

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱结合 Agilent 6470 LC/MS/MS 检测水产品中的卡巴氧及代谢物脱氧卡巴氧

作者

张子豪, 吴翠玲, 安娟, 杜伟
安捷伦科技(中国)有限公司

摘要

本文介绍了一种使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化并结合 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统 (LC/MS/MS) 同时检测草鱼和虾基质中的卡巴氧和脱氧卡巴氧的方法。该方法使用同位素内标法进行定量，在 0.2–20 ng/mL 的浓度范围内，两种目标化合物的线性相关良好，相关系数均高于 0.99。方法定量限为 1 µg/kg，检测限为 0.5 µg/kg；在加标浓度为 1–5 µg/kg 时，不同基质中两种目标化合物的平均加标回收率和相对标准偏差分别在 88.3%–114.1% 和 0.8%–8.8% 之间，表明该方法具有出色的准确度和精密度，适用于测定水产品中的卡巴氧和脱氧卡巴氧残留。

前言

卡巴氧属于化学合成的喹噁啉类抗菌药，同时具有促生长、促蛋白同化和广谱抗菌作用，加之价格低廉，曾广泛应用于水产养殖业中。卡巴氧本身具有潜在的致癌、致畸和致突变作用，多个国家/地区将其作为禁用药物^[1]，我国农业农村部公告第 250 号规定禁止在食品动物中添加卡巴氧及其盐、酯等。脱氧卡巴氧是卡巴氧在靶动物体内的代谢物之一，其危害同样不容忽视。

有关牛、猪的肝脏和肌肉中卡巴氧和喹乙醇及代谢物残留量的测定的国家标准方法 GB/T 20746-2006^[2] 中使用乙腈-乙酸乙酯 (1+1) 提取，正己烷液液萃取除脂，样品前处理过程耗时长且溶剂消耗大。本研究参考 GB/T 20746-2006，使用 Agilent 6470 LC/MS/MS 检测，同时对两种水产品中提取过程进行了简化，使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 固相萃取代替正己烷液液萃取，高效去除基质中的脂质，大大缩短了净化时间，提高了样品前处理效率。

实验部分

试剂和样品

实验用甲醇、甲酸铵、乙腈均为色谱纯，购于北京迪马科技有限公司；实验用水为娃哈哈纯净水。

卡巴氧、脱氧卡巴氧、d3-卡巴氧和 d3-脱氧卡巴氧标准品：浓度均为 100 µg/mL（BePure，购于曼哈格公司，以乙腈或甲醇为溶剂）。草鱼和虾样品为市售产品。

仪器和设备

采用 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统 (LC/MS/MS)；Agilent Vac Elut 20 位固相萃取装置。

其他主要设备包括：3K-15 离心机（德国 Sigma 公司）、氮吹仪（北京普立泰科仪器有限公司）和涡旋混匀器（德国 IKA 公司）。色谱柱采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 75 mm, 2.7 µm；部件号 697975-302)。

样品前处理采用 Agilent Captiva EMR-Lipid (300 mg, 3 mL；部件号 5190-1003)、Agilent Bond Elut QuEChERS 兽残专用盐包（部件号 5982-0032 或 5982-6032（不含离心管））、Agilent ValueLab PTFE-Q 微孔滤膜（0.2 µm, 13 mm；部件号 5191-4286）、Agilent 陶瓷均质子（用于 50 mL 离心管；部件号 5982-9313）。

溶剂标样制备

分别取适量的标准品用甲醇配制浓度为 1 µg/mL 的内标混合标准工作液和外标混合标准工作液，逐级稀释备用。校准标样的配制：分别准确移取上述适量外标、内标混合标准工作液，用 20% 甲醇-水溶液稀释得到外标浓度分别为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL，内标浓度为 4 ng/mL 的混合标准工作液，现配现用。

样品前处理

称取样品 5 g (± 0.05 g) 于 50 mL 离心管中，添加一定量的内标，涡旋混匀；加入 10 mL 乙腈，涡旋振荡 5 min；加入 Bond Elut QuEChERS 兽残专用盐包（部件号 5982-0032），涡旋 1 min，以 8000 r/min 离心 5 min；取 2.4 mL 上清液，加入 0.6 mL 水，涡旋混匀；过 Captiva EMR-Lipid 柱，并收集全部流出液；取 1 mL 流出液在 40°C 下用氮气吹至约 0.4 mL，加水定容至 1 mL；过 0.2 µm PTFE-Q 滤膜，待测。

