

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定鸡肉中喹诺酮类抗生素残留

LCMSMS-268

**摘要：** 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-8045 联用测定鸡肉中 12 种喹诺酮类抗生素的方法。该方法在 9 min 内完成 12 种抗生素的分析，校准曲线的相关系数均在 0.997 以上。对不同浓度抗生素的混合标准溶液各平行测试 6 次，12 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.27% 和 1.13~4.93% 之间，仪器精密度高。对于不同浓度下基质加标回收率范围在 91.90~108.60% 之间。该方法可应用于鸡肉中 12 种喹诺酮类抗生素残留的同时检测。

**关键词：** 三重四极杆质谱 喹诺酮 鸡肉 抗生素

喹诺酮类药物 (Quinolones, QNs) 是一类人工合成的广谱杀菌性抗菌药物，因其抗菌谱广、抗菌活性强等优点，而广泛应用于人、家禽、家畜的多种感染性疾病的预防和治疗。但过量或不正当使用会导致动物体内 QNs 药物残留量过高。特别是食品源性动物除其本身的毒副作用对人体造成直接危害外，人类长期食用含 QNs 药物的动物性食品容易诱导耐药性的传递，从而影响该类药物对人体的临床疗效。因此，喹诺酮类药物的残留问题越来越引起人们的关注。美国，日本，欧盟及我国都对食品中 QNs 最大残留量有相关规定，根据不同品

种、组织和药物种类，食品中 QNs 药物的最大残留量为 10~6000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

鸡肉作为我国大量使用的肉类食品，对鸡肉中喹诺酮类药物的残留检测，具有重要的意义。高效液相色谱-串联质谱联用技术是近些年来快速发展的分析技术，具有很高的选择性和灵敏度，对复杂基质中的抗生素类残留具有很强的定性和定量能力，准确度高，是目前超痕量残留分析的首选方法。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-8045 联用测定鸡肉中 12 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-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.86 色谱工作站。

### 1.2 分析条件

#### 液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS 2.1 mm I.D. $\times$  100 mm L.,  
1.9  $\mu\text{m}$

流动相：A 相 -0.2% 甲酸水溶液；  
B 相 - 乙腈 / 甲醇 (6:4)

流速：0.4 mL/min

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样量：10  $\mu\text{L}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，  
洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.50	Pumps	Pump B Conc.	40
4.60	Pumps	Pump B Conc.	95
5.50	Pumps	Pump B Conc.	95
5.60	Pumps	Pump B Conc.	10
9.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8045

离子化模式: ESI(+)

加热气: 空气 10.0 L/min

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

源温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM优化参数

NO	化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	吡哌酸	Pipemidic Acid	51940-44-4	304.1	286.1*	-16	-21	-20
					215.1	-30	-38	-24
2	依诺沙星	Enoxacin	84294-96-2	321.1	303.1*	-13	-22	-11
					232.1	-13	-35	-16
3	氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	362.1	318.2*	-12	-21	-22
					261.1	-12	-29	-18
4	诺氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	320.0	302.1*	-11	-22	-21
					231.1	-11	-39	-24
5	培氟沙星	Pefloxacin	149676-40-4	334.1	316.1*	-28	-23	-22
					290.1	-13	-18	-14
6	环丙沙星	Ciprofloxacin	93107-08-5	332.0	314.1*	-11	-16	-24
					231.0	-11	-37	-25
7	洛美沙星	Lomefloxacin	98079-52-8	352.1	265.1*	-16	-25	28
					308.1	-16	-17	-21
8	达氟沙星	Danofloxacin	119478-55-6	358.1	340.1*	-14	-24	-12
					255.1	-14	-40	-17
9	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	360.1	316.2*	-12	-20	-11
					342.1	-12	-20	-11
10	西诺沙星	Cinoxacin	28657-80-9	263.0	245.0*	-28	-15	-26
					217.0	-28	-23	-22
11	奥索利酸	Oxolinic Acid	14698-29-4	262.1	244.0*	-17	-18	-26
					216.1	-30	-28	-23
12	氟甲喹	Flumequine	42835-25-6	262.1	244.1*	-16	-16	-17
					202.0	-16	-36	-22

