

利用 T-wave 离子淌度质谱鉴定猪肌肉中的氟喹诺酮类抗生素的多位点分子离子及其碎片离子

Mike McCullagh¹、Sara Stead¹、Jonathan Williams¹、Wouter de Keizer²和Aldert Bergwerff²

¹沃特世公司（英国曼彻斯特）

²RnAssays BV（荷兰乌得勒支）

应用优势

利用T-wave离子淌度产生的正交分离有助于复杂基质样品的分析。

- 正交淌度分离技术能采集并生成复杂样品中各个组分的MS母离子和MS^E子离子谱图。
- 对于观察到的促进剂，可进行再次确认，并将其作为额外的鉴定点。
- 使用HDMSE^E作为分析手段，可以对实验室内或实验室内研究的差异性进行更深入的了解。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®系统

SYNAPT® G2-S质谱仪

MassLynx®软件

DriftScope™ ACQUITY UPLC BEH色谱柱

关键词

离子淌度，促进剂，精确质量数，单一组分碎片谱图

简介

氟喹诺酮是一类抗菌剂，可施用于牲畜，以达到多种目的，包括：(a) 预防并控制感染；(b) 促进生长。出于对抗性微生物在人类中传播的顾虑，美国食品药品监督管理局（FDA）于2005年9月颁布了在牲畜生产中使用恩诺沙星和环丙沙星的禁令^{1,2}。2006年起，欧盟（EU）禁止在畜牧业中使用抗生素生长促进剂（AGP），同年，最后四种抗生素也被禁止作为生长促进剂³。

虽然氟喹诺酮是一类化学性质多样的两性化合物，但这些化合物都具有4-喹诺酮环基本结构。为了增强其抗菌能力和药代动力学特性，已进行了多种改性尝试，包括在喹诺酮环（苯并吡喃酮核）四周引入不同的官能团。氟喹诺酮在其双环结构的6位上带有一个氟原子（图1），表现出广谱抗菌活性。目前，规定了八种（氟）-喹诺酮类化合物的欧盟最大残留量（MRL），根据种类和组织类型的不同，限量范围在10至1900 µg kg⁻¹之间⁴。

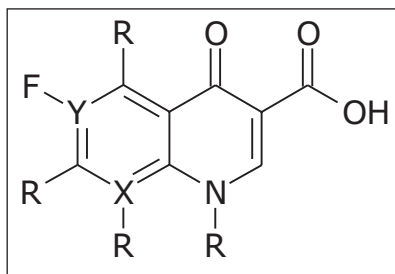


图1. 氟喹诺酮类抗菌化合物的一般结构，其中X和Y可以是碳或氮原子。根据具体氟喹诺酮化合物的不同，R可为多种不同官能团，如硝基、氨基、卤素、哌嗪基和环丙基。

实验

提取准备

用于此次研究的猪肌肉组织提取物由RnAssays慷慨提供。简单来讲，在提取前根据相关的欧盟最大残留量浓度要求，在已知的空白猪肌肉添加25种不同的抗菌化合物（来自于氟喹诺酮、四环素和酰胺醇类），将其在水/有机提取溶剂中，机械研磨成匀浆，然后进行离心操作。取上清液，并置于自动进样器样品瓶中进行后续的LC/MS分析。

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μm, 50 × 2.1 mm
柱温:	40 °C
流速:	0.6 mL/min
流动相A:	水 (0.1%甲酸)
流动相B:	乙腈 (0.1%甲酸)
进样体积:	10 μL

梯度:

时间(min)	流速	A%	B%
初始	0.600	95.0	5.0
1.00	0.600	95.0	5.0
8.00	0.600	5.0	95.0
9.00	0.600	95.0	5.0

MS条件

质谱仪:	SYNAPT G2-S
电离模式:	2.0 kVESI+
锥孔电压:	25 V
脱溶剂气温度:	550 °C
参比质量数:	亮氨酸脑啡肽, [M+H] ⁺ =556.2771
采集范围:	50-1200 m/z
采集速率:	4光谱/秒
碰撞能量:	15-45 eV
分辨率:	20,000 FWHM
IMS T-Wave速度:	550 m/s
IMS T-Wave脉冲高度:	40 V
缓冲气体:	N ₂ 和CO ₂

氟喹诺酮残留分析的典型步骤是：首先进行溶剂萃取，然后进行固相萃取（SPE）纯化，并通过LC分离，结合UV检测，荧光（FL）或质谱（MS）检测。这些方法通常只能检测少量目标分析物，并且样品通量较低⁵。许多不同种类的质量分析仪常被用于兽药残留（VDR）分析，包括单四极杆、串联四极杆、离子阱以及最近的基于飞行时间（ToF）的技术^{6,7,8}。串联四极杆质谱仪取代单级质谱用于定量分析现已得到广泛的接受，因为它在选择性和灵敏度方面可提供卓越的性能优势。这得益于多重反应监测（MRM）模式，在该模式下，首先使用第一个四极杆进行母离子的质量数选择，当选择特定母离子的质量数后，进入碰撞室碎裂，最后用第二个四极杆检测。即便采用这种方法，其它与分析物无关的化合物仍有一小部分会产生干扰信号。出于这个原因，会对第二对MRM离子对进行监测。只有样品中，两对离子对的MRM都产生了色谱峰并且色谱峰的保留时间与标准化合物的一致，才能确定该样品存在该化合物。另外，这两个MRM峰的强度比率也必须与纯标准品的相同。此方法已经在欧盟指令（2002/657/EEC）中进一步细化，该指令规定了对用于定量和确定食品和动物饲料中兽药残留的分析方法的要求⁹。

