离心机,旋转蒸发器,旋涡振荡器。

甲硝唑(MTZ)、二甲硝唑(DMZ)和洛哌硝唑(RNZ)标准品(纯度>99.5%);氘代二甲硝唑(DMZ-D3)标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$);甲醇、甲酸和醋酸铵(均为色谱纯);乙酸乙酯、硫酸钠(均为分析纯);0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 醋酸铵);滤膜(0.22 μm)。样品:国家监控样品。

1.2 分析条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil Gold C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 2.1 μm); 流动相: A, 0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 醋酸

按);B,甲醇;梯度洗脱程序:0~3.0 min 90%A;3.0~5.5 min 90%A~10%A;5.5~8.0 min 10%A;8.0~8.1 min 10%A~90%A;8.1~10 min 90%A。流速 0.25 ml/min。进样量:25 μ l;柱温:35 $^{\circ}$ C。

1.2.2 质谱条件

离子化模式:大气压化学源(APCI),正离子模式;放电电流:4 μ A;喷雾温度:400 $^{\circ}$ C;鞘气压力:45 psi;辅助气流量:5 psi;离子传输毛细管温度:250 $^{\circ}$ C;源内碰撞诱导解离电压:4V;扫描模式:选择反应监测(SRM),选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表1。Q1 半峰宽:0.7 Da;Q3 半峰宽:0.7 Da;碰撞气压力:氦气,1.5 mTorr。

1.3 样品前处理

准确称取 2.0 g 样品于 50 ml 具塞离心管中,准确加入 50 μ l 氘代二甲硝唑内标使用液,于涡旋混合器上快速混合 30 s,避光放置 10 min。加入 3.0 g 无水硫酸钠,涡旋混匀,再加入 8 ml 乙酸乙酯,于旋涡振荡器上涡旋提取 1 min,超声波提取 10 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 50 ml 梨形瓶中。重复上述提取步骤 1 次,合并乙酸乙酯提取液,于 35 $^{\circ}$ C 水浴旋转蒸发至干。准确加入 1.0 ml 甲醇水溶液(10:90)涡旋振荡溶解残留物(王志杰等 2008),再加入 2.0 ml 正己烷涡旋混合 30 s,转移于 5 ml 具塞离心管中,以 4 000 r/min 离心 5 min,弃去上层,下层液过 0.22 μ m 滤膜到进样瓶中,供液相色谱-质谱仪测定。

硝基咪唑类药物对光敏感,以上提取过程中尽量使用棕色试剂瓶避光操作。

2 结果与讨论

2.1 提取净化条件的研究

2.1.1 提取试剂的选择

文献报道的用于硝基咪唑类药物提取溶剂包括乙酸乙酯、甲醇、乙腈、甲苯和二氯甲烷等有机溶剂(丁涛等 2006)。实验发现二氯甲烷和乙酸乙酯对硝基咪唑类药物的提取效果比较高,但二氯甲烷对人体毒性较大,尽量不采用。同时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,因此应尽可能在实验中利用低沸点的有机溶剂,故本方法选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

2.1.2 提取方式的选择

实验分别考察了涡旋、超声波振荡和涡旋后再超声波振荡 3 种提取方式。结果表明,涡旋后再超声波振荡提取效果比较好,而且回收率比较稳定,因此本方法采用涡旋后再超声波振荡的提取方式。

2.1.3 挥干温度的选择

实验分别考察了 35、45 和 55 $^{\circ}$ C 3 种挥干温度对回收率的影响。结果表明,随着温度的升高 DMZ、DMZ-D3 的响应降低,RNZ、MTZ 的响应值相对稳定。采用 45 和 55 $^{\circ}$ C 的挥干温度时,RNZ、MTZ 均会因内标的响应值较低而导致回收率偏高;采用 35 $^{\circ}$ C 的挥干温度时,MTZ、DMZ 和 RNZ 的回收率均较好,因此,本方法选择 35 $^{\circ}$ C 的挥干温度。同时应注意旋转蒸发时不应过度蒸干,而且蒸干后应立即加入定容溶剂,防止硝基咪唑类药物分解。

2.1.4 定容溶液的选择

实验尝试了分别采用甲醇、甲醇:水(50:50)和甲醇:水(10:90)3 种溶液定容。结果发现,采用甲醇定容时色谱峰完全消失;甲醇:水(50:50)定容时色谱峰峰形较宽;流动相-甲醇:水(10:90)定容时色谱峰峰形较好。APCI 源是低流速源(流速一般在 0.2 ml/min 左右),主要靠高压和氮气雾化,加热毛细管加热使溶

