

超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定牛干巴中 2种喹噁啉类药物残留

马晓年, 陈俊秀, 张瑞雨, 欧利华, 张秀清*

(云南省昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定牛干巴中卡巴氧及喹赛多的含量的分析方法。

方法 样品经乙酸乙酯-乙腈提取, 正己烷脱色净化后, 以乙腈-0.1%甲酸溶液为流动相, 经ACQUITY™BEH₁₈柱分离, 采用多反应监测正离子模式进行定性及定量分析。**结果** 卡巴氧及喹赛多的检出限分别为0.2和2.0 μg/kg, 3个加标水平回收率范围为66.4%~115.0%, 相对标准偏差为4.2%~8.2%。**结论** 该方法灵敏度高、重复性好、准确度高、分析时间短、样品前处理操作简便, 适用于牛干巴中卡巴氧及喹赛多的测定。

关键词: 卡巴氧; 喹赛多; 牛干巴; 超高效液相色谱-三重四级杆质谱法

Determination of 2 kinds of quinoxaline drug residues in dry-cured beef by ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry

MA Xiao-Nian, CHEN Jun-Xiu, ZHANG Rui-Yu, OU Li-Hua, ZHANG Xiu-Qing*

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

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of carbadox and cyadox in dry-cured beef by ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Methods** The dry-cured beef sample was extracted with ethyl acetate-acetonitrile, and then decolorized and purified with *N*-hexane. Target compounds were separated with ACQUITY™BEH₁₈ column with acetonitrile-water (0.1% formate) as mobile phase, and then characterized by mass spectrometry in the positive electrospray ionization under multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results** Limits of detection of carbadox and cyadox were 0.2 μg/kg and 2.0 μg/kg, respectively. The recoveries at 3 spiked concentrations were from 66.4% to 115.0% and the relative standard deviations were from 4.2%-8.2%. **Conclusion** This method has higher sensitivity, good repeatability, higher accuracy, shorter analysis time and convenient sample pretreatment, which is suitable for the detection of carbadox and cyadox in dry-cured beef.

KEY WORDS: carbadox; cyadox; dry-cured beef; ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry

基金项目: 昆明市卫生人才科技人才培养项目(2017-sw(后备)-66)

Fund: Supported by the Health Talents and Technology Talents Training Project of Kunming (2017-sw(Reserve)-66)

*通讯作者: 张秀清, 硕士, 理化检验师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 648260795@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Xiu-Qing, Master, Technician, Kunming Center for Disease Control and Prevention, No.4, ZiyunRoad, Kunming 650228, China. E-mail: 648260795@qq.com

1 引言

卡巴氧和喹赛多属于喹噁啉类药物, 该药物能显著促进动物生长, 且对多数革兰氏病菌有较强的抑制作用, 因此被广泛作为饲料添加剂。其中喹赛多是人工合成的具有喹噁啉-1,4-二氧化物基本结构的抗菌促生长药物, 是喹噁啉类药物的新品种, 作为喹乙醇的换代产品, 不论对动物的一般毒性, 还是特殊毒性, 均比其他同类药物要好, 因此应用也越来越多。喹噁啉类药物作为催长剂使用虽然效果较好, 但也存在很多潜在风险, 食用残留喹噁啉类药物的食品可导致致癌、致畸风险升高^[1-7]。云南牛干巴是云南地区的一种传统民族肉制品, 以黄牛后腿肉为原料, 经腌制、晾晒、风干发酵而成的块状自然发酵肉制品^[8]。牛干巴以其加工方法考究、加工条件严格、产品风味独特、营养丰富、味道鲜美、保存期长、携带和食用方便而享誉省内外, 深受群众喜爱, 近年来产品更是远销至中东阿拉伯国家, 受到国外朋友的青睐。

喹噁啉类药物的残留量一般为痕量, 因此要求分析方法检出限较低, 现在大多研究采用液质联用方法分析测定饲料^[9]、猪肉^[10]及水产品^[11-17]中的喹噁啉药物残留, 而测定牛干巴中的卡巴氧、喹赛多的方法尚未见报道。本研究利用超高效液相色谱串联质谱技术建立了同时测定牛干巴中卡巴氧及喹赛多残留的方法, 弥补了测定具有高盐、低水分等特点的此类风干类肉制品的方法空缺。

