

# 液相色谱-串联质谱结合谱库检索测定猪组织中 13种氟喹诺酮类药物

蔡勤仁<sup>1</sup>, 冯家望<sup>1</sup>, 张毅<sup>1</sup>, 彭玉芬<sup>1</sup>, 薛良辰<sup>1</sup>, 余以刚<sup>2</sup>

(1. 珠海出入境检验检疫局技术中心, 广东珠海 519015) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 采用MRM→IDA→EPI→谱库检索模式建立了猪组织中13种氟喹诺酮类药物的液相色谱-电喷雾串联质谱多残留检测方法, 结合谱库检索功能同时实现了定性定量分析。组织样品经N,N-二甲基甲酰胺-乙腈混合溶液提取, Waters HLB柱净化, 本方法13种氟喹诺酮类药物的线性范围为1.0~5000.0 μg/kg, 线性相关系数良好( $r > 0.99$ ); 在2.0~20.0 μg/kg的添加水平范围内的平均回收率为81.6~114%; 相对标准偏差为1.1~11.2%; 方法检出限为0.1~0.5 μg/kg。

**关键词:** 氟喹诺酮; 猪组织; 液相色谱串联-质谱; 谱库

**文章编号:** 1673-9078(2011)1-109-113

## Determination of Fluoroquinolones in Pig Tissues by LC-MS/MS Combining with Spectral Library Search

CAI Qin-ren<sup>1</sup>, FENG Jia-wang<sup>1</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>, PENG Yu-fen<sup>1</sup>, XUE Liang-chen<sup>1</sup>, YU Yi-gang<sup>2</sup>

(1. Zhuhai Inspection & Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

(2. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** MRM→IDA→EPI→spectral library search model was used to establish a HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry method for the multi-residue detection of fluoroquinolones in pig tissues. The quantitative and qualitative analysis of the target analyses were achieved by LC-MS/MS combining with spectral library search function. Tissue samples were extracted with N,N-Dimethylformamide and acetonitrile, purified with Waters HLB column, The analytical method in the present study was well validated and good results were obtained with respect to precision, repeatability and spiked recovery. The limit of detection of residues was 0.1~0.5 μg/kg for fluoroquinolones, and with a linear range from 1.0 to 5000 μg/kg. The mean recovery was of 81.6%~114% and RSD was of 1.1%~11.2%.

**Key words:** fluoroquinolones; pig tissues; LC-MS/MS; spectral library

氟喹诺酮类药物是一族人工合成的抗菌药, 因其具有抗菌谱广、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, 被广泛应用于畜牧、水产等养殖业中。该类药物长期使用会造成动物性食品中喹诺酮类药物残留, 从而对人体造成危害。欧盟(EU), 联合国粮农组织(FAO), 世界卫生组织(WHO), 食品添加剂与污染物联合专家委员会(JEC-FA) 1990年就规定了几种喹诺酮的最大残留量, 在我国, 恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、氟哌酸、氧氟沙星等氟喹诺酮类药物在蜂产品中的残留量不得超过 10 μg/kg<sup>[1]</sup>。目前氟喹诺酮类药物的测定方法可以概括地划分为微生物法<sup>[2]</sup>、酶联免疫法<sup>[3-4]</sup>、色谱法<sup>[5-9]</sup>和

液相色谱-质谱联用技术<sup>[10-14]</sup>等。微生物抑制法是一种价格低廉、操作简便的初筛方法。但这种方法在较低限量水平时不够灵敏, 且由于具备抑菌作用的抗生素种类繁多, 干扰因素较多, 假阳性较高。免疫分析技术灵敏度较高、快速简便, 但存在交叉反应及假阳性问题。色谱法是最常见的分析方法, 但选择性差, 常见的液液萃取和固相萃取法都不能有效地去除干扰杂质, 给分析带来一定的困难, 近年来, 随着液相色谱-质谱联用技术的发展, 这种技术灵敏度高、定性准确, 可实现多种物质的同时定量与确证, 是该类药物分析的主要方法<sup>[15-16]</sup>。

本研究选择常见的13种氟喹诺酮类药物为研究对象, 建立相应的液相色谱串联质谱谱库, 结合谱库检索建立猪组织中13种氟喹诺酮类药物LC/MS/MS多残留检测方法, 国内外未见类似研究的报道。

