

液相色谱-质谱联用法分析检测鳗鱼中 4 种硝基呋喃代谢物

许 航

(福建省计量科学技术研究所 福州市屏东路 9 号 350003)

摘 要 建立了液相色谱-质谱联用法(LCMS)测定鳗鱼中 4 种硝基呋喃代谢物的快速方法。方法首先采用甲醇水溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=8:1$)粗提鳗鱼中的呋喃唑酮代谢物(AOZ), 呋喃它酮代谢物(AMOZ), 呋喃西林代谢物(SC)和呋喃妥因代谢物(AH), 再用 2-硝基苯甲醛(2-NBA)作为衍生剂, 使鳗鱼中的这 4 种硝基呋喃代谢物被成功衍生, 并最终实现 LCMS 的分离检测。结果表明, 本方法高效灵敏, 检出限低, AOZ 和 AMOZ 的检出限分别可达到 0.08、0.06 ng/g, AH 和 SC 的检出限分别为 0.16 ng/g 和 0.15 ng/g, 可很好地运用于鳗鱼企业内部及市场监管部门对水产品中硝基呋喃抗生素代谢物的检测分析。

关键词 液相色谱-质谱联用法; 硝基呋喃代谢物; 水产品; 鳗鱼

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-8138(2010)02-0769-05

1 引言

硝基呋喃类药物是极常见的人工合成广谱抗生素, 并且作为促生长的添加剂, 在猪、禽类和水产养殖中被广泛应用。但长时间的实验室研究表明, 无论通过何种途径摄入硝基呋喃类药物, 均会在机体中蓄积, 导致许多细菌产生抗药性, 同时, 连续长期使用, 其残留于体内的代谢物还会引起出血综合征, 并诱发癌变和基因突变。硝基呋喃与氯霉素一样, 已被欧盟确定为不得检出的抗生素之一。根据欧盟指令, 硝基呋喃代谢物残留检测方法的检出限性能要求(MRPL)为 $110 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。当前国际上普遍采用液相色谱-串联质谱法进行硝基呋喃代谢物的检测和确证^[1-10]。

由于液相色谱-串联质谱法在我国开展较迟, 且 LCMS/MS 的使用成本较高, 许多企业仍未普及, 仍然以 LCMS 作为定性和定量检测方法。本文研究了采用 LC-APC/MS 对鳗鱼样品中硝基呋喃代谢物 AOZ, AMOZ, SC, AH 进行检测分析方法。检出限可达到 $0.1-0.2 \mu\text{g}/\text{L}$, 可以满足国际对硝基呋喃代谢物的最低检测要求, 同时, 我们用本法检测市场上的各种鳗鱼, 得到较好的回收率, 可很好地运用于鳗鱼企业内部及市场监管部门对水产品中硝基呋喃抗生素代谢物的检测分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

2010EV 高效液相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司), 包含 LC-20AD 二元泵, 在线真空脱气机, 柱温箱, 大气压化学离子化接口的四极杆质谱检测器; Milli-Q Gradient A10 超纯水器(美国 Millipore 公司); 匀浆机; KQ-3200E 超声波清洗器(上海精密仪器仪表有限公司); RS-1 型涡旋混合器(北京吴诺斯科技有限公司); XHW-300 恒温箱(长春新科试验仪器设备有限公司)。

标准溶液: 称取呋喃唑酮代谢物(AOZ), 呋喃它酮代谢物(AMOZ), 呋喃西林代谢物(SC)和呋喃妥因代谢物(AH)标准品(纯度均不小于 99%, 购自德国 Witega Laboratorien Berlin-Adlershof

联系人, 电话: (0591)87804852; E-mail: xulin@fzu.edu.cn; lnhp686@163.com

作者简介: 许航(1957—), 男, 福州市人, 高级工程师, 主要从事化学化工的工程测试和计量检测工作。

收稿日期: 2010-02-01; 接受日期: 2010-02-15

GmbH 公司产品) 各约 0.0200g (精确至 0.0001g), 用乙腈溶解, 配成 100.0mg/L 标准储备液, 置于 4℃ 冰箱中存放。使用时, 取适量的储备液与乙腈按一定比例混合, 配置成所需浓度的标准工作溶液。

2.2 色谱条件

Shimadzu VP-ODS C18 色谱柱 (4.6mm ID × 250mm, 5μm), 柱温 40℃。流动相 A 为甲醇溶液, 流动相 B 为 10mmol/L 醋酸铵水溶液, 按表 1 程序进行梯度洗脱, 流速为 0.8mL/min。

