

超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨率质谱法测定鸡肉中8种喹噁啉类药物及其代谢产物

宋占腾, 樊霞, 肖志明, 王石, 赵根龙, 李阳, 索德成*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱串联四极杆/静电场轨道离子阱高分辨率质谱法同步测定鸡肉中8种喹噁啉类药物及其代谢物的分析方法。**方法** 鸡肉样品分别经过1%甲酸乙腈提取5种喹噁啉类原药和1 mol/L 盐酸溶液提取3种代谢物, 超声、振荡处理及高速离心后, 分别用多重基质吸附填料和Oasis HLB固相萃取柱净化并收集, 氮气吹干, 用0.1%甲酸-乙腈溶液定容后合并进行分析。采用Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱进行分离, 以0.1%甲酸水和0.1%甲酸甲醇作为流动相, 进行梯度洗脱。质谱采用平行反应监测模式下进行定性与定量分析。**结果** 8种化合物能够得到较好地分离, 在线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.999。在1、10、100 ng/g加标水平下, 8种化合物平均回收率为76.1%~112.8%, 相对标准偏差小于15%。方法检出限和定量限分别为0.04~0.1 μg/kg和0.12~0.3 μg/kg。**结论** 本方法样品处理过程简便、分析时间短, 准确可靠、灵敏度高, 可用于鸡肉产品中多种喹噁啉类药物的监测。

关键词: 静电场轨道离子阱高分辨率质谱法; 固相萃取净化; 多重机制吸附; 鸡肉; 喹噁啉类; 代谢物

Determination of 8 kinds of quinoxalines and their metabolites in chicken meat by applying high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbit trap high resolution mass spectrometry

SONG Zhan-Teng, FAN Xia, XIAO Zhi-Ming, WANG Shi,
ZHAO Gen-Long, LI Yang, SUO De-Cheng*

(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of eight quinoxalines and their metabolites in chicken by ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry. **Methods** The chicken samples were respectively subjected to extraction of five quinoxalines prodrugs with 1% formic acid-acetonitrile and extraction of three metabolites with 1 mol/L hydrochloric acid solution. After ultrasonic treatment, oscillation treatment and high-speed centrifugation, the

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602302)、国家自然科学基金项目(31572443)

Fund: Supported by the National Key R&D Projects (2018YFC1602302), and National Natural Science Foundation of China (31572443)

*通信作者: 索德成, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全及饲料质量安全与标准化研究。E-mail: suodecheng@caas.cn

*Corresponding author: SUO De-Cheng, Associate Researcher, Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China. E-mail: suodecheng@caas.cn

samples were purified and collected using multiple matrix adsorption fillers and an Oasis HLB solid-phase extraction column, respectively. The samples were blown dry with nitrogen, and fixed in volume with 0.1% formic acid-acetonitrile solution. The samples were combined for analysis. The separation was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) column with gradient elution using 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in methanol as the mobile phase. Qualitative and quantitative analysis was performed in parallel reaction monitoring mode on the mass spectrum. **Results** The eight compounds could be separated well, and the linear relationship was good in the linear range, and the correlation coefficients were all greater than 0.999. At the 1, 10, and 100 ng/g spiked levels, the average recoveries of the eight compounds were 76.1%–112.8%, and the relative standard deviation was less than 15%. The detection limit and quantitation limit of the method were 0.04–0.1 μg/kg and 0.12–0.3 μg/kg, respectively. **Conclusion** The method has the advantages of simple sample processing process, short analysis time, accuracy, reliability and high sensitivity, and can be used for monitoring a plurality of quinoxaline drugs in chicken products.

KEY WORDS: high-resolution mass spectrometry of electrostatic field orbital ion trap; solid phase extraction purification; multi-function impurity adsorption solid-phase extraction; chicken; quinoxalines; metabolites

0 引言

喹噁啉类药物(quinoxalines, QELs)是一类人工合成的具有抗菌活性的物质,带有喹噁啉-1,4-二氧化物母核结构(即喹噁啉环),并在喹噁啉环的 2 位和/或 3 位引入不同基团^[1]。其具有促进蛋白质同化,提高饲料转化率,促进动物生长,广谱抗菌、抗球虫的作用^[2],曾广泛应用于畜禽、水产养殖业^[3]。常见的喹噁啉类药物主要有喹乙醇(qlaquindox, OLA)、乙酰甲喹(mequindox, MEQ)、喹烯酮(quinctone, QCT)、喹赛多(cyadox, CYX)、卡巴氧(carbadox, CBX)等。喹噁啉类药物实际生产养殖中常被超剂量使用或者违规添加,据相关研究表明,喹噁啉类药物在实际生产中的违规使用,由畜禽组织中发生蓄积残留,随之转入食物链进入人体。喹噁啉类药物在动物体内代谢物有脱氧卡巴氧(desoxycy-carbadox, DCBX)、喹噁啉-2-羧酸(quinoxaline-2-carboxylic acid, QCA)、3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA)等^[4]。喹噁啉类药物和其代谢物具有细胞毒性、遗传毒性、光敏毒性,甚至具有致突变和致癌嫌疑^[5–10]。人类经常食用含有该类化合物的动物源性食品,对身体有较大危害。因此 QELs 残留问题引起各国高度重视,中国、欧盟及日本等都对 QELs 的使用给予明确禁止,欧盟禁止所有喹噁啉类药物作为饲料添加剂^[11–12],日本禁止在食品中不得检出卡巴氧和喹乙醇^[13],我国农业部也相继发布第 2638、第 193 等公告来禁止 QELs 的非法使用^[14–17]。

为保障畜禽类产品质量安全,对违规、超剂量添加的有害物进行检测是监管的重要手段,而开发这些有害物的高灵敏度检测技术是化合物分析检测的基础。近年来对于畜禽肉产品中 QELs 残留分析主要有免疫吸附测定法

(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[18–20]、气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)^[21]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[22–25]、超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-mass/mass, UPLC-MS/MS)^[26–32]等。总体来看,免疫吸附测定法对喹噁啉的研究较少,具有只能对单个抗体反应的特点。检测过程中需要对 QCA 衍生化后再进行检测,容易出现假阳性且限制了检测方法的实用性。QELs 及其代谢物沸点高,难以汽化,喹噁啉药物很难衍生转化为沸点低的物质,因此 GC-MS 法对于 QELs 的检测效果不佳。HPLC 法具有简单、经济的优点,但相比于质谱无法提供物质的结构信息,通过待测物分子离子峰的选择提高检测选择性和灵敏度。近年来随着仪器的推广,UPLC-MS/MS 法逐渐被应用于 QELs 的残留分析中,目前相关研究文献中,多以传统三重四极杆为主,且以水产品 and 畜产品偏多,检测药物种类以原药为主,无法满足较低浓度其代谢物的确证性分析和精准定量要求。

