

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

欧阳珊¹, 庞国芳², 谢丽琪¹, 蓝芳¹, 林黎¹, 涂小珂¹

(1. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518067; 2. 秦皇岛出入境检验检疫局, 河北 秦皇岛 066002)

摘要:建立了牛、猪肌肉和肝脏组织中卡巴氧 (CBX) 和喹乙醇 (OQX) 以及相关代谢产物——脱氧卡巴氧 (DCBX)、喹噁啉-2-羧酸 (QCA) 和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (MQCA) 残留的 LC-MS/MS 的检测方法。组织样品中的卡巴氧用乙腈-乙酸乙酯 (体积比 1:1) 溶液提取; 代谢产物的提取则是经适当处理后的样品加入 Protease 蛋白酶进行酶解, 后采用阴离子交换固相萃取柱 Oasis MAX 进行净化和富集。分析样品以甲酸溶液 (体积分数为 0.1%) - 甲醇-乙腈为流动相, 经 Inertsil ODS-3 色谱柱分离, 在 LC-MS/MS 多反应监测模式下进行定性、定量分析, 采用正离子扫描。CBX、DCBX、QCA 和 MQCA 的定量下限均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。猪、牛肌肉和肝脏在 0.5~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平的平均回收率在 76%~97% 之间, 相对标准偏差 ($n=10$) 在 2.9%~16.9% 之间。
关键词:卡巴氧; 喹乙醇; 代谢产物; 脱氧卡巴氧; 喹噁啉-2-羧酸; 3-甲基喹噁啉-2-羧酸; 残留分析; 液相色谱-质谱

中图分类号: O657.63; S482.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2008)06-0590-05

Determination of the Residues of Carbadox, Olaquinox and Related Metabolites in Bovine and Porcine Muscle and Liver Tissues by LC-MS/MS

OUYANG Shan¹, PANG Guo-fang², XIE Li-qi¹, LAN Fang¹, LIN Li¹, TU Xiao-ke¹

(1. Shenzhen Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518067, China; 2. Qinghuangdao Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qinghuangdao 066002, China)

Abstract A liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS/MS) method was developed for the simultaneous identification and determination of residues of carbadox (CBX), olaquinox and related metabolites, desoxycarbadox (DCBX), quinoxaline-2-carboxylic acid (QCA) and 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA) in bovine and porcine muscle and liver tissues. CBX was extracted by acetonitrile-ethyl acetate (1:1, by volume). As for the extraction of DCBX, QCA and MQCA, homogenized liver or muscle tissue was first digested with 0.6% formic acid to deactivate naturally-occurring enzymes. After overnight enzymatic hydrolysis with protease, the tissue extract was acidified, centrifuged and filtered. DCBX, QCA and MQCA were recovered from the tissue extract using an Oasis MAX solid phase extraction (SPE) cartridge. The analytes were separated on an Inertsil ODS-3 LC column, and determined qualitatively and quantitatively under multi-reaction monitoring (MRM) scan type with tandem mass analyzer using positive polarity mode. The limits of quantitation (LOQ) for the four analytes in bovine and porcine muscle and liver tissues were 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. At the spiked level in the range of 0.5 - 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the mean recoveries were in the range of 76% - 97%, the relative standard deviation were in the range of 2.9% - 16.9%.

Key words: carbadox; olaquinox; metabolites; desoxycarbadox (DCBX); quinoxaline-2-carboxylic acid (QCA); 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA); multi-residue analysis; LC-MS/MS

卡巴氧 (carbadox) 和喹乙醇 (olaquinox) 同属喹噁啉类化合物, 该类药物具有抑菌作用, 添加在饲料中可提高禽畜的消化能力和免疫力, 促进其生长发育。根据 JECFA 报告中对卡巴氧和喹乙醇的风险评估, 不仅二者本身具有潜在的致畸变、致癌作用, 其代谢物也可能带来健康风险^[1-2]。因此许多国

收稿日期: 2007-08-02; 修回日期: 2007-10-08

基金项目: 国家标准编制资助项目 (20051858-T-326)

第一作者: 欧阳珊 (1978-), 湖南邵阳人, 女, 工程师, 硕士, Tel: 0755-26816888-2081, E-mail: oyshan@163.com