表 1 梯度洗脱程序

时间 <i>t</i> (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0.00	50	50
13.00	50	50
13.01	95	5
17.00	95	5
17.01	50	50
27.00	STOP	

2.3 MS 分析条件

质谱检测模式: 大气压化学离子化 (APCI); 离子极性: 正电荷; 雾化气流速 2.5L/min; 反吹气 0.03MPa; 曲形脱溶剂装置 (CDL) 温度: 250℃; 电压 4.5kV; 加热块温度: 200℃; 检测器电压 1.50kV。选择性离子检测方式 (SM), 检测衍生化反应之后 4 个产物的目标离子 *m/z*, 2-NBA-AOZ: 253, 2-NBA-AMOZ: 335, 2-NBA-AH: 266, 2-NBA-SC: 226。

2.4 样品提取与净化方法

将样品用液氮冷却后, 用匀浆机将样品粉碎匀化, 取 1g 粉碎后的样品于 50mL 离心管中, 加入 1mL 水和 8mL 甲醇溶液, 于离心机中以 3000r/min (4℃) 速度离心 10min, 取出上清液, 用甲醇、乙醇和乙醚分别清洗样品提取液, 除去蛋白等干扰成分后, 加入 4mL 水溶液, 1mol/L 盐酸溶液 0.5mL, 再加入 50mmol/L 2-NBA 衍生剂 150μL, 于涡旋混合器中涡旋 10s, 放入 37℃ 恒温箱中水解, 衍生 16h, 衍生后, 加入 0.1mol/L 磷酸二氢钾 5mL, 1mol/L 氢氧化钠 400μL, 乙酸乙酯 5mL, 涡旋 30s, 2000r/min, 4℃ 离心 15min, 用移液器移取 5mL 的乙酸乙酯提取液于 15mL 离心管中, 于残液中再加入 5mL 的乙酸乙酯, 再次离心提取分离, 并将两次提取液汇集, 于 50℃ 条件下氮吹。将乙酸乙酯吹干后, 将浓缩物用 200μL 的甲醇水溶液 ($V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} = 1 : 1$) 重新复溶, 用 0.22μm 有机滤膜过滤后, 转移入进样瓶进样。

3 结果与讨论

3.1 样品的提纯制备

AOZ, AMOZ, SC, AH 这 4 种硝基咪喃代谢物的相对分子质量较小, 采用 LC-MS 分析, 容易受低质量端分子离子干扰, 为此, 我们将硝基咪喃代谢物通过衍生化反应接入大基团, 以增大其相对分子质量, 以获得良好的 LC-MS 检测效果, 这是样品制备的关键步骤。

本试验研究样品制备过程为: 酸性条件下水解释放出动物组织中与蛋白结合的代谢物, 同时采用 2-硝基苯甲醛 (2-NBA) 对代谢物进行衍生化, 这是由于这 4 种硝基咪喃代谢物的分子结构中均具有 1 个相同的氨基, 而衍生剂 2-NBA 的分子结构中具有 1 个醛酮基团, 在酸性条件下衍生剂的醛酮基团与代谢物的含氮亲核基团氨基发生醛胺亲核加成反应, 生成 NBAOZ, NBAMOZ, NBSC 和 NBAH, 这些衍生物分子离子质荷比增大至 *m/z* 200 附近或以上, 处于相对适于检测的质量区域。

