

鸡肉中喹诺酮类抗生素的测定

实验背景:

2017年8月23日,美国快餐连锁巨头麦当劳在官网宣布,将要求全球肉鸡供应商自2018年开始逐步停止使用人类抗生素,麦当劳针对的鸡肉是不含有世界卫生组织(WHO)认定的人类医学药物HPCIA(最高优先级的重要抗菌药物)。

停用宣言中,首当其冲的HPCIA,其实只是世界卫生组织人类抗菌药物清单中的一类。

世界卫生组织在2016年公布的第5版重要的人类抗菌药物清单(critically important antimicrobials for human medicine, CIA)中,HPCIA包括喹诺酮类、头孢菌素类、大环内酯类和酮内酯类,糖肽以及多粘菌素共五种。

其中,喹诺酮类在动物中主要用于治疗沙门氏菌和大肠杆菌的感染。本实验主要针对鸡肉中喹诺酮类抗生素的残留测定。

参考标准:

《GBT 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》

实验步骤:

(1) 样品提取:

称取5g已粉碎的鸡肉试样于50mL离心管中,加20mL 0.1mol/L EDTA-McIlvaine缓冲溶液(4),1000r/min旋涡1min,超声提取10min,10000r/min离心5min(温度低于5°C),提取3次,合并上清液。

(2) 样品净化:

活化: BRP(200mg/6mL)6mL 甲醇, 6mL 水

上样: 将上待净化样以2-3mL/min的速度通过小柱,弃液

淋洗: 先用2mL5%甲醇水溶液(体积比)淋洗,将小柱抽干

洗脱: 6mL 甲醇洗脱,收集,氮气吹干,用1mL0.2%甲酸水溶液(体积比)溶解,1000r/min旋涡混合1min,过0.22 μm滤膜,HPLC-MS/MS分析。

(3) 仪器条件:

3.1 UPLC 条件

色谱柱: Welch Xtimate UHPLC C18 2.1×100mm, 1.8μm

流动相: A:0.1%甲酸水溶液

柱温: 35°C

B: 乙腈

流速: 0.3mL/min

梯度洗脱程序: 见表1。

进样体积: 10μL

表1 梯度洗脱程序

Tab.1 Mobile phase composition and gradient elution

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	99.5	0.5
3	99.5	0.5
5	95	5

7	95	5
9	93	7
11	91	9
13	88	12
15	80	20
17	60	40
19	20	80
21	10	90
21.01	99.5	0.5
24.00	99.5	0.5

3.2 质谱条件:

离子源: ESI+

雾化器温度: 350°C

雾化器流速: 10L/min

鞘气温度: 350°C

鞘气流速: 12 L/min

采集方式: 多反应监测 (MRM)

Q1、Q3 均为单位分辨率

仪器型号: Agilent 1290 LC+ 6460 Triple Quadrupole MS

安捷伦 1290 超高压液相色谱 /6460 三重串联四极杆液质联用仪

表 2 多反应监测模式 (MRM) 参数

Tab.2 Multiple reaction monitoring(MRM) conditions

名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 (ms)	碰撞电压 (V)	碰撞能量 (V)
西诺沙星	263.1	244.1	9	136	17
		189.0	9		29
洛美沙星	352.3	265.2	9	120	17
		308.3	9		25
吡哌酸	304.2	271.1	9	134	21
		189.0	9		25
沙拉沙星	386	342	9	128	17
		299	9		29
萘啶酸	262.2	215.1	9	80	20
		187.0	9		25
氧氟沙星	362	318	9	134	20
		261	9		28
恩诺沙星	360	286	9	80	35
		245	9		25
单诺沙星	358	255	9	80	35
		245	9		17
培氟沙星	334	316	9	130	20
		290	9		16
环丙沙星	332	314	9	80	15
		288	9		15
依诺沙星	321	257	9	80	15
		232	9		35

诺氟沙星	320	276	9	80	10
		231	9		35
奥索利酸	262	244	9	80	10
		216	9		30
氟甲喹	262	244	9	80	10
		202	9		30

(4) 实验图谱及结果

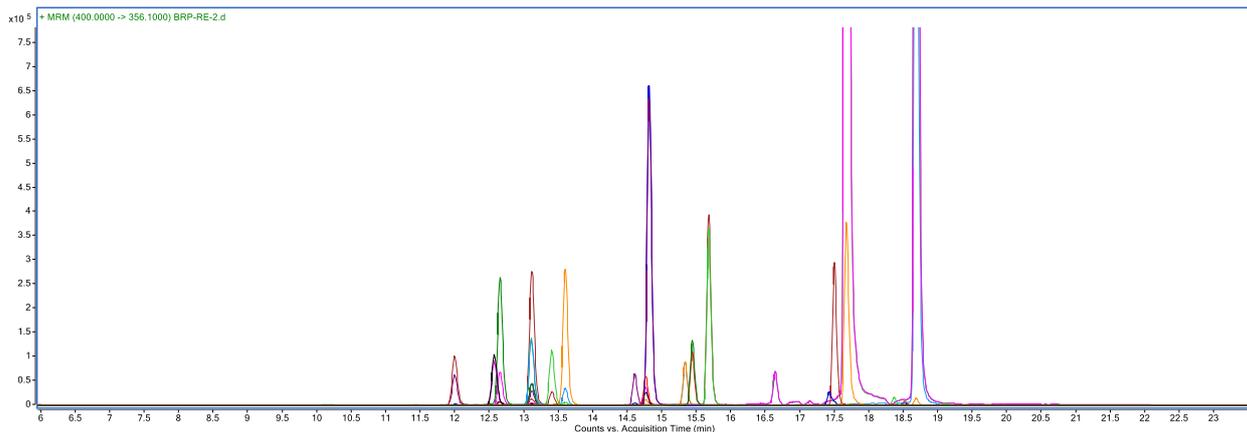


图 1 喹诺酮类样品加标 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 液相色谱串联质谱质量色谱图

Fig 1 MRM mass chromatogram of spiked quinolones samples at 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

