

液相色谱-质谱联用测定鸡蛋中 4-乙酰氨基苯甲酸的残留

吴玲, 刘雨昕, 刘善菁, 陆桂萍, 宋慧敏, 曲斌*

(江苏省畜产品质量检验测试中心, 南京 210036)

摘要: **目的** 建立液相色谱-质谱法检测鸡蛋中4-乙酰氨基苯甲酸残留的方法。**方法** 样品经乙腈提取, 通过式吸附净化和阴离子交换固相萃取净化, 液相色谱分离, 四极杆-静电场轨道阱质谱定性定量测定, 平行反应监测模式检测, 外标法定量。**结果** 4-乙酰氨基苯甲酸保留时间为5.6 min, 在2.5~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内呈现良好的线性关系, 日内、日间精密度均小于15%, 回收率为70%~80%, 定量限为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 此方法快速、准确且灵敏度高, 为监测异丙肌苷的非法使用及鸡蛋中的残留监控提供了快速准确的技术手段。

关键词: 异丙肌苷; 4-乙酰氨基苯甲酸; 鸡蛋; 残留; 液相色谱-质谱法

Residual determination of *p*-acetylamino-benzoic acid in eggs by liquid chromatography-mass spectrometry

WU Ling, LIU Yu-Xin, LIU Shan-Jing, LU Gui-Ping, SONG Hui-Min, QU Bin*

(Quality Inspection and Testing Center for Animal Products of Jiangsu, Nanjing 210036, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of *p*-acetaminobenzoic acid residues in eggs by liquid chromatography-mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile, purified by pass-through cleanup and solid phase extraction with anion exchange, separated by liquid chromatography, qualitatively and quantitatively determined by quadrupole-orbitrap mass spectrometry, detected by parallel reaction monitoring mode, and quantified by external standard method. **Results** The retention time of *p*-acetylamino-benzoic acid was 5.6 min, and showed a good linear relationship in the range of 2.5–50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The precisions of intra-day and inter-day were less than 15%. The recoveries were 70%–80% and the limit of quantitation was 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This method is fast, accurate and highly sensitive, which provides a fast and accurate technical means for monitoring the illegal use of isopropyl inosine and monitoring the residues in eggs.

KEY WORDS: inosiplex; *p*-acetylamino-benzoic acid; egg; residue; liquid chromatography-mass spectrometry

0 引言

异丙肌苷(inosiplex), 是一种抗病毒药物^[1], 由肌苷(inosine), 化学结构式见图 1, N、N-二甲氨基-2-丙醇(N,N-dimethylamino-2-propanol)结构式见图 2, 4-乙酰氨基

苯甲酸(*p*-acetylamino-benzoic acid, PAABA)结构式见图 3, 按物质的量比 1:3:3 组成^[2], 其应用范围包括病毒性疾病和免疫缺陷疾病^[3]。有报道, 将该产品与某些药物做成复方制剂治疗病毒性疾病, 如与阿奇霉素、氟苯尼考等配合治疗蓝耳病继发的呼吸道疾病, 与氟喹诺酮类复方用于治疗

*通信作者: 曲斌, 博士, 高级兽医师, 主要研究方向为畜产品质量安全检验检测的新技术新方法研究。E-mail: qubin2000@hotmail.com

*Corresponding author: QU Bin, Ph.D, Senior Veterinarian, Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products, Nanjing 210036, China. E-mail: qubin2000@hotmail.com

腹泻病毒继发的肠毒血症,可以提高动物机体免疫功能等^[4]。但是,我国并未批准异丙肌苷用于动物保健与疾病治疗^[5]。同抗生素一样,抗病毒药物的滥用,会造成病毒株的基因变异而耐药、抗药,引发严重的公共卫生和社会问题。因此,加强异丙肌苷的检测监控,对于保障食品安全意义重大。

