

concentration of viruses from tap water [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10):3500-3506.

[16] IKNER L A, SOTO-BELTRAN M, BRIGHT K R. New method using a positively charged microporous filter and ultrafiltration for

concentration of viruses from tap water [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(10):3500-3506.

[17] 叶晓艳. 饮用水中病毒浓缩及检测方法的研究和应用[D]. 武汉:同济医学院, 2012.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定纯牛奶中喹乙醇及其代谢物

马晓年, 张秀清, 张瑞雨, 赵丽, 陈俊秀

(昆明市疾病预防控制中心, 云南 昆明 650228)

摘要:目的 建立可靠的前处理方法, 采用超高效液相色谱-串联质谱法检测纯牛奶中喹乙醇及其代谢物 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(MQCA)。方法 样品经盐酸水解, 乙腈-乙酸乙酯(1:1, V/V)提取, 分析了直接浓缩及分别经 PAX、PEP 固相萃取小柱净化、富集的结果; 以乙腈-0.05% 氨水为流动相, 经 Inertsil ODS-3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm)分离, 采用多反应监测正离子模式进行定性及定量分析。结果 直接浓缩具有较好的回收率, 喹乙醇的方法检出限为 0.06 μg/kg, 方法定量限为 0.20 μg/kg, 在 0.20、1.00、5.00 μg/kg 3 个加标水平下回收率分别为 69.8%、111%、97.4%; MQCA 的方法检出限为 0.02 μg/kg, 方法定量限为 0.10 μg/kg, 在 0.10、1.00、3.00 μg/kg 3 个加标水平下回收率分别为 75.8%、112%、117%。结论 该检测方法适用于纯牛奶中喹乙醇及其代谢物残留的检测。

关键词: 喹乙醇; 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸; 超高效液相色谱-串联质谱; 纯牛奶; 兽药残留

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2018)06-0602-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2018.06.010

Determination of olaquinox and its metabolite in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

MA Xiaonian, ZHANG Xiuqing, ZHANG Ruiyu, ZHAO Li, CHEN Junxiu

(Kunming Center for Disease Control and Prevention, Yunnan Kunming 650228, China)

Abstract: Objective To establish a reliable pretreatment method for olaquinox and its metabolite methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA) in milk with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Methods The sample was hydrolyzed by hydrochloric acid and extracted by ethyl acetate-acetonitrile (1:1, V/V), then the concentration was analyzed directly or after PAX and PEP cartridge purification. The objective compounds were separated using Inertsil ODS-3 column (2.1 mm × 100 mm, 3 μm) with acetonitrile-water (0.05% ammonia) as mobile phase and analyzed by mass spectrometry in the positive electrospray ionization under multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results** The result showed that direct concentration had good recovery. The detection limit of olaquinox was 0.06 μg/kg, limit of quantitation was 0.20 μg/kg, the average recoveries or spiked levels of 0.20, 1.00, 5.00 μg/kg were 69.8%, 111% and 97.4%. The detection limit of MQCA was 0.02 μg/kg, the limit of quantitation was 0.10 μg/kg, the average recoveries for spiked levels of 0.10, 1.00, 3.00 μg/kg were 75.8%, 112%, 117%.

Conclusion The method was suitable for the detection of olaquinox residual in milk.

Key words: Olaquinox; methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; milk; residue of veterinary drug

收稿日期: 2018-10-25

作者简介: 马晓年 女 主管技师 研究方向为食品质量与安全

E-mail: 179267837@qq.com

通信作者: 陈俊秀 女 初级检验师 研究方向为理化分析

E-mail: 752110643@qq.com

喹乙醇(olaquinox)又称喹酰胺醇,属喹噁啉类化合物^[1],商品名为倍育诺、快育灵,该类药物具有明显的促进动物生长的作用,且具有较强的抑菌作用^[2],广泛用于促进猪、牛、鸡、羊生长和抗菌治病。喹乙醇在动物体内代谢后会生成 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(MQCA),它能抑制脱氧核糖核酸的合

