

并且操作简单、耗时短、检出限低,方法准确可靠。

参考文献

- [1] 肖雪花,陶保华,任一平. 超高效液相色谱柱前衍生法测定奶粉及其他乳制品中 L-羟脯氨酸[J]. 中国职业医学,2011,38(增刊):66-67.
- [2] 金苏英,林笑容,赵志红,等. 高效液相色谱法测定奶粉及其他乳制品中的 L-羟脯氨酸[J]. 检测与分析,2009,12(7):28-30.
- [3] 张秀尧,梁晓蓉,蔡欣欣. 氨基酸自动分析仪检测乳及乳制品中羟脯氨酸[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(10):2305-2306.
- [4] 曾暖茜,王洪健,周兴起,等. 氨基酸自动分析仪对乳制品中羟脯氨酸的测定方法研究[J]. 现代食品科技,2008,24(7):719-721.
- [5] LIANG H,XUE J,LI T, et al. A rapid capillary electrophoresis with electrochemiluminescence method for the assay of human urinary

- proline and hydroxyproline[J]. Luminescence,2005,20:287-291.
- [6] CHEN S, XU Y, XU F, et al. Separation and determination of amino acids by micellar electrokinetic chromatography coupling with novel multiphoton excited fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography,2007,1162:149-153.
- [7] 戴绚丽,范立英,任艳. 对二甲氨基苯甲醛分光光度法测定奶粉中 L-羟脯氨酸含量[J]. 食品工业科技,2009,30(3):313-314,318.
- [8] 孔晓峰,古丽曼,达成彪,等. 紫外分光光度法测定生鲜乳中动物水解蛋白 L-羟脯氨酸含量[J]. 饲料工业,2011,32(4):60-61.
- [9] 张强,赵福荣,邓小君. 乳与乳制品中 L(-)-羟脯氨酸测定方法的改进[J]. 现代科学仪器,2011,8(4):47-49.
- [10] 田艳玲,孙妍,陈婧,等. 乳与乳制品中动物水解蛋白 L-羟脯氨酸测定方法[J]. 中国乳品工业,2009,36(6):49-50.
- [11] 陈裕华,廖仕成,李瑞园,等. 乳与乳制品中羟脯氨酸测定方法的研究[J]. 职业与健康,2010,26(3):283-285.

实验技术与方法

固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水产品中硝基呋喃类代谢物

陈剑刚,白艳玲,梁素丹,胡小玲,张艳

(珠海市疾病预防控制中心,广东 珠海 519000)

摘要:目的 建立水产品中呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮等硝基呋喃代谢物的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱测定方法。方法 样品中加入同位素内标,经盐酸水解及 2-硝基苯甲醛衍生,再经 Oasis HLB 固相萃取小柱净化,乙酸乙酯洗脱吹浓浓缩;采用 XTerra® MS C₁₈ 色谱分离柱,以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液进行梯度洗脱,以正离子多反应监测模式,同位素内标法定量。结果 4 种硝基呋喃代谢物的定量限为 0.10 ~ 0.30 μg/kg;方法的线性范围为 0.5 ~ 25 μg/kg, $r > 0.995$;代谢衍生物的加标回收率分别为 81.0% ~ 104.8%、91.0% ~ 110.3%、85.0% ~ 111.4% 和 88.0% ~ 108.2%;RSD 在 2.7% ~ 14.5% 之间。应用建立的方法对 180 份淡水鱼进行测定,其中 4 份检出 3-氨基-2-噁唑烷基酮(AOZ),含量为 1.3 ~ 3.6 μg/kg。结论 方法选择性高、灵敏,能满足水产品中硝基呋喃类代谢物残留的高灵敏分析。

关键词:液相色谱-串联质谱;硝基呋喃类代谢物;固相萃取;水产品;兽药残留

中图分类号:R155;O657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)04-0338-06

Determination of nitrofurantoin metabolites in aquatic products by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with solid phase extraction

CHEN Jian-gang, BAI Yan-ling, LIANG Su-dan, HU Xiao-ling, ZHANG Yan

(Zhuhai Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhuhai 519000, China)

