

猪肉中硝基呋喃类代谢物的测定

SGLC-LC/MS-010

摘要：硝基呋喃类药物是一类合成的抗菌药物。该类物质很不稳定，在动物体内迅速分解产生代谢物，代谢物在体内与细胞膜蛋白结合成结合态。由于代谢物比较稳定也有致癌作用，所以在食品安全的检测中检测硝基呋喃代谢物。常见的硝基呋喃代谢物有如下四种：3-氨基-2-恶唑酮(AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮(AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(AHD)和氨基脲(SEM)。本研究采用岛津的 InertSep HLB 产品对猪肉样品进行净化,同时采用岛津液相色谱串联质谱 LCMS-8050,岛津 Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分析,对猪肉中 4 种硝基呋喃类代谢物进行检测,结果表明:该方法回收率高、重现性好,可以应对猪肉等动物源性食品中硝基呋喃类代谢物的测定要求。

关键词：InertSep HLB Shim-pack GIST C18 硝基呋喃代谢物 猪肉

1. 实验部分

1.1 实验仪器及耗材

仪器配置：Shimadzu LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统；

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (50×2.1 mm, 2 μm ; P/N: 227-30001-02)

固相萃取小柱：InertSep HLB 60 mg/3 mL (P/N: 5010-81973) ;

SHIMSEN Arc Disc HPTFE 针式过滤器 (P/N: 380-00341-05) ;

LC/MS 认证样品瓶 LabTotal Vial (P/N: 227-34001-01) ;

SHIMSEN Pipet 移液枪：SHIMSEN Pipet PMII-10 (P/N: 380-00751-02) ;

SHIMSEN Pipet PMII-100 (P/N: 380-00751-04) ;

SHIMSEN Pipet PMII-1000 (P/N: 380-00751-06) 。

1.2 分析条件

1.2.1 UHPLC 条件：

色谱柱：Shim-pack GIST C18, 50×2.1 mm, 2 μm (P/N: 227-30001-02)

流 速：0.5 mL/min

进样量：10 μL

柱 温：40 °C

流动相： A: 0.01%甲酸水 B: 0.01%甲酸乙腈

梯度洗脱程序如下：

时间 (Min)	0	0.5	1.5	3	3.01	4	4.01	5
A (%)	90	90	80	80	30	30	90	90

1.2.2 质谱条件:

离子化模式: ESI, 正离子扫描

扫描模式: 多反应监测(MRM)

碰撞气: 氦气

加热气: 氮气 15 L/min

雾化气: 氮气 3 L/min

干燥气: 氮气 5 L/min

接口温度: 400°C

DL 温度: 250 °C

加热模块温度: 450 °C

喷针偏移距离: +3.00 mm

各化合物 MRM 参数见下表

序号	兽药名称	前体离子 (m/z)	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias	CE	Q3 Pre Bias
1	AHD	249.0	134.0	-10.0	-12.0	-24.0
			178.0	-10.0	-16.0	-16.0
2	AMOZ	334.9	291.2	-10.0	-13.0	-12.0
			128.2	-10.0	-24.0	-22.0
3	AOZ	236.0	134.0	-10.0	-13.0	-30.0
			104.0	-12.0	-21.0	-22.0
4	SEM	209.0	192.0	-11.0	-12.0	-17.0
			166.0	-11.0	-10.0	-14.0

1.3 样品前处理

1.3.1 样品提取、衍生

称取均质样品 2.0 g 于 50 mL 离心管中, 加 20 mL 0.2 mol/L 盐酸溶液, 涡旋 1 min, 加 300 μ L 0.1 mol/L 2-硝基苯甲醛衍生剂, 涡旋混匀 1 min, 37°C 恒温振荡衍生 16 h。样品放置室温, 加 5 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液, 混匀, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 7.2-7.4, 8000 r/min 离心 2 min, 取出上清液, 待净化。具体步骤见图 1。

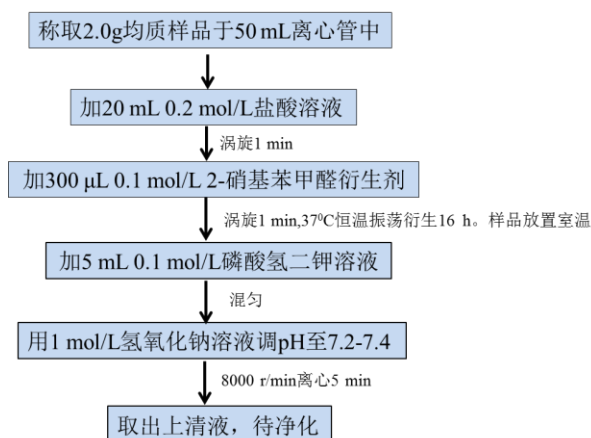


图 1 样品提取、衍生流程图

1.3.2 样品净化

InertSep HLB 60 mg/3 mL

5 mL 甲醇、5 mL 水活化，弃去流出液；待净化液上样，弃去流出液；5 mL 水清洗，弃去流出液；减压抽干小柱 5 min；5 mL 乙酸乙酯洗脱，收集流出液；将收集的洗脱液于 40℃ 下氮吹至干，用 0.01% 甲酸乙腈-0.01% 甲酸水溶液（1：9）定容至 1 mL，供 LC-MS/MS 分析。

