

许蔚, 辛志宏, 张晓燕, 等. LC-MS/MS 法测定蜂花粉中 18 种喹诺酮类药物残留 [J]. 环境化学, 2015, 34(4): 810-813

ThermoFisher
SCIENTIFIC

LC-MS/MS 法测定蜂花粉中 18 种喹诺酮类药物残留

许蔚^{1,2*} 辛志宏¹ 张晓燕² 柳菡² 殷耀² 杨雯笈²
徐牛生³ 吴斌² 沈崇钰² 张睿²

(1. 南京农业大学食品科技学院, 南京, 210095; 2. 江苏出入境检验检疫局食品实验室, 南京, 210001;
3. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 上海, 201206)

摘要 实验建立了蜂花粉样品前处理方法, 用 15 mL 2% (V/V) 的高氯酸进行提取, 离心过滤后调节清液 pH 值为 6.0, 经由 HLB 固相萃取净化后, 用液相色谱串联质谱法进行测定. 用最终建立的分析方法对蜂花粉进行添加回收实验, 添加量为 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 其回收率在 70.0%—111.5% 之间, 精密度小于 10.0%, 定量限为 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 该方法通用性较好, 结果可靠, 可适用于日常蜂花粉样品的检测.

关键词 高氯酸, 液相色谱-串联质谱, 喹诺酮类, 蜂花粉.

喹诺酮是一类人工合成的含 4-喹诺酮基本结构、对细菌 DNA 螺旋酶具有选择性抑制的抗菌剂, 是一类广泛使用的抗生素. 喹诺酮类药物除了其副作用直接危害人类外, 更严重的问题是食品中残留低浓度的药物可能使人的致病菌产生耐药性. 因此, 必须十分重视喹诺酮类在动物性食品中的残留问题. 目前先后有不同国家检出我国出口的蜂花粉中含有抗生素, 而我国现行的国家标准均无蜂花粉中抗生素检验指标, 对于农药残留和重金属污染元素也仅涉及了其中很少的一部分, 不足以保障蜂花粉的食用安全性.

目前用于喹诺酮类残留的检测方法主要有微生物法、薄层色谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱联用法. 其中微生物方法容易出现假阳性, 准确度不高, 因此很少被使用; 液相色谱法灵敏度高、方法稳定、精确度高、特异性强, 但是对多残留难以定性, 分离度不好; 液相色谱串联质谱联用 (LC-MS/MS) 是现代分析中常用的一种多残留分析方法, 抗干扰能力强、检出限低、无需强调分离, 可一次性检测几乎所有的常用喹诺酮类药物残留, 且随着仪器不断的普及, 成为最主要最常见的检测方法.

目前文献报道的液质联用法检测喹诺酮残留的方法主要针对于水产、畜禽肉类、蜂蜜和蜂王浆等基质, 而对于蜂花粉基质尚未见相关报道. 蜂花粉是蜜蜂采集被子植物雄蕊花药或裸子植物小孢子囊内的花粉细胞, 形成的团粒状物. 蜂花粉含有多种营养与生物活性物质, 如氨基酸、维生素、黄酮、常量和微量元素等, 成分比较复杂, 因此在分析前需要对蜂花粉进行处理, 去除干扰成分. 目前还没有有效的蜂花粉前处理方法, 虽然已有文献报道对于蜂蜜和蜂王浆可以采用如磷酸盐缓冲溶液、氢氧化钠溶液等处理, 但是由于蜂花粉主要成分与蜂蜜和蜂王浆差异较大, 这些方法均无法有效除去蛋白质和黄酮类物质, 导致回收率较低. 本方法优化了蜂花粉中 18 种喹诺酮类药物检测的提取方法和净化方法, 最终选择了 2% 高氯酸为提取液, 经 HLB 净化后, 采用高效液相色谱串联质谱法测定蜂花粉中喹诺酮类药物的含量.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及材料

液相色谱-串联四极杆质谱联用仪: Thermo TSQ Quantum Vantage (配备电喷雾离子 (ESI) 源和大气压化学电离 (APCI) 源); Thermo Finnigan Surveyor 液相色谱系统; 氮吹仪 (美国 Organomation 公司); 超纯水器 (Millipore 公司); 2-16PK 离心机 (德国 Sigma 公司); SPE 固相萃取装置 SHZ-D; OASIS HLB 固相萃取柱 3 mL/60 mg (美国 Waters 公司)