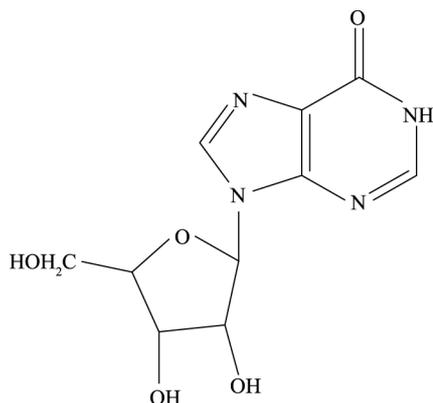


图1 肌苷的结构式

Fig.1 Chemical structure of inosine

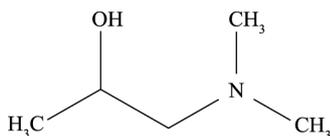


图2 N、N-二甲氨基-2-丙醇的结构式

Fig.2 Chemical structure of N,N-dimethylamino-2-propanol

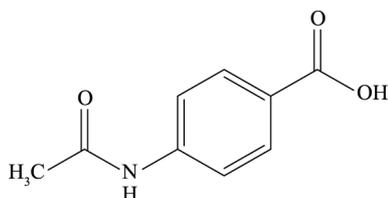


图3 4-乙酰氨基苯甲酸的结构式

Fig.3 Chemical structure of *p*-acetylaminobenzoic acid

异丙肌苷的组成中,肌苷是内源性物质,人体摄入肌苷后对其体内血药浓度水平无明显影响^[6-7],对于动物组织和鸡蛋中的变化,尚没有文献报道。N、N-二甲氨基-2-丙醇和 PAABA 性质差异较大^[8],目前,动物源性食品中 N、N-二甲氨基-2-丙醇和 PAABA 的检测尚没有文献报道,本研究建立液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)测定鸡蛋中 PAABA 残留的方法,以 PAABA 作为异丙肌苷的残留标志物,以期对异丙肌苷的残留监控提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

Q-Extractive 液相色谱-高分辨质谱联用仪、X1R 离心机(美国赛默飞公司);固相萃取装置(美国默克公司);MS basic 涡旋仪、KS501 振荡器(德国一卡公司);N-EVAP112 氮吹仪(美国 Organomation 公司);氮气发生器(中国金浪科技有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国默克公司);乙腈(分析纯,中国南京化学试剂厂);甲酸(LC-MS 级,美国费舍尔公司);无水硫酸钠(分析纯,中国南京化学试剂有限公司);固相萃取柱(Oasis PRiME HLB, 60mg/3mL, 美国 Waters 公司);阴离子交换固相萃取柱(Oasis MAX, 60mg/3cc, 美国沃特世公司);实验用水为自制;异丙肌苷(98%,加拿大 TRC 公司)。

空白鸡蛋购自江苏省兽用抗菌药使用减量化行动试点企业南京禄口禽业发展有限公司,并经确认养殖过程中未使用包括异丙肌苷在内的抗病毒药物。

1.2 溶液制备

取异丙肌苷对照品适量,精密称定,用水-甲醇(1:1, V/V)溶解,制成含 PAABA 100 μg/mL 的标准储备液,于 -20 °C 冷藏保存;

精密量取适量 PAABA 的标准储备液,用水稀释制得 100 ng/mL 工作液。

1.3 样品前处理

取 16 枚新鲜鸡蛋(约 1 kg),洗净去壳后用组织匀浆机充分搅拌均匀^[9],称取此鸡蛋样品 2 g,加入 10 mL 乙腈和 2 g 无水硫酸钠,振荡提取 20 min,高速低温离心,取上清液 2.5 mL,转移至 PRiME HLB 固相萃取柱,收集洗脱液,精密量取 1.0 mL 洗脱液至试管中,加入 0.1 %氨水 5 mL,涡旋混匀,待净化。

MAX 固相萃取柱依次用甲醇、水活化,将待净化液全部转移至固相萃取柱并流干后,依次用水、甲醇淋洗,5 %甲酸甲醇 3 mL 洗脱,收集洗脱液,在水浴中氮气流下吹干,0.5 mL 初始流动相复溶,待测定。

1.4 液相色谱-质谱条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱:赛默飞 Hypersil aQ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)。流动相 A: 0.1%甲酸,流动相 B: 乙腈,梯度洗脱条件见表 1。流速: 0.25 mL/min,柱温: 30 °C,进样量: 25 μL。

