

# 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中 喹乙醇代谢物残留量

刘正才<sup>1</sup>, 杨 方<sup>1</sup>, 余孔捷<sup>1</sup>, 林永辉<sup>1</sup>, 李 立<sup>2</sup>

(1. 福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350001; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100123)

**摘 要:** 建立动物源性食品中喹乙醇代谢残留标识物 3-甲基喹喔啉-2-羧酸残留量的高效液相色谱串联质谱法。样品均质后, 经 Protease 蛋白酶进行过夜酶解, 加入盐酸酸化, 离心, 过滤后采用阴离子交换固相萃取柱 Oasis MAX 进行净化和富集。分析样品经 Kinetex C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 在高效液相色谱-串联质谱多反应监测模式下进行定性、定量分析, 采用正离子扫描。6 种测定样品中 3-甲基喹喔啉-2-羧酸定量下限均为 0.5 μg/kg, 鳗鱼、虾、鸡肉、猪肉、牛肉和猪肝在 0.5、1.0、4.0 μg/kg 和 10.0 μg/kg 四个添加水平的平均回收率在 60.7%~107% 之间, 相对标准偏差( $n=10$ ) 在 4.59%~14.9% 之间。本方法分析速度快、灵敏度高、重现性好, 各项技术指标均满足国内外相关法规要求, 适用于动物源性食品中喹乙醇代谢物 3-甲基喹喔啉-2-羧酸残留的确证检测。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 喹乙醇; 3-甲基喹喔啉-2-羧酸; 动物源性食品

## Determination of Olaquinox Metabolite Residues in Food Products of Animal Origin Using High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LIU Zheng-cai<sup>1</sup>, YANG Fang<sup>1</sup>, YU Kong-jie<sup>1</sup>, LIN Yong-hui<sup>1</sup>, LI Li<sup>2</sup>

(1. Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China;

2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was developed to determine the olaquinox metabolite marker 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA) in food products of animal origin. Samples were homogenized, hydrolyzed with protease overnight, acidified by adding hydrochloric acid, centrifugated, filtrated, and then cleaned up and enriched using an Oasis MAX solid phase extraction cartridge. The chromatographic separation was performed on a Kinetex C<sub>18</sub> column. The qualitative and quantitative analysis of MQCA was carried out using an HPLC-MS/MS system under positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The limits of quantification for MQCA in meats from 6 different animal species (eel, shrimp, chicken, pork, beef and porcine liver) were all 0.5 μg/kg. The average recoveries at four different spike levels: 0.5, 1.0, 4.0 μg/mg and 10.0 μg/kg were 60.7%—107% with relative standard deviation between 4.59% and 14.9% ( $n=10$ ). This method was fast, sensitive and reproducible and all of its technical indexes could meet the requirements of domestic and international relevant standards. Therefore it is applicable for the determination and confirmation of MQCA residues in food products of animal origin.

**Key words:** liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); olaquinox; 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA); food products of animal origin

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)12-0210-05

喹乙醇(olaquinox CAS: 23696-28-8)又称喹酰胺醇, 是一种具有促生长作用的药物性添加剂, 可促进畜禽生长, 提高饲料转化率, 广泛用于猪、牛、鸡、

羊的促进生长、抗菌治病和水生动物疾病的防治<sup>[1]</sup>; 3-甲基喹喔啉-2-羧酸(3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA, CAS: 74003-63-7)是喹乙醇的主要代谢

收稿日期: 2011-05-16

基金项目: 国家质检总局检验检疫行业标准制(修)定计划项目(2009B781r)

作者简介: 刘正才(1977—), 男, 工程师, 硕士, 主要从事农、兽药残留检测研究。E-mail: zhengcailiu@yahoo.com.cn

产物,也是国际食品法典委员会认定的标示残留物<sup>[2]</sup>,由于其性质稳定而且毒性极大<sup>[3-4]</sup>,喹乙醇在动物源性食品中的残留已引起人们的重视,世界许多国家都禁止在食用性动物饲养和治疗中使用喹乙醇,美国没有批准使用;欧盟委员会 EC 2788/98 决议将喹乙醇列为禁用药物;我国也有明确规定,喹乙醇被禁止用于家禽及水产养殖。

