

HPLC 法同步检测鲤鱼、对虾中喹乙醇与 MQCA 残留

梅景良^{1,2}, 吴聪明¹, 程林丽¹, 沈建忠¹, 薛 麒¹, 钱民怡¹, 邵梦瑜¹

(1. 中国农业大学 动物医学院, 北京 100193; 2. 福建农林大学 动物科学学院, 福建 福州 350002)

摘要: 建立了一种高效液相色谱法同时检测鲤鱼、对虾肌肉组织中喹乙醇(OLA)及其代谢物 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(MQCA)的残留。采用 0.3 mol/L 盐酸提取鲤鱼、对虾中的残留物, C18 固相萃取柱净化, 氮气吹干及流动相定容后, Waters2695 高效液相色谱仪在 320 nm(MQCA)和 372 nm(OLA)双波长同步检测, 流动相由纯水、乙腈、甲醇和 0.5% 甲酸水组成, 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 外标法定量。在此条件下, 当 OLA 及 MQCA 在鱼组织中的添加水平分别为 20~200 $\mu\text{g/kg}$ 和 35~200 $\mu\text{g/kg}$ 时, 其平均回收率相应为 83.5%~87.7% 和 79.6%~87.4%; 当 OLA 及 MQCA 在虾组织中的添加水平分别为 15~200 $\mu\text{g/kg}$ 和 30~200 $\mu\text{g/kg}$ 时, 其平均回收率相应为 74.6%~80.9% 和 81.0%~86.6%。两种动物组织中两种化合物的批内相对标准偏差 $\text{RSD}(n=5)$ 为 0.51%~4.47%, 批间相对标准偏差 $\text{RSD}(n=3)$ 为 0.66%~7.58%。鲤鱼组织中 OLA 和 MQCA 的检测限分别为 6 $\mu\text{g/kg}$ 和 10 $\mu\text{g/kg}$, 定量限分别为 20 $\mu\text{g/kg}$ 和 35 $\mu\text{g/kg}$; 对虾组织中 OLA 和 MQCA 的检测限分别为 4.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 8 $\mu\text{g/kg}$, 定量限分别为 15 $\mu\text{g/kg}$ 和 30 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 喹乙醇; 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸; 残留; 高效液相色谱; 鲤鱼; 对虾

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)11-0041-07

喹乙醇(Olaquinox,OLA)是一种化学合成的广谱抗菌药,对革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌均具有一定的抑制作用,同时对动物具有显著的促生长作用^[1-2]。因此自 20 世纪 70 年代起,欧共体、澳大利亚、日本和中国等陆续批准该药作为饲料添加剂使用,在畜禽和水产养殖中曾得到广泛应用^[3]。但后来逐渐发现,喹乙醇具有光敏毒性^[4]、致突变和致癌作用^[5-8],是一种潜在的基因毒剂^[9-11]。基于此,欧盟认为喹乙醇的休药期不能确定,并对人体健康可能存在不良影响,因此,于 1999 年禁止在食品动物生产中使用该药作促生长添加剂^[8,12]。我国于 2000 年规定喹乙醇禁用于禽类和体重超过 35 kg 的猪,在 2005 年又规定禁用于鱼类。尽管如此,喹乙醇在我国仍然作为抗菌促生长添加剂被广泛使用^[8]。

由于喹乙醇具有较大危害性,对其进行残留监控是十分必要的。但喹乙醇本身不稳定,在动物体内能够于短时间内被代谢,其代谢产物有十多种,其中 3-甲基-喹噁啉-2-羧酸(methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA)是主要代谢物,在体内相对稳定,现已成为国际公认的喹乙醇在可食性动物组织中的残留标示物^[13]。国内外已有较多关于喹乙醇及其代谢物 MQCA 的残留检测方法,如高效液相

