

安捷伦液相 / 离子阱(XCT)质谱检测虾仁及家禽中硝基呋喃代谢物

应用

食品分析

作者

Bernhard Wüst, Christian Sauber
Agilent Technologies GmbH,
Hewlett-Packardstr. 8, 76337
Waldbronn
Germany

Hans (J.) A. van Rhijn
RIKILT -Institute of Food Safety
Bornsesteeg 45,6700 AE Wageningen
the Netherlands

摘要

在液相 / 离子阱质谱上, 利用液相 / 质谱 / 质谱方法对鸡肉及虾仁中硝基呋喃代谢物残留进行了定性定量分析。对于四种硝基呋喃代谢物的定量限在 0.125 到 0.5 µg/Kg 的范围内, 完全满足欧盟的 1 µg/kg 的最低检测限量的要求。

前言

硝基呋喃作为抗菌药物而被广泛地用于牛, 猪, 虾仁及家禽中。在 1995 年, 欧盟发布指令, 禁止在食用动物中使用呋喃它酮, 呋喃妥因, 呋喃唑酮及呋喃西林四种药物。由于上述药物具有快速代谢的性质, 因此无法直接检测原药化合物, 而是检测其相应的代谢物。液相色谱 / 质谱 / 质谱方法是一种非常灵敏的分析方法, 非常适合于虾仁及家禽中的硝基呋喃代谢物的定性定量检测。四种硝基呋喃及其代谢物的结构如图 1 所示。

实验

液相 / 质谱 / 质谱分析是利用安捷伦的 1100 XCT 离子阱质谱上进行的。它带有交叉直角电喷雾离子源。操作采用正离子多反应模式(MRM)。氘代 NBA-AMOX 和 NBA-AOX 作为同位素内标化合物。



