LC- MS- MS 测定烤鳗中 4 种氟喹诺酮药物残留量

林 峰, 林海丹, 吴映璇, 王 芳

(广州出入境检验检疫局, 广东 广州 510623)

摘 要: 应用 LC- MS- MS 技术, 建立了快速准确测定烤鳗中 4 种常见的氟喹诺酮药物残留量的方法, 样品经简单的溶剂提取后即可上机测定, 在 10~ 50 μg/ kg 范围内添加回收率良好, 检出限 10 μg/ kg。 本文还讨论了流动相以及质谱碰撞能对 4 种氟喹诺酮药物的质谱行为的影响, 并借助准 MS- MS- MS 技术探讨了氟喹诺酮药物的质谱碎片产生机理。

关键词: 液相色谱- 质谱- 质谱; 氟喹诺酮; 烤鳗

中图分类号: O657. 63; R978. 1 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2004) 05- 0043- 05

Detection of Four Fluoroquinolones in Processed Eels by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

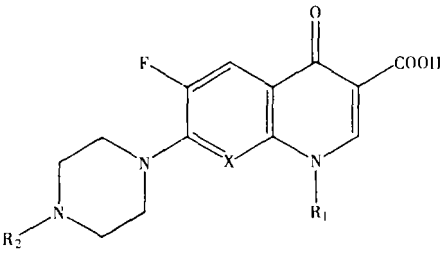
LIN Feng, LIN Hai_dan, WU Ying_xuan, WANG Fang

(Guangzhou Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A liquid chromatographic method coupled with tandem mass spectrometric detection was developed for the simultaneous analysis of four fluoroquinolones residues(norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin and enrofloxacin) in processed eels(Pushao eels). The residues were extracted from sample by simply solvent extraction. Good recoveries were obtained for four analytes within 10~ 50 μg/ kg and the limit of detection was found to be 10 μg/ kg. The method is also used for confirmation detection. The effects of mobile phase and collision energy on the mass spectrometric behavior of fluoroquinolones are discussed. The quasi- MS/ MS/ MS approach was employed for the elucidation of fragmentation mechanism of fluoroquinolones during collision.

Key words: LC- MS- MS; Fluoroquinolones; Pushao eels

氟喹诺酮类药物是喹诺酮药物的一个重要的亚组, 其化学结构是 6 号位氟取代的吡啶酮羧酸衍生物(见图 1), 因其具有抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透力强、价格低廉等特点, 曾广泛用于动物饲养业以达到治疗、预防、促生长等作用, 自八十年代起成为治疗鱼类疾病的主要抗菌药物[1], 在水产饲养中较常用的氟喹诺酮药物包括恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)和氧氟沙星(ofloxacin, OFL)等。 由于长期使用氟喹诺酮抗生素易导致动物群体体内致病菌产生耐药性, 某些氟喹诺酮类化合物还可能有潜在的致癌作用[2], 因此我国以及世界卫生组织、欧盟、美国、日本等国家和组织都将氟喹诺酮类药物列入限制使用的兽药药物名单中, 并制订出相关的最高残留限量 MRL, 我国是全球第一大烤鳗生产国和出口国, 鳗鱼中氟喹诺酮药物的残留问题已成为制约我国烤鳗生产和出口的一个重要因素。



Ofloxacin: R_1=CH_3NO, R_2=CH_3
$C_{18}H_{20}FN_3O_4$, M_r=361.1;
Norfloxacin: R_1=CH_2CH_3, R_2=H
$C_{16}H_{18}FN_3O_3$, M_r=319.1;
Ciprofloxacin: R_1=C_3H_5, R_2=H
$C_{17}H_{18}FN_3O_3$, M_r=331.1;
Enrofloxacin: R_1=C_3H_5, R_2=CH_2CH_3
$C_{19}H_{22}FN_3O_3$, M_r=359.1

