

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 和 LC/MS/MS 分析鸡蛋中的硝基咪唑

作者

Xia Yang

安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报描述使用简单、稳定的通过式净化和 LC/MS/MS 分析测定鸡蛋中的 4 种硝基咪唑（甲硝唑、迪美唑、罗硝唑和异丙硝唑）及其羟基代谢物。采用 QuEChERS 萃取和 Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化的样品前处理步骤获得了优异的脂类和色素去除结果。该方法在 3 个 QC 浓度下均呈现出出色的准确度 (85.6%–118.3%) 和精密度 (RSD < 6%)。

前言

硝基咪唑是用于家禽的一类活性抗生素，也可用作食品动物的生长促进剂。然而，由于存在潜在风险，许多国家/地区已禁止使用这类化合物¹。已有一些有关使用溶剂萃取^{2,3}和固相萃取 (SPE)⁴来分析硝基咪唑的报道。但是，溶剂萃取通常采用乙酸乙酯或二氯甲烷等强溶剂，这些溶剂可萃取额外的基质，从而在 LC/MS 分析期间造成干扰⁴。SPE 方法包括乙腈萃取及随后的阳离子交换固相萃取柱的净化，该方法可得到洁净的洗脱液，但在样品前处理期间需要多个步骤和多次 pH 调节。

Captiva EMR-Lipid 是一款脂质去除产品，其将体积排阻与疏水相互作用两种净化机制相结合，能够选择性地捕获脂类烃链，同时不损失目标分析物。相比 SPE 的多步骤操作，EMR 独有的通过式功能可大大简化样品前处理工作流程。本应用简报在分析鸡蛋中的硝基咪唑及其羟基代谢物时使用 Captiva EMR-Lipid 进行样品净化，得到了优异的回收率和精密度。图 1 显示了 4 种硝基咪唑及其代谢物的化学结构。