Agilent Technologies

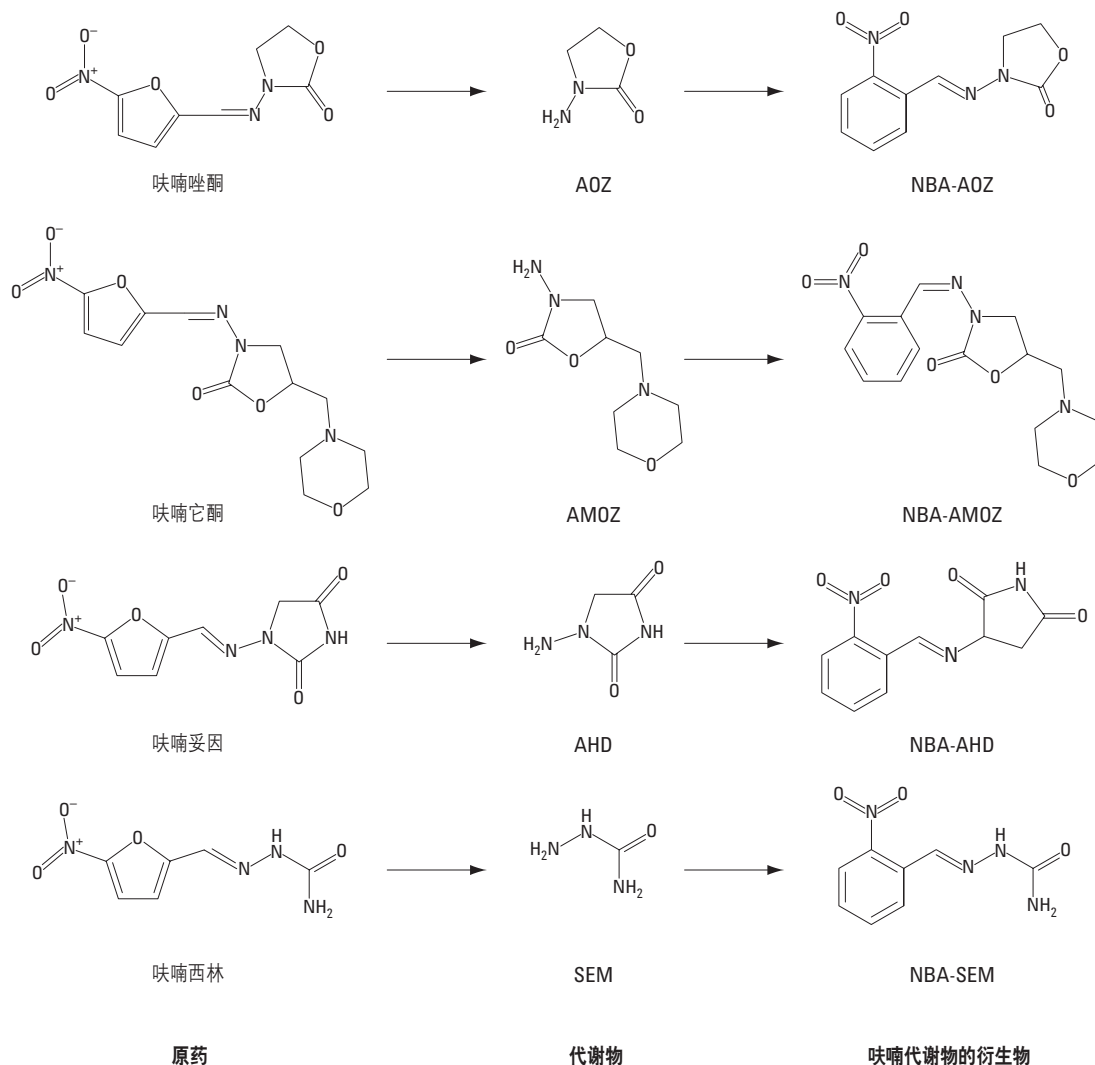


图 1. 四种硝基呋喃及相应的代谢化合物的化学结构

样品制备

取 1 克已绞碎的虾仁或猪肉样品，与 5 mL 含 0.2 M 盐酸的水溶液混合，然后加入 50 微升的二硝基苯甲醛溶液(100 mM 二硝基苯甲醛甲醇溶液)。在 370 °C 下，震荡过夜。本方法是基于荷兰农产品质量控制署的标准操作程序 (RIKILT, Netherlands)。使用此方法，通过酸解，将被键合的硝基呋喃残留基团解吸出来。这些含自由氨基基团的化合物，即硝基呋喃代谢物，与 2 - 硝基苯甲醛反应，最后生成芳香亚胺类衍生物。反应产

物用 500 微升 0.3 M 的磷酸钠溶液中和，然后用 2 M 的氢氧化钠溶液将 pH 值调节至 7。加入 4 mL 的乙酸乙酯，然后离心。将有机相转移至干净的试管。上述萃取过程重复一次。将两次的乙酸乙酯有机相合并，然后在氮气流下，吹干。加入 500-μL 溶剂溶解 (50 mL 乙腈，80 mL 水及 0.5 mL 的乙酸)。最后用液质联用分析。

标准曲线的建立方法是，在样品前处理之前，在虾仁或猪肉中加入四种已知浓度的未衍生化的标准样品，然后经过衍生化，最后分析。

化学试剂

甲醇	(Biosolve, 13683502)
盐酸, 32%	(Merck, 100319)
2- 硝基苯甲醛(2-NBA)	(Sigma, N6001)
12 结晶水的磷酸钠	(Merck, 106578)
氢氧化钠	(Merck, 106498)
乙酸乙酯	(Biosolve, 05402602)
乙酸	(Merck, 10063)
乙腈	(Biosolve, 01203502)
氘代甲醇, 99.5%	(Aldrich, 15.193-9)

液相 / 质谱 / 质谱的方法

高效液相色谱(HPLC):	Agilent 1100
流动相流速:	0.4 mL/min
色谱柱:	Zorbax XDB-C8, 2.1 mm x 50 mm, 3.5 μ m
流动相:	A: H ₂ O + 0.1% 乙酸 B: 乙腈 + 0.1% 乙酸 梯度: 0-14 min; 10% A -45% A; 14-16 min; 45% A -90% A
进样体积:	500 μ l 样品中抽取 50 μ l

1100 LC/MSD XCT 离子阱质谱

离子模式:	ESI 正离子模式
雾化器压力:	45 psi
干燥气流速:	12 L/min
干燥气温度:	350 °C
锥孔电压(Skimmer):	20 V
毛细管出口电压:	55 V
离子阱阱深(Trap Drive):	55
ICC:	on

