



高效液相色谱-串联质谱法测定猪尿中秋水仙碱

顾蓓丽

(上海市食品研究所, 上海 200235)

摘要: 提出了猪尿中秋水仙碱的液相色谱-串联质谱检测方法。采用 pH 8.0 磷酸盐缓冲溶液碱化 5 mL 尿样, 用乙酸乙酯提取两次, 合并提取液, 于 40 °C 吹氮蒸干, 用 2 mL 流动相溶解残渣。在色谱分离中选用 Sunfire C₁₈ 色谱柱, 流动相为甲醇-2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)混合溶液(40+60), 流量为 0.2 mL · min⁻¹, 进样量为 10 μL。质谱测定中采用电喷雾正离子模式离子化、多反应监测模式测定秋水仙碱, 外标法定量。猪尿中秋水仙碱在 1~50 μg · L⁻¹ 内呈线性, 测定下限(10S/N)为 0.2 μg · L⁻¹, 方法的回收率为 90%~100%, 相对标准偏差(n=6)小于 9.0%。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 秋水仙碱; 猪尿

中图分类号: O652.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2011)08-0916-03

HPLC-MS/MS Determination of Colchicin in Pig Urine

GU Bei-li

(Shanghai Municipal Food Research Institute, Shanghai 200235, China)

Abstract: Colchicin in pig urine was determined by HPLC in hyphenation with tandem MS/MS. The pig urine sample was alkalified with pH 8.0 phosphate buffer solution and extracted twice with ethylacetate. The combined extracts were blown with nitrogen to dryness at 40 °C. The residue was taken up with 2 mL of the mobile phase, which is a mixed solution of methanol and 2 mmol · L⁻¹ NH₄OAc solution containing 0.1% (by volume) of formic acid, mixed in the ratio of 40 to 60. Sunfire C₁₈ chromatographic column and the mobile phase mentioned above were used in the HPLC separation, with 10 μL of sample solution introduced and flow-rate of mobile phase of 0.2 mL · min⁻¹. The ionization mode of ESI⁺ and MRM mode of detection were adopted in MS/MS determination, with quantification by external standard method. Linear relationship between values of peak area and mass concentration of colchicin in the range of 1~50 μg · L⁻¹ was obtained, and value of lower limit of determination (10S/N) of 0.2 μg · L⁻¹ was found. Values of recovery were found in the range of 90%~100%, with RSD's (n=6) less than 9.0%.

Keywords: HPLC-MS/MS; Colchicin; Pig urine

秋水仙碱是从百合科植物秋水仙中提取的一种有机胺类生物碱, 化学名为 N-(5,6,7,9-四氢-1,2,3,10-四甲氧基-9-氧-苯并[a]庚间三烯并庚间三烯-7-基)乙酰胺, 分子式为 C₂₂H₂₅NO₆, 相对分子质量 399.44。秋水仙碱的作用主要是抑制或破坏纺锤体微管的形成, 主要用于治疗急性痛风; 亦可抑制细胞的有丝分裂, 有抗肿瘤作用; 也可用于诱发基因突

变。秋水仙碱的毒性较大, 常见恶心、呕吐、腹泻、腹痛、胃肠反应是严重中毒的前驱症状, 肾脏损害可见血尿、少尿、对骨髓有直接抑制作用、引起粒细胞缺乏、再生障碍性贫血。因此, 为了确保消费者的身体健康, 我国明文规定秋水仙碱属于 10 种禁止猪使用的兽药之一, 欧盟也将其列入禁止在食品动物使用的兽药及其它化合物清单中。秋水仙碱主要以原药的形式从尿液中排出, 因此, 检测尿样时只要检测原药秋水仙碱即可^[1]。目前, 对于检测秋水仙碱的常用方法有高效液相色谱法(HPLC)以及高效液相色谱

收稿日期: 2011-01-16

作者简介: 顾蓓丽(1984-)女, 上海人, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测。

• 916 •

谱-质谱联用法(HPLC-MS)^[1-3]。HPLC灵敏度低,特异性差,在定性方面存在不足。本工作用 HPLC-MS/MS 方法,对猪尿中的秋水仙碱进行检测。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Quattro Micro 液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾(ESI)离子源。

