

猪肉组织中 7种氟喹诺酮类药物残留检测 高效液相色谱 - 串联质谱法研究

孙雷¹,朱馨乐¹,刘琪¹,王树槐¹,汪霞¹,陈瑞清²

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081; 2. 福建省兽药饲料监察所,福州 350003)

[收稿日期] 2008-01-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2008)03-0012-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了猪肉组织中氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、达氟沙星、二氟沙星和沙拉沙星 7种氟喹诺酮类药物残留检测的高效液相色谱 - 串联质谱方法。液相色谱条件为:色谱柱 XB ridge C₁₈柱 (150 mm ×2.1 mm, 5 μm);流动相 0.1%甲酸甲醇溶液 - 0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱;柱温 30 ℃;流速 0.2 mL/min;进样量 20 μL。质谱条件为:电喷雾离子源 (ESI⁺),多反应监测 (MRM)方式采集。以诺氟沙星 - D₅ 作内标,内标法定量。结果表明:7种 FQs 药物在 5~250 ng/mL 浓度范围内呈现良好线性关系,相关系数 R² 均大于 0.997;方法检测限为 5 ng/g,定量限为 10 ng/g;从 10、20和 100 ng/g 三个添加浓度检测结果可以看出,方法平均回收率为 80.7%~116% (n=6),批内批间 RSD 均小于 20%。

[关键词] 氟喹诺酮类药物;猪肉;高效液相色谱 - 串联质谱

Determination of Fluoroquinolones in Pig Muscle by HPLC - MS/MS

SUN Lei¹, ZHU Xin-le¹, LIU Qi¹, WANG Shu-huai¹, WANG Xia¹, CHEN Rui-qing²

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; 2. Fujian Institute of Veterinary Drug and Feedstuffs Control, Fuzhou 350003; China)

Abstract: A HPLC - MS/MS method was established for the determination of ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, danofloxacin, difloxacin and sarafloxacin in pig muscle. HPLC condition: the chromatography column is XB ridge C₁₈ column of 150 mm ×2.1 mm, 5 μm; mobile phase is methanol (0.1% formic acid) and water (0.1% formic acid); column temperature is 30 ℃; flow rate is 0.2 mL/min; injection volume is 20 μL. Mass Spectrometry condition: ESI⁺ and MRM mode. The calibration curve was good linear between the ratio of the peak areas and concentrations of fluoroquinolones from 5 to 250 ng/mL containing the internal standard at 20 ng/mL, the correlation coefficient R² was greater than 0.997. The limit of detection of the method was 5 ng/g, the limit of quantification was 10 ng/g. The average recoveries from spiked pig muscle at the three concentrations of 10, 20 and 100 ng/g ranged from 80.7% to 116% (n=6), intra- and inter- batch variation coefficients were less than 20%.

Key words: fluoroquinolones; pig muscle; HPLC - MS/MS

氟喹诺酮类药物 (Fluoroquinolones, FQs)是在喹诺酮环结构的 6位引入氟、7位引入哌嗪环而得

到的一类衍生物,仅在 R₁、R₂、R₃ 位取代基不同 (图 1)。FQs 药物抗菌谱广、毒性低,有良好的药动学

作者简介:孙雷 (1978年-),男,硕士,助理研究员,主要从事兽药安全性评价工作。E-mail: sunlei@ivdc.gov.cn

特征,是目前兽医临床中最常用的药物之一。但是由于该类药物在临床上容易导致耐药菌株的产生,因此欧盟、美国、日本等已将其列为动物性食品中残留检测的重点监控药物。国外关于 FQs 药物残留检测的方法报道较多,大多为 HPLC 法。本文针对部颁标准准许在兽医临床治疗中使用的 7 种 FQs 药物,制定出了一种可同时检测它们在猪肉组织中残留的 HPLC-MS/MS 确证方法,该方法简便、灵敏度高且专属性强。

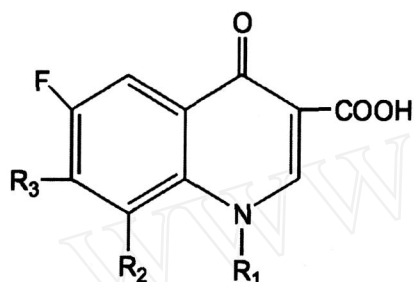


图 1 氟喹诺酮类药物的基本化学结构

1 材料与与方法

1.1 仪器 Waters 2695 - Quattro micro™ 高效液相色谱质谱联用仪, Waters 公司; AE260 电子天平, Mettler - toledo 公司; biofuge Strators 高速冷冻离心机, 德国贺利氏公司; Rescti - Them3 样品浓缩器, Pierce 公司; SR4 漩涡混合器, IKA 公司; Oasis MCX 小柱, 60mg/3cc, Waters 公司。

