

全新一代TSQ Plus系列三重四极杆液质联用仪快速检测食品基质中硝基呋喃类代谢物多残留

牛夏梦 高鹏 陈冰 孙银 郭藤 徐牛生
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

三重四极杆质谱；TSQ Plus系列；硝基呋喃代谢物；药物残留

摘要

本文基于Thermo Scientific™ TSQ Plus系列全新液相色谱串联质谱三重四极杆平台建立了快速检测食品基质中四种硝基呋喃类代谢物残留的方法。优化后的色谱条件如下：Thermo Fisher Hypersil Gold (2.1×50 mm, 1.9 μm)，甲醇：水（0.1%甲酸，5 mmol乙酸铵）为流动相，流速0.30 mL/min，柱温40℃。采用ESI源，正离子模式，扫描方式为选择反应监测（SRM）。结果表明：TSQ Plus系列质谱检测4种硝基呋喃代谢物，线性关系良好， $R^2 > 0.99$ ，LOD及LOQ均能满足国标规定的检测要求，连续进样6针，重复性较好，RSD均低于5%。采用该方法对基质样品进行分析，均取得了满意的灵敏度和重现性结果，可实现对硝基呋喃类代谢物的检出和定量工作。

前言

硝基呋喃及其代谢物是一类人工合成的广谱类抗菌剂，对大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、真菌和原虫等病原体均有杀灭作用，主要应用于动物以及水产品的肠道、粘膜等感染疾病的预防和治疗工作，对人体有致癌以及致畸胎的副作用。硝基呋喃类药物本身在生物体内代谢迅速，但是代谢的部分化合物分子会与细胞膜蛋白共价结合，结合体可长期保持稳定，延缓药物在生物体内的消除速度。当人类吃了含有硝基呋喃类药物残留的动物源性食品，结合体在人类胃液的酸性条件下可以从结合态中释放出来从而被人体吸收，进而影响人体健康。

世界许多国家都禁止在食用性动物养殖过程中使用硝基呋喃。2005年中国出台针对硝基呋喃代谢物相关的食品限定标准：SN/T 1627-2005《进出口动物源食品中硝基呋喃类代谢物残

留量测定方法》(LOQ为1.0 μg/kg)。2010年中国卫生部将硝基呋喃代谢物：呋喃它酮、呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃西林列入可能违法添加的非食用物质的黑名单中。关于硝基呋喃代谢物的标准一直有更新补充，截止到2022年3月，硝基呋喃最新的标准是GB 31656.13-2021《食品安全国家标准水产品中硝基呋喃类代谢物多残留的测定 液相色谱-串联质谱法》。

LC-MS/MS是分析动物源性食品中残留硝基呋喃代谢物的重要方法，具有较高的灵敏度和选择性。本文建立了基于TSQ Plus系列全新一代串联质谱平台分析4种硝基呋喃代谢物的方法，该方法满足现行国家标准法规要求，具有较好的灵敏度、重现性和线性范围。实际样品分析结果较好，可用于动物源食品中硝基呋喃代谢物类药物的准确定量分析。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo Fisher Vanquish Binary Core超高效液相色谱；

Thermo Fisher TSQ Fortis Plus系列三重四极杆质谱，配ESI源；

Thermo Fisher Hypersil GOLD C₁₈色谱柱（2.1×50 mm, 1.9 μm）；

4种硝基呋喃代谢物标准品溶液（纯度大于99.9%，浓度100 μg/mL，阿尔塔公司）；

甲醇（质谱纯，Thermo Fisher）；水（质谱纯，Thermo Fisher）；

甲酸（质谱纯，Thermo Fisher）；乙酸铵（质谱纯，Thermo Fisher）。

1.2 化合物信息及溶液配制

4种硝基咪喃代谢物的化合物信息:

化合物名称	英文简称	CAS	分子式	分子量	浓度 $\mu\text{g/mL}$
咪喃西林	2-NP-SEM	16004-43-6	$\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_3$	208.06	100.3
咪喃唑酮	2-NP-AOZ	19687-73-1	$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4$	235.06	99.8
咪喃妥因	2-NP-AHD	623145-57-3	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4$	248.05	99.9
咪喃它酮	2-NP-AMTZ	183193-59-1	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5$	334.13	99.2

储备液的配置: 精确移取目标物质标准品, 配置浓度约为10 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液作为备用。

标准品配置: 以甲醇水(50:50, V:V)为稀释剂, 稀释储备液成系列标准曲线, 浓度范围为: 0.01–200 ng/mL。

1.3 实验方法

色谱条件: 色谱柱: Hypersil GOLD C18 (2.1 \times 50 mm, 1.9 μm); 流速: 0.30 mL/min; 柱温: 40 $^\circ\text{C}$, 进样量: 5 μL 。流动相及洗脱梯度程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A/0.1%甲酸+5mmol 乙酸铵	B/甲醇	流速/ $\mu\text{L}/\text{min}$
0.0	85	15	300
0.5	70	30	300
1.5	10	90	300
3.0	10	90	300
3.1	85	15	300
5.0	85	15	300
5.50	95	5	350

质谱条件: ESI源, 正离子模式, 毛细管电压3.7 kV (+); 雾化温度420 $^\circ\text{C}$; 离子传输管温度300 $^\circ\text{C}$; 鞘气: N_2 , 40Arb; 辅助气: N_2 , 5Arb; 碰撞气: 高纯氩气, 2.0 mTorr; 扫描模式: SRM。4种硝基咪喃代谢物的监测离子对、RF lens电压以及碰撞能量等参数见表2。

表2 4种硝基咪喃代谢物SRM参数

化合物	母离子 (m/z)	RF Lens (V)	Source Fragmentation (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
2-NP-SEM	209.047	111	22.857	165.967*	8.87
				191.967	10.01
2-NP-AOZ	236.047	114	24.49	133.967*	11.59
				103.967	20.47
2-NP-AHD	249.047	119	27.755	133.8*	10.16
				103.967	21.68
2-NP-AMTZ	335.13	127	16.327	291.05*	10.73
				261.05	15.53

