

UPLC MS/MS 测定海水及沉积物中硝基喹啉类代谢物*

硝基喹啉类抗生素主要包括喹啉唑酮、喹啉它酮、喹啉西林和喹啉妥因, 是人工合成的广谱抗生素, 曾广泛应用于饲料添加剂和治疗药物, 以防止细菌性传染病和作为促生长剂, 其代谢物与动物机体细胞膜蛋白结合成结合态, 稳定存在于动物机体内, 从而延缓药物在体内的消除速度, 具有非常好的药效和较长的持药性. 近几年来发现硝基喹啉类药物及其代谢物具有强的致癌致畸致突变等毒副作用. 欧盟、日本、我国等国都将其列为禁用药物, 其可通过抗生素混入饵料或直接投入水体防治病害, 会有很大一部分直接散失到环境中, 对环境造成危害. 动物源性食品中硝基喹啉类代谢物的测定方法主要有液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 和酶联免疫法; 而海水和底泥中的硝基喹啉类代谢物的检测还未见报道.

本文研究采用对于养殖场出水口或是排污口附近海水直接衍生提取、用 HLB 柱净化, 对于大洋海水先用 Bond Elut® Plexa™ 柱富集后再衍生, 对于底泥样品直接提取, 然后用 Bond Elut® Plexa™ 柱净化的方法对硝基喹啉类药物进行前处理, 采用超高效液相色谱串联质谱对其进行测定, 专属性强, 灵敏度高, 适合海洋环境中硝基喹啉类代谢物的调查研究.

1 样品前处理

1.1 养殖场出水口或是排污口附近海水

取经 0.45 μm 滤膜过滤的海水 20 ml 于 50 ml 离心管中, 加入 100 μl 内标混合工作液, 再加入 150 μl 衍生溶液, 漩涡 2 min, 置于恒温水浴振荡器上 37℃ 避光振荡约 3h. 取出离心管放置至室温后, 用磷酸氢二钾溶液调节 pH 约 7.4, 加入 5 ml 乙酸乙酯, 漩涡 2—3 min, 以 7000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液至 15 ml 离心管中, 用 5 ml 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 于 45℃ 氮气吹干, 残渣用 1.0 ml 流动相溶解, 过 0.2 μm 滤膜, 供超高效液相色谱串联质谱测定.

1.2 大洋海水

取经 0.45 μm 滤膜过滤的海水 500 ml 过 Bond Elut® Plexa™ 小柱, 洗脱液吹干后, 加入 20 ml 超纯水, 加入 100 μl 内标混合工作液, 再加入 150 μl 衍生溶液, 漩涡 2 min, 置于恒温水浴振荡器上 37℃ 避光振荡约 3h. 取出离心管放置至室温后, 用磷酸二氢钾溶液调节 pH 约 7.4, 加入 5 ml 乙酸乙酯, 漩涡 2—3 min, 以 7000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液至 15 ml 离心管中, 用 5 ml 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 于 45℃ 氮气吹干, 残渣用 1.0 ml 流动相溶解, 过 0.2 μm 滤膜, 供超高效液相色谱串联质谱测定.

1.3 底泥样品

取风干后的底泥样品 1 g 于 25 ml 离心管中, 加入 100 μl 内标混合工作液, 再加入 150 μl 的衍生溶液, 加入 20 ml 盐酸溶液, 漩涡 2 min, 超声 30 min, 然后置于恒温水浴振荡器上 37℃ 避光振荡约 16h. 取出离心管放置至室温后, 用磷酸二氢钾溶液调节 pH 约 7.4, 加入 5 ml 乙酸乙酯, 漩涡 2—3 min, 以 7000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 吸取上清液至 15 ml 离心管中, 用 5 ml 乙酸乙酯重复提取一次, 合并上清液, 然后用 Bond Elut® Plexa™ 柱净化, 洗脱液在 40℃ 水浴下蒸干, 用 1.0 ml 流动相定容, 过 0.2 μm 滤膜, 供超高效液相色谱串联质谱测定.

2 液相色谱串联质谱分析

2.1 试验仪器

Waters Quattro Premier XE 超高效液相色谱-串联质谱仪, 超纯水仪 (Millipore Gradient), 高速离心机 (LG-10A), 超声波清洗器, 氮吹仪 (N-EVAPTM112), 旋转蒸发仪 (Heidolph).

2.2 色谱条件

色谱柱: ACQUITY™ BEH C18 (1.7 μm, 2.1 mm i.d. × 100 mm).

流动相: 甲醇和含有 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液梯度洗脱; 流速: 0.25 mL·min⁻¹; 进样量: 10 μl 柱温: 40℃.

2.3 质谱条件

电离方式: ESI⁺; 电离电压 2.80 kV; 离子源温度: 110℃; 锥孔反吹气流量: 20 L·h⁻¹; 脱溶剂气温度: 350℃; 脱溶剂气流量: 700 L·h⁻¹; 其它参数见表 1.

3 结果与讨论

3.1 样品衍生、提取与净化条件的选择

2009 年 3 月 13 日收稿.

* 海洋公益性行业科研专项经费项目 (No. 200805031) 资助.

