

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.09.09

国家标准方法测定水产品中硝基呋喃类代谢物残留量检测方法的改进

宋 瑞,李 云,赵义良,田 梅,王志恒,何立宁

(石家庄市畜产品质量监测中心,石家庄 050041)

[收稿日期] 2019-06-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 09-0057-08 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 针对水产品硝基呋喃类药物代谢物我国农业农村部制定了 783-1-2006 号公告,使用液相色谱串联质谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物。该方法是将样品肌肉组织残留的硝基呋喃类代谢物在酸性条件下水解衍生化,经液液萃取后,内标法定量。本方法前处理简单,液液萃取避免了固相萃取的繁琐,减少了目标化合物的损失,内标法校正使得结果较为准确。但是,仍存在衍生化过程酸度不够导致衍生化不够彻底,提取过程磷酸氢二钾浓度不够导致提取不彻底,甲醇溶液定容后,涡旋振荡溶解出现乳化现象等问题。结合实际情况对国家标准方法进行改进和优化,进一步提升方法的准确度、精密度、灵敏度。

[关键词] 硝基呋喃类代谢物;国家标准方法;改进

Improvement of National Standard Method for Determination of Residual Nitrofurans Metabolites in Aquatic Products

SONG Rui, LI Yun, ZHAO Yi-liang, TIAN Mei, WANG Zhi-heng, HE Li-ning

(Shijiazhuang Animal Product Quality Monitoring Center, Shijiazhuang 050041, China)

Abstract: The ministry of agriculture of China has formulated bulletin 783-1-2006 to detect the nitrofurans metabolites of aquatic products by liquid chromatography series mass spectrometry. The method is to hydrolyze the nitrofurans metabolites remaining in the muscle tissue of the sample under acidic conditions. After liquid extraction, the internal standard method quantifies it. The pretreatment is simple, liquid extraction avoids the complexity of solid phase extraction, reduces the loss of target compounds, and the internal calibration method makes the results more accurate. However, there are still problems such as insufficient acidity in the derivative process leading to incomplete derivation, insufficient concentration of potassium dihydrogen phosphate in the extraction process leading to incomplete extraction, and finally, after the methanol solution is fixed, emulsifying phenomenon occurs in vortex oscillation dissolution. The national standard method is improved and optimized

基金项目: 有毒有害物质残留高通量荧光免疫检测技术研究及质量追溯体系的建立(18272910D)

作者简介: 宋 瑞,高级兽医师,从事畜禽水产品检验检测研究。E-mail: Songrui_911@126.com

according to the actual situation. The accuracy, precision and sensitivity of the method were further improved.

Key words: nitrofurantoin metabolites; national standard methods; improvement

硝基呋喃类药物对大多数革兰氏阳性菌和阴性菌、真菌、原虫等病原体有很好杀灭作用,是一种广谱抗生素。硝基呋喃类药物常用的是以下 4 种:呋喃它酮、呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因。此 4 种药物使用后在生物体内代谢迅速,其代谢产物分别为 AMOZ、AOZ、SEM、AHD。因价格低且疗效好,硝基呋喃类药物广泛应用于水产养殖业。但是,硝基呋喃类药物及其代谢物对人体有致癌、致畸胎副作用。我国农业农村部已发布公告在饲养过程中禁止使用硝基呋喃类药物^[1],且在动物性食品中不得检出硝基呋喃类药物代谢物。农业部 783-1-2006 号公告^[2]实现了水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的检测工作从无方法、无标准到有国家检测方法的革新,并且能够指导基层工作者进行这项检测工作。其原理是将样品肌肉组织残留的硝基呋喃类代谢物在酸性条件下水解衍生化,经液液萃取后,氮气吹干、甲醇溶液溶解,内标法定量。由于其中部分检测过程不完善,会产生水解衍生化不彻底,液液萃取离心后,分层明显,保留层较浑浊。氮气吹干后,由于有油脂存在,涡旋离心后会产生严重乳化现象,使得标准曲线线性不理想。通过改变衍生化环境、调节离心转速以及定容后涡旋转速,较好的解决了上述问题,获得较好的标准曲线。做 2.5 ng/g 阳性添加后,回收率可以达到 95% 以上。检测的灵敏度可达 0.1 ng/g。方法改进后提升了准确度、精密性、灵敏度。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 AB SCIEX 5500 超高效液相色谱串联质谱仪; ZORBAX SB C18 (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) 色谱柱; 甲醇为色谱纯; 盐酸为优级纯; 磷酸氢二钾为分析纯; 2-硝基苯甲醛(购自德国 CNW 公司); 标准品 AMOZ(WITEGA 公司, 纯度 99.9%, 批号 C010MGNF003)、AOZ(WITEGA 公司, 纯度 99.1%, 批号 C010MGNF005)、SEM(Dr.

