

液质联用法同时测定猪粪便中 16 种 (氟)喹诺酮类药物残留

赵 扬¹, 郑志明¹, 金社胜¹, 周大卫¹, 侯晓林^{2*}

(1.商务部流通产业促进中心, 北京 100070; 2.北京农学院动物科技学院, 北京 102206)

摘 要:为检测猪粪便中氟喹诺酮类药物残留,建立了高效液相色谱-串联质谱方法,可同时测定猪粪便中环丙沙星、诺氟沙星等 16 种氟喹诺酮类药物的残留量。样品经 50%硝酸镁-4%氨水混合溶液提取,过 HLB 固相萃取小柱净化,HPLC-MS/MS 多反应监测模式下进行定性及定量分析,16 种氟喹诺酮类药物在 40~200 ng·mL⁻¹ 浓度范围内呈现良好线性关系,西诺沙星和沙拉沙星检出限为 0.005 μg·g⁻¹,其他 FQs 药物检出限均为 0.002 μg·g⁻¹。添加浓度为 0.05、0.5、1.0 μg·g⁻¹ 时,方法平均回收率为 51.4%~109.3%,RSD 小于 20%。该方法前处理简单、快速、灵敏、准确,仅使用少量有机试剂,检测成本低,对环境危害小。

关键词:氟喹诺酮类药物;猪粪便;高效液相色谱-串联质谱

中图分类号:X830.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)06-1248-06

Simultaneous Determination of Sixteen(Fluoro) Quinolones Residues in Pig Faeces by Liquid Chromatography-mass Spectrometry

ZHAO Yang¹, ZHENG Zhi-ming¹, JIN She-sheng¹, ZHOU Da-wei¹, HOU Xiao-lin^{2*}

(1.Circulation Industry Promotion Center of the Ministry of Commerce, Beijing 100070, China; 2.Animal Science College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was established for the determination of sixteen fluoroquinolones and quinolones in pig faeces. The sample was extracted using an aqueous solution of Mg(NO₃)₂ 50% (W/V) containing 4% of ammonia. After centrifugation, the extract supernatant was loaded upon a HLB solid phase extract cartridge, and was washed using 2% methanol in water. The targets were eluted by 5 mL of 4% ammonia in methanol. The chromatography separation was on an UPLC BEH C18 chromatography column with a gradient procedure, and detection was based on an electrospray positive ion source and MRM mode. The calibration curves were of well linearity for all compounds from 40 ng·mL⁻¹ to 200 ng·mL⁻¹. The limits of detection for the method was 0.005 μg·g⁻¹ for sarafloxacin and cinoxacin, and 0.002 μg·g⁻¹ for the other 14 compounds, respectively, in the samples. The average recoveries at the three concentrations were at 0.05, 0.5 μg·g⁻¹ and 1.0 μg·g⁻¹ in spiked pig faeces, respectively, ranged from 51.4% to 109.3% (n=6), with relative standard deviations of less than 20%. The real samples were detected, and ciprofloxacin, enrofloxacin, ofloxacin, sarafloxacin were the main residues. The method was simple, rapid, sensitive, reproducible, and could be used for the determination of the sixteen fluoroquinolones in pig faeces.

Keywords: (fluoro) quinolones; pig faeces; LC-MS/MS

随着我国养殖业和屠宰加工业集约化、规模化发展,兽药的使用量与日俱增。据报道,进入动物体内的

药物有相当一部分随粪、尿排泄物排出^[1],但绝大多数养殖场在建厂初期未考虑畜禽粪便处理,粪便随地堆积,而这些含有大量药物残留畜禽粪尿液大多直接流入江河或渗入地下,引起水质和土壤的污染,造成人类过敏反应及病原菌耐药性等问题,影响人类健康和环境生态安全。

