

# 超高效液相色谱串联质谱法 测定饲料中 7 种喹诺酮类药物

周 鑫 张建雄 李继丰 郑百芹 李爱军\*

河北省唐山市畜牧水产品质量监测中心,河北唐山 063000

**摘要** 本试验建立了超高效液相色谱串联质谱同时测定饲料中 7 种喹诺酮类药物残留的方法。饲料样品中喹诺酮类药物经酸化乙腈提取,电喷雾离子源三重四级杆串联质谱对喹诺酮类药物进行测定,外标法定量。试验结果表明,7 种喹诺酮类药物在 0~500 ng/mL 的浓度范围内,其回归标准曲线方程的相关系数为 0.997 4~0.999 7。对空白饲料添加 5、50、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3 种浓度的喹诺酮类药物,回收率在 74.7%~92.3% 范围内,相对标准偏差为 3.99%~8.29%,方法检出限为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以下。说明该方法操作简单快速,定性定量准确。

**关键词** 超高效液相色谱串联质谱;饲料;喹诺酮类

喹诺酮类(Quinolones),又称吡酮酸类或吡啶酮酸类,是人工合成的含 4-喹诺酮基本结构的抗菌药,均有广谱抗菌、价格低廉的特点<sup>[1]</sup>,因此该类药物在畜禽养殖环节中广泛使用。然而其使用也引发出一系列的问题,如通过食物链富集从而影响人体健康<sup>[2-4]</sup>,环境的污染<sup>[5]</sup>,因病菌对喹诺酮类药物抗性的产生而需不断研发新型药物<sup>[6]</sup>等。目前,喹诺酮类药物残留的检测方法主要有微生物法<sup>[7]</sup>、酶联免疫吸附法<sup>[8-9]</sup>、毛细管电泳法<sup>[10-12]</sup>、高效液相色谱法<sup>[13-14]</sup>、高效液相色谱串联质谱法等<sup>[15-19]</sup>。本试验拟采用超高效液相色谱串联质谱法对饲料中的 7 种喹诺酮类物质进行检测。

## 1 材料与方法

1) 仪器与试剂。仪器:超高效液相色谱仪串联三重四级杆质谱仪(美国 Waters 公司, Xevo TQ-S);离心机(Thermo Sorvall RC-6 plus);对照品:7 种喹诺酮药物混合标品(二氟沙星、奥比沙星、沙拉沙星、麻保沙星、恩诺沙星、丹诺沙星、环丙沙星),德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;试剂:乙腈:色谱纯, Dikma 公司;甲酸:色谱纯, Dikma 公司;试验用水为超纯水(电阻率为 18.25  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )。

2) 标准溶液配制。准确称取喹诺酮类对照品适量,乙腈定容,配制成 1  $\text{mg}/\text{mL}$  的储备液,  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  保存;稀释储备液成为 1 000  $\text{ng}/\text{mL}$  的工作液,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  保存。

3) 样品前处理。称取 2.00 g 搅碎的饲料样品(精确到 0.01 g),加入 10 mL 酸化乙腈(甲酸:乙腈=1:99)和 1 g 氯化钠,涡旋提取 1 min, 6 000 r/min 离心 5 min。准确吸取上层乙腈 5.00 mL 至另一离心管中,加入 5.00 mL 超纯水,过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜,待上机。

4) 液相色谱条件。色谱柱:ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  液相色谱柱(50 mm  $\times$  2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ , 美国 waters 公司);流速:0.3 mL/min;柱温:35  $^\circ\text{C}$ ;进样量:5  $\mu\text{L}$ ;流动相 A:0.1% 甲酸水溶液,流动相 B:乙腈,梯度洗脱,洗脱条件见表 1。

表 1 流动相洗脱梯度

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
1	0.00	0.30	95
2	0.50	0.30	95
3	3.00	0.30	5
4	3.10	0.30	95
5	5.00	0.30	95

收稿日期:2017-10-10

\* 通讯作者

周 鑫,男,1982 年生,兽医师。

5) 质谱条件。离子源:电喷雾(ESI);检测方式:多反应监测(MRM);扫描方式:正离子扫描;雾化温

度:350 ℃;喷雾电压:3 000 V。喹诺酮类药物检测离子对、碰撞能量(CE)见表 2。

表 2 喹诺酮类药物的选择离子及碰撞能量

化合物	定量离子 $m/z$	定性离子 $m/z$	碰撞能量 $eV$ <sup>a</sup>
二氟沙星	400.0>356.0	400.0>382.0	18/21
奥比沙星	396.2>295.1	396.2>352.3	24/17
沙拉沙星	386.1>342.3	386.1>368.2	18/21
麻保沙星	363.2>72.2	363.2>320.3	19/15
恩诺沙星	360.1>245.3	360.1>316.1	29/23
丹诺沙星	358.1>314.2	358.1>340.2	25/23
环丙沙星	332.1>288.2	332.1>314.1	16/20

