

净化柱结合超高效液相色谱—串联质谱检测 动物源性食品中 16 种喹诺酮药物

Establishment and application of clean-up combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the detection of 16 quinolones in animal-derived food

余婷婷¹ 梁 松¹ 黄文慧¹ 何 洁^{1,2} 严义勇¹

YU Tingting¹ LIANG Song¹ HUANG Wenhui¹ HE Jie^{1,2} YAN Yiyong¹

(1. 深圳市易瑞生物技术股份有限公司, 广东 深圳 518101;

2. 深圳职业技术学院集成电路关键材料研究院, 广东 深圳 518055)

(1. Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518101, China; 2. Institute of Critical Materials for Integrated Circuits, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

摘要:目的:加强动物源性食品安全检测市场监管。方法:动物源性食品样品使用 80% 乙腈(含 0.2% 甲酸)提取,净化柱(Speedy Prep®-Quino 1)净化后,利用超高效液相色谱—串联质谱检测 16 种喹诺酮类药物残留。结果:16 种喹诺酮类药物的线性范围为 1.6~40.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 相关系数 $r \geq 0.996$, 检出限为 0.14~0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.47~2.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在净化柱前处理后 7 个基质加标回收率为 62%~112%, 相对标准偏差为 0.9%~18.7%。结论:该方法具有检测速度快、灵敏度高的特点,适用于羊肉、鸭肉、牛肉、鱼肉、鸡蛋、猪腰、鸭皮等动物源性食品。

关键词:动物源性食品;喹诺酮;净化柱前处理;超高效液相色谱—串联质谱

Abstract: **Objective:** A method for simultaneous detection of 16 quinolones in food of animal origin was developed by clean-up column pretreatment combined with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods:** Food samples of animal origin were extracted using 80% acetonitrile (containing 0.2% formic acid). After purification on a Speedy Prep®-Quino 1 column, 16 quinolone residues were detected by

ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Results:** The results showed that the linear range of 16 quinolones was 1.6~40.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the correlation coefficient $r \geq 0.996$, the limits of detection were 0.14~0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantification were 0.47~2.68 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries of seven matrix after pretreatment were 62%~112%, and the relative standard deviations were 0.9%~18.7%. **Conclusion:** The method has the characteristics of fast detection speed and high sensitivity, and can be applied to animal derived food such as mutton, duck, beef, fish, eggs, pig kidney, duck skin.

Keywords: animal-derived food; quinolones; pretreatment of clean-up column; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

喹诺酮药物因其成本低、抗菌谱广、见效快等特点^[1-2],在畜禽养殖过程中常被“超剂量”使用,导致动物源性食品内药物残留。此外,因其代谢缓慢,会随食用动物源性食品的摄入在人体内蓄积,具有潜在的致癌风险。目前,喹诺酮药物检测的方法主要有薄层色谱法^[3]、微生物法^[4]、酶联免疫吸附法^[5]、高效液相色谱法^[6]、高效液相色谱—串联质谱法^[7]等。薄层色谱法用于定性分析^[8]、微生物法和酶联免疫法因其检测药物种类单一导致应用受限^[9]。利用高效液相色谱法对喹诺酮药物进行定性和定量分析,其原理是通过保留时间对物质进行定性,其色谱出峰受杂质干扰较大,会出现杂质与目标化合物保留时间重叠的情况导致结果出现假阳性,此外,该方法对样品中药物残留的提取方式要求较高,无法实现痕

基金项目:广东省粤港澳大湾区联合创新领域项目(编号:2021A0505080003);资助深圳市技术攻关重点项目(编号:JSGG20191115141601721)

作者简介:余婷婷,女,学士。

通信作者:何洁(1987—),女,深圳市易瑞生物技术股份有限公司高级工程师,博士。E-mail:bjhelp@163.com

严义勇(1985—),男,深圳市易瑞生物技术股份有限公司正高级工程师,博士。E-mail:yanyy@bioeasy.com

收稿日期:2023-02-07 **改回日期:**2023-06-16

量检测^[10]。液相色谱—串联质谱法是根据质荷比对每个化合物进行独立检测,分离能力较高、灵敏度高、可实现痕量分析,是目前认可度高的定性定量检测方法,但依然会受杂质干扰^[11]。

喹诺酮药物的样品前处理净化方法主要有分子印迹固相萃取^[12]、固相萃取^[13]、固相微萃取^[14]、磁性固相萃取^[15]、分散固相萃取^[16]、分散液液微萃取^[17]、液液微萃取^[18]、液液萃取^[19]、搅拌棒吸附萃取^[20]等。目前使用较为广泛的前处理方式是固相萃取柱,使用时需要对小柱进行填料活化、吸附上样、杂质淋洗、目标洗脱等过程,该方法耗时长,试剂需求量较大。目前使用净化柱对动物源性食品进行净化的研究较少。因此,研究拟采用滤过型净化柱作为前处理净化材料,无需经过上述繁杂步骤,减少溶剂使用量,也可避免由于基质复杂而导致的筛板堵塞^[21]等问题,结合过柱仪进行自动化过柱,可在 20 s 内一次性完成 12 管样品的净化,可提高大批量样品前处理净化效率,增加检测通量。通过对前处理条件、色谱、质谱分析条件的优化,以基质效应、回收率与精密度作为评价指标,确定 16 种喹诺酮药物最优的检测方法,建立过柱仪辅助净化柱结合超高效液相色谱—串联质谱检测动物源性食品中 16 种喹诺酮药物残留的方法,以期对动物源性食品的市场监管中食品安全检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

羊肉、鸭肉、牛肉、鱼肉、鸡蛋、猪腰、鸭皮等基质样品;样品经高通量组织研磨仪研磨后,于 -20 ℃ 保存备用,市售;

16 种喹诺酮药物标准品[噁唑酸(OXO)、氟甲喹(FLU)、诺氟沙星(NOR)、环丙沙星(CIP)、培氟沙星(PEF)、洛美沙星(LOM)、恩诺沙星(ENR)、氧氟沙星(OFL)、沙拉沙星(SAR)、双氟沙星(DIF)、氟罗沙星(FLE)、达氟沙星(DAN)、马波沙星(MAR)、奥比沙星(ORB)、依洛沙星(ENO)、司帕沙星(SPA)]:纯度 ≥ 98%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;