注: *为定量离子

2 结果与讨论

2.1 仪器灵敏度测试

采用上述仪器分析方法, 4种硝基咪喃代谢物在5min内均可以得到良好的峰形以及响应, 图1为目标物质在国标检出限浓度下的提取离子流图。

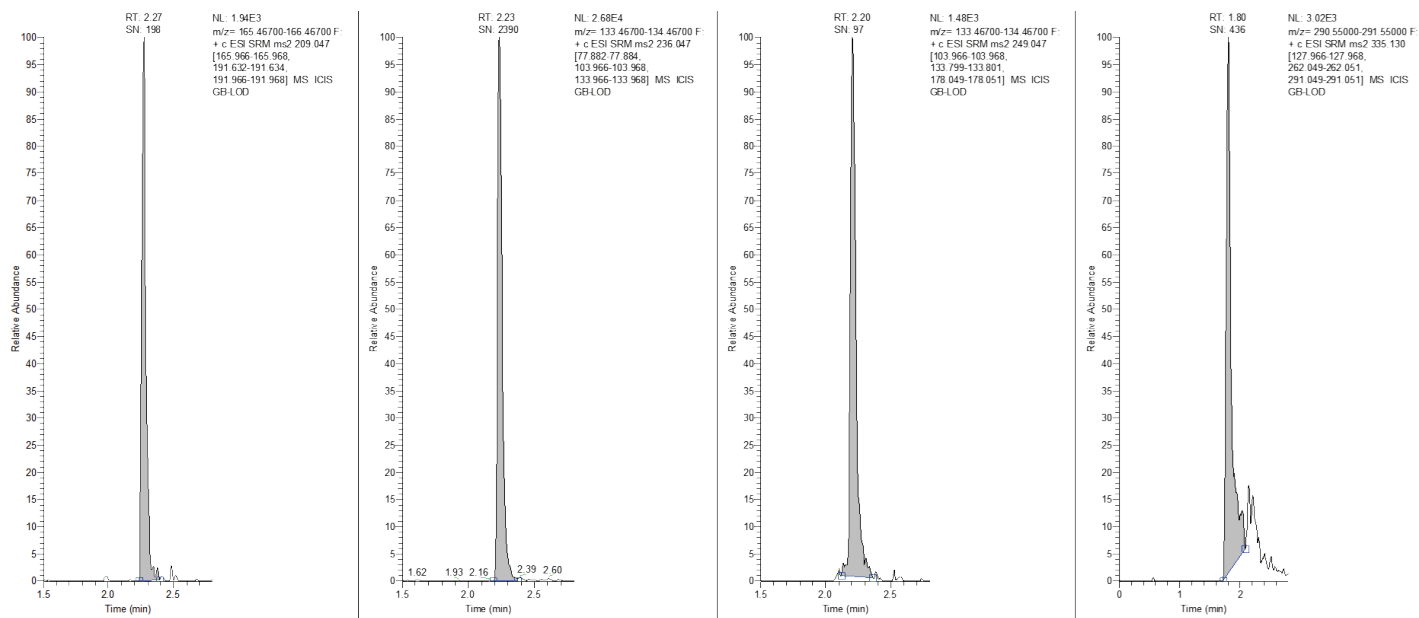


图1 4种硝基咪唑代谢物提取离子流图

2.2 线性范围测试

将标准储备液进行逐级稀释，配置成系列标准曲线。采用上述仪器分析方法，考察仪器的线性范围。结果表明四种硝基咪唑代谢物良好的线性关系，线性相关系数 R^2 均大于0.99。4种硝基咪唑类代谢物线性方程、线性相关系数结果见表4，化合物标准曲线图见图2。

表3 4种硝基咪唑代谢物LOD、LOQ和线性曲线测试结果

化合物	RT	线性范围	线性方程	R^2
2-NP-SEM	2.27	0.05-200	$Y=3.922e3X+2.127e2$	0.9995
2-NP-AOZ	2.23	0.01-20	$Y=8.93e4X+8.405e2$	0.9972
2-NP-AHD	2.20	0.1-200	$Y=3.014e3X+2.291e2$	0.9996
2-NP-AMOZ	1.80	0.02-200	$Y=3.397e4X+6.946e2$	0.9996

