

固相萃取-超高效液相色谱质谱联用法 测定水产品中左氧氟沙星残留

赵建晖¹, 唐庆强², 吴文凡¹, 郑香平¹, 陈志涛¹, 余钗¹

(1. 福清出入境检验检疫局, 福建 福清 350300

2. 三明出入境检验检疫局, 福建 三明 365000)

摘要:建立了水产品中左氧氟沙星残留的超高效液相色谱串联质谱检测方法。采用乙腈对样品中的待测物进行提取, 正己烷除脂, 浓缩后用固相萃取小柱进行净化, 吹氮浓缩后采用超高效液相色谱质谱联用-电喷雾正离子和MRM多反应监测模式进行定性定量分析。检测浓度线性范围为0~100 μ g/kg, 线性相关系数为0.9922, 检出限为4.5 μ g/kg。在鳗鱼、虾和罗非鱼三种不同样品基质中进行添加浓度为10, 20, 50 μ g/kg的验证试验, 该药物的回收率在72.5%~83.5%内, 相对标准偏差(n=6)在7.9~11.4%之间, 并对其质谱裂解和基质效应进行了研究。本检测方法快速、高效、灵敏度高, 符合检测要求。

关键词:左氧氟沙星, 固相萃取, 超高效液相色谱质谱联用, 水产品

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-8143(2011)05-015-05

Determination of Levofloxacin in aquatic products by SPE-Ultra Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Zhao Jian-hui, Tang Qing-qiang, Wu Wen-fan, Zheng Xiang-ping, Cheng Zhi-tao, Yu Chai

(Fuqing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuqing 350300, China)

Abstract: An analytical method was developed with Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry to determine Levofloxacin residues in aquatic products. The compound was extracted with acetonitrile and cleaned with hexane, followed by cleanup with LC-SCX SPE column and concentrated with N₂. Then the reconstituted sample solution was qualitative and quantitative analysis by UPLC-MS/MS under electrospray positive ion mode and multi-reaction monitoring (MRM). The coefficient correlation of this method was 0.9922 for spiked samples (range from 0 to 100 μ g/kg), the limit of quantification were 4.5 μ g/kg. The method was validated at 10, 20, 50 μ g/kg in eel, shrimp and tilapia fish, the mean recoveries were 72.5%-83.5%, the RSD were 7.9-11.4%, investigated the MS fragmentation mechanism of this compound. The method is effective, fast and high sensitivity, meet the request of detection.

Keywords: Levofloxacin; SPE; UPLC/MS/MS; aquatic products

随着食品安全问题的日益严峻, 世界各国特别是欧美发达国家近年来高度重视动物源性食品中的药物残留问题, 日本已于2006年5月实施了食品中农药化学品(农药、兽药及饲料添加剂等)残留“肯定列表制度”, 并执行了新的残留限量标准。欧盟对多种药物也制定了最大允许限量, 美国未允许

部分相关药物用于水产养殖业, 澳大利亚检验检疫署(AQIS)也从2007年9月起在进口的检测计划中将增加水产品中部分抗菌药成分的检测项目, 其中增加了左氧氟沙星药物。

左氧氟沙星属氟喹诺酮类药物, 具有抗菌谱广, 抗菌作用强的特点, 已报道的左氧氟沙星残留

收稿日期: 2011-4-19

基金项目: 福建出入境检验检疫局科技计划项目(FK2008-12)

作者简介: 赵建晖(1975-)男, 工程师, 从事食品检测工作。Email: Oasis886@126.com

的分析方法有微生物法、液相法, CE 或 HPLC/MS, 检测对象主要为生物组织、体液、水等^[1-2], 水产品中检测左氧氟沙星的方法尚未见报道。本文参考相关文献, 研究了水产品中左氧氟沙星残留的超高效液相色谱质谱联用检测法, 灵敏度高, 效果好, 速度快, 可满足水产品中相关药物残留的检测工作需要。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱质谱联用仪: WATERS Micro-mass Quattro PremierXE 三重四极杆配有 ESI 正离子源; 超纯水机: Milli-Q gradient; 漩涡振荡器: 上海精科 XW-80A; 所用流动相试剂甲醇、乙腈为色谱纯, 前处理所用试剂为分析纯, SPE 小柱为 SUPEL-CLEAN LC-SCX 3mL, 用前依次以 3 mL 甲醇、3 mL 水、3 mL 10mmol/L 乙酸铵(pH=4.5)缓冲液洗脱, 保持柱体湿润; 标准品为左氧氟沙星 Tokyo chemical (5g); 用甲醇配制成 100mg/L 储备液, 使用时根据需要用甲醇配制成标准工作液。