公司, 纯度 99.8%, 批号 G151417)、AHD(Dr. 公司, 纯度 99.3%, 批号 G138075); 同位素内标标准品 AHD-¹³C₃(WITEGA 公司, 纯度 99.1%, 批号 957509-21-8)、AOZ-D₄(WITEGA 公司, 纯度 99.2%, 批号 1188331-23-8)、AMOZ-D₅(WITEGA 公司, 纯度 99.6%, 批号 1017793-94-0)、SCA-HCl-¹³C,¹⁵N₂(WITEGA 公司, 纯度 99.8%, 批号 1173020-16-0)。

1.2 试剂配制 5 mmol 乙酸铵溶液 0.385 g 醋酸铵定溶于 1000 mL 水中, 冰乙酸调节 pH 值至 4.5; 5% 甲醇溶液: 甲醇 + 水 = 5 + 95 (V/V); 0.2 mol/L 盐酸溶液: 浓盐酸 1.6 mL, 用水稀释至 100 mL; 0.05 mol/L 2-硝基苯甲醛溶液: 称取 0.0378 g 2-硝基苯甲醛, 溶于 5 mL 二甲亚砜中, 现用现配; 1 mol/L 磷酸氢二钾溶液: 三水磷酸氢二钾 114.11 g, 溶于 500 mL 水中^[3]。

1.3 仪器工作条件

1.3.1 色谱条件 流动相: A 相(5 mmol 乙酸铵溶液, pH = 4.5) + B 相(0.1% 甲酸乙腈), 流速: 0.30 mL/min^[4], 梯度如表 1 所示。

表 1 流动相梯度

Tab 1 Flow phase gradient

Time/min	Flow	A	B
0.00	0.3	60	40
6.00	0.3	40	60
9.00	0.3	40	60

1.3.2 质谱条件 离子源: ESI 源, 正离子模式; IS 电压: 5500 V; 气帘气 CUR: 20 psi; 雾化气 GSI: 50 psi; 辅助气 GS2: 60 psi; 源温度 TEM: 550 °C; 碰撞气 CAD: 9 psi, 4 种硝基呋喃代谢物及其内标的定性、定量离子对、同位素化合物碎裂电压、碰撞能量如表 2、表 3 所示。

表 2 4 种硝基呋喃代谢物的定性、定量离子对、同位素化合物碎裂电压、碰撞能量

Tab 2 Qualitative and quantitative ion pairs, fracture voltage and collision energy of 4 nitrofuran metabolites

目标化合物	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	碎裂电压 DP/V	碰撞能量 CE/eV
AOZ	236.1 > 133.97	236.1 > 133.97	80	17
	236.1 > 103.9		80	31
AHD	249.2 > 134.1	249.2 > 134.1	80	17
	249.2 > 104.1		80	27
SEM	209.2 > 166.2	209.2 > 166.2	80	14
	209.2 > 192.1		80	16
AMOZ	335.2 > 291.1	335.2 > 291.1	80	17
	335.2 > 262.2		90	23

表 3 4 种硝基呋喃代谢物内标的定性、定量离子对、同位素化合物碎裂电压、碰撞能量

Tab 3 Qualitative and quantitative ion pairs, fracture voltage and collision energy of 4 nitrofuran metabolites

目标化合物	离子对 m/z	碎裂电压 DP/V	碰撞能量 CE/eV
AOZ - D ₄	240.0 > 134.0	80	17
AHD - ¹³ C ₃	252.0 > 134.0	80	17
EM - ¹³ C ₃ - ¹⁵ N ₂	212.0 > 168.0	80	14
AMOZ - D ₅	340.0 > 296.0	80	17

