

牛肉中三种氟喹诺酮类兽药残留的 UPLC-MS/MS 分析方法

杜振霞, 孙姝琦

(北京化工大学, 北京 100029)

摘要:应用超高效液相色谱-串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS),建立了一套同时分析牛的肌肉组织中环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星三种氟喹诺酮类药物残留的方法。该方法采用乙腈萃取牛肉中的残留药物,旋转蒸发至半干,正己烷萃取脂肪,下层溶液过滤,流动相定容后用作 UPLC-MS/MS 检测样品。经 Waters Acquity BHE C₁₈ 色谱柱分离,多反应监测模式采集质谱数据。三种药物的检出限均为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,定量限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。用外标法定量,50 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 两个添加水平下,三种物质回收率为 63.70%~89.25%,RSD ($n=3$) 为 0.45%~8.78%。

关键词:环丙沙星;恩诺沙星;沙拉沙星;超高效液相色谱-串联四极杆质谱;兽药残留

中图分类号:O657.63 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-2997(2007)04-219-05

Determination of Fluoroquinolones Veterinary Drug Residues in Bovine Muscle by UPLC-MS/MS

DU Zhen-xia, SUN Shu-qi

(Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

Abstract: The method of simultaneous analysis of Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Sarafloxacin in bovine muscle was developed with an ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrum. Acetonitrile was used to extract the residues from bovine muscle, and the acetonitrile resolution was concentrated and dried by the rotary evaporator. The residues were dissolved with mobile phase after cleaned with hexane. The lower layer was detected by the UPLC-MS/MS. The separation was achieved on a Waters Acquity BHE C₁₈ column, and the detection was by the MRM mode of the mass spectrum. The limit of detection (LOD) is $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the limit of quantitation (LOQ) is $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ all of the three substances. The average recoveries of $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ two spiked concentration levels are 63.70%-89.25%, and the RSD ($n=3$) is 0.45%-8.78%.

Key words: ciprofloxacin; enrofloxacin; sarafloxacin; UPLC-MS/MS; veterinary drug residues

氟喹诺酮类 (fluoroquinolones, FQs) 药物是近年来人工合成的一系列新型杀菌性抗菌药物,因其抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性和毒副作用小等特点而广泛应用于动物和人类的多种感染性疾病的防治当中^[1]。目前已有近 20 个品种的 FQs 投入市场,兽医临床上常用的 FQs 主要有环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP)、恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR)、沙拉沙星 (Sarafloxacin, SAR) 等。氟喹诺酮类药物的残留除其本身的毒副作用对人体造成直接危害外,更为严重的是长期食用含较低浓度 FQs 药物的动物源性食品,容易诱导人类致病菌产生耐药性,具有潜在致畸致癌的威胁^[1]。因此,随着 FQs 药物在动物源性食品中的广泛应用,其残留问题越来越引起社会各界的广泛关注和有关部门的高度重视。欧盟法规规定了氟喹诺酮类药物的最大残留限量 (maximum residue levels, MRLs)^[1-2]。本工作拟建立一套快速准确的食品中 FQs 残留的测定方法,这对保护消费者权益和我国进出口贸易都有很大的意义。

文献报道的氟喹诺酮类药物的检测方法多为液相色谱紫外^[3]或荧光^[4]检测、毛细管电泳法^[5]等,但是这些方法不可避免地存在杂质干扰,容易造成假阳性。串联四极杆质谱的多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描方式更加有效地提高了分析的灵敏度和选择性,通过对一个母离子和由它产生的两个子离子进行检测,避免了假阳性的可能,使检测结果准确可靠,是目前 MS/MS 定性和定量的主要手段。近期间世的超高效液相色谱 (ultra-performance liquid chromatography, UPLC), 采用粒径 1.7 μm 的填料技术,全面提升了 HPLC 的分离效率、峰容量和灵敏度。UPLC 技术与串联四极杆质谱的 MRM 检测联用,灵敏度高、分析时间短、