1.2 实验方法

1.2.1 样品提取

称取粉碎后样品约 2g 于 50mL 离心管中, 加入 2g 左右无水硫酸钠, 加 20mL 乙腈, 均质 1 分钟, 用 20mL 乙腈清洗分散头, 将其离心 5 min, 转速 3800rpm; 离心后的残渣再加入 20mL 乙腈, 再次均质 1 分钟, 3800rpm 离心 5 分钟, 合并两次上清液, 转移到分液漏斗, 分别两次用 20mL 左右正己烷进行脱脂, 脱脂后的提取液倒入鸡心瓶中于 40℃ 水浴真空浓缩近干。

1.2.2 样品净化

加入 3 mL 乙酸铵缓冲液(pH=4.5), 旋转涡动 30 秒, 充分清洗鸡心瓶内壁, 将洗液以约 1mL/min 的流速过预处理过的 SCX SPE 小柱, 以甲醇 3mL 进行淋洗, 氨水-甲醇溶液(25+75)3 mL 进行洗脱, 收集氨水-甲醇洗脱液, 在 35℃ 条件下用氮气吹至近干, 用 2.0mL 乙腈: 水溶液(10+90)振荡定容, 过 0.22μm 滤膜, 供仪器分析。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 柱 2.1 ×

50mm 1.7μm 柱温 30℃ 样品室温度 5℃ 进样体积: 10μL 流速: 0.2mL/min 流动相: 乙酸铵 5mmol/L 甲酸 0.1% 水溶液(缓冲盐溶液)、乙腈。梯度洗脱表见表 1。

表1 流动相洗脱梯度
Table 1 Gradient elution program

序号	时间(分钟)	缓冲盐溶液(%)	乙腈(%)
1	0	90	10
2	2.5	70	30
3	3	5	95
4	4.5	90	10
5	5	90	10

1.2.4 质谱条件:

电离方式: ESI (+) 毛细管电压: 1.0KV 离子源温度: 120℃ 二级锥孔电压: 30V 锥孔反吹气流量: 60L/h 去溶剂气温度: 400℃ 去溶剂气流量: 700L/h

2. 结果与讨论

2.1 提取与净化条件

左氧氟沙星属于氟喹诺酮类药物, 含有羧基和叔胺基, 从结构上决定了具有酸碱两性, 理论上提取方法可选择有机溶剂、酸性条件或碱性条件下水溶液提取, 考虑到提取后的浓缩问题, 选择使用有机试剂进行提取^[3]。本文分别试验乙腈、二氯甲烷和乙酸乙酯三种常用提取试剂, 对它们的提取效果进行了比较, 结果表明, 采用乙腈和二氯甲烷均能定量萃取这三种物质, 但乙腈能更有效地沉淀蛋白, 对类脂化合物溶解度又较小, 且减少杂质干扰, 更有利于提取, 后续过程也容易浓缩, 故选择使用乙腈; 加入无水硫酸钠可以去除样品中部分水分, 也可以加大研磨接触面, 提高分散效率, 促进样品均质的效果。

使用正己烷萃取是水产品兽药残留检测前处理过程中比较常用的除脂方式, 本法使用液液萃取法进行正己烷除脂, 有利于下一步浓缩后的净化效果; 对于水产品这类基质比较复杂、干扰物质较多的样品, 要获得比较好的净化效果, 去除仪器检测及样品基质的干扰, 采用固相小柱萃取成为目前通行的净化方式^[4]。本文参考杨方等^[5]使用乙酸铵提取液(pH=4.5)过 SPE 小柱(依次以甲醇、水、乙酸