本文结合国际研究的重点,根据我国药物使用情

收稿日期:2010-12-08

基金项目:国家高技术研究发展计划(863)项目(2007AA062.0404);北京市属高等学校人才强教计划

作者简介:赵 扬(1980—),女,吉林人,硕士,工程师,主要从事环境污染与食品相关理化分析研究。E-mail:zhyang56@163.com

* 通讯作者:侯晓林 E-mail:hxlxsx@163.com

况,选择目前应用最为广泛的氟喹诺酮类(Fluoro-quinolones,FQs)抗生素作为研究对象,以养殖屠宰废弃物猪粪便为研究基质,结合固相萃取样品净化技术,建立氟喹诺酮类药物的液-质联用检测技术,为环境危害评估和环境治理奠定基础。目前,国内外关于FQs药物多残留检测的分析方法报道较多^[2-10],但是关于猪粪中氟喹诺酮类的检测方法很少,仅采用液相色谱法测定环丙沙星和恩诺沙星^[11-12]。本文用液质法测定猪粪便中氟喹诺酮类药物,方法的检出限低,定性准,可以同时测定16种氟喹诺酮类药物残留量,在国内外尚未见报道。

由于样本中残留药物浓度较低(痕量或超微量),给样本前处理带来极大的挑战。通常情况下,样品前处理较为复杂,需要多种前处理方法配合使用才能将杂质去除到可以接受的程度。在此过程中要耗费大量有毒的有机试剂,检测成本高,大量有毒有害的溶剂的使用也不利于环境保护。本文建立猪粪便中16种氟喹诺酮类药物的分析方法,样品处理仅使用少量有机试剂,因而对环境的危害较小。

1 材料与方法

1.1 材料

样品:猪粪便样品取于中国农科院实验种猪场。

主要仪器:Waters Acquity TQD 串联四极杆 U-PLC/MS/MS 系统(美国 Waters 公司);二十孔固相萃取装置(美国 Waters 公司);高速低温冷冻离心机(GL-20G,上海安亭);氮吹仪(八方试剂);Oasis HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL, Waters);LC-C18 固相萃取柱(6 mL/500 mg, Supelco);SCX 固相萃取柱(6 mL/500 mg, Agela)。

试剂:环丙沙星、诺氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、单诺沙星、司帕沙星、二氟沙星、西诺沙星、奥索利酸、沙拉沙星、培氟沙星(含量 $\geq 94\%$, Dr. Ehrenstorfer 公司);氟罗沙星、依诺沙星、加替沙星(对照品,含量 $\geq 91\%$, 中国药品生物制品检定所);帕珠沙星(对照品,含量 $\geq 75.3\%$, 中国药品生物制品检定所);甲醇、甲酸为色谱纯(Fisher, 上海安谱公司);硝酸镁、氨水为分析纯(北京化学试剂厂);超纯水(电阻率 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别精密称取16种FQs药物标准品或对照品适量,用适量 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液溶解后用

甲醇稀释成浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准储备液。用甲醇稀释成浓度均为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的混合标准工作液,置 -20°C 冰箱中保存,有效期为3个月。

1.2.2 样品制备

称取猪粪便样品 0.2 g (精确至 0.01 g) 置 50 mL 离心管,加入适量混合标准工作液后,静置过夜。加入 50% 硝酸镁- 4% 氨水的混合液 8 mL , 涡旋混合 60 s , 超声提取 30 min , $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 。取 4 mL 上清液过 HLB 固相萃取柱(预先用甲醇、超纯水活化), 2% 甲醇淋洗,用 5 mL 4% 氨化甲醇溶液洗脱。洗脱液 45°C 用氮气吹至近干,用 0.1% 甲酸溶液定容至 1 mL , 涡旋 30 s , 过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜,供液相色谱-质谱/质谱分析。