色谱(HPLC)法、色谱-质谱联用(LC-MS/MS)、免疫分析法等^[14-18]。这些检测方法有的是针对喹乙醇的原药残留的测定,其结果不能体现喹乙醇在动物体内的真实残留情况,而有的方法虽然是针对 MQCA 的检测,但未测定原药的残留量,而且其前处理过程太繁琐,耗时较长,显然不利于实际样品的大规模检测^[19-21]。更主要的是,由于 MQCA 既是喹乙醇在动物源食品中的残留标示物,同时也是喹烯酮等其他喹噁啉类药物的残留标示物^[22-23],因此若单纯以 MQCA 为残留分析物,即使检测到阳性样品,也只能说明阳性样品曾用过喹噁啉类药物,并不能知道用的是这一类药物中的哪一具体品种。但对水产养殖动物而言,喹乙醇是禁用药,其他喹噁啉类药物为非禁用药,也就是说,如果想知道这些阳性样品是否是因使用喹乙醇而导致的 MQCA 残留,就必须再进行一次喹乙醇的残留检测才能确定。本项目的研究旨在建立一种能同时检测鱼、虾中喹乙醇及其

收稿日期: 2010-10-13; 修订日期: 2011-01-08

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项经费资助(200903055)。

作者简介: 梅景良(1967-),男,福建惠安人,副教授,硕士,主要从事水产药物与药理学教学及水产动物疾病防治研究,电话: 0591-87694452, E-mail: fujianmj@126.com; 吴聪明,通信作者,电话: 010-62733378, E-mail: wucm@cau.edu.cn

代谢物 MQCA 残留的 HPLC 方法, 以利于基层质检机构更有效、更快捷地检测喹乙醇及其代谢物的残留。

1 材料与方法

1.1 仪器与试验材料

Waters2695 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(美国 Waters 公司); 离心机; Bond Elut C18 固相萃取柱, 500 mg, 6 mL(美国 Varian 公司); 组织匀浆机; 氮吹仪; 涡旋混合器; 微孔滤膜, 0.22 μm 。

甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯; 其他试剂均为国产分析纯; 水为超纯水。

OLA 标准储备液(100 mg/L): 准确称取(10 $\pm$ 0.01) mg 的喹乙醇标准品(纯度 98.4%, 中国兽医药品监察所), 用甲醇溶解并转移到棕色容量瓶中定容至 100 mL。

MQCA 标准储备液(100 mg/L): 准确称取(10 $\pm$ 0.01) mg 的 3-甲基-喹啉-2-羧酸标准品(纯度 94%, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司), 用甲醇溶解并转移到棕色容量瓶中定容至 100 mL。

标准工作液: 根据需要使用, 用甲醇将标准储备液稀释成不同浓度的标准工作液, 在 4℃ 冰箱中保存, 可使用 2 周。

复溶液: 水-0.5%甲酸水-乙腈-甲醇混合溶液(30:40:5:25, V/V)。

供试验所用的活鲤鱼及活对虾均购自北京某超市, 将其可食用部分绞碎匀浆, 于 -20℃ 冰箱中贮存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理

将组织样品从低温冰箱中取出, 室温解冻。取

2.5 g 组织至 50 mL 的离心管中, 加入 7 mL 0.3 mol/L 和 1 mL 1mol/L 的 HCl 溶液, 涡旋振荡提取 2 min, 3 900 r/min 离心 10 min, 将上清液转至 15 mL 尖底塑料离心管中。残渣加入 6 mL 0.3 mol/L HCl 溶液再提取 1 次, 将上清液合并至尖底塑料离心管中。上清液以 3 900 r/min 离心 10 min, 于冰箱冷藏静置 1 h, 最后用 C18 固相萃取柱净化。依次用 5 mL 甲醇和 3 mL 0.3 mol/L HCl 活化小柱, 2 mL 超纯水淋洗, 再依次用 3 mL 甲醇和 1 mL 乙腈洗脱至玻璃试管中, 于 35℃ 氮气吹干。最后各组织残渣用 0.5 mL 复溶液涡旋振荡溶解 1 min, 并于 3 900 r/min 离心 15 min, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 滤液进行 HPLC 分析。