1.4.2 质谱条件

质谱分析采用平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM)模式^[10-11]。测试前使用 Thermo Pierce 正离子校正液校正,校正有效期维持在 5 d 内。质谱参数: 喷雾电压: 4500 V,雾化气: 45 L/h,辅助气: 15 L/h,离子传

输温度: 350 °C, 辅助加热温度: 500 °C。分辨率: 17500 FMWH@ m/z 200, AGC target: 1×10^6 , C-trap 最大注入时间: 100 ms, 母离子分离窗口: $0.4m/z$ 。目标物及其定量离子的精确质量数见表 2。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Procedure of gradient elution

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	95	5
0.5	95	5
7	30	70
7.2	95	5
10	95	5

1.5 方法学验证

使用空白鸡蛋样品评价方法学参数。空白鸡蛋样品被

制备成一系列浓度的基质标准曲线评价方法的线性、范围和定量限(limit of quantitation, LOQ), 通过向空白样品中添加 1 倍、2 倍和 10 倍 LOQ 的 PAABA, 并平行测定多次, 考察日内、日间精密度及回收率。

2 结果与分析

2.1 监测离子的选择

对 PAABA 在正离子和负离子模式下扫描, 监测其分子离子峰, 结果正离子模式下峰强度是负离子模式下峰强度的 2 倍, 故选择在正离子模式下检测 PAABA。

PAABA 的子离子扫描质谱图见图 4, 图中 PAABA 主要的碎片离子包括 m/z 162、 m/z 138、 m/z 136、 m/z 94, 对其裂解方式和离子组成进行归属, 见图 5, 选择信号最强的 m/z 94 作为定量离子, 选择特征碎片离子 m/z 138、 m/z 136 作为辅助定性离子。

表 2 4-乙酰氨基苯甲酸定性及定量离子信息
Table 2 Qualitative and quantitative information of *p*-acetylamino-benzoic acid

目标化合物	母离子		子离子		保留时间/min	碰撞能量/eV
	组成	质荷比(m/z)	组成	精确质量数		
4-乙酰氨基苯甲酸	[M+H] ⁺	180	C ₆ H ₈ N ⁺	94.06513	5.6	35
			C ₇ H ₈ NO ₂ ⁺	138.05496		
			C ₈ H ₁₀ NO ⁺	136.07569		

