

2017~2018 年云南省 9 种新鲜鱼类产品中 4 种硝基呋喃代谢物的检测

师 真, 陈俊秀, 梁志坚, 刘晓松, 董玉英, 赵 丽*

(昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228)

摘 要: 目的 对 2017~2018 年云南省 9 种鱼类水产品中的 4 种硝基呋喃类药物呋喃它定(furaltadon)、呋喃西林(furacilin)、呋喃妥因(titrofuranyoine)、呋喃唑酮(furazolidonum)的相关代谢物 3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone(AMOZ)、1-Aminohydantoin(AHD)、Semicardazide(SEM)、3-Amino-2-oxazolidinone(AOZ)进行检测。**方法** 每年从云南昆明(9 份)、曲靖(9 份)、玉溪(9 份)、昭通(9 份)、红河(9 份)、普洱(9 份)、文山(9 份)、德宏(9 份)共 8 个地市的超市和农贸市场随机取样 72 份, 2 年共采样 144 份。将样品搅碎后在酸性条件(盐酸水解)下用 2-NBA 衍生剂衍生一夜(约 16 h), 采用液液萃取的方式净化, 利用超高效液相色谱-串联质谱仪测定。用内标法定量。**结果** 云南省部分水产品中硝基呋喃类药物残留水平超标。**结论** 此方法可对当地的食品安全提供保障。

关键词: 鱼; 硝基呋喃; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 4 nitrofuran metabolites in 9 fresh fish products in Yunnan province from 2017 to 2018

SHI Zhen, CHEN Jun-Xiu, LIANG Zhi-Jian, LIU Xiao-Song, DONG Yu-Ying, ZHAO Li*

(Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China)

ABSTRACT: Objective To test 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone (AMOZ), 1-Aminohydantoin (AHD), semiconductor (SEM), 3-amino-2-oxazolidino (AOZ) related metabolites of 4 kinds of nitrofurans furaltadon, furacillin, ttofuranoyoine, furazolidonum in 9 kinds of fish aquatic products of Yunnan province in 2017-2018. **Methods** 72 samples were randomly collected from supermarkets and farmers' markets in 8 cities, including Kunming (9), Qujing (9), Yuxi (9), Zhaotong (9), Honghe (9), Pu'er (9), Wenshan (9), Dehong (9). 144 samples were collected in two years. The samples were stirred and then derivatized overnight (about 16 hours) with 2-nba derivatives under acid conditions (hydrochloric acid hydrolysis). The samples were purified by liquid-liquid extraction and determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. It was quantitative by internal standard method. **Results** The residue level of nitrofurans in some aquatic products of southern of Yunnan Province exceeded the standard. **Conclusion** This method can guarantee the local food safety.

KEY WORDS: fish; nitrofurans; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 赵丽, 中级检验技师, 主要研究方向为食品和水中有有机污染物检测研究。E-mail: 417640514@qq.com

*Corresponding author: ZHAO Li, Technician, Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China. E-mail: 417640514@qq.com

1 引言

硝基呋喃类药物是一种普遍使用的抗生素类药物, 对大部分革兰氏菌、真菌等病原体具有杀灭作用。它们作用于微生物酶系统, 抑制乙酰辅酶 A 的活性, 干扰微生物糖类的代谢, 从而起到抑制菌群生长的作用。

由于硝基呋喃类药物及其代谢物对人体有慢性毒性、可以诱导基因突变、致癌、致畸、致突变等副作用, 我国农业部于 2002 年 4 月发布了 193 号公告, 公布了《食品动物禁用兽药及其他化合物清单》, 该清单将硝基呋喃类药物列为禁止使用药物^[1], 2003 年又将水产品硝基呋喃代谢物纳入残留监控计划。

目前, 对于硝基呋喃类抗生素残留的检测主要 SI 外法^[2]、酶联免疫法^[3]、液相色谱-串联质谱法^[4-15], 超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 是近几年发展起来的一种药物残留分析检测技术, 它与传统的高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 相比, 分离速度、灵敏度和分离度分别是 HPLC 的 9、3、1.7 倍^[8], UPLC-MS/MS 是国际上普遍采用的硝基呋喃代谢物检测和确证方法。

本次研究采用 UPLC-MS/MS 技术, 对云南省 8 个地市 144 份鱼肉样品中的 4 种硝基呋喃类药物进行检测。以期为保证当地的食品安全提供保障。

2 材料与方法

2.1 主要仪器和试剂

1290 Infinity I 超高效液相色谱仪、0.22 μm 尼龙 66 微孔滤膜 (美国 Agilent Technologies 公司); QTRAP 4500 质谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); PB1502 电子天平、PH 计 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); VW30 涡旋混合器 (韩国 DAIHAN scientific 公司); 3H16RI 高速冷冻离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); Autoeva-30 氮吹仪 (深圳 REEKO 公司); PROLINE 移液器 (上海 BIOHIT 公司)。