1.2.2 HPLC 色谱条件

色谱柱: Inertsil® ODS-3 C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 日本 GL Sciences 公司产品; 柱温 30℃; 进样量 100 μL ; 样品运行时间为 20 min; 双波长检测, OLA 的检测波长为 372 nm, MQCA 的检测波长为 320 nm; 流动相由纯水、乙腈、甲醇和 0.5% 甲酸水组成, 梯度洗脱, 具体设定条件见表 1。采用外标法定量。

1.2.3 标准曲线的制备

标准储备液用复溶液稀释配制各含 OLA 和 MQCA 为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 和 1 $\mu\text{g/mL}$ 的系列混合标准溶液, 取 100 μL 按 1.2.2 项下的 HPLC 色谱条件进样分析。分别以 OLA 和 MQCA 的峰面积为纵坐标(Y), OLA 和 MQCA 的质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线, 并求回归方程和相关系数。

1.2.4 检测限与定量限的确定

称取 6 个空白组织样品, 按 1.2.1 项下的样品处理方法进行提取和净化, 同时设 0.02 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液作对照, 对空白组织样品和标准工作液进行

表 1 测定 OLA 与 MQCA 的流动相梯度洗脱条件

Tab. 1 Gradient elution for OLA and MQCA analysis

时间(min)	流速(mL/min)	水(%)	乙腈(%)	甲醇(%)	0.5%甲酸水(%)	梯度变化
0	1	30	5	25	40	1
2	1	30	5	25	40	6
9	1	0	17	55	28	6
13	1	0	15	40	45	6
13.1	1	5	15	40	40	1
16	1	20	10	30	40	6
18	1	30	5	25	40	1
20	1	30	5	25	40	1

HPLC 分析。计算 OLA 和 MQCA 色谱保留时间位置的信噪比, 以空白样品的 3 倍信噪比($S/N=3$)计算检测限(limits of detection, LOD), 以 10 倍信噪比($S/N=10$)计算定量限(limits of quantification, LOQ)。

1.2.5 回收率与精密度的测定

取 2.5 g(精确至 0.01g)空白鲤鱼、对虾组织样品, 鲤鱼组织样品 OLA 以 20、80、200 $\mu\text{g/kg}$, MQCA 以 35、100、200 $\mu\text{g/kg}$; 对虾组织样品 OLA 以 15、80、200 $\mu\text{g/kg}$, MQCA 以 30、100、200 $\mu\text{g/kg}$ 各 3 个浓度, 分别进行添加回收试验, 按 1.2.1 项下方法处理, 在 1.2.2 项条件下进行 HPLC 测定, 将峰面积乘以样品处理中的稀释倍数, 与相应浓度的 3 个随行标准工作液峰面积平均值比较, 计算回收率。每个浓度设 5 个平行, 连续做 3 d, 计算日内和日间变异系数即批内和批间相对标准偏差。

2 结果

2.1 方法的线性范围及检测限

在本试验所建立的色谱条件下, OLA 和 MQCA 标准工作液在 0.02~1.00 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内, 峰面积(Y)与浓度(X)呈良好的线性关系, 其线性回归方程分别为: $Y=266652X-523.88$, $R=0.9999$; $Y=181144X-25.76$, $R=0.9999$ 。

根据 6 个空白组织样品基线噪音值的平均值, 按信噪比 $S/N=3$ 计算 LOD, 信噪比 $S/N=10$ 计算 LOQ, 求的鲤鱼肌肉组织中 OLA 和 MQCA 的 LOD 分别为 6 和 10 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 分别为 20 和 35 $\mu\text{g/kg}$; 对虾组织中 OLA 和 MQCA 的 LOD 分别为 4.5 和 8 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 分别为 15 和 30 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 药物的色谱行为

在 1.2.2 项色谱条件下测定, 色谱峰对称性好, 药物峰与溶剂峰及基质干扰峰分离较好, 可准确测定其峰面积(见图 1~图 4)。且该条件下药物保留时间的重现性好, 以虾某浓度添加水平为例, OLA 及 MQCA 的保留时间分别为 $(4.464\pm0.009)\text{min}$ 和 $(12.657\pm0.028)\text{min}$, 变异系数分别仅为 0.20% 和 0.22%($n=15$)。