注: \*表示定量离子

### 1.3 标准溶液的配制

分别称取喹诺酮标准品适量，用甲醇溶解、配制成 1.0 mg/mL 的混合标准储备液，置于 -18℃ 冰箱中保存。取准确体积的标样储备液，加入到空白鸡肉基质中，依次配制成 0.2 ng/mL，0.5 ng/mL，1 ng/mL，5 ng/mL，10 ng/mL，20 ng/mL，50 ng/mL 浓度的混合标准工作液。

### 1.4 样品前处理方法

鸡肉样品的前处理操作方法参照国标《GB/T 21312-2007 动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》。称取均质试样 5.0 g (精确到 0.1 g)，置于 50 mL 聚丙烯离心管中，加入 20 mL 0.1 mol/L EDTA-Mellvaine 缓冲液，涡旋混匀后超声提取 10 min，10000 r/min 离心 5 min，提取 3 次合并上清液。取上清液 6 mL 经 HLB 固相萃取柱 (200 mg，6 mL) 净化，使用前分别用 6 mL 甲醇、6 mL 水活化，然后用 2 mL 5% 甲醇水溶液淋洗，弃去滤液，将小柱抽干，再用 6 mL 甲醇洗脱并收集洗脱液。洗脱液用氮气吹干，用 1 mL 流动相溶解，涡旋混匀后过 0.22 μm 滤膜，然后进液相色谱 - 串联质谱测定。

## 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

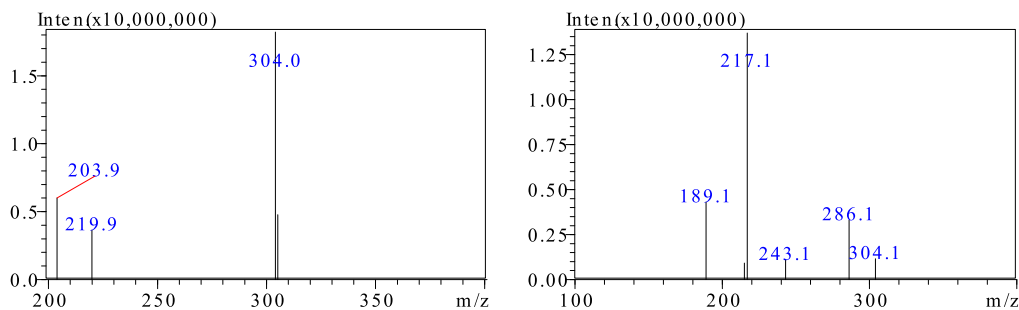


图1 吡哌酸的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值为-20V)(右图)

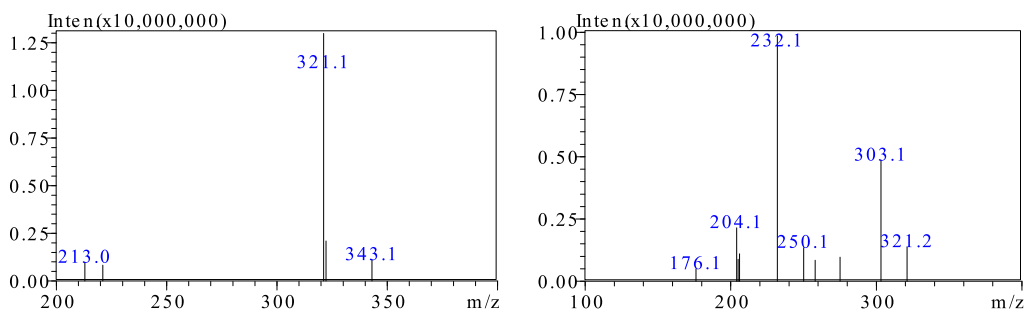


图2 依诺沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值为-30V)(右图)

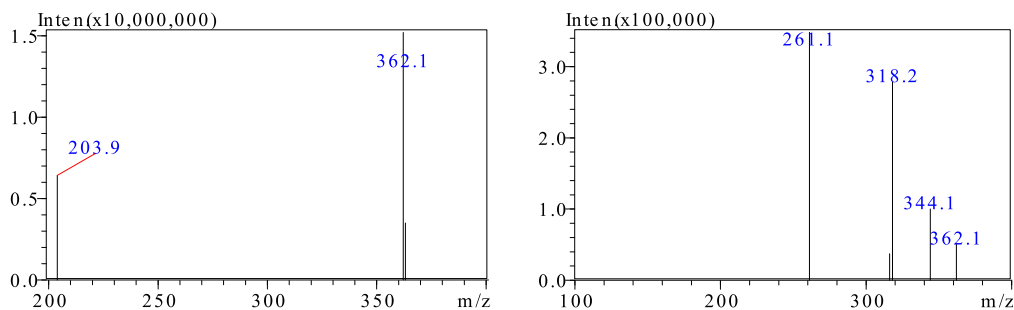


图3 氧氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值为-25V)(右图)