成,对染色体畸变有影响,也是一种致癌物。喹乙醇有明显蓄积毒性,对大多数动物有明显的致畸作用,对人也有潜在的“三致”(致畸形,致突变,致癌)作用,因此,喹乙醇在美国和欧盟都被禁止用作饲料添加剂。2018年1月11日中华人民共和国农业部发布第2638号公告^[3],自2018年5月1日起,停止生产喹乙醇、氨苯胂酸、洛克沙胂等3种兽药的原辅料及各种制剂,自2019年5月1日起,停止经营、使用。喹乙醇在动物体内造成的残留严重危害了消费者的健康,因此,建立简便、灵敏的分析方法十分必要。喹乙醇及其代谢物的检测常用液相色谱法^[4-7]、液相色谱-串联质谱法^[8-12],本试验在前人研究工作的基础上,对样品前处理方法进行了改进,建立了检测纯牛奶中喹乙醇及其代谢物的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

QTRAP 4500 质谱分析仪(美国 AB SCIEX)、Agilent 1290 超高效液相色谱仪(美国安捷伦)、高速冷冻离心机、振荡器、氮吹仪(Reeko Auto EVA-30)、电子天平、均质器、Agela Cleanert PAX 固相萃取小柱(60 mg/3 ml)、Agela Cleanert PEP 固相萃取小柱(60 mg/3 ml)。

喹乙醇(G123355,纯度为99.0%)、MQCA 标准品(G158632,纯度为99.0%)均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH,甲醇、乙腈、乙酸乙酯均为色谱纯,浓氨水、浓盐酸均为分析纯,试验用水为超纯水。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液的配制

喹乙醇和 MQCA 标准品分别称取 1.93、1.06 mg,用甲醇溶解并定容至 10 ml 制成母液。取 0.25 ml 喹乙醇、0.50 ml MQCA 定容至 100 ml 棕色容量瓶中,喹乙醇配成浓度为 483 $\mu\text{g/L}$ 、MQCA 配成浓度为 530 $\mu\text{g/L}$ 的标准储备液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。使用时根据需要配制适当浓度的标准使用液。

1.2.2 样品的提取

称取 5 g(精确至 0.01 g)均质好的纯牛奶样品至 50 ml 离心管中,加入 10 ml 乙腈-乙酸乙酯(1:1, V/V)溶液,混匀后置于 $(47 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中振摇 1 h, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 10 min(离心半径 7 cm),收集上层有机相;加入 20 ml 0.3 mol/L 盐酸,振荡 5 min,再加入 10 ml 乙腈-乙酸乙酯(1:1, V/V)溶液,混匀后置于 $(47 \pm 3)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中振摇 1 h, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 000 r/min 离心 10 min(离心半径 7 cm),合并上

层有机相。

1.2.3 样品的净化

将上述提取液分别过 PAX、PEP 固相萃取小柱(分别用 3 ml 甲醇和 3 ml 水活化)^[7,11],再分别用 3 ml 甲醇和 3 ml 水淋洗,最后用 3 ml 含 2% 甲酸的乙酸乙酯洗脱,挥至近干,准确加入 1.5 ml 甲醇溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,供 UPLC-MS/MS 仪测定。

1.2.4 仪器条件

色谱:色谱柱为岛津 Inertsil ODS-3 柱(2.1 mm \times 100 mm, 3 μm);流动相 A 为 0.05% 氨水,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱程序见表 1;流速 0.30 ml/min,分析时间 5 min,进样体积 5 μl ,柱温 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 流动相梯度洗脱

t/min	0.05% 氨水/%	乙腈/%
0.0	80	20
1.5	80	20
1.6	25	75
3.5	25	75
3.6	80	20
5.0	80	20

质谱:电离电压:4.5 kV;检测方式:多反应监测(MRM);离子源温度:450 $^{\circ}\text{C}$;喷雾气压力:40 psi (2.76×10^5 Pa);气帘气压力:35 psi (2.41×10^5 Pa);辅助气流速:40 $\mu\text{l/min}$;其他参数见表 2。