图 1 氟喹诺酮药物结构

Fig. 1 Structures of fluoro_quinolones

关于鳗鱼及其烤鳗中的氟喹诺酮类药物残留量的检验方法, 目前实验室多是采用微生物抑制法(杯碟法)、液

收稿日期: 2004- 04- 09; 修回日期: 2004- 07- 21

作者简介: 林 峰(1961-), 男, 广东广州人, 高级工程师.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相色谱- 荧光检测法等方法[2, 3]。 与通常的动物源食品不同, 烤鳗生产过程中鳗鱼肌肉组织吸入大量的调味酱汁, 由此带来的干扰杂质很多, 常见的液液萃取法、固相萃取法不能有效地去除干扰杂质, 造成检测结果假阳性比率高, 因此迫切需要建立一种快速、准确的检验方法。 液相色谱- 质谱- 质谱联用法具有特异性强, 定性准确等特点, 国外已有报道用于动物源食品中喹诺酮残留的测定[4~ 6], 但未见有报道用于烤鳗中氟喹诺酮残留量的测定。

本文提出了一种应用 LC- MS- MS 技术快速准确地测定烤鳗中 4 种氟喹诺酮药物 ENR、CIP、NOR、OFL 残留量的方法, 讨论了流动相以及二级质谱的碰撞能对 4 种氟喹诺酮药物的质谱行为的影响, 并借助准 MS- MS- MS 技术探讨了氟喹诺酮药物的碰撞裂解途径。 目前未见报道。

1 实验部分

1.1 仪 器

ABI/ SCIEX API3000 MS- MS 液质联用仪, Agilent1100 液相色谱仪, Valco 2 位控制十通道阀。

1.2 试剂及标准溶液

甲醇、乙腈均为色谱纯(MERCK 公司), 水为超纯水, 其余试剂为分析纯。 恩诺沙星(98.0%, Fluka 公司), 环丙沙星(98.0% , Fluka 公司), 诺氟沙星(98.0%, Fluka 公司), 氧氟沙星(98.6%, 中国药品生物制品检定所)。

分别称取一定量的氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星标准品, 先用少量甲酸溶解, 然后用甲醇配制成 100 μg/ mL 的储备液, 使用时根据需要用乙腈- 水(体积比 2∶ 8)稀释至合适浓度。

1.3 液相色谱条件

YMC- Pack ODS- A, S- 3 μm 色谱柱(150× 2.0 mm I.D., YMC Co. Ltd.), 流动相: 溶剂 A 是纯乙腈, 溶剂 B 是 5 mmol/ L 甲酸水溶液, 梯度洗脱, 在 0 至 3.5 min 内溶剂 A 体积分数从 20% 线性增加到 30% 并保持 3.5 min, 在 7.1 min 时溶剂 A 的体积分数改至 20% 并平衡 8 min, 流速 0.2 mL/ min, 柱温 35 ℃, 进样量 10 μL。

1.4 质谱条件

离子源是 Turbo Ionspray(ESI 源), 雾化气 12 mL/ min, 气帘气 12 mL/ min, 辅助加热气 7 L/ min, 辅助加热气温度 500 ℃, 碰撞气 9 mL/ min, 4 种气体均为氮气; 电离电压: 5 kV, 去簇电压(declustering potential, DP)、碰撞能(collision energy, CE)见表 1; Q_1 和 Q_3 均为单位分辨率。 检测方式为多反应选择监测(MRM)模式, 正离子; 采集 2~ 5 min 时间区间的信号。

表 1 4 种氟喹诺酮药物的去簇电压和碰撞能

Table 1 Declustering potential(DP) and collision energy(CE) for the four fluoro_quinolone analytes

Analyte	Retention time t/ min	Parent ions m/z	Daughter ions m/z	DP V/V	CE V/V
Norfloxacin	2.6	320	233	55	35
		320	276*	55	30
Ofloxacin	2.6	362	261	55	40
		362	318*	45	30
Ciprofloxacin	2.8	332	245	50	35
		332	288*	60	30
Enrofloxacin	3.6	360	245	60	35
		360	316*	45	30