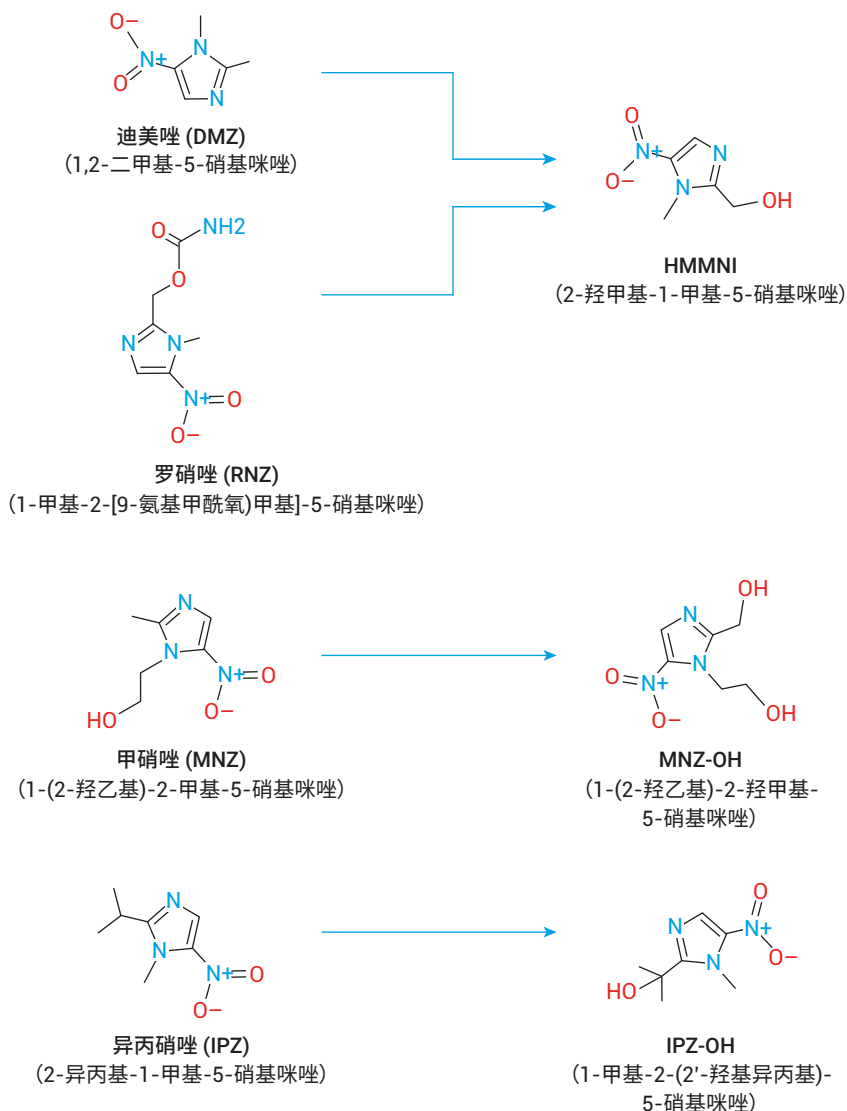


图 1. 4 种硝基咪唑及其代谢物的化学结构

实验部分

试剂与化学品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或分析纯级。乙腈 (ACN) 和甲醇 (MeOH) 购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。甲酸 (FA) 购自百灵威科技有限公司 (中国北京)。硝基咪唑和内标购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)。

溶液与标准品

单个标准品储备液由甲醇配制成 10 mg/mL, 置于棕色容量瓶中并在 -20°C 下储存。混合标准品加标溶液 (1 mg/mL) 和内标混合物 (1 mg/mL) 在使用前由甲醇配制。

仪器与材料

采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱执行分离操作, 该液相色谱与配备安捷伦喷射流电喷雾电离 (EI) 离子源的 Agilent 6495B 三重四极杆液质联用系统联用。Agilent 9000 气相色谱系统联用 Agilent 7000 GC/MS 三重四极杆系统, 利用 GC/MS 全扫描评估基质的去除情况。采用 Agilent MassHunter 工作站软件进行数据采集和分析。

其他的样品前处理所用的设备和材料包括:

- SPEX 样品前处理 2010 Geno/Grinder (Metuchen, NJ, USA)
- Eppendorf 5810R 离心机 (Hamburg, Germany)
- Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱, 3 mL, 300 mg (部件号 5190-1003)
- Agilent Vac Elut 20 真空萃取装置 (部件号 12234101)
- 用于兽药的 Agilent QuEChERS 萃取试剂盒 (部件号 5982-0032)

仪器条件

图 2 显示了鸡蛋中 7 种硝基咪唑及其代谢物以及 3 种内标的典型 MRM 色谱图, 其中硝基咪唑的加标浓度为 1 ng/g。内标的加标浓度为 10 ng/g。

