

高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肠道内容物中 32 种抗生素残留

丁 奇, 王建凤, 冯月超, 吴 赞, 马立利, 刘 佳, 王 颖, 贾 丽,
高丽娟, 邵 鹏*, 王秋水*

(北京市科学技术研究院分析测试研究所, 北京市理化分析测试中心, 北京 100089)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肠道内容物中 32 种抗生素残留的分析方法。**方法** 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 为分析色谱柱, 乙腈及酸化乙腈为提取溶剂, 通过兽药残留快速柱净化, 以高效液相色谱-串联质谱仪测定, 基质标准曲线定量。**结果** 该方法测定的 32 种抗生素检出限(limits of detection, LODs)为 0.2~0.5 μg/kg, 定量限(limits of quantitation, LOQs)为 1.0~1.5 μg/kg; 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 1.2%~12.8%, 3 个加标浓度的回收率范围为 79.5%~106.6%。在此基础上利用该方法分别对 5 家鱼类养殖场中鱼肠道内容物样品进行测定, 结果表明共检出 1 种磺胺类、1 种喹诺酮类、2 种四环素类和 3 种大环内酯类抗生素, 其中阿奇霉素(azithromycin, AZI)检出率较高。**结论** 该方法适用于鱼肠道内容物中 32 种抗生素残留的测定, 并可进一步为高效液相色谱-串联质谱法在各类样品检测及分析等方面的研究提供科学指导及理论依据。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 肠道内容物; 抗生素; 固相萃取柱

Determination of 32 kinds of antibiotic residues in fish intestinal content by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DING Qi, WANG Jian-Feng, FENG Yue-Chao, WU Zan, MA Li-Li, LIU Jia, WANG Ying,
JIA Li, GAO Li-Juan, SHAO Peng*, WANG Qiu-Shu*

(Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100089, China)

基金项目: 北京市科学技术研究院分析测试研究所改革与发展项目(2021ZL0112)、北京市科学技术研究院市级财政项目(PXM2021_178305_000005)、北京市科学技术研究院市级财政项目(11000022T000000442954)、北京市科学技术研究院“北科萌芽”计划(11000022T000000455559)

Fund: Supported by the Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing Center for Physical and Chemical Analysis Reform and Development Project (2021ZL0112), the Municipal Financial Project of Beijing Academy of Science and Technology (PXM2021_178305_000005), the Municipal Financial Project of Beijing Academy of Science and Technology (11000022T000000442954), and the BJAST Budding Talent Program of Beijing Academy of Science and Technology (11000022T000000455559)

*通信作者: 邵鹏, 博士, 副研究员, 主要研究方向为环境科学相关研究。E-mail: ses_shaopeng@163.com

王秋水, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为抗生素抗性基因污染相关研究。E-mail: wangqius9182901@hotmail.com

*Corresponding author: SHAO Peng, Ph.D, Associate Professor, Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, No.27, West 3rd Ring Rd North, Haidian District, Beijing 100089, China. E-mail: ses_shaopeng@163.com

WANG Qiu-Shui, Ph.D, Assistant Professor, Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology, Beijing Center for Physical and Chemical Analysis, No.27, West 3rd Ring Rd North, Haidian District, Beijing 100089, China. E-mail: wangqius9182901@hotmail.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 32 kinds of antibiotic residues in fish intestinal content by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** It was determined that the chromatographic column was ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), acetonitrile and acidified acetonitrile were used as extraction solvents, purification by rapid column of veterinary drug residues, determination by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, matrix standard curve quantification. **Results** The limits of detection (LODs) of 32 kinds of antibiotics determined by this method were 0.2–0.5 μg/kg, and the limits of quantification (LOQs) were 1.0–1.5 μg/kg, the relative standard deviations (RSDs) were 1.2%–12.8%, the recoveries of 3 spiked concentrations were 79.5%–106.6%. On this basis, the method was used to determine the fish intestinal content samples of 5 fish farms, the results showed that 1 kind of sulfonamide, 1 kind of quinolone, 2 kinds of tetracyclines and 3 kinds of macrolide antibiotics were detected, and the detection rate of azithromycin (AZI) was higher. **Conclusion** Based on the above conclusions, this method is suitable for the determination of 32 kinds of antibiotic residues in fish intestinal content, and can further provide scientific guidance and theoretical basis for the study of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the detection and analysis of various samples.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; intestinal content; antibiotics; solid phase extraction column

0 引言

水产养殖业是我国农业重要组成部分,其产量占世界 60%以上^[1]。中国也是世界上最大的水产品消费和出口国之一,仅 2019 年水产品进出口总量已达到 1053.32 万 t,为全球唯一水产品进出口总量超过千万 t 的国家^[2–3]。目前水产养殖通常采用集约化、高密度养殖模式来提高产量,但同时也使鱼类感染致病菌的风险增加,为了避免水生动物病害引起的经济损失所以需要抗生素对其来进行预防与治疗^[4–5]。抗生素是一类广谱抗菌药物,可有效预防和治疗多种细菌感染和寄生虫病,此外还能促进水产生物快速生长,提高饲料利用率等,因此该类药物在水产养殖方面具有广泛应用^[6–9]。但随着抗生素使用缺乏科学指导,滥用现象十分严重,在水产养殖过程中会有 20%~30%被鱼类吸收,当这些抗生素在鱼体内大量富集后能诱导体内致病微生物产生抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)从而使其耐药性增强,当抗性基因一旦通过食物链进入人体后会对人类健康构成巨大威胁^[2,10–12]。而鱼肠道内容物中抗生素含量直接影响着肠道微生物产生抗性基因的程度,因此建立其抗生素的检测方法具有重要意义。

目前,抗生素检测方法主要有酶联免疫法^[13]、液相色谱法^[14–15]、高效液相色谱-串联质谱法^[16–18]、毛细管电泳法^[19]、微生物检测法^[16,20]、分子印迹法等^[21]。但这些方法中最常用方法为高效液相色谱-串联质谱法,与其他方法相比具有无需衍生化、灵敏度高、特异性强、准确性及重现性好等优点,可以使某些难分离的待测物实现准确定量检测,并能同时分析多种目标物,适用于各类复杂基质