* The daughter ion is used for quantification

1.5 样品处理

称取经肉类组织粉碎机粉碎的试样 5 g(精确至 0.1 g)于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL× 2 样品提取液(乙腈- 乙酸, 体积比 100∶ 1), 匀浆提取, 提取液以 4 000 r/ min 速度离心 5 min, 上清液完全转移至 50 mL 具塞比色管中, 定容至 50 mL 待用。 取 10 mL 提取液在 50 ℃下用氮气挥干, 残渣用 2.0 mL 乙腈- 水(体积比 2∶ 8)溶解, 加入 5 mL× 2 正己烷脱脂, 下层样品溶液经 0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。 图 2 是 4 种氟喹诺酮标准添加样品(添加浓度为10 μg/ kg)的 MRM 图。

2 结果讨论

2.1 流动相对氟喹诺酮离子化效率的影响

通过自动进样器以直接进样方式分别考察了流动相中不同浓度的甲酸和乙酸对 NOR、OFL、CIP、

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ENR 离子化效率的影响。 实验结果表明, 在浓度相等的情况下, 甲酸比乙酸更有利于氟喹诺酮药物的离子(质子) 化, 应是甲酸给质子能力优于乙酸所致。 实验中发现对 4 种氟喹诺酮药物, 无论是甲酸还是乙酸, 都是浓度为 5 mmol/ L 时的质谱响应值最高, 随着酸浓度的加大, 质谱响应值逐渐下降, 因为离子源中离子浓度过高会抑制待测组分的电离, 从而导致离子化效率下降。

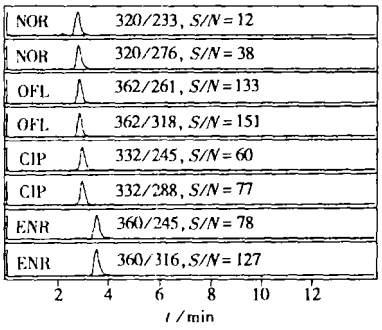


图 2　标准添加样品的 MRM 图
Fig. 2　MRM spectra of a spiked sample (10 μg/ kg)

2.2　碰撞能对氟喹诺酮二级质谱的影响

实验结果表明(图 3), 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]$^+$)、脱羧峰([M+ H- 44]$^+$)以及脱羧后哌嗪环断裂发生结构重排失去 $C_2H_4NR_2$ 的产物离子([M+ H- CO_2- $C_2H_4NR_2$]$^+$), 较低丰度的离子峰有[M+ H- 64]$^+$、[M+ H- CO_2- $C_2H_4NR_2$- 14]$^+$, [M+ H- 64]$^+$ 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_2- HF]$^+$), [M+ H- CO_2- $C_2H_4NR_2$- 14]$^+$是氟喹诺酮脱羧后哌嗪环断裂发生结构重排失去 $C_3H_6NR_2$ 的产物离子([M+ H- CO_2- $C_3H_6NR_2$]$^+$)[7, 8]。

