

超高效液相色谱-单四极杆质谱联用法检测 奶粉与酸奶中 33 种兽药残留

黑真真, 李 莉, 李 硕, 王钢力*, 曹 进*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱-单四极杆质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole mass spectrometer, UPLC-QDa)同时测定奶粉及酸奶中 33 种(咪唑类、 β 受体激动剂和大环内酯类)兽药残留的检测方法。**方法** 样品经水溶解分散后以 3%(*V:V*)甲酸乙腈超声提取, 离心后上清液用 PRIME HLB 固相萃取柱净化后氮吹浓缩, 采用 0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B)作为流动相进行梯度洗脱, 以选择离子监测模式对各个目标化合物定量离子进行监测分析。**结果** 33 种兽药在各自浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.991。33 种兽药在 2 种基质中的加标回收率为 59.4%~108.5%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.68%~13.70%(*n*=6), 检出限(*S/N*=3, limits of detection, LOD)和定量限(*S/N*=10, limits of quantification, LOQ)分别为 0.06~4.66 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.19~23.68 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法快捷简单, 灵敏度高, 适用于奶粉及酸奶样品中多种兽药检测。

关键词: 单四极杆质谱仪; PRIME HLB 固相萃取柱; 兽药残留; 咪唑类; 奶粉; 酸奶

Determination of 33 kinds of veterinary drugs residues in milk powder and yogurt by ultra performance liquid chromatography-quadrupole mass spectrometry

HEI Zhen-Zhen, LI Li, LI Shuo, WANG Gang-Li*, CAO Jin*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of the residues of 33 kinds of veterinary drugs (benzimidazoles, β -adrenergic receptors and macrolides) in milk powder and yogurt by ultra performance liquid chromatography-quadrupole mass spectrometry (UPLC-QDa). **Methods** The samples were dissolved in water and then extracted by ultrasonic with acetonitrile containing 3% formic acid (*V:V*). After the purification with solid phase extraction, the sample solutions were separated on a reversed phase using a gradient elution program of 0.1% formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile solution (B). The selected ion monitoring mode was used to monitor and analyze the quantitative ions of each target compound. **Results** The 33 kinds of veterinary drugs had good linear relationships in their concentration range, with correlation coefficient were higher than 0.991. The recoveries at 3

*通讯作者: 王钢力, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品和化妆品安全评价。E-mail: duneer@163.com

曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojin@nifdc.org.cn

*Corresponding author: WANG Gang-Li, Ph.D, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: duneer@163.com

CAO Jin, Ph.D, Professor, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@nifdc.org.cn

spiked levels in 2 type of 33 samples were 59.4%-108.5%, with the relative standard deviations of 1.68%-13.70% ($n=6$). The limits of detection(LOD, $S/N=3$)and the limits of quantification(LOQ, $S/N=10$) were 0.06-4.66 $\mu\text{g/kg}$ and 0.19-23.68 $\mu\text{g/kg}$, respectively. **Conclusion** This method is rapid, simple, sensitive, which suitable for the determination of the 33 veterinary drugs in milk powder and yogurt.

KEY WORDS: quadrupole mass spectrometer; PRIME HLB solid phase extraction; veterinary drugs residues; imidazoles; milk powder; yogurt

1 引言

任何畜牧养殖者在动物饲养的过程中都离不开兽药,其防治疾病、促进生长和提高饲料转化率^[1]的作用保障了动物健康和促进了畜牧业经济发展。但是由于经济利益驱动和相关饲养知识缺乏,动物源性食品中存在兽药残留的现象仍然在较大程度上存在,继而会对人类健康造成潜在危害。国家对动物源性食品中兽药残留设定了较为严格的最大限量标准^[2],兽药残留分析是食品安全检测中的一项重要内容。

动物源性食品基质复杂,残留限量多为痕量水平,因此对样品前处理和检测器的要求较高。兽药残留检测的前处理技术主要有液液萃取法、QuEChERS^[3]和固相萃取法^[4,5]等。相较于液液萃取,使用商业化的固相萃取柱显著节约试剂,同时具有较好的稳定性^[6],目前已有在线固相萃取前处理技术^[7]可更大程度的节约人力。对兽药残留分析检测多使用高灵敏度、高通量且适用范围广的液质联用技术,主要有液相色谱-三重四极杆质谱^[8]、液相色谱-四极杆飞行时间质谱^[9]和液相色谱-四极杆离子阱质谱^[10]等。国家标准对食品中兽药残留检测要求多集中在同类兽药上^[11,12],但是随着安全监测的需要,利用串联质谱对多类兽药残留同时检测的方法越来越多^[13,14],检测范围更加广泛。

苯并咪唑类兽药具有驱虫作用,多以少量掺入饲料中以达到预防作用的方式使用; β -受体激动剂有治疗哮喘的作用,但其更有显著促进饲养动物生长的作用使得饲养者常过度使用该类药物;大环内酯类药物主要用于衣原体、支原体感染的治疗,但是此类抗生素对人体有着肝毒性、耳毒性、心脏毒性等不良反应,长期被动食用会对人体健康造成极大的危害。在畜牧养殖过程中,这几类药物对预防治疗动物疾病发挥着重大作用,研究开发联合检测的方法实现高效监管势在必行。鉴于大型液相色谱质谱联用仪器价格较贵,对操作人员的要求高,检测成本较高,相对于大型液相色谱质谱联用仪器,近年来小型化质谱价格相对较低,操作简单,维护保养简便,且依然具备质谱的高灵敏性和专属性,可以作为较为便捷的快速检测设备应用到基层常规检测以及市场现场监测中。目前已有使用液相色谱串联质谱实现对痕量^[15]和微量^[16]目标物检测的文献报道。本研究选取上述常用兽药的部分代表,选择

乳制品中的牛奶奶粉和液态酸奶为基质,建立了牛源性奶粉及酸奶通过 PRIME 固相萃取柱净化后,使用液相色谱串联单四极杆质谱(quadrupole mass spectrometer, QDa)对其中 20 种苯并咪唑类、9 种 β -受体激动剂和 4 种大环内酯类共 33 种兽药残留进行快速处理分析的方法,该方法操作简单,灵敏度高,回收率稳定,适用于牛奶奶粉及酸奶样品中多种兽药的快速筛查,可作为一种常规检测手段的有力补充。本研究通过使用这一新型仪器,开发出牛奶奶粉与酸奶样品中兽药残留检测方法,旨在借助它小巧、低成本的优点适用到基层或者现场检测中,并逐步扩大它的应用层面,提高监管水平。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱-QDa 质谱(美国 Waters 公司); CF 16RXII 高速冷冻离心机(日本 HITCHI 公司); XHF-D 涡旋混合器(宁波新芝生物科技股份有限公司); MGS-2200 氮气吹干仪(东京理化公司)。

