

桂文龙, 苏治国, 徐婷婷. HPLC-MS/MS 检测猪肉中 4 种硝基呋喃类代谢物残留[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 212-215.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.054

HPLC-MS/MS 检测猪肉中 4 种硝基呋喃类代谢物残留

桂文龙, 苏治国, 徐婷婷

(江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300)

摘要:采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)对猪肉中硝基呋喃类药物的代谢物进行检测,从均质处理后的猪肉中提取出与蛋白质相结合的硝基呋喃类药物的代谢物,将其在弱酸性条件(pH 值 < 7)下水解,同时加入 2-硝基苯甲醛作为衍生试剂,避光恒温振荡反应 16 h,然后调整 pH 值为中性,分离出代谢物的衍生物,浓缩复溶后用液相色谱-三级四级杆质谱联用仪检测。结果显示,4 种硝基呋喃类药物代谢物在 0.5~10.0 ng/mL 范围内回归标准曲线方程的 $r^2 > 0.9999$,回收率为 93.2%~106.1%,相对标准偏差为 0.83%~13.9%。4 种硝基呋喃类代谢物残留检测得到其衍生物的定性定量分析结果,使用 4 种代谢物的同位素内标,减少了样品前处理对检测结果的影响,使定量更加精确。此法前处理过程简单易做、试验重复性好,具有较高的灵敏度,检测更为准确且具有较低的检出限。

关键词:HPLC-MS/MS;猪肉;硝基呋喃类抗菌药;代谢物;药物残留

中图分类号:S859.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0212-03

硝基呋喃类药物主要用于抗细菌感染,也用于抗滴虫感染^[1]。硝基呋喃类化合物都具有一个 5-硝基呋喃环的特征结构,主要包含有呋喃它酮(AMOX)、呋喃妥因(AHD)、呋喃西林(SEM)和呋喃唑酮(AOZ)等^[2]。由于硝基呋喃类药物的广谱抗菌性,除了能抑制、灭杀大多数的革兰阴性菌以外,还对大部分革兰阳性菌也有杀伤作用^[3-4]。硝基呋喃类抗菌药药效明显、很难产生耐药性,并且生产成本低廉,故而被大范围用于畜牧业,在禁用前作为饲料添加剂治疗猪、牛、禽类的胃肠道感染^[5]。多年来研究表明,硝基呋喃类药物具有基因毒性及致癌性,且其在动物源性食品中的有害残留也对人类健康存在一定风险。

应用于硝基呋喃类药物的色谱联用技术主要有高效液相色谱-质谱法和高效液相-串联质谱法^[6]。其中,高效液相-串联质谱法(HPLC-MS/MS)是我国国家标准规定的检测方法,满足了 0.5 μg/kg 的检测限^[7]。HPLC-MS/MS 法的原理是联用高效液相色谱与质谱,对物质结构定性并在定量限以上可以进行定量分析。利用高效液相色谱将待测样品中化合物分离并确定各化合物的浓度或含量进行定量,再将其汽化后导入多级质谱仪中进行结构分析,从而确定被高效液相色谱仪分离的各化合物的详细分子结构信息从而达到定性的目的。

1 仪器与试剂材料

1.1 主要仪器设

液相色谱-三级四级杆质谱联用仪(WatersAcquityUPLC-ThermoFisherTSQ);组织匀浆机(JZ-II型);电子分析天平(AB204-N型);多管涡旋振荡器(Targin Technologies VX-2

型);台式高速冷冻离心机(3K-30型);水浴恒温振荡器(MAXQ4000型);氮吹仪(TTL-DC11型);酸度计(SevevExcellence系列);有机相针式滤器(SCAA-104);具塞离心管(50 mL、10 mL规格);移液枪(5 mL、10 mL规格);高纯水发生器(MILLI-QADVANTAGE A10)。

1.2 主要试剂及配制

主要试剂有:对照品 AOZ、AMOX、AHD、SEM(纯度均 ≥ 99.0%);内标对照品 AOZ-D₄、AMOX-D₅、AHD-¹³C₃、SEM-HCl-[1,2-¹⁵N₂¹³C](纯度均 ≥ 99.0%);2-硝基苯甲醛(分析纯);甲醇、乙酸乙酯、甲酸、乙醚、乙腈、磷酸钾(均为色谱纯);浓盐酸。主要试验用的试剂配制如下。