目前报道的喹乙醇残留检测方法主要有液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[5-7]</sup>、液相色谱串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[8-13]</sup>等。液相色谱法灵敏度相对较低,容易受到复杂基质干扰,满足不了日益严格的残留限量要求;液相色谱串联质谱联法具有特异性强,定性准确等特点,检测灵敏度和准确性有了进一步的提高,因此现已成为分析喹乙醇代谢物的主要手段,但现有的喹乙醇残留检测的质谱方法存在前处理步骤繁琐、有机试剂消耗量大、测定周期长、检测基体较单一等缺点。因此,本实验室在参考喹乙醇残留检测国家标准<sup>[14-15]</sup>的基础上进行改进,扩大了检测基体,优化样品前处理步骤,拟建立喹乙醇标示代谢物 MQCA 的 LC-MS/MS 方法,为更全面、严格监控这类药物的使用和残留测定提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料、试剂与仪器

鱼、虾、猪肉、鸡肉、牛肉、猪肝均为市售,鱼肉、虾肉去皮,去壳后取其可食部分。

实验用水,应符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和实验方法》一级水的要求;乙腈、甲醇、甲酸、乙酸乙酯为色谱纯;盐酸、乙酸、乙酸钠、氢氧化钠、氯化钠、氨水为分析纯;Protease 蛋白酶(P5147, -18℃以下保存)、Tris 碱(T 1503) 美国 Sigma 公司;3-甲基喹啉-2-羧酸甲酯(MQCA)、氘代 3-甲基喹啉-2-羧酸甲酯(MQCA-D<sub>7</sub>)标准品(纯度>99%) 德国 Dr. Ehrenstorfen GmbH 公司。

4000Q Trap 液相色谱-串联质谱仪(配有电喷雾离子源) 美国 Applied Biosystems 公司;SK-1 涡旋混合器 上海医科大学仪器厂;高速冷冻离心机(转速可达 15000r/min,致冷可达 4℃) 美国 Beckman Coulter 公司;MilliQ 纯水系统 美国 Millipore 公司;固相萃取装置 美国 Waters 公司。

### 1.2 标准工作液的制备

MQCA 以及内标 MQCA-D<sub>7</sub> 的标准储备溶液:分别准确称取适量标准品(精确至 0.1mg),用甲醇溶解,配制质量浓度约为 100mg/L 的标准储备溶液,于 -18℃

保存,保存期 6 个月;MQCA 的标准工作溶液:根据需要吸取适量的 MQCA 标准储备溶液,用甲醇稀释成质量浓度为 1.0mg/L 的标准工作液,于 4℃ 保存,保存期 3 个月。MQCA-D<sub>7</sub> 标准工作溶液:根据需要吸取适量的 MQCA-D<sub>7</sub> 标准储备溶液,用甲醇稀释成质量浓度为 1.0mg/L 的标准工作液,于 4℃ 保存,保存期 6 个月。临用时,用 10% 甲醇水溶液稀释上述标准工作溶液,配制成不同浓度的标准工作液。

10g/L 蛋白酶水溶液,4℃ 保存;蛋白复合体消化溶液(0.2mol/L Tris 缓冲盐溶液含 0.1mol/L 的氯化钙, HCl 溶液调 pH9.6),室温保存;阴离子交换柱: Oasis MAX 60mg/3mL,使用前需用 3mL 甲醇和 3mL 水活化,保持柱体湿润。

