

doi: 10.19969/j.fxcsxb.21012707

在线固相萃取 – 同位素稀释/超高效液相色谱 – 串联质谱法测定蜂蜜中26种喹诺酮类化合物

张居舟^{1,2*}, 李 静^{1,2}

(1. 安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051; 2. 国家农副加工食品
质量检验检测中心, 安徽 合肥 230051)

摘要: 建立了在线固相萃取/超高效液相色谱 – 串联质谱(SPE/UPLC – MS/MS)同时测定蜂蜜中26种喹诺酮类化合物的方法。样品用1%甲酸溶液 – 甲醇(10 : 90)提取, 经Oasis PRiME HLB固相萃取柱快速净化后, 采用Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈柱(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)分离, 以0.1%甲酸溶液 – 乙腈为流动相梯度洗脱。在电喷雾离子源正离子模式下, 采用动态多反应监测(dMRM)模式, 内标法定量。结果表明, 26种喹诺酮类化合物在各自的质量浓度范围内均呈良好线性关系, 相关系数(r^2)均大于0.997, 定量下限(LOQ)为0.5 ~ 2.0 μg/kg; 在低、中、高3个加标水平下, 平均回收率为79.5% ~ 110%, 相对标准偏差(RSD)为2.0% ~ 12%。该方法简便、快捷、高效, 适用于蜂蜜中喹诺酮类化合物的筛查及定量测定。

关键词: 在线固相萃取; 超高效液相色谱 – 串联质谱法; 喹诺酮类; 蜂蜜

中图分类号: O657.7; TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2021)10-1417-08

Simultaneous Determination of 26 Quinolones in Honey by UPLC – MS/MS with On-line Solid-phase Extraction and Isotope Dilution

ZHANG Ju-zhou^{1,2*}, LI Jing^{1,2}

(1. Anhui Provincial Institute for Food and Drug Control, Hefei 230051, China; 2. China National Center for Quality Supervision and Test of Agricultural – Avocation Processed Food, Hefei 230051, China)

Abstract: An on-line solid-phase extraction/ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric(SPE/UPLC – MS/MS) method was developed for the determination of twenty-six quinolone residues in honey. Firstly, the samples were extracted with 1% formic acid solution – methanol (10 : 90), then rapidly purified by solid-phase extraction using an Oasis PRiME HLB cartridge. During the process, the key factors, such as the extraction solvent and purification method were optimized individually. The analytes were separated on an Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈ column (2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) by gradient elution, using water containing 0.1% formic acid and acetonitrile as the mobile phases. The target compounds were analyzed with electrospray ion source in positive ion mode under dynamic multi-reaction monitoring(dMRM) mode, and quantified by internal standard method. Results showed that there were good linear relationships for 26 quinolones in their respective concentration ranges with correlation coefficients(r^2) more than 0.997. The limits of quantitation(LOQ) were in the range of 0.5 – 2.0 μg/kg. The average recoveries for 26 quinolones at low, medium and high spiked levels ranged from 79.5% to 110%, with relative standard deviations(RSD, $n = 6$) of 2.0% – 12%. The developed method was rapid and accurate, which was suitable for the simultaneous screening and quantitative determination of 26 quinolones in honey.

Key words: on-line solid-phase extraction; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; quinolones; honey

收稿日期: 2021 – 01 – 27; 修回日期: 2021 – 03 – 15

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1601705)

* 通讯作者: 张居舟, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全分析检测技术与标准化研究, E-mail: juzhouzhang@163.com

喹诺酮类药物为人工合成的含4-喹诺酮基本结构的广谱抗生素,可作用于细菌的脱氧核糖核酸的回旋酶,使细胞无法分裂,从而起到抗菌效果^[1]。该类药物目前已发展到第五代,为人畜共用,可预防不同种类动物的疾病。喹诺酮类药物可防治蜜蜂的腐臭病、败血病等,然而药物滥用致使其在蜂产品中残留。人类若长期食用含有喹诺酮类药物的食品,会诱导致病菌产生耐药性;若过量食用此类药物,还会出现恶心、腹泻、头痛、眩晕,以及白细胞减少、肝损伤等不良反应,有致畸、致突变的潜在风险^[2-3]。因此,国内外对食品中喹诺酮的含量均进行严格限定。我国规定,恩诺沙星、达氟沙星、双氟沙星和沙拉沙星在家禽产蛋期禁用,并规定了其他动物源食品中的最大残留限量^[4];洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星和诺氟沙星在食品动物中禁用^[5]。欧盟规定了麻保沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、双氟沙星、氟甲喹和噁喹酸的最大残留限量,此类抗生素药物也未被授权用于治疗蜜蜂^[6]。为规避市场监管,仍有企业非法使用标准规定之外的喹诺酮类抗生素,然而新一代喹诺酮类药物的检测方法尚未建立。因此,迫切需要开发一种能同时测定蜂蜜中目前上市的所有喹诺酮类药物的检测方法,进而为监管部门及蜂蜜进出口贸易提供技术支持。