串联四极杆质谱仪广泛用于需要在复杂基质中，需要高灵敏检测（通常浓度为较低的 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 值）的残留监测项目。当选择新的基于串联四极杆的方法，以进行兽药残留分析时，对MRM通道的选择十分关键，必须按照上文所述2002/657/EC指导原则进行选择 and 验证。

本应用纪要探索了使用High Definition Mass Spectrometry™（HDMS™）作为重要的方法开发工具，用于支持组织粗提取物中氟喹诺酮类抗生素的明确鉴定。使用HDMS分析猪肌肉组织的粗提取物，以确定是否存在包括氟喹诺酮类在内的抗生素残留。该技术对于分析复杂基质具有独特的优势。它结合了高分辨率质谱与基于离子淌度的高效分离方法。离子淌度光谱法（IMS）是一种快速的正交气相分离技术，能在LC分离时间允许范围内，获得另一个维度的分离。它是根据化合物的大小、形状和电荷，对化合物进行区分的。另外，在HDMS实验中，单次进样就能获得母离子及其碎片离子信息，称为HDMS^E。

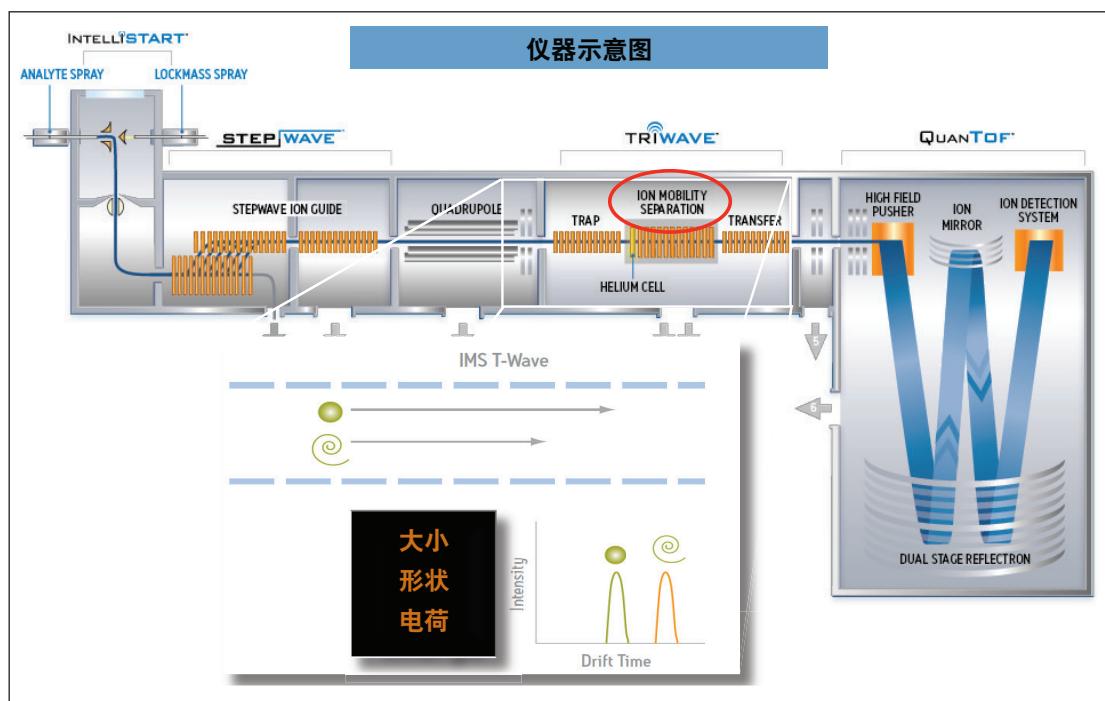


图2. SYNAPT G2-S和离子淌度原理示意图。

结果与讨论

使用通用梯度条件，测得抗生素环丙沙星在保留时间2.19分钟时洗脱，如图3所示（图3为基峰离子色谱图）。

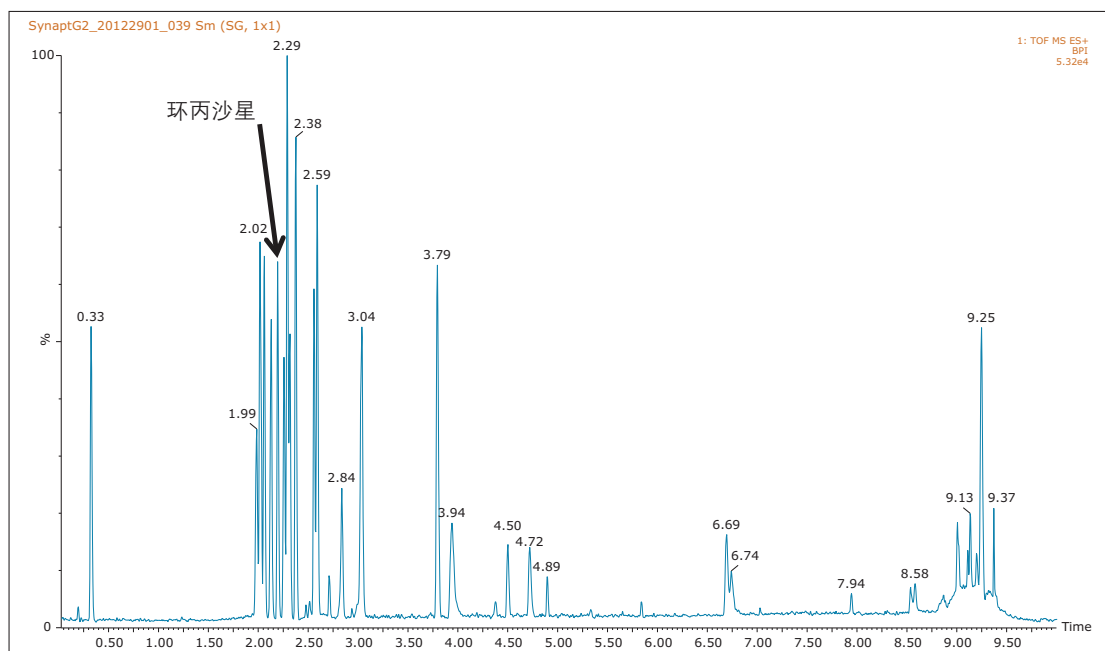


图3. 25种溶剂标准抗生素化合物的UPLC HDMS^E母离子基峰离子色谱图。

图4所示为使用MassLynx软件所得的常规精确质量数谱图，其中观察到：在 m/z 为332.1410时， $[M+H]^+$ 离子的精确质量数测量误差为0 ppm。通过获得的精确质量数测量结果与使用MassLynx中的元素组成计算工具，得到其元素组成，能使我们可靠地鉴定2.19分钟的色谱峰。

