

高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉组织中癸氧喹酯残留

陈瑞清^{1,2}, 俞道进¹, 陈 锋², 黄一帆^{1*}

(1. 福建农林大学动物科学学院, 福建 福州 350002 ;

2. 福建省农产品质量安全检验检测中心, 福建 福州 350003)

摘要 :建立了测定鸡肉组织中癸氧喹酯(DEC)残留的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)方法。样品经乙腈提取,正己烷脱脂,固相萃取(SPE)小柱净化,采用 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液(78:22, v/v)为流动相,电喷雾正离子电离(ESI⁺)模式,多反应监测(MRM)检测模式,以内标法进行定量。结果表明 :DEC 在 1 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系,相关系数(r^2)大于 0.99 ; 1、10、100 $\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平的回收率为 78.2% ~ 107.4% ,日内、日间相对标准偏差(RSD)均小于 15% ,方法检出限为 0.25 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法简便、灵敏、精确,可用于鸡肉组织中 DEC 药物残留的确证检测。

关键词 :高效液相色谱-串联质谱 ;癸氧喹酯 ;残留 ;鸡肉

中图分类号 :O658

文献标识码 :A

文章编号 :1000-8713(2010)10-0997-04

Determination of decoquinatate in chicken meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Ruiqing^{1,2}, YU Daojin¹, CHEN Feng², HUANG Yifan^{1*}

(1. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China ;

2. Fujian Inspection and Testing Centre for Agricultural Product Quality and Safety, Fuzhou 350003, China)

Abstract : A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was developed for the determination of decoquinatate (DEC) residue in chicken meat. The sample was extracted with acetonitrile, cleaned-up with hexane, and purified with solid phase extraction (SPE) cartridge. The mobile phase was acetonitrile (containing 0.1% formic acid) and water (containing 0.1% formic acid). The analyte was identified by positive electrospray ionization (ESI⁺) mode and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The results showed as follows : The calibration curve showed good linearity within the concentrations of 1 - 200 $\mu\text{g/L}$ with the correlation coefficient (r^2) > 0.99. At the spiked levels of 1, 10 and 100 $\mu\text{g/kg}$, the recoveries of DEC were 78.2% - 107.4%. The relative standard deviations (RSDs) of intra- and inter-days were both less than 15%. The limit of detection of DEC was 0.25 $\mu\text{g/kg}$ and the limit of quantification was 0.5 $\mu\text{g/kg}$. The method is simple, sensitive and accurate in the determination of DEC residue, which can meet the requirements of the domestic and international legislations.

Key words : high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) ; decoquinatate ; residue ; chicken meat

癸氧喹酯(decoquinatate, DEC)化学名为 6-癸氧基-7-乙氧基-4-羟基-3-喹啉羧酸乙酯(结构式见图 1) ,属化学型喹啉类抗球虫药,主要用于预防肉仔

鸡的球虫病^[1]。作为一种全新的抗球虫药,球虫尚未对 DEC 产生明显的抗药性^[2]。近几年人们对兽药残留问题日益关注,各国均制订了各类农、兽药在

* 通讯联系人 :黄一帆,教授,主要研究方向为天然药物研究与应用。E-mail : zjhyfang@163.com.

基金项目 :福建省科技重点项目(No. 2008Y0002)。

收稿日期 :2010-06-30

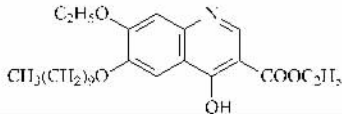


图 1 DEC 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of DEC

动物性食品上最高残留限量。抗球虫药一直是肉鸡及其制品中重点监测兽药。我国农业部 235 号公告规定了鸡肉中 DEC 的最大残留限量为 1 mg/kg ^[3], 并于 2006 年颁布国家标准《畜禽肉中癸氧喹酯残留量的测定:液相色谱-荧光检测法》^[4], 采用该方法的检出限为 0.2 mg/kg 。日本于 2006 年 5 月 29 日起实施食品中农业化学品(农药、兽药及饲料添加剂等)残留“肯定列表制度”, 并执行新的残留限量标准^[5], 其中 DEC 残留的暂定标准为 0.1 mg/kg 。由于日本是我国肉鸡及其制品出口的主要国家, 因此在国内研究更高灵敏度的 DEC 检测方法迫在眉睫。由于 DEC 引入中国时间较短, 尚未大面积推广使用, 因此有关 DEC 在动物组织中的残留研究报道较少。目前国内常用的 DEC 检测方法主要是高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]。国外已报道的检测方法主要为高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[9]。本文在该方法的基础上进行了适当的改进, 应用 HPLC-MS/MS 法成功地测定了鸡肉中 DEC 残留, 目前国内尚未见有文献报道。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Quattro Micro 高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司); AE160 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Biofuge Stratos 高速冷冻离心机(德国 Heraeus 公司); HLB 固相萃取(SPE)柱(500 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司)。DEC 标准品及 DEC-d₅ 内标(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯(美国 Fisher 公司); 正己烷为分析纯; 所用水为超纯水。

