

高效液相色谱 - 串联质谱法测定水产品中的喹乙醇

曾 静^{1,2} 朱宽正¹ 王 鹏² 林雁飞² 胡小钟²

(1. 华中科技大学同济医学院,湖北 武汉 430030;2. 湖北出入境检验检疫局,湖北 武汉 430022)

摘 要:为测定水产品中喹乙醇的残留量,建立了高效液相色谱 - 串联质谱联用(HPLC - MS/MS)的测定方法。均质后的试样经水提取、液 - 液分配净化后,采用 ZORBAX SB - C₁₈ 色谱柱,并以 0.1%乙酸 + 乙腈(70 + 30,体积分数)为流动相,色谱分离后直接进入串联质谱检测器。采用电喷雾正离子,多反应监测(MRM)模式检测,外标法定量。方法的检出限为 10 μg/kg,浓度在 0.5 ~ 500 μg/L 范围内,线性良好($r=0.9989$),添加浓度在 10 ~ 500 μg/kg 时,不同水产品基质的回收率在 74.3% ~ 93.5% 之间,相对标准偏差(RSD)小于 5.6%。本方法检出限低,回收率高,定性可靠,定量准确,适合于水产品中喹乙醇残留的检测。

关键词:色谱法,高压液相;光谱分析,质量;喹乙醇;水产品

Determination of Olaquinox Residues in Aquatic Products by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZENG Jing, ZHU Kuan-zheng, WANG Peng, LIN Yan-fei, HU Xiao-zhong

(Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method was developed for determination of olaquinox residues in aquatic products. The targeted analyte was extracted from homogenized samples with water, and purified with liquid-liquid extraction. Chromatographic separation was achieved by using ZORBAX SB-C₁₈ column with an isocratic mobile phase consisting of 0.1% acetic acid and acetonitrile (70 + 30, V/V). Analytical identification and quantification were performed using multiple reaction monitoring (MRM) with one precursor ion and three product ions as identifiers and electrospray ionization in positive mode. The detection limit of this method was 10 μg/kg. It was linearly ranged from 0.5 to 500 μg/L with the correlation coefficient 0.9989. The recoveries for different matrices were 74.3% ~ 93.5% when the concentration of olaquinox ranged from 10 to 500 μg/kg, the RSD was lower than 5.6%.

Key word: Chromatography, High Pressure Liquid; Spectrum Analysis, Mass; Olaquinox; Aquatic Products

喹乙醇(Olaquinox),又称喹酰胺醇,是一种化学合成抗菌促生长剂。因其具有广谱抗菌效果和促生长作用,作为饲料添加剂被广泛用于畜禽及水产品的养殖。大量生物毒性试验研究表明,喹乙醇可在动物体内形成残留,具有明显的蓄积毒性和DNA显性损伤等毒副作用^[1]。基于可能对人体健康造成危害,欧盟委员会2788/98决议规定禁止喹乙醇的使用。国内也对喹乙醇的使用量做了限制,并且为了加强对喹乙醇的监控,先后制定了出口肉、动物饲料中喹乙醇的检测方法^[2,3]。为保证食品安全以及我国水产品的进出口,建立水产品中喹乙醇的测量方法是十分必要的。

目前,对于饲料、肉类以及水产品等食品中喹乙醇的检测方法主要是液相色谱法^[2-8],检出限都比较高,无法满足国际贸易的要求。随着液质联用技

术发展日趋成熟,该方法被越来越多地应用于动物源性食品中禁用药物的检测。M. R. S. Fuh等^[9]利用LC-MS建立了猪肉中喹乙醇等13种兽药的检测方法,C. Van Poucke等^[10]采用固相萃取法净化,利用LC-MS/MS对饲料中喹乙醇等5种禁用的促生长剂同时进行检测。本文针对水产品的喹乙醇残留,建立了高效液相色谱电喷雾串联质谱(LC-ESI/MS/MS)的检测方法。多种不同水产品的检测结果表明本方法操作简单,回收率高,检测限低,定性可靠,定量准确,能满足对喹乙醇的检测要求。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Agilent1100HPLC仪(美国,安捷伦公司),API3000三级四极杆质谱仪(美国,ABI公司),配有电喷雾离子源,HARVARD pump II 泵泵,HITACHI CD6D离心机,YAMATO 涡旋混合器。HH - S24S 恒温水浴锅(金坛市大地自动仪器厂)。

作者简介:曾静 女 工程师

喹乙醇,纯度为 99.6% (Riedel-de 公司)。将喹乙醇用色谱纯甲醇溶解并配制成 1 mg/ml 标准储备液,再根据需要稀释成适当含量的混合标准工作液。

4 下避光保存;甲醇、乙腈和正己烷均为色谱纯 (Scharlau 公司),实验用水为超纯水。

1.2 试样前处理 精确称取 5 g 均质的试样置于 50 ml 离心管中,加入 15 ml 水,振荡混匀后,放入 60 °C 恒温水浴中振荡提取 15 min,取出冷却至室温,4 000 r/min 离心 10 min。移取提取液至另一个离心管中,再向残渣中加入 10 ml 水按上述方法提取,合并 2 次提取液。取 2 ml 提取液,加入 1 ml 乙腈混匀后,4 000 r/min 离心 5 min,取清液加入 3 ml 正己烷,混匀后,弃去上层正己烷,下层清液过 0.45 μm 滤膜,供 LC-MS/MS 分析。

