

液相色谱串联质谱测定狗肉中的氯化琥珀胆碱

Determination of suxamethonium chloride in meat by HPLC—MS/MS method

周兴旺 康绍英 张继红 邹桥

ZHOU Xing-wang KANG Shao-ying ZHANG Ji-hong ZOU Qiao

(湖南省食品质量监督检验研究院, 湖南 长沙 410117)

(Hunan Research Institute of Food Quality Supervision and Testing, Changsha, Hunan 410117, China)

摘要:用 Na_2CO_3 — NaHCO_3 缓冲盐震荡超声提取狗肉的氯化琥珀胆碱,过 WCX 固相萃取柱净化,液相色谱三重四极杆串联质谱定性、定量。结果表明,氯化琥珀胆碱在 0.5~250.0 ng/mL 浓度范围内线性关系良好($r=0.999\ 87$),回收率达 96% 以上,精密度小于 13%,检出限为 0.004 mg/kg。因此,该方法可用于狗肉中氯化琥珀胆碱快速、灵敏、准确的测定。

关键词:氯化琥珀胆碱;液相色谱串联质谱;狗肉

Abstract: Suxamethonium chloride in dog meat was extracted by ultrasonic vibration with Na_2CO_3 — NaHCO_3 buffer solution, then the supernatant was cleaned-up using WCX solid phase extraction cartridges. The qualitative and quantitative analysis for target was achieved by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The study showed that the suxamethonium chloride concentration had a good linear relationship ($r=0.999\ 87$) with mass signal ranging from 0.5~250.0 ng/mL. The recovery was above 96%. The relative standard deviation was below 13%. The limit of determination was 0.004 mg/kg. This is a rapid, sensitive, accurate method for determining suxamethonium chloride in dog meat.

Keywords: suxamethonium chloride; liquid chromatography tandem-mass spectrometry; dog meat

氯化琥珀胆碱(suxamethonium chloride, SUX)是一种肌肉松弛药,可作为手术麻醉辅助药。由于 SUX 可使动物快速死亡^[1],不法分子用其制作飞镖用于盗杀家犬^[2],被毒杀的家犬其肉中往往残留有 SUX,如流入餐桌将危害人体健康。目前,中国还没有针对 SUX 检测的国家标准、行业标准和地方标准,学者们^[3-4]曾采用化学显色法、滴定法、酶法、高效液相色谱法、离子色谱法等对 SUX 进行测定,这些方法灵敏度低、选择性差,可以检测纯品或飞镖中的 SUX,但不能

检测狗肉内痕量的 SUX。由于液相色谱串联质谱的高选择性和高灵敏度^[5],近年来有少量的研究^[6-7]采用液相色谱串联质谱法测定生物样品中的 SUX,但仅局限于血液和尿液的液体样品,因此,急需开展畜肉中 SUX 的测定方法,既可以鉴定狗肉是否有毒,也可以用于鉴定狗肉是否来源于非法盗猎。

1 材料与方法

1.1 试剂、材料与仪器

1.1.1 试剂与材料

乙腈、甲醇:色谱纯,上海安谱科学仪器有限公司;
甲酸、碳酸钠、碳酸氢钠、乙酸铵:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

氯化琥珀胆碱标准品:纯度 $\geq 95\%$,武汉大华伟业医药化工有限公司;

狗肉样品及飞镖:慈利县食品药品监督管理局送检样品;

WCX 固相萃取柱:500 mg, 3 mL, 上海安谱科学仪器有限公司;

试验所用离心管、样品瓶均为聚丙烯材质。

1.1.2 主要仪器

液相色谱:LC-30AD 型,日本岛津公司;

三重四极杆串联质谱仪:QTRAP 4500 型,美国 AB Sciex 公司;

色谱柱:Intersil C₈ 型,150 mm $\times$ 4.6 mm, 3 μm , 岛津技述(上海)商贸有限公司;

高速振荡器:CUTE MIXER CM-1000 型,日本 Tokyo Rikakakai 公司;

超声波清洗器:KQ-500B 型,昆山市超声仪器有限公司;

离心机:Heraeus Multifuge $\times$ 1R 型,美国 Thermo Fisher 公司;

漩涡混匀器:VORTEX-2 型,美国 Scientific Industries 公司;

