

# LC-MS/MS法测定蜂蜜中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量

## LCMSMS-918

**摘要：**使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用系统建立了蜂蜜中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量的分析方法。蜂蜜样品经磷酸二氢钾溶液溶解，硝基咪唑类药物及其代谢物用乙酸乙酯提取，使用 C18 色谱柱进行分离。采用正离子模式进行电离，通过多反应监测模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用内标法定量，硝基咪唑类药物及其代谢物在 0.5 µg/L ~ 50.0 µg/L 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.999 以上，各校准点准确度在 85.0%~114.1% 之间，且精密度和不同浓度水平的加标回收率实验结果良好。

**关键词：**三重四极杆质谱 蜂蜜 硝基咪唑类药物

### 技术特点：

- ❖ 样品前处理采用液液萃取法，操作简便易行；
- ❖ 优化色谱条件，羟基异丙硝唑和特尼达唑同分异构体获得了很好地分离；
- ❖ 使用 Peakintelligence™ 色谱峰智能算法进行积分，方便准确。

硝基咪唑类 (nitroimidazoles, NMZs) 药物是一类具有 5-硝基咪唑环共同结构的合成抗菌类药物，具有抗原虫和抗厌氧菌活性，被广泛用于蜜蜂孢子虫病的预防和治疗，易造成该类物质在蜂蜜中的残留问题。由于硝基咪唑类药物及其在生物体内的代谢产物具有潜在致癌性、致畸性和致突变性，且代谢物在动物体内比原药维持时间更长。如果在动物源性食品中残留、累积，则会对食品安全构成严重威胁。

目前，硝基咪唑类药物残留的检测方法主要有酶联免疫法、气相色谱 - 质谱联用法、高效液相色谱法和高效液相色谱 - 串联质谱法。酶联免疫法易产生假

阳性或者假阴性结果，一般用于常规大批量快速筛查；气相色谱 - 质谱联用法需要衍生化，实验条件要求严格，液相色谱法灵敏度相对较低；液相色谱 - 串联质谱法，具有选择性好、灵敏度高等优势，已成为复杂食品基质中测定痕量污染物的主流方法。

本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，针对蜂蜜样品，通过分析条件优化，建立了同时测定蜂蜜中 11 种硝基咪唑类药物的高效液相色谱 - 同位素稀释串联质谱法。该方法可在 12 min 内完成 11 种硝基咪唑类药物及其代谢物的定性定量分析，可供相关检测人员参考使用。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A <sub>SR</sub>
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.113		

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.8 µm, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03)

流 动 相 : A 相 - 0.1% 甲酸水溶液;  
                  B 相 - 甲醇 - 乙腈 (体积比 2 : 8, 含 0.1% 甲酸) 溶液  
流 速 : 0.30 mL/min  
进 样 体 积 : 5  $\mu$ L  
柱 温 : 35 $^{\circ}$ C  
洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc	10
4.00	泵	B.Conc	50
6.00	泵	B.Conc	95
6.50	泵	B.Conc	100
9.50	泵	B.Conc	100
10.00	泵	B.Conc	5
12.00	控制器	Stop	

质谱条件

离子化模式 : ESI+	接 口 温 度 : 300 $^{\circ}$ C
接 口 电 压 : 4.0 kV	D L 温 度 : 150 $^{\circ}$ C
雾化气流速 : 氮气 3.0 L/min	加 热 块 温 度 : 400 $^{\circ}$ C
加 热 气 流 速 : 空气 10 L/min	驻 留 时 间 : 20 ms
干 燥 气 流 速 : 氮气 10 L/min	扫 描 模 式 : 多反应监测 (MRM)
碰 撞 气 : 氩气 230 kPa	M R M 参 数 : 见表 2