液相色谱条件和质谱条件

1290 UHPLC 色谱条件

仪器：	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)	
	Agilent 1290 Infinity II 进样器 (G7167B)	
	Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)	
色谱柱：	Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 75mm, 2.7 µm	
流动相：	A: 3 mmol/L 甲酸铵溶液 B: 甲醇	
流速：	0.4 mL/min	
梯度：	时间 (min)	B (%)
	0	10
	2.0	80
	3.0	80
	3.5	100
	6.0	100
	后运行时间： 3 min	
柱温：	40°C	
进样体积：	10 µL	

6470 MS 质谱条件

仪器：	Agilent 6470 三重四极杆质谱 (G6470B)	
离子源模式：	ESI (+)	
干燥气温度：	350°C	
干燥气流速：	9 L/min	
鞘气温度：	400°C	
鞘气流速：	12 L/min	
雾化器压力：	45 psi	
毛细管电压：	4000 V (正)	
扫描模式：	MRM (具体参数见下表 1)	

表 1. 卡巴氧和脱氧卡巴氧及其同位素内标的 MRM 参数

目标化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)	碎裂电压 (V)
卡巴氧	263.0	231.0*	5	100
	263.0	90.0	30	100
脱氧卡巴氧	231.0	199.0*	10	90
	231.0	143.0	20	90
d3-卡巴氧	266.0	231.0	18	100
d3-脱氧卡巴氧	234.2	199.1	16	90

注：* 为定量离子

结果与讨论

本研究比较了参考 GB/T 20746-2006 中介绍的正己烷液液萃取净化和过 Captiva EMR-Lipid 柱净化之后的回收率和基质效应，提取和净化方法流程如图 1 所示，结果见图 2。液液萃取净化过程繁琐，回收率低（卡巴氧和脱氧卡巴氧外标法回收率均小于 25%）；而使用 EMR-Lipid 净化，操作简单，卡巴氧和脱氧卡巴氧的外标法回收率均大于 50%，大大高于液液萃取，且基质效应低，由此可见，使用 EMR-Lipid 净化在回收率和净化效果方面均优于液液萃取。同时，GB/T 20746-2006 使用乙腈-乙酸乙酯（1+1）提取，需要氮吹后再净化，也增加了前处理的时间，对于 EMR-Lipid 最佳的提取溶剂是乙腈，所以对提取步骤进行了优化，以草鱼和虾为研究对象，比较了使用 80% 乙腈水溶液提取和乙腈提取盐析，不使用中性氧化铝粉，EMR-Lipid 净化时回收率和基质效应的差异，结果列于表 2 中。从表中可以看出，使用 80% 乙腈水溶液提取，虾基质抑制严重，这可能与水溶性蛋白增加了离子抑制有关；而使用乙腈提取并进行盐析分层之后，基质效应大大降低，且回收率有所提高。综合考虑之下，最终选择使用乙腈进行提取，并加入 Bond Elut QuEChERS 兽残专用萃取盐包进行盐析，从而降低基质效应。

