

UPLC-MS/MS 检测鸡蛋中 22 种喹诺酮类药物残留方法的研究

杨盛茹¹, 张恒业¹, 张煌¹, 刘洪斌²

(1. 河南牧业经济学院食品工程学院, 河南郑州 450046) (2. 中国动物疫病预防控制中心, 北京 102609)

摘要: 应用超高效液相色谱串联质谱建立鸡蛋中加雷沙星、曲伐沙星、莫西沙星、奥比沙星、吉米沙星、加替沙星、培氟沙星和环丙沙星等 22 种喹诺酮类药物残留检测方法。样品经过 2% 甲酸乙腈提取、正己烷分步去脂, Oasis HLB 柱净化后, 经 Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 以甲醇和 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 双通道 MRM 信号采集模式, 22 种喹诺酮类药物能在 11 min 完好分离, 方法的最低定量限均低于 1.0 μg/kg, 在 2.0~100.0 μg/L 浓度范围内, 22 种喹诺酮类药物线性良好, 相关系数均在 0.99 以上; 通过 2、10、20 g/kg 三个浓度的加标回收实验表明, 回收率为 60.1%~96.2%, RSD% 值为 1.44%~11.1%。该方法相比现有国标检测药物种类多, 新型药物多, 对更全面筛查和确证鸡蛋中喹诺酮类药物残留, 防范非法添加造成安全隐患具有一定的参考价值。

关键词: 鸡蛋; 喹诺酮类; UPLC-MS/MS

文章编号: 1673-9078(2017)8-262-268

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.8.038

Simultaneous Determination of Twenty-two Quinolone Residues in Eggs Using Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

YANG Sheng-ru¹, ZHANG Heng-ye¹, ZHANG Huang¹, LIU Hong-bin²

(1. College of Food Engineering, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

(2. China Animal Disease Control Center, Beijing 102609, China)

Abstract: A multiresidue method for the determination of twenty-two quinolone residues (garenoxacin, trovafloxacin, moxifloxacin, orbifloxacin, gemifloxacin, gatifloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin, etc.) in eggs was developed based on ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). In this method, the analytes were extracted using acidified (2%) acetonitrile, degreased by *n*-hexane, and purified through an Oasis HLB SPE column. The twenty-two quinolones were separated on an Acquity UPLC BEH Shield RP18 column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), using methanol and 0.1% formic acid as the mobile phases for gradient elution. The signals were acquired through the dual-channel multiple reaction monitoring (MRM) mode. All analytes could be well separated by using a gradient program of 11 minutes. The calibration curves of the twenty-two quinolones showed good linearity in the concentration range of 2.0~100.0 μg/L ($r > 0.99$), and the limits of quantitation were all less than 1.0 μg/kg. The recoveries of the 2, 10 and 20 μg/kg spiked samples ranged from 60.1% to 96.2%, with RSDs of 1.44%~11.1%. Compared with the existing national standard, this new method has the advantage of detecting more types of quinolone drugs, especially the new ones. The new method has a certain reference value for a more comprehensive screening and identification of quinolone residues in eggs and prevention of illegal additions.

Key words: eggs; quinolones; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

喹诺酮类(quinolones, QNs)是一类人工合成抗菌

收稿日期: 2016-12-05

基金项目: 十二五国家科技支撑计划项目(2014BAD13B05); 河南省重点科技攻关项目(162102210107)

作者简介: 杨盛茹(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事食品质量安全研究

通讯作者: 刘洪斌(1985-), 男, 工程师, 主要从事动物产品质量安全研究

药物, 因具有高效谱广、价格低廉和无交叉耐药性等优点, 被广泛用于动物疾病治疗、预防及促生长方面。但随着养殖过程中喹诺酮类药物的不规范使用, 一方面会导致动物产品中喹诺酮类药物残留问题, 另一方面长期使用存在细菌耐药性问题, 其对动物产品质量和消费者身体健康带来极大安全隐患^[1,2], 因此国内外