萘啶酸 (Nalidixic acid, NAL)、恶喹酸 (Oxolinic acid, OXO)、氟甲喹 (Flumequine, FLU)、西诺沙星 (Cinoxacin, CIN)、诺氟沙星 (Norfloxacin, NOR)、伊诺沙星 (Enoxacin, ENO)、环丙沙星 (Ciprofloxacin, CIP)、洛美沙星 (Lomefloxacin, LOM)、丹诺沙星 (Danofloxacin, DAN)、恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR)、氧氟沙星 (Ofloxacin, OFL)、马波沙星 (Marbifloxacin, MAR)、氟罗沙星 (Fleroxacin, FLE)、加替沙星 (Gatifloxacin, GAT)、沙拉沙星 (Sarafloxacin, SAR)、司帕沙星 (Sparfloxacin, SPA)、奥比沙星 (Orbifloxacin, ORB)、双氟沙星 (Difloxacin, DIF) 均购自 Sigma 或 Dr. Ehrenstorfer 公司, 纯度均 $\geq 98\%$.

* 通讯联系人; Tel: (025) 52345176, E-mail: Cathy_xuwei@163.com

D5-诺氟沙星(D5-Norfloxacin, D5-NOR)、D5-恶喹酸(D5-Oxolinic acid, D5-OXO)、D8-环丙沙星(D8-Ciprofloxacin, D8-CIP)、D5-恩诺沙星(D5-Enrofloxacin, D5-ENR), 购自 WITEGA BERLIN 公司, 纯度均 $\geq 98\%$ 。

甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司), 甲酸(色谱纯, 德国 CNW 公司), 磷酸氢二钾、甲醇(分析纯, 南京化学试剂厂), 高氯酸(优级纯, 美国 Aladdin 公司)。

样品来源于市售蜂花粉样品以及来自不同产地不同花种的蜂花粉原料。

1.2 标准溶液的配制

标准储备液的配制: 准确的分别称取 18 种喹诺酮标准品, 用适量甲醇溶解, 需要时加入 500 μL 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液助溶, 用甲醇定容至 10 mL, 配成 1.0 g·L⁻¹ 的标准储备液, 于 0—4 °C 下避光保存。

吸取 1.0 mL 内标标准品, 用甲醇定容至 10 mL, 配成 1.0 g·L⁻¹ 的标准储备液, 于 0—4 °C 下避光保存。

标准工作液: 按照实际检测需求, 用流动相稀释标准储备液, 配制标准工作溶液, 质量浓度范围为 1—50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 并加入内标溶液, 使其质量浓度为 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

1.3 样品前处理

准确称取 1.00 \pm 0.05 g 样品于 50 mL 塑料离心管中, 加入 2 mL 水, 涡旋 30 s, 准确加入 50 μL 内标溶液后, 再加入 15 mL 2% (V/V) 高氯酸溶液, 于涡旋混匀器上涡旋 1 min, 以 8000 r·min⁻¹ 速率离心 3 min, 取出上清液至另一干净塑料离心管中, 用 1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液调节 pH 值为 6.0 后, 以 8000 r·min⁻¹ 速率离心 3 min, 上清液用中速滤纸过滤至干净的 50 mL 离心管中, 待净化。

提取液加入预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水处理的 HLB 柱中, 流速控制在每秒 1—2 滴, 用 5 mL 水洗小柱, 弃去全部流出液, 减压抽干 10 min, 最后用 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液于 10 mL 试管中, 于 45 °C 用氮吹仪吹干, 用甲醇-水(3:7, V/V) 定容至 1.0 mL, 过 0.45 μm 滤膜到进样瓶中, 供液相色谱-质谱仪测定。

1.4 分析方法

色谱条件: Varian Polaris C-18 色谱柱(100 \times 2.1 mm, 5 μm), 流动相: A, 0.1% (V/V) 甲酸水溶液; B, 甲醇。梯度洗脱程序: 0—1.0 min, 10% B; 1.0—3.0 min, 10%—30% B; 3.0—4.0 min, 30% B; 4.0—6.0 min, 30%—90% B; 6.0—9.5 min, 90% B; 9.5—11.0 min, 10% B。流速: 0.25 mL·min⁻¹。柱温为室温。进样体积为 25 μL 。

质谱条件: 采用 ESI 源, 正离子方式检测; 喷射电压: 2500 V; 鞘气(Sheath Gas) 55 bar, 辅助气(Auxiliary Gas) 10 bar; 毛细管温度: 350 °C。待测化合物的信息和质谱参数见表 1。