Abstract: Objective The method for determination of metabolites of four nitrofurantoin antibiotics, nitrofurantoin (AMOZ), furaltadone (SEM), nitrofurazone (AHD) and furazolidone (AOZ) in aquatic products was developed by solid-phase extraction coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Samples with isotope internal standard solutions were hydrolyzed by HCl and derivatized with 2-nitrobenzaldehyde. The analytes were cleaned up on HLB solid-phase column and eluted with ethyl acetate, then evaporated and dried with nitrogen gas. The extract components were separated and gradient eluted on a XTerra® C₁₈ column with acetonitrile-5 mmol/L ammonium

acetate of 0.1% formic acid solutions ion, and simultaneously quantified by the isotope internal standard operating in positive ion under multiple reactions monitoring mode. **Results** The limits of quantification ranged from 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for four nitrofurans metabolites. The standard curves were linear in the range of 0.5-25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, with the correlation coefficients > 0.995 . The average recoveries for nitrofurans metabolites were 81.0% -104.8%, 91.0% -110.3%, 85.0% -111.4%, 88.0% -108.2% respectively, and their relative standard deviation varied between 2.7% and 14.5%. The method was applied to analyze 180 fish samples from Guangdong region, four of which were confirmed to contain AOZ ranging from 1.3 to 3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The method developed was selective, sensitive and accurate, completely suitable for nitrofurans metabolites trace analysis in aquatic products.

Key words: Liquid chromatography tandem mass spectrometry; nitrofurans metabolites; solid phase extraction; aquatic products; veterinary drugs residue

硝基呋喃类药物主要包括呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮,因其具有广谱抗菌能力曾广泛应用于水产养殖业,自发现该类代谢物及其代谢物具有强致癌致畸等副作用后,已被大多数国家禁止在动物源性食品上使用^[1]。研究表明,硝基呋喃类药物在动物体内代谢很快,检测动物组织中硝基呋喃原药不足以反映其真实的残留水平^[2]。其代谢产物 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑烷基酮 (AMOZ)、氨基脲 (SEM)、1-氨基-2-内酰脲 (AHD)、3-氨基-2-噁唑烷基酮 (AOZ) 能与蛋白质结合,可长期稳定存在于动物体内。因此,目前通常以测定其代谢物的方式来监控硝基呋喃类药物在动物体内的含量^[3]。

硝基呋喃类代谢物残留的检测方法主要采用酶联免疫法 (ELISA)^[4]、高效液相色谱法 (HPLC)^[5]、液相色谱-质谱法 (LC/MS)^[6] 和液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[7-9]。ELISA 法仅适于筛选检测;HPLC 法和 LC/MS 法灵敏度无法达到痕量分析要求;LC-MS/MS 法灵敏度高、可同时进行定量和确证,已日益成为食品中硝基呋喃类代谢物检测的主要分析方法。但大部分方法,包括 GB/T 21311—2007《动物源食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法》^[10] 均采用衍生化后乙酸乙酯提取、正己烷脱脂后直接上机测定。由于未进一步净化,会导致基质复杂的水产品因严重的乳化现象而产生基体效应,不可避免地污染仪器系统和影响结果的准确性。本研究以相应的同位素为内标,经酸性条件下水解样品、2-硝基苯甲醛衍生化、Oasis HLB 固相萃取小柱净化等前处理,建立了 LC-MS/MS 测定水产品中硝基呋喃 4 种代谢产物 AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 的确证方法。采用同位素内标定量,有效地补偿了前处理过程中目标物的损失,提高了方法的回收率。该法定性定量准确,重现性好,灵敏度高,4 种硝基呋喃类代谢物的定量下限均可达 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,完全能满足欧盟

及我国食品安全风险监测的限量要求。应用该方法,对省内多份送检淡水鱼中的硝基呋喃类代谢物残留进行了监测检验,结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Alliance 2695 高效液相色谱仪、Quattro PremierXE 三重四级杆质谱仪 (配电喷雾离子源) (均购自美国 Waters)、Oasis HLB 固相萃取柱 (3cc, 200 mg)、Vacuum Manifold 12 孔固相萃取小柱装置、OA-SYS 氮吹仪、低温高速离心机、超声波仪。