确证能力强,可以应用该平台对肉类等基质复杂的食品样品进行兽药残留的检测。

1 试验部分

1.1 主要仪器与装置

Waters Acquity UPLC 超高效色相谱仪,配有 Waters Acquity BHE C₁₈ 色谱柱、Sample Manager 自动进样器、Binary Solvent Manager 溶剂管理系统等;Micromass Quattro premier 三重四极杆质谱仪,配有电喷雾电离源 (ESI),液相与质谱部分均为美国 Waters 公司产品;UPLC-MS/MS 部分由 MassLynx V4.1 软件控制;Sartorius GP225D 十万分之一电子天平;Gilson Pipetman P 型移液器;禾创 KH2200DB 超声波清洗仪;安亭 TGL-16G 离心机;亚荣 RE-52A 旋转蒸发仪。

1.2 主要材料与试剂

乙腈、甲醇 (Fisher, 色谱纯)、二次蒸馏水 (自制)、甲酸 (99%)、环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星标准品由中国兽药检查所提供,含量均大于 99 %。

1.3 试验条件

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity BHE C₁₈ (2.1×50 mm ×1.7 μm);柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$;流速: 0.3 mL · min⁻¹;流动相: 乙腈 (A)-0.1 % 甲酸水溶液 (B), 梯度洗脱, 流动相梯度列于表 1;进样量: 10 μL 。

1.3.2 质谱条件 电离模式: ESI+;毛细管电压: 3.5 kV;锥孔电压: 33 V;萃取锥孔电压: 5 V;RF 透镜电压: 0.5 V;源温: 110 $^{\circ}\text{C}$;裂解温度: 400 $^{\circ}\text{C}$;锥孔气: 50 L · h⁻¹;脱溶剂气流: 600 L · h⁻¹;采集模式: MRM of 6 channels;其他参数列于表 2。

表 1 流动相梯度表
Table 1 Grade table of mobile phase

时间 Time / min	流速 Flow rate / (mL · min ⁻¹)	A 相体积 V _A / %	B 相体积 V _B / %	曲线 Curve
Initial	0.3	10	90	Initial
2.0	0.3	20	80	6
3.0	0.3	50	50	8
4.5	0.3	90	10	1
6.0	0.3	10	90	1

表 2 质谱 MRM 方式检测部分参数
Table 2 Partial parameters of MRM detection

名称	母离子	碎片离子	锥孔电压	碰撞能量
Name	Parent ion/(<i>m/z</i>)	Fragment ion/(<i>m/z</i>)	Cone voltage/V	Collision energy/eV
环丙沙星	332	245	35	22
	332	288	35	22
恩诺沙星	360	245	40	24
	360	316	40	22
沙拉沙星	386	299	40	25
	386	342	40	22

1.3.3 标准曲线的配制 准确称取 CIP、ENR 和 SAR 标准品各 0.5 mg,用甲醇定容至 50 mL 容量瓶中,配制成 10 mg·L⁻¹混合标样储备液,4℃保存。临用时使用初始流动相 V(乙腈):V(0.1%甲酸水溶液)=10:90 稀释成不同浓度的混合标准曲线工作液。

1.3.4 样品前处理 准确称取 5.0 g 搅碎的牛肉样品于 30 mL 烧杯中,加入 10 mL 乙腈,超声萃取 30 min,高速离心 5 min(转速 10 000 r·min⁻¹),取上清液,剩余残渣中再加入 5 mL 乙腈混匀、离心,重复萃取 2 次,然后合并上清液得到乙腈提取液。35℃旋转蒸发乙腈提取液至半干,蒸发速度控制在 30 d·min⁻¹左右。然后用流动相定容,加入同体积的正己烷于分液漏斗中振荡,静置 30 min,反复萃取 3 次,取下层清液过 0.2 μm 滤膜,用流动相定容至 10 mL,作为色谱分析样品。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

分别配制浓度为 0.5 μg·L⁻¹的 CIP、ENR 和 SAR 标准品溶液,通过六通阀进样,在全扫描方式下优化毛细管电压、锥孔电压、裂解温度、脱溶剂气流等参数,确定每种物质最佳质谱条件下得到的[M+H]⁺峰。在选定的条件下对母离子进行子离子扫描(daughter scan),优化碰撞能量(collsion energy)等参数,选择两个响应较强的子离子作为检测的碎片离子,将其中 MRM 色谱图峰形好、响应值高的一个子离子用于定量计算。由实验得到三种物质的 MRM 检测所需的最佳离子对列于表 2。CIP、ENR 和 SAR 的[M+H]⁺峰分别为 *m/z* 332、360、386,其子离子扫描质谱图示于图 1。