表 1 3 种硝基咪唑类药物的质谱条件

Table 1 The mass spectrometry conditions of three nitroimidazole drugs

目标化合物 Analyte	母离子(m/z) Parent ion	子离子(m/z) Daughter ion	碰撞能量(eV) Collision energy
MTZ	172	128*	13
		82	20
DMZ	142	96*	18
		81	25
RNZ	201	140*	11
		55	21
DMZ-D3	145	95*	15

注: * 为定量碎片离子

剂汽化,如果流速太大,去溶剂效果不好,离子化效率也不高,会使响应降低。如此低的流速下,进入 25 μl 样品会严重改变流动相比比例,导致色谱峰峰形变宽,甚至消失。因此本方法选择甲醇水溶液(10:90)作为定容溶剂。

2.2 色谱条件的优化

色谱分离柱采用 C_{18} 或者 C_8 反相柱皆可,对 Thermo Hypersil Gold C_{18} 柱和 Agilent Extend C_{18} 柱的分离效果进行了评估,发现二者均可实现基质和分析物的较好分离。本实验采用 Thermo Hypersil Gold C_{18} 柱作为分析柱。

对于流动相中的有机相,分别比较了甲醇和乙腈的影响,结果发现甲醇作为流动相可以更好地提高检测的灵敏度和分离效果。在流动相的水相中加入挥发性电介质醋酸铵和甲酸,可以使离子预先形成,提高离子化效率,在保持较好分离度的前提下获得理想的色谱峰。

2.3 质谱条件的优化

DMZ、RNZ 和 MTZ 的分子结构如表 2 所示,用针泵以 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速注入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DMZ、RNZ、MTZ 和 DMZ-D3 混合标准溶液,在 m/z 100~300 扫描范围内以正离子模式进行一级质谱图扫描,发现这些化合物的 $[M+1]^+$ 峰均比较强,一些碎片和加合离子的峰均较弱。确定 DMZ、RNZ、MTZ 和 DMZ-D3 的分子离子分别为 m/z 142、201、172 和 145。分别以 142、201、172 和 145 作为母离子,进行子离子扫描,选取丰度最强的 $[M+1-C_2H_5O]^+$ m/z 96 作为 DMZ 的定量离子,次强的 m/z 81 作为 DMZ 的定性离子;选取丰度最强的 $[M+1-NH_2CO_2]^+$ m/z 140 作为 RNZ 的定量离子,次强的 m/z 55 作为 RNZ 的定性离子;选取丰度最强的 $[M+1-CO_2]^+$ m/z 128 作为 MTZ 的定量离子,次强的 m/z 82 作为 MTZ 的定性离子; m/z 145 作为 DMZ-D3 的监测离子。最后以选择反应监测(SRM)正离子模式优化锥孔电压(Skimmer offset)、碰撞能量(Collision energy)等质谱参数。

2.4 线性范围和灵敏度

配制质量浓度为 1.0~200.0 ng/ml 的系列标准溶液,以待测物与内标物的峰面积比为纵坐标,待测物的质量浓度为横坐标进行线性回归。结果表明,DMZ、RNZ 和 MTZ 的线性相关系数(r)分别为 0.999 4、0.999 2 和 0.999 7。

本文采用添加的方法,在空白样品中添加 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DMZ、MTZ 和 RNZ 的混标溶液,经测定信噪比(S/N)均大于 3,表明 3 种硝基咪唑类药物检测下限均可以达到 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。添加水平为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,DMZ、MTZ 和 RNZ 的信噪比(S/N)均大于 10,表明方法的定量限可以达到 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 回收率和精密度试验

分别选取阴性虾和鳗鱼样品,添加 3 种硝基咪唑类标准品和内标,添加水平为 1.0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,考察方法的回收率。每个样品重复测定 6 次,考察方法的精密度,结果见表 3,相应的色谱图见图 1 和图 2。