呋喃它酮代谢物 (AMOZ, 98.0%)、呋喃西林代谢物 (SEM, HCl, 99.5%)、呋喃妥因代谢物 (AHD, HCl, 99.0%) 及呋喃唑酮代谢物 (AOZ, 98.2%) (均购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH), 呋喃它酮代谢物氘代物 (AMOZ-D5)、呋喃西林代谢物内标 (SEM-¹³C¹⁵N₂, HCl)、呋喃妥因代谢物内标 (AHD-¹³C₃, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、呋喃唑酮代谢物内标 (AOZ-D4, 99.5%) (均购自 Dr. Ehrectorfe GmbH 公司), 甲醇、乙腈、乙酸乙酯 (色谱纯), 乙酸铵 (优级纯), 2-硝基苯甲醛 (2-NBA, 分析纯), 试验用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

水解和衍生化:准确称取 2.0 g 捣碎混匀样品置于 50 ml 离心管中,加入 50 μl 硝基呋喃代谢物混合内标中间溶液 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、10 ml 盐酸 (0.2 mol/L)、200 μl 2-硝基苯甲醛溶液 (0.1 mol/L), 先超声 10 min, 后振荡 20 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中过夜约 16 h, 使待测物衍生完全。

提取和净化:取出样品,冷却至室温,用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 至 7.2 ~ 7.4。4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行 SPE 净化。将提取液以自然重力下落的速率通过预先活化的 Oasis HLB 固相萃取柱,再用 3 ml 纯水淋洗小柱,减压抽干 2 min。用 6 ml 乙酸乙酯分两次洗脱,收集洗脱液,在氮气流下吹干,用甲醇-水 (1:1, V/V) 溶液定

容至 1 ml,旋涡器上充分混匀,过 0.22 μm 微孔滤膜至自动进样器小瓶中待测。

1.2.2 标准溶液的制备

硝基呋喃代谢物单标储备液 (1.0 mg/ml): 准确称取适量 AMOZ、SEM、HCl、AHD、HCl 及 AOZ,用甲醇溶解并分别配成 1.0 mg/ml 单标储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存;混合标准中间溶液 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 将 1.0 mg/ml 硝基呋喃代谢物单标储备液用甲醇逐级稀释为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的混合标准中间液;硝基呋喃代谢物混合内标储备液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 准确称取适量 AMOZ-D5、SEM- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ 、HCl、AOZ-D4,以甲醇溶解并分别配成 1.0 mg/ml 内标单标液,从中各吸取 50 μl ,加入 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AHD- $^{13}\text{C}_3$ 溶液 500 μl ,用甲醇逐级稀释为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混合内标储备液;混合内标中间溶液 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 将 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硝基呋喃代谢物混合内标储备液以甲醇稀释为 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 混合内标中间液。

1.2.3 仪器条件

色谱条件: 采用 Waters XTerra[®] MS C₁₈ 色谱柱 (150 mm \times 2.1 mm, 5 μm), 以乙腈-5 mmol/L 乙酸铵的 0.1% 甲酸水溶液进行梯度洗脱 (见表 1), 流速 0.20 ml/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 10 μl 。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program for HPLC

| 时间/min | 乙腈/% | 5 mmol/L NH ₄ AC 的 0.1% 甲酸溶液/% |
|--------|------|---|
| 0 | 10 | 90 |
| 7.0 | 90 | 10 |
| 11.0 | 90 | 10 |
| 11.1 | 10 | 90 |
| 20.0 | 10 | 90 |

质谱条件: 正离子电喷雾 (ESI+) 模式, 毛细管电压 3.5 kV, 萃取电压 5.0 V, 射频透镜电压 0.4 V, 离子源温度 120 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂气流量 650 L/h, 锥孔气流量 50 L/h, 碰撞室压力 3.6×10^{-3} mbar (Ar), 多反应监测 (MRM) 模式检测。AMOZ、SEM、AHD、AOZ 及其内标衍生物的 MRM 分析参数见表 2。

1.2.4 内标标准曲线制备

将硝基呋喃代谢物混合标准中间溶液 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 用甲醇-水 (1:1, V/V) 溶液稀释配制成 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 和 50.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准系列工作液, 加入 50 μl 硝基呋喃代谢物混合内标中间溶液 (0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 按照 1.2.1 和 1.2.3 方法进行前处理并依次测定, 以待测物与其内标物的峰面积之比为纵坐标, 对应的标准液质量浓度为横坐标, 绘制内标标准曲线。

