

高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法检测荷斯坦和水牛原料乳中喹诺酮残留

肖英平^{1,2}, 李玲³, 曾庆坤³, 杨华^{1,2*}, 任大喜^{4*}

(1. 浙江省农业科学院农产品质量标准研究所, 杭州 310021; 2. 浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 杭州 310021; 3. 中国农业科学院广西水牛研究所, 南宁 530001; 4. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法检测我国南方地区荷斯坦和水牛原料乳中喹诺酮类抗生素类残留的分析方法。**方法** 采集南方地区 15 个荷斯坦牧场和 15 个水牛牧场的 120 份原料乳, 采用高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法检测其中的喹诺酮类抗生素残留情况。**结果** 检出限和回收率分别为 0.05~0.25 $\mu\text{g/L}$ 和 88.2%~109.2%。水牛乳中喹诺酮类抗生素残留检出率为 8.06%, 荷斯坦牛乳中抗生素残留率为 6.89%。**结论** 该方法检测牛乳中喹诺酮类结果准确可靠, 南方地区的荷斯坦牛乳和水牛乳喹诺酮类残留量与国内外相比程度较低, 原料乳总体上处于安全范围。

关键词: 高效液相色谱-三重四级杆质谱联用法; 荷斯坦; 水牛; 喹诺酮

Determination of quinolone residues in raw Holstein and Buffalo milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Ying-Ping^{1,2}, LI Ling³, ZENG Qing-Kun³, YANG Hua^{1,2*}, REN Da-Xi^{4*}

(1. Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 3. Water Buffalo Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Nanning 530001, China; 4. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of quinolone residues in raw Holstein and Buffalo milk in south China by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** One hundred and twenty milk samples were collected from Holstein and Buffalo farms in Zhejiang and Guangxi, and the quinolones residues in raw milk were determined by HPLC-MS/MS. **Results** The LODs and recovery rates were 0.05~0.25 $\mu\text{g/L}$ and 88.2%~109.2%, respectively. The detection rates of quinolone residues in raw Buffalo and Holstein milk were 8.06% and 6.89%. **Conclusion** This method is accurate and reliable for the

基金项目: 浙江省植物有害生物防控重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地(2010DS700124-ZM1608)

Fund: Supported by State Key Laboratory Breeding Base for Zhejiang Sustainable Pest and Disease Control (2010DS700124-ZM1608)

*通讯作者: 杨华, 高级畜牧师, 硕士生导师, 主要研究方向为畜产品质量安全。E-mail: yanghua806@hotmail.com

任大喜, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要研究方向为营养与乳制品加工。E-mail: dxren@zju.edu.cn

*Corresponding author: YANG Hua, Senior Livestock Engineer, Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China. E-mail: yanghua806@hotmail.com

REN Da-Xi, Associate Professor, College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China. E-mail:

dxren@zju.edu.cn

determination of quinolones residues in raw milk. Compared to the results of other parts and area, the quinolone residues in raw Holstein and Buffalo are in safety situation in south China.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Holstein; Buffalo; quinolone

1 引言

喹诺酮类(quinolones, QNs)药物是一类人工合成的抗生素,最早出现在20世纪60年代,具有广谱抗菌、强力杀菌等特点,尤其对革兰氏阴性杆菌的抗菌活性高,并且因其吸收快、组织分布广泛,可治疗各个系统的感染性疾病的优点早已广泛应用于兽医临床、药物预防、水产养殖等领域^[1]。喹诺酮类药物具有较强的残留毒性,过量使用后可引起失眠、头痛等神经系统反应,恶心、呕吐等消化系统的反应及过敏等症状^[2]。喹诺酮类抗生素主要包括环丙沙星及恩诺沙星等,通常用于治疗家畜疾病,包括胃肠道及呼吸道感染。如果抗生素使用不当,或者没有按照推荐的安全剂量使用,则可能残留在动物体内,对动物产品如肉和奶等造成影响,例如影响乳酸菌的发酵等,乳中的抗生素残留则会导致人体肠道菌群具有抗药性^[3]。

目前已开发多种方法用于检测食品中抗生素残留,主要有微生物检测法和理化检测法两大类。微生物检测法应用最早且广泛,包括纸片法、TTC法、STOP法等^[4,5]。微生物法操作简便且费用低,但时间长、误差大。理化检测法根据抗生素分子基团的性质来测定含量,包括高效液相色谱法^[6]、免疫^[7]、亲和色谱法^[8]及免疫传感器^[9]等方法,具有定性定量和敏感性高等优点。

