

实验技术与方法

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中
6 种氟喹诺酮类抗生素残留量

薛荣旋,卢丽明,黄诚,刘国平,丘福保

(中山市疾病预防控制中心,广东 中山 528403)

摘要:目的 建立一种基于 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定水产品中诺氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星和培氟沙星的分析方法。方法 样品经 1%甲酸乙腈提取,采用改进的 QuEChERS 体系进行净化后通过 C_{18} 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m),以 0.1%甲酸水和甲醇-乙腈(4:6, V/V)为流动相进行梯度洗脱,用 UPLC-MS/MS 法进行定性、定量分析。结果 诺氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星和培氟沙星在一定浓度范围内具有良好的线性关系,相关系数(r)均大于 0.999,检出限为 0.30~0.80 μ g/kg,定量限为 1.0~2.5 μ g/kg,回收率范围为 86.6%~120%,相对标准偏差在 0.59%~7.6%之间。结论 该方法快速、准确,能满足水产品中 6 种氟喹诺酮类抗生素残留的快速筛查和检测分析要求。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱; 水产品; 氟喹诺酮类; 抗生素

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)05-0519-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.05.009

Determination of six fluoroquinolones in aquatic products by QuEChERS-ultra
performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XUE Rongxuan, LU Liming, HUANG Cheng, LIU Guoping, QIU Fubao

(Zhongshan Center for Disease Control and Prevention, Guangdong Zhongshan 528403, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, enrofloxacin, ofloxacin and pefloxacin in aquatic products by QuEChERS with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Six fluoroquinolones in aquatic products were extracted by 1% formic acid acetonitrile solution, purified by QuEChERS, separated by C_{18} column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m) using 0.1% formic acid and methanol-acetonitrile (4 : 6, V/V) as mobile phases, then identified and quantified by UPLC-MS/MS. **Results** Norfloxacin, ciprofloxacin, lomefloxacin, enrofloxacin, ofloxacin and pefloxacin had good linear relationships in a certain concentration range with correlation coefficients (r) above 0.999. The limits of detection of six fluoroquinolones were 0.30-0.80 μ g/kg, and limits of quantification were 1.0-2.5 μ g/kg. The average recoveries of the method were between 86.6% and 120%, and the relative standard deviations were between 0.59% and 7.6%. **Conclusion** The method was rapid and accurate, and was suitable for rapid screening and analysis of the six fluoroquinolones in aquatic products.

Key words: QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aquatic products; fluoroquinolones; antibiotic

氟喹诺酮类(FQs)药物属于第三类喹诺酮类药物,是一类人工合成广谱抗菌药物,相比于其他喹诺酮类药物抗菌谱更广^[1]。由于化学合成成本相对低廉,在农畜牧业得到广泛应用,导致细菌耐药率明显增加,有报道消费者食用了污染抗生素的畜产品和代谢物也能引起过敏反应^[2]。为加强兽药

残留监控,农业部第 2292 号规定^[3],在食品动物中停止使用洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 种兽药;第 235 号公告^[4]规定动物肌肉中恩诺沙星最高残留限量为 100 μ g/kg。

近年来,因液相色谱-串联质谱仪结合了液相色谱良好的分离能力和串联质谱检测的高特异性,具有灵敏度高、效率高等优点,被广泛应用于食品中的兽药残留^[5-11]的精确定量检测。2003 年 ANASTASSIADES 等^[12]建立的 QuEChERS 最初用于果蔬中农药残留量的提取净化,近年来,也被用于

收稿日期:2020-04-30

作者简介:薛荣旋 女 副主任技师 研究方向为食品中农药和兽药残留测定 E-mail:121759896@qq.com

抗生素多残留分析。该方法的优点是前处理简单、回收率高、重复性良好等。夏骏等^[7]、杨艳等^[8]建立了用 QuEChERS 联合液相色谱-串联质谱法测定多种氟喹诺酮类药物残留的检测方法;才凤等^[9]应用酸化乙腈对速冻调理肉制品中 18 种喹诺酮类药物残留量进行测定;魏祯^[10]应用 QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱对软体海产品中 21 种兽药和禁用化合物进行初筛。尚未见采用 QuEChERS 体系对鱼类中残留的诺氧沙星、环丙沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星和培氟沙星进行快速检测,并能直接用工作曲线进行校正的相关报道。