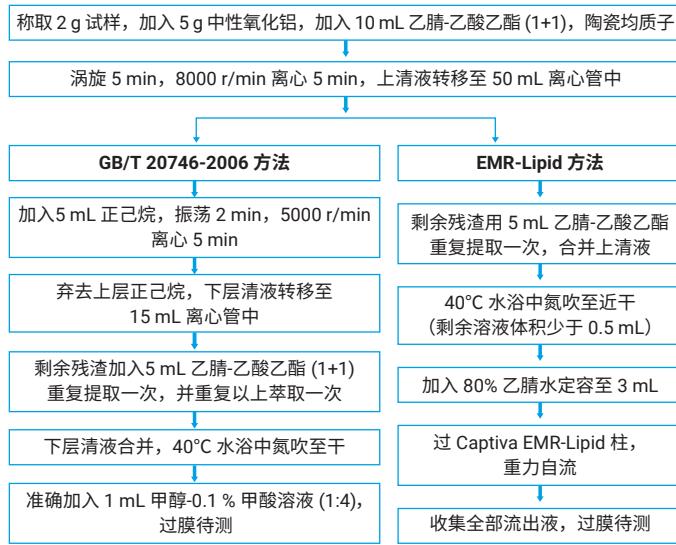


图 1. 液液萃取净化和 EMR-Lipid 净化流程比对

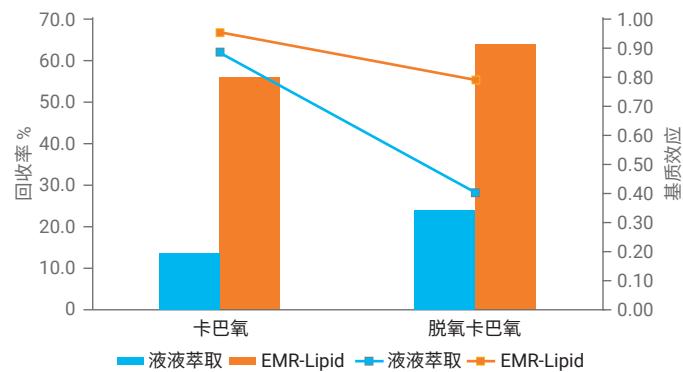


图 2. 液液萃取净化和 EMR-Lipid 净化回收率及基质效应比较（柱状图所示为回收率，折线图所示为基质效应，样品基质为虾）

表 2. 80% 乙腈水和乙腈提取盐析回收率和基质效应结果

基质	卡巴氧				脱氢卡巴氧			
	回收率 (%)		基质效应		回收率 (%)		基质效应	
	80% 乙腈水 (不盐析)	乙腈- 盐析						
草鱼	71.5	66.3	0.79	0.60	66.1	68.8	0.62	0.53
虾	63.9	74.6	0.23	0.55	52.8	78.4	0.18	0.52

标准曲线

使用内标法定量，以卡巴氧和脱氢卡巴氧选择离子色谱峰面积和内标物选择离子色谱峰面积比值为纵坐标，以相应的浓度与内标浓度的比值为横坐标，绘制标准曲线，结果如表 3 和图 3 所示。在 0.2–20 ng/mL 的浓度范围内，两种目标化合物的相关系数 R^2 均高于 0.99，表明该方法具有良好的线性。

表 3. 卡巴氧和脱氢卡巴氧标准曲线方程

化合物	线性回归方程 (浓度范围 0.2–20 ng/mL)	相关系数 (R^2)
卡巴氧	$y = 0.259109 * x - 0.006007$	0.9999
脱氢卡巴氧	$y = 0.976908 * x + 0.069929$	0.9936

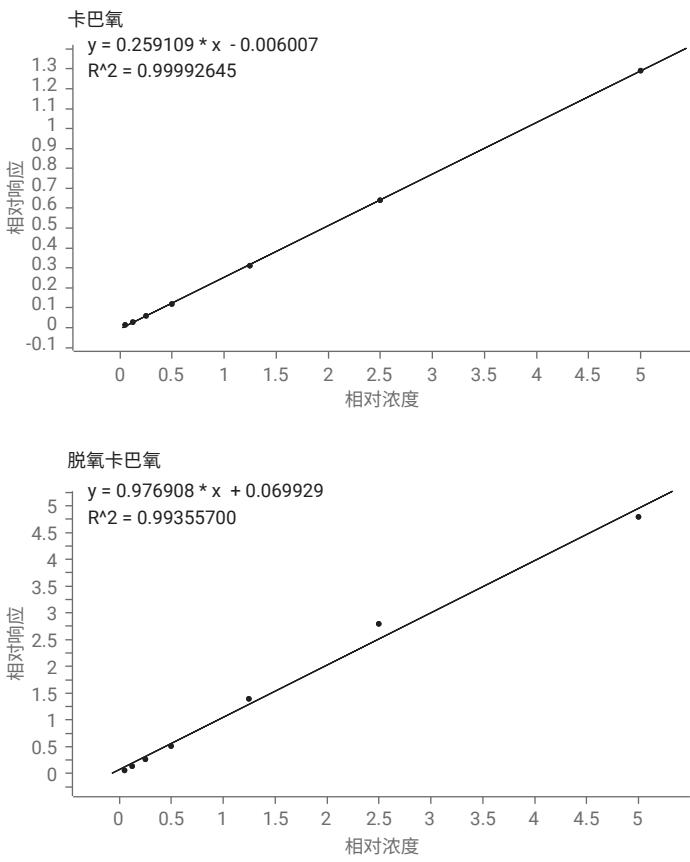


图3. 卡巴氧和脱氧卡巴氧标准曲线

检测限和定量限

通过在空白基质中加标回收试验来确定方法的检测限和定量限，当加标浓度为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时仍可定性检出，目标物色谱峰的信噪比 (S/N) 均大于 3，由此确定方法的检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ；当加标浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时，信噪比 (S/N) 大于 10，且回收率和重复性均能满足相关国家标准要求，由此确定方法的定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