家将卡巴氧和喹乙醇列为对食用动物禁用或限用的药物, 由于二者的原药在动物组织内代谢迅速 (代谢途径见图 1), 而相应的代谢产物喹噁啉-2-羧酸 (QCA) 和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (MQCA) 则相对稳定, 因此通常将这 2 个代谢产物作为残留分析和监控的目标物。检测 QCA 的方法有液相色谱法^[3]、气质联用法^[4], 但这些方法的灵敏度满足不了日益严格的残留限量要求, 近年来液相色谱 - 串联质谱联用技术 (LC-MS/MS) 得到普遍应用^[5-6], 检测灵敏度和准确性有了进一步的提高。本研究在参考前人成果的基础上进行改进, 增加了检测品种, 优化了样品前处理步骤, 建立了卡巴氧 (原形药)、脱氧卡巴氧 (DCBX)、QCA 和 MQCA 等多残留同时检测的 LC-MS/MS 方法, 该方法灵敏度高、选择性好, 为更全面、严格监控这类药物的使用和残留情况提供了依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

固相萃取装置 (美国 Agilent 公司)。液相色谱 - 质谱联用仪, 包括 Agilent 1100 液相色谱系统 (美国 Agilent 公司), 以及 API 3000 三级四极杆串联质谱仪 (美国 ABI 公司), Milli-Q 去离子水发生器 (美国 Millipore 公司)。

除液相色谱流动相所用的甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯外, 实验所用的其他试剂均为分析纯, 实验用水为去离子水。Protease 蛋白酶 (P5147, -18 °C 以下保存)、Tris 碱 (T1503) 均为美国 Sigma 公司产品。卡巴氧 (CBX, Sigma 公司)、脱氧卡巴氧 (DCBX, RMM 公司)、喹噁啉-2-羧酸 (QCA, Sigma 公司)、3-甲基喹噁啉-2-羧酸 (MQCA, CSS 公司)、喹噁啉-2-羧酸-d4 (QCA-d4, RMM 公司) 标准品, 纯度皆不低于 99%。分别准确称取适量标准品, 卡巴氧用二甲基甲酰胺溶解定容, 其余标准品用甲醇溶解定容, 配成 100 mg/L 的标准储备液, 在 -18 °C 保存。阴离子交换柱: Oasis MAX 60 mg, 3 mL, 用前分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化, 保持柱体湿润。

1.2 样品前处理

1.2.1 制 样 将牛、猪肝脏和肌肉组织样品充分搅碎, 取 0.5 kg 作为试样, 置于清洁样品容器中, 密封, 将制备好的试样于 -18 °C 以下保存。

1.2.2 样品中卡巴氧的提取 称取 5 g 组织样品 (精确至 0.01 g) 于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 5 g 中性氧化铝 (45~75 μm), 加入 25 mL 乙腈 - 乙酸乙酯 (体积比 1 : 1) 的混合溶液, 充分振荡混合 5 min, 以 5 000 r/min 离心 5 min, 将上清液移至另一干净的 50 mL 离心管, 加入 10 mL 正己烷, 振荡 2 min, 以 5 000 r/min 离心 5 min, 弃去上层正己烷, 将下层清液转移至 150 mL 鸡心瓶中。重复提取 1 次, 合并 2 次提取液于同一鸡心瓶中, 加入一定量的 QCA-d4 标准溶液, 使其相对于组织样品的含量为 2.0 ng/g, 在 40 °C 水浴中减压旋转蒸发至干。准确加入 1.0 mL 0.1% (体积分数) 甲酸 - 甲醇 (体积比 95 : 5) 溶液溶解残渣, 过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定, 内标法定量。

1.2.3 样品中 DCBX、QCA 和 MQCA 的提取 称取 5 g 组织样品 (精确至 0.01 g) 于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 0.6% (体积分数) 甲酸溶液, 混匀后, 置于 (47 ± 3) °C 空气浴恒温摇床中振摇 1 h; 然后加入 3 mL 1.0 mol/L Tris, 溶液混匀, 再加入 0.3 mL 10 g/L 蛋白酶溶液, 充分混匀后, 置于 (47 ± 3) °C 空气浴摇床中酶解 16~18 h。在酶解后的样品溶液中加入 20 mL 0.3 mol/L HCl, 振荡混匀, 以 5 000 r/min 离心 15 min, 将上清液过滤, 滤液移入 Oasis MAX 固相萃取柱中, 待样液全部流出后, 用 30 mL 乙酸钠溶液 (0.05 mol/L, pH 7.0) - 甲醇 (体积比 9 : 1) 溶液淋洗固相萃取柱, 待溶液全部流出后, 真空抽干 5 min。在一支干净的玻璃管内加入一定量的 QCA-d4 标准溶液, 使其相对于组织样品的含量为 2.0 ng/g, 用 4 × 3 mL 二氯甲烷将 DCBX 洗脱至管内, 在 45 °C 用氮气浓缩仪吹至近干。固相萃取柱依次用 3 × 3 mL 甲醇、3 mL 水、3 × 3 mL 0.1 mol/L 盐酸和 2 × 3 mL 甲醇 - 水 (体积比 1 : 4) 溶液淋洗, 然后真空抽干 5 min, 再用 2 mL 乙酸乙酯淋洗固相萃取柱, 最后用 3 mL 含 2% (体积分数, 下