多反应检测模式(MRM)

4 段时间编程:	0-2.2 min, 2.2-7.4 min, 7.4-10.6 min, 10.6-13.9 min			
时间段 1:	切换阀位置: 处于到废液, 不采集数据			
时间段 2:	<i>m/z</i> 335 的 MS/MS,	Isolation width: 2.0,	Cut-off: 140,	Amplitude: 1.16
	<i>m/z</i> 340 的 MS/MS,	Isolation width: 2.0,	Cut-off: 140,	Amplitude: 1.16
时间段 3:	<i>m/z</i> 209 的 MS/MS,	Isolation width: 2.0,	Cut-off: 140,	Amplitude: 1.28
	<i>m/z</i> 249 的 MS/MS,	Isolation width: 2.0,	Cut-off: 140,	Amplitude: 1.25
时间段 4:	<i>m/z</i> 236 的 MS/MS,	Isolation width: 2.0,	Cut-off: 140,	Amplitude: 1.25
	<i>m/z</i> 240 的 MS/MS,	Isolation width: 2.0,	Cut-off: 140,	Amplitude: 1.25

定量分析

NBA-AM0Z:	EIC of 261 + 291 (<i>m/z</i> 335 的 MS/MS),	保留时间: 4.5 min
NBA-dAM0Z:	EIC of 266 + 296 (<i>m/z</i> 340 的 MS/MS),	保留时间: 4.5 min
NBA-SEM:	EIC of 166 + 192 (<i>m/z</i> 209 的 MS/MS),	保留时间: 9.9 min
NBA-AHD:	EIC of 134 (<i>m/z</i> 249 的 MS/MS),	保留时间: 10.0 min
NBA-A0Z:	EIC of 134 (<i>m/z</i> 236 的 MS/MS),	保留时间: 10.8 min
NBA-dA0Z:	EIC of 134 (<i>m/z</i> 240 的 MS/MS),	保留时间: 10.8 min
Max Acc time:	150 ms	
Smart target:	100000	
Scan:	100-350	

结果与讨论

法规对于硝基咪唑代谢化合物的检测限量要求越来越严格。衍生化可以提高离子化效率同时改善色谱的分离性能。采用液-液萃取模式,可以提高浓缩倍数,降低最小检测限(LOD)。

在分析过程中,离子阱质谱采用多反应检测模式。在此种模式下,目标离子被选择为母离子,然后进行质谱/质谱分析,最后采集全扫描的二级质谱图。数据的全扫描二级质谱图可以与标准谱图比较,可以直接用于化合物的确认,如图 2。

