

液相色谱串联质谱法测定氨基糖软骨素片中硝基呋喃类代谢物残留

蒋 琰¹, 赵 轩¹, 王毅谦^{2*}, 殷 冉³, 孙慧宇¹, 陈君义¹, 王 伟¹

(1. 徐州海关, 徐州 221006; 2. 南京海关, 南京 210001; 3. 常熟海关, 常熟 215500)

摘 要: **目的** 采用液相色谱串联质谱法测定氨基糖软骨素片中的硝基呋喃类代谢物残留量。**方法** 样品在酸性条件下(pH<2)衍生 16 h, 经乙酸乙酯提取浓缩。经甲醇水溶液溶解过滤后, 用液相色谱-串联质谱测定。试验过程中采用添加同位素内标法来补偿前处理过程中产生的损失。**结果** 在 0.5、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度水平上进行添加回收试验, 4 种代谢物的回收率范围为 82.7~106.7%, 相对标准偏差不大于 12.3%, 检出限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法具有良好的准确度、灵敏度和稳定性, 可用于氨基糖软骨素片中硝基呋喃类代谢物残留量的测定。

关键词: 氨基糖软骨素; 硝基呋喃类代谢物; 液相色谱-串联质谱法

Determination of nitrofurans metabolites residues in glucosamine chondroitin tablets by liquid chromatography tandem mass spectrometry

JIANG Yan¹, ZHAO Xuan¹, WANG Yi-Qian^{2*}, YIN Ran³, SUN Hui-Yu¹, CHEN Jun-Yi¹, WANG Wei¹

(1. Xuzhou Customs, Xuzhou 221006, China; 2. Nanjing Customs, Nanjing 210001, China; 3. Changshu Customs, Changshu 215500, China)

ABSTRACT: Objective To determine the residue of nitrofurans metabolites in glucosamine chondroitin tablets by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** The sample was derived 16 h in acid condition (pH<2), and then extracted and concentrated by ethyl acetate. The extract was dissolved and filtered by methanol-water and determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The isotope internal standard method was used in the experiment to compensate the loss in the pretreatment. **Results** The recovery experiments were conducted at levels of 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the recoveries of the four metabolites ranged in 82.7%-106.7% with RSD \leq 12.3%. The limit of detection was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The method has good accuracy, sensitivity and stability and can be used for the determination of residual nitrofurans metabolites in glucosamine chondroitin tablets.

KEY WORDS: glucosamine chondroitin; nitrofurans metabolites; liquid chromatography tandem mass spectrometry

基金项目: 南京海关科技计划项目(2018KJ62)

Fund: Supported by Nanjing Customs Scientific Technology Program (2018KJ62)

*通讯作者: 王毅谦, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检验检测研究。E-mail: wang1000319@163.com

*Corresponding author: WANG Yi-Qian, Senior Engineer, Animal Plant and Food Inspection Center of Nanjing Customs, 39 Chuangzhi Road, Jianye District, Nanjing 210001, China. E-mail: wang1000319@163.com

1 引言

氨基糖苷类抗生素,是一种天然的氨基单糖,是关节软骨、结缔组织、关节滑液的组成基质。氨基糖苷类抗生素是由氨基葡萄糖和硫酸软骨素按照一定的配比加工制备而成,可口服用于改善关节机能、延缓关节老化,被称为“关节软黄金”、关节“液体磁石”。随着人们生活水平的提高,氨基糖苷类抗生素片越来越受消费者青睐。由于其主要原料源自海洋生物,随着人们食品安全意识的提高,有些国家对于氨基糖苷类抗生素片也提出了明确的兽药残留限量要求。硝基咪唑类药物为常见兽药,且被各国列入禁用药,因此,氨基糖苷类抗生素中的硝基咪唑类药物残留检测显得尤为重要。

硝基咪唑类药物代谢物主要是指:3-氨基-2-恶唑酮(3-amino-2-oxalidinone, AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑酮(5-morpholinomethyl-3-amino-2-oxalidinone, AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(1-amino-hydantoin, AHD)和氨基脲(semicarbazide, SEM)等硝基类人工合成的广谱抗菌药。研究表明,此类药物及其代谢物具有慢性毒性,可引起消化道反应及溶血性贫血,还能使动物组织产生癌变或基因突变^[1],包括中国在内,大部分国家早已禁止使用此类药物。我国农业农村部第 250 号公告中,也明确提出将硝基咪唑类药物列为禁用药。硝基咪唑类药物本身易降解,其代谢产物却可与蛋白质紧密结合,在动物体内可稳定地残留数周,甚至在食品加工过程中也不能有效降解,因此检测结合态的硝基咪唑类药物的代谢产物,更能起到监控作用^[2,3]。

