

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定淡水鱼和淡水虾中的 11 种喹诺酮类兽药残留量

魏玉霞*, 王 芳, 左 郡, 王建国, 任武洁, 雷 凯

(北京市通州区疾病预防控制中心, 北京 101100)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定淡水鱼和淡水虾中 11 种喹诺酮类兽药残留的分析方法。**方法** 样品中的喹诺酮残留经酸化乙腈提取, C₁₈ 基质分散固相萃取净化, 超高效液相色谱-串联质谱测定其中 11 种喹诺酮类兽药残留量。**结果** 恶喹酸在 1~50.0 µg/L, 其余 10 种喹诺酮类化合物在 1~100.0 µg/L 范围内线性关系良好, 11 种喹诺酮药物的检出限为 0.5~1.0 µg/kg, 定量限为 1.5~3.0 µg/kg, 精密度 < 12%, 低、中、高 3 个浓度加标回收率为 70.0%~120.1%。**结论** 该方法样品前处理简单、重现性好、灵敏度高, 能满足限量标准的要求, 可用于淡水鱼和淡水虾样品中喹诺酮类药物残留的分析检测。

关键词: 淡水鱼; 淡水虾; 喹诺酮残留; 超高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of 11 quinolone residues in fresh water fish and shrimp by QuEChERS purification coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WEI Yu-Xia*, WANG Fang, ZUO Jun, WANG Jian-Huo, REN Wu-Jie, LEI Kai

(Beijing Tongzhou District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 11 quinolone residues in fresh water fish and shrimp sample by QuEChERS purification combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The target 11 quinolone residues were extracted by acidic acetonitrile and purified by C₁₈ substrate dispersed solid extraction, finally determined by UPLC-MS/MS. **Results** The method showed good linear relationship within the concentration range of 1.0–50.0 µg/L for oxolinic acid and 1–100.0 µg/L for the other 10 quinolones. The recoveries of 11 quinolone residues ranged from 70.0% to 120.1% with the relative standard deviation less than 12%. The limits of detection and quantitation of 11 quinolone residues were in the range of 0.5–1.0 µg/kg and 1.5–3.0 µg/kg, respectively. **Conclusion** This method is simple, reproducible and sensitive, and can meet the requirements of the limit standard. It can be used for the determination of quinolones residues in freshwater fish and shrimp samples.

KEY WORDS: fresh water fish; fresh water shrimp; quinolone residue; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通信作者: 魏玉霞, 博士, 副研究员, 主要研究方向为理化检验。E-mail: wyx1130@163.com

*Corresponding author: WEI Yu-Xia, Ph.D, Associate Professor, Beijing Tongzhou District Center for Disease Control and Prevention, Beijing 101100, China. E-mail: wyx1130@163.com

0 引言

喹诺酮类药物是一类具有1,4-二氢-4-氧代喹啉-3-羧酸结构的化合物,以原核生物DNA螺旋酶和拓扑异构酶IV为靶点,通过与上述2种酶形成稳定的复合物,抑制细菌细胞的生长和分裂^[1],具有抗菌谱广、抗菌力强的特点,被广泛应用于畜牧、水产养殖中进行疾病防治^[2]。喹诺酮化合物残留可通过动物源性食物进入人体,在体内蓄积,从而对人体健康造成危害^[3]。世界各国和组织都制定了多种喹诺酮类抗生素在动物组织中的最高残留量限值^[4-5]。我国GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》^[6]中规定了达氟沙星、二氟沙星、氟甲喹、恶喹酸、恩诺沙星(残留标志物以恩诺沙星和环丙沙星计算)、沙拉沙星等7种喹诺酮类兽药的残留限量,其中鱼(皮+肉)中的限量在30~300 µg/kg之间,虾中暂未规定。