2 材料与方 法

2.1 仪器、试剂与材料

QTRAP 4500 质谱分析仪(美国 AB SCIEX 公司); 1290 infinity II 超高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司); 3H16R1 型智能台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); SHZ-82S 恒温水浴振荡器(常州金坛恒丰仪器制造有限公司); Auto EVA-30 氮吹仪(中国 Reeko 公司); 电子天平(0.001 g, 德国 Sartorius 公司); KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

卡巴氧标准物质(99.0%, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 喹赛多标准物质(97%, 加拿大 Toronto Reseach Chemicals 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙酸乙酯(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲酸(色谱纯, 阿拉丁); 浓盐酸(优级纯, 四川西陇化工有限公司); 二甲亚砜(分析纯, 北京化工厂)。

牛干巴为市售即食制品。

2.2 标准溶液配制

准确称取一定量的卡巴氧、喹赛多标准品, 先用少量的二甲亚砜溶解, 再用甲醇定容, 混匀, 得到卡巴氧浓度

为 200 $\mu\text{g/mL}$, 喹赛多浓度为 240 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。配制得到卡巴氧的质量浓度为 0.4、2.0、4.0、20.0、32.0、120.0、200.0、320、400.0 $\mu\text{g/L}$, 喹赛多的质量浓度为 2.4、9.6、14.4、48.0、240.0、480.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液。

2.3 样品前处理

称取 5.00 g(精确至 0.01 g)均质后的样品, 加入 15 mL 乙酸乙酯-乙腈(1:1), 振荡 5 min, 超声提取(超声功率 100%)10 min, 以 5000 r/min 离心 3 min, 上清液转移到 50 mL 离心管中, 残渣中再加入 15 mL 乙酸乙酯-乙腈提取液, 重复提取 1 次, 合并提取液至 50 mL 离心管中。于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干, 用 1.5 mL 含 0.1%甲酸的 20%甲醇溶液溶解残留物, 加入 1 mL 正己烷涡旋振荡 2 min, 以 5000 r/min 离心 3 min, 除去正己烷层, 下层过 0.22 μm 滤膜后上机检测。

2.4 仪器条件

2.4.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITYTMBEH₁₈ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 流动相为 0.1%甲酸-乙腈(70:30, V:V), 等度洗脱; 流速: 0.30 mL/min, 分析时间 5 min, 进样体积 5 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 质谱条件

电离电压: 4.5 kV; 检测方式: 多反应检测模式(multiple reaction monitoring, MRM); 离子源温度: 450 $^{\circ}\text{C}$; 喷雾器压力: 40 psi; 气帘气压力: 35 psi; 辅助气流速: 40 $\mu\text{L/min}$; 其他参数见表 1。

表 1 各化合物质谱参数
Table 1 MS parameters for analytes

化合物名称	母离子	子离子	去簇电压 /V	碰撞电压 /eV
卡巴氧	263.0	231.1	73	17
		131.0*	73	25
		90.2	73	30
喹赛多	272.0	188.1*	100	22
		171.0	100	31
		143.0	100	25

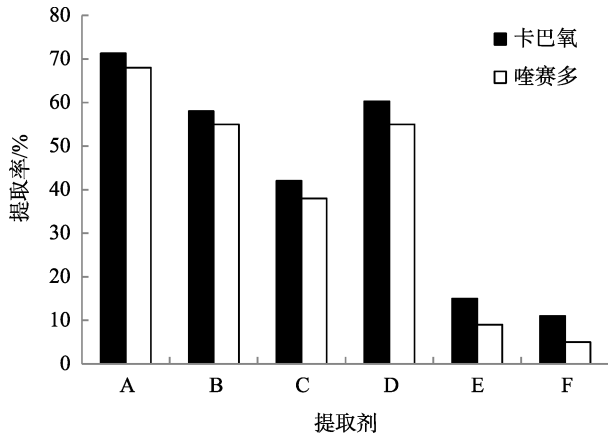
注: *定量离子(quantitative ion)。

3 结果与分析

3.1 前处理条件的选择

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。本研究比较了乙腈-

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,卡巴氧提取率达到 60%以上,喹赛多提取率达到 55%以上(见图 1)。乙腈-乙酸乙酯提取的杂质较少,故最终选用乙腈-乙酸乙酯(1:1, V:V)为提取剂。