收稿日期: 2010-09-27

基金项目: 珠海市科技计划项目(PC20081001)

作者简介: 蔡勤仁(1974-), 男, 博士, 主要从事食品安全方向的研究

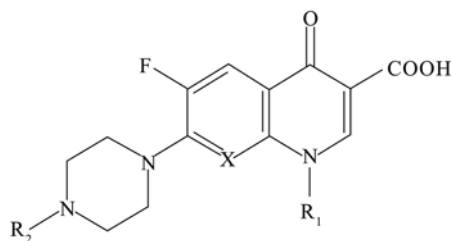


图1 氟喹诺酮类药物结构式

Fig.1 Structure of fluoroquinolones

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, API 4000 Q-Trap 三重四极质谱仪、配有电喷雾离子源; Agilent 固相萃取仪; JOUAN MR23i 离心机; Zymark TurboVap<sup>®</sup> LV 浓缩站; 恒温水浴振荡器等实验室常用设备。

Waters Oasis HLB 萃取小柱(6 mL, 200 mg), 环丙沙星、培氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、单诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、二氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、萘啶酸标准品, 购于 Dr.Ehrenstorfer 公司。用少量乙腈溶解, 色谱纯甲醇定容配制 1 mg/mL 标准储备液, 再根据需要稀释成适当含量的标准工作液, 4 °C 下保存, 有效期为 2 个月。乙酸铵、乙腈均为色谱纯, N,N-二甲基甲酰胺等所用试剂除注明外均为分析纯, 水为超纯水。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: YMC C18 2.1×150 mm, 3 μm, 保护柱: zorbax xdb-C8 2.1×12.5 mm, 流动相: 溶剂A是 5 mmol/L 乙酸铵缓冲溶液, 溶剂B是纯乙腈, 梯度洗脱, 在 0 至 5 min 内溶剂A 体积分数从 95% 线性减少到 55%, 然后保持 8 min, 在 13.1 min 时溶剂A 的体积分数改至 95% 并平衡 7 min, 流速 0.3 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL。

### 1.3 质谱条件

离子源: ESI; 雾化气 65 mL/min, 气帘气 20 mL/min, 辅助加热气 70 L/min, 辅助加热气温度 700 °C, 碰撞气 5 mL/min, 4 种气体均为氮气; Q1 和 Q3 均为单位分辨率; ESI 模式、去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能(collison energy, CE)见表 1。

### 1.4 LC-MS/MS 谱库

分别用高、中、低三种碰撞能量对 13 种氟喹诺酮类药物进行 EPI 扫描, 并用 Access 编写 13 种氟喹诺酮类药物液相色谱串联质谱数据库, 包括分子式、分子量、CAS 编号、化学名、结构图等。

### 1.5 样品处理

准确称取 5.0 g 样品(准确至 0.01 g)至 50 mL 离心管中, 加入 25 mL N,N-二甲基甲酰胺-乙腈(2+8, V/V), 均质 30 s, 水浴超声 10 min, 12000 r/min 高速离心 5 min。吸取 10 mL 上清液, 45~50 °C 氮气浓缩至 1 mL, 加入 5 mL 水, 于涡旋振荡器振荡 30 s, 待净化。将提取液以约 1~2 mL/min 的流速全部过 Oasis HLB(6 mL, 200 mg) 固相萃取小柱, 先后以 6 mL 水、6 mL 20% 甲醇淋洗, 弃去淋洗液, 抽干, 用 6 mL 5% 氨甲醇溶液洗脱, 收集洗脱液于 25 mL 鸡心瓶, 50 °C 旋转蒸发至干, 上述残渣加 1 mL 10% 乙腈溶解, 于涡旋振荡器振荡 1 min, 过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱-串联质谱测定。