1.2 标准溶液的配制

DEC 及 DEC-d₅ 标准储备液的配制: 精密称取 DEC 及 DEC-d₅ 标准品, 分别用 1% 甲酸乙腈溶解并定容成 100 mg/L 的储备液, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存。

标准工作溶液的配制: 将标准储备液用乙腈稀释至相应浓度 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下保存。

1.3 样品前处理

称取(2 ± 0.05) g 鸡肉组织, 置于 10 mL 聚丙烯离心管中, 加入 $500 \text{ } \mu\text{g/L}$ 的 DEC-d₅ 内标溶液 10

μL , 充分混匀, 静置 10 min, 加乙腈 5 mL, 涡动混合 1 min, 中速振荡 5 min, 8000 r/min 离心 10 min, 将上清液转移至另一洁净离心管中, 用 5 mL 乙腈重复提取 1 次。合并上清液, 加入 10 mL 正己烷涡旋, 中速振荡 5 min, 8000 r/min 离心 10 min, 弃去上层液, 下层液采用 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 氮气流吹至近干, 用 5 mL 5% 甲醇溶解残渣备用。

将 HLB SPE 小柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化后, 取上述溶解液上样, 待样液过柱完成后, 用 3 mL 水淋洗抽干, 然后用 5 mL 甲醇洗脱待测物。将洗脱液于 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下用氮气吹干, 加入流动相 1.0 mL, 涡旋超声充分溶解残渣, 过 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 滤膜, 滤液供 HPLC-MS/MS 法测定。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: XTerra C₁₈ (150 mm × 2.1 mm, 5 μm , 美国 Waters 公司); 流动相: 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液(78:22, v/v); 流速: 0.2 mL/min ; 柱温 $35 \text{ }^\circ\text{C}$; 进样量: $10 \text{ } \mu\text{L}$ 。

1.4.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子模式; 离子源温度: $110 \text{ }^\circ\text{C}$; 毛细管电压: 3.5 kV ; 脱溶剂气温度: $300 \text{ }^\circ\text{C}$; 脱溶剂气流速: 450 L/h ; 锥孔气流速: 30 L/h ; 检测方式: 多反应监测(MRM)模式; 定量方式: 内标法。DEC 及其同位素内标的质谱分析参数见表 1。

表 1 DEC 的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量
Table 1 Parent and daughter ions, cone voltage and collision energy for the determination of decoquinatone

Analyte	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Cone voltage/V	Collision energy/eV
DEC	418.4	372.4* 390.4	45	25
DEC-d ₅	423.5	377.5*	45	25

* quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 实验条件考察

2.1.1 样品前处理方法的选择

提取溶剂的选择 参考文献[4, 8, 9], 选择了用甲醇和三氯甲烷混合溶液(80:20, v/v)作提取液和用乙腈作提取液两种方法的提取效果。实验结果表明两种方法均获得了满意的回收率, 但前一种方法背景干扰大, 考虑到鸡肉组织中含有脂肪, 须用正己烷进行脱脂, 故采用乙腈作提取溶剂。比较不同提取液的体积(4 mL、5 mL、10 mL)及涡动提

取时间(30 s、60 s、90 s)的提取效果,结果表明 5 mL、10 mL 提取液的提取效果优于 4 mL 提取液,60 s、90 s 涡动时间的提取效果优于 30 s 的涡动时间。最终实验选择采用 5 mL 的提取液体积及 60 s 的涡动时间。

净化条件的选择 由于国家标准^[4]采用的前处理方法中没有净化步骤,因此考虑到样品基质的复杂性及检测仪器的要求,采用 SPE 小柱,可降低干扰,提高信噪比,进一步提高灵敏度。比较了 HLB 柱、硅胶柱、MAX 3 种 SPE 柱的净化效果,发现 HLB 柱净化效果最佳,可有效去除样品基质对目标分析物测定的干扰,灵敏度最高,且获得了较好的回收率。

2.1.2 色谱条件的优化

本实验发现采用 XTerra C₁₈ 柱,使用乙腈-水作流动相时比甲醇-水作流动相时灵敏度略高;当流动相中含有 0.1% 的甲酸时有利于改善色谱峰的峰形和提高质谱灵敏度,因此采用 0.1% 甲酸乙腈溶液-0.1% 甲酸水溶液(78:22, v/v)作为流动相。同时考察了 DEC 色谱峰在 6 次重复分析中保留时间的相对标准偏差(RSD),结果显示 RSD 均小于 0.2%。在 1.4 节所述分析条件下,DEC 标准溶液的典型 MRM 色谱图见图 2。

