

高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中残留的19种喹诺酮类药物

丁涛^{1*}, 沈东旭², 徐锦忠¹, 吴斌¹, 陈惠兰¹, 沈崇钰¹,
沈伟健¹, 赵增运¹, 练鸿振²

(1. 江苏出入境检验检疫局动植物与食品检测中心, 江苏 南京 210001;
2. 南京大学生命分析化学教育部重点实验室, 江苏 南京 210008)

摘要:建立了高效液相色谱-电喷雾串联质谱联用测定蜂蜜中恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、双氟沙星、恶喹酸、氟甲喹、沙拉沙星、司帕沙星、丹诺沙星、氟罗沙星、马波沙星、伊诺沙星、奥比沙星、吡哌酸、培氟沙星、洛美沙星、西诺沙星和萘啶酸等19种喹诺酮类药物残留的方法。比较酸性溶液阳离子固相萃取(PCX柱)、近中性缓冲溶液反相固相萃取(HLB柱)和碱性溶液阴离子固相萃取(PAX柱)3种不同提取净化方法的提取效果,最终选择使用碱性溶液溶解蜂蜜样品,强阴离子固相萃取柱一步富集净化。以甲醇和0.1%甲酸溶液作为流动相,C₁₈作为分析色谱柱,采用梯度洗脱方式进行液相色谱分离,选择离子反应监测模式检测19种喹诺酮类药物,内标方法定量。在1~100 μg/L范围内,19种喹诺酮类药物的线性相关系数均大于0.991。通过实际样品的添加回收试验,方法的定量限(S/N=10)为1.0 μg/kg,3个添加水平的回收率为71%~118%,相对标准偏差为4.2%~6.7%。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 喹诺酮类药物; 蜂蜜

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2009)01-0034-05 栏目类别: 研究论文

Simultaneous determination of 19 quinolone residues in honey using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DING Tao^{1*}, SHEN Dongxu², XU Jinzhong¹, WU Bin¹, CHEN Huilan¹, SHEN Chongyu¹,
SHEN Weijian¹, ZHAO Zengyun¹, LIAN Hongzhen²

(1. Animal, Plant and Food Inspection Center (APFIC) of Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China; 2. Key Laboratory of Analytical Chemistry for Life Science Education Ministry of China, Nanjing University, Nanjing 210008, China)

Abstracts: A method for the simultaneous analysis of 19 quinolone residues, enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, difloxacin, oxolinic acid, flumequine, sarafloxacin, sparfloxacin, danofloxacin, fleroxacin, marbofloxacin, enofloxacin, orbifloxacin, pipemidic acid, pefloxacin, lomefloxacin, cinofloxacin, and nalidixic acid in honey was developed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). In comparison of the three different extraction methods, i. e. acid solution coupled with cation-exchange solid-phase extraction cartridge (PCX), neutral buffer solution coupled with a reversed-phase extraction cartridge (HLB) and alkali solution coupled with a strong anion-exchange solid-phase extraction cartridge (PAX), the third method was finally used. The cartridge was then applied to accumulate and purify the target analytes from the sample matrices in one step. The HPLC separation was performed on a C₁₈ column with a linear gradient elution program of methanol and 0.1% formic acid solution as the mobile phase. Selective reaction monitoring (SRM) was used for the selective detection of 19 quinolones. The linearity of all the 19 quinolones in the range from 1 μg/L to 100 μg/L had correlation coefficient greater than 0.991. In the detection of spiked samples, the detection limit of the method was 1.0 μg/kg for all the 19 quinolones,

* 通讯联系人: 丁涛, 工程师. Tel: (025) 52345193, E-mail: dingt@jsciq.gov.cn.

基金项目: 生命分析化学教育部重点实验室开放课题(No. KLACLS07010).

收稿日期: 2008-07-24

and the recoveries were 71% – 118% with the relative standard deviations of 4.2% – 6.7%. Internal standard calibration was used for the quantitative analysis.

