

高效液相色谱—串联质谱法快速测定胶原蛋白粉中呋喃类代谢物

何京澄*, 王培锋, 宿立强, 温晓敬, 邱芳, 蔡雪, 周维政
(山东出入境检验检疫检验检疫技术中心, 青岛 266001)

摘要: **目的** 简化测定胶原蛋白粉中呋喃类代谢物残留的实验过程, 缩短实验的检测时间。**方法** 在 GB/T21311-2007 的基础上, 对其进行方法改进, 建立高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)测定胶原蛋白粉中呋喃西林(SEM)、呋喃妥因(AHD)、呋喃唑酮(AOZ)、呋喃它酮(AMOZ)等4种呋喃代谢物的快速检测方法。采用55℃衍生化, 对衍生品按照离心、调pH值、离心的步骤进行处理, 使得调节pH值更容易, 同时避免传统试验方法中使用分液漏斗时样品乳化成胶状体而不能达到液液分离的目的的现象。**结果** 实验结果表明, 本方法与《GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法》相比, 结果并无很大的差异, 但是大大缩短了实验的检测时间、简化了实验过程。**结论** 本实验方法更加适合大批量样品的试验检测。

关键词: 呋喃类代谢物兽药残留; 液相色谱—串联质谱法; 胶原蛋白粉; 乳化现象

Rapid determination of nitrofuran metabolite residues in collagen powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HE Jing-Cheng*, WANG Pei-Feng, SU Li-Qiang, WEN Xiao-Jing, QIU Fang, CAI Xue, ZHOU Wei-Zheng
(Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China)

ABSTRACT: Objective To simplify the experimental process for determination of furan metabolite residues in collagen powder, and shorten the detection time of the experiment. **Methods** Based on GB/T21311-2007, the method was improved, and a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was established to rapidly determine 4 kinds of nitrofuran metabolite residues in collagen powder, including nitrofurazone (SEM), nitrofurantoin (AHD), furaltadone (AOZ) and furazolidone (AMOZ). After derivation at 55℃, the derivatives were processed following the steps of centrifugation, pH adjustment, and centrifugation again, making it easier to adjust the pH value, while avoiding the problem found in the conventional test method using a separatory funnel where the sample emulsified into colloid and could not achieve the purpose of liquid-liquid separation. **Results** The experimental results showed no significant differences between the proposed method and the national standard GB/T21311-2007, while the detection time of the experiment was greatly reduced, and the experimental process was simplified. **Conclusion** This method is more suitable for experimental detection of large quantities of samples.

KEY WORDS: nitrofuran metabolite residues of veterinary drugs; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; collagen powder; emulsification

*通讯作者: 何京澄, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: 277467854@qq.com

*Corresponding author: HE Jing-Cheng, Assistant Engineer, Technical Center of Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China. E-mail: 277467854@qq.com

1 引 言

硝基呋喃类药物是合成广谱抗生素, 主要包括呋喃西林、呋喃妥因、呋喃唑酮、呋喃它酮^[1-3]。此类药物具有消炎杀菌的作用, 因此常被添入饲料广泛用于家禽、家畜、水产、蜂等动物传染性疾病的预防和治疗, 但其代谢物呋喃西林(nitrofurazone, SEM)、呋喃妥因(nitrofurantoin, AHD)、呋喃唑酮(furaltadone, AOZ)、呋喃它酮(furazolidone, AMOZ)均可使动物发生癌变和基因突变, 并且有生殖毒性, 对人类危害巨大, 因此硝基呋喃已被欧盟列为不得检出抗生素之一^[4-9]。近几年随着人们对硝基呋喃类代谢物检测方法的研究, 其检测方法已逐渐趋于成熟稳定, 但仍有不少特殊基质易乳化, 不易于被液相色谱—串联质谱(LC-MS/MS)分离检测^[10-13]。本文着重研究了其中一种特殊基质—胶原蛋白粉中呋喃类代谢物残留的检测方法。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