秋水仙碱标准储备溶液:100 mg · L⁻¹,称取秋水仙碱标准品 10.0 mg 于 100 mL 容量瓶中,用少量甲醇溶解后,并稀释至刻度。

乙腈、乙酸乙酯、正己烷均为色谱纯,其它试剂为分析纯,试验用水为超纯水。

1.2 仪器工作条件

色谱条件:Sunfire C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm),柱温 30 °C;流动相为甲醇与 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)以体积比 40 比 60 混合的溶液,流量 0.2 mL · min⁻¹;进样量 10 μL。

质谱条件:电喷雾离子源,正离子扫描模式,毛细管电压 3.0 kV,锥孔电压 40 V,萃取电压 3.0 V,透镜能量 0.1 V,离子源温度 120 °C,脱溶剂气温度 350 °C,锥孔气流量 50 L · h⁻¹,脱溶剂气流量 500 L · h⁻¹,光电倍增器电压 650 V,滞留时间 0.3 s。采用多反应监测(MRM)模式检测,定量离子对为 m/z 400.1/310.1,碰撞能量 25 V;定性离子对分别为 m/z 400.1/326.1,碰撞能量 25 V; m/z 400.1/358.1,碰撞能量 20 V。

1.3 试验方法

移取猪尿试样 5.00 mL 于 50 mL 塑料离心管中,加入 pH 8.0 的磷酸盐缓冲溶液 2 mL,混匀,加入乙酸乙酯 20 mL 振荡提取 10 min,以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min,将上清液置于 50 mL 塑料离心管,再取乙酸乙酯 10 mL 振荡提取 10 min,离心,合并两次上清液,在 40 °C 下用氮气吹干,用流动相定容至 2 mL,加入正己烷 2 mL,涡旋 2 min,以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 3 min,弃去正己烷层,经 0.22 μm 滤膜过滤后,在仪器工作条件下测定。

2 结果与讨论

2.1 检测条件优化

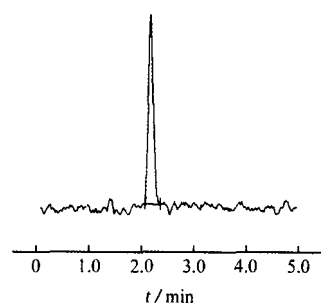
2.1.1 提取溶剂

采用乙醚、乙酸乙酯、甲醇、二氯甲烷等作为提

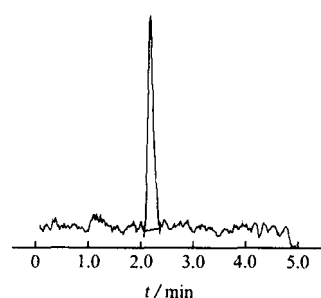
取溶剂进行比较,结果表明:尿液采用甲醇提取回收率最高,回收率为 90%,二氯甲烷提取回收率为 88%,乙酸乙酯提取回收率为 85%,乙醚提取回收率最低为 10%,但甲醇提取液中杂质较多,二氯甲烷毒性较大,因此,试验选择提取溶剂为乙酸乙酯。

2.1.2 流动相

采用甲醇与缓冲溶液、乙腈与缓冲溶液、水与甲醇等混合溶液作为流动相进行了试验,结果表明:由于乙腈是疏质子溶剂,选用乙腈与缓冲溶液作流动相,当采用电喷雾质谱正离子模式进行测定时,待测物的质谱相应值可能会受到一定的抑制,导致灵敏度下降;在水相中加入酸性介质,有利于被测组分的离子化,从而提高检测灵敏度。因此,采用甲醇与 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵-甲酸(99.9+0.1)溶液以体积比 40 比 60 混合的溶液作流动相时,不仅能提高灵敏度,而且能有效地改善色谱峰的拖尾现象。图 1 为 1.0 μg · L⁻¹ 秋水仙碱标准溶液和尿样加 1.0 μg · L⁻¹ 秋水仙碱标准的 MRM 质谱图。



(a) 秋水仙碱标准品



(b) 加标猪尿样品

图 1 秋水仙碱标准品和加标猪尿样品质谱图(MRM 模式)

Fig. 1 Mass spectra (under MRM mode) of colchicines standard and pig urine sample with standard added

2.1.3 质谱条件

根据秋水仙碱的分子式和结构特征,选择 ESI⁺ 电离方式,并确定其质荷比(m/z)应为 400。通过直接注射进样方式进行调谐,进行子离子扫描并优化碰撞能,优化后得到的质谱条件见 1.2 节。图 2 为秋