本试验采用 QuEChERS 净化体系结合超高效液相色谱-串联质谱仪,对水产品中的 6 种氟喹诺酮类抗生素残留量进行条件优化和测定,有效减少试验过程中有机溶剂的使用,缩短试验时间,为相关检测和日常监管工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 AB SCIEX, TRIPLE QUAD™ 6500⁺),匀浆机,旋涡混匀器,Milli-Q Element 超纯水机(美国 Millipore),3~30 K 超高速冷冻离心机,氮吹仪,电子天平。

诺氧沙星(CAS:70458-96-7,纯度为 97.29%)、盐酸环丙沙星(CAS:93107-08-5,纯度为 92.31%)、洛美沙星盐酸盐(CAS:98079-52-8,纯度为 99.50%)、恩诺沙星(CAS:93106-60-0,纯度为 99.90%)、氧氟沙星(CAS:82419-36-1,纯度为 95.71%)和培氟沙星二水甲磺酸盐(CAS:149676-40-4,纯度为 92.19%)标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯;*N*-丙基乙二胺(PSA)、C18、无水硫酸钠、乙二胺四乙酸二钠(EDTA- Na_2)均为分析纯;试验用水为符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》^[13]规定的一级水。1%甲酸乙腈:量取 5 mL 甲酸,用乙腈定容至 500 mL。0.1%甲酸水:量取 500 μL 甲酸,用纯水定容至 500 mL。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别称取诺氧沙星、盐酸环丙沙星、洛美沙星盐酸盐、恩诺沙星、氧氟沙星和培氟沙星二水甲磺酸盐标准品约 0.010 0 g,用甲醇定容于 10 mL 容量瓶中,配制成浓度约为 1.000 mg/mL 的单标储备液,储备液浓度以含量 100% 折算,有盐酸盐结合物等的标准品按照分子量换算成相应无盐化合物。

-20 °C 保存备用。分别移取上述单标储备液,用甲醇定容,配制成 10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液,4 °C 保存备用。

1.2.2 样品前处理

将鱼可食部分匀浆后,准确称取样品 2.00 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管,加入 0.1 g EDTA- Na_2 ,加入 10.00 mL 1%甲酸乙腈,涡旋振荡 30 min;取出后于 8 000 r/min 离心 5 min(温度低于 5 °C),上清液待净化。

取 5 mL 上清液转移至含有 50 mg PSA、150 mg C18、900 mg 无水硫酸钠的净化管中,涡旋提取 1 min,5 000 r/min 离心 5 min。取 2.00 mL 上清液转移至氮吹瓶中,40 °C 以下氮气吹干,以 1.00 mL 0.1%甲酸水溶解残渣,0.22 μm 微孔滤膜过滤后,上机测定,外标法定量。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC® BEH C₁₈(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);柱温 35 °C;样品温度 15 °C;流速为 0.25 mL/min;进样量为 2 μL 。流动相为 A:0.1%甲酸水;B:甲醇-乙腈(4:6, V/V)。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	0.1%甲酸水/%	甲醇-乙腈/%
0.01	90	10
7	70	30
8	10	90
11	90	10

质谱:离子化模式:电喷雾电离正离子模式;质谱扫描方式:多反应离子监测;气帘气压力:30 psi(207 kPa);喷雾电压:5 500 V;离子源温度:400 °C;雾化气压力 GS1:50 psi(345 kPa);辅助加热气压力 GS2:40 psi(276 kPa)。6 种目标化合物的定性定量离子以及对应的碰撞能量(CE)见表 2。

表 2 6 种氟喹诺酮类抗生素质谱参数

化合物	保留时间/min	母离子/(<i>m/z</i>)	子离子/(<i>m/z</i>)	碰撞电压/V
氧氟沙星	5.36	362.1	318.2 [*] /261.2	28/37
诺氧沙星	5.39	320.1	302.1 [*] /276.2	28/25
培氟沙星	5.45	334.1	290.3 [*] /233.2	32/25
环丙沙星	5.65	332.2	314.2 [*] /288.2	27/25
洛美沙星	6.11	352.1	308.2 [*] /265.1	23/32
恩诺沙星	6.34	360.1	342.2 [*] /316.2	30/27

