



LCMS法分析检测水产品鳗鱼中 四种硝基呋喃代谢物

No.LCMS-001

摘要：采用2-硝基苯甲醛(2-NBA)衍生化反应之后液液提取的样品前处理方法，对鳗鱼产品中的呋喃唑酮(AOZ)，呋喃它酮(AMOZ)，呋喃西林(SC)和呋喃妥因(AH)同时进行液相质谱联用(LCMS)检测分析。

关键词：LCMS 衍生化反应 鳗鱼 硝基呋喃代谢物

硝基呋喃类药物是人工合成的抗生素，被广泛应用，作为猪、禽类和水产品疾病控制的兽药。但在长时间的实验室研究过程中发现，硝基呋喃类药物及其代谢物均可以使实验动物发生癌变和基因突变。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。此文采用LC-APCI-MS对鳗鱼样品中硝基呋喃代谢物AOZ,AMOZ,SC,AH进行检测分析。

■ LCMS分析条件

1. 仪器

Shimadzu LCMS-2010EV高效液相色谱-质谱联用仪(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以及LCMSsolution 3.2色谱工作站)，Milli-Q Gradient A10超纯水器(Millipore Inc.USA)。

2. LC分析条件

色谱柱：Shimadzu VP-ODS (C18), 4.6mm I.D x 250mm, 5 μ m

柱温：40 $^{\circ}$ C 流速：0.8mL/min 流动相：A: MeOH B: Water (10mM NH₄Ac)

Time (min)	B (%)
0.01	50
13.00	50
13.01	5
17.00	5
17.01	50
27.00	stop

进样体积：50 μ L

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：Positive；雾化气流速2.5L/min，反吹气0.03MPa，曲形脱溶剂装置(CDL)温度：250 $^{\circ}$ C，电压(Probe Voltage) 4.5KV；加热块(Block)温度：200 $^{\circ}$ C；检测器电压1.50KV。选择性离子检测方式(SIM)，检测衍生化反应之后四个产物的目标离子m/z，2-NBA-AOZ: 253, 2-NBA-AMOZ: 335, 2-NBA-AH: 266, 2-NBA-SC: 226。

样品前处理

1. 清洗

- 加入1mL 水
 - 加入8mL 甲醇
- 溶剂清洗
- 1) 3次3mL甲醇
 - 2) 2次4mL乙醇
 - 3) 2次4mL乙醚

2. 衍生化

- 加 4mL 水
- 加 0.5mL 1 M盐酸
- 加150 μ L 2-NBA
(50mM, 二甲亚砜溶剂)