原料乳中抗生素残留对乳制品质量具有重要影响。荷斯坦牛和水牛是国内外饲养的主要产奶品种,但目前的研究集中在检测方法的开发和市场上乳制品上的检测等方面^[10-12]。对新鲜牛乳的检测分析较少,尚未见水牛原料乳及乳制品中喹诺酮的残留的报道^[13]。我国是水牛养殖和水牛乳生产大国,水牛数量和产量均位于世界第三。因此,水牛原料乳的安全对人们安全及区域发展息息相关。此外,国内外在不同区域和牧场间喹诺酮残留的比较方面报道也很少^[14]。本研究拟采用高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定不同地区及牧场中荷斯坦牛和水牛原料乳的抗生素残留,拟为我国现阶段原料乳安全提供数据支持。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

标准品:吡哌酸(pipemidic acid)、马波沙星(marbofloxacin)、氟罗沙星(fleroxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、培氟沙星(pefloxacin)、依诺沙星(enoxacin)、

诺氟沙星(norfloxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、恩诺沙星(enrofloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、达氟沙星(danofloxacin)、奥比沙星(orbifloxacin)、双氟沙星(difloxacin)、沙拉沙星(sarafloxacin)、司帕沙星(sparfloxacin)、西诺沙星(cinoxacin)、恶喹酸(oxolinic acid)、萘啶酸(nalidixic acid)、氟甲喹(flumequin)购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。乙腈、正己烷、甲醇(色谱纯,赛默飞中国有限公司);甲酸、磷酸(优级纯,上海凌风化学试剂有限公司)。

原料乳样品包括水牛乳和荷斯坦牛乳,其中水牛乳采集自广西和贵州地区15个牧场,荷斯坦样品采自浙江和广西的15个牧场。分数次一共采集样品120个,其中荷斯坦样品58个,水牛乳样品62个。样品采集于50 mL的离心管中,-20℃冻存,直至分析。

2.2 仪器与设备

Agilent1290 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); QTRAP® 6500 三重四极杆—线性离子阱复合质谱系统(美国 AB 公司);匀浆机(T8 Basic, 德国 IKA 公司);涡旋仪(945616): TALBOYS 公司;高速冷冻离心机(Biofuge Primor): 美国 Thermo Scientific 公司;旋转蒸发仪(HB10 digital): 德国 IKA 公司;超声波清洗器(KQ-100B): 昆山市超声仪器有限公司。

2.3 试验方法

2.3.1 标准溶液的配制

准确称取10 mg标准品于50 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配成浓度为0.2 mg/mL的标准储备液。分别吸取待测物标准储备液100 μL于200 mL容量瓶中,用甲醇-0.1%甲酸水液(1:9, V:V)定容,配制成100 ng/mL的混合标准工作液。用甲醇-0.1%甲酸水溶液稀释标准溶液至10 ng/mL,为内标标准工作溶液。

2.3.2 样品的前处理

样品的前处理依据前人研究并做一定修改^[15]。冷冻奶样先在37℃水浴中解冻,然后准确称取2 g牛乳样品于50 mL离心管,加入50 μL内标。加入10 mL浓磷酸和4 mL乙腈,用小型涡旋机振荡1 min后,放入7000 r/min的离心机中离心3 min,取出样品的上清液加入到离心管中。然后向该离心管中加入5 mL正己烷,振荡1 min后,取出样品静置。再次加入4 mL乙腈到之前的50 mL离心管中,振荡1 min后,放入7000 r/min的离心机中离心3 min,取出上清液并加入离心管。振荡1 min后,上清液用正己烷提取,将合并的下层液体转移到蒸发瓶中,在50℃恒温水浴

箱中以 100 r/min 的速度真空旋转至仅剩余不易蒸干的黄色油滴, 用 1 mL 流动相(甲醇:0.1%甲酸溶液=1:9, V:V)溶解残留物, 经超声波仪超声 1 min 后, 用滤膜过滤至色谱进样瓶中, 上机检测。

2.3.3 检测条件

采用 ACQITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱, 流动相为甲醇 (A)和 0.1%的甲酸及 2 mmol/L 甲酸胺的水溶液(B) 作为流动相进行梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1。

色谱条件: 流动相流速 0.20 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样体积 10 μL。

质谱条件: 电离源(electronic spray ion, ESI⁺); 喷雾电压为 5500 V; 离子源温度为 450 ℃; 喷射气流流量为 50 psi; 辅助气流流量为 60 psi。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 The gradient elution procedure