注:^{*}为定量离子

2 结果与分析

2.1 萃取溶剂的优化

测定氟喹诺酮类抗生素的前处理提取溶剂主

要有酸化乙腈^[5-10]、二氯甲烷^[11]、EDTA-McIlvaine 缓冲液^[14]等,适合用 QuEChERS 试剂进行萃取主要是有机溶剂。研究选择阴性脆肉鲩鱼肉样品为试验材料,以萃取溶剂 0.1% 甲酸乙腈、1% 甲酸乙腈、1% 乙酸乙腈 3 种酸化乙腈溶液进行提取比较,添加含量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的混合标准溶液,每个样品平行测定 6 次,对比 6 种氟喹诺酮类抗生素在鱼肉基质中的提取效率,以平均回收率评价(见图 1)。结果显示,采用 1% 甲酸乙腈的萃取效果明显优于其他两种提取酸化乙腈溶液,回收率为 86.0%~102%,重复性良好,因此本试验最终选择 1% 甲酸乙腈作为萃取溶剂。

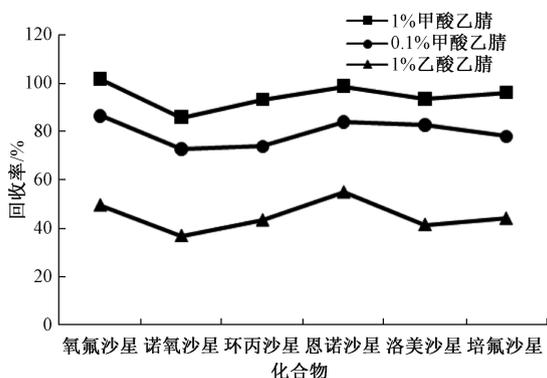


图 1 不同混合溶剂对提取氟喹诺酮类药物效果的影响 ($n=6$)

Figure 1 Recoveries of different mixed solvents on the extraction of fluoroquinolones

2.2 QuEChERS 体系的选择

水产品具有高脂肪、高蛋白等特点,在利用高分辨质谱检测技术分析时,由于色谱分离时样品基质中的非挥发性组分与待测物质在雾滴表面离子化的过程中发生竞争,引起待测物响应值增加或减少的现象产生,即基质效应。本试验表明,样品的萃取溶剂、净化方法、色谱条件对基质效应均有一定影响。

QuEChERS 净化剂可直接作用于提取液中,选择性的保留基质干扰成分而达到净化的目的。该试验通过对设计的两组 QuEChER 体系的净化效果进行探讨,第一组成分为 50 mg PSA、150 mg C18、900 mg 无水硫酸钠;第二组成分为 100 mg PSA、250 mg C18、900 mg 无水硫酸钠。方案的主要内容包括在 3 种鱼肉中添加浓度水平为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 6 种氟喹诺酮类抗生素,测定两种组合体系对目标化合物的影响。结果显示两种 QuEChERS 组合净化剂对鱼肉中 6 种氟喹诺酮类抗生素的提取回收率均能满足国标要求,在 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平下,第一组试剂中氟喹诺酮类抗生素的回收率在 86.0%~103% 之间,第二组试剂的回收率在 82.7%~96.2% 之间