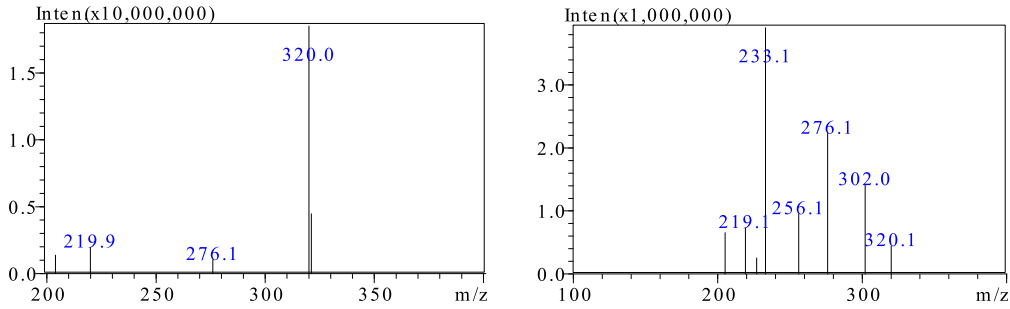


图4 诺氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE值为-25V) (右图)

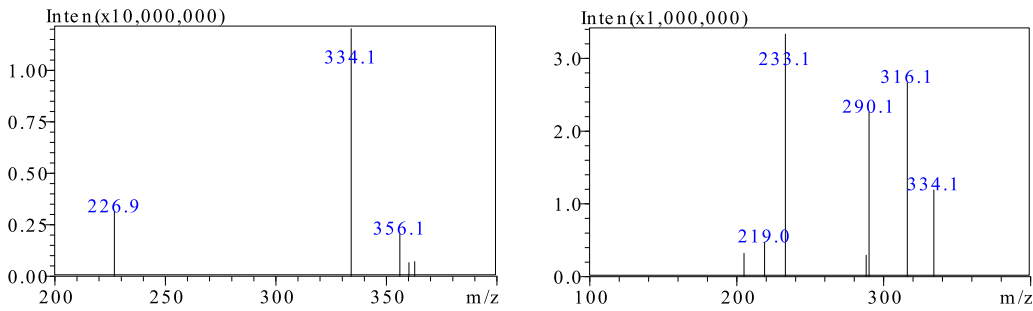


图5 培氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-25V) (右图)

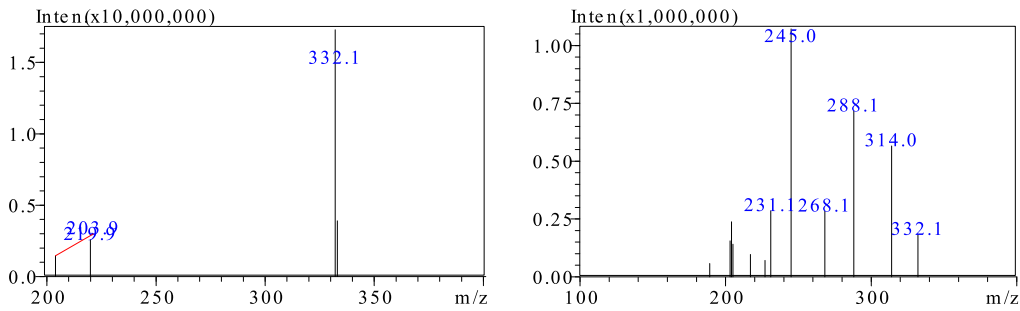


图6 环丙沙星的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-25V) (右图)