1.3 色谱和质谱条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈, 2.1 mm ×50 mm, 3.5 μm (Agilent, USA); 流动相:0.1% 乙酸+乙腈 (70+30, 体积分数); 流速:0.2 ml/min; 柱温:室温; 进样量:10 μl。

1.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源 (ESI); 扫描模式:正离子扫描; 离子源电压:5.5 kV; 离子源温度:400 °C; 氮气作为雾化气、气帘气和辅助气,其中雾化气为 7 psi, 气帘气为 9 psi, 辅助气流速为 7 L/min。监测模式:多反应 (MRM) 监测方式。选择 3 对监测离子对,其中母离子为 264.2, 相应的特征碎片离子分别为:212.3, 177.1 和 246.3。监测离子对的驻留时间 (Dwell time) 均为 100 ms, 去簇电压 (DP) 为 60 V, 对应的碰撞电压 (CE) 分别为:31 V, 24 V 和 20 V。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理 样品的前处理方法对喹乙醇的分析至关重要。根据文献报道^[7,8],喹乙醇在热水中溶解度很大,而在有机溶剂中溶解度较低,所以本文以水作为提取液,采用 60 °C 水浴加热的方法进行提取,经与乙腈作为提取液进行比较,结果显示采用热水作为提取液的回收率明显较高。其中乙腈作为提取液的回收率在 40% 左右,而热水作为提取液的回收率在 85% 以上。对于动物源性样品,脂肪等杂质是主要的干扰物质。由于采用热水作为提取剂,不可避免地存在大量的水溶性蛋白质、色素等杂质,严重影响喹乙醇的检测。本文采用乙腈去除蛋白质,并且加入正己烷进行净化,不仅能有效地去除提取液中的水溶性杂质,并且具有较强的脱色作用,处理后的提取液无色透明,过膜后可用于 LC-MS/MS 分析。因为水溶液不易浓缩处理,本试验采用部分提取液净化后,直接进样分析的方法,不仅操作简单,

提高了检测效率,而且避免了大量使用有机试剂,减少了对环境的污染。由于喹乙醇见光分解,整个实验应避免阳光的直射。

2.2 LC-MS/MS 分析 根据文献^[11]的报道,本文采用 ESI 正离子电离模式。将 1 mg/L 的喹乙醇标准溶液利用针泵以 10 μl/min 流动注射的方式在正离子模式下通过全离子扫描,找出准确的母离子峰,并且对其进行轰击,分别找出 3 个信号较强的碎片离子,以母离子和子离子组成监测离子对,以多反应监测 (MRM) 模式对待测物进行定性和定量分析。喹乙醇的离子碎片图如图 1,其碎片结构信息与文献^[10,11]相同,主要的碎片离子是 m/z 212.3 (丢失了 H₂O₂ 和 H₂O)、 m/z 246.3 (丢失了 H₂O) 和 m/z 177.1 (丢失了 C₂H₅N 和 CO₂)。选择丰度最强的碎片离子组成的监测离子对 m/z 264.2/212.3 用于喹乙醇的定量,而 m/z 264.2/177.1 和 m/z 264.2/246.3 用于其辅助定性。为了获得更高的离子强度,在多反应监测 (MRM) 模式下同时对质谱条件进行优化。

为了将待测物和杂质分开,选用 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm ×50 mm, 3.5 μm), 以不同比例的 0.1% 乙酸+乙腈作为流动相进行试验,当 0.1% 乙酸+乙腈比例为 70+30 (体积分数) 时,待测物和杂质得到很好的分离,峰形对称,峰宽较窄,且出峰较早。在优化的色谱条件下,喹乙醇的保留时间为 3 min (如图 2)。

2.3 方法的线性范围、检出限、回收率和精密度 采用喹乙醇标准溶液直接进样,喹乙醇浓度在 0.5 ~ 500 μg/L 范围内具有很好的线性关系,工作曲线方程为: $y = 4490x + 1530$, 其相关系数为 0.9989。以 3 倍信噪比为检出限 (LOD), 方法的检出限为 10 μg/kg。

以阴性鳊鱼和河虾样品为测试样品,喹乙醇的添加水平分别为 10、100、500 μg/kg, 每个水平在相同的实验条件下做 6 个平行样,对应工作曲线法计算每个试样的浓度,并计算回收率、相对标准偏差,结果见表 1。

表 1 试样加标回收率和重复测定的

试样	添加浓度 (μg/kg)	相对标准偏差 (n=6)	
		回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
鳊鱼	10	74.3	5.6
	100	91.2	3.4
	500	93.5	3.1
河虾	10	80.4	4.9
	50	89.6	3.7
	100	90.4	2.7