0.2 mol/L 盐酸溶液、1.0 mol/L 磷酸钾溶液和 0.1% 甲酸溶液按常规方法配制。

标准储备液:分别精确称取 AOZ、AMOX、AHD 和 SEM·HCl 的标准对照品各 0.01 g,置于 4 个 100 mL 棕色容量瓶中,用纯甲醇溶解并定容,配制成浓度为 100 μg/mL 的标准储备液,于 -20 ℃ 以下保存。

内标储备液:用分析天平精确称取 AOZ-D₄、AMOX-D₅、AHD-¹³C₃ 和 SEM-HCl-[1,2-¹⁵N₂¹³C] 对照品各 0.01 g,置于 100 mL 棕色容量瓶中,分别用甲醇溶解定容至刻度,稀释成浓度为 100 μg/mL 的内标储备液,于 -20 ℃ 以下保存。

混合标准工作液(100 ng/mL):精确量取 LAOZ、AMOX、AHD 和 SEM·HCl 标准储备液各 100 μL,混合于 10 mL 棕色容量瓶中,添加纯甲醇直至 10 mL 刻度线,制得 10 μg/mL 的混合标准中间溶液,再用 80% 甲醇稀释成 100 ng/mL 的混合标准工作液,于 4 ℃ 以下保存。

混合内标标准工作液(100 ng/mL):精确量取 AOZ-D₄、AMOX-D₅、AHD-¹³C₃ 和 SEM-HCl-[1,2-¹⁵N₂¹³C] 内标储备液 100 μL,置于 10 mL 棕色容量瓶中混匀,用甲醇定容至刻度,制得 100 μg/mL 的混合内标中间工作液,再逐步稀释为 100 ng/mL 的混合内标标准工作液于 4 ℃ 下保存。

收稿日期:2017-06-23

基金项目:江苏农牧科技职业学院科研课题(编号:NSF201602)。

作者简介:桂文龙(1978—),男,湖南江永人,硕士,讲师,主要从事畜牧兽医研究。E-mail:281303332@qq.com。

2 方法与步骤

2.1 待测试样处理

(1)洗涤。称取均质后的供试试料 2.00 g,于 50 mL 离心管中,每个试样称取 1 个平行样。加 10 mL 50% 甲醇溶液,涡旋,中速振荡 10 min,然后 6 000 r/min 离心 5 min,弃上清液;向离心管中加入 10 mL 50% 甲醇溶液,重复洗涤 1 次;用乙醚替代上述 50% 甲醇洗涤 2 次。(2)衍生。洗涤后试料加 100 ng/mL 的混合内标标准工作液 20 μ L;用刻度吸管加入 0.2 mol/L 盐酸 5 mL 和 0.1 mol/L 2-硝基苯甲醛的溶液 100 μ L,涡旋振荡混匀;于恒温水浴振荡器中设置 37 $^{\circ}$ C 遮光反应约 16 h。(3)提取。将衍生后的试料放置于实验室冷却至室温(避光条件下进行),调节其 pH 值至中性(7.4 左右),所用的 pH 值调节剂是 1 mol/L 磷酸三钾溶液,所需量大约为 0.85 mL;加乙酸乙酯 5 mL,进行液液萃取,先涡旋,中速振荡 5 min 后,高速冷冻离心机 3 000 r/min 离心 10 min,上清液分层,吸取上层清液;用乙酸乙酯 5 mL 重复提取 1 次,合并上层清液;合并的乙酸乙酯层于 40 $^{\circ}$ C 水浴下氮气吹干;用 0.1% 甲酸水溶液 1.0 mL 溶解残余物(若发现试样混浊,可将试样转移到 1.5 mL 离心管,离心后吸取上清液),经 0.22 μ m 的有机相针式滤器过滤后备用。