Key words : high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); quinolone drugs ; honey

喹诺酮类药物是在喹诺酮母核的基础上进行人工全合成的一类广谱抗菌药,被广泛用于人和动物疾病的治疗^[1]。在我国人用药和兽用药没有明确的界线,很多人用药物大量地在动物上使用。由于人用药在动物机体组织中的残留,致使人食用动物组织后造成人体对该药物的严重耐药性。喹诺酮类药物在蜂蜜生产过程中属于禁用药物,因此只要在蜂蜜中检出喹诺酮类药物就可以认定为产品不合格。近几年来随着喹诺酮类药物在蜂蜜中检出率的逐年增高,出口蜂蜜的质量受到日本、欧盟和美国的特别关注。

目前已发表的关于测定喹诺酮类药物残留的方法几乎都集中在禽肉类产品、水产品和奶制品上。蜂蜜样品的性质决定了一般针对禽肉等产品的样品前处理方法不适用于蜂蜜样品。测定喹诺酮类药物残留常用的方法包括高效液相色谱-荧光检测方法^[2-4]、高效液相色谱-紫外或二极管阵列检测^[5-7]和高效液相色谱-串联质谱方法(HPLC-MS/MS)^[8-12]。HPLC-MS/MS 的抗干扰能力强,检出限低,无需强调分离,可一次性检测几乎所有的常用喹诺酮类药物残留,且仪器不断普及;而紫外检测、二极管阵列检测和荧光检测方法的抗干扰能力相对弱,分析时间较长,且检出限达不到一些国家的最大残留限量要求,因而已逐渐不再作为喹诺酮类药物残留检测的首选方法。

本文通过比较蜂蜜中喹诺酮类药物残留的 3 种不同提取方法,最终利用碱性溶液溶解并提取样品中喹诺酮类药物分析物,强阴离子固相萃取柱一步净化后,采用 HPLC-MS/MS 同时测定 19 种喹诺酮类药物残留,检出限达到 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。大量进出口蜂蜜样品的检测结果表明,该方法能满足目前进出口及国家残留监控的要求。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪,配有电喷雾电离源。

甲醇(色谱纯,德国 Merck),甲酸(~85%,分析纯),氢氧化钠(分析纯,南京化学试剂厂),水为重蒸蒸馏水。强阴离子交换柱和强阳离子交换柱

(PAX 和 PCX ,60 mg/3 mL,Agela 公司),HLB 柱(60 mg/3 mL,Waters 公司)。

恩诺沙星(enrofloxacin ,ENR)、环丙沙星(ciprofloxacin ,CIP)、诺氟沙星(norfloxacin ,NOR)、氧氟沙星(ofloxacin ,OFL)、双氟沙星(difloxacin ,DIF)、恶喹酸(oxolinic acid ,OXO)、氟甲喹(flumequine ,FLU)、沙拉沙星(sarafloxacin ,SAR)、司帕沙星(sparfloxacin ,SPA)、丹诺沙星(danofloxacin ,DAN)、氟罗沙星(fleroxacin ,FLE)、马波沙星(marbofloxacin ,MAR)、伊诺沙星(enoxacin ,ENO)、奥比沙星(orbifloxacin ,ORB)、吡哌酸(pипimidic acid ,PIP)、培氟沙星(pefloxacin ,PEF)、洛美沙星(lomefloxacin ,LOM)、西诺沙星(cinoxacin ,CIN)和萘啶酸(nalidixic acid ,NAL)等 19 种喹诺酮类药物标准品购自 Sigma-Aldrich 公司,纯度 $\geq 98\%$ 。

诺氟沙星内标(norfloxacin-D5)购自 WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH 公司,纯度 $\geq 98\%$ 。

标准储备液:称取适量的标准品,使用 0.1 mol/L 氢氧化钠-甲醇(体积比为 1:99)溶解,得到质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液。