乙腈、乙酸乙酯、2-硝基苯甲醛 [色谱纯, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 甲酸、乙酸铵、浓盐酸 [优级纯, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; 二甲亚砜、氢氧化钠 [分析纯, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]。

标准品: 呋喃它酮 (furaldon) 的代谢产物 3-氨基 5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ, 纯度 $\geq 99\%$)、呋喃西林 (nitrofurazone) 的代谢产物氨基脒 (SEM, 纯度 $\geq 99\%$)、呋喃妥因 (nitofurantoin) 的代谢产物 1-氨基乙内酰脲 (AHD, 纯度 $\geq 99\%$)、呋喃唑酮 (furazolidone) 的代谢产物 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ, 纯度 $\geq 99\%$)、AMOZ-D₅ (纯度 $\geq 99\%$)、AOZ-D₄ (纯度 $\geq 99\%$)、SEM-¹³C¹⁵N₂ (纯度 $\geq 99\%$)、AHD-¹³C₃ (纯度 $\geq 99\%$) (上海 WiTEGA 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 试剂和标准品的配制

盐酸溶液: 量取 17 mL 浓盐酸用水定容至 1000 mL。

氢氧化钠溶液: 称取 80 g 氢氧化钠用水溶解, 定容至 1000 mL。

NBA 衍生剂: 称取 15.1 g 2-硝基苯甲醛溶于 10 mL 二甲亚砜, 现配现用 5 mol/L 乙酸铵溶液: 准确称取 0.772 g 乙酸铵, 用水溶解, 加入 1.0 mL 甲酸, 定容至 1000 mL。

4 种硝基呋喃代谢产物标准储备液 (1.0 mg/mL): 称取适量的 4 种硝基呋喃代谢产物标准物质, 分别用乙腈稀释成 1.0 mg/mL 的标准储备液。避光保存于 -20 °C 冰箱。

4 种硝基呋喃代谢产物混合标准溶液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$): 称取适量的 4 种硝基呋喃代谢产物标准储备液, 用乙腈稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。避光保存与 -20 °C 冰箱。

4 种硝基呋喃代谢产物内标物标准储备液 (1.0 mg/mL): 称取适量的 4 种硝基呋喃代谢产物内标物标准物质, 分别用乙腈稀释成 1.0 mg/mL 的标准储备液。避光保存与 -20 °C 冰箱。

4 种硝基呋喃代谢产物内标物混合标准溶液 (0.1 $\mu\text{g/mL}$): 称取适量的 4 种硝基呋喃代谢产物内标物标准储备液, 分别用乙腈稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。避光保存与 -20 °C 冰箱。

2.2.2 混合标准系列的制备

准确移取 4 种硝基呋喃代谢物混合标准溶液, 用空白鱼肉提取液配制成 0.5、1.0、2.0、5.0、10、50 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准系列。

2.3 样品处理

将鱼去鳞沿取肌肉, 充分搅碎, 匀质。分出 500 g 作为试样, 试样置于 -20 °C 以下避光保存。称取已匀浆的样品 1 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 依次加入 20 μL 4 种硝基呋喃代谢产物内标物混合标准液, 10 mL 盐酸溶液, 100 μL 2-NBA 衍生剂。漩涡混匀后, 将离心管置于 37 °C 恒温摇床中避光放置过夜。完成后取出离心管并冷却至室温, 用氢氧化钠溶液调节混合液的 pH 值, 使其 pH=7.4 \pm 0.2。再以 10000 r/min 的速度, 在 4 °C 下离心 10 min, 取上清液转入另一个 50 mL 离心管中。在装有上清液的离心管中加入 10 mL 乙酸乙酯, 漩涡混匀提取 1 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 收集乙酸乙酯层。残留物用 10 mL 乙酸乙酯再提取一次, 合并乙酸乙酯层。收集液在氮气流下吹干, 用乙腈/水溶液定容至 1.0 mL, 过 0.22 μm 微孔滤膜后待上机检测。

2.4 仪器条件

2.4.1 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 柱温: 35 °C;

流动相: A: 5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸), B: 乙腈;
进样量: 10 μ L。
液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱洗脱程序
Table 1 Elution procedure of liquid chromatography