### 1.6 检测模式

MRM→IDA→EPI→谱库检索

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理方法

沙星类药物是酸碱两性物质, 常见的提取方法可分为 3 种类型, 一种是在中性条件下用有机溶剂萃取, 这类药也可在碱性条件下提取, 如用氨水-乙腈溶液提取, 还可以在酸性条件下提取, 如采用乙酸-乙腈溶液等。本试验中分别采用了多种溶剂组合进行提取试验, 发现直接用乙腈提取对所有化合物的回收率都符合要求, 并考虑在乙腈中加入 0.1 mol/L 盐酸、0.1 mol/L 氨水、N,N-二甲基甲酰胺等溶剂来提高效率, 实验结果发现 N,N-二甲基甲酰胺-乙腈(2+8, V/V) 提取效率最佳, 本文选用 N,N-二甲基甲酰胺-乙腈作为提取溶剂。采用 N,N-二甲基甲酰胺-乙腈作为提取溶剂进行提取药物残留, 所提取出的杂质较多, 去除样品提取液中的杂质是重要的净化步骤。近年来, 固相萃取成为药物残留分析的主要净化方式, 对常用的 C18 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取柱和阳离子交换柱(SCX、MCX) 对 13 种沙星类药物的萃取效率进行了对比研究, 实验结果表明, Oasis HLB 固相萃取柱萃取效率最高, C18 固相萃取柱次之、阳离子交换柱(SCX、MCX) 最差。另外, 我们分别比较了 60 mg/3cc Oasis HLB 固相萃取柱和 200 mg/6cc Oasis HLB 固相萃取柱两种柱子的回收率, 实验结果发现, 采用 200 mg/6cc Oasis HLB 固相萃取柱的回收率在 75% 以上, 采用 60 mg/3cc Oasis HLB 固相萃取柱的回收率在 50%~78%, 因此本方法采用 200 mg/6cc Oasis HLB 固相萃取柱为净化柱。

表 1 氟喹诺酮类药物部分质谱参数

Table 1 Partial parameters of MS/MS analysis for fluoroquinolones

测定物质	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	CE /eV	DP /eV	ESI 模 式
氟甲喹	262.2	244.10*	25.0	90	+
		202.1	41.0		
恶喹酸	262.2	216.1*	41.0	90	+
		244.1	25.0		
萘啶酸	233.1	215.2*	23.0	90	+
		187.0	37.0		
诺氟沙星	320.3	276.1*	25.0	90	+
		302.1	27.0		
麻保沙星	363.1	345.1*	30.0	90	+
		319.1	28.0		
环丙沙星	332.2	288.1*	27.0	90	+
		314.1	28.0		
洛美沙星	352.2	265.1*	28.0	90	+
		308.2	28.0		
恩诺沙星	360.1	342.1*	28.0	90	+
		316.1	28.0		
沙拉沙星	386.1	342.1*	27.0	90	+
		299.1	39.0		
二氟沙星	400.1	356.1*	25.0	90	+
		299.1	40.0		
氧氟沙星	362.1	344.1*	32.0	90	+
		318.1	26.0		
培氟沙星	334.0	316.1*	28.0	90	+
		290.1	25.0		
诺氟沙星	358.2	340.1	28	90	+
		314.0*	28		