中的分析检测^[22]。而该方法在检测鱼肠道内容物中多种抗生素残留的研究较少,因此有必要开展其适用性研究。

本研究开展了高效液相色谱-串联质谱法对鱼肠道内容物中磺胺类(sulfonamides antibiotics, SAs)、喹诺酮类(quinolone antibiotics, QNs)、四环素类(tetracycline antibiotics, TCs)、大环内酯类(macrolide antibiotics, MLs)、氯霉素类(chloramphenicol antibiotics, CPs)等 32 种抗生素的检测,主要研究内容包含质谱及色谱仪器方法的优化、色谱柱选择、提取溶剂优化、净化方式优化、基质效应、方法检出限、精密度、准确性等方面,并通过对实际样品分析,从而验证该方法的适用性。本研究结果为鱼肠道内容物中多种抗生素的检测分析提供了一定的参考价值,以期为进一步阐明抗生素抗性基因(ARGs)宿主来源及传播方式等方面研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈、甲醇、乙酸(色谱纯,美国 Fisher Science 公司);甲酸[纯度>98%,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司];乙酸铵(纯度 98%,北京百灵威科技有限公司);十二水合磷酸氢二钠、无水硫酸钠(分析纯,汕头西陇科学股份有限公司);乙二胺四乙酸二钠(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na₂EDTA)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);柠檬酸(纯度 99.5%,天津市光复科技发展有限公司);磷酸(优级纯,北京市通广精细化工公司);磺胺甲氧吡嗪(sulfamethoxypyridazine, SMP)、磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMM)、磺胺地索辛(sulfadimethoxine,

SDT)、甲氧苄啶(trimethoprim, TMP)、磺胺甲噁二唑(sulfamethizole, SMT)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR)、磺胺噻唑(sulfathiazole, STZ)、磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMZ)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)、磺胺吡啶(sulfapyridine, SPD)、磺胺氯吡嗪(sulfachlorpyridazine, SCP)、磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SDM)、磺胺异恶唑(sulfisoxazole, SIZ)、磺胺恶唑(sulfamoxole, SMO)、磺胺对甲氧嘧啶(sulfamethoxydiazine, SMD)、磺胺索嘧啶(sulfisomidine, SIM)、四环素(tetracycline, TC)、氟苯尼考(flornicicol, FF)、罗红霉素(roxithromycin, ROX)、奥比沙星(orbifloxacin, ORB)、氟罗沙星(fleroxacin, FLE)、阿奇霉素(szithromycin, AZI)、林可霉素(lincomycin, LCM)、氯霉素(chloramphenicol, CAP)、环丙沙星-D8(ciprofloxacin-D8, CIP-D8)、诺氟沙星-D5(norfloxacin-D5, NOR-D5)、氧氟沙星-D3(ofloxacin-D3, OFL-D3)、氯霉素-D5(chloramphenicol-D5, CAP-D5)(浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 甲砒霉素(thiamphenicol, TAP)(浓度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 常州坛墨质检科技股份有限公司); 土霉素(oxytetracycline, OTC)(浓度 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、强力霉素(doxycycline, DXC)(浓度 0.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、替米考星(timicosin, TIL)(浓度 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(农业农村部环境保护科研监测所); 环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、氟甲喹(flumequine, FLU)、氧氟沙星(ofloxacin, OFL)(浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB)(上海安谱实验科技股份有限公司); N-丙基乙二胺(primary secondary amine sorbent, PSA)、十八烷基键合硅胶(octadecylsilane chemically bonded silica, C₁₈)(天津博纳艾杰尔科技有限公司); Oasis HLB 固相萃取柱(500 mg, 6 mL)、ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); FAVEX-NM50 兽药残留快速柱(高雄巨研科技股份有限公司)。

Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液^[23]: 称取 37.2 g 乙二胺四乙酸二钠、12.9 g 柠檬酸、27.5 g 十二水合磷酸氢二钠混合后, 用超纯水定容至 1 L 后用磷酸调节 pH 至 4 \pm 0.05。

1.2 仪器与设备

DKZ 电热恒温振荡水槽(常州荣华仪器制造有限公司); Elix10 Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); Xevo TQ-S 四极杆串联质谱仪、ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); GR22GIII 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司); N-EVAPTM112 恒温水浴氮吹仪(美国 Organomation 公司); SQP 天平(德国 Sartorius 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集与前处理

采集天津市 3 家鱼类养殖场中鱼新鲜肠道内容物样品, 将其避光密封于离心管中, 并立即放入装有冰盒的储存箱中, 保持冷藏状态下带回实验室于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存。

称取 1.00 g 鱼肠道内容物于 50 mL 具盖的聚丙烯离心管中, 后加入 50 μL 的 100 ng/mL 内标混合溶液于待测样品中, 再加入 5 mL 乙腈, 涡旋振荡 20 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 8000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 剩余残留物用 5 mL 的 1% 甲酸乙腈溶液重复提取 1 次, 合并 2 次提取液。取 5 mL 过 FAVEX-NM50 兽药残留快速柱, 以 1 滴/s 的流速收集流出液, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴氮气吹至近干, 加入 1 mL 乙腈-0.1% 甲酸水溶液(5:95, V:V), 涡旋 1 min, 过 0.22 μm 滤膜后待测。

1.3.2 标准曲线

采用基质加标制备标准曲线: 称取不含被测物的空白鱼肠道内容物样品, 向其中加入标准溶液, 混匀后静置 30 min, 余下操作同 1.3.1 前处理过程, 最终得到一系列基质标准工作溶液。其中 CAP、NOR、CIP 和 OFL 分别以 CAP-D5、NOR-D5、CIP-D8 及 OFL-D3 为内标, 剩余抗生素均采用外标法定量。

1.3.3 色谱条件

正离子模式: 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL , 流动相为乙腈(A)-0.1% 甲酸水溶液(B), 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱为 0.0~1.0 min, 5% A; 1.0~2.0 min, 5%~10% A; 2.0~7.0 min, 10%~15% A; 7.0~11.0 min, 15%~90% A; 11.0~12.0 min, 90%~100% A; 12.0~14.0 min, 100% A; 14.0~14.1 min, 100%~5% A; 14.1~16.0 min, 5% A。

负离子模式: 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL , 流动相为乙腈(A)-水(B), 流速 0.2 mL/min。梯度洗脱为 0.0~0.5 min, 10% A; 0.5~3.5 min, 10%~40% A; 3.5~4.0 min, 40%~10% A; 4.0~5.0 min, 10% A。