表 2 各化合物质谱参数

化合物名称	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	去簇电压 /V	碰撞电压 /eV
喹乙醇	263.8	212.0*	80	28
		177.1	80	22
		143.0	80	40
MQCA	188.9	145.0*	50	18
		143.0	50	20
		171.0	50	12

注:* 为定量离子

2 结果与分析

2.1 样品前处理的优化

2.1.1 提取溶剂的选择

采用各类溶剂提取动物源性食品中喹噁啉类药物残留已有文献报道,常用有乙腈、甲醇、水、乙酸乙酯等单一溶剂体系或二相、三相溶剂体系。本试验比较了乙腈-乙酸乙酯(1:1, V/V)、乙腈-甲醇-乙酸乙酯(1:1:1, V/V)、乙腈-甲醇(1:1, V/V)、甲醇-乙酸乙酯(1:1, V/V)、水、乙腈、乙腈-水的提取效果。结果表明,水体系对牛奶的提取效果不佳,而其他溶剂体系均有一定的提取率,其中乙腈-乙酸乙酯(1:1, V/V)及甲醇-乙酸乙酯(1:1, V/V)提取率最高,回收率均能达 75% 以上。而乙腈提取

时,杂质相对较少,且有沉淀蛋白的作用,能减轻净化的负担。乙酸乙酯对MQCA也有较好的提取率,故本试验采用乙腈-乙酸乙酯(1:1,V/V)作为提取溶剂。

2.1.2 净化条件的选择

本试验对经PAX、PEP两种固相萃取小柱净化富集及直接浓缩进行了加标回收试验。结果表明两种固相萃取小柱富集、净化过程中损失较大,回收率均偏低,且价格昂贵,而直接浓缩液能得到较好的回收率且大大节约了试验成本,结果见表3,综合考虑本试验采用直接浓缩。

表3 三种前处理方法的回收率

Table 3 Recovery rate of three pretreatment

前处理方法	啶乙醇/%	MQCA/%
直接浓缩	69.8 ~ 111	75.8 ~ 117
PEP固相萃取小柱	52.1 ~ 65.6	70.5 ~ 86.9
PAX固相萃取小柱	50.5 ~ 63.0	67.8 ~ 85.6

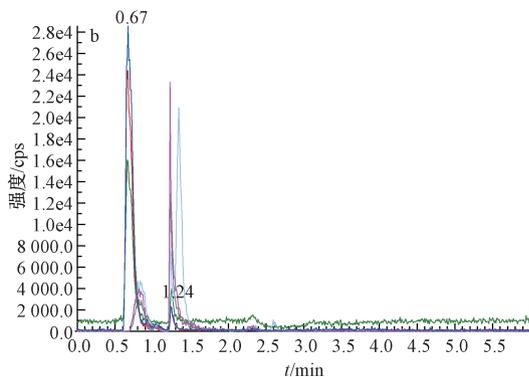
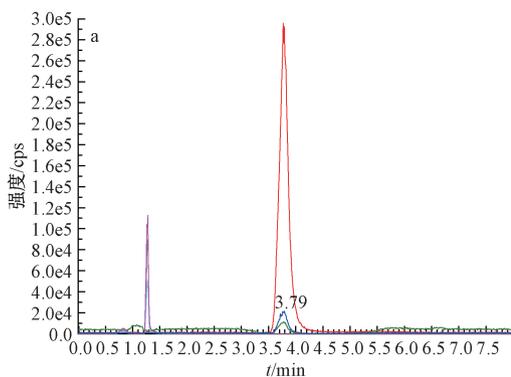
2.2 基质效应的消除

在应用UPLC-MS/MS法测定复杂样品(如动物源食品及生物样品)时,基质通常对分析物的离子化具有增强或抑制效应,此为基质效应。基质

效应影响仪器的灵敏度和重复性,是影响可靠性及准确定量的重要因素。本试验采用以下手段减少基质效应:(1)进行蛋白沉淀、液液萃取来降低绝对基质效应;(2)通过优化色谱分离条件使得内源性杂质与待测物分离;(3)采用较低流速使同时离子化的化合物减少,降低待测组分与基质成分在电离过程中的竞争,从而减弱基质效应;(4)在保证灵敏度的情况下,采用小进样体积降低基质效应。