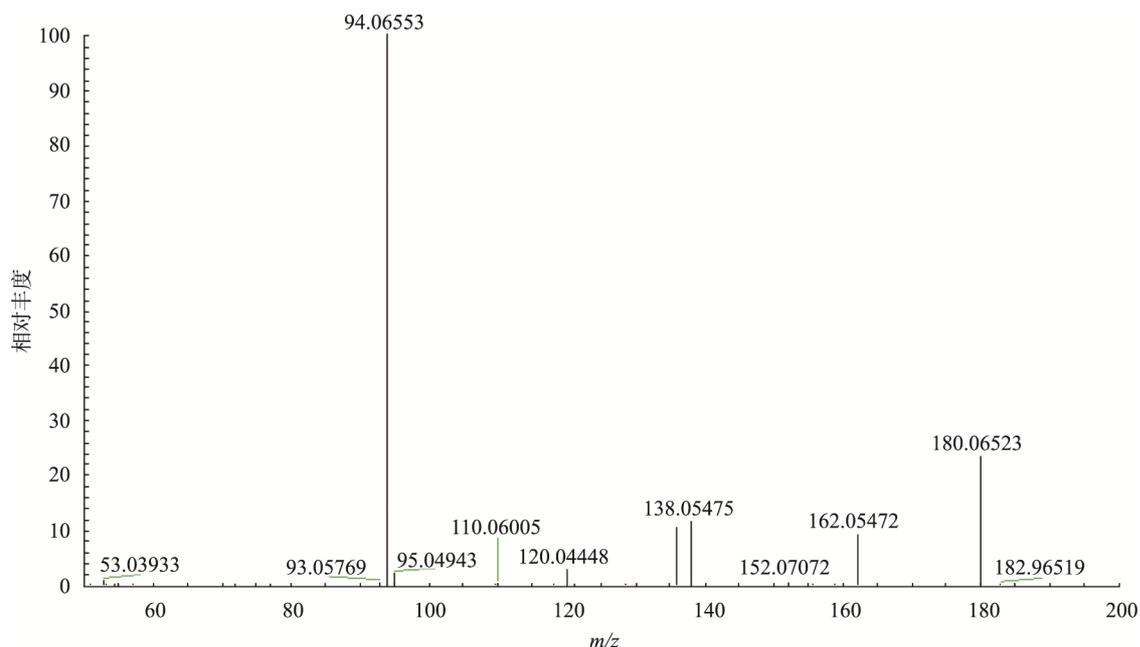


图 4 4-乙酰氨基苯甲酸的子离子扫描质谱图
Fig.4 Daughter ion mass spectrum of PAABA

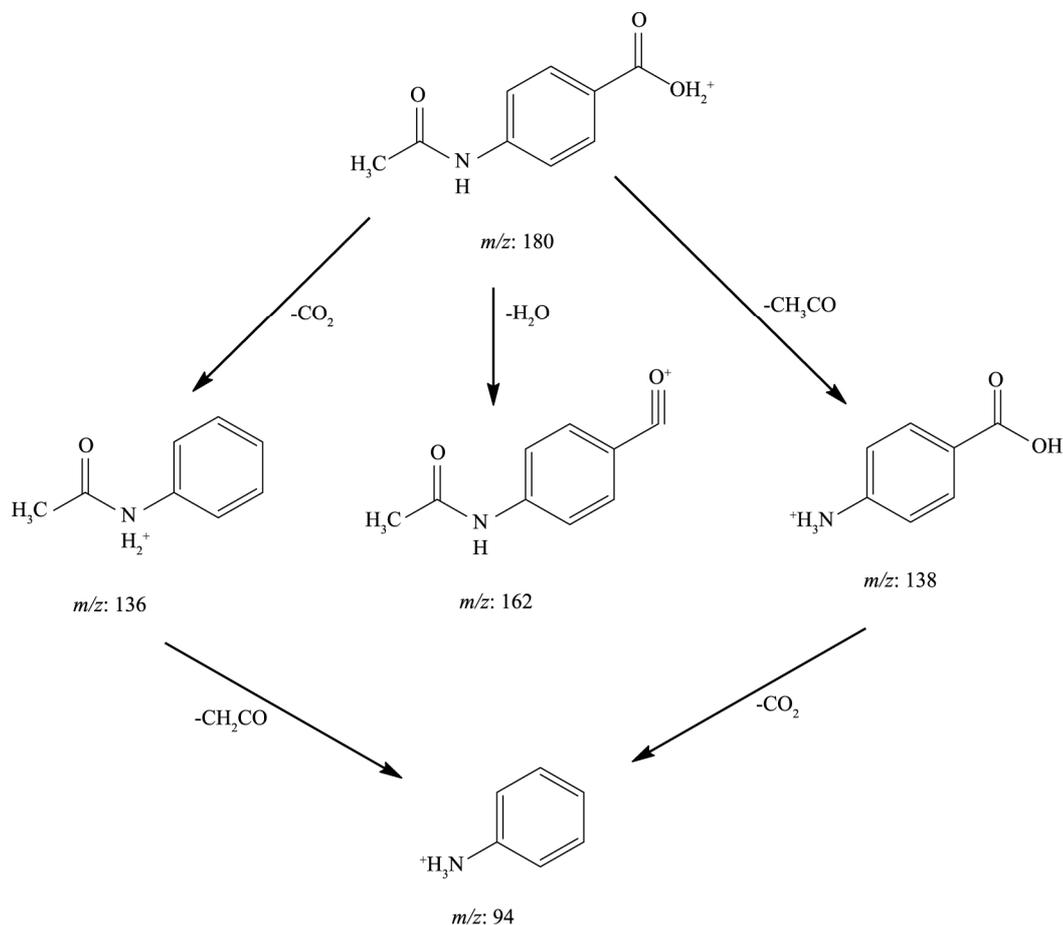


图5 4-乙酰氨基苯甲酸的质谱裂解图

Fig.5 Mass fragmentation attribution of PAABA

2.2 前处理方法的选择

鸡蛋样品含有大量的磷脂, 根据实践经验^[12-13], PRiME HLB 固相萃取柱具有高效去除磷脂的能力, 能够去除绝大多数鸡蛋中的脂类干扰物, 但是残余的基质干扰物在样品浓缩后会造成进样溶液浑浊, 影响色谱柱的柱效和质谱的灵敏度、重现性。PAABA 具有羧酸基团, 可以采用阴离子交换固相萃取柱净化的方式净化, 经比较, 经 MAX 净化后的 PAABA 峰面积较未经净化的样品峰面积大 20%, 并能降低基质效应的影响。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性

空白鸡蛋的色谱图见图 6, 鸡蛋中阳性添加(添加量为 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$)色谱图见图 7。如图可见, 空白鸡蛋样品中不含干扰测定的物质; 阳性添加样品中, PAABA 保留时间为 5.6 min, 是死时间的 5 倍, 保留合适且峰形对称。

2.3.2 标准曲线及线性范围

精密量取 $100\text{ ng}/\text{mL}$ PAABA 工作液适量, 添加到 2 g 空白鸡蛋中, 制得目标药物含量为 2.5 、 5.0 、 10 、 20 、 30 、 40 、 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 的系列空白添加试样, 依次经 LC-MS 分析测定, 分别以定量离子峰面积为纵坐标, 以化合物质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 回归方程 $Y=134561X-19144$, 相关系数 $r^2=0.9909$, 可以看出 PAABA 在 $2.5\sim 50\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 有良好的线性关系。

按照“样品前处理”项下建立的方法进行添加实验, 综合考虑信噪比和重现性, 确定本方法研究的鸡蛋基质中, 目标化合物的定量限为 $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.3.3 精密度与回收率

分别称量鸡蛋的空白样品, 进行 PAABA 的 1 倍 LOQ、2 倍 LOQ 和 10 倍 LOQ 这 3 个浓度的加标回收实验, 并且在每个浓度水平进行 5 次平行实验, 分别考察 3 d, 根据检测结果计算回收率, 并用相对标准偏差值(relative standard deviation, RSD)评价日内和日间精密度, 鸡蛋中 PAABA 检测结果见表 3。

