

LC-MS/MS 测定南美白虾中的硝基呋喃代谢物残留

LCMSMS-682

摘要：本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定南美白虾中硝基呋喃代谢物残留量的方法。4种化合物在 0.5 µg/L~20.0 µg/L 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上。在高、中、低三个浓度下，硝基呋喃代谢物的衍生物保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.08%~0.13% 和 0.89%~9.28% 之间，仪器精密度良好。加标浓度为 1、5 和 10 µg/kg 的样品，回收率在 82.3~112.7% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于水产品中硝基呋喃代谢物残留的准确定量检测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 南美白虾 硝基呋喃代谢物

硝基呋喃类药物是一种广谱抗生素，常见有呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因和呋喃西林 4 种。硝基呋喃类药物对大多数真菌和病毒具有较好的杀灭作用，且价格低廉，被广泛用于水产养殖业中，主要治疗由大肠杆菌或沙门氏菌所引发的疾病。硝基呋喃类原型药在体内迅速代谢，并与蛋白质结合后，形成具有致癌、致畸副作用的代谢产物 3-氨基-2-噁唑烷基酮(AOZ)，5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮(AMOZ)，1-氨基-乙内酰胺(AHD)，氨基脲(SEM)。中华人民共和国农业农村部公告第 250 号已明确将硝基呋喃类物质（呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮、呋喃唑酮和呋喃苯烯酸钠）

列入《食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单》。为了保障人们的食品安全，农业农村部首次发布了《GB 31656.13-2021 水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法》。

本文参考该标准，建立了南美大虾中硝基呋喃类代谢物多残留的方法。试料中残留的硝基呋喃类蛋白结合态代谢物在酸性条件下水解，经 2-硝基苯甲醛衍生化，用乙酸乙酯液液萃取，高速离心净化，液相色谱-串联质谱上机测定，内标法定量。该方法灵敏度高，定量准确。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40B

质谱仪：LCMS-8045

柱温箱：CTO-40S

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

在线脱气机：DGU-405

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 µm)

岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-30048-02

流动相：A 相 -0.002 mol/L 乙酸铵溶液，B 相 - 甲醇

流速：0.35 mL/min

柱温：35 °C

进样体积：10 µL

洗脱方式：梯度洗脱，初始 10%B，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	10
4.00	Pumps	Pump B Conc.	95
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
6.00	Pumps	Pump B Conc.	10
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI, 正离子模式	DL 管温度: 300°C
接口电压: 1 kV	加热模块温度: 450°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	接口温度: 400°C
干燥气: 氮气 8 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
加热气: 空气 12 L/min	MRM 参数: 见表 2
碰撞气: 氩气 (230 kPa)	喷雾针位置: 1 mm

表 2 MRM 参数

编号	名称	化学分子式	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	AOZ	C ₃ H ₆ N ₂ O ₂	80-65-9	236.1	104.1*	-17	-21	-18
					134.1	-11	-10	-13
2	AOZ-D ₄	C ₃ H ₂ D ₄ N ₂ O ₂	1188331-23-8	240.1	134.2*	-17	-9	-12
3	AMAZ	C ₈ H ₁₅ N ₃ O ₃	43056-63-9	334.9	262.1*	-17	-17	-17
					291.2	-12	-11	-20
4	AMAZ-D ₅	C ₈ H ₁₀ D ₅ N ₃ O ₃	1017793-94-0	340.1	296.1*	-23	-12	-20
5	AHD	C ₃ H ₅ N ₃ O ₂ HCl	2827-56-7	249.1	104.0*	-17	-21	-17
					134.0	-17	-10	-13
6	AHD- ¹³ C ₃	¹³ C ₃ H ₅ N ₃ O ₂	957509-31-8	252.1	133.9*	-19	-9	-24
7	SEM	CH ₅ N ₃ O HCl	563-41-7	209.1	166.1*	-10	-8	-16
					192.0	-10	-10	-12
8	SEM- ¹³ C, ¹⁵ N ₂	¹³ CH ₅ N ₁₅ N ₂ O HCl	1173020-16-0	212.1	168.1*	-10	-7	-17

* 表示定量离子

■ 标准品溶液的配制及样品前处理

标准工作溶液配制:

混合标准中间液: 取购买的 AOZ、AMAZ、AHD 及 SEM 的储备液 (100 µg/mL) 适量, 用甲醇逐级稀释, 配制浓度为 1.0 µg/mL 混合标准中间液。