表 2 硝基呋喃代谢物衍生物质谱分析参数

Table 2 MRM analytical parameters for derivatives of nitrofurans metabolites

| 化合物 | 保留时间/min | 母离子/ (<i>m/z</i>) | 子离子/ (<i>m/z</i>) | 锥孔电 压/V | 碰撞能 量/eV |
|-------------------------------------|----------|------------------------|------------------------|------------|-------------|
| AMOZ | 7.64 | 334.9 | 291.0* | 19 | 10 |
| | | | 261.9 | 19 | 15 |
| AMOZ-D5 | 7.59 | 340.0 | 265.0* | 19 | 12 |
| SEM | 8.85 | 208.9 | 165.9* | 20 | 12 |
| | | | 191.9 | 20 | 13 |
| SEM- $^{13}\text{C}^{15}\text{N}_2$ | 8.83 | 211.9 | 167.9 | 20 | 13 |
| AHD | 9.00 | 248.9 | 133.9* | 22 | 16 |
| | | | 177.9 | 22 | 17 |
| AHD- $^{13}\text{C}_3$ | 8.97 | 251.9 | 133.9 | 30 | 24 |
| AOZ | 9.46 | 235.9 | 133.9* | 22 | 27 |
| | | | 103.9 | 22 | 13 |
| AOZ-D4 | 9.43 | 239.9 | 133.9 | 20 | 16 |

注: * 表示定量离子。

2 结果与讨论

2.1 衍生化反应机理及衍生条件的选择

内源性硝基呋喃代谢物以蛋白质结合物的形态存在于样品中, 可在酸性环境中游离出来。4 种硝基呋喃代谢物的分子量在 75 ~ 201 之间, 该范围 ESI+ 离子模式质谱背景噪声大, 直接检测灵敏度较低。AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 的分子结构中均具有 1 个相同的氨基 (-NH₂), 而衍生剂 2-硝基苯甲醛 (2-NBA) 的分子结构中具有 1 个醛基 (-CHO)。在酸性条件下, 醛基 (-CHO) 与硝基呋喃代谢物的含氮亲核基团氨基 (-NH₂) 发生醛胺亲核加成反应, 接着 β 位发生消去反应失去 1 分子 H₂O, 可分别形成较好的特性衍生物^[7]。经柱前衍生后, 使分子量分别只有 201、75、115、102 的 AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 衍生为分子量为 334、208、248、235 的衍生物, 分子离子质荷比均大于 200, 处于相对适于检测的质量区域。

本研究根据 GB/T 21311—2007 国标方法, 采用盐酸水解代谢物与蛋白结合物, 用 2-NBA 衍生 4 种代谢物, 两个步骤同时进行, 比较了超声 10 min-振荡 20 min-恒温 16 h、振荡 30 min-恒温 16 h 两种不同衍生反应条件对测定结果的影响。当先超声 10 min, 后振荡 20 min, 再衍生 16 h 时, AHD 衍生物的测定信号明显强于不经超声的信号, 其它 3 个组分的信号也稍大, 这可能是超声波使溶液分子碰撞速度加快, 使得反应更为完全。因此, 实际测定时选用超声 10 min、振荡 20 min, 再 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱平衡 16 h 进行衍生化。

2.2 提取和净化条件的选择

衍生化完成后进行萃取操作时, 样品溶液的 pH 值对萃取效率有很大的影响。当 pH 值处于 (7.3 \pm

0.1)范围内,AMZO、SEM、AHD及AOZ代谢物的衍生产物提取效率最高,分别为95.5%、96.2%、92.4%和93.6%。特别对于响应较低的AHD组分,当用1 mol/L NaOH溶液调节pH至8~10时,其萃取效率极低;当pH < 5时,几乎不能将AMZO从水相提取至有机相中,其特征离子质量色谱图(MRM)中提取不到AMZO的监测离子对。相对而言,SEM、AOZ对pH值不敏感,提取效率较高且稳定。因此,本法提取对pH值控制较严格,调节样品溶液pH值时,应间隔30 s后重新测定,pH值应稳定在7.2~7.4范围内。此外,硝基呋喃代谢物受光照的影响也较大^[11],故在前处理过程中需进行必要的避光操作,所用器皿也应尽可能采用棕色。