目前,蜂蜜中喹诺酮类药物的检测方法有薄层色谱法^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8-9]、高效液相色谱-质谱/质谱法(HPLC-MS/MS)^[10-16]等,其中薄层色谱法适用于定性分析,HPLC法的定性易受假阳性干扰,HPLC-MS/MS法集多组分的定性、定量和高效分离于一体,应用最为广泛。喹诺酮类药物结构相似,且存在同分异构体,文献报道的前处理方法有经典固相萃取^[10,14]、分子印迹固相萃取^[16]、磁性多壁碳纳米管固相萃取^[15]、光纤固相微萃取^[11]和QuEChERS^[8,12]等,然而针对蜂蜜基质,上述方法均有各自的优势和不足。本文应用在线固相萃取技术,提升了前处理效率,采用超高效液相色谱-串联质谱的动态多反应监测(dMRM)模式,系统自动分配扫描时间,驻留时间更长,明显提高了灵敏度,适合高通量快速分析;检测26种目标物,较文献^[10]和国标^[17-18]方法新增了尚未报道的那氟沙星、妥苏沙星、克林沙星、莫西沙星、吉米沙星和巴洛沙星6种药物,可以满足蜂蜜中喹诺酮类化合物高通量快速筛查和食品安全应急检验的需要。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Agilent 1290超高效液相色谱仪、6495型三重四极杆串联质谱仪(配电喷雾离子源,美国Agilent公司),GX-271 ASPEC全自动固相萃取仪(美国Gilson公司),IKA MS3 Basic型涡旋振荡器(德国IKA公司)。Oasis PRiME HLB固相萃取柱(200 mg/6 mL,美国Waters公司)。

标准品:克林沙星标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,美国A ChemTek公司);加替沙星(纯度98.5%)、盐酸莫西沙星(纯度99.8%)购于美国CATO公司;吉米沙星(纯度97%)、巴洛沙星(纯度98%)、盐酸妥苏沙星(纯度97%)购于加拿大TRC公司;那氟沙星(纯度97.6%)购于德国Dr. Ehrenstorfer公司;其余19种喹诺酮类混合标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)购于美国A ChemTek公司。内标:恩诺沙星-D₅、诺氟沙星-D₅、氧氟沙星-D₃(德国Dr. Ehrenstorfer公司);环丙沙星-D₈、培氟沙星-D₅、沙拉沙星-D₈、依诺沙星-D₈、双氟沙星-D₃购于北京Manhage生物科技有限公司;氟罗沙星-D₃、洛美沙星-D₅、达氟沙星-D₃、氟甲喹-¹³C₃(美国A ChemTek公司),加替沙星-D₄、莫西沙星-¹³CD₃购于加拿大TRC公司,噁喹酸-D₅购于上海ANPEL公司。

甲醇、乙腈(LC-MS级)购于德国Merck公司;甲酸(色谱纯)购于美国ACS公司;实验用水由Milli-Q超纯水机制备。

样品:洋槐蜜、枣花蜜、荆条蜜、油菜花蜜、紫云英蜜、枸杞蜜、枇杷蜜、百花蜜、樱花蜜均为本地市售。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 混合标准溶液:分别准确称取10.0 mg(精确至0.01 mg)加替沙星、莫西沙星、吉米沙星、巴洛沙星、妥苏沙星、那氟沙星固体标准品至100 mL容量瓶,用甲醇溶解并定容至刻度,配成质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的6种混合标准储备液。再分别吸取1 mL克林沙星标准溶液、6种混合标准储备液、其余19种喹诺酮类药物混合标准溶液于100 mL容量瓶中,配成质量浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的

26 种混合标准溶液, 于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光储存。

同位素内标混合溶液: 使用甲醇-水溶液(体积比 3:1, 诺氟沙星-D₅、培氟沙星-D₃ 溶液分别加 2 滴盐酸助溶)分别配制 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的各单标储备液。再用甲醇稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 15 种混合内标溶液, 于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光储存。

分别精密量取上述混合标准溶液及同位素内标混合溶液适量, 用 1% 甲酸溶液-甲醇(体积比 10:90) 稀释成 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0、5.0、10、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作液, 其中内标的质量浓度均为 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

1.2.2 样品前处理 称取 2 g(精确至 0.001 g) 蜂蜜于 50 mL 离心管中, 准确加入 100 μL 1 mg/L 混合内标溶液和 10.0 mL 1% 甲酸溶液-甲醇(10:90), 涡旋混合至样品溶解, 10 000 r/min 离心 3 min。将 PRiME HLB 小柱置于全自动固相萃取仪萃取架上, 调节流速为 1 mL/min, 吸取 2 mL 提取液过柱, 收集流出液, 过 0.22 μm 滤膜至样品瓶, 待分析。

1.2.3 色谱参数 色谱柱: Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈(2.1 mm \times 50 mm, 1.8 μm), 流动相: A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为乙腈; 线性梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 95% A; 1.0~2.0 min, 95%~90% A; 2.0~3.0 min, 90%~87% A; 3.0~5.0 min, 87%~85% A; 5.0~7.0 min, 85%~35% A; 7.0~8.0 min, 35%~10% A; 8.0~9.0 min, 10% A; 9.0~11.0 min, 10%~95% A。流速: 0.3 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 2 μL 。

1.2.4 质谱参数 离子源: 电喷雾离子源(AJS ESI); 监测方式: dMRM; 扫描模式: 正离子扫描; 干燥气温度: 220 $^{\circ}\text{C}$; 干燥气流速: 17 L/min; 雾化气压力: 2.1×10^5 Pa; 鞘气温度: 340 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气流速: 11 L/min; 毛细管电压: 3 000 V; 喷嘴电压: 400 V; 碰撞池加速电压: 5 V; 碎裂电压: 380 V; 其它质谱参数见表 1。

