

全自动固相萃取-液相色谱串联质谱法测定 动物源性食品中53种常见兽药残留

梁倩文, 朱国婵, 郑超红, 邹国燊, 梁俏美, 刘辉*

(茂名海关综合技术服务中心, 茂名 525000)

摘要: 目的 建立全自动固相萃取-液相色谱串联质谱法同时检测6类53种常见兽药残留检测的分析方法。

方法 运用全自动固相萃取仪, 选取HLB、ENV、MCX等22种固相萃取小柱, 在反相萃取、离子萃取和正相萃取3种萃取机制下, 通过混合标准溶液考察各种小柱的吸附能力、净化能力和洗脱能力, 以选择合适的小柱和萃取程序, 结合液相色谱串联质谱法检测6类53种常见兽药的残留量。**结果** 在反相萃取机制下, ENV固相萃取小柱符合检测要求, 淋洗液为10%甲醇水, 洗脱液为甲醇、乙腈和乙酸乙酯分步洗脱。6类53种兽药检出限为0.20~5.0 μg/kg, 加标回收率为65%~118%, 相对标准偏差为1.1%~17.5%。**结论** 该方法具有前处理简单、检测结果准确、节能环保等特点, 适用于兽药残留检测的分析。

关键词: 兽药残留; 全自动固相萃取; 液相色谱串联质谱法; 动物源性食品

Determination of 53 kinds of common veterinary drug residues in animal-derived foods by automatic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIANG Qian-Wen, ZHU Guo-Chan, ZHENG Chao-Hong, ZOU Guo-Shen,
LIANG Qiao-Mei, LIU Hui*

(Maoming Customs Comprehensive Technical Service Center, Maoming 525000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 6 categories 53 kinds of common veterinary drug residues by automatic solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

Methods Automatic solid phase extraction instrument was used, and 22 kinds of solid-phase extraction columns, such as HLB, ENV and MCX, were selected, and the adsorption capacity, purification capacity and elution capacity of each column were investigated by mixing standard solution under 3 extraction mechanisms of reverse phase extraction, ion extraction and forward phase extraction, so as to select the appropriate column and extraction procedure. Combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, the residues of 6 categories 53 kinds of common veterinary drugs were determined. **Results** Under the reversed-phase extraction mechanism, the ENV solid phase extraction cartridge met the testing requirements. The rinse was 10% methanol water, and the eluent was mixed by methanol, acetonitrile and ethyl acetate and eluted by step. The limits of detection for 53 veterinary drugs were

基金项目: 茂名市科技计划项目(201552)

Fund: Supported by the Maoming City Science and Technology Plan Project (201552)

*通信作者: 刘辉, 高级工程师, 主要研究方向为进出口食品安全检测。E-mail: MMCL668@163.com

*Corresponding author: LIU Hui, Senior Engineer, Maoming Customs Comprehensive Technical & Service Center, No.9, Kouan Street, Renmin South Road, Maoming 525000, China. E-mail: MMCL668@163.com

0.20–5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the recoveries were 65%–118% and the relative standard deviations were 1.1%–17.5%. **Conclusion** This method has the characteristics of simple pretreatment, accurate detection results, energy saving and environmental protection. It is suitable for the analysis of veterinary drug residue detection.

KEY WORDS: veterinary residues; automatic solid phase extraction; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; animal-derived foods

0 引言

近年来,我国出口的产品因为兽药残留超标问题被国外通报或禁止出口的事件时有发生。主要原因是一方面由于国内外标准的差异,比如兽药氟苯尼考,在我国允许使用,限值为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (皮和肌肉中),而在美国不得使用,限值为不得检出。另一方面,由于国内养殖户自律性不够,对兽药滥用造成残留量超标。因此,加强对国内养殖环节的管理,减少兽药滥用和提高兽药残留检测能力,对保证我国相关产品的质量安全十分重要。