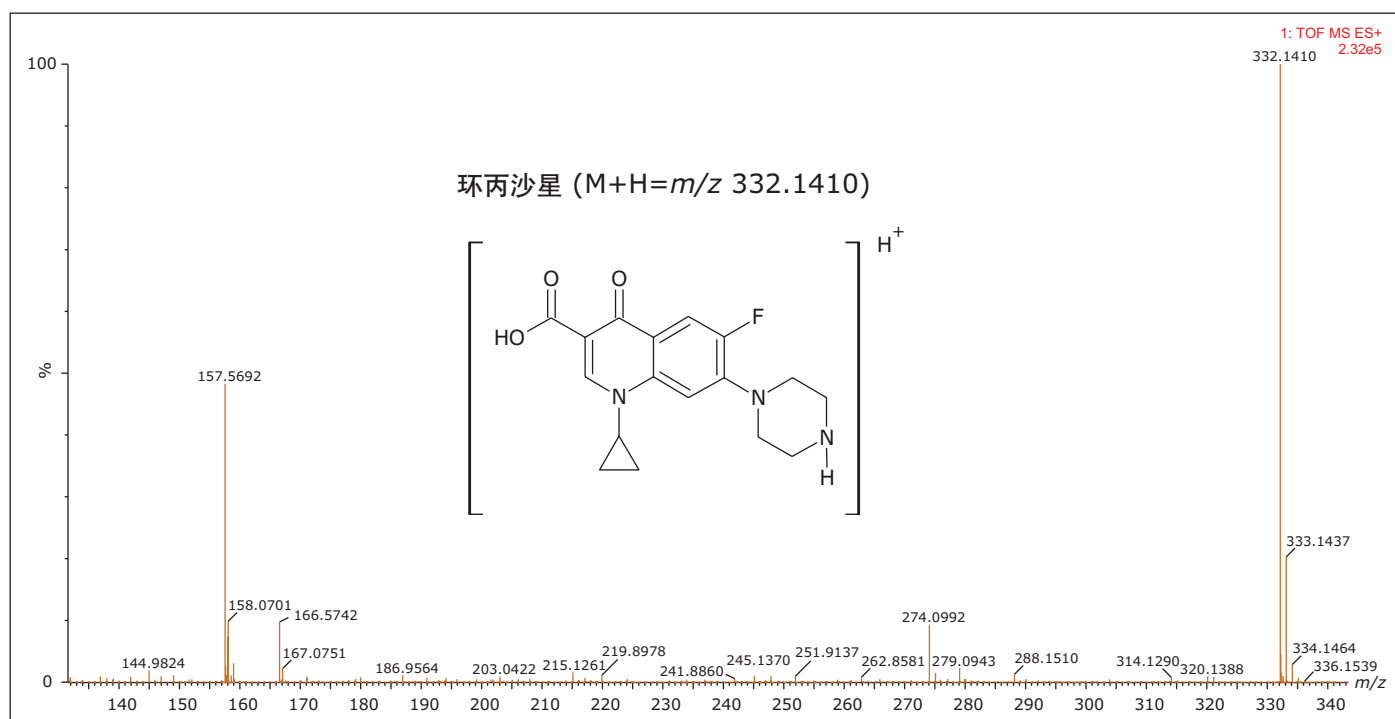


图4. 如MassLynx中所示在2.19分钟保留时间处，氟喹诺酮环丙沙星的UPLC HDMS^E精确质量数母离子谱图。

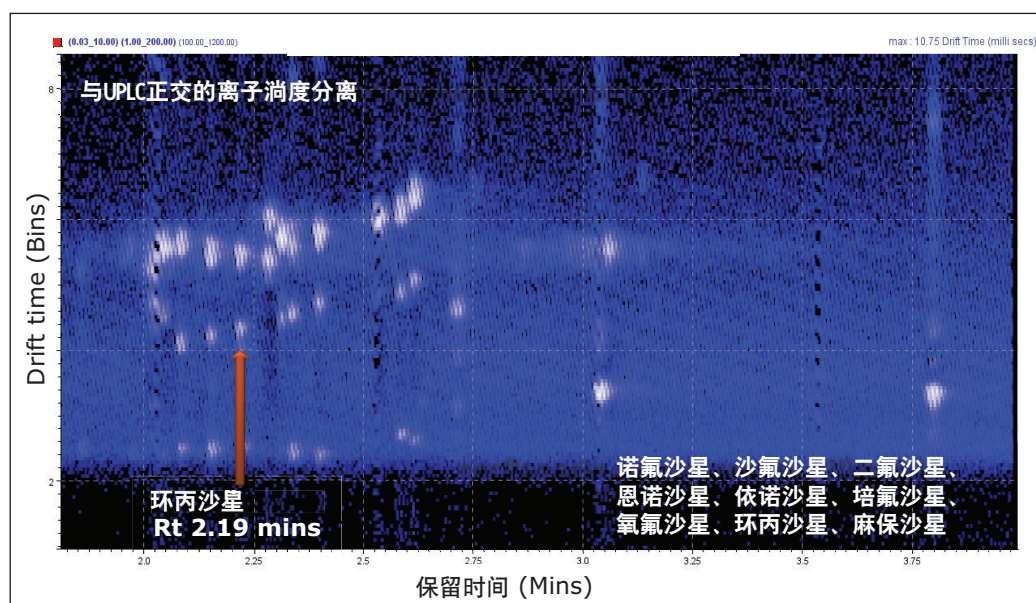


图5. 兽药标准品混合物的漂移时间与保留时间变化图，其中可观察到所分析的氟喹诺酮标准品的漂移时间分离以及获得的多个离子强度，并突出显示了环丙沙星的离子对强度。

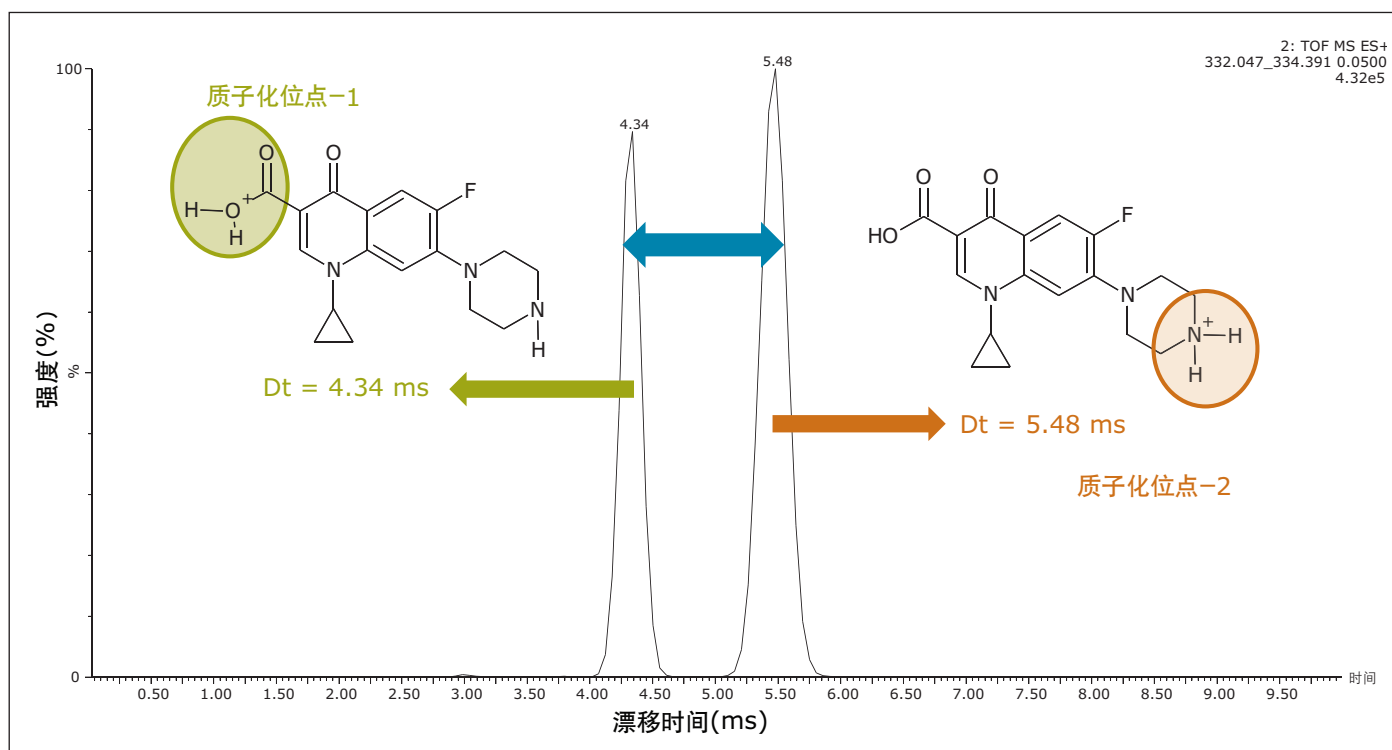


图6. 环丙沙星促进剂的强度与漂移时间，其中突出显示了相应位点的酸/碱基团质子化和漂移时间。

图3和图4的常规数据说明所分析的氟喹诺酮为单一组分。然而，使用离子淌度分析发现，氟喹诺酮是由两种离子化物质组成，如图5和图6所示。尽管这两个组分只是质子化位点不同，但是，在使用离子淌度对环丙沙星的分析中，分离相差了1.14毫秒。淌度分离可使用图5中的DriftScope查看，图5为兽药标准品混合物的漂移时间与保留时间变化图。图5显示出分析的所有氟喹诺酮标准品的漂移时间分离以及获得的离子强度。还突出显示了环丙沙星的离子对强度。图6显示了这对离子的更多具体数据，其中突出显示了相应的酸/碱基团质子化位点和漂移时间¹⁰。

