

高效液相色谱/串联质谱法测定奶粉中的硝基呋喃代谢物

彭涛^{1,2} 储晓刚² 杨强² 李刚² 李建中² 李重九^{*1}

¹ (中国农业大学理学院, 北京 100094)

² (中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘 要 用高效液相色谱/串联质谱 (LC-MS/MS) 法同时测定奶粉中呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林和呋喃妥因的代谢物。盐酸水解奶粉中蛋白结合的代谢物, 同时加入 2 硝基苯甲醛 (2-NBA), 37°C 过夜衍生化。加入硫酸锌, 调 pH 值至 7.0 后, 再加入亚铁氰化钾去除蛋白。后用乙酸乙酯提取, 正己烷净化, 分析物采用电喷雾电离正离子 (ESI⁺)、多反应监测 (MRM) 模式检测, 内标法定量。在添加浓度 0.5~2 μg/kg 范围内, 内标法回收率为 89.5%~110.3%; 相对标准偏差 (RSD) 小于 11.3%。5-马啉代甲基-3-氨基-2-恶唑酮 (5-methyl-morpholino-3-amino-2-oxazolidinone, AMOZ)、3-氨基-2-恶唑酮 (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ) 方法检出限为 0.05 μg/kg, 氨基脲 (semicarbazide, SEM)、1-氨基-乙内酰胺 (1-amino-hydantoin, AHD) 为 0.1 μg/kg。

关键词 液相色谱/串联质谱, 奶粉, 呋喃唑酮, 呋喃它酮, 呋喃西林, 呋喃妥因, 代谢物, 内标法

1 引言

硝基呋喃类药物主要包括呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林和呋喃妥因, 曾用于治疗 and 预防由埃希氏菌和沙门氏菌引起的哺乳动物消化道疾病。研究发现, 呋喃西林、呋喃唑酮及其代谢物 3-氨基-2-恶唑酮 (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ) 等具有致癌作用^[1]。欧盟已于 1995 年禁止在食用动物中使用硝基呋喃类药物^[2], 我国也于 2002 年颁布了禁止使用该类兽药的禁令。目前硝基呋喃类药物是国际动物源性食品贸易的必检项目, 成为发达国家限制第三国出口的技术贸易壁垒。

硝基呋喃类药物对光敏感, 代谢快速, 母体化合物在动物体及其产品中很快就降至检出限以下, 但其代谢物以蛋白结合物的形式在体内可残留较长时间^[3~5]。显然, 检测硝基呋喃类药物母体化合物已不能反映真实的用药情况。目前, 各国均将硝基呋喃代谢物作为指示硝基呋喃类药物残留的标示物。虽然国际上已建立起测定硝基呋喃代谢物的检测方法^[6], 彭涛等^[7]也率先在国内报道了用液相色谱/串联质谱测定动物组织中硝基呋喃代谢物的方法, 但是都是采用外标法定量, 受回收率影响大, 并且分析基质只适用于组织样品。到目前为止, 还没有关于高蛋白样品中硝基呋喃代谢物检测方法的报道。

本实验在已有研究的基础上, 采用硫酸锌和亚铁氰化钾脱蛋白, 液相色谱/串联质谱检测, 内标法定量, 成功测定了奶粉中的硝基呋喃代谢物。定量更准确, 检出限为 0.05~0.1 μg/kg, 优于欧盟 1 μg/kg 的要求。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Quattro Ultima Pt Tandem MS/MS 质谱系统 (英国 Micromass 公司)。色谱柱: XTerra MS C₁₈ (2.1 mm × 150 mm i.d., 3.5 μm, 美国 Waters 公司)。微孔滤膜 0.20 μm (安普科仪公司)。

5-马啉代甲基-3-氨基-2-恶唑酮 (AMOZ)、3-氨基-2-恶唑酮 (AOZ) (纯度 > 99%, RdH 公司); 氨基脲 (SEM) (纯度 > 98%, Fluka 公司); 1-氨基-乙内酰胺 (AHD) (纯度 > 99%, Aldrich 公司); D5-AMOZ, D4-AOZ, C13-AHD, C13-SEM 由北爱尔兰兽医科学部赠送。标准品储备液均用甲醇配制, 4°C 避光保存 (最多 3 个月)。工作液用甲醇由储备液稀释, 现用现配。2-硝基苯甲醛 (2-NBA) (纯度 > 98.5%, Fluka 公司), 用甲醇现用现配。甲醇、乙腈、乙酸乙酯、正己烷为色谱纯, 盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钾、硫酸锌、

