

同位素内标稀释液相色谱-串联质谱法测定 鱼贝类组织中残留的环丙氟哌酸

陈晓红, 王玉飞, 姚浔平, 金米聪*

(宁波市疾病预防控制中心, 宁波市毒物研究与控制重点实验室, 浙江 宁波 315010)

摘要 :建立了不同鱼贝类肌肉组织中以氘代同位素为内标测定环丙氟哌酸残留量的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法。样品加入内标环丙氟哌酸-D8和磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)后进行匀质并用乙腈超声提取,经正己烷脱脂后采用Waters Oasis[®] MAX小柱净化,在Cloversil-C18柱上,以乙腈-0.05%三氟醋酸(体积比为25:75)为流动相,采用多反应监测(MRM)模式,液相色谱-电喷雾质谱法测定。根据环丙氟哌酸和氘代内标物的定量离子质量色谱图的峰面积比值,采用内标法定量。结果表明,环丙氟哌酸和内标的定量离子峰面积比值与环丙氟哌酸浓度在0.1~50.0 μg/kg范围内呈现良好的线性关系,相关系数为0.999 1,方法的定量检测限为0.1 μg/kg,回收率为92.5%~98.1%,相对标准偏差(RSD)小于4.3%。将该方法用于市场上10种鱼和贝类样品的检测,结果表明该方法具有灵敏、准确的优点,完全满足残留分析的确证检测要求。

关键词 :固相萃取;液相色谱-串联质谱法;同位素内标;环丙氟哌酸;鱼贝类组织

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2009)01-0039-05 栏目类别:研究论文

Determination of ciprofloxacin residue in fish/shellfish tissues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standard dilution technique

CHEN Xiaohong, WANG Yufei, YAO Xunping, JIN Micong*

(Ningbo Key Laboratory of Poison Research and Control, Ningbo Municipal Center for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, China)

Abstract : Using isotope internal standard dilution technique, a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method has been developed for the identification and quantitative determination of ciprofloxacin residue in the tissues of various fishes/shellfishes. The homogenized tissue sample added with ciprofloxacin-D8 and phosphate buffer solution (pH 7.0) was extracted with acetonitrile under ultrasonication, and degreased with hexane. After solid-phase extraction (SPE) was performed on an Oasis[®] MAX cartridge, the sample was separated on a Cloversil-C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) by using the mobile phase consisting of CH₃CN-0.05% CF₃COOH (25:75, v/v). The detection was carried out by LC-MS/MS using an electrospray ionization interface in multiple reaction monitoring (MRM) mode. The quantification using isotope-labelled internal standard was based on the peak area ratio of ciprofloxacin and deuterated internal standard in the MRM mode. The calibration curve was linear within the range of 0.1–50.0 μg/kg and the limit of quantification was 0.1 μg/kg ($S/N \geq 10$). The recovery was between 92.5% and 98.1%, and the relative standard deviation was less than 4.3%. The application of this method was further demonstrated by analyzing ten various real samples from local markets. The results show that this method is sensitive, accurate and suitable for the confirmative determination of ciprofloxacin residues.

Key words : solid-phase extraction (SPE); liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); isotope internal standard; ciprofloxacin; fish/shellfish tissues

* 通讯联系人:金米聪,博士,主任技师。Tel:(0574)87274559, E-mail:jmcjc@163.com.