甲醇、乙腈(质谱级,德国 Merk 公司); 甲酸(质谱纯,美国 Fluka 公司); OASIS PRiME HLB 固相萃取柱(6 cc 200 mg, 美国 Waters 公司)。

实际样品奶粉及酸奶采购自当地超市

2.2 实验方法

2.2.1 混合标准溶液的配制

购于阿尔塔科技有限公司的 20 种咪唑与苯并咪唑类混合标准物质溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)、9 种 β -受体激动剂类混合标准物质溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)、4 种大环内酯类混合标准物质溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)。

精密移取上述 3 类各标准溶液 0.5 mL,用乙腈稀释配制成浓度约为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准储备液,将其放置于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,有效期为 1 个月。使用前取出并恢复至室温后用水稀释至不同浓度的 33 种混合标准溶液。

2.2.2 样品前处理

奶粉样品:称取奶粉样品约 10 g,用适量温水将其溶解,待其冷却至室温后加水至 20 mL,充分混匀后准确量取 4 mL 于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 含 3%(V/V)甲酸的酸化乙腈,涡旋使混匀,超声提取 20 min 后以 8000 r/min

的转速、温度 10 ℃下离心 8 min。取上清溶液 4 mL 过 Oasis PRIME HLB 固相萃取柱,使液滴保持 1 滴/秒的流速。取 3 mL 流出液于 15 mL 离心管中,50 ℃水浴中于氮气流下缓缓吹至近干,初始流动相定溶至 1 mL,涡旋振荡 1 min,样液经 0.22 μm 滤膜过滤后供液相色谱-串联质谱仪测定。

酸奶样品:称取酸奶样品约 4 g 于 50 mL 离心管中,直接加入 10 mL 含 3%(V/V)甲酸的酸化乙腈,涡旋混匀,同法进行提取与净化。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 色谱条件

色谱柱:ACQUITY BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)柱温: 30 ℃; 进样器温度: 10 ℃; 进样体积: 5 μL; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A 相为 0.1%(V/V)甲酸水溶液, B 相为乙腈; 洗针溶液: 甲醇:乙腈:异丙醇:水=1:1:1:1(V/V/V/V); 洗脱方式: 0~3 min: 10%B; 3~8 min: 10%B-30%B; 8~11 min: 30%B-20%B; 11~14 min: 20%B-50%B; 14~17 min: 50%B-100%B; 17~19 min: 100%B; 19~19.1 min:

100%B-10%B; 19.1~25 min: 10%B。

(2) 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;扫描方式:正离子选择离子监测(selective ion monitor, SIM)模式;毛细管电压: 0.8 kV; 锥孔电压: 15 V; 采样频率: 5 Hz。33 种兽药的保留时间、定量离子等质谱参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 LC-MS 条件的确定

本研究涉及 3 类共 33 种兽药均为小分子化合物,其结构差异较大,在色谱柱上的保留行为无法提前预知,因此本实验对比了 Waters 公司规格相同粒径较小为 1.7 μm、填充物不同的两根色谱柱,分别是 ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱和 ACQUITY UPLC CSH C₁₈柱,结果发现 CSH C₁₈柱对目标物齐帕特罗的响应明显低于另一色谱柱约 1 个数量级;同时对目标物特布他林硫酸盐的保留与杂质无法分离,有前延现象,因此选用 BEH C₁₈柱。

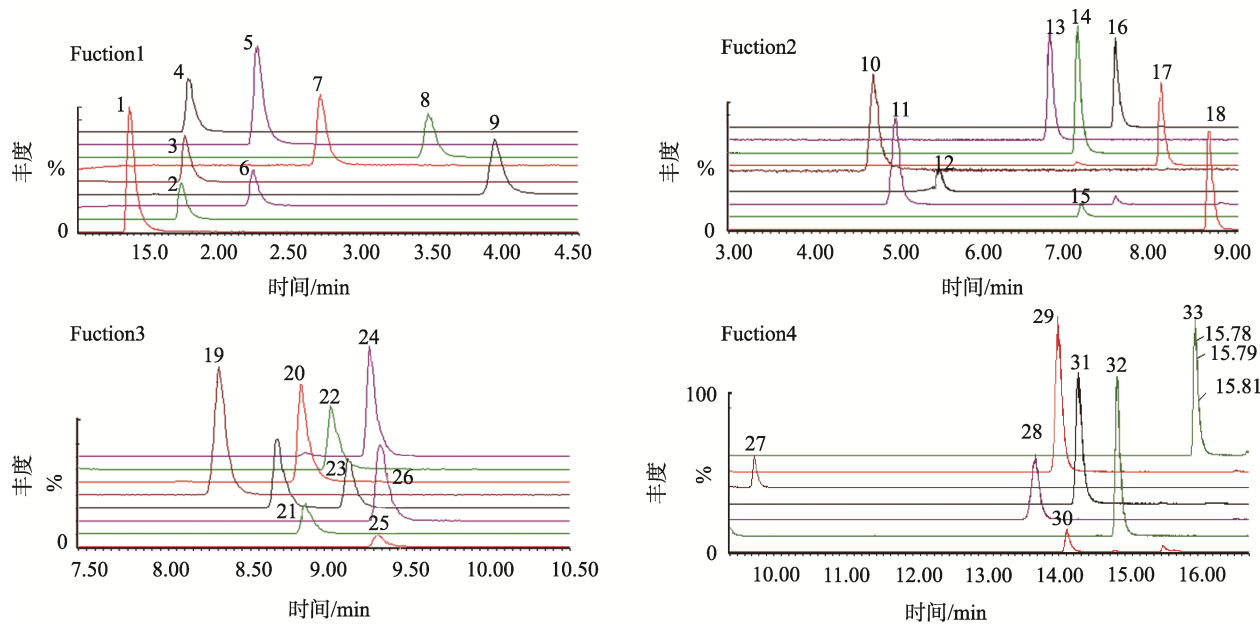
表 1 33 种兽药的质谱参数
Table 1 MS parameters of the 33 kinds of veterinary drugs

