

doi: 10.12131/20180278

## 超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼粉中喹噁啉类药物及其 主要代谢物的残留量

江永远<sup>1,2</sup>, 王 强<sup>2</sup>, 李来好<sup>2</sup>, 王旭峰<sup>2</sup>, 赵东豪<sup>2</sup>, 蔡 楠<sup>2</sup>, 关婉琪<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江 舟山 316022; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广东 广州 510300)

**摘要:** 文章建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时检测鱼粉中 5 种喹噁啉类药物及其 2 种主要代谢物残留量的方法。样品经乙腈-乙酸乙酯 (1 : 1,  $V : V$ ) 和 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸分步提取, 盐酸提取液进一步用乙酸乙酯反萃取, 有机相经浓缩后, 均用乙腈复溶, 用 PRiME HLB 通过性固相萃取柱净化处理。样品以乙腈和 0.1% 甲酸水溶液为流动相, 经 Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> 柱梯度洗脱分离, 质谱采取正离子多反应监测模式进行检测。代谢物采用内标法定量, 原药采用基质匹配外标法定量。结果表明, 7 种化合物在对应的浓度范围内线性关系良好 ( $R \geq 0.994$ ), 2 种代谢产物检测限为 2  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 定量限为 5  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 5 种喹噁啉类药物检测限为 1~10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 定量限为 2~20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。在高、中、低 3 种添加浓度下 7 种化合物的平均回收率为 64.4%~102.2%, 相对标准偏差为 3.2%~10.2%。方法灵敏度高、精密度好, 能同时测定鱼粉中的喹噁啉类药物及其主要代谢物。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 喹噁啉类药物; 代谢物; 鱼粉; 残留检测

中图分类号: TS 254.7

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2019)03-0014-08

## Determination of quinoxalines and their major metabolites residues in fishmeal by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

JIANG Yongyuan<sup>1,2</sup>, WANG Qiang<sup>2</sup>, LI Laihao<sup>2</sup>, WANG Xufeng<sup>2</sup>, ZHAO Donghao<sup>2</sup>, CAI Nan<sup>2</sup>, GUAN Wanqi<sup>2</sup>

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** A sensitive and reliable ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was established for the determination of olaquinox (OLA), carbadox (CBX), cyadox (CYA), quinocetone (QCT), mequinox (MEQ) and their main metabolites (QCA and MQCA) in fishmeal. The samples were extracted by acetonitrile-ethyl acetate mixture (1 : 1,  $V : V$ ) and hydrochloric acid solution (1 mol·L<sup>-1</sup>), then the analyte which dissolved in the aqueous phase was re-extracted by ethyl acetate. The extraction was concentrated and reconstituted with acetonitrile. After purification with the Oasis PRiME HLB SPE cartridge, the sample was subjected to the following analytical procedure. The mobile phase containing acetonitrile and 0.1% formic acid solution with a linear gradient elution was utilized to separate all compounds on a Phenomenex Kinetex

收稿日期: 2018-12-13; 修回日期: 2019-01-14

资助项目: 广东省水产品质量安全专项 (GDSCZA2015008); 国家自然科学基金项目 (31571869)

作者简介: 江永远 (1993—), 男, 硕士研究生, 从事食品质量安全研究。E-mail: 852830802@qq.com

通信作者: 李来好 (1963—), 男, 博士, 研究员, 从事水产品加工与质量安全研究。E-mail: laihao@163.com

C<sub>18</sub> column. The quantitative analysis of metabolites was carried out with an internal standard method and the others with an external standard method in the multiple reaction monitoring mode using positive electrospray ionization. The calibration curves for all compounds were linear ( $R \geq 0.994$ ) within their corresponding concentration range. The recoveries were 64.4%–102.2% at different spiking levels with RSDs of 3.2%–10.2%. The limits of detection and quantification of MQCA and QCA were  $2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; MEQ was  $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $20 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; the others were  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectively. This method with high sensitivity and good precision can be applied to the simultaneous determination of quinoxaline drugs and their major metabolite in fishmeal samples.

**Key words:** UPLC-MS/MS; quinoxalines; metabolites; fishmeal; residues determination

鱼粉是水产饲料中不可或缺的优质蛋白源, 蛋白质含量高, 富含必需氨基酸、脂肪酸、矿物质、维生素和促生长因子等动物生长发育所必需的成分<sup>[1]</sup>。为了提高饲料利用率并预防疾病, 水产饲料中有时会添加药物, 而喹噁啉类药物由于价格低廉, 曾被广泛作为药物添加剂用于饲料中。喹噁啉类药物是一类人工合成的、具有喹噁啉-1,4-二氧化物母核结构的抗菌促生长剂, 主要包括喹乙醇(OLA)、卡巴氧(CBX)、喹赛多(CYA)、喹烯酮(QCT)和乙酰甲喹(MEQ)。该类物质进入动物体内后会快速代谢生成多种代谢产物, 如脱氧代谢物、羟基化代谢物和羧基化代谢物, 其中羧基代谢物在动物体内残留时间较长, 被确定为喹噁啉类药物的残留标示物, 主要包括 CBX 和 CYA 产生的喹噁啉-2-羧酸(QCA)以及 OLA、QCT、MEQ 产生的 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)<sup>[2-3]</sup>。