2004-08-11 收稿; 2004-11-01 接受

本文系国家“十五”重大科技专项资助项目 (No. 2001BA804A18)

亚铁氰化钾、甲酸、醋酸铵为分析纯,水为去离子水。氮气和氩气 (>99.999%)。

2.2 LC-MS/MS分析条件

流动相 A 为乙腈, B 为 0.1%甲酸 (含 0.5 mmol/L 醋酸铵), 梯度洗脱: 0~7 min, 10% A~90% A; 7~10 min, 90% A; 10~20 min, 10% A; 流速 0.2 mL/min。柱温 30℃。

毛细管电压 3.5 kV, 源温度 120℃, 去溶剂温度 350℃, 锥孔气流 100 L/h, 去溶剂气流 600 L/h, 碰撞气体为氩气, 碰撞气压 2.6×10^{-4} Pa。电喷雾电离正离子方式 (ESI⁺)、多反应监测 (MRM) 方式检测 (见表 1)。

表 1 MRM 所用的母/子离子

Table 1 Precursor/daughter ions used in multiple reaction monitoring (MRM)

化合物 Compound	母离子 Precursor	子离子 Daughter	驻留时间 (s) Dwell time	锥孔电压 (V) Cone volt	碰撞能量 (eV) Col energy	监测窗口 Window
AMOZ	335	262	0.50	60	13	5.0~6.5 min
		291	0.30	60	9	
D5-AMOZ	340	296	0.30	60	9	6.5~8.0 min
		166	0.30	50	8	
C13-SEM	212	168	0.30	50	8	
		104	0.40	80	15	
AHD	249	104	0.40	80	15	
		134	0.30	80	10	
C13-AHD	252	134	0.20	80	10	
AOZ	236	104	0.30	77	14	
		134	0.10	77	10	
D4-AOZ	240	134	0.10	77	10	

AMOZ: 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone; AOZ: 3-amino-2-oxazolidinone; AHD: 1-amino-hydantoin; SEM: semicarbazide

2.3 样品处理

取 2.000 g 奶粉于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 准确加入 10 μg/L 的内标 100 μL, 再依次加入 0.2 mol/L HCl 溶液 20 mL, 50 mmol/L 的 2-NBA 100 μL, 涡动 1 min, 放置于 37℃ 恒温箱中过夜。取出样品, 冷却至室温, 依次加入 5 mL 0.25 mol/L 的 ZnSO₄ 和 4 mL 0.1 mol/L 的 K₂HPO₄, 震荡 10 min 后, 用 1 mol/L NaOH 调节 pH 7.0。再加入 5 mL 0.1 mol/L 的 K₄Fe(CN)₆, 震荡 10 min 后, 再 5000 r/min 离心 3 min, 转出上清液。上清液用 2 × 10 mL 乙酸乙酯提取, 合并乙酸乙酯层, 40℃ 减压浓缩。残留物用 1 mL 流动相溶解, 超声 2 min 后, 用 2 × 2 mL 正己烷脱脂, 0.20 μm 微孔滤膜过滤, 取 20 μL 进样检测。

2.4 添加实验

取 2.000 g 阴性奶粉于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中, 分别按 0.5、1.0 和 2.0 μg/kg 准确添加 4 种硝基咪唑代谢物混标, 余下操作同 2.3。

3 结果和讨论

3.1 奶粉样品的处理

3.1.1 衍生化 内源性硝基咪唑代谢物以蛋白结合物的形态存在于样品中, 并在适当的酸性条件下释放出来。硝基咪唑代谢物分子量在 75~201 之间, 该范围内 MS 背景影响大, 检测灵敏度很低。因此采用 2-NBA 对代谢物的自由氨基进行衍生化, 形成一个具有较好质谱特性的化合物。参照彭涛等^[7]的方法, 对奶粉中的硝基咪唑代谢物进行了同步水解和衍生化 (见图 1)。