序号	化合物	保留时间/min	定量离子	序号	化合物	保留时间/min	定量离子
1	苯并咪唑	1.37	119.1	18	阿苯达唑砒	8.79	298.3
2	齐帕特罗	1.74	262.3	19	异丙硝唑	8.48	170.1
3	硫酸特布他林	1.77	226.1	20	氨基甲苯咪唑	8.94	238.2
4	沙丁胺醇硫酸盐	1.79	240.1	21	溴布特罗	8.97	367.1
5	2-氨基苯并咪唑	2.29	134.1	22	噻苯咪唑酯	9.11	303.3
6	羟甲基甲硝咪唑	2.26	158.1	23	羟基甲苯咪唑	9.22	298.3
7	二甲硝咪唑	2.75	142.1	24	班布特罗盐酸盐	9.34	368.2
8	西布特罗	3.52	234.3	25	盐酸马布特罗	9.40	311.7
9	苯硝咪唑	4.00	164.1	26	2-氨基氟苯咪唑	9.41	256.2
10	噻苯哒唑	4.75	202.2	27	盐酸克林霉素	9.73	426.0
11	阿苯达唑-2-氨基砒	5.01	240.2	28	芬苯达唑砒	13.58	332.3
12	盐酸林可霉素	5.54	407.5	29	甲苯咪唑	13.88	296.2
13	羟基异丙硝唑	6.87	186.1	30	磷酸竹桃霉素	14.00	689.0
14	奥美普林	7.20	275.3	31	阿苯达唑	14.17	266.3
15	氯丙那林	7.25	214.7	32	氟苯达唑	14.69	314.2
16	阿苯达唑亚砒	7.67	282.3	33	芬苯达唑	15.76	300.3
17	盐酸克伦特罗	8.21	277.0				

在对流动相优化过程中, 考察了有机相种类及改性剂对色谱峰响应及峰形的影响。流动相为纯水和乙腈时, 大部分化合物峰展宽严重, 峰形不佳, 考虑到大部分化合物为含有咪唑环的碱性化合物且扫描模式为正离子, 引入酸更利于目标物电离, 向水相中加入 0.1%(V/V)的甲酸, 峰形改善。在有机相的选择上发现相比于乙腈, 甲醇作流动相时大部分化合物响应差别不明显, 但是对监测离子质荷比一样的阿苯达唑砒和羟基甲苯咪唑无法完全分离; 且所有目标化合物的洗脱用时更为长久, 分析时间延长, 大多数化合物的峰形较差; 同时由于甲醇相比于乙腈黏度系数

更高, 实验中发现使用甲醇时整个系统压力高于乙腈作流动相, 约接近于整个液相系统的最高耐受压力, 为保证仪器系统正常稳定持久的运行, 最终选择用乙腈-0.1%(V/V)甲酸水作流动相。

本实验所用的检测器为单四极杆质谱检测器 QDa, 它操作简单, 且在较短时间内便可完成仪器的自检和调谐, 无需额外对锥孔电压等质谱参数进行调整实验, 快捷方便, 适用于快速筛查使用。为尽可能减少多种目标物之间的相互干扰, 提高灵敏度, 采用分段扫描的方式进行离子数据采集。33 种目标物在 4 个采集通道的 SIM 色谱图见图 1。



注: 峰 1-峰 33 序号与表 1 序号一致, 依次为苯并咪唑, 齐帕特罗, 硫酸特布他林, 沙丁胺醇硫酸盐, 2-氨基苯并咪唑, 羟甲基甲硝咪唑, 二甲硝咪唑, 西布特罗, 苯硝咪唑, 噻苯哒唑, 阿苯达唑-2-氨基砒, 盐酸林可霉素, 羟基异丙硝唑, 奥美普林, 氯丙那林, 阿苯达唑亚砒, 盐酸克伦特罗, 阿苯达唑砒, 异丙硝唑, 氨基甲苯咪唑, 溴布特罗, 噻苯咪唑酯, 羟甲基苯咪唑, 班布特罗盐酸盐, 盐酸马布特罗, 2-氨基氟苯咪唑, 盐酸克林霉素, 芬苯达唑砒, 甲苯咪唑, 磷酸竹桃霉素, 阿苯达唑, 氟苯达唑, 芬苯达唑。

图 1 33 种目标物在 4 个采集通道的 SIM 色谱图

Fig.1 SIM chromatograms of the 33 kinds of veterinary drugs in four fuctions

3.2 样品前处理条件的优化

3.2.1 样品处理

对于奶粉样品需用温水分散均匀后进行提取净化, 在考察乙腈水溶液对奶粉的提取效果预实验中发现, 固态奶粉无法直接使用高比例乙腈对其进行提取, 其会在涡旋、超声后依然呈包块状态, 进一步实验了体积比分别为 60%、70%、80%、90%的乙腈水溶液作为提取溶剂, 发现体积比在 70%(V/V)以上的乙腈水溶液均会使奶粉样品包块而无法充分分散均匀, 影响提取效率, 但低比例乙腈对大多数目标化合物又不能充分提取, 故而固态奶粉需用适

量的温水溶解分散后再进一步确定提取溶剂的用量。而对于液态奶酸奶来说则可以直接加入提取溶剂进行沉淀提取。

3.2.2 提取溶剂的选择

奶粉及奶制品基质的主要成分是蛋白质和糖类, 同时含有少量脂质成分。实验中发现乙腈相比于甲醇有更好的沉淀蛋白作用, 所得的上清液明显比经甲醇沉淀后的上清液澄清, 因此将乙腈作为提取溶剂。进一步考察乙腈加入量对提取净化效果的影响, 研究了不同乙腈加入量和提取回收率的关系, 乙腈加入量和回收率范围在 80%~110%的目标物数量对比图如图 2 所示, 可以看出随着乙腈加入量的增加, 回收率整体向好。

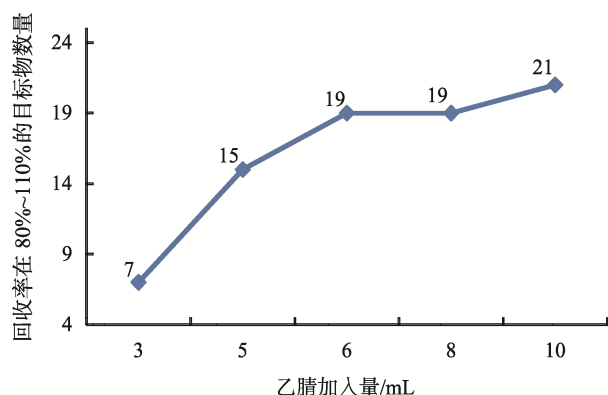


图 2 乙腈加入量与满足回收率范围(80%~110%)的目标物数量的关系($n=3$)

Fig.2 Relationship between the volume of acetonitrile and the number of veterinary drugs with recovery in the range of 80%-110% ($n=3$)

