

14 种喹诺酮类药物的残留检测

背景

养殖环节用药不当是造成兽药残留的最主要原因，尽管我国农业部对养殖方法有明文规定，但是总有养殖户为了追求最大的经济效益，违背相关法律法规进行养殖，例如将禁用药物（盐酸克伦特罗）当作添加剂添加到猪饲料中，从而引起瘦肉精中毒。兽药残留产生的危害会影响很多方面，最主要的是会在人体内蓄存以致发生急慢性中毒；对于动物体而言，反复接触抗菌药物，其体内的敏感菌株会产生抗药性，使得常规药物在临床上的治疗效果越来越差；其次，接触了药物以后的动物，它们的粪便和尿液随着排泄会稳定的存在于周围环境中，从而造成环境污染。

适用范围

本方法（参照 GB/T21312-2007）适用于猪肉、猪肝、猪肾、牛奶、鸡蛋等动物源性食品中氟罗沙星、氧氟沙星、依诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、达氟沙星、奥比沙星、双氟沙星、沙拉沙星、司帕沙星、奥索利酸、萘啶酸、氟甲喹等 14 种喹诺酮类兽药残留的检测。

实验步骤

1、试剂准备

- 甲醇（CH₃OH）：色谱纯
- 乙腈（CH₃CN）：色谱纯
- 乙二胺四乙酸二钠（EDTA）：色谱纯
- 甲酸（HCOOH）：色谱纯
- 水：GB/T 6682 规定的一级水
- 柠檬酸：分析纯
- 磷酸氢二钠：分析纯

1-1、仪器

- 1 • 高效液相色谱-串联质谱仪
- 2 • 电子天平：感量 0.0001 g
- 3 • 电子天平：感量 0.01 g
- 4 • 旋涡混合器
- 5 • 冷冻离心机
- 6 • 聚丙烯离心管
- 7 • 氮吹仪
- 8 • 固相萃取装置

1-2、溶液配制

- 5%甲醇水溶液：准确量取 5 mL 的甲醇，倒入 100 mL 的容量瓶中，用水溶液定容至刻度，摇匀。
- 0.2%甲酸水：取 2 mL 的甲酸，加入 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。
- 0.1%甲酸水：取 1 mL 的甲酸，加入 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀。

0.1 mol/L 柠檬酸水溶液：准确称取 21.01 g 柠檬酸，加入 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀

0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液：准确称取 71.63 g 磷酸氢二钠，加入 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀

Mcllvaine 缓冲溶液：将 1000 mL 的 0.1 mol/L 柠檬酸水溶液与 625 mL 的 0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液混合，必要时用盐酸或者氢氧化钠调节 pH 为 4.0 ± 0.05 。

0.1 mol/L EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液：准确称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠，放入 1625 mL 的 Mcllvaine 缓冲溶液中，摇晃混匀。

2、样品提取

牛奶和鸡蛋

称取均质试样 5.0g（精确到 0.01g）置于 50mL 离心管中，加入 40mL 0.1mol/L EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液，1000r/min 涡旋混合 1min，超声提取 10min，10000r/min 离心 5min（温度低于 5℃），取上清液。

3、净化

SPE 柱：SelectCore HLB 固相萃取柱（200mg/6mL）

活化：依次用 6 mL 的甲醇和水活化；

上样：加入提取好的全部上清液；

淋洗：2 mL 5% 甲醇水溶液进行淋洗，淋洗结束后再减压抽干；

洗脱：6mL 甲醇溶液进行洗脱，洗脱液在 40℃ 下用氮气吹干，用 1mL 0.2% 甲酸水复溶后过 0.22 μ m 有机滤膜，上机。

4、液相色谱仪器条件

色谱柱：ChromCore™ C18, 3 μ m

规格：2.1 \times 100mm

流动相：A）：0.1% 甲酸水溶液；

B）：乙腈

洗脱梯度：

时间 (min)	A%	B%	流速 (mL/min)
0.00	90	10	0.400
1.00	70	30	0.400
4.00	30	70	0.400
6.00	0	100	0.400
8.00	0	100	0.400
8.10	90	10	0.400
12.00	90	10	0.400