电子天平:BS224S 型,北京赛多利斯仪器系统有限公司。

作者简介:周兴旺(1980—),男,湖南省食品质量监督检验研究院工程师,硕士。E-mail: zwx516@sina.com

通讯作者:张继红

收稿日期:2015—06—27

1.2 方法

1.2.1 液相分析条件 色谱柱选用 Intersil C₈ (150 mm×4.6 mm, 填料粒度: 3 μm); 流动相流速: 200 μL/min; 进样体积: 5 μL; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液 (含 5 mmol/L 乙酸铵), 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱条件: 0.00~3.00 min, B 溶液保持 5%; 3.00~3.10 min, B 溶液由 5% 线性增加至 90%; 3.10~6.00 min, B 溶液保持 90%; 6.00~6.01 min, B 溶液线性变化至 5%; 6.01~13.20 min, B 溶液保持 5%。

1.2.2 质谱分析条件 电喷雾离子源; 正离子扫描 (ESI+); 喷雾电压: 5 500 V; 蒸发温度: 550 ℃; 气帘气压力: 207 kPa; 离子源气体 1: 276 kPa; 离子源气体 2: 310 kPa。通过试验得到的各离子对的最佳参数见表 1。

表 1 氯化琥珀胆碱的质谱条件

Table 1 Optimized mass spectrometric parameters for suxamethonium chloride				
母离子	子离子	去簇电压(DP)/V	碰撞能量(CE)/V	驻留时间/s
145.00	151.3	50	13.5	0.1
145.00	93.5	50	19.1	0.1

1.2.3 样品处理 称取 0.5 g 试样至 50 mL 塑料离心管中, 加入 10 mL Na₂CO₃—NaHCO₃ 缓冲盐 (pH=9.3), 高速震荡 5 min, 超声提取 5 min, 以 6 000 r/min 离心 5 min, 上清液经定量滤纸过滤, 收集 4 mL 滤液, 过 WCX SPE 小柱 (上样前依次用 3 mL 甲醇、3 mL Na₂CO₃—NaHCO₃ 缓冲盐活化), 5 mL 甲醇水 (50/50, V/V) 淋洗, 用 2 mL 甲酸乙腈水溶液 (1/8/1, V/V/V) 洗脱, 洗脱液上机分析。

1.2.4 基质溶液及标准溶液的配制 按照 1.2.3 取空白样品进行处理, 得到空白基质溶液。用甲醇水 (50/50, 含 0.1% 甲酸) 配制 1 mg/mL 的标准储备液, 用空白基质配制 5, 10, 25, 50, 100, 250 ng/mL 的标准使用液。进行线性范围和方法检测限的考察。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的选择

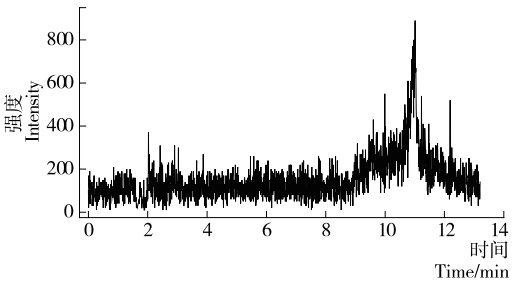
根据文献[4]和试验观察表明, 氯化琥珀胆碱为季铵盐, 极易溶于水, 微溶于乙醇、氯仿, 不溶于乙醚, 因此, 采用水相进行超声震荡提取。考虑到 WCX 固相萃取柱净化样品时对溶剂的 pH 值要求较严, 本试验采用 Na₂CO₃—NaHCO₃ 缓冲溶液进行提取。

2.2 固相萃取柱的选择

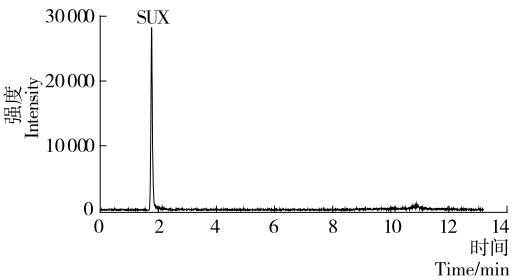
WCX 固相萃取柱是弱阳离子交换柱, 键合官能团为羧基, 常用于测定食品中季铵盐化合物或其他强阳离子化合物的样品净化处理。氯化琥珀胆碱在水相中以季铵盐的形式存在, 因此, 选用 WCX 固相萃取柱净化样品。

2.3 方法的选择性

分别取阴性样品和阳性样品按 1.2.3 进行前处理, 用建立的方法进行分析, 分别得阴性样品和阳性样品的 MRM 色谱图。由图 1 可知, 此检测方法用于检测畜肉中的氯化琥珀胆碱具有选择性, 不存在基质干扰。