当乙腈加入量由 6 mL 增加至 10 mL 时,对于个别化合物如苯并咪唑、2-氨基苯并咪唑、盐酸克林霉素和磷酸竹桃霉素,其平均回收率($n=3$, $RSD\% < 20\%$)还是有明显区别,当乙腈加入量为 10 mL 时提取效果最好(结果如图 3 所示),故而乙腈加入量最终确定为 10 mL。

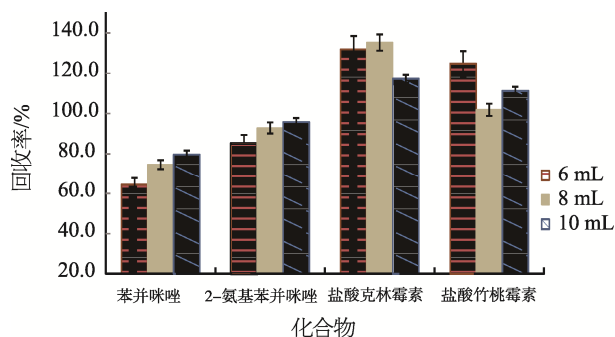


图 3 乙腈加入量对部分化合物的平均回收率影响($n=3$)

Fig.3 Effect of the amount of acetonitrile on recovery of some veterinary drugs ($n=3$)

酸具有沉淀蛋白、提高离子化效率的作用,从而具有改善回收率的效果。实验对比了乙腈中甲酸浓度($V:V$)分别为 0、0.5%、1%、2%、3%、5%时对各个化合物回收率的影响,结果见图 4,由图 4 可知,酸的引入有助于提高目标化合物的回收率,但加入酸的比例对总体结果影响不大。但是对个别化合物如,酸化比例为 0.5%($V:V$)时,芬苯达唑的回收率最低;酸化比例为 1%($V:V$)时,特布他林硫酸盐的回收率过高,达到 128%;酸化比例为 2%($V:V$)时,33 种化合物有 27 种目标物的回收率均低于 3%($V:V$)为酸化比例的回收率;酸化比例为 5%($V:V$)时,氟苯达唑的回收率仅

有 70%,明显低于酸化比例为 4%($V:V$)时的 92%。综合考虑 33 种目标化合物的回收情况最终提取溶剂确定为甲酸含量为 3%($V:V$)的乙腈溶液。

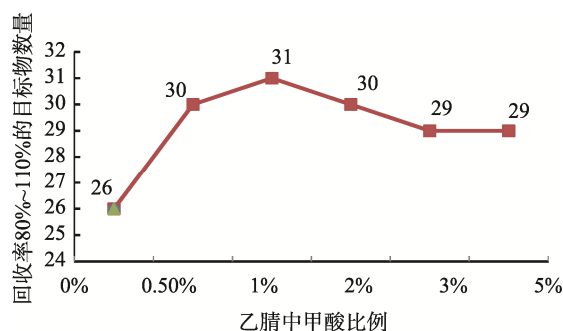


图 4 乙腈中甲酸比例与满足回收率范围(80%~110%)的目标物数量的关系($n=3$)

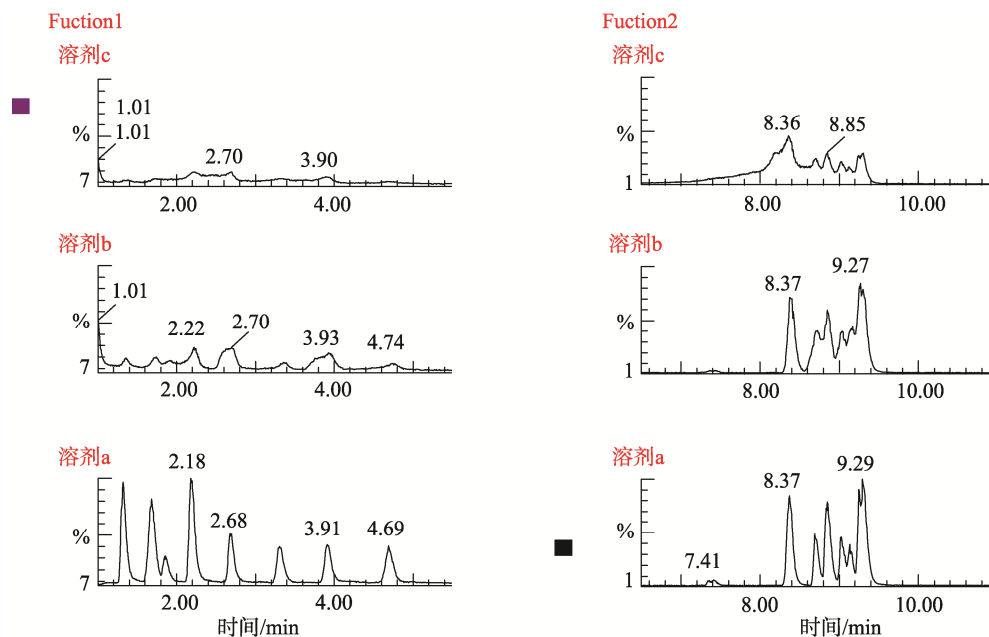
Fig.4 Relationship between the proportion of formic acid in acetonitrile and the number of veterinary drugs with recovery in the range of 80%-110% ($n=3$)

3.2.3 净化方式的选择

在多兽药残留分析中,由于不同类别的兽药目标物质不同,且同一类兽药虽然母核结构一致,但修饰结构差别较大,故而需采取较为通用型的净化方式,既要较大限度的降低基质效应,又要尽可能的避免对目标物的吸附。HLB 固相萃取小柱为 N -乙基吡咯烷酮和二乙烯基苯聚合而成的两性吸附材料,适用范围广,净化效果适中。本实验比较了两款商品化的 HLB 固相萃取小柱: Waters Oasis HLB 和 Waters Oasis PRIME HLB。对于第一种固相萃取小柱使用前需要进行活化与平衡步骤,上样后的淋洗这一步骤容易使目标化合物流失;而 PRIME 固相萃取柱为通过型净化方式,将杂质吸附在固相填料上,目标物直接流出,操作更简单,且对于样品中脂肪成分净化效果良好,尤其是更难去除的磷脂。实验结果也表明,经 PRIME 固相萃取柱净化后上清液更加澄清的同时,各个化合物的平均回收率优于普通的 HLB 固相萃取柱。

