

解决方案 鸡肉中硝基呋喃代谢物的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；硝基呋喃代谢物

介绍

硝基呋喃类药物是一种广谱抗生素，对大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、真菌和原虫等病原体均有杀灭作用。它们作用于微生物酶系统，抑制乙酰辅酶A，干扰微生物糖类的代谢，从而起抑菌作用。硝基呋喃类药物因为价格较低且效果好，曾广泛应用于畜禽及水产养殖业，以治疗由大肠杆菌或沙门氏菌所引起的肠炎、疥疮、赤鳍病、溃疡病等。由于硝基呋喃类药物及其代谢物对人体有致癌、致畸胎副作用，中国卫生部于2010年3月22日将硝基呋喃类药物呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃妥因、呋喃西林列入可能违法添加的非食用物质黑名单。

2019年12月27日，硝基呋喃被列入食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单，并严格执行对畜禽和水产品中硝基呋喃的残留检测。本文参考国标20752-2006《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》进行了鸡肉样品中硝基呋喃代谢物的检测。

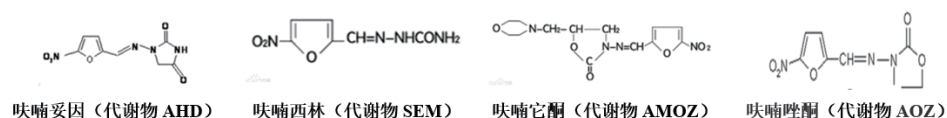


图-1. 四种硝基呋喃类代谢物结构图

1. 仪器和耗材

仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AH-30 全自动均质器

耗材

HLB 固相萃取柱 (RayCure HLB, 60mg/3 mL,

试剂

甲醇 (优级纯), 水

衍生剂: 含 2-硝基苯甲醛 0.05 mol/L。称取 0.075 g 2-硝基苯甲醛溶于 10 mL 二甲亚砜, 现配现用

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410

RC-204-36473)

盐酸溶液: 0.2 mol/L。量取 17 mL 浓盐酸用水定容至 1000 mL

氢氧化钠溶液: 1 mol/L。称取 40 g 氢氧化钠用水溶解, 定容至 1000 mL

2. 样品制备

2.1 标准工作曲线配置

称取 5 个阴性样品 2 g (精确到 0.01 g), 分别置于 50 mL 棕色离心管中, 加入 10 mL 甲醇-水混合溶液 (2+1), 用 AH-30 全自动均质器均质 1 min, 再用 5 mL 甲醇-水混合溶液洗涤均质器刀头, 二者合并 4000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液弃掉 (该步骤对样品进行清洗, 防止目标物对阴性样品干

2.2 样品提取

向每个样品离心管中加入 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液, 用 AH-30 全自动均质器均质 1 min, 用 10 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液洗涤均质器刀头, 二者合并后加入 0.3 mL 衍生剂, 用液体混匀器混匀, 置于 37°C 恒温振荡水浴中避光反应 16 h。(由于硝基呋喃代谢物与蛋白质中的氨基酸结合紧密, 故需要加入盐酸进行蛋白变性, 长时间的恒温水浴利于目标物的析出与衍生化, 注意避光保存, 硝基呋喃代谢物中的化合物见光易分解)

2.3 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科Fotector Plus
固相萃取柱	HLB (RayCure, 60 mg/3 mL)
活化	甲醇
淋洗	水
洗脱	乙酸乙酯

2.4 净化

上述衍生溶液放置至室温后, 加入 5 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节溶液 pH 约为 7.4, 4000 r/min 离心 10 min, 上清液 (若待测样品含脂肪较多, 上清液加 5 mL

扰)。向 5 个离心管中分别加入适量四种硝基呋喃代谢物混合标准溶液, 使四种硝基呋喃代谢物最终测定浓度分别为 0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、10.0 ng/mL。再向每个离心管中加入适量混合内标标准溶液, 使四种硝基呋喃代谢物内标物最终测定浓度均为 2.0 ng/mL。

正己烷, 振荡 2 min, 4 000 r/min 离心 10 min 吸取并弃掉正己烷)

采用 Fotector plus 仪器进行固相萃取柱的净化, 样液以 1 mL/min 的流速通过技迹 RayCure™ HLB

柱（根据样品量更改上样体积），待样液全部通过固相萃取柱后用 8 mL 水洗涤固相萃取柱，弃去全部流出液。用氮气吹干技迹 RayCure™ HLB 固相萃取柱 5 min（若不进行吹干，下一步的洗脱无法有效地浸润固相萃取柱，导致洗脱效果变差）。用 5 mL

乙酸乙酯洗脱被测物于 15 mL 棕色离心管中，使用 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪在 40 °C 水浴中吹干，用样品定容溶液（10%乙腈水溶液，含 0.3%乙酸）溶解并定容至 1.0 mL。混匀后过 0.2 μm 滤膜用液相色谱—串联质谱测定。

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	CH3OH		80	5	1.5
2	活化	CH3OH	废液1	5	5	1.7
3	活化	H2O	废液1	5	10	2.6
4	上样		废液1	1	11	11.9
5	清洗样品瓶	H2O	废液1	80	2	2.7
6	淋洗	H2O	废液1	8	8	1.5
7	气推		废液1	40	5	0.7
8	气推		废液1	160	80	4.8
9	清洗注射泵	CH3OH		80	1	0.3
10	清洗注射泵	Eth-Ace (Et...		80	1	0.3
11	洗脱	Eth-Ace (Et...	收集	1	6	6.5
12	气推		收集	20	10	1.3
13	结束					