基金项目:浙江省医药卫生优秀青年科技人才专项基金(2007QN014)。

收稿日期:2008-06-04

近年来由于食品安全事件的频频发生,食品安全成为了全球关注的焦点。随着 2006 年“多宝鱼事件”的曝光,水产品中禁用药物的残留监测已成为食品质量安全监管部门的重要任务。环丙氟哌酸又名环丙沙星,曾被用于治疗鱼的烂鳃病、赤皮病等细菌性疾病,目前是水产养殖的禁用药物。但由于其抗菌谱广,抗菌力强,防病效果好,价格低廉,许多养殖户由于对违禁药物的危害认识不足,依然对环丙氟哌酸的使用禁而不止,因此时有出口水产品遭遇欧盟环丙氟哌酸的药物残留技术壁垒而被拒收、扣留、退货或索赔等。目前水产品中环丙氟哌酸残留常见的检测方法主要有液相色谱-紫外法^[1-3]、液相色谱-荧光法^[3-6]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[6-9]等。根据欧盟委员会 2002/657/EC 决议^[10]的规定,禁用兽药的确证检测方法必须能提供结构方面的信息,且要达到法规规定的 4 个确证点,液相色谱-紫外或荧光法检测均不能满足这一要求。LC-MS/MS 能给出 4 个以上的确证点,定性准确度高,检出限低,目前已广泛用于食品质量安全及毒物残留等检测^[11-18],即使在鱼贝类肌肉组织中目标物的浓度低、基质背景高的情况下,也能消除背景干扰,改善灵敏度。目前文献报道的环丙氟哌酸检测方法大多采用外标法或其他类似抗生素作为内标的多种抗生素的同时测定方法^[1-9],由于外标法易受环境及仪器条件的变化而影响测定准确度,而其他同类抗生素可能同时存在于鱼贝类组织基体中,从而影响了方法的准确定量,同时由于没有采用同位素内标,难以较好地补偿样品预处理及检测过程中的诸多因素对检测结果的影响。本文利用同位素内标稀释技术,建立了一种科学、可靠、快速地测定鱼贝类组织中环丙氟哌酸的 LC-MS/MS 确证检测方法,用于实际样品的检测,取得了满意的效果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

1100 Series LC-MSD Trap SL 型高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司);KQ-2200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);全玻璃溶剂过滤器(美国 Waters 公司);HGC-24 型氮吹仪(天津恒奥科技有限公司);Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司);12 孔固相萃取仪(美国 Supelco 公司);Waters Oasis[®] MAX 混合型阴离子交换的苯乙烯-二乙烯基苯树脂基质的固相萃取小柱(3 mL/60 mg,美国 Waters 公司)。

甲醇、甲酸、三氟醋酸均为色谱纯(德国 Merck 公司),氨水、氢氧化钠、磷酸二氢钾均为分析纯(中

国医药集团上海化学试剂公司),所有的溶剂使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤;环丙氟哌酸标准品(纯度为 99.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司);环丙氟哌酸-D8 标准品(纯度为 98.0%,加拿大多伦多化学研究所)。

200.0 μg/L 环丙氟哌酸-D8 标准使用液的配制:准确称取 10.0 mg 环丙氟哌酸-D8 标准品置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释成 100.0 mg/L 的储备液,然后用甲醇稀释成 200.0 μg/L 的标准使用液,于 -4 °C 条件下避光保存。

环丙氟哌酸标准储备液的配制:准确称取 10.0 mg 环丙氟哌酸标准品于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释成 100.0 mg/L 的储备液。

环丙氟哌酸标准工作液的配制:使用前用甲醇稀释环丙氟哌酸标准储备液配成适当质量浓度的工作液(含环丙氟哌酸-D8 内标浓度为 2.0 μg/L),于 -4 °C 条件下避光保存。

磷酸盐缓冲液的配制:称取磷酸二氢钾 6.8 g,加水溶解定容至 500 mL,用 20% NaOH 溶液调 pH 为 7.0。实验用水均来自 Milli-Q 纯水系统。

1.2 分析条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Cloversil-C18 柱(150 mm × 4.6 mm 5 μm);流速 0.5 mL/min;柱温 30 °C;流动相:乙腈-0.05% 三氟醋酸(体积比为 25:75)。

1.2.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI),正离子模式;扫描范围 m/z 100 ~ 500;毛细管电压:3 100 V;毛细管出口电压:215 V;干燥温度:350 °C;干燥气流速:9.0 L/min;喷雾压力 241.3 kPa(35.0 psi)。环丙氟哌酸的定量离子对为 m/z 332/ m/z 288,确证离子对为 m/z 332/ m/z 245, m/z 332/ m/z 268,其碰撞电压为 2.95 V;环丙氟哌酸-D8 的定量离子对为 m/z 340/ m/z 296,其碰撞电压为 2.90 V。

