

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2021071302

郭添荣, 韩世鹤, 吴文林, 等. UPLC-MS/MS 法快速检测人工养殖淡水鱼中硝基呋喃类代谢物[J]. 环境化学, 2022, 41(11): 3534-3543.
GUO Tianrong, HAN Shihe, WU Wenlin, et al. Rapid detection of nitrofurans metabolites in cultured freshwater fish by UPLC-MS/MS[J].
Environmental Chemistry, 2022, 41 (11): 3534-3543.

UPLC-MS/MS 法快速检测人工养殖淡水鱼中 硝基呋喃类代谢物*

郭添荣^{1,2} 韩世鹤^{1**} 吴文林^{2,3,4**} 高媛¹
张胜杰¹ 蔡雪静¹ 赵丽娟¹ 石拓¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京, 100176; 2. 成都市食品检验研究院, 成都, 611130;
3. 中国科学院成都生物研究所, 成都, 610041; 4. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要 建立超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 快速检测人工养殖淡水鱼中 AHD、AMOZ、AOZ、SEM 等硝基呋喃类代谢物的分析方法. 向鲜活乌鳢、鲢鱼、鲫鱼和草鱼试样中分别加入甲醇-水标准混合溶液, 震荡并离心后弃去液体, 保留残留物, 残留物经盐酸水解, 邻硝基苯甲醛酸性条件下衍生, 利用乙酸乙酯提取, 再用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱分析柱洗脱, 电喷雾离子源 (ESI) 下以多重反应监测 (MRM) 正离子模式扫描进行检测, 内标法定量. 乌鳢、鲢鱼、鲫鱼和草鱼中 4 种硝基呋喃类代谢物浓度在 0.1—20 ng·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 相关系数均>0.9953, 检出限均为 0.25 μg·kg⁻¹; 平均回收率在 97.6%—107.8% 之间, 相对标准偏差 RSD 在 3.1%—9.6% 之间. 该方法简单高效, 具有准确性好、灵敏度高、重现性强等特点, 适用于多种人工养殖淡水鱼中硝基呋喃类代谢物的快速检测.

关键词 超高效液相色谱串联质谱法, 人工养殖, 淡水鱼, 硝基呋喃类代谢物, 快速检测.

Rapid detection of nitrofurans metabolites in cultured freshwater fish by UPLC-MS/MS

GUO Tianrong^{1,2} HAN Shihe^{1**} WU Wenlin^{2,3,4**} GAO Yuan¹ ZHANG Shengjie¹
CAI Xuejing¹ ZHAO Lijuan¹ SHI Tuo¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing, 100176, China; 2. Chengdu Institute of Food Inspection, Chengdu, 611130, China; 3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, 610041, China;
4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Abstract To establish an ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for the rapid detection of nitrofurans metabolites such as AHD, AMOZ, AOZ and SEM in cultured freshwater fish. The samples of fresh snakehead fish, silver carp, crucian carp and grass carp were respectively added with methanol-water mixed solution for shock and centrifugation. After shaking and centrifugation, discard the liquid to retain the residue, the residues

2021年7月13日收稿(Received: July 13, 2021).

* 国家市场监督管理总局技术保障专项项目(2021YJ009), 国家现代农业产业技术体系四川创新团队项目(scxctd-2021-15), 四川省科技计划应用基础研究项目(21YYJC0962)和成都市技术创新研发项目(2019-YFYF-00023-SN)资助.

Supported by the Technical Support Special Project of the State Administration for Market Regulation (2021YJ009), the National Innovation Team Project of China (scxctd-2021-15), the Applied Basic Research Project of Science and Technology Plan of Sichuan Province (21YYJC0962) and the Technology Innovation Research and Development Project of Chengdu City (2019-YFYF-00023-SN).

** 通信联系人 **Corresponding author**, Tel: 15210954081、15208427050, E-mail: 327803544@qq.com; wwl2008802@gmail.com

were hydrolyzed with hydrochloric acid, derived with o-nitrobenzaldehyde under acidic conditions, extracted with ethyl acetate, and then purified with ACQUIYUPLC BEH C₁₈ chromatographic analysis column elution. Multiple response monitoring (MRM) positive ion mode scanning was used for detection under the electrospray ion source (ESI), and quantification was carried out by internal standard method. The linear range of four nitrofurans metabolites in mullet, silver carp, crucian carp and grass carp was 0.1 ng·mL⁻¹ to 20 ng·mL⁻¹, the correlation coefficients were >0.9953, and the detection limits were 0.25 μg·kg⁻¹. The relative standard deviations (RSD) ranged from 3.1% to 9.6%, and the average recoveries ranged from 97.6% to 107.8%. The method is simple, efficient, accurate, sensitive and reproducible. It is suitable for the rapid detection of nitrofurans metabolites in a variety of cultured freshwater fish.

Keywords ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS), artificial breeding, freshwater fish, nitrofurans metabolites, rapid detection.