3.2 硝基咪喃代谢物的衍生物标准品谱图结果

在上述分析条件下, 4 种硝基咪喃衍生物标准品 2-NBA-AOZ, 2-NBA-AMOZ, 2-NBA-AH, 2-NBA-SC 色谱图如图 1 所示。

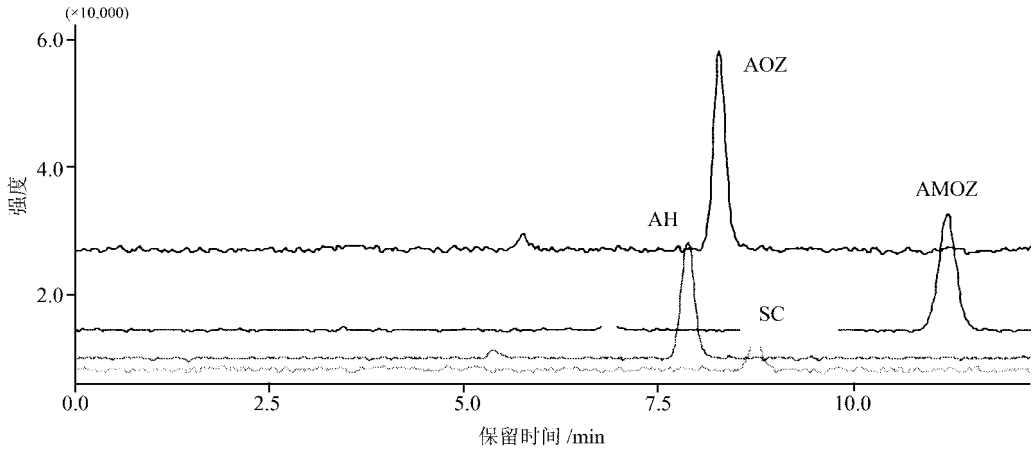


图 1 4 种硝基呋喃代谢物衍生物的标准品色谱图
 相应于 AOZ, AMOZ, AH, SC 的浓度分别为 0.43, 0.62, 2.32, 0.36 ng/mL。

3.3 空白鳗鱼样品

取空白鳗鱼样品, 按上述预处理方法进行操作, 得到空白样品谱图, 见图 2。可见该条件下, 背景杂质对 AOZ, AMOZ, AH, SC 检测不存在明显干扰。

3.4 回收率, 检出限, 定量限结果

在空白鳗鱼样品中加入硝基呋喃代谢物标准品溶液, 使 AOZ, AMOZ, AH, SC 的浓度为 0.5, 0.5, 0.5, 2.5 ng/g。按上述方法进行衍生化提取等前处理, 由 LC-MS 分析得到加标样品色谱图, 见图 3。利用加标样品得到方法回收率, 检出限, 定量限, 结果见表 2。

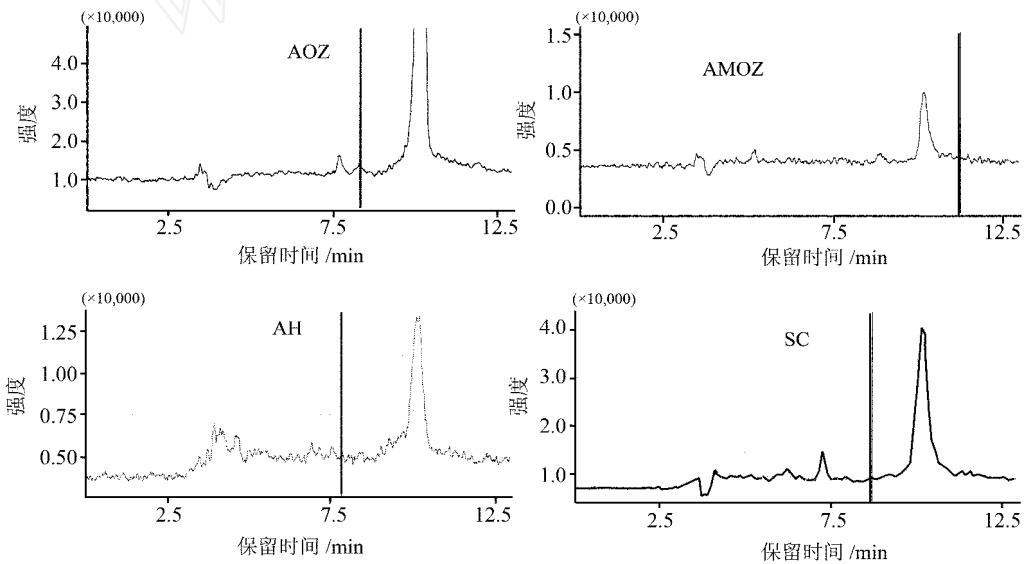


图 2 空白鳗鱼样品谱图

表 2 空白鳗鱼样品中 4 种硝基呋喃代谢物回收率, 检出限, 定量限结果

	含量 (ng · g ⁻¹)	平均值 (n=2)	回收率 (%)	RSD (%)	LOD (ng · g ⁻¹)	LOQ (ng · g ⁻¹)
AOZ	0.5	0.45	89.10	2.7	0.077	0.25
AMOZ	0.5	0.36	74.54	5.8	0.063	0.21
AH	2.5	0.94	42.13	16.3	0.163	0.55
SC	0.5	0.50	106.8	10.2	0.151	0.50