3.2.4 复溶溶剂的选择

样品经过提取和净化步骤后,得到的样品提取液经氮吹浓缩后的定容溶剂对目标化合物的峰形有着显著的影响。溶剂效应即当样品溶液的溶剂强度强于流动相溶剂强度时可能会造成的峰展宽、峰分叉现象^[17]。即色谱图上较早洗脱的峰前沿或者开叉,与此同时较晚洗脱的峰则较为正常的现象。图 5 为用纯乙腈、50%乙腈水溶液和 10%乙腈水溶液作为稀释溶剂稀释混合标准溶液进样的 2 个分段扫描总离子流色谱图。由图 5 可见,溶剂效应对本次实验的目标物影响很明显,故而样品经提取净化氮吹浓缩后,采用初始流动相[10%($V:V$)乙腈水溶液]作为定容溶剂。



注: a: 10%乙腈水溶液; b: 50%乙腈水溶液; c: 100%乙腈。

图 5 不同比例复溶溶剂对部分目标物色谱图的影响

Fig.5 Effect of solvent of different proportions on recovery of some veterinary drugs

3.3 基质效应

基质效应是指检测系统检测样品中分析物时,与分析物共存的环境物质对分析物参与反应的影响。基质效应与仪器、试样、检测方法和处理技术密切相关,本实验所用的电喷雾离子源会对几乎所有化合物与基质干扰成分有不同的电离程度,进而产生与待测物相同的监测离子,从而影响目标化合物的灵敏度、准确度,对分析方法的检出限、定量限、线性等方法学参数也有影响。评估基质效应可以用校准曲线的斜率比值来衡量,即基质效应=基质匹配校准曲线的斜率/溶剂校准曲线的斜率,其比值越接近于 1,表明基质效应越小,反之则基质效应越大。2 种样品的基质效应结果见表 2。实验结果表明,虽然样品同为奶制品但基质效应仍有较大的不同。对奶粉基质,大多数目标化合物基质效应较小,33 种兽药种基质效应在 0.85~1.1 之间的化合物数量占比 78.8%,齐帕特罗、苯并咪唑的基质效应最为明显,分别为 0.69 和 0.72;而对酸奶样品基质,大多数目标物的基质效应明显强于奶粉样品,盐酸林可霉素和芬苯达唑的基质效应最为明显,分别为 1.66 和 1.62。为降低基质效应对定量的影响,本实验使用易实现的基质匹配校准曲线定量方法。

3.4 方法学评价

3.4.1 检出限、定量限与校准曲线

根据我国农业部 235 公告及欧盟对动物源性食品中兽药最高残留限量(maximum residue limit, MRLs)的规定,结合各个兽药目标化合物在仪器中的响应值,在优化过的分析条件下按 2.2 节方法分别配制 10、25、50、100、150、200、250 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准溶液,结果表明所有目标物除噻

苯达唑外,在 10~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,噻苯达唑在较低浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时,在奶粉基质中的响应较弱,在 25~250 $\mu\text{g/L}$ 范围内基质匹配标准曲线线性关系良好。各目标化合物的基质匹配标准曲线线性相关系数均大于 0.991。逐级稀释基质标准品溶液至监测离子信噪比 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别计算各个化合物在各个基质中的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ),分别为 0.06~4.66 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.19~23.68 $\mu\text{g/kg}$ 。各目标化合物在各基质中线性范围、相关系数、LOD 和 LOQ 见表 3~4。

3.4.2 回收率与精密度

以经液相色谱串联三重四极杆质谱检测为阴性的样品为空白基质,进行 3 个浓度的添加水平平行测定 6 组,计算目标物检出量与目标物添加量的比值平均值为平均回收率;针对每个目标物的 6 组回收率值计算其相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为精密度;在空白样品中进行 3 个水平的加标回收实验,添加水平的选取标准为农业部中对动物源性食品中兽药最高残留量(maximum residue limit, MRL)规定,同时结合线性的低、中、高点,添加量分别为 50、100、150 $\mu\text{g/L}$ (0.5 MRL、1 MRL、1.5 MRL)。每个水平进行 6 次平行实验,采用基质匹配校准曲线定量,并计算其相对标准偏差为精密度。结果见表 5。奶粉基质中 32 种目标化合物在各浓度添加水平下平均回收率为 59.4%~104.6%, RSD 为 1.72%~13.02%。芬苯达唑在低浓度和高浓度添加水平下平均回收率分别为 59.7%和 59.4%,低于大多数目标物,可能是该物质的低浓度添加水平受基质影响太大进而影响回收率。酸奶基质中,各目标化合物在各浓度添加水平下平均回收率为 66.5%~108.5%, RSD 为 1.68%~13.7%(表 5)。

表 2 33 种兽药在 2 种基质中的基质效应
Table 2 Matrix effect of the 33 kinds of veterinary drugs in two matrixes

化合物	基质效应		化合物	基质效应	
	奶粉	酸奶		奶粉	酸奶
苯并咪唑	0.72	0.86	阿苯达唑砒	1.04	1.37
齐帕特罗	0.69	1.08	异丙硝唑	0.94	1.25
硫酸特布他林	0.74	1.15	氨基甲苯咪唑	0.97	1.30
沙丁胺醇硫酸盐	0.82	1.21	溴布特罗	1.01	1.17
2-氨基苯并咪唑	0.82	1.04	噻苯咪唑酯	1.05	1.36
羟甲基甲硝咪唑	0.83	1.52	羟甲基苯咪唑	1.02	1.46
二甲硝咪唑	0.91	1.35	班布特罗盐酸盐	1.03	1.22
西布特罗	0.94	1.20	盐酸马布特罗	0.96	1.18
苯硝咪唑	0.88	1.48	2-氨基氟苯咪唑	0.96	1.25
噻苯哒唑	0.89	0.93	盐酸克林霉素	0.96	1.43
阿苯达唑-2-氨基砒	0.97	1.28	芬苯达唑砒	1.06	1.62
盐酸林可霉素	0.88	1.66	甲苯咪唑	1.06	1.47
羟基异丙硝唑	0.97	1.52	磷酸竹桃霉素	0.97	0.87
奥美普林	1.04	1.08	阿苯达唑	0.93	1.25
氯丙那林	1.00	0.85	氟苯达唑	1.07	1.42
阿苯达唑亚砒	1.13	1.51	芬苯达唑	1.05	1.39
盐酸克伦特罗	0.90	1.02	阿苯达唑砒		

表 3 33 种兽药残留在奶粉基质中的线性范围、LOD 和 LOQ
Table 3 LOD, LOQ and linearity range of 33 kinds of veterinary drugs in matrix of milk powder