四极杆线性离子阱静电场轨道阱高分辨质谱仪(quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry, Q-orbitrap HRMS)作为一种高分辨率、高灵敏度质谱,对复杂的样品能够提供灵敏和可重复的监测,获得精确质量数并且实现多种药物在高扫描速率下的鉴定、定量和确证分析^[33–34],目前在食品安全领域研究中已有部分应用^[35–36]。但是,同时测定鸡肉产品喹噁啉类药物及其代谢物的研究还未见报道。为此,本研究针对鸡肉样品,经过提取净化,建立了利用 UPLC-Q-orbitrap HRMS 同时检测和确证 5 种 QELs 和 3 种代谢物的方法。结合超高效液相色谱更快、更灵敏的分离能力和静电场轨道离子阱高分辨率质谱精准质量数测定优势,分析了样品信息,以期

为更全面、严格监控这类药物的使用和残留情况提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

阳性样品来源: 阳性鸡肉样品通过动物实验获得, 依据饲料药物添加剂使用规范^[32], 混饲给予 100 mg/kg 的喹乙醇和 75 mg/kg 的喹烯酮药物, 连续给药 5 d, 分别于不同停药期采集样品。

1.2 仪器与试剂

Vanquish™ Flex UHPLC Systems 超高效液相色谱(美国 Thermo Scientific 公司); Q-Exactive 四极杆线性离子阱静电场轨道阱高分辨质谱仪, 带有热电喷雾离子源(heatable electrospray source ion, HESI)(美国 Thermo Fisher 公司); Acquity UPLC Beh C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)、Oasis HLB 固相萃取小柱、Oasis MAX 固相萃取小柱(3 cc, 60 mg)(美国 Waters 公司); 超声波清洗器(西班牙 Fungilab 公司); 3-16KL 高速台式离心机(德国 Sigma 公司); EOFO-945066 多管自动涡旋混合器(中国上海 ANPEL 公司); 0.22 μm 聚四氟乙烯(poly tetra fluoro ethylene, PTFE)滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司); RiOs150 超纯水器(美国 MERCK MILLIPORE 公司); JYS-A960 绞肉机(济南九阳股份有限公司)。

前处理吸附材料 Cleanert S C₁₈: 粒径 50 μm、Cleanert S SLE(硅藻土): 粒径 150 μm、Cleanert S 中性氧化铝(Alumina-N): 粒径 150 μm、Cleanert S 活性炭(Carb): 粒径 120~400 mesh、Cleanert S Nano Carb: 粒径 10~20 nm(美国 Agela Technologies 公司)。吸附材料 BONDESIL-SAX: 粒径 40 μm、BONDESIL-SCX: 粒径 40 μm、BONDESIL-PSA: 粒径 40 μm、BONDESIL-FL: 粒径 200 μm(美国 Agilent Technologies 公司)。羟基化多壁碳纳米管(hydroxylated mwcnts, HMCN): 粒径 30~50 μm(先丰纳米材料科技有限公司)。多重机制吸附填料: 称取 6 g BONDESIL-SAX、3 g Cleanert S C₁₈ 于 50 mL 三角瓶中, 混合均匀, 备用。

QCT、OLA、MEQ、CYX、CBX、DCBX 标准品(纯度 99.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); QCA、MQCA、QCA-D4、MQCA-D4 标准品(纯度 99.8%, 中国上海 ANPEL 公司); OLA-D4 标准品(纯度 98.0%, 德国 Witega 公司); 甲酸(色谱纯, 德国 Sigma 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Fisher ChenAlert Guide 公司); 其他试剂均为分析纯试剂, 实验用水为 Mili-Q 纯化后的超纯水(> 18 MΩ)。

1.3 标准储备液和内标的制备

取 CYX、MEQ、CBX、OLA、QCT、DCBX、QCA、MQCA 对照品各适量, 精密称定, 用甲醇溶解, 制成 500 μg/mL 的标准储备液, 于-20 °C 冷藏保存, 有效期 6 个

月; 精密吸取一定量 OLA-D4、QCA-D4、MQCA-D4 标准液, 用甲醇稀释成 500 ng/mL 的混合内标储备液, 于-20 °C 冷藏备用, 有效期 6 个月; 精密量取 8 种 QELs 标准储备液各适量, 置于同一棕色试剂瓶中, 经甲醇稀释, 制得 500 ng/mL 的混合标准工作液, 现用现配。

1.4 样品前处理

1.4.1 制 样

取鸡肉样品, 绞肉机中充分破碎至匀浆状态, 置于清洁容器中并编号, 于-20 °C 下保存。

1.4.2 样品中 DCBX、QCA、MQCA 的提取

称取鸡肉样品 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入一定量的混合内标储备液, 涡旋混合, 使其相对于组织中的含量为 10 ng/g; 准确加入 20 mL 1 mol/L 的盐酸溶液, 涡旋混合 5 min, 静置 30 min; 置于摇床 125 r/min, 40 °C 恒温下振摇 2 h; 9000 r/min 离心 5 min; 移取上清液于 50 mL 离心管。取 Oasis HLB 固相萃取小柱, 依次加入 3 mL 甲醇和 3 mL 水匀速流出使其完全活化, 加入 5 mL 上清液, 流出后依次加入 3 mL 水和 3 mL 5% 甲醇水淋洗并挤干; 加入 5 mL 2% 甲酸甲醇溶液洗脱至 10 mL 聚丙烯离心管, 在 40 °C 下氮气吹干, 加入 0.5 mL 0.1% 甲酸-乙腈(9:1, V:V)溶液, 涡旋振荡 30 s 复溶。

1.4.3 样品中 CYX、MEQ、CBX、OLA、QCT 的提取

称取鸡肉样品 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入一定量的混合内标储备液, 涡旋混合, 使其相对于组织中的含量为 10 ng/g; 加入 20 mL 1% 甲酸乙腈溶液, 涡旋混合 5 min, 静置 30 min; 置于摇床 125 r/min, 40 °C 恒温下振摇 1 h, 超声提取 40 min, 9000 r/min 离心 5 min; 移取上清液 5 mL 于 10 mL 离心管, 加入 50 mg 多重机制吸附填料, 涡旋混合超声 15 min, 9000 r/min 离心 5 min, 移取全部上清液 40 °C 下氮气吹干, 加入 0.5 mL 0.1% 甲酸-乙腈(9:1, V:V)溶液, 涡旋振荡 30 s 复溶。

将 2 次提取后的复溶液(1:1, V:V)混合涡旋, 经 0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜过滤后, 用 Q Exactive HF, HRMS 测定。

1.5 色谱与质谱条件

色谱柱: Acquity UPLC Beh C₁₈ (3.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 °C; 进样量: 5 μL; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为 0.1% 甲酸甲醇。流量、流动相和梯度洗脱见表 1。