仪器: Agilent2600 液相色谱仪(美国 Agilent 公司); API4000Q-trap 串联质谱仪(美国 AB 公司), 配有电喷雾离子源; 离心机(CR22GII/CR21GII), 氮吹仪(Caliper TurboVap®LV), 振荡器(IKA MS2), 恒温振荡装置(SHA-B), pH 计(SARTORIUS TB10), 主要试剂: 甲醇(色谱纯), 乙酸乙酯(色谱纯), 乙腈(色谱纯), 正己烷(色谱纯), 甲酸(分析纯), 四氯化碳(优级纯), 氯化钠(分析纯), 氢氧化钠(分析纯), 盐酸(分析纯), 2-硝基苯甲醛(HPLC), 磷酸氢二钾(分析纯), 实验用

水均为超纯水。
标准品: SEM、AHD、AMOZ、AOZ 均为 Sigma-Aldrich 产品, 纯度均大于 99%; AMOZ-D₅, AHD-¹³C₃, SCA-¹⁵N₂-¹³C-HCL, AOZ-D₄均为 Witega 产品, 纯度均大于 99%。
标准品溶液: 依次准确称取上述标准品, 用甲醇定容于 10 mL 棕色容量瓶。浓度为 1000 μg/mL。使用时用甲醇溶液依次稀释。

2.2 色谱条件

色谱柱: Intersil ODS-3(150 mm×4.6 mm, 5 μm)或相当者; 柱温: 20℃; 流动相: A: 乙腈; B: 0.1 %甲酸溶液; 洗脱程序: 0~10 min: 10%A+90%B, 0.6 mL/min; 10~11 min: 95%A+5%B, 0.6 mL/min; 11.00~11.05 min: 95%A+5%B, 0.8 mL/min; 11.05~16 min: 10%A+90%B, 0.8 mL/min; 16.00 min: 10%A+90% B, 0.8 mL/min; 进样量: 30 μL;

2.3 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多重反应监测; 电喷雾电压: 5500 V; 雾化气压力: 0.448 MPa; 气帘气压力: 0.193 MPa; 辅助气压力: 0.344 MPa; 离子源温度: 500℃; 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压, 见表 1。

2.4 样品的前处理方法

称 1.5 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 1 g 硅藻土, 然后加入 10 mL 0.125 mol/L 盐酸水溶液, 再加入 60 μL 0.1 μg/mL 的混合同位素内标及 300 μL 0.015 g/mL2-硝基苯甲醛甲醇溶液, 高速涡旋 2 min, 放置于 55 ℃水浴锅中震荡 2 h, 频率为 60 Hz。然后从水浴锅中取出, 离心(8000 r/min, 8 min, 15 ℃),

表 1 硝基呋喃代谢物的质谱条件
Table 1 MS parameters of nitrofuran metabolite

名称	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞气能量/eV	去簇电压/V
SEM	209.0/192.0, 209.0/166.0	209.0/166.0	18, 15	60, 60
AHD	249.0/133.9, 249.0/178.0, 249.0/103.9	249.0/133.9	18, 17, 32	60, 60, 60
AOZ	236.0/133.9, 236.0/103.9	236.0/133.9	19, 31	60, 60
AMOZ	335.1/291.0, 335.1/262.0	335.1/291.0	18, 25	60, 60
SCA- ¹³ C ¹⁵ N ₂	212.0/168.0	212.0/168.0	22	60
AHD- ¹³ C ₃	252.0/133.9	252.0/133.9	21	60
AOZ-D ₄	240.0/133.9	240.0/133.9	20	60
AMOZ-D ₅	340.0/296.9	340.0/296.9	15	60