硝基呋喃类药物是一类包括呋喃西林(nitrofurazone, SEM)、呋喃唑酮(furazolidone, AOZ)、呋喃它酮(furMtdone, AMOZ)和呋喃妥因(nitrofurantoin, AHD)等 4 种代谢产物的抗菌药物^[1-2], 因其对部分革兰氏性菌、真菌和原虫具有抑制与杀灭作用而曾被广泛用于淡水养殖业^[3-4]. 研究表明残留的硝基呋喃类药物可能会通过食物链危害人体健康^[5-6]. 尽管我国农业农村部在 193 号公告中明确规定了硝基呋喃类药物及代谢物不得用于可食动物, 但仍然存在部分淡水鱼养殖户在利益驱使下非法滥用硝基呋喃类药物^[7-8]. 因此, 对硝基呋喃类药物进行严密监控很有必要.

目前, 国内外报道用于检测水产品中硝基呋喃类药物的方法有酶联免疫法(ELISA)^[9]、高效液相色谱法(HPLC)^[10]、高效液相色谱质谱联用法(HPLC-MS)^[11-12]、高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[13-15]等. 其中 ELISA 法一般用于定性筛查且阳性样品需要进一步确证; 而 HPLC 法与 HPLC-MS 法存在灵敏度较低问题; HPLC-MS/MS 法可同时进行高质量定性和定量分析, 已被相应标准所采用^[16-17], 但该方法前处理及进样时间过长且多局限于单一基质样品^[18-19]. 此外, “农业部 783 号公告-1-2006”所述方法中, 虽然 4 种硝基呋喃类代谢物保留得到增强且各目标物分离度较好, 但峰形较宽, 检测时间长效率较低, 不利于大批量样品的快速检测. 因此, 探讨建立一种能够快速、准确检测多种鱼肉中硝基呋喃类代谢物的方法显得很有必要.

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS), 在农业部 783 号公告-1-2006 和 GB/T 20752—2006 的基础上, 通过优化前处理步骤及色谱和质谱分析条件, 构建用于快速检测乌鳢、鲫鱼、以及鲢鱼和草鱼等 4 种人工养殖淡水鱼中硝基呋喃类药物代谢物的检测方法. 该方法简便、快捷、高效, 可为人工养殖多种淡水鱼中硝基呋喃类代谢物的快速检测监控提供新的思路.

1 实验部分(Experimental section)

1.1 仪器与设备

UPLC Xevo TQ-S micro 超高效液相色谱串联质谱仪(配置电喷雾离子源)(美国 Waters 公司); ME204E 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); BT 125D 型精密天平(德国 Sartorius 公司); MS3 涡旋震荡搅拌器(德国 IKA 公司); 3K15 高速冷冻离心机(美国 Sigma Aldrich 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); 5800H-C 超声波仪(美国 Branson 公司) TurboVap LV 多样品快速浓缩仪(瑞典 Biotage); 绞肉机(德国 HanJiaOurs 公司); 色谱柱: ACQUIYUPLC BEH C₁₈(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm).

1.2 试剂与材料

试剂: 甲醇、乙腈、甲酸和正己烷均为色谱纯(美国 Sigma Aldrich 公司); 盐酸为优级纯; 氢氧化钠、乙酸乙酯均为分析纯(广州化学试剂厂); 磷酸氢二钾为分析纯(阿拉丁公司); 邻硝基苯甲醛为分析纯(德国 CNW 公司); 试验用水均为超纯水.

标准物质: 4 种硝基呋喃类药物代谢物 AMOZ、SEM、AHD、AOZ 及同位素内标 AMOZ-D₅、

SEM·HCl-¹³C-¹⁵N₂、AHD-¹³C₃、AOZ-D₄ 的对照品纯度均高于 99%(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司)。

试验材料: 从市场中随机采集乌鳢、鲫鱼、鲢鱼和草鱼等 4 种人工养殖的鲜活淡水鱼各 9 批次。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

活鱼制样: 将鲜活鱼去鳞、去皮、去头尾后, 沿鱼背脊对剖, 取背脊两侧肌肉部分, 再用绞肉机将制成肉泥状备用。

水解及衍生化: 准确称取各鱼样 3 g(精确到 0.01 g), 转置 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇-水(V/V, 1:1)混合溶液, 振荡 5 min 并离心 5 min 后弃去液体。继续加入 10 mL 0.2 mol·L⁻¹ 盐酸, 10000 r·min⁻¹ 均质 3 min, 再加入内标混合标准溶液 100 μL、邻硝基苯甲醛溶液 100 μL, 超声 5 min 后涡漩混合 30 s, 再充分振荡 20 min, 16 h 过夜衍生(37℃ 恒温箱)。

提取及净化: 拾取离心管并放置冷却, 至室温后加入 3 mL 磷酸氢二钾溶液(1 mol·L⁻¹), 涡漩混匀, 用氢氧化钠溶液(1 mol·L⁻¹)调节 pH 值至 7.0—8.0 后, 缓慢加入乙酸乙酯 10 mL, 经 5 min 振荡提取和 5 min 离心处理(8000 r·min⁻¹), 收集上清液转移至 15 mL 离心管中, 用 10 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并上清液并在 40℃ 下氮气吹干, 残渣用 1.0 mL 0.1% 甲酸水溶液溶解, 再用 3 mL 饱和乙腈正己烷去脂, 下层水相过 0.20 μm 滤膜, 上机测试。同时进行空白试验。

1.3.2 标准溶液的配制

单标储备液(1 mg·mL⁻¹): 准确称取适量 AMOZ、SEM、AOZ 和 AHD, 用甲醇溶解并分别配制成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的单标储备液, 4℃ 冷藏避光保存。

