

# HPLC – MS/MS 法测定饲料中甲硝唑 和二甲硝咪唑含量

郭礼强<sup>1</sup>, 张金玲<sup>1</sup>, 李凯<sup>1</sup>, 丁葵英<sup>1</sup>, 吴翠玲<sup>2</sup>

(1. 潍坊出入境检验检疫局, 山东潍坊 261041; 2. 安捷伦科技(中国)有限公司, 北京 100102)

[收稿日期] 2016-08-19 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 01-0052-05 [中图分类号] S859.83

**[摘要]** 建立了高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)快速测定饲料中甲硝唑和二甲硝咪唑的含量。饲料样品用乙酸乙酯提取后,经PCX固相萃取柱净化处理,过0.22 μm滤膜,以乙腈和含0.1%的甲酸水溶液为流动相,经Eclipse Plus C18色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm)分离,多级反应监测(MRM)正离子模式下扫描分析。结果表明,甲硝唑和二甲硝咪唑在0.2~50 μg/L范围呈良好线性,线性相关系数均大于0.997,检出限均为0.2 μg/kg,定量下限均为0.5 μg/kg。样品在定量下限1倍、2倍、10倍3个加标水平下的平均回收率为95.3%~103.2%,相对标准偏差(RSD)为4.67%~8.46%。该方法灵敏、简便、准确,可用于饲料中甲硝唑和二甲硝咪唑的检测分析。

**[关键词]** 饲料;含量分析;甲硝唑;二甲硝咪唑;液相色谱-串联质谱

## Determination of Metronidazole and Dimetridazole in Feed by High Performance Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometry

GUO Li-qiang<sup>1</sup>, ZHANG Jing-lin<sup>1</sup>, LI Kai<sup>1</sup>, DING Kui-ying<sup>1</sup>, WU Cui-ling<sup>2</sup>

(1. Weifang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weifang, Shandong 261041, China;

2. Agilent technologies Co., Ltd in China, Beijing 100102, China)

**Abstract:** A method for the determination of metronidazole and dimetridazole in feed by high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS) is presented. The sample were purified with solid phase extraction column of PCX after extraction by ethyl acetate. After filtered with a 0.22 μm membrane, the sample was separated on a eclipse plus C18 column (3.0 mm × 100 mm, 1.8 μm) using gradient elution with mobile phases of acetonitrile and aqueous solution containing 0.1% formic acid, and detected on positive electrospray ionization with a multiple reaction monitoring (MRM) as survey scan. The results showed that the calibration curves were linear in the range of 0.2 ~ 50 μg/L for metronidazole and dimetridazole with correlation coefficient (*r*) more than 0.997. The LODs for metronidazole and dimetridazole was 0.2 μg/kg and the LOQs was 0.5 μg/kg. The average recoveries (*n* = 6) in feed samples at three spiked levels (1 times, 2 times, 10 times) ranged from 95.3% to 103.2% with relative standard deviations (*RSDs*) of 4.67 - 8.46%. The

**基金项目:** 潍坊市 2015 年科学技术发展计划(2015ZJ1101); 山东出入境检验检疫局科研基金项目(SK201349)

**作者简介:** 郭礼强, 硕士, 工程师, 从事农兽药残留检测研究。E-mail: glq1980@sina.com

method was sensitive, convenient and accurate, and could satisfy the demand of detection and analysis of metronidazole and dimetridazole in feed.

**Key words:** feed; content analysis; metronidazole; dimetridazole; high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry

硝基咪唑类药物(nitromidazoles)是一类广泛应用的人工合成的具有5-硝基咪唑基本结构的抗菌、抗原虫药物,甲硝唑(metronidazole)和二甲硝咪唑(dimetridazole)为硝基咪唑类药物的两种,对原虫及各种厌氧细菌具有显著抑制作用,也用作生长促进剂,以促进牛、猪、禽的生长及改善饲料转化率。然而,甲硝唑和二甲硝咪唑对人体有多种毒副作用,尤其是具有致突变和致癌性。欧盟在96/23/EC欧盟理事会指令及EC2377/90<sup>[1]</sup>中将其列入A类禁用药,日本也将二甲硝咪唑列入肯定列表制度,属于15种农业化学品中的一种,不得在任何食品中检出。为防止二甲硝咪唑等致癌药物在食源性动物残留对人体健康产生危害,我国也于2002年禁用了该类物质<sup>[2]</sup>。甲硝唑和二甲硝咪唑的检测方法有气相色谱法<sup>[3-4]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[5-6]</sup>、液相色谱法<sup>[7-11]</sup>以及液相色谱-串联质谱法<sup>[12-17]</sup>,气相色谱和气相色谱-质谱法的缺点是需要衍生化,液相色谱法的选择性和灵敏度较差,具有高特异性和灵敏度的液相色谱-质谱法是目前检测硝基咪唑类药物含量的首选方法。由于监管的滞后和经济利益的驱使,硝基咪唑类药物经常被用于动物饲料和动物疫病防治过程,因此建立饲料中甲硝唑和二甲硝咪唑含量的分析方法,增加了检验检疫行政执法的手段。饲料成分复杂,尤其是预混料,粉尘颗粒较多,若净化效果不好将严重影响结果的判断,本文应用液相色谱-串联质谱法同时检测饲料中的甲硝唑和二甲硝咪唑药物,该方法具有快速高效、高通量、高灵敏度等特点,为从源头上对动物饲料的监控提供了技术支持。

## 1 材料与方 法

1.1 仪器和试剂 高效液相色谱-高分辨质谱联用仪:Agilent 1260-6460(美国Agilent公司),配电喷雾离子源(ESI);离心机:5810R型(Eppendorf公

司);氮吹仪:N-EVAP(Organomation Associates公司);纯水机:Milli-Q(美国Millipore公司);万分之一天平(Mettler AE163);振荡器(IKA MS1);5 mL一次性注射器;0.22 μm 针头过滤器;混合型阳离子交换柱:60 mg/3 mL(Agela公司)。

甲硝唑、二甲硝咪唑和氘代二甲硝咪唑标准品均购于德国Dr. Ehrenstorfer公司。甲醇、乙酸乙酯、乙腈和甲酸均为色谱纯,美国Biopure公司;盐酸和氨水为分析纯,天津科密欧公司。

标准溶液:分别配制甲硝唑、二甲硝咪唑和氘代二甲硝咪唑终浓度均为100 ng/mL的标准溶液,于0~4℃冰箱中保存。定容液:取80 mL 0.1%的甲酸水(V/V),与20 mL乙腈混匀。

1.2 样品处理 称取5.0 g(预混合饲料2.0 g)样品,置于50 mL聚丙烯离心管中,加入内标工作溶液100 μL(预混合饲料加40 μL),加入15 mL乙酸乙酯均质提取1 min,10000 r/min离心10 min,将上清液转入50 mL聚丙烯离心管,残渣再次用15 mL乙酸乙酯涡混重复提取,合并提取液,氮气吹干,用0.1 mol/L盐酸25 mL溶解,滤纸过滤。依次用3 mL甲醇、3 mL 0.1 mol/L盐酸活化阳离子交换柱,将上述溶解液全部过柱,依次用5 mL 0.1 mol/L盐酸、5 mL甲醇淋洗,6 mL洗脱溶液洗脱并收集,在40℃水浴上氮气吹干,用1 mL初始流动相溶液涡旋溶解,过0.22 μm滤膜,供质谱测定。

### 1.3 液相色谱串联质谱条件

1.3.1 液相色谱条件 色谱柱:Eclipse Plus C18(3.0 mm×100 mm,1.8 μm);流动相A:甲酸水(1:999,V/V)溶液;流动相B:乙腈;梯度洗脱程序:0 min 20%流动相B;3.0 min 40%流动相B;4.0 min 90%流动相B;4.1 min 20%流动相B;6.0 min 20%流动相B。进样体积20 μL。柱温40℃;流速0.4 mL/min。

1.3.2 质谱条件 大气压电喷雾电离源(ESI),正离子电离模式;干燥气:10 L/min ;干燥温度:350 ℃;喷雾气:45 psi ;电子倍增器电压:400 V;毛

细管电压:4000 V;雾化气压力:275.8 kPa(40 psi);多反应监测模式(MRM);甲硝唑和二甲硝咪唑的部分质谱参数见表1。

表1 甲硝唑和二甲硝咪唑的部分质谱参数

序号	化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	保留时间/min	毛细管电压/V	碰撞能量/V
1	二甲硝咪唑	142	96*	2.2	120	25
			81			30
2	甲硝唑	172	82*	1.7	70	20
			128			10
3	氘代二甲硝咪唑	145	99	2.1	80	25