1.3 样品前处理方法

称取蜂蜜试料 5 g 于 50 mL 塑料离心管中, 依次加入内标混合工作液 100  $\mu$ L 和磷酸二氢钾溶液 10 mL, 振荡溶解, 加入乙酸乙酯 10 mL, 振荡 5 min, 再于 4 $^{\circ}$ C 下 8000 r/min 离心 5 min, 取上层溶液于另一塑料离心管中, 再加入乙酸乙酯 10 mL 重复提取一次, 合并上层溶液, 于 45  $^{\circ}$ C 下氮吹至近干, 加入乙腈溶液 1.0 mL 复溶, 经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤后, 供液相色谱 - 串联质谱测定。

表 2 硝基咪唑类药物及其同位素内标的 MRM 采集参数

No.	化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais (V)	CE(V)	Q3 Pre Bais (V)
1	甲硝唑	172.2	128.1*	-12	-17	-13
			82.1	-12	-25	-30
2	羟基甲硝唑	188.2	123.2*	-11	-15	-22
			126.2	-12	-16	-23
3	地美硝唑	142.2	96.1*	-13	-16	-17
			81.1	-29	-28	-29

4	羟甲基甲硝咪唑	158.0	55.1* 94.1	-11 -10	-22 -23	-22 -16
5	异丙硝唑	170.2	109.2* 124.2	-22 -22	-25 -20	-21 -20
6	羟基异丙硝唑	186.1	168.1* 122.1	-24 -24	-14 -21	-16 -21
7	洛硝达唑	201.2	140.2* 55.2	-10 -11	-13 -22	-30 -22
8	氯甲硝咪唑	162.1	145.1* 116.1	-19 -19	-16 -16	-26 -11
9	苯硝咪唑	164.2	118.2* 91.1	-10 -10	-22 -39	-20 -15
10	替硝唑	248.2	121.2* 128.2	-13 -13	-17 -22	-20 -13
11	特尼哒唑	186.1	128.0* 82.1	-21 -21	-16 -28	-22 -30
12	甲硝唑 -13C2,15N2	176.2	132.1	-12	-17	-13
13	二甲硝咪唑 -D3	145.2	99.1	-13	-16	-17
14	洛硝达唑 -D3	204.2	143.2	-10	-13	-30
15	羟基异丙硝唑 -D3	189.1	171.1	-24	-14	-16
16	羟甲基甲硝咪唑 -D3	161.0	143.0	-10	-16	-24

注：\* 表示定量离子对

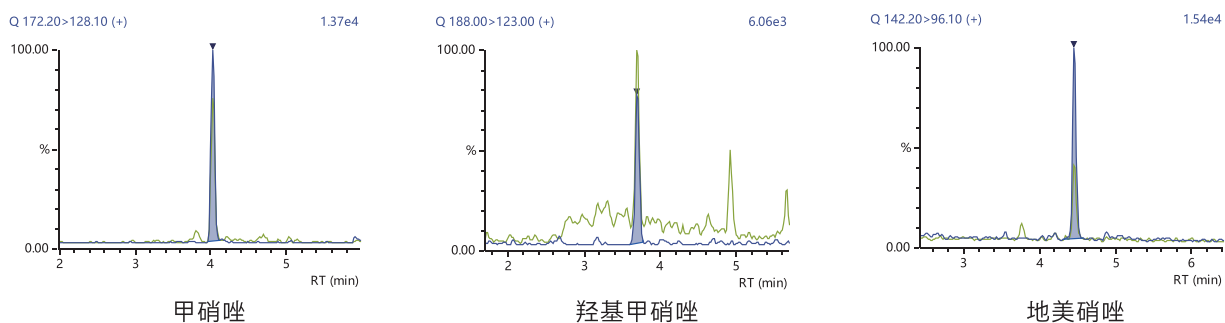
#### 1.4 校准曲线的制备

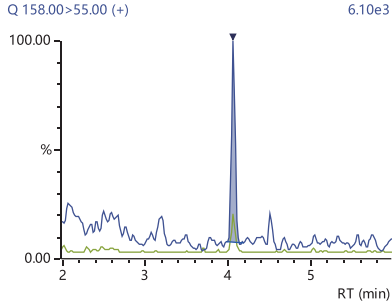
制备蜂蜜空白试样，精密量取硝基咪唑类药物混合标准工作液及其同位素内标混合标准工作液适量，配制成浓度为 0.5 μg/L、1.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L 和 50.0 μg/L 的基质匹配系列混合标准溶液，内标溶液浓度为 10.0 μg/L，供液相色谱 - 串联质谱测定。

