

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

赵 珊, 郭巧珍, 张 晶, 邵 兵*

(北京市疾病预防控制中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013)

摘 要: **目的** 建立鱼组织中卡巴氧代谢物喹恶啉-2-羧酸(QCA)及喹乙醇代谢物 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸(MQCA)的超高压液相色谱-串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)残留分析方法。**方法** 样品在一定温度、Tris/HCL缓冲溶液作用下,经蛋白酶酶解,浓盐酸酸化,乙酸乙酯提取,提取液吹干后加入20%甲醇水溶解,过PAX固相萃取柱净化、富集;以乙腈-0.1%甲酸水为流动相,经HSS T3色谱柱分离,采用多反应监测(MRM)正离子模式进行检测。**结果** QCA和MQCA定量限(LOQ)均为0.5 µg/kg,在0.5~5.0 µg/kg添加水平的平均回收率在93.1%~101.2%之间,相对标准偏差为1.4%~5.5%。**结论** 本方法适用于鱼组织中卡巴氧及喹乙醇代谢物残留检测。

关键词: 喹恶啉-2-羧酸; 3-甲基-喹恶啉-2-羧酸; 超高压液相色谱-串联质谱法

Determination of metabolites of carbadox and olaquinox in fish tissue using ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Shan, GUO Qiao-Zhen, ZHANG Jing, SHAO Bing*

(Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

ABSTRACT: Objective An analytical method for the detection of quinoxaline-2-carboxylic acid (QCA) and 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA), which were metabolites of carbadox and olaquinox, respectively, by ultra-pressure liquid chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established. **Methods** The enzymolysis of sample within Tris/HCl buffer under stable temperature was acidized by hydrochloric acid and extracted by ethyl acetate. The layer of ethyl acetate was evaporated to be nearly dry under a gentle stream of nitrogen. The residue was dissolved with methanol-water (1:4, v/v), and separated and purified by PAX cartridge. The objective compounds were separated using HSS T3 column with acetonitrile-water(0.1% formic acid) as mobile phase and analyzed by mass spectrometry in the positive electrospray ionization under multiple reaction monitoring mode(MRM). **Results** The LOQ for QCA and MQCA were both 0.5 µg/kg. The average recoveries were from 93.1% to 101.2% at the spiked level of 0.5~5.0 µg/kg with the relative standard deviation of 1.4%~5.5%. **Conclusion** The method is suitable for the detection of residual pollutant in fish tissues.

基金项目: 国家高技术研究发展计划 863 计划项目(2010AA023001)、北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目

Fund: Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (2010AA023001) and Beijing Municipal Senior Technical Training Plan in Health System

*通讯作者: 邵兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。E-mail: shaobingch@sina.com

*Corresponding author: SHAO Bing, Professor, Beijing Center for Disease Control and Prevention, No. 16, Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: shaobingch@sina.com

KEY WORDS: quinoxaline-2-carboxylic acid; methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid; ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

卡巴氧(carbadox)和喹乙醇(olaquinox)同属喹恶啉-1,4-二氧化物, 由于其具有明显地抗菌和促生长作用, 曾在养殖业广泛使用。卡巴氧具有遗传毒性和致癌嫌疑, 喹乙醇有强的蓄积毒性和致突变性, 喹乙醇在鱼体内易降解, 降解代谢物能抑制脱氧核糖核酸的合成, 对染色体畸变有一定影响, 属致癌物^[1], 欧盟于 1998 年发文禁止在饲料中添加卡巴氧和喹乙醇。我国目前还没有完全禁止使用这类药物, 在一些养殖行业仍在使用, 甚至出现滥用。因此建立灵敏、可靠的检测方法对其实施监测十分必要。

喹恶啉-2-羧酸(QCA)是卡巴氧在动物体内产生的代谢物; 3-甲基喹恶啉-2-羧酸(MQCA)是喹乙醇在动物体内产生的代谢物。QCA 和 MQCA 在体内相对稳定, 分别为卡巴氧和喹乙醇的残留标示物。QCA 和 MQCA 检测的方法已有很多文献报道, 其中最常用的是液相色谱法^[2-4]和液相色谱-质谱联用法^[5-10], 本研究在前人研究工作的基础上, 对样品前处理方法进行了改进, 建立了鱼组织中卡巴氧和喹乙醇代谢物的 UPLC-MS/MS 检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY™ 超高压液相色谱仪、Xevo™ TQ 三重四极杆串联质谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司); HZQ-C 空气浴振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); BOND ELUT PLEXA PAX(60 mg, 3 mL)固相萃取柱(美国 Agilent 公司), 使用前依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化, 保持柱体湿润。