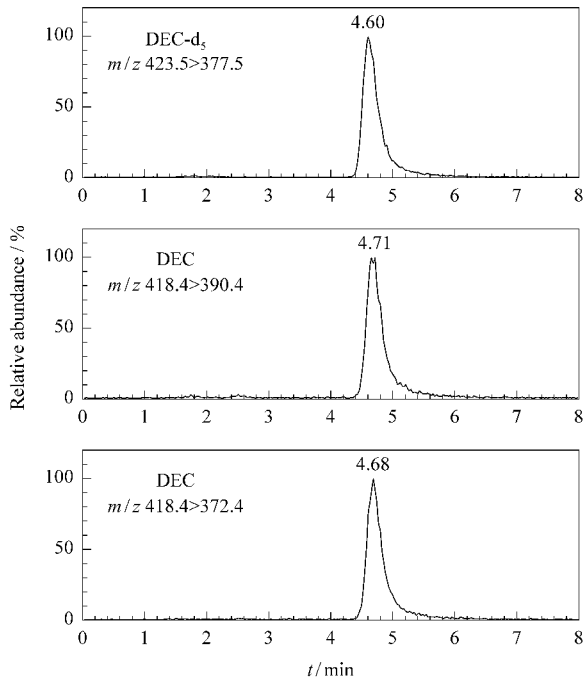


图 2 DEC 标准溶液(2 µg/L)的 MRM 色谱图
Fig. 2 MRM chromatograms of DEC standard solution (2 µg/L)

2.1.3 质谱条件的优化

试验了不同离子源(ESI 源和大气压力化学电

离(APCI)源)、不同离子参数(毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等)对测定结果的影响,结果表明 ESI 源灵敏度较高,毛细管电压为 3.5 kV 时响应值最大。根据欧盟对兽药残留检测的要求,DEC 药物确证至少需要 4 个识别(IP)点,因此实验选取丰度较强、干扰较小的两对子离子为定性离子。这样 1 个母离子获得 1 个 IP 点,两个子离子各获得 1.5 个 IP 点,满足 4 个 IP 点的要求。本实验最终选用响应信号强的 m/z 418.4 > 372.4 作为定量离子对, m/z 418.4 > 390.4 为定性离子对(见表 1)。

2.2 DEC 碎片离子的裂解规律探讨

通过对各碎片所有可能结构的优化及相应的键能断裂的比较,确定了各碎片的稳定结构,进而推导了 DEC 的质谱裂解途径。图 3 为 DEC 在 ESI⁺ 电离模式下的可能裂解途径。

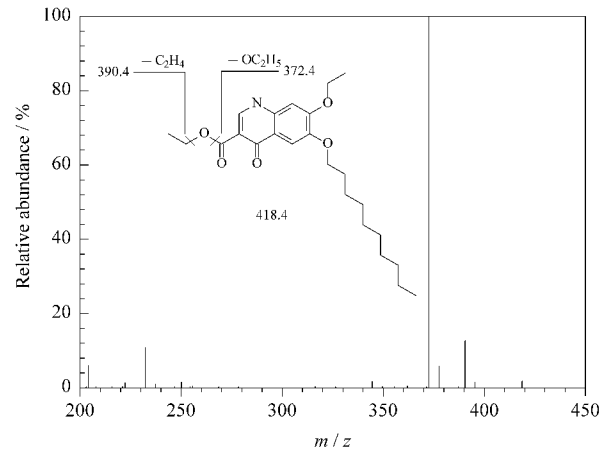


图 3 DEC(m/z 418.4)的子离子质谱图及可能裂解途径
Fig. 3 Proposed fragmentation mechanism and spectrum of daughter-scan of $[M + H]^+$ ions for DEC (m/z 418.4)

2.3 方法学考察

2.3.1 方法的专属性

空白样品按 1.3 节所述步骤处理后,与空白组织中加入一定浓度的标准溶液按相同的步骤得到的色谱图进行比较,测定结果表明:在相应的保留时间,空白样品对所测分析物无干扰。

2.3.2 线性范围

分别精密量取 DEC 及 DEC-d₅ 标准工作液适量配制系列的标准溶液(每个浓度水平下的 DEC 标准溶液中均含内标溶液 10 µg/L),从低浓度到高浓度依次进样,以定量离子质量色谱图中的峰面积为纵坐标(Y),标准溶液的质量浓度为横坐标(X, µg/L),以内标法进行线性回归。在 1 ~ 200 µg/L 范围内,DEC 的回归方程为 $Y = 3.4554 X - 1.18561$,相关系数(r^2) = 0.9993,呈现良好的线性

关系,符合仪器分析方法的要求。

2.3.3 定量限与检出限

采用标准添加法,在空白鸡肉中添加 DEC,经 1.3 节所述步骤处理后测定,以定量离子色谱峰的信噪比(S/N)大于 3 为方法的检出限,以 S/N 大于 10 为方法的定量限,得出 DEC 的检出限为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.3.4 加标回收和精密度试验