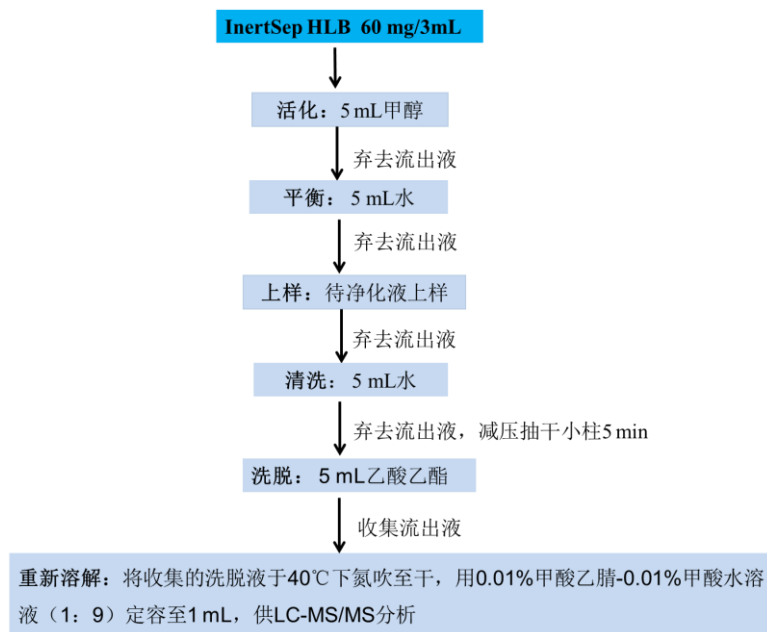
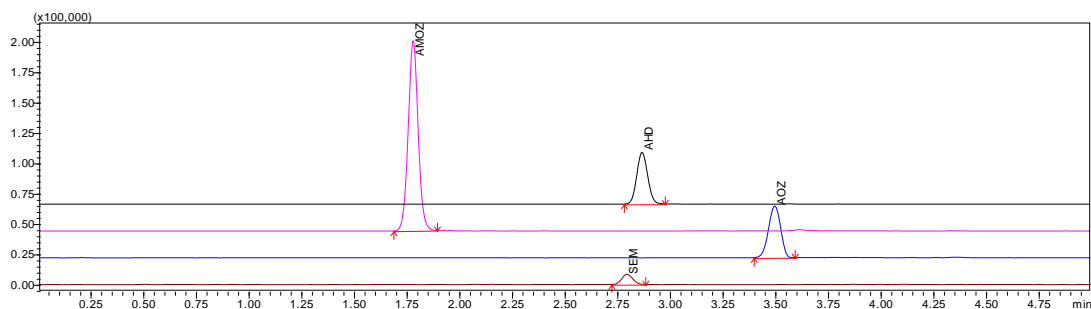


图 2 样品 SPE 净化流程图

2. 结果及讨论

2.1 标准品的 MRM 色谱图



硝基咪唑类代谢物的 MRM 色谱图 (1.0 µg/L)

2.2 猪肉中硝基咪唑类代谢物的 LC-MS/MS 检测添加回收结果

将猪肉空白样品进行 0.5 µg/kg 浓度加标，平行 3 份样品考察回收率和 RSD；并按上述相同方法采用 W 公司的 HLB 小柱对样品进行净化，平行 3 份样品考察回收率和 RSD，具体结果如下：采用岛津 InertSep HLB 小柱对样品进行净化，样品加标回收率为 71.26%-80.93%，RSD 为 4.77%-7.21%；采用 W 公司 HLB 小柱对样品进行净化，样品加标回收率为 72.45%-78.03%，RSD 为 8.47%-12.47%。

实验结果	InertSep HLB 60 mg/3 mL				W 公司 HLB 60 mg/3 mL			
	AHD	AMUZ	AOZ	SEM	AHD	AMUZ	AOZ	SEM
回收率 (%)	77.67	70.62	76.93	67.41	65.33	68.15	70.54	67.09
	71.62	79.59	85.27	76.02	83.42	81.88	89.03	79.14
	78.08	70.23	80.59	70.36	74.55	79.94	74.54	71.12
回收率平均值 (%)	75.79	73.48	80.93	71.26	74.43	76.65	78.03	72.45
RSD(%)	4.77	7.21	5.17	6.14	12.15	9.69	12.47	8.47

3. 结论

综上，本研究采用岛津的 InertSep HLB 产品对猪肉样品进行净化，同时采用岛津液相色谱串联质谱 LCMS-8050，岛津 Shim-pack GIST C18 色谱柱进行分析，对猪肉中 4 种硝基咪唑类代谢物进行检测，并和采用 W 公司 HLB 小柱净化样品后的回收率及 RSD 进行对比，结果表明：该方法回收率高、重现性好，可以应对猪肉中 4 种硝基咪唑类代谢物的测定要求；回收率和 W 公司 HLB 相当，但上样时小柱流速比 W 公司 HLB 小柱快，重现性比 W 公司 HLB 小柱高，可以为分析检测人员节省时间，并提供可靠的实验数据。