

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定牛奶中的喹诺酮类抗生素残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定动物源性食品中14种喹诺酮类抗生素的方法。样品经处理后,用超高效液相色谱LC-30A在7 min内实现快速分离,三重四极杆质谱仪LCMS-8040进行定量分析。使用外标法内绘制14种喹诺酮类抗生素的校准曲线,线性良好,相关系数为0.999以上;对不同浓度的标准溶液进行精密度实验,连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.437%和4.937%以下,表明仪器精密度良好。

关键词: 喹诺酮类抗生素 三重四极杆质谱 牛奶

喹诺酮类(Quinolones)是一类含有4-喹诺酮母核的化学合成抗菌药,它的抗菌谱广、抗菌活性强,广泛应用于畜牧、水产等养殖业中。然而,喹诺酮类药物有潜在的致癌性和遗传毒性,同时还容易使病菌产生耐药性。因此,喹诺酮类药物残留问题越来越引起人们的关注。美国FDA已于2005年宣布禁止用于治疗家禽细菌感染的抗菌药物恩诺沙星的销售和使用。联合国粮农组织/世界卫生组织食品添加剂专家联席会议、欧盟都已制定了多种喹诺酮类药物在动物组织中的最高残留限量。

高效液相色谱-串联质谱联用技术是近些年来发展很快的分析技术,具有很高的选择性和灵敏度,对复杂基质中的抗生素类残留具有很强的定性能力,准确度高,是目前超痕量残留分析的首选方法。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用测定牛奶中14种喹诺酮类抗生素的方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. × 150 mm L., 2.2 μm

流动相:

A—0.2% 甲酸水溶液;

B—甲醇-乙腈溶液(40/60, v/v)

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

| Time(min) | Module | Command | Value |
|-----------|------------|--------------|-------|
| 4.5 | Pumps | Pump B Conc. | 40 |
| 4.6 | Pumps | Pump B Conc. | 95 |
| 5.5 | Pumps | Pump B Conc. | 95 |
| 5.6 | Pumps | Pump B Conc. | 20 |
| 7 | Controller | Stop | |

质谱条件

离子化模式： ESI(+)

离子喷雾电压： 4.5 kV

雾化气： 氮气 3.0 L/min

干燥气： 氮气 15 L/min

碰撞气： 氩气

DL 温度： 250°C

加热模块温度： 400°C

扫描模式： 多反应监测(MRM)

驻留时间： 20 ms

延迟时间： 3 ms

MRM 参数： 见表 3

1.3 标准品溶液的配制

标准物质： 共 14 种，分别为依诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸、萘啶酸和西诺沙星。

标准工作溶液配制：用甲醇配制 20 mg/L 的混合标准中间溶液，用含有 0.2% 甲酸的甲醇水(20/80, v/v)溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液。各标准物质的具体浓度见表 2。

表 2 混合标准工作液中各标准物质的浓度(μg/L)

| 名称 | 浓度 1 | 浓度 2 | 浓度 3 | 浓度 4 | 浓度 5 | 浓度 6 |
|------|------|------|------|------|------|------|
| 依诺沙星 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| 氧氟沙星 | 0.5 | 2.5 | 5 | 25 | 50 | 250 |
| 诺氟沙星 | 5 | 25 | 50 | 250 | 500 | 2500 |
| 培氟沙星 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| 环丙沙星 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| 洛美沙星 | 0.5 | 2.5 | 5 | 25 | 50 | 250 |
| 达氟沙星 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| 恩诺沙星 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| 沙拉沙星 | 1 | 5 | 10 | 50 | 100 | 500 |
| 噁喹酸 | 0.5 | 2.5 | 5 | 25 | 50 | 250 |
| 氟甲喹 | 0.5 | 2.5 | 5 | 25 | 50 | 250 |
| 吡呱酸 | 0.5 | 2.5 | 5 | 25 | 50 | 250 |
| 萘啶酸 | 0.5 | 2.5 | 5 | 25 | 50 | 250 |
| 西诺沙星 | 5 | 25 | 50 | 250 | 500 | 2500 |

1.4 样品前处理方法

牛奶样品的前处理操作方法参照国标《GB/T 21312-2007 动物源性食品中14种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》。