化合物	线性	范围/(μg/kg)	相关系数 r^2	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
苯并咪唑	$Y=1136.02X+2891.28$	10~200	0.997	0.18	0.61
齐帕特罗	$Y=242.746X-12.5456$	10~200	0.998	1.00	3.32
硫酸特布他林	$Y=401.406X+3283.97$	10~200	0.992	0.46	1.52
沙丁胺醇硫酸盐	$Y=540.934X+1718.36$	10~200	0.996	0.63	2.08
2-氨基苯并咪唑	$Y=1255.13X+2224.84$	10~200	0.996	0.31	1.03
羟甲基甲硝咪唑	$Y=297.608X+385.633$	10~200	1.000	3.24	9.59
二甲硝咪唑	$Y=796.553X+492.256$	10~200	0.998	2.00	6.65
西布特罗	$Y=719.36X+1893.97$	10~200	0.998	0.28	0.93
苯硝咪唑	$Y=715.688X+138.249$	10~200	1.000	1.04	3.46
噻苯哒唑	$Y=1051.47X+7881.09$	25~250	0.993	4.66	23.68
阿苯达唑-2-氨基砒	$Y=617.58X+914.228$	10~200	1.000	0.96	3.21
盐酸林可霉素	$Y=185.239X+2202.5$	10~200	0.995	1.14	3.79
羟基异丙硝唑	$Y=678.458X-454.446$	10~200	0.999	0.97	3.24
奥美普林	$Y=1046.22X+3749.33$	10~200	0.995	0.35	1.16
氯丙那林	$Y=101.545X+676.716$	10~200	0.999	3.29	9.58
阿苯达唑亚砒	$Y=599.878X-394.976$	10~200	0.999	0.55	1.83
盐酸克伦特罗	$Y=623.394X+6652.58$	10~200	0.998	0.31	1.05

续表 3

化合物	线性	范围/(μg/kg)	相关系数 r^2	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
阿苯达唑砒	$Y=776.01X+649.547$	10~200	0.997	0.47	1.56
异丙硝唑	$Y=1464.46X+3220.65$	10~200	0.999	0.77	2.57
氨基甲苯咪唑	$Y=1071.61X+1887.67$	10~200	1.000	0.40	1.32
溴布特罗	$Y=367.984X+1629.83$	10~200	0.994	1.54	5.13
噻苯咪唑酯	$Y=792.38X+1914.36$	10~200	0.999	0.65	2.17
羟基甲苯咪唑	$Y=491.104X+382.027$	10~200	0.999	0.56	1.87
班布特罗盐酸盐	$Y=1171.73X+1133.3$	10~200	0.999	0.21	0.69
盐酸马布特罗	$Y=155.984X+401.889$	10~200	0.998	1.01	3.38
2-氨基氟苯咪唑	$Y=937.582X+2247.41$	10~200	0.997	0.53	1.77
盐酸克林霉素	$Y=140.18X-182.58$	10~200	0.994	0.32	1.07
芬苯达唑砒	$Y=449.023X+620.762$	10~200	0.997	1.10	3.67
甲苯咪唑	$Y=880.313X+77.728$	10~200	0.993	0.86	2.88
磷酸竹桃霉素	$Y=110.742X+116.226$	10~200	0.996	3.36	9.54
阿苯达唑	$Y=757.922X-819.376$	10~200	0.997	1.47	4.90
氟苯达唑	$Y=863.482X-716.08$	10~200	0.998	0.50	1.64
芬苯达唑	$Y=843.291X+434.171$	10~200	0.991	0.38	1.25

注: Y: 浓度/(μg/L), X: 峰面积。

表 4 33 种兽药残留在酸奶基质中的线性范围、LOD 和 LOQ
Table 4 LOD, LOQ and linearity range of 33 kinds of veterinary drugs in matrix of yogurt

化合物	线性	范围/(μg/kg)	相关系数 r^2	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
苯并咪唑	$Y=1368.47X+3042.78$	10~200	1.000	0.10	0.32
齐帕特罗	$Y=376.243X+2846.72$	10~200	0.994	0.13	0.44
硫酸特布他林	$Y=618.537X+5373.21$	10~200	0.993	0.11	0.37
沙丁胺醇硫酸盐	$Y=790.545X+6563.23$	10~200	0.995	0.10	0.33
2-氨基苯并咪唑	$Y=1598.24X+3115.61$	10~200	0.999	0.06	0.19
羟甲基甲硝咪唑	$Y=542.466X+987.048$	10~200	0.999	0.47	1.55
二甲硝咪唑	$Y=1178.2X+2269.52$	10~200	0.999	0.33	1.10
西布特罗	$Y=913.778X+3533.01$	10~200	0.998	0.15	0.49
苯硝咪唑	$Y=1200.56X+1647.25$	10~200	0.998	0.30	1.01
噻苯哒唑	$Y=1102.91X-346.345$	10~200	0.993	2.61	9.84
阿苯达唑-2-氨基砒	$Y=815.273X+757.774$	10~200	0.999	0.25	0.84
盐酸林可霉素	$Y=348.947X+3828.08$	10~200	0.997	0.19	0.63
羟基异丙硝唑	$Y=1056.9X+2092.96$	10~200	0.999	0.23	0.75
奥美普林	$Y=1091.76X+3336.99$	10~200	0.998	0.09	0.31
氯丙那林	$Y=86.1136X-598.517$	10~200	0.999	2.82	7.81
阿苯达唑亚砒	$Y=800.55X+135.413$	10~200	0.999	0.18	0.59
盐酸克伦特罗	$Y=712.155X+3228.03$	10~200	0.998	0.18	0.61

续表 4

化合物	线性	范围/(μg/kg)	相关系数 r^2	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
阿苯达唑砒	$Y=1025.2X+3093.79$	10~200	0.998	0.08	0.25
异丙硝唑	$Y=1938.33X+3901.65$	10~200	0.999	0.16	0.53
氨基甲苯咪唑	$Y=1437.06X+1792.22$	10~200	0.996	0.09	0.28
溴布特罗	$Y=427.233X+1967.42$	10~200	0.997	0.20	0.68
噻苯咪唑酯	$Y=1029.42X+2570.53$	10~200	0.994	0.14	0.48
羟基甲苯咪唑	$Y=708.419X+386.857$	10~200	0.999	0.13	0.42
班布特罗盐酸盐	$Y=1386.76X+1328.18$	10~200	0.999	0.06	0.19
盐酸马布特罗	$Y=192.066X+1095.04$	10~200	0.995	0.35	1.17
2-氨基氟苯咪唑	$Y=1226.5X+4312.8$	10~200	0.997	0.13	0.43
盐酸克林霉素	$Y=207.035X+272.771$	10~200	0.996	0.45	1.50
芬苯达唑砒	$Y=683.827X-463.322$	10~200	0.999	0.43	1.44
甲苯咪唑	$Y=1222.62X-246.339$	10~200	0.996	0.26	0.88
磷酸竹桃霉素	$Y=99.5706X+439.627$	10~200	0.994	1.47	5.75
阿苯达唑	$Y=1017.23X+661.214$	10~200	0.996	0.22	0.74
氟苯达唑	$Y=1142.96X+718.223$	10~200	0.999	0.11	0.37
芬苯达唑	$Y=1119.19X+2841.96$	10~200	0.999	0.13	0.45

