

- [2] PAUL C J, SIMO O P, LAU C C. Phorate and terbufos adsorption onto four tropical soils [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004, 240: 55-61.
- [3] SINGH G, SINGH Z. Persistence and movement of phorate at high concentrations in soil [J]. Ecotoxicol Environ Safety, 1984, 8 (6): 540-550.
- [4] 顾宗英. 急性甲拌磷中毒的急救护理体会 [J]. 华北煤炭医学院学报, 2009, 11 (5): 705-706.
- [5] 余革中, 戴荣彩, 贺敏, 等. 气相色谱测定土壤中甲拌磷及其代谢物甲拌磷砒 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34 (6): 732-734.
- [6] HEBERT V R, GEDDES J D, MENDOSA J. Gas-phase photolysis of phorate, a phosphorothioate insecticide [J]. Chemosphere, 1998, 36 (9): 2057-2066.
- [7] CHANDRA DAS A, CHAKRAVARTY A, Sukul P. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field [J]. Chemosphere, 2003, 53: 1033-1037.
- [8] KU Y, LIN H S. Decomposition of phorate in aqueous solution by photolytic ozonation [J]. Water Res, 2002, 36: 4155-4159.
- [9] 戴荣彩, 陈莉, 夏福利, 等. 混剂中甲拌磷在大豆和土壤中的残留动态 [J]. 农药科学与管理, 2005, 26 (7): 7-9.
- [10] 李文龙, 单宝丽, 依桂华, 等. 毛细柱气相色谱法快速测定黄瓜中六种有机磷农药残留 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2009, 21 (4): 42-44.
- [11] 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 19648—2006 水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定气相色谱-质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中8种喹诺酮类药物的残留量

李丽莉, 罗轶, 何颂华, 黄莉莉

(广西壮族自治区食品药品检验所, 广西南宁 530021)

摘要:目的 建立鱼肉中恩诺沙星、丹诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、沙拉沙星、双氟沙星、氧氟沙星等8种喹诺酮类药物残留量的高效液相色谱-串联质谱检测方法。方法 以氘代试剂为内标, 样品经酸性乙腈提取后, 用正己烷脱脂, 旋转蒸发浓缩, 采用 LC-MS/MS 多反应监测 (MRM) 正离子模式测定。结果 8种喹诺酮的水平为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时回收率为 88.4% ~ 114.9%, 检出限 ($S/N=3$) 为 0.03 ~ 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 该方法简便快捷, 精密度好, 准确度高, 可满足鱼肉中多种喹诺酮类药物残留的定性、定量检测要求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 氘代试剂; 喹诺酮; 鱼肉; 兽药残留

中图分类号: S816.17 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)01-0037-04

Simultaneous determination of 8 quinolone residues in fish meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Li Lili, Luo Yi, He Songhua, Huang Lili

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of 8 quinolone residues (enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, pelfoxacin, sarafloxacin, difloxacin, ofloxacin) in fish meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Deuterium substituted reagents used as internal standards were added to fish meat samples before extraction. Samples were extracted with acidified acetonitrile, cleaned-up by hexane, and concentrated with a rotary evaporator. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). **Results** The average recoveries of 8 quinolone compounds added at 1.0 and 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were in the range of 88.4% - 114.9%. The detection limits of compounds with the method were ranged from 0.03 to 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The method is suitable for quantitative and qualitative detection of quinolone residues in fish samples, with advantages of quick, simple and repeatable.

