

知识与经验

高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中喹乙醇及其代谢物

陈永平¹, 张素青¹, 林黎明^{2*}, 李春青¹, 李兆千¹

(1. 农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心, 天津 300221;

2. 山东省出入境检验检疫技术中心, 青岛 266002)

中图分类号: O657.62

文献标志码: B

文章编号: 1001-4020(2011)09-1108-03

喹乙醇(OQX)是以邻硝基苯胺为原料合成的一种抗菌促生长剂,因其具有良好的广谱抗菌效果、提高畜禽饲料消化率、促生长作用而被广泛应用于兽药及饲料添加剂中^[1]。但随着对OQX毒性的深入研究及评价,普遍认为它是一种基因毒剂和生殖诱变剂,有致突变、致畸作用,并且在动物体内会产生蓄积毒性,可通过食物链间接地对人体健康构成威胁^[2-3]。3-甲基喹啉-2-羧酸是喹恶啉在动物体内的代谢产物,以喹诺酮和OQX为主要代表^[4]。摄入OQX饲料添加剂后,会在肌肉、肠道、肾脏等组织中代谢生成3-甲基-喹啉-2-羧酸,这种代谢物对机体毒性极大^[5],美国规定猪肉中OQX含量不得高于 $4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,欧盟规定OQX及喹乙醇代谢物(MQCA)不得检出。

目前国内外报道了液相色谱法、气相质谱法、液相色谱-质谱法检测OQX或MQCA,其中关于饲料中OQX,鸡肉、牛肉、猪肉组织中MQCA的报道较多^[6-9]。高效液相色谱-紫外检测器测定OQX及MQCA,存在基质复杂、干扰较大,且不能定性的不足。本工作建立了高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中OQX及MQCA的方法,用外标法定量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-串联四极杆质谱联用仪,氮吹仪,离心机,旋转

蒸发仪。

OQX及MQCA标准储备溶液:称取OQX、MQCA标准品各1.0 mg,用乙腈-甲醇-0.1% (体积分数,下同)甲酸水溶液(8+7+85)的混合溶液溶解并定容至10 mL容量瓶中。配制成 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 标准储备溶液。

pH 8磷酸盐缓冲溶液:称取磷酸二氢钠12 g和磷酸氢二钠14.2 g,加水溶解,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液调pH至8,加水定容至1 L,配成 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲溶液。

乙腈、甲醇为色谱纯,其余试剂为分析纯,试验用水为二次蒸馏水。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 色谱条件

Agilent XDB C₁₈色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm),流动相:A为乙腈,B为甲醇,C为0.1%甲酸水溶液;流量 $200 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,进样量20 μL ,柱温30 $^{\circ}\text{C}$ 。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Program of gradient elution

时间 / min	流动相体积分数/ %		
	A	B	C
0.0	10	6	84
4.0	10	6	84
10.0	13	70	17
12.0	13	30	57

1.2.2 质谱条件

电喷雾离子源(EIS⁺),电喷雾电压4 000 V,离子传输管温度350 $^{\circ}\text{C}$,鞘气压力3.675 kPa,辅助气流量 $5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,碰撞诱导解离电压10 V,选择反

收稿日期: 2010-05-05

* 联系人

应监测(SRM), 正离子模式检测, 碰撞气氦气压力 200 Pa。其余质谱参数见表 2。

表 2 OQX 和 MQCA 的质谱参数

Tab. 2 MS parameters for OQX and MQCA

组分	质荷比 m/z		碰撞能量 / eV
	母离子	子离子	
OQX	263. 9	220. 9	13
		143. 0	30
MQCA	189. 1	145. 1	14
		102. 1	32

1.3 试验方法

1.3.1 MQCA 的测定

称取鱼肉匀浆试样 5.00 g, 置于 50 mL 玻璃离心管中, 加 3 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 10 mL, 置 95 ℃~ 100 ℃水浴中水解 20 min。冷却至室温, 加盐酸 4 mL, 混匀, 冷却至室温, 加乙酸乙酯 10 mL, 涡旋振荡 1 min, 以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min, 上层溶液转入 50 mL 玻璃离心管; 用 5 mL 乙酸乙酯重复提取两次, 合并上层溶液。加 pH 8 磷酸盐缓冲溶液 8 mL, 手摇振荡 1 min, 以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min。弃去上层有机层溶液, 在下层水相中加盐酸 0.3 mL, 混匀, 加乙酸乙酯 5 mL, 手摇振荡 30 s, 以 4 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min, 上层溶液转入另一个试管; 用 5 mL 乙酸乙酯重复提取两次, 合并上层溶液, 于 40 ℃氮气流下吹干, 加乙腈-甲醇-0.1% 甲酸水溶液(10+ 6+ 84)的混合溶液 1 mL, 混旋 1 min, 过 0.25 μm 滤膜后, 按仪器工作条件进行测定。