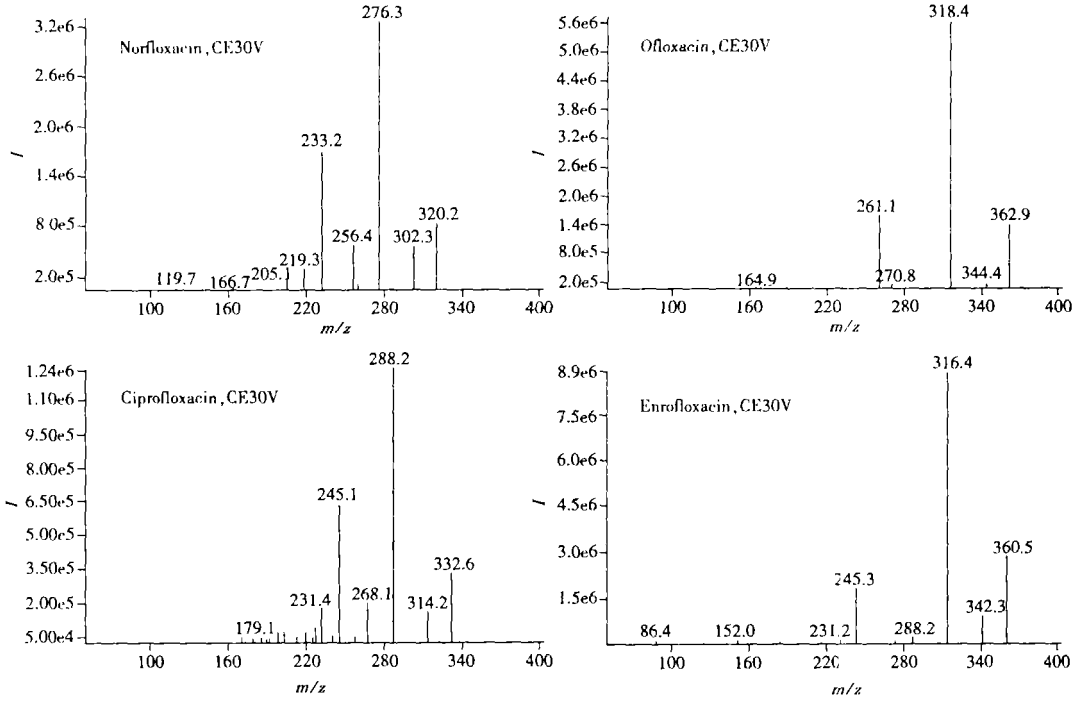


图 3　4 种氟喹诺酮的二级质谱图
Fig. 3　MS- MS spectra of fluoro_quinolones

当碰撞能较低时(CE= 20 V), 二级质谱的基峰是分子离子峰, 随着碰撞能的不断加大(CE= 25~ 30 V), 分子离子峰的强度逐渐下降, 氟喹诺酮分子的脱羧产物逐渐增多并成为基峰, 当碰撞能提高至 35~ 40 V, 脱羧后哌嗪环断裂重排产物成为主要的碰撞诱导离解产物。 基峰是氟喹诺酮分子脱羧产物时, 二级质谱的总强度达到最高(见图 4)。 考虑到电喷雾质谱中脱水峰是较为常见的质谱碎片峰, 而脱羧峰是氟喹诺酮分子含有羧基基团的表征, 脱羧后哌嗪环断裂重排的产物离子更是氟喹诺酮药物特有的结构表征碎片, 因此在进行 MRM 检测方式时选择脱羧峰 和脱羧后哌嗪环断裂重排的产物离子作为监测离子以提高质谱确证的准确性, 选取的离子对数符合欧盟对兽药残留物质谱确证的方法学要求(identification points ≥4)。

2.3　准 MS- MS- MS

通过调节质谱仪的去簇电压, 可以实现化合物的源内诱导碰撞裂解(源内 CID), 继而利用三重四

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

极杆实现准 MS- MS- MS。鉴于 4 种氟喹诺酮药物在碰撞能 25~ 40 V 时主要的碎片离子峰均是脱羧产物和脱羧后哌嗪环结构重排产物，选择这二对离子进行 MS- MS- MS 研究，有助于了解和判断氟喹诺酮药物分子的碰撞断裂过程。图 5 是通过源内 CID 得到的恩诺沙星的主要碎片 *m/z* 245、*m/z* 316 再进行二次碰撞的质谱图。当 *m/z* 245 的二级质谱碰撞能为 40 V 时，其主要的碰撞裂解产物离子包括 *m/z* 203、189、176 等(图 5B)，*m/z* 316 的二级质谱碰撞能达到 45 V 时，其主要产物离子是 *m/z* 245，以及 *m/z* 203、189、176、231 等(图 5A)。推测 *m/z* 231 是恩诺沙星脱羧后哌嗪环断裂重排的另一产物离子($[M+H-CO_2-C_3H_6NR_2]^+$)，*m/z* 203 和 *m/z* 189 分别是 *m/z* 245 脱去羰基后重排的产物离子($[M+H-CO_2-C_2H_2O]^+$，$[M+H-CO_2-C_3H_4O]^+$)，*m/z* 203、189、176 同时出现在 *m/z* 245、*m/z* 316 的二次碰撞质谱图中，由此可推断这两个离子具有相同的母核结构，*m/z* 245 是恩诺沙星脱羧产物离子 *m/z* 316 发生哌嗪环断裂重排的主要产物离子。氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星的准 MS- MS- MS 质谱实验中亦有相同的情况。