1.2.3 标准曲线绘制

称取样品按 1.2.2 方法处理,在洗脱溶液中加入适当体积的混合添加标准溶液,配制浓度为 40 、 80 、 120 、 160 、 $200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 基质添加标准溶液,氮气 45°C 吹干,用 1 mL 0.1% 的甲酸水溶液复溶,经 $0.22 \mu\text{m}$ 的滤膜过滤, HPLC-MS/MS 测定。每个浓度设3个平行,每个平行进3次。以各化合物定量离子色谱峰面积为纵坐标,基质添加标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.4 色谱-质谱条件

(1) 色谱条件: BEH C18 色谱柱 (1.7 mm , $2.1 \times 50 \text{ mm}$), 流动相为甲醇(A)和 0.1% 甲酸溶液(B), 柱温 35°C , 流速 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 梯度洗脱程序: $0 \sim 6 \text{ min}$, 10% ; $6 \sim 7.5 \text{ min}$, $10\% \sim 65\%$; $7.5 \sim 8 \text{ min}$, $65\% \sim 10\%$; $8 \sim 9 \text{ min}$, 10% , 进样量 $5 \mu\text{L}$ 。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子源(ESI⁺); 雾化气、脱溶剂气、锥孔气为氮气, 碰撞气为氩气; 源温度为 115°C , 脱溶剂气温度为 360°C ; 脱溶剂气流速为 $550 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$, 锥孔气流速为 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$; 毛细管电压为 0.8 kV , 检测方式为 MRM 模式。16种药物的锥孔电压、碰撞能量及其他质谱条件见表1。

2 结果与分析

2.1 线性范围

称取样品处理,在洗脱溶液中加入适当体积的混合添加标准溶液,配制浓度为 $40 \sim 200 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 基质添加标准溶液,16FQs 药物线性良好,线性方程和相关系数见表2。

2.2 方法灵敏度

将适当浓度16种FQs药物加入到空白猪粪便样

表 1 多反应监测模式下 16 种 FQs 药物的质谱条件参数
Table 1 The analysis MS parameters for 16 FQs in MRM mode

化合物 Substances	保留时间/min Retention time	母离子/子离子 Precursor ion/Product ion	锥孔电压/V Cone voltage	碰撞能/eV Collision energy
奥索利酸 Oxolinic acind	7.03	262.02/215.8	34	32
		262.02/244*		20
西诺沙星 Cinoxaci	6.26	263.02/189	37	30
		263.02/245*		14
帕珠沙星 Pazufloxacin	4.78	319.14/281.1	30	26
		319.14/301.1*		16
诺氟沙星 Norfloxacin	4.00	320.15/233	47	24
		320.15/276.12*		18
依诺沙星 Enoxacin	3.82	321.14/232	35	34
		321.14/303.1*		18
环丙沙星 Ciprofloxacin	4.27	332.15/245. 06	47	24
		332.15/288.12*		18
培氟沙星 Pefloxacin	3.78	334.16/290.04	35	18
		334.16/316.06*		20
洛美沙星 Lomefloxacin	4.74	352.29/265.23*	34	26
		352.29/308.33		18
单诺沙星 Danofloxacin	4.66	358.15/82*	43	52
		358.15/340.1		24
恩诺沙星 Enrofloxacin	4.56	360.15/316.2*	47	20
		360.15/342.1		22
氧氟沙星 Ofloxacin	3.77	362.13/261	37	28
		362.13/318.03		18
氟罗沙星 Fleroxacin	3.32	370.19/326.2*	40	18
		370.19/352.1		20
加替沙星 Gatifloxacin	5.81	376.25/261.1*	40	32
		376.25/358.2		18
沙拉沙星 Sarafloxacin	5.33	386.1/298.9*	43	30
		386.1/342		20
司帕沙星 Sparfloxacin	6.4	393.16/292*	46	26
		393.16/349		20
二氟沙星 Difloxacin	4.98	400.09/356.1	34	20
		400.09/382.1*		22