乙腈、甲醇:色谱级(≥99.9%),美国 J. T. Baker 公司;

甲酸、氨水:色谱级(≥98%),上海阿拉丁生化科技股份有限公司;

ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱:100 mm × 2.1 mm,1.7 μm,美国 Waters 公司;

尼龙滤膜:0.22 μm,天津艾杰尔有限公司;

注射器:常州悦康医疗器材有限公司;

色谱自动进样小瓶:浙江爱吉仁有限公司;

高通量组织研磨仪:XINW-M24 型,上海鑫翁科学仪器有限公司;

移液枪:10, 20, 50, 100, 1 000, 5 000 μL,德国 Eppendorf 公司;

纯水机:Milli-Q Synergy 型,默克化工技术(上海)有限公司;

高速涡旋仪:MS 3 basic 小型,德国 IKA 公司;

台式离心机:DM0412 型,深圳市易瑞生物技术股份有限公司;

氮吹仪:UGC-24C 型,北京优晟联合科技有限公司;

超高效液相色谱—串联质谱联用仪:SCIEX QTRAP 5500+型,美国 AB SCIEX 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液配制 16 种喹诺酮药物标准物质用甲醇配制标准储备液(1 mg/mL),-20 ℃ 密封避光贮藏备用,有效期 6 个月。用 50% 乙腈水溶液稀释 16 种喹诺酮药物的标准储备液,配制成 1 μg/mL,100 ng/mL 的单标溶液及 16 种喹诺酮混合标准溶液,4 ℃ 避光冷藏保存备用,有效期 1 个月。

1.2.2 样品前处理 取 5.0 g 基质样品于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 80% 乙腈(含 0.2% 甲酸)提取溶剂,涡旋 3 min,4 000 r/min 离心 2 min,取 5 mL 上清液于 15 mL 离心管中,将 Speedy Prep®-Quino 1 净化柱的橡胶头置于离心管端口,将离心管—净化柱放置于样品架上,使用过柱仪过柱,填料上端滤过的提取液即为净化后的提取液,倒出至样品瓶或样品管中,备用。取适量样品用氮气(45 ℃)吹干,按 $V_{0.2\% \text{ 甲酸水}} : V_{\text{甲醇}} = 9 : 1$ 复溶,涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜,上机检测。

1.2.3 色谱与质谱分析条件

(1) 液相条件:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm × 2.1 mm,1.7 μm);流动相 A 为 0.2% 甲酸水,流动相 B 为甲醇;流速 0.35 mL/min;柱温 40 ℃;进样量 10 μL;梯度洗脱程序:0.00~5.00 min,90%~70% A;5.00~7.00 min,70%~50% A;7.00~7.10 min,50%~5% A;7.10~10.00 min,5% A;10.00~10.10 min,5%~90% A;10.10~13.00 min,90% A。

(2) 质谱条件:质谱离子源为电喷雾离子源(ESI);采用正离子扫描模式;多反应监测(MRM)检测方式;离子源温度 550 ℃;电喷雾电压 5 500 V;气帘气压力 0.241 MPa(氮气);喷雾气压力 0.379 MPa(氮气);辅助气压力 0.379 MPa(氮气);离子源温度 550 ℃。

1.2.4 方法学验证

(1) 检出限及定量限:空白羊肉基质经过前处理的提取、净化得到样品测试前的复溶液,用此复溶液稀释 16 种混合标准溶液,配制喹诺酮药物溶液,质量浓度梯度分别为 0.05,0.1,0.2,0.5,0.8,1.0,2.0,5.0 ng/mL,UPLC-MS/MS 测试后,根据 SCIEX OS 软件得到标准曲线、线性方程、线性范围以及相关系数,以 3,10 倍的信噪比计算每种喹诺酮药物的检出限(LOD)与定量限(LOQ)。

(2) 基质效应:纯溶剂稀释标品,得到纯溶剂空白标

准溶液,质量浓度梯度分别为0.05,0.1,0.2,0.5,0.8,1.0,2.0,5.0 ng/mL。空白基质复溶液稀释标品,得到基质标准溶液,质量浓度梯度分别为0.05,0.1,0.2,0.5,0.8,1.0,2.0,5.0 ng/mL。UPLC-MS/MS检测后得到纯溶剂标准曲线和空白基质匹配曲线。按式(1)计算基质效应。

$$M_E = \frac{K_2}{K_1}, \quad (1)$$

式中:

M_E ——基质效应;

K_1 ——空白基质匹配曲线斜率;

K_2 ——纯溶剂标准曲线斜率。

(3) 添加回收率与精密度:精确称取5.0 g空白基质样品,分别加入5,20,100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的16种喹诺酮混合标准溶液,按1.2.2的方法对基质样品进行处理,外标法基质匹配曲线定量,以加标回收率及相对标准偏差为评价指标,验证方法的准确性及精密度。

(4) 数据分析:运用Excel 2010软件进行数据处理、计算,使用SolidWorks建模、绘图,使用Origin绘图,使用SPSS 23.0进行方差分析,试验结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 色谱条件和质谱条件优化

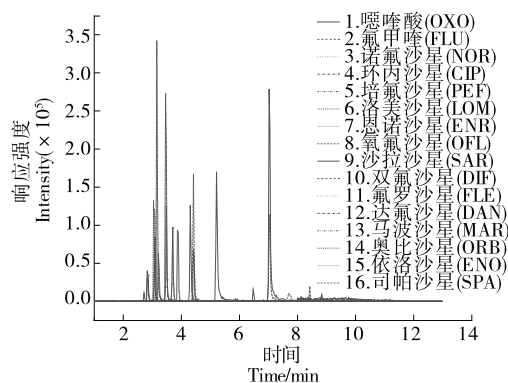
2.1.1 色谱条件优化 由图1可知,当水相均为0.1%甲酸水,甲醇为有机相时,喹诺酮药物在色谱上相互分离程度较乙腈为有机相时的好,峰型更为尖锐。0.1%甲酸水—乙腈洗脱的噻啶酸及氟甲喹拖尾严重,且乙腈毒性较大,因此选用甲醇为有机相。此外,随着甲酸浓度的增加,部分化合物响应有稍微的降低或增加,但均满足所需的响应需求,为使整体响应值偏高,选用0.2%甲酸水—甲醇作为流动相。

