

实验技术与方法

阴离子交换固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法
检测猪肌肉中 13 种喹诺酮类药物马建民¹,夏曦²,李晓薇²,丁双阳²

(1. 北京农业职业学院畜牧兽医系,北京 102442; 2. 中国农业大学动物医学院,北京 100094)

摘要:目的 建立猪肌肉中喹诺酮类(QNs)药物液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱(UPLC-MS/MS)检测方法。方法 样品经磷酸盐溶液超声提取碱化后,采用阴离子交换固相萃取(SPE)柱净化提取液,并对目标物质进行富集,用UPLC-MS/MS检测猪肌肉中喹诺酮类药物含量。试验通过空白基质净化液添加标准品,建立校正标准曲线,降低基质对离子化的干扰。结果 13种喹诺酮类药物在5~100 μg/kg的线性范围内均具有良好的线性关系,相关系数在0.991 0~0.999 2之间,定量限(LOQ)为0.255~3.322 μg/kg,回收率均在69.18%~104.45%之间,相对标准偏差为0.21%~10.98%。结论 该方法简便、快速、灵敏度高,适用于猪肌肉中喹诺酮类药物的检测需求。

关键词:阴离子交换固相萃取;液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱法;喹诺酮类药物;猪肌肉

中图分类号:TS 201.6 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)03-0249-05

Determination of 13 quinolone antibiotic residues in swine muscle by anion exchange
solid-phase extraction-ultra high performance liquid chromatography-triple
quadrupole mass spectrometer

Ma Jianmin, Xia Xi, Li Xiaowei, Ding Shuangyang

(Department of Animal Husbandry and Veterinary, Beijing Vocational College of Agriculture,
Beijing 102442, China)

Abstract: Objective A method was developed for the simultaneous determination of 13 quinolone (QNs) antibiotics in Swine muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The analytes were extracted from the sample using phosphate solution with ultrasonic bath and purified by anion exchange solid-phase extraction (SPE) cartridge. The residue was dried under nitrogen and redissolved for UPLC-MS/MS. The interference of matrix was reduced by the matrix-matched calibration standards curve. **Results** The linearity arrange was from 5 μg/kg to 100 μg/kg for 13 QNs with correlation coefficients from 0.991 0 - 0.999 2. The limit of quantification was 0.255 - 3.322 μg/kg. The recoveries were 69.18% - 104.45% with relative standard deviations of 0.21% - 10.98%. **Conclusion** The analytical method is simple, accurate, sensitive and suitable for the determination of 13 quinolone (QNs) antibiotics in swine muscle.

Key words: Anion exchange solid-phase extraction; UPLC-MS/MS; quinolone antibiotics; swine muscle

喹诺酮类(quinolones, QNs)药物被广泛应用于动物养殖中,随着该类药大量、非科学使用,造成其在动物体内残留,并通过食物链进入人体,从而影响人体健康。因此,动物体内的QNs残留检测备受关注。

动物组织基质复杂,在使用电喷雾离子源检测动物样品时,基质通常会产生干扰作用。通过改善

提取净化方法可以减少基质干扰。在喹诺酮类药物残留检测中,多种固相萃取方法被应用,包括反相柱^[1]、强阳离子交换柱^[2]、强阴离子交换柱^[3]、免疫亲和固相萃取柱^[4]、分子印迹固相萃取柱^[5]等。使用免疫亲和、分子印迹固相萃取柱同时检测的药物数量较少;使用反相固相萃取柱,有较强的基质干扰,表现为响应值偏低,变异系数偏大。阴离子交换固相萃取柱,理论上可以和所有QNs药物的羧基产生静电吸附,表现出一定的选择性。一般此类药物检测方法是使用酸性有机溶剂提取,蒸干,再用缓冲溶液溶解后过离子交换柱^[2,3]。本文利用QNs药物具有酸碱两性,采用酸提碱沉方法提取,不需要溶剂转换,直接过阴离子交换固相萃取柱,简

收稿日期:2013-04-02

基金项目:北京农业职业学院院级课题(NO. XY-YF-12-18)