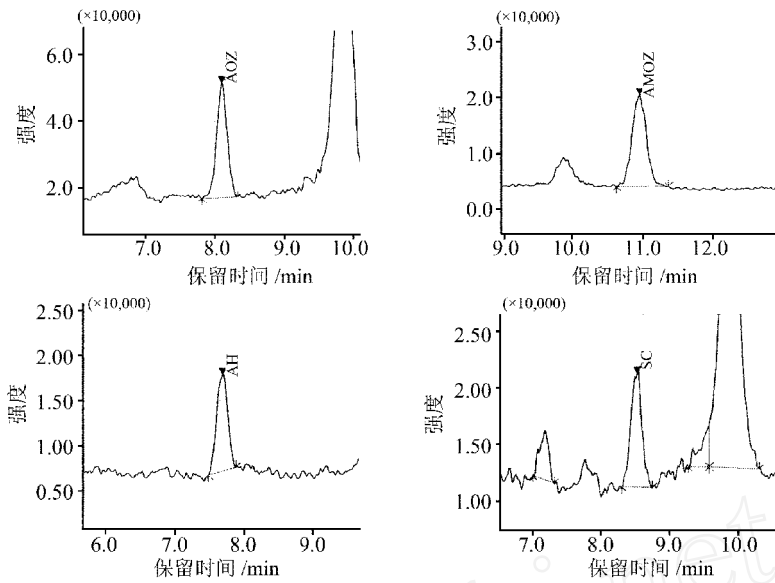


图 3 空白鳊鱼样品中加入AOZ, AMOZ, AH, SC 标准品后的分析谱图

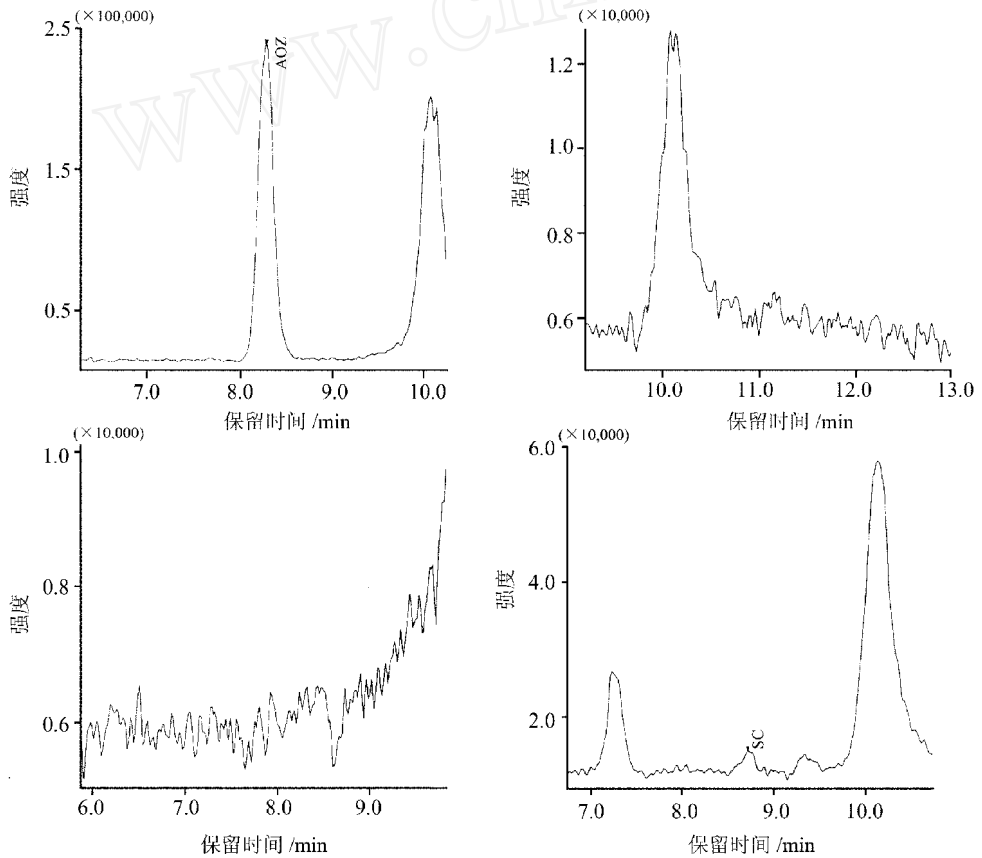


图 4 活鳊鱼样品中 4 种硝基咪唑代谢物的分析谱图

3.5 测定用户的活鳗鱼样品结果

取市面上 1g 鳗鱼, 均化粉碎, 按上述方法进行样品制备, 得到的谱图如图 4 所示。

可以得到以下结论, 此鳗鱼样品中含 AOZ 3.8ng/mL, 含有 SC 代谢物, 在定量限以下, 不含硝基呋喃代谢物 AMOZ 和 AH。

4 结论

利用 LC-APCMS 对鳗鱼样品中呋喃唑酮代谢物 AOZ, 呋喃它酮代谢物 AMOZ, 呋喃西林代谢物 SC 和呋喃妥因代谢物 AH 同时进行检测分析, AOZ 和 AMOZ 的检出限分别为 0.08、0.06 ng/g, 定量限分别为 0.25、0.21ng/g, AH 的检出限和定量限分别为 0.16 和 0.55ng/g, SC 的检出限和定量限分别为 0.15 和 0.5ng/g。此方法可以很好的用于鳗鱼企业内部对水产品中硝基呋喃抗生素代谢物的检测分析。

参考文献

- [1] 王凤池, 马振栋, 郭春海等. 进出口动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留时测定方法高效液相色谱串联质谱法[S]. 行业标准: SN/T1627-2005, 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [2] Ferretti G, Civitareale C, Pallesch IL *et al* Multiresidue Method for the Determination of Nitrofurans Metabolites in Egg Using Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Vet Pharmacol Therap*, 2006, **29**Suppl. 1: 129—180.
- [3] Mulder P P, Zuidema T, Keestra N G *et al* Determination of Nitrofurans Metabolites in Poultry Muscle and Liver Tissue Development and Validation of a Confirmatory Method[J]. *Analyst*, 2005, **130**(5): 763—771.
- [4] Mottier P, Khong S P, Grenaud E *et al* Quantitative Determination of Four Nitrofurans Metabolites in Meat by Isotope Dilution Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Chromatogr A*, 2005, **1067**(1/2): 86—91.
- [5] Finzi J K, Donato J L, Sucupia M *et al* Determination of Nitrofurans Metabolites in Poultry Muscle and Eggs by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Chromatogr B*, 2005, **824**(1/2): 30—35.
- [6] Chu Pak sin, Lopezm L. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Protein-Bound Residues in Shrimp Doesd with Nitrofurans[J]. *J. Agr and Food Chem*, 2005, **53**(23): 8934—8939.
- [7] 李耀平, 林永辉, 贾东芳等. 超高效液相色谱串联质谱法快速检测烤鳗鱼中硝基呋喃代谢物残留新技术[J]. 分析实验室, 2008, **27**(12): 76—79.
