

# UHPLC-MS/MS 快速测定水产品中喹诺酮类抗生素的残留

## LCMSMS-071

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定水产品中 10 种喹诺酮类抗生素的分析方法。样品经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 在 6 min 内实现快速分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。使用外标法绘制 10 种喹诺酮类抗生素的校准曲线线性良好，相关系数在 0.9989~0.9999 之间；对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.50 % 和 5.30% 以下，表明仪器精密度良好。不同浓度下基质加标回收率范围为 68.0%~95.5%。

**关键词：**水产品 喹诺酮类抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

喹诺酮类抗菌药 (Quinolones, QNs) 是指人工合成的一类抗菌药物，因其抗菌广谱、抗菌活性强、组织穿透力强、价格低廉、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点而广泛应用于动物和人类的多种感染性疾病的预防和治疗。此类药物主要用于预防和治疗鱼类疾病，少量使用还具有一定的促生长作用；过量使用或不当使用会造成动物源性食品中药物残留，若长期食用被此类药残污染的食品，人会产生耐药性和抗药性，严重时会引起食用者产生远期毒性作用及潜在“三致”（致癌、致畸、致突变）作用。因此，此类药物的残留问题越来越引起人们的关注。联合国粮农组织、世界卫生组织食品添加剂专家联席委员会、欧盟都已制定了恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、噁喹酸、氟甲喹在动物组织

中的最高残留限量；美国 FDA 于 2005 年宣布禁止用于治疗家禽和鱼类细菌感染的抗菌药物恩诺沙星的销售和使用；日本也在肯定列表中对恩诺沙星、环丙沙星、噁喹酸、氟甲喹的最大残留限量进行了规定。

由于水产品的蛋白质及脂肪含量高、基质复杂等原因，采用液相色谱法测定灵敏度低，超高效液相色谱与串联质谱联用法具有选择性强、灵敏度高和一次可检测多种喹诺酮类药物残留的优点，在喹诺酮类药物的确证分析中应用较多。本文建立了一种使用超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用 (UHPLC-MS/MS) 测定水产品中 10 种喹诺酮类抗生素的方法。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-20ADXR×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-20AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm I.D. × 75 mm L., 2.2 μm

流动相：A - 5 mM 乙酸铵 (含 0.1% 甲酸)；

B - 乙腈

流速：0.4 mL/min

柱温：40°C

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，梯度洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.0	Pumps	Pump B Conc.	10%
4.0	Pumps	Pump B Conc.	60%
4.5	Pumps	Pump B Conc.	60%
4.6	Pumps	Pump B Conc.	10%
6.0	Controller	Stop	

## 质谱条件

离子化模式：ESI (+)  
 离子喷雾电压：4.5 kV  
 雾化气：氮气 3.0 L/min  
 干燥气：氮气 15 L/min  
 碰撞气：氩气

DL 温度：250℃  
 加热模块温度：400℃  
 扫描模式：多反应监测 (MRM)  
 驻留时间：10 ms  
 延迟时间：3 ms  
 MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1Pre Bias(V)	CE(V)	Q3Pre Bias(V)
吡呱酸	304.2	286.1*	-30.0	-19.0	-20.0
		217.1	-30.0	-21.0	-23.0
依诺沙星	321.2	303.2*	-15.0	-18.0	-22.0
		204.1	-15.0	-41.0	-21.0
氧氟沙星	362.2	318.2*	-30.0	-18.0	-22.0
		261.1	-30.0	-26.0	-27.0
培氟沙星	334.2	316.1*	-22.0	-21.0	-16.0
		290.2	-22.0	-16.0	-30.0
环丙沙星	332.2	314.1*	-15.0	-20.0	-22.0
		231.1	-15.0	-39.0	-25.0
洛美沙星	352.2	265.1*	-12.0	-23.0	-29.0
		308.2	-12.0	-16.0	-24.0
达氟沙星	358.2	340.2*	-17.0	-19.0	-17.0
		82.2	-17.0	-44.0	-30.0
恩诺沙星	360.3	342.2*	-17.0	-21.0	-25.0
		316.2	-17.0	-18.0	-22.0
沙拉沙星	386.2	368.3*	-26.0	-20.0	-25.0
		270.2	-26.0	-44.0	-26.0
西诺沙星	263.1	245.1*	-12.0	-14.0	-12.0
		189.0	-12.0	-27.0	-19.0