注:* 定量离子对。

品中,经 1.2.2 前处理方法处理后,观察药物特征离子质量色谱峰信噪比(S/N)和对应药物浓度,S/N 大于 3 为方法检出限。西诺沙星、加替沙星、沙拉沙星平均检出限为 0.005 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,其他 12 种 FQs 药物检出限均为 0.002 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 准确度和精密度的测定

采用标准添加法,在空白猪粪便中添加 0.05、0.5、1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 3 个不同浓度药物进行回收率试验,每个浓度进行 6 个样品平行试验,回收率和相关系数结果汇总见表 3。可以看出该方法平均回收率为 51.4%~109.3%,RSD 为 1.2%~19.4%。

2.4 实际样品分析

采集北京市郊区 3 个规模化养猪场和 1 个屠宰场的猪粪样品进行检测。主要检出环丙沙星、恩诺沙

星、氧氟沙星、沙拉沙星。浓度范围在 10~600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,有的样品同时检出 3 种药物。

2.5 质谱条件优化

首先采用 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 各 FQs 药物标准溶液以蠕动泵进样方式在正离子模式下进行母离子全扫描,确定每种 FQs 的准分子离子,然后分别以其准分子离子为母离子,对其子离子进行全扫描。FQs 药物二级质谱中主要的碎片离子是脱水离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$ 、脱羧离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2]^+$ 以及脱羧后哌嗪环断裂发生结构重排失去 $\text{C}_2\text{H}_4\text{NR}$ 的产物离子 $[\text{M}+\text{H}-\text{CO}_2-\text{C}_2\text{H}_4\text{NR}]^+$ 。最后以多反应监测正离子模式,优化各种质谱调谐参数。16 种 FQS 药物特征离子质量色谱图见图 1。

2.6 提取条件选择

FQs 药物分子结构中含有羧基和叔胺基,是酸

表 2 16 种 FQs 药物在猪粪便中回归方程及相关系数
Table 2 The regression equations and correlation coefficient of sixteen FQs in pig faeces

化合物 Substances	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient
奥索利酸 Oxolinic acid	$y=87.929\ 4x$	0.995 244
西诺沙星 Cinoxaci	$y=933.195x$	0.990 767
帕珠沙星 Pazufloxacin	$y=33.623\ 6x$	0.990 716
诺氟沙星 Norfloxacin	$y=47.702\ 8x$	0.993 956
依诺沙星 Enoxacin	$y=76.920\ 2x$	0.993 511
环丙沙星 Ciprofloxacin	$y=62.277\ 9x$	0.993 576
培氟沙星 Pefloxacin	$y=22.338\ 2x$	0.990 439
洛美沙星 Lomefloxacin	$y=170.393x$	0.990 993
单诺沙星 Danofloxacin	$y=98.841\ 6x$	0.991 988
恩诺沙星 Enrofloxacin	$y=64.531\ 2x$	0.995 300
氧氟沙星 Ofloxacin	$y=92.818\ 9x$	0.992 164
氟罗沙星 Fleroxacin	$y=124.341x$	0.993 200
加替沙星 Gatifloxacin	$y=80.314\ 9x$	0.990 121
沙拉沙星 Sarafloxacin	$y=12.686\ 4x$	0.993 809
司帕沙星 Sparfloxacin	$y=42.944\ 5x$	0.991 304
二氟沙星 Difloxacin	$y=36.236\ 5x$	0.990 335