4种硝基呋喃代谢物的分子量在 102—201 之间, 用 ESI+ 离子模式进行检测时, 基质干扰很严重, 灵敏度较低, 用 2-硝基苯甲醛衍生 4 种代谢物, 可以分别形成具有较好特性的衍生物, 质谱检测灵敏度有很大提高. 用磷酸氢二钾调节 pH 值时会发现混浊现象, 因为当 pH 值大于 7 时会生成一部分的磷酸氢二盐和磷酸盐. 本研究在酸性条件下用 2-硝基苯甲醛衍生化, 然后用磷酸氢二钾调节 pH 值, 用乙酸乙酯液液萃取也能很好地提取出硝基呋喃代谢物的衍生物.

对于养殖场出水口或是排污口附近海水, 由于其硝基呋喃类代谢物的含量可能会比较高, 所以本研究采用样品直接衍生萃取的方法进行测定. 对于大洋海水其硝基呋喃类代谢物的含量微乎其微, 所以本研究用先富集后衍生的方法对其进行测定.

3.2 固相萃取小柱的选择

对于海水样品, 先后试验了 OASIS HLB 和 Bond Elut[®] Plexa[™] PCX 小柱, 发现 OASIS HLB 和 Bond Elut[®] Plexa[™] PCX 小柱的净化作用及回收率都很好, 但是 OASIS HLB 操作比较繁琐, 而且对于比较脏的排污口的海水净化效果不好, 不能有效地去除一些腐殖质带来的色素干扰, 而 Bond Elut[®] Plexa[™] 操作相对比较简单, 净化效果好, 因此采用 Bond Elut[®] Plexa[™] 用于海水中硝基呋喃代谢物的富集.

对于沉积物样品, 由于提取液中含有很多的腐殖质等杂质, 而且特别是色素很难去除, 本研究用 LC-SAX-OASIS HLB 串联和 Bond Elut[®] Plexa[™] 对沉积物提取液净化, 因为 LC-SAX 可以有效地去除水和有机溶液中的一些电负性的腐殖质等杂质, 而 OASIS HLB 也能有效地富集硝基呋喃代谢物衍生物, 两个柱子串联起来也可以起到去除杂质, 富集样品的作用, 但实验发现在过 LC-SAX 柱时目标物有一定的损失, 而且用两个柱子串联操作比较繁琐, 不容易重复; 用 Bond Elut[®] Plexa[™] 不仅能有效地去除杂质还能保证回收率, 减少了步骤, 减少了损失, 重复性好, 所以也选择用 Bond Elut[®] Plexa[™] 对沉积物样品净化富集.

3.3 色谱质谱条件的选择

根据硝基呋喃代谢物衍生产物的 pK_a 值, 本法选择加入 0.1% 的甲酸调节流动相的 pH 值来保证所有组分的分离, 并在水相中加入 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵, 既增加了各组分的保留, 又使各组分的峰形得到了很大的改善, 用甲醇和水相配合做流动相比用乙腈好, 因为甲醇比乙腈更容易使各组分电离.

取 4 种硝基呋喃代谢物 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 标准溶液, 用 2-硝基苯甲醛衍生化, 以手动进样的方式分别将 4 种代谢物的衍生溶液注入离子源, 在 ESI(+) 离子化模式下, 分别对毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、去脱溶剂气温度、Rt lens、碰撞能量等条件进行优化. 通过全扫描方式观察总离子流图, 得到 $[M+H]^+$ 离子峰; 分别以此为母离子进行二级质谱分析, 找出二级质谱中两个信号最强的碎片离子, 以母离子和子离子组成监测离子对, 见表 1. 以 MRM 的方式对样品进行定性和定量分析.

3.4 回收率、精密度和检出限

在大洋海水和沉积物中分别添加三个不同浓度的硝基呋喃类代谢物标准溶液, 按照本研究的方法进行回收率试验, 同时每个浓度的实验重做五次, 计算回收率和精密度, 以 3 倍信噪比作为各组分的检出限, 以 10 倍信噪比作为各组分的定量限, 结果表明, 在添加量为 $0.03\text{--}10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平时, 平均回收率均大于 80%; 相对标准偏差都小于 12%; 检出限均低于 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 定量限均低于 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

3.5 样品测定

用本研究的方法对四十里湾的六个站位和几个养殖场出水口附近的海水及底泥进行检测, 发现只有一家养殖场附近的沉积物中检出 AOZ, 其余站位都没有检出.

表 1 硝基呋喃类代谢物的 UPLC-ESIMSMS 仪器参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
AOZ	236.24	133.82 [*]	30	12
		104.05	30	25
AOZ-D ₄	240.31	134.01 [*]	30	12
SEM	209.27	166.02 [*]	20	12
		192.01	20	12
SEM • HCF ¹³ C- ¹⁵ N ₂	212.22	191.98 [*]	20	10
		168.04	25	12
AMOZ	335.50	291.29 [*]	30	12
		262.19	30	15
AMOZ-D ₅	340.31	296.34 [*]	20	12
AHD	249.38	134.14 [*]	30	10
		104.05	30	22
AHD- ¹³ C ₃	252.32	134.01 [*]	25	12

注: * 为定量离子.