

LC-MS/MS 法测定动物源性食品中硝呋索尔代谢物的残留量

LCMSMS-840

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪检测动物源性食品中硝呋索尔代谢物残留量的方法。该方法参考食品安全国家标准征求意见稿《水产品中硝呋索尔代谢物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，采用内标法定量，线性关系良好，相关系数为 0.9998。重复性测试的保留时间和峰面积的相对标准偏差 RSD 值分别小于 0.1% 和 1.0%，仪器精密度良好。仪器定量限为 0.05 ng/mL，灵敏度高。平均加标回收率在 97.2%~104.5% 之间，回收率良好。该方法灵敏可靠，可为相关行业人员参考。

关键词： 三重四极杆液质联用系统 硝呋索尔代谢物 动物源性食品

技术特点：

- ❖ 分析速度快，6 分钟完成硝呋索尔代谢物残留量的检测。
- ❖ 灵敏度优于国家标准要求，定量限值为 0.05 ng/mL。

硝呋索尔 (nifursol)，又称硝呋柳胍，是继呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃它酮和呋喃妥因之后的又一种硝基呋喃类抗菌药物。硝呋索尔的结构和性质与呋喃唑酮等其它硝基呋喃类药物相似，原药在动物组织中代谢快速，但其有毒代谢产物则在动物体内能与蛋白紧密结合，形成稳定的结合态残留物，可在体内存在相当长时间，具有一定的毒性。

2022 年底，海关总署发函，根据欧盟 (EU) 2019/1871 法规要求，自 2022 年 11 月 28 日起，动物源性食品中硝基呋喃类代谢物药残的测定限值将执行新的标准，即测定限值为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，并增加硝

基呋尔代谢物，总共 5 种，欧盟法规要求，输欧盟养殖水产品、禽肉制品、蛋及蛋制品等动物源性食品，通批检测硝基呋喃类代谢物。对于硝呋索尔代谢物药残的测试，目前最新的国家食品安全标准《水产品中硝呋索尔代谢物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》仍在征求意见稿中。

本文参考该标准，利用岛津三重四极杆液质联用系统，建立动物源性食品中硝呋索尔代谢物残留量的检测方法。该方法灵敏度高，分析速度快，可作为食品行业检测从业者参考使用。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用超高效液相色谱 LC-30A 与三重四极杆液质 LCMS-8050 联用系统。

具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{SR}

输液泵：LC-30AD \times 2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-30A

离子源：ESI

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.118

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST AQ-C18 (2.1 \times 50 mm, 1.9 μm , PN: 227-30807-01, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A相 -2 mM 乙酸铵水溶液，B相 - 甲醇
流速：0.3 mL/min 柱温：40°C
进样体积：5 μL
洗脱方式：梯度洗脱，B相初始浓度为30%，时间程序见表1。

表1 梯度时间程序表

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	40
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
3.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.55	Pumps	Pump B Conc.	30
6.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源参数

离子源：ESI- 接口温度：300°C
雾化气流速：3.0 L/min 加热模块温度：400°C
DL温度：220°C 干燥气流速：10.0 L/min
干燥气流速：10 L/min 扫描模式：MRM，参数见表2

表2 MRM 参数

中文名称	简称	CAS#	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
硝夫索尔代谢 衍生物	NP-DNSAH	851368-01-9	374.10	183.30*	10	27	17
				226.10	17	23	21
硝夫索尔代谢 衍生物内标物	NP-DNSAH- ¹⁵ N ₂	1346598-09-1	376.20	183.10*	10	27	17

* 定量离子对

1.3 标准溶液配制

储备溶液 (1 mg/mL)：分别精密称定硝夫索尔代谢物（简称 DNSAH）及其代谢衍生内标物 NP-DNSAH-¹⁵N₂ 固体粉末，使用甲醇溶解于棕色瓶中，均配制成浓度为 1 mg/mL 储备溶液，置于 -18°C 冰箱中保存备用。

DNSAH 标准工作液 (10 ng/mL & 100 ng/mL)：使用甲醇分别将 DNSAH 储备溶液稀释成标准工作溶液，浓度分别为 10 和 100 ng/mL，在配制校准曲线溶液中使用。

内标 NP-DNSAH-¹⁵N₂ 工作液 (100 ng/mL)：使用甲醇稀释内标储备溶液，得到 100 ng/mL 工作液。

1.4 样品前处理

1.4.1 水解和衍生化：称取试样 2 g（精确到 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入内标工作液 0.1 mL，涡旋混合 1 min，再加入盐酸溶液 (0.5 mol/L) 5 mL 和 2-硝基苯甲醛溶液 (0.05 mol/L) 0.15 mL，涡旋混合 1 min 后，置于恒温振荡器中 37°C 避光振荡 16 h。