1.4 实验方法

1.4.1 标准曲线的配制 分别准确移取 10 ng/mL 混合标准工作溶液 0.025、0.05、0.10 mL 和 100 ng/mL 混合标准工作溶液 0.025、0.05、0.10 mL 于 50 mL 离心管中,除不加样品外,按提取与净化步骤进行操作^[5]。

1.4.2 样品制备、提取与净化 试样制备,检测样品为市场监督抽检鲤鱼一尾(被抽样单位佳农贸市场,产地行唐县),去鳞、去皮,切下脊背肉。磨碎^[6],匀浆,作为检测试样,同时也当空白试样,多称取 2 份样品,加入适宜的标准溶液,作为阳性添加试样^[7]。

称取试样 2.0 g,置于 50 mL 的离心管中,加入 50 μL(100 ng/mL 的混合内标工作液)。涡旋混合^[8]50 s,加入 5 mL 盐酸溶液和 0.15 mL 2-硝基苯甲醛溶液,涡旋 50 s,37 度恒温振荡 16 h。取出离心管后放置至室温^[9],加入 4 mL 浓度为 1 mol/L 的磷酸氢二钾溶液,调节 pH = 7.0 ~ 7.5,(此处 pH 都在范围内,不用调),加入 4 mL 乙酸乙酯,涡旋振荡 50 s,10000 r/min 离心 5 min。取上清液转移至另一 15 mL 离心管中^[10](分 4 层,取最上层);再加入 4 mL 乙酸乙酯,涡旋振荡 50 s,10000 r/min 离心 5 min,合并有机相,40 °C 下氮气吹干。准确加入 1 mL 甲醇溶液^[11],使用 IKA 涡旋混合仪,涡旋速度低于 500 r/min,15 s,取上清液过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定^[12]。

2 结果与分析

2.1 衍生化过程 783 号公告酸性环境用 0.6 mL 浓盐酸加入 100 mL 水中,再加入 2-硝基苯甲醛。实验发现衍生化效果并不好,回收率较低,标准曲线线性不好。主要原因是浓盐酸量较少。浓盐酸使用量增大至 1.6 mL^[13],回收率有明显的提升。由图 1 可见提升浓盐酸浓度后,标准曲线线性得到明显改善。衍生化后的 pH 值经比对,783 号公告 pH = 1.18 ± 0.02,方法改进后 pH = 0.95 ± 0.02。

783 号公告:0.6 mL 浓盐酸加入 100 mL 水中,衍生化回收率的重复性不好,造成标准曲线的线性不太好,结果如图 2 ~ 图 4 所示。

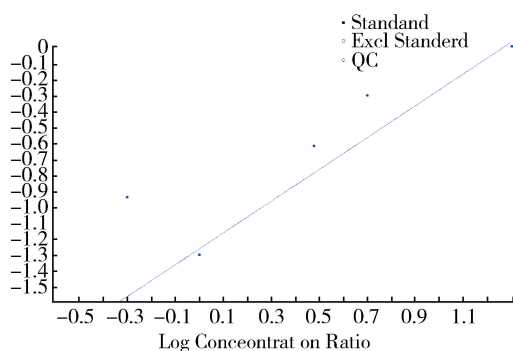


图 1 AOZ 定量离子标准曲线

$y = 0.05530x (r = 0.96985)$

Fig 1 AOZ Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.05530x (r = 0.96985)$

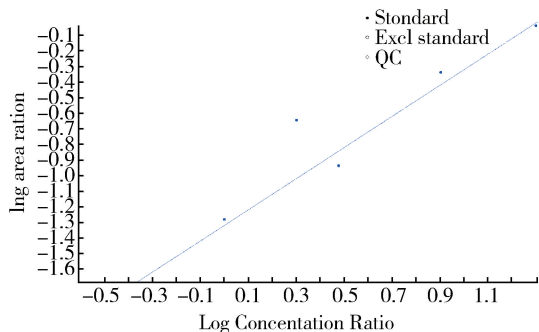


图 2 AHD 定量离子标准曲线

$y = 0.04788 x (r = 0.98370)$

Fig 2 AHD Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.04788 x (r = 0.98370)$