(a) 阴性样品



(b) 阳性样品

图 1 阴性样品和阳性样品的 MRM 色谱图

Figure 1 MRMChromatogram of negative and positive sample (tr=1.77 min)

2.4 基质效应的考察

分别用洗脱溶剂和空白基质配制 10, 25 ng/mL 的标准溶液, 上机分析, 考察信号值的差别。结果表明, 相同浓度空白基质配制溶液信号值为洗脱溶剂配制标准溶液的信号值的 6%, 因此本方法存在明显的基质效应, 标准使用液需用空白基质溶液配制。

2.5 不同洗脱体积的洗脱效率考察

净化时, 洗脱溶剂的体积关系到测量结果准确性和方法的检出限, 因此, 考察了不同洗脱溶剂的洗脱效率。按照 1.2.3 对 WCX 固相萃取柱进行活化, 并上标准溶液 25 ng, 并按 1.2.3 进行除杂淋洗和洗脱, 洗脱体积分别为 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 同时配制基质匹配的标准溶液, 考察不同洗脱体积的洗脱回收率。由图 2 可知, 当洗脱体积为 2 mL 时, 目标物已经完全从固相萃取柱洗脱下来, 因此, 选择 2.0 mL 洗脱溶剂来淋洗目标物。

2.6 线性范围和检测限

用空白基质溶剂, 配制了 0.50, 1.25, 10.00, 25.00, 50.00, 100.00, 250.00 ng/mL 标准系列溶液, 上机分析, 以浓度为

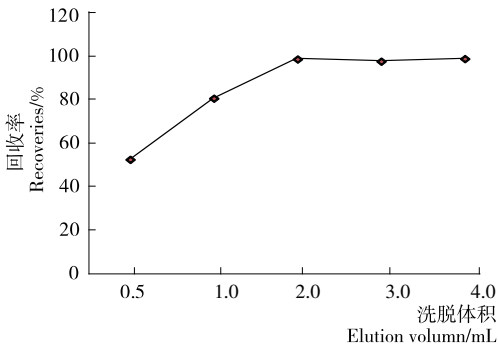


图 2 不同洗脱体积的洗脱效率

Figure 2 Elution efficiency of different elution volumes

横坐标,峰面积为纵坐标,得曲线方程为 $y=14\ 027x(r=0.999\ 87)$,因此氯化琥珀胆碱在 0.5~250.0 ng/mL 浓度范围内,线性关系良好,可用外标法定量。GB/T 5009.1—2013《食品卫生检验方法 理化部分 总则》和 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》附录 F.4 对检出限的定义为 $S/N=3$ 时对应样品中目标物的含量,因此,本方法的检出限为 4 μg/kg。

2.7 回收率和精密度

分别称取空白样品 0.5 g,添加 3 种不同浓度的氯化琥珀胆碱,按照 1.2.3 进行样品前处理并上机分析,每个浓度平行测定 6 次,计算回收率和精密度,见表 2。结果表明,本方法回收率高,重现性好。

表 2 阴性样品加标的回收率和精密度

Table 2 Recoveries and precisions of adding target in negative sample ($n=6$)

添加量/(μg · kg ⁻¹)	平均回收率/%	精密度(RSD)/%
5	103	12.1
15	96	8.7
50	98	6.3

2.8 样品检测情况

利用该方法检测了送检的 44 个狗肉样品,其中,4 个样品未检出,其余样品的检出量为 0.004~40.000 mg/kg。另外,研究还检测了 4 个送检的飞镖,检出量为 31~68 mg/个。因此,本方法可以用于检测畜肉和飞镖中的氯化琥珀胆碱。

(上接第 91 页)

可以为遏制蜂蜜市场以次充好、以假乱真、掺假造假等混乱现象的出现提供一定的参考和指导。在今后的研究中,可以更深入地探索蜂蜜从蜜源花期开始到结束全过程的糖组分变化规律。

参考文献

1 中华全国供销合作总社蜜蜂产品标准化技术委员会秘书处,中国蜂产品协会蜂蜜专业委员会,北京百花蜂业科技发展股份公司. GH/T 18796—2012 蜂蜜[S]. 北京:中国标准出版社,2012.

2 龚绍安. 生产成熟蜜效益可观[J]. 蜜蜂杂志,2012,32(6): 34.

3 陈渊. 生产成熟蜜是“得”还是“失”[J]. 蜜蜂杂志,2011,31(5): 44~45.