注:a 数值按照定量离子 / 定性离子的顺序给出。

## 2 结果与分析

1) 液相色谱条件及质谱条件优化。甲酸水溶液能够提供 H<sup>+</sup>,使目标化合物更容易离子化,增强了目标化合物扫描的响应强度。为了便于待测物目标峰的选择和流动相配制的方便,本试验选用了乙腈和 0.1% 甲酸作为流动相,同时也优化了质谱的电压、气流、电位等参数。7 种喹诺酮类药物的色谱图见图 1。

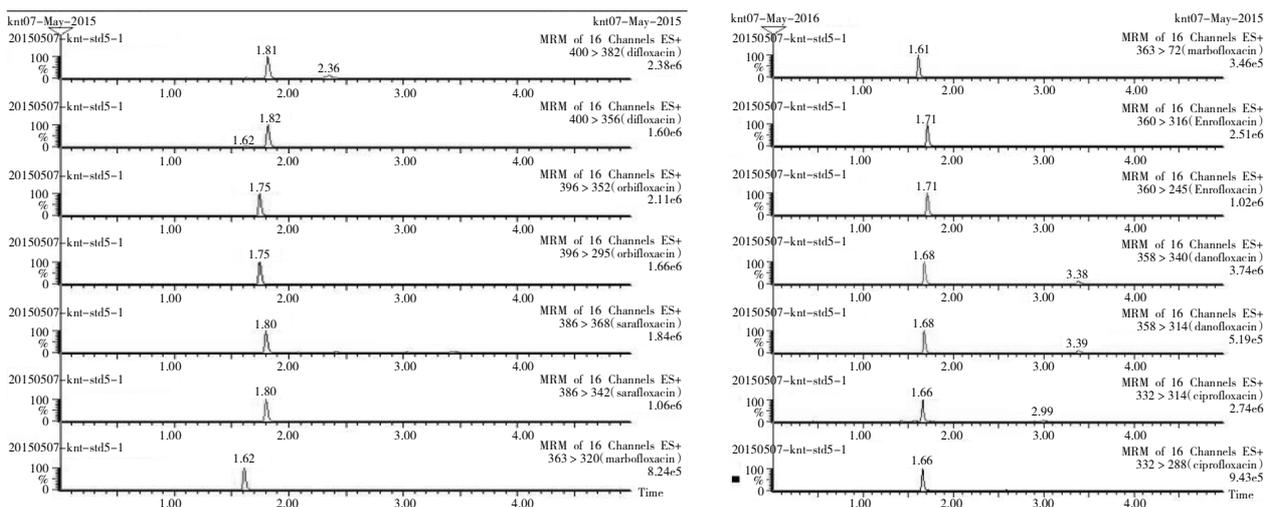


图 1 7 种喹诺酮类药物的色谱图

2) 线性范围及检出限。以空白基质提取液对工作液进行梯度稀释,进行上机分析,以进样浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归,7 种喹诺酮类药物在 0 ~ 500 ng/mL 的浓度范围内呈现出良好的线性关系,相关系数 r 的范围在 0.997 4 ~ 0.999 7。在空白样品中添加标准工作液,通过计算得到本试验方法检出限(LOD, S/N > 3)为 2 μg/kg,定量限(LOQ, S/N > 10)为 5 μg/kg。

为实验室检测提供了技术参考。

3) 回收率与精密度。称取样品,对其进行喹诺酮标准品添加,选择 5、50、100 μg/kg 3 种浓度,使用优化好的提取方法和上机条件进行数据测定,计算回收率和精密度,回收率在 74.7% ~ 92.3%,精密度在 3.99% ~ 8.29%。

## 3 结论

超高效液相色谱串联质谱法测定饲料中 7 种氟喹诺酮类药物灵敏度高、重复性好,能够满足一般实验室对饲料中喹诺酮类物质测定的检测要求,

## 参 考 文 献

- [1] 王金秋,马建民,夏曦,等.超高效液相色谱—串联质谱法同时测定猪肌肉中 13 种喹诺酮药物残留 [J]. 质谱学报,2014,35(2): 185-192.
- [2] 包晓丽,任一平,张虹.超高效液相色谱—电喷雾串联四极杆质谱法检测牛奶中 22 种喹诺酮类抗菌素 [J]. 分析化学,2009,37(3):389-394.
- [3] HOELZER K, WONG N, THOMAS J, et al. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? [J]. BMC Veterinary Research, 2017, 13(1): 211.
- [4] MARSHALL B M, LEVY S B. Food animals and antimicrobials: impacts on human health [J]. Clin Microbiol Rev. 2011, 24(4): 718-733.
- [5] BERG J, THORSEN M K, HOLM P E, et al. Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community toler-