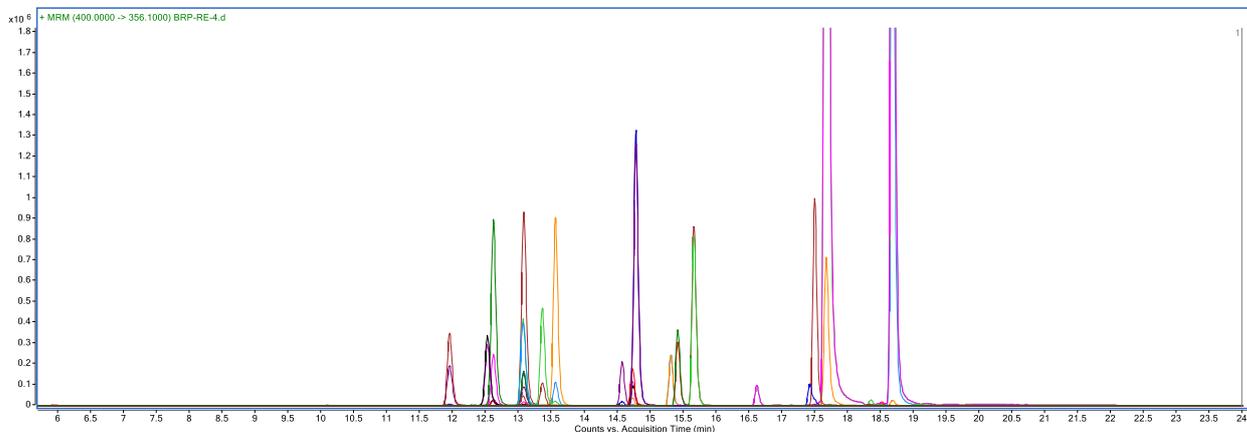


图 2 喹诺酮类样品加标 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 液相色谱串联质谱质量色谱图

Fig 2 MRM mass chromatogram of spiked quinolones samples at 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$

由表 3 可知，采用固相萃取结合液相色谱-串联质谱法检测 14 种喹诺酮类药物，加标量为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标回收率为 73.26%~103.9%，能够满足检测要求。由图 1 可看出经 BRP 固相萃取柱净化，采用月旭 Xtimate C18 色谱柱检测能够使将 14 种喹诺酮类药物较好的分离开，且各物质峰形良好，保留时间稳定。

表 3 喹诺酮类药物加标回收实验结果(n=6)

Tab.3 Results of recovery and precision of spiked samples

名称	加标量(μg/kg)	加标回收率(%)	RSD(%)	RT(min)
西诺沙星	5	93.26	3.67	15.398
	10	95.62	2.69	
洛美沙星	5	86.29	4.06	17.494
	10	85.68	3.59	
吡哌酸	5	70.05	5.28	15.649
	10	73.26	4.57	
沙拉沙星	5	77.06	5.27	15.296
	10	75.69	6.25	
萘啶酸	5	80.16	1.46	12.498
	10	81.29	2.48	
氧氟沙星	5	83.75	2.29	13.042
	10	82.53	3.28	
恩诺沙星	5	85.21	5.21	14.722
	10	86.29	4.08	
单诺沙星	5	76.15	6.07	14.599
	10	79.24	5.17	
培氟沙星	5	71.08	5.29	13.345
	10	78.36	3.64	
环丙沙星	5	88.26	3.51	13.544
	10	89.26	4.52	
依诺沙星	5	78.29	4.68	12.588
	10	88.19	5.26	
诺氟沙星	5	81.27	2.58	13.054
	10	84.38	1.59	
奥索利酸	5	96.26	2.17	17.661
	10	105.2	1.24	
氟甲喹	5	98.06	3.57	17.671
	10	103.9	2.06	

(5) 实际样品检测:

为了保证鸡肉样品的代表性,从大润发、永辉、华联、家乐福、苏果、沃尔玛等超市以及菜场选择具有代表性的 10 个鸡肉样品进行检测,结果均为未检出。

(6) 结论

本实验建立了喹诺酮类药物残留量检测的 LC-MS/MS 检测方法,并结合固相萃取技术对鸡肉中磺胺类药物的残留量进行了测定。对于加标量为 5.0 和 10.0 μg/kg 的样品进行了检测,回收率在 70.05%~103.9%,符合国标要求,固相萃取方法稳定并且色谱柱重现性良好,说明本方法能够用于检测动物源性食品中的喹诺酮类药物残留量。

(7) 订购指南

产品名称	包装规格	订货号
Welchrom® BRP	200mg/6ml, 30pk	00522-20014
Xtimate UHPLC C18	1.8um, 2.1×100mm	00101-01012