4 许政,邱泽群,胡军军. 天然成熟蜂蜜及巢蜜[J]. 中国蜂业,2012(4): 18~19.

5 鲍敬恒. “追花夺蜜”有感[J]. 蜜蜂杂志,2011,31(1): 30.

6 王德安. 天然成熟蜂蜜的困境[J]. 中国蜂业,2009(3): 39.

7 Fuente E de la, Ruiz-Matute A I, Valencia-Barrera R M. Carbohydrate composition of Spanish unifloral honeys[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1 483~1 489.

8 Brokl, Michal, Soria, et al. Separation of disaccharides by comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry. Application to honey analysis[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(22): 11 561~11 567.

9 Viviane Maria Rizelio, Laura Tenfen, Roberta da Silveira, et al. Development of a fast capillary electrophoresis method for deter-

3 结论

本试验通过仪器条件的建立、样品前处理的考察以及实际样品的检测,建立了狗肉中氯化琥珀胆碱的液相色谱串联质谱法。该方法选择性好,回收率高,测定过程简便快速,适用于狗肉中氯化琥珀胆碱的快速检测。但本试验存在较强的基质抑制作用,一定程度上影响了本方法的灵敏度,可以考虑通过改善固相萃取方式或改善色谱条件,从而降低基质抑制作用,进一步提高本方法的检测灵敏度。

参考文献

1 鞠文博,耿业业,高颂,等. 氯化琥珀胆碱对小白鼠及水貂口服毒理学实验[J]. 黑龙江畜牧兽医科技版,2013(3):112~113.

2 畅守鹏,张宏,董晓丽. 氯化琥珀胆碱急性中毒死亡 1 例[J]. 中国法医学杂志,2012,27(3):247

3 蒋明哲,程向炜,褚建新. 氯化琥珀胆碱分析测定的研究进展[J]. 法医学杂志,2013,29(6):451~453.

4 陈祥国,王淑真,吕纪忠,等. 离子色谱法分析生物检材中的氯化琥珀胆碱[J]. 刑事技术,2010(6): 17~18.

5 颜鸿飞,欧阳振中,蔡婧怡,等. 肉类食品中乙氧喹残留的液相色谱检测及质谱确证[J]. 食品与机械,2012,28(5):83~86.

6 宣宇,孙楠,傅得锋,等. 液相色谱质谱联用检测血液和尿液中的琥珀胆碱及对标样的稳定性评价[J]. 分析实验室,2011,30(8): 112~114.

7 张云峰,赵森,王炯. 超高效液相色谱—质谱法分析人全血中的氯化琥珀胆碱[J]. 中国法医学杂志,2013,28(6):475~477.

mination of carbohydrates in honey samples[J]. Talanta, 2012, 93(2): 62~66.

10 Roberto Consonni, Laura Ruth Cagliani, Clelia Cogliati, et al. NMR characterization of saccharides in Italian honeys of different floral sources[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(18): 4 526~4 534.

11 Morales V, Corzo N, Sanz M L, et al. HPAEC—PAD oligosaccharide analysis to detect adulterations of honey with sugar syrups[J]. Food Chemistry, 2008, 107(2): 922~928.

12 张欣,单杨,李水芳. 基于多元散射校正和偏最小二乘(MSC/PLS)的傅里叶变换近红外光谱检测蜂蜜中还原糖[J]. 食品与机械,2009,25(6): 109~112.

13 Ouchemoukh S, Schweitzer P, Bey MB, et al. HPLC sugar profiles of Algerian honeys[J]. Food Chemistry, 2010, 121(2): 561~568.

14 Bentabol Manzanares A, García ZH, Galdón BR, et al. Differentiation of blossom and honeydew honeys using multivariate analysis on the physicochemical parameters and sugar composition[J]. Food Chemistry, 2011, 126(2): 664~672.

15 张志国,王硕,生庆海. HPLC—ELSD 法检测液态奶中的低聚半乳糖[J]. 食品与机械,2011,27(3): 68~70.

16 张英,石雪萍,张卫明. HPLC—ELSD 法与 HPLC—RID 法检测蜂蜜中糖分的比较[J]. 中国野生植物资源,2009,28(1): 43~47.

17 Elena Venir, Massimiliano Spaziani, Enrico Maltini. Crystallization in “Tarassaco” Italian honey studied by DSC[J]. Food Chemistry, 2010, 122(2): 410~415.