### 1.3 样品前处理

制样:将鱼肉、虾肉、鸡肉、牛肉、猪肉组织和肝脏样品充分绞碎,取 0.5kg 作为试样,置于清洁样品容器中,密封,将制备好的试样于 -18℃ 以下保存。

酶解:称取 5g 组织样品(精确至 0.01g)于 50mL 聚丙烯离心管中,加入 8mL 蛋白复合体消化溶液(pH9.6),混匀,再加入 0.3mL 10g/L 蛋白酶溶液,充分混匀后,置于(47±3)℃ 空气浴摇床中酶解 16~18h。

提取与净化:酶解后的样品溶液置室温中冷至常温,加入 2×10mL 0.3mol/L HCl 溶液,振荡混匀,5000r/min 离心 5min,移出上层水溶液,加入 10mL 正己烷,振荡混匀,15000r/min 离心 10min,弃去正己烷后将上清液过滤;下层水溶液过滤后全部移入 Oasis MAX 固相萃取柱中,待样液全部流出后,用 10mL 乙酸钠溶液(0.05mol/L, pH7.0)-甲醇(19:1, V/V)溶液淋洗离心管后过固相萃取柱,待溶液全部流出后,固相萃取柱依次用 2×3mL 水、2×3mL 水-甲醇(4:1, V/V)溶液和 3mL 甲醇淋洗,然后真空抽干 5min,最后用 3mL 含体积分数 2% 甲酸的乙酸乙酯洗脱至玻璃管中,加入 50μL 内标工作液(相当于试样中含内标 10.0μg/kg),在 45℃ 用氮气浓缩仪吹干。准确加入 1.0mL 0.1% 甲酸-乙腈(9:1, V/V)溶液溶解残渣,过 0.22μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定,内标法定量。

### 1.4 LC-MS/MS 条件

表 1 MQCA 测定的梯度洗脱条件  
Table 1 Gradients elution condition for MQCA separation

时间/min	0.2% 甲酸/%	甲醇/%	乙腈/%
0.0	90	5	5
0.2	90	5	5
4.0	10	30	60
7.0	5	70	25
8.0	90	5	5
12.0	90	5	5

## 1.4.1 色谱条件

色谱柱: C<sub>18</sub> 柱, Kinetex(100mm × 3.0mm(i.d.), 2.6 μm); 流动相: 甲醇、乙腈以及 0.2% 甲酸溶液, 梯度洗脱条件见表 1。流速: 0.30mL/min; 柱温: 35 °C; 进样量: 2.0 μL。

## 1.4.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI); 扫描方式: 正离子模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 电喷雾电压: 4500V; 气帘气压力: 0.172MPa(氮气); 离子源温度(550 °C; 雾化气压力 0.379MPa; 辅助气压力 0.379MPa; 其他质谱参数见表 2。

表 2 MQCA 的主要质谱参数  
Table 2 MS/MS parameters of MQCA

化合物	保留时间	母离子(m/z)	子离子(m/z)	裂解结构解析	去簇电压/EV	碰撞能量/eV
MQCA	7.16	189.1	145.0*	[M + H - H <sub>2</sub> O - CO] <sup>+</sup>	54	22
			143.0	[M + H - H <sub>2</sub> O - CO - 2H] <sup>+</sup>	54	24
MQCA-D <sub>7</sub>	7.16	196.1	102.1	[M + H - COOH - CH <sub>3</sub> - HCN] <sup>+</sup>	54	35
			133.1	[M + H - D <sub>2</sub> O - CO - CD <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	54	25

注: \* 为定量离子。

## 2 结果与分析

## 2.1 提取条件的优化

MQCA 在动物体内与蛋白质以结合态存在, 因此在提取前需要水解, 使 MQCA 从组织中游离出来, 本方法采用酶解的方式, 选用 Protease 蛋白酶进行酶解, 酶解之前, 先加入 Tris 蛋白复合体消化溶液使蛋白复合体分解, 然后加入 Protease 蛋白酶, 置于 47 °C 空气浴中过夜(16~18h)。目前对 MQCA 的提取方法主要有有机溶剂(乙酸乙酯)提取以及采用酸提取, 本方法采用酶解后调节 pH 值后直接用酸溶液提取, 操作简单, 避免了采用有机溶剂多次提取, 有利于下一步的净化。