混合标准工作液: 分别准确量取混合标准中间液 1 mL 于 10 mL 和 100 mL 的棕色容量瓶, 用甲醇稀释至刻度, 配制浓度为 100 和 10 µg/L 混合标准工作液, 现用现配。

混合内标标准工作液: 取购买的 AOZ-D₄、AMAZ-D₅、AHD-¹³C₃ 及 SEM-¹³C¹⁵N₂ 的储备液 (100 µg/mL) 适量, 用甲醇逐级稀释, 配制浓度为 100 µg/L 的混合内标标准工作液。

样品前处理:

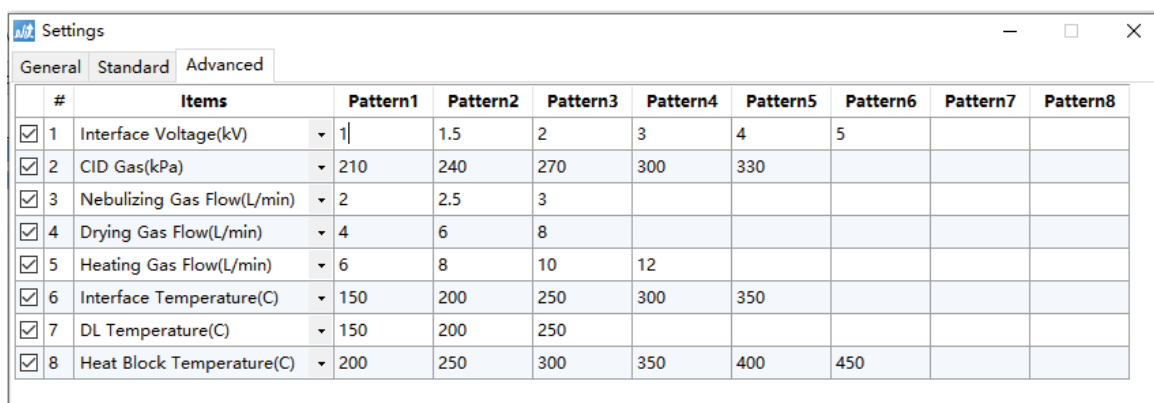
水解与衍生化: 取试料 2 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入混合内标标准工作液 50 μ L, 涡旋 1 min, 加 0.5 mol/L 盐酸溶液 5 mL, 2-硝基苯甲醛溶液 150 μ L, 涡旋混合 1 min, 于恒温振荡器中 37°C 避光振荡 16 h。

提取净化: 取出离心管冷却至室温, 用磷酸氢二钾溶液调 pH 至 7.0~7.5, 加乙酸乙酯 8 mL, 涡旋振荡 30 s, 6000 r/min 离心 5 min, 取上清液至 10 mL 玻璃离心管中, 40°C 氮气吹干。5% 甲醇溶液 1.0 mL 溶解残留物, 将溶液转移至 1.5 mL 离心管后 14000 r/min 离心 10 min, 上清液过 0.22 μ m 滤膜后上机分析。

■ 结果与讨论

3.1 离子源参数的优化

离子源参数对于化合物质谱响应具有重要的影响, 快速找到合理的参数是液质联用分析方法开发阶段的关键环节。一般在离子源部位有诸如雾化气流速、干燥气流速、离子源电压、离子源温度、ESI 喷针位置等因素可供调节和优化, 由于参数种类多、可调节范围宽等因素, 往往令初学者一时难以掌握。



#	Items	Pattern1	Pattern2	Pattern3	Pattern4	Pattern5	Pattern6	Pattern7	Pattern8
<input checked="" type="checkbox"/>	1 Interface Voltage(kV)	1	1.5	2	3	4	5		
<input checked="" type="checkbox"/>	2 CID Gas(kPa)	210	240	270	300	330			
<input checked="" type="checkbox"/>	3 Nebulizing Gas Flow(L/min)	2	2.5	3					
<input checked="" type="checkbox"/>	4 Drying Gas Flow(L/min)	4	6	8					
<input checked="" type="checkbox"/>	5 Heating Gas Flow(L/min)	6	8	10	12				
<input checked="" type="checkbox"/>	6 Interface Temperature(C)	150	200	250	300	350			
<input checked="" type="checkbox"/>	7 DL Temperature(C)	150	200	250					
<input checked="" type="checkbox"/>	8 Heat Block Temperature(C)	200	250	300	350	400	450		