喹噁啉类药物具有广谱抗菌和抗球虫作用, 能促进动物生长, 提高饲料利用率<sup>[4]</sup>。但研究表明, 与孔雀石绿、结晶紫类似<sup>[5-6]</sup>, 该类物质同样具有不同程度的致癌、致突变性、蓄积毒性和遗传毒性等<sup>[7-9]</sup>。因此, 欧盟在 2006 年禁止所有喹噁啉类药物作为饲料添加剂, 并要求其在动物源食品中不得检出<sup>[10]</sup>。农业部 560 号公告, 禁止 CBX 及其盐、酯和其他制剂的使用<sup>[11]</sup>, 农业部 2638 号公告明确禁止 OLA 用于食品动物<sup>[12]</sup>。饲料鱼在养殖过程中使用喹噁啉类药物, 加工成鱼粉后可能会残留有 MQCA 或 QCA 等该类药物的代谢产物, 在鱼粉等饲料中使用喹噁啉类药物作为添加剂, 则需要监控其原型药物。因此, 建立同时检测鱼粉中喹噁啉类药物及其代谢物残留量的方法具有现实意义。

目前, 有关喹噁啉类药物及其代谢物的分析方法主要是高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。Wu 等<sup>[13]</sup>建立了高效液相色谱同时测定猪和鸡的肌肉和肝脏以及鱼肉中 MQCA 和 QCA 残留量

的方法, 样品使用 MAX 固相萃取柱净化, MQCA 和 QCA 的回收率为 70%~110%, 检出限为 0.7~2.6  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。Li 等<sup>[14]</sup>采用超高效液相色谱-串联质谱测定鸡肉和猪肉中 QCT、MEQ 及其代谢物, 样品使用 C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化, 平均回收率为 69.1%~113.3%, 检出限为 0.05~1.0  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。黄学泓等<sup>[15]</sup>建立超高效液相色谱串联质谱法同时测定全价饲料中 QCT、OLA、MEQ、CBX 和 CYA 5 种喹噁啉类药物的分析方法, 样品使用 Agilent Bond Elut Plexa 固相萃取柱净化, 平均回收率为 65.8%~109.8%, 检出限为  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。这些方法主要检测其中的少数几种药物, 同时检测鱼粉中 5 种喹噁啉类药物及其 2 种主要代谢产物的方法尚未见报道。本研究建立的超高效液相色谱-串联质谱法同时检测鱼粉中 OLA、CBX、QCT、CYA 和 MEQ 5 种喹噁啉类药物及其 2 种主要代谢物 MQCA 和 QCA。方法稳定、可靠, 可以用于鱼粉中喹噁啉类药物的全面检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与药品

Acquity UPLC I-Class/Xevo TQ-S 型超高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); Anke DL-600B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); ZHWY-200D 型多轨道恒温振荡器(上海智城分析仪器公司); MS3 basic 型涡旋振荡器(德国 IKA 公司); DTA-3 型超声清洗仪(广州凯江仪器有限公司); Milli Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); Oasis HLB 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)、Oasis MAX 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)、Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(60 mg, 3 mL, 美国 Waters 公司); Supelclean LC-NH<sub>2</sub> 固相萃取柱(500 mg, 3 mL, 美国 Supelco 公司)。

OLA(纯度 97.8%)、CBX(纯度 99.0%)、MQCA

(纯度 99.0%)、QCA (纯度 99.8%)、QCA-D<sub>4</sub> (纯度 99.9%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); QCT (纯度 98.0%, 美国 A Chemtek 公司); CYA (纯度 98.0%), 华中农业大学兽医学院制备; MEQ (纯度 99.1%, 美国 Chem Service 公司)。乙腈、乙酸乙酯和甲醇均为色谱纯 (美国 Simga 公司); 其他试剂为分析纯。

## 1.2 标准溶液的配制

1.2.1 标准储备液 分别称取适量标准品, 5 种原药先用 2 mL 二甲亚砜溶解, 再用甲醇定容至 10 mL 棕色容量瓶中, 代谢物及内标物用甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成质量浓度为 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的标准储备液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存, 有效期 3 个月。

1.2.2 混合标准工作液 分别准确移取适量的标准储备液, 采用逐级稀释的方式, 用乙腈-0.1% 甲酸水 (1 : 9,  $V:V$ ) 稀释, 配制成质量浓度为 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  混合标准工作液, 内标工作液质量浓度为 500  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 现配现用。