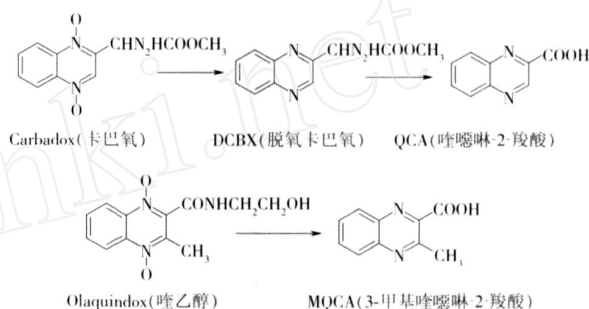


图 1 卡巴氧和喹乙醇在动物体内的代谢产物

Fig. 1 Metabolites of carbadox and olaquinox in animal tissues

同)甲酸的乙酸乙酯洗脱 QCA和 MQCA到上述同一玻璃管中,在 45 °C用氮气浓缩仪吹干。准确加入 1.0 mL 0.1%甲酸 - 甲醇 (体积比 95 :5)溶液溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,供液相色谱 - 串联质谱仪测定,内标法定量。

1.3 分析方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Inertsil ODS-3, 3 μm, 100 mm × 2.1 mm (i.d.); 流动相: 甲醇、乙腈以及 0.1%甲酸溶液, 梯度洗脱条件见表 1; 流速: 0.2 mL /min; 柱温: 30 °C; 进样量: 30 μL。

1.3.2 质谱参数 电喷雾离子源; 正离子扫描方式; 多反应监测; 单位分辨率; 电喷雾电压: 5 000 V; 雾化气流速: 8.0 L /min; 气帘气流速: 7.0 L /min; 辅助气流速: 5.0 L /min; 离子源温度: 450 °C; 定性离子对、定量离子对及其他质谱参数见表 2。

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Conditions of gradient elution

Time t/min	Methanol Φ/%	Acetonitrile Φ/%	0.1% Formic acid Φ/%
0	13	7	80
10.0	45	15	40
10.1	64	16	20
13.1	13	7	80
20.0	13	7	80

表 2 各分析物的质谱参数

Table 2 MS/MS parameters for targeted compounds

Compound	Qualitative ion pair m/z	Quantitative ion pair m/z	DP(去集簇电压) U/V	FP(聚焦电压) U/V	CE(碰撞电压) U/V	CXP(碰撞池出口电压) U/V
CBX	263.2/90.1	263.2/231.1	31	120	49	8
	263.2/231.1		31	120	19	18
QCA	175.0/129.2	175.0/131.2	26	120	23	12
	175.0/131.2		26	120	21	12
DCBX	231.2/143.2	231.2/143.2	26	140	49	8
	231.2/99.2		31	150	31	10
MQCA	189.2/143.1	189.2/145.1	26	120	23	12
	189.2/145.1		26	120	21	12
QCA-d4	179.2/133.2	179.2/133.2	26	130	29	10
	179.2/135.1		26	130	23	10

2 结果与讨论

2.1 样品处理方法的建立

2.1.1 卡巴氧原形药的提取方法 CBX在水和丙酮等极性溶剂中溶解性差,而用甲醇 - 水混合溶剂提取组织样品时,提取液中含有大量水溶性蛋白和色素等杂质,严重影响定性定量效果,同时污染色谱柱。为提高选择性,实验采用乙酸乙酯、乙腈以及二者混合液进行样品提取,结果表明,以乙腈作为提取液回收率较低(40%~50%);而采用乙酸乙酯 - 乙腈(体积比 1 :1)混合溶剂的提取效果最佳。为此,本研究采用乙酸乙酯 - 乙腈(体积比 1 :1)混合溶剂为提取液,且在提取前加入中性氧化铝于样品中,提取过程用正己烷脱脂,以减少脂肪的干扰。

