

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用测定牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物的残留量

LCMSMS-106

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物（喹噁啉-2-羧酸（QCA）和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸（MQCA））的方法。以 QCA-D4 做内标物，采用内标法快速、准确地测定 QCA 和 MQCA 的残留量。QCA 和 MQCA 的线性良好，相关系数均大于 0.999；不同浓度的精密度实验结果表明：其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.50% 和 1.32~ 4.91% 间，仪器精密度良好；QCA 和 MQCA 检出限分别为 0.27 $\mu\text{g/L}$ 和 0.23 $\mu\text{g/L}$ ，定量限分别为 1.09 $\mu\text{g/L}$ 和 0.92 $\mu\text{g/L}$ ；样品加标回收率在 72.8~ 94.2% 间。

关键词： 卡巴氧代谢物 喹乙醇代谢物 牛奶与奶粉 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

卡巴氧（Carbadox）和喹乙醇（Olaquinox）同属于喹噁啉类化合物，该类药物具有显著的促进动物生长的作用，用做牛、猪等养殖动物的饲料添加剂，可以改善动物的生长性能和饲料利用率。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，二者的代谢物也可能带来健康风险。因此，许多国家将卡巴氧和喹乙醇列为对食用动物禁用或限用的药物，欧盟、中国、日本、美国、澳大利亚等对二者在动物组织内迅速代谢而产生的相应代谢产物喹噁啉-2-羧酸（QCA）和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸（MQCA）制定了残留监控的限量标准。为此，建立卡巴氧和喹乙醇的代谢物在牛奶和奶粉中的多残留检测方法是十分必要的。

检测 QCA 和 MQCA 的方法有液相方法、气质联用法和液质联用法，但是多用超高效液相色谱与串联四极杆质谱联用法来测定。因此，本方法参考《GB/T 22984-2008 牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，建立了测定牛奶与奶粉中 QCA 和 MQCA 的超高效液相色谱-串联质谱分析方法，可供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.54 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II
2.0 mm I.D. \times 75 mm L., 2.2 μm

流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液；B - 甲醇流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.00	Pumps	Pump B Conc.	50
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	90
3.00	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI(+)

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 °C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：40 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

编号	中文名	英文名	CAS号	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	喹噁啉-2-羧酸	Quinoxaline-2-carboxylic acid (QCA)	879-65-2	175.05	129.10*	-19	-19	-24
					131.05	-12	-16	-23
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	3-methyl quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA)	74003-63-7	189.05	145.20*	-13	-14	-29
					143.20	-13	-17	-27
3	喹噁啉-2-羧酸-D4	Quinoxaline-2-carboxylic acid -D4 (QCA-D4)		179.05	133.10*	-13	-18	-25
					106.10	-13	-34	-20

*表示定量离子

实验部分

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制：

配制 1000 mg/L 单个标准溶液，然后混合稀释成 1 mg/L 混合标液；用甲醇：0.1% 甲酸水溶液（5/95, v/v）溶液稀释成 2、5、10、20、50、100 和 200 μg/L 不同浓度的混合标准工作液，并加入 10 μg/L 内标物 QCA-D4 至每个工作液中。

1.3.2 样品前处理方法：

奶粉样品的制备：称取 12.5 g 奶粉至 100 mL 烧杯中，加水至总质量为 100 g，充分混匀，取出 5 g 样品。称取 5 g 试样（精确至 0.01 g）至 50 mL 离心管中，加入一定量的内标溶液（QCA-D4），使其浓度为 2.0 ng/g，再加入 10 mL 0.6% 甲酸水溶液，混匀后，置于 (47 ± 3)°C 水浴 1 h，然后先加入 3 mL 1.0 mol/L Tris 溶液，再加入 0.3 mL 0.01g/mL Protease 蛋白酶水溶液，充分混匀后，置于 (47 ± 3)°C 水浴中酶解 16 h ~ 18 h。加入 20 mL 0.3 mol/L 盐酸，振荡 5 min，然后 5000 r/min 离心 15 min，上清液过滤。