2.3 回收率和精密度

在空白鲤鱼肌肉组织和对虾组织中分别添加低、中、高 3 个不同浓度水平 OLA 和 MQCA 的标准溶液, 按所述方法进行测定, 并计算出各加标样

品的回收率, 见表 2、表 3。鲤鱼肌肉组织中 OLA 3 个不同添加浓度的平均回收率为 83.5%~87.7%, MQCA 的平均回收率为 79.6%~87.4%; 对虾肌肉组织中 OLA 3 个不同添加浓度的平均回收率为 74.6%~80.9%, MQCA 的平均回收率为 81.0%~86.6%, 均符合兽药残留分析的准确度要求。批内相对标准

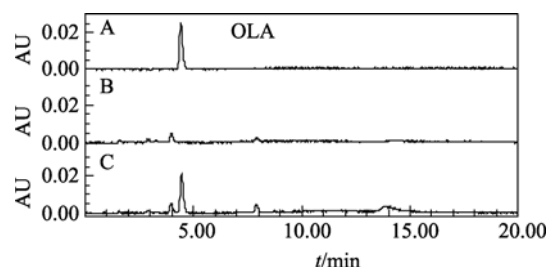


图 1 鲤鱼肌肉组织中 OLA 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 Liquid chromatograms of OLA in carp muscle tissues

A. 1.0 mg/L 标准溶液; B. 鲤鱼空白样品; C. 200 $\mu\text{g/kg}$ 鲤鱼添加样品
A. 1.0 mg/L standard solution; B. carp control; C. 200 $\mu\text{g/kg}$ spiked carp

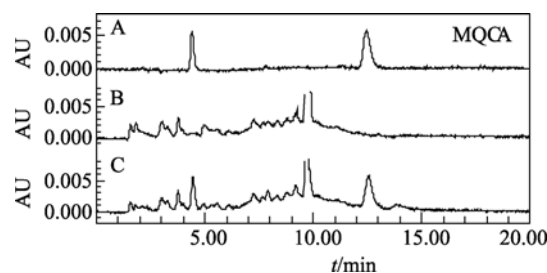


图 2 鲤鱼肌肉组织中 MQCA 的 HPLC 色谱图

Fig. 2 Liquid chromatograms of MQCA in carp muscle tissues

A. 1.0 mg/L 标准溶液; B. 鲤鱼空白样品; C. 200 $\mu\text{g/kg}$ 鲤鱼添加样品
A. 1.0 mg/L standard solution; B. carp control; C. 200 $\mu\text{g/kg}$ spiked carp

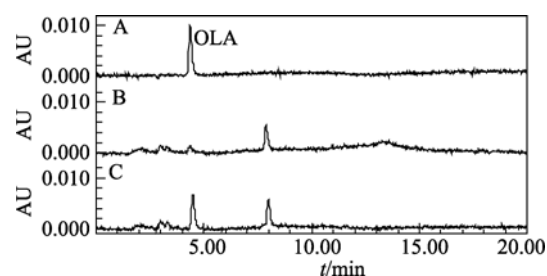


图 3 对虾肌肉组织中 OLA 的 HPLC 色谱图

Fig. 3 Liquid chromatograms of OLA in shrimp muscle tissues

A. 0.4 mg/L 标准溶液; B. 对虾空白样品; C. 80 $\mu\text{g/kg}$ 对虾添加样品
A. 0.4 mg/L standard solution; B. shrimp control; C. 80 $\mu\text{g/kg}$ spiked shrimp