时间(min)	流速(mL/min)	A(%)	B(%)
0.0	0.2	10	90
3.0	0.2	90	10
11.0	0.2	90	10
11.5	0.2	10	90
18.00	0.2	10	90

2.3.4 检测限、回收率及精密度试验

将标准品配制浓度为 0、10、25、50、100、300 μg/L 的溶液, 上机检测并建立标准曲线, 确定抗生素的检测限。对 10、50、100 μg/L 3 个浓度进行回收率试验, 计算回收率。对同一样品重复测定 6 次, 计算方法的准确性。

采用机器自带软件 MultiQuant 3.0 进行处理, 同时分析仪器的检测限和回收率等指标。

3 结果与分析

3.1 喹诺酮标准品

19 种喹诺酮类抗生素的保留时间、质谱信息及标准图

谱见表 2 和图 1。根据测定结果可知 19 种喹诺酮类抗生素的液相出峰时间在 5.77~7.07 min, 样品的分离效果良好, 可用于标准品及样品的分析测定。

表 2 19 种喹诺酮类抗生素标准品保留时间和质谱信息
Table 2 Retention time and mass fragment ions of 19 kinds of QNs

抗生素	保留时间 (min)	离子对 (m/z)	去簇电压 (V)	碰撞能 (v)
吡哌酸	5.77	304.0/286.0	80	24
马波沙星	5.85	363.2/320.0	80	25
氟罗沙星	5.89	370.4/326.4	80	30
氧氟沙星	5.95	362.4/261.3	80	40
培氟沙星	5.95	334.1/316.1	80	27
依诺沙星	5.96	321.1/303.4	80	35
诺氟沙星	6.01	320.4/233.2	80	30
环丙沙星	6.05	332.4/288.3	80	25
达氟沙星	6.05	358.3/340.3	80	30
恩诺沙星	6.06	360.6/316.4	80	33
洛美沙星	6.12	352.3/265.4	80	40
奥比沙星	6.13	396.3/352.3	80	2
双氟沙星	6.16	400.4/356.2	80	28
沙拉沙星	6.21	386.4/342.3	80	43
司帕沙星	6.33	393.3/349.4	80	30
西诺沙星	6.60	263.1/217.1	80	22
恶喹酸	6.70	262.3/244.2	80	30
萘啶酸	7.02	233.3/215.2	80	24
氟甲喹	7.07	262.3/244.3	80	30