图 1 LabSolutions MRM Connect 用于离子源参数优化的实验设计

LabSolutions MRM Connect 是岛津三重四极杆液质联用仪配套用于离子源参数优化软件, 通过如图 1 的实验设计 (DoE), 可以实现对离子源参数的自动优化过程, 进而找到最合理的离子源参数。

在本应用案例分析中, 以四个目标物中质谱响应相对较低的 AHD 和 SEM 为例, 进行离子源参数的优化。以下对比了接口电压、DL 温度和 ESI 喷针位置三个关键因素变化对质谱响应的影响。

3.1.1 接口电压的优化

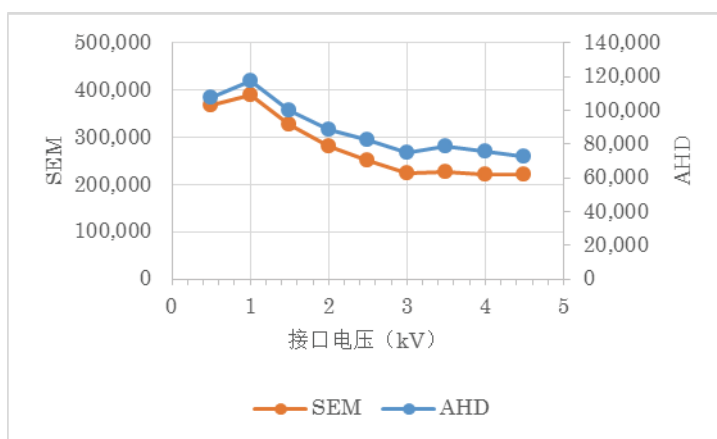


图 2 接口电压优化结果

设置接口电压从 0.5~4.5 kv，以 0.5 kv 为间隔进行优化，AHD 和 SEM 均在接口电压为 1 kv 时，灵敏度最高。

3.1.2 DL 温度的优化

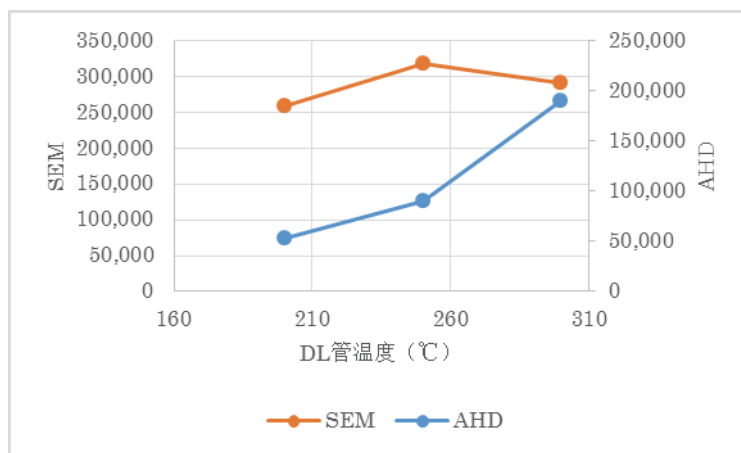


图 3 DL 管温度优化结果

设置 DL 管温度从 200~300°C，以 50°C 为间隔进行优化，AHD 和 SEM 分别在 300°C 和 250°C 时响应最高，鉴于 AHD 在 300°C 时灵敏度增幅非常明显，最终选择 DL 管温度为 300°C。