Key words: LC-MS/MS; deuterium substituted reagents; quinolone; fish; residues of veterinary drugs

- [2] PAUL C J, SIMO O P, LAU C C. Phorate and terbufos adsorption onto four tropical soils [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2004, 240: 55-61.
- [3] SINGH G, SINGH Z. Persistence and movement of phorate at high concentrations in soil [J]. Ecotoxicol Environ Safety, 1984, 8 (6): 540-550.
- [4] 顾宗英. 急性甲拌磷中毒的急救护理体会 [J]. 华北煤炭医学院学报, 2009, 11 (5): 705-706.
- [5] 余革中, 戴荣彩, 贺敏, 等. 气相色谱测定土壤中甲拌磷及其代谢物甲拌磷砒 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34 (6): 732-734.
- [6] HEBERT V R, GEDDES J D, MENDOSA J. Gas-phase photolysis of phorate, a phosphorothioate insecticide [J]. Chemosphere, 1998, 36 (9): 2057-2066.
- [7] CHANDRA DAS A, CHAKRAVARTY A, Sukul P. Influence and persistence of phorate and carbofuran insecticides on microorganisms in rice field [J]. Chemosphere, 2003, 53: 1033-1037.
- [8] KU Y, LIN H S. Decomposition of phorate in aqueous solution by photolytic ozonation [J]. Water Res, 2002, 36: 4155-4159.
- [9] 戴荣彩, 陈莉, 夏福利, 等. 混剂中甲拌磷在大豆和土壤中的残留动态 [J]. 农药科学与管理, 2005, 26 (7): 7-9.
- [10] 李文龙, 单宝丽, 依桂华, 等. 毛细柱气相色谱法快速测定黄瓜中六种有机磷农药残留 [J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2009, 21 (4): 42-44.
- [11] 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 19648—2006 水果和蔬菜中 500 种农药及相关化学品残留量的测定气相色谱-质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.

实验技术与方法

高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉中8种喹诺酮类药物的残留量

李丽莉, 罗轶, 何颂华, 黄莉莉

(广西壮族自治区食品药品检验所, 广西南宁 530021)

摘要:目的 建立鱼肉中恩诺沙星、丹诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、沙拉沙星、双氟沙星、氧氟沙星等8种喹诺酮类药物残留量的高效液相色谱-串联质谱检测方法。方法 以氘代试剂为内标, 样品经酸性乙腈提取后, 用正己烷脱脂, 旋转蒸发浓缩, 采用 LC-MS/MS 多反应监测 (MRM) 正离子模式测定。结果 8种喹诺酮的水平为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时回收率为 88.4% ~ 114.9%, 检出限 ($S/N=3$) 为 0.03 ~ 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 该方法简便快捷, 精密度好, 准确度高, 可满足鱼肉中多种喹诺酮类药物残留的定性、定量检测要求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 氘代试剂; 喹诺酮; 鱼肉; 兽药残留

中图分类号: S816.17 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2012)01-0037-04

Simultaneous determination of 8 quinolone residues in fish meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Li Lili, Luo Yi, He Songhua, Huang Lili

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To establish a method for simultaneous determination of 8 quinolone residues (enrofloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, pelfoxacin, sarafloxacin, difloxacin, ofloxacin) in fish meat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Deuterium substituted reagents used as internal standards were added to fish meat samples before extraction. Samples were extracted with acidified acetonitrile, cleaned-up by hexane, and concentrated with a rotary evaporator. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring (MRM). **Results** The average recoveries of 8 quinolone compounds added at 1.0 and 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were in the range of 88.4% -114.9%. The detection limits of compounds with the method were ranged from 0.03 to 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The method is suitable for quantitative and qualitative detection of quinolone residues in fish samples, with advantages of quick, simple and repeatable.

Key words: LC-MS/MS; deuterium substituted reagents; quinolone; fish; residues of veterinary drugs

喹诺酮类药物是一种具有 4-喹诺酮共同基本母核的人工合成药,其优点有抗菌谱广、抗菌作用强、口服及注射均有良好吸收等,目前被广泛用于人和动物的疾病治疗。该类药物对消化系统、中枢神经系统、肌肉、骨骼等有一定毒性且容易产生耐药性^[1],如对动物长期使用,会造成动物性食品中喹诺酮类药物残留,可能对食用者的健康造成危害,目前世界多数国家都对该类药物采取了禁用或限制措施。