流速：0.4 mL/min

柱温：40 °C

进样体积：1 μ L

5、质谱条件

离子源：电喷雾离子源（Electrospray ionization, ESI）正离子扫描

监测方式：多反应监测（Multiple Reaction Monitoring, MRM）

雾化气流量：3L/min

加热器流量：10L/min

干燥气流量：10L/min

接口温度：300 °C

DL 温度：250 °C

加热块温度：400 °C

6、实验谱图

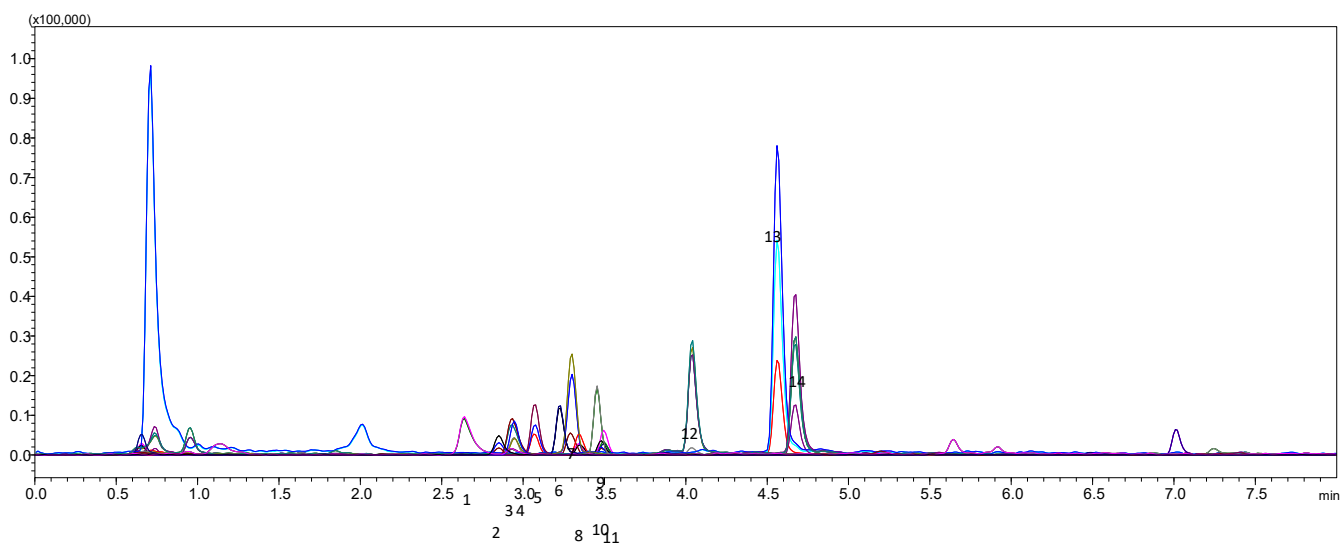


图 1：10ng/mL 14 种喹诺酮类药物标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图

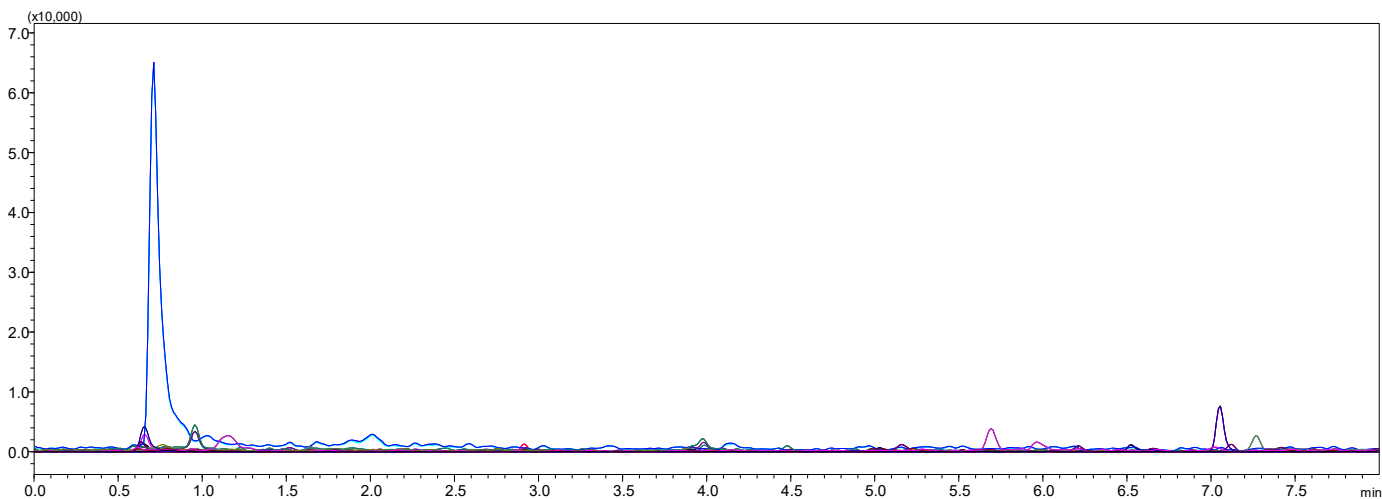


图 2：空白样品里 14 种喹诺酮类残留量的多反应监测（MRM）色谱图

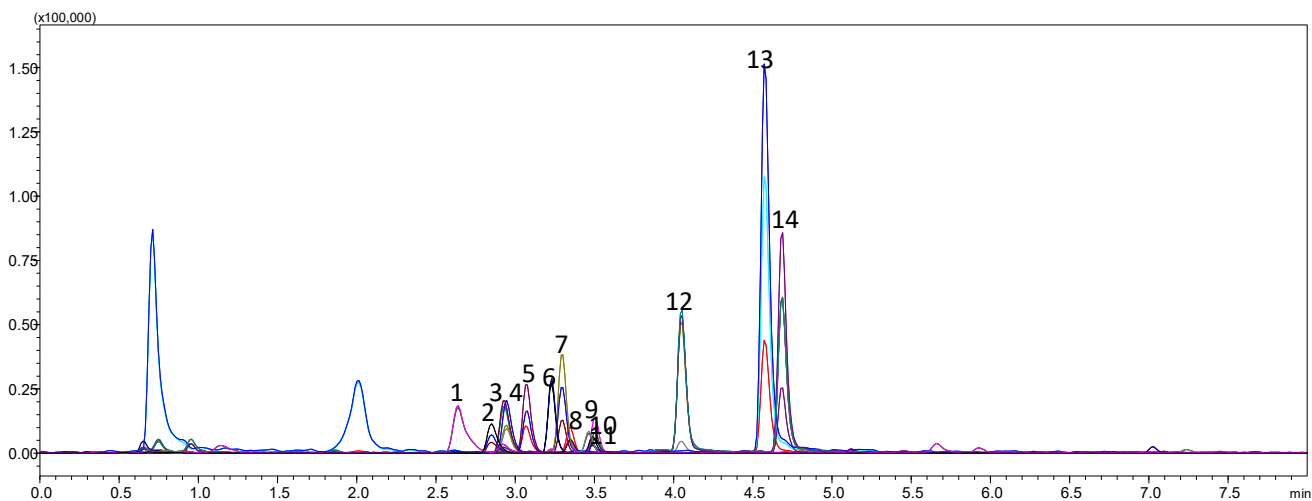


图 3：鸡蛋基质中添加量为 4.0µg/kg 14 种喹诺酮类药物标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图

样品加标回收率实验结果（添加水平为 4.0µg/kg）

样品名称	化合物（中	化合物（英文）	保留时间	m/z	加标量	平均回收
------	-------	---------	------	-----	-----	------

	文)		(min)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	率%