表 1 化合物的信息和质谱参数

| 化合物 | 母离子 (m/z) | 子离子 (m/z) | 碰撞能/eV |
|------------------|---------------|---------------|--------|
| Nalidixic acid | 233 | 187* 214.8 | 26 15 |
| Oxolinic acid | 262 | 244* 216 | 18 33 |
| Flumequine | 262 | 244* 202 | 18 29 |
| Cinoxacin | 263 | 217* 245 | 20 20 |
| Norfloxacin | 320 | 276* 233 | 14 18 |
| Enoxacin | 321 | 232* 303 | 35 18 |
| Ciprofloxacin | 332 | 231* 288 | 30 16 |
| Lomefloxacin | 352 | 265* 308 | 22 16 |
| Danofloxacin | 358.1 | 340* 283 | 22 32 |
| Enrofloxacin | 360 | 316* 245 | 20 22 |
| Ofloxacin | 362.3 | 318.3* 261.2 | 18 26 |
| Marbofloxacin | 363 | 72.1* 345 | 26 25 |
| Fleroxacin | 370 | 326* 352 | 16 21 |
| Gatixacin | 376 | 260.9* 358.1 | 26 15 |
| Sarafloxacin | 386 | 299* 368 | 31 23 |
| Sparfloxacin | 393.1 | 292* 375 | 24 22 |
| Orbifloxacin | 396 | 352* 295 | 19 26 |
| Difloxacin | 400 | 299* 382 | 31 20 |
| D5-Norfloxacin | 325 | 281 | 21 |
| D5-Oxolinic acid | 267.1 | 249.1 | 17 |
| D8-Ciprofloxacin | 340 | 235.1 | 36 |
| D5-Enrofloxacin | 365.1 | 321.1 | 17 |

* 定量离子。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择与优化

花粉中含有较多的蛋白质和黄酮类化合物, 采用一般的有机溶剂提取法如乙酸乙酯、乙腈或其它混合试剂, 难以有

效将喹诺酮类药物残留从花粉中完全提取出来。喹诺酮类抗生素化学结构中含有羧基和氨基,属于酸碱两性化合物,酸解常数(pK_{a1}) ≈ 6 ,碱解常数(pK_{a2}) ≈ 9 ,等电点(pI) ≈ 7 。当pH值在 ≤ 4 或 ≥ 9 即在酸性和碱性溶液中有较好的溶解性,因此本研究实验了不同的酸性和碱性溶液进行提取。

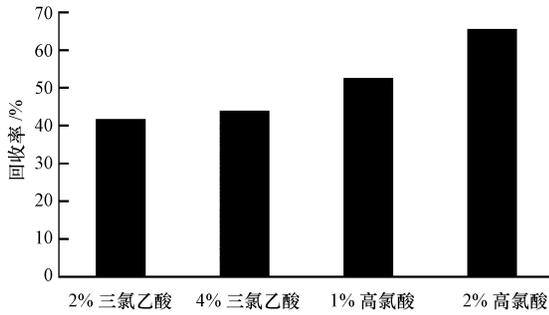


图1 不同酸性提取液对绝对回收率的影响

实验发现,由于花粉蛋白质含量较高,用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH等碱性溶液提取时,无法去除蛋白等杂质,基质干扰大。而酸性溶液能够较好的沉淀蛋白、去除杂质,因此,选择了酸性溶液进行提取。比较了不同浓度的三氯乙酸和高氯酸溶液:2%三氯乙酸、4%三氯乙酸、1%高氯酸和2%高氯酸溶液,在提取过程中发现高氯酸相较于三氯乙酸沉淀蛋白的能力要强。相同浓度的酸性溶液,高氯酸提取离心完后的液体清亮、颜色较浅、杂质基本被沉淀。经回收率实验对比(图1),发现2%高氯酸沉淀效果最好,因此选用2%高氯酸为提取溶液。

2.2 固相萃取条件的选择

蜂花粉样品经由2%高氯酸溶液提取后,采用SPE净化并富集,比较了强阳离子交换柱(MCX)和亲水亲脂平衡柱(HLB)两种方法。实验结果表明,喹诺酮类药物在MCX柱上有良好的吸附,但吸附作用太强,如环丙沙星用5%的氨水甲醇5 mL仅能洗脱大约20%;而HLB柱能很好地保留住目标物,回收率高且易于洗脱,故采用HLB固相萃取柱。