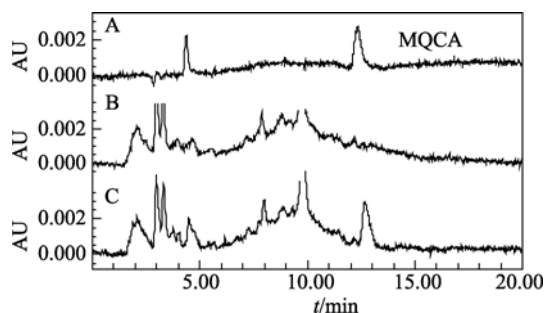


图4 对虾肌肉组织中MQCA的HPLC色谱图

Fig. 4 Liquid chromatograms of MQCA in shrimp muscle tissues

A. 0.4 mg/L 标准溶液; B. 对虾空白样品; C. 100 µg/kg 对虾添加样品
A. 0.4 mg/L standard solution; B. shrimp control; C. 100 µg/kg spiked shrimp

偏差为 0.51%~4.47%，小于 5%；批间相对标准偏差为 0.66%~7.58%，小于 10%，皆符合兽药残留分析的精确度要求。

3 讨论

3.1 提取与净化条件的选择

目前在 OLA 或 MQCA 残留色谱法检测的样品制备中，残留物的提取主要是采用水提取^[24-27]，偏磷酸甲醇溶液、乙酸乙酯及磷酸盐缓冲液依次提

取^[21,28-29]，氢氧化钠溶液水解、乙酸乙酯重复提取^[22-23,30]，蛋白酶酶解、盐酸溶液或乙酸乙酯提取^[19-20,31]，以及用乙腈和乙酸乙酯提取^[32]。在本研究中比较了盐酸溶液、氢氧化钠溶液、乙酸乙酯等有机溶剂提取，以及这些提取液的不同组合提取，并比较了提取液的用量、用时、温度、次数和 pH 值。结果表明，仅采用 0.3 mol/L 盐酸溶液水解即可将 OLA 及 MQCA 从鲤鱼组织或对虾组织中同时分离提取出来，且与同等试验条件下氢氧化钠溶液水解相比，盐酸水解可减少提取液中的杂质成分，提高后续的净化效果和方法回收率。本文经过对比研究之后尚发现，若再适当增加提取液的酸性还可提高 MQCA 的提取效果，因此在初次提取液 7 mL 0.3 mol/L 中增加使用了 1 mL 1 mol/L 盐酸。

在 OLA 及 MQCA 残留检测的样品制备过程中，提取液内残留物的纯化技术基本上是采用固相萃取法，并以使用 MAX 小柱^[20-21,28-29]和 SCX 小柱^[19]为主，但也有的是直接利用液液萃取进行净化的^[22-23,30]。本研究采用的是固相萃取法，并对 MAX、MCX、HLB、C18、中性氧化铝柱等几种小柱的净化效果进行了比较，结果发现 C18 小柱可同时较好地保留 OLA 和 MQCA。研究中尚对淋洗液和洗脱液的种类

表2 鲤鱼肌肉组织中 OLA 及 MQCA 的提取回收率与相对标准偏差

Tab. 2 Recoveries and RSDs of OLA / MQCA in carp muscle tissues

药物	添加浓度 (µg/g)	批平均回收率(%)	总平均回收率(%)	RSD(%)	
				批内(n=5)	批间(n=3)
OLA	0.02	88.3±2.8	87.7±2.3	3.13	0.69
		87.6±2.8		3.24	
		87.1±1.6		1.80	
	0.08	85.4±1.6	84.8±1.3	1.92	0.66
		84.3±1.0		1.20	
		84.7±1.1		1.23	
	0.20	84.9±0.7	83.5±2.8	0.85	3.72
		79.9±1.2		1.53	
		85.6±1.0		1.15	
MQCA	0.035	78.1±1.2	79.6±2.6	1.57	2.10
		79.3±3.3		4.13	
		81.4±2.1		2.53	
	0.10	83.3±1.2	83.4±1.9	1.42	2.10
		85.2±1.2		1.38	
		81.7±1.7		2.07	
	0.20	88.6±2.6	87.4±3.4	2.99	4.02
		83.4±1.6		1.86	
		90.1±0.8		0.87	