Q Exactive HF, HRMS 采用热电喷雾离子源, 正离子模式, 平行反应监测(parallel reaction monitoring, PRM); 鞘气流速 40 Arb; 辅助气流速 10 Arb; 喷雾电压 3.50 kV; 毛细管温度: 320 °C; S-lens 电压: 55 V; 辅助气加热温度: 300 °C。脱溶剂气和锥孔气均为氮气; 使用前调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。质谱扫描参数及各药物物质谱条件见表 2、表 3。

表 1 流动相梯度条件
Table 1 Mobile phase gradient condition

时间/min	流量/(mL/min)	A/%	B/%	曲线类型
0.000	0.400	90.0	10.0	5
0.500	0.400	90.0	10.0	5
1.000	0.400	70.0	30.0	5
2.500	0.400	20.0	80.0	5
4.000	0.400	0.00	100.0	5
5.000	0.400	0.00	100.0	5
5.100	0.400	90.0	10.0	5
6.000	0.400	90.0	10.0	5

表 2 质谱扫描参数
Table 2 Scanning parameters of mass spectrometry

质谱扫描参数	设定值
扫描模式	PRM
正负扫描模式	positive
容纳的离子数量	2e4
最大注射时间	50 ms
分辨率	120000
隔离窗口	2.0m/z
归一化碰撞能	35

表 3 5 种喹噁啉原药、3 种代谢物及其 3 种内标化合物质谱条件

Table 3 Mass spectrometry conditions of five quinoxaline prodrugs, three metabolites and three of their internal standard compounds

化合物名称	保留时间/min	一级离子 (m/z)	二级离子 (m/z)
OLA ^a	3.67	264.0979	177.0656* 143.0601 160.0627
QCA ^b	3.79	175.0449	147.0549* 117.9796 161.0096
MQCA ^c	3.68	188.1066	109.1012* 143.0601 67.0546
CYX ^a	3.43	272.0771	188.0451* 143.0602 238.0720
MEQ ^a	3.80	219.0761	143.0602* 185.0607 160.0627
CBX ^a	3.81	263.0767	229.0713* 145.0392 159.0549
DCBX ^a	4.25	231.0872	199.0610* 143.0601 171.0662
QCT ^a	4.45	307.1066	131.0489* 143.0601 273.1013
OLA-D4 ^a	3.67	268.1215	250.1119
QCA-D4 ^b	3.79	179.0750	151.0801
MQCA-D4 ^c	3.68	193.0493	151.0801

注: *为定量离子(quantitative ion); a、b、c 分别表示定量内标化合物。

2 结果与分析

2.1 色谱与质谱条件

对于色谱柱的选择,不同填料的色谱柱分离效果不同,本研究选用了 Acquity UPLC Beh C₁₈(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱,结果表明,对各类化合物进行分离时,出峰时间、分离度、峰形较好,质谱采用正离子模式进行检测时,通常使用有一定酸度的流动相,以使被分析物容易质子化带上正电荷,从而提高检测的灵敏度。本研究比较了添加不同浓度的甲酸溶液时的分离效果,结果表明,在水相和有机相中同时加入 0.1%甲酸,能够促进电离,有效提高灵敏度。通过流动相梯度洗脱,能够在 6 min 内有效地分离 8 种化合物,缩短了保留时间,同时在很大程度上节省了溶剂消耗,降低了分析成本和废液产生。各类化合物离子流色谱图见图 1。

质谱采用热电喷雾离子源,正离子模式,平行反应监测,此模式是一种基于高分辨、高精度质谱的离子监视技术,能够对目标分析物进行选择性检测,从而实现对目标物进行绝对定量。利用四级杆质量分析器的选择能力,用 Q1 选择目标物的母离子;最后利用精度分析器在二级质谱中检测所选择的母离子窗口内的所有碎片的信息。相比于传统选择反应监测扫描(selective reaction monitoring, SRM)和多反应检测扫描(multi reaction monitoring, MRM)只检测目标离子对的模式,PRM 模式不仅具有 SRM/MRM 的靶向定量分析能力,还同时具备了精准定性能力。此模式有效地消除了样品基质的干扰,大大提高方法的灵敏度。8 种化合物的增强子离子扫描质谱图见图 2。