混合标准工作溶液(10 ng·mL⁻¹、100 ng·mL⁻¹): 准确吸取 AMOZ、SEM、AOZ 和 AHD 单标储备液, 用甲醇逐级稀释为 10 ng·mL⁻¹、100 ng·mL⁻¹ 的混合标准工作溶液, 4℃ 冷藏避光保存。

内标单标储备液(1 mg·mL⁻¹): 准确称取适量 AMOZ-D₅、SEM·HCl-¹³C-¹⁵N₂、AOZ-D₄ 和 AHD-¹³C₃, 用甲醇溶解并分别配制成浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的内标单标储备液, 4℃ 冷藏避光保存。

混合内标工作溶液(100 ng·mL⁻¹): 准确吸取 AMOZ-D₅、SEM·HCl-¹³C-¹⁵N₂、AOZ-D₄ 和 AHD-¹³C₃ 同位素内标单标储备液, 用甲醇逐级稀释为 100 ng·mL⁻¹ 的混合内标工作溶液, 4℃ 冷藏避光保存。

1.3.3 标准曲线的建立

分别准确移取硝基喹代谢物 10 ng·mL⁻¹ 混合标准工作溶液 10、50、100、200、100 ng·mL⁻¹ 混合标准工作溶液 50、100、200 μL 至 7 支离心管中, 配制成浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng·mL⁻¹ 系列混合标准工作液, 按 1.3.1 操作并依次测定。

1.3.4 色谱与质谱条件

色谱条件: 采用 ACQUIYUPLC BEH C₁₈(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm) 为色谱分析柱, 流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(含 0.1% 甲酸)(B), 梯度洗脱见表 1; 流速: 0.3 mL·min⁻¹, 柱温: 35℃; 进样量: 1.0 μL。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min Time	A/%	B/%
0	95	5
0.6	95	5
2.5	10	90
3.0	10	90
4.5	95	5

质谱条件: 离子化方式: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子模式; 检测方式: 多重反应监测(MRM); 电喷雾电压(IS)3.0 kV; 离子源温度(TEM)150℃; 脱溶剂气温度和流量: 400℃、800 L·h⁻¹; 锥孔气流量 100 L·h⁻¹; 碰撞气流量 0.15 mL·min⁻¹。4 种代谢物及内标物监测情况见表 2。

表 2 硝基呋喃代谢物及其同位素内标物质谱分析参数

Table 2 Analysis of nitrofurantoin internal standard and its metabolite mass spectrometry

化合物名称 Compounds	母离子 Parent ion(m/z)	子离子 Daughter ion(m/z)	锥孔电压/V Taper voltage	碰撞能量/eV Collision energy	保留时间/min Retention time
AMOZ	335	291*, 262	28	11, 20	1.64
AMOZ-D ₅	340	296	32	11	1.64
SEM	209	166*, 192	30	14, 9	1.93
SEM·HCl- ¹³ C- ¹⁵ N ₂	212	168	30	11	1.93
AHD	249	134*, 104	30	9, 12	1.96
AHD- ¹³ C ₃	252	134	28	15	1.96
AOZ	236	134*, 104	28	11, 20	2.05
AOZ-D ₄	240	134	30	12	2.05

注: 带*的离子为定量离子。

Note: The ion with "*" is qualitative ion.

1.3.5 基质效应的计算

将 4 种硝基呋喃类代谢物标准品分别通过鱼肉基质以及甲醇制备为标准溶液, 通过甲醇纯溶剂和基质溶液中同一物质的标准曲线斜率之比进行基质效应评价。基质效应(ME%)计算公式如下:

$$ME\% = \left(\frac{\text{空白基质标准曲线的斜率}}{\text{溶液标准曲线斜率}} \right) \times 100\%$$

其中, $80\% \leq ME\% \leq 120\%$ 时, 基质效应可忽略; $ME\% < 80\%$ 或 $ME\% > 120\%$ 时, 基质抑制或增强。

1.3.6 数据处理与分析

利用 UPLC Xevo TQ-S micro 超高效液相色谱串联质谱仪系统配套的 Waters MassLynx 数据管理软件, 并结合 WPS 和 Origin 8.5 进行数据处理与分析。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 UPLC-MS/MS 测定硝基呋喃类药物方法的优化研究

“农业部 783 号公告-1-2006”和“GB /T 20752—2006”方法中均使用梯度洗脱法, 前者中甲醇的初始比例为 40%, 高比例的有机相导致色谱保留不明显且出峰早峰形宽; 后者用 0.3% 乙酸乙腈溶液和 0.3% 乙酸水溶液, 各代谢物之间分离度适中, 但 AMOZ 存在较弱保留问题。本研究在上述 2 个标准方法的基础上, 对色谱、质谱条件和前处理方法进行了优化。