注: \*标注的子离子是用来进行定量分析的离子。

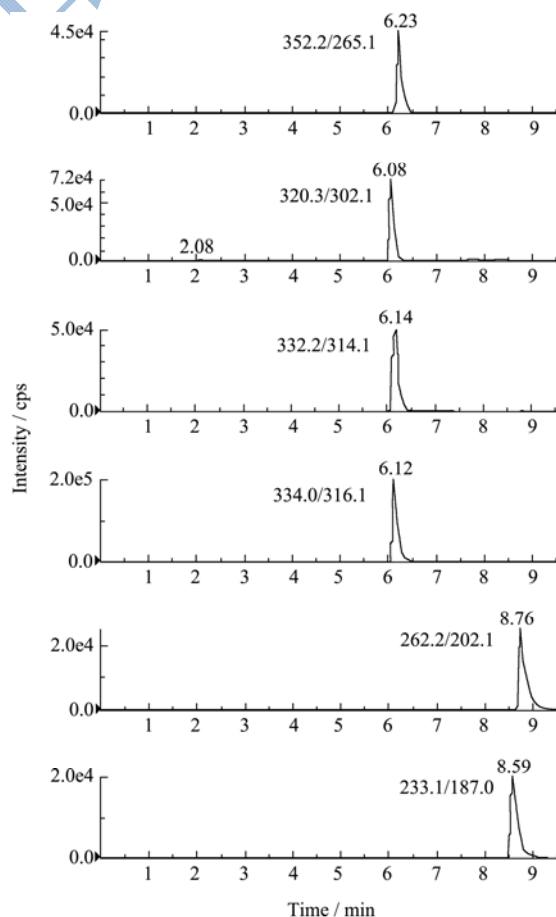
### 2.2 色谱条件的选择

采用“T”三通方式,即蠕动泵以 10 μL/min 的流速连续注射 0.01 mg/L 的 13 种沙星类药物标准溶液,流动相则以 300 μL/min 的流速与 13 种沙星类药物标准溶液混合后进入离子源来进行优化。当分别用 0.1%甲酸、0.1%乙酸、5 mmol/L 醋酸铵溶液代替流动相组成的水,未发现沙星类药物灵敏度的明显变化,故选择 5 mmol/L 醋酸铵与乙腈做为流动相,并用梯度洗脱,能完全将 13 种沙星类药物分离,峰形完美。

### 2.3 质谱条件的优化

用蠕动泵以 5 μL/min 的流速连续注射,分别将 13 种 0.5 mg/L 的沙星类药物标准溶液注入 ESI 离子源

中,在正离子检测方式下对沙星类药物进行一级质谱分析(Q1 扫描),得到准分子离子峰(M+1),优化去簇电压。对准分子离子峰进行二级质谱分析(子离子扫描),得到碎片离子信息,优化碰撞能,此外,还对离子源温度、雾化气、气帘气、辅助气等参数进行了优化见表 1。实验结果表明,氟喹诺酮化合物的二级质谱中主要的碎片离子峰是氟喹诺酮药物分子的脱水峰([M+H-18]<sup>+</sup>)、脱羧峰([M+H-44]<sup>+</sup>)以及脱羧后哌嗪环断裂发生结构重排失去 C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NR<sub>2</sub> 的产物离子([M+H-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NR<sub>2</sub>]<sup>+</sup>),较低丰度的离子峰有 [M+H-64]<sup>+</sup>、[M+H-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NR<sub>2</sub>-14]<sup>+</sup>, [M+H-64]<sup>+</sup> 应是氟喹诺酮脱羧后再丢失 HF 分子产生的带电离子([M+H-CO<sub>2</sub>-HF]<sup>+</sup>), [M+H-CO<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>NR<sub>2</sub>-14]<sup>+</sup> 是氟喹诺酮脱羧后哌嗪环断裂发生结构重排失去 C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NR<sub>2</sub> 的产物离子([M+H-CO<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>NR<sub>2</sub>]<sup>+</sup>)。为了同时实现定量定性的要求,本研究采用了 MRM→IDA→EPI→谱库检索的模式,利用 QTrap 的线性离子阱功能,在 MRM 获得化合物的保留时间、峰高、峰面积、离子比率等信息的同时,通过 EPI 扫描获得一张二级质谱图,可用已经建立好的谱库进行检索,这对化合物的结构确认有很大帮助,实际样品(氧氟沙星阳性样)检测见图 2~图 4。





