

UPLC-MS/MS 快速测定貉组织中 4 种硝基呋喃代谢物残留量的研究

李宏娟, 曹秀梅, 李 曼, 张嘉楠, 闫玉杰, 杜顺丰*

(秦皇岛市农产品质量安全检验监测中心, 河北 秦皇岛 066000)

摘 要: 为了解皮用貉子胴体中硝基呋喃类药物残留情况, 建立貉组织中硝基呋喃代谢物残留量准确、快速测定的超高效液相-串联质谱法(UPLC-MS/MS), 采用貉子肌肉样品, 在酸性条件下, 经 60 °C 高温衍生 1 h, 调节 pH 值 7~8 后用乙酸乙酯提取, 水浴浓缩后, 经正己烷除脂净化, 由超高效液相色谱-串联质谱仪在正离子模式下检测, 内标法定量。结果表明: 4 种硝基呋喃代谢物在 0.25~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内线性良好, 相关系数 $r>0.999$ 。貉肌肉组织中 4 种硝基呋喃代谢物检出限(LOD)均为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限(LOQ)均为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 0.25~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的四个添加水平 4 种硝基呋喃代谢物的回收率为 89.7%~108%, 相对标准偏差为 1.32%~10.5%($n=6$)。说明该方法操作简单, 灵敏度高、准确性好, 适用于貉组织中硝基呋喃类代谢物残留的检测。

关键词: 硝基呋喃代谢物; 快速测定; 超高效液相-串联质谱法; 残留; 貉组织

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2021)05-0112-05

Study on Rapid Determination of Nitrofuran Metabolites in Raccoon Dog Tissues by UPLC-MS/MS

LI Hongjuan, CAO Xiumei, LI Man, ZHANG Jia'nan, YAN Yujie, DU Shunfeng*

(Qinhuangdao Agricultural Product Quality Safety Supervision and Inspection Center, Qinhuangdao 066000, China)

Abstract: A method for rapid and accurate determination of nitrofuran metabolite residues in raccoon dog was developed using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples of raccoon dog muscle were hydrolyzed derivatization at 60 °C for 1 h under acidic conditions, adjusting pH 7~8, and then concentrated in water bath, and purified with n-hexane. The samples were detected by UPLC-MS/MS in positive ion mode, and quantified by internal standard method. The limit of detection (LOD) was 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limit of quantification(LOQ) was 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The correlation coefficient was greater than 0.999($r>0.999$) within 0.25~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ linear ranges. The recoveries of four nitrofuran metabolites at four levels in the range of 0.25~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were between 89.7%~108%, and the relative standard deviations (RSD) were between 1.32%~10.5%($n=6$). The method is simple, sensitive and accurate. It is suitable for the determination of nitrofuran metabolic residues in raccoon dog tissue.

Key words: Nitrofuran metabolites; Rapid determination; UPLC-MS/MS; Residue; Raccoon dog tissue

硝基呋喃类药物是一类人工合成的广谱抗生素, 主要包括呋喃唑酮(AOZ)、呋喃妥因(AHD)、呋喃它酮(AMOZ)和呋喃西林(SCA)。因其对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌均有很好的抗

菌效果, 曾被广泛应用于畜禽、水产和毛皮动物的养殖中。据报道, 硝基呋喃类药物及其代谢物均可使动物发生癌变和基因突变^[1], 严重威胁着人类的健康, 所以欧盟于 1995 年起禁止呋喃类抗生素在食用动物中使用; 我国也于 2002 年在农业部农牧发 1 号文中规定食品性动物中不得检出硝基呋喃类药物。硝基呋喃原型药物在生物体内代谢迅速, 很难检测, 但其代谢物与蛋白结合而长时间稳定存在, 所以一般以硝基呋喃类代谢物作为硝基呋喃残留的标示物^[2]。

