

高效液相色谱 - 质谱法测定水产品中孔雀石绿及其代谢物

郭德华, 叶长淋, 李波, 方晓明

(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

在水产养殖过程中, 人们经常使用各种药物进行水体消毒和防止鱼病害, 孔雀石绿就是其中的一种染料类杀菌剂^[1], 近年来发现它特别是其代谢物在水产品体内有明显的残留现象, 且代谢物的残留时间较长, 由于孔雀石绿化学官能团三苯甲烷是一种致癌物质, 所以欧盟、美国等宣布禁止其在经济鱼类(观赏鱼除外)养殖过程中使用。经文献检索, 国内虽有水产品中孔雀石绿残留量检验方法的报道^[2], 但未涉及代谢物残留量检测方法的报道。国外已建立的检测方法主要采用了气相色谱质谱联用法测定孔雀石绿代谢物^[3]、高效液相 - 色谱法同时测定孔雀石绿及其代谢物^[4-5]和高效液相色谱 - 质谱法同时测定孔雀石绿及其代谢物^[6]。我们利用 HPLC - VIS 和 Q - TOF MS 技术分别建立了高效液相色谱法(初筛法)和高效液相串联质谱法(确证法)两种检测方法。

1 实验部分

1.1 原理

试样中的残留物用乙腈 - 醋酸盐缓冲混合液提取, 乙腈再次提取后, 液液分配到二氯甲烷层, 最后用丙磺酸固相提取小柱净化, 洗脱液上机测定, 其中的隐性孔雀石绿用 PbO₂ 衍生柱还原为可见光处可检测的孔雀石绿, 外标法定量。对呈阳性的样品用液相色谱 - 四极杆串联飞行时间质谱法确证。

1.2 仪器与试剂

DX - 500 离子色谱仪配有紫外 - 可见光检测器(美国戴安公司); Waters 2695 高效液相色谱仪配有 QUltima 四极杆 - 飞行时间串联质谱仪(Q - Tof MS, 英国质谱公司); 高速均质器, 离心机: 3 000 r/min, SPE 固相萃取装置。

25% PbO₂ 氧化柱: 空的不锈钢预柱管, 3 cm × 4 mm i. d., 两端覆以 2 μm 的过滤板, 把拌有 25% PbO₂ 的硅藻土装柱, 添加数滴甲醇后压实后旋紧。临用前用甲醇冲洗。

Bond Elut LRC 丙磺酸(PRS - SPE)固相萃取小柱: 500 mg。

二氯甲烷, 甲醇、乙腈(液相色谱纯), 醋酸盐缓冲液(溶解 4.95 g 无水乙酸钠及 0.95 g *p*-甲苯磺酸于 900 mL 水中, 用冰醋酸调节溶液 pH 到 4.5, 最后用水稀释到 1 L), 20% (*w*) 盐酸羟胺水溶液, 0.2% 盐酸羟胺甲醇溶液(移取 1 mL 20% 盐酸羟胺水溶液到 100 mL 容量瓶, 用甲醇定容) 1.0 mol/L *p*-甲苯磺酸, 二甘醇, 孔雀石绿及隐性孔雀石绿标准品: 纯度大于 98%。孔雀石绿及隐性孔雀石绿标准溶液: 用甲醇配成质量浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。根据需要, 配成适当浓度的标准混合液。

1.3 仪器条件

1.3.1 HPLC - VIS 条件 色谱柱 1: Kromasil[®] KR60 - 5 CN, 150 mm × 4.6 mm, 10 μm, 在 CN 柱和检测器之间连接 25% PbO₂ 氧化柱; 流动相: 乙腈 - 醋酸盐缓冲液(体积比 55 : 45); 流速: 2.0 mL/min; 柱温: 室温; 检测波长: 618 nm; 进样量: 50 μL。

1.3.2 HPLC - MS - MS 条件 色谱柱 2: TSK - GEL[®] ODS, 250 mm × 2.0 mm, 在色谱柱和检测器之间连接 25% PbO₂ 氧化柱; 流动相: 0.05 mol/L 醋酸铵(pH 4.5) - 乙腈(体积比 25 : 75); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 50 μL; 电离方式: ESI +; 毛细管电压: 2.9 kV; 锥体电压: 55 V; 离子源温度: 120 °C; 干燥温度: 350 °C; 雾化气流量: 90 L/h; 干燥气流量: 490 L/h; 碰撞能量: 27 eV; 测定方式: TOF; 母离子(*m/z*): 329, 碎片离子(*m/z*): 313, 208。