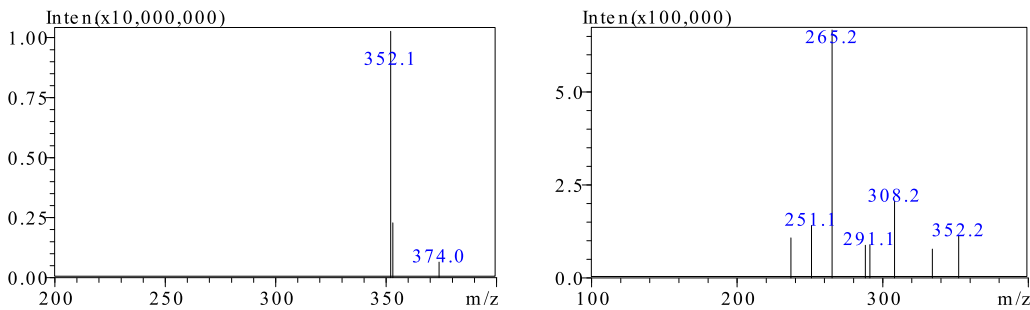


图7 洛美沙星的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-25V) (右图)

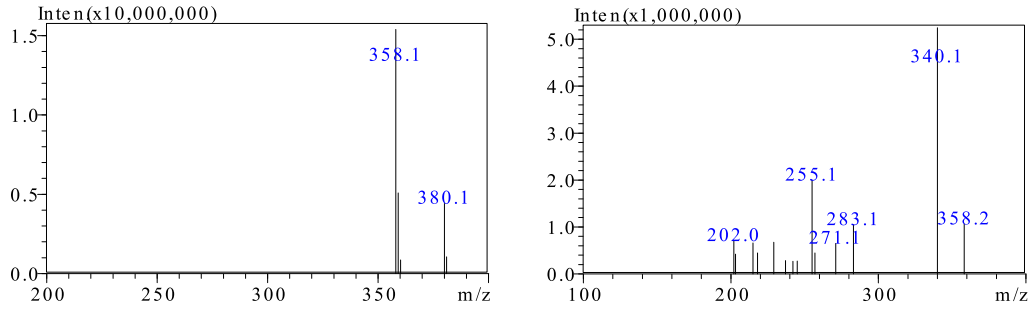


图8 达氟沙星的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-25V)(右图)

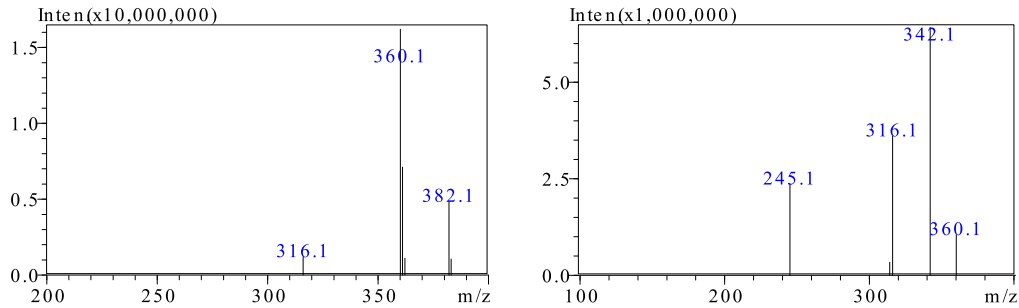


图9 恩诺沙星的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-25V)(右图)

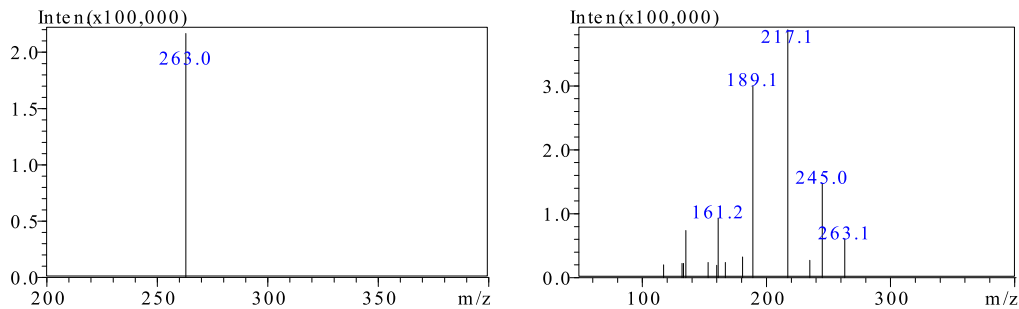


图10 西诺沙星的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-30V)(右图)