目前已有大量文献及国家标准报道了硝基咪唑类代谢物残留的检测方法^[4-8],其中,由于灵敏度高、回收率好,液相色谱-串联质谱法已逐渐成为此类代谢物检测的主要手段,但在此类研究中,主要是以水产品、畜禽产品、蛋及乳制品、蜂产品等动物源性产品^[9-17]作为基质进行试验,而鲜见氨基糖苷类抗生素中硝基咪唑类药物残留的研究。本文建立了氨基糖苷类抗生素中硝基咪唑类药物残留的液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)分析方法,以同位素标记物为内标,2-硝基苯甲醛为衍生剂,以期实现样品中代谢物残留的快速、准确定量。

2 材料与试剂

2.1 主要仪器与试剂

Triple Quad 4500 型液相串联质谱仪(美国 AB 公司); Talboys STD.MINI VORTEXER 涡旋混合器(美国 Talboys 公司); 3-30KS 型低温高速离心机(美国 Sigma 公司); SHA-B 型恒温水浴摇床(金坛亿通公司); P-11 型组织破碎机(德国 FRITSCH 公司); N-EVAP12 型水浴氮吹仪(美国

Organomation 公司)。

甲醇、二甲基亚砜均为色谱级(德国 MERCK 公司); 盐酸(德国 CNW 公司,稀释成 1.0 mol/L); 乙酸乙酯、甲酸(分析纯,西陇化工有限公司); 2-硝基苯甲醛溶液(美国 Sigma-Aldrich 公司,0.05 mol/L,现配现用); 磷酸氢二钾溶液(分析纯,西陇化工有限公司,配制成 1.0 mol/L); 实验用水为去离子水。

盐酸咪唑西林(SEM-HCl, 99.4%)、盐酸咪唑妥因(AHD-HCl, 98.3%)、咪唑啉酮(AOZ, 98.3%)、咪唑它酮(AMOZ, 98.3%)标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)(用 HPLC 级甲醇配制成 1000 mg/L 的单标储备液)。

同位素内标标准品 AOZ-D4、AMOZ-D5、AHD-¹³C₃、SEM-¹³C¹⁵N₂(德国 Witega 公司)(用色谱级甲醇配制成 1000 mg/L 的内标储备液,试验中用 HPLC 级甲醇配成 100 μg/L 的混合同位素内标液)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备

随机抽取 200 g 样品,粉碎后混合均匀,分装两份,-20 °C 保存。

2.2.2 样品前处理

准确称取 0.5 g 样品于 25 mL 具塞玻璃离心管中,准确加入 100 ng/mL 混合同位素内标液 40 μL, 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛 150 μL, 水 5 mL 和 1.0 mol/L 盐酸 0.5~1.5 mL, 使溶液 pH 值小于 2。漩涡振荡 15 s 后,于 37 °C 水浴中避光振荡 16 h。将样品自然冷却至室温,加入 1~3 mL 磷酸氢二钾溶液(1.0 mol/L),调节 pH 值 7.0~7.5。加入乙酸乙酯 8 mL, 涡旋 20 s, 2500 r/min 离心 10 min。取上层清液于玻璃试管中,40 °C 水浴中氮吹至干。向试管中加入 1 mL 流动相,漩涡溶解,过 0.22 μm 滤膜后上机。

2.2.3 液相色谱参数

色谱柱: Phenomenex Kinetex 2.6 μm Biphenyl, (100 mm×3.0 mm), 柱温: 40 °C; 流动相: A 相为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.2% 的甲酸), B 相为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~2 min, B 相从 10% 线性升至 90%, 保持 3.0 min。0.1 min 内, B 相降至 10%, 保持至 7.0 min; 流速: 400 μL/min; 进样体积 10 μL。

2.2.4 质谱参数

电喷雾离子源正离子扫描模式(ESI+), 多反应监测(multireaction monitoring, MRM); 离子源喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 550 °C。