碱两性化合物。本方法采用 50%硝酸镁-4%氨水溶液作为提取溶剂,溶液中 Mg^{2+} 与 FQs 药物分子结构中含有羧基和叔胺基在碱性条件下结合,形成稳定的螯合物。设定超声时间分别为 15、30、45、60 min 比较样品的回收率,经比较可知,超声时间为 15

min 时,样品回收率较低,超声时间为 30、45、60 min 时回收率变化不明显。据此选择超声时间为 30 min。

2.7 固相萃取柱的选择

FQs 药物属于强极性分子,经碱性溶液提取,其提取液为碱性,而 HLB 固相萃取柱、LC-C18 固相萃取柱、SCX 固相萃取柱均可以对碱性化合物进行保留,因此本文对 3 种固相萃取柱柱回收率分别进行了测定。当添加浓度为 $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混合标准溶液,各物质回收率结果见图 2。可以看出,SCX 固相萃取柱对 16 种化合物的回收率均小于 50%;LC-C18 固相萃取柱对部分化合物回收率较好,但对个别物质回收率较低;HLB 固相萃取柱对 16 种化合物的回收率在 70%~120%之间,较理想。从对 16 种化合物整体回收率效果考虑,确定选用 HLB 固相萃取柱。

2.8 洗脱液的选择

本文选用 4%氨化-甲醇溶液作为洗脱液,通过调节 pH 值使离子化的 FQs 洗脱出来。本文分别吸取 3、4、5、6、7 mL 洗脱液进行洗脱,实验结果表明,5 mL 洗脱样品回收率较为理想。据此确定用 5 mL 洗脱液进行洗脱。

3 结论

本文建立了动物粪便中 16 中喹诺酮类药物的检

表 3 猪粪便中 16 种 FQs 药物加标回收率及变异系数 ($n=6$)
Table 3 The recovery and RSD of sixteen FQs in pig faeces($n=6$)

化合物 Substances	添加浓度 $0.05\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		添加浓度 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$		添加浓度 $1.0\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
奥索利酸 Oxolinic acid	51.4	9.69	72.0	1.8	74.1	1.6
西诺沙星 Cinoxaci	53.7	12.7	82.8	2.0	80.1	1.2
诺氟沙星 Norfloxacin	54.5	12.4	94.2	4.8	83.7	4.1
依诺沙星 Enoxacin	63.2	9.7	93.7	3.1	88.0	3.1
环丙沙星 Ciprofloxacin	71.4	10.5	102.1	3.9	92.8	4.7
培氟沙星 Pefloxacin	63.5	9.3	95.4	2.0	94.5	3.7
洛美沙星 Lomefloxacin	67.9	10.0	103.6	1.4	92.4	3.3
单诺沙星 Danofloxacin	76.2	11.7	109.3	9.1	108.8	2.3
恩诺沙星 Enrofloxacin	59.0	11.1	94.6	3.7	78.9	19.4
氧氟沙星 Ofloxacin	72.5	12.3	103.6	8.3	96.3	1.4
氟罗沙星 Fleroxacin	69.3	11.6	103.2	1.9	94.8	2.9
加替沙星 Gatifloxacin	67.6	9.6	99.4	2.7	92.6	2.6
司帕沙星 Sparfloxacin	59.7	11.9	97.1	2.4	93.9	1.7
二氟沙星 Difloxacin	60.5	6.2	94.0	2.0	93.0	2.0
沙拉沙星 Sarafloxacin	57.3	13.6	99.8	1.3	95.5	2.3
帕珠沙星 Pazufloxacin	55.8	5.5	89.9	5.3	82.3	5.4