2.3 流动相的选择

本试验对流动相进行了研究,有机相分别采用了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈混合溶液,水相分别采用了0.1%甲酸、0.05%氨水,将有机相和水相进行两两搭配进行试验。结果发现乙腈有改善峰形的作用,0.01%甲酸-乙腈及0.05%氨水-乙腈均能分离测定两个物质。但0.01%甲酸-乙腈分离体系下,啶乙醇响应低且MQCA峰形拖尾展宽严重;0.05%氨水-乙腈体系下,两个物质均有较高响应,峰形窄,且分离时间缩短,在3 min内就能完成分离,见图1。考虑到操作的简便及分离的效果,本试验最终确定流动相为0.05%氨水-乙腈。



注:a:流动相为0.01%甲酸-乙腈的TIC图;b:流动相为0.05%氨水-乙腈的TIC图

图1 两种流动相下的TIC图

Figure 1 TIC chromatogram of 2 mobile phase

2.4 质谱条件的优化

根据待测物的性质,分别配制193 $\mu\text{g/ml}$ 的啶乙醇和106 $\mu\text{g/ml}$ 的MQCA标准溶液,在ESI⁺模式下分别进行质谱条件优化,第一步进行母离子扫描,确定母离子,并优化得到去簇电压和碰撞电压。同时在MRM模式下优化了气帘气压力、离子源温度、喷雾气压力、辅助气流速。

2.5 线性范围、回归方程和检出限

配制啶乙醇的质量浓度为0.386、0.772、1.93、38.6、77.2、193、309、386 $\mu\text{g/L}$,MQCA的质量浓度为0.106、0.212、0.530、10.6、21.2、53.0、84.8、106 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液。以目标组分的峰面积(y)对质量浓度(x)做标准曲线。两种化合物的线

性关系、相关系数、方法检出限见表4。

表4 目标物的回归方程、线性范围、相关系数、检出限

Table 4 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, limits of target compounds

化合物	回归方程	相关系数 r	线性范围 / ($\mu\text{g/L}$)	方法检出限 / ($\mu\text{g/kg}$)
啶乙醇	$y = 74392.1x + 9.2$	0.999 1	0.386 ~ 386	0.06
MQCA	$y = 509587.0x + 226.5$	0.999 3	0.106 ~ 106	0.02

2.6 方法的回收率和精密度

准确称取空白样品9份,每份5.00 g,共3组,分别添加1.00、5.00、25.00 ng啶乙醇和0.50、5.00、15.00 ng MQCA。按供试品溶液制备方法制备后进行测定,结果见表5。从表中可见,不同浓度