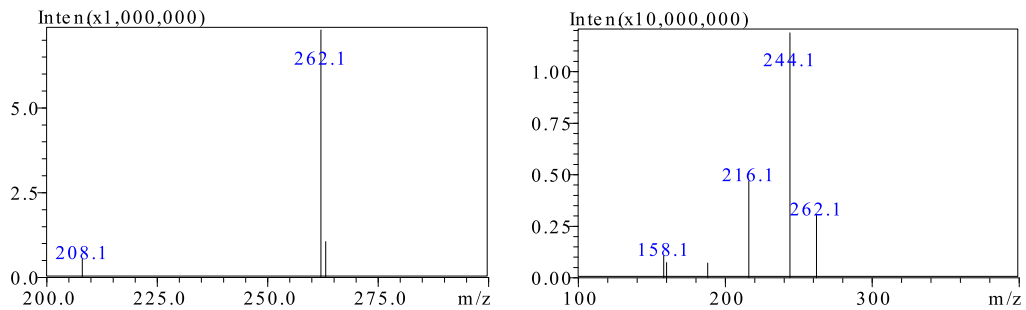


图11 奥索利酸的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-25V)(右图)

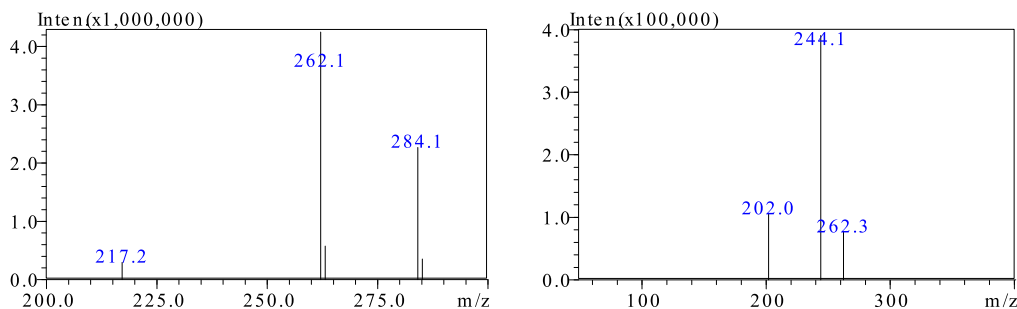


图12 氟甲嗪的一级质谱图(左图)和产物离子质谱扫描图(CE值为-35V)(右图)

2.2 12种喹诺酮标准溶液的MRM色谱图(1 ng/mL)