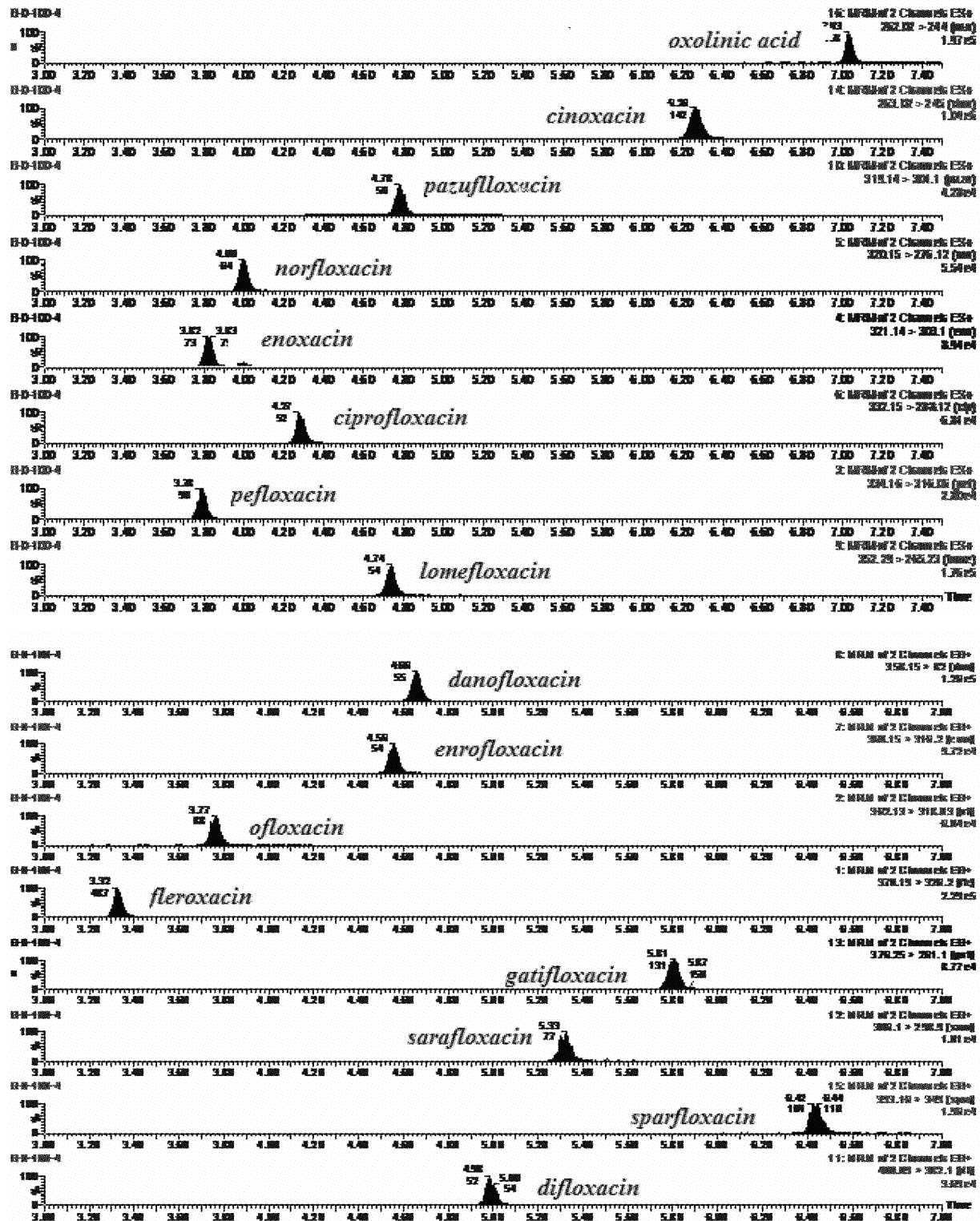


图 1 基质添加标液中 16 种 FQs 药物特征离子质量色谱图

Figure 1 The chromatograms of sixteen FQs added in pig faeces

测方法,用于对北京地区养殖与屠宰场猪粪样本进行了分析,为以后进行动物性粪便来源药物造成的环境负荷及环境风险评估提供了有力工具。

参考文献

- [1] Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky P. Occurrence, fate and ef-

