

养殖水产品中氟喹诺酮类药物残留检测的方法验证

郭兰, 刘鑫*, 邬杰, 吕婷, 王建军, 白志荣
(包头市农畜产品质量安全中心, 包头 014000)

摘要: 目的 验证实验室是否能够依据标准方法准确开展养殖水产品中氟喹诺酮类药物残留检测工作。**方法** 本文按照《水产品中17种磺胺类及15种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》(农业部1077号公告—1—2008)和《实验室质量控制规范 食品理化检测》(GB/T 27404—2008)中的方法要求, 采用高效液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)对养殖水产品中5种氟喹诺酮类药物残留检测进行方法验证, 验证参数包括线性范围、方法灵敏度、正确度、精密度。**结果** 恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、达氟沙星、沙拉沙星添加含量为0.5~100 µg/kg时, 相关系数均大于0.99, 具有良好的线性关系, 回收率在93.0%~110%之间, 相对标准偏差(RSD)均小于15%, 方法灵敏度(最低检出含量为0.940 µg/kg, 定量限为2 µg/kg)满足检测方法中检出限、定量限要求。**结论** 表明该实验室现有检测条件符合标准方法的技术能力要求, 能够正确运用标准方法开展养殖水产品中氟喹诺酮类药物的残留检测工作。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 养殖水产品; 氟喹诺酮类药物; 方法验证

Method validation for the detection of fluoroquinolone residues in farmed aquatic products

GUO Lan¹, LIU Xin*, WU Jie, LV Ting, WANG Jian-Jun, BAI Zhi-Rong

(Baotou Agricultural and livestock Product Quality and Safety Center, Baotou 014000, China)

ABSTRACT: Objective To verify whether the laboratory can accurately detect fluoroquinolone residues in aquaculture products according to standard Methods. **Methods** In this article, according to the Methods of Determination of 17 Sulfonamides and 15 Quinolones Residues in Aquatic Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (Ministry of Agriculture Announcement No. 1077-1-2008) and Laboratory Quality Control Specifications for Food Physical and Chemical Testing (GB/T 27404-2008), the method validation of the determination of 5 fluoroquinolones residues in cultured aquatic products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry was carried out, including linearity range, method sensitivity, accuracy and precision. **Results** The results showed that the 5 target compounds had good linear relationships in the range of 0~100 µg/kg, with correlation coefficients above 0.99. The method sensitivity (detection limit, quantification limit) met the method requirements, the average recovery rate was 93.0%~110%, and the relative standard deviation was ≤15%, all of which met the method requirements. **Conclusion** It indicates that the laboratory can correctly apply this method for detection work under the existing detection conditions.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; farmed aquatic products; fluoroquinolones; method validation.

0 引言

氟喹诺酮类药物是继磺胺之后由人工合成的抗菌药物, 其中第三代氟喹诺酮类药物具有广谱抗菌性、抗菌活

*通信作者: 刘鑫, 硕士, 高级兽医师, 主要从事农畜产品质量安全监管研究。E-mail: 474647378@qq.com

*Corresponding author: LIU Xin, Master, Senior Veterinarian, engaged in agricultural and livestock product quality and safety supervision research. Baotou Agricultural and livestock Product Quality and Safety Center, Baotou 014000, China. E-mail: 474647378@qq.com