对喹诺酮类药物的禁用和限用都有严格规定。

2002年我国农业部第235公告中对动物性食品中兽药最高残留限量进行了要求,其中对喹诺酮类药物在动物性食品中残留限量进行了明确,2003年农业部第278公告指出达氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、诺氟沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、二氟沙星、沙拉沙星和洛美沙星等各种制剂在产蛋鸡中禁用,2015年农业部第2292号公告决定在食品动物中停止使用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星和诺氟沙星4种兽药。虽然我国对家禽养殖环节喹诺酮类药物的使用和禁用有明确规定,但从历年监测数据可以看出鸡蛋、鸡肉中喹诺酮类药物残留问题仍然突出,同时随着对喹诺酮类药物禁用药物范围的扩大,新型喹诺酮类药物用于动物生产的风险也越来越大。目前鸡蛋喹诺酮类药物残留检测文献较多^[3-7],但大多药物种类较少,且不涵盖莫西沙星、加替沙星等新型喹诺酮类药物,因此建立适用于鸡蛋中更大范围的喹诺酮类药物残留同时检测的定量方法势在必行。

本文建立鸡蛋中22种喹诺酮类药物的超高效液相串联质谱检测方法,方法灵敏度高,稳定性好,22种喹诺酮类药物能在11min内得到较好分离,方法的最低定量限均低于1.0 μg/kg,方法满足鸡蛋中喹诺酮类药物残留检测要求。

1 材料与amp;方法

1.1 原料

加雷沙星、曲伐沙星、莫西沙星、奥比沙星、吉米沙星、加替沙星、氟罗沙星、马波沙星、那氟沙星、氟甲喹、诺氟沙星、吡哌酸、萘啶酸、培氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星、恩诺沙星、达氟沙星、洛美沙星、二氟沙星、司帕沙星和沙拉沙星购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度均在97%以上;乙腈、甲醇、乙酸、甲酸和正己烷等有机溶剂均为色谱纯,购自美国 Fisher 公司; Waters Oasis HLB SPE 柱(200 mg, 6

cc) 购于美国 waters 公司。

将标准品用甲醇配成单标母液,并配制10 μg/mL混合储备液于-20℃保存,使用时现配成系列标准工作液;鸡蛋购于超市,经LC-MS/MS分析确认为阴性样本。

1.2 仪器设备

超高效液相色谱仪(Acquity UPLC)配三重四级杆质谱仪(quattro premier XE),美国 waters 公司;3K15型离心机,美国 sigma 公司;纯水仪,美国 millipore 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 前处理过程

提取:准确称取经匀质的鸡蛋样品5g于50 mL离心管中,加入10 mL、2%(体积比)甲酸乙腈,涡旋震荡10 min,提取液经过9500 r/min离心5 min,取上清液于另一50 mL离心管中,再用10 mL、2%甲酸乙腈重复提取一次,合并提取液,然后提取液加入20 mL正己烷除脂,涡旋震荡10 min,9500 r/min离心5 min,弃去正己烷层,下层提取液50℃吹至近干,并用2%甲酸水溶液溶解。

净化:将提取液全部转移至经3 mL甲醇和3 mL水、2%甲酸水活化的HLB柱中,然后用4 mL、10%甲醇淋洗,流速1~2 d/s,用5 mL甲醇洗脱,50℃氮气吹至近干,用流动相定容至1 mL,12000 r/min离心10 min,0.22 μm滤膜过滤待上机测定。

1.3.2 液相条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH Shield RP18 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流速:0.25 mL/min;流动相A:甲醇;B:0.1%甲酸水溶液,0~5 min,10% A线性变化至35%;5~8 min,35% A线性变化至90%;8~8.5 min,90% A保持不变;8.5~9 min,90% A线性变化至10%,9~13 min,10% A保持不变。

1.3.3 质谱条件

表1 22种喹诺酮类药物的检测离子、对应质谱参数及保留时间

Table 1 Detected ions, relevant mass spectrometer parameters, and retention times of 22 quinolones

名称	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	聚焦电压/V	碰撞电压/V	保留时间 t/min
加雷沙星	427.4	286.2	30	30	6.93
		366.3*		20	
曲伐沙星	417.3	330.2*	25	35	6.94
		399.4		20	
莫西沙星	402.4	261.1	30	23	6.14
		384.4*		25	