2.1.1 色谱条件的优化

0.1% 的甲酸水溶液是优选流动相^[20], 试验首先以 0.1% 甲酸水溶液和乙腈作为流动相, 分别考察在 Agilent Eclipse Plus C₁₈(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) 和 ACQUIYUPLC BEH C₁₈(1.7 μm, 2.1 mm×50 mm) 两种色谱柱中的分离效果。发现后者能获得更加尖锐对称的色谱峰和较高的灵敏度, 且 4 种代谢物的分离效果更好; 低浓度(0.1%)甲酸的添加能够获取更高的离子化效率, 故以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈作为流动相; 由于目标物与影响物难以完全分离在等度洗脱中持续存在, 故采用梯度洗脱。多品类养殖淡水鱼样品的基质复杂, 为避免大批量进样时色谱柱中蓄积未知杂质成分, 该法设置初始比例为 5%(0.1% 甲酸乙腈)且在 2 min 内持续增加线性, 使各化合物在 C₁₈ 柱中保留增强, 随后将比例提高至 90%, 以达到杂质的多量、快速洗脱目的。将乙腈的比例从 90% 降低为初始比例 5%, 充分平衡色谱柱, 为下一针进样做准备。该法将进样分离时间提升至 4.5 min 内, 相比于 2 个标准方法, 各项评价指标均有所提高, 优化后梯度洗脱程序见表 1。

2.1.2 质谱条件的优化

采用正离子(ESI⁺)电离扫描模式, 对 4 种硝基呋喃代谢物及其内标物分别进行一级质谱扫描并获得高响应的母离子 [M+H]⁺, 在确定准分子离子峰的基础上分别优化锥孔电压; 借助氩气的能量化碰撞

产生子离子,在优化碰撞能量的基础上使选定的特征碎片离子的响应强度达到最大,最终确定以 m/z 为 291.185 的准分子离子和 166.100、134.089、134.069 的 3 个碎片离子组成监测离子对,质谱监测条件满足欧盟 657/2002/EC 号指令要求(见表 2)。

2.1.3 样品洗涤液的选择

乌鳢、鲢鱼、鲫鱼、草鱼中脂质含量均较高,前处理时应考虑脱脂^[21]。现行标准中均采用甲醇水溶液去除脂质^[22-23],由于目前对洗涤液配比研究少有报道,本试验将甲醇与水的比例分别设置为 1:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1,考察回收率和精密度的受影响情况(见表 3)。结果显示,不同比例的甲醇水洗涤液加标回收率在 89.8%—95.8% 之间,精密度在 3.8%—6.3% 之间。其中,比例为 1:1 时,回收率和精密度均达到最高,分别为 95.8% 和 6.3%。故洗涤液中甲醇与水比例选择为 1:1。

表 3 不同比例洗涤液对回收率和精密度的影响($n=6$)

Table 3 The influence of different proportions of washing liquid on recovery rate and precision

序号 No.	甲醇:水 Methanol:Water	回收率/% Recovery	精密度/% RSD
1	1:1	95.8	6.3
2	2:1	89.8	5.9
3	4:1	90.1	5.7
4	6:1	93.1	6.0
5	8:1	94.3	6.1
6	10:1	93.7	3.8

2.1.4 光照强度的选择与溶液 pH 的调节

衍生化产物往往受到光照条件的影响^[24]。试验将同浓度硝基呋喃代谢物的衍生物分别放置于日间光照和夜晚避光条件下考察光照强度的影响,发现 4 种衍生物均呈现光敏性且敏感程度不一致。其中,AMOZ 对光照最敏感,日间光照下放置 6 h 后衍生物几乎完全分解;AHD 对光照最不敏感,日间光照下放置 6 h 前衍生物含量基本不变,而放置 6 h 后出现缓慢分解;SEM 和 AOZ 相对稳定,但长时间日间光照会出现不同程度的分解。4 种衍生物在夜晚避光条件下放置的衍生物含量几乎不变。因此选择过夜避光衍生化,以减少衍生物的分解,同时提高测定的灵敏度,避免假阴性的出现。

溶液的 pH 对回收率的影响较大且现行方法工作效率较低^[25],农业部 783 号公告-1-2006 与文献方法中一般采用 3—5 mL $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钾溶液或 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液来调节 pH,这些方法在调节 pH 到最佳萃取范围难度较大,而在水解液中加入适量缓冲溶液可以保证萃取效率。故本实验在 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 等 7 个梯度下分别先加入 3 mL $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钾溶液,充分涡旋混匀形成缓冲溶液,再用 $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液调节 pH, pH 的首次调节时,需要逐滴加入氢氧化钠溶液并记录体积,经充分涡旋水解衍生化后的混合溶液,使试样中的酸充分释放。通过实验考察不同 pH 条件下 4 种硝基呋喃代谢物的回收率(见图 1)。

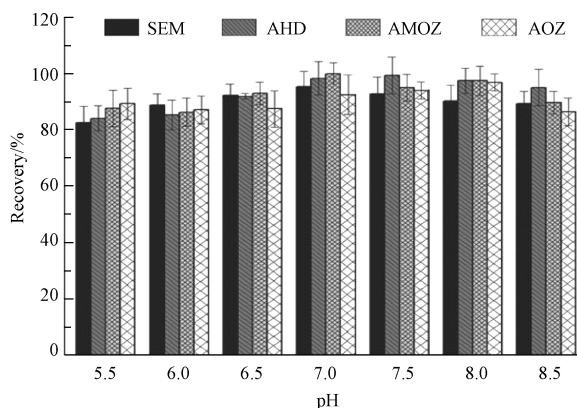


图 1 不同 pH 条件下 4 种硝基呋喃代谢物回收率

Fig.1 Recovery rates of 4 nitrofur metabolites under different pH conditions

由图 1 可知,不同 pH 条件下 4 种硝基呋喃代谢衍生物的回收率不同.其中 AHD 和 AMOZ 受 pH 的影响较大,当 pH 调节至弱碱性(7.0—8.0)时,均能达到 90% 及以上的回收率效果,而当 pH 偏低或过高时,均会对回收率造成不良影响回收率,原因可能是衍生物难以萃取造成.因此,溶液 pH 调节至 7.0—8.0 范围内,不仅缩短处理时间,有效提高工作效率,还能够获得更高的回收率.