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.00	0.3	20	80
3.50	0.3	55	45
4.00	0.3	95	5
6.00	0.3	95	5
6.50	0.3	20	80

2.4.2 质谱条件

电离源: 电喷雾离子源正离子 (electron spray ionization, ESI+); 离子源温度: 550 $^{\circ}$ C; 监测模式: 多反应检测 (multiple reaction monitoring, MRM); 离子喷雾电压: 5500 V; 质谱定性定量离子对信息见表 2。

表 2 目标化合物液质测定条件
Table 2 Determination conditions of liquid quality of target compounds

	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP/V	CE/V
2-NP-AMAZ	335.0	291.1	110.0	16.0
2-NP-AMAZ-D ₅	340.0	296.0	75.0	19.0
2-NP-SEM	209.0	166.0	59.0	13.0
2-NP-SEM- ¹³ C ¹⁵ N ₂	211.8	194.1	78.0	11.0
2-NP-AHD	249.0	134.1	65.0	18.0
2-NP-AHD- ¹³ C ₃	251.9	235.0	43.0	25.0
2-NP-AOZ	236.0	133.9	70.0	16.0
2-NP-AOZ-D ₄	239.9	211.3	75.0	21.0

表 3 线性回归方程
Table 3 Linear regression equation

目标物/ μ g/kg	线性回归方程	相关系数/ r^2	检出限
AOZ	$Y=0.23823X-0.00416$	0.99324	0.5
AMAZ	$Y=0.00235X+0.01144$	0.99874	0.5
SEM	$Y=0.00308X+0.01230$	0.99945	0.5
AHD	$Y=0.27652X+0.47329$	0.99359	0.5

表 4 样品中 4 种硝基呋喃代谢产物精密度与回收率
Table 4 Precision and recovery of 4 nitrofurans metabolites in the sample

硝基呋喃 4 种代谢产物	含量/ μ g/kg							
	0.5		1.0		10		50	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
AMAZ	100	9	105.1	5	130.5	8	98.5	7
AHD	106	7	113	5	98	7	89	4
SEM	90	13	102	12	115	9	98	3
AOZ	103	3	91	2	105	1	99	1

3 结果与分析

3.1 工作曲线的制作

分别称取已搅碎均匀的空白样品 1 g 于 6 个 50 mL 塑料离心管中, 分别加入各混合溶液(2.2.2) 1.0 mL, 其余步骤同处理方法(2.3)。以目标峰面积与相对应内标峰面积的比值 $Y(\mu\text{g}/\text{kg})$ 为纵坐标, 以标准工作液的浓度为横坐标, 进行线性回归, 绘制工作曲线。线性回归方程见表 3。

由表 3 可知硝基呋喃代谢物在 0.5 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内其标准曲线的线性关系良好, 相关系数 r^2 在 0.993 以上。

3.2 回收率和精密度

选用昆明、曲靖、玉溪、昭通、红河、普洱、文山、德宏地区的鱼类作为基值样品, 混匀后分别称取 1.00 g 混匀样品分别加入混合溶液(2.2.2)浓度为 0.5、1.0、10、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 各 1.0 mL, 其余步骤同处理方法(2.3), 做 0.5、1.0、10、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 个水平的加标回收实验, 测定结果见表 4。由此可见本次实验的试验方法具有较好的准确度和精密度。

3.3 样品测定结果

采用建立的方法对144份鱼类产品(包括草鱼、鲤鱼、罗非鱼、大菱鲆鱼、乌鳢、鳊鱼)进行硝基呋喃代谢物残留量的测定,其测定结果为:AMOZ检出4件(0.58~4.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$),检出率2.8%;AHD检出1件(72.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$),检出率0.69%;SEM检出4件(0.58~2.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$),检出率2.8%;AOZ检出4件(1.05~8.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$)检出,检出率2.8%。