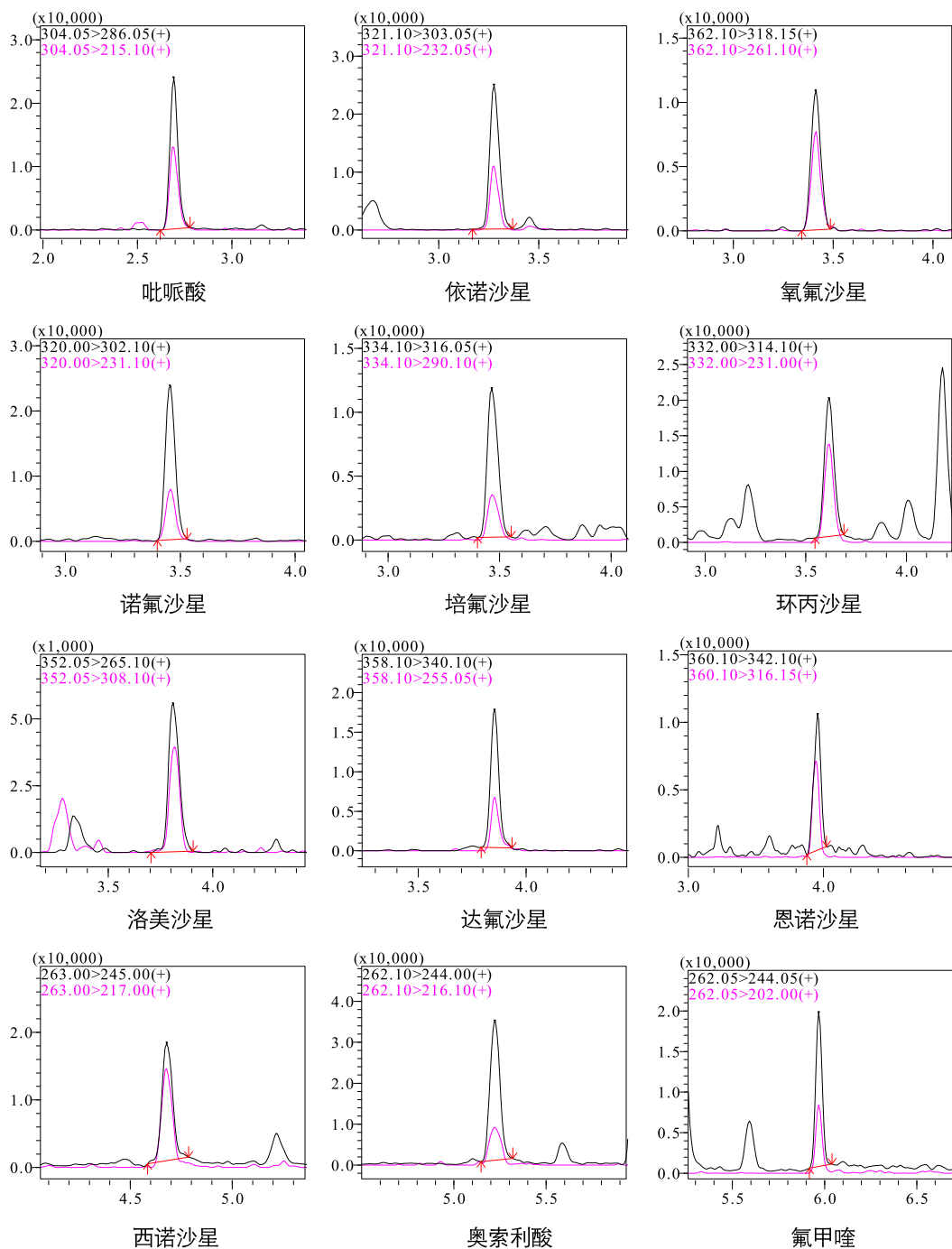


图3 1 ng/mL 12种喹诺酮的MRM色谱图

### 2.3 线性范围

取 5 g 空白鸡肉基质 1 份, 得到约 60 mL 提取液, 将提取液按上述净化过程进行处理, 得到 10 mL 空白基质提取液。用该空白基质溶液稀释标准储备液, 配制成 0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 浓度的混合标准工作液。以工作溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线 (见下图 14), 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程及相关系数见表 3。