## 2.2 净化条件的优化

目前根据文献报道的方法<sup>[5-12]</sup>, 对 MQCA 的净化主要包括有利用酸碱条件下溶解性不同的液液分配进行净化和利用 SPE 净化, SPE 主要有包括 SCX 和 MAX, 本方法比较两种净化方法, 最终选择先用正己烷去除脂溶性杂质后再过 MAX 进行净化。由于 Oasis MAX 克服传统硅胶基质混合型固相提取吸附剂的局限性, 有较强的 pH 值适应范围, 因此选择混合型固相萃取柱 Oasis MAX, 用 3mL 的洗脱液基本上能洗脱保留在 SPE 上的目标化合物, 回收率达 98% 以上; 但是其氘代内标物 MQCA-D<sub>7</sub> 在 MAX 的过柱回收率比较低, 因此采用过柱后加入内标溶液。

## 2.3 基质效应的考察

将 MQCA 标准溶液分别用流动相和空白基质提取溶液稀释至 0、0.50、1.0、2.0 μg/L 和 5.0 μg/L, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标作图, 即可得到标准工作曲线和基质曲线, 通过两个曲线的斜率求商可知, MQCA 的基质曲线响应值约为标准曲线响应值的 95%, 说明 MQCA 在所验证基质中无基质效应。

## 2.4 液相色谱条件的选择

流动相的优化, 采用水、甲醇、乙腈三通道对 MQCA 进行测定, 使其获得最佳的保留时间, 分别往水相中加入少量的甲酸、乙酸以及乙酸铵等进行测试, 发现甲酸, 乙酸有明显的离子增强作用, 而乙酸铵对其中的离子对(m/z 145.0/189.1)有明显的离子抑制作用, 因此采用 0.2% 甲酸、甲醇、乙腈作为流动相。

## 2.5 质谱条件的优化

实验采用 1.0mg/L 的 MQCA 以及 MQCA-D<sub>7</sub> 标准溶液在正离子模式下进行母离子全扫描, 确定其分子离子, 并对仪器电离电压、锥孔电压、离子源温、碰撞能量等参数进行优化。分别对其母离子, 子离子进行全扫描, MQCA 的子离子二级质谱图见图 1, 经过优化, 选择 m/z 189.1/145.0 作为定量离子对, 而 m/z 189.1/143.0 和 m/z 189.1/102.2 为定性离子对, 最后以 MRM 正离子模式优化各种质谱参数, 得到最佳质谱条件以及其可能的结构式见表 2。

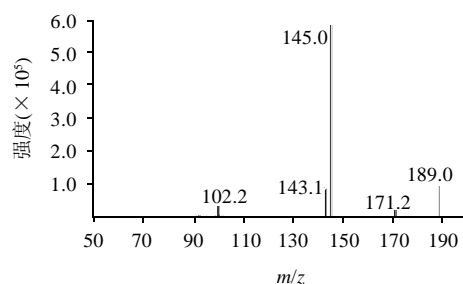


图 1 MQCA 的二级质谱图  
Fig.1 MS/MS spectra of MQCA

## 2.6 线性范围、线性关系、测定低限

在本方法所确定的实验条件下, 分别以流动相逐级稀释成标准系列浓度进行测定, 以定量离子的响应峰面积(y)对相应的 MQCA 的质量浓度(x/(ng/mL))作图, 获得的线性方程为  $y = 1160x + 22.4$ , 相关系数(r)为 0.9996, 结果表明在 0.5~100ng/mL 范围内定量离子的响应峰面积和样品质量浓度之间有很好的线性关系。

表3 不同添加水平下6种动物组织中MQCA的回收率及相对标准偏差( $n=10$ )Table 3 Recoveries and relative standard deviations of triadimenol at four spiked levels in animal tissue samples ( $n=10$ )