表 3 MRM 优化参数

| 化合物名称 | 前体离子 | 产物离子 | Q1 Pre Bais(V) | CE(V) | Q3 Pre Bais(V) |
|-------|-------|--------|----------------|-------|----------------|
| 依诺沙星 | 321.2 | 303.1* | -16 | -20 | -23 |
| | | 203.9 | -16 | -48 | -23 |
| 氧氟沙星 | 362.2 | 318.2* | -30 | -18 | -24 |
| | | 261.1 | -30 | -28 | -19 |
| 诺氟沙星 | 320.2 | 302.1* | -16 | -20 | -23 |
| | | 231.1 | -16 | -46 | -28 |
| 培氟沙星 | 334.2 | 316.2* | -13 | -20 | -24 |
| | | 290.1 | -13 | -16 | -22 |
| 环丙沙星 | 332.2 | 314.1* | -13 | -16 | -24 |
| | | 231.0 | -13 | -44 | -18 |
| 洛美沙星 | 352.2 | 265.0* | -18 | -22 | -20 |
| | | 308.2 | -18 | -16 | -23 |
| 达氟沙星 | 358.2 | 340.1* | -14 | -20 | -26 |
| | | 255.0 | -14 | -42 | -29 |
| 恩诺沙星 | 360.3 | 342.2* | -29 | -20 | -26 |
| | | 316.2 | -29 | -20 | -24 |
| 沙拉沙星 | 386.2 | 368.1* | -15 | -20 | -28 |
| | | 299.1 | -15 | -25 | -23 |
| 噁喹酸 | 262.1 | 244.1* | -30 | -18 | -30 |
| | | 216.0 | -30 | -32 | -26 |
| 氟甲喹 | 262.1 | 244.1* | -30 | -16 | -18 |
| | | 202.0 | -30 | -36 | -23 |
| 吡呱酸 | 304.2 | 286.1* | -30 | -18 | -22 |
| | | 215.1 | -30 | -38 | -24 |
| 萘啶酸 | 233.1 | 215.1* | -30 | -14 | -26 |
| | | 187.0 | -30 | -28 | -22 |
| 西诺沙星 | 263.1 | 245.1* | -21 | -16 | -19 |
| | | 189.0 | -21 | -30 | -22 |