3 结果与分析

3.1 样品前处理条件的选择

硝基咪唑类代谢物分子量较小,在 75~201 之间,受质谱背景干扰大,影响检测的灵敏度。为获得较好的质谱响

应, 参照文献^[5-15]采用 2-硝基苯甲醛将硝基呋喃类代谢物衍生为分子量较大的物质进行质谱测定。

硝基呋喃代谢物本身不稳定, 分析过程中需要注意光照、pH 值等因素的影响^[12], 以确保试验的提取率。由于氨基糖苷类有别于动物肌肉, 本身具有一定的酸度, 称样量不同, 调节 pH 值所用缓冲液体积不同, 对回收率造成一定的影响。试验中分别选取了 0.2、0.5、1.0、2.0 g 4 组称样量进行试验, 在加入盐酸调节 pH 值之前, 用 pH 计测定溶液的 pH 值。2 种成分不同的氨基糖片 A 和 B 在 4 组质量下的 pH 值分别为 3.64、3.26、3.15、3.04 和 4.79、4.41、4.12、3.83。用盐酸调节溶液 pH<2, 处理后上机分析, 试验结果如图 1 所示。结果表明, 称样量选在 0.5 g 时, 回收效果较好。按照兽药检测过程的惯例, 采用同位素内标校正实验过程和分析结果的偏差, 提高准确性。

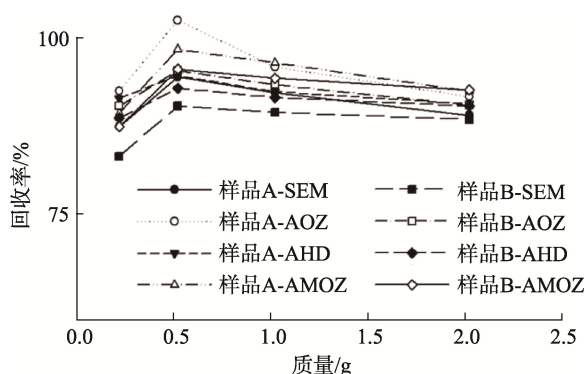


图 1 不同称样量对硝基呋喃类代谢物在 2 种氨基糖片中回收率的影响

Fig.1 Effect of sampling weight on the recovery of nitrofurantoin metabolites in 2 glucosamine chondroitin tablets

3.2 质谱条件的优化

采用 Triple Quad 4500 型液质联用仪的多通道扫描技术, 选用多反应监测模式对各化合物的衍生物进行质谱参数的优化。试验中采用 2-硝基苯甲醛进行柱前衍生, 衍生

物的分子量较衍生前增加 133, 在适当的碰撞电压下可以产生多个特征离子碎片。经过质谱扫描, 确定的离子对参数和质谱图如表 1 和图 2 所示。

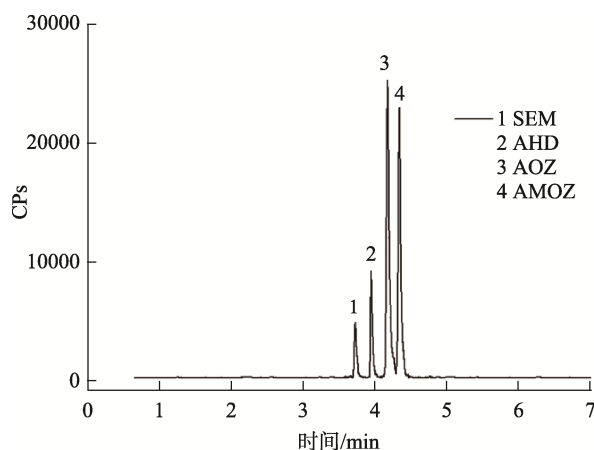


图 2 硝基呋喃类代谢物标准物质图谱

Fig.2 Mass spectra of nitrofurantoin metabolites standards

3.3 标准工作曲线

在标准系列溶液(0.0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL)中加入 40 μL 的混合同位素内标液, 衍生、浓缩、定容后上机分析。以峰面积比 X (标准峰与内标峰面积之比)为横坐标, 浓度 C (ng/mL)为纵坐标, 建立标准曲线。线性方程、相关系数、检出限见表 2, 最低检出浓度为 0.25 ng/mL。最低检出浓度下, SEM, AHD, AOZ 和 AMOZ 的信噪比分别为 12,22,63 和 57。