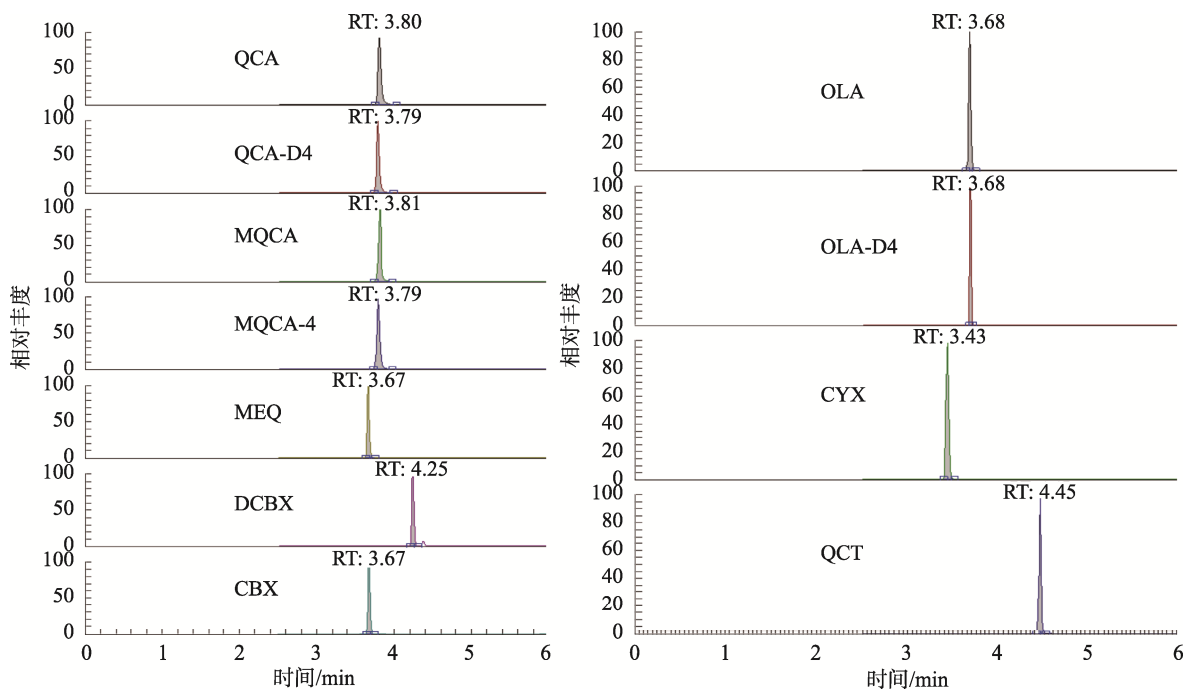


图 1 各类化合物离子流色谱图

Fig.1 Ion flow chromatograms of various compounds

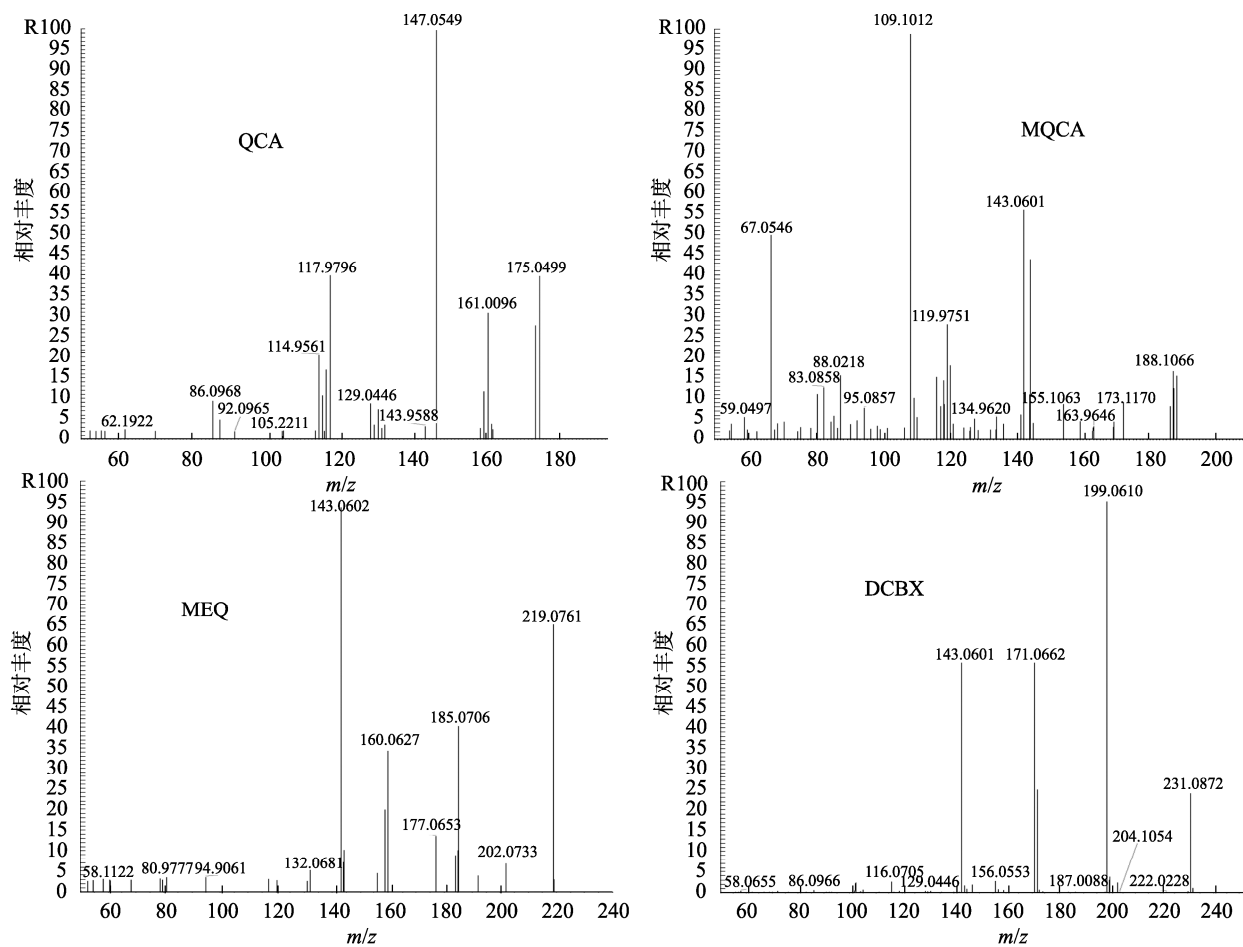


图 2 8 种化合物增强子离子扫描质谱图

Fig.2 Augmented ion scanning mass spectra of eight compounds

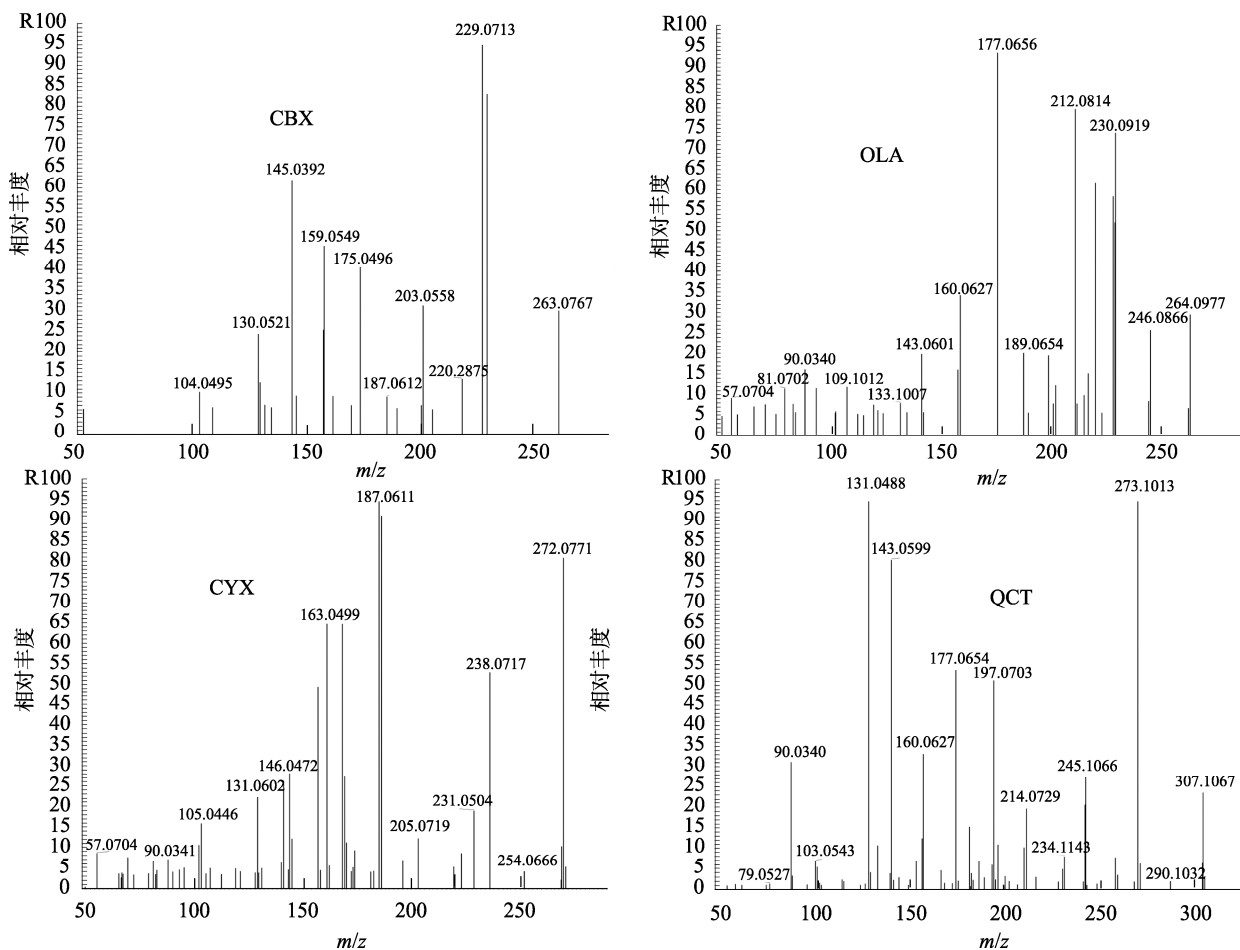


图 2(续) 8 种化合物增强子离子扫描质谱图

Fig.2 Augmentor ion scanning mass spectra of eight compounds

2.2 提取条件选择

基于 5 种喹噁啉原药与 3 种代谢物的化学性质以及在样品中的残留特征有较大的差异性,且喹噁啉类药物在动物体内的代谢过程复杂,其喹噁啉环中较活泼的 N-O 基团先还原脱氧,生成脱氧代谢物,再发生侧链断裂反应,生成羧酸及其衍生物。但目前分析检测手段仍有一定局限性,缺乏对代谢物整体机制的分析判断。喹噁啉原药主要以游离态形式存在,常见报道中主要使用有机溶剂使其化合物溶解以提取^[37],而代谢物 DCBX、QCA、MQCA 极性较强,在动物体内通过共价键与内源性物质以结合状态存在^[38],一般采用酸水解^[39-40]、碱水解^[41-42]、酶解^[28-29,43]等方式将目标化合物与蛋白质分离。

本研究考察了乙腈/乙酸乙酯(1:1, V:V)、二甲基亚砜/乙腈(2:8, V:V)、甲酸/乙腈(1:99, V:V)、1 mol/L 盐酸溶液、2 mol/L 氢氧化钠溶液、10 mg/mL 蛋白酶溶液对 OLA、QCT 及其代谢物 MQCA 的提取效率,如图 3 所示。结果表明,碱性水解提取内源性物质造成的干扰较大,回收率低;采用乙酸乙酯、二甲基亚砜的混合溶剂时,得到的杂质较多,