1.3.2 OQX 的测定

称取组织试样 5.00 g 于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入中性氧化铝(45~ 75 mm) 5.0 g, 加入乙腈-乙酸乙酯(1+ 1)混合溶液 25 mL, 充分振荡混合 2 min, 以 10 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min, 将上清液移至另一个干净的 50 mL 离心管中, 加入正己烷 3 mL, 振荡 2 min, 以 10 000 r · min⁻¹ 转速离心 5 min, 弃去上层正己烷, 将下层清液过无水硫酸钠柱转移至 150 mL 鸡心瓶中。重复提取 1 次, 合并两次提取液于同一鸡心瓶中, 在 30 ℃水浴中减压旋转蒸发至干。加入甲醇(5+ 95)溶液 2.0 mL 涡旋, 过已活化好的 HLB 小柱(经甲醇 2 mL 和水 2 mL 活化), 分别用 0.02 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 3 mL 和甲醇(5+ 95)溶液淋洗小柱, 负压抽干小柱 3 min, 最后用甲醇(1+ 1)溶液 1 mL 洗脱, 洗脱液过 0.2 μm

滤膜后, 按仪器工作条件进行测定, 外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 提取净化条件的选择

试验分别用甲醇(5+ 95)溶液与乙腈-乙酸乙酯(1+ 1)混合溶液作提取剂, 对 OQX 进行提取, 正己烷去脂、过无水硫酸钠柱和 HLB 小柱, 除去基质中的水及大分子杂质, 减少对色谱柱、质谱仪的污染。结果表明: 采用乙腈-乙酸乙酯(1+ 1)混合溶液提取, 回收率较甲醇(5+ 95)溶液提取回收率高。与文献报道的测定动物组织中 OQX^[2] 和猪粪中 OQX^[10] 方法作比较, 净化效果理想。

MQCA 带有一个 - COOH 基团显弱酸性, 与组织中某些蛋白质结合较牢固, 通常可采用酸水解、碱水解或酶解的方式将目标化合物与蛋白质分离。试验分别采用酶水解、酸水解和碱水解 3 种提取方式对 MQCA 进行提取, 结果表明: 用酶水解时, 温度、pH 值对酶活性影响较大, 试验过程较难控制, 且酶解时间需 16 h 以上, 耗时^[11]; 碱水解较酸水解回收率高, 原因可能是 MQCA 含一个羧基显弱酸性, 试验选择在碱性条件下水解对 MQCA 进行提取。

2.2 液相色谱条件的选择

试验考察了不同型号的色谱柱及流动相比对目标物分离效果的影响。结果表明: 选择 Agilent XDB C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm), 以不同配比的甲醇、乙腈和 0.1% 甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, 出峰效果最佳, 可以满足试验要求。

2.3 质谱条件的选择

OQX 及 MQCA 分子结构中同时含有酸性基团和碱性基团, 电离时会同时产生正、负离子。试验表明: 正离子[M+ H]⁺ 采集到的信号较强, 因此以正离子方式(ESI⁺)进行采集。在 m/z 100~ 500 扫描范围内进行一级质谱图扫描, 确定 OQX 和 MQCA 的分子离子分别为 m/z 189.1 和 263.9。然后以 m/z 189.1 和 263.9 作为母离子进行子离子扫描, 选取丰度最强的 m/z 220.9 和 145.1 作为定量离子, 以次强离子 m/z 143.0 和 102.1 作为定性离子。最后以选择反应监测正离子模式优化锥孔电压、碰撞能量等质谱参数, 见 1.2.2 节。