\* 定量离子

## 2 结果与分析

2.1 线性关系、检出限与定量下限 对两种目标分析物质量浓度在0.20~50 μg/L之间的系列混合标准溶液进行测定,以各化合物定量离子与内标校正离子峰面积之比的平均值(Y)对其质量浓度(X, μg/L)绘制标准曲线,其相关系数(r)均大于0.997。在饲料中添加系列浓度的混合标准物质,以

信噪比(S/N)为3作为方法的检出限(LOD),以信噪比(S/N)为10作为方法的定量下限(LOQ),甲硝唑和二甲硝咪唑的LOD为0.20 μg/kg,LOQ分别为0.50 μg/kg。两种目标分析物的提取离子流图见图1,回归方程、相关系数、线性范围、检出限和定量下限见表2。

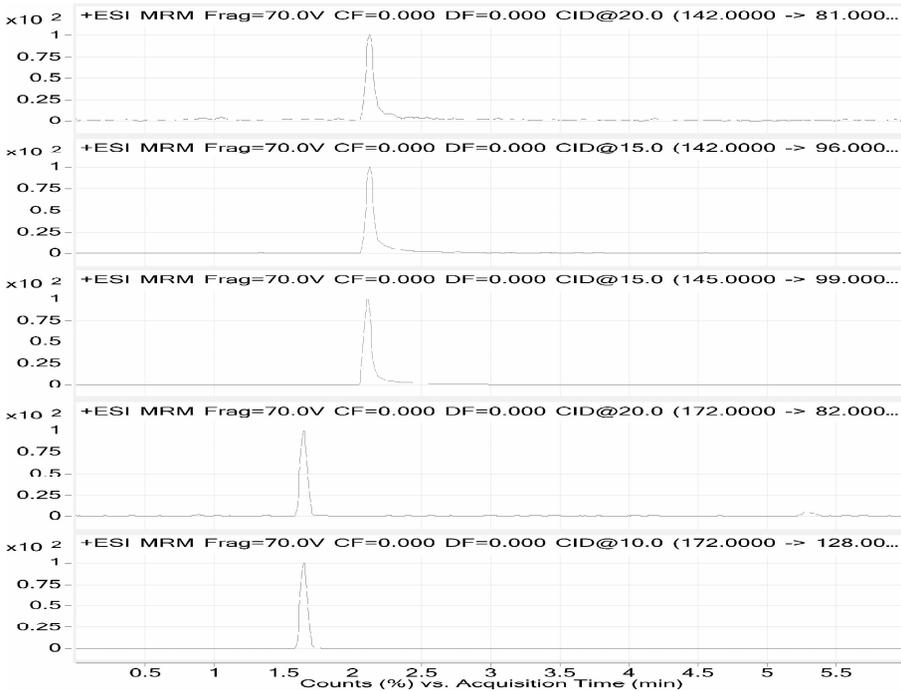


图1 混合标准溶液(0.5 μg/L)中甲硝唑和二甲硝咪唑的多反应监测色谱图

表2 甲硝唑和二甲硝咪唑的线性方程、相关系数、线性范围、检出限与定量下限(n=6)

化合物	回归方程	相关系数(r)	线性范围/(μg · L <sup>-1</sup> )	检出限/(μg · kg <sup>-1</sup> )	定量下限/(μg · kg <sup>-1</sup> )
甲硝唑	Y=0.335365X+0.137172	0.9979	0.20~50.0	0.20	0.50
二甲硝咪唑	Y=0.486102X-0.4845	0.9983	0.20~50.0	0.20	0.50

2.2 准确度与精密度 在牛预混料空白样品中添加甲硝唑和二甲硝咪唑定量下限 1 倍、2 倍、10 倍 3 个水平的混合标准物质进行加标回收实验。以回收率结果表示方法准确度,回收率的相对标准偏差 (*RSD*) 表示方法的精密度,每个水平平行测定 6 个

样品,测定结果见表 3。结果显示,甲硝唑和二甲硝咪唑在 3 个加标水平下的平均回收率分别为 95.3% ~ 103.2%, 相对标准偏差 (*RSD*) 分别为 4.67% ~ 8.46%。