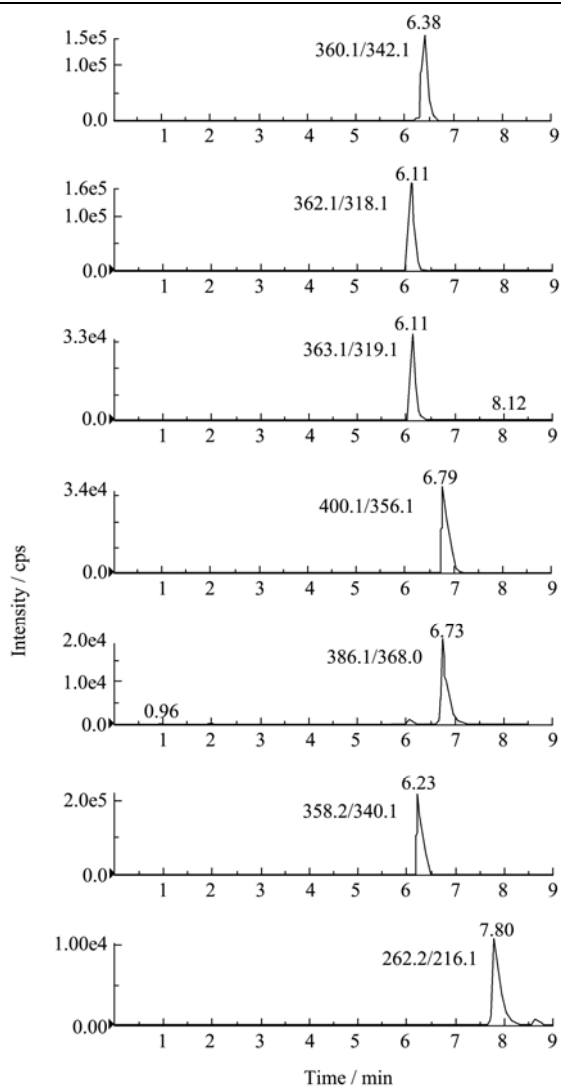


图2 氟喹诺酮类药物标准物质的提取离子图(10 μg/kg)

Fig.2 Extracted ion chromatography of fluoroquinolones

2.4 方法的检测限、回收率、重复性及线性范围

将 13 种氟喹诺酮类药物混合标准储备液用空白组织提取液依次稀释成 1.0~5000.0 μg/L 系列浓度,按 1.5 方法测定。将测得的各种氟喹诺酮类药物峰面积的平均值 (X) 与所对应的药物浓度 (Y) 做线性回归,外标法定量,求得标准曲线回归方程和相关系数 (R)。本方法 13 种氟喹诺酮类药物的线性范围为 1.0~5000.0 μg/kg, 线性相关系良好 (r>0.99)。

13种氟喹诺酮类药物在添加水平2.0~20.0 μg/kg, 其平均回收率在 81.6~114%, 相对标准偏差在 1.1~11.2%之间; 本方法对 13 种 FQs 药物的检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 (μg/kg): 麻保沙星 0.5(2)、诺氟沙星 0.5(2)、氧氟沙星 0.5(2)、培氟沙星 0.5(2)、环丙沙星 0.5(2)、洛美沙星 0.5(0.5)、达氟沙星 0.5(1)、恩诺沙星 0.5(1)、沙拉沙星 0.5(2)、二氟沙星 0.5(2)、氟甲喹 0.5 (2)、恶喹酸 0.5(2)、萘啶酸 0.1(0.4);

本方法的回收率和精密度符合SN/T0001-1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》对回收率和精密度的要求。