性强、组织穿透力强、价格低廉、吸收快、体内分布广泛与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点^[1-7], 被广泛应用于疾病预防、治疗, 目前该药已成为水产、畜禽养殖业中主要的抗感染药物之一^[4]。近年来, 由于饲养规模不断增大, 且养殖人员缺乏科学知识和过度追求经济利益, 导致兽药滥用及残留超标问题更加突出, 由此带来的负面影响一方面是动物源食品中有害物质的残留富集影响人类健康, 具体表现为氟喹诺酮类药物进入人体后引起的消化系统反应、中枢神经系统毒性、过敏反应、光敏反应、心脏毒性、肝肾损害、软骨损害等疾病症状; 另一方面是该类药物会随养殖场排泄物造成环境污染, 对生态健康造成威胁^[6,8]。联合国粮农组织、世界卫生组织都已制定了恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星等药物在动物组织中的最高残留限量, 2005 年美国食品药品监督管理局宣布禁止将恩诺沙星用于治疗家禽和鱼类的细菌感染^[6,9,10], 欧盟食品药品监督管理局规定, 动物源性食品中氟喹诺酮类药物的残留量为 30 ~ 1900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11-12]。我国农业农村部在《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》(GB31650.1—2022) 中规定了恩诺沙星、达氟沙星在鱼肉中最大残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、沙拉沙星在鱼肉中最大残留限量为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。中华人民共和国农业部公告 第 2292 号中规定停止经营、使用用于食品动物的洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星 4 种原料药的各种盐、酯及其各种制剂^[1]。综上, 氟喹诺酮类药物的广泛使用和滥用会造成较严重的不良影响, 因此作为保障农畜产品质量安全的检测单位, 实验室能够正确应用标准方法对养殖水产品及畜禽食品中残留的氟喹诺酮类药物开展准确检测具有十分重要的意义。

方法验证是指实验室通过核查, 提供客观、有效的证据证明满足检测方法规定的要求^[13], 是检测过程中实验室质量控制检测工作的重要组成部分, 是证明检测过程科学、可行, 检测人员、仪器设备、设施与环境、标准物质等条件满足检测方法规定的技术要求, 是保证结果准确性和可靠性的基础^[14-18]。本文按照以《农业部 1077 号公告—1—2008, GB/T 27404—2008》为指导依据, 对养殖水产品中氟喹诺酮类药物残留检测开展方法验证工作, 验证内容包括线性范围、方法灵敏度、准确度、精密度, 证实该实验室条件能够满足标准方法的技术能力要求, 方法灵敏度、准确性、线性范围等参数可以达到预期检测目的。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

主要仪器: 高效液相色谱串联质谱仪器 (High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS/MS) (Agilent 1260- 6420)、分析天平(上海卓精电子科技有限公司 BSM220.4)、旋转蒸发器(德国 Heidolph Hei-VAP Precision)、超声波清洗仪(宁波新芝生物科技有限公司 SB-800DT)、高速冷冻离心机(Sigma 3k15)、高速匀浆机(德国氟鲁克 FA25)、旋涡振荡器(IKA)。

主要试剂: 标准物质见表 1。色谱级甲醇、乙腈、正己烷和甲酸(赛默飞世尔科技(中国)有限公司), 分析纯无水硫酸钠(天津市鑫铂特化工有限公司), 0.1%甲酸水溶液(实验室自己配制)。

表 1 标准物质信息

Table 1 Reference material information

标准物质名称	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	编号	厂家
恩诺沙星		GBW(E)082560	
诺氟沙星		GBW(E)082559	
氧氟沙星	100	GBW(E)083127	农业农村部农产品质量标准研究中心
达氟沙星		GBW(E)083589	
沙拉沙星		GBW(E)083590	

1.2 试验方法

1.2.1 前处理过程

提取净化: 称取(5±0.02)g 试样, 于 50 mL 具塞离心管中, 准确加入 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 混合内标标准工作液 50 μL , 涡旋混合 30 s, 避光放置 10 min, 加入 10 g 无水硫酸钠, 涡旋混匀, 再加入 20 mL 酸化乙腈, 涡旋混合 1 min, 超声波提取 10 min。4000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 50 mL 梨形瓶中, 残渣中加 20 mL 酸化乙腈, 重复提取一次, 合并两次提取液, 于 40°C 水浴旋转蒸发至干, 加 1.0 mL 甲醇溶液涡旋溶解残留物, 再加入 2.0 mL 正己烷涡旋混合 30 s, 转入 5 mL 具塞离心管中, 以 4000 r/min 离心 5 min, 弃上

层液, 取下层清液, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 待测^[19]。

1.2.2 检测方法。

色谱条件: Eclipse Plus C18 色谱柱(100 mm×2.1 mm×3.5 μm), 流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液(含 5.0 mmol/L 醋酸铵), 流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈溶液, 梯度洗脱条件见表 2。柱温为 40°C; 进样量为 10 μL ; 流速 0.3 mL/min。