净化主要有固相萃取和液液萃取两种方式,GB/T 21311—2007及已报道的文献^[7-9]方法中大多采用正己烷脱脂、乙酸乙酯提取的净化方式。本研究采用Oasis HLB固相萃取柱(3cc,200 mg)净化富含蛋白的鱼样,净化效果好,回收率高。用提取的阴性样品溶液作为基质空白,向其中添加硝基呋喃代谢物混标应用液,衍生、固相萃取,4种硝基呋喃代谢物回收率均在90%以上。

2.3 色谱条件优化

分别比较了XTerra®C₁₈、Xbridge™C₁₈、Sunfire™C₈

等反相色谱柱对目标物质的色谱分离效果。结果表明,4种硝基呋喃代谢物的衍生产物及其内标衍生产物在XTerra®C₁₈柱获得了理想的分离效果。SEM及AOZ组分在Xbridge™C₁₈、Sunfire™C₈两柱上分离与峰形良好,但AMZO、AHD两组分响应偏低且峰形扩宽。因流动相组成影响出峰的保留时间、峰形和目标化合物的离子化效率,考察了液质分析常用的乙腈-水和甲醇-水体系,发现影响不大,出于改善峰形考虑,选用前者。为了增加离子化效率,在体系中添加5 mmol/L的乙酸铵,在流动相体系中加入0.1%甲酸,使溶出时间较早的AMZO组分峰形尖锐,从而提高了灵敏度。本方法采用梯度洗脱程序,当乙腈-5 mmol/L乙酸铵的0.1%甲酸水溶液的比例达到90:10时,AMZO、SEM、AHD及AOZ能与杂质完全分离并流出。因此,在本流动相体系及梯度洗脱程序试验条件下,4种硝基呋喃代谢物及其内标的衍生产物均能获得最佳色谱分离和最高的灵敏度。同时为减少杂质对质谱检测器的污染,在0~6.5 min和11~20 min采用了溶剂延迟程序。在优化的色谱条件下,空白鱼样中添加4种硝基呋喃代谢物及相应内标的衍生产物总离子流图(TIC)及其特征离子质量色谱图(MRM)见图1。