注: A: 乙腈-乙酸乙酯; B: 乙腈-甲醇-乙酸乙酯; C: 乙腈-甲醇; D: 甲醇-乙酸乙酯; E: 乙腈; F: 乙腈-水。

图 1 提取率对比图

Fig.1 Comparison of extraction rate

3.2 流动相的选择

本实验对流动相进行研究,有机相分别采用了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈混合溶液,水相分别采用了含 0.1%甲酸,将有机相和水相进行两两搭配进行实验。结果发现乙腈有改善峰形的作用,0.1%甲酸-乙腈能分离测定 2 个物质。梯度洗脱虽能缩短卡巴氧的分析时间,改善其峰形,但喹赛多出峰效果不理想,基线抬高、峰形展宽、响应降低。故流动相采用 0.1%甲酸-乙腈(70:30, V:V)进行等度分离。

3.3 质谱条件的优化

根据待测物的性质,分别配制 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡巴氧和 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的喹赛多标准溶液,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。并在 MRM 模式下优化了气帘气、离子源温度、喷雾气、辅助加热气。标准物质二级质谱图见图 2。

3.4 方法学考察

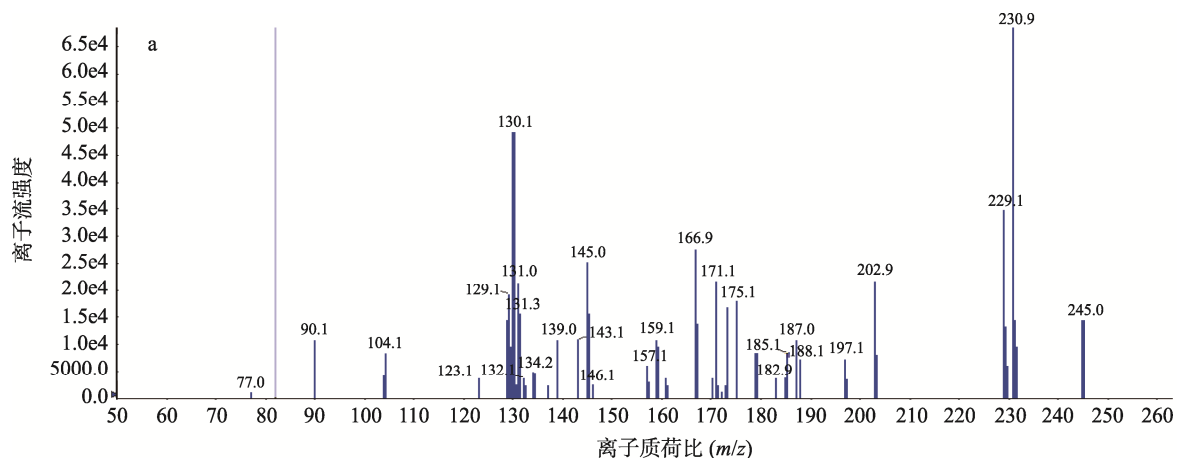
3.4.1 线性范围、回归方程和检出限

根据配制得到卡巴氧的质量浓度为 0.4、2.0、4.0、20.0、32.0、120.0、200.0、320、400.0 $\mu\text{g}/\text{L}$,喹赛多的质量浓度为 2.4、9.6、14.4、48.0、240.0、480.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 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)绘制标准曲线。2 种化合物的线性关系、相关系数、方法检出限见表 2,标准样品 MRM 色谱图见图 3。

表 2 目标物的回归方程、线性范围、相关系数、检出限

Table 2 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, limits of detection of target compounds

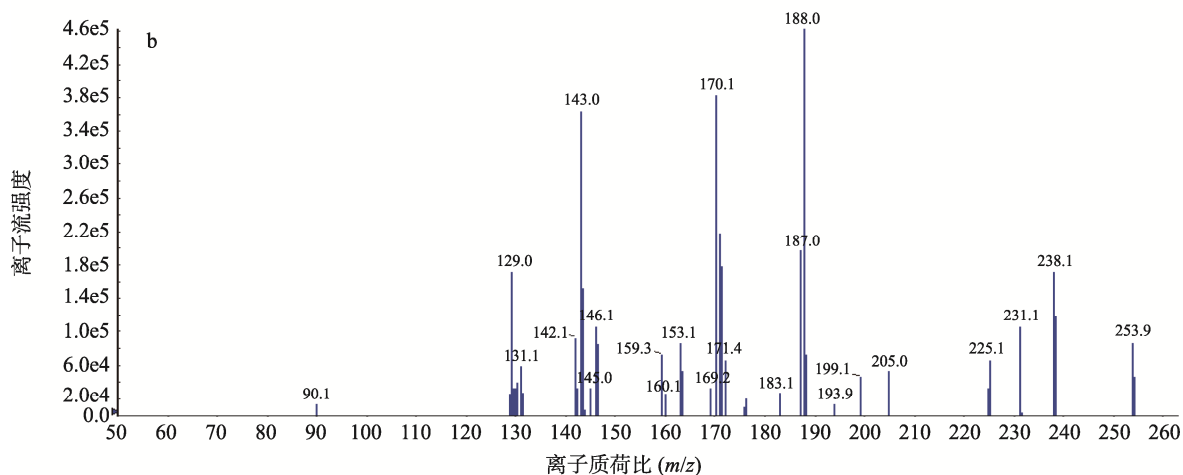
化合物	回归方程	相关系数(r)	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{L})$	方法检出限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	方法定量限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
卡巴氧	$Y=2.02483e^5X+6.94559e^7$	0.9996	0.4~400.0	0.20	0.60
喹赛多	$Y=9.41730e^3X+1.85311e^4$	0.9993	2.4~480.0	2.0	6.0