因此，每种促进剂都被视为单一组分，以获得各自的碎片谱图（图7）。从单一组分MS^E碎片谱图中，可测定出环丙沙星酸性和碱性基团发生质子化而产生的两种淌度分离的物质。实际上，m/z 314和m/z 231的碎片离子（图7）是由酸性基团发生离子化的环丙沙星产生的。而m/z 288和m/z 245碎片离子只是由碱性基团质子化的环丙沙星产生的。据观察，两种促进剂均能形成m/z 231碎片离子。有关碎片离子的进一步研究已经完成，将在另一篇文章中进行介绍。

在图4中，显示了UPLC HDMS^E实验生成的常规MS谱图。在 m/z 157和 m/z 166处，清楚显示环丙沙星存在两个小的双电荷离子，表明环丙沙星确实形成了一种双电荷物质。使用离子淌度能够实现分离并确认该小分子形成了双电荷物质。双电荷物质的形成与否，取决于使用的MS参数，尤其是锥孔电压。如果锥孔电压过高，则无法观察到双电荷物质，仅能观察到 $[M+H]^+$ 。

所得数据表明：应当仔细考虑方法开发和所选的分析方法，因为促进剂的比例和形成会根据洗脱液流速、毛细管电压、锥孔电压和基质的不同而发生变化。如果选择了MRM方法，则需要考虑使用的实验条件和所选择的具体质谱通道。实验数据表明：选择的MRM离子对如果不一致，容易在实验室内和不同实验室间产生偏差，阐述了保持这些化合物可重现性结果，遇到的挑战。离子淌度是一种可用于方法开发的强大工具，能够确保方法的可靠性并获得一致结果。

除了更加具体和可靠的方法开发，不同组分不同漂移时间，可作为另一个鉴别条件。本应用纪要介绍了可用作环丙沙星鉴定条件的保留时间、母离子精确质量数、碎片离子精确质量数和两个漂移时间。