## 1.3 样品前处理方法

1.3.1 提取 准确称取 2 g ( $\pm 0.02$  g) 鱼粉样品于 50 mL 离心管中, 加入 200  $\mu\text{L}$  内标工作液, 静置 30 min 后加入 10 mL 乙腈-乙酸乙酯提取液, 涡旋混合均匀, 置于恒温振荡器中  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  振荡提取 20 min, 取出后冷却至室温, 5 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 转移全部上清液后再加入 5 mL 提取液重复提取 1 次, 合并上清液,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下氮吹至近干, 乙腈定容至 4 mL, 待净化。

向样品残渣中加入 10 mL  $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸溶液, 充分涡旋使样品完全分散, 超声处理 15 min, 5 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 转移全部上清液后再加入 10 mL 盐酸溶液重复提取 1 次, 合并上清液, 分别用 10 mL 和 5 mL 乙酸乙酯萃取两次, 将萃取液转移至玻璃管,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下氮吹至近干, 乙腈定容至 3 mL, 待净化。

1.3.2 净化 将上述待净化液体全部转移至 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱, 上样后用玻璃管收集全部流出液, 于  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下氮气吹干, 加入 1 mL 乙腈-0.1% 甲酸水 (1 : 9,  $V:V$ ) 复溶, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机检测。

## 1.4 色谱、质谱条件

1.4.1 色谱条件 Kinetex C<sub>18</sub> 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国 Phenomenex 公司); 流动相 A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水溶液; 流速为 0.3  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;

进样量为 10  $\mu\text{L}$ ; 柱温  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 梯度洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序  
Tab.1 Gradient elution program %

$t/\text{min}$	流动相A mobile phase A	流动相B mobile phase B
0	10	90
1.80	95	5
3.00	95	5
3.30	10	90
5.00	10	90

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源, 正离子扫描; 质谱扫描方式为多反应监测 (MRM); 离子源温度  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 脱溶剂气流量  $850\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 脱溶剂气温度  $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 锥孔气流量  $150\text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ ; 毛细管电压 3.0 kV; 母离子、子离子、碰撞能量和锥孔电压见表 2。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的确定

在喹噁啉类药物的残留分析中使用的色谱柱多为 C<sub>18</sub> 柱<sup>[3,16-18]</sup>, 本实验比较了 Phenomenex Kinetex C<sub>18</sub> 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm) 和 Thermo Accucore C<sub>18</sub> 柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm) 2 种色谱柱。结果表明, MEQ、QCA 和 MQCA 在 Accucore C<sub>18</sub> 上的峰形较差, 响应值低; 使用 Kinetex C<sub>18</sub> 柱时 7 种药物均能获得较好的分离度和峰形, 故选用 Kinetex C<sub>18</sub> 柱作为色谱柱。另外还对流动相的比例组成进行了研究。与甲醇相比, 使用乙腈作为流动相时, 各目标物的出峰时间比甲醇早, 响应值增强, 峰形尖锐, 没有明显的拖尾现象。水相分别选用 0.1% 甲酸水溶液和 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  乙酸铵溶液, 结果显示, 使用 0.1% 甲酸水溶液时 7 种药物的响应值比乙酸铵溶液高, 原因是在正离子模式下, 加入适量的有机酸可以提高离子化效率, 使响应值提高, 定量限加标色谱图见图 1。故最终确定流动相为乙腈-0.1% 甲酸水溶液。

### 2.2 提取剂的选择

喹噁啉类药物与其主要代谢物的化学性质及在样品中的残留特征均有很大差异。原药主要以游离态形式存在, 直接使用有机溶剂即能将其有效提取出来; 代谢物则常与蛋白质结合, 必须先水解使其

表2 喹噁啉类药物及其主要代谢物的质谱参数

Tab.2 MS parameters of quinoxalines and its major metabolites

化合物 compound	母离子/(质荷比) parent ion m/z	子离子/(质荷比) daughter ion m/z	碰撞能量/eV collision energy	锥孔电压/V cone voltage
3-甲基喹噁啉-2-羧酸 MQCA	189.0	145.2 <sup>*</sup> /143.2	22/14	32
喹噁啉-2-羧酸 QCA	175.0	101.9 <sup>*</sup> /129.1	28/14	2
喹噁啉-2-羧酸-D4 QCA-D <sub>4</sub>	179.0	135.2	28	2
喹烯酮 QCT	306.9	103.1 <sup>*</sup> /131.1	40/26	56
喹赛多 CYA	271.9	129.1 <sup>*</sup> /143.0	32/30	30
喹乙醇 OLA	264.1	212.1 <sup>*</sup> /142.9	28/22	4
卡巴氧 CBX	262.9	231.0 <sup>*</sup> /130.2	20/12	2
乙酰甲喹 MEQ	218.9	143.1 <sup>*</sup> /185.1	24/18	46

