

关键词

全自动固相萃取；均质器；浓缩仪；高效液相色谱-串联质谱；硝基呋喃代谢物

介绍

硝基呋喃类药物在人类疾病治疗上也有一定的应用。呋喃妥因（呋喃坦啶）为抑菌剂，多数大肠杆菌、肠球菌对其敏感。呋喃唑酮（痢特灵）口服吸收少，肠内浓度高。主要用于细菌性痢疾和旅游者腹泻。呋喃它酮内服后在肠道不易吸收，故主要用于肠道感染，也可用于球虫病、火鸡黑头病的治疗。呋喃西林临床仅用作消毒防腐药，用于皮肤及粘膜的感染，如化脓性中耳炎、化脓性皮炎、急慢性鼻炎、烧伤、溃疡等。对组织几无刺激，脓、血对其消毒作用无明显影响。

硝基呋喃类因为价格较低且效果好，而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，个别国家已经禁止硝基呋喃类药物在畜禽及水产动物食品中使用，并严格执行对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》进行了鱼肉样品中硝基呋喃代谢物的检测。

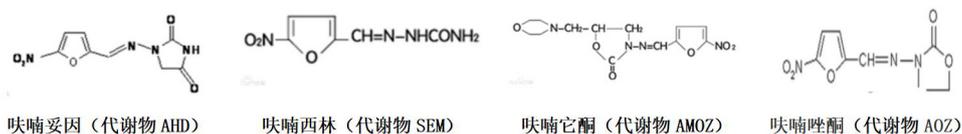


图1. 四种硝基呋喃类代谢物结构图

1. 仪器和耗材

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站；

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪；

Raykol AH-30 全自动均质器；

Raykol MPE 高通量真空平行浓缩仪；

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪；

HLB 固相萃取柱 (RayCure HLB, 60mg/3 mL, RC-204-36473)；

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

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；

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 标准工作曲线配制

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), 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扰)。向 5 个离心管中分别加入适量四种硝基咪唑代谢物混合标准溶液, 使四种硝基咪唑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, 使四种硝基咪唑代谢物内标物最终测定浓度均为 2.0 ng/mL。

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。(由于硝基咪唑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, 硝基咪唑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	Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪
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, 4 000 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 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 高通量全自动固相萃取仪进行固相萃取柱的净化, 样液以 1 mL/min 的流速通过 Oasis 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 Oasis 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 AutoEVA-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	6	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	180	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 硝基呋喃代谢物固相萃取方法

3. 检测条件

表 1. 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μ m \times 21 mm \times 150 mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A: 0.3% 乙酸水溶液, B: 0.3% 乙酸乙腈溶液
柱温	35 $^{\circ}$ C
进样体积	10 μ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 $^{\circ}$ C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	具体洗脱请见国标

3.1 MRM 参数

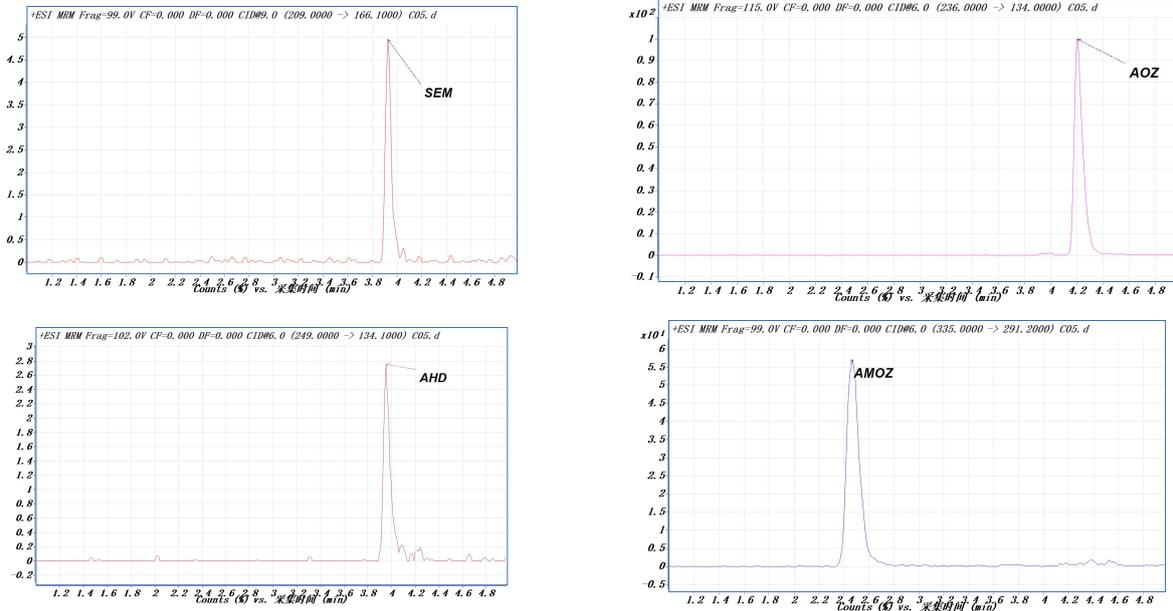
表 2. 4 种呋喃代谢物的串联质谱检测参数 (具体数值请参考标准)

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
AMZ	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

3.2 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

4.1 样品基质加标回收实验

为了验证该方法的回收率，本实验向鱼肉样品

（2 g）中加入上述 4 种咪唑代谢物标准品（20 μ L，100 μ g/L），进行加标回收验证。测试结果（如表 3）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 3. 新鲜鱼肉中的加标回收率及 RSD 值（2 μ g/kg）

化合物 (Compound)	加标量 (ng/g)	平均回收量	平均回收率 (%)	RSD (%)
AMOZ	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

5.1 硝基咪唑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。

5.2 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。

5.3 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。

5.4 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。

6. 解决方案的优势

睿科 AH-30 全自动均质器实现多任务的高通量均质，完全取代了手动均质的过程。一次最多处理 32 个样品，大大提高工作效率。

睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站能够实现混标制备、标准曲线制备、样品添加和分液等液体样品处理功能，全程无需人员值守，极大减轻工作量并且保护实验人员的身体健康；同时仪

器程序化运行可以有效避免人为误差，保证曲线的精密性和准确性。

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。

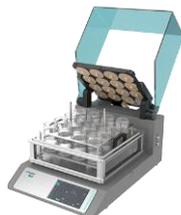
MPE 真空平行浓缩仪/AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪，大大地提高了样品前处理效率，真正完全解放实验室人员劳动。



全自动均质器
均质



全自动液体样品处理工作站
标曲配制



高通量真空平行浓缩仪
预浓缩



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.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

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5月版