提取液中含有大量水溶性蛋白和色素等杂质,影响定性与定量效果,同时污染色谱柱;酶溶液对组织的分解较为彻底,目标化合物可以有效分离,但酶解通常需要分解 18 h 以上,无法满足检测时限需求;用乙腈作为提取剂时,可以有效沉淀蛋白质,但对 CBX 和 CAX 的回收率不理想,因此以适量加入甲酸作为提取剂,消除代谢活性物质及终产物对提取的影响。由于 CBX 和 OLA 呈弱碱性,试剂酸性过高无法将其从样品中提取出来,为此,本研究对比了 0.1%甲酸-乙腈溶液和 1%甲酸-乙腈溶液,不同加酸量的添加对 CBX 和 OLA 提取效率的影响,最终确定以 1%甲酸乙腈作为 QELs 的提取溶剂;DCBX、QCA 和 MQCA 呈弱酸性,水解液经酸化后更易被提取,分别使用 0.1、1、2 mol/L 不同浓度的盐酸溶液进行酸化,最终确定以 2 mol/L 盐酸溶液提取时,效率达到最高。

2.3 净化条件选择

样品提取液常含有脂类、蛋白质以及其他大分子杂质,对化合物分析的准确性有较大影响,因此需要净化处理。本研究选用 Oasis HLB 固相萃取小柱、Oasis MAX 固相萃

取小柱进行比较, 2 种萃取小柱对 QELs 及其代谢物的回收率如图 4 所示, 结果表明, 使用 MAX 柱时 OLA 和 QCT 回收率低于 20%; Oasis HLB 柱可耐受 pH 范围较广, 有较好的可浸润性, 对 8 种化合物均有一定保留, 且对 DCBX、QCA 和 MQCA 有较好效果, 但通过酸化乙腈提取的 5 种原药回收率总体偏低, 不能满足实验需要, 因此最终确定使用 Oasis HLB 柱对 MQCA、QCA 和 DCBX 3 种代谢物的提取液富集净化。

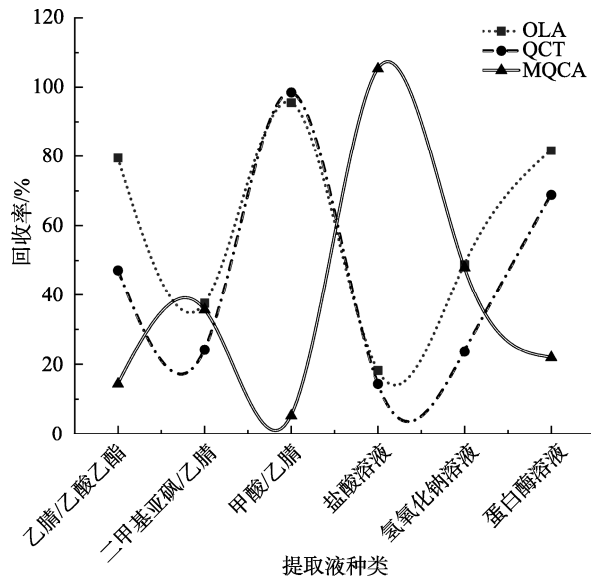


图 3 不同提取液对鸡肉中 QELs 回收效率
Fig.3 Recovery efficiency of QELs in chicken meat by different extraction solutions

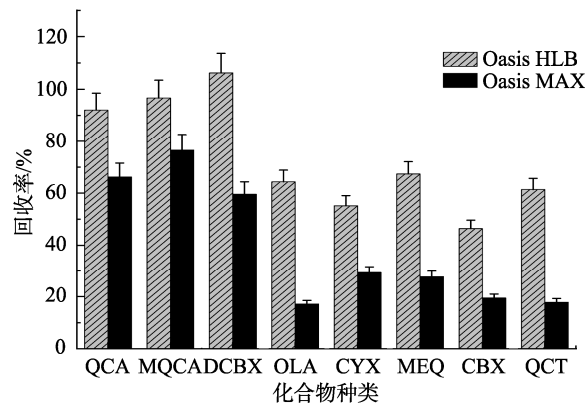


图 4 2 种固相萃取柱对 QELs 回收效率
Fig.4 QELs recovery efficiency of two kinds of SPE columns

QELs 5 种原药使用有机溶剂提取后难以在固相萃取柱有效富集, 回收率偏低, 直接过滤进样又存在杂质多、基质干扰严重等问题。因此本研究选用一种基于介质分散固相萃取的方法, 此方法主要通过多种不同粒径功能化吸