1.3 样品处理

1.3.1 匀质和提取

将鱼贝类肌肉组织用家庭用搅拌机粉碎后置于 -18 °C 下冷冻保存备用。准确称取 1.00 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 10.0 μL 一定浓度的内标标准溶液及 5 mL 磷酸盐缓冲溶液,用匀质器以 10 000 r/min 速率匀质,然后加入 5 mL 乙腈,充分旋涡混合 1 min,室温下超声提取 15 min。取出离心管,以 10 000 r/min 速率于 4 °C 下离心 10 min,上清液倒入另一离心管中。残渣中加入 5 mL 磷酸盐缓冲液-乙腈(体积比为 1:1),按上述方法再提取一次,合并上清液。

1.3.2 净化

在上清液中加入 5 mL 预先用乙腈饱和的正己烷,加塞剧烈振荡 1~2 min,以 10 000 r/min 速率于 4 °C 下离心 5 min,弃去正己烷层,下层溶液用正己烷重复洗涤一次,合并下层溶液。将下层溶液过预先依次用 1 mL 甲醇、1 mL 5 mol/L NaOH 和 1 mL 水活化的 C18 SPE 固相萃取小柱,分别用 1 mL 5% 氨水、1 mL 甲醇淋洗,然后用 2 mL 含 4% 甲酸的甲醇溶液洗脱,挥干溶剂,用乙腈溶解定容至 1.0 mL,过 0.45 μm 滤膜后,取样 10.0 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2 结果与讨论

2.1 样品处理条件的选择及优化

环丙氟哌酸主要以盐酸盐或乳酸盐的形式存在,易溶于水,在中等极性或极性的有机溶剂中有较好的溶解度。分别以甲醇、磷酸盐缓冲溶液、乙腈-磷酸盐缓冲溶液(体积比为 1:1)和乙腈作为提取溶剂考察样品中环丙氟哌酸的提取效果,结果表明:乙腈的提取率约为 50%,这可能是由于鱼贝类肌肉组织中蛋白质和油脂含量较高,而乙腈对动物蛋白具有良好的沉淀作用,部分待测物被蛋白包裹后与蛋白共沉淀;甲醇的回收率尽管比乙腈要稍高,但也并不十分理想,磷酸盐缓冲溶液具有较高的回收率,但是经充分粉碎的鱼贝类肌肉组织中部分小分子蛋白溶解于磷酸盐缓冲溶液中,如果不进行蛋白沉淀,则易导致下一步的固相萃取小柱堵塞;乙腈-磷酸盐缓冲溶液(体积比为 1:1)既可使环丙氟哌酸残留得到较好的提取,同时又因为乙腈的存在,使提取液中的小分子蛋白能较好地沉淀,保证了固相萃取净化步骤的顺利进行,故本方法选用乙腈-磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)作为环丙氟哌酸的提取溶剂。

对于痕量环丙氟哌酸残留的检测,其检测结果的准确性在很大的程度上依赖于共存成分对待测物离子化的影响大小。如果仅采用液-液萃取,鱼贝类组织的共存物要影响环丙氟哌酸在质谱雾化室中的离子化,文献[6-9]均采用固相萃取进行前处理。本工作通过优化条件,选用混合型阴离子交换 Oasis® MAX 固相萃取小柱,采用乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 7.0)提取后直接上样,既方便操作,又可使环丙氟哌酸以中性分子的形式吸附保留在 MAX 小柱上(环丙氟哌酸分子中同时含有氨基和羧基,在不同酸碱溶液中,存在着质子化平衡体系,表现为两性分子,当 pH 为 7.0 时,环丙氟哌酸以中性分子形式存在),在采用 5% 氨水淋洗时,环丙氟哌酸以碱式阴离子的形式发生离子交换而保留在 MAX 小柱