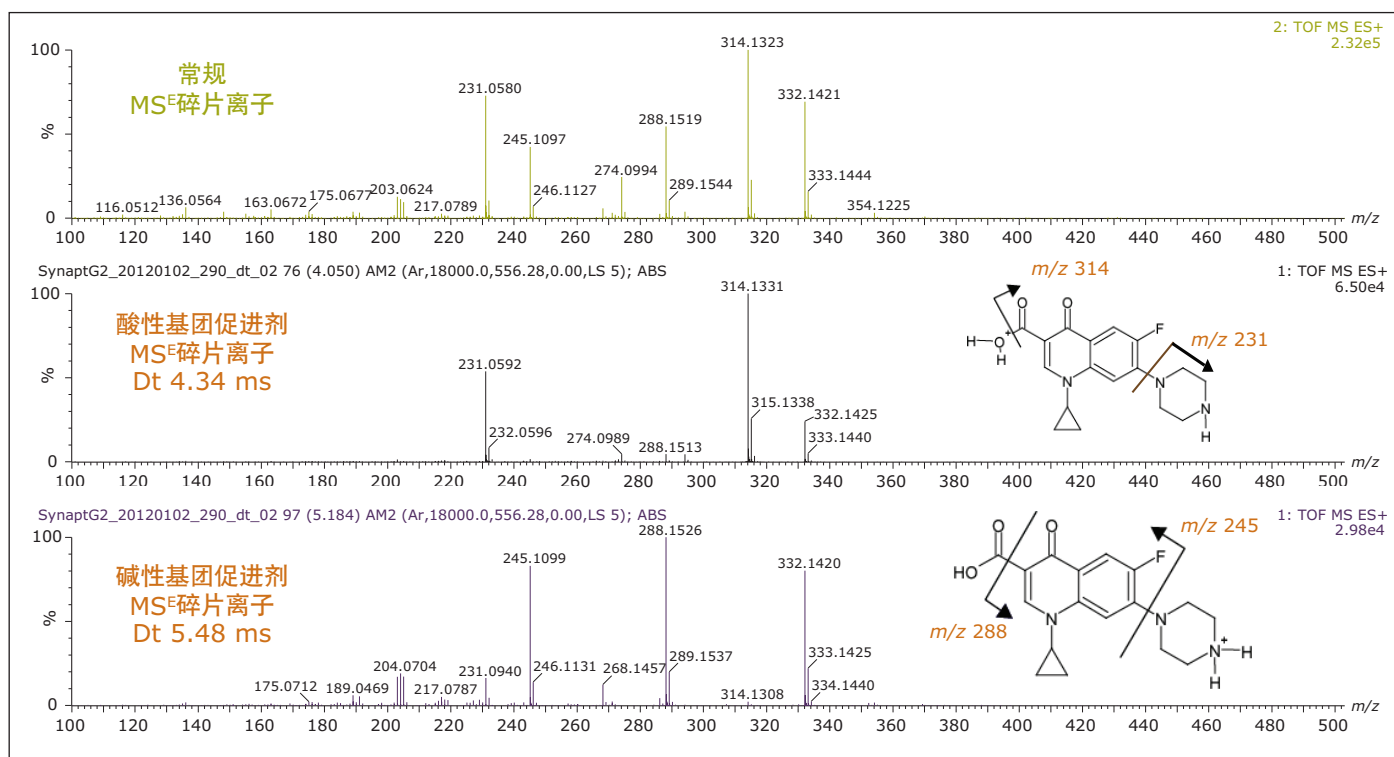


图7. 环丙沙星(m/z 332) 常规MS碎片精确质量数谱图及其两种环丙沙星促进剂的单个碎片精确质量数谱图

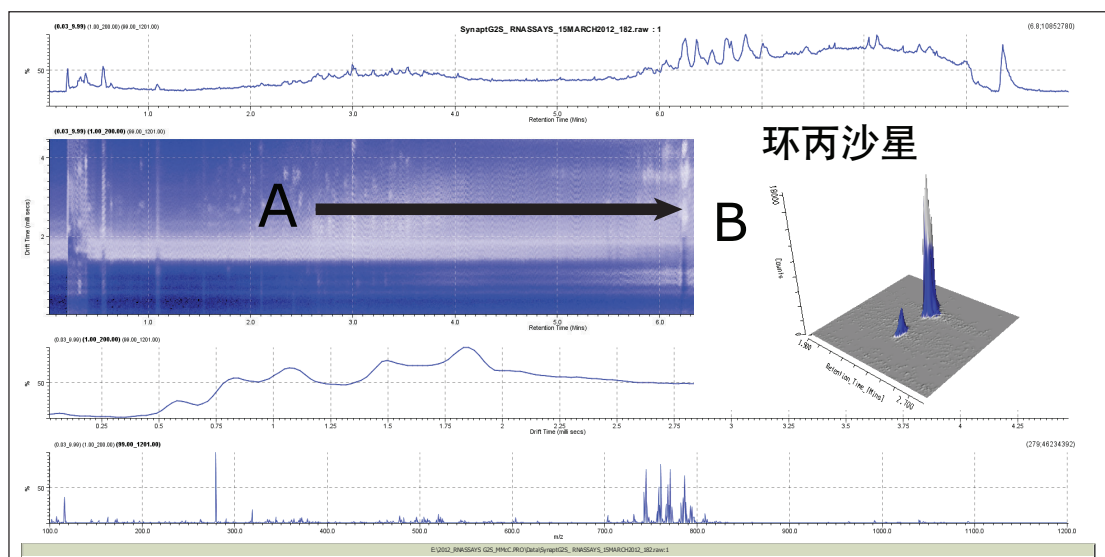


图8. 猪提取物中环丙沙星的基质移除图示，显示了环丙沙星促进剂1 μL \times MRL进样的3D图像。

除了利用离子淌度获得一个新的鉴定条件，还可将离子淌度产生的正交分离用于谱图清理。漂移时间与保留时间变化图（图8A）显示了离子强度，用白色像素表示。基质离子的存在范围用连续的白色表示。更大强度的分析物和基质组分由更明显的白点表示。但是由于基质产生了大量的离子强度，所以很难观察到低浓度的目标分析物。在图8B中，从猪基质中提取出了环丙沙星促进剂。根据使用离子淌度所得到的清晰、选择性的分离，可产生单一组分的MS及其碎片离子谱图。在这些条件下，猪基质中的酸性位点促进剂与碱性位点促进剂的比例测定为5:1。这受到了毛细管电压、锥孔电压、电极位置、流速和基质的影响。在注射实验中，可以改变酸/碱促进剂的比例，甚至可改变含量最高的促进剂。