注: a: 卡巴氧; b: 喹赛多。

图 2 标准物质二级质谱图

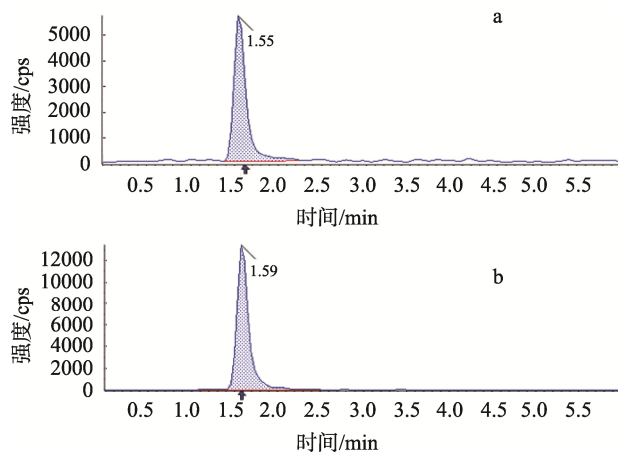
Fig.2 Mass spectrometry-mass spectra of standard compounds



注: a: 卡巴氧; b: 喹赛多。

续图 2 标准物质二级质谱图

Fig.2 Mass spectrometry-mass spectra of standard compounds



注: a: 卡巴氧; b: 喹赛多。

图 3 标准样品 MRM 色谱图

Fig.3 MRM chromatograms of standard compounds

3.4.2 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 3.0、16.0、32.0 ng 卡巴氧和 30.0、50.0、150.0 ng 喹赛多。按供试品溶液制备方法制备后进行测定, 结果见表 3。不同浓度的平均加标回收率在 66.4%~115%之间, 平均相对标准偏差为 4.2%~8.2%。

表 3 目标化合物的加标回收率及相对标准偏差(n=3)

Table 3 The recovery rates and RSDs of target compounds (n=3)

目标物	加标水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	RSD/%
卡巴氧	0.60	82.1	7.8
	3.20	115.0	6.3
	6.40	109.0	4.2
喹赛多	6.0	66.4	8.2
	10.0	95.8	5.6
	30.00	97.6	6.1

4 结论

本研究建立了同时检测牛干巴中卡巴氧及喹赛多残留的 UPLC-MS/MS 分析方法, 3 min 内能完成测定, 缩短了分析时间, 提高了工作效率。前处理方法操作简单、快捷, 使用的有毒有害试剂较少, 适用于大批量样品的处理。方法灵敏、稳定、准确性高, 可满足牛干巴中卡巴氧及喹赛多残留的检测。

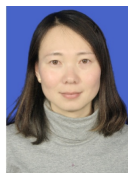
参考文献

- [1] 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.
Zhen L, Wu YJ, Zhao YF, et al. Determination of olaquinox and carbadox in animal foodstuffs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(1): 21-26.
- [2] 邱银生, 袁宗辉, 范盛先, 等. 高效液相色谱法测定猪血浆及组织中喹赛多及其脱氧代谢物[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 363-365.
Qiu YS, Yuan ZH, Fan SX, et al. High performance liquid chromatographic determination of cyadox and its metabolite desoxycyadox in swine plasma and tissues [J]. Chin J Veter Sci, 2003, 23(4): 363-365.
- [3] 郭军朋, 张展, 远立国, 等. 喹赛多及其主要代谢物在猪体内的药代动力学研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(9): 228-231.
Guo JP, Zhang Z, Yuan LG, et al. Pharmacokinetics of cyadox and its mainly metabolites in swine [J]. Chin Anim Husb Veter Sci, 2011, 38(9): 228-231.
- [4] 陆桂萍, 曲斌, 耿士伟, 等. 液相色谱串联高分辨质谱测定鸡肉中卡巴氧、喹乙醇的代谢物残留[J]. 中国家禽, 2016, 38(2): 33-36.
Lu GP, Qu B, Geng SW, et al. Determination of metabolites of carbadox and olaquinox in chicken by LC-HRMS [J]. Chin Poul, 2016, 38(2): 33-36.
- [5] 杨盼盼. 喹噁啉类遗传毒性分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.