目前,针对进出口产品检测的兽药残留种类主要为氯霉素类、硝基呋喃代谢物类(需衍生才能检测)、四环素类、孔雀石绿类、喹诺酮类、磺胺类等 6 类 53 种。检测方法主要有:酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[1]、放射免疫法^[2]、液相色谱法^[3]、气相色谱串联质谱法^[4]、液相色谱串联质谱法^[5]和高分辨质谱法^[6]。而针对兽药残留检测前处理方法主要有:液液萃取法^[7]、分散基质法^[8]、固相萃取法^[9]、QuEChERS 法^[10]、分子印迹法^[11]等,检测指标也由单一向多类别多种类发展^[12–15]。兽药残留检测的关键在于前处理,近年来应用比较多的是 QuEChERS,如莫迎等^[16]运用 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中 4 类 29 种禁用兽药残留,郭海霞等^[17]应用 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中 121 种兽药,曹亚飞等^[18]采用 QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定奶酪中多类兽药残留,臧国栋等^[19]QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测水产品中 49 种农兽药残留。但 QuEChERS 法无法实现标准化和自动化,而且处理净化效果一般;固相萃取法除了净化效果好,还可以实现标准化和自动化。本研究建立全自动固相萃取-液相色谱串联质谱法检测动物源性食品中 6 类 53 种兽药残留的方法,以期实现自动化与标准化,提高检验效率,缩短检验周期,加快进出口产品的通关速度。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

Quattro Premier XE 液相色谱串联质谱仪(美国 Waters 公司); WINSPE 全自动固相萃取仪(北京优兴公司); P-12 平

行蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司); V7 涡旋振荡器(美国安胜设备有限公司); 3-18K 高速离心机(德国 Sigma 有限公司); SD-30 超声波仪(天津科导超声设备有限公司); 甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵(分析纯,美国 Fisher 试剂有限公司); 氢氧化钠(分析纯,天津光复化学有限公司); 三氯乙酸(分析纯,上海阿拉丁试剂有限公司); 硝基呋喃代谢物快速衍生试剂(广州润坤生物科技有限公司)。

固相萃取小柱(美国 Agilent): A 相(反相模式柱): HLB 柱(60 mg/3 mL), LMS 柱(60 mg/3 mL), ENV 柱(100 mg/3 mL), C8 柱(500 mg/6 mL), PPL 柱(500 mg/6 mL), Focus 柱(60 mg/3 mL); B 相(正相模式柱): CH 柱(500 mg/3 mL), pH 柱(500 mg/3 mL), C₁₈ 柱(500 mg/3 mL), CN 柱(500 mg/3 mL), OH 柱(500 mg/3 mL), AL-B 柱(500 mg/3 mL), AL-N 柱(500 mg/3 mL), PSA 柱(500 mg/6 mL), NH₂/Carb 混合柱(500 mg/500 mg/6 mL), Prime 柱(500 mg/6 mL), NH₂ 柱(500 mg/6 mL), Carb 柱(500 mg/6 mL), SI 柱(500 mg/3 mL); C 相(离子模式柱): MCX 柱(60 mg/3 mL), C8/MCX 混合柱(500 mg/60 mg/3 mL)CBA 柱(60 mg/3 mL), MAX 柱(60 mg/3 mL)。

