超高效液相色谱-串联质谱法快速检测水产品中喹乙醇及其代谢物 3-甲基-喹噁啉-2-羟酸的残留

薛良辰[1,2]，彭玉芬[2]，刘陆[2]，蔡勤仁[2]，冯家望[2]，余以刚[1]
（1. 华南理工大学轻工与食品学院，广东广州 510640）（2. 珠海出入境检验检疫局技术中心，广东珠海 519015）

摘要： 建立了水产品中喹乙醇（OQX）及其代谢物3-甲基-喹噁啉-2-羟酸（MQCA）的超高效液相色谱串联质谱快速测定方法。试样经乙酸乙酯+乙腈（1+1，*V/V*）液液萃取提取和净化后，BEH C_{18} UPLC进行分离，多反应选择离子检测。方法的回收率和变异系数分别在62.5%~91.4%和2.6%~11.8%之间。本方法对水产品中喹乙醇和3-甲基喹噁啉-2-羧酸的检测限均为1.0 μg/kg。

关键词： 超高效液相色谱串联质谱；喹乙醇；3-甲基-喹噁啉-2-羟酸；残留
文章篇号： 1673-9078(2013)2-413-415

Rapid Determination of the Residues of Olaquindox and 3-methylquinoline-2-carboxylic Acid in Aquatic Products by UPLC-MS/MS

XUE Liang-chen[1,2], PENG Yu-fen[2], LIU Lu[2], CAI Qin-ren[2], FENG Jia-wang[2], YU Yi-gang[1]
(1.College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)
(2.Zhuhai Inspection & Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

Abstract: This study presented a ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for fast determination of the residues of olaquindox and 3-methylquinoline-2-carboxylic acid in aquatic products. Resident of olaquindox and 3-methylquinoline-2-carboxylic acid ware extracted by the liquid- liquid method using ethyl acetate+ acetonitrile（1+1, *V/V*）.After BEH C18 LC gradient elution separation,the analytes ware determined under multi-reaction monitoring (MRM) scan type with tandemmass analyzer using positive polarity mode. The recoveries are in the range of 62.5%~91.4%, the relative standard deviation are in the range of 2.6%~11.8%. The limit of detection (LOD) for olaquindox and methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid in aquatic products was 1.0 μg/kg.

Key words: UPLC-MS/MS; aquatic products; olaquindox; methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid; residue

喹乙醇是喹噁啉类兽用抗菌药，具有促进生长、提高饲料效率和广谱抗菌的作用[1]。研究结果表明喹乙醇及其代谢物 3-甲基-喹噁啉-2-羟酸（见图 1~2）会在动物体内产生残留，进而形成对人体的危害，我国也已出台相应的政策、法规及测定标准，禁止其用于食用动物[2~4]。因此为保障食品安全，有必要对喹乙醇及其代谢物的检测方法进行研究。目前，有不少有关喹乙醇的高效液相色谱-串联质谱法检测方法的研究报道[5~6]，但未见利用超高效液相色谱串联质谱快速检测喹乙醇及其代谢物的研究报道，本研究建立了水产品中喹乙醇及其代谢物的快速检测方法，该方法快速准确、灵敏度高，非常适合水产品中喹乙醇及其代谢物的快速确证分析。

收稿日期：2012-10-17

作者简介：薛良辰，（1982-），硕士研究生，研究方向：食品安全检测
通信作者：余以刚，（1968-），研究方向：食品安全检测

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

喹乙醇，含量99.0%，德国 Dr.Ehrenstorfera公司；3-甲基喹噁啉-2-羧酸，含量94.0%，德国Dr.Ehrenstorfera公司。乙酸铵、盐酸、甲酸、乙腈、甲醇、乙酸乙酯均为色谱纯，三氯乙酸、正己烷、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠为分析纯。

1.2 仪器与设备

Waters UPLC超高效液相色谱仪、API 4000Q trap三级四级质谱仪；Zymark TurboVap® LV浓缩站；IKA MS 3 basic微型混合器；水浴恒温振荡器等实验室常用设备。

1.3 样品前处理

1.3.1 喹乙醇提取

准确称取均质后的试样5 g，精确到0.01 g，置于50 mL聚丙烯离心管中，加入5 g中性氧化铝和20 mL乙酸乙酯+乙腈（1+1，*V*/*V*）混合溶液，振荡提取15 min后5000 r/min离心5 min，取上清液转入另一支50 mL离心管中，样品重复提取一次，合并提取液，加入10 mL正己烷，振荡5 min，5000 r/min离心5 min。取下层清液于45 ℃吹氮浓缩至近干，用1 mL流动相溶解残渣，过0.22 μm微孔滤膜，待测。