3.1.3 喷雾针位置的优化

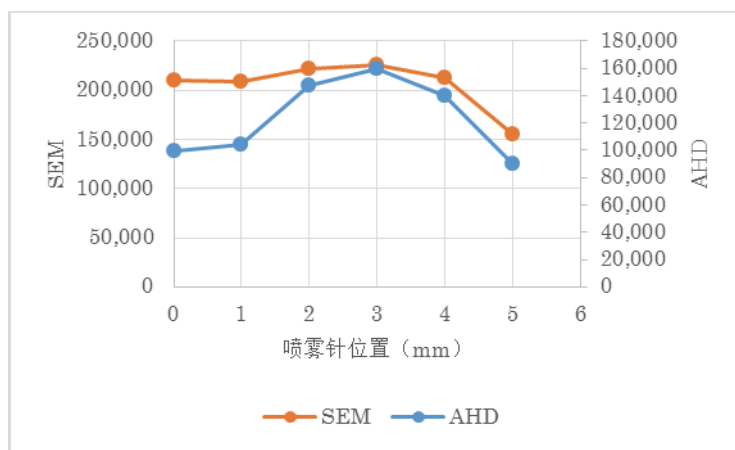


图 4 喷雾针位置优化结果

调整喷雾针位置从 0~5 mm，以 1 mm 为间隔进行优化，SEM 和 AHD 均在 3 mm 时，响应最高。在本例中，喷雾针位置位于默认位置，灵敏度可以满足对应标准的要求。如需追求更高的灵敏度，可通过调整喷雾针位置至 3 mm 左右来实现。

3.2 硝基咪喃代谢物衍生物的灵敏度

图 5 为 0.5 ng/mL 4 种硝基咪喃代谢物经水解、衍生化及提取净化操作后的 MRM 色谱图，色谱峰分离良好，通道无干扰。

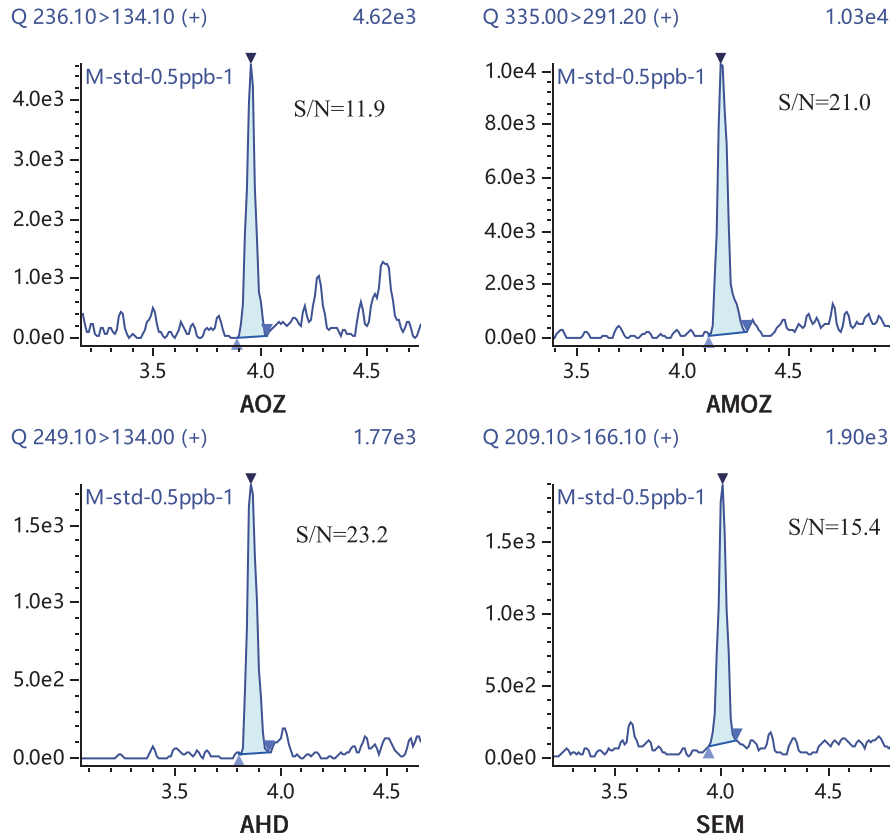


图 5 0.5 ng/mL 4 种硝基咪唑代谢物衍生物的 MRM 色谱图

3.3 线性关系

分别准确移取 10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准工作液各 0.05、0.1、0.2 mL 于 6 个 50 mL 离心管中，除不加试料外，按试样水解与衍生化及提取净化方法操作，使最终浓度分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10 和 20 $\mu\text{g/L}$ ，按 1.2 条件进行测定。以测得特征离子质量色谱峰外标和内标峰面积比值为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制校准曲线如图 6 所示。4 种硝基咪唑代谢物衍生物校准曲线及检测限、定量限的结果见表 3。