图-2 Fotector Plus 硝基咪唑代谢物固相萃取方法

3. 液质检测条件

3.1 液质条件

色谱柱	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm×21 mm×150mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A: 0.3%甲酸水溶液, B: 0.3%甲酸乙腈溶液
柱温	35 °C
进样体积	10 μL
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 °C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi

3.2 液相洗脱梯度

时间/min	流动相 A (0.3%甲酸水溶液)	流动相 B (0.3%甲酸乙腈)
0.0	80%	20%
3.0	50%	50%
8.0	50%	50%
8.1	80%	20%
16.0	80%	20%

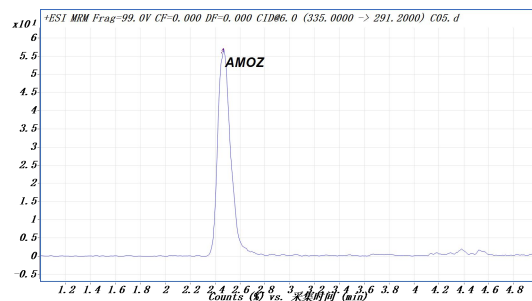
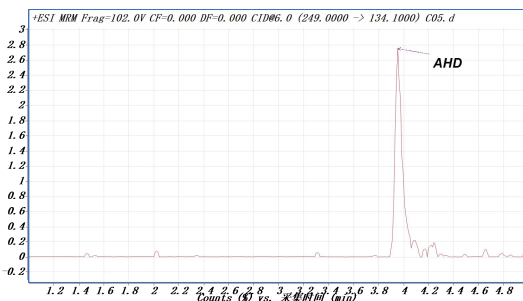
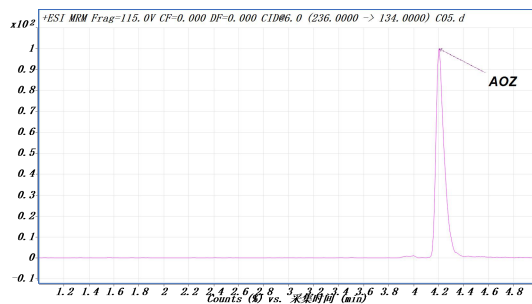
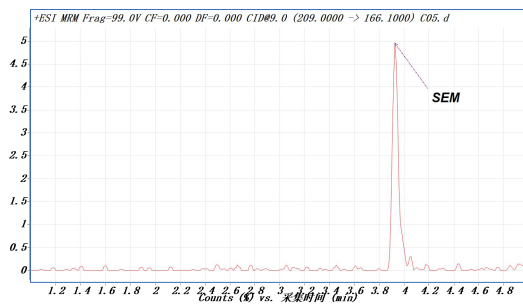
3.3 MRM 参数

表-1. 4种咪唑代谢物的串联质谱检测参数（具体数值请参考标准）

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
AMAZ	335	291	40	120	18	7
		128	40	120	16	7
SEM	209	192	40	115	17	7
		166	40	115	12	7
AHD	249	134	40	120	18	7
		178	40	120	12	7
AOZ	236	134	40	125	14	7
		192	40	125	19	7

3.4 色谱图

下图为4种硝基咪唑代谢物的衍生物（5 ppb）在液质色谱中的质谱图：



4. 方法可行性验证

样品基质加标回收实验

为了验证该方法的回收率，本实验向鸡肉样品（2 g）中加入上述4种咪唑代谢物标准品（20 uL，100 ug/L），进行加标回收验证。测试结果如表-2

所示。四种硝基咪唑代谢物的回收率在94.5-110.5%之间，RSD值2.1-5.2%之间。

表-2. 新鲜鸡肉的加标回收率及 RSD 值（2 μg/kg）

化合物 (Compound)	加标量 (ng/g)	平均回收量	平均回收率 (%)	RSD (%)
AMAZ	2.0	1.94	97.0	3.6
AOZ	2.0	2.21	110.5	5.2
SEM	2.0	1.89	94.5	2.1
AHD	2.0	2.05	100.3	2.6

5. 结果与讨论

硝基呋喃代谢物容易与蛋白多肽链上的羧基键合，因此需要加入浓盐酸进行蛋白组织破坏及酰基水解。另一方面，加入硝基苯甲醛进行衍生化，可增大被测物的分子量，进而避免样品基质中小分子杂质对待测物的干扰。

衍生化反应生成的席夫碱处在过酸或过碱的条件下均容易发生分解，因此在避光衍生化 16 h 后，需要将反应液中和至 pH=7.4 左右，然后进行固相萃取净化。

6. 总结

本解决方案操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。AH-30 全自动均质器可以自动完成 16 个样品均质，均质后能够自动清洗刀头，清洗刀头时可以采用水洗、超声洗和溶剂洗等多级清洗组合，有效防止交叉污染，且全程无需人工干预；

Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪通过独特的针自动追随液面技术可以极大地减少氮气使用量，同时避免手动氮吹需要经常去调节氮吹针高度带来

AMOZ 化合物的极性较强，因此需要控制上样速度在 1 mL/min 左右，否则 AMOZ 衍生物容易穿透固相萃取柱，导致其在液质上的响应值下降。若上样速度大于 2 mL/min，AMOZ 的质谱信号将过低，导致其在仪器上无法被检出。

样品（空白，待测样，工作曲线等）衍生化过程中，需要加入合适的内标进行跟踪反应，避免反应过程中个别样品的衍生化失败，导致测试结果的假阴性。

的麻烦；

Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。能良好的按照国标完成鸡肉样品中硝基呋喃代谢物的检测。



全自动均质器
均质



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 10 月版