1.3.4 质谱条件

电喷雾电离源, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式。电喷雾离子源正离子(electron spray ionization, ESI+)模式, 毛细管电压 1.00 kV, 脱溶剂气温度 450 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速 800 L/Hr, 锥孔气流速 150 L/Hr; 负离子模式(ESI-), 毛细管电压 3.00 kV, 脱溶剂气温度 400 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂气流速 650 L/Hr, 锥孔气流速 150 L/Hr。多种抗生素质谱参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 色谱柱选择

分别考察色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)与 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm)的分离效果。结果表明 2 种色谱柱均能较好地分离氯霉素类、磺胺类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类抗生素, 但 T3 在分离 3 种氯霉素类抗生素时出峰时间较晚, 本研究为了能快速进行分析检测, 因此采用 BEH C₁₈ 色谱柱, 其各类抗生素标准品的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)如图 1 所示, 该类型色谱柱与胡钰等^[24]在测定土壤中抗生素时所使用的色谱柱一致。

表1 多种抗生素 MRM 质谱参数
Table 1 Mass spectrometry parameters for multiple antibiotics

编号	分类	抗生素	离子模式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
1	磺胺类(Sas)	SIM	ESI+	279.2	124.1 ⁺ /186.1	10	20/16
2		SDT	ESI+	311.2	156.0 ⁺ /92.0	50	20/32
3		SMD	ESI+	281.2	156.1 ⁺ /92.0	28	16/24
4		SMP	ESI+	281.2	156.0 ⁺ /108.0	46	16/26
5		SMM	ESI+	281.2	156.0 ⁺ /92.0	32	16/26
6		SDM	ESI+	279.2	186.1 ⁺ /92.0	18	16/30
7		SMO	ESI+	268.2	156.0 ⁺ /92.0	28	14/26
8		SIZ	ESI+	268.2	156.0 ⁺ /92.0	34	12/24
9		TMP	ESI+	291.3	230.2 ⁺ /123.1	62	22/24
10		SCP	ESI+	285.2	156.0 ⁺ /92.0	32	14/28
11		SMT	ESI+	271.2	156.0 ⁺ /108.0	22	14/22
12		SMR	ESI+	265.2	156.1 ⁺ /92.0	12	16/26
13		STZ	ESI+	256.1	156.0 ⁺ /92.0	22	14/22
14		SMZ	ESI+	254.2	156.0 ⁺ /92.0	16	14/26
15		SDZ	ESI+	251.2	152.1 ⁺ /92.0	14	14/26
16		SPD	ESI+	250.2	156.0 ⁺ /92.0	32	16/26
17	喹诺酮类(QNs)	ORB	ESI+	396.6	295.2 ⁺ /226.1	48	22/44
18		FLE	ESI+	370.6	269.3 ⁺ /194.1	52	26/44
19		CIP	ESI+	332.1	245.0 ⁺ /231.0	40	22/38
20		NOR	ESI+	320.1	233.1 ⁺ /205.0	36	24/32
21		FLU	ESI+	262.0	202.0 ⁺ /126.0	8	32/44
22		OFL	ESI+	362.1	261.1 ⁺ /318.2	18	26/26
23		CIP-D8	ESI+	340.2	296.3 ⁺ /206.3	34	18/24
24		NOR-D5	ESI+	325.4	238.2 ⁺ /206.1	6	26/24
25	OFL-D3	ESI+	365.5	261.1 ⁺ /221.5	60	26/38	
26	四环素类(TCs)	TC	ESI+	445.4	410.4 ⁺ /427.3	32	18/10
27		OTC	ESI+	461.4	426.4 ⁺ /201.1	35	20/40
28	DXC	ESI+	445.3	428.3 ⁺ /410.1	44	16/22	
29	大环内酯类(MLs)	AZI	ESI+	750.0	591.9 ⁺ /116.1	80	28/44
30		ROX	ESI+	838.1	158.1 ⁺ /679.9	52	32/18
31		TIL	ESI+	870.2	174.1 ⁺ /88.0	78	42/68
32	氯霉素类(CPs)	LCM	ESI+	407.4	126.1 ⁺ /82.3	54	26/30
33		CAP	ESI-	321.1	151.8 ⁺ /257.0	30	20/15
34		FF	ESI-	356.1	336.2 ⁺ /185.1	2	10/20
35		TAP	ESI-	354.3	185.1 ⁺ /290.2	54	18/10
36		CAP-D5	ESI-	326.3	156.8 ⁺ /262.1	25	18/12

注: *定量离子。

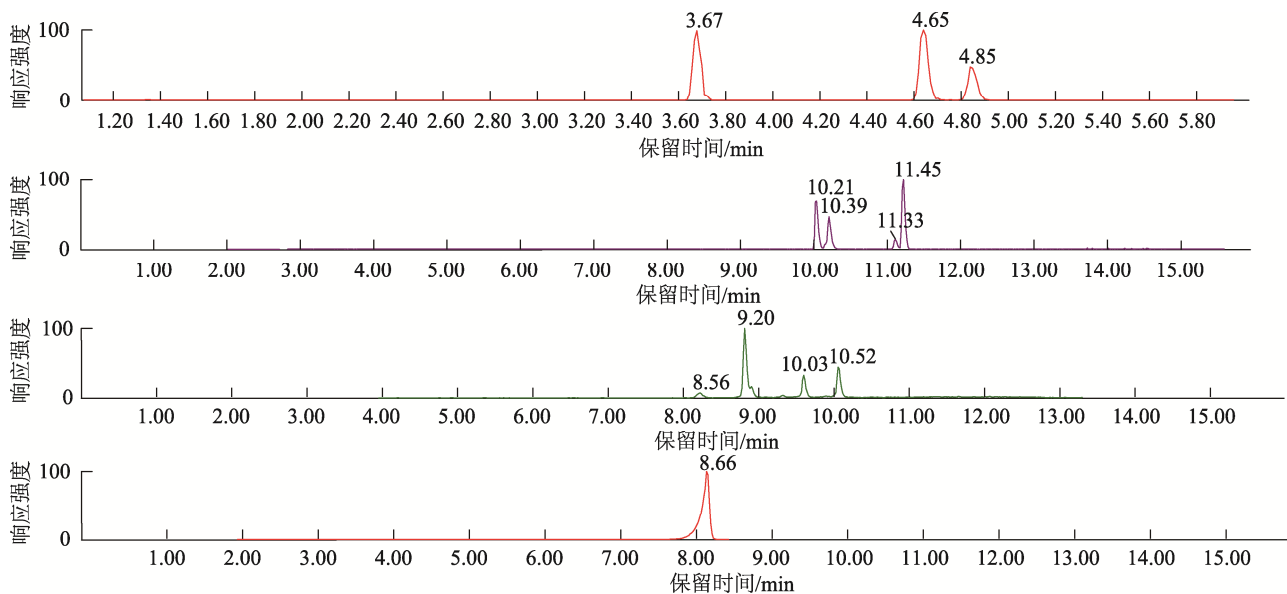


图1 32种抗生素标准品多反应监测的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of multiple reaction monitoring of 32 kinds of antibiotics