## ■ 结果与讨论

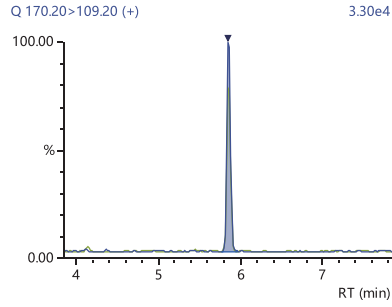
### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

通过优化液相色谱分离条件，11 种硝基咪唑类药物及其代谢物在 12 min 内完成分析，且羟基异丙硝唑和特尼哒唑同分异构体获得了很好地分离，具体结果见图 1。

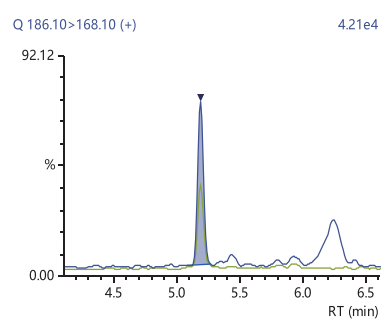




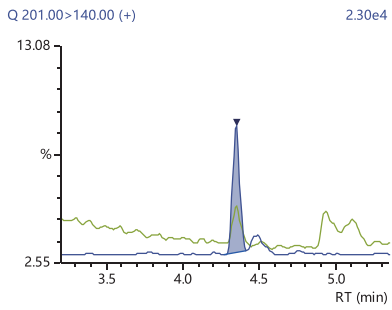
羟甲基甲硝咪唑



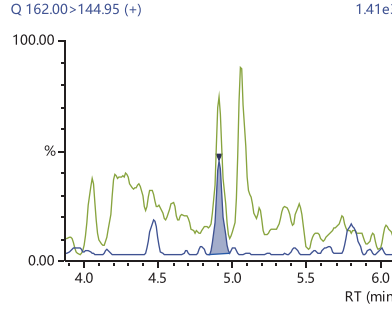
异丙硝唑



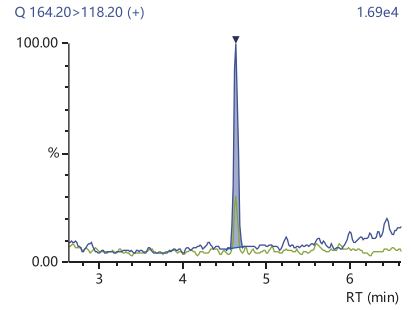
羟基异丙硝唑



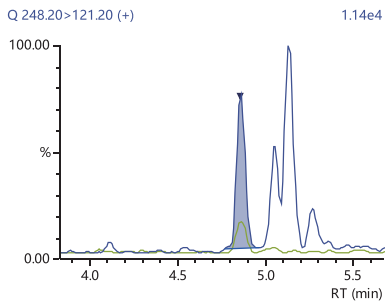
洛硝达唑



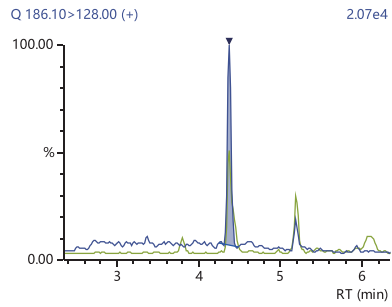
氯甲硝咪唑



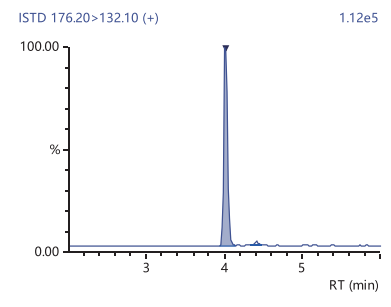