3. 中和、提取

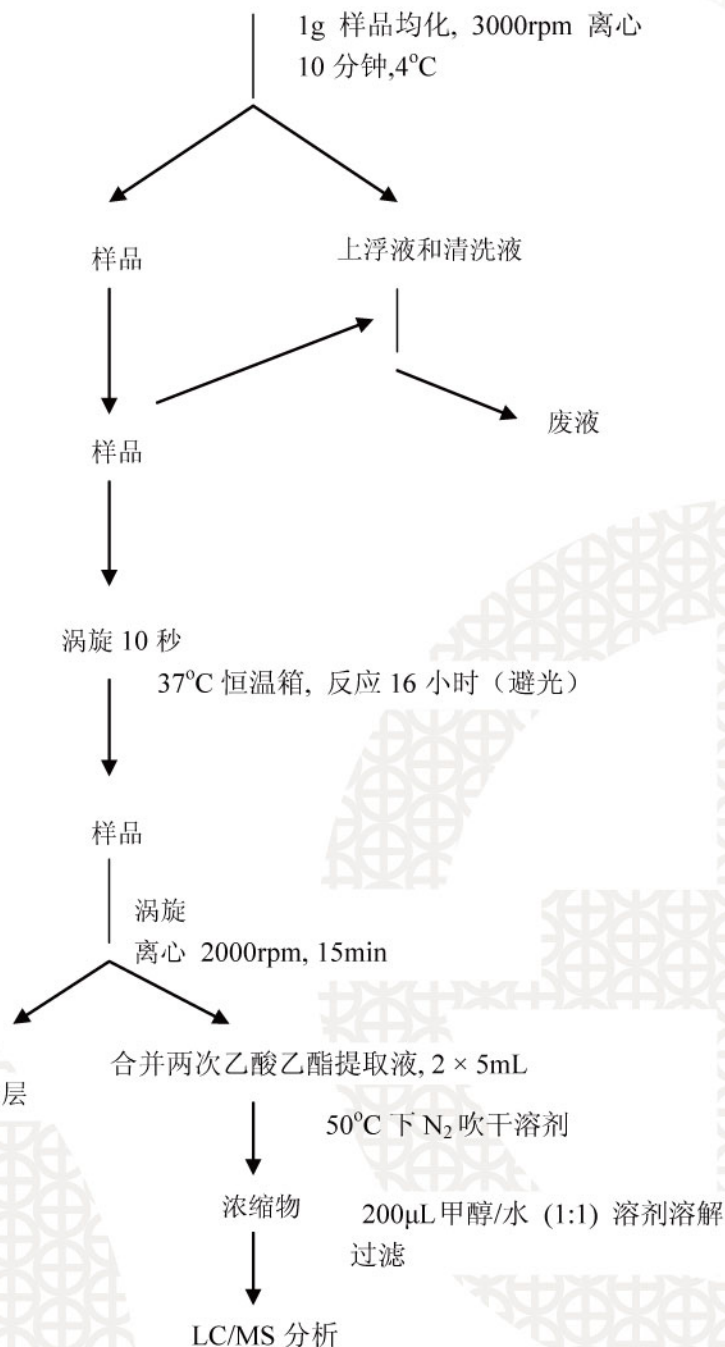
- 1) 5mL 0.1M磷酸氢二钾
- 2) 400 μ L 1M氢氧化钠
- 3) 2次5mL乙酸乙酯

4. 浓缩

分析结果

1. 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, 四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。



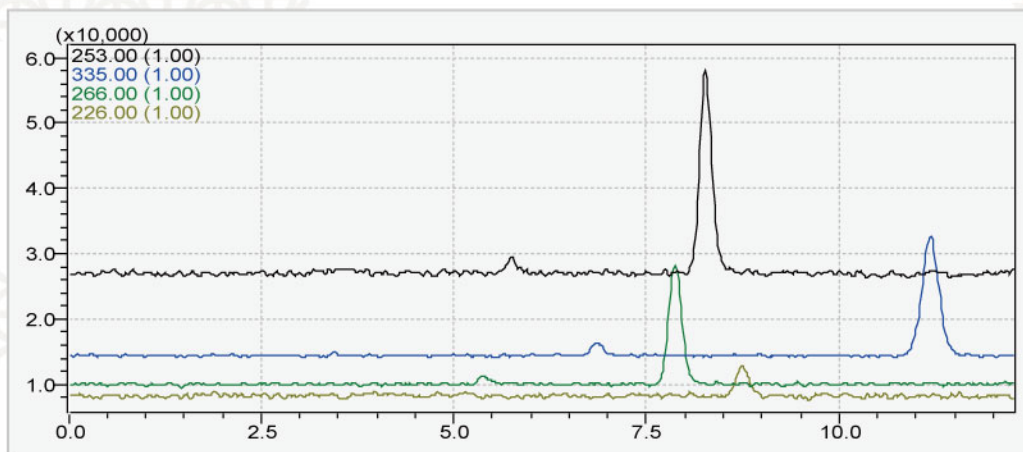
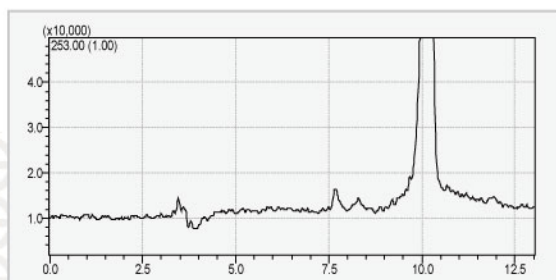