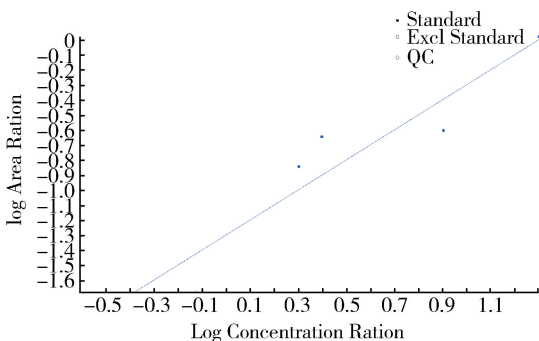


图 3 SEM 定量离子标准曲线

$y = 0.05071 x (r = 0.97434)$

Fig 3 SEM Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.05071 x (r = 0.97434)$

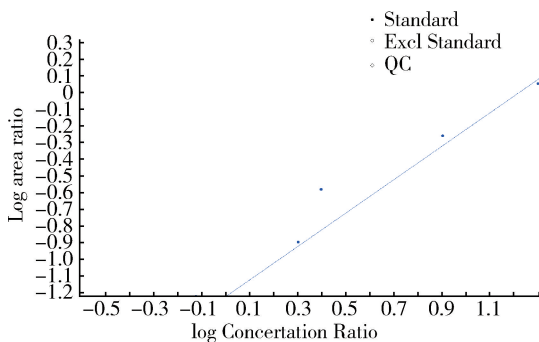


图 4 AMOZ 定量离子标准曲线

$y = 0.05995 x (r = 0.16883)$

Fig 4 AMOZ Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.05995 x (r = 0.16883)$

衍生化回收率的重复性明显改善,得到的标准曲线线性很好,结果如图 5 ~ 图 8 所示。

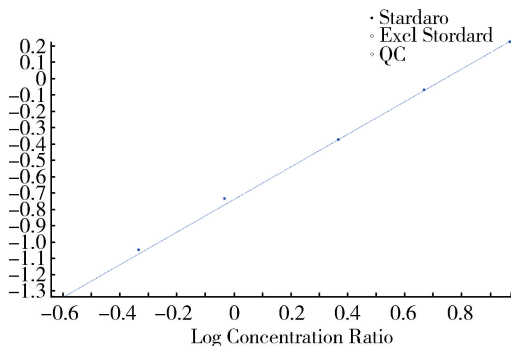


图 5 AOZ 定量离子标准曲线

$y = 0.18210 x (r = 0.99997)$

Fig 5 AOZ Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.18210 x (r = 0.99997)$

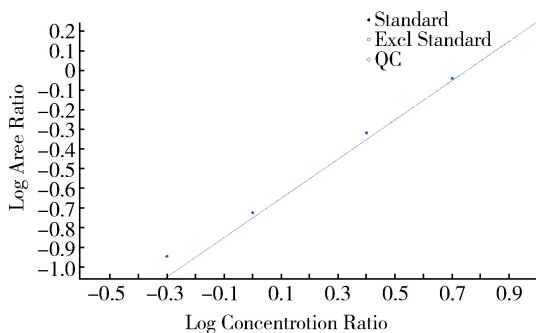


图 6 AHD 定量离子标准曲线

$y = 0.17715 x (r = 0.99977)$

Fig 6 AHD Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.17715 x (r = 0.99977)$