2.2 质量控制样品的制备

空白样品:称取 2.00 g 空白试样,在衍生步骤中不添加混合内标标准工作液,其余步骤与待测试样相同。

添加样品:取空白试样 2.00 g,在上述待测试样衍生步骤中再添加 100 ng/mL 的混合标准工作液 20 μ L,其余操作相同,从而制得浓度为 1.0 ng/g 的阳性添加试料。

2.3 标准曲线

精确量取上述试验试剂配制好的混合标准工作液(100 ng/mL)0.1、0.2、0.4、0.8、1.0 mL 分别置于 5 个 10 mL 容量瓶中,用 5% 乙腈(含 0.1% 甲酸)水溶液定容至刻度,混匀即得各浓度为 1、2、4、8、10 ng/mL 的标准工作液,按与待测试样相同的色谱和质谱条件进样并进行检测,将测得的数据制作图表得到标准曲线,并换算出相关系数公式,求出该检测方法的定量的线性范围。

2.4 准确度与精密度

分别精确量取 100 ng/mL 的标准贮备液 0.1、0.5、1.0 mL 于 10 mL 容量瓶内,加 0.1% 甲酸水溶液直至容量瓶刻度线,从而制得序列浓度为 1.0、5.0、10.0 ng/mL 的溶液,每个浓度的溶液制备 6 个平行样,分别进样检测用于计算仪器回收率并得到相对标准偏差。

3 仪器参数与测定

3.1 色谱条件

色谱柱:Waters UPLCTM BEH C₁₈ 柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m);进样量:2 μ L;柱温:35 $^{\circ}$ C;流动相:A:乙腈;B:0.1% (体积分数) 甲酸溶液,梯度洗脱(梯度洗脱程序见表 1)。

3.2 质谱条件

离子源参考参数见表 2。质量分析器参考参数见表 3。定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 4。

表 1 液相色谱流动相浓度梯度

时间(min)	A(%)	B(%)	流速(mL/min)	曲线类型
0.00	10	90	0.3	1
3.00	90	10	0.3	6
5.00	10	90	0.3	1

注:曲线类型 1 为即时变化,6 为线性变化。

表 2 离子源参考参数

离子源参数	参考数值
离子源类型	电喷雾离子源 ESI+
毛细管电压(kV)	3.5
萃取电压(V)	5.0
RF 透镜电压(V)	0.3
源温($^{\circ}$ C)	110
雾化温度($^{\circ}$ C)	400
锥孔气流速(L/h)	50
雾化气流速(L/h)	550

表 3 质量分析器参考参数

质量分析器参数	参考数值
低质量数分辨率 LM ₁	15.0
高质量数分辨率 HM ₁	15.0
离子能量 1	1.0
入口电压(V)	2
出口电压(V)	2
低质量数分辨率 LM ₂	15.0
高质量数分辨率 HM ₂	15.0
离子能量 2	1.0
氦气示数	3.5 e-3 mbar

表 4 硝基咪唑类代谢物衍生物和内标的定性、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

目标化合物	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
AOZ	236.0 > 134.0	236.00 > 134.00	28	12
	236.0 > 104.0			22
AMOZ	335.0 > 291.0	335.00 > 291.00	25	10
	335.0 > 262.0			16
AHD	249.0 > 178.0	249.00 > 134.00	28	20
	249.0 > 134.0			10
SEM	209.03 > 192.1	209.03 > 166.10	23	8
	209.03 > 166.1			10
AOZ-D ₄	240.0 > 134.0	240.00 > 134.00	28	12
AMOZ-D ₅	340.1 > 296.2	340.10 > 296.20	28	12
AHD- ¹³ C ₃	252.0 > 134.0	252.00 > 134.00	28	10
SEM-[1, 2- ¹⁵ N ₂ ¹³ C]	212.00 > 168.0	212.10 > 168.00	23	10