标准品: 氯霉素(chloramphenicol, CAP)、氟苯尼考(flornfenicol, Flor)、甲砒霉素(thiamphenicol, TAP)、呋喃西林代谢物(semicarbazide hydrochloride, SEM)、呋喃唑酮代谢物(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)、呋喃妥因代谢物(1-aminohydantoin hydrochloride, AHD)、呋喃它酮代谢物(3-amino-5-morpholinylmethyl-2-oxazolidinone, AMOZ)、孔雀石绿(malachite green, MG)、隐性孔雀石绿(leucomalachite green, LMG)、结晶紫(crystal violet, CV)、隐性结晶紫(leucocrystal violet, LCV)、四环素(tetracycline, TC)、强力霉素(doxycycline, DC)、土霉素(oxytocin, OTC)、金霉素(chlortetracycline, CTC)、氧氟沙星(ofloxacin, OFL)、丹诺沙星(danoxacin, Dano)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENRO)、双氟沙星(difloxacin, DIF)、沙拉沙星(sarafloxacin, SARA)、恶喹酸(oxolinic acid, OA)、氟甲喹(fluoroquine, FQ)、培氟沙星(pefloxacin, PEF)、洛美沙星(lomefloxacin, Lome)、依诺沙星(enoxacin, Eno)、奥比沙星(obifloxacin, Obi)、麻保沙星(marbofloxacin, Mb)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)、磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine, SDMD)、磺胺甲基嘧啶(sulfamethyldiazine, SMR)、磺胺邻二甲氧嘧啶

(sulfamethoxine, SDM)、磺胺喹恶啉(sulfaquinolaxine, SQX)、磺胺-6-甲氧嘧啶(sulfonamide-6-methoxypyrimidine, SMMX)、磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMZ)、甲氧苄啶(trimethoprim, TMP)、磺胺甲氧哒嗪(sulfamethoxazine, SMOD)、磺胺氯哒嗪(sulfachloropyridazine, SCPD)、磺胺间二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine, SDO)、磺胺-5-甲氧嘧啶(sulfa-5-methoxypyrimidine, SFM)、磺胺噻唑(sulfathiazole, SFZ)(德国 Dr 标准物质有限公司)。

内标物(CAP-D5、SEM-13C15N、AOZ-D4、AHD-13C3、AMOZ-D5、MG-D5、LMG-D6、ENRO-D5、SDZ-13C6、SMZ-13C6、SDM-D3)(德国 Dr 标准物质有限公司)。

1.2 分析条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱: Waters BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 柱温: 40 °C 进样体积: 10 μL。流速为 0.25 mL/min, 流动相:

(1)检测氯霉素类时为: A 相纯水, B 相甲醇, 梯度为: 0~1 min, 30%B~50%B; 1~2.5 min, 50%B~50%B; 2.5~3 min, 50%B~30%B。(2)检测硝基咪唑代谢物类时为: A 相 5mmol/L 乙酸铵(含 0.1%FA), B 相甲醇, 梯度为: 0~1 min, 35%B~75%B; 1~2.5 min, 75%B~75%B; 2.5~3 min, 75%B~35%B。(3)检测孔雀石绿类时为: A 相 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%FA), B 相乙腈, 梯度为: 0~1 min, 50%B~90%B; 1~2.5 min, 90%B~90%B; 2.5~3 min, 90%B~50%B。(4)检测四环素、喹诺酮、磺胺类时为: A 相 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%FA), B 相乙腈, 梯度为: 0~1 min, 10%B~30%B; 1~2.5 min, 30%B~30%B; 2.5~3 min, 30%B~10%B。