为有效检测动物源性食品中喹诺酮残留,国内外建立了多种喹诺酮类兽药残留的分析检测方法^[7]。其中,样品前处理主要包括有机溶剂提取、脱脂,固相萃取净化等^[8-9],过程复杂,耗时,同时会使用大量的有机溶剂。QuEChERS是由美国化学家LEHOTAY和德国的ANASTASSIADAS于2003年提出的一种快速、简单、便宜、有效、可靠和安全的样品前处理技术^[10],在提取液中直接加入吸附剂粉末进行净化,即分散固相萃取,最初应用于农药残留中,近年来已越来越多的应用于多组分目标化合物的样品前处理。近年来也有将QuEChERS方法应用于喹诺酮类化合物中的报道。曹鹏等^[11]建立了分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时检测火锅食材中的喹诺酮类化合物残留的分析方法。李佩佩等^[12]建立了分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱检测水产品中14种喹诺酮类药物的分析方法,但前处理方法较为繁琐。液质联用技术具有灵敏高效、快速准确和专属性强等优势,在喹诺酮类药物残留分析领域得到广泛应用^[13-15]。本研究选择QuEChERS方法,并进行条件优化建立了简单快速的样品前处理方法,采用液质联用技术进行分析检测,旨在建立内标法同时检测淡水鱼虾中的11种喹诺酮类兽药残留的快速、灵敏、准确的检测方法,并将其用于实际样品检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Waters Acquity UPLC-TQS液相色谱-质谱联用仪(美国Waters公司);低温离心机(德国sigma公司);IKA MS3漩涡混合器(德国IKA公司);Milli-Q超纯水仪(美国

Millipore公司)。

1.2 主要材料与试剂

乙腈、甲醇(色谱纯,美国Thermo Fisher Scientific公司);氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂北京有限公司);甲酸(色谱纯,中国安谱公司);喹诺酮混合标准溶液、诺氟沙星-同位素D₅标准溶液(均为100.0 µg/mL,中国first standard公司);基质分散固相萃取净化管、0.22 µm滤膜(中国迪马公司);Waters ACQUITY HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 µm, 美国Waters公司);水为超纯水(美国Millipore公司)。

样品:市售淡水鱼(含鲤鱼、草鱼、武昌鱼和鲫鱼等)和淡水虾(淡水虾、小龙虾、河虾和白虾等)各25件。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

准确吸取甲醇中喹诺酮混合标准溶液1.00 mL,用乙腈配制为1.0 µg/mL和10.0 µg/mL的混合标准使用液。准确吸取甲醇中诺氟沙星-D₅标准溶液内标溶液1.00 mL,用乙腈配制为10.0 µg/mL和1.0 µg/mL的内标使用液。配制空白基质匹配混合标准系列:11种喹诺酮化合物浓度分别为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 µg/L,内标诺氟沙星-D₅浓度为50.0 µg/L,临用现配。

1.3.2 样品前处理

(1)提取

喹诺酮类化合物属于酸碱两性化合物。它们在中性溶液中主要以3种形式存在:阳离子、两性离子、阴离子,本研究涉及到的目标物中,恶喹酸和氟甲喹呈酸性,其余9种呈两性^[16]。因此,本研究选择含2%甲酸的乙腈溶液作为提取液。同时,在提取过程中加入1.0 g NaCl以便离心时更好地分层。

(2)净化

采用QuEChERS方法进行样品净化时将样品加入基质分散固相萃取管,干扰物保留在固相萃取基质中,上清液过膜后直接上机测定。与传统固相萃取相比,不需要活化、洗脱、浓缩等步骤,操作简单。本研究采用空白基质加标样品比较4种不同的基质分散固相萃取管的净化效果。

(3)样品处理

样品取可食部分,切碎、混匀,准确称取5.00 g样品,置于50 mL具塞离心管中,准确加入10.0 µg/mL内标溶液25 µL,加入5.0 mL 2%甲酸乙腈溶液,1.00 g NaCl于涡旋混匀器上快速混匀1 min。4 °C, 8000 r/min离心10 min。取2 mL上清液,移入净化管。4 °C, 8000 r/min离心10 min,上清液过膜,上机测定。