1.4 测定步骤

准确称取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管内, 加入 1.5 mL 盐酸羟胺水溶液、2.5 mL *p*-甲苯磺酸溶液、5.0 mL 醋酸盐缓冲溶液, 用均质机以 15 000 r/min 的速度均质 30 s, 加入 10 mL 乙腈后剧烈震荡 30 s。将离心管置于离心机内以 3 000 r/min 的速度离心 10 min。把上清液转移至装有 10 mL 水和 2 mL 二甘醇的 100 mL 离心管中。加入 10 mL 乙腈, 重复上述操作, 将上清液转移至同一 100 mL 离心管中。

在离心管中加入 15 mL 二氯甲烷, 振荡 10 s 后, 置于离心机内以 2 000 r/min 的速度离心 10 min。用尖嘴移液管将下层溶液转移至 100 mL 的梨形烧瓶中, 再用 10 mL 二氯甲烷重复上述操作 1 次, 合并二氯甲烷层于同一梨形烧瓶中。于 45 °C 旋转蒸发至约 1 mL, 用 5 mL 乙腈溶解残渣。

将 PRS 固相萃取小柱安装在固相萃取装置上, 用 5 mL 乙腈活化小柱, 把烧瓶中的溶液转移到小柱上, 在抽真空情况下过柱, 再用乙腈洗涤烧瓶两次, 每次 2.5 mL, 在不抽真空的情况下, 依次准确用 1 mL 流动相、1 mL 流动相和 1 mL 盐酸羟胺甲醇溶液洗脱 PRS 柱, 把洗脱液收集到 5 mL 刻度试管中, 如有必要用流动相稀释至 3 mL, 过 0.45 μm 微孔滤膜, 滤液供液相色谱测定。

根据需要, 准确移取适量标准混合液于 5 mL 刻度试管中, 放在 40 °C 加热板上用氮气流吹干, 准确加入 1 mL 盐酸羟胺甲醇溶液, 用流动相稀释至 3 mL, 混匀。

对色谱法检测呈阳性的样品溶液, 用 2 mL 二氯甲烷提取, 移取二氯甲烷层并挥干, 准确加入 1.0 mL 流动相以溶解残渣, 按质谱条件参数进行测定。

2 结果与讨论

2.1 氧化铅衍生柱浓度与转化效率的关系

我们用同样规格的空柱分别填充了 2%、5%、10%、25% 4 种不同氧化铅含量的衍生柱考核隐性孔雀石绿的在线转化效率: 用 50 mg/L 的隐性孔雀石绿标准溶液重复进样 5 次, 观察每次峰面积数值的变化情况并计算 5 次的平均峰面积数值, 试验结果发现氧化铅含量达到 10% 以上的即可得到最大并且稳定的峰面积数值, 考虑到衍生柱使用寿命, 本标准采用 25% 氧化铅含量的衍生柱。

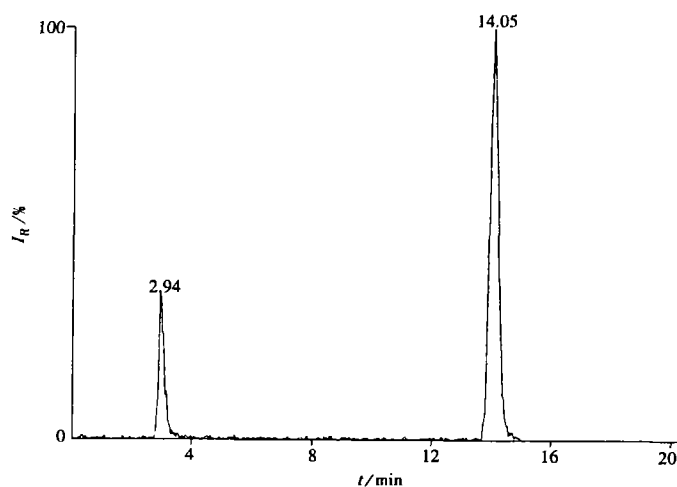


图 1 孔雀石绿及隐性孔雀石绿标准品的总离子流图
孔雀石绿保留时间: 2.94 min, 隐性孔雀石绿保留时间: 14.05 min

2.2 Q-TOF-MS 条件的选择

试验了不同参数(毛细管电压、锥体电压和碰撞电压等)对测定结果的影响。结果表明, 随着毛细管电压的增大, 孔雀石绿的电离急剧增大, 信号响应值增加, 电压达到 2.9 kV 时达到最大值, 随后趋于平缓。锥体电压的变化对孔雀石绿的响应值影响不大。碰撞能量到达 27 eV 后, 在分子离子峰[M + 1]产生断裂形成特征性碎片离子基础上, 响应值达到最大(见图 2)。