附材料, 将样品中的主要干扰杂质吸附, 有效地去除基质中可能存在的磷脂、脂肪和部分蛋白质等, 同时将被测物质留在样品溶液中, 从而达到净化和富集的目的。该方法快速、简单, 可大大节省样品前处理时间。样品提取液经过离心后移取 5 mL, 通过加入不同种吸附材料净化, 其 10 种吸附材料对 5 种 QELs 原药的回收率见图 5。

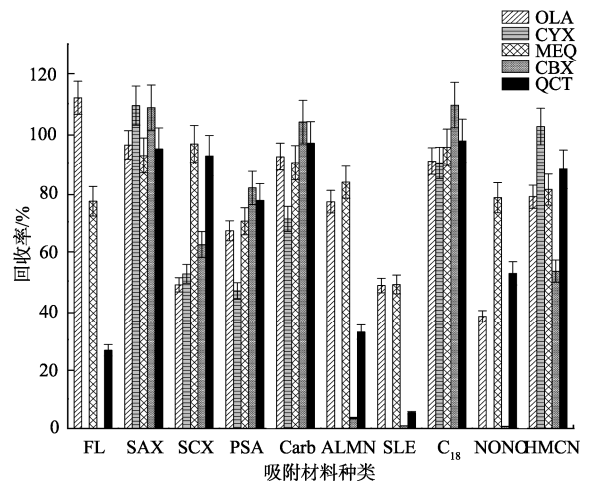


图 5 不同吸附材料对 QELs 回收效率
Fig.5 Recovery efficiency of QELs with different adsorbent materials

由图 5 可知, 提取液经 FL、ALMN、SLE、NONO 净化吸附时, CYX 和 CBX 基质效应明显, 回收率偏低; 5 种原药经过 SAX 和 C₁₈ 分别吸附净化时, 样品溶液颜色清透, C₁₈ 固体吸附剂有效防止了非极性化合物进入色谱柱, C₁₈ 是主要靠非极性碳键相互作用, 有助于对非极性吸附过程的样品的洗脱反相萃取, 主要吸附于磷脂和中等极性的化合物, 对 OLA、CYX、MEQ、CBX 和 QCT 5 种喹噁啉原型药物回收率达到较好的效果。因此初步将 SAX 和 C₁₈ 同比例添加进行净化研究, 但是结果发现对 QCT 的回收率不足 60%, 因此将 SAX 和 C₁₈ 通过不同配比混合来进行吸附净化, 进一步提高回收效率。经过不同比例对样品吸附过后回收效率的考察, 最终确定 SAX 与 C₁₈ 比例为 2:1 时, 回收效率达到最优, 不同比例添加下对各化合物回收效率见图 6。同时考察了吸附材料的使用量, 比较了 5、10、20、50、80、100 mg 不同固体吸附剂加入量对 5 mL 样品提取液中杂质净化效果的影响。结果表明, 当固体吸附材料加入量达 50 mg 时, 继续加大吸附剂的用量对样品杂质的净化效果和回收率无明显改善。因此将吸附材料加入量设定为 50 mg。当加入吸附剂吸附净化后, 可以有效除去基质中的干扰物对待测物色谱峰的影响, 同时减少杂质对仪器和色谱柱的损害。

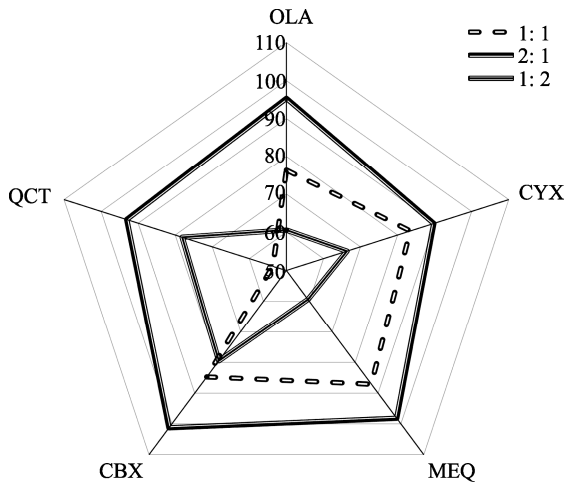


图 6 不同比例吸附材料对各化合物的回收率
Fig.6 Recovery of each compound by different ratios of adsorbent materials

2.4 基质效应

在样品分析中, 基质常对待测物质的分析有明显干扰。本研究用 0.1%甲酸-乙腈(9:1, V:V)溶液配制成一定浓度范围的 8 种化合物混合溶液标准, 同时称取空白鸡肉样品, 按照本方法提取净化, 并对空白样品提取液配制系列同浓度的基质混合标准溶液并绘制标准曲线。以基质标准溶液和溶剂标准溶液的标准曲线斜率比值作为评价基质效应, 比值越接近 1.0 说明基质效应越弱。结果表明喹噁啉类药物在鸡肉样品中受基质干扰效应很弱, 表明采用酸化有机溶剂提取、超声萃取, 同时在采用高分辨质谱的 PRM 模式监测下可以较好地消除鸡肉中基质效应的影响。因此本研究采用基质匹配的标准曲线进行定量, 确保定量结果

的分析可靠, 基质匹配标准曲线及相关系数见表 4。

2.5 线性范围、检出限和定量限

以其和内标物的峰面积之比为纵坐标, 和内标物的浓度之比为横坐标绘制标准曲线; 结果显示, 在相应的线性范围内, 8 种化合物均呈现良好的线性关系。在空白样品中添加不同浓度的待测组分, 前处理后按浓度由高至低检测, 以信噪比 ≥ 3 , 确定方法的检出限为 0.04~0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 以信噪比 ≥ 10 确定方法的定量限为 0.12~0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 8 种化合物的线性方程、相关系数、检出限及定量限如表 4 所示。

2.6 回收率和精密度

精确称取空白鸡肉样品 5 g, 加入 1、10、100 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的混合标准溶液, 将样品在避光条件下静止 2 h, 使其标准溶液被样品充分吸收, 每个添加浓度平行测定 6 次, 按上述优化后的提取方法和仪器条件处理测定。计算各目标 QELs 及其代谢物的添加回收率和相对标准偏差。结果表明, 该方法在低、中、高 3 个添加水平下的回收率达到 76.1%~112.8%(见表 5), 相对标准偏差为 0.3%~11.4%。CBX 回收率较与其他化合物偏低, 可能与药物本身理化性质有关。

2.7 动物实验样品检测

通过以上处理方法对动物实验的样品进行检测, 不同停药期采集的样品中所含的化合物含量如表 6 所示。在停药期第 1 d 鸡肉中 OLA、QCT、MQCA 含量分别达到 1.69、9.79、5.93 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 停药 14 d 时, OLA 与 MQCA 已无检出, 而 QCT 检出量为 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 说明 QCT 在鸡肉中残留代谢较为缓慢, 停药期更长, 其残留代谢规律需要进一步研究。其他药物残留未被检出。