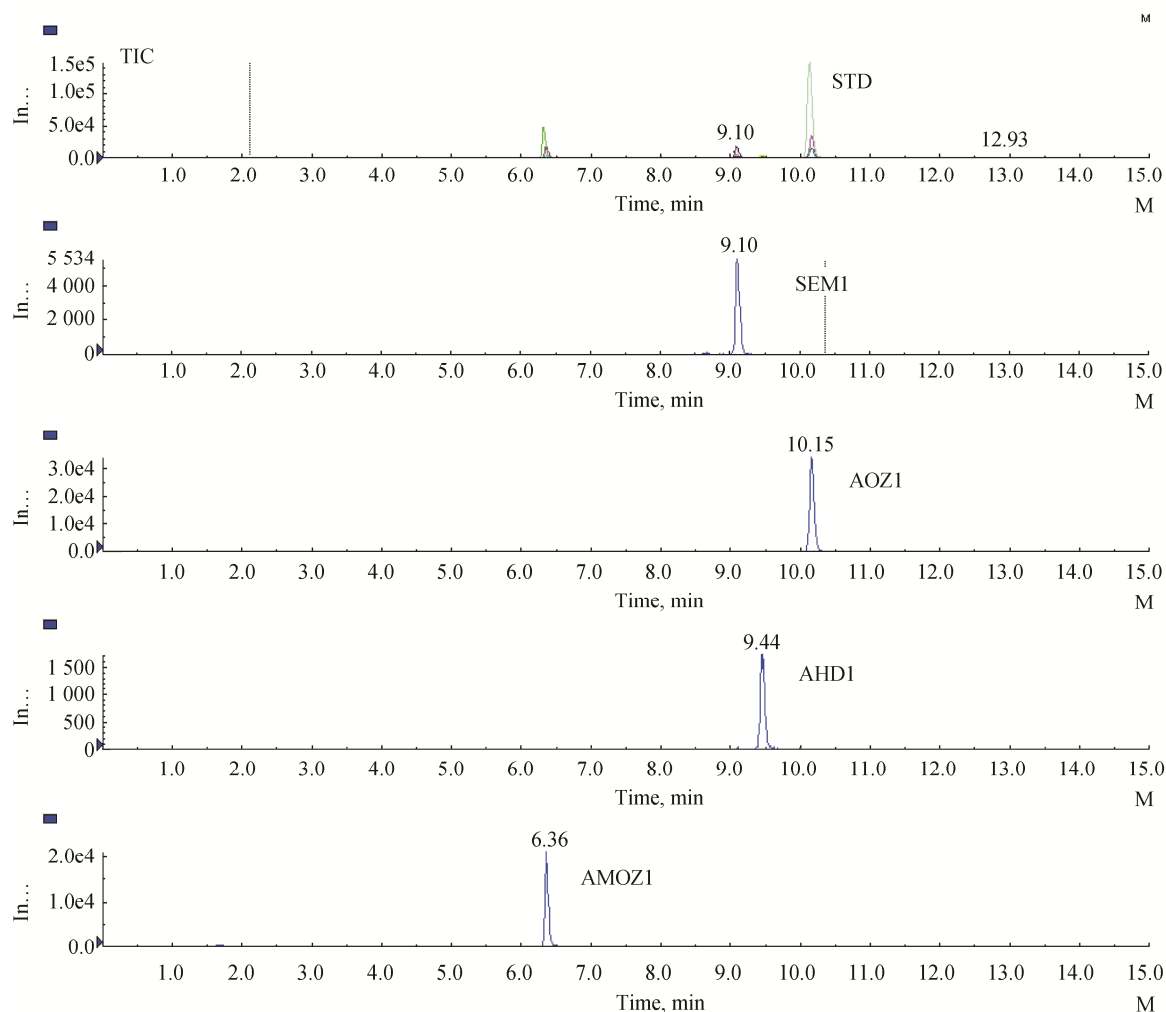


图1 标准溶液中4种呋喃代谢物定量离子提取色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of 4 kinds of nitrofuran metabolite in standard solution

取出上清液于另一干净 50 mL 离心管中, 用 3 mol/L NaOH 溶液、1 mol/L KH_2PO_4 溶液、1 mol/L HCL 溶液调 PH 值至 7.0~7.5, 然后加 10 mL 乙酸乙酯, 再加 NaCl 至溶液饱和, 振荡器振荡 10 min, 10000 r/min 离心 10 min, 取出上层于 15 mL 具盖氮吹管中, 40 °C 下氮吹至干, 用 1 mL 0.2% 甲酸水溶液定容, 加入 2.5 mL 1:1 四氯化碳正己烷溶液, 涡旋 1 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取上层溶液过 0.22 μm 滤液于进样小瓶中, 供液相色谱-串联质谱测定。

3 结果与讨论

3.1 提取与净化

本实验分别在 40 °C、50 °C、55 °C、60 °C 不同温度条件下衍生化 2 h^[14], 对比其衍生化温度对提取效率的影响。结果表明: 在 55 °C 时, 衍生化更完全,

