

陈培荣,刘锦妮,李 洵. 饲料中硝基咪唑类药物的 GC-MS 检测方法[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):292-293.

饲料中硝基咪唑类药物的 GC-MS 检测方法

陈培荣¹, 刘锦妮¹, 李 洵¹, 何 斌²

(1. 信阳农业高等专科学校, 河南信阳 464000; 2. 湖北省武汉市畜牧兽医科学研究所, 湖北武汉 430208)

摘要:采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)法测定饲料中硝基咪唑类药物的含量,通过色谱分离,发现保留时间与标准一致,线性关系良好,检出限为 0.20~0.63 ng/kg,回收率为 83.7%~95.4%,此外日内和日间的变异系数均小于 15%。结果表明,GC-MS 法适用于饲料中的硝基咪唑类药物的含量测定。

关键词:硝基咪唑类药物;气相色谱-质谱联用法;检测方法

中图分类号: S816.17 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)07-0292-02

硝基咪唑类药物具有抗原虫和抗厌氧菌活性,临床上主要用于治疗畜禽的厌氧菌感染及各种原虫病的防治。由于具有潜在的致畸、致突变和致癌作用^[1],硝基咪唑类药物在环境和动物性食品中的残留对人类健康构成了一定威胁。欧盟和美国已经禁止在食源性动物中使用硝基咪唑类药物^[2],我国农业部也规定,在动物性食品中不得检出硝基咪唑药物的残留^[3],因此对硝基咪唑类药物残留检测方法的研究受到广泛重视。本研究用气相色谱-质谱(GC-MS)法测定饲料中硝基咪唑类药物的含量,检测限为 0.20~0.63 ng/kg,因此本研究方法的建立将为饲料中硝基咪唑类药物的检测提供新方法,并为硝基咪唑类药物在饲料中残留的监控、人民健康的保障和维护工作提供重要的理论和实践依据。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品与试剂 地美硝唑(DMZ, $C_5H_7N_3O_2$),批号:073K0675;甲硝唑(MNZ, $C_6H_9N_3O_3$),批号:033K14731;奥硝唑(ONZ, $C_7H_{10}ClN_3O_3$),批号:044H0887;购自 Sigma 公司。

N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺、异辛烷、二甲苯、正辛醇、正己烷、乙酸乙酯、一氯代苯、甲醇均为分析纯,购自上海振兴化工一厂;试验用水为超纯水。

1.1.2 仪器设备 Varian 3800 GC/Saturn 2000 MS 气相色谱/质谱联用分析仪(美国瓦里安公司生产);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(上海东玺制冷仪器设备有限公司生产);Milli-Q PLUS 超纯水装置(美国 Millipore 公司生产);2-16K 冷冻离心机(德国 Sigma 公司生产);5 μ L 微量进样器(上海高鸽工贸有限公司生产);微量移液器(Finnpipette Digital 40~1 000 μ L)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制 分别准确称取 10 mg DMZ、MNZ、

ONZ,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇定容并振荡均匀。将质量浓度为 100 mg/L 的 DMZ、MNZ、ONZ 储备液存放在阴暗的 4 $^{\circ}$ C 冰箱内备用。

1.2.2 GC-MS 条件的确立 气相条件:VF-5MS 色谱柱,30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m;载气,氦气(99.99%);流速为 0.9 mL/min;进样方式为无分流进样;进样量 1 μ L;进样口温度为 250 $^{\circ}$ C;柱温升温程序:初始温度 100 $^{\circ}$ C,保持 1 min 后,以 10 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 180 $^{\circ}$ C,保持 1 min,再以 20 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 280 $^{\circ}$ C。

质谱条件:电子轰击离子源,电离能量 70 eV;溶剂延迟 3 min;离子阱温度为 150 $^{\circ}$ C;传输线温度为 260 $^{\circ}$ C;歧管温度为 40 $^{\circ}$ C;电子倍增管电压为 1 550 V;质谱扫描采用选择离子监控(SIM)模式。