喹恶啉-2-羧酸($C_9H_6N_2O_2$, 97%, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 3-甲基喹恶啉-2-羧酸($C_{10}H_8N_2O_2$, 94%, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 喹恶啉-2-羧酸-d4 ($C_9H_6N_2O_2$, 99.5%, 德国 WITEGA 公司); 蛋白酶(P5147, 美国 Sigma 公司); Tris 碱(进口分装, 国药集团化学试剂有限公司); 酶消解液为 0.2 mol/L Tris/HCL 缓冲溶液(含 0.1 mol/L 氯化钙, pH 9.6±0.2)^[8], 4 °C 保存。

甲醇、乙腈、乙酸乙酯(色谱纯, Dikma Pure 公司);

甲酸(98%, 比利时 Acros Organics 公司); 盐酸(优级纯, 北京兴青红精细化学品科技有限公司); 氨水(优级纯, 北京化工厂)。

标准储备液的制备: 分别准确称取喹恶啉-2-羧酸、3-甲基喹恶啉-2-羧酸、喹恶啉-2-羧酸-d4 标准品 5.0 mg(按纯度示值折算), 用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 500 mg/L 的标准储备液, -20 °C 以下避光存放, 可使用 12 个月。

蛋白酶溶液: 准确称取一定量蛋白酶, 加入纯水溶解、定容, 配置的酶液浓度为 10 mg/mL, 现用现配。

1.2 样品预处理

龙利鱼沿背脊取肌肉, 充分绞碎, 匀质。-20 °C 以下避光保存。

称取 5 g(精确到 0.01 g)均质样品于 50 mL 离心管中, 加入质量浓度为 100 µg/L 的 QCA-d4 内标溶液 0.1 mL, 加入 8 mL 0.2 mol/L pH 9.6 Tris/HCL 缓冲溶液和 300 µL 10 mg/mL 蛋白酶水溶液, 涡旋混匀, 置于空气浴恒温摇床中 47 °C 酶解 16~18 h, 取出样品放至室温, 加入 0.8 mL 浓盐酸, 振摇混匀, 4 °C、9000 r/min 离心 5 min, 将上层清液转移至另一干净的 50 mL 离心管。

加入 6 mL 乙酸乙酯, 涡旋 1 min, 4 °C、9000 r/min 离心 5 min, 将上层清液转移至干净的 15 mL 离心管。重复乙酸乙酯提取步骤, 合并上清液, 35 °C 下氮吹浓缩至干, 残渣用 10 mL 20% 甲醇水溶解。

提取液转移至经活化的 PAX 固相萃取柱中, 依次用 3 mL 水、3 mL 2% 氨水、3 mL 甲醇和 3 mL 0.5% 乙酸-甲醇淋洗 PAX 柱。然后将 PAX 柱抽干, 用 6 mL 2% 甲酸-甲醇溶液洗脱目标化合物, 收集洗脱液, 35 °C 下氮吹浓缩至干, 用 1.0 mL 50% 甲醇-水溶液溶解残渣, 过 0.22 µm 滤膜, 进样, UPLC-MS/MS 测定。

1.3 色谱质谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC® HSS T3 (1.8 µm, 2.1 mm × 100 mm); 柱温: 40 °C; 流动相: A 液为 0.1% 甲酸水溶液; B 液为乙腈; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 5 µL。梯度洗脱程序: 0~6.0 min, 5%B 线性升至 25%; 保持 1 min, 然后迅速下降至 5%。

ESI(+)离子源: 毛细管电压: 2.5 kV; 离子源温度: 100 ℃; 锥孔反吹气流量 50 L/h; 脱溶剂气温度: 350 ℃; 脱溶剂气流量: 540 L/h。