1	依诺沙星	enoxacin	2.659	321.0>303.0	4.0	84.05
2	氟罗沙星	fleroxacin	2.865	369.9>326.0	4.0	105.06
3	诺氟沙星	norfloxacin	2.943	320.0>302.0	4.0	90.93
4	氧氟沙星	ofloxacin	2.957	362.1>318.2	4.0	90.67
5	环丙沙星	ciprofloxacin	3.080	331.9>314.0	4.0	88.76
6	达氟沙星	danofloxacin	3.233	357.9>340.0	4.0	81.96
7	恩诺沙星	enrofloxacin	3.307	360.0>342.1	4.0	93.79
8	奥比沙星	orbifloxacin	3.351	395.90>352.1	4.0	85.79
9	沙拉沙星	sarafloxacin	3.468	386.1>368.0	4.0	86.96
10	双氟沙星	difloxacin	3.493	399.9>355.9	4.0	109.01
11	司帕沙星	sparfloxacin	3.507	393.0>349.2	4.0	105.15
12	噁喹酸	oxolinic acid	4.060	261.9>244.1	4.0	114.85
13	萘啶酸	nalidixic acid	4.589	232.9>215.0	4.0	93.26
14	氟甲喹	flumequin	4.697	261.9>243.9	4.0	108.13

7、实验结论

由以上数据和图谱可知，纳谱分析 SelectCore HLB 小柱能有效去除杂质的干扰，对目标物质有良好的保留和洗脱能力，回收率也较好，符合国标动物源性食品中 14 种喹诺酮类兽药残留的检测要求。