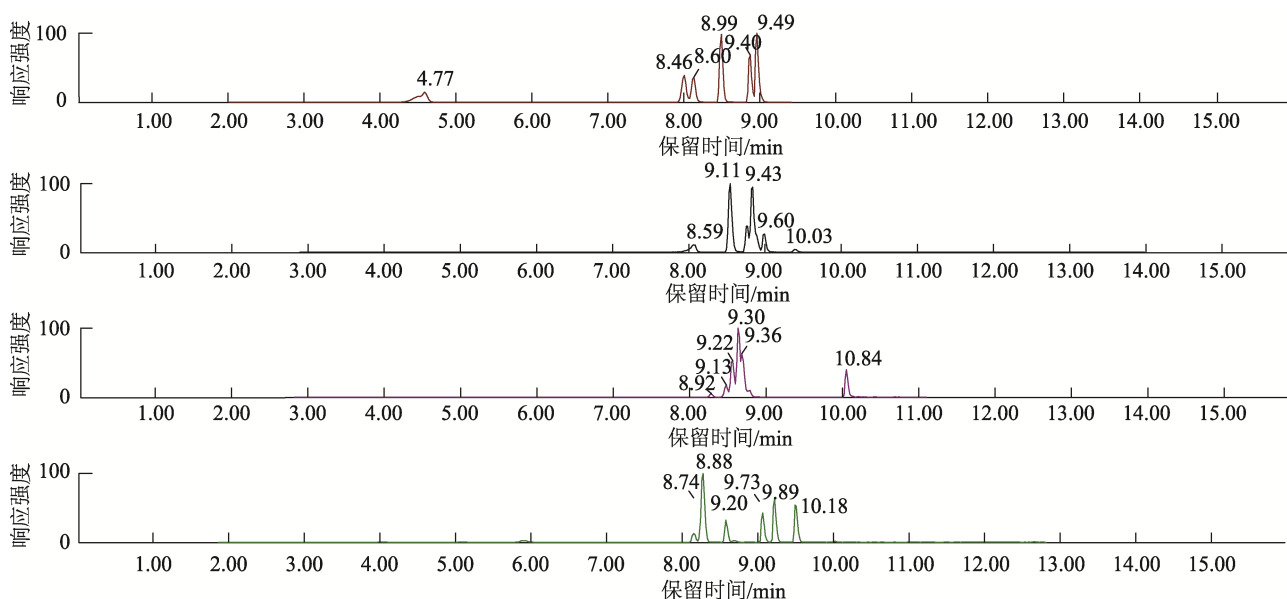


图1(续) 32种抗生素标准品多反应监测的总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of multiple reaction monitoring of 32 kinds of antibiotics

2.2 流动相的选择

本研究考察了正负离子模式下以乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸的10 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈-0.1%乙酸水溶液作为流动相对5类抗生素的分离效果。结果发现在正离子模式下采用流动相为乙腈-水时大多数抗生素未出峰,其他流动相条件下各类抗生素均出峰。但乙腈-0.1%甲酸水溶液、乙腈-0.1%乙酸的10 mmol/L 乙酸铵水溶液分别会降低吡哌酸、四环素类抗生素的质谱响应而且峰形较差,综合考虑正离子模式下流动相选用乙腈-0.1%乙酸水溶液;负离子模式下主要是考察不同流动相对氯霉素类抗生素分离的影响,发现流动相中添加酸性物质后峰形变差,因此在分离氯霉素类抗生素时选用乙腈-水作为流动相。