2017年检出6件,2018年检出7件,2年度检出数量无明显差异。

4 结论

通过连续2年对云南省9种新鲜食用鱼抽样检测硝基呋喃代谢物,总的检出率为9.0%。新鲜食用鱼中仍存在非法药品添加的问题,需继续加大力度进行监测。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部. 农业部 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]. Ministry of agriculture of the people's Republic of China. Announcement No. 783-1-2006 of the Ministry of Agriculture: Determination of nitrofurans metabolite residues in aquatic products-Liquid chromatography tandem mass spectrometry [S].
- [2] Conneely A, Nugent A, Keffe MO. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues [J]. *Analyst*, 2002, 127(6): 705-709.
- [3] Wang Q, Liu YC, Wang MY, et al. A multiplex immuno chromatographic test using gold nanoparticles for the rapid and simultaneous detection of four nitrofurans metabolites in fish samples [J]. 2018, 410(1): 223-233.
- [4] McCrachen BJ, Kennedy DG. Determination of furazolidone in animal feeds using HPLC with UV and thermospray MS detection [J]. *J chromatography A*, 1997, 771(1/2): 349-354.
- [5] 林黎明, 林回春, 刘心同, 等. 固相萃取高效液相色谱-质谱法测定动物组织中硝基呋喃代谢物[J]. *分析化学*, 2005, 33(5): 707-710. Lin LM, Lin HC, Liu XT, et al. Determination of nitrofurans metabolites in animal tissues by SPE-HPLC-MS [J]. *Chin J Anal Chem*, 2005, 33(5): 707-710.
- [6] 马骏, 罗华明, 张玲茜. 液相色谱串联质谱测定水产品中硝基呋喃类代谢物残留[J]. *浙江农业科学*, 2016, 57(4): 558-562. Ma J, Luo HM, Zhang LQ. Determination of nitrofurans metabolites in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Zhejiang Agric Sci*, 2016, 57(4): 558-562.
- [7] 王狄, 张嘉楠. 超高效液相色谱串联质谱法对水产品中硝基呋喃代谢物的测定[J]. *河北渔业*, 2016, (7): 47-51. Wang D, Zhang JN. Determination of nitrofurans metabolites in aquatic products by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Hebei Fish*, 2016, (7): 47-51.
- [8] 唐红梅, 曾芳, 李成洪. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(10): 3952-3959. Tang HM, Zeng F, Li CH. Progress on the detection of nitrofurans drugs residues and their metabolites in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(10):

3952-3959.

- [9] 丁军伟, 邓建朝, 杨贤庆. 4种硝基呋喃类代谢物在青石斑鱼肌肉中的富集与消除规律[J]. *南方水产科学*, 2018, 14(1): 60-67. Ding JW, Deng JC, Yang XQ. Enrichment and elimination of four nitrofurans metabolites in muscle of grouper [J]. *South Fish Sci*, 2018, 14(1): 60-67.
- [10] 王兴进. 液相色谱-串联质谱法检测黄鱼鲞中硝基呋喃代谢物残留量[J]. *分析仪器*, 2016, (5): 14-18. Wang XJ. Determination of nitrofurans metabolites in yellow croaker by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Instrum*, 2016, (5): 14-18.
- [11] 周贻兵, 吴坤, 李磊. UPLC-MS/MS 法测定鱼肉中硝基呋喃代谢物残留量[J]. *食品研究与开发*, 2016, 37(10): 159-164. Zhou YB, Wu K, Li L. Determination of nitrofurans metabolite residues in fish by UPLC-MS/MS [J]. *Food Res Dev*, 2016, 37(10): 159-164.
- [12] 梁雪琪, 何凤芹. 液相色谱串联质谱法测定巴鱼中硝基呋喃代谢物的残留量[J]. *分析仪器*, 2013, (6): 92-97. Liang XQ, He FQ. Determination of nitrofurans metabolic residues in Spanish mackerel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Instrum*, 2013, (6): 92-97.
- [13] 刘书贵, 尹怡, 单奇. 广东省鳊鱼和杂交鳢中孔雀石绿和硝基呋喃残留调查及暴露评估[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(5): 553-558. Liu SG, Yin Y, Shan Q. Residual levels of malachite green and nitrofurans metabolites in farmed fish from Guangdong and exposure assessment [J]. *Chin J Food Hygi*, 2015, 27(5): 553-558.
- [14] 陈兴连, 林涛, 刘兴勇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鱼和虾中多类禁、限用兽药残留[J]. *色谱*, 2020, 38(5): 538-546. Chen XL, Lin T, Liu XY, et al. Rapid determination of various banned and restricted veterinary drug residues in fish and shrimp by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chromatography*, 2020, 38(5): 538-546.
- [15] 肖曼, 张玲, 张杨, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测中华圆田螺硝基呋喃代谢物残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(6): 1814-1820. Xiao M, Zhang L, Zhang Y, et al. Determination of Nitrofurans Metabolite Residues in *Spira chinensis* by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(6): 1814-1820.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



师真, 硕士研究生, 理化检验中级技师, 主要研究方向为水和食品中有机污染物检测。
E-mail: 403908568@qq.com



赵丽, 硕士研究生, 理化检验中级技师, 主要研究方向为水和食品中有机污染物检测。
E-mail: 417640514@qq.com