注: Y: 浓度/(μg/L), X: 峰面积。

表 5 奶粉和酸奶基质中 33 种兽药的回收率与精密度结果(% , n=6)
Table 5 Results of recovery and RSD for 33 kinds of veterinary drugs in milk powder and yogurt (% , n=6)

化合物	奶粉						酸奶					
	低浓度		中浓度		高浓度		低浓度		中浓度		高浓度	
	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度
苯并咪唑	75.9	1.75	74.8	4.69	76.6	3.90	74.8	4.68	70.9	7.14	70.2	5.24
齐帕特罗	76.0	4.70	76.3	2.04	79.2	2.70	87.9	2.13	82.5	3.55	77.9	7.78
硫酸特布他林	92.9	6.29	91.6	3.49	91.2	1.72	98.1	1.68	93.8	4.77	90.8	5.10
沙丁胺醇硫酸盐	68.9	10.91	76.5	9.45	80.9	5.25	71.3	5.84	69.7	5.54	76.8	5.73
2-氨基苯并咪唑	80.3	2.12	80.8	2.54	80.2	1.97	85.7	2.54	80.6	5.14	80.9	4.29
羟甲基甲硝咪唑	80.7	5.81	86.7	5.59	84.7	2.65	83.2	3.00	91.3	4.94	84.1	6.67
二甲硝咪唑	86.7	8.53	88.9	2.64	88.6	5.27	89.9	3.95	87.1	7.22	84.7	4.16
西布特罗	79.4	9.92	82.8	11.74	77.5	13.00	67.1	4.51	67.5	7.81	71.3	5.87
苯硝咪唑	84.8	4.60	85.5	7.21	86.2	4.35	93.2	5.96	92.1	6.13	86.1	4.92
噻苯咪唑	96.5	9.88	99.5	4.46	98.3	4.12	79.7	7.64	81.5	6.83	78.8	5.91
阿苯达唑-2-氨基砒	91.7	5.29	90.9	3.95	91.5	3.57	83.6	5.21	77.3	4.97	76.9	4.91
盐酸林可霉素	77.8	12.02	78.1	6.45	81.8	4.46	82.2	7.85	79.3	7.19	83.4	5.90
羟基异丙硝唑	91.5	3.56	90.3	4.67	89.8	3.40	95.2	2.91	89.2	6.08	87.1	5.12
奥美普林	100.5	2.71	97.8	5.79	96.8	2.53	91.2	6.29	91.8	8.45	87.3	4.03
氯丙那林	97.4	9.63	95.7	2.27	99.6	6.56	80.5	4.58	73.0	9.74	80.1	5.41

续表 5

化合物	奶粉						酸奶					
	低浓度		中浓度		高浓度		低浓度		中浓度		高浓度	
	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度	回收率	精密度
阿苯达唑亚砒	101.1	2.78	96.5	1.86	97.8	3.70	98.8	3.58	98.9	9.78	93.0	4.54
盐酸克伦特罗	103.7	4.22	96.0	5.66	95.5	3.78	82.8	6.06	85.7	7.55	84.5	3.24
阿苯达唑砒	95.8	4.59	94.1	4.00	93.5	3.63	93.1	4.19	90.3	7.07	89.4	3.25
异丙硝唑	95.6	6.55	93.4	5.43	93.1	3.09	95.1	4.40	89.8	5.88	88.9	2.80
氨基甲苯咪唑	84.8	2.28	85.7	6.19	82.6	6.11	89.2	5.25	84.8	4.59	81.8	6.25
溴布特罗	99.5	6.42	99.5	3.69	99.4	2.20	96.3	4.81	90.8	7.19	88.9	5.13
噻苯咪唑酯	94.0	5.10	93.6	7.42	89.3	3.21	89.8	7.06	91.2	7.08	90.0	6.08
羧基甲苯咪唑	96.5	4.53	97.1	3.77	96.5	1.85	99.7	7.86	94.9	7.58	93.4	4.73
班布特罗盐酸盐	103.3	4.60	100.7	5.07	101.3	5.40	99.1	3.38	95.7	8.72	91.3	7.36
盐酸马布特罗	104.6	4.10	104.1	4.42	101.4	5.20	108.5	5.56	100.2	7.57	94.5	5.70
2-氨基氟苯咪唑	86.3	4.72	85.6	5.24	86.4	3.84	88.5	2.19	85.1	4.84	85.6	3.95
盐酸克林霉素	97.0	9.03	98.4	6.90	100.4	7.34	95.5	6.44	96.3	7.48	90.6	4.77
芬苯达唑砒	83.9	11.13	83.0	9.71	81.2	10.50	88.4	4.13	89.9	7.46	87.9	4.88
甲苯咪唑	88.5	5.42	87.9	7.03	88.0	6.43	90.4	7.39	92.6	7.36	87.9	4.38
磷酸竹桃霉素	101.6	3.24	96.1	3.63	79.1	6.53	89.9	12.12	97.9	11.14	103.8	13.70
阿苯达唑	87.3	8.20	82.8	9.28	77.2	9.62	85.5	3.39	84.6	10.81	82.5	12.20
氟苯达唑	82.9	9.46	85.5	7.20	79.5	10.10	91.6	2.81	86.9	6.48	86.9	5.77
芬苯达唑	59.7	5.09	63.4	13.02	59.4	12.36	66.5	7.56	70.2	7.21	73.4	4.36

3.5 实际样品检测

采用本方法对采购自超市的 20 批奶粉样品及 15 批酸奶样品进行检测, 未检出兽药残留。

4 结 论

本研究借助新型便捷的单四极杆质谱完成建立了奶粉及酸奶样品通过沉淀提取、prime HLB 通过式净化, 液质联用分析检测咪唑类、β-受体激动剂和大环内酯类共 33 种兽药残留的方法, 相较于当前相关国标^[18]具有检测成本低, 所用净化方式溶剂耗费用量少的优点, 该方法快速、简便、灵敏, 满足兽药残留痕量分析的要求, 尤其适用于在基层及室外等条件较差的情况下分析检测筛查。同时限于单四极杆的灵敏度, 遇到痕量物质在诸如猪肉、鸡蛋等复杂食品基质中进行分析时, 基质干扰太严重, 接下来将考虑其在微量级层面的添加物检测应用, 发挥出其便捷、快速、易操作的优势。