然后将所得上清液以约 1 mL/min 的流速全部通过 Oasis MAX 固相萃取柱，分别用 15 mL 0.05 mol/L 乙酸钠 (pH 7.0) - 甲醇溶液 (19+1) 淋洗固相萃取柱，真空抽干 15 min。再用 5 mL 甲醇、3 mL 水、5 mL 0.1mol/L 盐酸和 3 mL 20% 甲醇 - 水溶液分别淋洗，真空抽干 15 min，然后用 2 mL 乙酸乙酯淋洗固相萃取柱，弃去全部淋出液，最后用 3 mL 2% 甲酸 - 乙酸乙酯溶液洗脱目标物，置于 15 mL 离心管中，然后氮吹干。准确加入 1.0 mL 甲醇 - 0.1% 甲酸 (5+95) 溶液溶解残渣，过 0.22 μm 滤膜，用质谱分析。

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

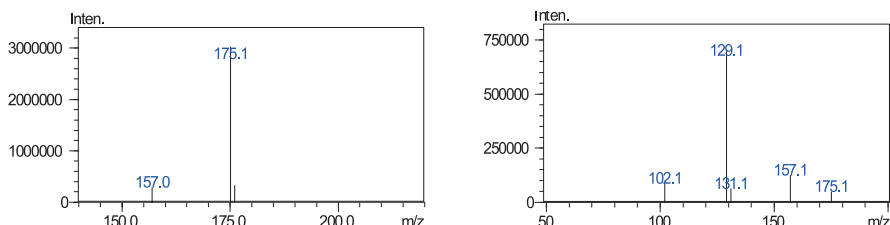


图1 喹噁啉-2-羧酸的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(右图)

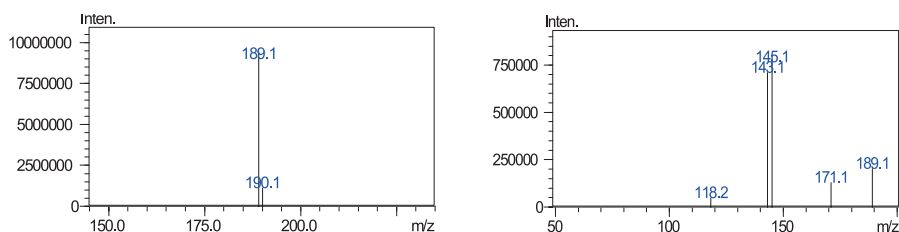


图2 3-甲基喹噁啉-2-羧酸(MQCA)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值-15V, 右图)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱如图 3 所示。

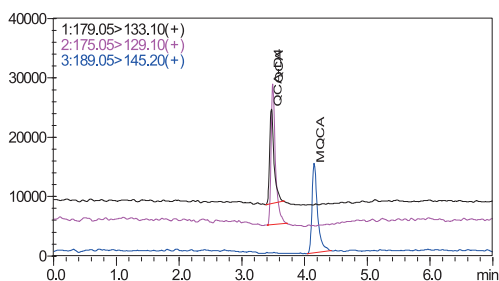


图3 20 µg/L混合标样的MRM图

2.3 线性关系

将浓度为 2、5、10、20、50、100 和 200 µg/L 混合标准工作液,按 1.2 中的分析条件进行测定,内标法制作校准曲线,如图 4 ~ 图 5 所示。

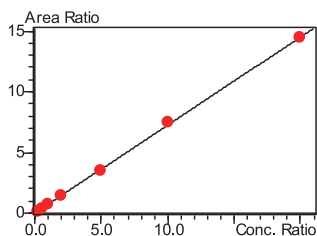


图4 喹噁啉-2-羧酸的标准工作曲线

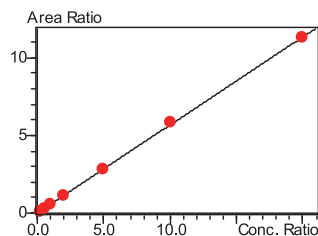


图5 3-甲基喹噁啉-2-羧酸的标准工作曲线

表3 2种物质的校准曲线参数

No.	名称	线性范围	校准曲线	相关系数 R
1	喹噁啉-2-羧酸	2~200 µg/L	$Y = (0.725519)X + (-0.00569246)$	0.9998
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	2~200 µg/L	$Y = (0.566103)X + (0.0147298)$	0.9998

2.4 检出限和定量限

配制 2 µg/L 的混合标样 7 份,进样分析,对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S,此时检出限 MDL = 3.14 × S,定量限 LOQ=4 × MDL。