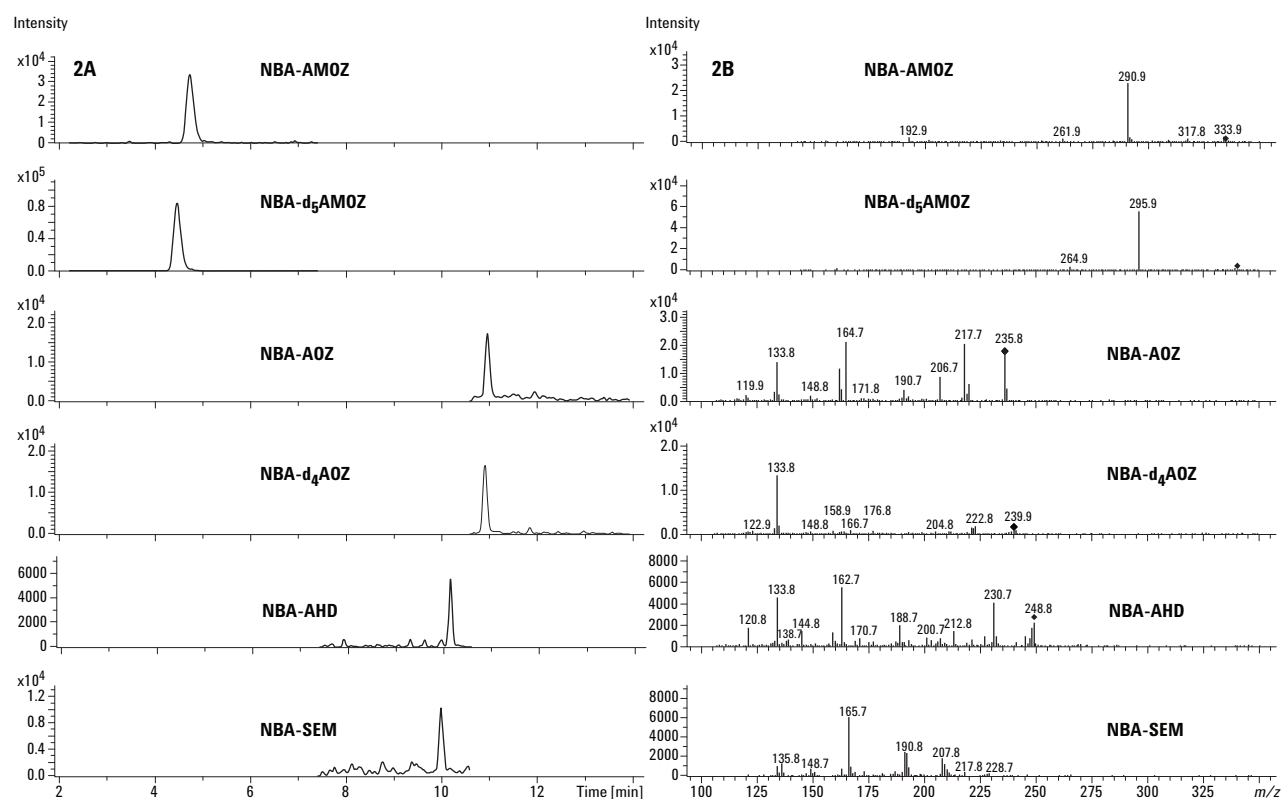


图 2. 四种硝基咪唑代谢物的典型谱图 (2A) 和它们的二级质谱图

选择二级质谱图中的某一个或几个特征子离子进行定量分析。可以得到很高的信噪比，如图 3 和 4 所示。

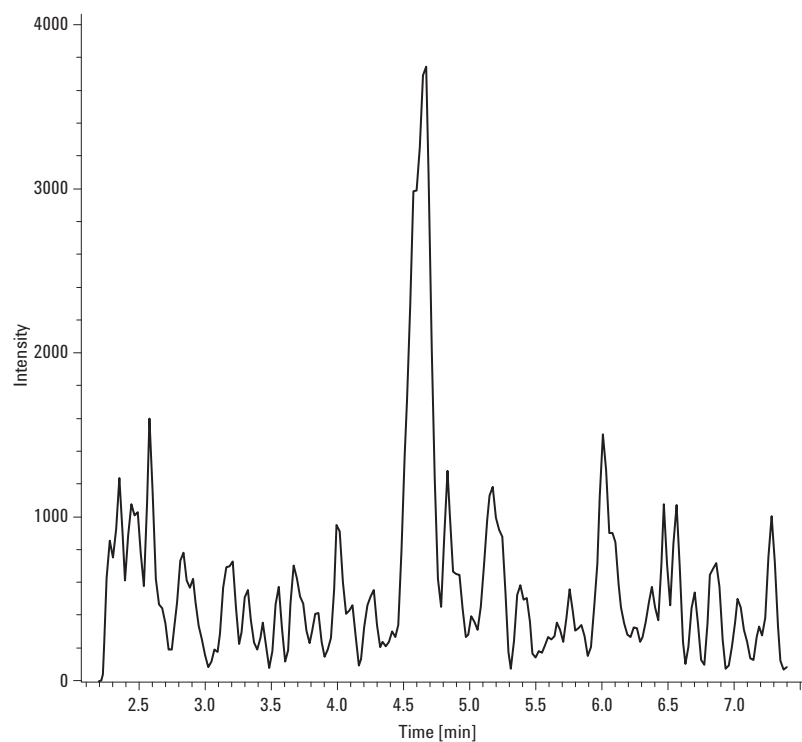


图 3. 在虾仁样品中，NBA-AM0Z的检测限可达 $0.125 \mu\text{g}/\text{kg}$

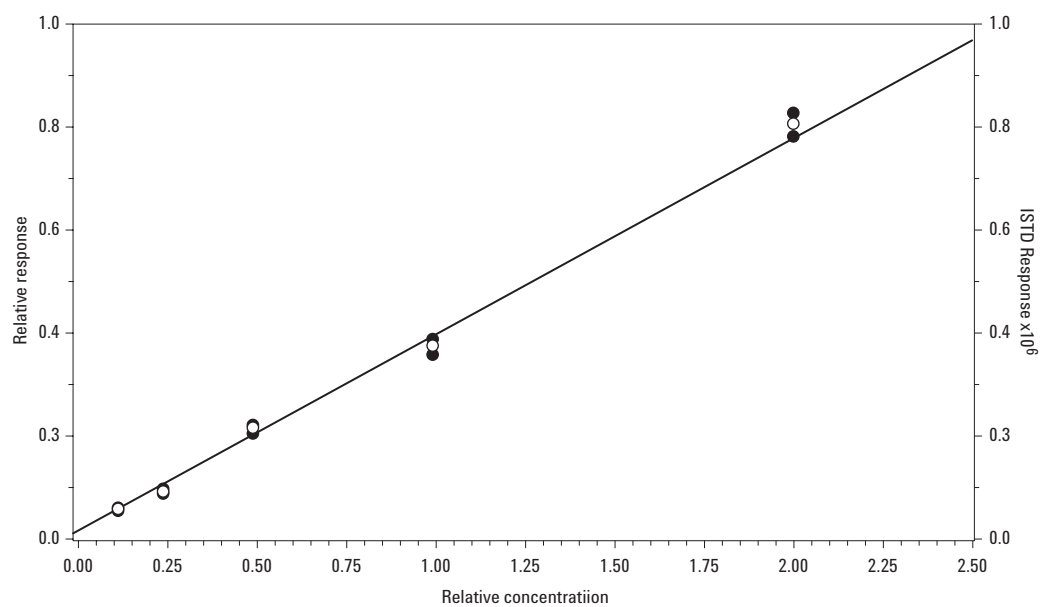


图 4. 对于 NBA-AM0Z, 猪肉样品基质, $0.125 \mu\text{g}/\text{kg}$ - $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 范围的校正曲线, 重复三次

对于 NBA-AMTZ 和 NBA-SEM，用两个子离子的加和来进行定量分析，而 NBA-AHD 和 NBA-AOZ 则用一个子离子进行定量分析。

欧盟对于硝基呋喃代谢物的最低限量要求是 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。而本方法对于四种硝基呋喃代谢物的最低检测限分别为，NBA-AMTZ: $0.125\text{ }\mu\text{g/kg}$, NBA-AOZ 和 NBA-SEM: $0.25\text{ }\mu\text{g/kg}$ 和 NBA-AHD: $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。结果完全满足欧盟的法规要求。