铵缓冲液预淋洗处理过),以甲醇、氨水甲醇依次进行洗脱的方法进行净化洗脱。共比较了 OASIS MAX, OASIS MCX, OASIS HLB, C18, SUPELCLEAN LC-SCX 五种常用的 SPE 小柱,结果表明使用 SCX 小柱回收率相对较好, MCX 次之。对小柱进行预淋洗是为了消除小柱吸附剂上吸附的杂质及其对目标化合物的干扰,该化合物分子极性较强,所以对极性物质吸附能力较强的阳离子交换柱(SCX 柱或 MCX)比较合适,由于在酸性环境中喹诺酮类药物可以以完全离子化方式与 SPE 柱中的复合吸附剂作用,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^[6];用氨水甲醇进行洗脱,可以调节 pH 值

使离子化的待测化合物变为中性,进而将待测物洗脱出来。结果表明用上述方法使用 SCX 小柱进行净化,可达到去除杂质干扰及样品基质效应的效果,降低仪器检测检出限,且重现性好,结果稳定。

2.2 色谱条件的选择

本文使用超高效液相色谱仪(UPLC)对待测物进行分离,相对于传统的 HPLC 技术具有更高的分离效率、更快的出峰时间和更高的灵敏度。

氟喹诺酮类药物的液相分离通常使用反相色谱法,本文使用 UPLC 中最常用的 ACQUITY UPLC BEH C18 柱,采用梯度洗脱,分析时间短,整个过程只要 5min,左氧氟沙星出峰时间为 1.56min,(如表 2),且峰形良好(见图 1)。

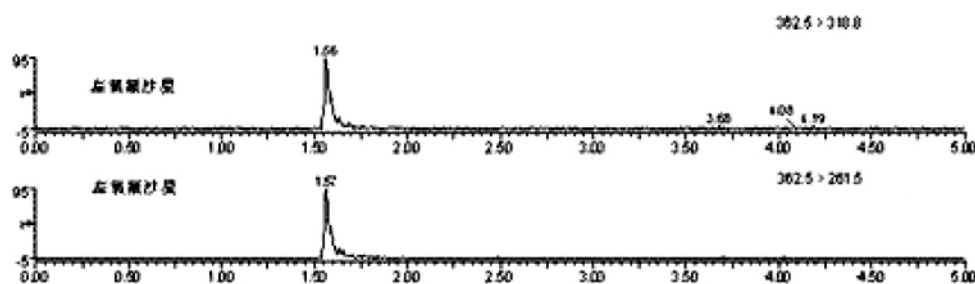


图1 左氧氟沙星在M RM 条件下两种子离子的谱图(10 μg/kg添加水平,进样量10 μL)

Fig.1: Double ion chromatograms of Levofloxacin in MRM(spiked level: 10μ g/kg, inject volume :10μ L)

甲醇、乙腈、水和缓冲盐体系是液相色谱常用的流动相组合,本文在试验过程中分别用了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-乙酸铵缓冲液和乙腈-乙酸铵缓冲液四种流动相体系对待测物进行分离,发现在质谱检测中使用乙腈作流动相在这几个待测物检测时相对灵敏度更高,峰型更佳,在水相中添加 5mmol/L 乙酸铵作为缓冲盐则出峰时间较为稳定,峰型也较好,在水相中添加 0.1%甲酸则是为了提高待测物在 ESI 正离子电喷雾中的离子化效率,以达到灵敏度更高的效果。因此本文采用含有 0.1%甲酸的 5mmol/L 乙酸铵缓冲盐溶液-乙腈的液相色谱

体系,分离度与灵敏度均能达到最佳。

2.3 质谱解析条件

本文中左氧氟沙星的 LC-MS/MS 检测的离子化模式为 ESI 正离子,在该模式下主要生成[M+H]⁺峰,选择 ESI(+),分别对电离电压、锥孔电压、离子源温度、去溶剂剂气温度、Rflens、碰撞能量等条件进行调谐,通过全扫描方式观察总离子流图,得到母离子峰,通过碰撞反应进行子离子扫描来确定所需要的定量和辅助定性离子,进而进行 MRM 测定。MRM 模式下母离子、子离子及调谐参数情况见表 2。