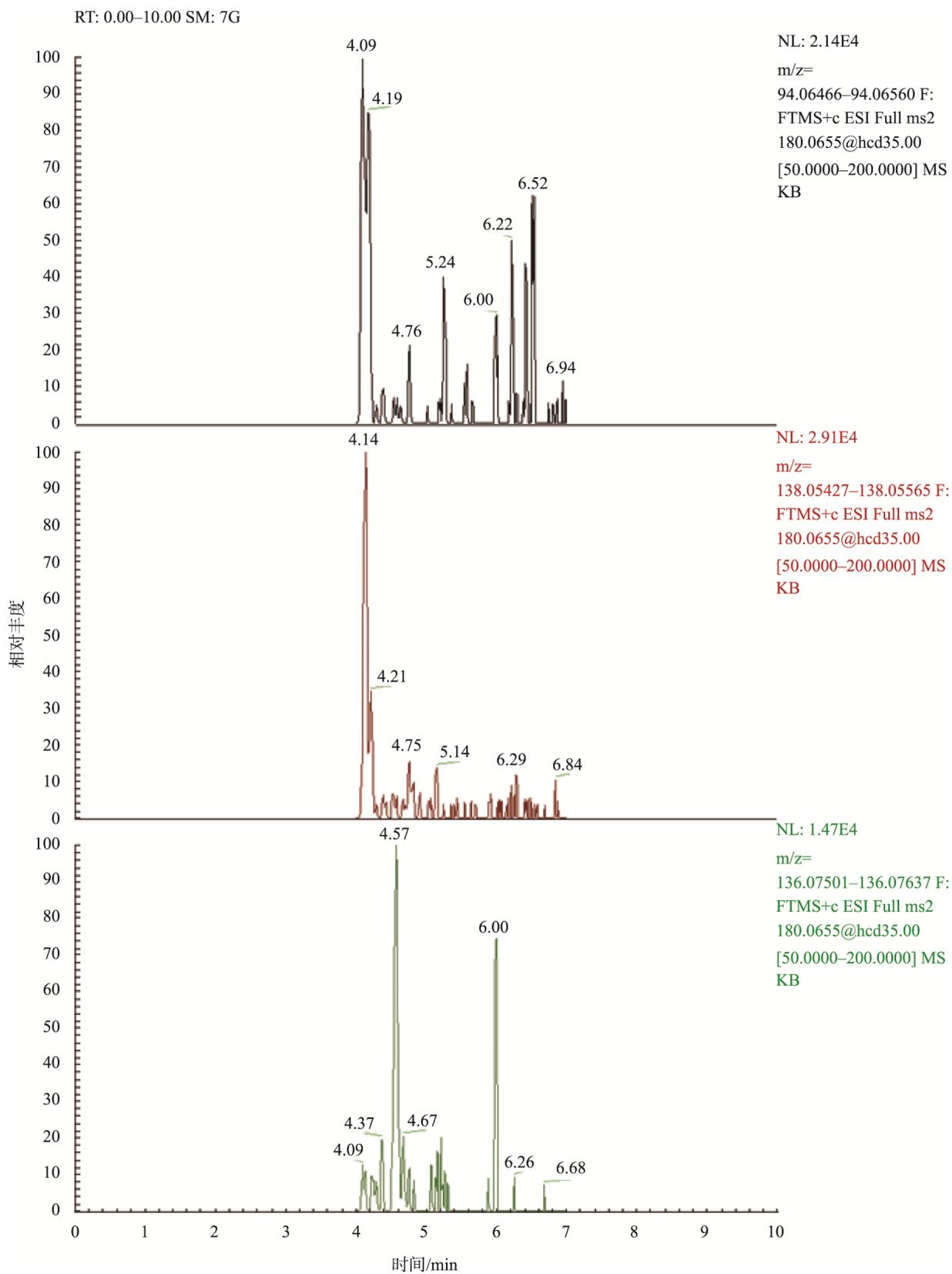


图 6 空白鸡蛋色谱图

Fig.6 Selective ion chromatogram of blank egg

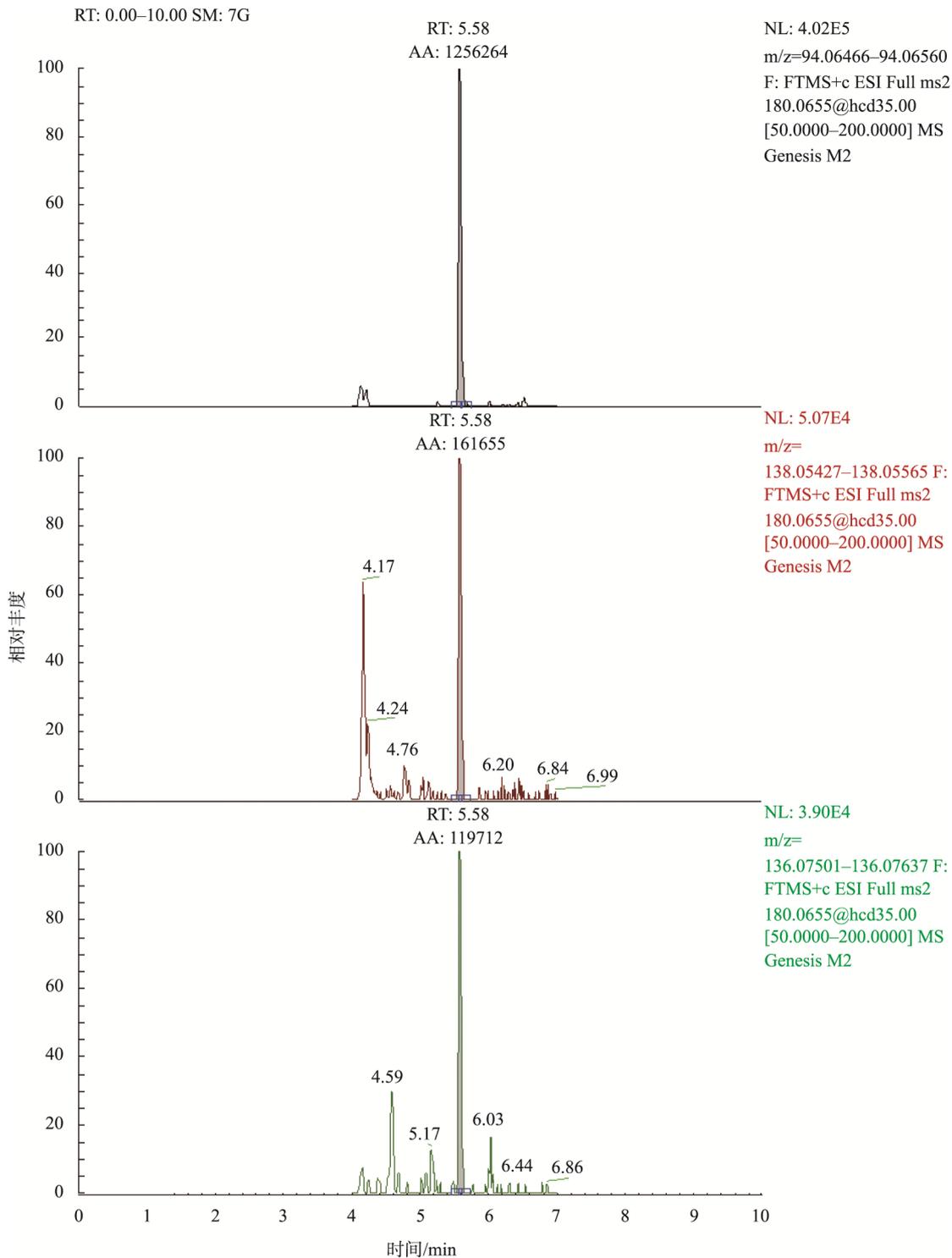


图 7 鸡蛋中阳性添加色谱图

Fig.7 Selective ion chromatogram of spiked egg

表 3 鸡蛋中 PAABA 检测的回收率和精密度(n=5)
Table 3 Recoveries and precision of PAABA in egg(n=5)

日内精密度(RSD)%			日间精密度(RSD)%			平均回收率/%		
2.5 μg/kg	5.0 μg/kg	25 μg/kg	2.5 μg/kg	5.0 μg/kg	25 μg/kg	2.5 μg/kg	5.0 μg/kg	25 μg/kg
1.6	4.1	8.5	4.3	5.5	9.2	75.7	74.9	78.7

2.4 实际样品的测定

对55个鸡蛋样品进行了筛选测试, 暂未检出PAABA残留。另外, 在检测PAABA的同时, 对肌苷也进行了定性检测, 结果, 肌苷做为内源性物质^[14-15], 在鸡蛋中也存在。对于内源性的肌苷检测, 及其异丙肌苷用药后对肌苷含量的影响, 尚需要新的方法研究与开发。

3 结论

本研究建立了鸡蛋中PAABA残留测定的方法, 方法简便快速, 适用于作为异丙肌苷残留监控的标志物, 为异丙肌苷使用的风险评估和风险预警提供了有效的技术手段, 适合于残留筛选和日常监测。