目前喹诺酮类药物的测定方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[2-3]和高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[4-5]。HPLC 灵敏度低,抗干扰能力弱,分析时间长且无法提供结构碎片;HPLC-MS/MS 抗干扰能力强,检出限低,无需强调分离,可一次检测几乎所有常用的喹诺酮类药物,随着质谱仪的不断普及,HPLC-MS/MS 已成为检测药物残留的首选方法。

由于动物性食品中蛋白质及脂肪含量高、基质复杂,多数需要用 SPE 固相萃取柱^[6-7]、离子交换柱^[8-9]或者其他吸附剂^[10]处理以消除样品基质的干扰,并用内标法定量以弥补样品前处理过程中的低效和损耗^[6,8,10]。采用过柱或者用吸附剂吸附进行前处理所需时间较长,不利于大批量分析;且目前使用内标法定量的文献报道中,多数是几个化合物共用某一个同位素内标,使得在回收率的校正上存在一定偏差。本研究中,每个化合物均有对应的氘代同位素内标,样品无需过柱进行前处理,大大提高了分析的效率,在一定程度上实现了样品的快速检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 6460 Triple Quad LC-MS/MS 液相色谱/质谱联用仪,超声仪,旋转蒸发仪,氮吹仪,离心机。

水为 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》规定的一级水,乙腈、正己烷均为色谱纯,甲酸为优级纯。

8 种喹诺酮对照品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,其纯度分别为丹诺沙星 94.0%,恩诺沙星 99.0%,环丙沙星 94.0%,诺氟沙星 99.0%,培氟沙星 98.0%,双氟沙星 98.5%,沙拉沙星 95.0%,氧氟沙星 99.0%。

氘代丹诺沙星-D3、氘代恩诺沙星-D5、氘代环丙沙星-D8 均购自加拿大 TRC 公司;氘代诺氟沙星-D5 购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,批号 91123,纯度 96.0%;氘代培氟沙星-D5、氘代双氟沙星-D3、氘代沙拉沙星-D8、氘代氧氟沙星-D3 均购自

德国 Witega 公司。

对照品储备液的制备:取喹诺酮类标准品 10 mg,精密称定,置 100 ml 量瓶中,加甲醇 5 ml、甲酸 2 ml 溶解,用甲醇稀释成浓度为 100 μg/ml 的储备液。

内标储备液的制备:取内标对照品加甲醇溶解(必要时加甲酸)并稀释至刻度得浓度为 100 μg/ml 的储备液。

1.2 HPLC-MS/MS 条件

HPLC 条件:ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(1.8 μm,2.1 mm × 100 mm);流速 0.3 ml/min;柱温 35 °C;进样量 10 μl;流动相 0.1% 甲酸溶液(A)-0.1% 甲酸乙腈(B),梯度洗脱,程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	0.1% 甲酸溶液(%)	0.1% 甲酸乙腈(%)
0	90	10
8	75	25
8.5	10	90
10.5	10	90
11	90	10
15	90	10

MS/MS 条件:电喷雾离子源;正离子扫描;多反应监测(MRM);干燥气温度 350 °C;干燥气流速 7 L/min;雾化器压力 40 psi;鞘流气温度 350 °C;鞘流气流速 10 L/min;毛细管电压 4 000 V;喷嘴电压 2 000 V;驻留时间 40 ms;分段采集时间窗:0 ~ 3 min 不采集,3 ~ 8 min 采集,8 min 以后不采集;定性、定量离子及对应的碎裂电压和碰撞能量见表 2。

1.3 样品前处理

取 5 g 经高速组织捣碎机均匀捣碎的样品,置 50 ml 离心管中,精确加入混合内标工作液(100 ng/ml)250 μl,涡旋混合均匀,加 1% 甲酸乙腈溶液 20 ml,涡旋 1 min,超声处理(320 W,40 kHz)10 min,4 000 r/min 离心 5 min,将上清液移至 100 ml 棕色鸡心瓶中,重复提取 1 次,合并提取液。45 °C 以下水浴旋转蒸发至近干,氮气流吹干。残渣精确加入初始流动相 1 ml 使溶解,加 5 ml 正己烷振荡,吸取下层液,用微孔滤膜(0.22 μm)滤过,取滤液,即得。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