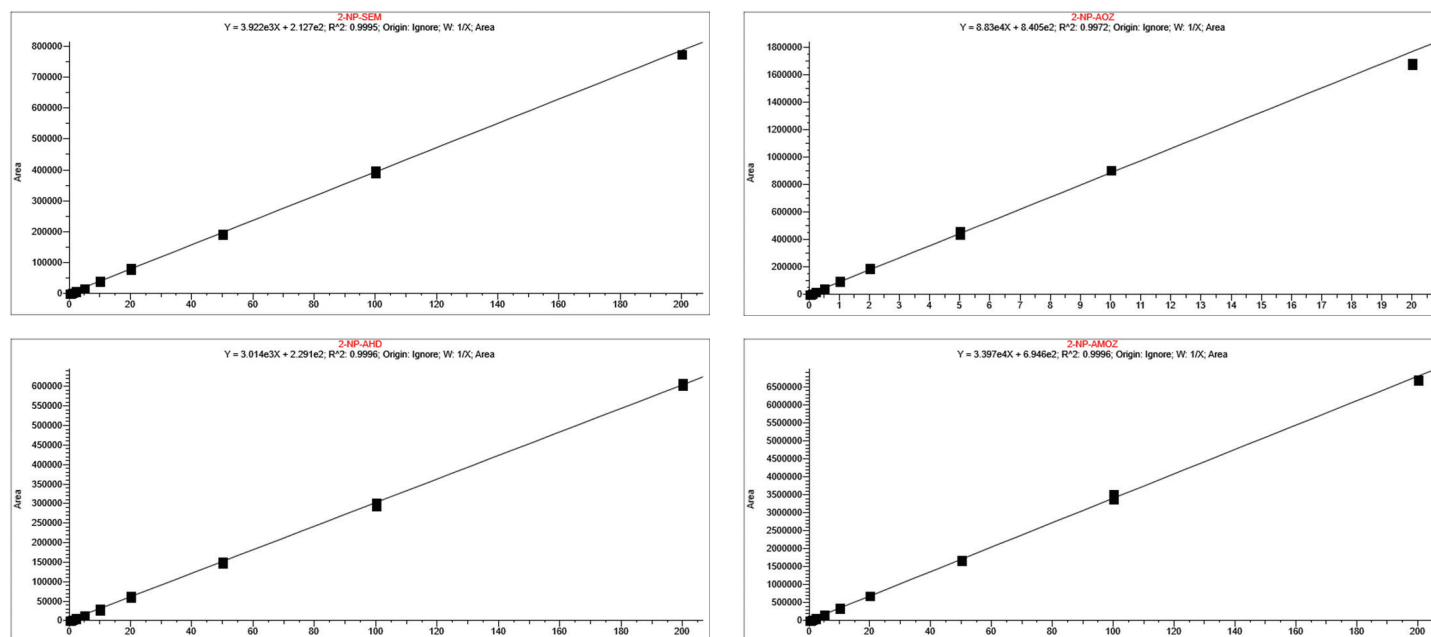


图2 4种硝基咪唑代谢物的标准曲线图

2.3 稳定性测试

将0.5ng/mL的标准溶液连续进样6针考察TSQ Plus在痕量浓度下的重现性，实验结果表明，4种硝基咪唑代谢物的RSD值均小于5%，数据重现性优异，结果见表4。

表4 0.5ng/mL硝基咪唑代谢物连续进样6针峰面积重现性

化合物	1	2	3	4	5	6	RSD%
2-NP-SEM	2038	2093	1901	1934	2064	1921	4.15
2-NP-AOZ	51017	45505	47125	48173	50711	48547	4.34
2-NP-AHD	1954	2026	2153	1919	1959	2015	4.15
2-NP-AMAZ	17829	18091	18983	19565	18155	19839	4.49

2.4 实际样品分析

往猪肉类基质中添加4种硝基咪唑代谢物标准品，按照本文所建立方法进行分析。由图3可以看出，4种硝基咪唑代谢物均得到了比较好的分析结果，各离子通道在扫描时间内不存在干扰峰和溶剂效应。连续进样6针国标检出限浓度的基质加标样品，考察4种硝基咪唑代谢物在基质溶剂下的重现性。实验结果表明，4种硝基咪唑代谢物的RSD值均小于5%，仪器方法稳定性良好，满足GB 31656.13-2021定量限的要求。