*表示定量离子

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

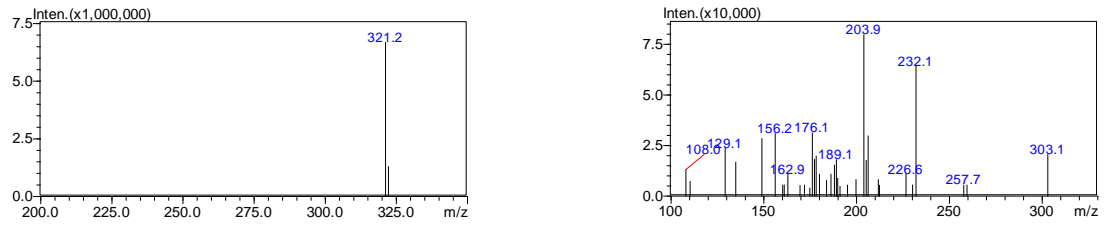


图 1 依诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-48V）（右图）

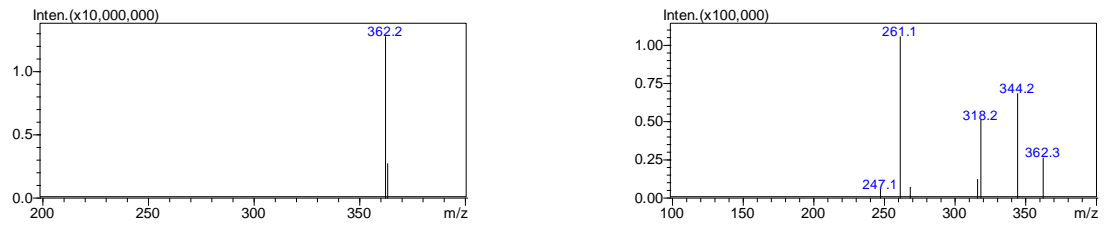


图 2 氧氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

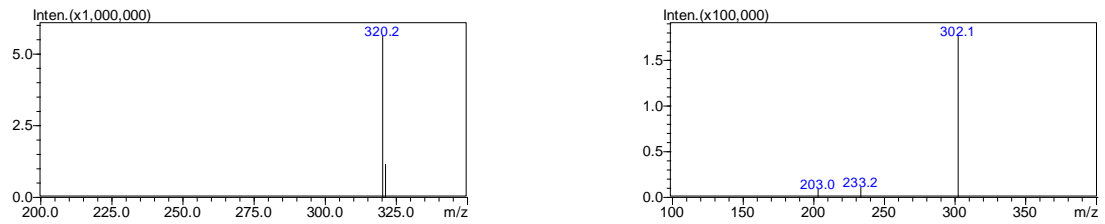


图 3 诺氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

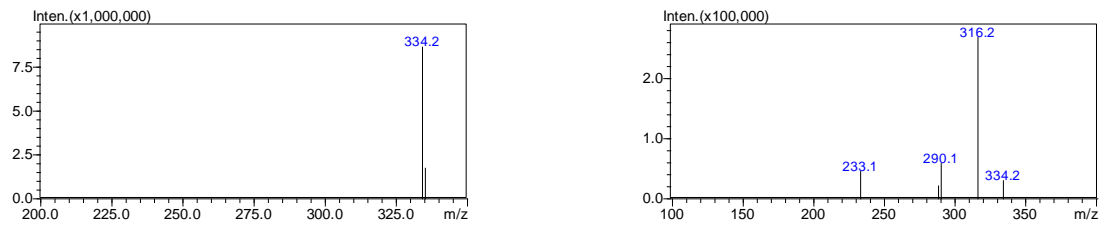


图 4 培氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

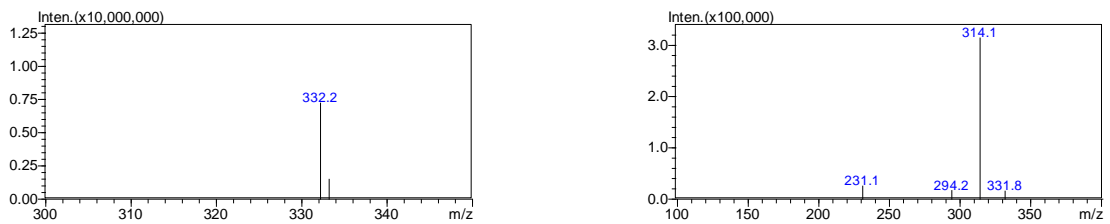


图 5 环丙沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

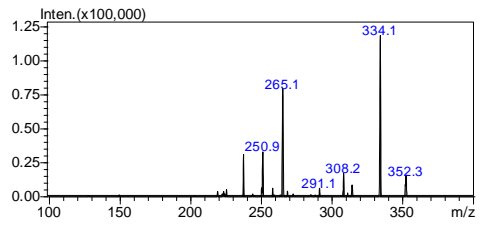
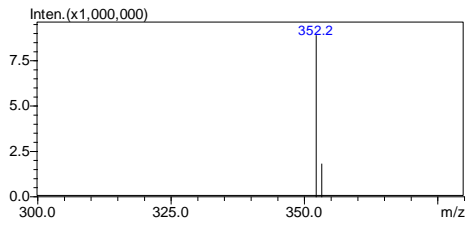


图 6 洛美沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

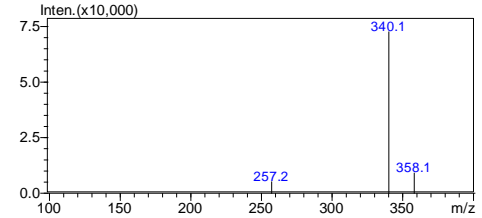
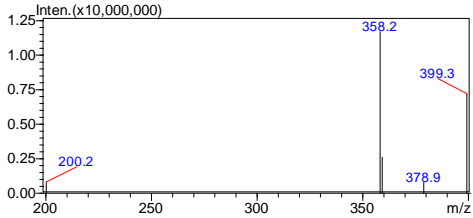


图 7 达氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

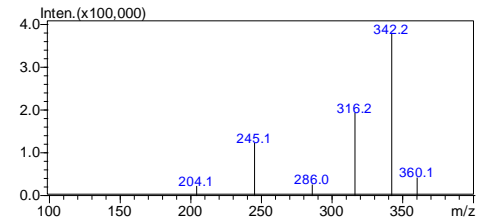
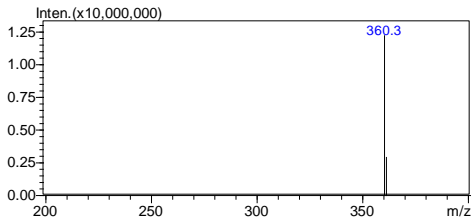


图 8 恩诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

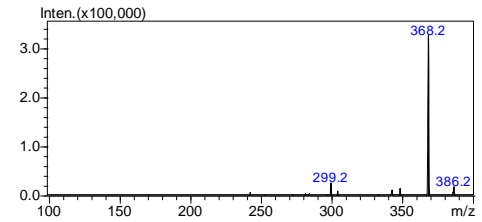
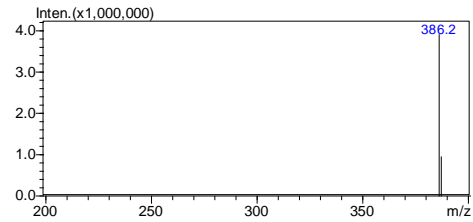


图 9 沙拉沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

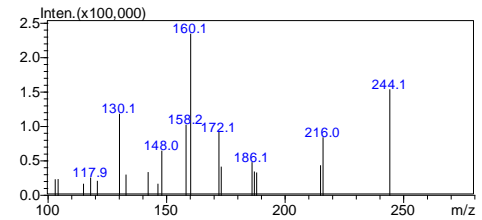
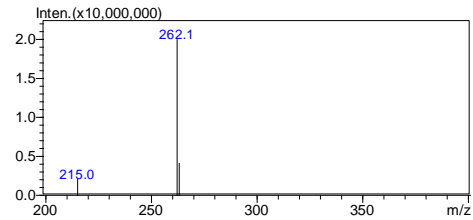