2.1.5 萃取溶剂体积与提取次数的考察

在选取适量萃取溶剂的基础上,适配最佳提取体积及次数.实验对比了 4、6、8、10、12 mL 不同体积条件下经乙酸乙酯提取 1—3 次与 10 mL 相同体积条件下经乙酸乙酯分 2 次(5 mL×2)和 1 次(10 mL×1)提取时,对回收率的影响(见表 4).实验表明,当以 10 mL 乙酸乙酯提取 2 次时回收率最高,这可能与非最优溶剂体积条件下提取时,药物提取不充分有关;而 8 mL 和 10 mL 乙酸乙酯 3 次提取时,回收率表现与 10 mL 乙酸乙酯提取 2 次相当,从节约成本和时间考虑,试验最终选择以 10 mL 乙酸乙酯提取 2 次.

表 4 不同萃取溶剂体积与提取次数对回收率的影响($n=6$)

Table 4 The influence of different extraction solvent volume and extraction times on recovery ($n=6$)

提取次数 Extraction times	溶剂体积 Solvent volume						
	4 mL	6 mL	8 mL	10 mL	12 mL	5 mL×2	10 mL×1
1次	85.2%	84.7%	85.0%	88.0%	89.6%		
2次	92.0%	94.3%	96.0	96.8%	94.2%	92.6%	88.0%
3次	87.9%	93.7	96.5	96.5%	93.4%		

2.2 基质效应的评价

鱼肉样品基质较为复杂,UPLC-MS/MS 分析过程中,目标共流物会对分析结果造成系统干扰.实验按照既定基质效应计算方法,对 4 种鱼肉样品开展基质效应评价.实验发现(见表 5),在乌鳢和草鱼中,4 种代谢物的基质效应均在 80%—120% 范围内,即基质效应不明显;在鲢鱼中,4 种代谢物均表现为基质增强效应;在鲫鱼中,AMOZ、AHD 表现为基质抑制效应,SEM、AOZ 则表现为基质增强效应,从而可以判断本实验存在部分基质效应.本实验采用基质加标法构建标准工作曲线,结合同位素内标物使基质效应影响得到消减,从而提高定量检测水平.

表 5 4 种硝基呋喃类代谢物在不同养殖鱼中的基质效应

Table 5 Matrix effects of four nitrofurans metabolites in different cultured fish

分析物 Analytes	基质效应/% Matrix effect			
	乌鳢 Snakehead fish	鲢鱼 Silver carp	鲫鱼 Crucian carp	草鱼 Grass carp
AMOZ	97.9	126.3	73.5	101.3
SEM	103.5	121.5	123.6	97.5
AHD	99.2	126.1	77.6	99.3
AOZ	106.3	130.2	129.6	112.7

2.3 线性关系、方法检出限和定量限

在 UPLC-MS/MS 优化条件分析中,分别以待测物浓度及对应离子峰面积为横纵坐标制作标准曲线,得到 4 类鱼肉样品基质中硝基呋喃类代谢物的线性方程(见表 6).表中数据显示,4 种硝基呋喃代谢物在 0.1—20 ng·mL⁻¹ 线性范围内线性关系良好($r \geq 0.9953$).以响应信号分别大于 3 倍和 10 倍噪声时对应的物质含量作为方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ),各物质方法检出限均为 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,定量限均为 0.80 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,表明本方法灵敏度较高.

表 6 养殖鱼样品基质中硝基呋喃类代谢物的线性关系和方法检出限

Table 6 Linear relationships and detection limits of nitrofurans metabolites in the matrix of cultured fish samples

品种 Varieties	分析物 Analytes	线性方程 Linear equation	相关系数(r) Correlation coefficient	检出限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ LOD	定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ LOQ
乌鳢	AMOZ	$y=0.715724x+0.0548122$	0.997423	0.25	0.80

续表 6

品种 Varieties	分析物 Analytes	线性方程 Linear equation	相关系数(<i>r</i>) Correlation coefficient	检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) LOD	定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) LOQ
乌鳢	SEM	$y=0.660234x + 0.070156$	0.998871	0.25	0.80
	AHD	$y=0.655721x + 0.0891361$	0.996414	0.25	0.80
	AOZ	$y=0.851029x + 0.0264705$	0.996372	0.25	0.80
鲢鱼	AMAZ	$y=0.14741x - 0.0440801$	0.998282	0.25	0.80
	SEM	$y=0.177392x - 0.0182822$	0.997467	0.25	0.80
	AHD	$y=0.124583x + 0.0116315$	0.995397	0.25	0.80
	AOZ	$y=0.169779x - 0.0155245$	0.999737	0.25	0.80
鲫鱼	AMAZ	$y=0.735794x - 0.0498112$	0.998424	0.25	0.80
	SEM	$y=0.760354x + 0.060856$	0.995881	0.25	0.80
	AHD	$y=0.605711x + 0.0881371$	0.995412	0.25	0.80
	AOZ	$y=0.801019x + 0.00674701$	0.997370	0.25	0.80
草鱼	AMAZ	$y=0.14741x - 0.0440801$	0.998282	0.25	0.80
	SEM	$y=0.177392x - 0.0182822$	0.997467	0.25	0.80
	AHD	$y=0.124583x + 0.0116315$	0.995397	0.25	0.80
	AOZ	$y=0.169779x - 0.0155245$	0.999737	0.25	0.80