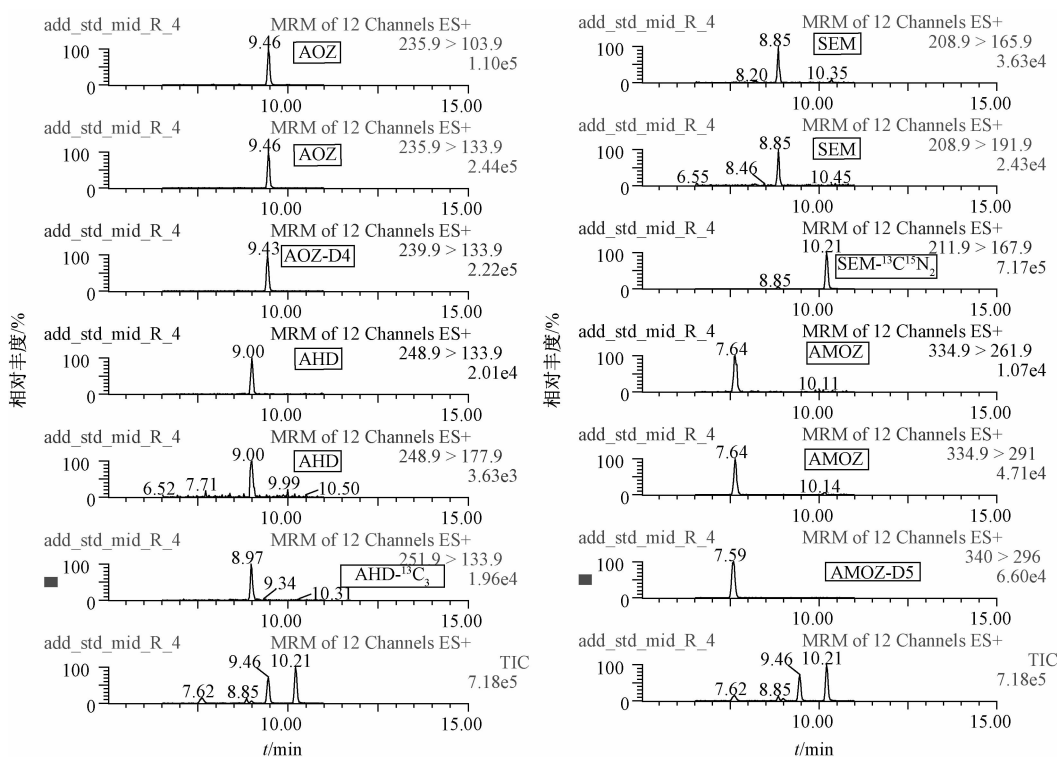


图1 空白鱼样中添加5.0 µg/kg混标及其内标的衍生产物色谱图

Figure 1 Chromatogram of a blank fish spiked with 5.0 µg/kg mixed nitrofurantoin metabolite standards

2.4 质谱条件的优化

硝基呋喃代谢物的衍生产物含有极性较强的

-CH=N-N氨基官能团,选用ESI+离子化模式灵敏度较高。取5 µg/ml的硝基呋喃代谢物及其内

标的混合标准溶液,用2-硝基苯甲醛衍生化,分别得到它们的标准衍生溶液。采用流动注射泵以10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 连续进样方式在正离子模式下进行一级质谱母离子扫描,确定 AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 衍生物的分子离子峰分别为 m/z 334.9、208.9、248.9 和 235.9。然后分别以各自的母离子,用子离子扫描方式进行二级质谱扫描分析,找出丰度相对较强的两个特征碎片离子,以母离子和子离子组成监测离子对,在多反应监测(MRM)模式下对目标物进行定性定量分析。选择丰度最强、无干扰的监测离子对 m/z

z 334.9/291.0、 m/z 208.9/165.9、 m/z 248.9/133.9 和 m/z 235.9/133.9,分别用于 AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 的定量分析,其它离子对则用于辅助定性分析。如图2为 AMOZ 的二级质谱图, m/z 291.0 为定量离子, m/z 261.9 为定性离子。通过优化毛细管电压、锥孔电压、射频透镜电压、碰撞能量、碰撞气压、离子源温度、去溶剂气温度及流量、锥孔气流量等质谱参数,使 AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 衍生物的监测离子对强度达到最大,本研究优化后的质谱参数见 1.2.3 中质谱条件。

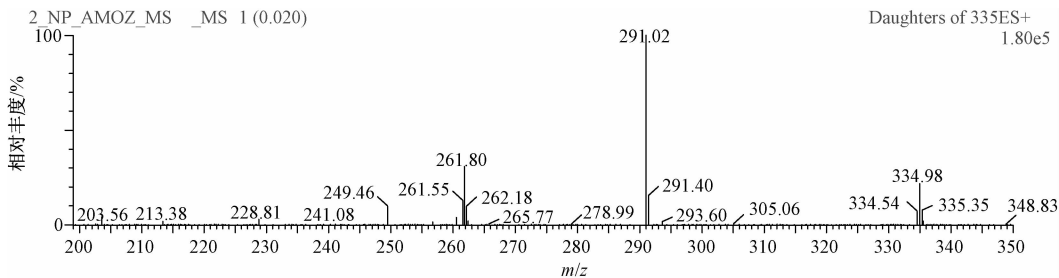


图2 AMOZ 二级质谱图

Figure 2 Mass spectra of AMOZ

2.5 线性关系和检出限

分别配制一系列标准工作溶液,衍生、提取、净化后,在本研究的色谱和质谱条件下进行测定,AMOZ、SEM、AHD 及 AOZ 衍生物在 0.5 ~ 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内线性系数良好, $r > 0.998$ 。方法检出限(LOD)以3倍信噪比估算,AMOZ、AHD 的检出限均为 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$,SEM、AOZ 的检出限均为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$;以10倍信噪比计算方法定量限(LOQ),AMOZ、AHD 的定量限均为 0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$,SEM、AOZ 均为 0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法的最低定量限均优于国标要求的定量限(0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$),方法线性关系与检出限见表3。