目标化合物相应最强, 因此本实验采用 55 °C 衍生化。然而《GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法》中是要求在 37 °C 条件下衍生 16 h, 本实验方法衍生化效率与之没有显著差异, 但是大大缩减了衍生化的时间, 从而使得整个实验的时间大幅度减少, 使得实验更加快速硝基呋喃代谢物 GB/T21311-2007 与本实验的 t 检验对比, 其中的添加浓度均为 0.50 $\mu\text{g/kg}$ 。得 SEM、AHD、AMOZ、AOZ 的 t 值均小于 $t_{0.05}$, 因此在 95% 置信水平下两组数据平均值无显著性差异

根据《GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法》是对衍生样品直接进行 PH 值的调节, 基质干扰影响 PH 值不稳定, 并且基质附着在探头上不易

于清洗; 而本实验方法处理过程采用了先离心再调 PH 值的方法, 由于只有上清液, 去除了基质的干扰, 与《GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法》相比, 使得 pH 值更容易调节。

《GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法》是对样品先进行提取, 然后对其净化, 是相互分离的两步; 然而本实验方法中的提取和净化是同时进行, 两者在同一步完成, 简化了实验步骤, 节约了大量的人力物力。

《GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类

药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法》中是采用静置的方法使样品达到液液分离的目的, 然而胶原蛋白粉中的胶原蛋白含量高, 静置无法使其分离彻底, 往往不能达到最佳的分离效果; 本实验方法中直接用高速离心的方法, 可以有效破除乳化现象, 使得液液分离快速并且彻底, 同时避免了传统试验方法中使用分液漏斗时样品乳化成胶状体而不能达到液液分离的目的的现象。

3.2 实际样品的测定

采用本方法对胶原蛋白样品进行检测, 有一胶原粉样品检出呋喃西林代谢物, 结果为 SEM: 16.3 $\mu\text{g/kg}$ 。提取离子色谱图见图 2。

表 2 硝基呋喃代谢物 GB/T21311-2007 与本实验的 t 检验对比
Table 2 t -test comparison of GB/T21311-2007 and this method of nitrofuran metabolite determination

检测值	SEM		AHD		AOZ		AMOZ	
	GB/T21311-2007	本实验方法	GB/T21311-2007	本实验方法	GB/T21311-2007	本实验方法	GB/T21311-2007	本实验方法
第一组	0.495	0.489	0.533	0.512	0.455	0.494	0.495	0.516
第二组	0.478	0.489	0.479	0.522	0.509	0.472	0.518	5.529
第三组	0.501	0.479	0.45	0.488	0.502	0.534	0.463	0.490
第四组	0.499	0.455	0.488	0.511	0.508	0.536	0.452	0.476
第五组	0.523	0.512	0.533	0.501	0.477	0.491	0.461	0.482
第六组	0.467	0.475	0.479	0.521	0.498	0.534	0.541	0.537
t 值	0.96		1.07		1.30		1.01	
自由度 ν	10		10		10		10	
$t_{0.05}$	2.228		2.228		2.228		2.228	