2.3 提取溶剂的选择

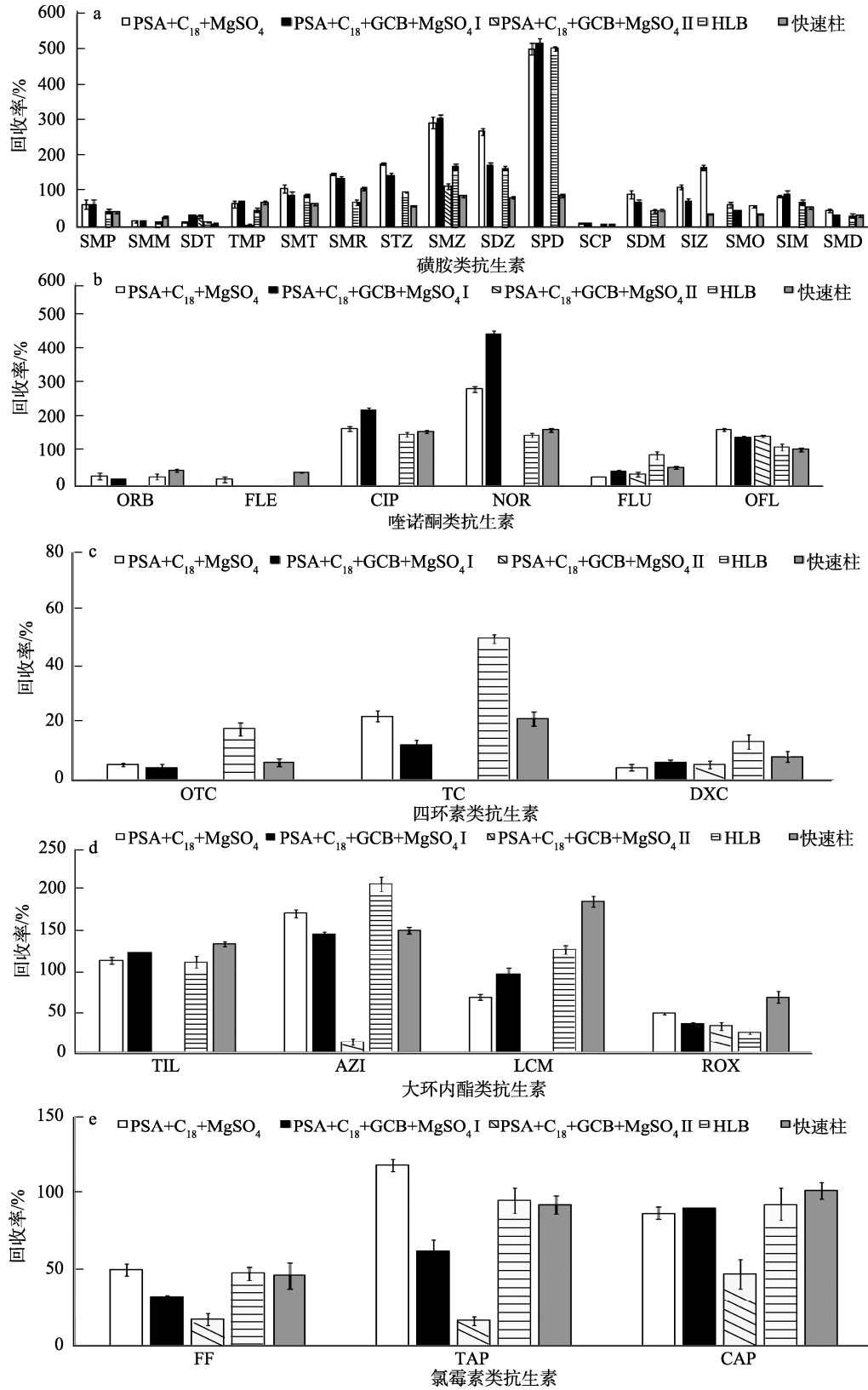
选择甲醇、乙腈、1%甲酸乙腈、 Na_2EDTA -Mcllvaine 缓冲液(pH=4)-乙腈(1:1, V:V)为提取溶剂,分别对目标化合物的提取效果进行比较。研究发现,乙腈对磺胺类、喹诺酮类抗生素提取效果好于其他3种,而酸化后的溶剂1%甲酸乙腈和 Na_2EDTA -Mcllvaine 缓冲液(pH=4)-乙腈(1:1, V:V)能明显提高四环素类的提取效率,其中以1%甲酸乙腈效果最好,大环内酯类的提取效果较好的为甲醇、乙腈,这是由于大环内酯类为碱性化合物更易溶于中性溶剂。但在实验中发现甲醇、 Na_2EDTA -Mcllvaine 缓冲液(pH=4)-乙腈(1:1, V:V)提取杂质过多,容易对待测物的出峰造成干扰,而乙腈能有效降低干扰过程。有研究表明乙腈适用于磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素提取,并且酸化溶剂有助于提高四环素类、氯霉素类抗生素的萃取效率^[24-28]。因此,本研究先采用乙腈提取,再以1%甲酸乙腈进行重复操作。

2.4 净化方式的选择

为了减少提取液中基质效应的影响,本研究探讨了 QuEChERS 和固相萃取柱等方法的净化效果,并选择 $\text{PSA}+\text{C}_{18}+\text{MgSO}_4$ (100 mg+100 mg+100 mg)、 $\text{PSA}+\text{C}_{18}+\text{GCB}+\text{MgSO}_4$ I (100 mg+100 mg+50 mg+100 mg)、 $\text{PSA}+\text{C}_{18}+\text{GCB}+\text{MgSO}_4$ II (100 mg+100 mg+100 mg+100 mg) 3种 QuEChERS 及 Oasis HLB、FAVEX-NM50 兽药残留快速柱2种固相萃取柱进行实验。由图2可知,经5种方式净化处理后部分抗生素的回收率受到了不同程度基质效应影响,但固相萃取柱的整体净化杂质的效果好于 QuEChERS,其中2种固相萃取柱净化效果相当,而含 GCB 的 QuEChERS 净化方式会吸附部分抗生素,并随着其含量增加吸附抗生素程度不断增强,从而导致回收率逐渐降低。通过综合比较,固相萃取柱方法中 FAVEX-NM50 快速柱净化步骤相对简单且净化效果较好,因此选择该净化方式。

2.5 线性关系和基质效应

经高效液相色谱-串联质谱法测定系列混合标准溶液后,以各抗生素标准品质量浓度 X 为横坐标,峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,计算回归方程,确定相关系数。如表2所示,32种抗生素的相关系数均大于0.99,满足该方法的需求。参考文献方法^[9,29],基质效应(matrix effects, ME)采用空白样品中标准物质峰面积与溶剂中标准物质峰面积的比值进行评估。当 $\text{ME}=1$ 为无基质效应, $\text{ME}<1$ 为基质抑制效应, $\text{ME}>1$ 为基质增强效应。结果表明,32种抗生素中仅有 TIL、AZI、LCM 的 ME 大于1,存在明显的基质增强效应,其余均呈现基质抑制效应,因此本方法采用基质标准曲线进行定量测定,以降低基质效应的影响。



注: a: 磺胺类抗生素的回收率; b: 喹诺酮类抗生素的回收率; c: 四环素类抗生素的回收率; d: 大环内酯类抗生素的回收率; e: 氯霉素类抗生素的回收率。

图 2 不同净化方式对抗生素回收率的影响(n=3)

Fig.2 Effects of different purification methods on the recoveries of antibiotics (n=3)

表 2 32 种抗生素的回归方程和基质效应(n=3)
Table 2 Regression equations and matrix effects of 32 kinds of antibiotics (n=3)