注：\*表示定量离子

## 1.3 样品制备

## 1.3.1 标准溶液配制

标准物质：共 10 种，分别为依诺沙星、氧氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、吡呱酸和西诺沙星。

标准工作溶液配制：用乙腈配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用乙腈和 0.1% 甲酸水 (1/9, v/v) 溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液。各标准物质的具体浓度见表 3。

表 3 混合标准工作液中各标准物质的浓度(μg/L)

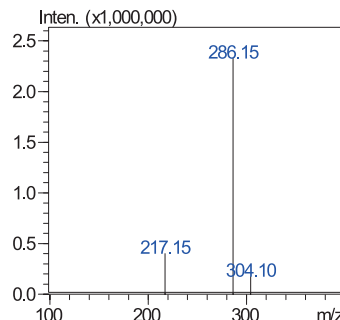
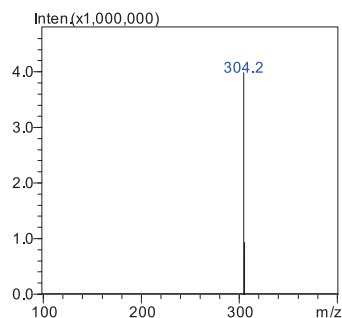
名称	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5	浓度6
吡呱酸	2	4	10	40	200	500
依诺沙星	2	4	10	40	200	500
氧氟沙星	2	4	10	40	200	500
培氟沙星	1	2	5	20	100	250
环丙沙星	0.5	1	2.5	10	50	125
洛美沙星	2	4	10	40	200	500
达氟沙星	1	2	5	20	100	250
恩诺沙星	0.5	1	2.5	10	50	125
沙拉沙星	0.4	0.8	2	8	40	100
西诺沙星	2	4	10	40	200	500

### 1.3.2 样品前处理方法

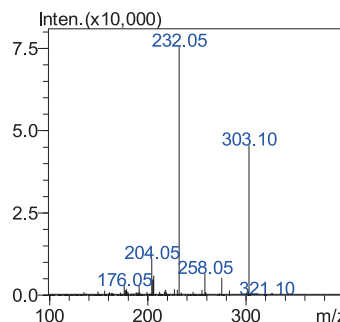
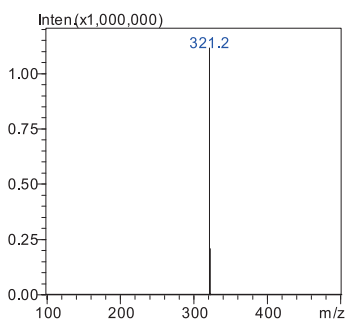
水产品基质的前处理操作方法参照国标《GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。

### 结果讨论

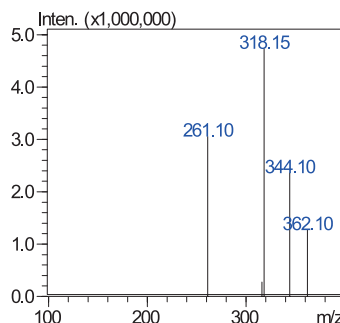
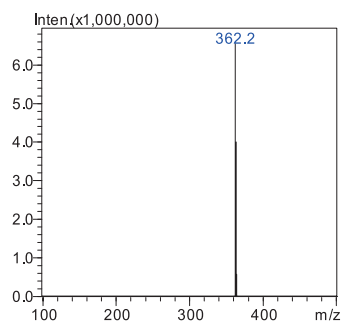
#### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



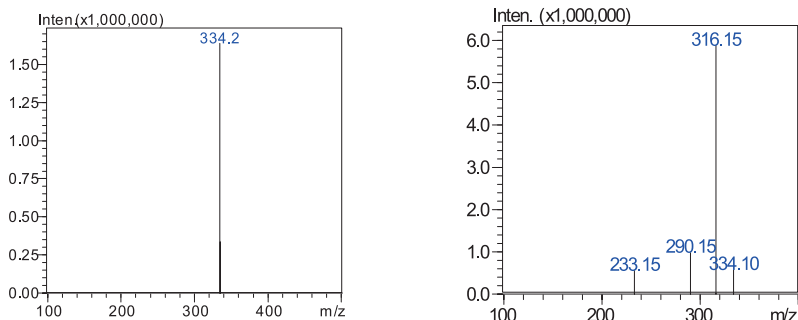
1. 吡呱酸的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-20V) (右图)