注: \*. 定量离子

Note: \*. quantitative ion

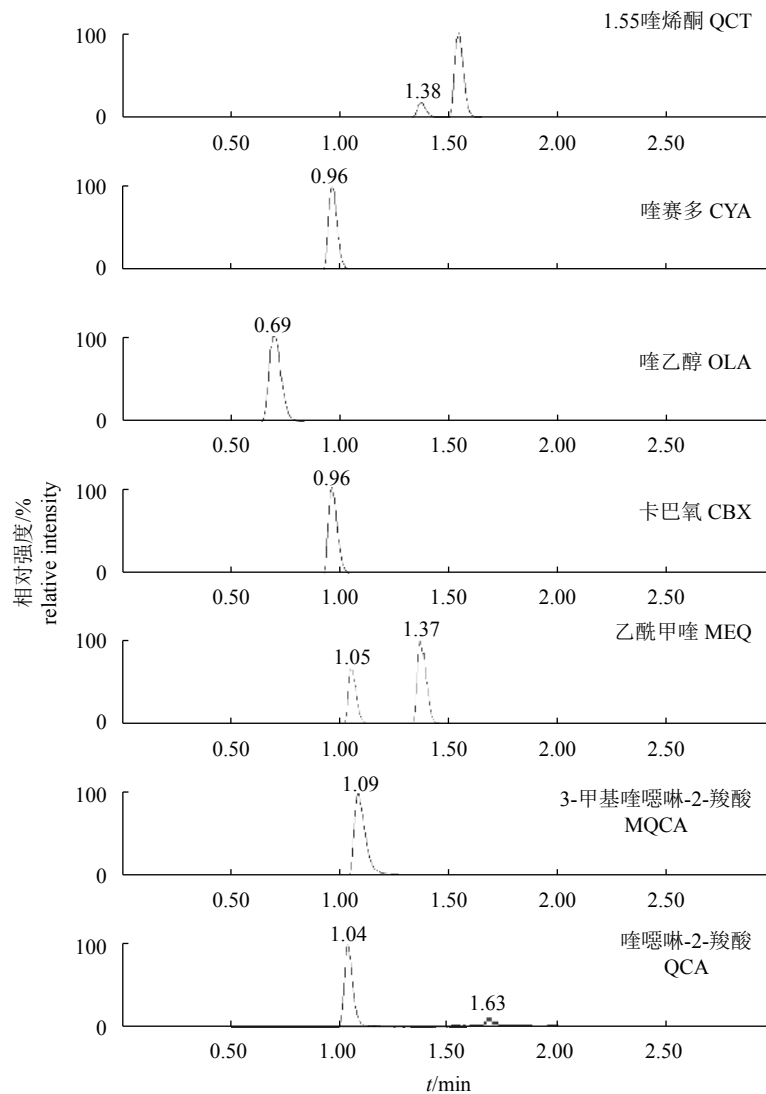


图1 定量限浓度加标多反应监测色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of LOQ

从样品中游离出来, 再进行提取。在目前已有的液相色谱法检测喹噁啉类药物残留量的方法中, 常用提取剂主要有甲醇-水<sup>[19]</sup>、乙腈-氯仿<sup>[18]</sup>、乙酸乙酯<sup>[20]</sup>和乙腈<sup>[21]</sup>等, 其中氯仿毒性强, 容易对人体和环境造成不良影响, 笔者分别对其他几种溶剂及其不同比例混合溶剂进行比较试验。使用5% 甲醇-水溶液作为提取液, 溶液浑浊, QCT、CYA 和

CBX 回收率低于20%; 单独使用乙酸乙酯或乙腈均难以有效提取样品中5种喹噁啉类药物。使用乙腈-乙酸乙酯混合液作为提取液, 5种药物能同时获得较好的回收率, 进一步优化乙腈与乙酸乙酯的比例(图2), 结果发现乙腈-乙酸乙酯(1:1, V:V)能有效提取5种化合物, 回收率满足实验需要。