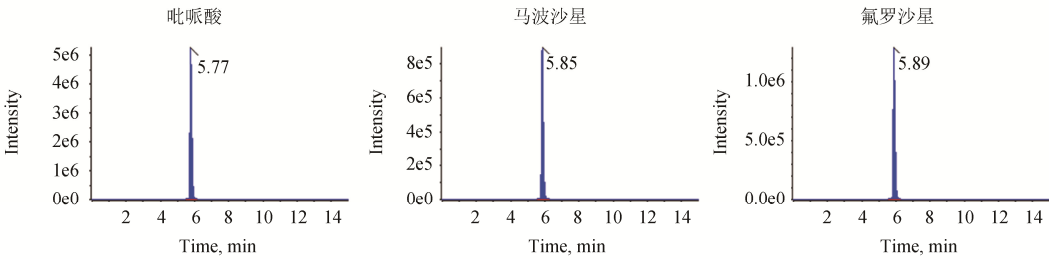
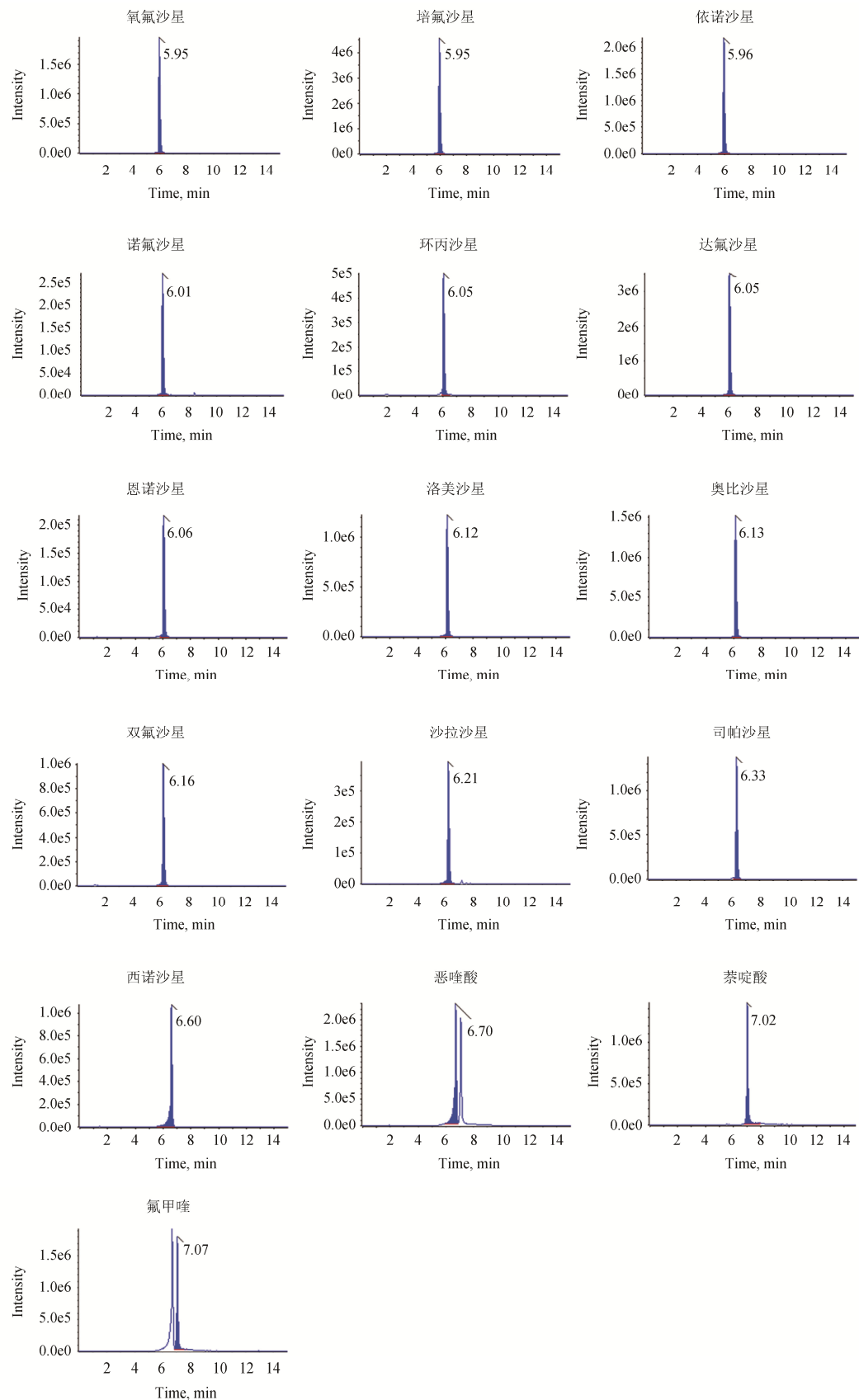


图 1 19 种喹诺酮标准品的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of 19 kinds of QNs



续图 1 19 种喹诺酮标准品的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of 19 kinds of QNs

3.2 回收率、检出限和精密度

喹诺酮类抗生素采用高效液相色谱-串联质谱法检测的相关性、回收率、检出限及精确度等数据见表 3。由表 3 可知, 19 种兽药均有良好的线性关系, 相关系数(r^2)为 0.993~0.999, 方法的检出限为 0.05~0.25 $\mu\text{g/L}$, 研究结果与国外研究结果^[16,17]类似, 他们采用超高效液相色谱-质谱法的方法检测, 检出限在 0.3~2.0 ng/g 。各种喹诺酮类抗生素的回收率在 88.2%~109.2%, 符合欧盟及我国兽药残留检测标准中平均回收率在 70%~120%的要求, Noemí 等^[16]测定的回收率在 96%~104.5%, 略高于本方法。样品的精密度试验结果发现 6 次检测后结果的相关标准偏差 $\leq 6.1\%$, 说明液相串联质谱法检测重复性好、准确性高。上述检测结果表明采用高效液相色谱-三重四级杆质谱检测方法准确可靠, 可用于乳制品中喹诺酮类抗生素残留的检测。