喹诺酮类药物的化学结构中有羧基和哌嗪基,属于酸碱两性化合物,流动相中的酸度对化合物的峰型和响应有显著影响。本研究在流动相中加入

表 2 化合物的质谱条件参数
Table 2 MS/MS parameters for quinolone compounds

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碎裂电压(V)	碰撞电压(V)	内标化合物
丹诺沙星	358.0	340.0 ^a	88	21	氘代丹诺沙星-D3
		254.9	88	41	
恩诺沙星	360.0	316.0 ^a	88	17	氘代恩诺沙星-D5
		244.9	88	25	
环丙沙星	332.0	314.0 ^a	78	17	氘代环丙沙星-D8
		230.9	78	37	
诺氟沙星	320.0	302.0 ^a	74	17	氘代诺氟沙星-D5
		233.0	74	21	
培氟沙星	334.3	290.3 ^a	78	13	氘代培氟沙星-D5
		233.2	78	25	
双氟沙星	400.0	356.1 ^a	78	17	氘代双氟沙星-D3
		299.0	78	25	
沙拉沙星	386.0	342.0 ^a	78	13	氘代双氟沙星-D8
		299.0	78	29	
氧氟沙星	361.9	318.1 ^a	78	17	氘代双氟沙星-D3
		261.1	78	25	
氘代丹诺沙星-D3	361.0	343.1 ^a	78	21	
氘代恩诺沙星-D5	365.0	321.1 ^a	78	17	
氘代环丙沙星-D8	340.0	249.1 ^a	74	25	
氘代诺氟沙星-D5	325.0	281.1 ^a	74	13	
氘代培氟沙星-D5	339.0	238.1 ^a	74	25	
氘代双氟沙星-D3	403.0	359.1 ^a	78	17	
氘代沙拉沙星-D8	394.0	350.1 ^a	78	17	
氘代氧氟沙星-D3	364.9	321.1 ^a	78	17	

注:a 定量离子。

甲酸以控制流动相的 pH 值并提高灵敏度。曾比较 0.1%、0.2%、1.0%、2.0% 甲酸溶液对化合物响应的影 响,结果使用 0.1% 甲酸溶液时化合物响应最高。虽然质谱分析并不要求在色谱柱上完全分离,但本研究中有化合物存在母离子质荷比相同的情况,因此分析过程采用梯度洗脱程序以便将母离子质荷比相同的化合物分离,为保证整个分析过程中酸度一致,在有机相和水相中都加入 0.1% 甲酸。

2.1.2 质谱条件的选择

由于喹诺酮类化合物母核中均有羧基,其在正离子软电离状态下均可由电荷诱导羧基中的 C—O 单键发生断裂丢失一分子 H₂O,也可以发生分子内重排后丢失一分子 CO₂^[11-12]。目前喹诺酮类化合物的定量离子多采用脱水峰(丢失一分子 H₂O 的碎片),本研究发现,如果样品提取后不能及时进样,部分化合物(恩诺沙星、培氟沙星、双氟沙星、沙拉沙星、氧氟沙星等)脱水峰 的响应将降低,使定量不准确,因此本研究中这一部分化合物采用丢失一分子 CO₂ 的碎片进行定量,结果见表 2。