1.4.2 提取净化：取出离心管冷却至室温，加入磷酸氢二钾水溶液 (1.0 mol/L)，调节 pH 至 7.0~7.5，加入乙酸乙酯 8 mL，涡旋振荡 10 min，6000 r/min 离心 5 min，取上层清液转移至 10 mL 离心管中，于 40°C 下氮

气吹干。准确加入氨水乙腈溶液（100 mL 的 10% 乙腈水溶液含 35 μ L 氨水）1 mL 定容，充分涡旋振荡溶解残留物，取 0.8 mL 溶解液转移至超滤离心管中，14000 r/min 离心 10 min，取滤液，及时上机分析，实验过程注意避光。

1.4.3 校准曲线溶液的制备：分别准确移取标准工作液（10 ng/mL）0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL 和标准工作液（100 ng/mL）0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL 和 1.0 mL 于 8 个 50 mL 离心管中，除不加试样外，按 1.4.1 和 1.4.2 步骤操作，使标准溶液最终浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20、50 和 100 ng/mL，内标溶液浓度为 10 ng/mL。

■ 结果与讨论

2.1 MRM 色谱图

校准溶液中硝夫索尔代谢衍生物（NP-DNSAH）及其内标物（NP-DNSAH- 15 N $_2$ ）的 MRM 色谱图，如下图 1 所示。

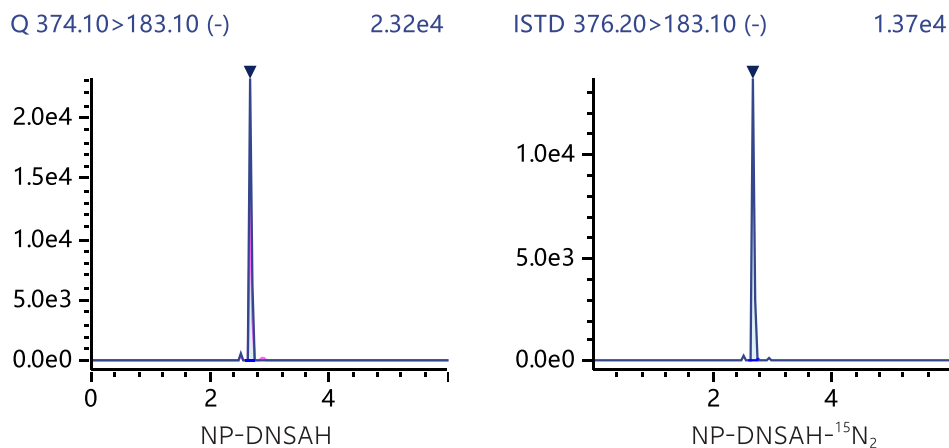


图 1 MRM 色谱图 (0.5 ng/mL)

2.2 校准曲线

校准曲线溶液按 1.2 条件进行分析，内标法制作校准曲线。测试结果显示，在浓度范围 0.5~100.0 ng/mL 内线性良好，相关系数 r 在 0.9998 以上，线性准确度在 97.0%~105.3% 之间。根据 $S/N=10$ 计算定量限（ASTM），NP-DNSAH 仪器定量限为 0.05 ng/mL。校准曲线见图 2。

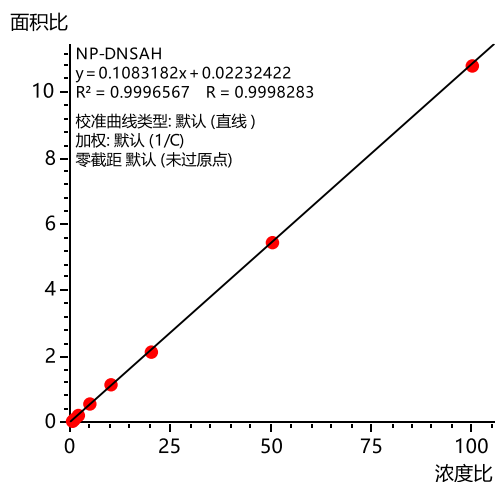


图 2 NP-DNSAH 校准曲线

2.3 重复性实验

分别取三个不同浓度的校准工作溶液连续平行测定 6 次，考察仪器精密度。结果显示，NP-DNSAH 保留时间相对标准偏差小于 0.1%，峰面积的相对标准偏差小于 1.0%，仪器精密度良好（见表 3）。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物名称	0.5 ng/mL (RSD%)		1.0 ng/mL (RSD%)		2.0 ng/mL (RSD%)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
NP-DNSAH	0.09	0.83	0.08	0.69	0.09	0.66