- [8] Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-Residue Monitoring for the Simultaneous Determination of 5 Nitrofurans (Furazolidone, Furaldalone, Nitrofurazone, Nitrofurantoin, Nitrofur) in Poultry Muscle Tissue Through the Detection of Their Five Major Metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DN SAH) by Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Tandem Mass Spectrometry—In-House Validation in Line with Commission Decision[J]. *Anal Chim Acta*, 2007, **586**(1—2): 336—347.
- [9] Leitner A, Zollner P, Lindner W. Determination of the Metabolites of Nitrofurans Antibiotics in Animal Tissue by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Chromatogr A*, 2001, **939**(1—2): 49—58.
- [10] Conneely A, Nugent A, O'Keefe M *et al* Isolation of Bound Residues of Nitrofurans Drugs from Tissue by Solid-Phase Extraction by Liquid Chromatography with UV and Tandem Mass Spectrometry Detection[J]. *Anal Chim Acta*, 2003, **483**(1): 91—98.

Detemination of Nitrofurans Metabolites in Eel by LC-MS

Xu Hang

(Fujian Metrology Institute, Fuzhou 350003, P. R. China)

Abstract A method of LC-MS for determination of nitrofurans metabolites in eel has been established. After extracted by ethanol liquor crudely, nitrofurans metabolites AOZ, AMOZ, AH and SC were derivatized with 2-nitrobenzene formaldehyde (2-NBA), and the derivatized solution was separated and detected with LC-MS by a series of disposal. A lower detection was achieved by the method. The lowest detection limit (LOD) of AOZ and AMOZ were 0.08、0.06ng/g simultaneously, while the LOD of AH and SC was 0.16ng/g and 0.15ng/g respectively. The experiment results demonstrate that this method can be used in the determination of nitrofurans metabolites in aquatic products widely.

Key words LC-MS; Nitrofurans Metabolites; Aquatic Products; Eel