2.1.2 质谱参数优化 由表1可知,16种喹诺酮药物保留时间为4.25~8.26 min,可在10 min内完成定性分析。

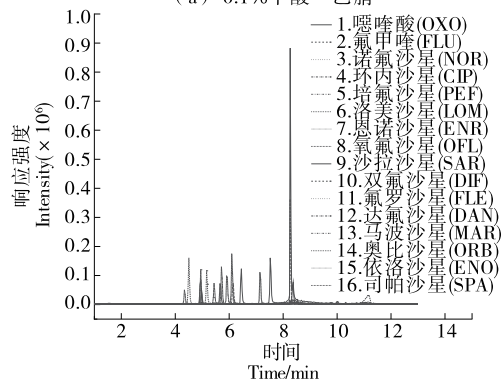
2.2 前处理条件优化

2.2.1 净化材料 由图2可知,净化柱从装有提取液的离心管端口下压使得提取液穿过复合填料,此过程中杂质被复合填料吸附,而目标分析物不被吸附,流穿的提取液即为净化后的提取液。分别对净化前和净化后的羊肉基质提取液中的杂质进行紫外测试,结果如图3所示。由图3可知,过柱后的提取液在波长 <300 nm时紫外吸收值较未过柱的提取液有一定程度的降低,表明动物源性食品提取液经净化柱过柱后蛋白质等杂质有一定程度的减少,利用净化柱方法净化效果较好。

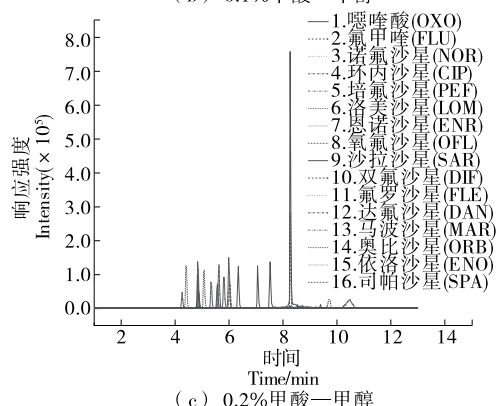
2.2.2 过柱仪辅助净化 过柱仪辅助净化操作过程如图4所示,插入电源适配器通电,将离心管—净化柱放置于样品管架上,然后将待过柱的管架水平居中放入舱内运动板下方,启动仪器开始工作,工作流程结束后运动板



(a) 0.1%甲酸—乙醇



(b) 0.1%甲酸—甲醇



(c) 0.2%甲酸—甲醇

图1 不同流动相下16种喹诺酮药物标准溶液的MRM色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of 16 standard solutions of quinolones under different mobile phase

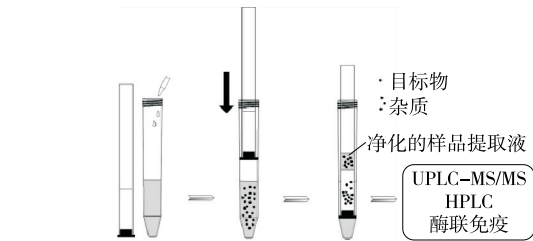
自动复位,此时可取出离心管架,完成过柱。

2.2.3 提取溶剂 以羊肉为基质,探究不同浓度的乙腈水对回收率的影响。结果显示,随着有机溶剂的减少,提取液色素含量显著增高,提取液杂质增多,浑浊度增高,当乙腈浓度低于50%时,色素增加得更为明显。因此选择50%,60%,70%,80%,90%,100%乙腈分别对羊肉基质进行提取。当以90%,100%乙腈作为提取液时,大部分喹诺酮药物的回收率较低;当以50%,60%,70%乙腈水作为提取液时,噻啶酸、氟甲喹的回收率较低,尤其是氟甲喹的回收率低于60%。当以80%乙腈水作为提取

表 1 喹诺酮药物质谱检测参数

Table 1 Quinolones mass spectrometry detection parameters

药物	出峰时 间/min	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞气能 量/eV	去簇电 压/eV	药物	出峰时 间/min	定性离子对 (<i>m/z</i>)	定量离子对 (<i>m/z</i>)	碰撞气能 量/eV	去簇电 压/eV
诺氟沙星	5.06	320.1~302.1	320.1~302.1	27	120	氟罗沙星	4.4	370.2~326.0	370.2~326.0	27	140
		320.1~233.2		33	120			370.2~332.0		28	140
环丙沙星	5.33	332.1~231.0	332.1~231.0	49	127	达氟沙星	5.62	358.1~340.1	358.1~340.1	32	140
		332.1~288.0		25	127			358.1~283.1		32	140
培氟沙星	4.84	334.1~316.0	334.1~316.0	29	130	马波沙星	4.25	363.2~72.1	363.2~72.1	25	100
		334.1~233.2		35	130			363.2~345.2		29	100
洛美沙星	5.8	352.1~265.1	352.1~265.1	31	130	奥比沙星	5.98	396.1~352.2	396.1~352.2	26	140
		352.1~334.0		29	130			396.1~295.1		34	140
恩诺沙星	5.56	360.1~316.1	360.1~316.1	28	100	依洛沙星	4.87	321.2~232.0	321.2~232.0	46	125
		360.1~245.2		38	100			321.2~303.1		26	125
氧氟沙星	4.83	362.2~318.2	362.2~318.2	28	100	司帕沙星	7.05	393.0~292.1	393.0~292.1	34	143
		362.2~261.2		36	100			393.0~375.1		30	143
沙拉沙星	6.33	386.1~368.1	386.1~368.1	30	140	氟甲喹	8.26	262.1~202.0	262.1~202.0	44	115
		386.1~299.1		38	140			262.1~244.1		24	115
双氟沙星	6.02	400.2~382.2	400.2~382.2	30	145	噁喹酸	7.52	262.1~244.0	262.1~244.0	25	100
		400.2~299.1		40	145			262.1~160.0		50	100