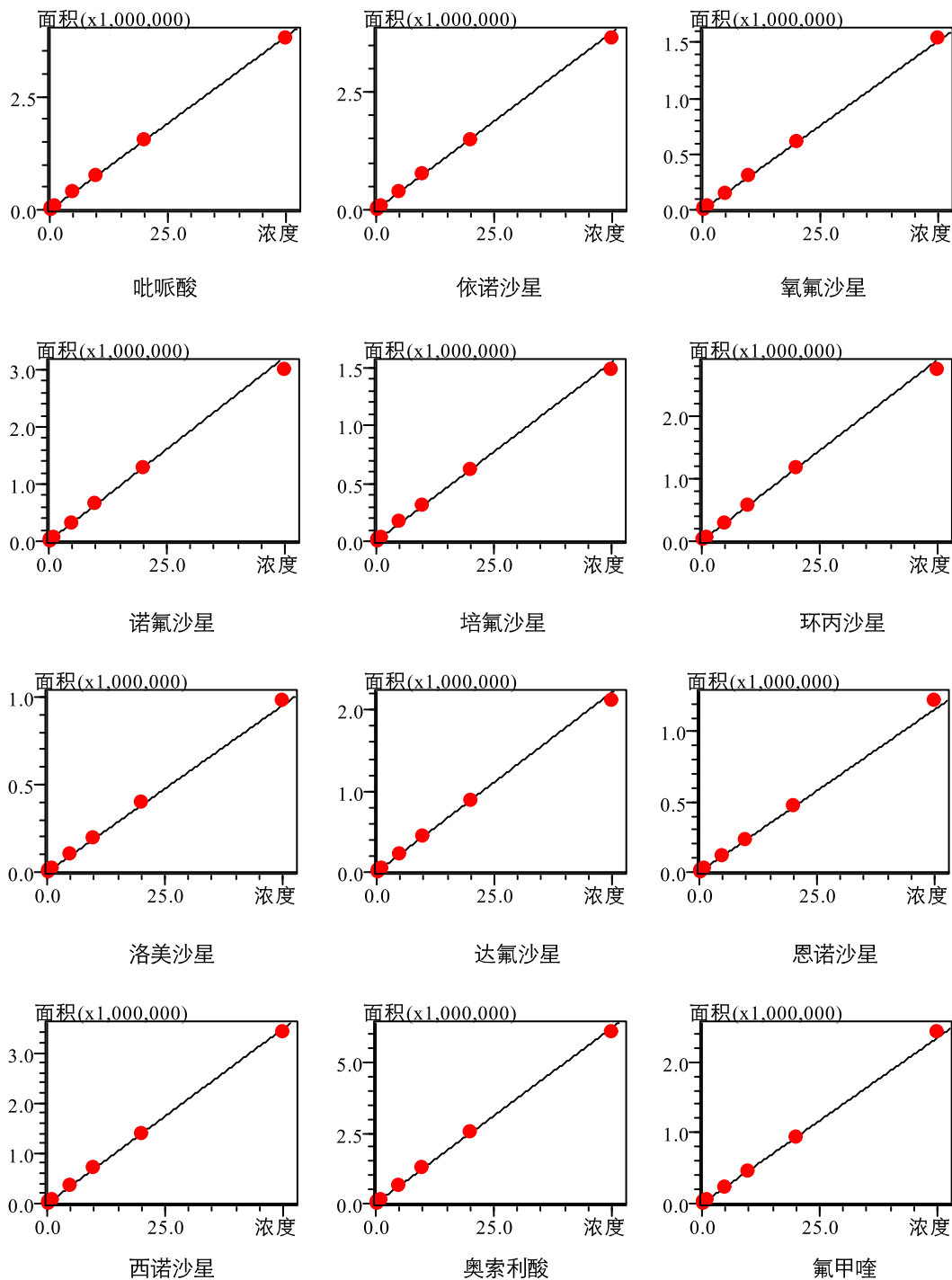


图14 12种喹诺酮的标准曲线

表3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	相关系数 r	准确度%
1	吡哌酸	$Y = (76616.3)X + (-2517.68)$	0.2~50	0.9998	96.1~104.1
2	依诺沙星	$Y = (75235.4)X + (832.686)$	0.2~50	0.9996	87.9~109.4
3	氧氟沙星	$Y = (30271.5)X + (-849.705)$	0.2~50	0.9998	90.9~106.6
4	诺氟沙星	$Y = (64434.1)X + (1680.13)$	0.2~50	0.9988	85.7~112.4
5	培氟沙星	$Y = (30801.7)X + (579.667)$	0.2~50	0.9990	89.5~109.8
6	环丙沙星	$Y = (58040.6)X + (4785.98)$	0.2~50	0.9990	90.7~114.2
7	洛美沙星	$Y = (19629.0)X + (-749.499)$	0.2~50	0.9997	89.8~107.5
8	达氟沙星	$Y = (44434.3)X + (911.073)$	0.2~50	0.9995	91.1~110.6
9	恩诺沙星	$Y = (23178.6)X + (76.5354)$	0.2~50	0.9975	87.2~111.3
10	西诺沙星	$Y = (69528.6)X + (284.320)$	0.2~50	0.9995	92.1~111.6
11	奥索利酸	$Y = (124807)X + (4369.16)$	0.2~50	0.9999	87.5~113.0
12	氟甲喹	$Y = (18436.0)X + (814.851)$	0.2~50	0.9987	91.2~108.2

#### 2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.27% 和 1.13~4.93% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性及灵敏度结果