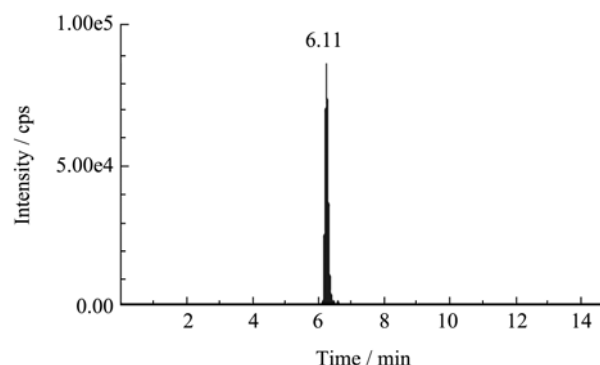


图3 氧氟阳性样品重构离子色谱图

Fig.3 Reconstituted ion chromatogram of the the doubtful positive sample

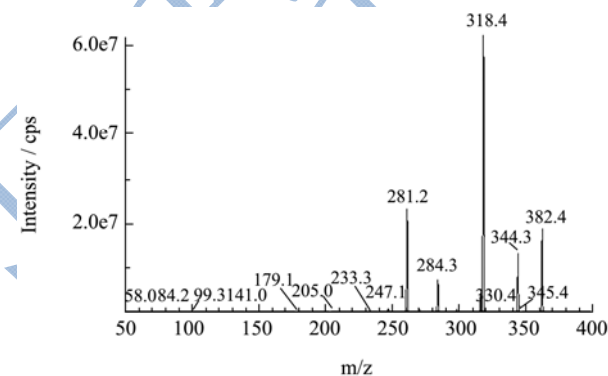


图4 阳性可疑样品 EPI 扫描图

Fig.4 EPI mass spectrum of the doubtful positive sample

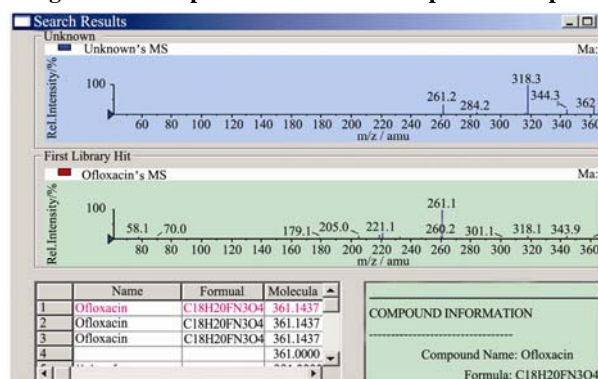


图5 阳性可疑样品谱库检索

Fig.5 Results of index search from library for the doubtful positive sample

3 结论

建立了测定猪组织中13种氟喹诺酮类药物的高效液相-电喷雾质谱多残留检测方法, 该方法采用MRM→IDA→EPI→谱库检索模式, 能同时实现定量定性分析。方法在1.0~5000 μg/L浓度范围内, 线性关

系良好,相关系数均大于0.99,在2~20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加水平范围内的平均回收率为81.6%~114%;相对标准偏差为1.1%~11.2%;方法检出限等指标满足国内外对氟喹诺酮类药物检测的相关要求。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部公告第235号.动物性食品中兽药最高残留限量[S],2002
- [2] Kerman L, Hoof J V, Debeuckelaere W, et al. Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets [J]. AOAC Int, 1998, 81(1): 51
- [3] Choi J, Yee A J. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues using Escherichia coli as indicator organism [J]. J AOAC Int, 1999, 82(6): 1407-1412
- [4] Hohzapfel C K, Buckley S A, Stanker L H. Determination of fluoroquinolones in using an on line clean-up column to high performance immunoaffinity reversed phase liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2003, 754: 1-9
- [5] Vega M, Rios G. Analysis of ofloxacin flumequine in fish by high-performance thin layer chromatography [J]. J Planar Chromatogr, 1995, 18: 1473
- [6] Roybal J, Walker C C, Pfenning A P, et al. Concurrent determination of four fluoroquinolones in catfish, shrimp, and salmon by liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J AOAC Int, 2002, 85(6): 1293-1301
- [7] Hernandez M, Borrull F, Calull M. Using nonaqueous capillary electrophoresis to analyze several quinolones in pig kidney samples [J]. Electrophoresis, 2002, 23(3): 506-511
- [8] Roybal J E, Pfenning A P, Turnipseed S B, et al. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography [J]. AOAC Int, 1999, 80(5): 982-987
- [9] Zhenling Z, Aiguo D, Guixiang Y. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorimetric detection [J]. J Chromatogr B, 2005, 82: 1202-1209
- [10] Toussaint B, Bordin G, Janosi A, et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 11 (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney [J]. J Chromatogr A, 2002, 976 (1-2): 195-206
- [11] 岳振峰,林秀云,唐少冰,等.高效液相色谱-串联质谱法测定动物组织中的16种喹诺酮类药物残留[J].色谱,2007,25(4): 491
- [12] Rubies A, Vaquerizo R, Centrich F, et al. Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry detection [J]. Talanta, 2007, 72: 269
- [13] Vynchtg V, Janosi A, Bording, et al. Multiresidues determination of (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2002, 952: 121-129
- [14] Johnston I, Mackay I, Croft M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr A, 2002, 982: 97-109
- [15] 冯家望,蔡勤仁,柳训才,等.高效液相色谱-电喷雾串联技术测定奶及奶制品中三聚氰胺和环丙氨嗪[J].现代食品科技, 2008,24(10):1058-1060
- [16] 蔡勤仁,彭玉芬,冯家望,等.超高效液相色谱-电喷雾串联技术测定猪组织中7种 $\beta$ -兴奋剂[J].现代食品科技,2009,25(4): 451-454