作者简介:马建民 男 讲师 研究方向为兽药残留检测

E-mail:dysy@cau.edu.cn

通讯作者:丁双阳 女 研究员 研究方向为兽药残留检测

E-mail:dingsy@cau.edu.cn

化提取方法。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

Acquity UltraPerformance LC 超高效液相色谱仪、Xevo-TQ 质谱系统、N-EVAPTM-111 氮吹仪、5417C/R 高速冷冻离心机、Oasis[®] MAX 固相萃取柱 (3 ml, 60 mg)。

诺氟沙星 (NOR)、环丙沙星 (CIP)、洛美沙星 (LOM)、氧氟沙星 (OFL)、培氟沙星 (PEF)、依诺沙星 (ENO) 均购于中国药品生物制品检定所, 恩诺沙星 (ENR)、沙拉沙星 (SAR)、恶喹酸 (OXO)、氟甲喹 (FLU)、达氟沙星 (DAN)、二氟沙星 (DIF)、麻保沙星 (MAR) 均购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 甲醇 (色谱纯), 甲酸 (99%), 磷酸二氢钠、氢氧化钠 (均为分析纯), 水为 Mill-iQ 超纯水, 磷酸盐溶液: 0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液, 用磷酸调节至 pH 2.8。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理

准确称取均质后的猪组织 1.00 g 于 50 ml 离心管中, 加入 8 ml 磷酸盐溶液超声提取 15 min 后, 以 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液置于 50 ml 离心管中。残留组织用磷酸盐溶液重复提取 1 次, 合并两次提取的上清液。向上清液中加入 10 mol/L 氢氧化钠溶液 90 μ l, 涡动 1 min, 超声 10 min, 以 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液于 50 ml 刻度管中, 定容至 20 ml, 精密量取 5 ml 定容后溶液, 超纯水稀释至 15 ml, 涡动 1 min, 以 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液经固相萃取柱净化。净化前依次用 3 ml 的甲醇、5% 氨水活化固相萃取柱, 提取液以 0.25 ml/min 流速过柱后, 先经过 3 ml 5% 氨水及 3 ml 甲醇淋洗, 再以 3 ml 4% 甲酸甲醇洗脱。洗脱液在 45 $^{\circ}$ C 条件下用氮气吹干, 用 1 ml 甲醇-乙腈-水 (1+1+8, V/V/V) 复溶, 复溶溶液过 0.22 μ m 滤膜后待测。

1.2.2 色谱质谱条件

Acquity UPLC[™] BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 流动相: A 液为 0.1% 甲酸水, B 液为 0.2% 甲酸甲醇; 流速 0.3 ml/min, 柱温 35 $^{\circ}$ C, 进样体积 10 μ l, 样品温度 15 $^{\circ}$ C, 梯度洗脱程序见表 1。

电喷雾离子源 (ESI⁺): 毛细管电压 0.5 kV, 锥孔电压 24 V, 萃取电压 3.00 V, 电离源温度 150 $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度 550 $^{\circ}$ C, 锥孔气流速 50 L/Hr, 脱溶剂气流 1 000 L/Hr, 二级碰撞器 0.16 ml/min。质量分析器 1 (母离子选择): 低端分辨率 2.8, 高端分辨率

表 1 UPLC 流动相梯度洗脱条件

表 1 UPLC gradient program for the analysis of QNs

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	曲线
0	0.3	95	5	6
0.5	0.3	80	20	6
5	0.3	60	40	6
5.5	0.3	0	100	6
6.5	0.3	0	100	6
6.6	0.3	95	5	1
9	0.3	95	5	6

注: 曲线“6”表示线性变化, “1”表示立即变化

14.7; 离子能量 0.5 V。质量分析器 2 (子离子选择): 低端分辨率 2.8, 高端分辨率 14.7; 离子能量 0.9 V。

2 结果

2.1 样品前处理条件的选择

QNs 的基本结构见图 1。QNs 药物结构决定其可溶解在酸/碱水溶液中。因此利用 QNs 酸碱两性, 采用酸提碱沉方法提取, 减少共提物质, 超声提取可起到沉淀蛋白作用。