转下页

接上页

吉米沙星	390.4	313.3 372.3*	30	28 20	6.66
加替沙星	376.4	261.2 358.3*	35	30 20	5.58
奥比沙星	396.4	295.2 352.3*	28	22 18	4.80
氟罗沙星	370.4	269.2 326.3*	28	26 20	3.90
马波沙星	363.4	71.8* 320.3	28	20 15	3.71
那氟沙星	361.3	283.4 343.2*	25	35 22	8.24
氟甲喹	262.2	202.0 244.1*	25	30 20	7.91
诺氟沙星	320.0	276.2* 302.2	30	15 20	4.56
吡哌酸	304.0	189.0 217.1*	30	30 20	3.44
萘啶酸	233.0	187.0 215.0*	20	25 15	7.63
培氟沙星	334.2	290.2 316.2*	35	15 20	4.31
环丙沙星	332.1	288.1 314.1*	30	18 23	4.69
氧氟沙星	362.1	261.1 318.1*	30	25 20	4.21
恩诺沙星	360.2	245.1 316.2*	30	25 18	4.72
达氟沙星	358.2	283.1 340.1*	30	21 20	4.69
洛美沙星	352.1	265.1* 308.1	30	23 15	4.77
二氟沙星	400.2	356.1 382.1*	30	20 25	5.08
司帕沙星	393.1	292.2 349.2*	35	25 20	6.04
沙拉沙星	386.2	299.1 342.2*	30	27 19	5.34

电离模式: ESI+; 毛细管电压: 3.0 kV; 萃取锥孔电压: 3 V; RF 透镜电压: 0.5 V; 源温: 110 °C; 脱溶剂温度: 350 °C; 锥孔气流速: 50 L/h; 脱溶剂气流速: 550 L/h; 碰撞气流速: 0.18 mL/min; 采集模式: 双通道 MRM; 各种药物优化母离子和子离子及对应聚焦电压和碰撞电压值见表 1。

2 结果与讨论

2.1 提取液选择

喹诺酮类药物分子结构中存在羧基和叔胺基, 具有酸碱两性性质, 易溶于极性和水溶性有机溶剂, 酸、

碱溶液中, 文献报道^[8-10]动物性食品中喹诺酮类药物提取剂有有机溶剂、酸性有机溶剂和缓冲盐溶液为主, 本文通过空白鸡蛋样品添加 20 μg/kg 喹诺酮类混标溶液, 分别选取甲醇、乙腈、1%乙酸乙腈、2%乙酸乙腈、1%甲酸乙腈和 2%甲酸乙腈为提取溶剂处理鸡蛋样品, 经 UPLC-MS/MS 检测发现: 当甲醇处理样品, 蛋白沉淀差, 离心效果不好, 回收率较低; 乙腈及酸化乙腈处理样品时, 沉淀蛋白较完全, 试验表明酸化乙腈比纯乙腈做为提取溶剂, 提取效率更好; 虽然加入甲酸和乙酸提取效果相差不大, 但加酸量的多少对提取效果影响较大, 通过图 1 可以看出 2%甲酸乙腈提取效果最好, 22 种喹诺酮类药物回收率均能达到 60%以上。