我国黑龙江、吉林、河北、山东等省是乌苏里貉

收稿日期: 2019-04-19

基金项目: 秦皇岛市重点研发计划科技支撑项目(201703A038);
河北省人才工程培养经费资助科研项目
(A2017005053)

作者简介: 李宏娟(1982-), 女, 高级兽医师, 硕士, 主要从事农产品质量和残留检测研究。

通讯作者: 杜顺丰, 男, 硕士, 研究员, E-mail: qhdzjzh@163.com

的主要养殖地,尤其河北昌黎县年产量达1 000万只以上,享有“中国养貉之乡”的美誉。目前,貉子养殖主要取其毛皮,对其屠体的开发利用和药物残留检测鲜有报道。乌苏里貉皮下脂肪中不饱和脂肪酸占65%以上,必需脂肪酸亚油酸、亚麻酸可分别达到18.99%和22.61%^[3],而普通家猪的亚油酸含量只有6%~8%,高屠宰体重的长白山野猪亚油酸含量也只有15%^[4];乌苏里貉肌肉内6种必需氨基酸(赖氨酸、蛋氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸)含量高于FAO/WHO提出的理想蛋白模式中必需氨基酸的含量,一些甚至高于营养价值较高的牛奶、鸡蛋中的含量^[3];貉腿肌肉中锌含量高达38.33 mg/kg,高于羊后腿中锌的含量^[5],由此可见,貉子的屠体有很大的开发空间。目前国内外尚未有关于貉子等毛皮动物组织中硝基呋喃代谢物残留检测的报道。本研究在参考畜禽产品、水产品中硝基呋喃代谢物残留检测标准方法的基础上,优化处理和检测条件,建立简单快速、准确高效的定性定量检测方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

UPLC-Xevo TQ型超高效液相色谱-串联质谱仪,美国Waters公司;H2100R台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;SPT-24V可视氮空吹扫浓缩仪,北京斯珀特科技有限公司;ZD-85恒温振荡器,常州国华电器有限公司。

1.1.2 试剂

2-硝基苯甲醛(色谱纯,含量>99.0%),CNW公司;乙酸铵(色谱纯),EMSURE公司;甲酸(Dikma Pure),Dikma公司;乙腈(色谱纯)、乙酸乙酯(色谱纯)、正己烷(色谱纯),TEDIA公司;磷酸氢二钾(GR)、盐酸(GR),天津市科密欧化学试剂有限公司;二甲亚砜(GR),天津市光复精细化工研究所。

硝基呋喃代谢物标准物质:AOZ、AMOX、AHD·HCl、SCA·HCl,纯度≥99.0%,WITEGA公司。

硝基呋喃类代谢物同位素标准物质(内标物):AOZ-D₄、AMOX-D₅、AHD-¹³C₃、SCA-¹³C、¹⁵N₂,纯度≥99.0%,WITEGA公司。

1.1.3 主要溶液配制

100 mg/L混合外标储备液:准确称取AOZ(10.0±0.1)mg,AMOX(10.0±0.1)mg,AHD·HCl(13.2±0.1)mg,SCA·HCl(14.9±0.1)mg,用甲醇定

容至100 mL,-18℃保存。

100 mg/L混合内标溶液:分别准确称取AOZ-D₄、AMOX-D₅、AHD-¹³C₃、SCA-¹³C、¹⁵N₂各(10.0±0.1)mg,用甲醇定容至100 mL,-18℃保存。

0.1 mol/L衍生化试剂:称取0.15 g 2-硝基苯甲醛,溶于10 mL二甲亚砜,现用现配。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理

打皮期健康乌苏里貉腿部肌肉,匀浆制成肉糜。

衍生:称取(2.0±0.2)g貉子肌肉样品于50 mL离心管中,加入混合内标溶液100 μL,涡旋混匀后静置30 min,加入0.1 mol/L衍生化试剂100 μL,0.2 mol/L盐酸溶液约6 mL,充分混匀,60℃避光衍生1 h。