表2 左氧氟沙星在ESI(+)的M RM 模式下的质谱参数

Table 2: ESI(+) MS/MS parameters for Levofloxacin in MRM mode

待测物质 Compound	保留时间 RT	母离子 Parent ion	子离子 Daughter ion	驻留时间(秒) Dwell(s)	锥孔电压 Cone(V)	碰撞能量 Collision energy(eV)
左氧氟沙星 Levofloxacin	1.56	362.5	261.5*	0.05	30	25
		362.5	318.8	0.05	30	20

注:* 为定量离子

2.4 质谱解析结构分析初探

根据马彬等^[7]对氟喹诺酮类化合物的质谱分析推断, 本文比较了化合物的结构信息和质谱信息, 对左氧氟沙星进行了 MS / MS 质谱分析, 其裂解方式初步推断如下:

左氧氟沙星在软电离状态下中性丢失 CO₂ 后, 形成 m/z 318 子离子, 其哌嗪环取代基上再丢失一

中性分子丙烯胺形成 m/z 261 的子离子(如图 2)。

2.5 方法的线性范围、相关性及检出限实验

以空白鳊鱼样品为本底, 分别添加相当于 0 μg/kg、5 μg/kg、10 μg/kg、20 μg/kg、50 μg/kg、100 μg/kg 六种水平的待测物, 按本文方法进行基质加标回收曲线试验和检出限实验, 结果如表 3。

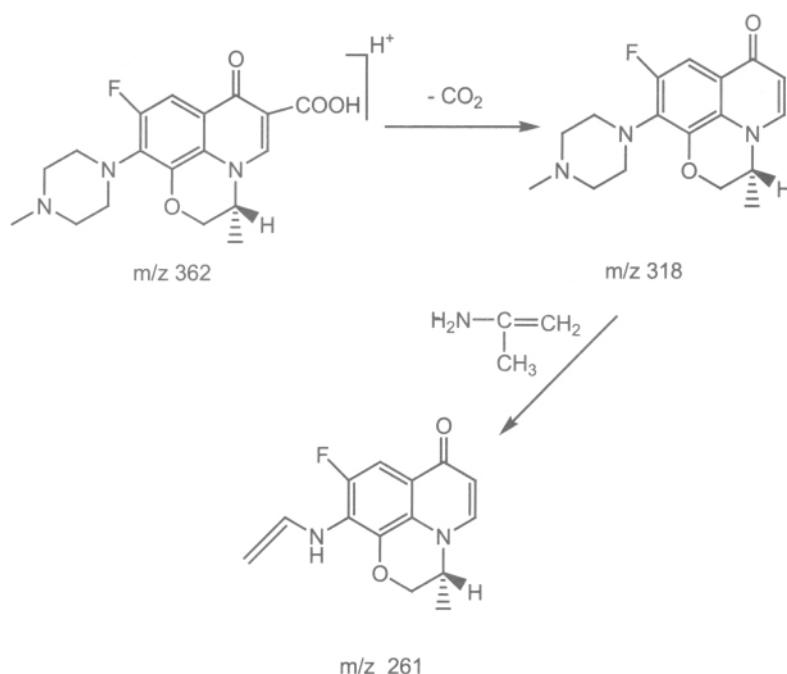


图2 左氧氟沙星m/z 362的MS裂解图

Fig.2 The MS fragmentation of Levofloxacin at m/z 362

表3 左氧氟沙星的线性方程、相关系数和检出限

Table 3: Regression equation, Coefficient correlation and Limit of detection of levofloxacin

化合物 compound	浓度范围 Concentration range(μ g/kg)	线性方程 Regression equation	相关系数 Coefficient correlation	检出限 Limit of detection(μ g/kg)
左氧氟沙星 Levofloxacin	0- 100	y=55.296x- 30.617	r=0.9922	4.5

2.6 方法的准确度和精密度实验

按上述方法进行鳊鱼、虾、罗非鱼三种水产样品中左氧氟沙星的基质加标试验回收率及精密度试验, 进行 10、20、50 μg/kg 三个添加水平, 每个加标水平同时做 6 个样品平行, 结果如表 4。