表4 2种物质的检出限与定量限(n=7)

No.	名称	标准偏差(S)	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
1	喹噁啉-2-羧酸	0.087	0.27	1.09
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.073	0.23	0.92

2.5 精密度实验

配置如表 4 浓度的混合标液,重复进样 6 次。2 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.50% 和 1.32~ 4.91% 之间,仪器精密度良好。

表5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

No.	名称	RSD% (2 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (200 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	喹噁啉-2-羧酸	0.42	4.91	0.28	2.56	0.14	1.32
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.50	2.91	0.33	2.58	0.18	1.32

2.5 基质加标实验

按照 1.3.2 中样品制备方法, 加标含量如表 6, 各平行 4 次。测试结果显示: 牛奶样品的加标回收率在 72.8~80.0% 之间; 奶粉样品的加标回收率在 77.8~94.2% 之间; 具体结果如表 6。样品的色谱图如图 6、图 9 所示, 加标样品的色谱图如图 9、图 10 所示。

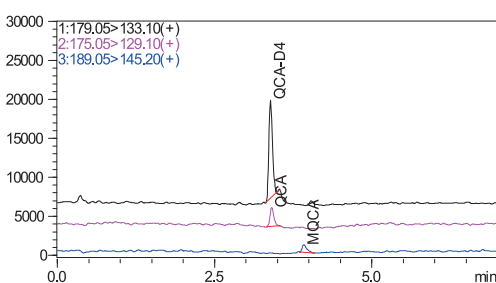


图6 牛奶样品的色谱图

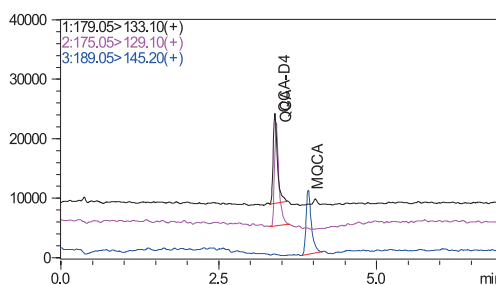


图7 4 µg/kg牛奶基质加标样色谱图

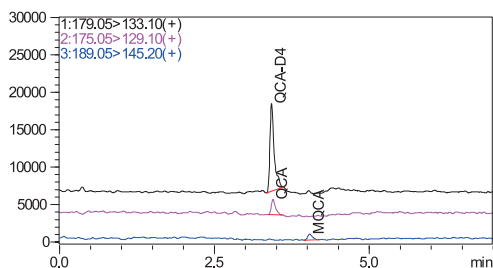


图8 奶粉样品的色谱图

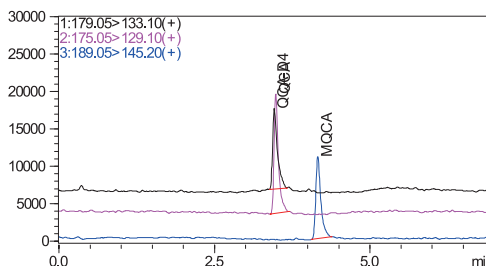


图9 32 µg/kg奶粉基质加标样色谱图

表6 加标样的回收率结果(n=4)

No.	样品名称	牛奶样品			奶粉样品		
		样品	回收率	回收率	样品	回收率	回收率
			(1 µg/kg)	(4 µg/kg)		(32 µg/kg)	(240 µg/kg)
1	喹噁啉-2-羧酸	0.51 µg/kg	72.8%	74.9%	4.09 µg/kg	77.8%	79.6%
2	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	0.36 µg/kg	80.0%	78.5%	1.64 µg/kg	89.0%	94.2%

结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定牛奶与奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物(喹噁啉-2-羧酸和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸)的残留量, 喹噁啉-2-羧酸和 3-甲基喹噁啉-2-羧酸的线性良好, 相关系数均大于 0.999; 其检出限分别为 0.27 µg/L 和 0.23 µg/L, 定量限分别为 1.09 µg/L 和 0.92 µg/L; 牛奶基质加标的回收率在 72.8~80.0% 之间; 奶粉样品的加标回收率在 77.8~94.2% 之间; 完全满足《GB/T 22984-2008 牛奶和奶粉中卡巴氧和喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》的要求。