表 3 对虾肌肉组织中 OLA 及 MQCA 的提取回收率与相对标准偏差
Tab. 3 Recoveries and RSDs of OLA / MQCA in shrimp muscle tissues

药物	添加浓度 ($\mu\text{g/g}$)	批平均回收率(%)	总平均回收率(%)	RSD/%	
				批内($n=5$)	批间($n=3$)
OLA	0.015	84.8 $\pm$ 2.1	80.9 $\pm$ 4.1	2.53	4.59
		80.6 $\pm$ 2.9		3.61	
		77.4 $\pm$ 3.5		4.47	
	0.08	77.9 $\pm$ 2.7	80.0 $\pm$ 2.4	3.49	2.63
		79.9 $\pm$ 0.4		0.51	
		82.1 $\pm$ 1.3		1.64	
	0.20	73.7 $\pm$ 0.8	74.6 $\pm$ 2.2	1.11	3.14
		72.9 $\pm$ 0.8		1.04	
		77.3 $\pm$ 1.4		1.84	
	0.030	81.4 $\pm$ 1.6	81.0 $\pm$ 3.3	2.01	3.55
		83.6 $\pm$ 1.7		2.09	
		77.9 $\pm$ 3.3		4.23	
MQCA	0.10	83.4 $\pm$ 1.8	86.6 $\pm$ 2.7	2.10	3.17
		88.3 $\pm$ 0.9		1.06	
		88.0 $\pm$ 1.4		1.54	
	0.20	89.3 $\pm$ 0.6	85.4 $\pm$ 5.6	0.66	7.58
		88.9 $\pm$ 1.2		1.34	
		77.9 $\pm$ 1.5		1.88	

及用量进行了大量的筛选和优化,结果表明用 2 mL 超纯水淋洗、3 mL 甲醇和 1 mL 乙腈依次洗脱即可达到较好的净化效果和较高的方法回收率。至于在净化过程中是否需要采用正己烷进行脱脂这一步骤,可视情况而定,以尽量避免不必要的回收率损失。如虾肌肉组织的含脂量极低,对检测基本不存在干扰现象,可不必进行脱脂;而鱼肌肉组织存在一定的含脂量,但其高低与鱼的种类和不同季节有很大的关系,在实际工作中若发现含脂量较大而干扰正常检测时,就必须采用适量的正己烷进行脱脂,一般可在氮吹残渣复溶后用 2 mL 正己烷脱脂即可获得满意的效果。

3.2 色谱条件的选择

由于在 OLA 及 MQCA 的 HPLC 法残留分析中,使用的色谱柱基本上是 C18 柱^[19-21,28-32],本研究便直接采用色谱性能较好的 Inertsil ODS-3 C18 柱作为 HPLC 柱。不过,在不同的研究中所使用的流动相却存在着很大的差别^[19-21,28-30]。经过对比发现,这些流动相也基本上都是由水相和有机相混合而成,水相一般是纯水或低浓度甲酸水,有机相是甲醇、乙腈或二者都有,采用等度或梯度洗脱。因此,在选定色谱柱之后,本研究对以水、甲酸水、甲醇及乙腈组成的

不同组合流动相进行了比较,结果表明以 0.1%甲酸水-甲醇-乙腈为流动相时分离效果较好,但 MQCA 的峰型较宽,拖尾现象严重。又对流动相继续进行了优化,最后发现当采用 1.2.2 项下的流动相进行梯度洗脱时,OLA 及 MQCA 的保留时间和峰型均非常理想,且与干扰峰之间能获得很好的分离结果。

OLA 和 MQCA 在近紫外光区有较强的特征吸收峰,但是二者的最大吸收波长不同。为了使 OLA 和 MQCA 均能获得较高的灵敏度,本研究通过 DAD 全波段扫描(200~400 nm),考察了不同检测波长对 OLA、MQCA 测定灵敏度的影响,结果表明,当 OLA 以 372 nm, MQCA 以 320 nm 为检测波长时,检测的灵敏度均较高,并且在空白样品添加测定中能排除其他物质峰的干扰,因而将其作为鲤鱼、对虾组织中 OLA 和 MQCA 同步测定的最佳检测波长。在选定的色谱条件下对鲤鱼、对虾两种组织中添加的 OLA 和 MQCA 进行同步测定,获得了较为理想的研究结果。