表 1 26 种喹诺酮类化合物及 15 种内标的质谱参数

Table 1 MS/MS parameters of the 26 quinolones and 15 internal standards

No.	Compound	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision ener- gy(eV)	Retention time (min)	Retention win- dow(min)
1	Pipemidic acid(吡派酸)	304.1	217.1 [*] , 286.1	22, 17	3.32	1.31
2	Marbofloxacin(麻保沙星)	363.1	319.9 [*] , 344.9	13, 20	3.87	1.14
3	Enoxacin(依诺沙星)	321.1	303.1 [*] , 232.0	22, 43	3.99	0.71
4	Fleroxacin(氟罗沙星)	370.1	326.1 [*] , 269.1	20, 27	4.12	1.37
5	Norfloxacin(诺氟沙星)	320.3	302.0 [*] , 233.1	20, 20	4.19	1.17
6	Ofloxacin(氧氟沙星)	362.1	318.1 [*] , 261.1	20, 25	4.22	1.17
7	Pefloxacin(培氟沙星)	334.2	316.2 [*] , 290.2	20, 17	4.33	1.12
8	Ciprofloxacin(环丙沙星)	332.2	314.0 [*] , 230.9	20, 25	4.40	1.13
9	Lomefloxacin(洛美沙星)	352.2	265.1 [*] , 308.3	25, 15	4.73	1.21
10	Danofloxacin(达氟沙星)	358.2	340.1 [*] , 283.0	20, 20	4.93	1.40
11	Enrofloxacin(恩诺沙星)	360.0	316.1 [*] , 342.1	20, 22	5.16	1.40
12	Orbifloxacin(奥比沙星)	396.1	352.2 [*] , 295.1	18, 25	5.32	1.24
13	Gatifloxacin(加替沙星)	376.2	332.2 [*] , 261.1	18, 33	5.81	0.99
14	Sarafloxacin(沙拉沙星)	386.0	342.0 [*] , 299.0	20, 20	6.04	1.17
15	Clinafloxacin(克林沙星)	366.1	348.1 [*] , 305.1	20, 22	6.08	1.08
16	Difloxacin(双氟沙星)	400.2	382.1 [*] , 356.1	20, 15	6.12	1.14
17	Sparfloxacin(司帕沙星)	393.1	349.1 [*] , 292.1	20, 25	6.20	0.88
18	Moxifloxacin(莫西沙星)	402.3	384.5 [*] , 357.9	23, 32	6.35	0.88
19	Gemifloxacin(吉米沙星)	390.0	372.2 [*] , 359.0	20, 13	6.37	0.98
20	Balofloxacin(巴洛沙星)	391.1	360.0 [*] , 373.0	25, 15	6.39	0.86
21	Tosufloxacin(妥苏沙星)	405.0	387.0 [*] , 344.0	23, 23	6.39	0.74
22	Cinoxacin(西诺沙星)	263.0	245.0 [*] , 217.0	15, 25	6.44	0.76
23	Oxolinic acid(噁啉酸)	262.0	244.0 [*] , 216.0	18, 33	6.69	0.98
24	Nadifloxacin(那氟沙星)	361.2	343.1 [*] , 283.1	22, 43	7.01	0.98
25	Nalidixic acid(萘啶酸)	233.0	215.0 [*] , 187.0	13, 25	7.11	0.97
26	Flumequine(氟甲喹)	262.1	244.0 [*] , 202.0	18, 38	7.18	0.98
27	Enoxacin-D ₈ (依诺沙星-D ₈)	329.2	311.2 [*] , 236.0	25, 43	3.98	1.04
28	Fleroxacin-D ₃ (氟罗沙星-D ₃)	373.0	329.0 [*] , 355.0	25, 20	4.09	1.08
29	Norfloxacin-D ₅ (诺氟沙星-D ₅)	325.2	307.1 [*] , 281.2	20, 17	4.17	1.01

(续表1)

No.	Compound	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision ener- gy (eV)	Retention time (min)	Retention win- dow (min)
30	Ofloxacin - D ₃ (氧氟沙星 - D ₃)	365. 2	321. 2 ⁺ , 261. 1	20, 30	4. 25	1. 17
31	Pefloxacin - D ₅ (培氟沙星 - D ₅)	339. 1	321. 1 ⁺ , 295. 2	23, 20	4. 31	1. 12
32	Ciprofloxacin - D ₈ (环丙沙星 - D ₈)	340. 2	322. 0 ⁺ , 235. 0	20, 45	4. 37	1. 63
33	Lomefloxacin - D ₅ (洛美沙星 - D ₅)	357. 1	270. 0 ⁺ , 313. 1	15, 25	4. 67	0. 98
34	Danofloxacin - D ₅ (达氟沙星 - D ₅)	361. 1	343. 0 ⁺ , 85. 2	25, 50	4. 91	0. 98
35	Enrofloxacin - D ₅ (恩诺沙星 - D ₅)	365. 3	321. 2 ⁺ , 245. 1	20, 30	5. 16	1. 24
36	Gatifloxacin - D ₄ (加替沙星 - D ₄)	380. 2	263. 0 ⁺ , 362. 0	20, 35	5. 78	1. 16
37	Sarafloxacin - D ₈ (沙拉沙星 - D ₈)	394. 3	376. 2 ⁺ , 350. 2	25, 23	6. 02	0. 72
38	Difloxacin - D ₃ (双氟沙星 - D ₃)	403. 1	385. 1 ⁺ , 359. 1	20, 20	6. 12	1. 08
39	Moxifloxacin - ¹³ CD ₃ (莫西沙星 - ¹³ CD ₃)	406. 0	388. 0 ⁺ , 368. 1	25, 30	6. 35	0. 72
40	Oxolinic acid - D ₅ (噁唑酸 - D ₅)	267. 1	249. 1 ⁺ , 161. 0	18, 43	6. 67	1. 17
41	Flumequine - ¹³ C ₃ (氟甲喹 - ¹³ C ₃)	265. 0	246. 9 ⁺ , 205. 0	20, 35	7. 16	0. 86