- Yang PP. The molecular mechanisms of genotoxicity of quinoxalines [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [6] 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种喹噁啉类药物残留量[J]. 分析测试学报, 2015, 34(5): 610-615.
Wu JP, Zhang X, Li DN, *et al.* Determination of 5 quinoxaline drug residues in feed by on-line solid phase extraction/liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2015, 34(5): 610-615.
- [7] 赵春保, 彭大鹏, 陶燕飞, 等. 猪饲料中喹噁啉类药物酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(s2): 69-75.
Zhao CB, Peng DP, Tao YF, *et al.* Development of an ELISA method for detection of five derivatives of quinoxaline-1,4-dioxide in porcine feeds [J]. *J Agric Sci Technol*, 2008, 10(s2): 69-75.
- [8] 刘妹韵, 孙灿, 王桂瑛, 等. 云南牛干巴加工过程中生物胺变化规律[J]. 肉类研究, 2017, 31(6): 7-12.
Liu SY, Sun C, Wang GY, *et al.* Changes of biogenic amines during processing of Yunnan dry-cured beef [J]. *Meat Res*, 2017, 31(6): 7-12.
- [9] Hutchinson MJ, Young PB, Kenecy DG. Confirmatory method for the analysis of carbadox and olaquinox in porcine feedingstuffs using LC-electrospray MS-MS [J]. *Food Assit Contam*, 2005, 22(2): 113-119.
- [10] Horie M, Murayama M. Determination of carbadox metabolites, quinoxaline-2-carboxylic acid and desoxycarbadox, in swine muscle and liver by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *J Food Hyg Soc Japan*, 2004, 45(3): 135-140.
- [11] 徐英江, 任传博, 田秀慧, 等. 超高效液相色谱-串联质谱测定水产品中的卡巴氧、喹烯酮、乙酰甲喹及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2011, 30(10): 1133-1137.
Xu YJ, Ren CB, Tian XH, *et al.* Determination of residues of carbadox, quinocetone, mequinox and their metabolites in aquatic products by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2011, 30(10): 1133-1137.
- [12] 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的卡巴氧及喹乙醇代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1): 124-128.
Zhao S, Guo QZ, Zhang J, *et al.* Determination of metabolites of carbadox and olaquinox in fish tissue using ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(1): 124-128.
- [13] 曾静, 朱宽正, 王鹏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中的喹乙醇[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(5): 423-425.
Zeng J, Zhu KZ, Wang P, *et al.* Determination of olaquinox residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2006, 18(5): 423-425.
- [14] 潘葳. 高效液相色谱法测定鳗鲡各组织中的乙酰甲喹残留量[J]. 福建农业学报, 2016, 31(8): 853-857.
Pan W. HPLC analysis on mequinox residues in tissues of eel [J]. *Fujian J Agric Sci*, 2016, 31(8): 853-857.
- [15] 郭霞, 孙建华, 孙振中, 等. 水产品中喹烯酮和喹赛多及其主要代谢物残留的 HPLC-MS/MS 检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2016, 35(12): 1535-1541.
Guo X, Sun JH, Sun ZZ, *et al.* Research on the residual detection of quinocetone, cyadox and their main metabolites in aquatic products by HPLC-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(12): 1535-1541.
- [16] 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.
Yang GM, Zhen B, Chen XC, *et al.* Determination of olaquinox metabolites in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Zhejiang Ocean Univ (Nat Sci Ed)*, 2010, 29(3): 254-259.
- [17] 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]. 分析实验室, 2010, 29(9): 19-22.
Zhao DH, Li ZG, Yang JL, *et al.* Determination of olaquinox metabolites residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2010, 29(9): 19-22.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



马晓年, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: 179267837@qq.com



张秀清, 硕士, 理化检验师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 648260795@qq.com