50 μg · L⁻¹ OQX 和 MQCA 混合标准溶液的总离子流图见图 1。

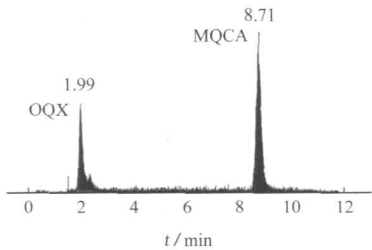


图1 标准溶液总离子流图

Fig. 1 TIC chromatograms of the standard solution

2.4 标准曲线和检出限

向空白组织中分别加入 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0, 40.0, 100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ OQX 及 MQCA 标准溶液, 按试验方法提取后在仪器工作条件下测定, OQX 在 1.0~100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围呈线性, MQCA 在 0.5~100.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 范围呈线性, OQX 及 MQCA 的线性回归方程分别为 $y = 97\,513\rho + 95\,250$, $y = 79\,695\rho - 41\,340$, 相关系数分别为 0.999 8, 0.999 7。

按试验方法分别对空白样品中添加 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ OQX 和 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MQCA 标准溶液进行测定, 结果表明: OQX 及 MQCA 的测定下限(10S/N)分别为 1.0, 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 比文献[11]报道的 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ OQX、1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ MQCA 低。

2.5 方法的回收率及精密度

取罗非鱼、南美白对虾和梭子蟹空白样品, 在 3 个浓度水平下做 OQX 及 MQCA 的加标回收试验, 按试验方法平行测定 6 次, 计算回收率及相对标准偏差, 结果见表 3。

表3 回收率及精密度试验结果(n= 6)

Tab. 3 Results of tests for recovery and precision

样品	标准加入量 $w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	MQCA		OQX	
		回收率 /%	RSD /%	回收率 /%	RSD /%
罗非鱼	4.0	81.9	1.4	80.9	0.8
	10.0	83.4	3.5	82.4	1.9
	40.0	91.7	4.7	86.9	5.5
南美白对虾	4.0	81.8	1.1	79.7	0.6
	10.0	84.0	2.6	84.6	1.6
	40.0	88.5	2.1	88.8	1.2
梭子蟹	4.0	83.5	1.0	81.0	0.7
	10.0	83.0	1.5	84.0	1.6
	40.0	86.4	1.3	85.4	2.3

2.6 样品分析

按试验方法对 44 个从市场采集的水产品样品

进行测定, 结果检出 1 个水产品样品中 OQX 超标, 合格率为 97.7%; 所有样品中 MQCA 均合格。

方法具有灵敏度高、选择性强、简便、快速、外标法定量成本低等优点, 可用于水产可食部分样品中 OQX 及 MQCA 残留量的同时确证检测。

参考文献:

[1] 张海琪, 何中央, 徐晓林, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产饲料中喹乙醇残留量[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(1): 131-134.

[2] 欧阳姗, 庞国芳, 谢丽琪, 等. 动物组织中卡巴氧和喹乙醇以及相关代谢产物的液相色谱-串联质谱检测方法[J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 590-594.

[3] 宫秀杰. 高效液相色谱法测定饲料中喹乙醇含量[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(10): 32-34.

[4] 王霄昞, 张丽芳, 薛飞群, 等. 采用高效液相色谱-串联质谱法检测鲫鱼组织 3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留量[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(8): 718-720.

[5] HUANG Ling-li, XIAO Ai-guo, FAN Sheng-xian, et al. Development of liquid chromatographic methods for determination of quincetone and its main metabolites in edible tissues of swine and chicken[J]. J AOAC INT, 2005, 88: 472-478.

[6] 殷居易, 倪梅林, 寿成杰. 鸡肉中喹乙醇、卡巴多及其代谢物的残留检测[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(1): 11-14.

[7] 邱银生, 袁宗辉, 范盛先, 等. 高效液相色谱法测定猪血浆及组织中喹赛多及其脱二氧化碳代谢物[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 363-365.

[8] HUTCHINSON M J, YOUNG B P B, KENNEDY D G. Confirmation of carbadox and olaquinox metabolites in porcine liver using liquid chromatography-electrospray, tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 816: 15-20.

[9] WU Y-jie, YU Huan, WANG Yu-lian, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of quinoxaline-2-carboxylic acid and methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid in animal tissues[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1146: 1-7.

[10] 李维, 王冉, 魏瑞成, 等. HPLC-MS/MS 法测定猪粪中喹乙醇的残留[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(2): 411-415.

[11] 赵东豪, 黎智广, 杨金兰, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定水产品中残留的喹乙醇代谢物[J]. 分析试验室, 2010, 29(9): 19-22.