*quantitative ion

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

喹诺酮类化合物结构含有哌嗪环、羧基或喹啉环, 其[M + H]⁺峰响应强度均较大, 因此选择[M + H]⁺作为分子离子峰。使用电喷雾离子源, 正离子模式(ESI⁺), 在*m/z* 100 ~ 500 范围内对母离子进行全扫描, 比较各化合物的母离子响应强度, 依次优化毛细管电压、干燥气温度、干燥气流速、雾化气压力、鞘气温度、鞘气流速和喷嘴电压; 再分别进行子离子扫描, 子离子主要为脱羧峰[M + H - CO₂]⁺和脱羧后哌嗪环断裂重排峰[M + H - CO₂ - C₂H₄NR]⁺[10], 在优化碰撞能及碰撞池加速电压后, 形成多反应监测(MRM)方法, 进一步优化色谱条件, 进行数据采集, 在MRM方法数据或图谱的基础上升级形成dMRM方法, 每个化合物的保留时间窗口自动进行动态分配, 灵敏度和峰形均有不同程度的改善。值得注意的是, 氟甲喹和噁唑酸、恩诺沙星 - D₅和氧氟沙星 - D₃互为同分异构体, 具有相同的母离子和碎片离子信息, 需分别优化其单标准溶液以确定各离子对的碰撞能, 并通过各同分异构体在色谱柱上保留时间的差异, 设置保留时间窗对峰进行定位。

2.2 色谱条件的优化

喹诺酮类化合物结构含有亲油亲水两性基团, 极性存在一定差异, 实验分别选择Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)、Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)和Waters BEH HILIC(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)色谱柱进行分析, 为避免在反向色谱柱上出现色谱峰拖尾现象, 选择0.1%甲酸溶液 - 乙腈为流动相, 依次优化流动相的初始比、梯度洗脱曲线斜率和洗脱时间。结果表明, 0.1%甲酸溶液不仅可为正离子扫描提供质子, 提高离子化效率, 且提高了峰的对称性; C₁₈色谱柱较HILIC色谱柱的分离效果更佳。随着洗脱曲线斜率的变小, 洗脱时间的延长, 各化合物被洗脱的速率变缓, 可将互为同分异构体的氟甲喹和噁唑酸、恩诺沙星 - D₅和氧氟沙星 - D₃完全分离, 26种化合物的灵敏度和分辨率均满足要求。在优化的梯度洗脱程序下, 由于100 mm长度的C₁₈和HILIC色谱柱需更长的分离时间, 且分离效果和峰灵敏度均比50 mm长度的色谱柱差, 因此实验采用50 mm的Agilent Eclipse Plus RRHD C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm)色谱柱, 目标化合物的分离效果良好(如图1)。

2.3 提取条件的选择

喹诺酮类化合物中含有叔氨基和羧基, 溶于碱性或酸性溶液, 可使用酸性或碱性溶液混合有机溶剂提取。实验对1%甲酸溶液 - 乙腈(5 : 95)、1%甲酸溶液 - 甲醇(5 : 95)、氨水 - 甲醇(5 : 95)的提取效果进行了比较。结果表明, 1%甲酸溶液 - 乙腈(5 : 95)的提取液有少量白色沉淀, 26种待测物的回收率为65% ~ 115%, 其中氟罗沙星、克林沙星的回收率低于70%; 1%甲酸溶液 - 甲醇(5 : 95)可将蜂蜜样品完全溶解, 26种待测物的回收率为70% ~ 128%, 其中双氟沙星的回收率≥120%。氨水 - 甲醇(5 : 95)也能完全溶解样品, 除奥比沙星的回收率为32%外, 其它待测物的回收率为75% ~ 125%。

为进一步验证各提取剂的效果, 取6组阳性蜂蜜(其中含有不同浓度的诺氟沙星、氧氟沙星、恩诺

沙星及环丙沙星), 应用上述 3 种提取剂进行提取。结果显示, 1% 甲酸溶液 - 乙腈(5 : 95) 提取液只检出氧氟沙星; 氨水 - 甲醇(5 : 95) 提取液对低浓度样品未检出, 1% 甲酸溶液 - 甲醇(5 : 95) 提取液与国标 GB/T 20757 - 2006^[17] 的检测结果基本一致, 故选择 1% 甲酸溶液 - 甲醇(5 : 95) 作为提取剂, 并比较了不同体积比(50 : 50、40 : 60、30 : 70、20 : 80、10 : 90、5 : 95) 的 1% 甲酸溶液 - 甲醇对 26 种待测物的回收率(如图 2)。结果显示, 体积比为 20 : 80 时, 除吡派酸、氟罗沙星、氧氟沙星、洛美沙星外, 其余化合物的回收率明显偏离 100%, 体积比为 50 : 50 时整体回收率降至最低, 净化时的流速也最慢。实验选择对 26 种待测物回收率更佳的 1% 甲酸溶液 - 甲醇(10 : 90) 作为提取剂。