质谱条件: 喷射流技术离子源(Agilent Jet Stream Source, AJS)、电喷雾离子源(Electrospray Ionization Source, ESI)、全离子扫描模式(MS2 Scan)、选择离子监测模式(Selected Ion Monitor, MS2 SIM)、子离子扫描模式(Product Ion)、多反应监测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)、离子源温度 300°C、脱溶剂气流速 13 L/min。

表2 梯度洗脱条件
Table 2 Gradient elution conditions

时间/min	A%	B%
0.0-2.0	80.0	20.0
2.0-4.0	60.0	40.0
5.0-15.0	10.0	90.0
15.01-18.0	80.0	20.0

1.2.3 方法验证过程

(1)线性范围。准确量取适量混合标准工作液,用A、B流动相(1:1)稀释成浓度为0.5、1.0、5.0、10.0、40.0、100 ng/mL的混合标准系列工作溶液,供液相色谱串联质谱仪测定。

(2)方法灵敏度。农业部1077号公告—1—2008中规定恩诺沙星、诺氟沙星等5种兽药的检出低限为1.0 μg/kg,定量限为2.0 μg/kg。称取5.00 g空白样品,根据检出限和定量限浓度水平添加6种兽药的混标工作液,按照1.2.1前处理过程处理,HPLC-MS/MS测定。

(3)回收率和正确度。采用加标回收验证。氟喹诺酮类药物已制定最高残留限量(Maximum Residue Limit, MRL)^[20],以GB/T 27404—2008方法为依据,在检出限、定量限、检出限与MRL之间适合点,选择1.0、2.0、4.0 μg/kg三个水平浓度,进行加标回收试验。GB/T 27404—2008规定,添加含量<100 ng/kg时回收率应在60%~120%。

(4)精密度。分别准确称取三份5.00 g空白试样,添加5种氟喹诺酮类药物的混标工作液,本试验设置了1.0、2.0、4.0 μg/kg三个浓度添加量,按照前处理过程操作,

HPLC-MS/MS测定,计算相对标准偏差,检测方法规定相对标准偏差应≤15%。

2 结果与分析

2.1 质谱参数优化

在AJS ESI条件下,先使用MS2 Scan模式,分别对5种氟喹诺酮类药物的单标溶液进行母离子优化,得到每一种化合物的母离子。再使用MS2 SIM模式进行母离子电压优化,分别给5种氟喹诺酮类药物施加50~130 V的毛细管电压,以5V为梯度进行优化,得到最佳毛细管电压。然后使用Product Ion模式进行子离子优化,分别对5种氟喹诺酮类药物的母离子设置5~50 eV的碰撞能量进行电子轰击,获取碰撞产生的定性离子和定量离子,再以1 eV为梯度分别对两种离子进行优化,获取子离子响应值最高时的碰撞能量。5种氟喹诺酮类药物的母离子、定性离子、定量离子、最佳毛细管电压、最佳碰撞能量见表3。最后,在MRM模式下,按照表3中所示最优参数设置方法检测条件,得到5种氟喹诺酮类药物的质谱图,如图(1~5)所示。

表3 氟喹诺酮类药物的最佳毛细管电压和碰撞能量
Table 3 Fragmentor and collision energy for fluoroquinolones

目标化合物	保留时间/(t·min ⁻¹)	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	毛细管电压/V	碰撞能量/eV
恩诺沙星	4.754	360.0	245.1	115	25
		360.0	316.1*	115	18
诺氟沙星	4.522	320.1	233.1	100	23
		320.1	276.1*	100	13
氧氟沙星	4.525	362.2	261.1	110	28
		362.2	318.1*	110	15
达氟沙星	4.692	358.1	314.1	110	13
		358.1	340.1*	110	20
沙拉沙星	4.909	386.0	299.0	105	28
		386.0	342.3*	105	15