1.3.3 液相色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY HSS T3 色谱柱, 流动相: A: 0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 乙腈溶液。流速: 0.3 mL/min, 柱温: 40 °C, 进样量: 3 μL。梯度洗脱条件为: 0~1.0 min(90%A), 1.0~8.0 min(90%~0%A), 8.0~10.0 min(0%A), 10.0~10.1 min(0%~90%A)。

1.3.4 质谱条件

模式: 电喷雾离子源正离子(electron spray ionization, ESI+), 喷雾电压: 3 KV, 雾化器温度: 500 °C, 雾化器流速: 1000 L/Hr, 锥孔气流速: 150 L/Hr, 雾化气压力: 7 bar。检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM), 参数见表 1。

表 1 11 种喹诺酮类兽残和内标的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of 11 kinds of quinolones and internal standard

化合物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞电压/V
恶喹酸	262.0>244.1	262.0>244.1	4	23
	262.0>160.1			35
氟甲喹	262.2>244.0	262.2>244.0	40	20
	262.2>202.6			40
诺氟沙星	320.3>276.3	320.3>276.3	50	17
	320.3>302.3			19
诺氟沙星-D ₅	325.2>238.1	325.2>238.1	6	30
	332.2>288.1			18
环丙沙星	332.2>314.1	332.2>288.1	32	23
	334.3>290.3			17
培氟沙星	334.3>233.2	334.3>290.3	38	25
	352.1>265.1			32
洛美沙星	352.1>237.0	352.1>265.1	42	44
	358.3>314.1			18
达氟沙星	358.3>340.3	358.3>314.1	38	25
	360.2>316.4			19
恩诺沙星	360.2>342.3	360.2>316.4	32	23
	362.2>261.1			26
氧氟沙星	362.2>318.3	362.2>261.1	4	18
	386.1>299.1			26
沙拉沙星	386.1>342.3	386.1>299.1	40	18
	400.2>299.1			30
二氟沙星	400.2>256.1	400.2>299.1	44	46

2 结果与分析

2.1 净化条件的选择

11 种化合物和内标中恶喹酸的响应最高, 经不同固相萃取管净化, 响应强度大小为 50 mg PSA+50 mg C₁₈+150 mg MgSO₄>50 mg PSA+150 mg MgSO₄>50 mg C₁₈>50 mg PSA+50 mg C₁₈+50 mg Carb+150 mg MgSO₄。图 1 给出了另外 10 种化合物和内标经 4 种净化基质净化后的响应, 氟甲喹的响应大小顺序为: 50 mg PSA+50 mg C₁₈+150 mg MgSO₄~50 mg PSA+150 mg MgSO₄>C₁₈>50 mg PSA+50 mg C₁₈+50 mg Carb+150 mg MgSO₄。其他 9 种沙星类化合物用 C₁₈ 净化后响应最高。综合化合物响应和净化基质对化合物响应的影响, 本实验选用 C₁₈ 作为净化剂。

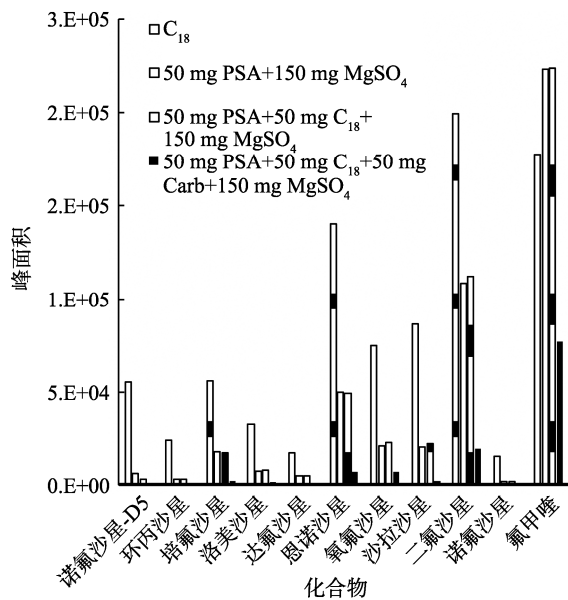


图 1 4 种不同净化条件下目标化合物的响应
Fig.1 Response of target compounds to 4 kinds of different purification conditions