表 2 DMZ、MTZ 和 RNZ 分子结构和分子量

Table 2 Molecular structures and molecular masses of DMZ, MTZ and RNZ

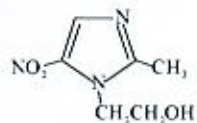
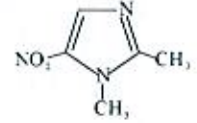
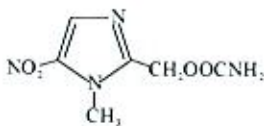
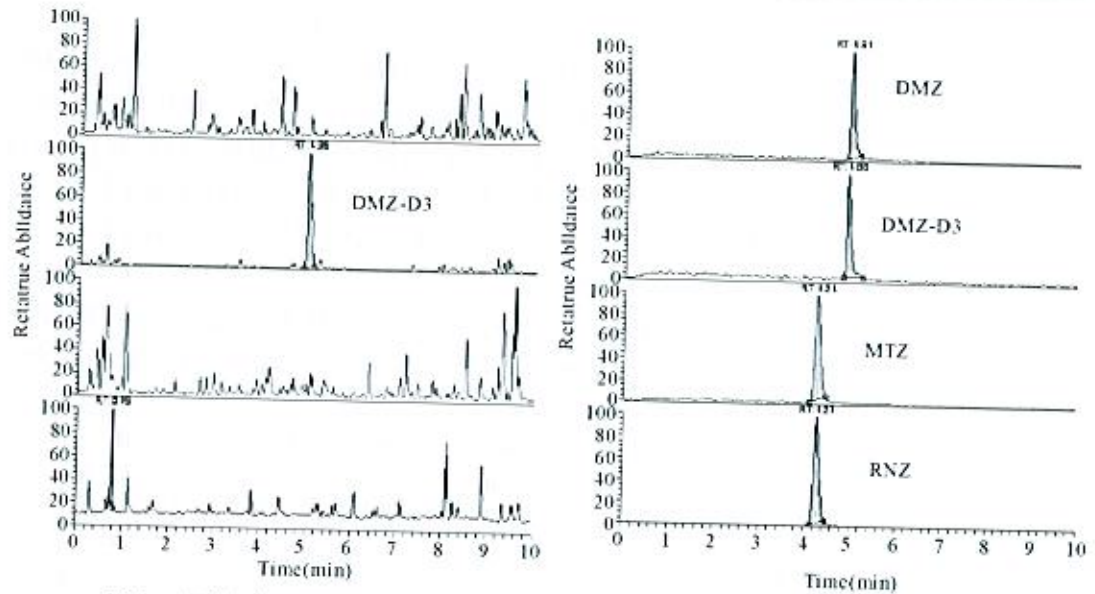
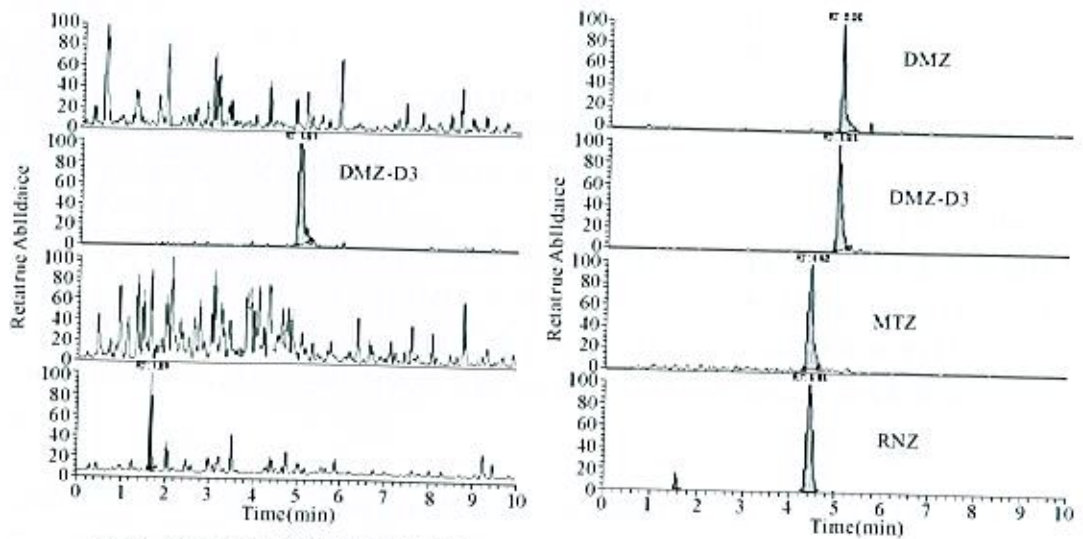
化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecular mass	结构 Structure
MTZ	$C_5H_5N_2O_3$	171.15	
DMZ	$C_5H_5N_2O_2$	141.13	
RNZ	$C_5H_5N_4O_2$	200.16	

表3 虾、鳗鱼样品中DMZ、RNZ和MTZ的添加回收率($n=6$)Table 3 Recoveries of DMZ, RNZ and MTZ from spiked shrimp and eel($n=6$)