注: *为定量离子

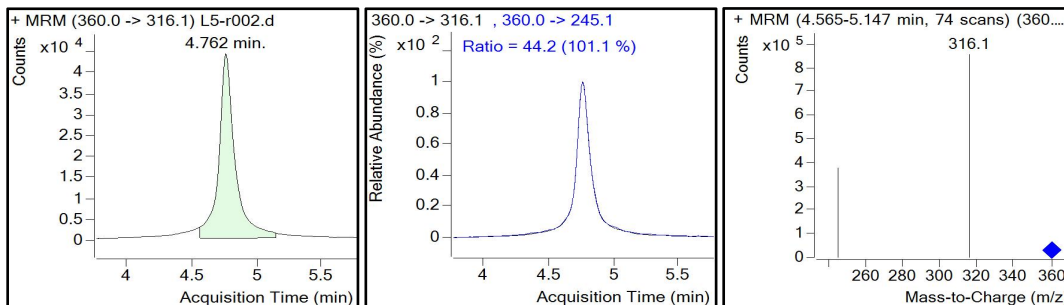


图 1. 恩诺沙星质谱图

Fig.1 Enrofloxacin mass spectrum

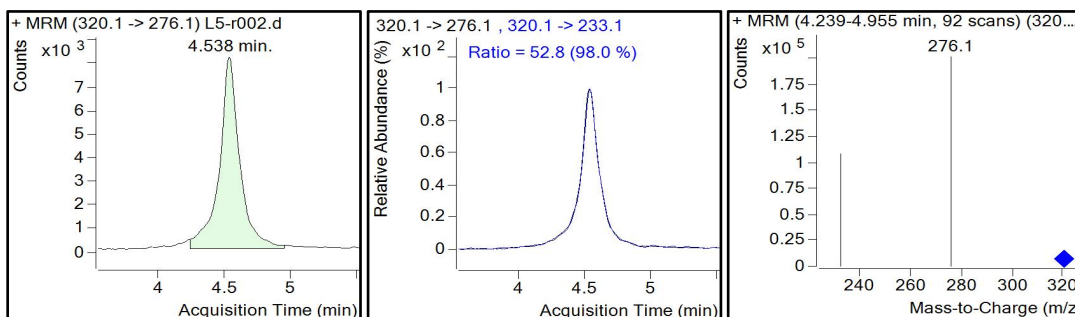


图 2 诺氟沙星质谱图

Fig.2 norfloxacin mass spectrum

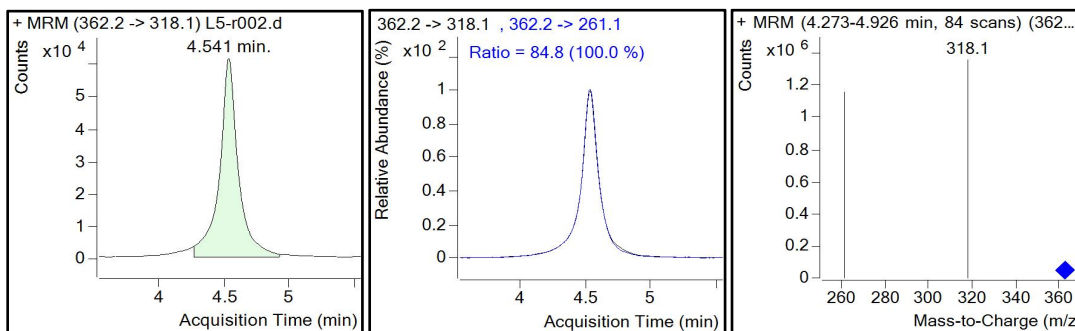


图 3 氧氟沙星质谱图

Fig.3 ofloxacin mass spectrum

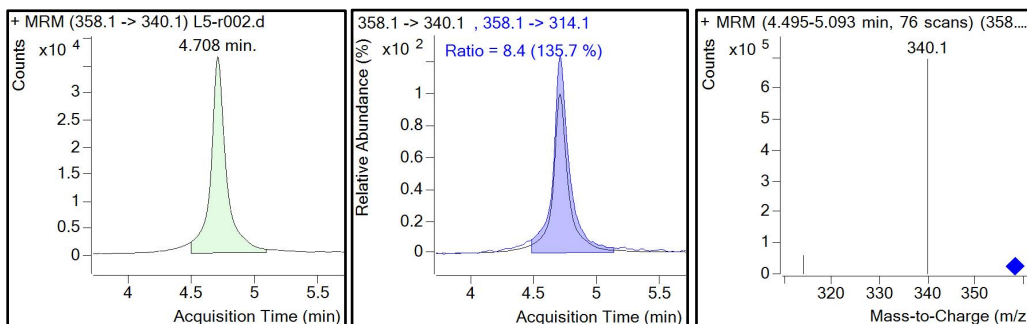


图 4 达氟沙星质谱图

Fig.4 daxifloxacin mass spectrum

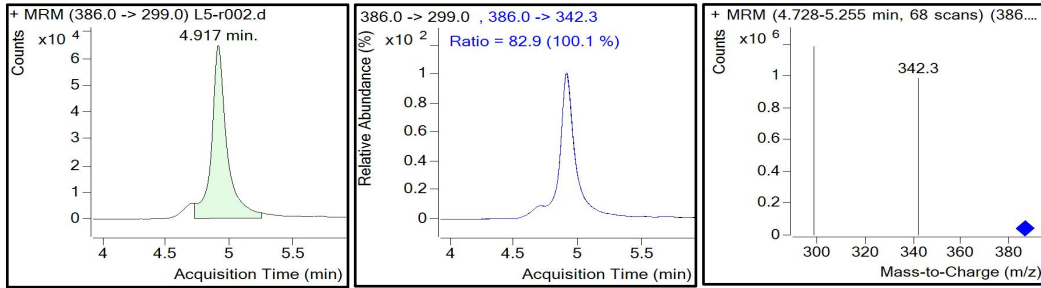


图5 沙拉沙星质谱图

Fig.5 Sarafloxacin mass spectrum

2.2 工作曲线及线性范围

分别将5种喹诺酮类药物标准系列工作液按浓度(低→高)顺序进样测定,以浓度为横坐标,定量离子色谱

峰面积为纵坐标绘制标准曲线,如图6~10所示。曲线相关系数均大于0.99,满足GB/T 27404—2008中相关系数不低于0.99的要求。

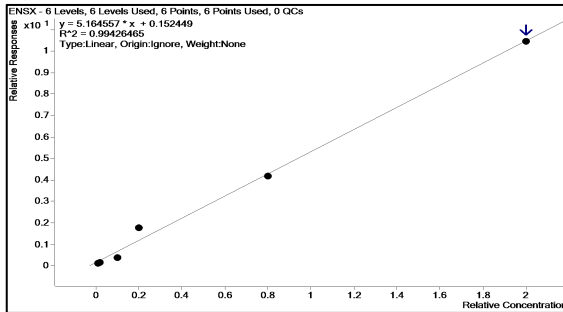


图6 恩诺沙星标准曲线

Fig.6 Enrofloxacin standard curve

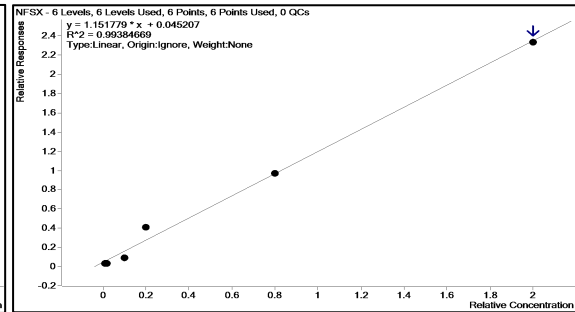


图7 诺氟沙星标准曲线

Fig.7 Norfloxacin standard curve

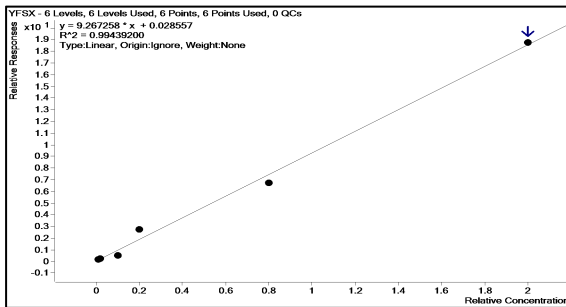


图8 氧氟沙星标准曲线

Fig.8 Ofloxacin standard curve

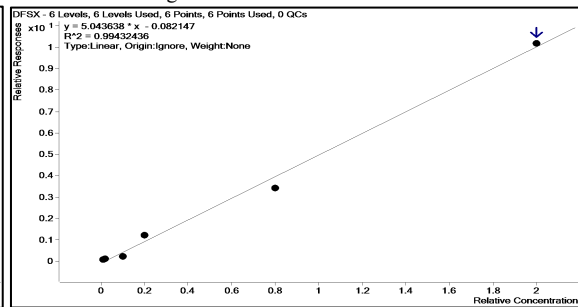


图9 达氟沙星标准曲线

Fig.9 Dafloxacin standard curve