图 10 噁啉酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

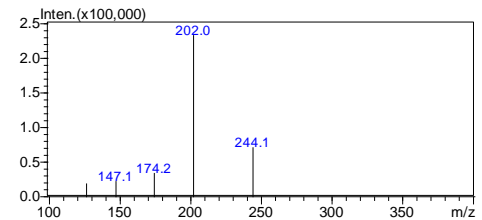
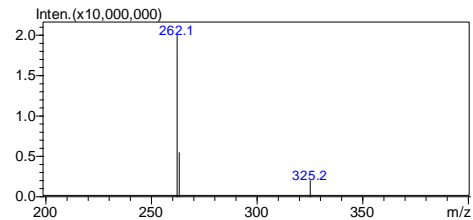


图 11 氟甲嗪的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

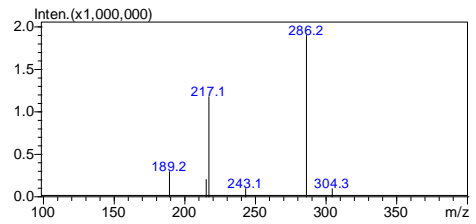
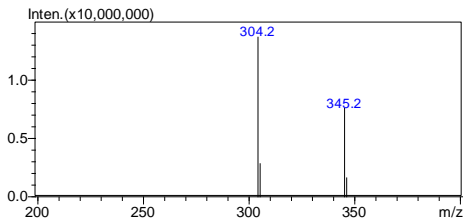


图 12 吡嘧酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

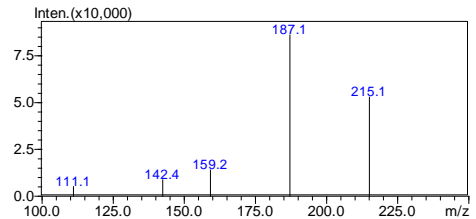
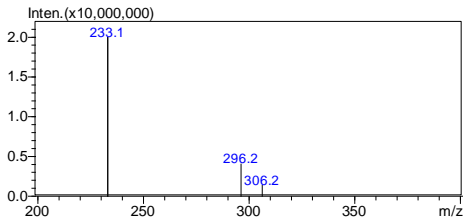


图 13 萘啶酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

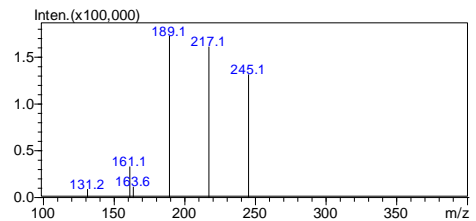
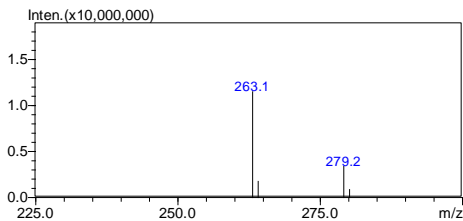


图 14 西诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-25V）（右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

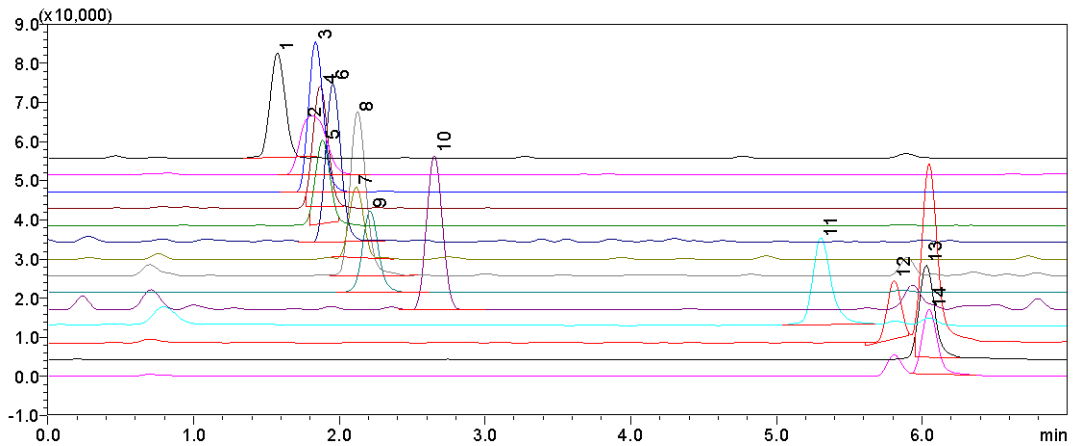


图 15 标准样品的 MRM 色谱图

(1: 2.5 $\mu\text{g/L}$ 吡嘧酸; 2: 5 $\mu\text{g/L}$ 依诺沙星; 3: 2.5 $\mu\text{g/L}$ 氧氟沙星; 4: 25 $\mu\text{g/L}$ 诺氟沙星; 5: 5 $\mu\text{g/L}$ 培氟沙星; 6: 5 $\mu\text{g/L}$ 环丙沙星; 7: 2.5 $\mu\text{g/L}$ 洛美沙星; 8: 5 $\mu\text{g/L}$ 达氟沙星; 9: 5 $\mu\text{g/L}$ 恩诺沙星; 10: 5 $\mu\text{g/L}$ 沙拉沙星; 11: 25 $\mu\text{g/L}$ 西诺沙星; 12: 2.5 $\mu\text{g/L}$ 噁唑酸; 13: 2.5 $\mu\text{g/L}$ 萘啶酸; 14: 2.5 $\mu\text{g/L}$ 氟甲喹)