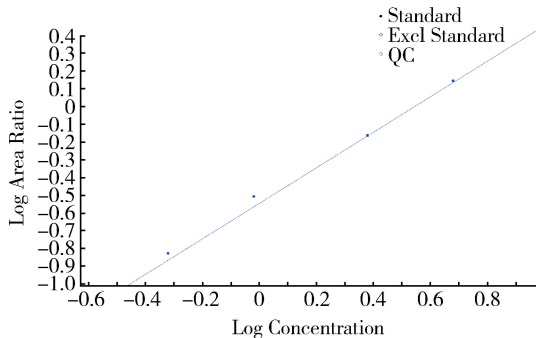


图 7 SEM 定量离子标准曲线

$y = 0.28517 x (r = 0.99989)$

Fig 7 SEM Quantitative Ion Standard Curve

$y = 0.28517 x (r = 0.99989)$

方法改进后,1.6 mL 浓盐酸加入 100 mL 水中

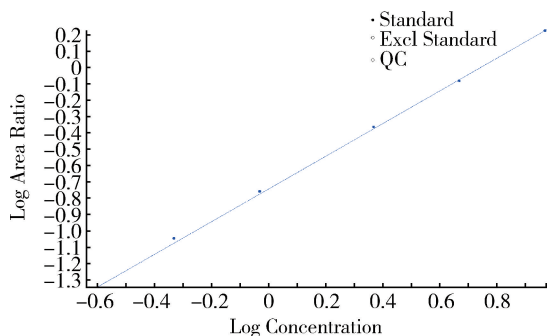


图 8 AMOZ 定量离子标准曲线

$$y = 0.18027x \quad (r = 0.99995)$$

Fig 8 AMOZ Quantitative Ion Standard Curve

$$y = 0.18027x \quad (r = 0.99995)$$

2.2 提取过程 磷酸氢二钾溶液,783 号公告为 87.1g 磷酸氢二钾溶于 500 mL 水中。通常所用的磷酸氢二钾为三水化合物,折完水应为 114.11 g^[14]。

2.3 离心过程 783 号公告显示离心转速为 4000 r/min,实验发现此转速离心后,上层液较浑浊,将转速提升至 10000 r/min 时,可以很好的分层,上清液较澄清(图 9、图 10)。



图 9 离心转速为 4000 r/min 上层液体

Fig 9 Centrifugal speed 4000 r/min upper liquid



图 10 离心转速为 10000 r/min 上层液体

Fig 10 Centrifugal speed 4000 r/min upper liquid

2.4 定容过程 氮气吹干乙酸乙酯后,783 号公告使用甲醇溶液溶解,涡旋振荡残留物,实验发现由于油脂的存在,涡旋振荡残留物会发生严重的乳化现象。氮气吹干后加入 1 mL 正己烷除酯^[15],再加入甲醇溶液,涡旋 10000 r/min 离心 10 min,离心后发现正己烷与甲醇溶液仍然发生乳化现象。氮气吹干乙酸乙酯后^[16],使用甲醇溶液溶解将涡旋速度限定在 500 r/min 以下,15 s,短时间缓慢涡动,不仅能很好的溶解残留物,同时避免油脂乳化。经检测并不影响回收率。

2.5 检测方法改进后回收率情况 由于 783 号公告所得标准曲线上的点分布较乱,改进后的方法标准曲线线性较好,可作为回收率计算的基础。通过如上衍生化过程、提取过程、离心过程、定容过程的改进,平行样品的阳性添加浓度为 2.5 ng/g,称取 2 g,上仪器浓度应为 5 ng/mL。4 种硝基咪唑代谢物的回收率在 95% 以上,标准偏差小于 10%,回收率有明显的提升(图 11 ~ 图 15)。