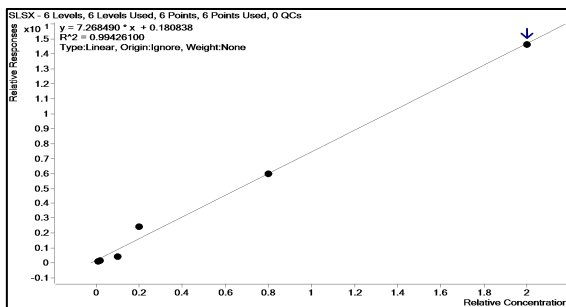


图10 沙拉沙星标准曲线

Fig.10 Sarafloxacin standard curve

2.3 方法灵敏度

5 种目标化合物的检出限信噪比(S/N)为 19.4~208.7, 均大于 3, 按照标准方法中规定的检出限量 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 添加到样品中, 独立检测 10 次, 检出概率为 100%(见表 4); 定量限信噪比(S/N)为 35.2~154.1, 均大于 10(见表 5), 表明实验室在现有条件下能够达到标准方法灵敏度要求。

2.4 正确度

以空白样品为本底, 分别添加 5 种不同浓度喹诺酮类

标品溶液, 其回收率范围为 93%~110%, 加标回收结果见表 6。满足 GB/T 27404—2008 方法中回收率要求, 即以空白添加标准校正, 被测组分含量 $< 0.1 \text{ mg}/\text{kg}$, 其回收率范围为 60%~120%。

2.5 精密度

由表 6 可知, 空白样品种添加 5 种喹诺酮类药物标准物质分别进行三水平重复试验, 其相对标准偏差在 0%~5.02%, 满足标准方法中精密度部分规定的相对标准偏差 $\leq 15\%$ 的要求。

表 4 方法检出限数据
Table 4 Method detection limit data

分析项目	检测含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)										检出限信噪比(S/N)
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	
恩诺沙星	1.00	0.99	1.01	1.00	0.994	1.01	0.996	1.00	0.994	1.00	26.6
诺氟沙星	0.988	0.970	0.968	0.970	0.998	0.986	0.968	0.982	0.998	0.974	35.2