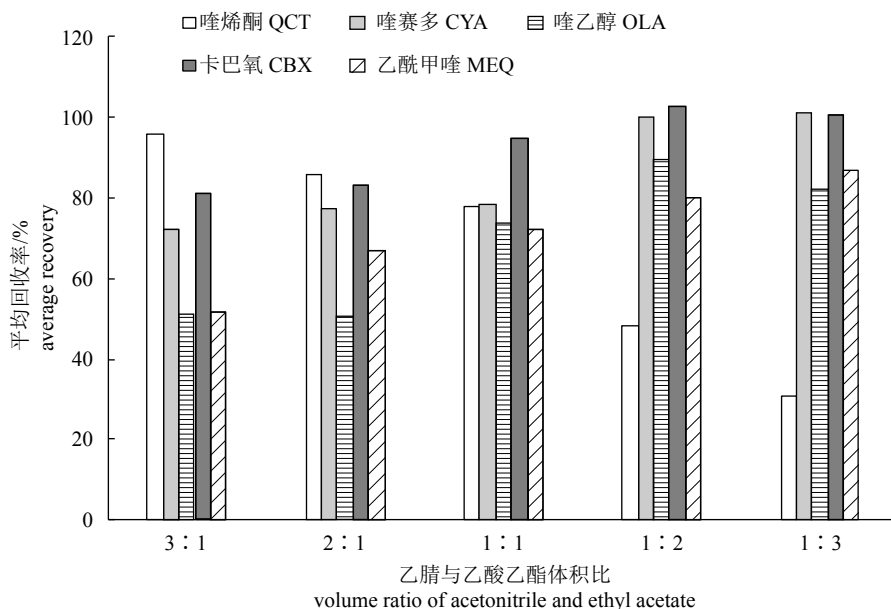


图2 不同提取液配比对5种原药加标回收率的影响

Fig.2 Effect of different extractant volume ratios on recoveries of five drugs

由于MQCA和QCA在生物体内会和蛋白质结合, 在样品前处理时直接用试剂提取, 无法将与组织结合的化合物提取出来, 必须通过水解破坏组织, 使化合物转变为游离态。常见的肉类样品中MQCA和QCA的水解方法主要有酸水解法<sup>[17,22]</sup>、碱水解法<sup>[23-24]</sup>和酶水解法<sup>[25-26]</sup>。本实验比较了3种方法, 结果显示, 酶和碱的水解程度更彻底, 但酶水解所需时间长(16~18 h), 碱水解产生的杂质多, 酸水解可以有效地将目标物从样品中游离出来, 并且杂质更少, 水解时间更短(约15 min)。进一步研究不同浓度的盐酸及超声处理时间对MQCA和QCA回收率的影响(图3、图4), 在相同水解条件下(超声15 min), 随着盐酸浓度增加, MQCA和QCA回收率也随之提高, 当浓度超过 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , MQCA和QCA回收率趋于平稳; 在盐酸浓度为 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、水解反应总时间为15 min时, 超声处理可以显著提高两者的提取率, 继续延长水解及超声时间, 回收率无明显提高, 最终确定

样品使用 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液超声水解15 min。

### 2.3 净化方法的选择

样品提取液中常含有脂类、蛋白质以及其他大

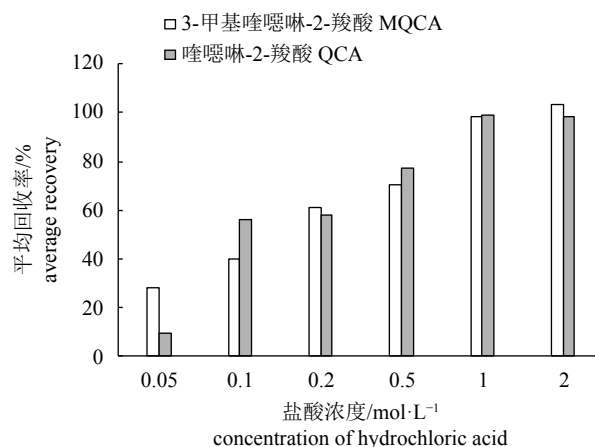


图3 盐酸浓度对MQCA和QCA加标回收率的影响

Fig.3 Effect of hydrochloric acid concentration on recoveries of MQCA and QCA



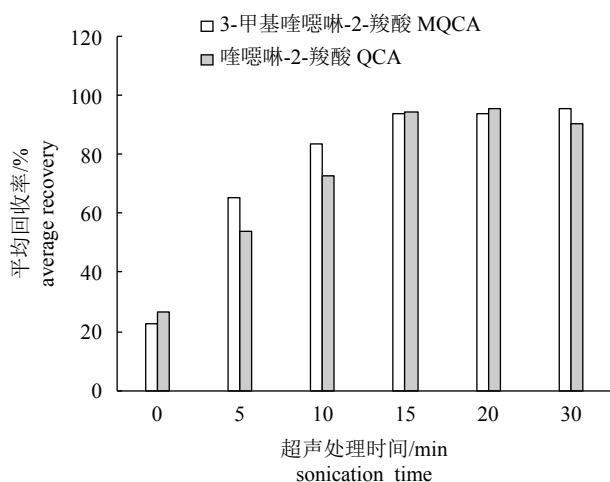


图4 超声处理时间对MQCA和QCA加标回收率的影响

Fig.4 Effect of sonication time on recoveries of MQCA and QCA

分子杂质,严重影响仪器对目标化合物分析的准确性,因此提取液需要净化处理。常用的净化方法有液液萃取和固相萃取2种方法。固相萃取使用的试剂量少且净化效果好。常用于喹噁啉类药物检测的固相萃取柱有HLB柱<sup>[16,27]</sup>和MAX柱<sup>[17,23,28]</sup>等,实验使用Oasis HLB柱、Oasis MAX柱、Supelco LC-NH<sub>2</sub>柱以及LC-NH<sub>2</sub>柱+HLB柱对提取液进行净化,结果见图5。在20 μg·L<sup>-1</sup>的添加水平下,MAX柱及LC-NH<sub>2</sub>柱对MQCA和QCA有很好的