上,而其他难以转化成阴离子的杂质被首先淋洗下来,最后当用含 4% 甲酸的甲醇洗脱时,环丙氟哌酸重新转化成中性分子或酸式阳离子形式而被甲醇洗脱。本文还比较了 Oasis® HLB(3 mL/60 mg)、Bond ELUT SAX(3 mL/60 mg)、Supelco LC-18(3 mL/60 mg)及 Oasis® MAX(3 mL/60 mg) 4 种固相萃取小柱的净化效果。结果发现,在 0.5、2.0 和 10.0 μg/kg 3 个添加水平下,Oasis® HLB、Bond ELUT SAX 和 Supelco LC-18 小柱的平均回收率分别为 62.3%、79.3% 和 65.8%,而 Oasis® MAX 的平均回收率为 94.9%。最终选择采用 Oasis® MAX(3 mL/60 mg)固相萃取小柱净化样品。

2.2 质谱条件的优化

文献[6-9]报道了利用电喷雾电离源(ESI)在正离子模式下测定环丙氟哌酸残留。为了获得最佳的质谱检测条件,本实验通过直接注射泵将质量浓度为 1.0 mg/L 的环丙氟哌酸标准溶液以 0.5 mL/h 的流速,以及将乙腈-0.05% 三氟醋酸(体积比为 25:75)的流动相以 0.2 mL/min 的流速通过 T 型管同时引入质谱雾化室,利用仪器自动优化程序,优化其毛细管电压、毛细管出口电压、干燥气温度及流量等,以得到强而稳定的准分子离子信号,确定环丙氟哌酸的准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 332,与文献[6-9]的采用串联四极杆质谱的结果一致。选择其准分子离子峰 $[M+H]^+$ m/z 332 为母离子,对其子离子进行全扫描,在本文的质谱条件下,环丙氟哌酸主要产生 m/z 288、 m/z 268 和 m/z 245 等子离子;而环丙氟哌酸-D8 以 m/z 340 为母离子主要产生 m/z 296、 m/z 276 和 m/z 249 等子离子,其一级及二级质谱图见图 1。选取丰度最强的 m/z 288 和 m/z 296 分别作为环丙氟哌酸和环丙氟哌酸-D8 的定量监测离子,选择环丙氟哌酸 m/z 332/ m/z 245 和 m/z 332/ m/z 268 为确证离子对,其碎片离子的相对丰度分别为 m/z 288(100%)、 m/z 268(16%)、 m/z 245(18%)。我们推测,以环丙氟哌酸的准分子离子 $[M+H]^+$ m/z 332 为母离子,碎裂脱去一个 CO₂ 中性分子后得到的碎片离子是 m/z 288 $[M+H-CO_2]^+$,在脱去一个 CO₂ 中性分子后再脱去一分子 HF 或 C₂H₅N 后得到的碎片离子分别是 m/z 268 $[M+H-CO_2-HF]^+$ 和 m/z 245 $[M+H-CO_2-C_2H_5N]^+$,其特征碎片离子的可能裂解途径如图 2 所示。

2.3 线性范围和检出限

称取 6 份空白样品各 1.0 g 置于 50 mL 烧杯中,加入环丙氟哌酸-D8 标准使用液 10.0 μL(浓度为 2.0 μg/kg),加入环丙氟哌酸标准储备液配制成