2.1.2 代谢产物 DCBX、QCA 和 MQCA 的提取方法 DCBX、QCA 和 MQCA 等代谢物在动物体内与蛋白质以结合态存在,通常可采用酸水解、碱水解或酶解的方式将目标化合物与蛋白组织分离,其中酶解的效果最好,不仅反应条件最温和,且与动物组织分离最为彻底。温度和 pH 值对酶的生物活性影响很大,本实验方法选用 Protease 蛋白酶进行酶解,Protease 在 pH 8.5、47 °C 时活性最强。酶解之前,先在样品中加 0.6% (体积分数)的甲酸溶液,置于 47 °C 空气浴中 1 h,使动物组织中天然存在的酶失活;然后用 Tris 缓冲溶液调节 pH 值,加入 Protease 蛋白酶,置于 47 °C 空气浴中过夜(16~18 h)。

在样品溶液中加入 0.3 mol/L HCl,使酶解液酸化后,采用阴离子交换固相萃取柱进行净化,本研究对比了 Bond Elute Certify II 和 OasisMAX 2 种 SPE 柱的效果,结果表明 OasisMAX 的净化效果和回收率优于前者,由于化合物性质的差异,DCBX、QCA 和 MQCA 需要分 2 步洗脱,先用二氯甲烷洗脱 DCBX,再用含 2% (体积分数)甲酸的乙酸乙酯洗脱 QCA 和 MQCA。

2.2 液相色谱 - 质谱联用分析方法的建立

2.2.1 质谱条件 动物组织的成分复杂,样品基质容易对目标分析物产生干扰,本研究采用电喷雾

离子源 (ESI)和正离子扫描方式进行 LC - MS/MS检测, 多反应监测模式 (MRM)能有效地消除样品基质的干扰, 大大提高方法的灵敏度。为了消除样品基质对离子化的抑制作用, 在标准溶液和测试样品溶液中都加入已知量的内标 QCA -d4。选取丰度最强的离子作为各组分的监测离子, 通过对质谱条件进行优化, 使每种化合物的分子离子与特征碎片离子的离子对强度达到最大, 确定的质谱条件如“1.3.2”节和表 2所述。

2.2.2 液相色谱条件 对色谱柱的选择, 比较了 Phenomenex Luna C₁₈、Waters Atlantis dC₁₈以及 Inertsil ODS-3 等不同填料色谱柱的分离效果, 结果表明, 使用 Inertsil ODS-3 3 μm, 2.1 mm ×100 mm 色谱柱时, 各化合物的出峰时间、分离度和峰形较好。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, 本实验比较了 0.05%~0.3% (体积分数)的甲酸溶液, 结果表明, 使用 0.1% (体积分数)的甲酸溶液作为流动相时各组分得到良好的分离, 并且质谱上有较强的响应, 故实验选择 0.1% (体积分数)的甲酸溶液作为流动相。另外, 流动相体系还包括甲醇和乙腈, 采用梯度洗脱, 时间梯度见表 1。用“1.3.1”节所述条件得到的总离子流图如图 2A所示。

2.3 方法的线性范围与定量下限

在上述确定的检测条件下, 取一系列标准溶液 (n=8)进行分析, 以分析物和内标物的峰面积比为纵坐标, 以分析物和内标物的浓度比为横坐标作标准工作曲线, 结果表明, 线性关系良好 (如表 3所示)。

通过对不含目标分析物的猪肉、牛肉、猪肝、牛肝样品进行添加回收实验, 以 S/N = 10确定本方法对上述各种动物组织中 CBX、QCA、DCBX、MQCA的定量下限均为 0.5 μg/kg。

2.4 方法的回收率与精密度

以不含 CBX、DCBX、QCA 和 MQCA 的猪肉、猪肝、牛肉、牛肝为添加基质, 分别添加 0.5、1.0、2.0、5.0 μg/kg浓度水平, 每个浓度进行 10 次试验, 测得本方法的平均回收率在 76%~97%之间, 相对标准偏差 (n = 10)在 2.9%~16.9%之间。添加样品的总离子流图如图 2B、2C所示。