2 结果与讨论

2.1 液相色谱-质谱条件的优化

采用多反应监测(MRM)模式, 分别对 QCA、MQCA 和 QCA-d4 标准液进行一级离子扫描, 确定化合物的电离方式和分子离子, 在获得分子离子峰(母离子)质荷比后, 再进行二级质谱(子离子)扫描, 优化碰撞能量, 确定两个丰度比较高的子离子作为定性和定量离子。在 ESI(+)检测模式下, 化合物质谱采集参数见表 1。

液相色谱流动相选择乙腈-水或甲醇-水均可将 QCA、MQCA 在 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱分离; 当进行梯度洗脱时, 乙腈-水色谱柱反压变化明显小于甲醇-水体系; 而在流动相中加入 0.1%甲酸能增加 ESI(+)模式下的电离效率^[5], 提高检测灵敏度; 对色谱柱的选择, 比较了 QCA、MQCA 在 ACQUITY UPLC® BEH C₁₈ 柱、ACQUITY UPLC® BEH C₈ 柱和 ACQUITY UPLC® HSS T3 柱上的分离效果, 结果表明差异不大; 但当样品测定时, 采用 ACQUITY UPLC® HSS T3 柱基质抑制最小。因此选择 0.1%甲酸水和乙腈为流动相, 在 ACQUITY UPLC® HSS T3 柱上, 梯度洗脱分离。龙利鱼样品加标 MRM 色谱图见图 1。

表 1 化合物的质谱采集条件
Table1 Mass spectrometric acquisition parameters

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	定量离子 (碰撞能量, eV)	定性离子 (碰撞能量, eV)	锥孔电压 (V)
喹恶啉-2-羧酸	175.0	129(15)	131(15)	25
3-甲基喹恶啉-2-羧酸	189.0	145(15)	143(15)	23
喹恶啉-2-羧酸-d4	179.0	133(15)	135(15)	25