标准工作溶液:使用甲醇-水(体积比为 2:8)稀释标准储备液至所需的质量浓度。

蜂蜜样品为国内各省送检样品。

1.2 HPLC-MS/MS 条件

HPLC 条件:Phenomenex Gemini C₁₈ 色谱柱(150 mm \times 2.1 mm 3 μm)流动相 A 相为甲醇,流动相 B 相为 0.1% 甲酸水溶液,流速 0.20 mL/min,梯度洗脱程序见表 1;柱温为室温;进样体积为 25 μL ;分析时间为 11 min。

表 1 喹诺酮类药物色谱分离的线性梯度洗脱程序
Table 1 Linear gradient elution program for the separation of quinolone drugs

Time/min	φ (Methanol)/%	φ (0.1% Formic solution)/%
0.00	10	90
2.00	10	90
4.00	90	10
8.00	90	10
9.00	10	90
11.00	10	90

MS/MS 条件:电喷雾离子化源,正离子方式检测,源内诱导解离电压(SID)15 V。19 种喹诺酮类药物质谱定性定量信息见表 2。

表 2 19 种喹诺酮类药物的母离子和选择离子

Table 2 Parent ions and selective ions of 19 quinolone drugs

Compound	Parent ion (m/z)	Daughter ions (m/z)
Enrofloxacin	360	316*, 245
Ciprofloxacin	332	231*, 288
Norfloxacin	320	276*, 302
Ofloxacin	362	261*, 318
Difloxacin	400	299*, 382
Sarafloxacin	386	299*, 368
Sparfloxacin	393	292*, 375
Danofloxacin	358	340*, 283
Oxolinic acid	262	216*, 244
Flumequine	262	202*, 244
Fleroxacin	370	326*, 332
Marbofloxacin	363	72*, 245
Enoxacin	321	232*, 303
Orbifloxacin	396	352*, 295
Pipemidic acid	304	217*, 189
Pefloxacin	334	233*, 290
Lomefloxacin	352	308*, 334
Cinoxacin	263	217*, 245
Nalidixic acid	233	187*, 215
Norfloxacin-D5 (IS)	325	281*

* quantification ion.

1.3 样品提取

准确称取 2 g 蜂蜜样品(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,准确加入诺氟沙星内标 50 ng。加入 0.25 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL,于旋涡混匀器上快速混合至蜂蜜完全溶解。依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化 PAX 阴离子交换柱,将样品溶液转移到小柱上,依次用水、甲醇淋洗,弃去流出液。用 5% 甲酸甲醇 3 mL 洗脱,收集洗脱溶液,并于 40 °C 水浴中旋转蒸发至干,用甲醇-水(体积比为 2:8)定容到 1.0 mL,过 0.45 μm 的滤膜到进样瓶中,供 HPLC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 标准溶液和样品溶液的配制

喹诺酮类药物的化学结构中有羧基和哌嗪基,属于酸碱两性化合物,酸解离常数 $pK_{a1} \approx 6$,碱解离常数 $pK_{a2} \approx 9$,等电点 $pI \approx 7$,在酸性和碱性溶液中有较好的溶解性。当使用甲醇和乙腈作为溶剂配制喹诺酮类药物标准溶液时,发现某些喹诺酮类药物标准品(如诺氟沙星、沙拉沙星等)无法全部溶解。尽管超声可促进其溶解,但配制好的标准储备液在 0~4 °C 下保存一两天会出现沉淀,经测定发现响应

信号有不同程度的下降。实验中发现,配制过程中加入适量的酸性溶液(如甲酸和乙酸)或碱性溶液(如氨水和适量氢氧化钠溶液)都可提高其在有机溶剂中的溶解性并延长标准溶液的稳定性。

在液相色谱分析中,样品的定容一般都使用有机溶剂和水的混合溶液。实验中发现,当使用乙腈-水或甲醇-水混合溶液定容时,定容溶液中有有机溶剂的比例高于色谱洗脱程序起始时有机相比例的 2 倍时,就会出现色谱峰分裂现象,即在死时间(约 2.5 min)有一个色谱峰,其峰面积为后流出主峰峰面积的 5%~10% 左右。因此,在样品定容时需要控制定容溶剂中有机相和水相的比例与起始流动相有机相和水相的比例,否则将会造成峰分裂,直接影响最后的定量结果。