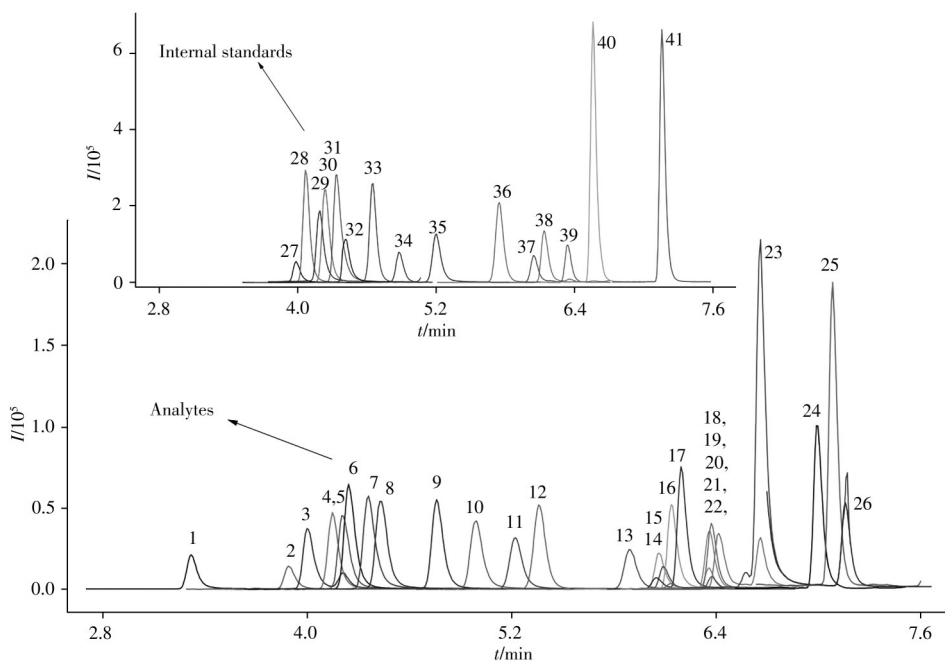


图 1 26 种喹诺酮类化合物(2.0 μg/L)及 15 种内标(10 μg/L)的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of 26 quinolones(2.0 μg/L) and 15 internal standards(10 μg/L) the peak numbers denoted were the same as those in Table 1

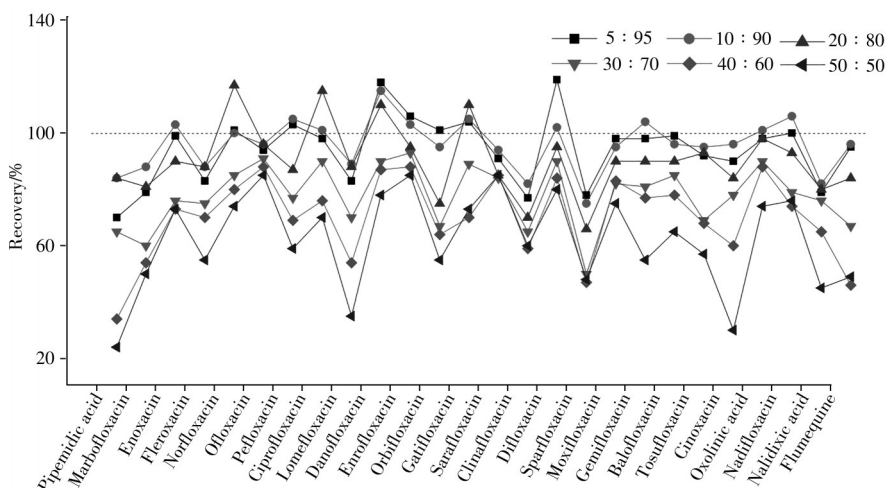


图 2 不同体积比的 1% 甲酸溶液 - 甲醇对 26 种待测物的提取效果

Fig. 2 Extraction efficiencies of 26 analytes by different volume ratios of 1% formic acid solution - methanol

2.4 净化条件的选择

蜂蜜含有氨基酸、有机酸、糖类、色素和少量蛋白质等^[19], 针对蜂蜜的净化方法有固相萃取和 QuEChERS 等方法, 本文考察了 PRiME HLB 柱、HLB 柱^[17]、PAX 柱^[18]和 QuEChERS^[12]的净化效果。称取空白基质样品进行 10.0 μg/kg 的加标回收实验, 结果表明, PRiME HLB 柱可去除蜂蜜中有机酸、部

分色素及糖类杂质。从去除杂质效果看, HLB 柱与 PAX 柱相当, PRiME HLB 柱和 QuEChERS 次之。从回收率上看, PRiME HLB 柱优于 HLB 柱, 均有 24 种目标物的回收率在 80%~110% 之间; QuEChERS 次之; PAX 最差, 只有 10 种化合物的回收率大于 80%, 其余在 22%~78% 之间。实验最终选择净化能力略弱, 但回收率较好, 且无需活化、淋洗和洗脱, 操作过程更简便的 PRiME HLB 柱进行净化。

2.5 基质效应评价

基质效应(ME)是指在测定过程中, 由于待测化合物的离子化效应被样品基质改变, 从而使响应信号受到增强或抑制的现象。目前评价基质效应的方法有标准曲线法和相对响应值法, 本文采用标准曲线法考察喹诺酮类化合物在蜂蜜中的基质效应, $ME = \text{基质匹配标准曲线斜率} / \text{溶剂标准曲线斜率} \times 100\%$ 。当 $ME > 115\%$ 时为基质增强效应; 当 $85\% \leq ME \leq 115\%$ 时基质效应可忽略; 当 $ME < 85\%$ 时为基质抑制效应^[20-21]。实验考察了洋槐蜜、油菜花蜜和荆条蜜的基质效应(分别以 ME_1 、 ME_2 、 ME_3 表示), 表 2 结果表明, 目标化合物及其同位素内标在各个蜂蜜中的基质效应变化趋势一致, 荆条蜜较其他蜜的基质效应略小, 奥比沙星、加替沙星等 8 种化合物的基质效应不明显(89%~115%), 麻保沙星等 18 种化合物为基质增强效应, 其中, 吡派酸、依诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、达氟沙星、环丙沙星的基质增强效应较强。

表 2 26 种喹诺酮类化合物及 15 种内标的基质效应(%)

Table 2 Matrix effects of 26 quinolones and 15 internal standards(%)