3.4 样品中硝基呋喃类代谢物含量的计算

样品中硝基呋喃类代谢物的含量 X (单位 μg/kg)按下式计算: $X=C \times V \times 1000 / m / 1000$ 。其中 C 为提取液经液相色谱-串联质谱测定的硝基呋喃类代谢物浓度(单位 ng/mL), V 为最终定容体积(单位 mL), m 为称样量(单位 g)。按此方法检测, 样品中硝基呋喃类代谢物的检出限为 0.5 μg/kg。

表 1 硝基呋喃类代谢物的定性和定量参数

Table 1 Qualitative and quantitative parameters for nitrofurantoin metabolites

待测组分	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	同位素内标物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)
SEM	209.2/166.2	209.2/166.2	SEM- ¹³ C ¹⁵ N ₂	212.2/168.2	212.2/168.2
	209.2/192.1				
AOZ	236.1/133.9	236.1/133.9	AOZ-D ₄	240.1/134.1	240.1/134.1
	236.1/103.8				
AHD	249.1/134.1	249.1/134.1	AHD- ¹³ C ₃	252.0/134.1	252.0/134.1
	249.1/104.1				
AMOZ	335.2/262.1	335.2/262.1	AMOZ-D ₅	340.1/296.1	340.1/296.1
	335.2/291.3				

表 2 不同待测组分的线性方程及检出限
Table 2 Linear equations and limit of detection of different target compounds

待测物	线性方程	<i>r</i>	检出限/(ng/mL)
SEM	$C=0.0976X-0.00605$	0.9985	0.25
AOZ	$C=0.00324X+0.00105$	0.9972	0.25
AHD	$C=0.0129X+0.000716$	0.9996	0.25
AMAZ	$C=0.00144X+0.000538$	0.9959	0.25

3.5 加标回收率和精密度试验

以不含有硝基呋喃类代谢物残留的氨基葡萄糖素片为样品,按照上述方法进行 3 水平 6 平行的加标回收试验,回收率范围为 82.7%~106.7%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均不大于 12.3%(见表 3)。

表 3 氨基葡萄糖素片中不同添加水平的回收率
Table 3 Recovery at different spiked levels in sample of glucosamine chondroitin tablets

待测组分	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	氨基葡萄糖素片	
		平均回收率/%	RSD/%
SEM	0.5	87.3	12.1
	1.0	95.6	8.45
	2.0	106.7	10.7
AOZ	0.5	98.8	9.60
	1.0	94.0	9.50
	2.0	102.4	8.60
AHD	0.5	83.1	12.3
	1.0	88.6	11.3
	2.0	98.1	10.1
AMAZ	0.5	82.7	6.44
	1.0	85.7	4.13
	2.0	95.5	11.9

4 讨论与结论

利用该方法对氨基葡萄糖素片进行检测时发现,在累计检测的 200 多批样品中检出呋喃西林阳性样品 10 余批,但含量不高。实验室推测可能是由于氨基葡萄糖素片的主要成分包含了从海洋生物中提取的硫酸软骨素,而海洋生物中的一些甲壳类生物含有 SEM^[16,17]而引入产品中。

综上,本试验主要探索了 LC-MS/MS 检测氨基葡萄糖

素片中硝基呋喃类代谢物残留的方法。以硝基呋喃代谢物的同位素标记物作为内标,补偿了样品处理和液质测定过程中产生的误差,有效地提高了定量的灵敏度(样品的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$),保证了试验的回收率。