2.2 标准品配制溶剂及样品定容溶剂的选择

2.2.1 标准品配制溶剂的选择

试验过程中发现,部分化合物(环丙沙星、氧氟沙星等)难溶于甲醇、乙腈等有机溶剂。因喹诺酮

类为两性化合物,易溶于酸性或碱性溶液中,故在标准品配制过程中,先用少量甲酸溶解对照品后用甲醇定容,可提高其在有机溶剂中的溶解性并延长标准溶液的稳定性。

2.2.2 样品定容溶剂的选择

喹诺酮类化合物出峰的峰型与溶剂有关,当定容溶液中有机相比比例高于色谱系统洗脱程序起始时有机比例的 2 倍时,出峰时间较快的化合物容易裂解成 2 个峰,故本实验采用初始流动相溶解样品,消除溶剂的干扰。

2.3 线性范围

用初始流动相稀释对照品储备液,配制成浓度为 2~50 ng/ml 的标准系列溶液,以待测物与内标的峰面积比为纵坐标,待测物的质量浓度为横坐标进行线性回归,结果各化合物线性良好,相关系数均大于 0.99,具体数据见表 3。

2.4 回收率

在阴性鱼肉样品中添加 8 种混合标准溶液,检验方法的回收率,平行操作 6 份,结果见表 3 和图 1。依据特征离子色谱峰的信噪比(S/N)=3 为检出限,得到 8 种喹诺酮类药物的检出限,结果见表 3。

表3 鱼肉样品中添加喹诺酮的回收率、方法检出限、回归方程及系数

Table 3 Recoveries, detection limit, regression equation and regression coefficient of quinolone compounds in fish samples (n = 6)

化合物	检出限 (μg/kg)	添加水平				回归方程	回归系数(r)
		1.0 μg/kg		3.0 μg/kg			
		平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)		
丹诺沙星	0.1	106.6	3.6	95.4	7.3	y = 0.02454x + 0.04842	0.9989
恩诺沙星	0.03	105.8	2.4	88.4	5.7	y = 0.03724x - 0.04107	0.9926
环丙沙星	0.1	114.9	3.3	112.3	4.7	y = 0.1851x + 0.6005	0.9984
诺氟沙星	0.1	108.6	5	95.7	3.1	y = 0.05689x - 0.04155	0.9979
培氟沙星	0.05	112.7	2.7	95.8	6	y = 0.07491x + 0.1618	0.9977
双氟沙星	0.02	107.5	2.6	94.5	45	y = 0.03618x + 0.02062	0.9990
沙拉沙星	0.04	105.8	3.2	96.2	4.3	y = 0.04061x + 0.01611	0.9976
氧氟沙星	0.04	109.3	2.4	93.8	4.4	y = 0.01432x + 0.003117	0.9986