图1 4种硝基咪喃代谢物衍生物的标准品色谱图

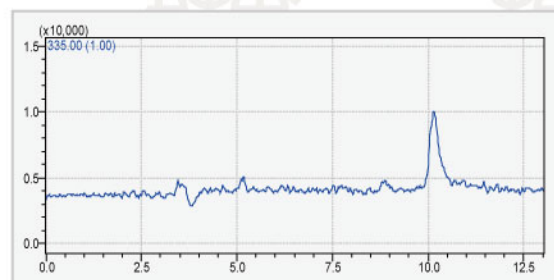
相应于AOZ,AMoz,AH,SC的浓度分别为0.43, 0.62, 2.32, 0.36 ppb

2. 空白鳗鱼样品

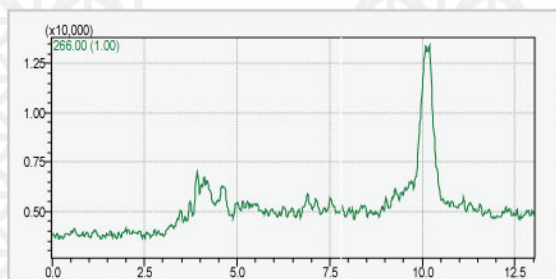
取空白鳗鱼样品，按上述预处理方法进行操作，得到空白样品谱图，见图2。可见该条件下，背景杂质对AOZ、AMoz、AH、SC检测不存在明显干扰。



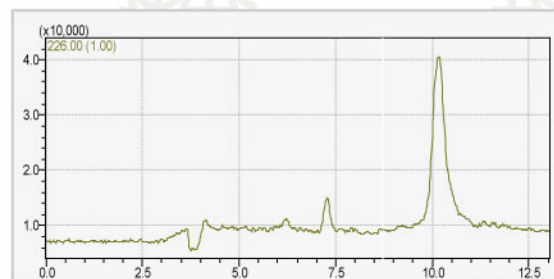
AOZ m/z 253 空白鳗鱼



AMoz m/z 335 空白鳗鱼



AH m/z 266 空白鳗鱼



SC m/z 226 空白鳗鱼

图2 空白鳗鱼样品谱图

3. 回收率, 检测限, 定量限结果

在空白鳊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, 2.5ppb. 按上述方法进行衍生化提取等前处理, 由LCMS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、检测限、定量限, 结果见表1。