4 结论

采用高效液相色谱法同时检测鲤鱼、对虾肌肉组织中喹乙醇及其代谢物 MQCA 残留,通过稀盐酸提取,优化流动相的配比,可有效分离干扰峰和喹

乙醇及其代谢物的色谱峰。本方法可操作性强、重复性好,将有助于基层质检机构更有效、更快捷地检测喹乙醇及其代谢物的残留,以避免含喹乙醇残留的同类水产品在国内市场流通和进入国际市场。

参考文献:

- [1] Williams B J, Shively J E. In vitro antitreponemal activities of carbadox, virginiamycin, olaquinox, and tylosin as indices of their effectiveness for preventing swine dysentery[J]. Veterinary Medicine and Small Animal Clinician, 1978, 73: 349-354.
- [2] Barber R S, Braude R, Hosking Z D, et al. Olaquinox as performance-promoting feed additive for growing pigs[J]. Animal Feed Science and Technology, 1979, 4(2): 117-123.
- [3] 孙雷, 韩嘉媛, 汪霞, 等. 喹乙醇的毒理学研究概况[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(1): 41-44.
- [4] De Vries H, Bojarski J, Donker A A, et al. Photochemical reactions of quinoxin, olaquinox, carbadox and cyadox with protein, indicating photoallergic properties[J]. Toxicology, 1990, 63(1): 85-95.
- [5] Yoshimura H, Nakamura M, Koeda T, et al. Mutagenicities of carbadox and olaquinox—Growth promoters for pigs[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology, 1981, 90(1): 49-55.
- [6] WHO. Evaluation of certain veterinary drug residues in food[S]. WHO Technical Report Series 799, Geneva, 1990. 45-50.
- [7] WHO. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food[S]. WHO Food Additive Series 27, Geneva, 1991. 141-173.
- [8] Hao L H, Chen Q, Xiao X L. Molecular mechanism of mutagenesis induced by olaquinox using a shuttle vector pSP189/mammalian cell system[J]. Mutation Research, 2006, 599: 21-25.
- [9] Nunoshiba T, Nishioka H. Genotoxicity of quinoxaline 1,4-dioxide derivatives in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*[J]. Mutation Research/DNA Repair, 1989, 217(3): 203-209.
- [10] WHO. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food[S]. WHO Food Additive Series 27, Geneva, 1991. 175-210.
- [11] Zou J J, Chen Q, Tang S S, et al. Olaquinox-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in human hepatoma G2 (HepG2) cells[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2009, 676(1-2): 27-33.
- [12] Commission Regulation (EC) No.2788/98.On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing[S]. Official Journal of the European Communities, 1998, L347(31-32): 12-23.
- [13] FAO/WHO, Joint Expert Committee on Food Additives. Evaluation of Certain Veterinary Drug Residues in Food, Technical Series, 1995, 851: 19.
- [14] 张昱, 冀宝庆, 胥传来. 动物源食品中喹啉及其代谢物的分析方法研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 668-671.
- [15] Toldrá F, Reig M. Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods[J]. Trends in Food Science & Technology, 2006, 17: 482-489.
- [16] Blasco C, Torres C M, Picó Y. Progress in analysis of residual antibacterials in food[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(9): 895-913.
- [17] De Brabander H F, Noppe H, Verheyden K, et al. Residue analysis:Future trends from a historical perspective[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216: 7964-7976.
- [18] Chen W, Jiang Y, Ji B Q, et al. Automated and ultrasensitive detection of methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid by using gold nanoparticles probes SIA-rt-PCR[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2009, 24: 2858-2863.
- [19] 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]. Journal of Chromatography B, 2005, 816: 15-20.
- [20] Boison J O, Lee S C, Gedir R G. A determinative and confirmatory method for residues of the metabolites of carbadox and olaquinox in porcine tissues[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 637: 128-134.
- [21] Yang B, Huang L L, Wang Y L, et al. Residue depletion and tissue-plasma correlation of methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid after dietary administration of olaquinox in pigs[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(2): 937-942.
- [22] 张丽芳, 薛飞群, 刘元元, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鸡组织中的喹啉酮标示残留物[J]. 分析测试学报, 2006, 25(5): 63-65.
- [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、鸡可食性组织中喹啉酮类兽药残留标示物[J]. 中国兽医学报, 2010, 10: 110-114.
- [24] Kinsella B, O'Mahony J, Malone E, et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis[J]. Journal of Chro-