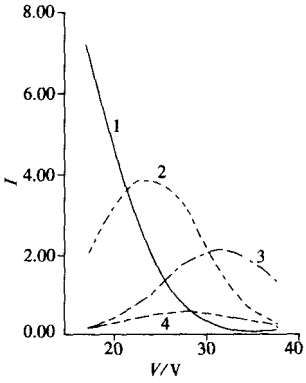


图 4 碰撞能对诺氟沙星二级质谱离子强度的影响

Fig. 4 Effect of collision energy on MS- MS ion intensities of norfloxacin

1. *m/z* 320; 2. *m/z* 276; 3. *m/z* 233; 4. *m/z* 302

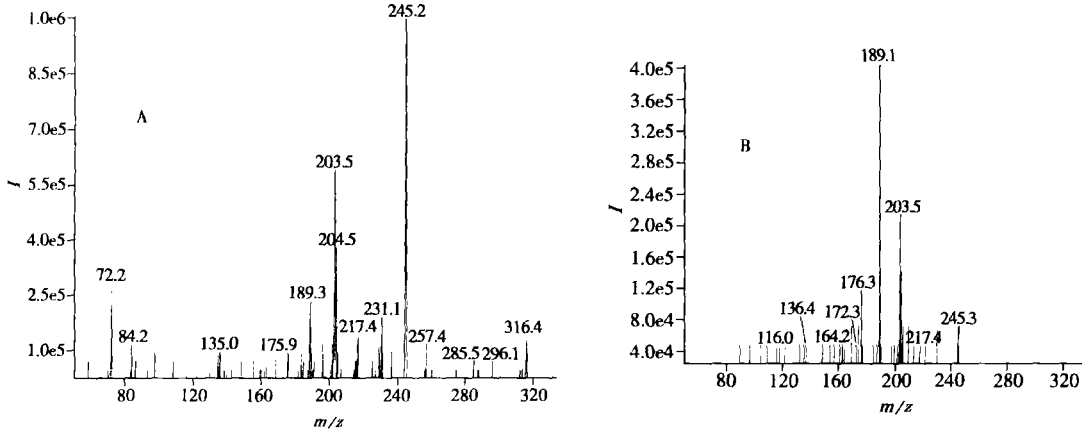


图 5 恩诺沙星的准 MS- MS- MS 谱图

Fig. 5 Quasi- MS- MS- MS spectra of enrofloxacin

A. *m/z* 316; B. *m/z* 245

2.4 方法适应性试验

2.4.1 线性响应范围 按 1.2 所述方法分别配制质量浓度为 5、10、20、50 和 100 μg/L 的 4 种氟喹诺酮混合物标准溶液，按照上述实验方法在 5~ 100 μg/L 浓度范围内(相当样品中 10~ 200 μg/kg 残留量)得到 NOR、OFL、CIP、ENR 的线性回归方程，分别为 $Y= 4.52\times 10^3 X- 6.00\times 10^3$，$r= 0.9976$；$Y= 1.12\times 10^4 X- 1.98\times 10^3$，$r= 0.9964$；$Y= 4.67\times 10^3 X- 6.36\times 10^3$，$r= 0.9981$；$Y= 1.14\times 10^4 X- 1.06\times 10^4$，$r= 0.9998$。式中 X 表示相应的氟喹诺酮质量浓度(μg/L)，Y 表示质谱响应值，r 表示相关系数。