# 猪圆环病毒的分离与鉴定

叶丛华 陈礼朋

河南省固始县动物疫病预防控制中心,河南固始 465200

**摘要** 无菌条件下采集患有多系统衰竭综合征的断奶仔猪的淋巴结、肺脏和脾脏组织病料,对病毒进行电镜观察、间接免疫荧光试验、荧光定量 PCR 测定、动物人工感染试验。动物人工感染试验结果表明,将第 18 代 PCV2 病毒接种于 4 头未免疫过的健康猪只体内,其中 2 头有较严重的临床症状,另外 2 头有较轻微的临床症状,对剖杀时采集的血液进行间接免疫荧光试验,结果呈阳性,说明即使经过多次传代,PCV2 病毒仍然能够使猪只感染。

**关键词** 猪圆环病毒;分离;鉴定

近年来,我国多个地区在患病猪体内分离到了猪圆环病毒 2 型(PCV2),该病毒能够引起断奶仔猪多系统衰竭综合征以及多种疾病。PCV2 经常与猪呼吸与繁殖综合征病毒(PRR SV)或猪细小病毒(PPV)并发感染或继发细菌感染<sup>[1]</sup>。猪圆环病毒(porcine circovirus,PCV)属于圆环病毒科圆环病毒属,包括 2 个血清型 PVC1 和 PVC2,PVC1 存在于猪只体内,没有致病性,首次是在 PK-15 细胞中发

现<sup>[2]</sup>;PVC2 是致病性的病毒,能够引起断奶仔猪多系统衰竭综合征。此外,PVC2 也是导致母猪繁殖障碍、呼吸道疾病、猪皮炎和肾综合征、猪增生性坏死性肺炎、间质性肺炎的主要病原。

猪圆环病毒 2 型 (porcine circovirus type 2)能够使仔猪发生断奶后多系统衰竭综合征(PMSW),临床表现主要有生长发育迟缓,身体逐渐消瘦,呼吸困难,精神萎靡,皮毛杂乱,食欲减退,黄染,皮肤

收稿日期:2017-11-20

叶丛华,女,1980 年生,兽医师。

ance assay [J].Environmental Science & Technology,2010,44 (22):8724.

[6] KOCSIS B,DOMOKOS J,SZABO D.Chemical structure and pharmacokinetics of novel quinolone agents represented by avarofloxacin,delafoxacin,finafloxacin,zabofloxacin and nemonoxacin [J].Annals of Clinical Microbiology & Antimicrobials,2016,15 (1):34.

[7] 黄晓蓉,郑晶,李寿崧,等.鳊鱼及其制品中喹诺酮类药物残留的微生物快速检测方法[J].淡水渔业,2005,35(4):3-6.

[8] 李雅丽.喹诺酮类兽药残留的酶联免疫检测方法的研究与建立[D].无锡:江南大学,2008.

[9] 郑晶,黄晓蓉,李耀平,等.鳊鱼中恩诺沙星残留量的酶联免疫检测方法[J].食品科学,2004,25(10):247-250.

[10] SUN H,ZHAO W,HE P.Effective separation and simultaneous determination of four fluoroquinolones in milk by CE with SPE [J].Chromatographia,2008,68(5/6):425-429.

[11] 饶钦雄,刘慧慧,刘向明,等.鱼组织中氟喹诺酮类药物的 HPCE 多残留检测方法的建立[J].中国农学通报,2007,23(2):93-97.

[12] 李慧,祁克宗,邵黎,等.高效毛细管电泳用于饲料中 5 种氟喹诺酮类药物的同时测定[J].中国饲料,2009(20):33-37.

[13] 刘媛,谢孟峡,丁岚,等.高效液相色谱同时测定鸡蛋中 4 种氟喹诺酮类药物残留[J].分析化学,2004,32(3):352-355.

[14] 张国文,占春瑞,倪永年.HPLC 法测定鳊鱼中多种氟喹诺酮[J].食品科技,2004(11):69-71.

[15] 岳振峰,谢丽琪,陈小霞,等.牛奶中 16 种喹诺酮类药物残留量的效液相色谱-串联质谱法测定[J].分析测试学报,2008,27(3):240-243.

[16] 王硕,张晶,邵兵,等.超高效液相色谱-串联质谱测定污泥中氯霉素、磺胺类、喹诺酮类、四环素类与大环内酯类抗生素[J].分析测试学报,2013,32(3):179-185.

[17] 林黎,张毅,涂小珂,等.液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中的 25 种喹诺酮类药物[J].色谱,2015,33(3):275-281.

[18] 彭丽,吴宁鹏,张发旺,等.液相色谱-串联质谱法测定饲料中磺胺类和喹诺酮类药物的含量[J].中国兽药杂志,2014,48(10):53-59.

[19] 封家旺,李封赛,顾庆云,等.高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中 6 种氟喹诺酮类药物残留[J].畜牧与兽医,2015,47(3):101-103.