抗生素	回归方程	基质效应	抗生素	回归方程	基质效应
SMP	Y=27858.9X+10363.6	0.26	SDZ	Y=14362.5X+16461.8	0.81
SMM	Y=10303.1X+292.92	0.30	SPD	Y=18912.4X+457098.6	0.74
SDT	Y=34315.7X-1162.49	0.51	SCP	Y=6915.74X+15687.5	0.17
TMP	Y=47197.1X+14074.8	0.27	SDM	Y=2185701X+1628.58	0.56
SMT	Y=14948.7X+16580.4	0.88	SIZ	Y=25040.8X-10159.6	0.40
SMR	Y=17800.4X-669.972	0.44	SMO	Y=11215.9X-3717.91	0.52
STZ	Y=7531.8X+6262.71	0.67	SIM	Y=15177.9X+3689.94	0.70
SMZ	Y=18890.9X-2343.81	0.71	SMD	Y=1416.34X+8166.34	0.34
ORB	Y=162.838X-49.5016	0.12	DXC	Y=7456.51X-1329.64	0.44
FLE	Y=33471.6X+24303.7	0.35	TIL	Y=6986.38X+6400.66	3.09
CIP	Y=2.11583X-1.7328536	0.38	AZI	Y=7811.69X-5362.59	1.16
NOR	Y=0.0726711X+0.0349123	0.51	LCM	Y=175866X+174974	2.19
FLU	Y=78.3159X-78.0888	0.73	ROX	Y=18438.7X-7862.91	0.48
OFL	Y=0.0159484X+0.00381508	0.40	FF	Y=1100.7X+1241.98	0.88
OTC	Y=1417.25X+1985.19	0.56	TAP	Y=788.09X-296.518	0.80
TC	Y=8448.79X+4791.57	0.34	CAP	Y=0.575093X+0.0442331	0.66

2.6 检出限、定量限、准确度和精密度

本方法的检出限(limits of detection, LODs)和定量限(limits of quantitation, LOQs)分别通过空白基质中待测物在 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)处的含量来确定^[30-31]。由表 3 可知, 32 种抗生素的 LODs 为 0.2~0.5 μg/kg, LOQs 为 1.0~1.5 μg/kg。在空白鱼肠道内容物样品中添加 3 个浓度水平进行回收率实验, 浓度依次为 2.0、5.0、8.0 μg/kg, 每

个水平平行测定 6 次, 得出磺胺类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类、氯霉素类抗生素的加标回收率范围分别为 79.5%~106.6%、81.6%~102.7%、90.3%~99.6%、86.9%~100.0%、90.1%~98.6%; 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)范围分别为 1.2%~12.8%、1.7%~7.4%、1.7%~9.7%、1.9%~6.3%、3.3%~8.5%, 该方法的准确度和精密度均满足检测要求。

表 3 32 种抗生素的方法检出限、定量限、准确度和精密度(n=6)
Table 3 Limits of detection, limits of quantification, accuracies and precisions of 32 kinds of antibiotics (n=6)

抗生素	加标量 /(μg/kg)	回收率 /%	RSDs /%	LODs /(μg/kg)	LOQs /(μg/kg)	抗生素	加标量 /(μg/kg)	回收率 /%	RSDs /%	LODs /(μg/kg)	LOQs /(μg/kg)
SMP	2.0	87.1	1.2	0.5	1.5	SDZ	2.0	95.6	5.7	0.5	1.5
	5.0	80.5	3.3				5.0	85.3	5.4		
	8.0	80.6	2.3				8.0	84.1	8.3		
SMM	2.0	96.9	6.4	0.5	1.5	SPD	2.0	96.4	5.9	0.5	1.5
	5.0	96.9	6.4				5.0	92.3	10.4		
	8.0	88.2	7.2				8.0	101.2	5.6		
SDT	2.0	90.7	3.9	0.5	1.5	SCP	2.0	87.5	3.0	0.5	1.5
	5.0	84.5	3.6				5.0	91.6	7.0		
	8.0	81.8	4.7				8.0	95.4	7.1		
TMP	2.0	90.0	1.9	0.2	1.0	SDM	2.0	88.8	1.9	0.5	1.5
	5.0	88.4	8.4				5.0	90.3	8.0		
	8.0	79.5	3.4				8.0	94.6	4.5		
SMT	2.0	99.8	8.4	0.5	1.5	SIZ	2.0	92.5	7.8	0.5	1.5
	5.0	99.0	12.8				5.0	84.0	2.3		
	8.0	91.0	3.6				8.0	92.5	3.1		
SMR	2.0	83.9	5.6	0.5	1.5	SMO	2.0	93.6	6.2	0.5	1.5
	5.0	90.4	5.7				5.0	87.7	4.7		
	8.0	95.8	4.6				8.0	90.9	3.6		
STZ	2.0	91.7	5.5	0.5	1.5	SIM	2.0	85.6	8.3	0.5	1.5
	5.0	89.4	6.0				5.0	91.1	5.3		
	8.0	101.4	4.9				8.0	83.3	2.6		
SMZ	2.0	106.6	6.5	0.5	1.5	SMD	2.0	93.5	3.4	0.5	1.5
	5.0	90.7	6.1				5.0	87.3	4.7		
	8.0	92.5	4.7				8.0	92.7	2.8		
ORB	2.0	89.3	3.5	0.5	1.5	DXC	2.0	98.4	7.3	0.2	1.0
	5.0	86.0	7.0				5.0	91.7	7.6		
	8.0	93.6	5.4				8.0	93.0	5.9		
FLE	2.0	89.9	5.1	0.5	1.5	TIL	2.0	96.8	6.3	0.2	1.0
	5.0	89.0	4.5				5.0	92.2	4.3		
	8.0	81.6	4.2				8.0	95.2	3.7		
CIP	2.0	99.0	4.8	0.5	1.5	AZI	2.0	99.8	3.2	0.2	1.0
	5.0	89.4	6.7				5.0	88.0	5.8		
	8.0	92.7	3.9				8.0	93.5	5.2		

表 3(续)

抗生素	加标量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSDs /%	LODs /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQs /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	抗生素	加标量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSDs /%	LODs /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQs /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
NOR	2.0	97.8	6.4	0.2	1.0	LCM	2.0	100.0	4.2	0.2	1.0
	5.0	88.1	6.4				5.0	90.9	5.7		
	8.0	96.3	7.4				8.0	91.7	5.7		
FLU	2.0	92.2	3.0	0.2	1.0	ROX	2.0	86.9	1.9	0.2	1.0
	5.0	92.2	5.8				5.0	90.0	5.2		
	8.0	94.2	4.1				8.0	91.5	4.4		
OFL	2.0	96.2	4.1	0.2	1.0	FF	2.0	94.6	3.5	0.2	1.0
	5.0	85.9	5.1				5.0	92.0	8.5		
	8.0	102.7	1.7				8.0	93.7	4.6		
OTC	2.0	99.6	1.7	0.2	1.0	TAP	2.0	97.8	7.3	0.5	1.5
	5.0	92.9	9.7				5.0	94.7	8.3		
	8.0	90.3	7.1				8.0	92.8	3.3		
TC	2.0	96.5	7.7	0.5	1.5	CAP	2.0	98.6	6.8	0.2	1.0
	5.0	93.4	5.8				5.0	95.0	4.8		
	8.0	95.7	4.8				8.0	90.1	5.8		