1.3.2 代谢产物MQCA的提取

准确称取2 g试样，精确到0.01 g，置于50 mL离心管中，加入15 mL乙酸乙酯，旋涡混匀，振荡15 min，4000 r/min离心5 min，取上清液转入另一支50 mL离心管中，再用15 mL乙酸乙酯提取一次，合并上清液于同一离心管中。往样品残渣中加入0.1 mol/L磷酸盐缓冲液10mL，旋涡混匀，振荡15 min，8000 r/min离心10 min，取上清液合并到离心管中，振荡15 min，6000 r/min离心5 min，取下层溶液至50 mL具塞离心管中。加入盐酸200 μL，混匀，再加入乙酸乙酯8 mL，振荡15 min，8000 r/min离心10 min，上层溶液转入玻璃试管中，再用8 mL乙酸乙酯重复提取一次，合并上层溶液于同一玻璃试管，55 ℃吹氮浓缩至干，用1 mL流动相溶解残渣，过0.22 μm微孔滤膜，待测。

1.4 测定

1.4.1 色谱条件

色谱柱：UPLC ACQUITY BEH C_{18} 2.1×100 mm，1.7 μm，流动相：溶剂A是含0.1%甲酸的5 mmol/L乙酸铵溶液，溶剂B为乙腈，梯度洗脱，在0至3 min内溶剂A体积分数从90%线性减少到40%，在3至4 min内溶剂A体积分数从40%线性增加到90%然后保持1 min，流速0.3 mL/min，柱温30 ℃，进样量10 μL。

1.4.2 质谱条件

表1 喹乙醇及代谢物质谱条件参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for OQX and MQCA

测定物质	母离子/(m/z)	特征碎片离子/(m/z0	碰撞能量/eV	去簇电压/eV
喹乙醇	264.2	143.1*	45	70
		246.2	19	70
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	189.2	143*	23	35
		145.1	20	45

注：其中*标注的特征碎片离子是用来进行定量分析的离子。

离子源：电喷雾离子源（ESI）；扫描方式：正离子扫描；检测方式：多反应选择离子检测；电喷雾电压：5500 V；雾化气：60 MPa，气帘气：20 MPa，辅助加热气：70 MPa；碰撞气：Medium，四种气体均为氮气；离子源温度：550 ℃；碰撞能量、去簇电压见表1。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

将1 μg/mL标准溶液用蠕动泵以5 μL/min的流速连续注射入质谱仪，在正离子模式下先进行一级质谱分析（Q1扫描），得到准分子离子峰（M+1）即m/z 264.2、m/z 189.2，优化去簇电压。对m/z 264.2、m/z 189.2进行二级质谱分析，得到碎片离子信息，优化碰撞电压，然后对离子源温度、雾化气、气帘气等进行优化。再以多反应监测（MRM）正离子模式优化去簇电压、碰撞电压、碰撞室入口及出口电压等质谱参。分别选择丰度较强的2个子离子为特征离子，以母离子与子离子组成监测离子对，进行定性和定量分析。

2.2 色谱条件的优化

对色谱柱的选择，比较了BEH C_{18} 2.1×100 mm、1.7 μm与XDB-C_{18} 2.1×100 mm、3.5 μm。用BEH C_{18} 2.1×100 mm、1.7 μm分离，各组分的出峰时间、分离度和峰形较好，且耐受性更好。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，加强离子化效率，从而提高检测的灵敏度。本研究比较了乙腈或甲醇与0.1%的甲酸溶液、5 mmol/L乙酸铵溶液、5 mmol/L乙酸铵（含有0.1%甲酸）组成的多种组合的流动相，结果表明，使用5 mmol/L乙酸铵（含有0.1%甲酸）和乙腈作为流动相时，各组分得到良好的分离，并且可以有效改善峰形；同时可以提高质谱的离子化效率，从而提高检测的灵敏度，使其有较强的响应。因此，实验选择5 mmol/L乙酸铵（含有0.1%甲酸）溶液和乙腈作为流动相。

2.3 样品前处理条件的选择

液液萃取是一种比较经典的净化方法，它是利用待测组分与样品杂质在两相中的溶解性差异来净化样品的。样品提取过程中不可避免的会携带许多与待测组分溶解性相似的杂质一并转移出来。这些微量的杂质会干扰光谱检测、增加基线噪声、降低柱效、堵塞色谱管路、污染色谱柱和检测器。根据药物的理化性质，通过液液萃取将待测组分与杂质进行分离，通过这样的一些过程使样品达到净化的效果，便于检测。本研究喹乙醇的残留用乙酸乙酯-乙腈作为提取剂，因为喹噁啉类药物在甲醇、乙醇和氯仿中几乎不溶。3-甲基喹噁啉-2-羧酸的提取，本实验比较了蛋白酶在47 ℃空气浴中酶解16~18 h，Oasis MAX柱净化和乙酸

乙酯和磷酸盐缓冲液在不同的pH的条件下液液萃取，结果表明，乙酸乙酯和磷酸盐缓冲液在不同的pH的条件下液液萃取基质干扰少、回收率高，前处理相对简单。

2.4 方法的定量限、回收率、重复性及线性范围

在以上确定的测定条件下,配制标准系列(n=6)，分析化合物的浓度比为X轴，以分析化合物的峰面积比为Y轴绘制标准曲线。结果表明，喹乙醇和3-甲基喹噁啉-2-羧酸浓度在1~100 μg/L范围内时，线性关系良好，其相关系数和回归方程见表2。