2.2 液质条件的优化

质谱条件优化采用直接进样方式, 取混标溶液(浓度为 100 ng/mL, 分子量接近的目标化合物采用单标溶液)。在正离子模式下得到分子离子峰, 接着进行子离子扫描, 得到碎片离子, 优化锥孔电压, 碰撞电压等参数, 得到最佳的 MRM 参数。参考文献^[8-9], 本研究液相色谱分离中采用乙腈和水(含

0.1%甲酸)作为流动相, 通过优化梯度洗脱, 使得测物得到较好的分离。空白基质加标样品中各化合物的色谱图见图 2。

2.3 线性关系、检出限和定量限

为尽可能地去掉基质干扰, 本研究采用空白基质匹配曲线。恶喹酸和氟甲喹保留时间与内标相差较远, 且这 2 个化合物与内标性质差异较大, 因此这 2 种目标物采用外标法定量, 其余 9 组分为内标法定量。结果见表 2, 表明恶喹酸在 1.0~50.0 μg/L, 其余 10 种化合物在 1.0~100.0 μg/L 范围内, 线性相关系数均大于 0.996, 线性关系良好。

采用加标浓度为 5.0 μg/kg 的空白基质加标样品, 经样品处理, 进行灵敏度测定, 计算得到检出限(limits of detection, LOD, S/N=3)和定量限(limits of quantification, LOQ, S/N=10), 结果表明 11 种喹诺酮兽残的检出限为 0.5~1.0 μg/kg; 定量限为 1.5~3.0 μg/kg, 满足法规对喹诺酮药物残留监测的要求。

2.4 添加回收率与精密度

分别向淡水鱼和淡水虾阴性样品中, 在 5.0、10.0、20.0 μg/kg 的条件下进行加标实验, 制备 6 个平行样品, 计算回收率和精密度(n=6)。结果见表 3, 淡水鱼样品中回收率在 70.0%~120.1%之间, 精密度在 4.7%~12%之间, 淡水虾样品中回收率在 71.0%~115.8%之间, 精密度在 5.9%~12%之间, 方法准确度和精密度满足要求。

2.5 实际样品检测

将本方法应用于 50 件市售淡水鱼和淡水虾样品的检测, 25 件淡水虾样品中 11 种喹诺酮均为阴性。25 件淡水鱼样品中, 17 件样品检出恩诺沙星, 检出浓度在 2.2~74.8 μg/kg 之间, 同时有 3 件样品检出环丙沙星, 检出浓度在 1.5~9.5 μg/kg 之间, 均符合 GB 31650—2019 规定的限量要求, 其余组分未检出。

3 结 论

本研究建立了同时测定淡水鱼和淡水虾中的 11 种喹诺酮类兽药残留量的液相色谱-串联质谱分析测定方法。试样用酸性乙腈提取, C₁₈ 基质分散固相萃取净化, UPLC-MS/MS 分析检测, 基质匹配内标法定量。该方法简单快速、灵敏度高、回收率高, 重现性好, 为淡水鱼和淡水虾中喹诺酮类化合物的检测提供了可靠的前处理方法和检测方法。

表 2 11 种喹诺酮的线性方程、相关系数、检出限和定量限
Table 2 Standard curve, correlation coefficient, limits of detection and limits of quantification of 11 quinolones

化合物	保留时间/min	线性方程	相关系数 r	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
恶喹酸	3.94	Y=168759X+28108.1	0.996	0.5	1.5
氟甲喹	4.55	Y=51690.3X+5553.37	0.999	0.55	1.5
诺氟沙星	2.90	Y=0.0332362X-0.02137	0.998	1.0	3.0

表 2(续)

化合物	保留时间/min	线性方程	相关系数 r	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
环丙沙星	2.94	$Y=0.0534554X-0.01516$	0.999	1.0	3.0
培氟沙星	2.92	$Y=0.188755X-0.03385$	0.999	1.0	3.0
洛美沙星	3.01	$Y=0.0643464X-0.02593$	0.998	1.0	3.0
达氟沙星	2.99	$Y=0.0423755X-0.03428$	0.998	1.0	3.0
恩诺沙星	3.06	$Y=0.286548X-0.12638$	0.998	1.0	3.0
氧氟沙星	2.91	$Y=0.219256X-0.03368$	0.999	1.0	3.0
沙拉沙星	3.21	$Y=0.129599X-0.07203$	0.998	1.0	3.0
二氟沙星	3.25	$Y=0.283839X-0.17358$	0.998	1.0	3.0

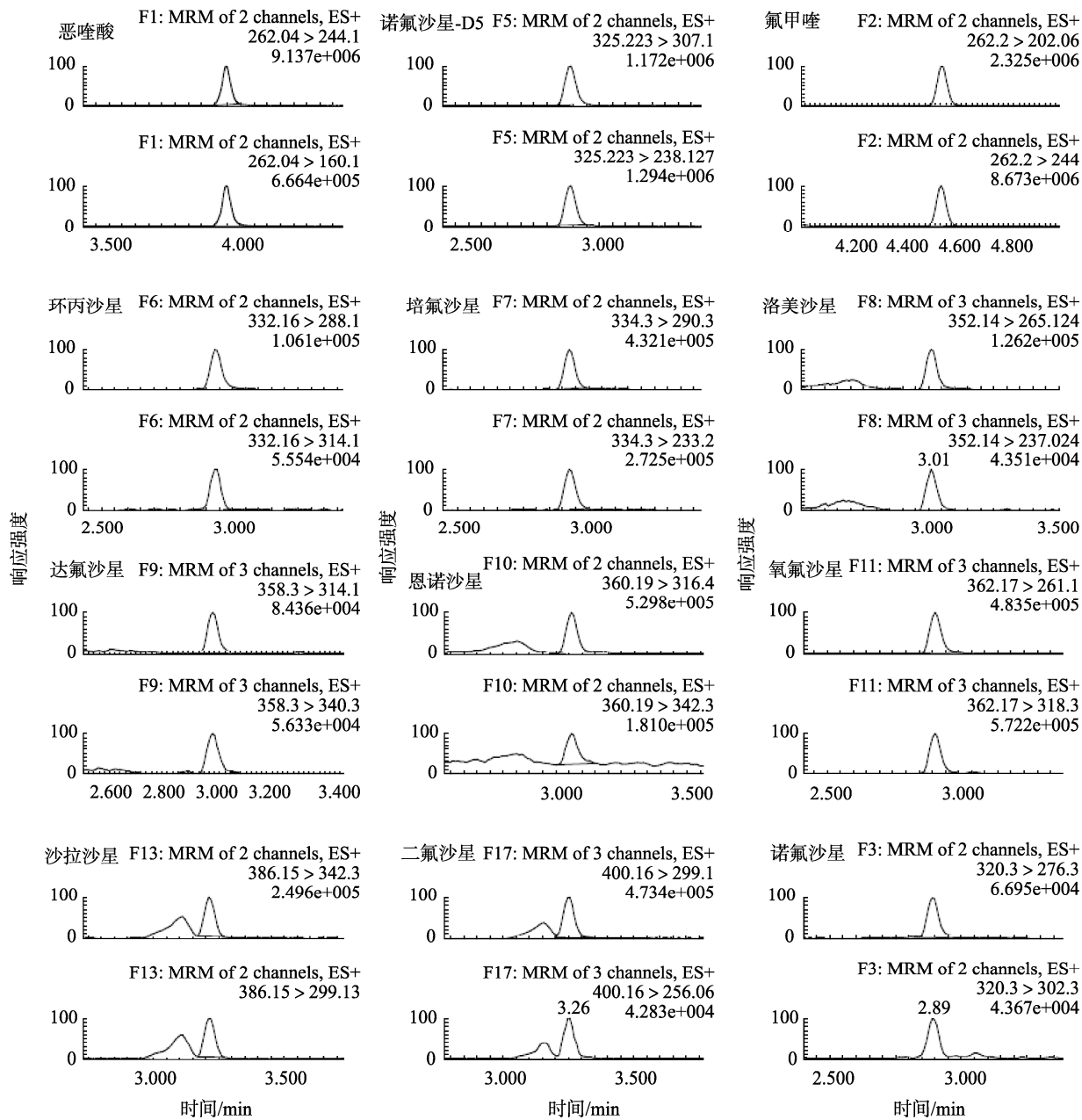


图 2 空白基质加标样品中各化合物的色谱图
Fig.2 Chromatogram of each compound in blank matrix spiked sample

表 3 准确度和精密度(n=6)
Table 3 Recoveries and precisions(n=6)

化合物	加标量/ (μg/kg)	淡水鱼		淡水虾	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
恶喹酸	5.0	120.1	9.1	94.2	7.9
	10.0	76.9	7.2	91.6	7.4
	20.0	101.6	5.9	87.8	6.9
氟甲喹	5.0	95.6	10	90.1	9.5
	10.0	70.0	7.4	77.1	8.0
	20.0	76.3	4.7	71.1	4.6
诺氟沙星	5.0	106.4	7.9	96.7	7.9
	10.0	104.3	6.2	93.8	7.1
	20.0	99.8	7.3	91.8	6.5
环丙沙星	5.0	114.0	5.7	111.1	10
	10.0	108.8	8.0	105.7	9.5
	20.0	116.3	4.9	101.9	5.7
培氟沙星	5.0	118.1	5.5	104.2	8.2
	10.0	115.5	5.9	97.3	9.1
	20.0	107.6	11	96.4	9.4
洛美沙星	5.0	117.2	4.3	115.8	8.9
	10.0	113.9	7.2	109.6	8.9
	20.0	109.4	5.8	100.3	4
达氟沙星	5.0	99.6	8.5	97.5	9.8
	10.0	84.0	6.5	108.4	11
	20.0	104.1	9.3	109.7	6.7
恩诺沙星	5.0	97.1	12	103.6	13
	10.0	89.6	9.5	89.9	8.4
	20.0	86.9	5.2	105.1	5.9
氧氟沙星	5.0	83.2	12	85.4	14
	10.0	103.0	9.6	96.2	9.5
	20.0	96.4	7.4	92.3	9.3
沙拉沙星	5.0	96.4	13	84.6	12
	10.0	76.1	11	80.4	11
	20.0	100.3	9	88.7	6.5
二氟沙星	5.0	76.9	12	91.7	11
	10.0	86.1	9.7	88.3	8.4
	20.0	88.6	9.5	74.9	11

参考文献

[1] 高何刚, 王瑞, 杜赛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱联用法同时测定鸡肉中磺胺和喹诺酮类兽药残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(17): 2481-2485.
GAO HG, WANG R, DU S, *et al.* Simultaneous determination of 16 sulfonamides and 15 quinolones in chicken by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2017, 27(17): 2481-2485.

[2] 施杏芬, 陆国林. 兽用喹诺酮类药物残留的危害及对策 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25(9): 16-17.
SHI XF, LU GL. The harm and countermeasure of veterinary quinolone residues [J]. Chin Anim Heal Insp, 2008, 25(9): 16-17.

[3] NIWA H, CHUMA T, OKAMOTO K, *et al.* Simultaneous detection of mutations associated with resistance to macrolides and quinolones in *Campylobacter jejuni* and *C. coli* using a PCR-line probe assay [J]. Int Antimicrob Agents, 2003, 22(4): 374-379.

[4] FDA. FDA announces final decision about veterinary medicine[Z].

- [5] HEMANDEZ AJA, BARBOSA J, COMPANO R, *et al.* Analysis of quinolone residues in edible animal products [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 945(1-2): 1–24.
- [6] GB 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S].
GB 31650—2019 National food safety standard-Maximum residue limits for veterinary drugs in foods [S].
- [7] 郭亚文, 卜晓娜, 刘楚君, 等. 动物源性食品中氟喹诺酮类药物残留色谱质谱检测技术研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53(1): 64–76.
GUO YW, BU XN, LIU CJ, *et al.* Research status on chromatographic and mass spectrometry analytical methods for the detection of fluoroquinolones residues in animal food [J]. *Chin J Veter Drug*, 2019, 53(1): 64–76.
- [8] 闵宇航, 魏宇涛, 杜钢, 等. 液相色谱串联质谱法测定豆芽中 15 诺酮类药物[J]. *食品科技*, 2020, 45(7): 332–337.
MIN YH, WEI YT, DU G, *et al.* Determination of 15 quinolone antibiotics in soy bean sprout by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci Technol*, 2020, 45(7): 332–337.
- [9] 康莉, 刘红河, 李勇, 等. LC/MS/MS 法测定水产品中(氟)喹诺酮类药物残留[J]. *中国卫生检验杂志*, 2008, 18(10): 1941–1944.
KANG L, LIU HH, LI Y, *et al.* Determination of (Fluoro) quinolones residues in aquatic products by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2008, 18(10): 1941–1944.
- [10] 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 Int*, 2003, 86(2): 412–431.
- [11] 曹鹏, 牟妍, 高飞, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测火锅食材中 11 种喹诺酮类药物[J]. *色谱*, 2013, 31(9): 862–868.
CAO P, MOU Y, GAO F, *et al.* Simultaneous determination of 11 quinolones in hotpot ingredients by dispersive solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2013, 31(9): 862–868.
- [12] 李佩佩, 张小军, 梅光明, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱检测水产品中 14 种喹诺酮类药物[J]. *食品科学*, 2014, 35(24): 265–270.
LI PP, ZHANG XJ, MEI GM, *et al.* Determination of 14 quinolone antibiotics in aquatic products by dispersive solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2014, 35(24): 265–270.
- [13] 李振华, 魏东, 张乃生. 氟喹诺酮类药物残留检测方法研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(3): 98–101.
LI ZH, WEI D, ZHANG NS. Progress on the detection methods of fluoroquinolones residue [J]. *Prog Vet Med*, 2007, 28(3): 98–101.
- [14] 史艳艳, 高琳, 李俊, 等. 液相色谱-串联质谱法检测饲料中洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3367–3375.
SHI YY, GAO L, LI J, *et al.* Determination of iomefloxacin, pefloxacin, ofloxacin and norfloxacin residues in feed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(11): 3367–3375.
- [15] 贾英杰. 液质联用技术在蜂蜜兽药残留检测中的应用[J]. *食品工业*, 2019, 40(7): 284–286.
JIA YJ. Application of liquid chromatography-mass spectrometry detection technology in veterinary drug residues in honey [J]. *Food Ind*, 2019, 40(7): 284–286.
- [16] 廖艳华, 周劲恒, 林文斯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 11 种喹诺酮类抗生素残留的样品前处理方法优化[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(8): 910–921.
LIAO YH, ZHOU SH, LIN WS, *et al.* Optimization of sample pretreatment method for determination of 11 quinolone antibiotic residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2018, 28(8): 910–921.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



魏玉霞, 博士, 副研究员, 主要研究方向为理化检验。
E-mail: wyx1130@163.com.