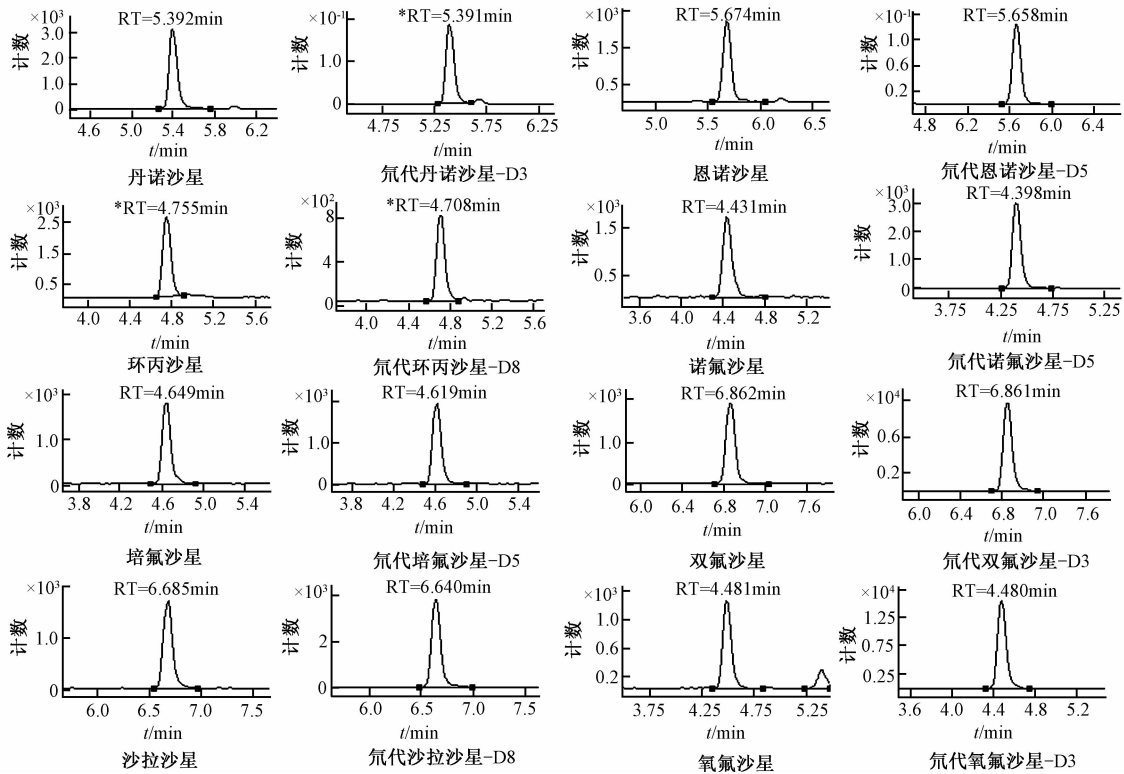


图1 空白鱼肉中添加8种喹诺酮类药物及氘代内标的选择离子流图(添加水平 1.0 μg/kg)

Figure1 Chromatograms of 8 quinolone drugs and internal standard spiked in fish sample in SIM mode(added level 1.0μg/kg)

参考文献

[1] 万俊茹. 喹诺酮类药物应用及不良反应探讨[J]. 基层医学论坛, 2009, 13: 1044-1045.

[2] 杨守国, 李兆新, 王清印, 等. 高效液相色谱法检测海水养殖环境中喹诺酮类药物残留[J]. 渔业科学进展, 2010, 31(2): 95-101.

[3] 柳华春, 王继才, 谢文斌, 等. 化妆品中4种喹诺酮类抗生素测定的方法研究[J]. 质量与市场, 2010, (7): 68-69.

[4] 施冰, 张志刚, 吴抒怀, 等. LC/MS/MS测定水产品中7种喹诺酮类抗菌素残留量的方法研究[J]. 检验检疫科学, 2004, 14(增刊): 25-30.

[5] 王志杰, 冷凯凉, 孙伟红, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定鳗鱼和虾中残留的33种喹诺酮和磺胺类药物[J]. 色谱, 2009, 27(2): 138-143.

[6] 丁涛, 沈东旭, 徐锦忠, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中残留的19种喹诺酮类药物[J]. 色谱, 2009, 27(1): 34-38.

[7] 权英, 詹月华, 张根华, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联四级杆质谱法测定食品中喹诺酮类药物的残留量[J]. 常熟理工学院学报: 自然科学, 2010, 24(2): 65-68.

[8] 厉文辉, 史亚利, 高立红, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时检测鱼肉中喹诺酮、磺胺与大环内酯类抗生素[J]. 分析测试学报, 2010, 29(10): 987-992.

[9] 何强, 孔祥虹, 李建华, 等. 超高效液相-串联质谱法同时测定蜂蜜中15种喹诺酮类药物残留[J]. 分析试验室, 2010, 29(3): 101-105.

[10] 李锋格, 苏敏, 李晓岩, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肝中磺胺类、喹诺酮类和苯并咪唑类药物及代谢物的残留量[J]. 色谱, 2011, 29(2): 120-125.

[11] 周红华, 郭寅龙, 盛龙生, 等. 喹诺酮类药物质谱研究[J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(9): 547-550.

[12] 焦豪妍, 许风国, 田媛, 等. 氟喹诺酮类化合物电喷雾质谱裂解规律[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(6): 344-347.