2.3 样液pH值的优化

为了提高喹诺酮类药物的回收率,对上样液的pH值进行优化。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钾溶液分别将提取液调节至pH 4.0、5.0、6.0、7.0,考察了其回收率的影响。结果表明,当pH值为6.0时回收率最高,所有目标物的回收率基本在65%以上,故在净化前将提取液的pH值调为6.0,固相萃取效果最好。

2.4 线性范围和检出限

在质量浓度为 $1\text{--}50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,以标准品与内标物峰面积比值 Y 为纵坐标,工作溶液的质量浓度 $X(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ 为横坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液的响应值均在仪器测定的线性范围内。在 $1\text{--}50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内,18种喹诺酮类药物的线性方程相关系数 $r^2 > 0.991$ 。

在阴性蜂花粉样品中添加18种喹诺酮药物的标准溶液,提取净化后进行测定,分别以3倍信噪比($S/N=3$)和10倍信噪比($S/N=10$)确定方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ),分别为 $5.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,图2为添加 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标准色谱图。

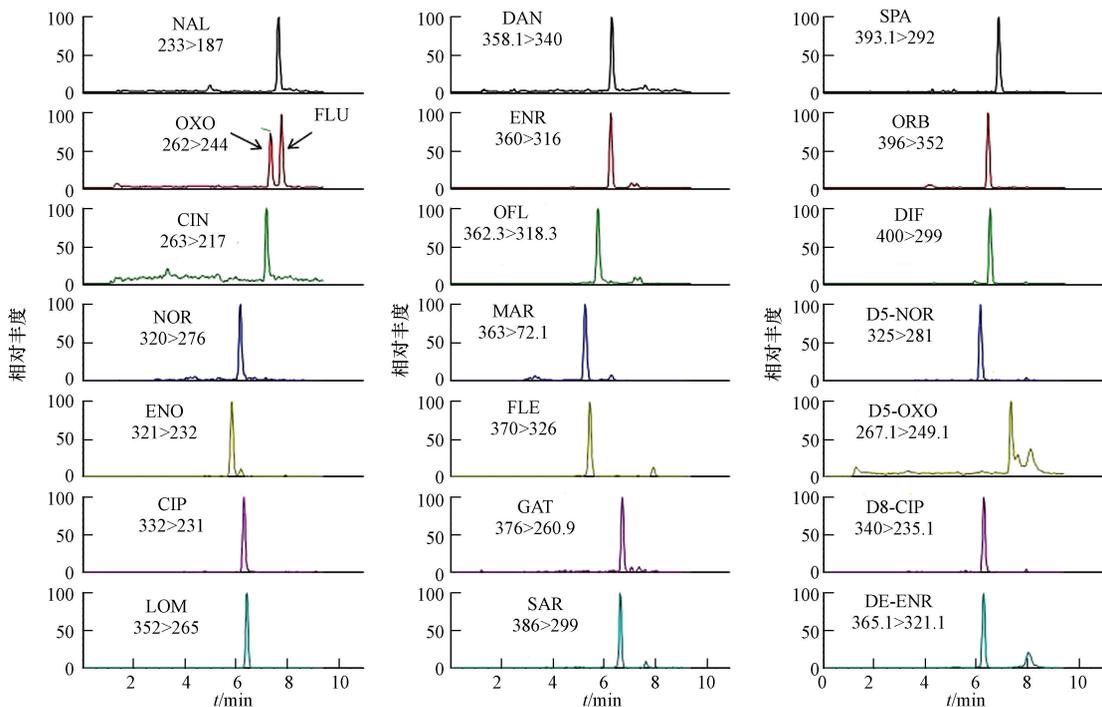


图2 阴性蜂花粉加标样品(添加水平为 $10.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)的色谱图

2.5 添加回收实验和精密度

选取阴性蜂花粉样品,添加喹诺酮药物标准品,添加水平分别为为 5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,每个水平做 6 个平行,按照“1.3 节”方法处理,进行回收率实验,结果见表 2。由表 2 可知,18 种化合物的平均回收率为 70.0%—111.5%,相对标准偏差为 3.4%—10.0%,方法的准确度和精密度均达到残留分析方法的要求。