(图 2)。通过比较第一组分试剂的回收率略好于第二组分试剂,因此本试验选择第一组分试剂作为 QuEChERS 净化条件。

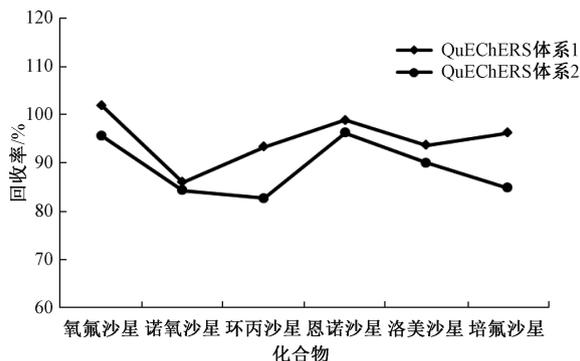
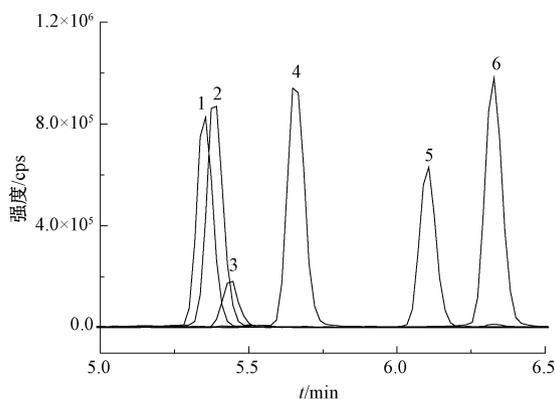


图 2 QuEChER 体系对氟喹诺酮类药物净化效果的影响 ($n=6$)

Figure 2 Recoveries of fluoroquinolones with different QuEChER systems

2.3 色谱条件的优化

选择合适的流动相,在流动相中调节溶剂的组成和配比,能够使各个组分在适宜的条件下得到较好的分离,获得较好的离子化效率。由于氟喹诺酮类抗生素易溶于乙腈和甲醇,试验分别选择两者作为强洗脱流动相时,甲醇-乙腈(4:6, V/V)的分离效果较好。而在水相中加入少量的酸,可以提高电离效果,增加目标物的响应值。试验还比较了 0.1% 甲酸水-甲醇, 0.1% 甲酸水和 5 mmol/L 甲酸铵-甲醇, 0.1% 甲酸水-乙腈, 0.1% 甲酸水和甲醇-乙腈(4:6, V/V), 0.2% 甲酸水和甲醇-乙腈(4:6, V/V) 作为流动相时 6 种氟喹诺酮类抗生素的离子化效率。结果显示,0.1% 甲酸水和甲醇-乙腈(4:6, V/V) 作为流动相时灵敏度较高, 6 种目标化合物的标准溶液质谱图见图 3。



注:1:氧氟沙星;2:诺氧沙星;3:培氟沙星;4:环丙沙星;5:洛美沙星;6:恩诺沙星

图 3 6 种氟喹诺酮混合标准溶液色谱图

Figure 3 Extracted ion chromatograms of 6 kinds of FQs in standard solution

2.4 加标回收率和精密度

按照本试验的前处理方法和仪器条件,分别

考察了脆肉鲩、草鱼、海鲈鱼3种鱼类产品的阴性空白基质在2.50、7.50、25.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个加标浓度下氟喹诺酮类抗生素的回收率,每个加标浓度平行测试6次,外标法定量。结果表明,6种氟喹诺

酮类抗生素的平均回收率范围为86.6%~120%,相对标准偏差(RSD)在0.59%~7.6%之间(见表3),其精密度和准确度均符合检测方法确认的技术要求。

表3 3种浓度中6种氟喹诺酮类抗生素的回收率和RSD($n=6$)

Table 3 Recoveries of 6 fluoroquinolones in 3 concentrations

水产品	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	诺氧沙星		环丙沙星		洛美沙星		恩诺沙星		氧氟沙星		培氟沙星	
		回收率 /%	RSD /%										
海鲈鱼	2.50	99.2	1.1	96.9	2.7	107	1.3	120	2.0	115	1.8	116	2.2
	7.50	99.1	3.9	98.8	2.0	105	1.7	109	1.7	110	2.0	115	1.7
	25.0	87.4	1.1	89.6	1.8	100	2.7	98.7	3.6	100	2.1	103	2.2
脆肉鲩	2.50	98.8	1.7	97.2	3.0	106	1.7	116	2.6	109	1.5	116	1.2
	7.50	97.2	1.9	99.1	3.4	106	0.89	112	2.0	106	0.59	112	1.5
	25.0	89.6	1.5	89.2	1.8	89.4	1.3	97.9	1.2	92.1	0.92	95.9	1.8
草鱼	2.50	86.6	3.0	90.5	2.3	93.6	0.90	105	3.3	101	0.92	103	3.0
	7.50	89.8	7.6	90.2	5.6	95.0	2.5	102	6.6	96.0	6.3	101	4.5
	25.0	94.5	5.9	92.2	6.0	92.4	2.1	103	2.3	96.1	5.2	99.7	7.2