加入样本提取物 向下压 收集净化的样本提取液

图 2 净化柱净化样品提取液过程示意图

Figure 2 Schematic diagram of purification process of sample extract by clean-up column

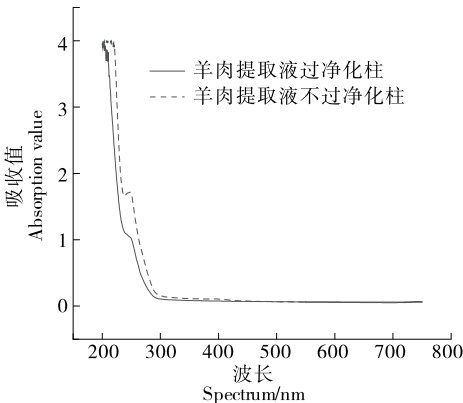


图 3 羊肉基质净化前及净化后的紫外吸收对比图

Figure 3 Comparison of UV absorption before and after purification of mutton matrix

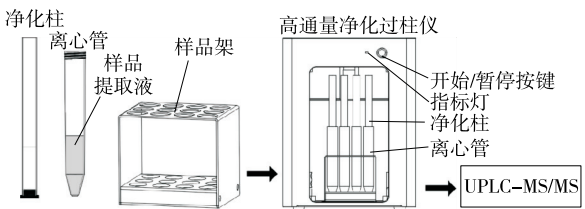


图 4 过柱仪过柱示意图

Figure 4 Working diagram of clean-up column instrument

液时,16 种喹诺酮药物的回收率为 73.12%~122.41%,提取效果较好。

为进一步提高部分喹诺酮药物的回收率,向 80%乙腈水中分别添加氨水及甲酸,结果见表 2。由表 2 可知,与 80%乙腈水相比,当提取液中添加 0.2%氨水时,大部分喹诺酮药物的回收率显著降低($P<0.05$),而添加 0.2%甲酸的提取液,9 种喹诺酮药物的回收率均显著增加($P<0.05$),尤其是依诺沙星的回收率由 73.12%提升至 97.39%。当甲酸添加量分别增加至 0.5%,1.0%时,部分药物的回收率显著降低($P<0.05$),可能是因为喹诺酮药物是两性化合物,一定的酸性条件促进了部分喹诺酮药物的溶解,而过酸条件下部分喹诺酮药物可能会有一定程度的降解^[22]。与 80%甲醇水(含 0.2%甲酸)相比,当以 80%乙腈水(含 0.2%甲酸)作为提取液时,喹诺酮药物的回收率较高且具有显著性差异。因此,最终选择

80%乙腈水(含 0.2%甲酸)为提取溶剂。

范围、线性方程、相关系数如表 3 所示。羊肉基质在此方法检测下的 16 种喹诺酮类药物在 1.6~40.0 μg/kg 质量浓度范围内线性较好,相关系数 $r\geq 0.996\ 1$,检出限为以羊肉基质为例,其基质标曲的检出限、定量限、线性

表 2 不同提取溶剂下 16 种喹诺酮药物的回收率[†]

Table 2 Recoveries of 16 quinolones with different extraction solvents %

药物	80%乙腈水	80%乙腈水				80%甲醇水—
		0.2%甲酸	0.5%甲酸	1.0%甲酸	0.2%氨水	0.2%甲酸
噁唑酸	97±3.2 ^c	103±9.8 ^a	69±2.3 ^b	80±4.4 ^b	69±5.5 ^b	51±1.9 ^c
氟甲喹	83±3.7 ^e	87±11.1 ^a	73±5.7 ^b	53±8.0 ^c	59±2.3 ^c	34±3.4 ^d
诺氟沙星	99±9.8 ^b	107±2.5 ^a	93±3.5 ^b	117±11.6 ^a	81±4.0 ^b	85±4.1 ^b
环丙沙星	90±11.7 ^b	103±4.0 ^b	101±4.8 ^b	132±10.9 ^a	88±10.0 ^b	99±4.6 ^b
培氟沙星	94±6.6 ^c	112±3.1 ^{ab}	102±4.5 ^b	116±7.9 ^a	86±3.5 ^c	78±9.7 ^c
洛美沙星	95±3.6 ^a	111±6.3 ^a	116±7.6 ^a	107±3.1 ^a	87±5.7 ^b	76±3.8 ^b
恩诺沙星	91±3.6 ^{ab}	112±9.9 ^{ab}	101±7.2 ^{bc}	120±4.1 ^a	89±7.8 ^{cd}	79±9.5 ^d
氧氟沙星	89±4.7 ^{bc}	116±5.0 ^a	103±4.1 ^{cd}	112±7.5 ^{ab}	97±3.2 ^{cd}	94±2.7 ^d
沙拉沙星	96±5.0 ^{bc}	99±11.0 ^a	107±2.8 ^{ab}	112±15.1 ^{ab}	86±9.5 ^c	76±7.0 ^c
双氟沙星	93±5.5 ^b	104±5.5 ^a	84±9.4 ^b	106±11.1 ^a	97±2.8 ^{ab}	52±3.4 ^c
氟罗沙星	89±10.1 ^{ab}	108±12.8 ^{ab}	95±3.0 ^b	114±9.2 ^a	93±1.5 ^b	77±6.0 ^c
达氟沙星	102±3.4 ^{ab}	106±7.3 ^{ab}	87±2.1 ^b	113±14.4 ^a	91±6.2 ^b	87±6.7 ^b
马波沙星	84±6.4 ^a	113±12.7 ^a	94±9.0 ^b	127±7.2 ^a	91±10.1 ^b	85±20.0 ^b
奥比沙星	100±7.5 ^b	128±14.9 ^a	98±5.5 ^b	122±3.0 ^a	98±4.8 ^b	89±10.0 ^b
依洛沙星	73±6.2 ^{bc}	97±11.8 ^{bc}	110±7.7 ^{ab}	120±5.2 ^a	82±13.4 ^c	85±2.4 ^c
司帕沙星	122±4.1 ^b	119±6.2 ^a	117±6.8 ^a	115±4.2 ^a	86±10.0 ^b	93±10.5 ^b