2.2 提取和净化方式的选择

蜂蜜为弱酸性,且其中含有大量的糖类和少量的蛋白质等。采用有机溶剂提取或采用一般针对禽肉类、水产品类样品的提取方法,喹诺酮类药物的绝对回收率很低。本文比较了 3 种提取方法(即分别为 1% 三氯乙酸、0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(PBS, pH 6.5)和 0.25 mol/L 氢氧化钠提取,对应使用的固相萃取柱为阳离子交换柱(PCX)、HLB 柱和阴离子交换柱(PAX))的提取效果。用 1% 三氯乙酸溶液提取离心后,提取液中有少量的沉淀;用磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5)溶解蜂蜜样品,可以控制其中的喹诺酮类分析物以中性分子态存在,但蜂蜜样品溶解后需要高速离心、过滤才能保证过柱后净化柱不被堵塞;用 0.25 mol/L 氢氧化钠溶液可以完全溶解蜂蜜,故无需离心。分析结果表明:使用 PCX 柱和 HLB 柱净化蜂蜜样品,喹诺酮类药物的回收率总体偏低,约为 25%~60%;使用 PCX 柱净化时,由于恶喹酸和氟甲喹接受质子的能力弱,无法有效形成正离子,导致其回收率尤其低。而喹诺酮类药物种类多, pK_a 值的范围广,使用磷酸盐缓冲溶液只能控制 pH 在近中性,对于喹诺酮类药物这种同时具有酸碱两性化合物而言,很难做到完全不电离,因此容易导致固相萃取时损失,从而带来回收率的损失。而使用氢氧化钠(0.25 mol/L)溶液溶解蜂蜜,能使其完全溶解,无沉淀,所有分析物均以负离子形式被富集,使用甲醇淋洗固相萃取柱去除中性基质干扰,被测组分的绝对回收率在 60%~86% 之间。

2.3 色谱和质谱条件的优化

不同的色谱柱对同一样品有不同的保留时间。实验中,我们使用几种不同的反相色谱柱进行分离,结果发现:在现有的色谱洗脱条件下,Phenomenex 公司的 Gemini C₁₈ 柱(150 mm × 2 mm, 3 μm)由于

填料颗粒细,使峰形更加对称尖锐,信噪比更高,因此本文最终选择该色谱柱作为分离柱。而在流动相中加入适量的甲酸(0.1%),可以提高灵敏度,具有相同母离子的恶喹酸和氟甲喹在加入甲酸的条件下,在色谱柱上可以完全分离,不产生色谱峰交叉。

在现有的色谱条件下进行色谱分离,19种喹诺酮类分析物在2min左右全部被洗脱下来,且大部分色谱峰重叠在一起,每个色谱峰的底宽约14s。为了使每一个色谱峰有足够的扫描点(duty cycle),优化了质谱参数。在“1.2”节的优化条件下,每个子离子的扫描驻留时间为5ms,每个子离子切换时间为3ms,每个分析物色谱峰扫描点在25个以上,保证每个色谱峰有良好的重现性。

2.4 方法的定性、定量、线性范围、回收率和精密度
进行样品测定时,若样品的色谱峰保留时间与

标准品一致,并且在扣除背景后的样品谱图中各定性离子的相对丰度与浓度接近的同样条件下得到的标准溶液谱图相比,最大允许相对偏差不超过相关文件^[13]中规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。在质量浓度为1~100 μg/L时,以标准品与内标物峰面积比值Y为纵坐标,工作溶液的质量浓度X(μg/L)为横坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液的响应值均在仪器测定的线性范围内。在1~100 μg/L范围内,19种喹诺酮类药物的线性方程相关系数 $r > 0.991$ 。在阴性蜂蜜基质中添加19种喹诺酮类药物标准溶液(添加水平为1.0 μg/kg,图谱见图1),19种喹诺酮类药物的信噪比(S/N)大于10,表明该方法所有喹诺酮类药物的定量限均可达到1.0 μg/kg。