1.2.3 样品处理方法的建立 样品的提取与净化:准确称取 5.0 g 粉碎均匀的试样于 50 mL 离心管中,加 2.5 mL 磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 值 8.0),振荡并混合均匀;再添加 10 mL 乙酸乙酯,于 8 000 r/min 条件离心 10 min;将上层有机相转移至另 1 支离心管中,于 40 $^{\circ}$ C 水浴中用 N_2 吹干后用 10 mL 磷酸缓冲液溶解,过 0.45 μ m 滤膜后作为待测样品备用。

样品的衍生化:用移液管准确移取 5.0 mL 上述待测溶液,加到萃取小瓶中,用 5 μ L 微量进样器取一定量的有机溶剂(作为萃取溶剂),在温度 50 $^{\circ}$ C、搅拌速度 600 r/min 的条件下萃取 20 min;然后抽回悬挂的小液滴并转移至微型衍生化试管中,加入 5 μ L 10% 二甲基砷-甲醇溶液,用 N_2 在 40 $^{\circ}$ C 条件下吹干,再加入各 15 μ L 的衍生化试剂 N,O-双(三甲基硅烷基)乙酰胺、异辛烷,涡旋混合后在 70 $^{\circ}$ C 条件下衍生 45 min,直接注入 GC-MS 仪进行分析。

1.3 方法学验证

取未添加药物的饲料,粉碎均匀后置于 50 mL 离心管中,添加适量的硝基咪唑类药物混合标准溶液,分别配制浓度为 1、5、10 μ g/kg 的 DMZ、MNZ、ONZ 样品。每个浓度设置 5 个平行,按照上述样品的处理方法,连续做 5 d。计算回收率和变异系数,以变异系数达到要求的最低浓度作为检测限($S/N=3$),以回收率和变异系数达到要求的最低浓度作为定量限($S/N=10$)。

收稿日期:2012-12-21

作者简介:陈培荣(1977—),男,陕西西安人,讲师,主要研究方向为兽药药物的检测与分析。Tel:(0376)6698010;E-mail:haigang413@sohu.com。

通信作者:何 斌,男,四川广安人,主要研究方向为兽药药理与毒理学。E-mail:953355126@qq.com。

2 结果与讨论

2.1 色谱分析

采用“1.2.2”的 GC-MS 条件,对 3 种硝基咪唑类药物的混合标准溶液进行 GC-EI-MS 总离子流测定,依次分离出 3 个峰的质谱图,结果经过 NIST 谱图检索,发现它们依次对应 DMZ、MNZ、ONZ。3 种物质的保留时间、特征离子和定量离子见表 1。3 种物质的离子质谱图见图 1 至图 3。各物质的保留时间和特征离子作为实际样品测定的定性依据。

表 1 分析物的保留时间、特征离子和定量离子

药物	保留时间 (min)	特征离子 (m/z)	定量离子 (m/z)
DMZ	6.80	54,95,141	141
MNZ	10.02	182,197,228,244	182
ONZ	12.96	230,276,292	276