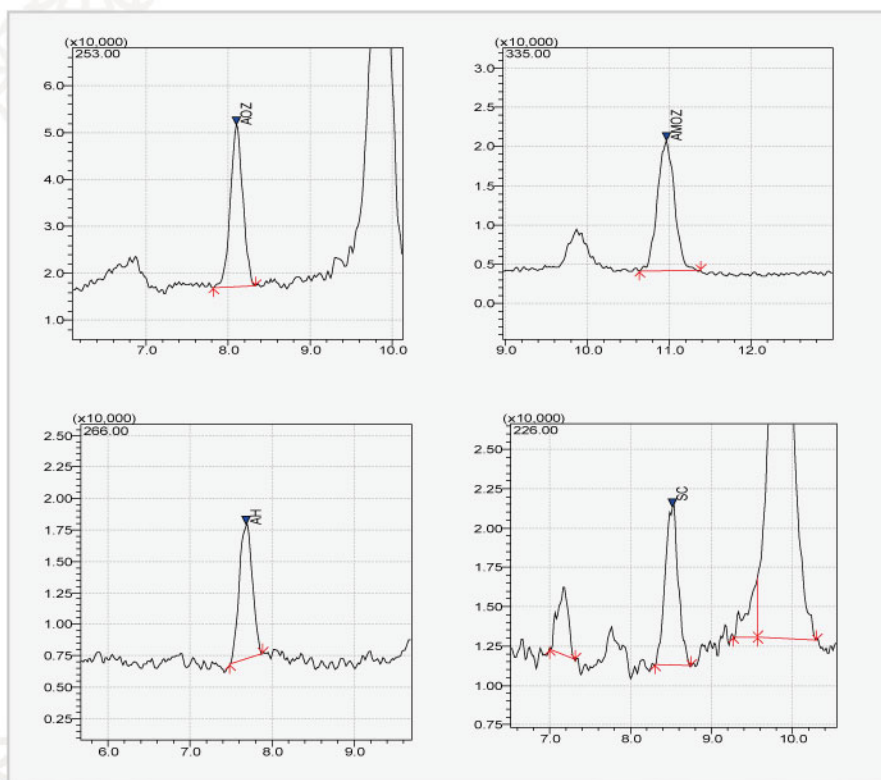


图3 空白鳊鱼样品中加入AOZ,AMOZ,AH,SC标准品后的分析谱图

表1 方法回收率、检测限、定量限结果

	Conc($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	Mean(n=2)	Recovery (%)	RSD%	LOD ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	LOQ($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)
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	106.80	10.2	0.151	0.50

4. 测定用户的活鳊样品结果

取市面上1g 鳊鱼,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。

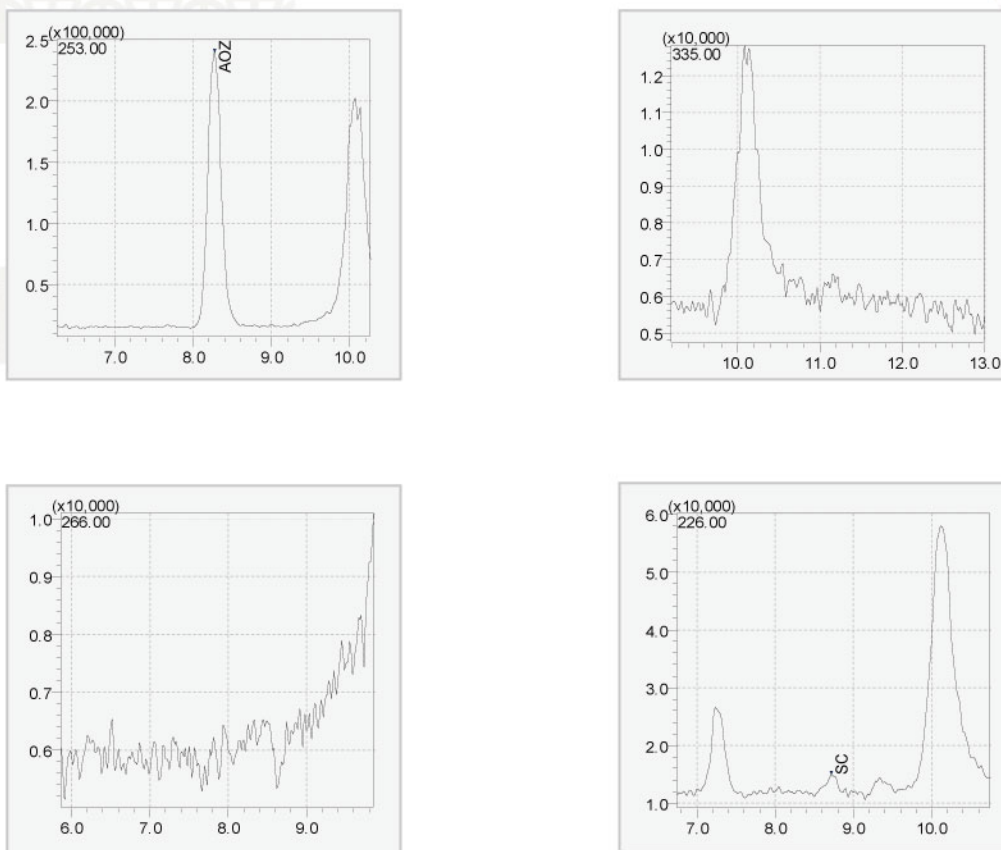


图4 活鳗样品谱图结果

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

结论

利用LC-APCI-MS对鳗鱼样品中硝基呋喃代谢物呋喃唑酮AOZ,呋喃它酮AMOZ,呋喃西林SC和呋喃妥因AH同时进行检测分析,AOZ和AMOZ的检测限为0.1ppb,定量限为0.3ppb,AH的检测限和定量限分别为0.2ppb和0.6ppb,SC的检测限和定量限分别为0.15ppb和0.5ppb.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代谢物的检测分析。