Compound	ME ₁	ME ₂	ME ₃	Compound	ME ₁	ME ₂	ME ₃	Compound	ME ₁	ME ₂	ME ₃
Pipemidic acid	140	123	130	Clinafloxacin	121	123	116	Norfloxacin - D ₅	138	138	127
Marbofloxacin	125	122	106	Difloxacin	114	117	111	Ofloxacin - D ₃	122	121	119
Enoxacin	137	136	130	Sparfloxacin	102	108	97	Pefloxacin - D ₅	139	130	129
Fleroxacin	124	125	118	Moxifloxacin	107	114	101	Ciprofloxacin - D ₈	133	131	130
Norfloxacin	136	138	126	Gemifloxacin	109	115	99	Lomefloxacin - D ₅	120	116	115
Ofloxacin	121	123	115	Balofloxacin	118	114	108	Danofloxacin - D ₃	142	137	131
Pefloxacin	139	131	127	Tosufloxacin	119	116	105	Enrofloxacin - D ₅	118	120	114
Ciprofloxacin	133	134	128	Cinoxacin	118	119	116	Gatifloxacin - D ₄	110	110	112
Lomefloxacin	119	117	113	Oxolinic acid	103	109	103	Sarafloxacin - D ₈	118	113	117
Danofloxacin	143	138	132	Nadifloxacin	96	107	95	Difloxacin - D ₃	113	116	111
Enrofloxacin	116	120	113	Nalidixic acid	105	101	97	Moxifloxacin - ¹³ C ₃	99	113	101
Orbifloxacin	89	96	93	Flumequine	114	118	106	Oxolinic acid - D ₃	104	108	102
Gatifloxacin	112	110	114	Enoxacin - D ₈	139	135	131	Flumequine - ¹³ C ₃	115	118	105
Sarafloxacin	116	115	117	Fleroxacin - D ₃	124	123	120				

基质效应的消除方法通常有基质匹配曲线、同位素内标、基质净化法等^[22], 本文选择内标法减弱基质效应对目标物定量结果的影响。对于有同位素内标的待测物, 选择其同位素内标作为内标定量; 对于无同位素内标的化合物, 依据结构相似、保留时间相近、基质效应差异较小的原则选择其它同位素内标定量(见表 3)。

表 3 26 种喹诺酮类化合物的线性范围、相关系数、定量下限、平均回收率及相对标准偏差($n = 6$)

Table 3 Linear ranges, correlation coefficients(r^2), limits of quantitation, average recoveries and relative standard deviations of 26 quinolones($n = 6$)

Compound	IS	Linear range	r^2	LOQ	Spiked	Average recovery	RSD
		($\mu\text{g/L}$)		($\mu\text{g/kg}$)			
Pipemidic acid	Norfloxacin - D ₅	0.2~20	0.999 0	1.0	1.0, 5.0, 10.0	106, 107, 103	6.3, 5.2, 3.3
Marbofloxacin	Ofloxacin - D ₃	0.2~20	0.999 1	1.0	1.0, 5.0, 10.0	87.4, 85.3, 105	6.9, 5.6, 4.5
Enoxacin	Enoxacin - D ₈	0.2~20	0.998 8	1.0	1.0, 5.0, 10.0	84.5, 87.8, 103	6.3, 5.0, 6.9
Fleroxacin	Fleroxacin - D ₃	0.1~20	0.998 4	0.5	1.0, 5.0, 10.0	100, 95.1, 103	5.8, 5.2, 3.7
Norfloxacin	Norfloxacin - D ₅	0.2~20	0.999 3	1.0	1.0, 5.0, 10.0	99.7, 99.8, 107	5.9, 8.0, 4.0
Ofloxacin	Ofloxacin - D ₃	0.1~20	0.999 3	0.5	1.0, 5.0, 10.0	109, 102, 102	6.0, 5.1, 5.4
Pefloxacin	Pefloxacin - D ₅	0.2~20	0.999 2	1.0	1.0, 5.0, 10.0	96.8, 103, 103	8.1, 7.7, 5.4
Ciprofloxacin	Ciprofloxacin - D ₈	0.2~20	0.998 8	1.0	1.0, 5.0, 10.0	104, 98.3, 101	9.9, 6.7, 4.4
Lomefloxacin	Lomefloxacin - D ₅	0.1~20	0.999 8	0.5	1.0, 5.0, 10.0	102, 102, 102	8.8, 5.7, 5.7
Danofloxacin	Danofloxacin - D ₃	0.2~20	0.998 5	1.0	1.0, 5.0, 10.0	102, 104, 100	8.9, 3.9, 3.5
Enrofloxacin	Enrofloxacin - D ₅	0.1~20	0.998 6	0.5	1.0, 5.0, 10.0	107, 102, 101	5.9, 4.1, 7.5
Orbifloxacin	Gatifloxacin - D ₄	0.1~20	0.999 5	0.5	1.0, 5.0, 10.0	85.9, 85.2, 90.3	6.9, 4.8, 4.4
Gatifloxacin	Gatifloxacin - D ₄	0.1~20	0.998 2	0.5	1.0, 5.0, 10.0	98.5, 101, 99.8	5.5, 3.5, 6.0
Sarafloxacin	Sarafloxacin - D ₈	0.1~20	0.999 9	0.5	1.0, 5.0, 10.0	92.9, 93.5, 97.3	11, 6.5, 4.1

(续表3)