苯硝咪唑



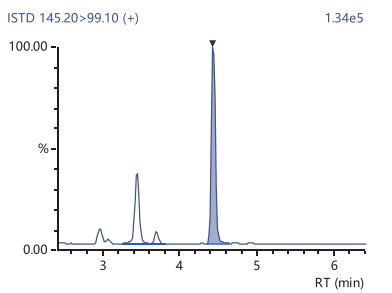
替硝唑



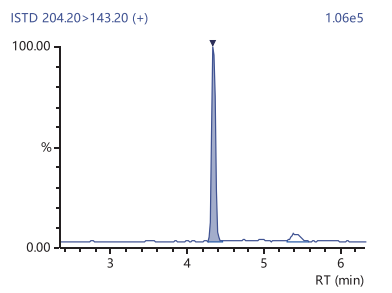
特尼达唑



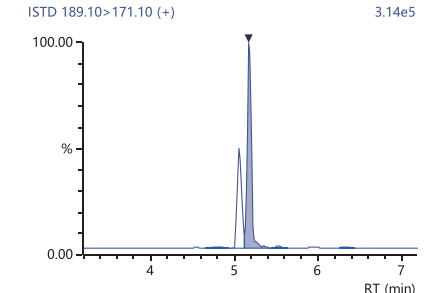
甲硝唑 -13C2,15N2



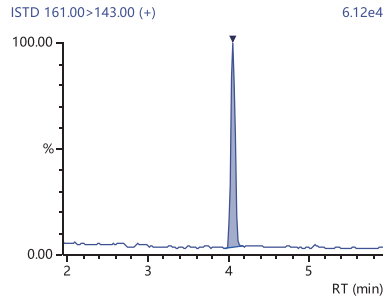
二甲硝咪唑 -D3



洛硝达唑 -D3



羟基异丙硝唑 -D3



羟甲基甲硝咪唑 -D3

图 1 硝基咪唑类药物及其代谢物 (1.0 µg/L) 的 MRM 图谱

### 2.2 Peakintelligence™自动积分示例

在传统的积分模式下，当出现两个色谱峰的分度未达到完全基线分离时，可能会出现色谱峰积分基线的不合理现象。使用 Peakintelligence™自动积分模式，无需设定高级积分处理参数，即可得到较合理的积分结果。

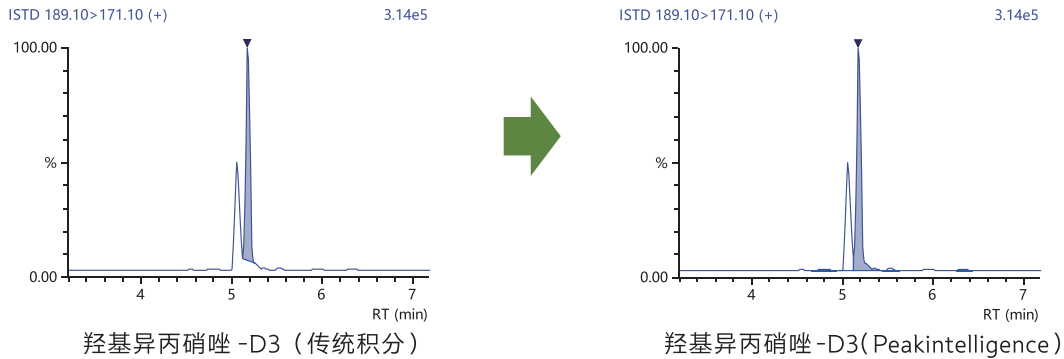
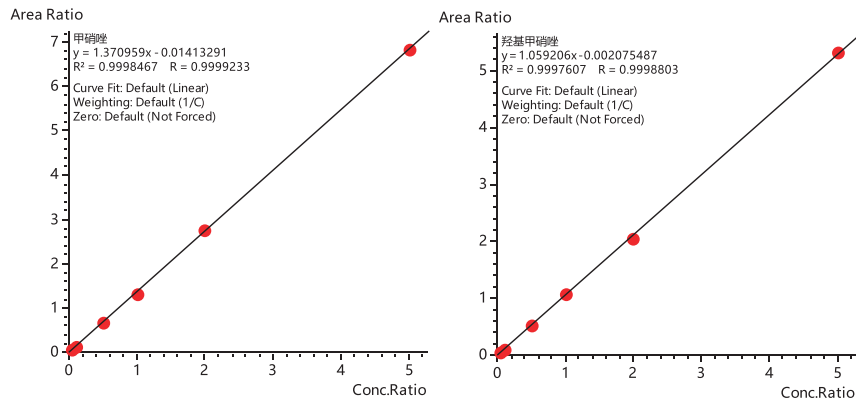