表3 方法线性与检出限

Table 3 Linear equation and limit of detection

| 化合物 | 线性方程 | 相关系数 | 检出限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 定量限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) |
|------|----------------------------|--------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| AMOZ | $y = 0.055371x + 0.014367$ | $r = 0.9995$ | 0.09 | 0.30 |
| SEM | $y = 0.081710x + 0.12325$ | $r = 0.9977$ | 0.03 | 0.10 |
| AHD | $y = 0.098672x + 0.099317$ | $r = 0.9996$ | 0.09 | 0.30 |
| AOZ | $y = 0.089617x + 0.089296$ | $r = 0.9992$ | 0.03 | 0.10 |

2.6 方法的回收率和精密度

在2g空白鱼肉中分别添加100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 4种硝基咪唑代谢物混合标准应用液20、100、400 μl 和200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 硝基咪唑代谢物混合内标中间液50 μl ,4种硝基咪唑代谢物的添加水平分别为1.0、5.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,添加的硝基咪唑代谢物内标浓度均为10 $\mu\text{g}/\text{L}$,按1.2.1制备样品溶液,每个加标水平平行测定6次,考察方法的回收率和精密度。AMOZ、

SEM、AHD 及 AOZ 代谢物的回收率分别为 81.0% ~ 104.8%、91.0% ~ 110.3%、85.0% ~ 111.4% 及 88.0% ~ 108.2%;变异系数在 2.7% ~ 14.5%。方法的回收率与精密度完全可以满足国内外相关法规的要求,试验结果见表4。

表4 方法的回收率及精密度测定结果($n = 6$)

Table 4 The results of recoveries and precisions

| 化合物 | 加标水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 平均测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 回收率/ % | 变异系数/ % |
|------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------|------------|
| AMOZ | 1.0 | 0.81 | 81.0 | 14.5 |
| | 5.0 | 5.24 | 104.8 | 12.2 |
| | 20.0 | 18.68 | 93.4 | 7.6 |
| SEM | 1.0 | 0.91 | 91.0 | 5.3 |
| | 5.0 | 5.44 | 108.8 | 6.8 |
| | 20.0 | 22.06 | 110.3 | 5.4 |
| AHD | 1.0 | 0.85 | 85.0 | 6.5 |
| | 5.0 | 5.33 | 106.5 | 7.3 |
| | 20.0 | 22.28 | 111.4 | 4.9 |
| AOZ | 1.0 | 0.88 | 88.0 | 5.0 |
| | 5.0 | 5.41 | 108.2 | 2.7 |
| | 20.0 | 19.98 | 99.9 | 4.5 |

2.7 样品测定

采用建立的方法,对180份送检的淡水鱼进行硝基咪唑代谢物残留量测定。绝大部分鱼样未检出4种硝基咪唑代谢物残留,仅从4份鱼样中检出含AOZ的阳性样品,AOZ浓度分别为1.3、3.0、3.2及3.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其它代谢物组分均未检出。图3为某份鱼样中检出AOZ的总离子流图及其质量色谱图。