2.2 液相条件的选择

氟喹诺酮类药物的分离多选用 C₁₈、C₈ 色谱柱,但是与普通色谱柱相比,Acquity BHE C₁₈ UPLC 色谱柱灵敏度高、分离时间短,可以得到更好的分离效果。采用乙腈和水作为流动相,由于氟喹诺酮类药物中含有羧基和可质子化的氮,属于两性分子,因此考虑加入甲酸促进其电离并抑制色谱峰拖尾。分别考察了甲酸添加体积分数为 0.05%、0.1%、0.15%、0.2% 色谱图的峰形和分离度,发现 0.1% 的甲酸水溶液分离效果最好。故选用乙腈-0.1% 甲酸水溶液的流动相体系。

由以上条件得到的 CIP、ENR 和 SAR 三种物质的多反应通道 MRM 色谱图示于图 2。三者的保留时间依次为 2.05、2.37、2.78 min,分离效果良好,分析时间在 3 min 之内完成,这为高通量样品的快速测定奠定了基础。

2.3 标准曲线与线性范围

通过测定,空白样品 MRM 色谱图无基质干扰,示于图 3,因此直接使用溶剂标准品配置标准曲线即可进行定量。由于食源性动物体内残留的药物水平较低,为了更好地适应实际样品的测定工作,标准曲线需选择较低浓度的线性范围。配制 CIP、ENR 和 SAR 浓度均为 1、5、10、50、100 μg·L⁻¹混合标准溶液,在 1.3.1 的液相条件下进混合标准溶液,经 UPLC-MS/MS 的 MRM 方式检测,通过 MassLynx V4.1 软件计算得到各物质质量离子对的峰面积对浓度绘制的标准曲线,其结果列于表 3,其线性关系良好,线性相关系数均大于 0.99。

2.4 检测限和定量限

根据 IUPAC (International Union of Pure

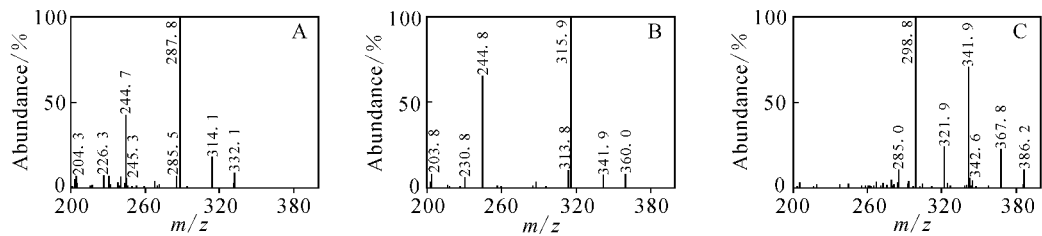


图 1 环丙沙星(A)、恩诺沙星(B)、沙拉沙星(C)的子离子扫描质谱图

Fig. 1 Daughter scan mass spectrum of Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Sarafloxacin

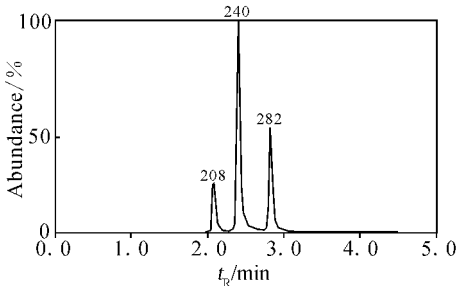


图 2 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的标准品 MRM 色谱图

Fig. 2 MRM chromatogram of standard sample of Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Sarafloxacin

and Applied Chemistry, 国际纯粹与应用化学联合会)的定义,本方法的检出限和定量限的定义分别为产生相应于 3 倍和 10 倍背景噪音的标准

偏差分析信号的分析物浓度。根据此定义由 MassLynx V4.1 软件计算出来的三种物质的检出限为 $0.05\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,定量限为 $0.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。检出限和定量限完全可以满足欧盟法规的要求。