表 4 8 种化合物的线性范围、线性方程、检出限及定量限

Table 4 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantitation (LOQ) of eight kinds of compounds

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{L})$	线性方程	相关系数	LOD/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	LOQ/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
OLA	0.15~200	$Y=19030X-24997$	0.9996	0.05	0.15
QCA	0.6~200	$Y=97511X-103861$	0.9992	0.05	0.15
MQCA	0.3~200	$Y=50292X-17466$	0.9998	0.1	0.3
CYX	1.5~200	$Y=3779.7X-6050.6$	0.9995	0.05	0.15
MEQ	0.3~200	$Y=129802X-50904$	0.9998	0.1	0.3
CBX	0.6~200	$Y=37259X-22927$	0.9997	0.04	0.12
DCBX	0.3~200	$Y=172133X+10978$	0.9992	0.1	0.3
QCT	0.3~200	$Y=42279X-24047$	0.9997	0.1	0.3

表 5 鸡肉样品中 8 种化合物添加回收率及相对标准偏差($n=6$)
Table 5 Recoveries and relative standard deviations of eight compounds in chicken samples ($n=6$)

化合物	1/($\mu\text{g}/\text{kg}$)		10/($\mu\text{g}/\text{kg}$)		100/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
OLA	76.6	5.7	93.0	9.8	82.7	3.1
QCA	108.8	2.2	112.8	5.5	100.9	5.4
MQCA	111.3	11.4	110.8	5.1	102.9	7.3
CYX	88.1	1.9	106.4	3.7	90.6	0.7
MEQ	95.2	10.8	103.1	2.9	100.6	1.8
CBX	84.9	5.3	87.6	3.4	76.1	3.9
DCBX	84.5	4.3	88.1	1.4	86.5	2.7
QCT	94.6	0.3	96.7	5.9	91.1	1.3

表 6 动物实验休药期鸡肉中化合物代谢浓度
Table 6 Metabolic concentration of compounds in chicken during drug withdrawal period in animal experiments

停药期/d	OLA/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	QCT/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	MQCA/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	1.69	9.79	5.93
3	1.54	5.71	2.48
5	1.49	2.50	1.49
7	1.02	1.35	0.79
9	0.17	0.71	0.12
14	ND	0.06	ND
21	ND	ND	ND

3 结论与讨论

本研究利用超高效液相色谱串联四极杆/静电场轨道离子阱高分辨率质谱法,建立了同时测定鸡肉中 5 种 QELs 原药和 3 种代谢物的方法,考察了提取溶剂、固相萃取净化柱、多重基质吸附净化与流动相等关键因素对检测结果的影响。通过 1 mol/L 盐酸与 1% 甲酸乙腈提取,固相萃取柱与多重基质吸附材料净化,利用平行反应监测-增强子离子扫描复合模式同步测定 8 种待测化合物。该方法的检出限为 0.04~0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.12~0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在 10、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平下,8 种化合物在鸡肉中的平均回收率为 76.1%~112.8%,相对标准偏差小于 15%。本方法灵敏度高、检出限低、稳定性好、高效、低成本,能够准确地对样品中的 QELs 进行定量分析,适用于鸡肉中多种 QELs 的检测,可为食品安全提供保障。

参考文献

[1] LIU ZY, SUN ZL. The metabolism of carbadox, olaquinox, mequinox, quinocetone, and cyadox: An overview [J]. *Med Chem*, 2013, 9(8):

1017-1027.

- [2] 曹随忠, 张力, 梁建平, 等. 喹噁啉-1,4-二氧化物类抗菌促生长剂特殊毒理学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2001, 22(2): 17-20.
CAO SZ, ZHANG L, LIANG JP, *et al.* Advances in the special toxicology of quinoxaline-1,4-dioxide antibacterial growth promoters [J]. *Prog Vet Med*, 2001, 22(2): 17-20.
- [3] VICENTE E, VILLAR R, PEREZ-SILANES S, *et al.* Quinoxaline 1,4-Di-N-oxide and the potential for treating tuberculosis [J]. *Infect Disord*, 2011, 11(2): 196-204.
- [4] 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.* HPLC-MS/MS method for the determination of quinoxalene and quinoxalones and their major metabolite residues in aquatic products [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(12): 1535-1541.
- [5] CHEN Q, CHEN YQ, QI YT, *et al.* Characterization of carbadox-induced mutagenesis using a shuttle vector pSP189 in mammalian cells [J]. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2008, 638(1/2): 11-16.
- [6] CHEN Q, TANG SS, JIN X, *et al.* Investigation of the genotoxicity of quinocetone, carbadox and olaquinox *in vitro* using Vero cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(2): 328-334.
- [7] IHSAN A, WANG X, ZHANG W, *et al.* Genotoxicity of quinocetone, cyadox and olaquinox *in vitro* and *in vivo* [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 59C: 207-214.
- [8] IHSAN A, WANG X, TU HG, *et al.* Genotoxicity evaluation of mequinox in different short-term tests [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 51: 330-336.
- [9] 张秀珍, 刘云, 徐英江, 等. 新型喹噁啉类药物在水产养殖中的有效性及安全性研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(1): 38-44.
ZHANG XZ, LIU Y, XU YJ, *et al.* Advances in the effectiveness and safety of new quinoxalines in aquaculture [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(1): 38-44.
- [10] 班曼曼, 张可煜, 江善祥, 等. 喹烯酮和喹乙醇对人源肝细胞的毒性作用[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(11): 1517-1521.
BAN MM, ZHANG KY, JIANG SX, *et al.* Toxic effects of quinolones and quinolines on human-derived hepatocytes [J]. *Chin J Vet Sci*, 2010, 30(11):