[†] 同行小写字母不同表示差异显著($P<0.05$)。

表 3 16 种喹诺酮药物的线性方程、相关系数、线性范围、检出限及定量限

Table 3 Linear equations, correlation coefficients, linear ranges, limits of detection, and limits of quantification for 16 quinolones

药物	线性方程	相关系数 r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	检出限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
噁唑酸	$y=5.570\ 93\text{E}005x-2\ 289.510\ 67$	0.999 7	0.4~40.0	0.16	0.55
氟甲喹	$y=8.775\ 97\text{E}004x+4\ 065.204\ 59$	0.999 5	0.8~40.0	0.31	1.05
诺氟沙星	$y=2.288\ 53\text{E}005x-369.694\ 82$	0.999 5	0.8~40.0	0.36	1.21
环丙沙星	$y=1.246\ 18\text{E}005x-1\ 364.812\ 94$	0.999 4	0.8~40.0	0.28	0.92
培氟沙星	$y=3.034\ 84\text{E}005x+2\ 254.794\ 66$	0.999 4	0.4~40.0	0.14	0.47
洛美沙星	$y=1.480\ 57\text{E}005x-2\ 499.526\ 51$	0.999 9	0.8~40.0	0.44	1.46
恩诺沙星	$y=1.567\ 96\text{E}005x-3\ 383.926\ 46$	0.999 5	0.8~40.0	0.36	1.21
氧氟沙星	$y=2.304\ 90\text{E}005x-2\ 049.905\ 32$	0.999 6	0.4~40.0	0.23	0.77
沙拉沙星	$y=2.300\ 11\text{E}005x-2\ 104.088\ 80$	0.999 2	0.8~40.0	0.57	1.90
双氟沙星	$y=1.243\ 55\text{E}005x+1\ 075.095\ 35$	0.999 7	1.6~40.0	0.61	2.05
氟罗沙星	$y=2.054\ 72\text{E}005x-8\ 063.566\ 00$	0.998 7	0.8~40.0	0.29	0.96
达氟沙星	$y=3.094\ 18\text{E}005x+700.536\ 84$	0.999 9	0.8~40.0	0.18	0.62
马波沙星	$y=7.545\ 91\text{E}004x+1\ 111.943\ 94$	0.999 9	0.8~40.0	0.80	2.68
奥比沙星	$y=1.585\ 13\text{E}005x-1\ 708.448\ 64$	0.996 1	0.8~40.0	0.30	0.99
依洛沙星	$y=9.979\ 35\text{E}004x+27.011\ 05$	0.997 9	0.8~40.0	0.24	0.81
司帕沙星	$y=1.579\ 13\text{E}005x-4\ 586.404\ 85$	0.997 8	0.8~40.0	0.24	0.79

0.14~0.80 μg/kg,定量限为 0.47~2.68 μg/kg。

2.4 基质效应

以羊肉基质为例,由表 4 可知,16 种喹诺酮药物中有 6 种喹诺酮药物即噁嗉酸、氟甲喹、环丙沙星、沙拉沙星、双氟沙星、奥比沙星受基质干扰程度大,表现为强基质效应,其中氟甲喹的基质效应最强,比值为 0.29,其余 10 种基质效应为弱基质效应,可忽略不计。

2.5 回收率与精密度

以羊肉、鸭肉、牛肉、鱼肉、鸡蛋、猪腰、鸭皮为样品基质,使用建立的方法对其进行添加回收试验,进行方法验证和应用,结果见表 5。由表 5 可知,羊肉基质的平均回收率为 72%~109%,相对标准偏差为 1.7%~11.0%;鸭肉基质的平均回收率为 72%~112%,相对标准偏差为 0.9%~13.0%;牛肉基质的平均回收率为 72%~105%,相对标准偏差为 1.6%~13.1%;鱼肉基质的平均回收率为 74%~110%,相对标准偏差为 2.6%~10.9%;鸡蛋基质的平均回收率为 69%~110%,相对标准偏差为 1.0%~18.7%;猪腰基质的平均回收率为 62%~109%,相对标准偏差为 1.5%~13.3%;鸭皮基质的平均回收率

表 4 16 种喹诺酮药物基质效应

Table 4 Matrix effects of 16 quinolones

药物	基质标曲斜率	空白标曲斜率	基质效应
噁嗉酸	5.57E005	9.24E005	0.60
氟甲喹	8.78E004	3.00E005	0.29
诺氟沙星	2.29E005	2.74E005	0.84
环丙沙星	1.25E005	1.60E005	0.78
培氟沙星	3.03E005	3.04E005	1.00
洛美沙星	1.48E005	1.31E005	1.13
恩诺沙星	1.57E005	1.54E005	1.02
氧氟沙星	2.30E005	2.32E005	0.99
沙拉沙星	2.30E005	3.22E005	0.72
双氟沙星	1.24E005	1.82E005	0.68
氟罗沙星	2.05E005	2.06E005	1.00
达氟沙星	3.09E005	3.81E005	0.81
马波沙星	7.55E004	7.17E004	1.05
奥比沙星	1.59E005	2.39E005	0.66
依洛沙星	9.98E004	1.14E005	0.87
司帕沙星	1.58E005	1.54E005	1.03