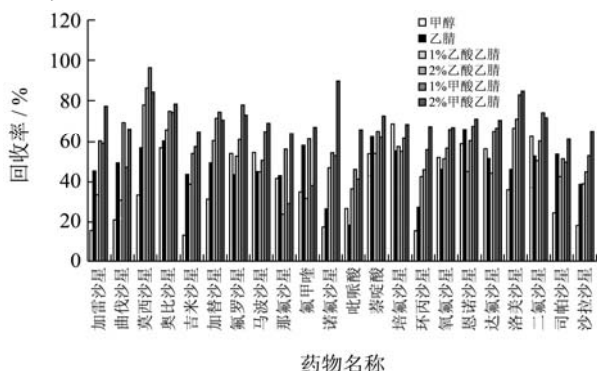


图 1 不同提取溶剂下提取回收率

Fig.1 Recoveries obtained by different extracting solvents

2.2 固相萃取条件优化

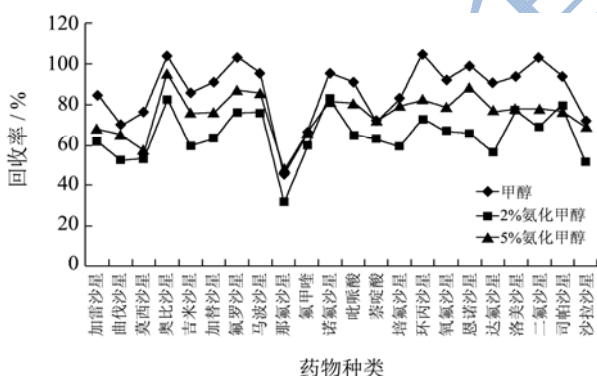


图 2 不同洗脱溶剂下提取回收率

Fig.2 Recoveries obtained by different eluents

因为鸡蛋成分相对于其他动物组织较为复杂, 为进一步净化目标提取物, 提高灵敏度, 实验选取空白鸡蛋样品添加 20 μg/kg 喹诺酮类混标溶液, 经 2% 甲酸乙腈提取, 正己烷除脂后, 参照农业部 2086 号公告和文献方法^[11-13], 对提取液进行 SPE 柱净化, 并对纯化条件进行优化。SPE 柱选择 Waters Oasis HLB SPE 柱, 60 mg/3cc 和 200 mg/6cc 两种 (标号 H3H6); 淋洗溶液选择: (1) 4 mL H₂O、(2) 4 mL、5% 甲醇水、

(3) 4 mL、10% 甲醇水; 洗脱溶液选择 (1) 5 mL 甲醇、(2) 5 mL、2% 氨水甲醇、(3) 5 mL、5% 氨水甲醇, 实验结果表明, 60 mg/3cc 和 200 mg/6cc 两种 SPE 柱对净化喹诺酮类药物没有明显区别; 收集三种淋洗液进行检测也均未发现有喹诺酮类药物被淋洗掉, 考虑到甲醇含量加大可以较好去除有机杂质, 因此试验选取 10% 甲醇作为淋洗溶剂; 而通过图 2, 三种洗脱溶液对比试验可以看出, 甲醇的洗脱效果要优于氨化甲醇, 因此最终试验选择 5 mL 甲醇作为洗脱溶剂。

2.3 基质效应

基于鸡蛋样本含有更多的卵磷脂、胆固醇和核黄素, 大大增加了基质的复杂性, 因此试验设计基质效应对照试验, 按照 1.3.1 方法处理空白鸡蛋样本, 然后添加 20 μg/kg 混合标准溶液制成基质加标溶液, 与溶剂加标溶液进行比较, 结果发现 22 种药物均存在不同程度的基质抑制作用, 其中奥比沙星、氧氟沙星、洛美沙星、沙拉沙星回收率略高于 60%, 因此在检测过程中应采用基质加标溶液, 消除基质效应的影响。不同药物基质抑制程度见图 3。

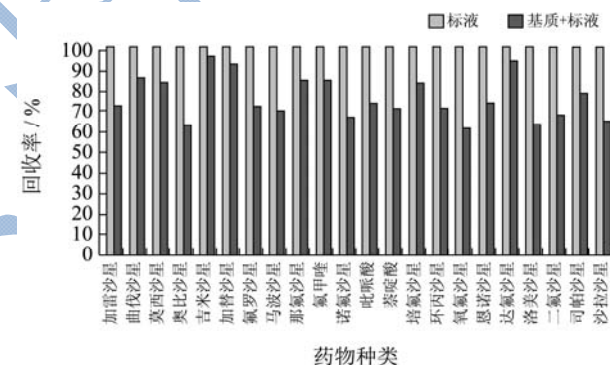


图 3 鸡蛋中基质效应图

Fig.3 The matrix effect in eggs

2.4 线性方程及灵敏度实验

实验采用空白鸡蛋样品经 1.3.1 方法处理, 在 2.0~100.0 μg/L 浓度范围内分别添加喹诺酮类药物混标溶液, 配制 2.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μg/L 基质加标溶液, 依次进样, 以色谱峰面积为纵坐标, 化合物浓度为横坐标做标准曲线, 实验结果表明 2.0~100.0 μg/L 范围内线性良好, 相关系数均大于 0.99, 结果见表 2。