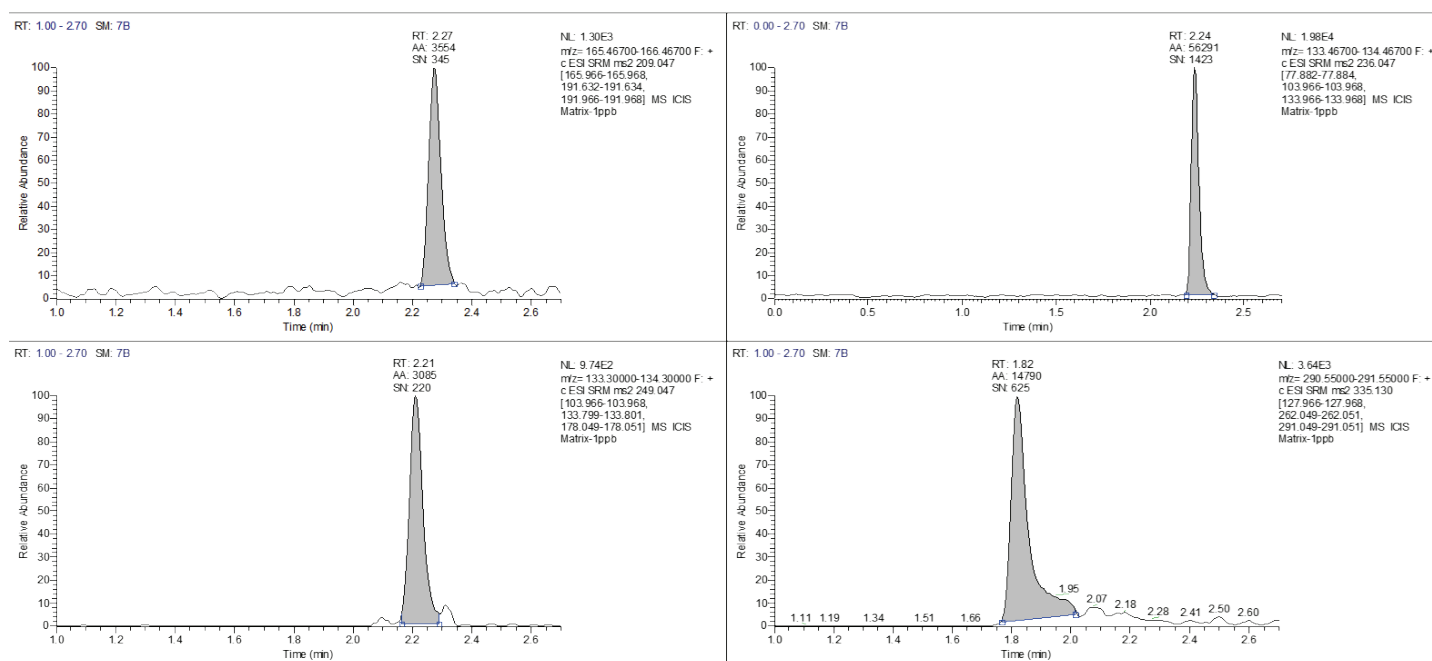


图3 肉类基质样品实际分析结果

表5 基质加标1ng/mL硝基咪唑代谢物连续进样6针峰面积重现性

化合物	1	2	3	4	5	6	RSD%
2-NP-SEM	4004	3723	3899	3888	4088	4029	3.32
2-NP-AOZ	53389	52562	55905	54887	57635	59191	4.53
2-NP-AHD	3162	3137	3348	2945	3131	3252	4.27
2-NP-AMAZ	11951	12891	13718	12978	12479	12961	4.58

3 结论

本文建立了全新一代TSQ Plus系列三重四极杆分析动物源性食品中4种硝基呋喃代谢物的方法。Thermo Fisher TSQ Plus系列三重四极杆质谱系2021年全新质谱产品，采用分段式共轭双曲面四极杆和双模式离散打拿极检测器，以及专为提供稳定分析数据改良设计的离子源。TSQ Plus系列三重四极杆可实现较快的极性切换，每次运行可通过极性切换实验分析更多化合物，提高生产力；方法建立中Thermo Scientific™ mzCloud™数据库集成，可访问上万种精选化合物，直接导入谱库里现有的离子对信息，降低标准品购买的成本，节约化合物优化时间。本方案针对4种硝基呋喃代谢物检测均取得了很好的灵敏度，连续进样6针，4种硝基呋喃代谢物RSD≤5%，具有非常好的重现性。采用该方法对基质样品进行分析，也均取得了满意的灵敏度和重现性结果，各离子通道在扫描时间内不存在基质干扰峰，可准确定量定性。



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC