

QuEChERS-高效液相色谱法检测不同畜禽产品中 5 种氟喹诺酮类的药物残留

梁海斌*

(三门峡市食品药品检验检测中心, 三门峡 472000)

摘 要: 目的 建立 QuEChERS 法检测多种畜禽产品中 5 种氟喹诺酮类药物残留。**方法** 采用酸化的乙腈溶液提取猪、牛、羊、鸡和鸭等畜禽的肌肉、皮脂、脂肪、肝和肾组织中氟喹诺酮类残留, 用微型高速分散机在离心管内同时完成均质与提取, 采用增强型脂质去除过滤柱对提取物进行 2 次洗脱, 用高效液相色谱-可变波长荧光检测器法检测。**结果** 达氟沙星和恩诺沙星的线性范围为 5~500 $\mu\text{g/L}$, 沙拉沙星的线性范围为 2.5~100.0 $\mu\text{g/L}$, 二氟沙星的线性范围为 10~2000 $\mu\text{g/L}$, 氟甲喹的线性范围为 10~3000 $\mu\text{g/L}$; 检出限为 2~10 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 5~25 $\mu\text{g/kg}$ 。畜禽产品基质中各药物的空白样品加标回收率均为 76.09%~93.20%, RSDs 为 2.98%~6.29%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合测定猪、牛、羊、鸡和鸭的肌肉、脂肪(皮脂)、肾和肝中沙拉沙星、恩诺沙星、达氟沙星、二氟沙星和氟甲喹药物残留。

关键词: QuEChERS; 畜禽产品; 氟喹诺酮类药物

Determination of 5 fluoroquinolones residues in different livestock and poultry products by QuEChERS-high performance liquid chromatography

LIANG Hai-Bin*

(Sanmenxia Food and Drug Inspection and Testing Center, Sanmenxia 472000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 5 fluoroquinolones residues in various livestock and poultry products by QuEChERS method. **Methods** Fluoroquinolones were extracted from the muscle, sebum, fat, liver and kidney tissues of pigs, cattle, sheep, chickens and ducks by acidified acetonitrile solution. Homogenization and extraction were performed simultaneously in a centrifuge tube with a micro high speed dispersing machine. The extract was eluted twice with an enhanced lipid removal filter column and detected by high performance liquid chromatogram-variable wavelength fluorescence detector. **Results** The linear ranges of dafloxacin and enrofloxacin were 5–500 $\mu\text{g/L}$, the linear range of sarafloxacin was 2.5–100.0 $\mu\text{g/L}$, the linear range of difloxacin was 10–2000 $\mu\text{g/L}$, and the linear range of flumequine was 10–3000 $\mu\text{g/L}$. The limits of detection were 2–10 $\mu\text{g/kg}$, and the limits of quantitation were 5–25 $\mu\text{g/kg}$. The standard recoveries of blank samples and RSDs were 76.09%–93.20% and 2.98%–6.29%, respectively. **Conclusion** This method is rapid, accurate and sensitive, which is suitable for the determination of sarafloxacin, enrofloxacin, dafloxacin, difloxacin and flumequine drug residues in muscle, fat (sebum), kidney and liver of pig, ox, sheep, chicken and duck.

*通信作者: 梁海斌, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 27949545@qq.com

*Corresponding author: LIANG Hai-Bin, Master, Senior Engineer, Sanmenxia Food and Drug Inspection and Testing Center, Sanmen Xia 472000, China. E-mail: 27949545@qq.com

KEY WORDS: QuEChERS; livestock and poultry products; fluoroquinolones

0 引 言

畜禽产品中氟喹诺类抗菌药残留是国家食品安全抽检及食用农产品安全监控的重点,国家制定了严格的法律法规^[1-5]。目前动物源性食品中喹诺酮类残留检测技术难点主要集中在复杂基质中残留物提取、净化和浓缩方法的研究,准确、绿色、快速和高通量是发展的方向,主要前处理技术有溶剂提取法(solvent extraction, SE)、加速溶剂萃取法(accelerated solvent extraction, ASE)、固相萃取法(solid phase extraction, SPE)、固相微萃取法(solid phase microextraction, SPME)和基质分散固相萃取法(matrix solid-phase dispersion, MSPD)等,快速、简便、低廉、有效和安全的方法(QuEChERS)具有省时省力、分离高效、准确可靠,有着广阔的发展前景^[6-9]。农业部 1025 号公告-14-2008^[10]提取过程复杂、待测目标物易损失,GB/T 21312-2007《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》^[11]检测成本高、周期长。水产品中氟喹诺酮残留的液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS-MS)研究、鸡蛋中 6 种氟喹诺酮残留高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)研究、胶体金免疫层析法快速测定牛奶中氟喹诺类残留,都因畜禽产品的基体效应不同,检测效果均不理想^[12-14]。为了满足应急检验需求,本研究建立 QuEChERS 法检测多种畜禽产品中氟喹诺酮类多残留方法,以期减少食品安全问题发生。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); ULTRA-TURRAX T25 高速分散机(德国 IKA 集团); Allegra 64 高速冷冻离心机(美国 BECKMAN COULTER 公司); BYDCY-24SL 氮气吹扫仪(上海秉越电子仪器有限公司)。

拉沙星、诺沙星、二氟沙星、氟沙星、氟甲喹标准品(纯度≥99.6%,中国兽药监察所);乙腈(色谱纯,德国默克集团);Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱(6 mL, 600 mg, 美国安捷伦科技有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备

取猪、牛、羊、鸡、鸭的肌肉、脂肪、肝和肾,顺着组织纹理,剔除结蹄组织、筋和基膜等杂物,用滚筒挤压式绞肉机将样品绞碎后,用做待测试样。取不含氟喹诺酮类残留的试样为空白试样。往空白试样中加入适量的氟喹诺酮标准工作液,在室温下,静置 20 min,使

氟喹诺酮类标准工作液充分渗入样品基质中,制成空白基质加标试样。将处理好的试样装入做好标记的真空包装袋内,抽气密封,保存于-20℃下。

1.2.2 提取与净化

精确称取 2 g 畜禽的肌肉或脂肪试料,置入 50 mL 聚丙烯离心管中,将 10 mL 0.1 mol/L EDTA-2Na 溶液加入离心管中,用高速分散机处理 2 min,后在 4℃下,以 10000 r/min 的转速离心 5 min,取上清液待用。往样品残渣中分别加入 5 mL 2%甲酸-乙腈溶液和 5 mL 2%二甲基亚砷溶液,振摇 3 min,后在 4℃下以 10000 r/min 离心 5 min,合并 2 次上清液,涡旋混合 3 min,备用。

精确称取 1 g 绞碎的畜禽的肝或肾试料,置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入 10 mL 5%甲酸的乙腈溶液,用高速分散机处理 2 min,然后在 4℃下,以 15000 r/min 的转速离心 10 min,取上清液待用。样品残渣中分别加入 5 mL 2%甲酸的乙腈溶液和 5 mL 2%二甲基亚砷溶液,振摇 3 min,后在 4℃下,以 15000 r/min 的转速离心 10 min,合并 2 次上清液,涡旋混合 3 min,备用。

准确量取 5 mL 提取后的上清液,转移至 Agilent Captiva EMR-Lipid 6 mL 过滤柱中,并在重力作用下洗脱。将 3 mL 乙腈/柠檬酸-乙酸铵缓冲溶液(80:20, V:V)加入 EMR-Lipid 过滤柱中进行二次洗脱。逐渐在负压下,将过滤柱中液体排除,使过滤柱中无可见残留物,收集洗脱液。将洗脱液在 40℃下用氮气吹干。残留物用 1 mL 乙腈/柠檬酸-乙酸铵缓冲溶液(80:20, V:V)复溶,用 0.2 μm 的聚偏二氟乙稀过滤头过滤后,置于自动进样瓶中,供 HPLC 测定。

1.2.3 标准曲线的建立

准确称取适量沙拉沙星、恩诺沙星、二氟沙星、达氟沙星和氟甲喹标准工作溶液,用乙腈/柠檬酸-乙酸铵缓冲溶液(80:20, V:V)稀释成混合标准溶液,配置成适当的标准系列。准确称取 2 g 空白试样,分别加入 1 mL 系列混合标准溶液,按 1.2.2 操作后,供 HPLC 测定。

1.2.4 色谱条件

色谱柱:Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×100 mm, 4.0 μm);流动相:乙腈/柠檬酸-乙酸铵缓冲溶液(80:20, V:V);流速:2 mL/min;柱温:50℃;进样体积:10 μL;荧光检测器的检测波长^[14],见表 1。

表 1 荧光检测器的检测波长
Table 1 Detection wavelengths of fluorescence detector

时间/min	激发波长/nm	发射波长/nm
0	278	465
9.5	312	366
15	278	366

1.3 测定指标

1.3.1 线性范围

恩诺沙星和达氟沙星质量浓度分别为 5、25、50、100、200、400、500 $\mu\text{g/L}$ ，沙拉沙星质量浓度为 2.5、5.0、10.0、20.0、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g/L}$ ，二氟沙星质量浓度为 10、50、250、500、1000、1500、2000 $\mu\text{g/L}$ ，氟甲喹质量浓度为 10、50、250、500、750、1500、3000 $\mu\text{g/L}$ 。按 1.2.4 设定色谱条件，对每个校正点重复测定 3 次。以浓度值为横坐标，峰面积为纵坐标，分别建立 5 种氟喹诺酮类标准曲线，求得线性回归方程，计算线性范围。

1.3.2 检出限与定量限

考虑到仪器的背景噪音，采用基线噪音分析方法，把已知低浓度试样测出的信号与噪声信号进行比较，以信噪比 3:1 时相应的浓度确定为检出限，以信噪比 10:1 时相应的浓度确定定量限^[15]。

1.3.3 准确度与精密度

分别在空白试样中加入氟喹诺酮标准工作液，在重复性测定条件下对每个添加浓度测定 6 次，计算回收率和 RSD。回收率/%=(实际浓度/待测浓度) $\times$ 100%。

1.4 数据处理

取空白基质加标试样溶液，做不少于 7 点校正，以外标法定量，用峰面积计算。待测试样、空白试样和空

白基质加标试样按以上相同方法测定。

2 结果与分析

2.1 色谱图

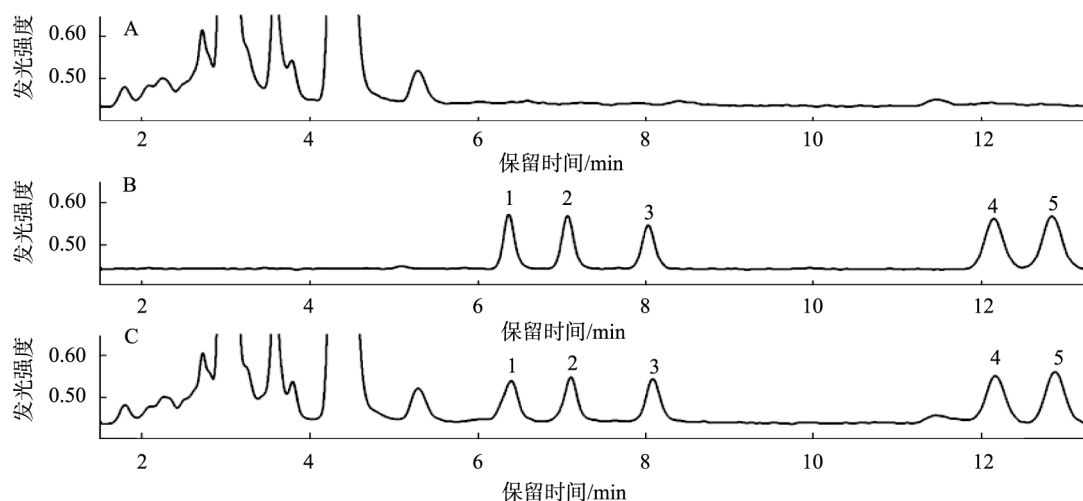
液相色谱图见图 1，理论塔板数高于 6000，待测物质色谱峰与相邻色谱峰之间的分离度大于 1.5，信噪比大于 10，拖尾因子在 0.95~1.05 之间，峰面积测量值的相对标准偏差不大于 2.0%。

2.2 标准曲线和线性范围

5 种氟喹诺酮类在规定的浓度范围内线性相关性良好，相关系数均大于 0.99，沙拉沙星的线性范围为 2.5~100.0 $\mu\text{g/L}$ ，恩诺沙星和达氟沙星的线性范围为 5~500 $\mu\text{g/L}$ ，二氟沙星的方法线性范围为 10~2000 $\mu\text{g/L}$ ，氟甲喹的线性范围为 10~3000 $\mu\text{g/L}$ ，线性范围分别覆盖 5 种氟喹诺酮类的定量限、1/2 最大残留限量(maximum residue limit, MRL)、MRL 和 2MRL，见表 2。

2.3 检出限与定量限

采用高速分散机、两步萃取方案及增强型脂质去除过滤柱进行 2 次洗脱，大大提高了疏水性化合物的溶剂可萃取性和蛋白质去除效率，待测目标物的分离效能得到提高并减少了损失，检出限和定量限与 HPLC-MS-MS 法无明显差异，与液相色谱法相比降低了 50%，结果如表 3 所示。



注: A 空白鸡肝样品; B 标准品; C 空白鸡肝加标样品 1. 氟甲喹; 2. 达氟沙星; 3. 恩诺沙星; 4. 沙拉沙星; 5. 二氟沙星。

图1 液相色谱图

Fig.1 Liquid chromatogram

表 2 氟喹诺酮类残留的回归方程及相关系数
Table 2 Regression equations and correlation coefficients of fluoroquinolones residues

氟喹诺酮类残留	回归方程	相关系数
沙拉沙星	$Y=0.2398X+1.4082$	0.999
恩诺沙星	$Y=1.7497X+4.9774$	0.997
二氟沙星	$Y=0.3844X+13.044$	0.990
达氟沙星	$Y=0.7281X+6.62$	0.999
氟甲喹	$Y=0.081X+9.5606$	0.995

表 3 氟喹诺酮类残留的检出限和定量限
Table 3 Limits of detection and limits of quantitative of fluoroquinolone residues

氟喹诺酮类残留	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
沙拉沙星	2	5
恩诺沙星	10	20
二氟沙星	10	20
达氟沙星	5	15
氟甲喹	10	25

2.4 准确度和精密度

恩诺沙星、达氟沙星在 50~500 $\mu\text{g/kg}$ 、氟甲喹在 25~3000 $\mu\text{g/kg}$ 、二氟沙星在 50~2000 $\mu\text{g/kg}$ 、沙拉沙星在 10~200 $\mu\text{g/kg}$ 的添加浓度水平下, 畜禽产品基质中各药物的空白样品加标回收率在 76.09%~93.20% 范围内, RSDs 在 2.98%~6.29% 范围内, 如表 4 所示。

表 4 氟喹诺酮类残留的空白样品加标回收率和 RSD 值($n=6$)
Table 4 Standard recoveries and RSDs values of blank sample with fluoroquinolones residues ($n=6$)

氟喹诺酮类残留 RSD($n=6$)	添加水平/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	RSD/%
沙拉沙星	10	77.63	5.74
	50	83.21	6.07
	200	87.90	5.00
恩诺沙星	50	76.09	5.13
	100	85.69	3.68
	500	90.63	6.29
二氟沙星	50	79.67	3.86
	200	88.26	6.12
	2000	93.00	3.95
达氟沙星	50	80.76	2.98
	200	84.75	3.50
	500	91.08	3.24
氟甲喹	25	78.04	4.73
	100	84.14	2.98
	3000	93.20	4.00

3 结 论

通过样品前处理的改进, 根据待测目标物的性质选择合适的色谱柱和高选择性检测器, 并确定最佳检测波长或最佳激发波长或最佳发射波长。同时, 对流动相种类、配比、流速及柱温等条件进行优化。方法确认结果表明, 线性范围、检出限、回收率和精密度均优于 HPLC 法(农业部 1025 号公告-14-2008^[10]), 10 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平回收率提高了 30%, 同时检测时间缩短了 30%; 该方法准确度与 HPLC-MS-MS 法一致, 检出限与 HPLC-MS-MS 法(GB/T 21312-2007^[11])和 HPLC 法(1025 号公告-14-2008^[10])相比, 下降了 50%。

参考文献

[1] 中华人民共和国农业农村部公告 第 362 号[EB/OL]. [2020-11-19]. [http: //www. moa. gov. cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357042. htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357042.htm).
Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, PRCNo. 362. [EB/OL]. [2020-11-19]. [http: //www. moa. gov. cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357042. htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357042.htm).

[2] 中华人民共和国农业农村部公告 第 363 号[EB/OL]. [2020-11-19]. [http: //www. moa. gov. cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357041. ht-m](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357041.htm).
Announcement of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, PRCNo. 363 [EB/OL]. [2020-11-19]. [http: //www. moa. gov. cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357041. htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/xmsyj/202011/t20201126_6357041.htm).

[3] 中华人民共和国食品安全法实施条例[EB/OL]. [2019-10-01]. [http: //scjg. henan. gov. cn/2020/01-14/1248698. html](http://scjg.henan.gov.cn/2020/01-14/1248698.html).
Egulations for the implementation of the food safety law of the people's republic of China [EB/OL]. [2019-10-01]. [http: //scjg. henan. gov. cn/2020/01-14/1248698. html](http://scjg.henan.gov.cn/2020/01-14/1248698.html).

[4] 国家食品安全监督抽检实施细则(2020 年版)[Z].
Implementation rules for sampling inspection of national food safety supervision (2020 version) [Z].

[5] GB 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药残留最大限量[S].
GB 31650—2019 National food safety standard-Maximum veterinary drug residue in food [S].

[6] DB 45/T 1488—2017 动物源性食品中兽药残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S].
DB 45/T 1488—2017 Determination of veterinary drug residues in animal-Derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].

[7] RODRIGUEZ E, MORENO-BONDI MC, MARAZUELA MD. Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to liquid chromatography with fluorescence detection for the determination of fluoroquinolone residues in powdered infant formulae [J]. J Chromatogr A, 2008, 1209(1): 136-134.

[8] RODRIGUEZ E, MORENO-BONDI MC, MARAZUELA MD. Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography [J]. Food Chem, 2011, 127(3): 1354-1360.

[9] MANIMEKALAI M, ASHISH R, ANIMESH SS, et al. Development, optimization, and validation of methods for quantification of veterinary drug residues in complex food matrices using liquid chromatography-A

- review [J]. Food Anal Method, 2019, 12(8): 1823–1837.
- [10] 农业部 1025 号公告–14–2008 动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测高效液相色谱法[S].
Ministry of Agriculture No. 1025–14–2008 Detection of fluoroquinolones residue in animal food by high performance liquid chromatography [S].
- [11] GB/T 2132–2007 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[S].
GB/T 2132–2007 Methods for detection of 14 quinolone residues in animal-Derived foods LC–MS–MS [S].
- [12] TIELE M, RIZZETTI, MAIARA P, *et al.* Optimization of sample preparation by central composite design for multi-class determination of veterinary drugs in bovine muscle, kidney and liver by ultra-high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2018, 246(4): 404–413.
- [13] ANDRZEJ P, JAN Z, STANISLAW S. Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues [J]. J Chromatogr A, 2017, 914(1): 89–94.
- [14] KHALED A, SINGH V, PAWLISZYN J. Comparison of solid-phase microextraction to solvent extraction and QuEChERS for quantitative analysis of veterinary drug residues in chicken and beef matrices [J]. J Agric Food Chem, 2019, (8): 228–233.
- [15] GB/T 27417–2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].
GB/T 27417–2017 Conformity assessment guidelines for validation and verification of chemical analysis methods [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



梁海斌, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 27949545@qq.com

“食品保鲜与贮藏”专题征稿函

随着生活水平的逐渐提高, 人们对食品的质量有了更高的要求。因此, 保鲜技术被广泛应用于食品的加工流通过程中。如何保持食品的新鲜度以及食品在储藏过程中的安全性成为目前研究的重点。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品保鲜与贮藏”专题, 由浙江大学 罗自生 教授 担任专题主编, 主要围绕 (1)果蔬、粮食、水产品、禽肉制品等食品保鲜方法、技术; (2)食品在储藏中的生理、生化变化; (3)食品腐败以及控制方法等或您认为有意义的领域展开讨论, 计划在 2021 年 6 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编国家风险评估 吴永宁 研究员 及浙江大学 罗自生教授 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 2021 年 3 月 19 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式(注明专题): 食品保鲜与贮藏

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部