氧氟沙星	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	1.01	113
达氟沙星	0.940	9.954	0.900	0.960	0.966	0.966	0.962	0.962	0.956	0.948	56.3
沙拉沙星	1.07	1.07	1.08	1.08	1.03	1.02	1.02	1.00	1.02	1.08	111

表 5 方法定量限数据
Table 5 Quantitative limit data of the method

分析项目	方法定量限($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限信噪比(S/N)
恩诺沙星	2.0	73.0
诺氟沙星	2.0	35.2
氧氟沙星	2.0	92.2
达氟沙星	2.0	113.1
沙拉沙星	2.0	154.1

表 6 方法正确度和精密度数据
Table 6 Accuracy and precision data of the method

分析项目	添加含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			平均回收率(%)	RSD(%)
		I	II	III		
诺氟沙星	1	0.988	0.970	0.968	97.9	1.71
	2	1.98	1.96	1.96	98.3	0.587
	4	3.78	3.98	3.64	95.0	4.50
氧氟沙星	1	1.01	1.01	1.01	101	0
	2	2.04	1.93	2.04	100	3.17
	4	3.86	3.92	3.86	97.0	0.893
恩诺沙星	1	1.00	0.992	1.01	100	0.901
	2	2.02	2.04	2.02	101	0.570
	4	3.76	3.76	3.74	93.8	0.308
沙拉沙星	1	1.07	1.07	1.08	107	0.538
	2	2.12	2.14	2.32	110	5.02
	4	4.20	4.04	4.20	104	2.23
达氟沙星	1	0.954	0.954	0.960	95.6	0.362