图 2 不同积分算法下的色谱图积分对比

### 2.3 线性范围

将浓度分别为 0.5 µg/L、1.0 µg/L、5.0 µg/L、10.0 µg/L、20.0 µg/L 和 50.0 µg/L 不同浓度的硝基咪唑类药物及其代谢物混合标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用内标法定量，其中甲硝唑 -13C2,15N2 作为甲硝唑、异丙硝唑、特尼哒唑的内标，二甲硝唑 -D3 作为地美硝唑、苯硝咪唑的内标，洛硝哒唑 -D3 作为洛硝哒唑、氯甲硝咪唑、替硝唑的内标，羟基异丙硝唑 -D3 作为羟基异丙硝唑的内标，羟甲基甲硝咪唑 -D3 作为羟甲基甲硝咪唑、2-羟甲基-1-甲基-5硝基咪唑的内标。以目标物浓度与对应内标浓度的比值为横坐标，目标物的峰面积与对应内标的峰面积比值为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。



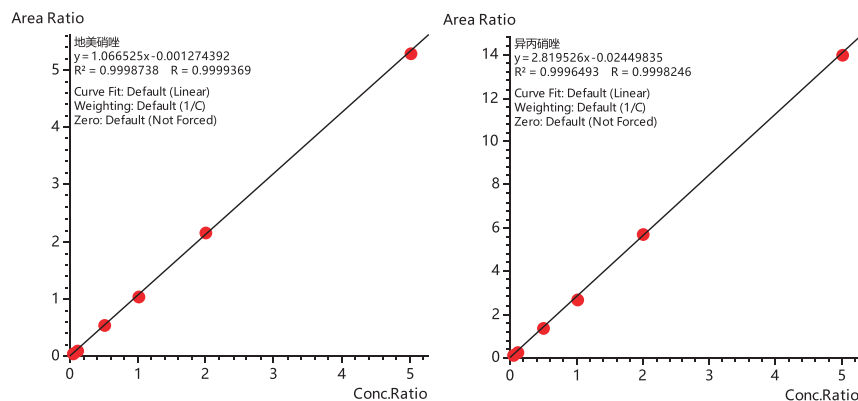


图3 部分硝基咪唑类药物及其代谢物校准曲线

表3 标准曲线信息

No.	化合物名称	校准曲线	相关系数 R	准确度 (%)	检出限 (µg/kg)
1	甲硝唑	$Y = (1.35892)X + (-0.0126576)$	0.9999	97.6~101.9	0.2
2	羟基甲硝唑	$Y = (1.04426)X + (-0.000977702)$	0.9998	96.0~104.0	0.2
3	地美硝唑	$Y = (1.07240)X + (0.000527852)$	0.9999	92.3~105.1	0.2
4	羟甲基甲硝唑	$Y = (0.991841)X + (-0.00645328)$	0.9995	94.5~108.8	0.2
5	异丙硝唑	$Y = (2.81974)X + (-0.0241003)$	0.9998	96.5~106.1	0.2
6	羟基异丙硝唑	$Y = (0.867824)X + (0.00269291)$	0.9992	85.0~107.9	0.2
7	洛硝达唑	$Y = (1.89994)X + (0.000942931)$	0.9994	87.7~110.9	0.2
8	氯甲硝唑	$Y = (0.205676)X + (-0.00129456)$	0.9999	96.1~105.1	0.2
9	苯硝唑	$Y = (1.09679)X + (0.00399022)$	0.9999	92.4~107.8	0.2
10	替硝唑	$Y = (0.722102)X + (-0.00616476)$	0.9993	91.6~114.1	0.2
11	特尼哒唑	$Y = (1.83920)X + (-0.00960177)$	0.9997	98.4~104.5	0.2

#### 2.4 精密度实验

对 1.0 µg/L、5.0 µg/L 和 10.0 µg/L 不同浓度硝基咪唑类药物及其代谢物混合标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：硝基咪唑类药物及其代谢物的保留时间和峰面积相对标准偏差不高于 0.10% 和 6.92%，显示仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	化合物名称	1.0 µg/L		5.0 µg/L		10.0 µg/L	