提取净化:待样品冷却至室温后,加入1 mol/L磷酸氢二钾溶液5 mL,4℃8 000 r/min离心5 min,转移上清液至另一50 mL离心管中,调节pH值7~8,加入10 mL乙酸乙酯,涡旋混匀,4 000 r/min,室温离心5 min,上层有机相转移至15 mL玻璃试管中,40℃水浴吹干。吹干后试管中加入3 mL正己烷,涡旋混匀,再准确加入1 mL 0.1%甲酸水溶液,轻轻震荡混匀,4 000 r/min离心5 min,下层水相过0.22 μm微孔滤膜,滤液供UPLC-MS-MS分析。

1.2.2 色谱条件

色谱柱:UPLC BEH C₁₈色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.7 μm,美国Waters公司)流动相A:5 mmol/L乙酸铵溶液-0.1%甲酸;B:乙腈;流速:0.4 mL/min;柱温:30℃;进样量:5 μL;运行时间:4.51 min。梯度洗脱见表1。

表1 硝基呋喃类代谢物洗脱梯度

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)	曲线
-	0.4	90	10	-
1.0	0.4	90	10	6
3.0	0.4	10	90	6
4.5	0.4	10	90	6
4.51	0.4	90	10	6

1.2.3 质谱条件

电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺);检测方式:多反应监测(MRM);电喷雾电压:3.5 kV;雾化气温度:500℃;监测离子对、锥孔电压和碰撞能量等参数见表2。

1.2.4 标准曲线绘制

分别移取100 μL浓度分别为2.5、5、10、20、50、100、200、500 μg/L系列标准溶液于不同离心

表2 4种硝基呋喃代谢物特征离子锥孔电压和碰撞能量

目标物	离子对	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
2-NP-AOZ	236/134*,236/104	28	14,20
2-NP-AMOZ	335.1/291.2*,335.1/100	28	12,16
2-NP-AHD	249/134*,249/104	28	10,20
2-NP-SCA	209/166.1*,209/192.1	23	8,10
2-NP-AOZ-D ₄	240/134	28	13
2-NP-AMOZ-D ₅	340/296.2	28	12
2-NP-AHD- ¹³ C ₃	252/134	28	11
2-NP-SCA- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	212/168	24	10

注:带*为定量离子

管中,除不称样品外,分别按照样品处理步骤操作。以硝基呋喃代谢物浓度为横坐标,各特征离子的定量离子与相应内标的峰面积比为纵坐标,绘制标准曲线。

1.2.5 方法检出限和定量限确定

制备4种硝基呋喃类代谢物含量在0.1~1.0 μg/kg的系列猪肌肉组织样品,经样品处理后由高至低检测,以3倍信噪比确定方法检出限,10倍信噪比确定定量限。

1.2.6 回收率检测

准确称取(2.00±0.2)g不含硝基呋喃类药物肌肉各12份,制备4种硝基呋喃类代谢物含量分别为0.25、0.5、1.0、2.0 μg/kg的四个添加水平的阳性样品,每个添加水平做3份平行,按照样品的操作过程进行提取、净化和测定,用标准曲线校准样品,计算每个样品的浓度和加标回收率。

1.2.7 精密度测定

日内精密度:分别制备4种硝基呋喃类代谢物含量分别为0.25、0.5、1.0、2.0 μg/kg肌肉组织样品,每种浓度制备6份,每种浓度水平的样品按照样品处理方法同时操作,一同上机测定,分别计

算每一浓度水平样品的相对标准偏差(RSD值)。

日间精密度:分别制备4种硝基呋喃类代谢物含量分别为0.25、0.5、1.0、2.0 μg/kg肌肉组织样品,每种浓度制备6份,-18℃冷冻保存,每天各浓度取一份,按照样品处理方法操作,上机测定,连续检测6天,分别计算每一浓度水平样品的相对标准偏差(RSD值)。