表 5 16 种喹诺酮药物在不同加标水平下的回收率及精密度

Table 5 Recoveries and precision of 16 quinolones at different spike levels

药物	加标浓度/ (μg·kg ⁻¹)	羊肉		鸭肉		牛肉		鱼肉		鸡蛋		猪腰		鸭皮	
		回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %
噁嗉酸	5	95	8.7	96	13.0	79	11.0	85	5.0	88	17.0	101	5.6	83	6.3
	20	93	6.0	96	7.2	77	3.4	85	4.3	97	8.6	96	7.6	75	7.5
	100	107	10.4	108	5.8	97	4.6	99	5.6	82	8.1	80	5.4	100	6.7
氟甲喹	5	92	8.3	91	8.2	86	8.2	88	7.2	72	18.7	75	10.8	90	5.0
	20	95	4.0	91	6.9	81	5.2	89	10.9	81	12.2	62	13.0	80	8.8
	100	99	6.7	97	8.5	88	8.7	92	6.3	69	7.3	73	7.0	95	3.2
诺氟沙星	5	88	4.6	89	5.3	100	13.1	87	3.5	86	13.6	105	10.5	85	6.1
	20	83	3.0	91	2.3	87	8.4	78	5.3	98	4.5	104	7.5	81	5.3
	100	94	7.2	95	3.5	86	6.9	89	9.5	84	5.2	89	7.7	101	3.2
环丙沙星	5	89	3.9	91	0.9	89	7.5	90	4.6	109	7.3	95	7.5	91	7.2
	20	85	2.8	90	2.8	80	4.4	81	6.2	106	3.2	93	1.5	82	5.5
	100	96	8.3	95	4.5	92	5.8	92	7.4	88	3.1	83	5.4	99	1.8
培氟沙星	5	86	11.0	87	2.4	88	6.7	84	9.5	99	5.7	103	6.7	90	8.1
	20	84	4.9	84	3.7	77	5.0	81	7.0	106	3.8	104	5.1	80	10.4
	100	100	7.7	96	4.2	92	3.1	97	8.2	88	6.6	85	5.6	111	4.4
洛美沙星	5	89	5.7	87	5.0	84	4.5	93	6.0	106	9.0	103	9.5	100	5.7
	20	87	2.7	85	1.2	79	3.2	84	4.9	95	5.8	101	2.5	90	5.3
	100	96	4.6	96	4.2	91	2.2	95	7.4	84	6.2	84	5.8	105	3.4
恩诺沙星	5	94	6.6	92	4.6	90	7.2	92	8.7	89	14.9	106	10.7	100	10.7
	20	89	1.7	88	2.2	85	2.8	85	4.7	105	1.0	105	5.1	80	6.8
	100	107	4.5	100	4.6	97	4.1	100	4.8	91	6.3	89	3.5	113	3.9

续表 5

药物	加标浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	羊肉		鸭肉		牛肉		鱼肉		鸡蛋		猪腰		鸭皮	
		回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %	回收 率/%	RSD/ %
氧氟沙星	5	85	5.8	90	4.1	85	5.3	92	4.2	108	11.6	100	7.2	94	5.8
	20	87	2.5	88	2.2	80	4.0	85	2.8	104	2.8	101	2.5	80	7.8
	100	98	5.8	94	5.0	92	3.6	97	5.9	85	5.7	85	2.7	106	3.1
沙拉沙星	5	96	7.3	98	4.0	92	9.1	105	6.9	100	12.4	100	7.3	97	3.8
	20	94	3.2	93	4.0	90	2.3	98	4.0	103	7.2	106	5.7	84	6.0
	100	107	4.5	110	3.5	99	5.6	108	6.3	89	6.3	83	5.0	113	2.6
双氟沙星	5	82	9.2	92	7.8	84	5.9	89	8.5	93	11.5	92	7.5	92	3.2
	20	91	3.3	86	1.4	84	3.9	86	6.2	102	5.7	99	3.9	82	3.3
	100	98	2.5	96	3.9	96	3.5	100	7.2	87	6.5	84	10.4	109	4.6
氟罗沙星	5	75	5.9	78	3.7	77	5.2	88	3.6	97	10.6	99	5.2	82	7.6
	20	76	3.0	77	1.9	72	3.7	80	2.6	103	4.1	96	4.8	71	7.4
	100	87	3.7	85	1.9	80	3.3	91	3.8	83	4.6	81	5.3	100	2.0
达氟沙星	5	108	7.7	112	6.3	100	8.9	110	3.6	100	12.2	105	7.7	99	8.5
	20	103	4.9	108	3.3	90	6.8	99	8.2	105	4.8	109	7.5	92	4.4
	100	109	7.0	110	5.8	105	6.0	106	6.5	90	4.5	85	7.5	118	4.1
马波沙星	5	72	7.2	74	9.5	79	5.0	85	7.3	94	15.0	99	4.8	86	7.7
	20	77	4.6	72	6.8	75	3.1	74	7.2	96	4.7	91	13.3	74	5.6
	100	87	4.5	83	4.7	81	6.3	89	6.8	80	9.5	85	6.9	101	3.2
奥比沙星	5	90	9.8	84	9.5	86	4.1	100	6.8	97	14.3	106	7.7	99	4.4
	20	87	7.8	83	5.4	86	5.6	93	6.2	110	3.4	101	2.2	90	8.6
	100	97	4.4	94	1.7	91	2.1	101	5.4	93	4.5	83	4.5	112	3.3
依洛沙星	5	88	9.7	84	5.1	77	4.8	83	10.0	96	10.4	89	10.7	85	3.3
	20	84	5.2	84	2.6	72	6.9	77	8.2	100	5.8	92	4.7	77	7.9
	100	88	6.0	85	4.6	84	3.1	89	6.6	85	4.3	77	5.6	99	2.6
司帕沙星	5	97	6.2	90	7.7	98	3.7	102	2.6	105	10.6	105	5.9	111	2.5
	20	95	3.7	88	3.7	92	2.8	93	4.9	107	7.2	104	8.4	101	4.0
	100	96	5.4	94	2.9	101	1.6	100	4.5	98	5.0	88	5.6	109	3.2

为 71%~118%，相对标准偏差为 1.8%~10.7%；7 个基质的平均回收率为 62%~112%，RSD 为 0.90%~18.7%，平均回收率均满足 GB/T 27404—2008 的要求，表明试验建立的方法适用基质广泛，准确度和精密度良好，稳定性好。

3 结论

建立了一种过柱仪辅助净化柱结合 UPLC-MS/MS 检测动物源性食品中 16 种喹诺酮药物的确证性定量方法。样品经 80%乙腈水(含 0.2%甲酸)提取溶剂进行提取,能减少部分杂质与目标化合物共提取。使用滤过型净化柱对提取液内杂质进行净化,相对于 SPE 小柱可减少净化过程中活化、淋洗、洗脱等步骤,解决了 16 种喹诺酮药物因杂质干扰导致的部分化合物回收率差及前处理过程复杂、耗时长的问题,配合使用过柱仪可一次性于

20 s 内完成 12 管样品的净化,增大了样品检测通量,提高了前处理净化效率。结合 UPLC-MS/MS 对每个化合物进行独立检测,其重现性好,灵敏度高,满足定性及痕量分析的检测需求。研究的不足在于对色素较深和基质较为复杂的动物源性食品可能需要进行 2 次及以上净化或减少净化量从而确保较好的净化效果,而此关键在于净化柱填料的选择及填料的使用量和待净化液量,以期在未来的净化柱产品填料选择以及方法建立上进行进一步优化。

参考文献

[1] 黄华, 谢文东, 谷雨, 等. UPLC-MS-MS 法同时测定鸡肉食品中 37 种兽药残留[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 290-296.
HUAN G H, XIE W D, GU Y, et al. Simultaneous determination of 37 veterinary drug residues in chicken food by UPLC-MS-MS[J]. Food FermentInd, 2022, 48(13): 290-296.