采用标准添加法,在空白鸡肉中添加 3 个不同浓度的 DEC 进行回收率试验,每个添加水平重复测定 6 次,连续 3 d 重复操作,最终结果见表 2。

表 2 DEC 在不同加标水平下的平均回收率($n=6$)及日内、日间相对标准偏差

Table 2 Average recoveries ($n=6$) and RSDs of intra- and inter-days of DEC spiked at different levels

Spiked/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/ %	RSD/%	
		Intra-day ($n=6$)	Inter-day ($n=3$)
1.0	90.3	9.8	10.5
10.0	90.5	7.2	12.3
100.0	101.0	11.4	11.9

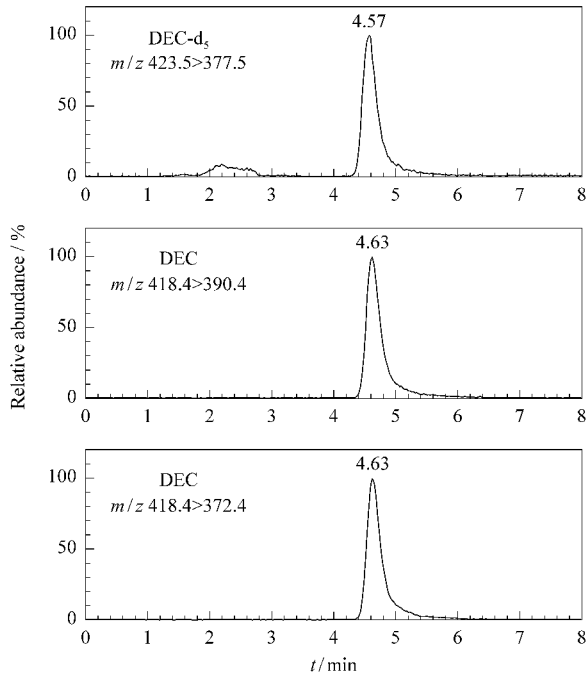


图 4 灌服 10 mg/kg (体重) DEC 后肉鸡胸肌中 DEC 的 MRM 色谱图

Fig. 4 MRM chromatograms of DEC in chicken meat administrated orally at 10 mg/kg (bw) to a broiler

根据表 2 结果得知,在 1.0 ~ 100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加范围内的回收率为 78.2% ~ 107.4%。日内、日间 RSD 均小于 15%,符合残留检测要求。

2.4 样品测试

应用所建立的检测方法测定实际样品 6 份,均未检出 DEC 残留。为此采取 10 mg/kg (体重) 的灌服量,对 4 羽肉鸡进行单次灌服,分别于第 1、3、5、7 d 宰杀一羽,取胸肌按 1.3 节所述步骤处理后检测 DEC 残留,检测结果均为阳性。图 4 为肉鸡单次灌服 10 mg/kg (体重) DEC 5 d 后鸡胸肌中 DEC 的 MRM 色谱图。

3 结语

通过对前处理条件及 HPLC 及 MS 条件的优化,建立了对鸡肉中 DEC 残留进行检测的 HPLC-MS/MS 方法。该方法具灵敏度高、选择性高等特点,可用于动物来源的食品中 DEC 药物残留的确证检测。

参考文献:

- [1] Williams R B. Vet Parasitol, 2006, 135: 1
- [2] Du Y L, Zhang C, Liu H T, et al. Chinese Agricultural Science Bulletin (都业良, 张灿, 刘焕厅, 等. 中国农学通报), 2009, 25(4): 6
- [3] Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号). (2002-12-24) [2010-05-05]. <http://yz.hz-agri.gov.cn/uploadFiles/2005-10/1130221564406.doc>
- [4] GB/T 20745-2006
- [5] Japan Ministry of Health, Labour and Welfare. The Japanese Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods. [2010-05-05]. <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/index.html>
- [6] Luan M N, Zhou Y W, Wang H Z, et al. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives (栾明娜, 周玉武, 王慧珍, 等. 兽药与饲料添加剂), 2009, 14(4): 3
- [7] Zhou Y W, Luan M N, Xu F L, et al. Chinese Journal of Veterinary Drug (周玉武, 栾明娜, 徐福亮, 等. 中国兽药杂志), 2009, 43(2): 32
- [8] Zhou Y W, Luan M N, Xu F L, et al. Animal Husbandry & Veterinary Medicine (周玉武, 栾明娜, 徐福亮, 等. 畜牧与兽医), 2009, 41(12): 72
- [9] Olejnik M, Szprengier-Juszkiewicz T, Jedziniak P. J Chromatogr A, 2009, 1216: 8141