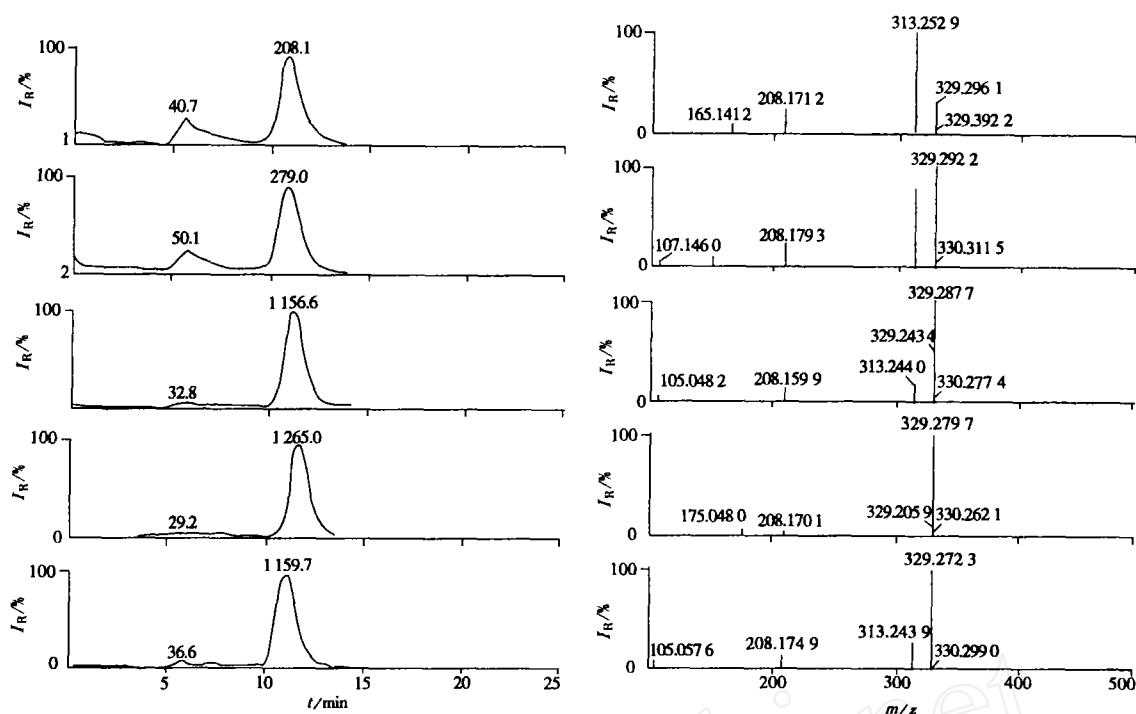


图 2 不同碰撞能量情况下隐色孔雀石绿的信号响应值和质谱图

2.3 方法的检出限、回收率、精密度

以本底无孔雀石绿及其代谢物残留的鳗鱼为样品,采用添加法用 HPLC-VIS 法进行回收率及精密度试验,加标平均回收率为 85.5%~90.0%,相对标准偏差为 6.0%~7.3%,检出限为 2 μg/kg。采用液相串联质谱法的检出限也为 2 μg/kg。

3 结论

用高效液相色谱-可见光检测法进行孔雀石绿残留量快速筛选,并配以串联质谱进行确证符合当前检测工作快速和准确的需要,将检测对象扩充到较母体蓄积时间更长的代谢物也是残留检测的发展趋势,符合动物源性食品种药物残留监控的技术要求。

参考文献:

- [1] 卢迈新,黄樟翰,等.美洲鳗对几种药物的敏感性研究.淡水渔业,2000,30(5):28-29.
- [2] 郭德华,叶长淋,等.液相色谱法测定鳗鱼中的孔雀石绿.化学分析计量,2002,11(2):20.
- [3] TURNIPSEED S B, ROYBAL J E. J AOAC Int, 1995, 78(4): 971-977.
- [4] ROYBAL J E, PFENNING A P. J AOAC Int, 1995, 78(2): 453-457.
- [5] STEVEN M P, KATHLEEN R E. J AOAC Int, 1995, 78(6): 1388-1393.
- [6] TARBIN J A, BARNES K A. J The Analyst Int, 1998, 123: 2567-2571.

Determination of Malachite Green and Its Metabolites in Aquatic Products Using HPLC-VIS and HPLC-TOF-MS

GUO De-hua, YE Chang-lin, LI Bo, FANG Xiao-ming

(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: An extraction and clean-up protocol for the determination of malachite green and its metabolites in aquatic products has been developed. Final determination is by HPLC with visible(screening) or HPLC-TOF (confirmation) detection. Lead(IV) oxide was on-line to oxidise the leucomalachite green back to the parent after chromatographic separation and prior to detection. The procedure was validated down to 2 μg/kg. The recoveries were in the range of 85.5%~90.0% and the RSD of 6.0%~7.3%.

Key words: HPLC-VIS; HPLC-TOF MS; Malachite green; Leucomalachite green