

液相色谱 - 串联质谱法测定水产饲料中喹乙醇残留量

张海琪, 何中央, 徐晓林, 施礼科

(浙江省水产质量检测中心, 浙江 杭州 310012)

摘要:为测定水产饲料中喹乙醇的残留量,建立了高效液相色谱 - 串联质谱的测定方法。水产饲料经 5% 甲醇溶液提取,HLB 固相萃取小柱净化后上机定量检测。采用 Zorbax XDB C₁₈ 色谱柱,并以 0.2% 乙酸水溶液 + 甲醇(60 + 40,体积分数)为流动相,色谱分离后直接进串联质谱器。采用电喷雾正离子,多反应监测模式检测,外标法定量。在 1 ~ 20 mg/L 浓度下具有良好的线性关系,方法的定量限为 0.04 mg/kg,添加浓度在 1 ~ 20 mg/kg 时的回收率为 72.2% ~ 98.5%,相对标准偏差小于 7.9%。

关键词:液相色谱 - 串联质谱;固相萃取;喹乙醇;水产饲料

中图分类号:S963.16⁺5 **文献标志码:**A **文章编号:**1674 - 3075(2009)01 - 0131 - 04

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。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(徐韵等,2004)。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作了限制,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(1993;2006)。目前饲料中喹乙醇的检测方法主要是液相色谱法(欧阳华学等,2002;李来生和邱水平,1997;E Roets et al,2001),在日常检测中往往存在干扰大、无法确证等问题。本实验旨在研究建立一个样品经过固相萃取小柱净化,高效液相色谱电喷雾串联质谱的检测方法。

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;Oasis HLB 3 mL 固相萃取小柱;固相萃取仪。

甲醇为色谱纯,实验用水为超纯水。喹乙醇标准品,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 g/L 标准储备液。准

确量取标准储备液于容量瓶中,氮气吹干后用 40% 甲醇水溶液定容,使其浓度依次成 1.0、2.5、5.0、10.0、20.0mg/L 的标准溶液,现配现用。

1.2 样品前处理

用 50mL 5% 甲醇溶液作为提取液,分 2 次避光提取。合并混匀后的提取液经普通滤纸过滤,取 2 mL 滤液加入已活化好的 HLB 小柱(2mL 甲醇和 2 mL 水),分别用 3 mL 0.02 mol/L 的盐酸溶液和 5% 甲醇水溶液淋洗小柱,负压抽干小柱 3min,最后用 2mL 40% 甲醇水溶液洗脱,洗脱液过 0.2 μ m 滤膜后上机测定。

1.3 色谱和质谱条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax XDB C₁₈ 柱(2.1 mm \times 150 mm, 5.0 μ m);流动相:0.2% 乙酸水溶液 + 甲醇(60 + 40,体积分数);流速:0.2mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;进样量:20 μ L。

1.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源;扫描模式:正离子扫描;离子源电压:5 500 V;离子源温度:450 $^{\circ}$ C;氮气作为雾化气、气帘气和辅助气,其中雾化气为 7,气帘气为 9,辅助气流速为 7 L/min。监测模式:多反应监测方式。选择 3 对监测离子对,其中母离子为 264.3,相应的特征碎片离子分别为 212.3、177.2 和 246.3。监测离子对的驻留时间均为 100 ms,去簇电压为 85V,对应的碰撞电压分别为 30 V、24V 和 17V。

2 结果与分析

2.1 LC - MS/MS 分析

由于液相色谱 - 串联质谱拥有多反应监测功能,可以实现特定离子对的有效监测,因此增加了监

测的专一性,并可进行良好的定量定性分析,这一点比液相色谱分析中所采用的保留时间定性要优越得多。根据 Miao X S 等(2003)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 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ 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 Miao X S 等(2003)和