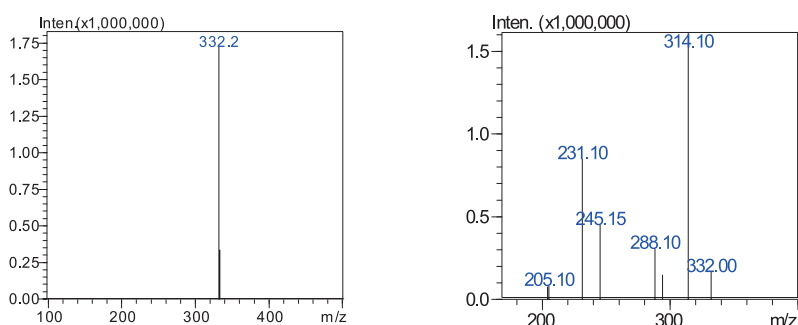
2. 依诺沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-20V) (右图)



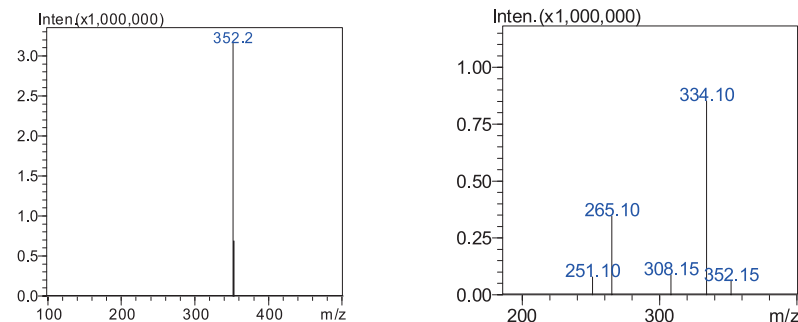
3. 氧氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-22V) (右图)



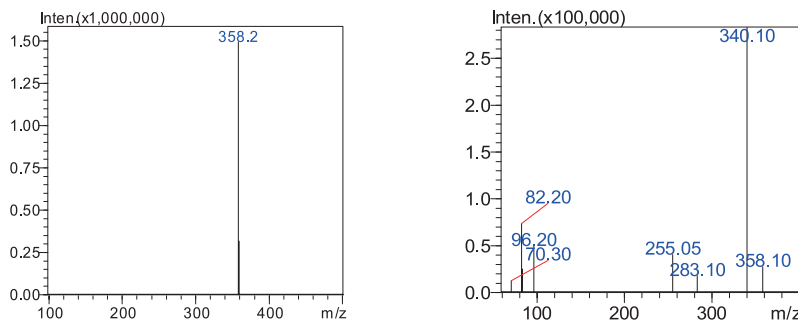
4. 培氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-21V) (右图)



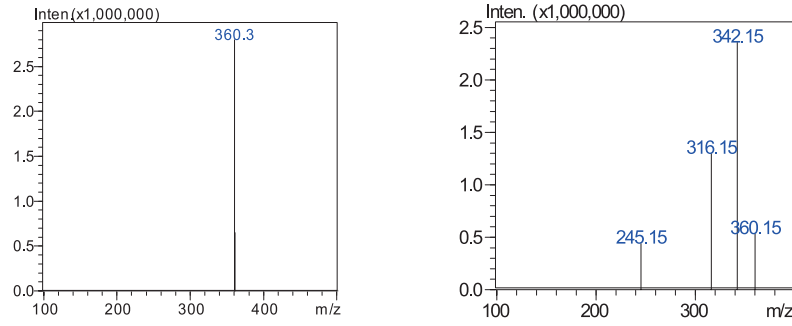
5. 环丙沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-24V) (右图)



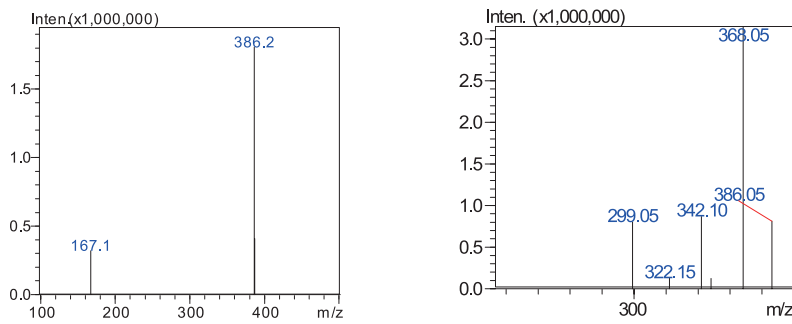
6. 洛美沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-23V) (右图)