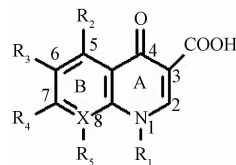


图 1 喹诺酮基本结构

Figure 1 The basic structure of Quinolone

固相萃取柱属于阴离子交换与反相混合机理的固相萃取柱, 与 QNs 药物 3 位羧基产生静电吸附。离子作用速度较慢, 流速过快, 诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、二氟沙星回收率较低。提取液中离子强度也影响药物的吸附, 本试验取 1/4 的提取液稀释后过柱降低离子强度。

取空白样品过柱前提取液, 向提取液中加入 100 μ g/kg 标准溶液, 漩涡混匀后静置 15 min, 使药物在提取液中状态接近真实提取情况; 取固相萃取柱 2 个, 串联, 上面标注柱 1, 下面标注柱 2, 用 3 ml 的甲醇、5% 氨水活化, 样品过柱后分开洗脱。柱 1、柱 2 分别用 1.2.1 中净化方法净化, 连续收集甲醇淋洗液、4% 甲酸甲醇洗脱液, 每次 1 ml, 测定淋洗液及洗脱液中药物响应值。结果表明: 柱 1、柱 2 淋洗液、柱 2 洗脱液中均未检测到药物, 仅在柱 1 的洗脱液中检测到药物; 药物主要在柱 1 的前 1 ml 洗脱液中, 最后 1 ml 洗脱液中仅检测出了沙拉沙星、二氟沙星、恶喹酸、氟甲喹、洛美沙星及环丙沙星且都不足前 1 ml 的 3%。因此, 推测 100 μ g/kg 药物没

有出现穿透现象,可用 3 ml 甲醇淋洗及 3 ml 4% 甲酸甲醇洗脱。

2.2 流动相的选择

使用酸性甲醇-水作为流动相,色谱图峰形对称,而且有机相比比例高,可以降低毛细管电压及脱溶剂温度,所以本试验选用酸性甲醇-水作为流动相梯度洗脱。出峰是时间 2.65 ~ 6.32 min,13 种药物除氧氟沙星、培氟沙星、依诺沙星没有达到完全分离,其他 10 种药物均达到基线分离。

2.3 母离子和子离子的选择

用初始流动相稀释各个喹诺酮单标,对每个单标进行全扫描,确定每种喹诺酮类药物的母离子质量数,然后分别对子离子及碰撞能量进行优化,从中选出丰度最高时所对应的碰撞能量值作为最佳碰撞能量,选择两个丰度比较高的子离子作为定性和定量离子,建立多离子反应监测(MRM)模式,各种喹诺酮类药物的质谱采集参数见表 2,总离子色谱图见图 2。

表 2 喹诺酮类质谱采集参数、线性关系及定量限(LOQ)和检出限(LOD)

Table 2 Parameters for MS-MS detection, Linear range, correlation coefficient, limits of detection and quantification of 13 types of quinolones (QNs)

QNs	母离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碎片离子(碰撞能量 eV) (<i>m/z</i>)		标准曲线	相关系数 (<i>r</i>)	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
OXO	262.0	24	244.0(18)	<u>216.0(28)</u>	$y = 9114.5x + 3115.7$	0.998 4	5 ~ 100	0.091	0.303
FLU	262.1	26	<u>244.0(18)</u>	202.0(32)	$y = 13687x + 3344.1$	0.999 2	5 ~ 100	0.129	0.431
NOR	320.1	33	<u>302.0(19)</u>	233.0(25)	$y = 486.11x + 363.71$	0.992 6	5 ~ 100	0.997	3.322
ENO	321.1	32	<u>303.1(20)</u>	234.0(22)	$y = 3747.3x + 2274.5$	0.995 1	5 ~ 100	0.144	0.480
CIP	332.1	21	314.1(22)	<u>231.1(38)</u>	$y = 11130x + 4737$	0.997 6	5 ~ 100	0.076	0.255
PEF	334.1	34	<u>316.1(20)</u>	290.1(18)	$y = 5768.7x + 3317.9$	0.995 6	5 ~ 100	0.097	0.323
LOM	352.1	31	308.1(16)	<u>265.1(22)</u>	$y = 3825.8x + 1583.8$	0.997 4	5 ~ 100	0.233	0.778
DAN	358.2	34	<u>340.2(23)</u>	96.0(25)	$y = 4144x + 3103.6$	0.992 6	5 ~ 100	0.465	1.551
ENR	360.2	34	316.1(20)	<u>245.0(26)</u>	$y = 5369.6x + 3005.4$	0.995 8	5 ~ 100	0.138	0.459
OFL	362.1	30	318.1(20)	<u>261.1(26)</u>	$y = 19252x + 9932.6$	0.996 5	5 ~ 100	0.320	1.066
MAR	363.1	24	320.0(15)	<u>72.0(21)</u>	$y = 13430x + 11093$	0.991 0	5 ~ 100	0.564	1.881
SAR	386.2	33	342.1(20)	<u>299.1(27)</u>	$y = 13043x + 5491.3$	0.997 6	5 ~ 100	0.451	1.505
DIF	400.2	37	356.1(19)	<u>299.0(30)</u>	$y = 10938x + 6684.9$	0.995 0	5 ~ 100	0.088	0.292