2.3 线性范围

将不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 16~29 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 4。

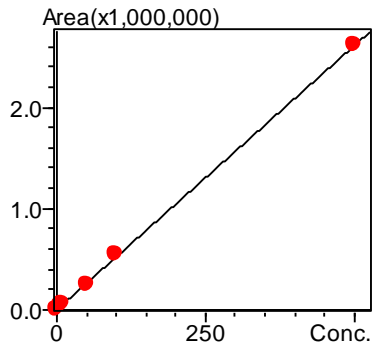


图 16 依诺沙星的校准曲线

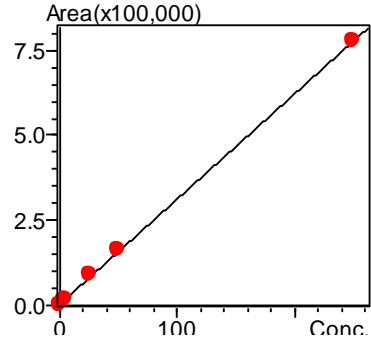


图 17 氧氟沙星的校准曲线

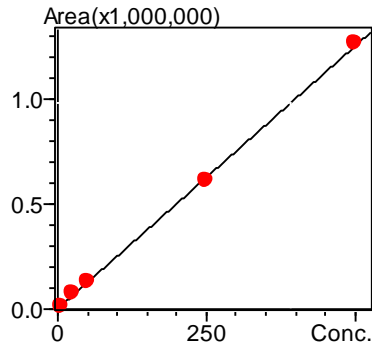


图 18 诺氟沙星的校准曲线

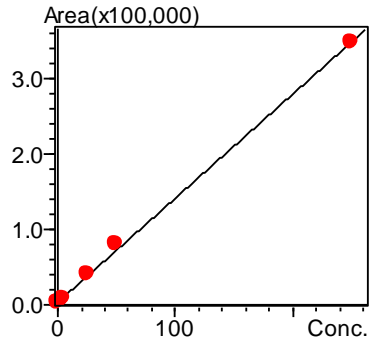


图 21 洛美沙星的校准曲线

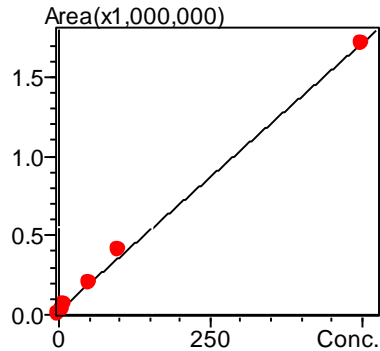


图 19 培氟沙星的校准曲线

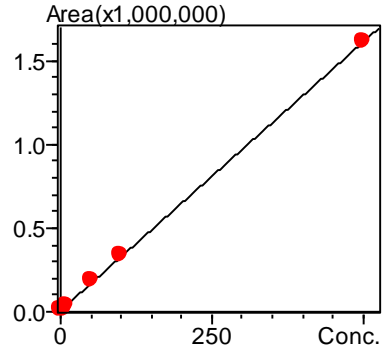


图 22 达氟沙星的校准曲线

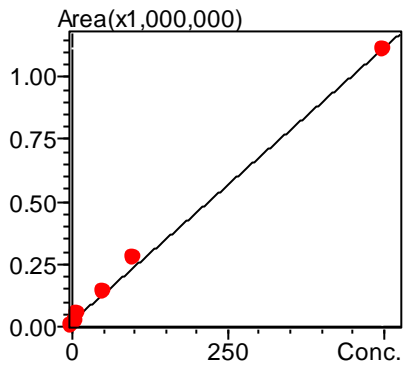


图 20 环丙沙星的校准曲线

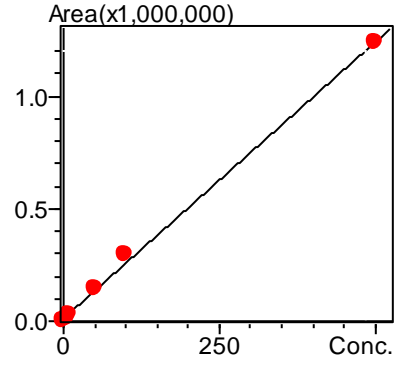


图 23 恩诺沙星的校准曲线

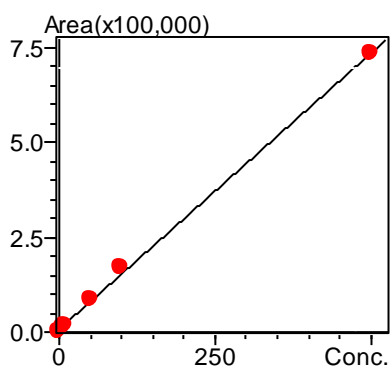


图 24 沙拉沙星的校准曲线

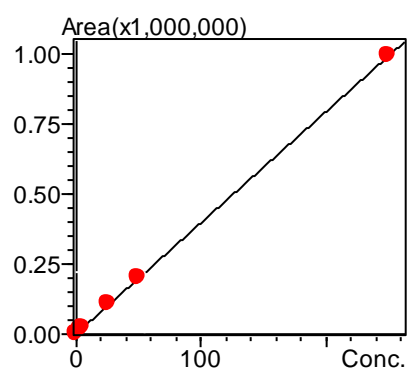


图 27 吡哌酸的校准曲线

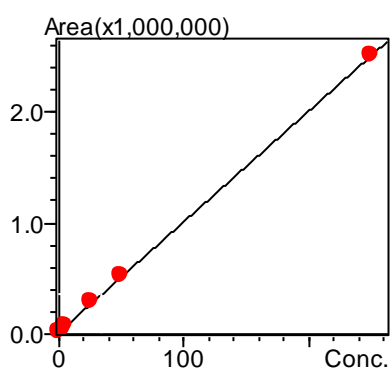


图 25 噁啉酸的校准曲线

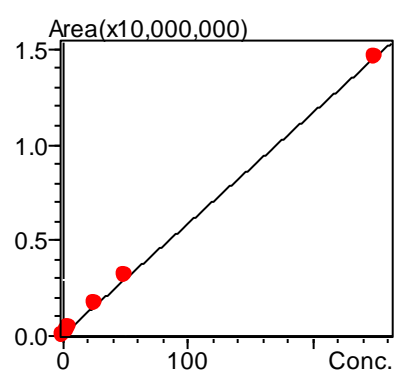


图 28 吡哌酸的校准曲线

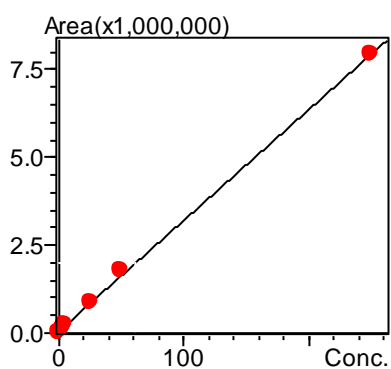


图 26 氟甲喹的校准曲线

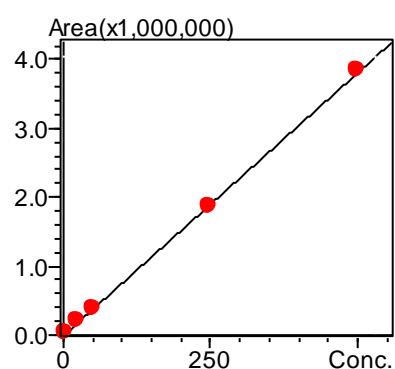


图 29 西诺沙星的校准曲线

表 4 校准曲线参数