4 结果与分析

4.1 标准曲线

根据配制的标准溶液进样检测,将标准溶液浓度设为横坐标,将检测得到的 Area/IS Area 比值设为纵坐标,绘制标准曲线,得到线性方程(图 1 至图 4)。

由图 1 至图 4 可知,回归标准曲线方程的 *r*² 范围为 0.999 478~0.999 679, *r*² > 0.999 9。

4.2 回收率与精密度

方法回收率及相对标准偏差数据见表 5。

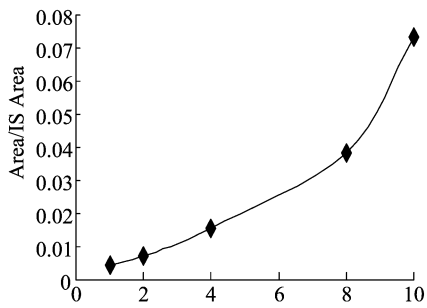


图1 AHD 曲线

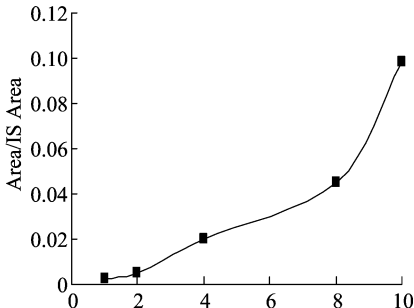


图2 AOZ 曲线

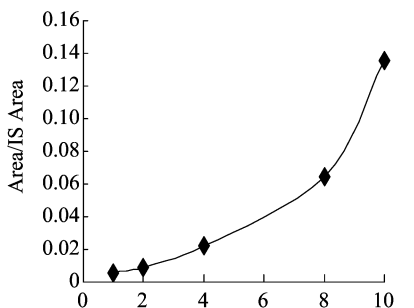


图3 AMOZ 曲线

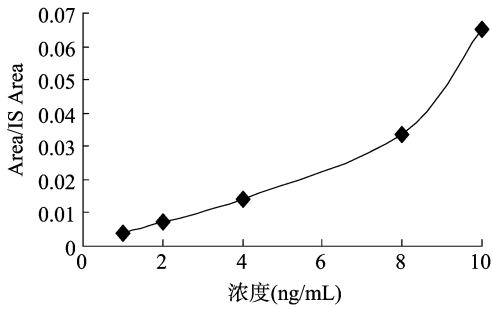


图4 SEM 曲线

由表 5 可知,各组的回收率在 93.2% ~ 106.1% 之间,即绝对误差范围在 1.12% ~ 6.80%。结果显示,相对标准偏差 (*RSD*) 处在 0.83% ~ 13.9% 范围内。

表 5 方法回收率及相对标准偏差数据 (*n* = 6)

待测组分	阳性添加量 (ng/mL)	平均实测残留量 (ng/mL)	平均回收率 (%)	<i>RSD</i> (%)
AOZ	0.50	0.51	102.30	7.90
	5.00	4.91	98.10	3.68
	25.00	24.72	98.80	0.96
AMOZ	0.50	0.53	106.10	13.90
	5.00	4.78	95.60	4.29
	25.00	23.83	95.20	1.48
AHD	0.50	0.53	106.10	7.90
	5.00	4.93	98.60	4.77
	25.00	24.13	96.50	0.83
SEM	0.50	0.52	103.60	11.70
	5.00	4.66	93.20	4.11
	25.00	24.68	98.70	2.10

4.3 检测样品药物残留

根据样品前处理过程,选择样品进行检测,样品编号为 SX2017W0003,检测结果见表 6,该样品未检出硝基呋喃类药物的代谢物。

表 6 样品 SX2017W0003 检测结果

项目	添加量 (μg/kg)	残留量 (μg/kg)	回收率 (%)	SX2017W0003
AOZ	1.07	1.01	94.40	0.00
AMOZ	1.040	0.989	95.100	0.000
AHD	1.05	0.99	94.30	0.00
SEM	1.04	1.01	97.10	0.00

5 讨论

5.1 样品前处理过程

硝基呋喃类药物在动物体内代谢,代谢物与猪肉中的蛋白质键合在一起,所以若要检测硝基呋喃类代谢物的残留量则需要将该结合蛋白从样品中分离出来,并分离出结合蛋白中的 4 种代谢物,为进行下一步的仪器分析提供检测目标物。