		R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%
1	甲硝唑	0.06	4.89	0.09	2.03	0.09	1.46
2	羟基甲硝唑	0.10	4.52	0.08	1.36	0.09	3.04
3	地美硝唑	0.05	6.72	0.08	1.74	0.07	2.15
4	羟甲基甲硝唑	0.09	6.92	0.09	1.43	0.08	2.91
5	异丙硝唑	0.05	3.15	0.05	1.33	0.05	2.09
6	羟基异丙硝唑	0.05	3.51	0.06	2.75	0.06	2.12
7	洛硝达唑	0.07	5.10	0.08	4.18	0.06	2.26

8	氯甲硝咪唑	0.06	5.09	0.07	4.83	0.05	3.96
9	苯硝咪唑	0.06	5.10	0.07	2.54	0.06	2.23
10	替硝唑	0.07	4.26	0.07	4.72	0.06	2.74
11	特尼哒唑	0.07	5.35	0.09	1.51	0.06	1.77

## 2.5 加标回收率实验

取空白蜂蜜样品，加入适量硝基咪唑类药物及其代谢物混合标准储备溶液和内标混合工作液，使蜂蜜中添加浓度为分别为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，平行做 3 份。按照 1.3 样品前处理方法完成处理后上机分析，测定硝基咪唑类药物及其代谢物的添加回收率，各化合物的平均加标回收率结果在 78.20% ~ 103.90% 之间（见表 5）。

表 5 硝基咪唑类药物及其代谢物加标回收率结果 (n=3)

No.	化合物名称	添加浓度水平	
		0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	甲硝唑	94.76%	96.13%
2	羟基甲硝唑	100.28%	99.63%
3	地美硝唑	99.32%	102.90%
4	羟甲基甲硝咪唑	98.48%	103.60%
5	异丙硝唑	94.60%	94.35%
6	羟基异丙硝唑	93.36%	103.90%
7	洛硝达唑	88.12%	102.81%
8	氯甲硝咪唑	78.20%	93.01%
9	苯硝咪唑	90.68%	96.76%
10	替硝唑	96.68%	93.17%
11	特尼哒唑	87.68%	90.62%

## ■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统建立了测定蜂蜜中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量的分析方法。11 种硝基咪唑类药物及其代谢物在 12 min 内完成分析，且羟基异丙硝唑和特尼达唑同分异构体分离良好。该方法灵敏度高、精密度好、结果准确，且杂质干扰少，为监测蜂蜜中硝基咪唑类药物残留提供参考方法。

岛津应用云