将处理好的空白鸡蛋样品逐级稀释标准溶液, 按 10 倍信噪比确定方法的定量限 (LOQ) 结果见表 2。

2.5 回收率实验

取空白鸡蛋样品, 添加浓度为 2、10 和 20 μg/kg

三个水平混标溶液, 每个浓度 6 个平行, 按 1.3.1 方法进行添加回收实验, 添加样品总离子图见图 4, 回收

率在 60.1%~96.2%, RSD%值为 1.44%~11.1%之间, 结果见表 2。

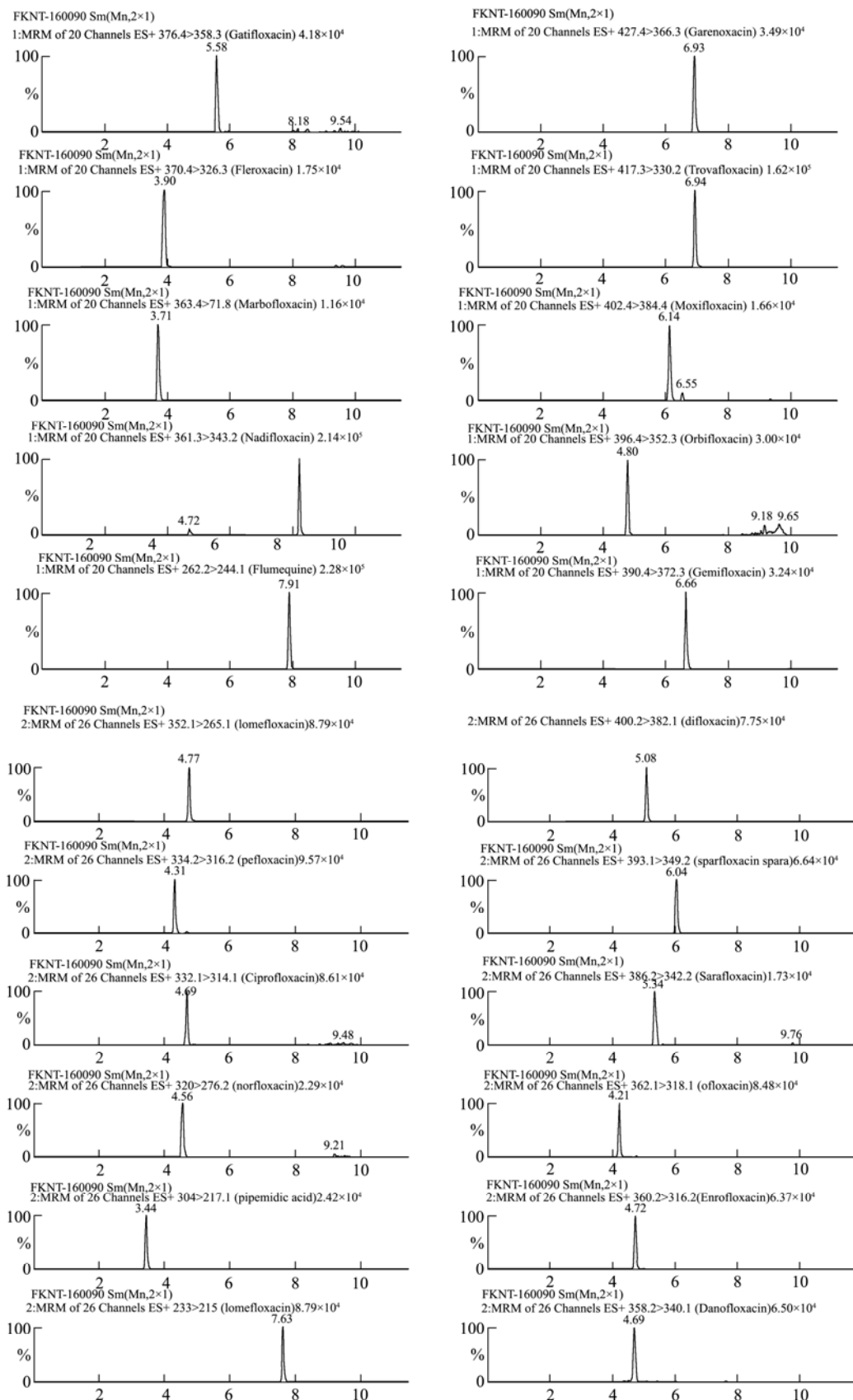


图 4 空白鸡蛋基质中添加 10 µg/kg 喹诺酮类药物色谱图

Fig.4 Chromatograms obtained from blank eggs spiked with 10 µg/kg of quinolones

2.6 实际样品检测

使用建立方法对全国不同城市超市抽检的 38 份鸡蛋样品进行测定, 其中编号为 FT1605001 和

FT1605012 的样品分别检出环丙沙星含量为 56.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和恩诺沙星 6.32 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 检出率为 5.26%, 证实该方法适用于鸡蛋中喹诺酮类药物检测。

表 2 鸡蛋中 22 种喹诺酮类药物添加回收率、RSD 值、线性系数及定量限值 (n=6)

Table 2 Spiked recoveries, RSDs, linear coefficients, and the limits of quantitation of 22 quinolones in eggs (n=6)

化合物	2 $\mu\text{g}/\text{kg}$		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		20 $\mu\text{g}/\text{kg}$		相关系数	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%		
加雷沙星	67.3	5.23	63.3	3.16	68.3	2.29	r=0.9994	1.0