水仙碱的子离子扫描图。

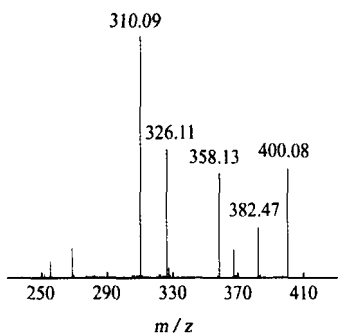


图2 秋水仙碱子离子扫描图
Fig. 2 Ionic mass spectrum of colchicine

2.2 标准曲线与检出限

移取一定量的秋水仙碱标准溶液,加入空白基质溶液,配制成质量浓度为 0.5,1,2,5,10,20,50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 秋水仙碱标准溶液,按仪器工作条件进行测定。以秋水仙碱质量浓度(ρ)对其相应的峰面积(y)进行线性回归,秋水仙碱质量浓度在 1~50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性,线性回归方程 $y = 23.2\rho + 2.4$,相关系数为 0.999 0。并以 10 倍的信噪比计算测定下限为 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.3 回收试验

分别在空白猪尿样品 5 mL 中加入秋水仙碱标准溶液,使其质量浓度分别为 0.2,1,10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,按工作条件处理样品并进行测定,结果见表 1。

表 1 空白样品加入秋水仙碱标准溶液测得的回收率及精密度试验结果(n=6)

Tab. 1 Results of recovery and precision tests by addition of colchicin standards to blank sample

标准加入量 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	测定值 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 /%	RSD _{日内} /%	RSD _{日间} /%
0.2	0.2	100	7.6	8.5
1.0	0.9	90	6.5	6.7
10.0	9.6	96	6.0	6.1

本工作建立了猪尿中秋水仙碱的高效液相色谱-串联质谱检测方法。通过实验室内部精密度和添加回收试验,证明本方法回收率高、精密度好、检出限低,该方法可应用于食品安全监测。

参考文献:

[1] 赵建波,张丽慧,邱相君,等. 高效液相色谱-质谱检测血浆秋水仙碱及其药动力学研究[J]. 杭州师范学院学报:医学版,2007,27(6):349-352.
[2] 何纯莲,李谷才,任凤莲,等. 超临界流体萃取-高效液相色谱法测定百合中秋水仙碱[J]. 天然产物研究与开发,2003,15(1):5-8.
[3] 陈晓红,仇佩虹,金米聪,等. 高效液相色谱-质谱联用法同时测定体液中麻黄碱和秋水仙碱[J]. 分析化学,2006,42(10):790-792,806.

(上接第 915 页)

须避免使用易挥发的酸性物质,如盐酸等,以减少实验室空气对样品的污染。压好的样片应放入干燥器中保存并尽快测定。氯的测定结果随测量时间的增加而不断变化,如果还同时测定原煤中其他元素的含量,在测量方式上,不能采用优化测定顺序模式,应首先测定氯。

3) 预抽真空时间和照射时间的长短,对其测定结果都有影响,分析方法的测量时间不能随意改变。氯在压样过程中极易沾污,易出汗的操作者须多加注意。操作间应装配空调,工作人员应戴手套操作。大批量样品应计算好每测定一个样品所需的时间,放置在样品交换器上的样品不宜过多,以避免空气污染。结果表明:本方法与国家标准方法(GB/T 3558—1996)相比,具有污染少、操作简便、准确度高、精密度好等特点,是准确快速测定煤中氯的理想方法,可满足各种煤样品中氯的测定。

参考文献:

[1] 赵峰华,任德怡,张旺. 煤中氯的地球化学特征及逐级化学提取[J]. 中国矿业大学学报,1999,28(1):61-64.
[2] 杨秀波. 伏尔哈德法测定煤中氯的最佳条件[J]. 宿州学院学报,2008,23(3):95-96.
[3] 关瑞,李昌,宋维. 分光光度法测定微量氯离子的研究与应用[J]. 化工标准化与质量监督,2000(3):6-8.
[4] 张丽珠,崔高峰,杨艳伟. 离子色谱法测定煤中的氯[J]. 岩矿测试,1999,18(4):299-301.
[5] 李东,孙家义,赵军. 高效液相色谱法和硫氰酸钾滴定法检测煤中氯的比较研究[J]. 光谱实验室,2003,20(5):686-688.
[6] 岳春雷,刘稚. 电感耦合等离子体发射光谱法间接测定煤中氯[J]. 岩矿测试,2003,22(1):64-66.
[7] 宋义,郭芬,谷松海. X 射线荧光光谱法同时测定煤中硫磷氯[J]. 岩矿测试,2006,25(3):285-287.