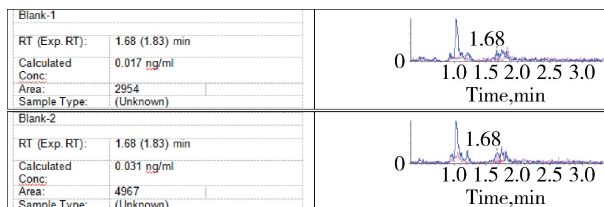


图 11 空白样品图谱

Fig 11 Map of blank samples

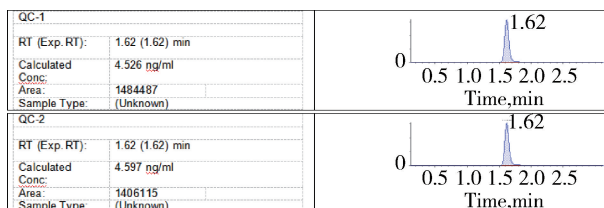


图 12 AOZ 阳性添加样品图谱

Fig 12 Map of AOZ positive samples added

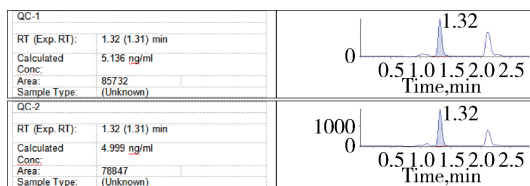


图 13 AHD 阳性添加样品图谱

Fig 13 Map of AHD positive samples added

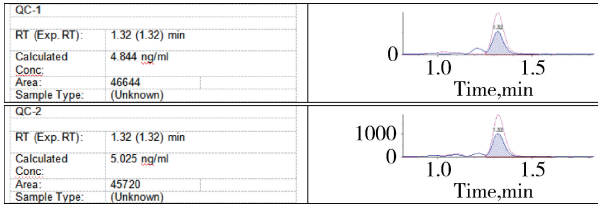


图 14 SEM 阳性添加样品图谱

Fig 14 Map of SEM positive samples added

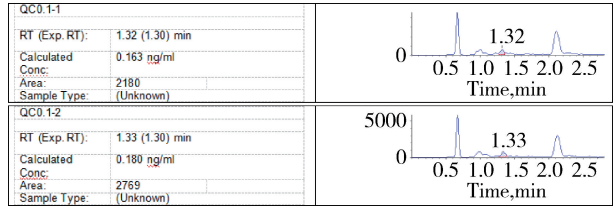


图 18 0.1 ng/g AHD 添加样品图谱

Fig 18 0.1 ng/g AHD Add sample map

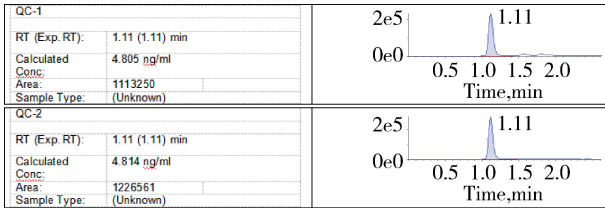


图 15 AMOZ 阳性添加样品图谱

Fig 15 Map of AMOZ positive samples added

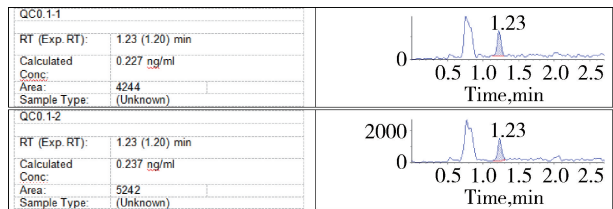


图 19 0.1 ng/g SEM 添加样品图谱

Fig 19 0.1 ng/g SEM Add sample map

2.6 检测的灵敏度 国家标准 783 - 1 - 2006 号公告中检测限为 0.25 ng/g, 使用改进后的方法, 最低检出限可以达到 0.1 ng/g。在空白的鲤鱼样品中加入适量标准溶液使之含有 0.1 ng/g 的 4 种硝基咪唑代谢物, 称取 2 g, 上仪器浓度应为 0.2 ng/mL。按照改进后的前处理方法进行前处理, 可以得到信噪比大于 3, 回收率在 80% ~ 120% 之间, 标准偏差小于 10% 的检测结果(图 16 ~ 图 20)。