- [2] 严明, 严寒, 唐建, 等. HPLC-MS/MS 快速测定饲料中 25 种喹诺酮类药物[J]. 中国饲料, 2021(15): 72-77.
- YAN M, YAN H, TANG J, et al. Rapid determination of 25 quinolones in feed by HPLC-MS/MS[J]. China Feed, 2021(15): 72-77.
- [3] 杨勇, 罗奕, 吴琳琳, 等. 薄层色谱法测定牛奶、蜂蜜中 6 种氟喹诺酮类药物残留[J]. 江苏农业科学, 2015(10): 380-383.
- YANG Y, LUO Y, WU L L, et al. Determination of 6 fluoroquinolones residues in milk and honey by thin-layer chromatography[J]. Jiangsu Agric Sci, 2015(10): 380-383.
- [4] CHO H J, ABD EL-ATY A M, GOUDAH A, et al. Monitoring of fluoroquinolone residual levels in chicken eggs by microbiological assay and confirmation by liquid chromatography [J]. Biomed Chromatogr, 2008, 22(1): 92-99.
- [5] UET A C, CHARLIER C, TITTELMIER S A, et al. Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(8): 2 822-2 827.
- [6] 钱卓真, 苏秀华, 魏博娟, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 6 种喹诺酮药物的残留[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 185-189.
- QIAN Z Z, SU X H, WEI B J, et al. Simultaneous determination of six quinolone residues in aquatic products by high performance liquid chromatography[J]. Food Science, 2010, 31(6): 185-189.
- [7] TOUSSAINT B, CHEDIN M, BORDIN G, et al. Determination of (fluoro) quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. I. Laboratory-validated method[J]. J Chromatogr A, 2005, 1 088(1/2): 32-39.
- [8] 张居舟, 李静. 在线固相萃取—同位素稀释/超高效液相色谱—串联质谱法测定蜂蜜中 26 种喹诺酮类化合物[J]. 分析测试学报, 2021, 40(10): 1 417-1 424.
- ZHANG J Z, LI J. Determination of 26 quinolones in honey by online solid phase extraction isotopic dilution/ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. J Instrum Anal, 2021, 40(10): 1 417-1 424.
- [9] 彭大红, 梅艳珍, 郝爱月, 等. 基于响应面分析的 PRiME HLB-HPLC 法高灵敏检测牛乳中 5 种限用氟喹诺酮类药物[J]. 食品科技, 2021, 46(8): 276-283.
- PENG D H, MEI Y Z, HAO A Y, et al. Highly sensitive detection of five restricted fluoroquinolones in milk by PRiME HLB HPLC based on response surface analysis[J]. Food Science Technology, 2021, 46(8): 276-283.
- [10] 孙卫明, 王权师. 多功能净化柱—超高效液相色谱—串联质谱法测定挂面、方便面中 4 种真菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(6): 662-665.
- SUN W M, WANG Q S. Determination of four mycotoxins in dried noodles and instant noodles by multifunctional purification column ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chin J Health Lab Technol, 2021, 31(6): 662-665.
- [11] 张健玲, 黄慧贤, 王志林, 等. 超高效液相色谱—串联质谱法同时测定鳗鱼中 32 种兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(23): 9 013-9 020.
- ZHANG J L, HUANG H X, WANG Z L, et al. Simultaneous determination of 32 veterinary drug residues in eel by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Saf Qual, 2021, 12(23): 9 013-9 020.
- [12] 杨艳菲, 曹旭敏, 李雪莲, 等. 分子印迹固相萃取—超高效液相色谱—串联质谱法测定鸡肉中 9 种氟喹诺酮类药物残留[J]. 色谱, 2016, 34(11): 1 063-1 069.
- YANG Y F, CAO X M, LI X L, et al. Determination of 9 fluoroquinolones residues in chicken by molecular imprinted solid phase extraction ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(11): 1 063-1 069.
- [13] TURIEL E, BORDIN G, RODRIGUEZ A R. Trace enrichment of (fluoro) quinolone antibiotics in surface waters by solid-phase extraction and their determination by liquid chromatography-ultraviolet detection[J]. J Chromatogr A, 2003, 1 008(2): 145-155.
- [14] MIRZAJANI R, KARDANI F. Fabrication of ciprofloxacin molecular imprinted polymer coating on a stainless steel wire as a selective solid-phase microextraction fiber for sensitive determination of fluoroquinolones in biological fluids and tablet formulation using HPLC-UV detection[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 122: 98-109.
- [15] WANG H, ZHAO X, XU J, et al. Determination of quinolones in environmental water and fish by magnetic metal organic frameworks based magnetic solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2021, 1 651: 462286.
- [16] WANG C, LI X, YU F, et al. Multi-class analysis of veterinary drugs in eggs using dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chem, 2021, 334: 127598.
- [17] VÁZQUEZ M M, VÁZQUEZ P P, GALERA M M, et al. Determination of eight fluoroquinolones in groundwater samples with ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction prior to high-performance liquid chromatography and fluorescence detection[J]. Anal Chim Acta, 2012, 748: 20-27.
- [18] TIMOFEEVA I, TIMOFEEV S, MOSKVIN L, et al. A dispersive liquid-liquid microextraction using a switchable polarity dispersive solvent. Automated HPLC-FLD determination of ofloxacin in chicken meat[J]. Anal Chim Acta, 2017, 949: 35-42.
- [19] 周艳华, 李涛, 潘小红, 等. 液液萃取—超高效液相色谱—串联质谱法快速检测原料乳中 18 种喹诺酮类药物残留[J]. 食品与机械, 2021, 37(8): 63-69, 76.
- ZHOU Y H, LI T, PAN X H, et al. Rapid determination of 18 quinolone residues in raw milk by liquid liquid extraction ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2021, 37(8): 63-69, 76.