| No. | 名称 | 校准曲线 | 线性范围 (µg/L) | 相关系数 r |
|-----|------|-------------------------------|-------------|--------|
| 1 | 依诺沙星 | $Y = (5210.26)X + (3090.70)$ | 1.0~500 | 1.0000 |
| 2 | 氧氟沙星 | $Y = (3088.28)X + (4327.79)$ | 0.5~250 | 0.9998 |
| 3 | 诺氟沙星 | $Y = (2499.58)X + (1672.78)$ | 5~500 | 0.9998 |
| 4 | 培氟沙星 | $Y = (3370.81)X + (26856.7)$ | 1.0~500 | 0.9993 |
| 5 | 环丙沙星 | $Y = (2189.90)X + (21093.5)$ | 1.0~500 | 0.9992 |
| 6 | 洛美沙星 | $Y = (1382.09)X + (3417.15)$ | 0.5~250 | 0.9995 |
| 7 | 达氟沙星 | $Y = (3207.19)X + (7670.04)$ | 1.0~500 | 0.9999 |
| 8 | 恩诺沙星 | $Y = (2457.58)X + (12362.3)$ | 1.0~500 | 0.9992 |
| 9 | 沙拉沙星 | $Y = (1453.99)X + (7474.59)$ | 1.0~500 | 0.9994 |
| 10 | 噁喹酸 | $Y = (9946.96)X + (18523.3)$ | 0.5~250 | 0.9999 |
| 11 | 氟甲喹 | $Y = (31449.4)X + (66461.2)$ | 0.5~250 | 0.9998 |
| 12 | 吡呱酸 | $Y = (3955.87)X + (2805.99)$ | 0.5~250 | 1.0000 |
| 13 | 萘啶酸 | $Y = (57834.6)X + (105320)$ | 0.5~250 | 0.9999 |
| 14 | 西诺沙星 | $Y = (7624.15)X + (-8145.69)$ | 5~500 | 0.9998 |