富集作用,但使用MAX柱时CBX和MEQ回收率低于30%;使用LC-NH<sub>2</sub>柱时CYA和OLA回收率低于15%;HLB柱对7种药物均有一定保留,但OLA和MEQ回收率低于50%,不能满足实验需要。Oasis PRiME HLB固相萃取柱属于通过性固相萃取柱,当上样液为高浓度有机溶剂时,盐类、磷脂和蛋白质等杂质被保留,而目标物则直接通过,且上样前无需对填料进行活化与平衡处理,进一步缩短了实验时间。实验尝试使用Oasis PRiME HLB小柱对样品提取液进行净化处理,结果显示,7种目标物回收率基本满足实验需要。

#### 2.4 线性范围、相关性、检测限和定量限

2种代谢产物以内标法定量,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;另外5种药物以基质匹配外标法定量,以自身峰面积为纵坐标,浓度为横坐标绘制标准曲线。结果显示,在相应的线性范围内,7种化合物均呈现良好的线性关系( $R \geq 0.994$ ,表3)。采用空白鱼粉样品进行添加回收试验,以3倍信噪比( $S/N \geq 3$ )为检测限,以10倍信噪比( $S/N \geq 10$ )为定量限,结果显示,MQCA和QCA的检测限为2 μg·kg<sup>-1</sup>,定量限为5 μg·kg<sup>-1</sup>;MEQ的检测限为10 μg·kg<sup>-1</sup>,定量限为20 μg·kg<sup>-1</sup>;其余4种药物检测限为1 μg·kg<sup>-1</sup>,定量限为2 μg·kg<sup>-1</sup>,与黄学

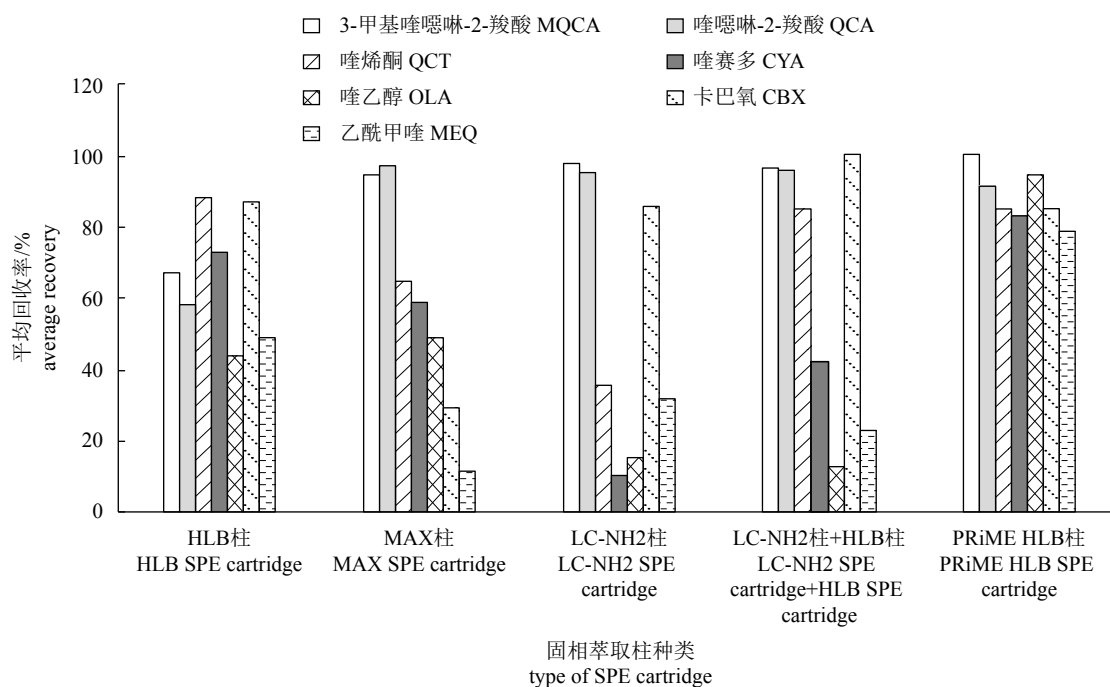


图5 不同类型固相萃取柱对7种目标物加标回收率的影响

Fig.5 Effect of different types of SPE cartridge on recoveries of seven compounds