参考文献

- 王传现,黄帆,王敏,等.液相色谱-串联质谱法检测水产品中残留的硝基呋喃类药物的代谢物[J].色谱,2013,31(3):206-210.
Wang CX, Huang F, Wang M, *et al.* Determination of metabolite residues of nitrofurantoin antibiotics in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(3): 206-210.
- 蒋原,丁涛,徐锦忠,等.硝基呋喃类药物在克氏螯虾组织中消除规律的研究[J].畜牧与兽医,2008,40(2):37-40.
Jiang Y, Ding T, Xu JZ, *et al.* Dynamical changes of nitrofurantoin metabolites in crawfish [J]. *Anim Husb Vet Med*, 2008, 40(2): 37-40.
- Aila O, Shitandi A, Mahungu MS, *et al.* Determination of nitrofurantoin drugs in aquatic products [J]. *Food Control*, 2009, 20: 543.
- 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 nitrofurantoin metabolites in aquatic products by LC-MS/MS [J]. *J Zhejiang Agric Sci*, 2016, 57(4): 558-562.
- 李芳,陈莹,李献刚,等.动物源性食品中硝基呋喃及其代谢物产物检测方法研究进展[J].食品安全质量检测学报,2016,7(6):2320-2327.
Li F, Chen Y, Li XG, *et al.* Progress on determination of nitrofurantoin and their metabolites in animal-derived food [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(6): 2320-2327.
- GB/T 21311-2007 中华人民共和国国家标准 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/T 21311-2007 National Standard-Determination of residues of nitrofurantoin metabolites in foodstuffs of animal origin-HPLC-MS/MS method [S].
- GB/T 20752-2006 中华人民共和国国家标准猪肉、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/T 20752-2006 National Standard-Method for the determination residues of the metabolites of nitrofurantoin in pork, beef, chicken, porcine liver and aquatic products-LC-MS/MS method [S].
- 农业部 781 号公告-4-2006 动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定-高效液相色谱-串联质谱法[S].
Announcement of No. 781 of Ministry of Agriculture-4-2006 Determination of nitrofurantoin metabolites in animal derived food by high performance liquid chromatography-Tandem mass spectrometry [S].
- 赵东豪,黎智广,王旭峰,等.高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物的优化研究[J].南方水产科学,2015,11(6):61-62.
Zhao DH, Li ZG, Wang XF, *et al.* Optimization of determination of nitrofurantoin metabolites in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *South China Fisher Sci*, 2015, 11(6): 61-62.
- Fadi A, Kevin CH, Obiadada NU, *et al.* Accurate quantitation and analysis of nitrofurantoin metabolites, chloramphenicol, and florfenicol in seafood by

- ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: method validation and regulatory samples [J]. *J Agr Food Chem*, 2018, 66(20): 5018-5030.
- [11] 杨鹏, 刘桂华, 陈丽丽, 等. 同位素稀释液相色谱-串联质谱法同时测定贝类产品中 5 种硝基呋喃类代谢物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(1): 195-203.
- Yang P, Liu GH, Chen LL, *et al.* Determination of 5 nitrofurans metabolites in shellfish products by isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(1): 195-203
- [12] 丁涛, 徐锦忠, 沈崇钰, 等. 高效液相色谱-串联质谱联用测定蜂王浆中的四种硝基呋喃类药物的代谢物[J]. *色谱*, 2006, 24(5): 432-435.
- Ding T, Xu JZ, Shen CY, *et al.* Determination of metabolites of nitrofurans antibiotics in royal jelly by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24(5): 432-435.
- [13] Veach B, Anglin R, Mudalige T, *et al.* Quantitation and confirmation of chloramphenicol, florfenicol, and nitrofurans metabolites in honey using LC-MS/MS [J]. *J AOAC Int*, 2018, 101(3): 897-904.
- [14] 宋利军, 于晖, 程鑫, 等. 液相色谱-串联质谱法检测动物性食品中硝基呋喃代谢产物的残留[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(3): 321-323.
- Song LJ, Yu H, Cheng X, *et al.* Determination of nitrofurans metabolites in animal derived food with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(3): 321-323.
- [15] 孙慧宇, 陈君义, 王玥, 等. 液相色谱-同位素稀释串联质谱法测定动物性食品中硝基呋喃类代谢物残留[J]. *分析试验室*, 2011, 30(7): 115-118.
- Sun HY, Chen JY, Wang Y, *et al.* Determination of nitrofurans metabolites in food of animal origin by liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2011, 30(7): 115-118.
- [16] 张晓燕, 张睿, 陈雷, 等. 甲壳类水产品中氨基脲的来源分析[J]. *食品研究与开发*, 2013, 34(13): 125-127.
- Zhang XY, Zhang R, Chen L, *et al.* Analysis to the occurrence of semicarbazide in shellfish [J]. *Food Res Dev*, 2013, 34(13): 125-127.
- [17] 程波, 舒秀君, 宋蓓, 等. 甲壳类水产品中氨基脲残留来源研究进展[J]. *广东海洋大学学报*, 2018, 38(5): 93-98.
- Cheng B, Shu XJ, Song B, *et al.* Advance in research on other sources that are linked neither to the illegal use of nitrofurazone in crustacean aquatic products [J]. *J Guangdong Ocean Univ*, 2018, 38(5): 93-98.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



蒋 琰, 助理工程师, 主要研究方向为食品药物残留检测。

E-mail: 690714929@qq.com



王毅谦, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: w1000319@163.com