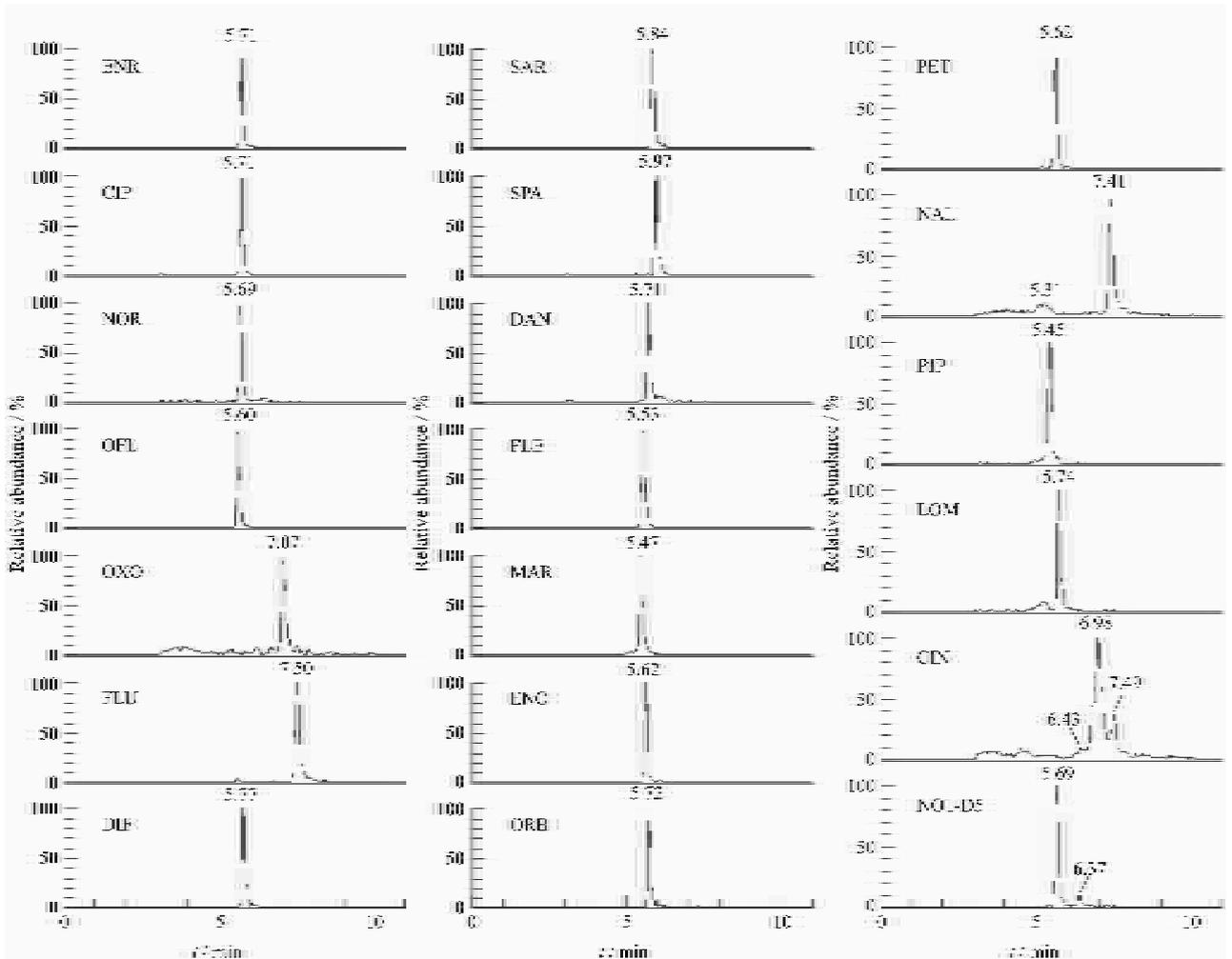


图 1 空白蜂蜜中添加 19 种喹诺酮类药物的选择离子色谱图

Fig. 1 Chromatograms of 19 quinolone drugs and internal standard spiked in honey in SIM mode
Spiking level : 1.0 μg/kg.