曲伐沙星	65.4	6.61	67.8	2.01	61.6	3.36	r=0.9964	0.3
莫西沙星	64.7	9.57	67.2	4.17	72.6	5.74	r=0.9920	1.0
奥比沙星	82.0	10.2	83.8	2.32	83.1	3.09	r=0.9963	1.0
吉米沙星	62.8	5.11	66.1	6.31	64.5	6.15	r=0.9960	1.0
加替沙星	61.6	5.32	72.4	6.46	76.0	4.28	r=0.9969	0.6
氟罗沙星	64.5	8.83	74.4	6.39	82.2	7.72	r=0.9977	1.0
马波沙星	62.5	7.08	65.2	6.28	65.9	4.53	r=0.9942	1.0
那氟沙星	66.4	11.1	62.9	9.32	66.0	3.88	r=0.9989	1.3
氟甲喹	65.7	7.09	61.7	6.41	76.0	5.27	r=0.9975	0.3
诺氟沙星	63.2	3.77	63.8	4.27	75.4	2.02	r=0.9936	1.0
吡哌酸	60.1	8.41	72.0	6.76	96.2	4.63	r=0.9954	1.0
萘啶酸	73.8	6.09	85.2	5.82	79.1	3.11	r=0.9964	1.0
培氟沙星	63.6	9.35	67.9	4.63	62.8	5.03	r=0.9989	1.0
环丙沙星	74.1	3.19	65.0	2.55	88.4	1.96	r=0.9903	0.8
氧氟沙星	64.6	4.63	70.5	6.02	75.0	2.53	r=0.9959	0.8
恩诺沙星	65.5	5.25	71.0	1.44	89.5	4.08	r=0.9905	1.2
达氟沙星	61.5	7.52	67.3	6.31	62.9	4.73	r=0.9968	0.7
洛美沙星	61.7	9.16	65.6	8.48	83.7	7.49	r=0.9924	0.3
二氟沙星	74.7	4.37	71.7	7.22	79.5	5.32	r=0.9968	1.0
司帕沙星	65.2	9.24	62.0	6.39	72.5	5.04	r=0.9957	1.0
沙拉沙星	60.9	6.43	60.7	5.23	74.3	2.05	r=0.9960	0.8