Compound	IS	Linear range		LOQ	Spiked	Average recovery			RSD
		($\mu\text{g/L}$)	r^2			($\mu\text{g/kg}$)	($\mu\text{g/kg}$)	(%)	
Clinafloxacin	Sarafloxacin - D ₈	0.4 ~ 20	0.998 2	2.0	2.0, 10.0, 20.0	84.5, 91.0, 90.5	6.8, 11, 8.3		
Difloxacin	Difloxacin - D ₃	0.2 ~ 20	0.998 5	1.0	1.0, 5.0, 10.0	95.6, 101, 98.5	4.8, 10, 8.0		
Sparfloxacin	Difloxacin - D ₃	0.1 ~ 20	0.998 3	0.5	1.0, 5.0, 10.0	110, 104, 99.2	5.3, 4.1, 6.5		
Moxifloxacin	Moxifloxacin - ¹³ CD ₃	0.4 ~ 20	0.997 3	2.0	2.0, 10.0, 20.0	89.2, 84.5, 89.4	9.5, 8.3, 8.2		
Gemifloxacin	Moxifloxacin - ¹³ CD ₃	0.2 ~ 20	0.997 3	1.0	1.0, 5.0, 10.0	103, 89.8, 102	12, 6.2, 5.5		
Balofloxacin	Moxifloxacin - ¹³ CD ₃	0.2 ~ 20	0.999 0	1.0	1.0, 5.0, 10.0	87.9, 88.3, 90.0	6.9, 8.2, 6.3		
Tosufloxacin	Moxifloxacin - ¹³ CD ₃	0.2 ~ 20	0.997 2	1.0	1.0, 5.0, 10.0	83.0, 85.7, 89.4	9.5, 5.7, 6.8		
Cinoxacin	Moxifloxacin - ¹³ CD ₃	0.4 ~ 20	0.999 7	2.0	2.0, 10.0, 20.0	81.2, 90.1, 88.8	11, 4.8, 4.6		
Oxolinic acid	Oxolinic acid - D ₅	0.2 ~ 20	0.998 6	1.0	1.0, 5.0, 10.0	91.1, 98.7, 91.3	12, 7.6, 6.7		
Nadifloxacin	Oxolinic acid - D ₅	0.1 ~ 20	0.998 2	0.5	1.0, 5.0, 10.0	91.1, 90.2, 90.4	8.8, 2.0, 5.2		
Nalidixic acid	Oxolinic acid - D ₅	0.1 ~ 20	0.999 5	0.5	1.0, 5.0, 10.0	95.3, 103, 103	9.4, 7.3, 5.7		
Flumequine	Flumequine - ¹³ C ₃	0.2 ~ 20	0.999 0	1.0	1.0, 5.0, 10.0	79.5, 105, 98.9	9.5, 4.7, 7.4		

2.6 线性范围与定量下限

精密量取适量喹诺酮类化合物混合标准溶液, 用初始流动相配制质量浓度为 0.1 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液, 同时加入 15 种内标(内标质量浓度均为 10 $\mu\text{g/L}$), 按优化的条件进行 UPLC-MS/MS 分析。以定量离子和内标化合物的峰面积比为纵坐标(y), 待测化合物和内标化合物的质量浓度比为横坐标(x), 绘制标准工作曲线, 内标法定量。结果表明, 26 种喹诺酮类化合物在各自的质量浓度范围内线性良好, 相关系数(r^2) > 0.997。采用空白蜂蜜样品添加待测物, 以 10 倍信噪比($S/N \geq 10$)对应的质量浓度确定为定量下限(LOQ), 结果表明, 26 种喹诺酮类化合物的 LOQ 为 0.5 ~ 2.0 $\mu\text{g/kg}$ (见表 3)。

2.7 准确度与精密度

按照本方法对空白洋槐蜜进行加标回收实验, 加标水平为低、中、高 3 个浓度, 每个浓度平行 6 个。由表 3 可知, 26 种喹诺酮类化合物的平均回收率为 79.5% ~ 110%, 相对标准偏差(RSD)为 2.0% ~ 12%, 表明方法的准确度和精密度良好。

2.8 实际样品检测

为评价该方法的有效性, 本实验测定了随机抽取的市售洋槐蜜、枣花蜜、荆条蜜、油菜花蜜、紫云英蜜各 10 份, 枸杞蜜、枇杷蜜各 5 份, 百花蜜、樱花蜜各 1 份, 共 62 份样品。在 2 份紫云英蜜、3 份洋槐蜜样品中检出诺氟沙星, 检出量为 2.1 ~ 22.1 $\mu\text{g/kg}$; 1 份枣花蜜样品中检出氧氟沙星, 检出量为 17.1 $\mu\text{g/kg}$; 1 份枇杷蜜中同时检出 3.4 $\mu\text{g/kg}$ 诺氟沙星和 8.8 $\mu\text{g/kg}$ 氧氟沙星(如图 3); 其余样品均未检出目标化合物。

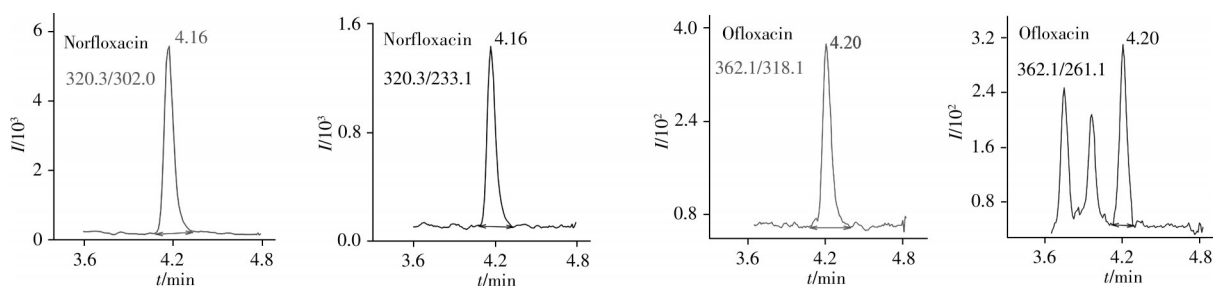


图 3 阳性样品中诺氟沙星和氧氟沙星的选择离子色谱图

Fig. 3 Selected ion chromatograms of norfloxacin and ofloxacin in positive sample

3 结论

本文建立了一种同时检测蜂蜜中 26 种喹诺酮类药物的在线固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱方法。蜂蜜样品以 1% 甲酸溶液-甲醇(10:90)提取, 经 PRiME HLB 小柱在线通过式固相萃取净化后, 回收率优于标准方法; 液质联用仪采用 dMRM 采集模式, 进一步提升了检测灵敏度; 15 种同位素内标有效补偿了基质效应带来的定量偏差; 并首次检测了巴洛沙星等新一代喹诺酮类药物, 填补了相关物质检测技术的空白。本方法操作简便、快速, 重复性好、灵敏度高、准确可靠, 完全满足蜂蜜的实际检验和风险监测需要。