前处理过程第 1 步洗涤的目的是除去样品中游离可溶性杂质及脂类物质,甲醇作为蛋白质沉淀剂与水同时存在可以沉淀蛋白质,甲醇在水中溶解度很大,能破坏蛋白质外表面的水化层,从而使蛋白质相互聚集而沉淀。弃去上清液中游离的杂质,再用乙醚洗涤,乙醚是非极性化合物,能与样品脂类化合物互溶,从而除去样品中的脂类物质,减少基质对后期仪器检测的影响。第 2 步衍生是先将硝基呋喃类药物的 4 种代谢物从其结合的蛋白质中提取出来,再进行衍生反应。代谢物质解离水解需要适当酸性的 pH 值条件,故而需要盐酸调节 pH 值至所需条件,同时为了之后的仪器分析,要对代谢物进行衍生。第 3 步提取是将衍生后的物质从样品中提取出来,使用液液萃取的方法进行提取净化,利用衍生物与样品中其他物质在乙酸乙酯中的溶解度不同,从而达到提取净化的目的。然后用氮吹仪氮吹,对提取液进行浓缩以减少基质效应。

硝基呋喃类药物见光易分解,故前处理过程中尽量避免光操作。

5.2 标准曲线与检出限、定量限

由上述 4 种代谢物标准曲线分析可得 4 种硝基呋喃类药物代谢物的标准曲线在 0.5 ~ 10.0 ng/mL 的范围内所得到的线性关系,回归标准曲线方程的 r^2 在 0.999 478 ~ 0.999 679 范围内, $r^2 > 0.999 9$,线性良好。即样品浓度在 0.5 ~ 10.0 ng/mL 的范围内,色谱峰面积与样品中某组分的浓度成正比,可以根据线性方程进行定量分析。本方法所用仪器达到检出限 0.25 μg/kg,定量限 0.5 μg/kg。

5.3 回收率与精密度

由表 5 可知,猪肉空白样品中硝基呋喃四中代谢物的 3 个不同添加水平,测定 6 次的回收率,准确度范围在 93.2% ~ 106.1% 之间,绝对误差范围在 1.12% ~ 6.80% 之间,说明仪器所导致的系统误差较小,处在检测的标准范围内,符合检测标准规定的误差大小。由表 5 可知,各代谢物回收率相对标准偏差范围为 0.83% ~ 13.90%,均 $< 20\%$,即精密度较高。上述检测数据的 *RSD* 均符合国家标准检测要求。

徐 慧,赵双枝,刘孝永,等. 响应面法优化鹿角灵芝产胞内多糖的液体发酵工艺[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):215-220.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.055

响应面法优化鹿角灵芝产胞内多糖的液体发酵工艺

徐 慧,赵双枝,刘孝永,张彦昊,陈蕾蕾

(山东省农业科学院农产品研究所/山东省农产品精深加工技术重点实验室/农业部新食品资源加工重点实验室,山东济南 250100)

摘要:为了优化鹿角灵芝产胞内多糖的液体发酵工艺,以鹿角灵芝胞内多糖得率为指标,研究碳源、氮源、初始 pH 值、发酵时间、接种量、装液量、马铃薯添加量对鹿角灵芝胞内多糖得率的影响,并通过单因素和响应面法对鹿角灵芝产胞内多糖的发酵工艺进行优化。结果表明,鹿角灵芝胞内多糖得率最高时的发酵条件如下:20% 马铃薯、3.3% 葡萄糖、3% 麦麸、0.2% KH_2PO_4 、0.1% MgSO_4 ,初始 pH 值为 7.0,接种量为 11%,500 mL 三角瓶装液量为 151 mL,转速为 150 r/min,培养温度为 $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$,培养时间为 82 h。在此条件下,鹿角灵芝胞内多糖的得率为 12.94%,与预测值 13.16% 的相对误差小于 5%,说明该优化模型真实可行,具有指导生产的实用价值。

关键词:鹿角灵芝;胞内多糖;液体发酵;响应面法;工艺优化

中图分类号: S188+.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0215-06

灵芝是我国传统名贵大型真菌^[1-2],可用于辅助治疗肿瘤、调节免疫力、抗氧化、抗衰老等,灵芝多糖是其主要功能活性物质之一^[3-8]。鹿角灵芝是一种表面具有漆样光泽、菌柄长、有多个分支、形似鹿角、因生长外界条件变化而异型生长