(下转第 67 页)

- 液相色谱法测定蜜蜂中氯虫苯甲酰胺残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(2): 492-497.
- LIANG Y, SI L L, WANG W L, et al. Determination of chlorantraniliprole residues in bees by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality Testing, 2022, 13(2): 492-497.
- [10] 李文卓, 钱圆, MATSUMOTO H, 等. 五氟磺草胺在稻田中的降解动态及残留特性[J]. 农药学报, 2017, 19(1): 61-67.
- LI W Z, QIAN Y, MATSUMOTO H, et al. Decomposition dynamics and residual characteristics of penoxsulam in rice fields [J]. Journal of Pesticides, 2017, 19(1): 61-67.
- [11] 贺敏, 朱晓丹, 贾春红, 等. 玉米中氯虫苯甲酰胺残留的超高效液相色谱分析方法[J]. 农药学报, 2013, 15(5): 597-600.
- HE M, ZHU X D, JIA C H, et al. Ultra-high performance liquid chromatography method for analysis of chlorantraniliprole residues in corn[J]. Journal of Pesticides, 2013, 15(5): 597-600.
- [12] SINGH B, KAR A, MANDAL K, et al. Development and validation of QuEChERS method for estimation of chlorantraniliprole residue in vegetables[J]. J Food Sci, 2012, 77(12): T208-T215.
- [13] 韩娟, 杨向黎, 周道煌, 等. 五氟磺草胺的高效液相分析[J]. 农药, 2013, 52(9): 664-665.
- HAN J, YANG X L, ZHOU D H, et al. High performance liquid phase analysis of penoxsulam[J]. Pesticides, 2013, 52(9): 664-665.
- [14] DHARAM B Y, NARENDER S, ANIL D, et al. Penoxsulam influence on weed complex and productivity of transplanted rice and its residual effects in rice-wheat cropping system[J]. Indian Journal of Weed Science, 2019, 51(1): 10-14.
- [15] 司文帅, 张颖, 张其才, 等. 植物源性食品中氟吡菌胺、烯丙菌胺、氯虫苯甲酰胺残留的 LC-MS/MS 检测方法研究[J]. 上海农业学报, 2019, 35(1): 76-79.
- SI W S, ZHANG Y, ZHANG Q C, et al. Research on LC-MS/MS detection methods of fluopicostrobin, fenclufen and chlorantraniliprole residues in plant-derived food [J]. Shanghai Agricultural Journal, 2019, 35(1): 76-79.
- [16] TELÓ G M, SENSEMAN S A, MARCHESAN E, et al. Residues of thiamethoxam and chlorantraniliprole in rice grain[J]. J Agric Food Chem, 2015, 63(8): 2 119-2 126.
- [17] 林毅楠, 黄美玲, 王海鸣, 等. 液相色谱串联质谱法测定茶叶中氯虫苯甲酰胺残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(20): 7 024-7 030.
- LIN Y N, HUANG M L, WANG H M, et al. Determination of chlorantraniliprole residues in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(20): 7 024-7 030.
- [18] 李桂红, 李二虎, 张武, 等. 超高效液相色谱串联质谱测定果蔬中氯虫苯甲酰胺残留[J]. 世界农药, 2018, 40(3): 58-61, 64.
- LI G H, LI E H, ZHANG W, et al. Determination of chlorantraniliprole residues in fruits and vegetables by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. World Pesticides, 2018, 40(3): 58-61, 64.
- [19] 张聪, 游菁菁, 陈亮, 等. 多壁碳纳米管 QuEChERS-液相色谱—串联质谱法快速检测茶叶中氯虫苯甲酰胺残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8 062-8 067.
- ZHANG C, YOU J J, CHEN L, et al. Rapid detection of chlorantraniliprole residues in tea using multi-walled carbon nanotube QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2021, 12(20): 8 062-8 067.
- [20] 文静, 莫楠, 张立佳, 等. 超高液相色谱—串联质谱法测定牛乳中氯虫苯甲酰胺、氯苯虫酰胺和 2 甲 4 氯的残留[J]. 食品工业科技, 2023, 44(5): 285-291.
- WEN J, MO N, ZHANG L J, et al. Determination of chlorantraniliprole, chlorobenzamide and 2-methyl-4-chloride residues in milk by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Industry Science and Technology, 2023, 44(5): 285-291.
- [21] 王昕璐, 贾琪, 许颜阳, 等. QuEChERS-超高效液相色谱—串联质谱法同时测定草莓中甲基硫菌灵、多菌灵和乙嘧酚残留[J]. 农药学报, 2017, 19(5): 603-608.
- WANG X L, JIA Q, XU Y Y, et al. Simultaneous determination of thiophanate-methyl, carbendazim and pyrimethol residues in strawberries by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Pesticides, 2017, 19(5): 603-608.

(上接第 62 页)

- [20] HUANG X, QIU N, YUAN D, et al. Preparation of a mixed stir bar sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater [J]. J Chromatogr A, 2010, 1 217(16): 2 667-2 673.
- [21] 黄季维, 樊文明, 刘桂丹, 等. QuEChERS 净化液相色谱质谱/质谱法用于测定禽畜肉中 18 种喹诺酮类抗生素[J]. 预防医学情报杂志, 2021, 37(11): 1 596-1 603.
- HUANG J W, FAN W M, LIU G D, et al. QuEChERS purified liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry was used to determine 18 quinolone antibiotics in poultry and livestock meat[J]. J Prev Med Inf, 2021, 37(11): 1 596-1 603.
- [22] 马俊美, 范素芳, 孙磊, 等. 超高效液相色谱—四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定牛奶中 19 种喹诺酮类抗生素[J]. 中国食品学报, 2021, 21(1): 309-317.
- MA J M, FAN S F, SUN L, et al. Determination of 19 quinolones in milk by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry[J]. Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(1): 309-317.