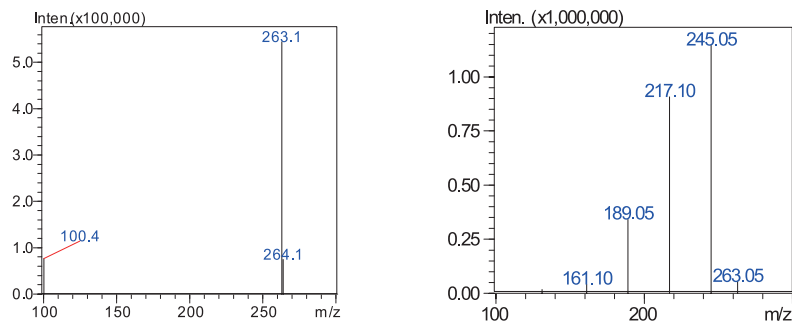
7. 达氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-30V) (右图)



8. 恩诺沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-21V)(右图)



9. 沙拉沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-22V)(右图)



10. 西诺沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值-20V)(右图)

图 1 10 种喹诺酮类抗生素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

## 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

10 种喹诺酮类抗生素标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

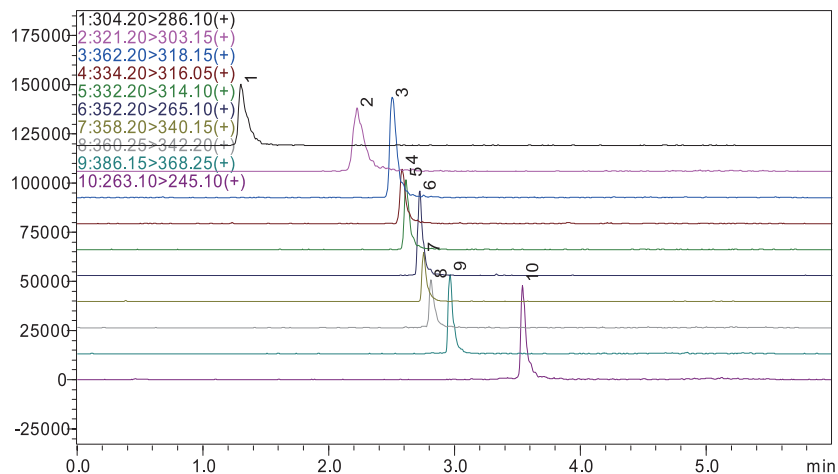
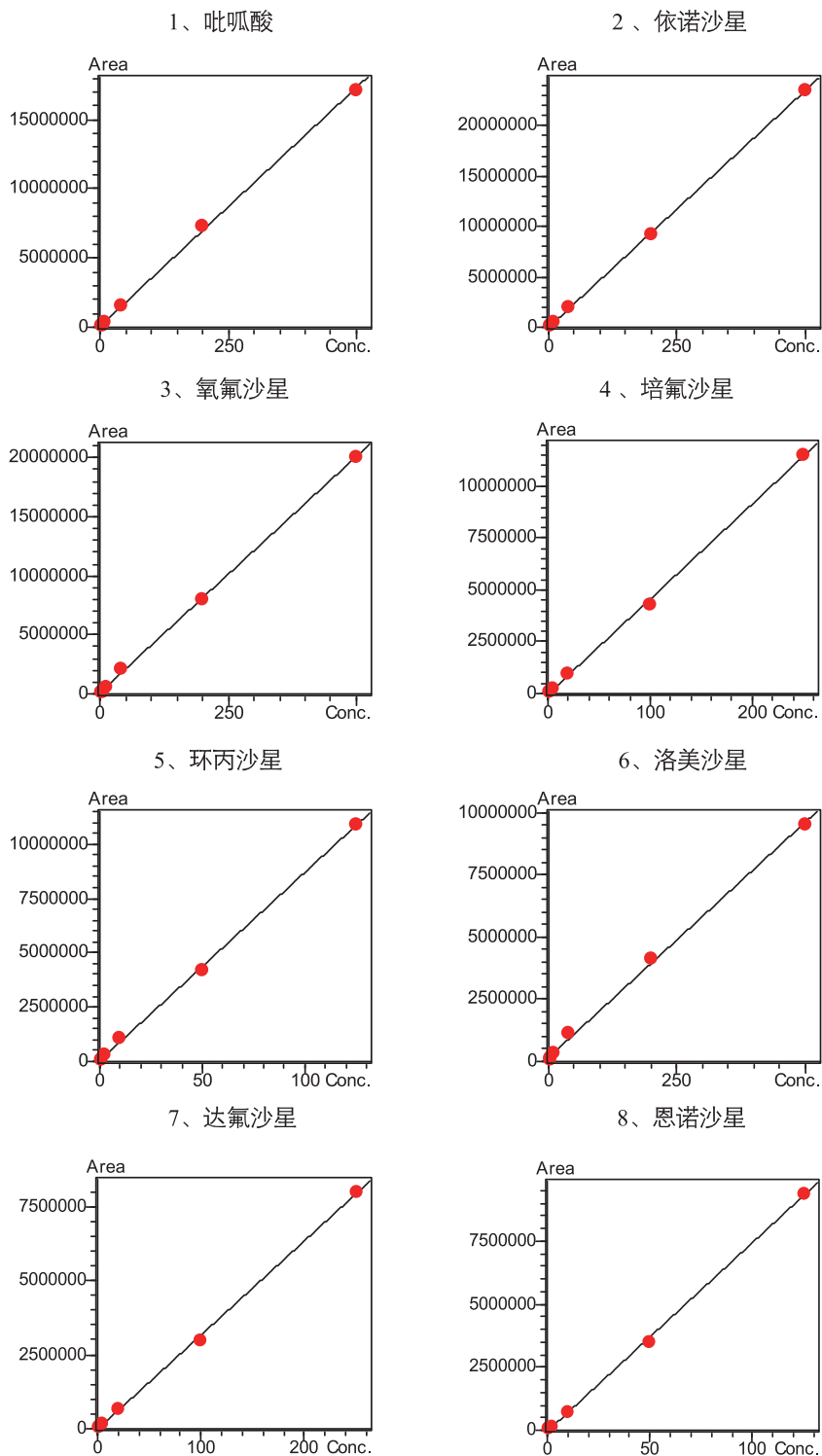