3 结论

本实验针对基质复杂的鸡蛋样本, 建立了包括莫西沙星、加替沙星等新型喹诺酮类药物在内的 22 种喹诺酮药物同时检测的 UPLC-MS/MS 检测方法, 方法灵敏度高, 稳定性好, 能够满足鸡蛋中喹诺酮类药物残留检测要求, 为禽蛋中多种喹诺酮类同时确证检测标准制定提供一定技术参考。

参考文献

[1] 董书云, 陈慧慧, 王琼, 等. 喹诺酮类药物的严重不良反应及临床合理应用[J]. 中华全科医学, 2014, 12(12): 1998-2000
DONG Shu-yun, CHEN Hui-hui, WANG Qiong, et al. Serious ADRs of quinolones and clinical rational application [J]. Chinese Journal of General Practice, 2014, 12(12):

1998-2000
[2] 周珊, 范秀珍, 周小玲. 氟喹诺酮类药物致不良反应 128 例分析[J]. 临床合理用药, 2013, 6(11): 29-30
ZHOU Shan, FAN Xiu-zhen, ZHOU Xiao-ling. Analysis of 128 cases of adverse drug reactions induced by fluoroquinolones [J]. Chin. J. of Clinical Rational Drug Use, 2013, 6(11): 29-30
[3] Jiménez V, Companyó R, Guiteras J. Validation of a method for the analysis of nine quinolones in eggs by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Talanta, 2011, 85(1): 596-606
[4] Rocha D G, Santos F A, Da Silva J C, et al. Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid

- chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1379: 83-91
- [5] Zeng Z L, Dong A G, Yang G, et al. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography B, 2005, 821(2): 202-209
- [6] 刘媛,谢孟峡,丁岚,等.高效液相色谱同时测定鸡蛋中 4 种喹诺酮类药物残留[J].分析化学,2004,35(3):352-355
LIU Yuan, XIE Meng-xia, DING Lan, et al. Simultaneous determination of four fluoroquinolones in eggs by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2004, 35(3): 352-355
- [7] 彭涛,雍炜,安娟,等.反相高效液相色谱/质谱法同时测定鸡肉中 5 种喹诺酮类药物残留[J].分析化学,2006,34(9):10-14
PENG Tao, YONG Wei, AN Juan, et al. Simultaneous determination of residues of five quinolones in chicken muscle by reversed phase high performance liquid chromatography with quadrupole rods tandem mass spectrometric detection [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(9): 10-14
- [8] 李佩佩,郭远明,陈雪昌,等.色谱法检测动物源食品中喹诺酮类药物残留研究进展[J].食品科学,2013,34(3):303-306
LI Pei-pei, GUO Yuan-ming, CHEN Xue-chang, et al. Chromatographic detection of quinolones residues in animal tissues [J]. Food Science, 2013, 34(3): 303-306
- [9] 杨方,庞国芳,刘正才.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].分析实验室,2008,27(12):27-33
YANG Fang, PANG Guo-fang, LIU Zheng-cai. Simultaneous determination of 15 quinolones in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2008, 27(12): 27-33
- [10] Samandou V, Evaggelopoulos E, Trotsmullerm, et al. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 1203(2): 115-123
- [11] 农业部,中华人民共和国农业部公告第 2086 号[S]
Ministry of agriculture, Announcement No. 2086th of the ministry of agriculture of People's republic of China [S]
- [12] 李海燕,李小微,李娜,等.鸡蛋中 9 种喹诺酮类药物多残留检测方法的建立及甲磺酸培氟沙星在鸡蛋中的消除研究[J].中国兽医杂志,2008,44(5):84-86
LI Hai-yan, LI Xiao-wei, LI Na, et al. Study on the establishment of detection method of 9 quinolones residues and eliminating of pefloxacin in the eggs [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2008, 44(5): 84-86
- [13] 田媛,张尊建,李静,等.固相萃取-LC-MS/MS 测定鸡蛋中喹诺酮类药物残[J].中国药科大学学报,2010,41(1):60-65
TIAN Yuan, ZHANG Zun-jian, LI Jing, et al. Multiresidue determination of fluoroquinolones in eggs by solid-phase extraction-LC-MS/MS [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2010, 41(1): 60-65