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。结果显示: 不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.014 % ~ 0.437 % 和 1.309 % ~ 4.937% 之间, 仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

| 样品名称 | RSD% (5 µg/L) | | RSD% (10 µg/L) | | RSD% (50 µg/L) | |
|------|-----------------|-------|----------------|-------|-----------------|-------|
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |
| 依诺沙星 | 0.437 | 4.576 | 0.272 | 3.315 | 0.152 | 1.309 |
| 培氟沙星 | 0.158 | 4.419 | 0.248 | 3.974 | 0.065 | 1.762 |
| 环丙沙星 | 0.273 | 4.706 | 0.163 | 3.438 | 0.085 | 2.810 |
| 达氟沙星 | 0.143 | 3.545 | 0.186 | 3.172 | 0.079 | 2.468 |
| 恩诺沙星 | 0.212 | 4.756 | 0.225 | 3.750 | 0.099 | 2.719 |
| 沙拉沙星 | 0.238 | 4.353 | 0.060 | 1.918 | 0.119 | 2.622 |
| | RSD% (2.5 µg/L) | | RSD% (5 µg/L) | | RSD% (25 µg/L) | |
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |
| 氧氟沙星 | 0.245 | 4.625 | 0.300 | 4.556 | 0.145 | 2.719 |
| 洛美沙星 | 0.188 | 4.937 | 0.140 | 4.052 | 0.119 | 2.916 |
| 噁喹酸 | 0.023 | 4.790 | 0.023 | 3.308 | 0.014 | 2.450 |
| 氟甲喹 | 0.018 | 2.934 | 0.014 | 2.184 | 0.019 | 2.251 |
| 吡呱酸 | 0.202 | 3.765 | 0.268 | 3.762 | 0.036 | 2.645 |
| 萘啶酸 | 0.057 | 4.633 | 0.010 | 2.592 | 0.046 | 2.738 |
| | RSD% (25 µg/L) | | RSD% (50 µg/L) | | RSD% (250 µg/L) | |
| | R.T. | Area | R.T. | Area | R.T. | Area |

| | | | | | | |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 诺氟沙星 | 0.200 | 3.989 | 0.252 | 2.864 | 0.069 | 2.706 |
| 西诺沙星 | 0.046 | 4.384 | 0.075 | 1.782 | 0.040 | 1.344 |

2.5 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将低浓度混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver. 5.41 软件计算信噪比和检出限（以 3 倍信噪比计算），依诺沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸、萘啶酸和西诺沙星的信噪比和检出限如表 6 所示。

表 6 信噪比(S/N)和检出限(LOD)

| 名称 | 浓度水平($\mu\text{g/L}$) | S/N | LOD($\mu\text{g/L}$) |
|------|-------------------------|-----|------------------------|
| 依诺沙星 | 1.00 | 14 | 0.24 |
| 氧氟沙星 | 0.50 | 31 | 0.05 |
| 诺氟沙星 | 5.00 | 39 | 0.43 |
| 培氟沙星 | 1.00 | 47 | 0.07 |
| 环丙沙星 | 1.00 | 8 | 0.41 |
| 洛美沙星 | 0.50 | 51 | 0.03 |
| 达氟沙星 | 1.00 | 10 | 0.35 |
| 恩诺沙星 | 1.00 | 32 | 0.10 |
| 沙拉沙星 | 1.00 | 9 | 3.60 |
| 噁喹酸 | 0.50 | 40 | 0.04 |
| 氟甲喹 | 0.50 | 70 | 0.02 |
| 吡呱酸 | 0.50 | 27 | 0.06 |
| 萘啶酸 | 0.50 | 44 | 0.04 |
| 西诺沙星 | 5.00 | 30 | 0.56 |

2.6 基质加标实验

选用不含 14 种喹诺酮类抗生素的牛奶为空白样品，进行基质加标实验，其中依诺沙星、培氟沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星和沙拉沙星的加标含量为 $2 \mu\text{g/kg}$ ，氧氟沙星、洛美沙星、噁喹酸、氟甲喹、吡呱酸和萘啶酸的加标含量为 $1 \mu\text{g/kg}$ ，诺氟沙星和西诺沙星的加标含量为 $10 \mu\text{g/kg}$ 。牛奶样品的检测色谱图与加标样品色谱图如图 30 和图 31 所示。由表 7 结果可知该方法灵敏度高，对于牛奶样品中的喹诺酮类抗生素检测的测定达到了国标《GB/T 21312-2007 动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》水平。