2.4.2 回收率和重复性 取经检验不含氟喹诺酮残留物的烤鳗样品，分别按样品中 10、20、50 μg/kg 含量水平添加一定量的氟喹诺酮标准混合液，每一添加浓度重复 10 份样品，按上述实验方法测定，得到10~ 50 μg/kg 添加浓度范围的回收率见表 2。

2.4.3 二级质谱碎片的相对丰度比 质谱分析中同一分析物的质谱碎片离子间的相对丰度比是对分析物定性(确证)的重要依据，对于动物源食品的药物残留检验，欧盟《2002/657/EC》规定了样品中的某一分析物的质谱碎片离子间的相对丰度比与同一批次检验的标准样品(溶液)的质谱碎片离子间的

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

相对丰度比的相对偏差。对添加回收实验的样品计算了 4 种氟喹诺酮药物各自的两对子离子的相对丰度比见表 3。

3 结　论

实验结果表明本文建立的液相色谱- 质谱- 质谱方法具有特异性强, 样品前处理简单等特点, 监测离子选择合理, 可快速准确地测定成分复杂的烤鳗中 4 种常用氟喹诺酮药物残留量。定量下限为 10 μg/ kg, 可满足目前各国对动物源食品中相关氟喹诺酮残留物的限量要求。

表 2　4 种氟喹诺酮药物的添加回收率和重复性实验

Table 2　Recovery and reproducibility of four fluoro_quinolones

Analyte	Spike level $w/10^{-9}$	Recovery R/%	RSD(n= 10) s_r/%
Norfloxcin	10	99	3.9
	20	84	4.4
	50	82	5.5
Ofloxacin	10	75	4.5
	20	74	4.3
	50	82	5.9
Ciprofloxacin	10	105	5.1
	20	86	4.1
	50	86	3.7
Enrofloxacin	10	110	4.9
	20	93	4.2
	50	99	3.0

表 3　4 种氟喹诺酮药物的质谱碎片相对丰度比

Table 3　Ion ratios of four fluoro_quinolones analystes

Analyte (ion pair)	Ion ratio		
	Spike sample	Standard	Relative deviation of the ion ratio/%
Norfloxacin(233/ 276)	0.90	0.81	11
Ofloxacin(261/ 318)	0.61	0.56	8.9
Ciprofloxacin(245/ 288)	0.71	0.81	12
Enrofloxacin(245/ 316)	0.20	0.21	4.8

参考文献:

[1] TURNIPSEED S B, LONG A R. 动物源性食品中药物残留分析方法[M]. 福建进口食品行业协会译. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1999. 484.

[2] 李俊锁, 邱月明, 王　超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002. 257- 275.

[3] YORKE J C, FROC P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high_performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr, A, 2000, 882: 63- 77.

[4] VYNCHT G V, JANOSI A, BORDIN G, *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.

[5] JOHNSTON L, MACKAY L, CROFT M. Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high_performance liquid chromatography with eletrospray ionization tandem mass spectrometric detection[J]. J Chromatogr, A, 2002, 982: 97- 109.

[6] VOLMER D A, IDANSOORI B, LOCKE S J. Study of 4_quinolone antibiotics in biological samples by short_column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Anal Chem, 1997, 69: 4143- 4155.

[7] 麦克拉弗蒂 F W. 质谱解析[M]. 第三版. 王光辉, 姜龙飞, 汪聪慧译. 北京: 化学工业出版社, 1987. 301.

[8] 陈耀祖, 涂亚平. 有机质谱原理及应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 153.

(上接第 42 页)

[13] US Food and Drug Administration. Pesticide analytical manual[M] 3rd Edition, Washington D. C.: R. O. W. Sciences, Inc, 1994. 12- 76.

[14] ERNEY D R, POOLE C F. A study of single compound additives to minimize the matrix induced chromatographic response enhancement observed in the gas chromatography of pesticide residues[J]. High resolution chromatography, 1993, 16: 501- 503.

[15] FILLION J, HINDLE R, LACROIX M, *et al*. Multiresidue determination of pesticides in fruit and vegetables by gas chromatography- mass- selective detection and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. AOAC Int, 1995, 78: 1252- 1266.

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net