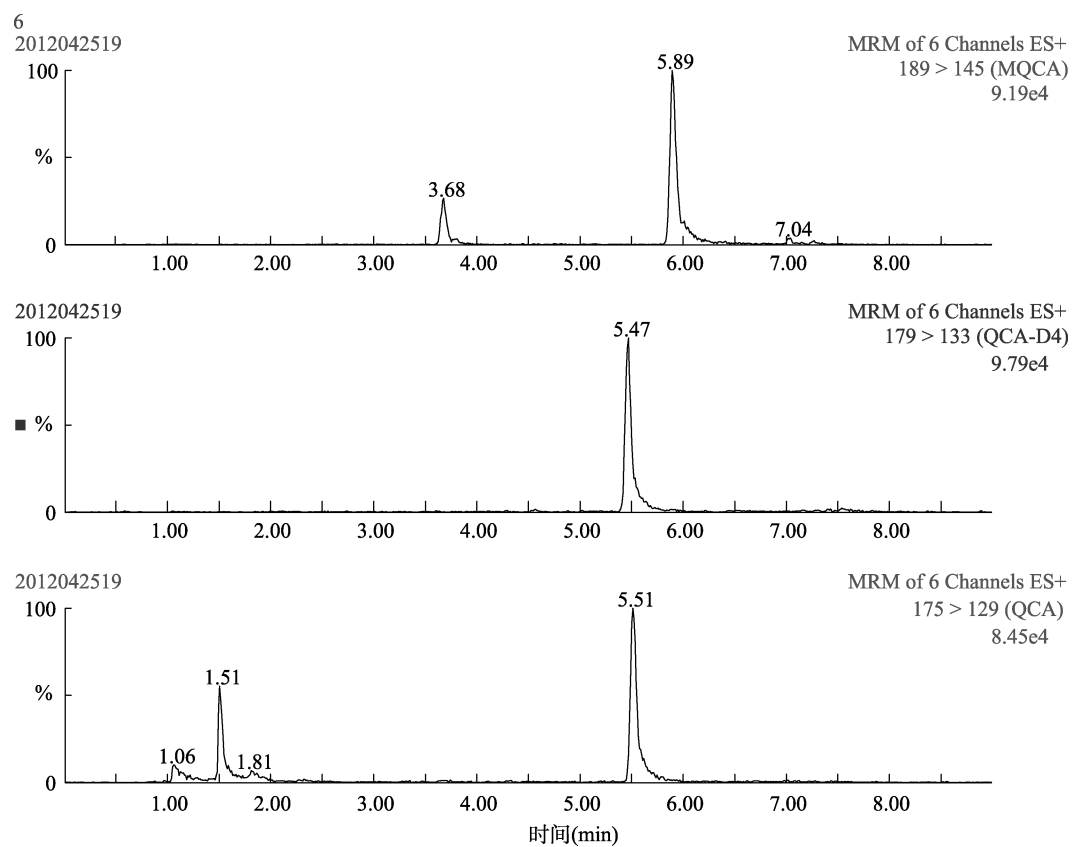


图 1 龙利鱼加标 MRM 色谱图(加标浓度 5 μg/kg)
Fig.1 MRM chromatograms of target compounds in spiked long lee fish at the spiked level of 5 μg/kg

2.2 样品前处理方法的选择

由于 QCA 和 MQCA 等代谢物在动物体内与蛋白质以结合态形式存在, 因此, 样品预处理的第一步需将化合物转变为游离态, 文献报道有酸解^[3,7]、碱解^[10]和酶解^[5,6,8,9]等方式, 使用蛋白酶酶解一般需要过夜^[5,8], 酶解后动物组织被破坏, 目标化合物呈游离状态, 与动物组织分离最为彻底。蛋白酶酶解需要在一定温度和 pH 值条件下进行, 欧阳姗^[5]和 Hutchinson^[8]分别将酶解条件控制在 47 ℃和 55 ℃, 经过比较, 在两种温度下, 酶解都可达到较好的效果, 当 10 mg/mL 蛋白酶水溶液用量为 300 μL 时, 能够保证 5 g 样品酶解完全^[5]。

由于 QCA 和 MQCA 呈弱酸性, 水解液经酸化后, QCA 和 MQCA 才能够被乙酸乙酯提取, Hutchinson^[8]用 1 mL 浓盐酸对 QCA 和 MQCA 进行酸化, 为此我们进行了考察, 分别用 0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 mL 浓盐酸酸化, 结果表明乙酸乙酯的提取效率无明显差异; 但发现随着浓 HCL 的加入, 水解溶液中有少量的蛋白不断沉淀析出, 浓盐酸的用量为 0.8 mL 时, 蛋白析出的量不再增加, 蛋白的沉淀析出, 可大大减少基质抑制, 因此选择加入 0.8 mL 浓盐酸酸化水解液。

Hutchinson^[8]采用 SCX 固相萃取柱净化, 用磷酸盐缓冲溶液对乙酸乙酯提取液进行反萃取, 过柱后再次酸化, 用乙酸乙酯提取, 步骤十分繁琐、耗时。赵东豪^[9]则省略了过柱净化步骤, 将乙酸乙酯挥干, 流动相溶解后进样, 后者虽然简便, 但基质抑制较大。由于 QCA 和 MQCA 的分子结构中都带有羧基, 因此可采用 MAX 或 PAX 固相萃取柱进行净化, 提取液挥干后用 20% 甲醇水溶解, 在 MAX 或 PAX 固相萃取柱上直接上样, 淋洗步骤分别为水、2% 氨水、甲醇和 0.5% 乙酸-甲醇等四步, 如果样品含脂肪较多, 可将 0.5% 乙酸-甲醇更换为乙酸乙酯淋洗, 最后用 2% 甲酸-甲醇溶液洗脱目标化合物。由图 1 可见, 经过 PAX 净化, 龙利鱼基质加标的色谱峰几乎无杂质干扰。

2.3 方法学验证

2.3.1 标准曲线和定量限

配制两种目标物的质量浓度为 2.5~100 μg/L 的系列混合标准工作液, 内标浓度均为 10 μg/L, 以目标组分峰面积与相应内标峰面积的比值 Y 为纵坐标,