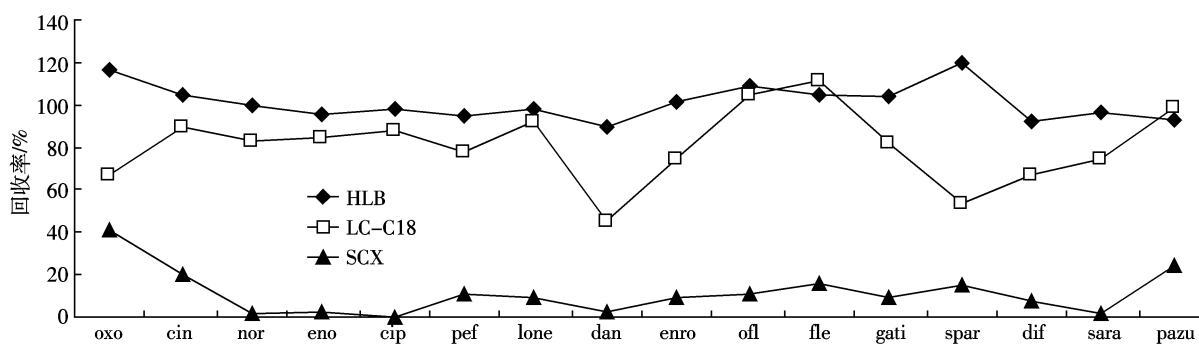


图2 HLB、LC-C18、SCX 固相萃取柱对16种化合物的回收率

Figure 2 The recovery of sixteen compounds by HLB, LC-C18, SCX solid-phase extraction

fects of pharmaceutical substances in the environment—A review[J]. *Chemosphere*, 1998, 36:357–393.

- [2] Turiel E, Martín-Esteban A, Tadeo J. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC–UV[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 562:30–35.
- [3] Golet E M, Strehler A, Alder C A. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction[J]. *Anal Chem*, 2002, 74:5455–5462.
- [4] GB/T 0751—2006. 鳗鱼及制品中十五种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 0751—2006. Determination of 15 fluoroquinolones in eel and its product[S].
- [5] GB/T 21312—2007. 动物源性食品中喹诺酮类药物残留检测方法 超高效液相色谱-质谱[S].
GB/T 21312—2007. Determination of quinolones in animal original food [S].
- [6] 孙 雷, 朱馨乐, 刘 琪, 等. 猪肉组织中7种氟喹诺酮类药物残留检测高效液相色谱-串联质谱法研究 [J]. 中国兽药杂志, 2008, 42 (3):12–15.
SUN Lei, ZHU Xin-le, LIU Qi, et al. Determination of 7 fluoroquinolones in pig meat[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2008, 42 (3):12–15.
- [7] 施 冰, 张志刚, 吴抒怀, 等. LC/MS/MS 测定水产品中7种氟喹诺酮类抗菌素残留量的方法研究[J]. 检验检疫科学, 2004, 14(增刊): 25–30.

SHI Bing, ZHANG Zhi-gang, WU Shu-huai, et al. Determination of 7 fluoroquinolones in aquatic product[J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2004, 14(Suppl.):25–30.

- [8] Toussaint B, Bordin G, Janosi A, et al. Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of 11 (fluoro) quinolone antibiotics in swine kidney[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 976(1–2):195–206.
- [9] Johnston L, Mackay L, Croft M. Determination of quinolone and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 982(1):97–109.
- [10] Holtzapfel CK, Buckley SA, Stanker LH. Determination of fluoroquinolones in serum using an on-line clean-up column coupled to high-performance immunoaffinity-reversed-phase liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 754(1):1–9.
- [11] Sunderland J, Lovering A M, Tobin C M, et al. A reverse-phase HPLC assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig faeces[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004, 24(3):390–393.
- [12] 陈 红, 陈杖榴, 曾振灵, 等. 鸡猪排泄物中恩诺沙星和环丙沙星含量 HPLC 检测方法的建立[J]. 中国兽药科技, 2005, 3(12):1004–1007.
CHEN Hong, CHEN Zhang-liu, ZENG Zhen-ling, et al. Development of HPLC assay for the simultaneous determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pig and chicken excreta[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug Science*, 2005, 3(12):1004–1007.