表3 基质标准曲线的线性范围、线性方程和相关系数

Tab.3 Linear range and equations and correlation coefficients of matrix standard curve

化合物 compound	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ linear range	线性方程 linear equation	相关系数 $R$ correlation coefficient	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LOD	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ LOQ
3-甲基喹噁啉-2-羧酸 MQCA	10~200	$y=4\ 569.47x-1\ 591.88$	0.999	2	5
喹噁啉-2-羧酸 QCA	10~200	$y=883.32x-967.768$	0.997	2	5
喹烯酮 QCT	4~200	$y=3\ 690.52x+5\ 658.01$	0.994	1	2
喹赛多 CYA	4~200	$y=3\ 565.28x+791.096$	0.996	1	2
喹乙醇 OLA	4~200	$y=260.13x-358.032$	0.998	1	2
卡巴氧 CBX	4~200	$y=256.568x+577.777$	0.997	1	2
乙酰甲喹 MEQ	40~1 000	$y=488.546x-606.712$	0.998	10	20

表4 样品加标回收率及相对标准偏差

Tab.4 Recovery and RSD of fortified samples

 $n=5$ 

化合物 compound	添加水平/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ added level	平均回收率/% average recovery	相对标准偏差/% RSD
3-甲基喹噁啉-2-羧酸 MQCA	5.0, 10, 100	94.8, 102.2, 91.6	3.2, 3.5, 4.1
喹噁啉-2-羧酸 QCA	5.0, 10, 100	72.4, 80.8, 77.5	4.3, 3.8, 5.1
喹烯酮 QCT	2.0, 10, 100	70.2, 85.3, 85.4	7.8, 8.1, 7.2
喹赛多 CYA	2.0, 10, 100	70.7, 71.7, 73.8	6.4, 7.8, 5.1
喹乙醇 OLA	2.0, 10, 100	87.1, 89.7, 94.9	9.4, 8.6, 6.8
卡巴氧 CBX	2.0, 10, 100	70.6, 75.8, 85.3	8.4, 8.9, 6.2
乙酰甲喹 MEQ	20, 50, 100	64.4, 66.8, 67.6	10.2, 9.9, 7.6

泓等<sup>[15]</sup>建立的超高效液相色谱串联质谱同时测定全价饲料中5种喹噁啉类药物的方法相比,本研究建立的方法能同时测定原药和代谢物,方法灵敏度总体有所提高。

### 2.5 回收率测定

每种化合物制作低、中、高3个浓度水平的样品,每个浓度水平做5个平行(表4)。7种化合物平均回收率为64.4%~102.2%,相对标准偏差(RSD)为3.2%~10.2%。

MEQ回收率偏低,可能与样品前处理方法或药物本身的理化性质有关,邹荣婕等<sup>[29]</sup>研究MEQ在鲤鱼肌肉组织中的残留消除规律,使用二氯甲烷-乙酸乙酯(3:1,  $V:V$ )作为提取液,MEQ回收率约75%。宫向红等<sup>[30]</sup>建立了高效液相色谱法测定水产品中MEQ残留量,使用二氯甲烷-乙酸乙酯(4:1,  $V:V$ )作为提取液,MEQ回收率约73%。张嘉慧等<sup>[31]</sup>研究发现,使用有机溶剂直接提取MEQ存在杂质干扰、回收率偏低的问题。本研究同时测定5种原药及其2种主要代谢物,难以确保每个化合物均有较高的回收率。因

此,如何解决多种喹噁啉类药物同时检测及MEQ回收率偏低的问题,还需要进一步研究。

### 3 结论

本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼粉中5种喹噁啉类药物及其2种主要代谢物。样品经乙腈-乙酸乙酯混合液、盐酸提取, Oasis PRiME HLB小柱净化处理, UPLC-MS/MS测定。在低、中、高3个浓度加标水平内,方法回收率为64.4%~102.2%, RSD为3.2%~10.2%, QCT、CYA、OLA和CBX检出限为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 定量限为 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; MQCA和QCA检出限为 $2\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 定量限为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; MEQ检出限为 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 定量限为 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ; 本方法能同时测定鱼粉中的喹噁啉类药物及其主要代谢产物,提高了检测效率,适用于鱼粉中喹噁啉类药物的全面检测。

### 参考文献:

- [1] 曹小华. 浅析鱼粉的营养特性与新鲜度评价指标(一)[J]. 广东饲料, 2015, 24(8): 39-42.