2	1.87	1.85	1.86	93.0	0.538
4	3.78	4.00	3.66	95.3	4.52

3 结论与讨论

通过开展养殖水产品—鲤鱼中氟喹诺酮类药物残留的高效液相色谱—串联质谱法的方法验证,结果显示在最优的质谱参数条件下,工作曲线线性关系良好,测定样品得到的灵敏度、正确度、精密度满足方法要求,证明了该实验室现有设施设备、场所环境、检测人员等条件可以达到标准方法规定的检测技术能力要求,能够按照标准方法规范、正确、准确开展养殖水产品中恩诺沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、达氟沙星、沙拉沙星5种氟喹诺酮类药物残留的检测工作。

参考文献

- [1] 高志存, 石露莎, 余舒宁, 等. 动物源性食品中8种氟喹诺酮类药物多残留高效液相色谱检测方法的建立[J]. 中国动物检疫, 2023, 40(7): 116-120.
- [2] Hain E, Adejumo H, Anger B, et al. Advances in antimicrobial activity analysis of fluoroquinolone, macrolide, sulfonamide, and tetracycline antibiotics for environmental applications through improved bacteria selection [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 415: 125686.
- [3] Madikizela L M, Nomngongo P N, Pakadev E. Synthesis of molecularly imprinted polymers for extraction of fluorquinolones in environmental, food and biological samples [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022, 208: 114447.
- [4] 段宁馨, 邹玉婷, 古飞燕, 等. 动物源性食品中氟喹诺酮类兽药残留检测方法研究进展[J]. 肉类研究, 2022, 36(1): 7.
- [5] 刘灿, 王中新, 姚杰, 等. gyrA 和 parC 基因与嗜麦芽窄食单胞菌对氟喹诺酮类抗菌药物耐药的关系[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(3): 4.
- [6] 丑亚琴, 唐巍, 卢艳芬, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中四种氟喹诺酮类药物残留前处理条件的优化[J]. 水产养殖, 2013.
- [7] 贺江, 李晓月, 仇玉洁, 等. 固相萃取—超高效液相色谱法测定水产品中6种氟喹诺酮类药物残留[J]. 食品与机械, 2018, 34(5): 5.
- [8] 李永盼. 鸡蛋中氟喹诺酮类药物残留的危害及检测技术应用[J]. 食品安全导刊, 2020, (18): 155.
- [9] 许磊. 简述动物源食品中氟喹诺酮类药物残留的危害及检测方法[J]. 四川农业科技, 2022(9): 92-94.
- [10] 张宪臣, 华洪波, 张朋杰, 等. 平行定量浓缩仪-超高效液相色谱-串联质谱联用快速检测鳊鱼中8种喹诺酮类药物残留量[J]. 食品科学, 2012, 33(12): 190-195.
- [11] The European Medicines Agency. Commission regulation (EU)(2010) No.37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin [S]. 2009-12-22.
- [12] Codex Alimentarius Commission (CAC). Codex alimentarius international food standards: maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods: CX/MRL 2-2018 [S].

CAC, 2018.

- [13] 赵响. 五河县农产品质量安全追溯体系存在的问题及建议[J]. 现代农业科技, 2020(20): 206-207.
- [14] 蒋治国, 王博超, 殷雪琰, 等. 食用农产品合格证管理的实践研究: 以常州市为例[J]. 食品安全导刊, 2020(23): 32-33.
- [15] 郭琳, 孙秀菊, 郭艳琼, 等. 动物源性食品中 β -受体激动剂残留检测的方法验证[J]. 现代农业科技, 2022(013): 000.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求: GB/T 32465—2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [18] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 合格评定化学分析方法确认和验证指南: GB/T 27417—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [19] 中华人民共和国农业部. 水产品中17种磺胺类及15种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱—串联质谱法: 农业部1077号公告—1—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [20] 中华人民共和国农业农村部, 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量: GB 31650.1-2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.

(责任编辑: 吴华)

作者简介



郭兰, 硕士, 初级工程师, 包头市农畜产品质量安全中心, 主要从事农畜水产品中农兽药残留检测研究。

Email: gl17886750621@163.com



刘鑫, 硕士, 高级兽医师, 包头市农畜产品质量安全中心主任, 主要从事农畜产品质量安全监管研究。

E-mail: 474647378@qq.com