样品	添加水平/( $\mu\text{g/kg}$ )							
	0.5		1.0		4.0		10.0	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
鳗鱼	76.0~95.6	8.57	78.5~105.0	7.76	60.7~94.5	12.7	73.7~106.0	11.8
虾	73.4~91.4	7.38	69.0~90.7	9.86	69.0~98.5	11.4	63.6~97.2	14.8
猪肉	71.8~103.2	12.8	73.3~99.7	12.5	73.2~94.5	8.20	75.7~103.0	8.10
猪肝	72.4~99.4	12.5	68.9~98.5	13.3	61.7~81.7	10.7	67.3~97.0	14.9
鸡肉	69.4~96.4	8.62	76.9~89.4	4.59	85.5~105.2	6.86	83.5~107.0	9.11
牛肉	73.8~103.2	11.8	73.6~99.1	11.6	75.2~98.2	8.00	74.7~103.0	8.10

选择鳗鱼、虾、猪肉、鸡肉、牛肉、猪肝6个各不同批次不含MQCA的样品,按照上述的实验步骤进行测定,得到20个空白样品的质谱图,按照10倍的信噪比计算所对应MQCA的浓度即为测定低限,其结果分别为鳗鱼( $0.4\mu\text{g/kg}$ )、虾( $0.3\mu\text{g/kg}$ )、猪肉( $0.5\mu\text{g/kg}$ )、鸡肉( $0.3\mu\text{g/kg}$ )、牛肉( $0.5\mu\text{g/kg}$ )、猪肝( $0.5\mu\text{g/kg}$ ),远低于国内外对MQCA的最大残留限量规定。

## 2.7 方法的回收率与精密度

以不含MQCA残留的鳗鱼、虾、鸡肉、牛肉、猪肉、猪肝为空白样品,进行4个水平的添加回收实验,方法的回收率范围及相对标准偏差见表3。4个添加水平的平均回收率在60.7%~107%之间,相对标准偏差( $n=10$ )在4.59%~14.9%之间。实验结果满足国内外对残留分析的要求,空白及加标鳗鱼样品的重构离子色谱图见图2。

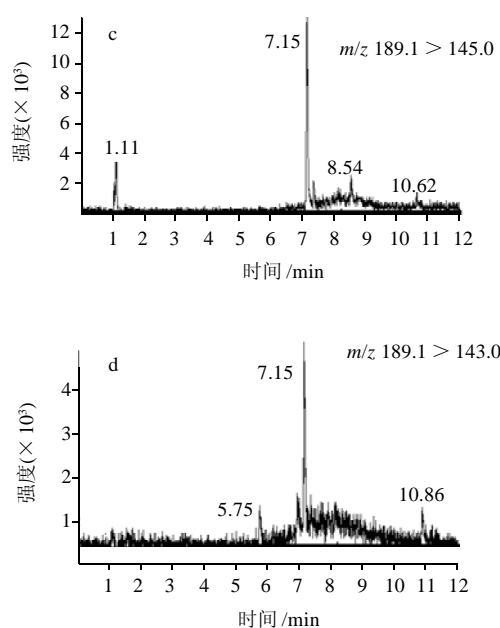
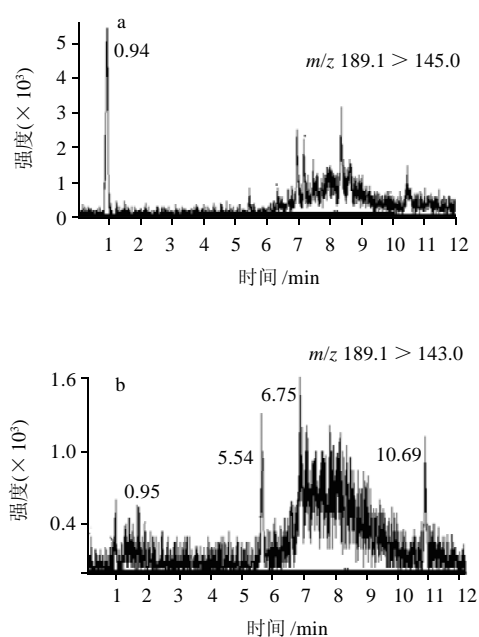
a、b 空白鳗鱼样品; c、d 空白鳗鱼样品加标  $0.5\mu\text{g/kg}$ 。