结果显示本方法检出限低,重现性好,回收率高,定性可靠,定量准确,适合于水产品中喹乙醇残留量的检测。

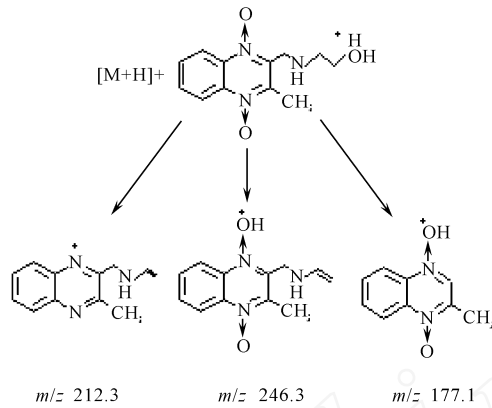
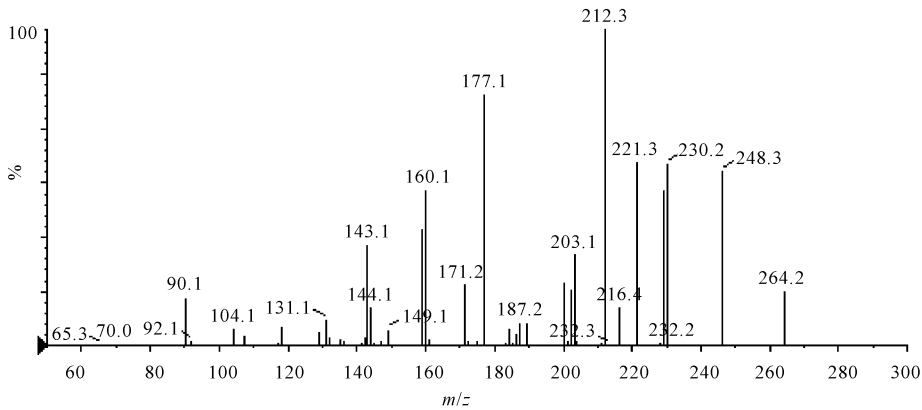


图1 喹乙醇的分子离子裂解碎片图

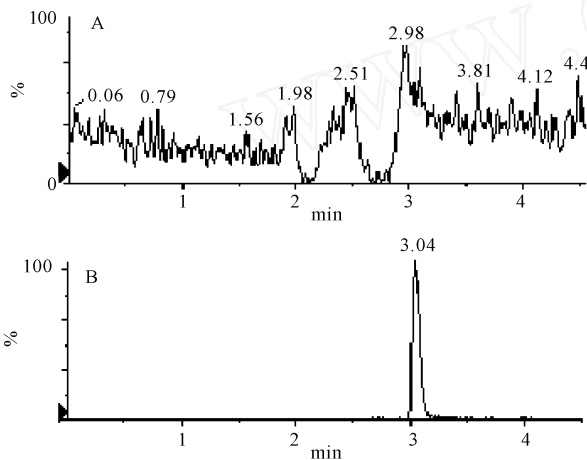


图2 空白河虾样品(A)和添加浓度为500 µg/kg的河虾样品的质量色谱图(B)

参考文献

[1] 徐韵,李兆利,陈海刚,等. 兽药添加剂喹乙醇对水生生物的毒理学研究[J]. 南京大学学报,2004,40(6):728-733.
 [2] SN 0197—1993. 出口肉中喹乙醇残留量检验方法[S].
 [3] GB/T 8381.7—2005. 饲料中喹乙醇的测定 高效液相色谱法[S].
 [4] 欧阳华学,雷华越,汪开毓. 测定饲料中喹乙醇含量的反相高效液相色谱法[J]. 分析测试学报,2002,21(3):73-74.

[5] 李来生,邱水平. 高效液相色谱法测定饲料中的喹乙醇[J]. 色谱,1997,15(5):440-441.
 [6] E Roets, I Quintens, R Kibaya, et al. Quantitative determination of olaquinox in animal feed[J]. J Planar Chromatogr, 2001,14:347-349.
 [7] 于慧娟,毕士川,黄冬梅,等. 高效液相色谱法测定水产品中喹乙醇的残留量[J]. 分析科学学报,2004,20(3):281-283.
 [8] 艾晓辉,刘长征,文华. 鱼组织中喹乙醇残留量高效液相色谱检测方法研究[J]. 湖北农学院学报,2003,23(4):266-270.
 [9] Fuh M R S, Chan S A, Wang H L. Determination of antibacterial reagents by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. Talanta, 2000,52:141-151.
 [10] Poucke C Van, Keyser K De, Baltusnikiene A, et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed[J]. Analytica Chimica Acta,2003,483:99-109.
 [11] Miao X S, March R E, Metcalfe C D. A tandem mass spectrometric study of the N-oxides, quinoline N-oxide, carbadox, and olaquinox, carried out at high mass accuracy using electrospray ionization[J]. Mass Spectrometry, 2003,230:123-133.

[收稿日期:2006-06-24]

中图分类号:R15;O657.63;TS254 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2006)05-0423-03