注:“ ”:定量离子

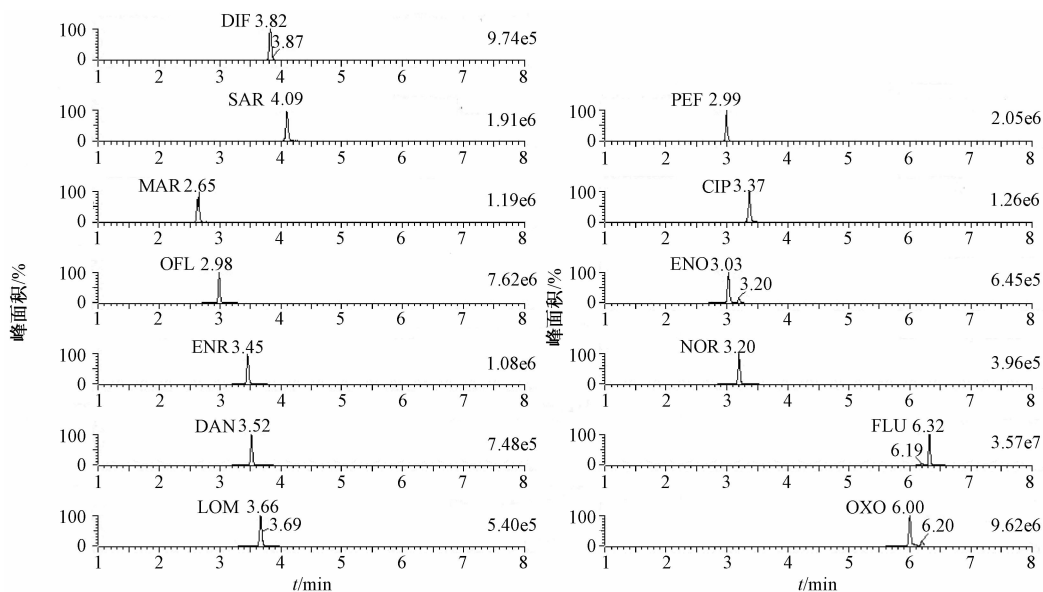


图 2 标准品色谱图(10 $\mu\text{g}/\text{L}$)

Figure 2 Ionic chromatogram of standard at 10 $\mu\text{g}/\text{L}$

2.4 方法学验证

2.4.1 标准曲线

取 5 份空白样品,将每份空白样品经过提取和

净化后,在洗脱液中添加浓度为 0、5、10、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 混合标准溶液,样品按上述方法处理后,计算得到标准曲线及相关参数,见表 2。与溶剂标

准品比较,只有恶喹酸没有基质干扰作用,诺氟沙星表现轻微基质抑制,其它药物表现基质增强作用。因此需采用阴性样品基质添加标准曲线定量。

2.4.2 方法的检出限和定量下限

通过向阴性样品中添加 QNs 来考察方法的检

出限(S/N = 3)、定量限(S/N = 10)。猪肌肉中各种 QNs 药物的方法检出限和定量限见表 2。图 3 为 13 种喹诺酮空白猪肌肉样品加标色谱图。13 个通道中并未发现明显杂质干扰。