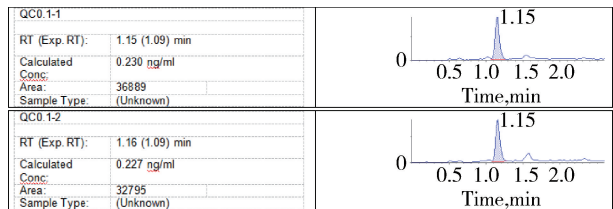


图 20 0.1 ng/g AMOZ 添加样品图谱

Fig 20 0.1 ng/g AMOZ Add sample map

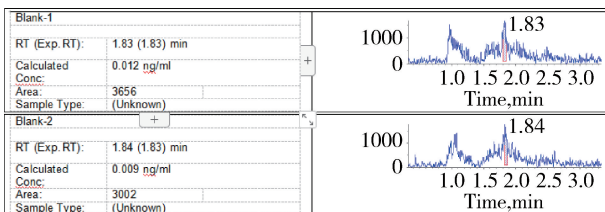


图 16 空白样品图谱

Fig 16 Map of blank samples

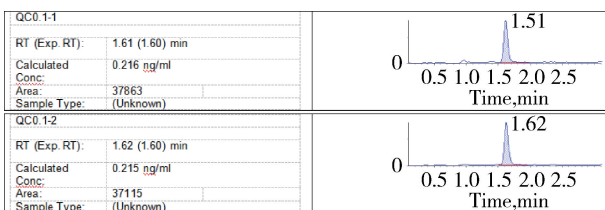


图 17 0.1 ng/g AOZ 添加样品图谱

Fig 17 0.1 ng/g AOZ Add sample map

3 讨论与结论

农业部 783 - 1 - 2006 号公告, 实现了水产品中硝基咪唑类代谢物残留量的检测工作从无方法、无标准到有国家检测方法的革新, 并且能够指导基层工作者进行这项检测工作。虽然本方法有很好的实用性, 但在工作中也发现本方法存在回收率不高、重复性不好、基质效应较大等缺点。因此, 在实际工作中通过不断对本方法进行研究与摸索, 进一步对本方法进行了优化和改进, 通过对以上论述整理与总结, 本研究总共从以下几个方面对农业部 783 - 1 - 2006 号公告进行了优化: (1) 进一步优化了水解衍生化酸性条件, 加大了酸的浓度, 提升了衍生化效率, 提高了回收率, 标准曲线线性得到明显改善; (2) 根据提取过程实际市售磷酸氢二钾为三水化合物的情况, 改进磷酸氢二钾的使用量, 使

得磷酸氢二钾的用量更加准确; (3) 离心过程提升离心速度, 使得上层液体更加澄清, 分离效果更好; (4) 本方法定容过程中限制甲醇溶液涡旋溶解速度, 减轻乳化现象, 使得前处理过程的净化效果更好, 降低了仪器的基质效应。有的方法是进一步用正己烷除脂, 然后高速离心, 但是这样做也会造成乳化现象, 导致分层不明显, 进而导致回收率降低, 因此, 两相比较, 本方法的净化效果和回收率更好; (5) 做 2.5 ng/g 阳性添加后, 回收率可以达到 95% 以上, 提高了方法的回收率; (6) 检测的灵敏度可达 0.1 ng/g。将改进方法用于实际样品和标准样品的测定, 提升了方法的准确度、精密度和灵敏度。综上所述, 通过对国家标准 783-1-2006 号公告的进一步优化, 大大提高了方法的实际应用效果, 对于更好的做好硝基呋喃类药物及其代谢物的残留检测工作具有很好的现实意义。

参考文献:

[1] 杨惠宇, 张惠峰. 水产品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测技术的研究进展[J]. 河北渔业, 2017, 282(6): 49-53.
Yang H Y, Zhang H F. Research progress on residual detection techniques for nitrofurans and their metabolites in aquatic products[J]. Hebei Fisheries, 2017, 282(6): 49-53.

[2] 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 Notice No. 783-1-2006. Determination of residual nitrofurans metabolites in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[S].

[3] 吴亚梅, 符云, 李绪鹏. 水产品中硝基呋喃类代谢物检测方法对比研究[J]. 黑龙江水产, 2019, 3(1): 37-46.
Wu Y M, Fu Y, Li X P. Comparative Study on Detection Methods of Nitrofurans Metabolites in Aquatic Products[J]. Heilongjiang Aquatic Products, 2019, 3(1): 37-46.

[4] 吴明媛, 韦信贤, 童桂香, 等. 水产品组织中硝基呋喃类代谢物残留检测方法优化研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29(7): 1750-1754.
Wu M Y, Wei X X, Tong G X, et al. Study on the optimization of residual detection methods for nitrofurans metabolites in aquatic tissues[J]. Southwest Journal of Agriculture, 2016, 29(7): 1750-1754.