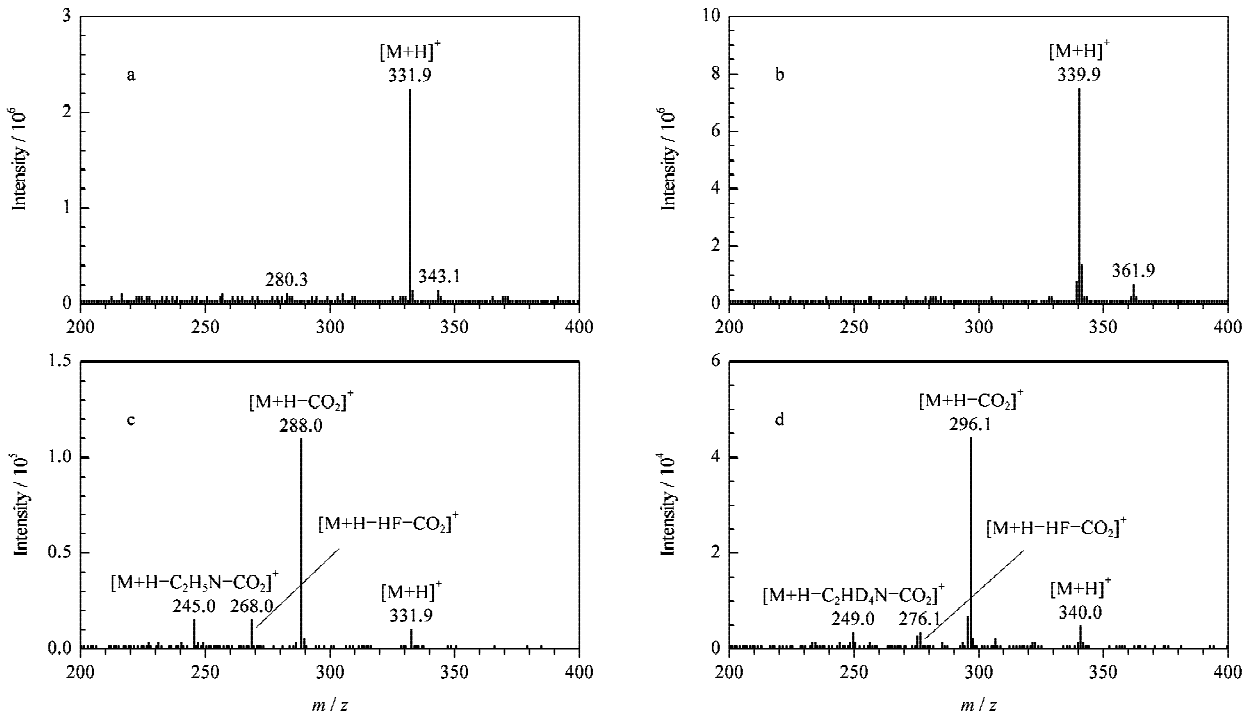


图 1 (a)环丙氟哌酸和 (b)环丙氟哌酸-D8 的 MS 图及 (c)环丙氟哌酸和 (d)环丙氟哌酸-D8 的 MS/MS 图

Fig. 1 MS spectra of (a) ciprofloxacin and (b) ciprofloxacin-D8, and the MS/MS spectra of (c) ciprofloxacin and (d) ciprofloxacin-D8

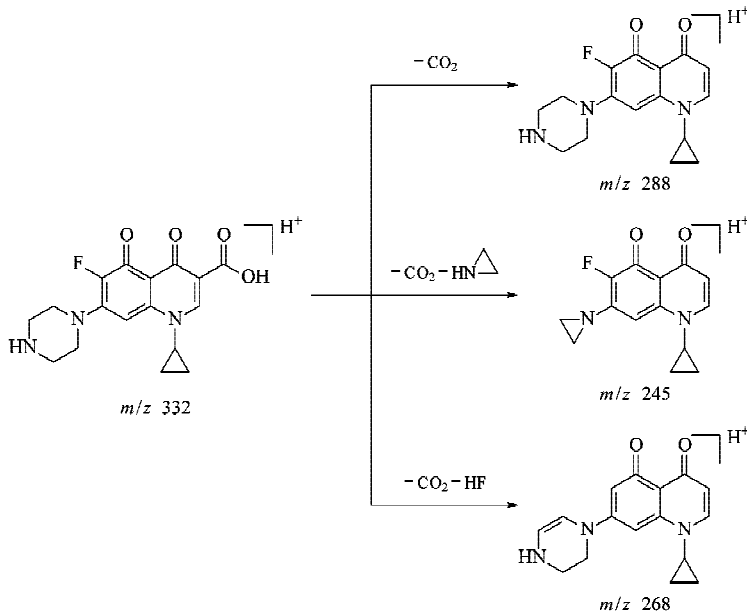


图 2 环丙氟哌酸特征碎片离子的可能裂解途径

Fig. 2 Possible fragmentation mechanism of the characteristic fragments for ciprofloxacin

