



# 改进的 QuEChERS 方法用于鱼肉中尼古丁及其代谢物的 HILIC LC/MS/MS 分析

## 应用简报

食品检测与农业

### 作者

Mike Chang  
安捷伦科技有限公司

### 摘要

尼古丁是应用最广泛的植物类杀虫剂之一。尽管已被欧盟禁用，最近美国国家环境保护局 (EPA) 也宣布禁止使用尼古丁作为杀虫剂 [1]，但鱼体内的尼古丁污染仍然存在并会杀死水生生物 [2]。尼古丁经历典型的农药生命周期，是烟草产品中常见的一种化合物。

各国之间的食品进出口属于日常贸易活动。对食品检测实验室和政府机构等许多组织而言，食品安全检测已成为一项重要的任务。在实验室中以适当的通量和可靠的数据及时筛查多种食品样品是食品科学家的基本目标之一。本应用简报展示了一种简单易用的快速、简便、经济、高效、耐用和安全 (QuEChERS) 的样品前处理方法，以用于通过亲水相互作用色谱 (HILIC) 分析鱼肉样品中的尼古丁及其代谢物。



Agilent Technologies

## 前言

QuEChERS 已成为各种食品样品常用的样品前处理方法。QuEChERS 方法主要包括两个步骤。第一步是萃取，第二步是分散式固相萃取净化。第一步萃取需要约 10 分钟，其中包括手动振摇 50 mL 塑料管 1 分钟。分散式固相萃取净化步骤也需要 10 分钟。在这一 20 分钟的样品前处理过程中，同时手动振摇四个 50 mL 萃取管时，最多可对 42 个样品进行前处理。

## 实验部分

甲醇和乙腈为 LC/MS 级。水经过 Milli-Q 的过滤，或为 LC/MS 级。甲酸铵和 NaOH 为 ACS 级。尼古丁、新烟碱、可铁宁和苦参碱购自 Sigma-Aldrich 公司。野生鳕鱼片购自当地杂货店。

## 条件

色谱柱:	Agilent Poroshell 120 HILIC, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-901)
样品前处理:	Agilent QuEChERS AOAC 萃取试剂盒 (部件号 5982-5755CH)、Agilent QuEChERS 分散式固相萃取试剂盒 (部件号 5982-5022)
洗脱液:	A: 10 mM 甲酸铵, pH 3.0; B: 乙腈
进样量:	20 μL
流速:	0.7 mL/min
梯度:	时间 (min)      %B
	0                    90
	4.0                70
	4.5                70
	4.6                90
	6                    90
LC/MS/MS:	Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统和配备喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统
干燥气:	300 °C, 5 L/min
鞘气:	350 °C, 11 L/min
雾化器压力:	45 psi
毛细管电压:	3500 V (+)
喷嘴电压:	500 V (+)

表 1. 分析物特性

	尼古丁	可铁宁	新烟碱	苦参碱 (内标)
log P	1.20	0.07	1.25	1.71
pKa	8.02	8.80	11.00	7.72
MRM	163.1 → 132.1	177.1 → 80.1	163.1 → 118.1	249.2 → 148.1
碰撞能量	82	112	92	32

## 样品前处理

将野生鳕鱼片切成小块 (小于 1 cm) 并在研磨机中用干冰将其磨碎。磨碎后的鱼肉在分析之前保存在 -70 °C 下。在萃取步骤中，称取 2 g 匀浆鱼肉于 50 mL AOAC 萃取管中，然后加入混标溶液并加入 13 mL 水，使总载样量达到 15 g。用 NaOH 将 pH 调节为 11。加入两粒陶瓷均质子、15 mL 乙腈和 AOAC 萃取盐包 (其中包括 6 g MgSO<sub>4</sub> 和 1.5 g 乙酸钠)。将离心管用手剧烈振摇 1 分钟并以 5000 rpm 的转速离心 5 分钟。随后观察到明显的相分离，萃取管中形成了四层，从底部向上依次为盐层、水层、鱼肉基质层和乙腈层。从顶部乙腈层中移取 1 mL 至 2 mL 分散式固相萃取管中进行净化。将分散式固相萃取管涡旋混合 10 秒，并以 10000 rpm 的转速离心 10 分钟。将上清液 (0.4 mL) 转移至配有内置过滤器的自动进样器样品瓶中，并在 HILIC LC/MS/MS 分析之前加入内标。图 1 总结了整个流程。