2 结果

2.1 线性范围、检出限和定量限

如图1所示,4种硝基呋喃代谢物在3 min之内均得到较好的分离。4种硝基呋喃代谢物浓度范围在0.25~50 μg/L线性良好,相关系数r均达到0.999以上;在确保定性离子和定量离子均有很好的响应下,肌肉样品中4种硝基呋喃代谢物的检出限均为0.1 μg/kg,定量限均为0.25 μg/kg,均低于我国现行标准的最低检测限和定量限(表3)。

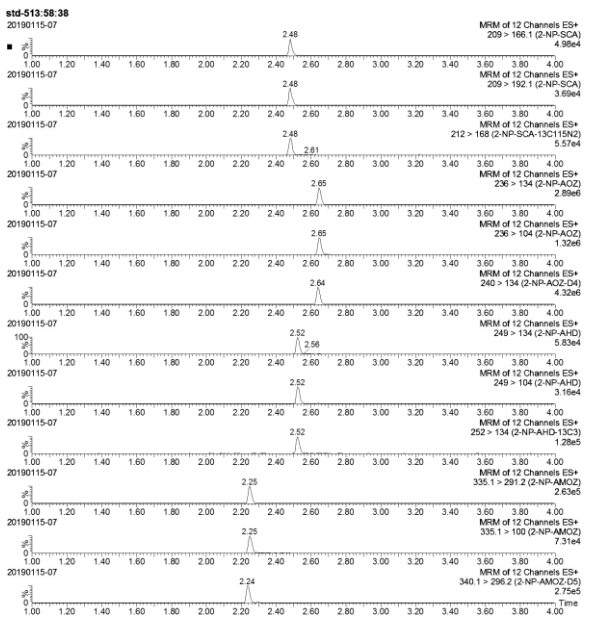


图1 4种硝基呋喃代谢物混合标准特征离子质量色谱图

表3 4种硝基呋喃代谢物的线性范围、检出限和定量限

化合物名称	线性范围(μg/L)	线性回归方程	相关系数(r)	检出限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
AOZ	0.25~50	$y=0.93x-3.70\times10^{-3}$	0.9999	0.1	0.25
AMOZ	0.25~50	$y=1.28x-3.73\times10^{-3}$	0.9996	0.1	0.25
AHD	0.25~50	$y=0.73x+1.72\times10^{-2}$	0.9992	0.1	0.25
SCA	0.25~50	$y=1.42x+8.27\times10^{-2}$	0.9995	0.1	0.25

2.2 方法的回收率和精密度

肌肉组织中4种硝基呋喃代谢物四水平回收

率为89.7%~108%,日内相对标准偏差为1.32%~7.0%,日间标准偏差为4.26%~10.5%(表4)。

3.4 液相条件优化

本方法选择 waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱,该色谱柱粒径只有 1.7 μm,分离时间短,分离效果好。流动相有机相比较了乙腈和甲醇溶液,水相比较了 0.1% 甲酸水溶液、5 mmol/L 乙酸铵溶液和乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液。试验表明,在保证灵敏度和分辨率的前提下,乙腈作为流动相的有机相比甲醇洗脱能力强;0.1% 甲酸水溶液作为流动相水相比 5 mmol/L 乙酸铵溶液缩短了检测时间,但是 5 mmol/L 乙酸铵溶液作为水相时被测物的响应要高于 0.1% 甲酸水溶液,实验选择 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液作为流动相水相,配合有机相乙腈使 4 种硝基呋喃代谢物的分子离子峰响应更强,峰形更好,在更短时间内硝基呋喃各代谢物均得到较好的分离。

3.5 质谱条件的优化

4 中硝基呋喃代谢物经 2-硝基苯甲醛衍生后的衍生物为西佛碱化物,在 ESI⁺模式下,容易得到 H⁺,形成稳定的[M+H]⁺准分子离子,因此选择 ESI⁺方法进行母离子扫描,确定每种硝基呋喃衍生化物的分子离子的锥孔电压(cone 电压);然后对其子离子进行全扫描,调整碰撞能量选择信号强且稳定子离子为定量离子,在选择第二对离子进行准确定性,得到表 2 所示的 4 种硝基呋喃代谢物特征离子锥孔电压和碰撞能量。