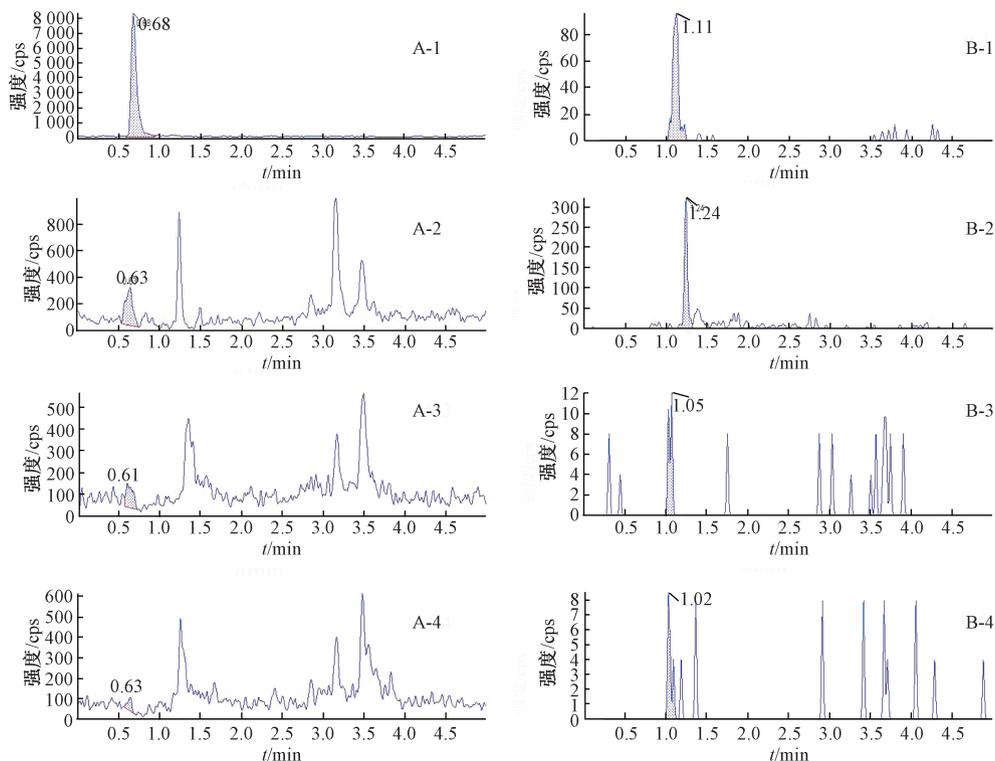
的平均加标回收率在 69.8% ~ 117% 之间,平均相对标准偏差 (*RSD*) 为 4.3% ~ 7.2%。图 2 为标准品及加标样品 MRM 色谱图。

3 小结

本试验建立了同时检测纯牛奶中喹乙醇及其代谢物残留的 UPLC-MS/MS 分析方法,通过对样

表 5 目标化合物在不同加标水平下的加标回收率及 *RSD* ($n=3$)

Table 5 Recovery rate and <i>RSD</i> of compounds			
目标物	加标水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
喹乙醇	0.20	69.8	6.8
	1.00	111	7.2
	5.00	97.4	5.5
MQCA	0.10	75.8	4.3
	1.00	112	5.2
	3.00	117	6.6



注:A-1 为 MQCA 标准谱图;A-2 为 MQCA 直接浓缩的加标样品谱图;A-3 为 MQCA 过 PEP 小柱的加标样品谱图;A-4 为 MQCA 过 PAX 小柱的加标样品谱图;B-1 为喹乙醇标准谱图;B-2 为喹乙醇直接浓缩的加标样品谱图;B-3 为喹乙醇过 PEP 小柱的加标样品谱图;B-4 为喹乙醇过 PAX 小柱的加标样品谱图

图 2 标准溶液及加标样品 MRM 谱图

Figure 2 MRM chromatogram of MQCA and olaquinox

品前处理条件和仪器条件进行优化,使得方法简便、经济。该方法操作简单、灵敏、稳定,可满足牛奶中喹乙醇及其代谢产物残留的检测。

参考文献

- [1] WHO. WHO food additives series[M]. 2016.
- [2] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告:第 2638 号[A]. 2018-01-11.
- [4] 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.
- [5] 谢小华,周德山,宋向明,等. 高效液相色谱法测定水产品中喹乙醇残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2011, 47(1): 102-103.
- [6] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告:第 1077 号[A]. 2008-08-12.
- [7] 姚鑫珊,沈建忠,吴聪明,等. 高效液相色谱法测定猪肝组织

中 3-甲基喹啉-2-羧酸[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(2): 187-190.

- [8] 林黎,谢丽琪,欧阳珊,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]. 分析实验室, 2010, 29(2): 138-141.
- [9] 吴剑平,张鑫,李丹妮,等. 在线固相萃取/液相色谱-串联质谱法检测饲料中 5 种喹啉类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 610-615.
- [10] 欧阳珊,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.
- [11] 赵珊,郭巧珍,张晶,等. 超高压液相色谱-串联质谱法测定鱼组织中卡巴氧及喹乙醇代谢物法[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 124-128.
- [12] 郑玲,吴玉杰,赵永锋,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中喹乙醇与卡巴氧残留量[J]. 分析测试学报, 2014, 33(1): 21-26.