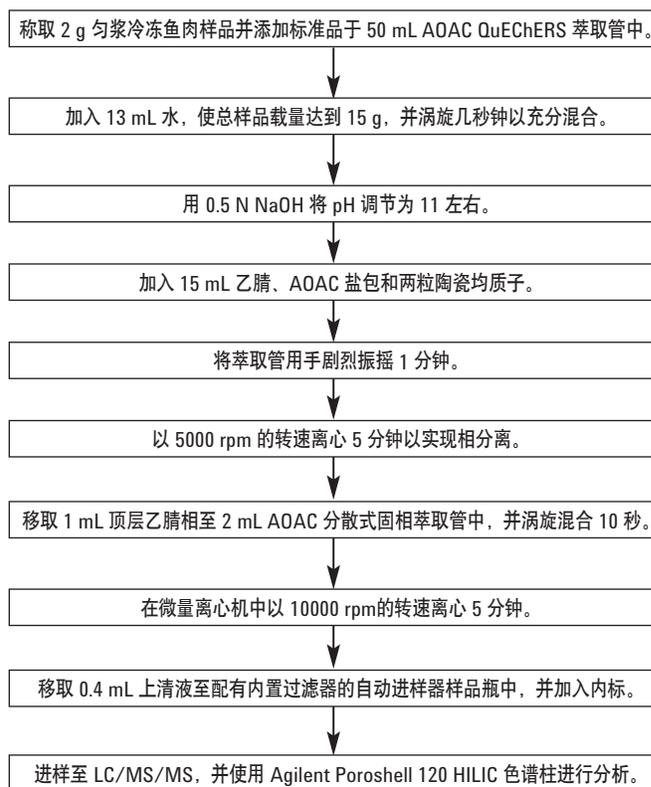


图 1. 用于分析鱼肉中尼古丁及其代谢物的改进型 QuEChERS 样品前处理工作流程

## 结果与讨论

色谱图显示所有化合物均实现了基线分离。苦参碱在 Poroshell 120 HILIC 色谱柱上的保留时间与尼古丁很接近 (图 2)。鱼肉中的目标分析物在 1-500 ng/g 的浓度范围内表现出优异的线性 ( $R^2 \geq 0.998$ ) (图 3)。大多数商品中尼古丁的典型最大残留限量 (MRL) 为 10 ng/g。对于所有化合物, 鱼肉中所有化合物的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 1 ng/g 和 5 ng/g。这些值均低于 MRL 水平, 可用于食品检测。在  $n = 8$  以及低 (5 ng/g)、中等 (50 ng/g) 和高 (100 ng/g) 三种不同浓度水平下, 获得了非常出色的回收率和 %RSD 值。表 2 为汇总的结果。