1.2 药品和试剂 7 种 FQs 药物对照品, 纯度大于 99.0%, 均由中国兽医药品监察所提供; 诺氟沙星 - D₅, 纯度为 99.0%, 由德国 Dr Ehrenstorfer 公司提供; 乙腈、甲醇为色谱纯, MERCK 公司; 甲酸、氨水、正丙醇为分析纯; 所用水为超纯水。

1.3 对照溶液的配制 分别精密称取 7 种 FQs 药物对照品适量, 置于不同容量瓶中, 用 0.03 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并用甲醇稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。准确量取各标准储备液适量, 用甲醇逐步稀释成浓度均为 1 μg/mL 的混合标准工作液。置 -20℃ 冰箱中保存, 有效期为 3 个月。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 XBridge C₁₈ 柱 (150 mm × 2.1 mm, 5 μm); 流动相 A 相为 0.1% 甲酸甲醇溶液, B 相为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0 min, A - B (18/82); 14 min, A - B (25/75); 18 min, A - B (95/5); 21 min, A - B (95/5); 21.1 min, A -

B (18/82), 保持 10 min。柱温为 30℃; 流速为 0.2 mL/min; 进样量为 20 μL。

1.4.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI⁺), 毛细管电压为 3.0 kV, 源温为 105℃, 脱溶剂温度为 350℃; 锥孔反吹风速为 50 L/h, 雾化风速为 450 L/h; 多反应监测离子情况见表 1。

表 1 7 种 FQs 药物和内标的特征离子对以及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
氧氟沙星	362.3 > 261.3	362.3 > 318.3	35	25
	362.3 > 318.3			18
诺氟沙星	320.4 > 276.3	320.4 > 302.2	33	16
	320.4 > 302.2			18
环丙沙星	332.4 > 245.4	332.4 > 314.2	33	23
	332.4 > 314.2			18
恩诺沙星	360.6 > 245.4	360.6 > 316.5	38	25
	360.6 > 316.5			17
达氟沙星	358.4 > 81.7	358.4 > 340.2	35	41
	358.4 > 340.2			22
二氟沙星	400.3 > 356.2	400.3 > 356.2	35	20
	400.3 > 382.2			20
沙拉沙星	386.3 > 342.3	386.3 > 368.2	37	18
	386.3 > 368.2			20
诺氟沙星 - D ₅	325.2 > 281.3	325.2 > 307.2	32	16
	325.2 > 307.2			19

1.4.3 定性与定量 该方法定性需满足四个条件: 试剂空白和样品空白不能出现与阳性对照相同的离子峰; 特征离子色谱峰信噪比 (S/N) 都在 3:1 以上; 试样色谱峰保留时间应与校正溶液的一致, 容许偏差为 ±2.5%; 检测到的离子丰度比应与校正溶液的一致, 容许偏差达到欧盟 2002/657/EC 中的规定。定量时标液和内标都以响应强度最强离子对进行计算。

1.4.4 标准曲线绘制 精密量取适量混合标准工作液, 用初始比例流动相稀释成浓度均为 5、10、20、50、100、250 ng/mL 的系列混合对照溶液 (内标 Nor - D₅ 浓度为 20 ng/mL), 由低浓度到高浓度进样, 内标法定量, 以特征离子质量色谱峰面积与内标色谱峰面积比为纵坐标, 对应浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

1.4.5 样品前处理 取 (2 ± 0.05) g 试料, 置 50 mL 离心管, 加 1% 甲酸乙腈溶液 10 mL, 涡旋混合 10 s, 8 000 r/min 离心 5 min, 转移上清液。离心管中沉淀物用 1% 甲酸乙腈溶液 10 mL 重复提取 1 次, 合并上清液, 摇匀备用。MCX 柱依次用甲醇、

水各 3 mL 预洗。取 10 mL 备用液过柱,用 2% 甲酸水溶液、纯甲醇各 3 mL 淋洗,真空抽干。用 5% 氨水甲醇溶液 5 mL 洗脱,真空抽干,收集洗脱液,50 °C 下氮气吹干,残余物用初始比例流动相 1.0 mL 溶解,过滤后上机测定。

1.4.6 灵敏度的确定 将适当浓度的 7 种 FQs 药物加入到空白猪肉组织中,制成 2、5、10 ng/g 三个浓度的添加样品,经上述方法前处理后,用 HPLC-MS/MS 检测,观察药物特征离子质量色谱峰信噪比 (S/N) 和对应药物浓度, S/N 大于 3 者,定其为方法检测限; S/N 大于 10 者,定其为方法定量限。