4 结 论

本研究建立了以貉子为代表的毛皮动物组织中硝基呋喃类代谢物的快速定性准确定量的检测方法,与畜产品和水产品中硝基呋喃代谢物检测

的标准方法相比,有效缩短了样品处理和检测时间,操作简单快速、灵敏度高、稳定性好,重现性好,适用于大样本检测,为毛皮动物的副产品开发利用提供简单、准确、高效的检测方法。

参考文献:

- [1] Nouws J F, Laurenson J. Postmortal degradation of furazolidone and furaltadone in edible tissues of calves [J]. *Vent Q*, 1990, 12 (1):56-59.
- [2] Cooper A D, Creaser C S, Farrington W H, et al. Development of multi-residue methodology for the HPLC determination of veterinary drugs in animal tissues [J]. *Food Addit Contam*, 1995, 12 (2): 167-176.
- [3] 马文杰, 逢锦颖, 王 康, 等. 银霜狐和乌苏里貉皮下脂肪、肌肉组成成分与特性分析[J]. *经济动物学报*, 2018, 22(4): 187-193.
- [4] 于永生, 罗晓彤, 张志斌, 等. 不同体重长白山野猪肌肉脂肪酸含量分析[J]. *东北农业科学*, 2016, 41(3): 73-76.
- [5] 杨赵伟, 曹秀梅, 闫玉洁, 等. 微波消解-原子吸收法测定猪肉中重金属含量 [J]. *现代畜牧兽医*, 2016(2): 5-9.
- [6] 农业农村部 1077 号公告-2-2008. 水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 高效液相色谱法[S].
- [7] GB/T 21166-2007. 肠衣中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- [8] 农业农村部 783 号公告-1-2006. 水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- [9] 农业农村部 781 号公告-4-2006. 动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 高效液相色谱-串联质谱法[S].
- [10] GB/T21311-2007. 动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留量检测 高效液相色谱/串联质谱法[S].
- [11] 刘正才, 杨 方, 余孔捷, 等. 硝基呋喃类代谢物残留检测标准的比较[J]. *分析实验室*, 2011, 30(11): 43-47.
- [12] 吴明媛, 韦信贤, 童桂香, 等. 水产品中硝基呋喃类代谢物残留检测方法优化研究[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(7): 145.

(责任编辑:刘洪霞)

(上接第 66 页)

- [8] 梁 瑜. 西门塔尔杂种牛脂肪酸营养特性及肉品品质研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [9] 宋倩倩, 张金枝, 刘 健, 等. 不同品种猪肉肉质性状和脂肪酸含量的研究[J]. *家畜生态学报*, 2018, 39(2): 24-28.
- [10] 张志超, 段子渊, 张新华, 等. 羊肉肉质风味研究进展[J]. *肉类研究*, 2018, 32(10): 61-65.
- [11] Kerth C R, Harbison A L, Smith S B, et al. Consumer sensory evaluation, fatty acid composition, and shelf-life of ground beef with subcutaneous fat trimmings from different carcass locations

[J]. *Meat Sci*, 2015, 104: 30-36.

- [12] Appenroth K J, Sree K S, Bog M, et al. Nutritional Value of the Duckweed Species of the Genus *Wolffia* (Lemnaceae) as Human Food[J]. *Front Chem*, 2018, 6: 483.
- [13] Batista E D, Hussein A H, Detmann E, et al. Efficiency of lysine utilization by growing steers[J]. *J Anim Sci*, 2016, 94(2): 648-655.
- [14] 侯 丽, 柴沙驼, 刘书杰, 等. 青海牦牛肉与秦川牛肉氨基酸和脂肪酸的比较研究[J]. *肉类研究*, 2013, 27(3): 30-36.

(责任编辑:王 昱)