- [2] 程林丽. 动物组织中喹噁啉类药物残留检测方法研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2013: 5-10.
- [3] 刘慧慧, 任传博, 张华威, 等. HPLC-MS/MS 法分析乙酰甲喹在海参中的主要代谢物 [J]. 质谱学报, 2015, 36(5): 417-424.
- [4] 曹随忠, 张力, 梁剑平, 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.
- [5] 王丽敏, 杜雪莉, 赵艳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱快速测定水产品中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物残留量 [J]. 南方水产, 2010, 6(4): 32-36.
- [6] 杨金兰, 陈培基, 黎智广, 等. 高效液相色谱法测定水产品孔雀石绿残留量的优化研究 [J]. 南方水产, 2010, 6(4): 43-48.
- [7] IHSAN A, WANG X, HUANG X J, et al. Acute and subchronic toxicological evaluation of Mequindox in Wistar rats[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2010, 257(2/3): 307-314.
- [8] 王旭, 程古月, 周秋格, 等. 兽用喹噁啉类毒理学研究进展 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(17): 16-21.
- [9] 杨波, 陈吉红. 喹乙醇在水产动物中的应用及其安全性评价 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2006, 11(2): 13-15.
- [10] WU S X, FENG C M, LI Y S, et al. LC-MS-MS Quantification of four quinoxaline-1,4-dioxides in swine feed[J]. Chromatographia, 2009, 70(11/12): 1605-1611.
- [11] 农业部. 中华人民共和国农业部第 560 号公告: 兽药地方标准废止目录 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [12] 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喹乙醇, 氨基甲酸, 洛克沙肿等 3 种兽药 [EB/OL]. [2018-01-11]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201801/t20180112\\_6134888.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201801/t20180112_6134888.htm).
- [13] WU Y J, YU H, WANG Y L, 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.
- [14] LI Y, LIU K, BEIER R C, et al. Simultaneous determination of mequindox, quinocetone, and their major metabolites in chicken and pork by UPLC-MS/MS[J]. Food Chem, 2014, 160: 171-179.
- [15] 黄学泓, 张林田, 张冬辉. 超高效液相色谱串联质谱法测定全价饲料中 5 种喹噁啉类药物 [J]. 饲料研究, 2015, 38(11): 48-52.
- [16] 叶松生, 吴德峰, 刘正才, 等. 高效液相串联质谱法测定动物源食品中喹赛多、卡巴氧残留 [J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2008, 37(3): 307-311.
- [17] 应寒松, 钟世欢, 裘钧陶, 等. 高效液相色谱测定鲫鱼组织中 3-甲基喹噁啉-2-羧酸和喹噁啉-2-羧酸的残留 [J]. 农产品加工, 2018, 17(19): 53-54+59.
- [18] 陈红, 曾振灵, 武力, 等. 饲料中乙酰甲喹含量的 HPLC 检测 [J]. 养禽与禽病防治, 2006, 25(8): 12-13.
- [19] LIN S Y, JENG S L. High-performance liquid chromatographic determination of carbadox, olaquindox, furazolidone, nitrofurazone, and nitrovin in feed[J]. J Food Prot, 2001, 64(8): 1231-1234.
- [20] 尹怡, 李平杰, 林晨, 等. 超声辅助-分散固相萃取/高效液相色谱串联质谱法联用测定鱼肝脏中喹烯酮的残留量 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(11): 1349-1353.
- [21] 易锡斌, 裴立群, 刘世琦, 等. 液相色谱-串联质谱同时测定禽肉组织中盐酸金刚烷胺、盐酸金刚乙胺、地塞米松、替米考星及喹乙醇代谢物的残留量 [J]. 分析测试学报, 2015, 34(3): 346-351.
- [22] 郑玲, 吴玉杰, 李湧, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中 3-甲基喹噁啉-2-羧酸和喹噁啉-2-羧酸残留 [J]. 色谱, 2012, 30(7): 660-664.
- [23] 董义春, 张丽芳, 张可煜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测猪、鸡可食性组织中喹噁啉类兽药残留标示物 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30(1): 110-114.
- [24] 李二粉, 张媚玉, 马合勤, 等. 液相色谱-串联质谱测定鸡肉中喹乙醇残留标示物 3-甲基喹噁啉-2-羧酸 [J]. 色谱, 2018, 36(5): 446-451.
- [25] 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.
- [26] 张静余, 杨卫军, 严敏鸣. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中喹乙醇和卡巴氧的代谢物残留量 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3788-3793.
- [27] 杨方, 刘正才, 叶松生, 等. HPLC-MS/MS 法测定动物源性食品中喹赛多的残留量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 58(4): 630-633.
- [28] 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-甲基喹噁啉-2-羧酸 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(2): 187-190.
- [29] 邹荣婕, 徐英江, 刘京熙, 等. 乙酰甲喹在鲤鱼肌肉组织中的残留消除规律研究 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(29): 137-141.
- [30] 宫向红, 邹荣婕, 徐英江, 等. 高效液相色谱法测定水产品中乙酰甲喹残留量 [J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(4): 71-75.
- [31] 张嘉慧, 贺利民, 黄显会, 等. 高效液相色谱法测定猪肌肉中乙酰甲喹的残留量 [J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(4): 122-124.