表 2 不同加标量下 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 回收率和精密度实验结果

| 化合物 | 检测值/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | | | 回收率/% | | | 相对标准偏差/% | | |
|----------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|----------|------|------|
| | 5.0 | 10.0 | 20.0 | 5.0 | 10.0 | 20.0 | 5.0 | 10.0 | 20.0 |
| Nalidixic acid | 3.77 | 8.74 | 20.88 | 75.5 | 87.4 | 104.4 | 4.9 | 8.9 | 5.5 |
| Oxolinic acid | 4.31 | 8.62 | 17.25 | 86.1 | 86.2 | 86.2 | 8.7 | 9.3 | 5.2 |
| Flumequine | 3.89 | 7.72 | 16.20 | 77.8 | 77.2 | 81.0 | 9.6 | 9.6 | 9.4 |
| Cinoxacin | 4.30 | 9.61 | 17.29 | 85.9 | 96.1 | 86.5 | 6.0 | 10.0 | 9.8 |
| Norfloxacin | 4.56 | 9.01 | 19.02 | 91.1 | 90.1 | 95.1 | 7.1 | 6.6 | 9.2 |
| Enoxacin | 4.17 | 8.69 | 21.98 | 83.3 | 86.9 | 109.9 | 6.9 | 10.0 | 5.5 |
| Ciprofloxacin | 4.78 | 10.58 | 17.35 | 95.6 | 105.8 | 86.7 | 4.3 | 7.9 | 6.0 |
| Lomefloxacin | 4.24 | 7.99 | 16.05 | 84.7 | 79.9 | 80.2 | 10.0 | 9.1 | 7.3 |
| Danofloxacin | 4.33 | 9.07 | 15.97 | 86.5 | 90.7 | 79.9 | 8.5 | 8.2 | 8.8 |
| Enrofloxacin | 5.57 | 9.59 | 19.20 | 111.5 | 95.9 | 96.0 | 9.5 | 6.6 | 6.4 |
| Ofloxacin | 4.51 | 9.95 | 17.80 | 90.1 | 99.5 | 89.0 | 9.3 | 6.3 | 9.2 |
| Marbofloxacin | 4.17 | 8.75 | 17.80 | 83.3 | 87.5 | 89.0 | 9.8 | 9.9 | 5.4 |
| Fleroxacin | 4.21 | 8.71 | 14.62 | 84.2 | 87.1 | 73.1 | 5.9 | 9.8 | 5.0 |
| Gatixacin | 4.79 | 8.18 | 16.62 | 95.8 | 81.8 | 83.1 | 7.1 | 6.6 | 8.8 |
| Sarafloxacin | 3.61 | 7.03 | 14.03 | 72.2 | 70.3 | 70.2 | 9.0 | 7.5 | 5.5 |
| Sparfloxacin | 3.77 | 7.12 | 14.29 | 75.3 | 71.2 | 71.4 | 7.1 | 5.6 | 4.7 |
| Orbifloxacin | 3.50 | 7.76 | 14.13 | 70.0 | 77.6 | 70.7 | 7.4 | 8.5 | 3.4 |
| Difloxacin | 3.62 | 7.01 | 14.14 | 72.3 | 70.1 | 70.7 | 8.2 | 4.7 | 4.6 |

2.6 实际样品的测定

采用该检测方法对 20 余个花粉样品进行检测,其中 2 个样品测出诺氟沙星,4 个检出环丙沙星,其含量范围为 10.2—69.7 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,具体数值见表 3。

表 3 实际蜂花粉样品检测 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

| 蜂花粉 | 喹诺酮药物种类 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|---------|-----|-----|-----|------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | NAL | OXO | FLU | CIN | NOR | ENO | CIP | LOM | DAN | ENR | OFL | MAR | FLE | GAT | SAR | SPA | ORB | DIF |
| 河南油菜花粉 | — | — | — | — | — | — | 69.7 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 南京油菜花粉 | — | — | — | — | — | — | 10.4 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 安徽滁菊花粉 | — | — | — | — | — | — | 43.2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 河南茶花粉 | — | — | — | — | 10.2 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 南京茶花粉 | — | — | — | — | 13.0 | — | 24.6 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

注:“—”为小于定量限。

3 结论

实验建立了高效液相色谱-串联质谱测定蜂花粉中喹诺酮类药物残留的方法,用 2% 高氯酸进行提取可以有效地去除蛋白质等大部分杂质干扰,经由 HLB 固相萃取净化后进行测定。该方法有较好的重现性,结果可靠,符合实际检测工作的需要。