- matography A, 2009, 1216: 7977-8015.
- [25] 艾晓辉, 刘长征, 文华. 鱼组织中喹乙醇残留量高效液相色谱检测方法研究[J]. 湖北农学院学, 2003, 23(4): 266-270.
- [26] 于慧娟, 毕士川, 黄冬梅, 等. 高效液相色谱法测定水产品中喹乙醇的残留量[J]. 分析科学学报, 2004, 20(3): 281-283.
- [27] 曾静, 朱宽正, 王鹏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中的喹乙醇[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(5): 423-425.
- [28] 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-甲基喹噁啉-2-羧酸残留量[J]. 分析科学学报, 2009, 25(4): 427-430.
- [29] 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]. Journal of Chromatography A, 2007, 1146: 1-7.
- [30] 王霄昉, 张丽芳, 薛飞群, 等. 采用高效液相色谱-串联质谱法检测鲫鱼组织 3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留量[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(8): 718-720.
- [31] 欧阳姗, 庞国芳, 谢丽琪, 等. 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[J]. 分析测试学报, 2008, 27(6): 590-594.
- [32] 殷居易, 倪梅林, 寿成杰, 等. 鸡肉中喹乙醇、卡巴多及其代谢物的残留检测[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(1): 11-15.

Simultaneous determination of olaquinox and MQCA in carp and shrimp by HPLC

MEI Jing-liang^{1,2}, WU Cong-ming¹, CHENG Lin-li¹, SHEN Jian-zhong¹, XUE Qi¹, QIAN Min-yi¹, SHAO Meng-yu¹

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Received: Oct., 13, 2010

Key words: Olaquinox; Methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid; Residue; HPLC; Carp; Shrimp

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determination of olaquinox(OLA) and methyl-3-quinoxaline-2-carboxylic acid (MQCA) in carp and shrimp. The analytes were extracted with 0.3mol/L hydrochloric acid and cleaned up on a C18 cartridge. The eluate was collected, dried under nitrogen gas, and reconstituted in primary mobile phase solution. OLA and MQCA was separated on a reversed phase Inertsil[®] ODS-3 C18 column in combination of a gradient elution, MQCA was detected at 320 nm and OLA at 372 nm with a UV detector, with mobile phase of water-acetonitrile-methanol-0.5% formic acid, flow rate of 1.0 mL/min. Quantitation was performed with external standard. The average recoveries of OLA and MQCA in carp muscle were 83.5%~87.7% and 79.6%~87.4%, respectively, when spiked at levels of 20~200µg/kg and 35~200 µg/kg, respectively; while for shrimp muscle were 74.6%~80.9% and 81.0%~86.6%, respectively, when spiked at 15~200 µg/kg and 30~200 µg/kg, respectively. Intra-day relative standard deviations (RSDs, $n=5$) were 0.51%~4.47% and inter-day RSDs($n=3$) were 0.66%~7.58%. The limits of detection (LOD) of OLA and MQCA in fish were 6 µg/kg and 10 µg/kg, respectively, and the limits of quantification (LOQ) were 20 µg/kg and 35 µg/kg respectively; the LODs of the two analytes in shrimp were 4.5 µg/kg and 8 µg/kg and the LOQs were 15 µg/kg and 30 µg/kg, respectively.

(本文编辑: 康亦兼)