分析物 Analyte	添加水平 Added level($\mu\text{g}/\text{kg}$)	虾中平均回收率 Average recovery from shrimp(%)	相对标准偏差 RSD(%)	鳗鱼中平均回收率 Average recovery from eel(%)	相对标准偏差 RSD(%)
DMZ	1.0	82.9	7.9	112.8	8.3
	5.0	84.6	5.6	86.1	6.4
	10.0	93.5	3.9	104.5	4.7
	20.0	92.8	4.2	102.9	3.5
RNZ	1.0	82.8	6.7	78.6	7.4
	5.0	90.6	4.3	87.3	5.4
	10.0	97.8	4.8	98.1	4.5
	20.0	95.1	3.4	97.6	3.7
MTZ	1.0	109.4	7.2	110.7	6.9
	5.0	96.1	6.0	98.9	5.7
	10.0	96.9	4.4	95.3	3.8
	20.0	94.7	2.2	95.6	3.4

图1 虾中空白及添加3种硝基咪唑类药物及内标物的离子流(添加水平: $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)Fig. 1 Ion chromatograms of blank and three Nitroimidazole drugs and internal standard spiked in a shrimp sample(Spiked level: $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)图2 鳗鱼中空白及添加3种硝基咪唑类药物及内标物的离子流(添加水平: $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)Fig. 2 Ion chromatograms of blank and three Nitroimidazole drugs and internal standard spiked in a eel sample(Spiked level: $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$)

3 小结

本文建立了水产品中 MTZ、DMZ 和 RNZ 残留的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS-MS)测定法。该方法采用简单的液-液萃取,省去固相萃取步骤,具有操作简便、有机试剂消耗量少和测定周期短等优点。该方法在样品前处理时加入内标物,部分补偿了 MTZ、DMZ 和 RNZ 在样品前处理时的损失,回收率满意。该方法可适用于水产品中 MTZ、DMZ 和 RNZ 残留的确证检验(王志杰等 2008)。

参 考 文 献

- 丁涛,徐锦忠,沈崇钰,蒋原,陈慧兰,吴斌,赵增运,李公海,张婧,刘飞. 2006. 高效液相色谱-串联质谱联用测定蜂蜜中3种硝基咪唑类药物残留. 色谱, 24(4): 331~334
- 王建华,林黎明,崔鹤. 2000. 液相色谱紫外法测定鸡肉中3种硝基咪唑类药物残留量. 化学分析计量, 9(4): 9~10
- 王志杰,刘艳萍,冷凯良,孙伟红,谭志军,郭萌萌,刘飞. 2008. 水产品中3种硝基咪唑类药物残留量的测定. 环境化学, 29(6): 696~697
- 艾霞,王大菊,张丛兰,许艳. 2005. 高效液相色谱法检测草鱼可食用组织中甲硝唑的残留. 天津农学院学报, 12(2): 10~14
- 汪纪仓,王大菊,杨自军,林菲. 2007. 硝基咪唑类药物残留检测方法研究进展. 中国兽药杂志, 41(8): 31~33
- 殷居易,谢东华,李佑卿,倪梅林,章再婷,房科博,陈树兵. 2007. HPLC-APCI(+)MS/MS分析动物源性食品中的硝基咪唑类药物残留量. 分析测试学报, 26(3): 385~388
- Gaugain, M., and Abjean, J. P. 1996. High-performance thin-layer chromatographic method for the fluorescence detection of three nitroimidazole residues in swine and poultry tissue. *J. Chrom. A.* 737(2): 343~346
- Anne-Catherine Huot, Leen Mortier, Els Daeseleire, Terrence Fodey, Christopher Elliott, and Philippe Delahaut. 2005. Development of an ELISA screening test for nitroimidazoles in egg and chicken muscle. *Analytica Chimica Acta*, 534(1): 157~162
- Clare, H., Della, M. W., Sin, K. M., *et al.* 2005. Determination of dimetridazole and metronidazole in poultry and porcine tissues by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 530: 23~31
- Dominique Hurtaud-Pessel, Bernard Delépine, and Michel Laurentie. 2000. Determination of four nitroimidazole residues in poultry meat by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chrom. A.* 882(1-2): 89~98
- Matusik, J. E., Leadbetter, M. G., Barnes, C. J., and Sphon, J. A. 1992. Identification of dimetridazole, ipronidazole, and their alcohol metabolites in turkey by thermospray tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 40 (3): 439~443
- Wang Jian-hua. 2001. Determination of three nitroimidazole residues in poultry meat by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J. Chrom. A.* 918(2): 435~438