2.7 实际样品测定

采用本研究建立的方法分别对 5 家鱼类养殖场所采集的肠道内容物样品进行检测。由表 4 可知,共检出 1 种磺胺类、1 种喹诺酮类、2 种四环素类和 3 种大环内酯类抗生素,分别为 TMP、CIP、OTC、DXC、TIL、AZI、LCM,其中 5 家鱼类养殖场均检出 AZI,而氯霉素类抗生素均未被检出。由此可知,这 5 家养殖场的鱼类肠道内容物样品中均存在抗生素残留现象。

表 4 实际样品中检出的抗生素含量

Table 4 Content of antibiotics detected in actual samples

分类	名称	养殖场编号	含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSDs/%
SAs	TMP	2	6.15	3.4
QNs	CIP	5	4.64	2.2
TCs	OTC	2	5.44	2.7
MLs	TIL	2	6.18	3.6
		1	0.54	3.7
		2	3.27	2.1
AZI	3	1.16	1.8	
	4	0.64	1.6	
	5	0.59	2.6	
LCM	2	3.85	2.5	

3 结论与讨论

本研究建立了鱼肠道内容物中 32 种抗生素含量测定的高效液相色谱-串联质谱法。该方法采用快速固相萃取柱净化,比常用的固相萃取柱 HLB 和 QuEChERS 方法更加便捷,并对检出限、精密度、准确度及实际样品等方面进行研究,验证了其适用性。本方法操作简便、效率高、准确性好,可用于抗生素残留等方面的快速筛查与检测,并能够为食品及环境污染等方面的安全风险性研究提高一定的技术支持。

参考文献

[1] 马昊楠. 现实与理性的选择-业内资深人士谈水产养殖业抗生素使用问题[J]. 首都食品与医药, 2015, (3): 37-38.

MA HN. Realistic and rational choice-industry veterans talk about the use of antibiotics in aquaculture [J]. *Cap Food Med*, 2015, (3): 37-38.

[2] 李贞金, 张洪昌, 沈根祥, 等. 水产养殖水、沉积物中抗生素检测方法优化及残留特征研究[J]. *生态毒理学*, 2020, 15(1): 209-219.

LI ZJ, ZHANG HC, SHEN GX, *et al.* Optimization of antibiotic detection methods and residual characteristics in aquaculture water and sediment [J]. *Asian J Ecotoxicol*, 2020, 15(1): 209-219.

[3] 阮思甜. 我国水产养殖业需加快推进高质量发展[J]. *农经*, 2021, (1): 46-50.

RUAN ST. China's aquaculture industry needs to accelerate the development of high quality [J]. *Agric Econ*, 2021, (1): 46-50.

[4] 郝勤伟, 徐向荣, 陈辉, 等. 广州市南沙水产养殖区抗生素的残留特性[J]. *热带海洋学报*, 2017, 36(1): 106-113.

HAO QW, XU XR, CHEN H, *et al.* Residual antibiotics in the nansha aquaculture area of Guangzhou [J]. *J Trop Ocean*, 2017, 36(1): 106-113.

[5] 洪扬, 李孟月, 张驰, 等. 水产养殖中抗生素耐药性研究现状[J]. *安徽农学通报*, 2021, 27(12): 65-68, 89.

HONG Y, LI MY, ZHANG C, *et al.* Research status of antibiotic resistance in aquatic product industry [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2021, 27(12): 65-68, 89.

[6] 王晓燕, 张航俊, 张晓丽, 等. 畜禽粪便中抗生素残留检测技术研究进展[J]. *中国畜禽种业*, 2021, 17(2): 42-45.

WANG XY, ZHANG HJ, ZHANG XL, *et al.* Research progress on the detection technology of antibiotic residues in livestock and poultry manure [J]. *Chin Livestock Poult Breed*, 2021, 17(2): 42-45.

[7] 钱卓真, 汤水粉, 梁焱, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产养殖环境沉积物中磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素[J]. *质谱学报*, 2019, 40(4): 356-368.

QIAN ZZ, TANG SF, LIANG Y, *et al.* Simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and macrolides antibiotics residues in sediment from aquaculture environment by QuEChERS-HPLC-MS/MS [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2019, 40(4): 356-368.

[8] BAZINE I, BENDJEDID S, BOUKHARI A. Potential antibacterial and antifungal activities of novel sulfamidophosphonate derivatives bearing the quinoline or quinolone moiety [J]. *Archiv Pharmazie*, 2020. DOI: 10.1002/ardp.202000291

[9] 严明, 唐建, 严寒, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中 10 种喹诺酮类和四环素类抗生素[J]. *化学分析计量*, 2021, 30(5): 55-60, 69.

YAN M, TANG J, YAN H, *et al.* Simultaneous determination of 10 quinolones and tetracycline antibiotics in feed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Anal Meter*, 2021, 30(5): 55-60, 69.

[10] 刘玉林. 淡水水产品抗生素使用现状及其检测技术研究进展[J]. *农村科学实验*, 2019, (3): 81-82, 93.

LIU YL. Current situation of antibiotic use in freshwater aquatic products and research progress of its detection technology [J]. *Sci Exper Count*, 2019, (3): 81-82, 93.