以标准工作液的浓度 $X(\mu\text{g/L})$ 为横坐标, 进行线性回归分析, 绘制标准曲线。

QCA 和 MQCA 的线性方程分别为 $Y=1.0044X-0.7532$ 和 $Y=1.2135X-1.5282$, 相关系数(R^2)分别为 0.9990 和 0.9987。以加标样品中待测化合物色谱峰的信噪比等于 10($S/N=10$)对应的浓度为方法的定量限(LOQ), 确定鱼肉样品中 QCA 和 MQCA 的 LOQ 均为 0.5 μg/kg。

2.3.2 方法回收率实验

分别取龙利鱼空白样品, 添加 3 个浓度水平的混合标准溶液, 按 1.2 节样品预处理方法进行处理, UPLC-MS/MS 测定提取液中目标化合物浓度。每个浓度点取 6 份样品进行实验, 内标法定量, 计算平均回收率和相对标准偏差(RSD)。QCA 和 MQCA 不同加标水平的回收率见表 2。

表 2 龙利鱼基质中 QCA 和 MQCA 的回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 2 Recoveries and RSDs of QCA and MQCA in long lee fish($n=6$)

化合物	加标水平 (μg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
QCA	0.5	95.6	4.3
	2.0	101.2	3.6
	5.0	99.1	5.2
MQCA	0.5	93.1	4.8
	2.0	94.6	1.4
	5.0	100.6	5.5

3 结 论

本研究建立了鱼组织中卡巴氧、喹乙醇的残留标示物 QCA 和 MQCA 的高压液相色谱-串联质谱测定方法, 样品经过酶解、提取、净化, 有效地消除了基质干扰, 方法具有较高的灵敏度, 以 QCA-d4 作为内标, 提高了定量准确性, 本方法适用于鱼组织中卡巴氧、喹乙醇的残留监测。

参考文献

[1] 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.
Xie XH, Zhou DS, Song XM, *et al.* Determination of residue of Olaquinox in fishery products by high performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal B: Chem Anal, 2011, 47(1): 102-103

- [2] 全国水产标准化技术委员会.农业部 1077 号公告-5-2008 水产品中喹乙醇代谢物残留量的测定 高效液相色谱法[S]. National Fisheries Technical Committee of Standardization. Ministry of Agriculture, 1077 Bulletin-5-2008 Determination of olaquinox metabolite residues in fishery products by high performance liquid chromatography [S].
- [3] Wu YJ, Yu H, Wang YL, *et al.* Development of a high-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of quinoxaline-2-carboxylic acid and methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid in animal tissues [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1146(1): 1-7.
- [4] 姚蕴珊, 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.
Yao YS, Shen JZ, Wu CM, *et al.* Determination of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid in porcine liver tissues by high performance liquid chromatography [J]. *China Anim Husb Vet Med*, 2011, 38(2): 187-190.
- [5] 欧阳嫒, 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.
Ou YS, Pang GF, Xie LQ, *et al.* Determination of the residues of carbadox, olaquinox and related metabolites in bovine and porcine muscle and liver tissues by LC-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2008, 27(6): 590-594.
- [6] Merou A, Kaklamanos G, Theodoridis G. Determination of Carbadox and metabolites of Carbadox and Olaquinox in muscle tissue using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2012, 881: 882-90-95.
- [7] Zhang XJ, Zheng B, Zhang H, *et al.* Determination of marker residue of olaquinox in fish tissue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(4): 469-474.
- [8] Hutchinson MJ, Young PB, Kennedy DG. Confirmation of carbadox and olaquinox metabolites in porcine liver using liquid chromatography-electrospray, tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 816: 15-20.
- [9] 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.
Zhao DH, Li ZG, Yang JL, *et al.* Determination of residue of Olaquinox metabolites in fishery products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2010, 29(9): 19-22.
- [10] Hutchinson MJ, Young PY, Hewitt SA, *et al.* Development and validation of an improved method for confirmation of the carbadox metabolite, quinoxaline-2-carboxylic acid, in porcine liver using LC-electrospray MS-MS according to revised EU criteria for veterinary drug residue analysis [J]. *Analyst*, 2002, 127: 342-346.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



赵珊, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: ms_zhaoshan@yahoo.com.cn



邵兵, 研究员, 主要研究方向为食品安全保障技术。

E-mail: shaobingch@sina.com