图 2 10 种喹诺酮类抗生素标准样品的 MRM 色谱图

峰型归属：1、吡呱酸(4 $\mu$ g/L)； 2、依诺沙星(4 $\mu$ g/L)； 3、氧氟沙星(4 $\mu$ g/L)；  
4、培氟沙星(2 $\mu$ g/L)； 5、环丙沙星(1 $\mu$ g/L)； 6、洛美沙星(4 $\mu$ g/L)； 7、达氟沙星  
(2 $\mu$ g/L)； 8、恩诺沙星(1 $\mu$ g/L)； 9、沙拉沙星(0.8  $\mu$ g/L)； 10、西诺沙星(4 $\mu$ g/L)

### 2.3 线性关系

将不同浓度的混合标准工作液（见表3）按1.2中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制校准曲线如图3所示，所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表4。





## 2.5 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度，配制如下浓度的标准测试样品 1 份(见表 6)，平行进样 7 次。由 7 次进样测定的标准偏差(S)计算出检出限和定量限，此时检出限 MDL = 3.14 × S，定量限 LOQ=4 × MDL。测定结果如表 6 所示。

表 6 10 种抗生素的检出限和定量限

No.	名称	浓度 (μg/L)	相对标准偏差 (RSD%)	检出限 (μg/L)	定量限 (μg/L)
1	吡呱酸	2	4.63	0.29	1.16
2	依诺沙星	2	2.85	0.18	0.72
3	氧氟沙星	2	1.63	0.10	0.40
4	培氟沙星	1	4.48	0.14	0.56
5	环丙沙星	0.5	4.40	0.07	0.28
6	洛美沙星	2	3.23	0.20	0.80
7	达氟沙星	1	2.80	0.09	0.36
8	恩诺沙星	0.5	2.80	0.05	0.20
9	沙拉沙星	0.4	1.82	0.03	0.12
10	西诺沙星	2	2.91	0.18	0.72

## 2.6 基质加标实验

以不含 10 种喹诺酮类抗生素的鱼肉作为空白样品，进行基质加标实验，加标浓度如表 7 所示。鱼肉样品的检测色谱图与加标样品色谱图分别如图 4 和图 5 所示。由表 7 结果可知该方法灵敏度高，对于鱼肉样品中的 10 种喹诺酮类抗生素检测的测定限低于国标《GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》水平。