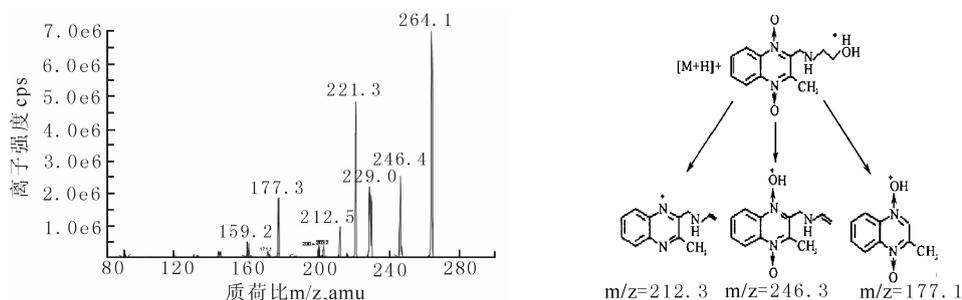


图 1 喹乙醇的子离子扫描图(左)及分子离子裂解碎片图(右)

Fig. 1 Product ion scan spectrum (left) and fragment ion spectrum (right) of Olaquinox

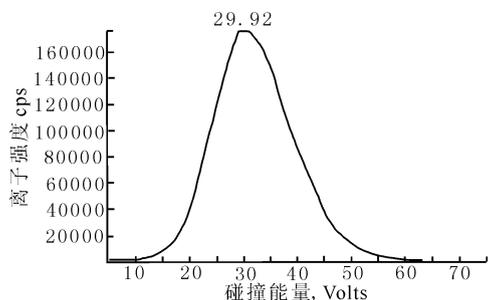
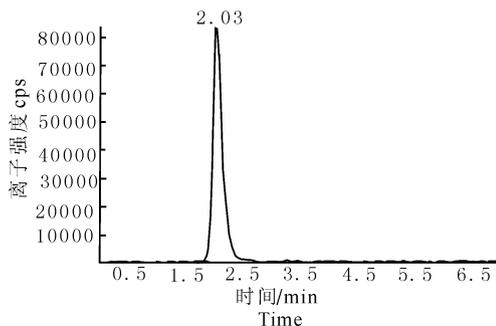


图 2 不同碰撞能量对喹乙醇总离子流强度的影响

Fig. 2 Effect of different collision energies on the intensity of total ions

取阴性样品,按照上述样品处理操作,进行 HPLC-MS/MS 分析。阴性加标样品和标样品的液



Poucke C V 等(2003)人的方法相同,主要的碎片离子是 m/z 212.3 (丢失了 H_2O_2 和 H_2O)、 m/z 246.3 (丢失了 H_2O) 和 m/z 177.2 (丢失了 $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ 和 CO_2)。选择丰度最强的碎片离子组成的监测离子对 m/z 264.3/212.3 用于喹乙醇的定量, m/z 264.3/177.2 和 m/z 264.3/246.3 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,以碰撞能量对离子强度影响最大(见图 2)。

相色谱-串联质谱图见图 3。

2.2 样品前处理的优化

样品的前处理方法对喹乙醇的分析至关重要。目前一般都是采用 5% 甲醇溶液作为提取液,只简单通过微孔滤膜的物理过滤,无法解决色谱柱的受污染问题,因此提取液必须经过净化处理。本试验选用了 Oasis HLB 小柱进行净化,开展了 SPE 小柱条件的优化。试验发现,5% 甲醇水溶液过小柱后只造成 2.82% 的喹乙醇损失,而 40% 甲醇水溶液则造成 95.6% 的损失。通过 SPE 小柱的净化,大部分杂质都被净化掉,大大减少了受污染的程度。

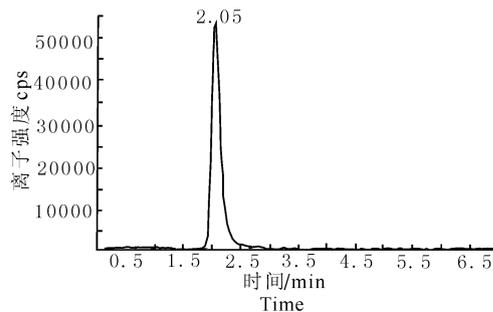


图 3 喹乙醇标准品(1 mg/L)及空白饲料添加 10mg/kg 喹乙醇的总离子流
Fig. 3 Total ion current chromatograms of Olaquinox standard (1 mg/L) and spiked sample with concentration of 10mg/kg