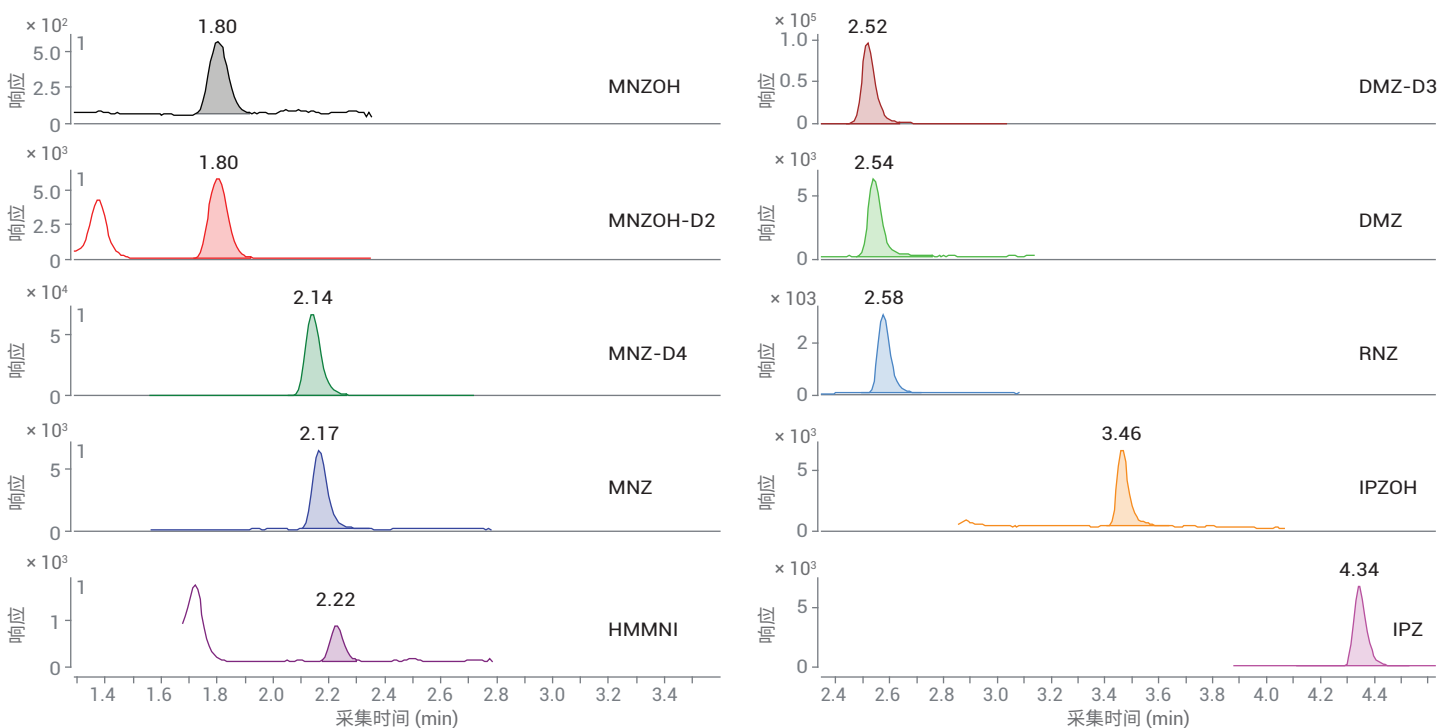


图 2. 以每种硝基咪唑 1 ng/g 以及内标 10 ng/g 加标的鸡蛋的典型色谱图

HPLC 条件

参数	值																		
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695975-302)																		
柱温	35 °C																		
自动进样器温度	15 °C																		
进样量	1 μL																		
流动相	A) 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.1% 甲酸的乙腈溶液																		
梯度	<table><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th><th>流速 (mL/min)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>10</td><td>0.5</td></tr><tr><td>0.5</td><td>10</td><td>0.5</td></tr><tr><td>4.5</td><td>50</td><td>0.5</td></tr><tr><td>5.0</td><td>95</td><td>0.5</td></tr><tr><td>6.0</td><td>95</td><td>0.5</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	流速 (mL/min)	0	10	0.5	0.5	10	0.5	4.5	50	0.5	5.0	95	0.5	6.0	95	0.5
时间 (min)	%B	流速 (mL/min)																	
0	10	0.5																	
0.5	10	0.5																	
4.5	50	0.5																	
5.0	95	0.5																	
6.0	95	0.5																	
停止时间	8.5 min																		

质谱条件

参数	值
正/负离子模式	正
碎裂电压	380 V
碰撞池加速器电压	3
气体温度	210
气体流速	13 L/min
雾化器	35 psi
鞘气温度	400
鞘气流速	12
毛细管电压	3500 V
Delta EMV (+)	400

MRM 参数

分析物	保留时间 (min)	离子对 (m/z)	碰撞能量 (eV)
DMZ	2.54	142 → 96	21
		142 → 81	33
DMZ-D3	2.52	145 → 99	17
MNZ	2.17	172 → 128	13
		172 → 82	25
MNZ-D4	2.15	176 → 128	15
MNZOH	1.83	188 → 123	13
		188 → 126	21
MNZOH-D2	1.82	190 → 128	17
HMMNI	2.18	158 → 55	18
		158 → 140	13
IPZ	4.35	170 → 109	25
		170 → 124	33
IPZOH	3.46	186 → 168	13
		186 → 121	29
RNZ	2.58	201 → 140	9
		201 → 55	25

样品前处理

图 3 展示了样品前处理过程。将鸡蛋样品混合均匀并准确称量 (5 g)。然后, 配制含 5% 甲酸的乙腈溶液用于提取。实验表明, 高比例的甲酸可实现更好的蛋白沉淀效果, 产生更多的沉淀。选择包含 4 g Na₂SO₄ 和 1 g NaCl 的 QuEChERS 萃取包来净化鸡蛋样品中的极性干扰物。离心后, 移取上层乙腈相 (2.4 mL) 至洁净的试管中, 加入 0.6 mL 水进行稀释 (水的体积百分比为 20%) 并充分涡旋混合。然后, 将混合溶液转移到 3 mL Captiva EMR-Lipid 净化管中, 使其在重力作用下流过净化管。然后真空干燥过滤柱。最后, 收集并涡旋洗脱液, 待进样。

校准标样和质量控制 (QC) 样品

用于标准曲线的校准标样溶剂的配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10、50 和 100 ng/g。包含 DMZ-D3、MNZ-D4 和 MNZOH-D2 的内标混合物的加标浓度为 10 ng/g。