1.4.7 准确度和精密度的测定 采用标准添加法,在空白猪肉组织中添加 10、20、100 ng/g 三个不同浓度药物进行回收率试验,各浓度进行 6 个样品平行试验,重复 3 次,求批内批间相对标准偏差。

2 结果

2.1 标准曲线 7 种 FQs 药物在 5~250 ng/mL 浓度范围内呈现良好的线性关系,线性方程和相关系数见表 2。

表 2 7 种 FQs 药物回归方程及相关系数 (R^2)

药物	回归方程	R^2
氧氟沙星	$y = 11.05x - 0.1729$	0.9992
诺氟沙星	$y = 1.754x + 0.2810$	0.9983
环丙沙星	$y = 1.716x + 0.2324$	0.9976
恩诺沙星	$y = 2.485x - 0.4586$	0.9970
达氟沙星	$y = 2.448x + 0.0754$	0.9987
二氟沙星	$y = 4.401x - 0.7216$	0.9973
沙拉沙星	$y = 2.247x + 0.0485$	0.9970

2.2 方法灵敏度 按上述方法进行处理,当添加浓度为 10 ng/g 时,测得 7 种 FQs 药物 S/N 大于 10,说明方法定量限为 10 ng/g。当添加浓度为 5 ng/g 时,测得 7 种 FQs 药物 S/N 大于 3,表明方法检测限为 5 ng/g。

10 ng/mL 对照溶液和 10 ng/g 添加试液中 7 种 FQs 药物和内标的特征离子质量色谱图见图 2 和图 3。

2.3 方法精确度 7 种 FQs 药物在 10、20、100 ng/g 三个添加浓度进行回收率试验结果汇总见表 3,从中可以看出方法平均回收率为 80.7%~116%,批内 RSD 为 2.8%~18.4%,批间 RSD 为 1.07%~16.2%。