2.5 线性范围和检出限、定量限

取10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液逐级稀释成1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准系列溶液,诺氧沙星、环丙沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星和培氟沙星的标准曲线线性相关系数(r)均大于0.999。以3倍信噪比($S/N=3$)计算得到6种氟喹诺酮类抗生素的检出限;以10倍信噪比($S/N=10$)计算得到6种氟喹诺酮类抗生素的定量限,检出限为0.30~0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为1.0~2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,见表4。

表4 6种氟喹诺酮类抗生素的线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 4 Linear regression equation, correlation coefficient(r),

LODs and LOQs of 6 fluoroquinolones

化合物	线性方程	r	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
诺氧沙星	$y = 2.27 \times 10^5 x + 2.65 \times 10^5$	0.999 0	0.30	1.0
环丙沙星	$y = 2.53 \times 10^5 x + 3.99 \times 10^4$	0.999 9	0.30	1.0
洛美沙星	$y = 2.15 \times 10^5 x - 2.29 \times 10^4$	0.999 5	0.40	1.5
恩诺沙星	$y = 3.52 \times 10^5 x - 2.11 \times 10^4$	0.999 6	0.30	1.0
氧氟沙星	$y = 2.84 \times 10^5 x - 1.81 \times 10^5$	0.999 9	0.30	1.0
培氟沙星	$y = 1.24 \times 10^5 x - 8.42 \times 10^4$	0.999 4	0.80	2.5

2.6 基质效应分析

电喷雾电离离子源质谱分析时,样品提取液中含有的内源性物质如盐类、脂肪酸等与分析物的电荷产生竞争,改变电雾滴的表面张力,最终导致进入质谱的离子增加或减少,即产生了基质效应,表现为目标离子的响应被增强或抑制^[15]。本试验考察了草鱼、脆肉鲩和海鲈鱼3种水产品中的基质效应(ME)对氟喹诺酮类药物响应的影响,采用的评价方法为提取后加入法,主要通过测定分析物在同浓度的加标空白基质提取液和纯溶剂标准溶液中的离子信号强度,计算二者的比值进行评价,公式

为 $ME(\%) = (B/A - 1) \times 100\%$, B 为基质标准曲线斜率, A 为溶剂标准曲线斜率。其中 $ME > 50\%$ 为强基质效应; $20\% \sim 50\%$ 为中等基质效应; $0\% \sim 20\%$ 为弱基质效应^[8]。结果表明,不同样品基质对目标化合物均存在不同程度的抑制作用,同一基质对不同化合物的抑制程度也不同。本试验条件下,不同样品基质对6种氟喹诺酮类抗生素的基质效应均 $< 20\%$ (见图4),说明存在基质效应,但影响不大,表明此法可以有效地从目标化合物中分离大部分基质,在精密度、准确率和回收率上也得到了验证。

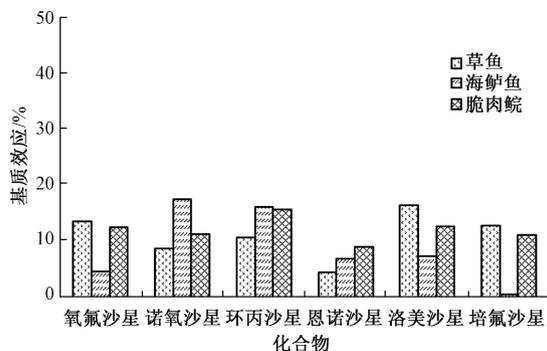


图4 不同水产品基质中6种氟喹诺酮类药物的基质效应

Figure 4 Matrix effects of 6 fluoroquinolones

in different aquatic product bases

2.7 实际样品的检测

应用本方法对从本地农贸市场中购置的6份鱼肉样品进行检测,其中一份样品检出了恩诺沙星,含量为2.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余样品均未检出。阳性样品色谱图见图5~6。