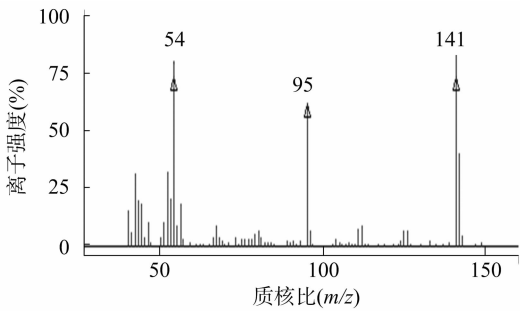


图1 地美硝唑离子质谱图

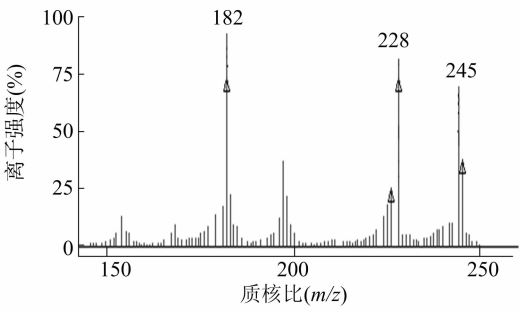


图2 甲硝唑离子质谱图

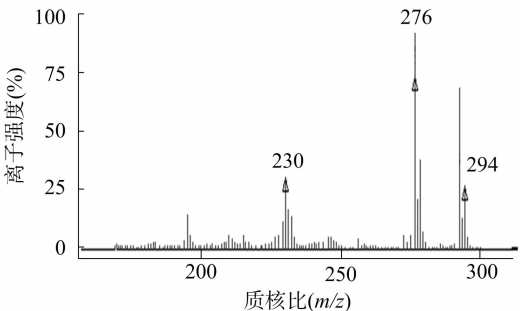


图3 奥硝唑离子质谱图

2.2 方法的线性范围和检出限

由表 2 可以看出,本研究所建立的饲料中硝基咪唑类药

物的标准工作曲线相关性较好,相关系数均大于 0.990 0,地美硝唑、甲硝唑、奥硝唑的最低检测限(LOD)见表 2。

表 2 GC-MS 法检测饲料中硝基咪唑类药物的相关参数

药物	范围 (ng/kg)	相关系数 (r)	LOD (ng/kg)	RSD (%,n=5)
DMZ	1.0~200	0.997 6	0.63	5.04
MNZ	0.5~400	0.996 1	0.20	2.37
ONZ	1.0~100	0.994 9	0.42	3.28

2.3 回收率和精密度

参照“1.2.3”所描述的方法,硝基咪唑类药物在饲料中的回收率为 83.7%~95.4%,日内变异系数和日间变异系数均小于 15%,表明本方法具有较好的精密度,适用于饲料中硝基咪唑类药物含量的测定。

3 讨论

萃取溶剂的选择是建立具体药物 GC-MS 方法的关键。笔者考察了对分析物的测定不产生干扰的 5 种有机溶剂(二甲苯、氯苯、正己烷、正辛醇、乙酸乙酯)对目标物的萃取能力。结果表明,正辛醇和目标物的极性较为接近,黏度和表面张力较大,且其沸点较高(196℃),在萃取过程中的损失较小,因此选择正辛醇作为萃取溶剂。

色谱柱的选择是色谱分离的关键,如果选择不当,很容易造成分析物分离度较差或者不能分离。DMZ 极性较小,而 MNZ、ONZ 由于带有羟基,因而极性较强、沸点较高、难以气化,衍生后可以降低极性,因此可以采用低极性的色谱柱进行分离。相关文献报道采用气相色谱和质谱联用分离检测硝基咪唑时,也以低极性的色谱柱为主^[4-5]。本试验采用 Varian VF-5MS 低流速低极性柱,分离效果较好。

致谢:华中农业大学兽医药理实验室在试验和仪器使用中给予了无私的帮助,在此表示感谢。

参考文献:

[1] Mudry M D, Carballo M, Venuesa M L, et al. Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs; III. Metronidazole (MTZ) [J]. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 1994, 305(2): 127-132.

[2] Polzer J, Gowik P. Validation of a method for the detection and confirmation of nitromidazoles and corresponding hydroxy metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 2001, 761(1): 47-60.

[3] 沈建忠, 项新华, 张跃, 等. 家禽肉鸡组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱检测法研究 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 700-703.

[4] Capitan-Vallvey L F, Ariza A, Checa R, et al. Determination of five nitroimidazoles in water by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 978(1/2): 243-248.

[5] 汪纪仑. 猪可食组织中硝基咪唑类药物多残留的 HPLC 法和 GC-MS 法的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.