2.3 方法的线性范围、定量限、回收率和精密度

本试验采用喹乙醇标准溶液直接进样,以喹乙醇的浓度和峰面积关系来绘制线性关系曲线。结果发现,浓度在1~20 mg/L范围内具有很好的线性关系,工作曲线方程为: $y = 2.43 \times 10^5 x + 2.26 \times 10^5$,其相关系数为 $r = 0.9988$ 。以10倍信噪比计算方法的定量限(LOQ),方法的定量限为0.04mg/kg。

以空白水产饲料添加不同浓度的喹乙醇标准溶液,将样品置于烘箱中挥发掉甲醇,依本法测定添加回收率,结果见表1。由表1可知,水产饲料中添加浓度1mg/kg喹乙醇,回收率最低为72.2%。

表1 试样加标回收率和重复测定的相对标准偏差

Tab.1 Recoveries and relative standard deviation of Olaquinox in blank feed

水平 Level	添加浓度/mg · kg ⁻¹ Added Conc.	测定浓度/mg · kg ⁻¹ Detected Conc.	平均回收率/% Average recovery	相对标准偏差/% RSD
1	1.00	0.722,0.815,0.765,0.738,0.806,0.795	77.4	4.91
2	10.0	8.21,9.85,9.19,8.84,8.06,9.14	89.3	7.90
3	20.0	17.4,19.4,18.2,18.4,18.6,18.7	92.2	3.56

参考文献:

- 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 2006. GB/T 8381.7-2005. 饲料中喹乙醇的测定-高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社.
- 中华人民共和国进出口商品检验行业标准. SN 0197-1993. 出口肉中喹乙醇残留量检验方法[S].
- 李来生,邱水平. 1997. 高效液相色谱法测定饲料中的喹乙醇[J]. 色谱,15(5):440-441.
- 欧阳华学,雷华越,王开毓. 2002. 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,21(3):73-74.
- 徐韵,李兆利,陈海刚,等. 2004. 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,40(6):728-733.

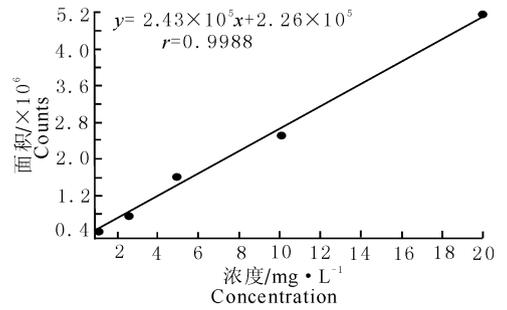


图4 喹乙醇的浓度与峰面积的线性关系

Fig.4 Linear relationship of concentration and area of Olaquinox

- E Roets, I Quintens, R Kibaya, et al. 2001. Quantitative determination of olaquinox in animal feed[J]. J Planar Chromatogr, 14:347-349.
- Miao X S, March R E, Metcalfe C D. 2003. 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, 230:123-133.
- Poucke C V, Keyser K D, Baltusnikiene A, et al. 2003. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed[J]. Analytica Chimica Acta, 483:99-109.

(责任编辑 万月华)

Determination of Olaquinox Residues in Aquatic Feed by High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Hai-qi, HE Zhong-yang, XU Xiao-lin, SHI Li-ke

(Zhejiang Fishery Products Quality Testing Center, Hangzhou 310012, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC – MS/MS) method was developed for determination of olaquinox residues in aquatic feeds. Olaquinox in feeds were extracted with 5% methanol solution and further purified with HLB solid phase extraction cartridge. Chromatographic separation was achieved by using Zorbax XDB C18 column with an isocratic mobile phase consisting of 0.2% acetic acid and methanol (60 + 40, V/V). Analytical identification and quantification were performed using multiple reaction monitoring with one precursor ion and three product ions as identifiers and electrospray ionization in positive mode. It was linearly ranged from 1 to 20mg/L, the LOQ was 0.04mg/kg. the recoveries were 72.2% ~ 98.5% , the RSD was lower than 7.9% .

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; Olaquinox; aquatic feeds