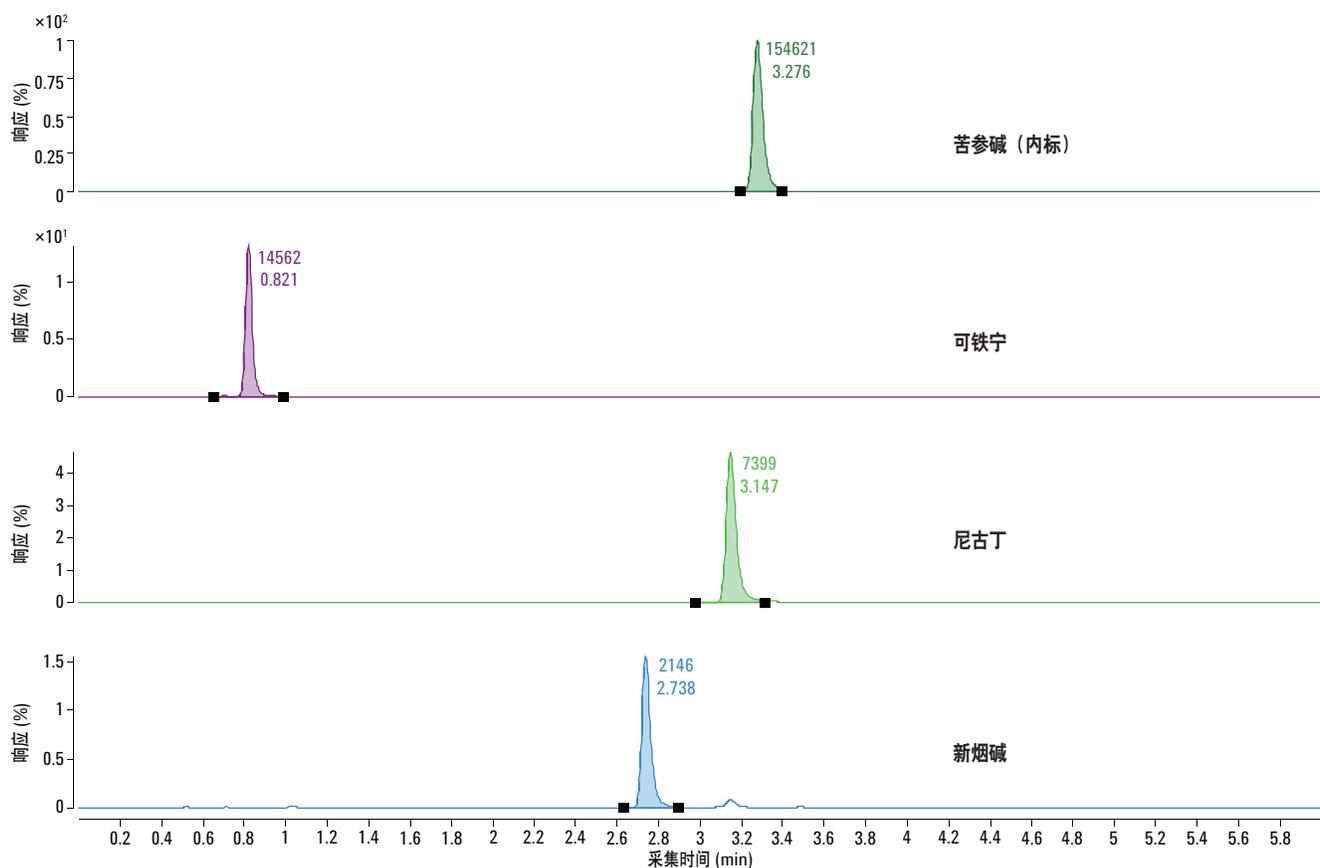


图 2. 鱼肉中尼古丁、尼古丁代谢物以及 5 ng/g 内标物的质谱图

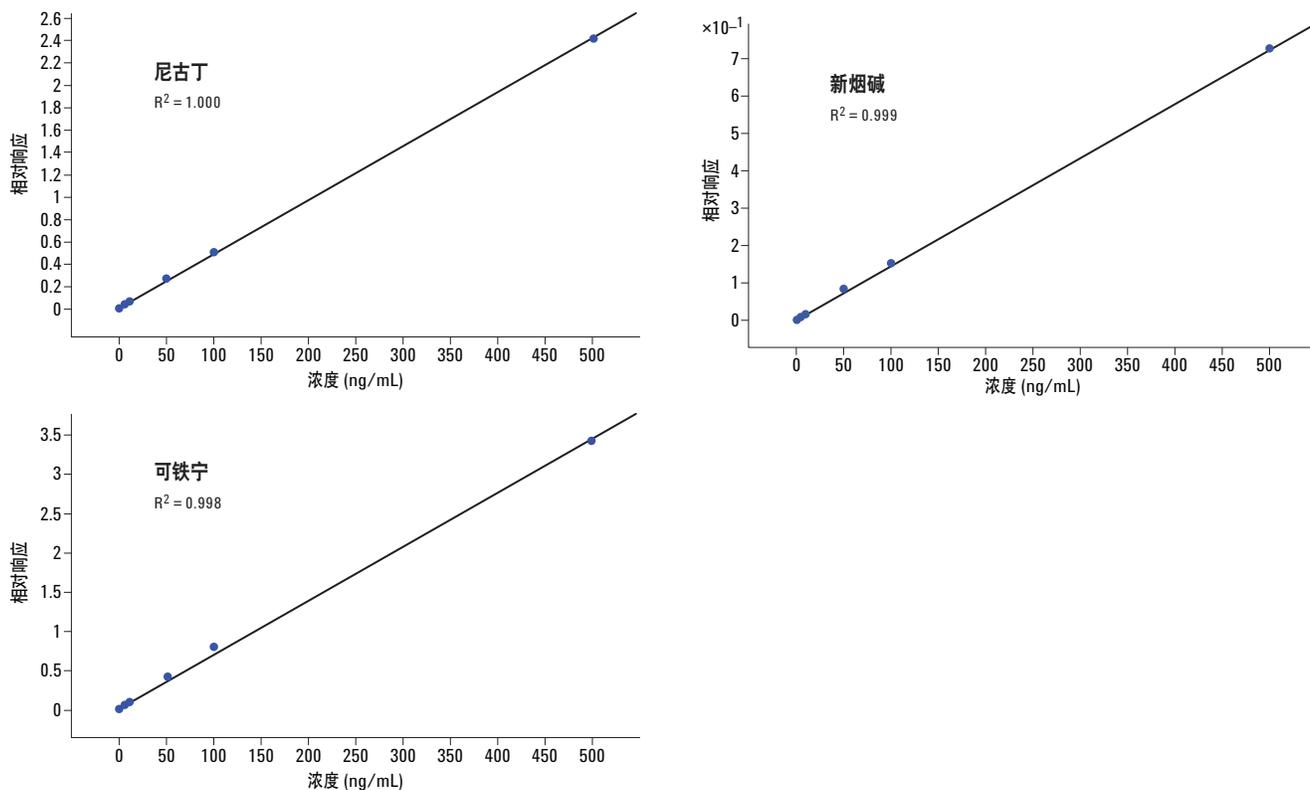


图 3. 鱼肉中尼古丁及其代谢物的校准曲线 (1-500 ng/g, 六个不同浓度)

表 2. LOD、LOQ、校准曲线线性 (R<sup>2</sup>)、回收率和 %RSD 结果总结 (每个浓度 n = 8)

	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)	线性, R <sup>2</sup>	5 ng/mL (低)		50 ng/mL (中)		100 ng/mL (高)	
				%回收率	%RSD	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD
尼古丁	1	5	1.000	113.7	6.4	97.7	1.6	90.0	2.1
可铁宁	1	5	0.998	127.9	5.4	117.0	2.2	93.4	2.1
新烟碱	1	5	0.999	91.8	6.2	86.4	1.6	77.8	2.5

## 结论

一种改进的 QuEChERS 方法为分析鱼肉中尼古丁及其代谢物提供了一种快速而简单的样品前处理工具。无需使用特殊的工具或附件，只需通过振荡、涡旋混合和离心即可在 20 分钟或更短时间内处理多达 48 个鱼肉样品。结合 Agilent Poroshell 120 HILIC 表面多孔色谱柱，所有极性化合物均获得了良好的色谱分离，并且校准曲线和回收率数据的线性度极佳。

## 参考文献

1. US EPA. Nicotine; Product Cancellation Order. Federal Register, Vol 74, No. 105 (June 2009)  
<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2009/June/Day-03/p12561.pdf>
2. E. Slaughter, R. Gersberg, K. Watanabe, J. Rudolph, C. Stansky, T.E. Novotny. *Tob. Control* **20** (Supp. 1), 25 (2011)
3. M. Anastassiades, A. R. Fernández-Alba. *Analysis of nicotine in mushrooms*. EU Reference Laboratories for Residues of Pesticides EU. [http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth\\_NicotineMushrooms\\_CrIFvCrlSrm.pdf](http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_NicotineMushrooms_CrIFvCrlSrm.pdf)

## 更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的信息，请访问我们的网站 [www.agilent.com](http://www.agilent.com)。

查找当地的安捷伦客户中心:

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线:

**800-820-3278, 400-820-3278** (手机用户)

联系我们:

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价:

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2013

2013年5月3日, 中国出版

5991-2408CHCN



**Agilent Technologies**