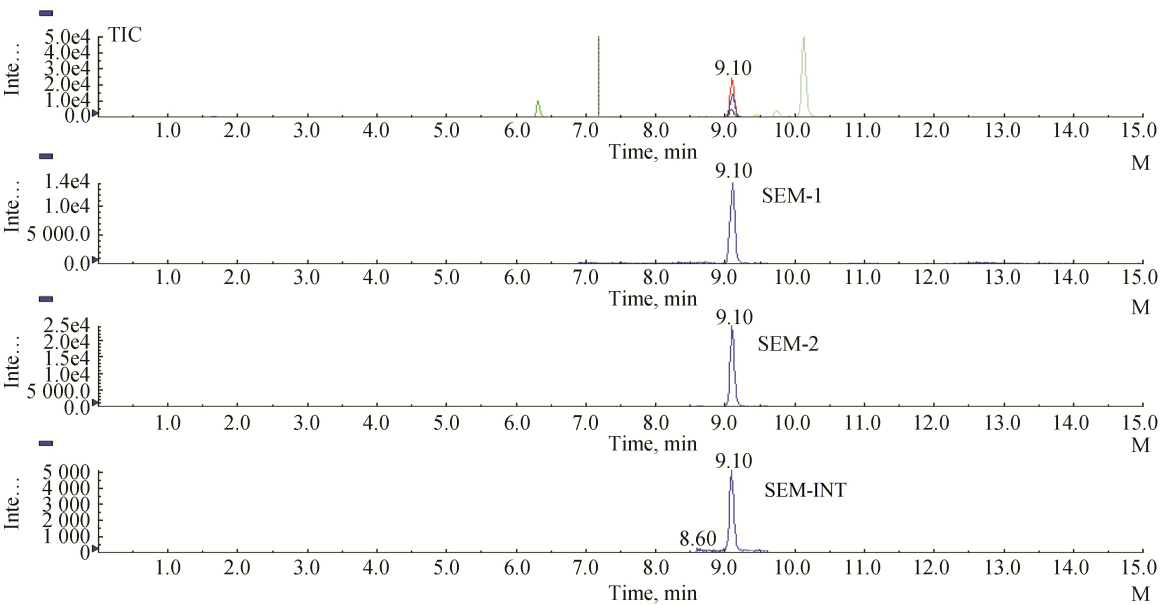


图 2 阳性样品中呋喃西林代谢物提取离子色谱图
Fig. 2 Extracted ion chromatograms of nitrofuran metabolite in positive solution

表 3 4 种呋喃代谢物的线性方程、相关系数及检出限
Table 3 Linear equations, correlation coefficient and limits of quantitation of 4 kinds of nitrofuran metabolite

化合物名称	线性方程	相关系数	检出限 (μg/kg)
SEM	$Y=0.82X+3.22e^{-7}$	0.9998	0.5
AHD	$Y=0.673X-5.23e^{-7}$	0.9990	0.5
AOZ	$Y=0.619X-1.32e^{-8}$	0.9999	0.5
AMOX	$Y=0.835X+1.21e^{-6}$	0.9994	0.5

表 4 4 种呋喃代谢物回收率及精密度(n=6)
Table 4 Recoveries and relative standard deviations of 4 kinds of nitrofuran metabolite

化合物名称	添加水平 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	标准偏差 (μg/kg)	相对标准偏差%
SEM	0.50, 1.00, 3.00	102.07, 99.70, 101.18	6.06, 6.41, 6.00	5.9, 6.4, 5.9
AHD	0.50, 1.00, 3.00	96.35, 103.18, 103.63	8.95, 5.89, 8.53	9.3, 5.7, 8.2
AOZ	0.50, 1.00, 3.00	102.1, 98.52, 99.23	7.92, 5.83, 6.97	7.8, 5.9, 7.0
AMOX	0.50, 1.00, 3.00	92.98, 102.23, 98.73	7.10, 7.16, 6.15	7.6, 7.0, 6.2

3.3 线性关系及检出限

4 种硝基呋喃代谢物在 0~20.0 ng/mL 内线性关系良好, 相关系数均>0.99.该方法种 4 种化合物的检出限均为 0.5 μg/kg(三倍基线噪音对应浓度)^[15]。

3.4 样品的添加回收率和精密度

使用空白胶原蛋白粉样品, 在浓度为 0.5 μg/kg(检测底线水平)、1.0 μg/kg、3.0 μg/kg 下进行添加回收试验, 每个浓度水平平行测定 6 次, 回收率及精密度见表 4。

4 结 论

本方法回收率在 80%~120%范围内, 相对标准偏差小于 10%, 完全满足欧盟指令 2002/657/EC 中对硝基呋喃类药物代谢物的检测要求。本方法专属性强, 灵敏度高, 准确度高, 可作为胶原蛋白粉中 4 种呋喃代谢物的快速检测及确证方法。

参考文献

[1] 余建新, 胡小钟, 林雁飞, 等. 串联质谱联用法测定蜂蜜及水产品中硝基呋喃类抗生素代谢物残留量[J]. 分析科学学报, 2004, 20(4): 382–384.
Yu JX, Hu XZ, Lin YF, et al. Residues in tandem mass Spectrometry in honey and fish nitrofuran antibiotic metabolites [J]. J Anal Sci, 2004, 20(4): 382–384.
[2] 陈瑞清. 液相色谱-电喷雾串联质谱联用检测鳗鱼肌肉组织中 4 种硝基呋喃代谢物残留量[J]. 福建农业学报, 2007, 22(1):