2.4 回收率与精密度

准确称取 3 g 乌鳢、鲢鱼、鲫鱼和草鱼样品, 分别添加 1.0、2.0、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的硝基呋喃代谢物, 低、中、高的 3 个浓度水平下重复 6 次实验, 计算方法回收率和精密度. 结果显示, 该方法在 1.0—10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 添加水平下的平均回收率在 97.6%—107.8% 之间, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 在 3.1%—9.6% 之间, 均符合标准检测分析的要求, 试验结果见表 7. 空白鱼肉中添加 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 混标及其内标的衍生物色谱图见图 2.

表 7 硝基呋喃代谢物在不同养殖鱼肉中的加标回收率与精密度 ($n = 6$)

Table 7 Recovery and precision of nitrofurans metabolites in different cultured fish ($n = 6$)

分析物 Analytes	品种 Varieties	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$		10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
		回收率/% Recovery	精密度/% RSD	回收率/% Recovery	精密度/% RSD	回收率/% Recovery	精密度/% RSD
AMAZ	乌鳢	98.6	3.6	99.4	5.6	99.3	3.3
	鲢鱼	99.1	4.2	98.4	6.1	99.6	4.1
	鲫鱼	98.1	4.4	98.1	5.9	99.0	3.9
	草鱼	102.4	3.9	99.4	7.1	97.8	4.4
SEM	乌鳢	98.5	7.1	97.9	6.0	98.3	6.3
	鲢鱼	97.9	9.1	97.7	5.4	97.9	7.1
	鲫鱼	97.7	8.3	99.2	6.0	100.6	6.3
	草鱼	99.3	7.7	105.6	7.2	99.0	5.4
AHD	乌鳢	97.6	6.1	101.4	7.4	98.7	3.8
	鲢鱼	97.9	4.3	99.0	8.2	99.4	4.5
	鲫鱼	100.3	7.3	102.1	9.6	98.2	5.1
	草鱼	107.8	6.3	99.7	8.1	99.6	5.5
AOZ	乌鳢	99.2	8.1	105.2	7.4	99.3	6.0
	鲢鱼	98.1	8.5	99.8	7.9	98.6	6.3
	鲫鱼	101.2	7.9	104.1	9.5	100.4	5.7
	草鱼	99.3	8.0	100.9	8.2	107.7	5.2