参考文献

- [1] DE SIMONE C, FAMULARO G, TZANTZOGLOU S, *et al.* Inosine pranobex in the treatment of HIV infection: A review [J]. *Int J Immunopharm*, 1991, 13(S1): 19-27.
- [2] ROSSI C, PICCHI M, TIEZZI E, *et al.* Conformational and dynamic investigation in solution of inosine and its molecular complex, inosiplex, by proton and carbon NMR spectroscopy [J]. *Magn Reson Chem*, 1990, 28(4): 348-354.
- [3] ENNA SJ, BYLUND DB. Inosiplex [J]. *Xpharm Compr Pharm Refer*, 2007, (1): 1-2.
- [4] 孙国祥. 抗病毒药物异丙肌苷[J]. *北方牧业*, 2010, 17(9): 27.
SUN GX. Antiviral drug Inosine pranobex [J]. *Northern Anim Husb*, 2010, 17(9): 27.
- [5] GB 31650—2019 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量[S].
GB 31650—2019 National food safety standard—Maximum residue limits for veterinary drugs in foods [S].
- [6] 阙小亭, 丁娅, 杭太俊, 等. 健康受试者口服异丙肌苷片的药动学[J]. *中国新药与临床杂志*, 2010, 29(10): 738-742.
QUE XT, DING Y, HANG TJ, *et al.* Pharmacokinetics of inosiplex tablets in healthy Chinese volunteers [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2010, 29(10): 738-742.
- [7] CHEN M, ZHANG Y, QUE XT, *et al.* Pharmacokinetic study of inosiplex tablets in healthy Chinese volunteers by hyphenated HPLC and tandem MS techniques [J]. *J Pharm Anal*, 2013, 3(6): 387-393.
- [8] 于勇, 孙鲁宁, 杜晓琅, 等. 人尿中对乙酰氨基苯甲酸和 N, N-二甲氨基-2-丙醇的液质联用法测定及尿药排泄特征研究[J]. *药学进展*, 2011, (9): 417-423.
YU Y, SUN LN, DU XL, *et al.* Determination of *p*-acetaminobenzoic acid and N, N-dimethylamino-2-propanol in human urine by LC-MS and study on their urinary excretion profiles [J]. *Prog Pharm Sci*, 2011, (9): 417-423.
- [9] GB 23200. 115—2018 食品安全国家标准鸡蛋中氟虫腈及其代谢物残留量的测定液相色谱-质谱联用法[S].
GB 23200. 115—2018 National food safety standard—Determination of fipronil and metabolites residues in eggs—Liquid chromatography tandem mass spectrometry method [S].
- [10] 汪云花, 曲斌, 刘善菁, 等. 基于平行反应监测模式的液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱法快速测定猪肉中 β -受体激动剂残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(10): 2369-2378.
WANG YH, QU B, LIU SJ, *et al.* Quantitative determination of β -agonists residues in pork by liquid chromatography quadrupole-orbitrap-high resolution mass spectrometry based on parallel reaction monitoring mode [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(10): 2369-2378.
- [11] 曲斌, 刘善菁, 刘雨昕, 等. 基于平行反应监测模式的液相色谱-四极杆-静电场轨道阱质谱测定生鲜牛乳中氟虫腈及其代谢物残留[J]. *药物分析杂志*. 2019, 39(2): 333-340.
QU B, LIU SJ, LIU YX, *et al.* Quantitative determination of fipronil and its metabolites residues in raw milk by liquid chromatography quadrupole-orbitrap mass spectrometry with parallel reaction monitoring mode [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(2): 333-340.
- [12] 曲斌, 刘善菁, 刘雨昕, 等. 液相色谱-串联质谱法测定猪肉中氟虫腈及其代谢物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(6): 1332-1337.
QU B, LIU SJ, LIU YX, *et al.* Quantitative determination of fipronil and its metabolites residues in pork by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(6): 1332-1337.
- [13] 刘善菁, 刘雨昕, 陆桂萍, 等. 液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱测定鸡蛋及鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留的研究[J]. *中国兽药杂志*. 2017, 51(10): 29-38.
LIU SJ, LIU YX, LU GP, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites residues in chicken egg and muscle by liquid chromatography quadrupole-orbitrap-high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Vet Drug*, 2017, 51(10): 29-38.
- [14] YAN J, LIU P, XU L, *et al.* Effects of exogenous inosine monophosphate on growth performance, flavor compounds, enzyme activity, and gene expression of muscle tissues in chicken [J]. *Poultry Sci*, 2018, 97(4): 1229-1237.
- [15] ZHENG M, MAO P, TIAN X, *et al.* Effects of dietary supplementation of alfalfa meal on growth performance, carcass characteristics, meat and egg quality, and intestinal microbiota in Beijing-you chicken [J]. *Poultry Sci*, 2019, 98(5): 2250-2259.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

吴 玲, 检验员, 主要研究方向为兽药残留分析与管理。
E-mail: 419818154@qq.com

曲 斌, 博士, 高级兽医师, 主要研究方向为兽药残留分析新技术新方法。
E-mail: qubin2000@hotmail.com