3.1.2 提取与净化 在文献^[7]的样品处理方法中, 对组织样品首先采用甲醇/水 (1+1) 洗, 一些分析干扰物和游离态的 SEM (外源性干扰) 可以被除去。该方法为测定内源性硝基咪唑代谢物方法 (目前欧盟主要采用的方法)。奶粉属于高蛋白、高脂肪样品, 但同时具有一定的水溶性, 不能采用甲醇/水洗。因此, 本研究是测定内、外源性硝基咪唑代谢物总量的方法。若按照文献^[7]的提取、净化方法处理, 奶粉样品乳化、胶化现象严重, 回收率低 (30%~60%)。本实验在水解、衍生化蛋白结合态硝基咪唑代谢物后, 加入蛋白质沉淀剂 ZnSO₄ 和 K₄Fe(CN)₆, 有效去除了奶粉中的蛋白, 避免了提取、净化过程中的乳

化、胶化现象,同时对回收无明显影响。需要注意的是: $K_4Fe(CN)_6$ 必须在调整 pH 值为中性后,方可加入,否则可能产生剧毒的 HCN 气体。此前处理方法同样适用于蛋粉中硝基呋喃代谢物的提取和净化。

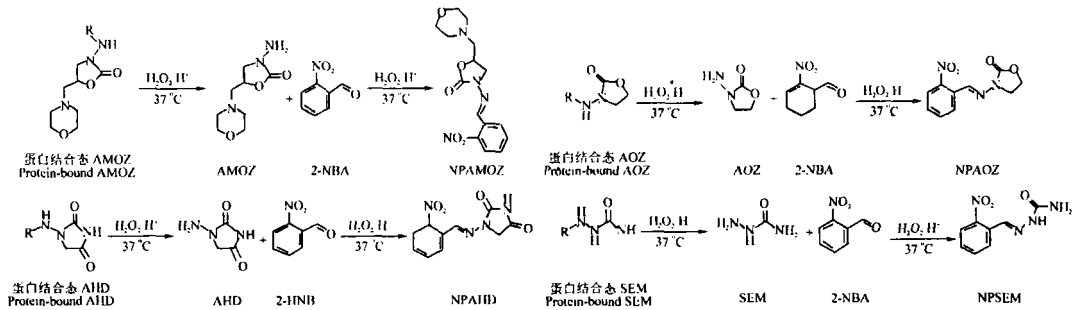


图 1 结合态硝基呋喃代谢物的同步水解和衍生化
Fig 1 Simultaneous hydrolysis and derivatisation of protein-bound nitrofurans metabolites

3.2 HPLC-MS/MS 条件优化

以前的研究中,采用了以乙腈/0.2%冰醋酸溶液为流动相的等度洗脱方式。为进一步提高检测灵敏度,对更易挥发的乙腈/0.1%甲酸流动相体系,采用梯度洗脱方式。实验发现,流动相中加入甲酸后, $M+Na^+$ (258) 峰丰度增加, $M+H^+$ (236) 降低,检测灵敏度下降;然而继续加入 0.5 mmol/L 的醋酸铵后, $M+Na^+$ 峰显著降低, $M+H^+$ 增高,检测灵敏度提高。这可能是由于实验在进行仪器质量数校正时使用了 $NaCl_2$, 系统中残留了 Na^+ , 由于甲酸强的溶解能力将其带入到质谱分析系统中,造成 $M+Na^+$ 峰丰度增加;醋酸铵的加入则有效削弱了甲酸对 Na^+ 的溶解。本研究采用 XTerra MS C_{18} 色谱柱,乙腈/0.1%甲酸/0.5 mmol/L 醋酸铵流动相体系,进行梯度洗脱,对 4 种分析物均获得良好分离和较高的分辨率。

3.3 内标法定量

采用氘代标准 (D5-AMOZ, D4-AOZ) 和 C_{13} 标记标准 (C_{13} -AHD, C_{13} -SEM) 为内标, 4 种分析物分别以各自内标定量,减小了外标法回收率的影响,使定量更加准确。采用 MRM 模式,按三离子原则对分析物进行定性,推断断裂方式如图 2,选用离子 335 > 291, 340 > 296; 209 > 166, 212 > 168; 249 > 134, 252 > 134; 236 > 134, 240 > 134 定量。

在标准品浓度 1.0~5.0 $\mu g/L$ 范围内, AMOZ 线性方程为 $y = 1.46854X + 0.206494$, $r = 0.9990$; SEM 线性方程为 $y = 2.24696X + 0.346803$, $r = 0.9992$; AHD 线性方程为 $y = 1.97745X + 1.75002$, $r = 0.9994$; AOZ 线性方程为 $y = 2.62932X + 0.102269$, $r = 0.9994$ 。