图2 鳗鱼基质中测定低限水平的MQCA在MRM检测模式下的色谱图

Fig.2 Chromatograms of MQCA in blank and spiked eel samples under MRM mode

## 2.8 实际样品的检测

已将该方法应用于进出口动物组织中MQCA的残留监控检测,检测的基体包括鳗鱼、虾、猪肝、鸡肝等,检测样品42批次,没有发现阳性样品,结果表明,方法灵敏度高(定量下限为 $0.5\mu\text{g/kg}$ )、重现性好、适用性强,完全能满足国内外相关法规的要求。

## 3 结论

本实验采用蛋白酶水解动物组织样品,盐酸酸化后,直接采用MAX阴离子固相萃取小柱富集与净化,高效液相色谱分离,串联质谱仪测定,该方法有机溶

剂用量少、操作简单、灵敏度高,适用于食品中MQCA的痕量测定。

#### 参考文献:

- [1] 胡新岗, 方希修, 黄银云, 等. 喹乙醇饲料添加剂应用研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 19(5):64-65.
- [2] FAO/WHO. Joint expert committee on food additives: evaluation of certain veterinary drug residues in food technical series [S]. 1995.
- [3] 徐韵, 李兆利, 陈海刚, 等. 兽药添加剂喹乙醇对水生生物的毒理学研究[J]. 南京大学学报, 2004, 40(6): 728-733.
- [4] 宋春美, 侯玉泽, 刘宣兵, 等. 喹乙醇的危害及检测方法研究进展[J]. 河南农业科学, 2009(12): 13-17.
- [5] 张小军, 郑斌, 陈雪昌, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中喹乙醇标示残留物[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 289-292.
- [6] 殷居易, 倪梅林, 寿成杰, 等. 鸡肉中喹乙醇、卡巴多及其代谢物的残留检测[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(1): 11-15.
- [7] WU Yujie, YU Huang, WANG Yulian, et al. Development of a highperformance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of quinoxaline-2-carboxylic acid and methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid in animal tissues[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1146(1): 1-7.
- [8] HURTAUD-PESSEL D, PIROTAIS Y, BLOT J, et al. An LC/MS-MS method for the determination of QCA and MQCA, the metabolites of carbadox and olaquinox in porcine liver and muscle[C]. Antwerp Belgium: Fifth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, 2006: 16-19.
- [9] BOISON J O, LEE S C, GEDIR R G. A determinative and confirmatory method for residues of the metabolites of carbadox and olaquinox in porcine tissues[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 637(1/2): 128-134.
- [10] 梅光明, 郑斌, 陈雪昌, 等. 超高效液相色谱-质谱联用法测定水产品中喹乙醇代谢物残留量[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2010, 29(3): 254-259.
- [11] 赵东豪, 黎智广, 杨金兰, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定水产品中残留的喹乙醇代谢物[J]. 分析试验室, 2010, 29(9): 19-22.
- [12] 欧阳姗, 庞国芳, 谢丽琪, 等. 动物组织中卡巴氧和喹乙醇以及相关代谢产物的液相色谱-串联质谱检测方法[J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 590-594.
- [13] 林黎, 谢丽琪, 欧阳姗, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物的残留量[J]. 分析试验室, 2010, 29(2): 38-41.
- [14] 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[S].
- [15] 农业部 1077 号公告. 水产品中喹乙醇代谢物残留量的测定: 高效液相色谱法[S].