68–72.
Chen RQ. Liquid chromatography-electro spray tandem mass spectrometry detection eel muscle tissue in four kinds of residues of nitro furan metabolites [J]. Fujian J Agric Sci, 2007, 22(1): 68–72.
[3] 李耀平, 林永辉, 贾东芳, 等. 超高效液相色谱串联质谱法快速检测烤鳗中硝基呋喃代谢物残留新技术[J]. 分析试验室, 2008, 27(12): 76–79.
Li YP, Lin YH, Jia DF, et al. Ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry detection eel shrimp nitrofuran metabolite residues in new technology [J]. Chin J Anal Lab, 2008, 27(12): 76–79.
[4] 张仲秋, 郑明. 畜禽药物使用手册[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
Zhang ZQ, Zheng M. Animal Drug User Manual [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2000.
[5] 张健玲, 高华鹏, 沈维军, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定烤鳗中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(1): 19–21.
Zhang JL, Gao HP, Shen WJ, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry eel nitrofuran metabolites residues of [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(1): 19–21.
[6] 杨楠, 赵晶, 权伍英, 等. 液相色谱-串联质谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(6): 978–980.
Yang N, Zhao J, Quan WY, et al. Liquid chromatography - tandem mass spectrometry nitrofuran metabolites in aquatic products [J]. Chin J Health Lab Technol, 2008, 18(6): 978–980.

- [7] 梁希扬, 张林田, 罗惠明, 等. 液相色谱-串联质谱测定水产品中残留硝基呋喃类药物含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(11): 1986-1988.
- Liang XY, Zhang LT, Luo HM, *et al.* Liquid chromatography - tandem mass spectrometry nitrofurans residues in aquatic drug content [J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(11): 1986-1988.
- [8] 尹江伟, 刘红河, 刘桂华, 等. HPLC-MS/MS 法测定水产品中硝基呋喃类化合物代谢物[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2141-2143.
- Yin JW, Liu HH, Liu GJ, *et al.* HPLC-MS/determination of metabolites nitrofurans in aquatic products MS method[J]. Chin J Health Lab Technol, 2007, 17(12): 2141-2143.
- [9] GB/T20752—2006 猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和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].
- GB/T20752—2006 Determination of pork, beef, chicken, liver and aquatic products nitrofurans metabolites residues: liquid chromatography/tandem mass spectrometry [S].
- [10] Finzi JK, Donato JL, Sucupira M, *et al.* Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2005, 824(1/2): 30-35.
- [11] GB/T21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱串联质谱法[S].
- GB/T21311-2007 Food of animal origin nitrofurans residues of drug metabolites high performance liquid chromatography tandem mass detection method [S].
- [12] 许航. 液相色谱质谱联用法分析检测鳗鱼中 4 种硝基呋喃代谢物[D]. 福州: 福建省计量科学研究所, 2010.
- Xu H. Liquid chromatography mass spectrometry analysis and detection of four nitrofurans eel metabolites [D]. Fuzhou: Fujian Metrology Institute, 2010.
- [13] Ferretti GG, Itareale C, Palleschi L. Multiresidue method for the determination of nitrofurans metabolites in egg using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry [J]. J Vet Pharmacol Therap, 2006, 29(s1): 129-180.
- [14] 李耀平, 林永辉, 贾东芬, 等. 水产品中硝基呋喃代谢物残留快速检测新方法研究[J]. 分析测试学报, 2008, 27(7): 712-717.
- Li HP, Lin YH, Jia DF, *et al.* Aquatic nitrofurans metabolite residues new method for rapid detection [J]. J Anal Sci, 2008, 27(7): 712-717.
- [15] 管恩平, 张艺兵. 欧盟食品中残留物严控技术/国家质检总局进出口食品安全局编译[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010.
- Guan EP, Zhang YB. EU strictly control residues in food technology/AQSIQ Import and Export Food Safety Bureau to compile [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2010.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



何京澄, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测。
E-mail: 277467854@qq.com。