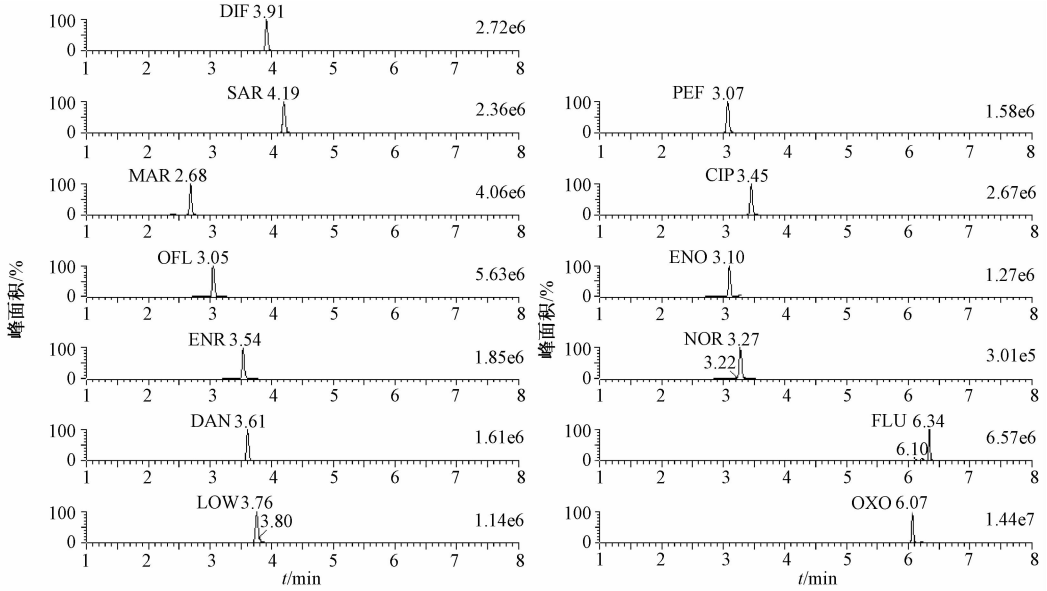


图 3 猪肌肉加标样品色谱图(40 µg/L)

Figure 3 Chromatograms of swine muscle at 40 µg/L with 13 QNs

2.4.3 方法回收率及精密度

取空白猪肌肉,分别添加 20、40、100 µg/kg 混合标准品,按 1.2.1 样品前处理方法进行处理,做回

收率试验,结果见表 3。13 种 QNs 的回收率在 69.18%~104.45% 之间,能够达到比较满意的回收率,方法的重现性也在可接受范围内(RSD < 15%)。

表 3 方法的回收率(猪肌肉)

Table 3 Test of recoveries and inter-day precision (swine muscle)

药物	添加量(µg/kg)								
	20			40			100		
	回收率 (%)	日内 RSD (%) (n=6)	日间 RSD (%) (n=18)	回收率 (%)	日内 RSD (%) (n=6)	日间 RSD (%) (n=18)	回收率 (%)	日内 RSD (%) (n=6)	日间 RSD (%) (n=18)
OXO	76.4	0.61	2.21	76.76	0.46	1.51	76.13	0.33	1.59
	76.88	2.27		77.86	2.07		75.62	1.10	
	76.23	2.37		77.45	1.07		75.18	2.23	
FLU	75.02	5.13	7.38	72.06	3.89	6.43	77.31	2.75	6.50
	70.97	5.13		74.33	1.09		70.04	7.04	
	76.49	6.53		78.15	7.85		73.39	1.99	
NOR	83.43	7.47	6.59	86.61	7.64	6.19	79.54	1.68	3.66
	83.07	6.45		85.48	3.85		79.63	5.38	
	79.92	2.89		80.24	4.02		81.23	2.73	
ENO	78.26	2.73	8.18	80.73	0.21	7.83	77.78	3.57	6.06
	86.36	8.20		86.54	10.98		82.56	6.08	
	78.95	6.42		79.41	5.39		79.62	6.68	
CIP	82.94	2.54	4.13	84.40	1.92	4.17	81.81	1.36	1.90
	84.94	5.42		86.95	5.72		81.73	1.71	
	82.21	2.36		82.47	2.35		82.67	2.50	