0.0, 0.1, 0.5, 2.0, 10.0, 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的系列样品,在上述分析条件下,以环丙氟哌酸与环丙氟哌酸-D8 的峰面积比值 A 为纵坐标,以环丙氟哌酸的质量浓度 C 为横坐标,计算线性回归方程,其回归方程为 $A = 0.65C - 0.023$, 相关系数 (r) 为 0.999 1, 环丙氟哌酸在 0.1 ~ 50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围具有良好的线性关系,以信噪比 (S/N) 为 10 进行计算,鱼类组织中

的环丙氟哌酸的定量检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4 回收率和精密度

取空白样品,分别添加一定量的环丙氟哌酸标准溶液(其中含 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氘代内标),使其浓度为 0.5, 2.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按“1.3”节进行操作,平行测定 6 次,回收率为 92.5% ~ 98.1%,相对标准偏差 (RSD) 为 2.1% ~ 4.3% (见表 1)。

表 1 空白样品中环丙氟哌酸的加标回收率($n=6$)Table 1 Recovery of ciprofloxacin spiked in a blank sample ($n=6$)

Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Found (mean \pm SD)/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/ %	RSD/ %
0.5	0.47 \pm 0.01	94.0	2.1
2.0	1.85 \pm 0.06	92.5	3.2
10.0	9.81 \pm 0.42	98.1	4.3

2.5 方法的比较

在实验中利用高效液相色谱-串联质谱技术,分别使用内标法和外标法对鱼贝类组织中的环丙氟哌酸进行回收率比较。结果表明:使用外标法时其回收率为 78.3%~95.2%,平均回收率为 86.8%,而用内标法进行定量时,其回收率为 92.5%~98.1%,平均回收率为 94.9%;内标法的定量回收率高于外标法,使用外标法时其最低检出限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,与内

标法的 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相比,稍有差别,这主要由于外标法抗环境与检测条件变化能力不如同位素内标法所致;外标法的线性范围为 0.2~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,与内标法的 0.1~50.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 相比,主要由于检出限的差异引起的线性范围低限的差别。总体而言,同位素内标法比外标法具有更好的准确性。

2.6 样品分析

为考察方法的适用性,按本方法对市售的鲜活鱼贝类进行了抽检,样品包括鲫鱼、鳊鱼、草鱼、鲤鱼、鳕鱼、鲢鱼、小黄鱼、对虾和花蛤、牡蛎共 10 种。结果显示,除小黄鱼样品中含有 4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的环丙氟哌酸外,其他 9 种鱼贝类肌肉组织中均未检测出环丙氟哌酸。图 3 为小黄鱼样品的 MRM 色谱图。由图 3 可以看出,空白小黄鱼样品中没有出现明显的色谱峰,说明基质中的其他成分几乎不干扰测定。