2.5 回收率的测定

从空白基质 MRM 色谱图(图 3(A))中可以看出,基质中没有干扰物质。向空白基质中添加一定比例的 CIP、ENR 和 SAR 混合标准溶液,加标后的样品 MRM 色谱图示于图 3(B)。由峰面积根据标准曲线计算加标回收率,添加量为 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,CIP、ENR 和 SAR 三种物质的回收率结果列于表 4。结果表明,3 份平行样品中三种物质的加标回收率为 $68.70\%\sim 89.25\%$,相对标准偏差在 $0.45\%\sim 8.78\%$ 之间,可以满足残留分析要求。

表 3 三种药物的线性关系

Table 3 Linear relation of fluoroquinolones

名称 Name	线性范围 Liner range / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	线性方程 Liner equations	相关系数 Related coefficients
环丙沙星	1~100	$Y=408X-58.9665$	0.999
恩诺沙星	1~100	$Y=1995.26X-659.292$	0.998
沙拉沙星	1~100	$Y=772.361X-193.179$	0.995

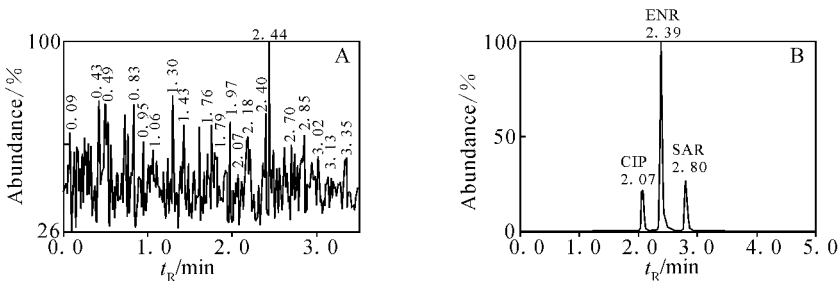


图 3 环丙沙星、恩诺沙星、沙拉沙星的标准品 MRM 色谱图: A. 基质;B. 加标样品

Fig. 3 MRM chromatogram of Ciprofloxacin, Enrofloxacin and Sarafloxacin: A. matrix; B. spiked sample

表 4 回收率实验结果

Table 4 Average recoveries of the methods

名称	添加浓度	平均测定值(n=3)	平均回收率	相对标准偏差
Name	Spiked /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Average value/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Average recovery/%	RSD /%
环丙沙星	100	78.90	78.90	3.93
	50	34.35	68.70	5.27
恩诺沙星	100	87.40	87.40	1.21
	50	44.63	89.25	0.45
沙拉沙星	100	86.77	86.77	1.23
	50	36.98	73.96	8.78

3 结 论

本方法采用超高效液相色谱-串联四极质谱联用仪,建立了牛肉中 3 种氟喹诺酮类药物残留检测方法,每个样品分析时间仅为 3 min,与传统液相色谱相比,极大地缩短了分析时间,这为高通量地分析样品提供了可靠的系统分析平台。质谱的 MRM 模式采集的数据准确可靠,符合国际上对化合物确证的要求,检出限可达 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,低于欧盟法规规定的最大残留量,因此本方法可供临床医学、食品安全及进出口检测中大通量样品的分析要求。

参考文献:

[1] VAN H N, WASCH D K, OKERMAN L, et al. Validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products[J]. Analytica Chimica Ac-

ta, 2005, 529 (1/2): 265-272.

[2] TOUSSAINT B, CHEDIN M, BORDIN G, et al. Determination of (fluoro)quinoione antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry I. Laboratory-validated method[J]. Chromatography A, 2005, 1 088(1/2): 32-39.

[3] 刘 媛, 谢孟峡, 丁 岚, 等. 反相高效液相色谱同时测定鸡蛋中 4 种氟喹诺酮类药物的残留[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 352-355.

[4] 董琳琳, 刘艳华, 汪 霞, 等. 反相高效液相色谱法同时测定 4 种氟喹诺酮类药物在鸡可食用性组织中的残留[J]. 色谱, 2005, 23(3): 285-288.

[5] ZHOU S, OUYANG J, WILLY G, et al. Chiral separation of four fluoroquinolone compounds using capillary electrophoresis with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector[J]. Chromatograph A, 2006, 1 130 (2): 296-301.