续表 3

药物	添加量(μg/kg)								
	20			40			100		
	回收率 (%)	日内 RSD(%) (n=6)	日间 RSD(%) (n=18)	回收率 (%)	日内 RSD(%) (n=6)	日间 RSD(%) (n=18)	回收率 (%)	日内 RSD(%) (n=6)	日间 RSD(%) (n=18)
PEF	89.28	6.49	8.45	93.55	3.87	5.23	86.70	4.60	9.01
	97.47	6.88		94.37	6.95		96.28	9.89	
	88.12	8.49		90.12	5.82		88.17	10.27	
LOM	100.31	3.41	3.74	102.28	2.58	2.42	98.79	1.82	3.97
	103.00	4.88		99.93	0.45		104.45	5.85	
	99.33	3.25		99.36	3.61		100.27	2.92	
DAN	92.42	4.20	4.38	94.84	3.18	4.21	90.55	2.26	2.73
	95.73	4.12		96.42	5.75		93.06	0.91	
	91.21	3.92		91.80	3.67		91.81	4.39	
ENR	97.13	4.98	3.75	99.45	4.77	4.23	94.63	1.52	1.55
	97.94	2.52		98.55	2.52		96.22	1.29	
	95.01	3.81		94.13	4.84		97.07	0.95	
OFL	91.17	6.99	7.23	95.20	5.30	7.24	88.05	3.75	4.37
	96.68	6.39		97.52	9.15		92.53	1.92	
	89.16	6.59		89.43	7.11		90.86	6.30	
MAR	88.22	1.97	2.16	87.09	1.49	1.69	89.10	1.06	2.10
	86.66	1.76		87.83	0.61		86.44	2.52	
	88.79	1.95		88.90	2.27		88.13	1.52	
SAR	70.33	0.82	1.03	69.86	0.62	0.84	70.69	0.44	0.92
	69.68	0.46		69.92	0.59		69.84	0.70	
	70.56	0.76		70.47	0.75		70.43	0.81	
DIF	95.56	1.32	2.09	94.80	1.00	0.86	96.15	0.71	2.25
	94.52	1.01		95.18	0.57		94.48	1.53	
	95.94	3.38		94.22	1.02		97.29	3.55	

3 小结

本研究采用阴离子交换固相萃取,结合 UPLC-MS/MS 技术建立了猪肌肉中 13 种 QNs 多残留同时分析方法。本方法简便、可靠,灵敏度满足国际上对猪肌肉中 QNs 残留限量的要求。

参考文献

- [1] 包晓丽,任一平,张虹.超高效液相色谱-电喷雾串联四极质谱法检测牛奶中 22 种喹诺酮类抗菌素[J].分析化学,2009,37(3):389-394.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准

化管理委员会.GB/T 20751—2006 鳊鱼及制品中十五种喹诺酮类药物残留的测定液相色谱-串联质谱法[S].北京:中国标准出版社,2007.

- [3] 赵维国,安蓉,霍润兰.食品中抗生素和农药残留分析:用于 LC-MS 分析的 SPE 样品前处理方法[J].现代科学仪器,2005,1(99):10-14.
- [4] 赵思俊,曲志娜,郑增忍,等.免疫亲和色谱-HPLC-FLD 法测定动物肝脏中 10 种喹诺酮类药物残留[J].分析化学,2009,37(3):335-340.
- [5] 孙汉文,刘广宇,乔凤霞,等.氧氟沙星分子烙印聚合物用于血清中 6 种氟喹诺酮的固相萃取[J].药物分析杂志,2008(6):848-852.

· 公告 ·

关于 N,N-二乙基乙醇胺等 258 种食品包装材料用添加剂名单的公告

2013 年 第 5 号

根据《食品安全法》及其实施条例的规定,按照《关于开展食品包装材料清理工作的通知》(卫监督发[2009]108 号)的要求,经组织专家评估,现公布 N,N-二乙基乙醇胺等 258 种食品包装材料用添加剂名单。特此公告。

附件:N,N-二乙基乙醇胺等 258 种食品包装材料用添加剂名单.pdf (略)

国家卫生和计划生育委员会
二〇一三年四月十日