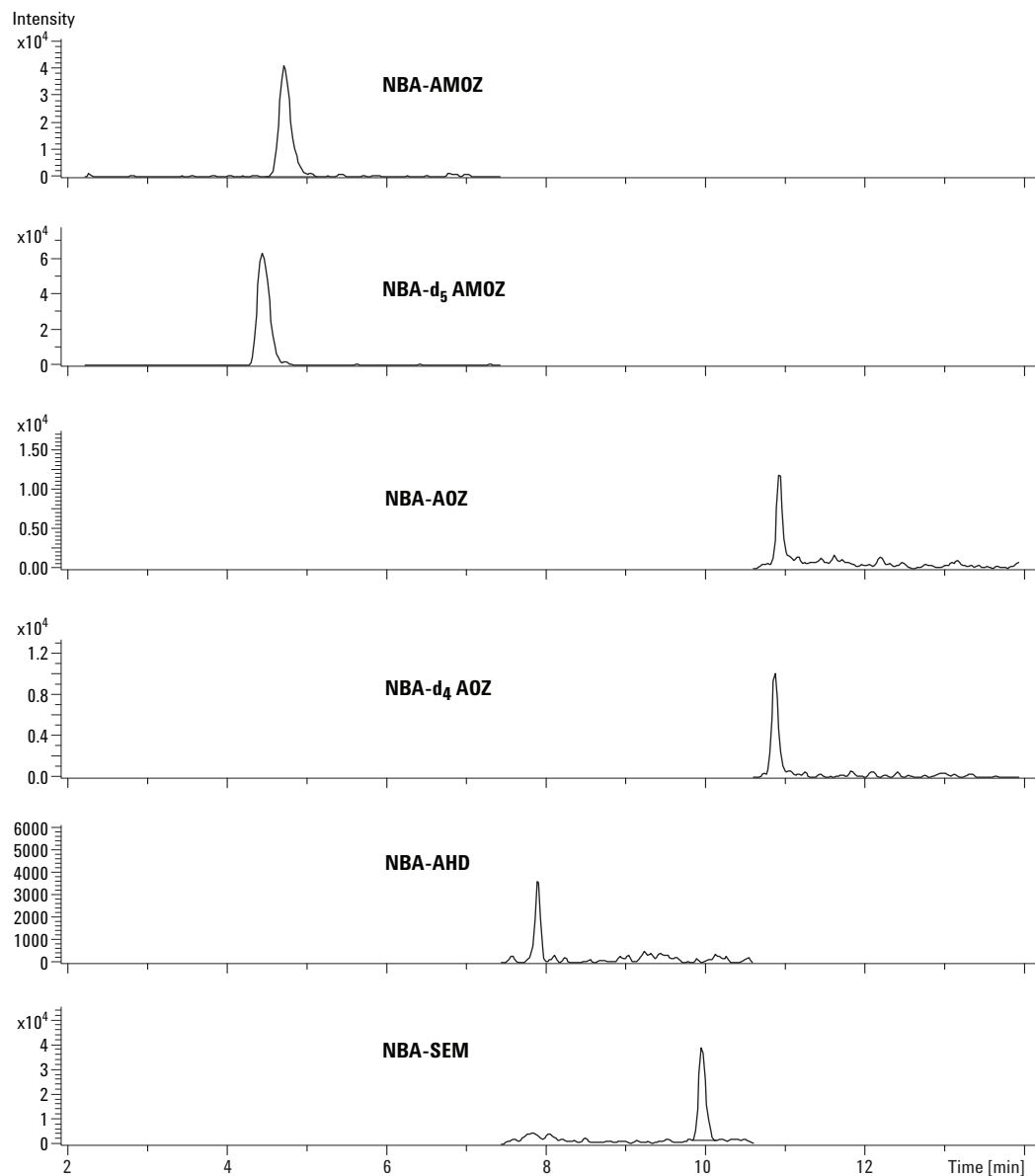


图 5. 虾仁样品中标样添加水平为 $0.25\text{ }\mu\text{g/kg}$ 时的典型质谱萃取离子流图

在 0.125 µg/kg-2 µg/kg 的范围，建立了校正曲线，其线性回归大于 0.99。对于所有的浓度水平下，相对标准偏差(RSD)小于 10%。其分析结果图表 1 所示。

表 1. 四种硝基咪唑代谢物的分析方法重现性和分析精确度

Standard (µg/kg)	NBA-SEM		NBA-AOZ		NBA-AMOZ		NBA-AHD	
	SD %	Accuracy % (average)	SD %	Accuracy % (average)	SD %	Accuracy % (average)	SD %	Accuracy % (average)
0.125	3.77	98.81	2.29	98.94	4.34	101.10		
0.25	2.26	102.72	2.52	101.76	5.87	95.55	6.05	98.31
0.5	3.40	100.72	3.35	100.58	6.21	105.19	4.59	103.87
1	3.56	96.62	3.01	101.90	5.46	99.11	6.53	100.22
2	2.94	101.12	2.13	96.82	5.77	99.05	6.97	97.60

All calibration curves linear weighted 1/x n = 6

结论

使用 XCT 离子阱质谱，建立了虾仁及鸡肉中的四种硝基咪唑代谢物残留的检测方法。其最低检测限在 0.125 µg/kg到 0.25 µg/kg的范围内，满足欧盟规定的最低要求限量(MRPL)。

其他信息

如需了解更多我们的产品和服务信息，请访问
www.agilent.com/chem

安捷伦科技公司对本文中可能有的错误,或与装置、性能即材料使用有关内容而带来的意外伤害和问题不负任何责任。

本文内容如有变动,恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司, 2004

中国印刷
2004 年 5 月 11 日
5989-0738CHCN



Agilent Technologies