表 3 检测方法的添加精密度和平均回收率 ( $n=6$ )

化合物	一倍添加 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )		二倍添加 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )		十倍添加 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	
	回收率 <i>R</i> / %	<i>RSD</i> <sub>sr</sub> / %	回收率 <i>R</i> / %	<i>RSD</i> <sub>sr</sub> / %	回收率 <i>R</i> / %	<i>RSD</i> <sub>sr</sub> / %
甲硝唑	99.0	6.80	95.3	4.67	97.8	8.46
二甲硝咪唑	101.3	8.25	103.2	5.52	102.8	6.07

2.3 实际样品的测定 对市场上购买的 20 份饲料中的甲硝唑和二甲硝咪唑进行测定,在 1 份鸡预混饲料样品中检出了二甲硝咪唑 (3.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 说明仍存在企业违法添加禁用硝基咪唑类抗菌药物。

### 3 讨论与小结

3.1 样品提取条件的优化 饲料基质复杂,不同的提取溶剂对回收率的影响很大。本文考察了甲醇<sup>[10,17]</sup>、乙腈<sup>[12,14]</sup>、乙酸乙酯<sup>[4,15,18]</sup> 作为提取剂对甲硝唑和二甲硝咪唑回收率的影响,试验发现采用甲醇、乙醇、乙腈作为提取剂用于饲料样品的提取,会产生非常多的干扰杂质,即使采用阳离子固相萃取柱净化也非常困难,抑制了目标分析物的灵敏度和回收率,而使用乙酸乙酯作为提取溶剂,可以显著降低饲料中的基质干扰。试验进一步比较了饲料加水浸润后添加标准品经乙酸乙酯提取和饲料直接添加标准品后经乙酸乙酯提取对回收率的影响,结果发现,饲料经水浸泡后经乙酸乙酯提取,提取回收率反而降低,说明饲料浸润提取的杂质更多,不利于目标分析物的检测。试验同时考察了酸性乙酸乙酯溶液对目标物回收率的影响,在饲料基质中添加 15 mL 乙酸乙酯后,再加入 0.1 mol/L 盐酸 1 mL,结果发现回收率非常低,分析后认为在震荡提取的过程中盐酸和目标分析物结合,造成大部分目标物保留在水相中。饲料浸润和提取酸化反而抑制了目标分析物的回收率,最终确定只用乙酸乙酯作为提取溶剂。

3.2 样品净化条件的优化 乙酸乙酯提取液中依然含有一定量极性的杂质,如蛋白质、脂肪和色素等脂溶性物质,尤其是牛预混料,提取液颜色为棕红色,对甲硝唑和二甲硝咪唑有一定的干扰。为提高方法的灵敏度和通用性,采用固相萃取进一步净

化样品。考察了 MCX、PCX、WCX 三种净化柱对目标物回收率和稳定性的影响,发现 MCX 和 PCX 净化柱回收率分别为 85.2% 和 84.1%,要好于 WCX 净化柱,因 MCX 和 PCX 净化柱回收率差异不明显,从性价比考虑最终选用 PCX 净化柱。乙酸乙酯属于中等极性化合物,若直接将乙酸乙酯提取液过 PCX 净化柱,降低了 PCX 净化柱吸附目标物,影响回收率;净化效果差,依然有一些色素残留,干扰目标物分析。为提高方法的回收率和灵敏度,实验进一步考察了甲酸、乙酸和盐酸溶解目标物经 PCX 柱净化对回收率的影响。提取液经氮气吹干,分别用 0.1 mol/L 的甲酸、乙酸和盐酸溶解,经 PCX 柱净化后经质谱检测,试验发现三种酸性溶液均能将目标物回收率提高到 80% 以上,但盐酸质谱噪音低,灵敏度比甲酸和乙酸高 20% 以上,最终选用盐酸溶液溶解。预混料粉尘多,乙酸乙酯残渣用盐酸溶液溶解后上柱,粉尘会堵塞固相萃取柱,过滤速度慢,通过试验尝试,上柱前先将溶解液滤纸过滤,能够很好解决上柱慢的问题。