3 小结

建立 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肉样品中诺氧沙星、环丙沙星、洛美沙

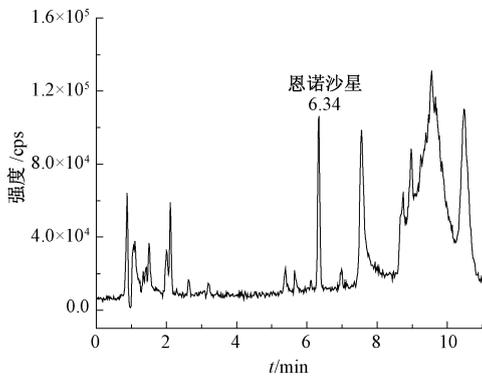


图5 阳性样品的总离子流图

Figure 5 Total ion chromatograms of positive sample

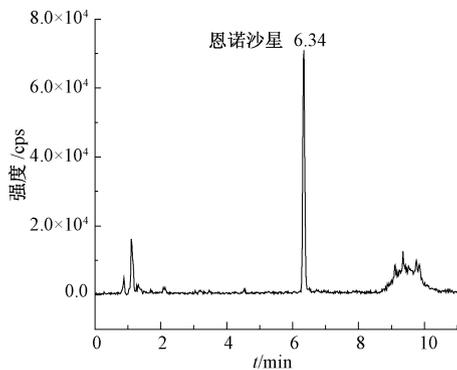


图6 从阳性样品中提取恩诺沙星离子色谱图

Figure 6 Chromatograms of positive sample of enrofloxacin

星、恩诺沙星、氧氟沙星、培氟沙星6种氟喹诺酮类抗生素,符合国内外有关标准和法规的要求,适合快速、批量检测水产品中抗生素残留量,减少试验过程中寻找基质曲线校正的工作量,提高检测效率,为水产品中6种氟喹诺酮类抗生素的准确定量分析提供技术支持。

参考文献

- [1] 宋晓婉,梁先龙,冯娟,等. QuEChERS方法检测动物源性食品中15种喹诺酮类药物残留量及风险监测研究[J]. 食品安全导刊,2019(18):89-91.
- [2] 李光辉,唐彩琰,罗静如. 俄罗斯、美国和欧盟成员国等关于动物性食品中兽药残留量监测的规定[J]. 饲养管理,2020,40(1):31-35.
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第2292

- 号[Z/OL]. (2015-09-01)[2019-03-26]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201509/t20150907_4819267.htm.
- [4] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量[Z/OL]. (2002-12-24)[2019-03-26]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwl/m/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm.
- [5] MARTINS M T, BARRETO F, HOFF R B, et al. Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS[J]. Food Addit Contam,2015,32(3):333-341.
- [6] WAGIL M, KUMIRSKA J, STOLTE S, et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland[J]. Science of the Total Environment, 2014,493(6):1006-1013.
- [7] 夏骏,李勇,吴科盛,等. QuEChERS-液相色谱串联质谱法测定动物源性食品中氟喹诺酮类残留量[J]. 江西畜牧兽医杂志,2019(6):1-5.
- [8] 杨艳,邱文倩,李宇翔. 基于QuEChERS法-超高效液相色谱-串联质谱同位素标记内标法测定动物源性食品中11种喹诺酮类药物残留[J]. 国际药学研究杂志,2019,46(2):158-162.
- [9] 才凤,赵飞,贾宏新. 超高效液相-串联质谱法测定速冻调理肉制品中18种喹诺酮类药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(24):8456-8461.
- [10] 魏祯. QuEChERS前处理技术在海产品四类兽药残留检测中的应用研究[D]. 海口:海南大学,2018.
- [11] 汪雪雁,檀华蓉,薛秀恒,等. 高效毛细管电泳法同时检测鸡肝中氟喹诺酮类和磺胺类药物残留[J]. 黑龙江农业科学,2011(2):107-110.
- [12] ANASTASSIADES M, LEHOTAY S J, STAJNBAHER D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce[J]. J AOAC Intern,2003,86(2):412-431.
- [13] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 分析实验室用水规格和试验方法:GB/T 6682—2008[S]. 北京:中国标准出版社,2008.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 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:GB/T 21312—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.
- [15] 徐炎炎,李森,张芹,等. 气质联用和液质联用中基质效应的分析和总结[J]. 农药,2017,56(3):162-167.