参考文献

[1] 王简. 食品中抗菌药物残留的化学分析[M]. 于康震, 沈建忠, 译. 北

京: 中国农业出版社, 2017.
Wang J. Chemical analysis of antibiotic residues in food [M]. Yu KZ, Shen JZ, translated. Beijing: China Agriculture Press, 2017.
[2] 农业部. 中华人民共和国农业部公告第 235 号. (2002-12-24) [EB/OL]. [2019-02-23].
http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/nybz/200803/t20080304_1028649.htm
Ministry of Agriculture. No.235 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (2002-12-24). [EB/OL]. [2019-02-23].
http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/tzgg/gg/200302/t20030226_59300.htm
[3] 张科明, 梁飞燕, 邓鸣, 等. QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中多类兽药残留[J]. 色谱, 2016, 34(9): 860-867.
Zhang KM, Liang FY, Deng M, et al. Multi-residue determination of veterinary drugs in porcine muscle by QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(9): 860-867.
[4] 覃玲, 董亚蕾, 王钢力, 等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定常见动物源性食品中 42 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(9): 880-888.
Qin L, Dong YL, Wang GL, et al. Determination of 42 veterinary drug residues in common animal derived food by dispersive solid phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(9): 880-888.
[5] 王嘉琦, 马立利, 曹英华, 等. 动物源性食品中 56 种兽药残留物的 UPLC-MS/MS 高通量分析[J]. 分析实验室, 2018, 37(3): 306-310.

- Wang JQ, Ma LL, Cao YH, *et al.* UPLC-MS/MS high-throughput detection of 56 veterinary drug residues in food products of animal origin [J]. *Chin J Anal Lab*, 2018, 37(3): 306–310.
- [6] 王杰, 裴斐, 李彭, 等. 不同前处理方法对猪组织中喹诺酮类兽药残留检测效果对比[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 309–314.
- Wang J, Pei F, Li P, *et al.* Comparison of different sample pretreatments for the analysis of quinolone residues in porcine tissues [J]. *Food Sci*, 2018, 39(18): 309–314.
- [7] 马俊美, 孙磊, 刘茁, 等. 在线固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉和羊肉中10种 β -受体激动剂[J]. *肉类研究*, 2018, 32(5): 19–25.
- Ma JM, Sun L, Liu Z, *et al.* Determination of 10 β -agonists in pork and lamb samples by on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Meat Res*, 2018, 32(5): 19–25.
- [8] 杨直, 彭彦, 金滕娜, 等. 固相萃取-超临界流体色谱-质谱联用同时快速测定中成药和保健食品中的12种抗过敏化学药物[J]. *色谱*, 2018, 36(9): 889–894.
- Yang Z, Peng Y, Jin MN, *et al.* Simultaneous rapid determination of 12 anti-allergic chemical drugs in Chinese traditional patent medicine and health food by supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(9): 889–894.
- [9] 宋伟, 赵暮雨, 韩芳, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法测定克氏鲮中39种兽药残留[J]. *色谱*, 2018, 36(12): 1261–1268.
- Song W, Zhao MY, Han F, *et al.* Determination of 39 veterinary drug residues in *Procambarus clarkii* by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(12): 1261–1268.
- [10] 孙雷, 王亦琳, 叶妮, 等. 猪肉中92种兽药残留的UPLC-Qtrap高通量筛查和定量方法的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2017, 51(9): 36–42.
- Sun L, Wang Y L, Ye N, *et al.* The study on high-throughput screening and quantitative method for 92 veterinary drugs residues in pig muscle by UPLC-Qtrap [J]. *Chin J Veter Drug*, 2017, 51(9): 36–42.
- [11] GB/T 22955-2008 河豚鱼、鳗鱼和烤鳗鱼中苯并咪唑类药物残留量的测定[S].
- GB/T 22955-2008 Determination of benzimidazoles residues in fugu eel and baked eel-LC-MS-MS method [S].
- [12] GB/T 22286-2008 动物源性食品中多种 β -受体激动剂残留量的测定[S].
- GB/T 22286-2008 Determination of β -agonists residues in foodstuff of animal origin-Liquid chromatography with tandem-mass spectrometric method [S].
- [13] 熊春兰, 郭平, 占春瑞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中8类38种兽药残留[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(2): 193–198.
- Xing CL, Guo P, Zhan CR, *et al.* Simultaneous determination of 8 kinds of 38 veterinary drug residues in aquatic products by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2013, 32(2): 193–198.
- [14] 罗辉泰, 谢梦婷, 黄晓兰, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中63种兽药残留[J]. *色谱*, 2015, 33(4): 354–362.
- Luo HT, Xie MT, Huang XL, *et al.* Multiresidue analysis of 63 veterinary drugs in meat by dispersive solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(4): 354–362.
- [15] Spaggiari D. Comparison of liquid chromatography and supercritical fluid chromatography coupled to compact single quadrupole mass spectrometer for targeted in vitro metabolism assay [J]. *Chromatogr A*, 2014, 1371: 244–256.
- [16] 张丰梅, 何轶, 李耀磊, 等. 高效液相色谱与QDA质谱联用同时测定附子理中丸中6个单酯及双酯型生物碱含量[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(7): 1248–1253.
- Zhang YM, He Y, Li YL, *et al.* Simultaneous determination of six diterpenoid alkaloids in Fuzilizhong pills by HPLC coupled with QDA mass detector [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(7): 1248–1253.
- [17] 张嘉楠, 曹秀梅, 王爱卿. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中57种农药残留量[J]. *化学分析计量*, 2018, 27(4): 60–65.
- Zhang JN, Cao XM, Wang AQ. Determination of 57 pesticide residues in fruits and vegetables by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Anal Meterag*, 2018, 27(4): 60–65.
- [18] GB/T 22972-2008 牛奶和奶粉中噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、苯硫氨酯残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- GB/T 22972-2008 Determination of thiabendazole, albendazole, fenbendazole, oxfendazole and febantel residues in milk powder-HPLC-MS-MS method [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介

黑真真, 硕士, 主要研究方向食品化妆品安全分析。
E-mail: 493575215@qq.com

王钢力, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品和化妆品安全评价。
E-mail: duneer@163.com

曹进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: caojin@nifdc.org.cn