3.3 定量方法的选择 研究发现,不同饲料样品对甲硝唑和二甲硝咪唑的吸附有一定的差异,如鸡预混料粉尘颗粒较多,对目标分析物吸附要比鸡浓缩料和鸡全价料高,造成提取回收率偏低,因此在定量方法选择时采用内标法定量,可以有效的消除不同饲料基质带来的干扰,本方法采用氘代二甲硝咪唑作为甲硝唑和二甲硝咪唑的内标,提高了定量方法的准确度。

3.4 色谱、质谱条件的优化 分别配制 500  $\mu\text{g}/\text{L}$  的甲硝唑和二甲硝咪唑标准品,选用正离子模式扫描,优化各化合物的毛细管电压和碰撞能量,以响应值最高的两个碎片离子和母离子组成定量离子

对和定性离子对,并进行MRM参数的优化。比较了甲醇和乙腈作为流动相对甲硝唑和二甲硝咪唑的影响,发现使用乙腈为流动相两种目标物的MRM的提取离子流图峰型较好,保留时间稳定。

本文建立了饲料中甲硝唑和二甲硝咪唑的高效液相色谱-串联质谱联用的检测方法。该方法具有简便、快速、灵敏、准确、实用性强等优点,可以满足复杂饲料中甲硝唑和二甲硝咪唑含量的检测要求。

## 参考文献:

- [1] EEC2377/90 关于确定动物源性食品中兽药制品最高残留限量程序的规定,国家质量监督检验检疫总局. 欧盟食品卫生法规汇编[M]. 青岛:中国海洋大学出版社,2003:819.
- [2] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第193号[S].
- [3] 贾斌,冯书惠,王铁良,等. 气相色谱法测定饲料中二甲硝咪唑方法的研究[J]. 饲料博览,2007,7:31-32.
- [4] 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.
- [5] 傅哲,彭智,肖志勇. 气相色谱法测定动物血中甲硝唑浓度及药动学研究[J]. 长沙医学院,2010,12:5-9.
- [6] 汪纪仓,马素英,王大菊,等. 气相色谱-离子阱串联质谱法同时测定猪肌肉中硝基咪唑类药物残留量[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(12):1772-1778.
- [7] 李玉文,田颖,孙晓伟. 高效液相色谱法测定饲料中二甲硝咪唑[J]. 饲料工业,2001,22(6):37.
- [8] 戴华,李拥军,袁智能,等. 猪饲料中甲硝唑、二甲硝咪唑药物含量的HPLC法测定[J]. 光谱实验室,2004,21(2):313-316.
- [9] 胡海燕,徐倩,孙雷. 鸡肉组织中硝基咪唑类药物及代谢物多残留检测高效液相色谱法研究[J]. 中国兽药杂志,2008,42(8):9-12.
- [10] 冯学忠,黎华鹏,盘苑芷,等. HPLC同时测定复方二甲硝咪唑可溶性粉中地美硝唑、甲氧苄啶、磺胺对甲氧嘧啶的含量[J]. 动物医学进展,2011,32(7):55-60.
- [11] 秦松,张蓓. RP-HPLC法测定人工牛黄甲硝唑胶囊中甲硝唑的溶出度[J]. 中国医药科学,2015,5(21):48-53.
- [12] 郭少飞,王鹏,荆涛林,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中甲硝唑、二甲硝咪唑和洛硝哒唑残留[J]. 华中科技大学学报(医学版),2008,37(6):830-833.
- [13] 刘永明,曹彦忠,李金,等. 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[J]. 色谱,2010,28(6):596-600.
- [14] 徐娟,陈捷,邵琳智,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测口腔卫生用品中的硝基咪唑类药物[J]. 色谱,2011,29(5):450-453.
- [15] 张鸿伟,简慧敏,林黎明,等. 液相色谱-四极杆/离子阱质谱快速测定蜂蜜中痕量硝基咪唑类药物及其代谢物残留[J]. 分析测试学报,2012,31(7):763-770.
- [16] 班付国,胡兴娟,吴宁鹏,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中66种兽药残留的研究[J]. 中国兽药杂志,2014,48(6):40-51.
- [17] 郭菁,丁立平,吴文凡,等. 高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定水产品中硝基咪唑类化合物及其代谢物残留[J]. 分析测试学报,2015,34(1):28-34.
- [18] GB/T 21995-2008. 中华人民共和国国家标准. 饲料中硝基咪唑类药物的测定 液相色谱-串联质谱法[S].

(编辑:侯向辉)