样品名称	RSD% (0.2 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
吡哌酸	0.23	4.93	0.21	2.54	0.24	1.85
依诺沙星	0.16	3.73	0.18	1.21	0.19	1.79
氧氟沙星	0.27	4.93	0.17	1.59	0.18	1.66
诺氟沙星	0.17	4.91	0.16	1.92	0.19	1.13
培氟沙星	0.16	4.77	0.17	2.06	0.19	2.01
环丙沙星	0.07	3.88	0.15	1.34	0.18	2.29
洛美沙星	0.15	3.37	0.15	1.70	0.18	1.45
达氟沙星	0.17	3.23	0.15	2.61	0.16	3.74
恩诺沙星	0.23	4.88	0.13	3.16	0.15	1.81
西诺沙星	0.10	3.32	0.11	1.40	0.10	1.34
奥索利酸	0.09	2.15	0.09	1.69	0.07	1.44
氟甲喹	0.04	3.43	0.03	3.37	0.03	2.00

## 2.5 灵敏度实验

配制 0.2 ng/mL 抗生素的混合标准溶液进样, 为考察仪器的灵敏度, 将低浓度混合标准工作液按 1.2 中的分析条件下进行测定。通过 LabSolutions Ver. 5.86 软件计算信噪比 (采用 RMS 计算方式), 检出限和定量限, 12 种化合物的信噪比和方法检出限如下表 5 所示。

表5 信噪比(S/N)和方法检出限以及定量限

名称	浓度水平(ng/mL)	S/N	检出限 (ng/mL)	定量限(ng/mL)
吡哌酸	0.20	15.43	0.04	0.13
依诺沙星	0.20	31.11	0.02	0.07
氧氟沙星	0.20	21.89	0.03	0.10
诺氟沙星	0.20	39.04	0.02	0.06
培氟沙星	0.20	19.21	0.04	0.12
环丙沙星	0.20	56.02	0.01	0.04
洛美沙星	0.20	39.68	0.02	0.06
达氟沙星	0.20	29.48	0.02	0.07
恩诺沙星	0.20	13.34	0.05	0.16
西诺沙星	0.20	29.57	0.07	0.21
奥索利酸	0.20	44.84	0.02	0.05
氟甲喹	0.20	18.66	0.03	0.09

## 2.6 基质加标实验

按照 1.4 中样品制备方法, 空白基质处理完之后, 采用后加标的方式, 添加标样浓度为 0.5 ng/mL、10 ng/mL 和 40 ng/mL, 各平行测定 3 次, 结果如表 6。

表6 基质加标实验结果

序号	名称	加标浓度 0.5 ng/mL		加标浓度 10 ng/mL		加标浓度 40 ng/mL	
		检测平均值 (ng/mL)	回收率 (%)	检测平均值 (ng/mL)	回收率 (%)	检测平均值 (ng/mL)	回收率 (%)
1	吡哌酸	0.54	108.60	10.22	102.20	39.02	97.55
2	依诺沙星	0.50	100.23	9.72	97.23	37.34	93.38
3	氧氟沙星	0.51	101.93	9.59	95.90	38.84	97.08
4	诺氟沙星	0.48	96.35	9.82	98.20	37.16	92.90
5	培氟沙星	0.47	94.08	10.01	100.08	37.37	93.43
6	环丙沙星	0.47	94.23	9.90	99.03	37.12	92.83
7	洛美沙星	0.46	93.70	9.33	93.40	38.51	96.30
8	达氟沙星	0.47	93.05	9.72	97.20	36.77	91.90
9	恩诺沙星	0.48	95.85	9.86	98.63	39.70	99.25
10	西诺沙星	0.48	95.78	9.82	98.25	37.71	94.28
11	奥索利酸	0.50	100.65	10.24	102.45	39.36	98.43
12	氟甲喹	0.50	100.50	10.05	100.60	39.40	98.50

测试结果显示：12 种抗生素样品的加标回收率在 91.90~108.60% 之间。

## ■ 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-8045 联用测定鸡肉中喹诺酮类抗生素残留的方法。该方法在 9 min 内完成 12 种抗生素的分析，校准曲线的相关系数均在 0.997 以上。对 0.2 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 抗生素的混合标准溶液，各平行测试 6 次，12 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.27% 和 1.13~4.93% 之间，仪器精密度良好。对于加标浓度为 0.5 ng/mL，10 ng/mL 和 40 ng/mL 的鸡肉样品，各平行测定 3 次，加标回收率在 91.90~108.60% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势，可用于鸡肉中多种抗生素残留检测。