在添加浓度为 0.5~2 $\mu g/kg$ 范围内, 4 种代谢物内标法回收率在 89.5%~110.3% 之间, 相对标准偏差 RSD 小于 11.3%。经计算,方法检出限 (3 倍 S/N) AMOZ、AOZ 为 0.05 $\mu g/kg$, SEM、AHD 为 0.1 $\mu g/kg$, 优于欧盟的要求。

4 结 论

本研究采用高效液相色谱-串联质谱, ESI⁺、MRM 模式, 内标法定量, 成功测定了奶粉中 4 种硝基呋喃的内、外源性代谢物总量, 各项指标满足欧盟要求。

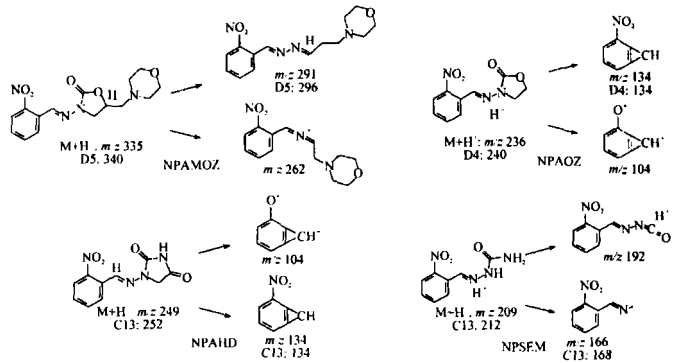


图 2 衍生化后的硝基呋喃代谢物断裂方式
Fig 2 Fragmentation pathways of derivatives of the nitrofurans metabolites

References

- 1 Yndestad M. *Public Health Aspects of Residues in Animal Products: Fundamental Considerations*, Department of Food Hygiene, Norwegian College of Veterinary Medicine, Oslo, Norway, **1990**
- 2 Off J. Europ. Communities *Comm ission Regulation* (EC) No 1442/95. **1995**, No L143: 26~30
- 3 Hoogenboom L A P, van Kammen M, Berghmans M C J, Koeman J H, Kuiper H A. *Food Chem. Toxicol*, **1991**, 29: 321
- 4 Hoogenboom L A P, Berghmans M C J, Polman T H G, Parker R, Shaw I C. *Food Addit Contam.*, **1992**, 9: 623
- 5 Gottschall D W, Wang R. *J. Agric Food Chem.*, **1995**, 43: 2520
- 6 Alexander L, Peter Z, Wolfgang L. *J. Chromatogr A*, **2001**, 939: 49~58
- 7 Peng Tao (彭 涛), Qiu Yueming (邱月明), Li Shujuan (李淑娟), Chen Dongdong (陈冬东), An Juan (安 娟), Cai Huixia (蔡慧霞). *Inspection and Quarantine Science (检验检疫科学)*, **2003**, 13(6): 23~25

Determination of Nitrofuran Metabolites in Milk Powder by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Peng Tao^{1,2}, Chu Xiaogang², Yang Qiang², Li Gang², Li Jianzhong², Li Chongjiu^{*1}

¹ (College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

² (Chinese Academy of Inspection & Quarantine, Beijing 100025)

Abstract A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method was established for simultaneous determination of the nitrofuran metabolites, furazolidone, furaltadone, nitrofurazone and nitrofurantoin in milk powder. Protein-bound metabolites were released in HCl solution and derivatised with 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA) overnight at 37°C. Proteins were sedimentated by ZnSO₄ and K₄Fe(CN)₆, after adjusting pH to 7.0. Then the analytes were extracted by ethyl acetate and cleaned up by *n*-hexane. Identification was achieved by electrospray ionization in positive mode (ESI⁺) using multiple reaction monitoring (MRM). The quantification was performed with internal standards. The recoveries of 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ), 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), semicarbazide (SEM) and 1-amino-hydantoin (AHD) were in the range of 89.5%~110.3% with spiked levels of 0.5~2 μg/kg. The RSDs were less than 11.3%. The limits of detection were 0.05 μg/kg for AMOZ and AOZ, and 0.1 μg/kg for SEM and AHD.

Keywords Liquid chromatography-tandem mass spectrometric, milk powder, furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, metabolites and internal standard

(Received 11 August 2004; accepted 1 November 2004)