参考文献:

- [1] Li Q, Zhang Y J, Li D, Wang J, Wang H J, Guo Y. *Heilongjiang Anim. Sci. Vet. Med.* (李倩, 张玉洁, 李丹, 王甲, 王鹤佳, 郭晔. 黑龙江畜牧兽医), **2020**, (19): 51–54.
- [2] Min Y H, Wei Y T, Du G, Yu X Q. *Food Sci. Technol.* (闵宇航, 魏宇涛, 杜钢, 余晓琴. 食品科技), **2020**, 45(7): 332–337.
- [3] Jia W P, Guo D H, Yang H Y, Liu S Y, Kou W, Pang N. *Clin. Med. J.* (贾王平, 郭代红, 杨鸿溢, 刘思源, 寇炜, 庞宁. 临床药物治疗杂志), **2019**, 17(7): 34–38.
- [4] GB 31650–2019. National Food Safety Standard Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准).
- [5] Ministry of Agriculture. No. 2292 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(农业部. 中华人民共和国农业部公告第2292号). [2020–12–01]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm
- [6] Lombardo–Agüí M, García–Campaña A M, Gámiz–Gracia L, Cruces–Blanco C. *Talanta*, **2012**, 93: 193–199.
- [7] Yang Y, Luo Y, Wu L L, Luo M, Mao X J, Yang W W, Wang L O. *Jiangsu Agric. Sci.* (杨勇, 罗奕, 吴琳琳, 罗曼, 茅向军, 杨微微, 王伧瓯. 江苏农业科学), **2015**, 43(10): 380–383.
- [8] Yang W W, Yang Y, Luo M, Xu Q L, Luo Y, Wang L O. *Guizhou Agric. Sci.* (杨微微, 杨勇, 罗曼, 许乾丽, 罗奕, 王伧瓯. 贵州农业科学), **2015**, 43(2): 165–169.
- [9] Di X, Wang X, Liu Y P, Xing J G, Xin D. *J. Sep. Sci.*, **2019**, 42(13): 2255–2262.
- [10] Peng L, Wu N P, Fang Z Y, Shu C, Du H G, Zhu L. *Chin. J. Vet. Drug*(彭丽, 吴宁鹏, 方忠意, 舒畅, 杜红鸽, 朱雷. 中国兽药杂志), **2018**, 52(9): 53–60.
- [11] Chen L, Huang X J. *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, 64(45): 8684–8693.
- [12] Lei H Y, Guo J B, Lv Z, Zhu X H, Xue X F, Wu L M, Cao W. *Int. J. Anal. Chem.*, **2018**, 2018: 1–12.
- [13] Sun X, Wang T, Wang Y J, Li Z, Zhang Y F. *J. Food Saf. Qual.* (孙晓, 王涛, 王永姣, 李卓, 张亚锋. 食品安全质量检测学报), **2019**, 10(17): 5604–5608.
- [14] Hou J B, Xie W, Chen X M, Xi J Y, Qian Y, Wang F, Liu H S. *Chin. J. Chromatogr.* (侯建波, 谢文, 陈笑梅, 奚君阳, 钱艳, 王峰, 刘海山. 色谱), **2011**, 29(6): 535–542.
- [15] Xu X Y, Luo J W, Chen W Q, Zhao C Q, Liu Z. *J. Instrum. Anal.* (徐潇颖, 罗金文, 陈万勤, 赵超群, 刘柱. 分析测试学报), **2017**, 36(1): 61–66.
- [16] Zhang L, Zhou T T, Luo J, Fan Z Y, Jiang F, Yu T T, Wang P. *Acta Med. Univ. Sci. Technol. Huazhong*(张莉, 周廷廷, 罗静, 范志勇, 江丰, 余婷婷, 王鹏. 华中科技大学学报: 医学版), **2018**, 47(5): 539–545.
- [17] GB/T 20757–2006. Method for the Determination of Fourteen Quinolone Residues in Honey LC–MS–MS Method. National Standards of the People's Republic of China(蜂蜜中十四种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱–串联质谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [18] GB/T 23412–2009. Determination of Residues of 19 Quinolones in Honey LC–MS/MS Method. National Standards of the People's Republic of China(蜂蜜中19种喹诺酮类药物残留量的测定方法 液相色谱–质谱/质谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [19] Yang M, Yi J, Chen D, Wang M Y, Xu Q, Tian T, Guan Z L, Hou J, Zhou Y, Liu K, Wang D M, Hu X J, Lu Y P, Jiang X M, Tu F Q. *J. Instrum. Anal.* (杨明, 伊黎, 陈丹, 王梦颖, 许晴, 田甜, 管卓龙, 侯靖, 周原, 刘坤, 王冬梅, 胡筱静, 卢跃鹏, 江小明, 涂凤琴. 分析测试学报), **2020**, 39(8): 974–979.
- [20] Liu F, Meng T Y, Chen L, Wu Y J, Xiong S, Ding L. *Chin. J. Chromatogr.* (刘芳, 孟桃子, 陈练, 吴雅君, 熊顺, 丁利. 色谱), **2020**, 38(12): 1381–1387.
- [21] Gong L, Luan F T, Wen T R, Chen M, Deng B W, Zhang Z J, Wei R C, Wang R. *J. Instrum. Anal.* (龚兰, 栾枫婷, 温天锐, 陈明, 邓博文, 张泽璟, 魏瑞成, 王冉. 分析测试学报), **2020**, 39(7): 874–880.
- [22] Xu Y Y, Li S, Zhang Q, Shi L L, Wang J K, Song N H. *Agrochemicals*(徐炎炎, 李森, 张芹, 石利利, 王济奎, 宋宁慧. 农药), **2017**, 56(3): 162–167.