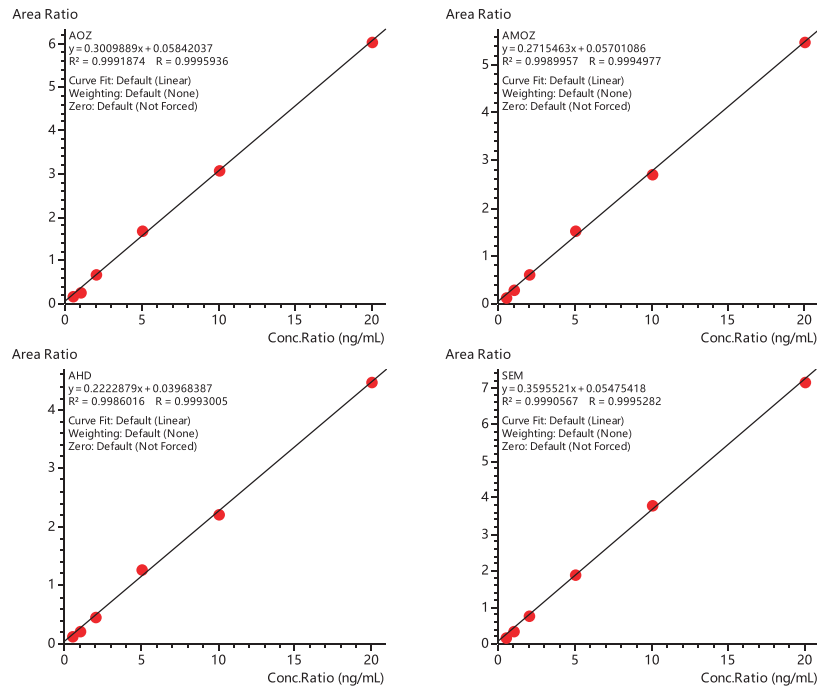


图 6 4 种硝基咪唑代谢物衍生物校准曲线

表 3 4 种硝基呋喃代谢物衍生物校准曲线及检测限、定量限

编号	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	AOZ	$Y = (0.300989)X + (0.0584204)$	0.9996	76.2~107.5	0.11	0.33
2	AMAZ	$Y = (0.271546)X + (0.0570109)$	0.9995	74.4~108.5	0.06	0.18
3	AHD	$Y = (0.222288)X + (0.0396839)$	0.9993	85.3~111.2	0.06	0.17
4	SEM	$Y = (0.359552)X + (0.0547542)$	0.9995	86.4~105.7	0.09	0.28

3.4 精密度

浓度为 0.5、2 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 硝基呋喃代谢物衍生物连续测定 6 次，考察仪器的精密度。不同浓度样品中待测物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08%~0.13% 和 0.89%~9.28% 之间，仪器精密度良好。

表 4 4 种硝基呋喃代谢物衍生物保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物	RSD% (0.5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (20 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	AOZ	0.19	5.77	0.09	3.75	0.08	1.90
2	AMAZ	0.11	6.04	0.09	4.11	0.08	0.89
3	AHD	0.10	9.28	0.08	4.40	0.08	1.99
4	SEM	0.13	4.06	0.08	2.82	0.08	1.07

3.5 回收率

取空白南美大虾 2 g，加入混标工作液，使加标浓度为 1、5 和 10 $\mu\text{g/kg}$ ，样品经水解与衍生化及提取净化方法后，按照 1.2 中的分析条件测定 4 种硝基呋喃代谢物的加标回收率，平行测定 3 次。4 个化合物的回收率在 82.3~112.7% 之间，具体结果见表 5。

表 5 4 种硝基呋喃代谢物衍生物回收率结果 (n=3)

编号	化合物	加标浓度 1 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 5 $\mu\text{g/kg}$		加标浓度 10 $\mu\text{g/kg}$	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
1	AOZ	103.0	8.43	92.9	2.63	87.2	7.61
2	AMAZ	101.9	3.91	112.7	2.48	94.0	1.34
3	AHD	92.8	4.26	105.0	8.53	86.8	6.53
4	SEM	82.3	8.50	84.9	5.51	86.4	6.13

■ 结论

依据国家标准《GB 31656.13-2021 水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定南美大虾中硝基呋喃代谢物多残留的方法。样品经酸性条件水解和衍生后，乙酸乙酯萃取，高速离心净化，三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 进行检测，内标法定量。4 种硝基呋喃类代谢物在 0.5 $\mu\text{g/L}$ ~20.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 均在 0.999 以上。加标浓度为 1、5 和 10 $\mu\text{g/kg}$ 的样品，回收率在 82.3~112.7% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于水产品中硝基呋喃代谢物残留的准确检测。

岛津应用云