3 讨论

3.1 质谱条件优化 首先采用 1 μg/mL 的各 FQs 药物标准溶液以蠕动泵进样方式在正离子模式下

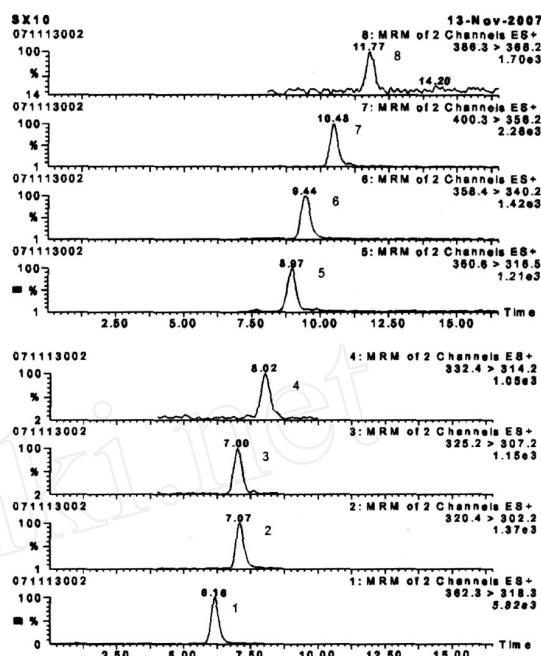


图 2 10 ng/mL 对照溶液中 7 种 FQs 药物特征离子质量色谱图

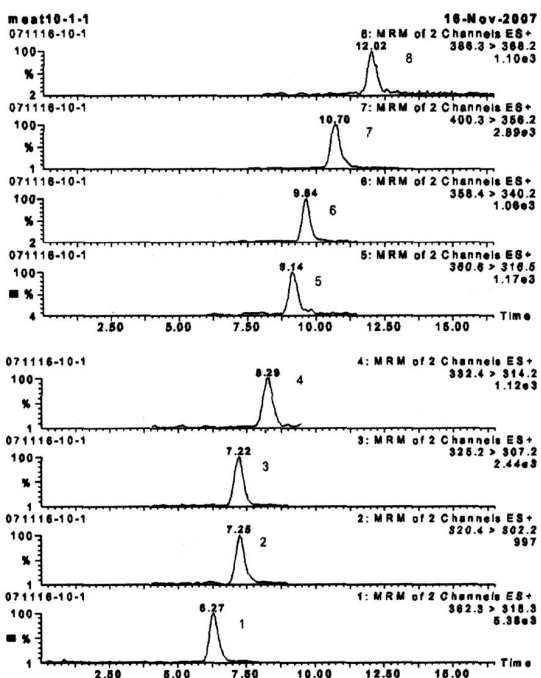


图 3 10 ng/g 空白猪肉添加试液中 7 种 FQs 药物特征离子质量色谱图

- 图 2、图 3 质量色谱图中:
- 1 - 氧氟沙星特征离子质量色谱图 (362.3 > 318.3);
 - 2 - 诺氟沙星特征离子质量色谱图 (320.4 > 302.2);
 - 3 - 诺氟沙星 - D₅ 特征离子质量色谱图 (325.2 > 307.2);
 - 4 - 环丙沙星特征离子质量色谱图 (332.4 > 314.2);
 - 5 - 恩诺沙星特征离子质量色谱图 (360.6 > 316.5);
 - 6 - 达氟沙星特征离子质量色谱图 (358.4 > 340.2);
 - 7 - 二氟沙星特征离子质量色谱图 (400.3 > 356.2);
 - 8 - 沙拉沙星特征离子质量色谱图 (386.3 > 368.2)。

表3 猪肉中添加7种FQs药物精确度测定结果 (n=6)

药物	添加浓度 (ng/g)	批内平均回收率 (RSD /%)			批间平均回收率 (RSD /%)
		1	2	3	
氧氟沙星	10	93.4(10.2)	83.1(18.4)	95.5(8.11)	6.64
	20	93.4(7.34)	98.9(4.37)	95.5(14.2)	2.78
	100	116(4.30)	97.2(14.0)	94.4(14.3)	12.1
诺氟沙星	10	91.7(12.4)	89.4(18.1)	89.4(16.2)	1.33
	20	91.7(10.4)	82.1(11.0)	89.6(17.6)	5.05
	100	97.7(11.8)	82.3(4.64)	113(5.16)	15.8
环丙沙星	10	108(9.13)	102(10.4)	114(4.08)	6.06
	20	92.5(13.8)	93.6(12.5)	84.9(10.6)	4.74
	100	100(8.74)	91.4(4.95)	114(8.13)	11.6
恩诺沙星	10	83.0(9.33)	76.9(8.17)	103(13.1)	13.7
	20	95.0(15.6)	101(14.6)	112(6.00)	8.40
	100	97.9(16.3)	96.0(14.5)	96.1(14.8)	1.07
达氟沙星	10	104(4.98)	93.4(11.2)	91.7(4.47)	6.72
	20	80.7(8.22)	95.7(13.6)	100(16.9)	10.1
	100	99.7(11.7)	81.9(10.6)	105(18.1)	12.1
二氟沙星	10	95.3(14.3)	83.2(17.5)	86.6(13.4)	6.24
	20	99.5(16.6)	111(8.78)	108(12.8)	6.20
	100	118(2.80)	105(16.3)	109(14.0)	7.03
沙拉沙星	10	115(5.35)	82.0(11.9)	86.9(17.3)	16.2
	20	96.6(18.4)	102(12.9)	111(14.1)	7.25
	100	108(7.80)	95.0(12.3)	112(11.7)	9.06

进行母离子全扫描,确定各种FQs药物的准分子离子,然后分别以其准分子离子为母离子,对其子离子进行全扫描。FQs药物二级质谱中主要的碎片离子是脱水离子($[M + H - H_2O]^+$)、脱羧离子($[M + H - CO_2]^+$)以及脱羧后哌嗪环断裂发生结构重排失去 C_2H_4NR 的产物离子($[M + H - CO_2 - C_2H_4NR]^+$)。最后以多反应监测正离子模式优化了各种质谱调谐参数。

3.2 提取和净化条件选择 FQs药物分子结构中含有羧基和叔胺基,是酸碱两性化合物。文献报道^[1]的提取方法包括用纯有机溶剂(甲醇、乙腈、二氯甲烷等),或用有机溶剂添加一定比例的酸或碱来进行提取。本方法采用1%甲酸乙腈溶液作为提取溶剂,不仅除蛋白效果好,而且容易浓缩,提取回

收率也可满足有关要求。FQs药物分子极性较强,选用对碱性极性物质吸附能力较强的复合模式阳离子交换柱(MCX柱),在酸性环境中FQs药物以完全离子化方式与复合模式吸附剂作用,当用甲醇淋洗时离子型化合物得以完全保留,而单纯以疏水性作用为保留机制的物质将被大部分去除。用氯化甲醇进行洗脱,可以调节pH值使离子化的FQs变为中性,进而洗脱出来。结果表明该方法净化样品效果理想,且重现性好。

参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超.兽药残留分析[M].上海:上海科学技术出版社,2002:365-392.