表 3 高效液相色谱串联质谱法测定喹诺酮类抗生素的回收率、检出限及精确度

Table 3 The recovery rate, LOD and precision of quinolone residues determined by HPLC-MS/MS				
抗生素	相关性(%)	回收率(%)	检测限($\mu\text{g/L}$)	精密度(%, RSD)
吡哌酸	0.998	95.1~104.6	0.05	3.5
马波沙星	0.993	93.7~101.5	0.09	2.8
氟罗沙星	0.997	90.8~103.7	0.10	3.9
氧氟沙星	0.998	91.1~105.7	0.05	4.5
培氟沙星	0.999	91.5~99.9	0.05	5.4
依诺沙星	0.997	91.8~105.4	0.10	3.7
诺氟沙星	0.998	96.4~107.8	0.15	2.9
环丙沙星	0.998	91.5~102.7	0.11	3.3
恩诺沙星	0.999	90.1~100.3	0.05	3.8
洛美沙星	0.995	89.4~99.6	0.10	2.5
达氟沙星	0.997	88.2~99.8	0.05	4.9
奥比沙星	0.999	95.2~109.2	0.05	5.2
双氟沙星	0.994	90.3~101.7	0.15	3.4
沙拉沙星	0.997	94.3~105.4	0.15	5.6
司帕沙星	0.998	90.9~102.3	0.05	4.4
西诺沙星	0.999	90.0~100.1	0.05	6.1
恶喹酸	0.996	94.4~108.7	0.25	3.9
萘啶酸	0.997	91.1~99.8	0.10	2.8
氟甲喹	0.998	92.7~98.9	0.05	2.9

3.3 原料牛乳和水牛乳中喹诺酮含量

南方地区 15 个荷斯坦牧场和 15 个水牛乳牧场不同时间采集的 120 个的样品中喹诺酮类抗生素检测结果见表 4。由表 4 可知, 有 9 个样品检出抗生素, 其中水牛乳样品 5 个(检出率 8.06%), 荷斯坦乳样品 4 个(检出率 6.89%)。检测出的抗生素种类包括氟甲喹、诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星和恶喹酸, 浓度范围在 0.06~1.02 $\mu\text{g/L}$ 。

表 4 原料乳中喹诺酮检测结果
Table 4 Results of quinolone in raw milk

抗生素	检出率	浓度 $\mu\text{g/L}$	品种
氧氟沙星	3/62	0.06~1.02	水牛
诺氟沙星	2/62	0.14~0.51	水牛
环丙沙星	4/62	0.25~0.87	水牛
洛美沙星	2/62	0.29~0.55	水牛
氟甲喹	1/62	0.06	水牛
氟罗沙星	3/58	0.16~0.62	荷斯坦
恩诺沙星	2/58	0.25~0.89	荷斯坦
恶喹酸	3/58	0.11~0.35	荷斯坦
氟甲喹	2/58	0.06~0.13	荷斯坦

Noemí 等^[16]对西班牙 28 个牧场的原料乳进行检测, 共有 5 个牧场发现喹诺酮类抗生素, 范围在 0.2~0.6 ng/g 。Chung 等^[4]对 269 个牛乳和羊乳产品进行检测, 结果有 4 个样品检出喹诺酮。闫正等^[18]采用超快速液相-质谱法测定 30 个液态乳和乳粉中喹诺酮残留, 发现其残留量均低于 0.05 $\mu\text{g/L}$ 。根据国内外关于喹诺酮类抗生素的测定结果可知, 目前我国原料乳中喹诺酮类抗生素残留总体情况良好, 样品的检出率和残留浓度均在可控范围内。

4 结 论

本研究采用高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定了浙江和广西等地荷斯坦及水牛原料乳中 19 种喹诺酮类抗生素残留情况。此方法的检出限为 0.05~0.25 $\mu\text{g/L}$, 回收率为 88.2%~109.7%, 检测相对标准偏差 $\leq 6.1\%$ 。对采集的 120 个原料乳样品检测发现, 样品中水牛乳检出率为 8.06%, 浓度在 0.06~1.02 $\mu\text{g/L}$; 荷斯坦牛乳的检出率为 6.89%, 浓度在 0.06~0.89 $\mu\text{g/L}$ 。结果表明高效液相色谱-三重四级杆质谱法是检测水牛和荷斯坦乳中抗生素残留准确、可靠的方法。我国南方地区的荷斯坦和水牛原料乳中抗生素残留情况总体良好。

参考文献

[1] Jiang W, Beier RC, Wang Z, et al. Simultaneous screening analysis of 3-methyl-quinoxaline-2- carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic

- acid residues in edible animal tissues by a competitive indirect immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(42): 10018–10025.
- [2] Wang J, Leung D, Lenz SP. Determination of five macrolide antibiotic residues in raw milk using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54, 2873–2880.
- [3] Choma I, Grenda D, Malinowska I, *et al.* Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 734: 7–14.
- [4] Chung H, Lee J, Chung Y, *et al.* Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2009, 113: 297–301.
- [5] Cho BH, Kim BH, Sohn SW, *et al.* Development of modified 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) reduction test for the detection of sulfonamide residues in raw milk [J]. *Korean J Vet Public Health*, 1993, 17(1): 77–86.
- [6] Vidal JL, Aguilera MM, Romerogonzález R, *et al.* Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(5): 1760–1767.
- [7] Hu W, Xin L, He G, *et al.* Sensitive competitive immunoassay of multiple mycotoxins with non-fouling antigen microarray [J]. *Bios Bioelect*, 2013, 50(24): 338–344.
- [8] Ediage EN, Mavungu JDD, Goryacheva IY, *et al.* Multiplex flow-through immunoassay formats for screening of mycotoxins in a variety of food matrices [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2012, 403(1): 265–278.
- [9] Ma X, Truong PL, Anh NH, *et al.* Single gold nanoplasmonic sensor for clinical cancer diagnosis based on specific interaction between nucleic acids and protein [J]. *Bios Bioelect*, 2014, 67(8): 59–65.
- [10] 王鑫, 车振明. 市售纯牛奶中抗生素残留的检测 [J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(8): 144–146.
- Wang X, Che ZM, Huang TR. Assay on residue of antibiotics in pure milk from market [J]. *Food Res Dev*, 2009, 30(8): 144–146.
- [11] 饶勇, 曾振灵, 杨桂香, 等. 液相色谱-质谱联用检测牛奶中氟喹诺酮类药物残留的验证方法 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(5): 1033.
- Rao Y, Zeng ZL, Yang GX *et al.* Confirmation of Fluoroquinolone Residues in Milk by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry [J]. *Sci Agric Sin*, 2007, 40(5): 1033–1041.
- [12] Antonio H, Javier H, Miguel R, *et al.* Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(42): 7608–7614.
- [13] 李洪忠, 蔡生胜. 鲜牛奶中抗生素残留的检测 [J]. *中国牛业科学*, 2008, 34(2): 26–27.
- Li HZ, Cai SS. The detection of residues of antibiotics in cow's milk [J]. *China Cattle Sci*, 2008, 34(2): 26–27.
- [14] 李书云, 蒙超林, 全宏怀. 柳州市猪肉、鸡肉和牛奶的抗生素残留的调查报告 [J]. *广西畜牧兽医*, 2001, 17(6): 12–14.
- Li SY, Meng CL, Quan HH. The investigation report of antibiotic residues in pork, chicken and milk in Liu Zhou market [J]. *Guangxi J Anim Husb Vet Med*, 2001, 17(6): 12–14.
- [15] Cho HJ, Yi H, Cho SM, *et al.* Single-step extraction followed by LC for determination of (fluoro) quinolone drug residues in muscle, eggs, and milk [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(8): 1034–1043.
- [16] Noemi D, Alexandra Z, Alberto, *et al.* Simultaneous determination of quinolone and beta-lactam residues in raw cow milk samples using ultrasound-assisted extraction and dispersive-SPE prior to UHPLC-MS/MS analysis [J]. *Food Control*, 2016, 60: 382–393.
- [17] Jiang W, Beloglazova N, Wang Z, *et al.* Development of a multiplex flow-through immunoaffinity chromatography test for the on-site screening of 14 sulfonamide and 13 quinolone residues in milk [J]. *Bios Bioelect*, 2015, 66: 124–128.
- [18] 闫正, 任孟伟, 张丽冰, 等. 超快速液相-质谱法同时测定液体奶和奶粉中磺胺和喹诺酮类药物残留 [J]. *化学分析计量*, 2016, 25(1): 5–9.
- Yan Z, Ren MW, Zhang LB, *et al.* Simultaneous analysis of sulfonamides and quinolones in milk and milk powder by UFLC-MS/MS [J]. *Chem Anal Meter*, 2016, 25(1): 5–9.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



肖英平, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为畜产品质量安全。
E-mail: ypxiaoju@126.com



杨 华, 高级畜牧师, 副院长, 主要研究方向为畜产品质量安全。
E-mail: yanghua806@hotmail.com



任大喜, 博士, 副教授, 博士生导师, 主要研究方向为营养与乳制品加工。
E-mail: dxren@zju.edu.cn