[11] MARCHANT J. When antibiotics turn toxic [J]. *Nature*, 2018, 555(7697):

- 431-433.
- [12] 赵帝,徐在言,吴山功,等.草鱼肠道微生物抗生素抗性基因研究[J].水生生态学杂志,2019,40(6):111-116.
ZHAO D, XU ZY, WU SG, *et al.* Antibiotic resistance genes in the intestinal microorganisms of grass carp [J]. J Hydroecol, 2019, 40(6): 111-116.
- [13] DU B, WEN F, GUO X, *et al.* Evaluation of an ELISA-based visualization microarray chip technique for the detection of veterinary antibiotics in milk [J]. Food Control, 2019, 106: 106713.
- [14] YU WH, CHIU HW, CHIU CF, *et al.* Validated HPLC method with UV detection for florfenicol determination in bester sturgeon, a cultured Hybrid of *Huso huso*-*Acipenser ruthenus* [J]. Biomed J Sci Technol Resh, 2019. DOI: 10.26717/BJSTR.2019.17.002994
- [15] KUMAR A, PANDA AK, SHARMA N. Determination of antibiotic residues in bovine milk by HPLC-DAD and assessment of human health risks in Northwestern Himalayan region, India [J]. J Food Sci Technol, 2021. DOI: 10.1007/s13197-021-04988-8
- [16] 王志显,张桂芳,张晓瑜,等. QuEChERS-高效液相色谱-质谱联用法同时检测鸡肝和鸡肝中15种喹诺酮类和四环素类抗生素[J].肉类研究,2020,34(3):51-57.
WANG ZY, ZHANG GF, ZHANG XY, *et al.* Simultaneous determination of 15 kinds of quinolones and tetracyclines in chicken gizzard and chicken liver by QuEChERS-high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J] Meat Res, 2020, 34(3): 51-57
- [17] 韦航,邹强,李军法,等.液相色谱-串联质谱测定豆芽中4种四环素类药物残留量研究[J].广州化工,2019,47(17):122-124,148.
WEI H, ZOU Q, LI JF, *et al.* Determination of four tetracycline antibiotics in bean sprouts by HPLC-MS/MS [J]. Guangzhou Chem Ind, 2019, 47(17): 122-124, 148.
- [18] LKA B, ML C, GH C, *et al.* A filtration optimized on-line SPE-HPLC-MS/MS method for determination of three macrolide antibiotics dissolved and bound to suspended solids in surface water [J]. Microchem J, 2019, 148: 480-492.
- [19] 李爱梅,黄苗,卢文平,等.毛细管电泳法测定水体中四环素类抗生素的基质效应及场放大进样技术的应用[J].色谱,2014,32(8):897-903.
LI AIM, HUANG Z, LU WP, *et al.* Matrix effect of tetracycline antibiotics in water by capillary electrophoresis and application of field amplification injection technology [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(8): 897-903.
- [20] YANG Z, CUI Q, ZHANG M, *et al.* A lux-based *Staphylococcus aureus* bioluminescence screening assay for the detection/identification of antibiotics and prediction of antibiotic mechanisms [J]. J Antibiot, 2020. DOI: 10.1038/s41429-020-0349-7
- [21] BENACHIO I, LOBATO A, GONALVES LM. Employing molecularly imprinted polymers in the development of electroanalytical methodologies for antibiotic determination [J]. J Molecul Recog, 2020, (10): e2878.
- [22] 吴丹,韩梅琳,邹德勋,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡粪中16种残留抗生素[J].分析化学,2017,45(9):1389-1396.
WU D, HAN ML, ZOU DX, *et al.* Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 16 kinds of residual antibiotics in chicken manure [J]. Chin J Anal Chem, 2017, 45(9): 1389-1396.
- [23] 夏天骄,夏训峰,徐东耀,等.基于固相萃取-高效液相色谱法的畜禽粪便中四环素类抗生素残留量检测[J].安全与环境学报,2013,13(2):121-125.
XIA TJ, XIA XF, XUN DY, *et al.* Determination of the residual tetracycline antibiotics in the manures of livestock via the solid-phase extraction-high performance liquid chromatography method [J]. J Saf Environ, 2013, 13(2): 121-125.
- [24] 胡钰,朱青青,胡立刚,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中30种抗生素[J].色谱,2021,39(8):878-888.
HU Y, ZHU QQ, HU LG, *et al.* Simultaneous determination of 30 antibiotics in soil by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2021, 39(8): 878-888.
- [25] 陈舒奕,梁剑,郑麟毅,等.水产品中多类抗生素药物同时检测样品处理技术[J].广州化工,2014,(12):112-115.
CHEN SY, LIANG J, ZHENG LY, *et al.* A sample treatment method for antibiotics simultaneous detection in aquatic products [J]. Guangzhou Chem Ind, 2014, (12): 112-115.
- [26] 宋梓豪,石会娟,王鹏,等.蜂蜜中26种磺胺及其增效剂类药物残留检测方法研究[J].农产品质量与安全,2021,(1):60-66.
SONG ZH, SHI HJ, WANG P, *et al.* Determination of 26 sulfonamides and potentiators residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Qual Saf Agro-prod, 2021, (1): 60-66.
- [27] 马俊美,孙磊,曹梅荣,等.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定猪肉中9种大环内酯类抗生素[J].食品科学,2020,41(4):273-279.
MA JM, SUN L, CAO MR, *et al.* Determination of nine macrolide antibiotics in pork samples by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Food Sci, 2020, 41(4): 273-279.
- [28] 万位宁,陈嘉,居学海,等.固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测禽畜粪便中多种抗生素残留[J].分析化学,2013,41(7):993-999.
WAN WN, CHEN X, JU XH, *et al.* Simultaneous detection of multiple antibiotic residues in poultry and livestock manure by solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(7): 993-999.
- [29] 仲伶俐,郑苹果,赵珊,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定沼液中的林可霉素和大环内酯类抗生素[J].分析科学学报,2021,37(1):57-62.
ZHONG LL, ZHENG XG, ZHAO S, *et al.* Determination of lincomycin and macrolide antibiotics in biogas slurry by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2021, 37(1): 57-62.
- [30] 胡婷婷,赵慧慧,刘浩,等.液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋粉中16种磺胺类药物的残留量[J].食品安全质量检测学报,2019,10(19):6494-6502.
HU TT, ZHAO WH, LIU H, *et al.* Determination of 16 kinds of sulfonamides residues in egg powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(19): 6494-6502.
- [31] 刘畅.改良 QuEChERS/超高效液相色谱-串联质谱法同时检测蔬菜中14种喹诺酮类抗生素残留[J].分析科学学报,2019,35(1):124-128.
LIU C. Determination of quinolones in vegetables by improved QuEChERS/ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2019, 35(1): 124-128.

(责任编辑:于梦娇 张晓寒)

作者简介



丁奇,硕士,助理研究员,主要研究方向为色谱质谱分析研究。
E-mail: dingqidem@163.com



邵鹏,博士,副研究员,主要研究方向为环境科学相关研究。
E-mail: ses_shaopeng@163.com



王秋水,博士,助理研究员,主要研究方向为抗生素抗性基因污染相关研究。
E-mail: wangqiushui9182901@hotmail.com