的灵芝菌株,在自然条件下极为罕见,多通过人工培养方式获取。传统灵芝多糖主要从灵芝孢子粉和子实体中提取,近年来的研究显示,通过深层发酵提取的灵芝多糖,较传统方式的得率和功效具有优势^[9-10]。刘艳芳等对同种灵芝子实体、菌丝体和孢子粉多糖成分进行了比较,发现灵芝菌丝体中多糖含量最高,孢子粉中多糖含量次之,子实体中多糖含量最低^[11]。在对小鼠巨噬细胞 RAW264.7 释放一氧化氮(NO)产量的影响研究中发现,从菌丝体和子实体中提取的多糖活性表现良好,而孢子粉多糖呈低活性状态,表明从灵芝菌丝体中制得的灵芝多糖具有产量高、活性优的特点。于浩瀚等以 8 个灵芝菌株为研究对象,比较菌丝体多糖、子实体的多糖含量发现,血芝的菌丝体多糖含量为子实体的 30 倍,进而证实通过深层发酵获得灵芝多糖是切实可行的^[12]。随着生活水平

收稿日期:2017-07-27

基金项目:山东省自然科学基金(编号:ZR2016YL022);山东省农业科学院农业科技创新工程(编号:CXGC2017A01);山东省农业重大应用技术创新课题(编号:鲁财农指 2015[16]号);山东省农业科学院青年英才培养计划;泰山学者建设工程专项。

作者简介:徐 慧(1989—),女,山东烟台人,硕士,助理研究员,主要从事食品发酵工程研究。E-mail: xh201501@163.com。

通信作者:陈蕾蕾,博士,副研究员,主要从事微生物源生物活性物质研究。E-mail: chenleilei8210@163.com。

5.4 检测方法

高效液相-串联质谱法充分利用了色谱与质谱的检测功能,本次试验中所用的液质联用仪是液相色谱-三级四级杆质谱联用仪,其采用多级质谱检测,对化合物的鉴别非常精细,其检测限能够达到 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,远远高于酶联免疫法和液相色谱-紫外法两种检测仪器,在实际的食品检测分析中能够更加准确的进行药物残留鉴定。

6 结论

世界各国都要求禁止使用硝基呋喃类药物于动物源性食品当中,该类药物的有效检测是对人类食用安全健康肉类食品的保证。硝基呋喃类药物残留量的检测属于痕量检测,对于检测方法的准确性要求很高。本研究采用高效液相色谱-串联质谱法对猪肉中的 4 种硝基呋喃类代谢物残留同时进行检测,得到硝基呋喃类药物代谢衍生物的定位定量分析结果。使用 4 种代谢物的同位素内标,减少了样品前处理对检测结果的影响,使定量更加精确。此法前处理过程简单易做、试验重复性好,该方法具有较高的灵敏度,检测更为准确且具有较低的检出限。因此,对比液相色谱-串联质谱法、液相色谱-质谱法

和液相色谱法,三者中液相色谱-串联质谱法的准确性最高,其检测限量限都是最低的,是三者中最为理想的检测方法。

参考文献:

- [1]王汝龙. 硝基呋喃类抗感染药物[J]. 中国药学杂志,1963(9): 393-396.
- [2]赵东豪,王旭峰,王 强,等. 液相色谱串联电喷雾质谱检测中溶剂对硝基呋喃类代谢物响应的影响[J]. 南方水产科学,2016(6): 108-114.
- [3]朱其太,颜景堂. 对硝基呋喃类药物亮红灯[N]. 中国畜牧报,2003-05-18.
- [4]徐一平,胥传来. 动物源食品中硝基呋喃类物质及其代谢物残留的检测技术研究[J]. 食品科学,2007(10): 590-593.
- [5]唐红梅,曾 芳,李成洪. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016(10): 3952-3959.
- [6]蒙君丽,周 鑫,郑百芹,等. UPLC-MS/MS 检测牛奶中硝基呋喃类代谢物残留[J]. 食品工业,2016(7): 278-280.
- [7]刘正华,杨 娟,李拥军,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中硝基呋喃类代谢物残留[J]. 广东农业科学,2012(4): 87-89.