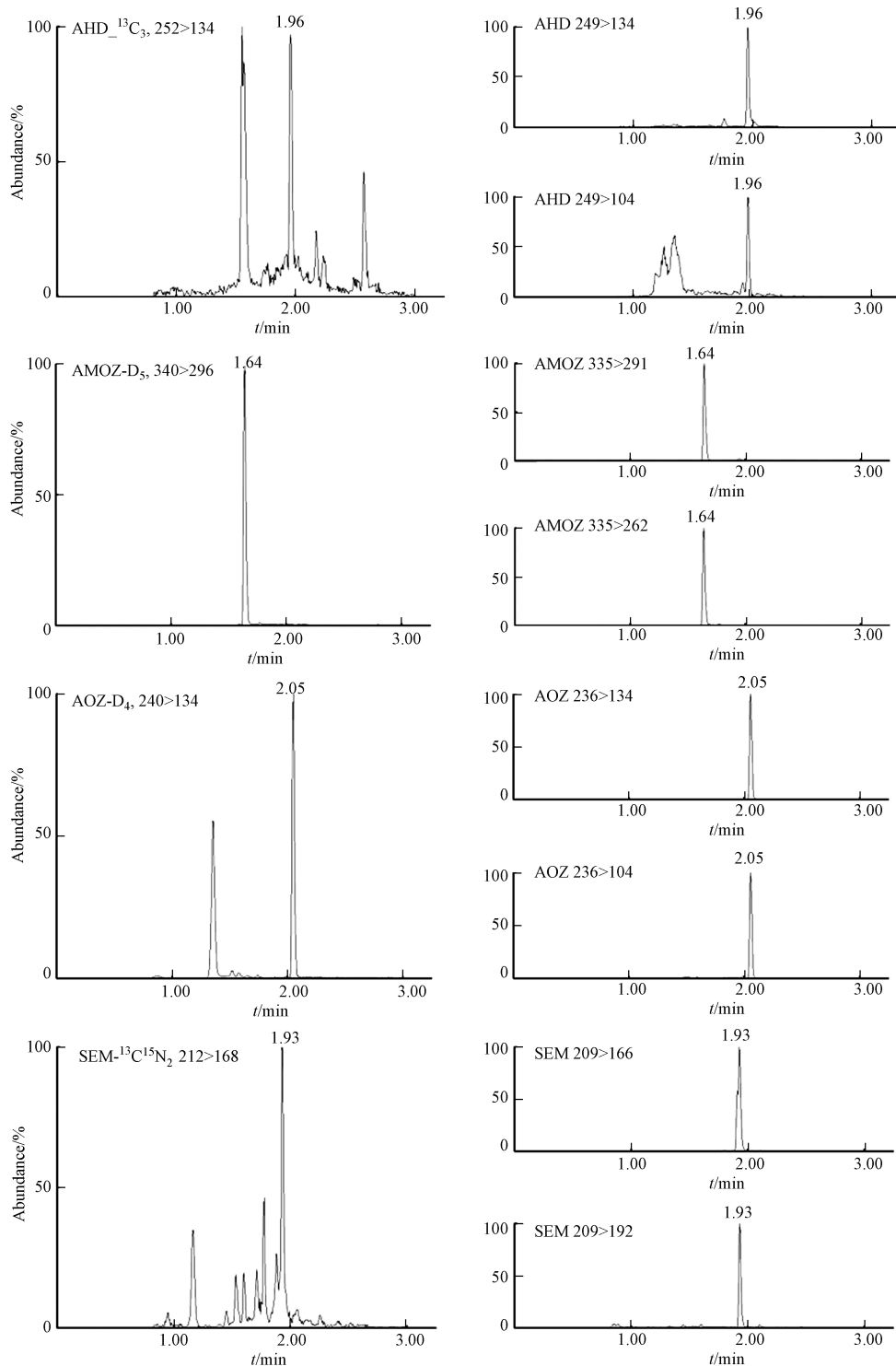


图 2 空白鱼肉中添加 $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 混标及其内标的衍生物质谱图

Fig.2 Chromatograms of blank fish samples spiked with mixed nitrofurantoin metabolite standards ($10.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

2.5 实际样品的检测

采用本方法和国家标准方法 GB/T 20752—2006 分别对市场随机抽取的 36 批次人工养殖淡水鱼(乌鳢、鲢鱼、鲫鱼、草鱼各 9 批次)和乌鳢中硝基呋喃类代谢物质控样品(AOZ 特性值 $5.50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 量值范围 $1.74\text{—}9.26 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; AMOZ 特性值 $5.75 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 量值范围 $1.94\text{—}9.56 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)进行检测,结果显示,除质控样品检出阳性外,其他市售样品均显示未检出.用本方法与标准方法分别测试质控样,检测值无显著性差异且均保持在量值范围内(见表 8).在符合检测需求的基础上,本方法较标准方法可以省略固相萃取柱,在同等条件下检测效率得到提升.

表 8 质控测试样品验证结果($n=2$)

Table 8 Quality control test sample validation results

样品标号 Sample label	分析物 Analytes	检测结果/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Detection results	
		GB/T 20752—2006	本方法
质控样#	AOZ	5.70	5.80
质控样#	AMOZ	5.40	5.55

3 结论(Conclusion)

本实验通过对样品前处理和仪器条件的优化,建立了一种基于超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)对人工养殖淡水鱼中 AHD、AMOZ、AOZ、SEM 等 4 种硝基呋喃类代谢物的检测分析方法。硝基呋喃类代谢物在 $0.1\text{--}20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,相关系数均 >0.9953 ,检出限和定量限分别为 $0.25\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $0.80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;在 1.0、2.0、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 3 个添加水平下,平均回收率在 97.6%—107.8% 之间,相对标准偏差 RSD 在 3.1%—9.6% 之间,方法学指标均能满足国家药物残留检测的要求。该方法简单高效、准确灵敏,为人工养殖淡水鱼中硝基呋喃类代谢物的快速检测提供了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] KULIKOVSKII A V, GORLOV I F, SLOZHENKINA M I, et al. Determination of nitrofurans metabolites in muscular tissue by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 74(9): 906-912.
- [2] ZHANG Y B, QIAO H O, CHEN C, et al. Determination of nitrofurans metabolites residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2016, 192: 612-617.
- [3] WANG Q, LIU Y C, WANG M Y, et al. A multiplex immunochromatographic test using gold nanoparticles for the rapid and simultaneous detection of four nitrofurans metabolites in fish samples [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(1): 223-233.
- [4] WANG J, CHANG X X, ZUO X W, et al. A multiplex immunochromatographic assay employing colored latex beads for simultaneously quantitative detection of four nitrofurans metabolites in animal-derived food [J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(2): 503-516.
- [5] 郭添荣, 张崑, 叶梅, 等. 中国水产食品质量及安全控制研究进展 [J]. *肉类研究*, 2019, 33(5): 67-72.
GUO T R, ZHANG Y, YE M, et al. A review of recent advances in quality and safety control of aquatic products in China [J]. *Meat Research*, 2019, 33(5): 67-72 (in Chinese).
- [6] REJCZAK T, TUZIMSKI T. Recent trends in sample preparation and liquid chromatography/mass spectrometry for pesticide residue analysis in food and related matrixes [J]. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 2015, 98(5): 1143-1162.
- [7] LI Y, ZHANG J Z, JIN Y, et al. Hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry analysis with accurate-mass database and parallel reaction monitoring for high-throughput screening and quantification of multi-xenobiotics in honey [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1429: 119-126.
- [8] 郭添荣, 柯欢, 吴文林, 等. 动物源食品中兽药残留检测方法的影响因素分析 [J]. *农产品加工*, 2020(8): 63-68.
GUO T R, KE H, WU W L, et al. Analysis of influencing factors of veterinary drug residue detection technology in foods of animal origin [J]. *Farm Products Processing*, 2020(8): 63-68 (in Chinese).
- [9] SHEN J Z, WANG W J, XIA X, et al. Determination of four nitrofurans metabolites and chloramphenicol in biological samples using enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Analytical Letters*, 2013, 46(9): 1404-1418.
- [10] 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, 7(10): 3952-3959.
TANG H M, ZENG F, LI C H. Progress on the detection of nitrofurans drugs residues and their metabolites in food [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7(10): 3952-3959 (in Chinese).
- [11] 李仲超. 液相色谱-质谱同时测定水产品中 78 种兽药残留 [J]. *食品科学*, 2014, 35(16): 217-221.
LI Z C. Simultaneous determination of veterinary drug residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS-MS) [J]. *Food Science*, 2014, 35(16): 217-221 (in Chinese).
- [12] 张艺蓓, 岳田利, 乔海鸥, 等. 陕西省水产品中 4 种硝基呋喃类代谢物的检测 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2015, 43(10): 195-203.
ZHANG Y B, YUE T L, QIAO H O, et al. Determination of four nitrofurans metabolites residues in aquatic products in Shaanxi