[5] 王娜, 潘治利, 凡静云, 等. 高效液相-串联质谱法测定预出口猪肉中硝基呋喃代谢物[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 533-537.
Wang N, Pan Z L, Fan J Y, et al. Determination of nitrofurans metabolites in pre-export pork by HPLC[J]. Food Science, 2008, 29(9): 533-537.

[6] 张秀妍, 马琳, 王慧龙. 海参和海参苗种中硝基呋喃类代谢物残留的液质联用检测法[J]. 口岸卫生控制, 2012, 12(6): 24-28.
Zhang X Y, Ma R L, Wang H L. Liquid test method for residual nitrofurans metabolites in sea cucumber and Haicanmiao species[J]. Port Health Control, 2012, 12(6): 24-28.

[7] 徐维海, 林黎明, 朱校斌, 等. HPLC/MS 法对呋喃唑酮及其代谢物 AOZ 在罗非鱼体内残留研究[J]. 上海水产大学学报, 2015, 14(1): 35-40.
Xu W H, Lin L M, Zhu X B, et al. Study on the residues of furazolidone and its metabolite AOZ in tilapia by HPLC/MS[J]. Journal of Shanghai Aquatic University, 2015, 14(1): 35-40.

[8] Gehuaili, Mengjunli, Songsunyang, et al. Determination of furans residues in aquatic products by enzymatic immunoassay Zoldone metabolite[J]. Hebei Fisheries, 2014, 5(8): 25-32.

[9] 龙顺荣, 李炜正, 王力清. 超高效液相-串联质谱法测定动物组织中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 食品与机械, 2017, 23(6): 90-92.
Long S R, Li W Z, Wang L Q. Ultra efficient liquid phase-series mass spectrometry determination of nitrofurans metabolites residues in animal tissues[J]. Food and Machinery, 2017, 23(6): 90-92.

[10] Xietibo, Niuzhicun, Yizhongren, et al. Chemiluminescence for the determination of furazolidone metabolites residues in aquatic products[J]. Agricultural products Quality and Safety, 2016, 12(3): 51-55.

[11] 景立新, 孙武平, 杨钦德, 等. 分光光度法快速测定海虾中呋喃唑酮残留量[J]. 光谱实验室, 2006, 23(3): 547-550.
Jing L X, Sun W P, Yang Q D, et al. Spectrophotometry rapid determination of furazolidone residues in sea shrimp[J]. Spectral Laboratory, 2006, 23(3): 547-550.

[12] Zhang Lei. Rapid immunofluorescence detection of furazolidone residues in aquatic products Research[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2014.

[13] 蒋宏伟. 酶联免疫技术在动物产品中硝基呋喃类药物残留检测的应用[J]. 陕西农业科学, 2006, (5): 53-55.
Jiang H W. Application of Enzyme Joint Immunology Technology in the Detection of Nitrofurans in Animal Products[J]. Shaanxi

- Agricultural Science, 2006, (5): 53 - 55.
- [14] Yuwansong. Detection of feed and feed based on metal Sol surface Zengqianglaman Study on furazolidone and malachite green in aquatic products [D] . Shanghai: Shanghai Haiyang University, 2015.
- [15] 黄宣运, 李冰, 蔡友琼, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 4 种硝基呋喃原药残留[J]. 分析实验室, 2013, 2(32): 44 - 49.
- Huang X Y, Li B, Cai Y Q, *et al.* High Performance Liquid Chromatography for the Simultaneous Determination of 4 Nitrofurran Substance in Aquatic Products [J]. Analytical Laboratory, 2013, 2(32): 44 - 49.
- [16] 祝伟霞, 袁萍, 杨冀州, 等. 固相支撑液液萃取 - 平行蒸发前处理技术测定动物源性食品中 4 种硝基呋喃类代谢物[J]. 食品科技, 2011, 36(2): 300 - 303.
- Zhu W X, Yuan P, Yang J Z, *et al.* Determination of 4 nitrofurran metabolites in animal food by solid support liquid extraction - parallel evaporation pretreatment [J]. Food Technology, 2011, 36(2): 300 - 303.

(编辑:侯向辉)