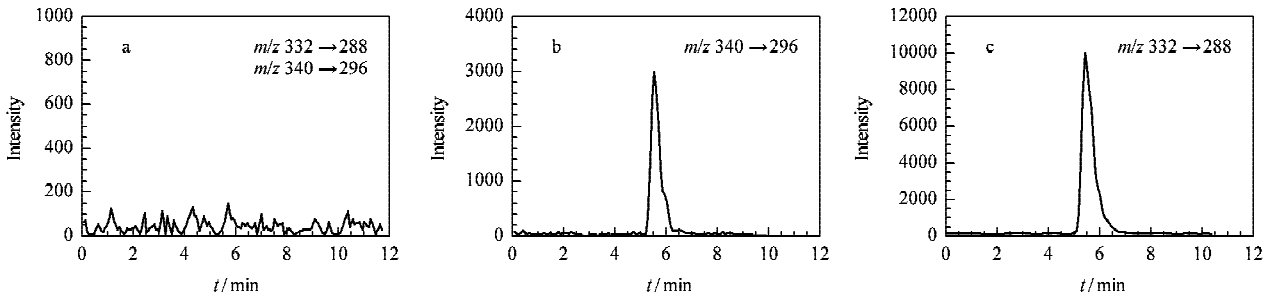


图 3 MRM 模式下 (a) 空白小黄鱼样品、(b) 空白小黄鱼样品中添加环丙氟哌酸-D8 (2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 和 (c) 阳性小黄鱼样品 (4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的色谱图

Fig. 3 Chromatograms of (a) a blank small yellow croaker sample, (b) a blank small yellow croaker sample spiked with ciprofloxacin-D8 (2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and (c) a positive small yellow croaker sample of ciprofloxacin (4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) in MRM mode

3 结论

所建立的鱼贝类肌肉组织中环丙氟哌酸残留的同位素稀释高效液相色谱-电喷雾电离离子阱质谱联用测定方法具有样品用量少、操作简便、方法准确灵敏、有机试剂消耗量少等优点,适用于鱼贝类肌肉组织中环丙氟哌酸残留的确证检验。

参考文献:

[1] Pellegrino R M, Segoloni F, Cagini C. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(2): 567
 [2] Meng Y, Wu G H, Zhu X H, et al. Journal of Fishery Sciences of China (孟勇, 吴光红, 朱晓华, 等. 中国水产科学), 2005, 12(6): 772
 [3] Xu Y P, Ding H Y, Pan H X. Chinese Journal of Health Laboratory Technology (徐亚萍, 丁红云, 潘海祥. 中国卫生检验杂志), 2007, 17(6): 977
 [4] Yorke J C, Froc P. J Chromatogr A, 2000, 882(1/2): 63
 [5] Guo G H, Pan W, Su D S, et al. Chinese Journal of Chromatography (郭根和, 潘葳, 苏德森, 等. 色谱), 2005, 23(4): 401
 [6] Chen X M, Chi H C, Liu H S, et al. Life Science Instruments (陈笑梅, 池浩超, 刘海山, 等. 生命科学仪器),

2005, 3(5): 20

[7] Johnston L, Mackay L, Crft M. J Chromatogr A, 2002, 982(1): 97
 [8] Du Z X, Sun S Q. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society (杜振霞, 孙殊琦. 质谱学报), 2007, 28(4): 219
 [9] Toussaint B, Chedin M, Bordin G, et al. J Chromatogr A, 2005, 1088(1): 32
 [10] Commission Decision 2002/657/EC. [2008-05-10]. http://www.wetgiw.gov.pl/old/UE/prawo/02_657/e02657.pdf
 [11] Jin M C, Ouyang X K, Chen X H. J Appl Toxicol, 2007, 27(1): 18
 [12] Jin M C, Ren Y P, Xu X M, et al. Anal Letters, 2007, 40(4): 737
 [13] Xu Q, Huang M, Ren Q L, et al. Chromatographia, 2007, 66(9/10): 735
 [14] Jin M C, Ouyang X K, Ren Q L, et al. Talanta, 2007, 72(2): 582
 [15] Jin M C, Ren Y P, Xu X M, et al. Forensic Sci Int, 2007, 171(1): 52
 [16] Jin M C, Ren Y P, Chen X H. Chromatographia, 2007, 66(5/6): 407
 [17] Chen K B, Cai M Q, Chen X H, et al. Chromatographia, 2008, 67(3/4): 225
 [18] Yue Z F, Lin X Y, Tang S B, et al. Chinese Journal of Chromatography (岳振峰, 林秀云, 唐少冰, 等. 色谱), 2007, 25(4): 491