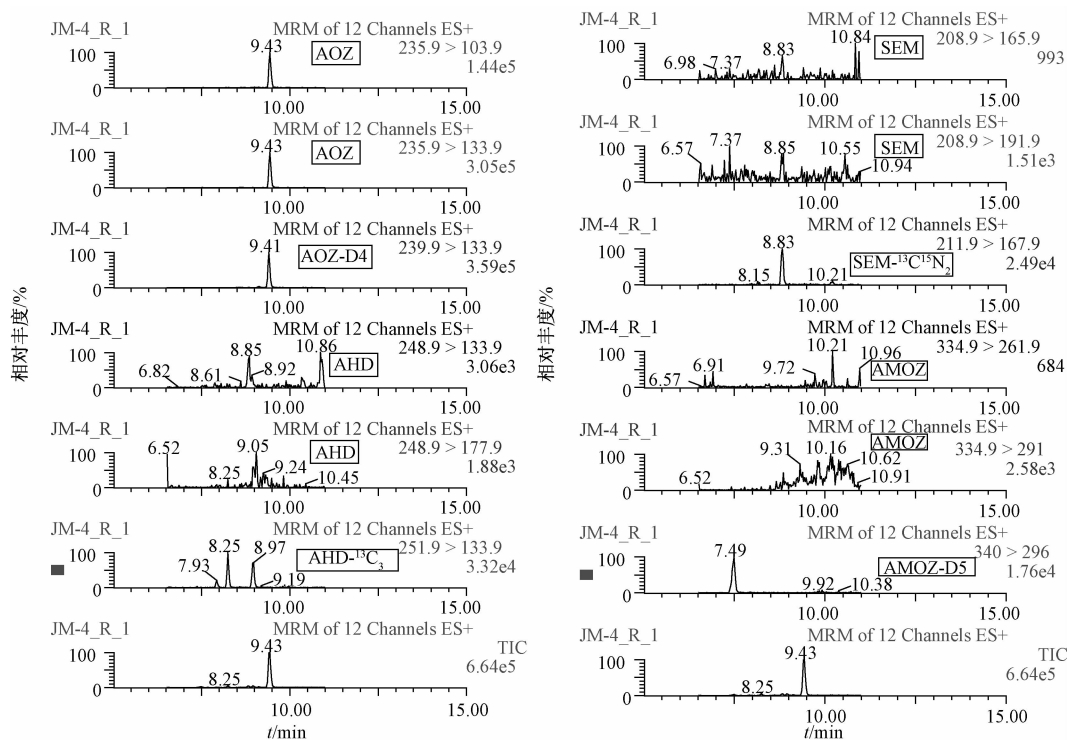


图3 某鱼样中检出AOZ的TIC及其MRM色谱图
Figure 3 TIC and MRM chromatogram of one fish contained AOZ

3 结论

本研究建立了同位素稀释液相色谱串联质谱法测定水产品中AOMZ、SEM、AHD及AOZ等4种硝基呋喃类代谢物的分析方法。通过对仪器色谱条件和质谱条件各项参数的调谐,在优化的试验条件下,经XTerra®C₁₈色谱柱分离,在LC-MS/MS多反应监测模式下进行定性定量分析。该法以待测物的同位素标记物为内标,补偿了前处理过程中目标物的损失,保证了回收率,有效地提高了定量的灵敏度。方法的检出限为0.03~0.09 μg/kg,定量限为0.10~0.30 μg/kg,回收率和重现性等方法学指标亦均能满足水产品中硝基呋喃类代谢物残留的检测要求;采用同位素内标,以双离子监控模式,可准确地甄别样品中残留的硝基呋喃类代谢物,保证了定性的准确性。该方法适用于水产品中4种硝基呋喃类代谢物残留的确证检验。

参考文献

[1] 张敏, 桑丽雅, 王振国, 等. 用于水产品中硝基呋喃类代谢物检测的胶体金快速检测试剂板的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(1): 32-36.

[2] European Communities. Commission regulation (EC) No. 250/2002[R]. Off. J. European Communities, 2002, L84: 75-81.

[3] Alexander L, Peter Z, Wolfgang L, et al. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-

performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatography A, 2001, 939: 49-58.

[4] 蒋宏伟. 酶联免疫技术在动物产品中硝基呋喃类药物残留检测的应用[J]. 陕西农业科学, 2006(5): 53-55.

[5] Conneely A, Nugent A, Keeffe M O. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues [J]. Analyst, 2002, 127(6): 705-709.

[6] McCracken R J, Kennedy D G. Determination of furazolidone in animal feeds using HPLC with UV and thermospray MS detection [J]. J Chromatogr A, 1997, 771(1/2): 349-354.

[7] 李耀平, 林永辉, 贾东芬, 等. 水产品中硝基呋喃类代谢物残留快速检测新方法的研究[J]. 分析测试学报, 2008, 27(7): 712-717.

[8] Motter P, Khong S P, Gremaud E, et al. Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1/2): 85-91.

[9] 孙宜春, 张洁, 牟振波, 等. 固相萃取液相色谱串联质谱测定水产品中硝基呋喃类代谢物残留研究[J]. 中国渔业质量与标准, 2011, 1(2): 54-59.

[10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21311—2007 动物源食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

[11] 丁涛, 徐锦忠, 沈崇钰, 等. 高效液相色谱-串联质谱联用测定蜂蜜浆中的四种硝基呋喃类药物的代谢物[J]. 色谱, 2006, 24(5): 432-435.