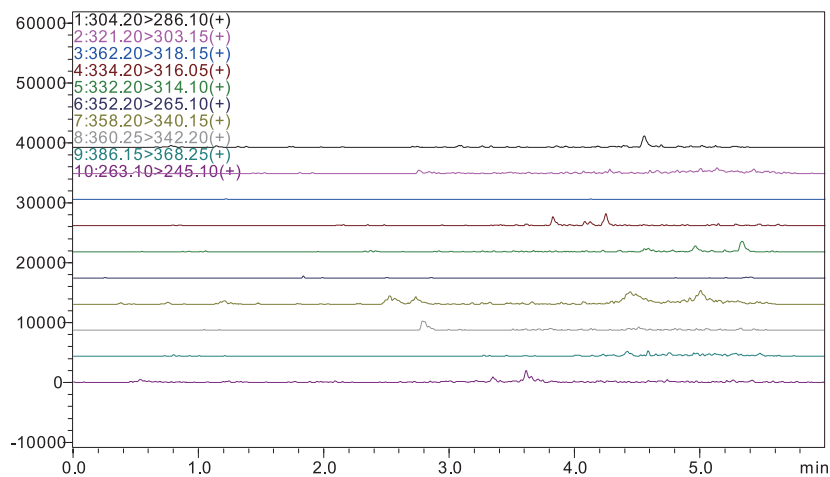


图 4 鱼肉样品的 MRM 色谱

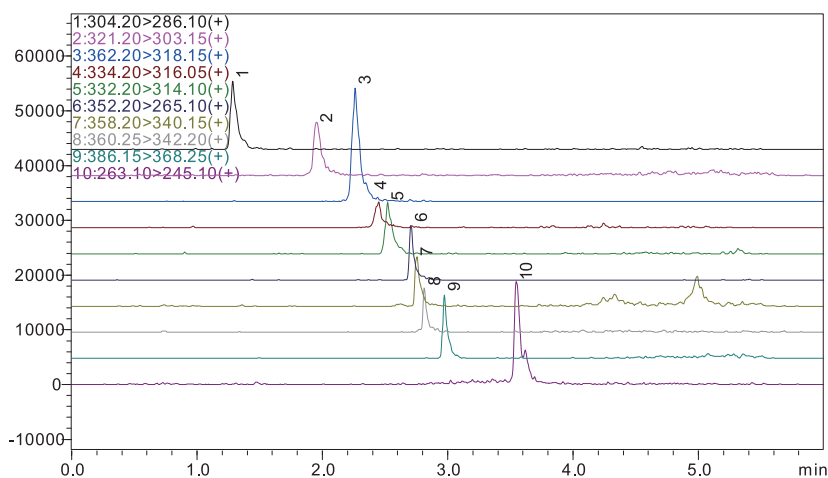


图 5 鱼肉加标样品的 MRM 色谱图(加标浓度见表 7)

峰型归属: 1、吡呱酸; 2、依诺沙星; 3、氧氟沙星; 4、培氟沙星; 5、环丙沙星;  
 6、洛美沙星; 7、达氟沙星; 8、恩诺沙星; 9、沙拉沙星; 10、西诺沙星

表 7 加标样品回收率和信噪比

编号	名称	加标含量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	信噪比 (S/N)	实测值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 (%)
1	吡呱酸	2	76	1.62	81.0
2	依诺沙星	2	46	1.36	68.0
3	氧氟沙星	2	154	1.76	88.0
4	洛美沙星	2	224	1.44	77.0
5	西诺沙星	2	51	1.91	95.5
6	培氟沙星	1	33	0.92	92.0
7	达氟沙星	1	42	0.83	83.0
8	环丙沙星	0.5	55	0.37	74.0
9	恩诺沙星	0.5	41	0.38	76.0
10	沙拉沙星	0.4	104	0.33	82.5

## 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定水产品中 10 种喹诺酮类抗生素的分析方法。该方法在 6.0 min 之内完成 10 种目标物的分离分析, 标准曲线的相关系数在 0.9989~0.9999 之间。对不同浓度的标准溶液进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.50 % 和 5.30 % 以下, 系统精密度良好。该方法具有超快速、高灵敏的特点, 检出限低于国标《GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》, 适合动物水产品中喹诺酮类抗生素残留量的快速检测。