- Province [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2015, 43(10): 195-203 (in Chinese).
- [13] 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): 58-64.
ZHAO D H, LI Z G, WANG X F, et al. Optimization of determination of nitrofurans metabolites in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(6): 58-64 (in Chinese).
- [14] 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): 558-562,610.
MA J, LUO H M, ZHANG L (Q /X). Determination of nitrofurans metabolites in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2016, 57(4): 558-562,610 (in Chinese).
- [15] 王狄, 张嘉楠. 超高效液相色谱串联质谱法对水产品中硝基呋喃类代谢物的测定 [J]. *河北渔业*, 2016(7): 47-51.
WANG D, ZHANG J N. Determination of nitrofurans metabolites in aquatic products by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Hebei Fisheries*, 2016(7): 47-51 (in Chinese).
- [16] 周纯洁, 候美玲, 何春兰, 等. LC-MS/MS技术在食品中农药多残留分析的应用进展 [J]. *食品工业科技*, 2019, 40(13): 283-286,298.
ZHOU C J, HOU M L, HE C L, et al. Progress on application of LC-MS/MS technology in pesticide multiresidue analysis for food [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(13): 283-286,298 (in Chinese).
- [17] 姜艳彬, 单吉浩, 王莹, 等. LC-MS/MS技术在药物代谢研究中的应用进展 [J]. *药物分析杂志*, 2014, 34(3): 385-391.
JIANG Y B, SHAN J H, WANG Y, et al. Application progress of LC-MS/MS technology in drug metabolism research [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014, 34(3): 385-391 (in Chinese).
- [18] 王杰, 裴斐, 李彭, 等. 不同前处理方法对猪组织中喹诺酮类兽药残留检测效果对比 [J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 309-314.
WANG J, PEI F, LI P, et al. Comparison of different sample pretreatments for the analysis of quinolone residues in porcine tissues [J]. *Food Science*, 2018, 39(18): 309-314 (in Chinese).
- [19] 李中权, 张芳, 苏越, 等. 质谱直接定量分析技术的应用进展 [J]. *质谱学报*, 2018, 39(2): 129-140.
LI Z Q, ZHANG F, SU Y, et al. Advances in direct quantification analysis by mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2018, 39(2): 129-140 (in Chinese).
- [20] 王立丹. QuEChERS结合超高效液相色谱-高分辨质谱法测定畜禽产品中兽药残留的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
WANG L D. Determination of veterinary drug residues in livestock and poultry products by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [21] 余静. 传统腌腊鱼加工工艺优化及其对产品特性的影响[D]. 成都: 成都大学, 2019.
YU J. Optimization of processing technology of traditional salted fish and its influence on product characteristics[D]. Chengdu: Chengdu University, , 2019 (in Chinese).
- [22] 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].
Announcement of the Ministry of Agriculture 783-1-2006 Determination of nitrofurans metabolic residues in aquatic products by LC-MS/MS method [S] (in Chinese).
- [23] GB/T 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[S].
GB/T 20752—2006 Determination of residues of nitrofurans in pork, beef, chicken, pork liver and aquatic products-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (in Chinese).
- [24] 吕珍珍, 程滢, 李昌松, 等. UPLC-MS/MS法同时测定不同动物源性食品中硝基呋喃类代谢物残留 [J]. *食品工业科技*, 2020, 41(12): 245-250,255.
LV Z Z, CHENG L, LI C S, et al. Simultaneous determination of nitrofurans metabolite residues in different animal derived foods by UPLC-MS/MS [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(12): 245-250,255 (in Chinese).
- [25] 丁春燕. 青虾中硝基呋喃类代谢物残留的检测研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019.
DING C Y. Study on the detection of nitrofurans metabolites residues in shrimps[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019 (in Chinese).