准确度和精密度

以草鱼和虾为研究基质，选择 1 、 2 、 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 三个加标水平，每个加标水平设三个平行，结果见表 4。各目标化合物的平均加标回收率和相对标准偏差分别在 $88.3\%-114.1\%$ 和 $0.8\%-8.8\%$ 之间，均能满足相关国家标准要求，表明本文所述的方法具有良好的准确度和精密度。草鱼和虾基质空白及加标样品的 MRM 谱图见图 3。

表4. 卡巴氧和脱氧卡巴氧在草鱼和虾中的加标回收实验结果 ($n=3$)

基质	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	卡巴氧		脱氧卡巴氧	
		平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
草鱼	1	103.7	8.0	99.4	6.5
	2	102.9	4.6	96.9	2.8
	5	100.6	6.4	101.3	3.2
虾	1	92.6	7.3	88.3	1.9
	2	114.1	2.2	112.8	0.8
	5	92.2	8.8	93.5	8.2

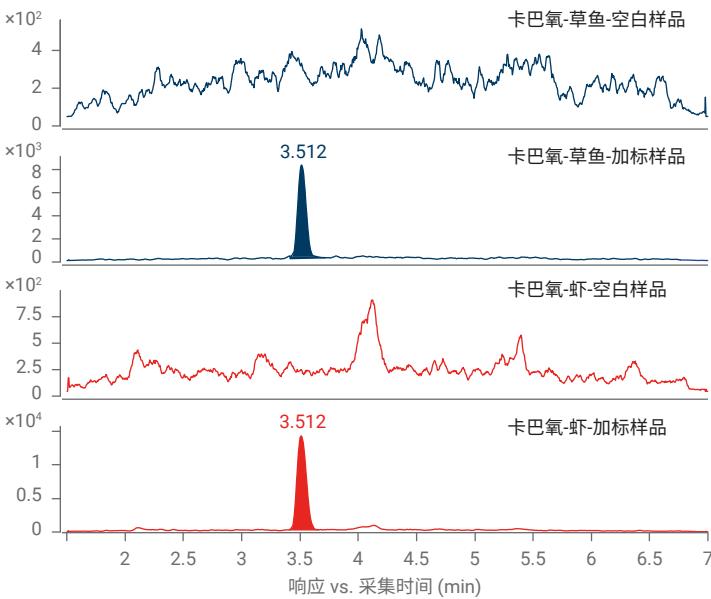


图4. 草鱼和虾基质空白以及卡巴氧和脱氧卡巴氧加标样品（加标浓度： $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）的 MRM 谱图

结论

本文以草鱼和虾为研究基质，采用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化代替 GB/T 20746-2006 中所述的正己烷液液萃取，高效去除基质中的脂质，提高了净化效率，并结合 Agilent 6470 LC/MS/MS 检测。使用内标法定量，在 0.2–10 ng/mL 的浓度范围内表现出良好的线性，线性相关系数高于 0.99；方法检测限为 0.5 µg/kg，定量限为 1 µg/kg；在加标浓度 1、2、5 µg/kg 下，回收率均在 88.3%–114.1% 之间，且相对标准偏差均小于 8.8%，表明该方法具有良好的准确度和精密度，适用于草鱼、虾等水产品中卡巴氧和脱氧卡巴氧的残留测定。

参考文献

1. 张静余, 杨卫军, 严敏鸣. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中喹乙醇和卡巴氧的代谢物残留量. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14):3788-3793
2. 中华人民共和国农业农村部. GB/T 20746-2006 牛、猪的肝脏和肌肉中卡巴氧和喹乙醇及代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法. 北京:中国标准出版社, 2006

产品订购信息

消耗品	部件号
Agilent Captiva EMR-Lipid (300 mg, 3 mL)	5190-1003
Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3.0 × 75mm, 2.7 µm)	697975-302
Agilent Bond Elut QuEChERS 兽残专用盐包	5982-0032 或 5982-6032 (不含离心管)
Agilent ValueLab PTFE-Q 微孔滤膜 (13 mm, 0.2 µm)	5191-4286
Agilent 陶瓷均质子 (用于 50 mL 离心管)	5982-9313

查找当地的安捷伦客户中心：

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

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

DE.66594618

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, 2022
2022年6月23日, 中国出版
5994-5076ZHCN