2.4 加标回收率

按照 1.4 前处理方法，使用市场购买的鲫鱼开展样品加标回收率实验。根据标准限值要求，选择加标浓度分别为 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，每个浓度平行实验 3 个样品。鲫鱼肉样本有检出，但浓度远小于定量限值，NP-DNSAH 的平均回收率范围分别在 97.2%~104.5% 之间，回收率良好。具体结果图 3-4 和表 4。

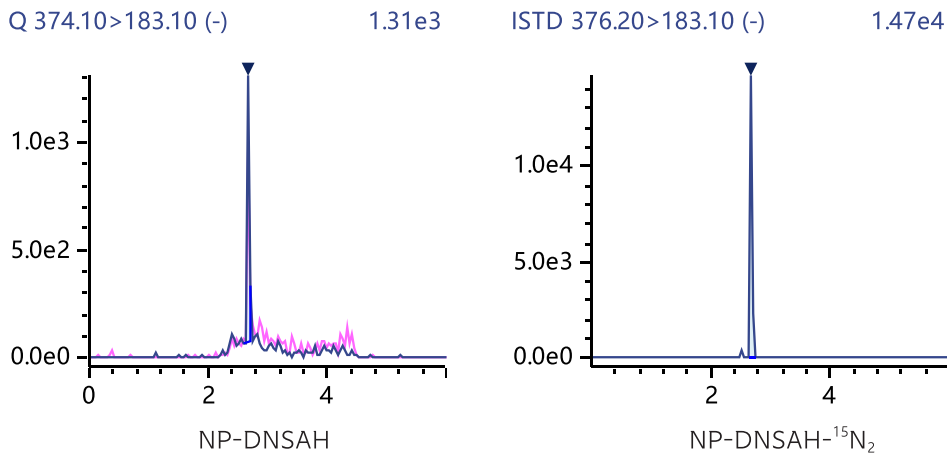


图 3 鲫鱼肉样品测试色谱图（浓度远低于定量限值）

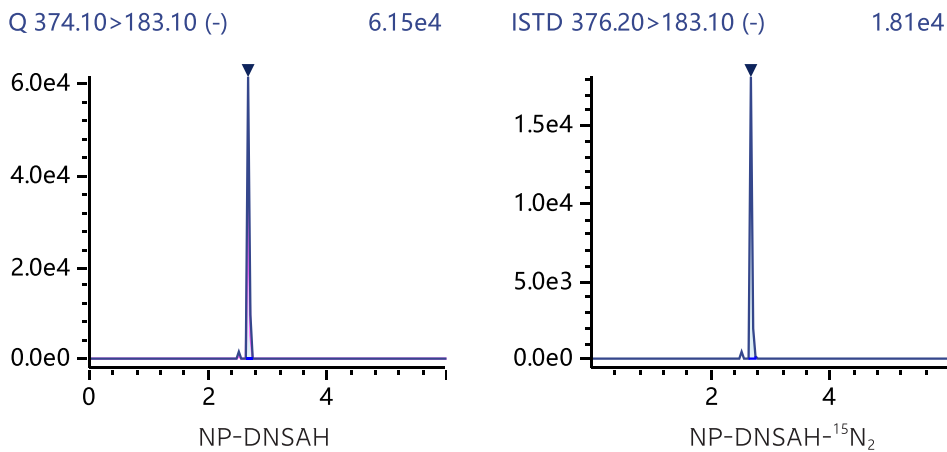


图 4 鲫鱼肉样品加标测试色谱图（加标浓度 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）

表 4 回收率结果

化合物名称	平均回收率 (%)		
	加标浓度 1.0 µg/kg	加标浓度 2.0 µg/kg	加标浓度 5.0 µg/kg
NP-DNSAH	97.2	103.5	104.5

■ 结论

本文参考食品安全国家标准征求意见稿《水产品中硝呋索尔代谢物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》，采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪，建立测定动物源性食品中硝夫索尔代谢物残留量的方法。该方法分析灵敏度高，重复性好，回收率高，测试稳定可靠，可供食品相关行业检测人员参考使用。

岛津应用云