表2 喹乙醇及3-甲基喹噁啉-2-羧酸的标准曲线和线性范围

Table 2 The standard curve and linear range for OQX and MQCA

药物	线性范围(μg/L)	标准曲线	相关系数
喹乙醇	1~100	y=8330x+4970	0.9996
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	1~100	y=2490x-1410	0.9999

在空白样品中添加喹乙醇和3-甲基喹噁啉-2-羧酸标准溶液，进行3个水平浓度添加回收试验，每个浓度做6个重复。

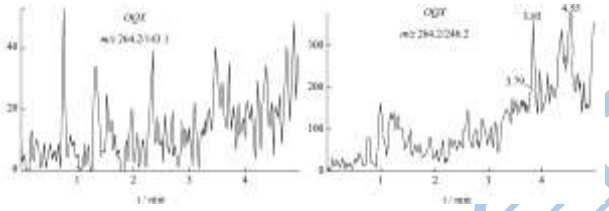


图 1 空白肌肉 MRM 色谱图

Fig.1 Extracted product ion spectrum of a blank sample

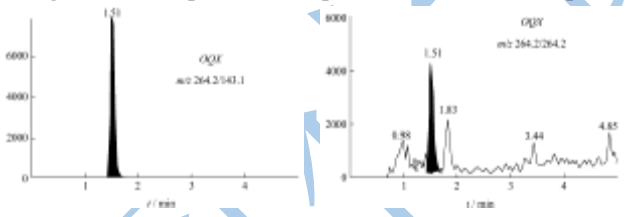


图 2 空白鱼肉加标 1.0 μg/kg 喹乙醇 MRM 色谱图

Fig.2 Extracted product ion spectrum of a spiked fish muscle sample containing OQX at 1.0 μg/kg

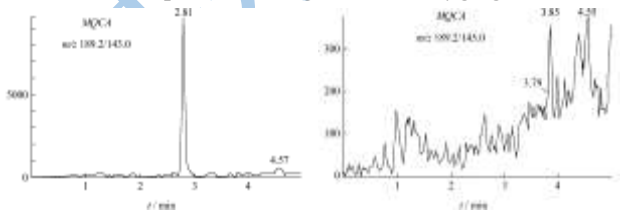


图 3 空白鱼肉 MRM 色谱图

Fig.3 Extracted product ion spectrum of a blank sample

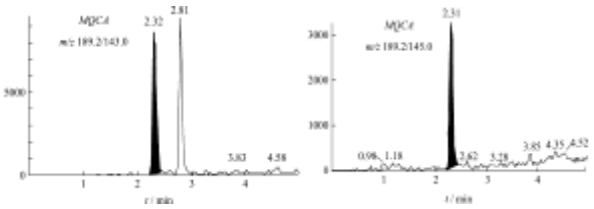


图 4 空白鱼肉加标 1.0 μg/kg 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 MRM 色谱图

Fig.4 Extracted product ion spectrum of a spiked fish muscle sample containing MQCA at a Concentra -tion of 1.0 μg/kg

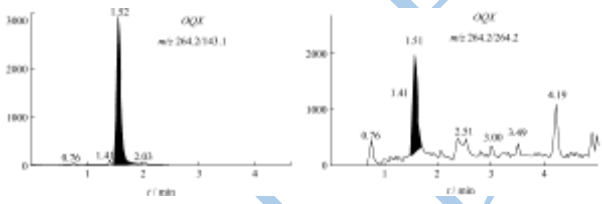


图 5 喹乙醇阳性样品重构离子色谱图

Fig.5 Reconstituted ion chromatogram of the the doubtful positive sample

在本方法所确定的实验条件下，回收率和变异系数分别在62.5%~91.4%、2.6%~11.8%之间。本方法对水产品中喹乙醇和3-甲基喹噁啉-2-羧酸的定量限均为1.0 μg/kg。

3 结论

水产品中喹乙醇及其代谢物3-甲基-喹噁啉-2-羟酸可利用超高效液相色谱串联质谱进行快速测定，该方法非常适合水产品中喹乙醇及其代谢物的快速定量定性分析，在1.0~10 μg/kg的添加水平范围内的平均回收率为62.5%~91.4%；相对标准偏差为2.6%~11.8%；方法检测限等指标满足国内外检测的相关要求。

参考文献

[1] 耿毅，汪开毓.鲤鱼喹乙醇亚急性中毒的病理学研究[J].水利渔业,2002,22(1):44-46

[2] 中华人民共和国农业部公告第 235 号.动物性食品中兽药最高残留限量[S],2002

[3] GB/T 20746-2006 中华人民共和国国标,牛、猪的肝脏和肌肉中卡巴氧和喹乙醇及代谢物残留量的测定.液相色谱-串联质谱法[S]

[4] NY 5071-2002 无公害食品渔用工物使用准则[S]

[5] 农牧发[2001]38 号.动物源食品中兽药残留检测方法[S]

[6] 林黎,谢丽琪,欧阳姗,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].分析试验室,2010,29(2):38-41