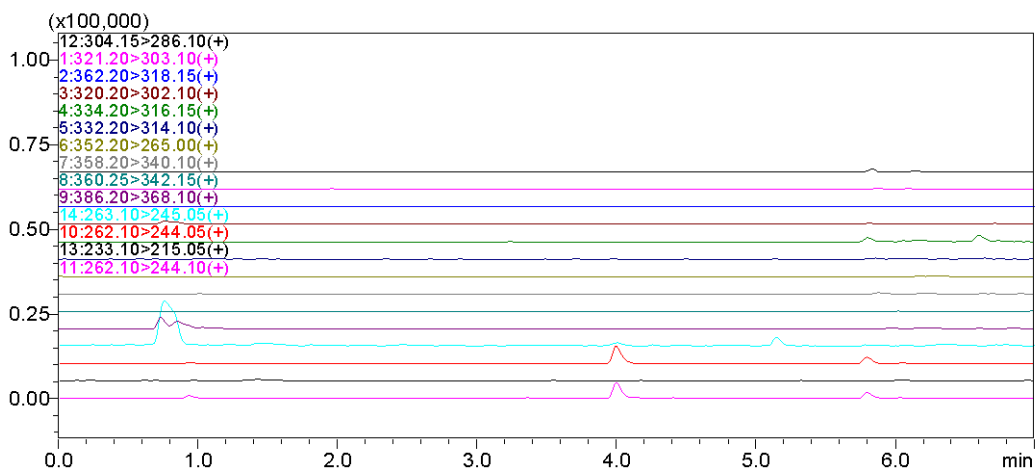


图 30 牛奶样品的 MRM 色谱图（未检出）

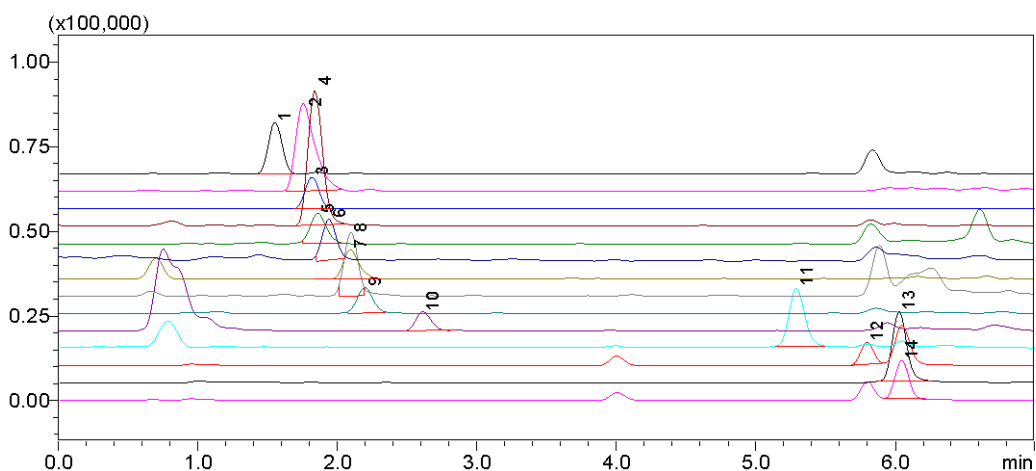


图 31 牛奶加标样品的 MRM 色谱图

(1:吡呱酸；2:依诺沙星；3:氧氟沙星；4:诺氟沙星；5:培氟沙星；6:环丙沙星；7:洛美沙星；8:达氟沙星；9:恩诺沙星；10:沙拉沙星；11:西诺沙星；12:噁喹酸；13:萘啶酸；14:氟甲喹)

表 6 加标样品信噪比(S/N)

| 名称 | 加标含量($\mu\text{g}/\text{kg}$) | S/N |
|------|---------------------------------|-----|
| 依诺沙星 | 2.00 | 40 |
| 氧氟沙星 | 1.00 | 79 |
| 诺氟沙星 | 10.00 | 45 |
| 培氟沙星 | 2.00 | 10 |
| 环丙沙星 | 2.00 | 11 |
| 洛美沙星 | 1.00 | 7 |
| 达氟沙星 | 2.00 | 9 |
| 恩诺沙星 | 2.00 | 17 |
| 沙拉沙星 | 2.00 | 10 |
| 噁喹酸 | 1.00 | 16 |
| 氟甲喹 | 1.00 | 15 |
| 吡呱酸 | 1.00 | 11 |

| | | |
|------|-------|----|
| 萘啶酸 | 1.00 | 58 |
| 西诺沙星 | 10.00 | 11 |

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用测定牛奶中14种喹诺酮类抗生素的方法。该方法在7.0 min 之内完成14 种目标物的分离分析，且精密度高，线性范围宽，校准曲线的相关系数均在0.999以上。对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.437%和4.937%以下，系统精密度良好。该方法具有超快速、高灵敏的特点，适合动物食品、水产品中喹诺酮类抗生素残留量的快速检测。