2.7 基质效应试验

对于生物样品的药物残留检测, 液质联用法普遍存在基质效应, 在实际检测中必须对基质效应进

行评估, 否则将影响数据的准确性^{[8][9]}。

采用提取后添加法建立数学模型评定基质效应在液质联用法中使用的最多, 而且, 此法可同时考察提取回收率^[10]。本试验比较了左氧氟沙星在 3 种不同样品基质以及 3 个不同条件下的信号峰面积值(加标浓度为 10 μg/kg), 其中, Set1: 纯的标准品溶液, Set2: 不同水产品样品基质提取后添加, Set3: 不同水产品样品基质提取前添加, 则基质效应

ME=Set2 / Set1 提取回收率 RE=Set3 / Set2 ,方法过程效率 PE=Set3 / Set1。

试验说明三种基质均存在不同程度的离子抑制作用 结果见表 5。

表4 三种样品基质中加标试验回收率及精密度(n=6)

Table 4 The results of recovery and precision in three matrix (n=6)

化合物 compound	添加水平 added level(μ g/kg)	鳗鱼 eel		虾 shrimp		罗非鱼 Tilapia fish	
		平均回收率 Recovery(%)	RSD (%)	平均回收率 Recovery(%)	RSD (%)	平均回收率 Recovery(%)	RSD (%)
左氧氟沙星 Levofloxacin	10 μ g/kg	79.5	9.5	72.5	7.9	75.6	11.5
	20 μ g/kg	83.5	8.3	79.5	11.4	80.5	8.3
	50 μ g/kg	80.1	10.1	81.7	11.2	77.2	11.3

表5 3个不同条件下的信号峰面积及基质效应回收率和过程效率的计算结果

Table 5 Results for signal peak areas ,matrix effects ,recoveries and process efficiencies obtained under three different conditions

化合物 compound	基质 matrix	峰面积 peak area			ME%	RE%	PE%
		set1	set2	set3			
左氧氟沙星	鳗鱼	6073	4289	3579	71	83	59
	虾	6207	4322	3455	70	80	56
	罗非鱼	6317	4401	3601	70	82	57

3 结论

本文建立了固相萃取 - 超高效液相色谱串联质谱法检测水产品中左氧氟沙星药物残留的方法。对前处理过程的提取、净化方式以及仪器检测的条件进行了探讨与优化,并对基质效应和质谱解析进行了讨论,以基体加标曲线进行实际样品的残留定量。实践证明,该检测方法快速高效,灵敏度高,基体干扰少,该药物的回收率在 72.5% ~83.5% 内,相对标准偏差(RSD)在 7.9~11.4% 之间。准确度与精密度均令人满意,可以满足水产品中相关药物的实际检测要求。

参考文献

- [1] Donghui Bao, Thanh-Thai Truong, Paul J. Renick et al, Simultaneous determination of rifampicin and levofloxacin concentrations in catheter segments from a mouse model of a device-related infection by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J], Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2008 46 :723 - 727.
- [2] Justin M. Conley, Steven J. Symes, Scott A. Kindelberger et al,

Rapid liquid chromatography - tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water [J] Journal of Chromatography A, 2008 ,1185 ,206 - 215.

- [3] 李佐卿 倪梅林 章再婷等 高效液相色谱法检测水产品中喹诺酮类药物残留[J] 现代科学仪器,2006,3 :70- 71.
- [4] 姜宁,刘芄岩,吴伟 固相萃取技术及其在氟喹诺酮类兽药残留分析中的应用 [J] 河北大学成人教育学院学报, 2006,12 8(4) :126- 128.
- [5] 杨方,庞国芳,刘正才等 液相色谱-串联质谱法检测水产品中 15 种喹诺酮类药物残留量[J] 分析试验室 2008,12 27 (12): 27- 33.
- [6] 孙雷,朱馨乐,刘琪等 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[J] 中国兽药杂志 2008 42(3) :12-15.
- [7] 马彬,孙玉明,陈笑艳等 氟喹诺酮类化合物的电喷雾离子阱质谱分析[J] 质谱学报 2006 8 27(3): 163- 167.
- [8] 向平,沈敏,卓先义 液相色谱 - 质谱分析中的基质效应[J] 分析测试学报 2009 ,28(6) :753- 756.
- [9] 齐美玲 液相色谱-质谱法在生物样品药物定量分析中的基质效应[J] 药物分析杂志 2005 25(4) :476- 479.
- [10] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS [J] Anal. Chem.2003, 75 :3019- 3030.