将适量的标准工作溶液加入均质化蛋样品中, 得到预加标的 QC 样品, 其中涵盖低浓度 (1 ng/g)、中等浓度 (5 ng/g) 和高浓度 (10 ng/g), 各平行配制 6 份。

结果与讨论

线性

使用 Agilent MassHunter 定量分析软件处理数据。使用线性回归拟合和 1/x 加权得到 7 种硝基咪唑和代谢物的校准曲线, 其 R² 值均在 0.993–0.995 之间。

回收率和精密度结果

表 1 显示运行 3 个 QC 浓度的加标样品对先进行 QuEChERS 萃取, 然后进行 Captiva EMR-Lipid 净化的方法的验证结果。回收率为 86.5%–118.3%, RSD < 6%。由于内标数量有限, 因此用 MNZOH-D3 校准 MNZOH, 用 MNZ-D4 校准 MNZ, 用 DMZ-D3 校准 DMZ、RNZ、IPZ 和 IPZOH。由于 HMMNI 具有不同的化学特性, 因此未用任何内标对其进行校准。

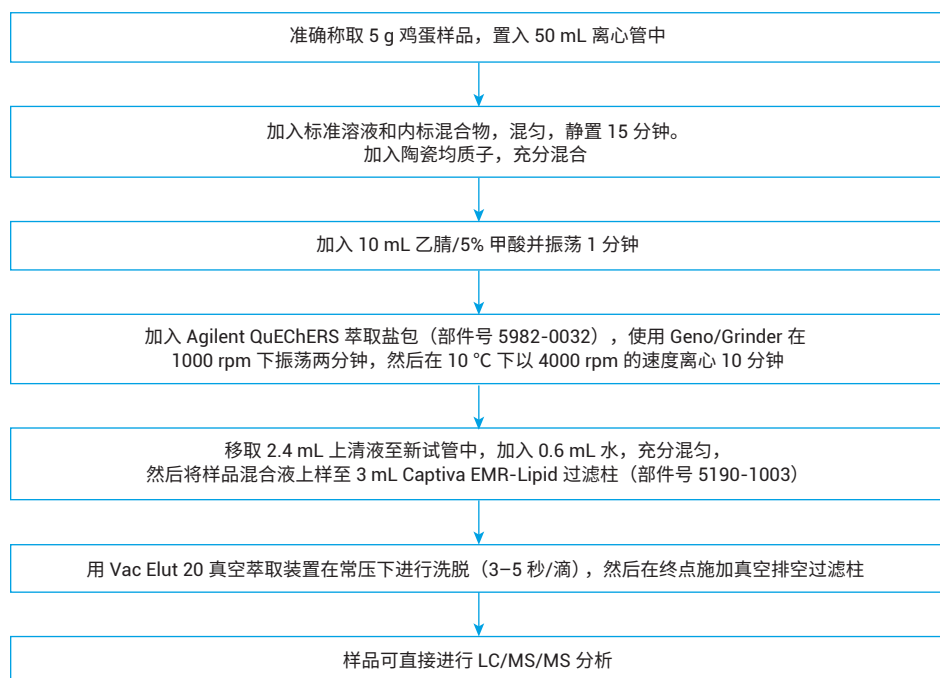


图 3. 鸡蛋样品萃取及使用 Captiva EMR-Lipid 3 mL 过滤柱的后续净化

表 1. 鸡蛋中 3 个 QC 浓度的方法定量分析结果

分析物	R ²	线性范围 (ng/g)	1 ng/g QC (n = 6)		5 ng/g QC (n = 6)		10 ng/g QC (n = 6)	
			回收率%	RSD%	回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
DMZ	0.994	0.1–50	89.6	3.2	89.6	2.4	88.8	2.6
HMMNI	0.993	0.5–100	118.3	4.7	103.9	4.3	110.9	2.5
IPZ	0.994	0.1–50	93.3	3.5	93.1	2.9	93.0	3.0
IPZOH	0.995	0.1–50	94.2	5.0	91.3	3.5	90.0	3.3
MNZ	0.994	0.1–50	91.5	3.5	87.6	3.7	86.5	3.6
MNZOH	0.995	0.1–50	94.3	5.4	88.4	4.8	87.3	3.4
RNZ	0.994	0.1–50	99.3	5.9	99.7	3.5	98.9	3.4