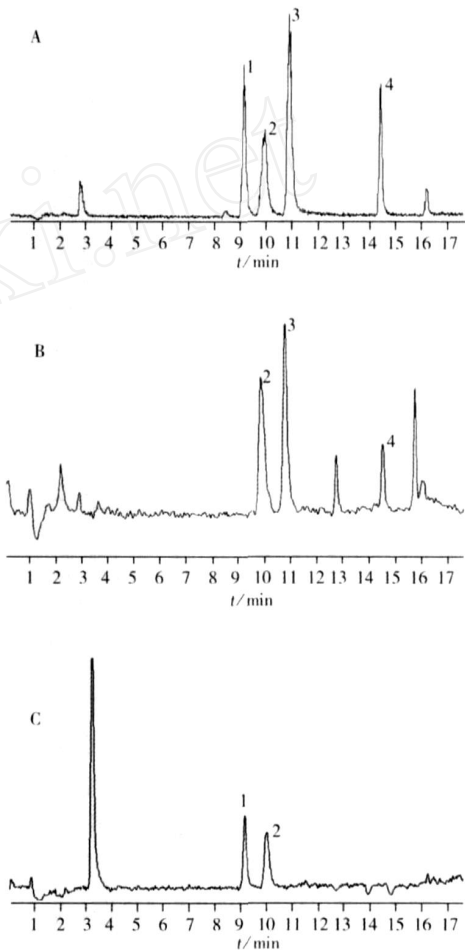


图 2 标准样品 (A)、添加 QCA、MQCA 和 DCBX 的猪肉样品 (B)及添加 CBX 的猪肉样品 (C)总离子流图
Fig. 2 The total ion chromatograms of standards (A), pork spiked with QCA, MQCA and DCBX (B) and pork spiked with CBX (C)
1. CBX: 9.11 min; 2. QCA: 9.95 min; 3. MQCA: 10.97 min; 4. DCBX: 14.43 min

表 3 各分析物浓度与峰面积的线性关系
Table 3 The linearly correlation relationship between concentration and peak area

Compound	L inear range ρ/(μg · L ⁻¹)	L inear equation	Correlation coefficient r
CBX	0.5~30	Y = 0.357 X - 0.092 6	0.999 9
QCA	0.5~30	Y = 0.119 X + 0.032 4	0.999 7
DCBX	0.5~30	Y = 0.191 X - 0.095 6	0.999 9
MQCA	0.5~30	Y = 0.546 X - 0.196	0.999 8

参考文献:

- [1] World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food[S]. WHO Food Additives Series 27, Geneva, 1991.
- [2] World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food [S]. WHO Food Additives Series 33, Geneva, 1994.
- [3] 邱银生, 袁宗辉, 殷居易. 猪食用组织中喹噁啉-2-羧酸的高效液相色谱检测方法[J]. 中国兽医学报, 2003, 23: 286 - 288.
- [4] SN D W M S, CHUNG L P K, LA IM M C, 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 Chem Acta, 2004, 508: 147 - 158.
- [5] HUTCHINSON M J, YOUNG P B, KENNEDY D G. Confirmation of carbadox and olaquinox metabolites in porcine liver using liquid chromatography - electrospray, tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr. B, 2005, 816: 15 - 20.
- [6] MAO Xiusheng, MARCH R E, METCALFE C D. A tandem mass spectrometric study of the N-oxides, quinoline N-oxide, carbadox, and olaquinox, carried out at high mass accuracy using electrospray ionization[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2003, 230: 123 - 133.

第十届中国科协年会第九分会场: 节能减排与公共安全学术研讨会征文通知

由中国科协和河南省人民政府联合主办的第十届中国科协年会, 将于 2008 年 9 月 17 - 19 日在郑州市召开, 主题为“科学发展与社会责任”。本届年会围绕学科发展中学术前沿、交叉问题, 设立 37 个分会场。

中国仪器仪表学会承办第九分会场: 节能减排与公共安全学术研讨会, 本次研讨会以促进测量控制与仪器仪表在国家节能减排、公共安全建设中发挥更大的作用, 推进测量控制与仪器仪表技术的创新、开发和应用为宗旨, 会议面向全国科研、生产单位及各大院校征集论文, 论文要求为未曾发表的 2005~2008 年完成的学术成果。

征文内容:

- (1) 能源计量管理设备及技术的研究、开发与应用;
- (2) 食品安全检测设备及技术的研究、开发与应用;
- (3) 药品安全检测设备及技术的研究、开发与应用;
- (4) 环境监测设备及技术的研究、开发与应用;
- (5) 玩具安全检测设备及技术的研究、开发与应用。

经审稿录用的论文将刊登在本次会议的《论文集》上(本论文集将向有关论文收藏机构和检索机构推荐)。并将推荐到《仪器仪表学报(增刊)》上发表。

征文截止时间为 2008 年 7 月 1 日, 电子版和打印稿(A4)各一份。

投稿邮箱: (100088)北京市海淀区知春路 6 号锦秋国际大厦 A2304

联系人: 燕泽程 张 莉

联系电话: 010 - 82800721 82800752

传 真: 010 - 82800485

电子信箱: yzc@cis.org.cn zhangli@cis.org.cn

中国仪器仪表学会
2008 年 3 月 5 日