- 1517–1521.
- [11] WU CM, LI Y, SHEN JZ, *et al.* LC-MS-MS quantification of four quinoxaline-1,4-dioxides in swine feed [J]. *Chromatographia*, 2009, 70(11/12): 1605–1611.
- [12] Commission Regulation No. 2788/98, Official Journal of the European Communities (1998) [Z].
- [13] Japan. The system of definite list of agricultural chemical residues in food, 2007 [Z].
- [14] LIU ZY, SUN ZL. The metabolism of carbadox, olaquinox, mequinox, quinocetone, and cyadox: an overview [J]. *Med Chem*, 2013, 9(8): 1017–1027.
- [15] 农业部. 中华人民共和国农业部第 2638 号公告: 停止在食品动物中使用唑乙醇、氨基苯砷酸、洛克沙肿等 3 种兽药[M]. 北京: 农业部兽医局, 2018.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement No. 2638: Stop using three veterinary drugs in food animals, including quinol, aminophenylarsonic acid and loxarsine [M]. Beijing: Veterinary Bureau, Ministry of Agriculture, 2018.
- [16] 农业部. 中华人民共和国农业部第 193 号公告: 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[M]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement No.193: List of veterinary drugs and other compounds banned in food animals [M]. Beijing: China Standard Publishing House, 2002.
- [17] 农业部. 中华人民共和国农业部第 1506 号公告[M]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement No. 1506 [M]. Beijing: China Standards Publishing House, 2010.
- [18] PENG D, ZHANG Z, CHEN D, *et al.* Development and validation of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring quinoxaline-2-carboxylic acid in the edible tissues of animals [J]. *Food Addit Contam A*, 2011, 28(11): 1524–1533.
- [19] CHENG L, SHEN J, WANG Z, *et al.* A sensitive and specific ELISA for determining a residue marker of three quinoxaline antibiotics in swine liver [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(8): 2653–2659.
- [20] LE T, ZHU L, YU H. Dual-label quantum dot-based immunoassay for simultaneous determination of carbadox and olaquinox metabolites in animal tissues [J]. *Food Chem*, 2016, (199): 70–74.
- [21] SIN DWM, CHUNG LPK, LAI MMC, *et al.* Determination of quinoxaline-2-carboxylic acid, the major metabolite of carbadox, in porcine liver by isotope dilution gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 508(2): 147–158.
- [22] NASR JJ, SHALAN S, BELAL F. Determination of carbadox and olaquinox residues in chicken muscles, chicken liver, bovine meat, liver and milk by MLC with UV detection: application to baby formulae [J]. *Chromatographia*, 2013, 76(9-10): 523–528.
- [23] WU Y, YU H, WANG Y, *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.
- [24] HUANG L, WANG Y, TAO Y, *et al.* Development of high performance liquid chromatographic methods for the determination of cyadox and its metabolites in plasma and tissues of chicken [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 874(1-2): 7–14.
- [25] 罗成江, 陆春波, 林仙军, 等. 氟喹诺酮类药物粉剂中非法添加四种唑啉类药物的 UPLC 检测方法研究[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(4): 24–29.
LUO CJ, LU CB, LIN XJ, *et al.* Study on the UPLC detection method for the illegal addition of four quinoxalines in fluoroquinolone drug powder [J]. *Chin J Vet Med*, 2015, 49(4): 24–29.
- [26] YAN DD, HE LM, ZHANG GJ, *et al.* Simultaneous determination of cyadox and its metabolites in chicken tissues by LC-MS/MS [J]. *Food Anal Method*, 2012, 5(6): 1497–1505.
- [27] 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唑乙醇代谢物[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 carbachol and quinol metabolites in fish tissues by ultrahigh-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(1): 124–128.
- [28] 欧阳珊, 庞国芳, 谢丽琪, 等. 动物组织中卡巴氧和唑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 carbachol and quinol and related metabolites in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2008, 27(6): 590–594.
- [29] 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唑乙醇代谢物[J]. *分析实验室*, 2010, 29(9): 19–22.
ZHAO DH, LI ZG, YANG JL, *et al.* Determination of residual quinine ethanol metabolites in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2010, 29(9): 19–22.
- [30] YOU Y, SONG L, LI Y, *et al.* Simple and fast extraction-coupled UPLC-MS/MS method for the determination of mequinox and its major metabolites in food animal tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 2016, 64(11): 2394–2404.
- [31] LI Y, LIU K, BEIER RC, *et al.* Simultaneous determination of mequinox, quinocetone, and their major metabolites in chicken and pork by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2014, (160): 171–179.
- [32] 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.
- [33] LÉON R, SWEREDOSKI MJ, ANNIE M. Data-independent acquisition for the orbitrap Q Exactive HF: A tutorial [J]. *J Proteom Res*, 2019, 18(3): 803–813.
- [34] SCHELTEMA RA, HAUSCHILD JP, LANGE O, *et al.* The Q Exactive HF, a benchtop mass spectrometer with a pre-filter, high-performance quadrupole and an ultra-high-field orbitrap analyzer [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2014, 13(12): 3698–708.
- [35] KALLI A, SMITH GT, SWEREDOSKI MJ, *et al.* Evaluation and optimization of mass spectrometric settings during data-dependent acquisition mode: Focus on LTQ-Orbitrap mass analyzers [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(7): 3071–3086.
- [36] 刘芸, 丁涛, 费晓庆, 等. 高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨

- 率质谱检测蜂蜜中的 4-甲基咪唑和 2-甲基咪唑[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(10): 2979–2986.
- LIU Y, DING T, FEI XQ, *et al.* Determination of 4-methylimidazole and 2-methylimidazole in honey by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital hydrazine high resolution mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(10): 2979–2986.
- [37] YAN DD, HE LM, ZHANG GJ, *et al.* Simultaneous determination of cyadox and its metabolites in chicken tissues by LC-MS/MS [J]. *Food Anal Method*, 2012, 5(6): 1497–1505.
- [38] 范立鹏, 段振娟, 方国臻, 等. 动物源性食品中喹啉类药物残留检测方法研究进展[J]. 中国食品学报, 2012, 12(9): 171–178.
- FAN LP, DUAN ZJ, FANG GZ, *et al.* Advances in the detection of quinoxaline residues in foods of animal origin [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2012, 12(9): 171–178.
- [39] 陈俊秀, 张秀清, 李文廷, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定奶酪中喹乙醇及其代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 3171–3176.
- CHEN JX, ZHANG XQ, LI WT, *et al.* Determination of quinol and its metabolites in cheese by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(12): 3171–3176.
- [40] 贝亦江, 王扬, 何丰, 等. 高效液相色谱法测定水产品中喹乙醇代谢物残留量[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 255–258.
- BEI YJ, WANG Y, HE F, *et al.* Determination of quinol residues in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2013, 34(10): 255–258.
- [41] 薛良辰, 彭玉芬, 刘陆, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测 3-甲基-喹啉-2-羧酸的残留[J]. 现代食品科技, 2013, 29(2): 413–415.
- XUE LC, PENG YF, LIU L, *et al.* Rapid determination of 3-methyl-quinoxaline-2-hydroxy acid residues by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 29(2): 413–415.
- [42] 吴玉杰, 陈冬梅, 陶燕飞, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中 3-甲基喹啉-2-羧酸残留量[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4): 427–430.
- WU YJ, CHEN DM, TAO YF, *et al.* Determination of 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid residues in animal tissues by high performance liquid chromatography [J]. *J Anal Sci*, 2009, 25(4): 427–430.
- [43] 刘正才, 杨方, 余孔捷, 等. 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[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 210–214.
- LIU ZC, YANG F, YU KJ, *et al.* Determination of quinine ethanol metabolite residues in foods of animal origin by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2012, 33(12): 210–214.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



宋占腾, 硕士研究生, 主要研究方向为食品加工与质量安全。
E-mail: 18293897471@163.com



索德成, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全及饲料质量与安全标准化研究。
E-mail: suodecheng@caas.cn