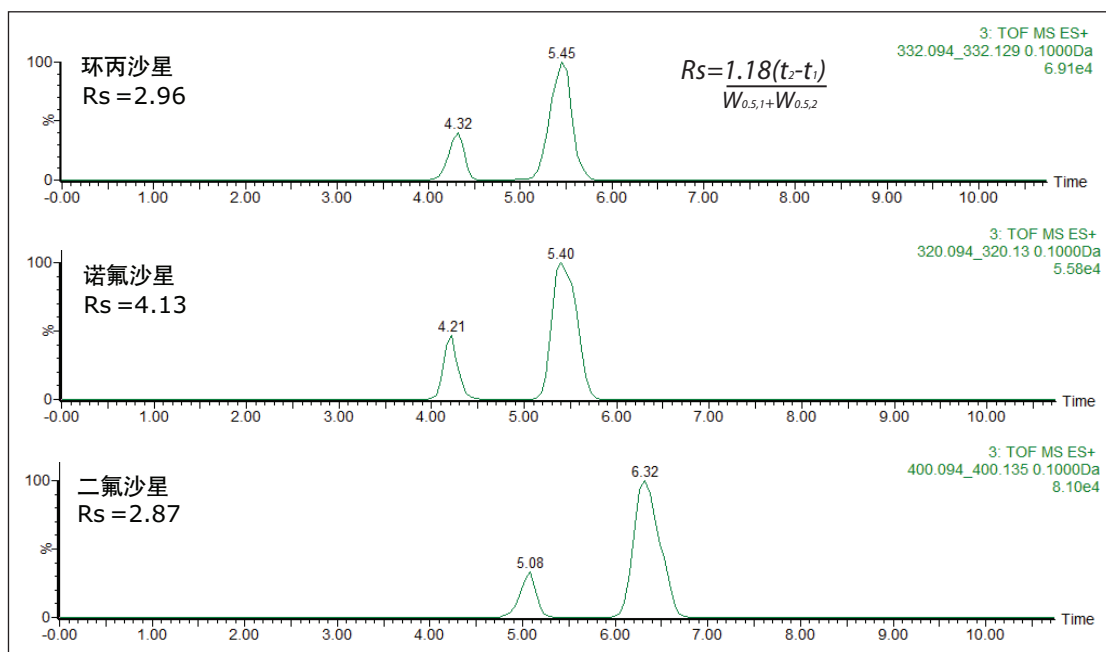


图9.使用二氧化碳作为缓冲气体时，通过UPLC IMS获得的氟喹诺酮抗生素离子淌度分离图示。峰间分离度由图示公式使用半峰高计算得出。

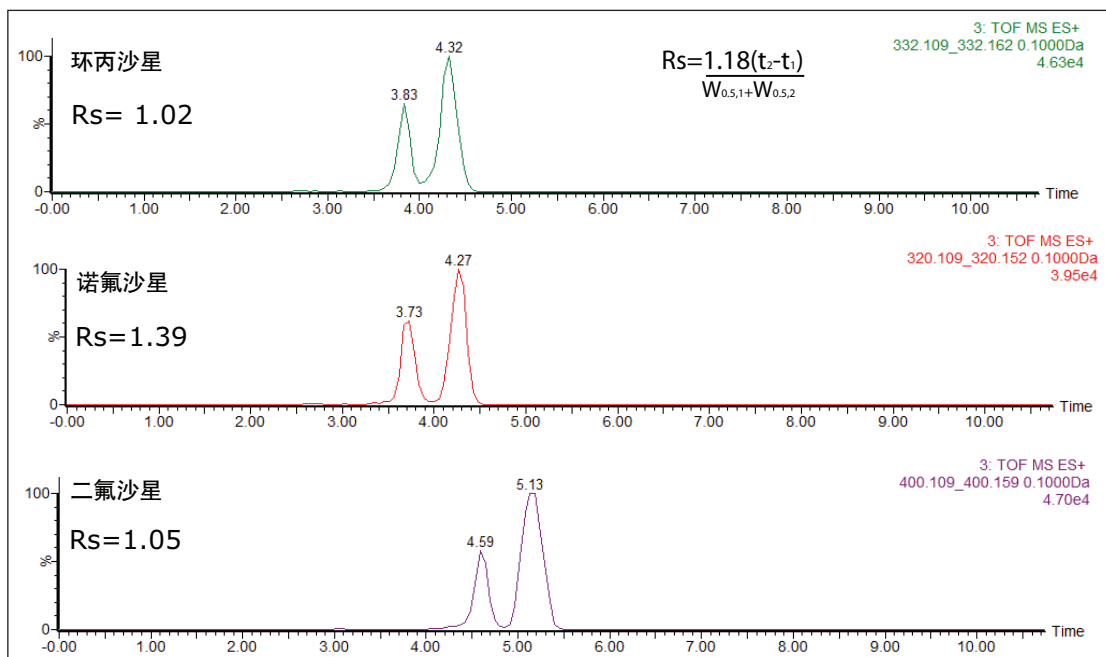


图10.使用氮气作为缓冲气体时，通过UPLC IMS获得的氟喹诺酮抗生素离子淌度分离图示。峰间分离度由图示公式使用半峰高计算得出。

图9和10显示了环丙沙星、诺氟沙星和二氟沙星促进剂的到达时间分布以及分别使用氮气和二氧化碳作为缓冲气体时得到的峰间分离度计算结果。虽然两种气体都获得了可接受的分离度，但是峰间的Rs值大于1.5才视为完全分离。先前的研究认为：交替使用这两种缓冲气体，可增加离子淌度的分离度¹⁰⁻¹⁴。

在执行IMS时，离子分离在T Wave离子淌度（TWIM）漂移管中进行，分离结果由电荷态、质量数、形状、缓冲气体极化率以及离子与中性气体分子间的相互作用决定。在该应用中，增加缓冲气体的极化率，能增加TWIM的分离能力（峰容量）。因此，通过充分考虑所使用的缓冲气体的极化率，可使峰与峰之间的分离度得到提高，在本研究中，使用的是二氧化碳。使用氮气或二氧化碳时获得的峰间分离度（ $R_s=1.18(t_a-t_b)/(W_{0.5,a}+W_{0.5,b})$ ）汇总于表1中（其中 R_s 表示计算得到的分离度， $W_{0.5,a}$ 和 $W_{0.5,b}$ 分别表示峰A和峰B的半高峰宽， t_a 和 t_b 分别为峰A和峰B的漂移时间）。可以看到，当使用二氧化碳作为离子淌度缓冲气体时，所有氟喹诺酮促进剂对均完全分离，峰间分离度介于2.61和4.13之间。使用二氧化碳所增加的峰容量进一步提升了单一组分母离子及其相应的单一组分碎片离子谱图的质量。