在阴性蜂蜜中添加 19 种喹诺酮类药物标准溶液,添加水平为 1.0、2.0 和 5.0 μg/kg,按本方法每个添加水平平行测定 10 次,计算其回收率和相对标

准偏差(RSD)。添加水平为 1.0 μg/kg 时,平均回收率为 71%~118%,RSD 为 4.9%~6.7%;添加水平为 2.0 μg/kg 时,平均回收率为 71%~117%,RSD

为 4.2% ~ 5.7% 添加水平为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 74% ~ 117% ,RSD 为 4.0% ~ 5.1%。

2.5 实际样品测定

为验证方法的实用性和准确性,参加由英国中央实验室(CSL)组织的 FAPAS 国际水平比对实验^[14],19 个国家 29 个实验室参加并提交有效试验数据。我们利用本文建立的方法对阳性蜂蜜中可能存在的 10 种喹诺酮类药物残留进行定性和定量,测定结果表明该蜂蜜中含有环丙沙星(17.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和诺氟沙星(28.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) ,此分析结果在合理范围之内。

3 结论

建立了 HPLC-MS/MS 同时测定蜂蜜中 19 种喹诺酮类药物残留方法。碱性氢氧化钠溶液溶解样品,阴离子交换柱一步富集净化,有效去除基质干扰,方法快速简洁,适合大量进出口蜂蜜样品的检测。

参考文献:

[1] Li J S , Qiu Y M , Wang C . Analysis of veterinary drug residues . Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Press (李俊锁 , 邱月明 , 王超 . 兽药残留分析 . 上海 : 上海科学技术出版社) , 2002 : 2

[2] Du L M , Wei H Q , Zhang J Y , et al . Chinese Journal of

Chromatography (杜黎明 , 卫洪清 , 张俊燕 , 等 . 色谱) , 2003 , 21(5) : 503

- [3] Marazuela M D , Moreno-Bondi M C . J Chromatogr A , 2004 , 1 034 : 25
- [4] Qi K Z , Zhu L Q , Sun G R . Chinese Journal of Chromatography (祁克宗 , 朱良强 , 孙国仁 . 色谱) , 2007 , 25(4) : 553
- [5] Christodoulou E A , Samanidou V F , Papadoyannis I N . J Sep Sci , 2008 , 31(1) : 119
- [6] Turiel E , Bordin G , Rodriguez A R . J Chromatogr A , 2003 , 1 008(2) : 145
- [7] Pecorelli I , Galarini R , Bibi R . Anal Chim Acta , 2003 , 483 : 81
- [8] Yue Z F , Lin X Y , Tang S B . Chinese Journal of Chromatography (岳振峰 , 林秀云 , 唐少冰 . 色谱) , 2007 , 25(4) : 491
- [9] Johnston L , Mackay L , Croft M . J Chromatogr A , 2002 , 982 : 97
- [10] Herranz S , Moreno-Bondi M C , Marazuela M D . J Chromatogr A , 2007 , 1 140 : 63
- [11] Liu P Y , Jiang N , Wang Y F , et al . Chinese Journal of Chromatography (刘芃岩 , 姜宁 , 王英峰 , 等 . 色谱) , 2008 , 26(3) : 348
- [12] Ye Z Q , Weinberg H S , Meyer M T . Anal Chem , 2007 , 79 (3) : 1 135
- [13] Commission of the European Communities . Implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results , 2002/657/EC . [2002-08-14] . http://www.wetgiw.gov.pl/old/UE/prawo/02_657/e02657.pdf
- [14] FAPAS® Proficiency Test 02115 : Quinolones and fluoroquinolones in honey . [2008-05-20] . <http://www.fapas.com/prog.cfm?newlang=zh>