使用 GC/MS 监测基质去除率

鸡蛋含有蛋白质和各类脂质。我们在图 4 中比较了采用和未采用 Captiva EMR-Lipid 净化的 GC/MS 全扫描。红色色谱图仅代表酸性乙腈萃取，黑色色谱图代表的是先用酸性乙腈萃取然后用 Captiva EMR-Lipid 净化的结果。通过

比较两种条件下的总峰面积计算得出，EMR-Lipid 对基质的去除率达到了 76%。图 5 显示使用两种不同条件进行预处理后的干燥样品。从中可以明显看出 Captiva EMR-Lipid 去除了大部分基质和色素。

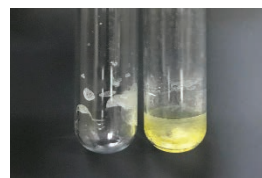


图 5. 左图：用酸性乙腈萃取，随后用 Captiva EMR-Lipid 净化的干燥鸡蛋样品；右图：仅用酸性乙腈萃取的干燥鸡蛋样品

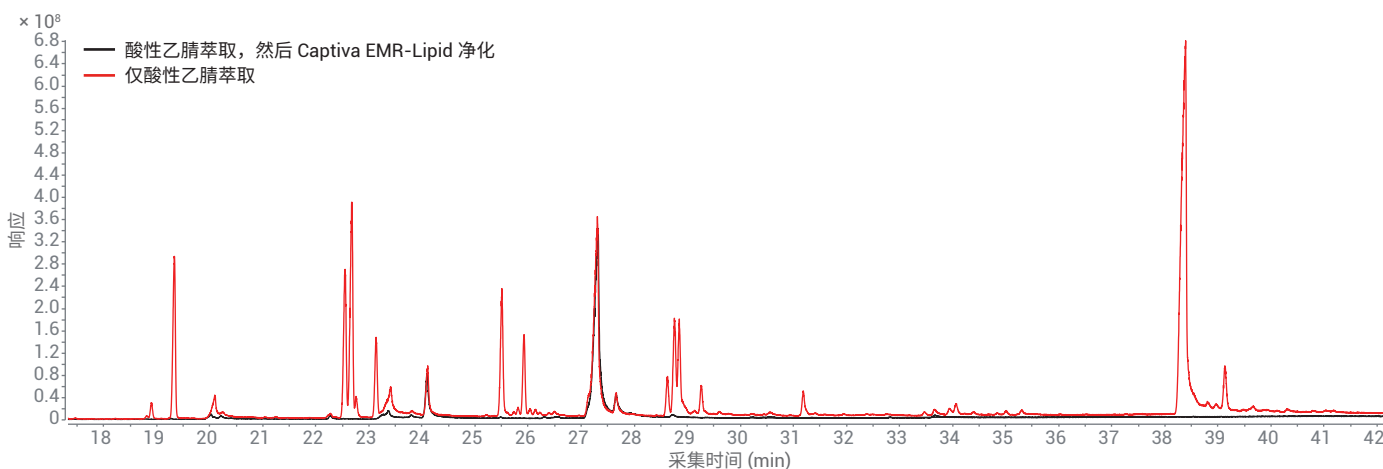


图 4. 通过比较鸡蛋样品仅经溶剂萃取后（红色）以及经 Captiva EMR-Lipid 净化后（黑色）的 GC/MS 全扫描色谱图来评估基质去除率

结论

本研究证明 Captiva EMR-Lipid 是一种简便有效的净化方法，适用于分析鸡蛋中的兽药。对 7 种硝基咪唑和代谢物的验证得到了出色的回收率 (86.5%–118.3%) 和精密度 (RSD < 6%)。GC/MS 全扫描表明使用 Captiva EMR-Lipid 可高效除去脂质和色素。总体而言，在分析鸡蛋中的兽药时，Captiva EMR-Lipid 能够高效简单选择性地除去脂质/基质，且不会对分析物的回收率产生负面影响。

参考文献

1. Establishment of MRLs of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Council Regulation (EEC) no. 2377/90, Official Journal of the European Communities L224, **1990**
2. Cronly, M.; *et al.* Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatog. A* **2009**, 1216, 8101-8109
3. Granja, R.; *et al.* Determination and confirmation of metronidazole, dimetridazole, ronidazole, and their metabolites in bovine muscle by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2013**, 30, 970–976
4. Mitrowska, K.; Posyniak, A.; Zmudzki, J. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma, and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **2010**, 81, 1273–1280

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019
2019年1月18日，中国出版
5994-0641ZHCN