氟喹诺酮 抗生素	m/z	峰间 分离度(N ₂)	峰间 分离度(CO ₂)
环丙沙星	332.1	1.02	2.96
恩诺沙星	360.2	0.75	2.77
洛美沙星	352.12	1.20	3.05
达氟沙星	358.15	0.81	2.99
二氟沙星	400.17	1.05	2.87
恩诺沙星	321.1	1.39	3.08
沙氟沙星	386.14	1.04	2.61
麻保沙星	363.13	0.92	2.82
诺氟沙星	320.14	1.29	4.13

表1. 使用氮气和二氧化碳作为缓冲气体时，通过离子淌度分离的九种氟喹诺酮促进剂的峰间分离度对比。

结论

- 基于对本研究中氟喹诺酮化合物的特征离子化的观察，使用UPLC/MS/MS^E进行方法开发是合理的。
- 使用离子淌度，可将同一分子，不同质子化物质实现神奇的分离。
- 显示并鉴别了同分子，不同位点质子化化合物的碎片谱图。
- 得到每个组分的母离子MS及其MSE碎片谱图
- HDMS^E观察结果可以解释在同一实验室内监测特定MRM离子队获得的研究对象报告结果有时会出现差异的原因。
- 漂移时间值可作为保留时间、母离子精确质量数和碎片精确质量数谱图之外的又一个鉴定条件。
- 离子淌度分离可以有效地将目标峰从基质干扰中分离出来，而不需要对复杂样品进行纯化及色谱分离。

参考文献

1. Final Decision of the Commissioner, Docket # 2000N-I 57 1 October 24, 2000, Withdrawal of the approval of the new animal drug application for enrofloxacin in poultry. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration.
2. FDA Center for Veterinary Medicine, June 2, 1997, FDA Order Prohibits Extralabel Use Of Fluoroquinolones And Glycopeptides.
3. Official Journal of the European Union, L268:29-43, Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition.
4. Official Journal of the European Union, L24:1-8 Annex I, Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin.
5. Verdon E, Couedor P, Roudaut B, Sanders PJ. Multiresidue Method for Simultaneous Determination of Ten Quinolone Antibacterial Residues in Multimatrix/Multispecies Animal Tissues by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Single Laboratory Validation Study. AOAC Inter. 2005; 88:1179-1192.
6. Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Widmer M, Giles K, Uria D. Are liquid chromatography/electrospray tandem quadrupole fragmentation ratios unequivocal confirmation criteria? Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23: 985-998.
7. Mol HG, Zomer P, de Koning M. Qualitative aspects and validation of a screening method for pesticides in vegetables and fruits based on liquid chromatography coupled to full scan high resolution (Orbitrap) mass spectrometry. Anal Bioanal Chem. 2012; 403:2891-2908.
8. Croley TR, White KD, Callahan JH, Musser SM. The chromatographic role in high resolution mass spectrometry for non-targeted analysis. J Am Soc Mass Spectrom. 2012; 23:1569.
9. Commission Decision (2002/657/EEC) Official Journal of the European Communities 2002.
10. Lalli PM, Iglesias BA, Toma HE, de Sá GF, Daroda RJ, Silva Filho JC, Szulejko JE, Araki K, Eberlin MN. Protomers: formation, separation and characterization via travelling wave ion mobility mass spectrometry. J Mass Spectrom. 2012; 47(6):712-9.
11. Eberlin MN, Lalli PM, Nachtigall FM, Riccio MF, de Sa GF, Daroda RJ, de Souza V, Campuzano I, Souza GHMF. SYNAPT HDMS: [Improving Ion Mobility Separation by Increasing Drift-Gas Polarizability. Waters Technical Note 720003201en](#). 2009 October.
12. Jurneczko E, Kalapothakis J, Campuzano IDG, Morris M, Barran PE. Effects of drift gas on collision cross sections of a protein standard in linear drift tube and traveling wave ion mobility mass spectrometry. Anal Chem. 2012; 84(20):8524-31.
13. Asbury GR, Hill HH. Using different drift gases to change separation factors (alpha) in ion mobility spectrometry. Anal. Chem. 2000; 72(3): 580-4.
14. Fasciotti M, Sanvido GB, Santos VG, Lalli PM, McCullagh M, de Sá GF, Daroda RJ, Petera MG, Eberlin MN. J Mass Spectrom. 2012; 47(12):1643-7.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®



Waters, UPLC, ACQUITY UPLC, SYNAPT, MassLynx和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。HDMS, High Definition Mass Spectrometry, DriftScope, 是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013沃特世公司。于中国印制。
2013年6月 720004720ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010-5209 3866
上海: 021-6156 2666
广州: 020-2829 6555
成都: 028-6554 5999
香港: 852-2964 1800

免费售后服务热线: 800(400) 820 2676
www.waters.com