1.2.2 质谱条件

毛细管电压: 1.0 kV, 源温: 120 °C, 脱溶剂温度: 350 °C, 脱溶剂气流速: 800 L/Hr。

采集方式: 氯霉素类采用负离子模式, 其他类别均采用正离子模式。6 类 53 种化合物的具体采集参数见表 1。

表 1 53 种化合物质谱采集参数
Table 1 Mass acquisition parameters of 53 kinds of compounds

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/V
CAP	321.1	151.9*, 257.1	0.1	33	18, 12
TAP	353.9	184.9*, 289.9	0.05	30	20, 12
FLOR	355.8	218.9*, 335.8	0.05	30	12, 10
CAP-D5	325.9	157	0.1	30	18
SEM	208.9	165.9*, 191.9	0.02	25	10, 10
SEM-13C15N	211.9	167.9	0.02	25	10
AOZ	235.9	133.9*, 191.9	0.05	30	12, 12
AOZ-D4	239.9	133.9	0.05	30	12
AHD	248.9	134*, 177.9	0.02	30	12, 15
AHD-13C3	251.9	133.9	0.02	30	12
AMOZ	334.9	128.1*, 291	0.05	30	20, 12
AMOZ-D5	340	296	0.05	30	12
MG	329	208*, 313	0.05	60	35, 35
MG-D5	334	318	0.05	60	35
CV	372	251*, 356	0.05	60	35, 42
LCV	374	238*, 359	0.05	45	30, 23
LMG	331	239*, 316	0.05	45	30, 21
LMG-D6	337	322	0.05	45	22
DC	444.9	153.9*, 427.9	0.05	30	30, 18
TC	445	409.9*, 426.9	0.05	30	20, 15
OTC	460.9	425.9*, 442.9	0.05	30	20, 15
CTC	478.9	153.9*, 443.9	0.05	30	30, 20

表 1(续)

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/V
OA	262	160*, 216.1	0.05	30	40, 30
FQ	262.1	174*, 202.1	0.05	25	40, 30
NOF	320	233.1*, 276.1	0.02	35	25, 18
ENO	321.2	232.2*, 303.2	0.05	35	35, 20
CIP	332	245.1*, 288.1	0.02	35	24, 18
PeF	334.3	290.3*, 316.3	0.02	35	18, 20
Lome	352.2	265.3*, 308.3	0.05	35	20, 15
Dano	357.8	282.9*, 339.9	0.05	35	25, 22
ENRO	360	245.1*, 316.1	0.05	35	24, 20
OFL	362	261.1*, 318.1	0.05	35	26, 20
MB	363	320*, 345	0.05	30	15, 20
DIF	400	299.1*, 356.1	0.02	35	27, 19
SARA	386	299.1*, 342.1	0.05	35	26, 20
Obi	396.2	295.2*, 352.2	0.05	30	25, 20
ENRO-D5	365.1	321.2	0.05	35	22
SDZ	251	108.1*, 156	0.02	25	25, 16
SMZ	254	108.1*, 156	0.02	25	25, 16
SFZ	256.1	108.3*, 156.1	0.05	25	22, 12
SMOD	281	108.2*, 156	0.05	30	22, 17
SMR	265	156*, 172	0.05	30	17, 17
SDMD	279	156*, 186.1	0.05	30	18, 17
SMMX	281	108.2*, 156	0.05	30	22, 17
SCPD	284.8	108.1*, 155.9	0.05	20	25, 15
TMP	291.1	230.2*, 261.2	0.05	35	25, 25
SQX	301	108.2*, 156	0.02	30	25, 16
SDM	311	108.2*, 156	0.05	30	25, 18
SFM	281	108.2*, 156	0.05	30	22, 17
SDO	311	108.2*, 156	0.05	30	25, 18
SDZ-13C6	257	161.9	0.05	30	16
SMZ-13C6	260	162	0.05	25	15
SDM-D3	314	159.1	0.05	30	20

注: 带*者为定量离子。

1.3 样品前处理方法

称取 3.0 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 100 μ L 浓度为 50 ng/mL 的 6 类兽药混合内标溶液, 加入 10 mL 5% 三氯乙酸溶液, 再加入 50 μ L 硝基咪唑代谢物快速衍生试剂, 涡旋混合, 超声 5 min, 置于 60 $^{\circ}$ C 水浴中衍生 10 min。离心,

将上清液全部转移至另一个 50 mL 离心管中, 用 5 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 4.0 \pm 0.1, 后用全自动固相萃取仪过 ENV 小柱萃取净化, 萃取程序为: (1)活化 1, 溶剂为甲醇, 体积为 3 mL, 流速为 4 mL/min; (2)活化 2, 溶剂为纯水, 体积为 3 mL, 流速为 4 mL/min; (3)上样品, 不收集过

柱液, 体积为 10 mL, 流速为 4 mL/min; (4)淋洗, 溶剂为 10%甲醇-水, 体积为 5 mL, 流速为 4 mL/min; (5)小柱干燥; (6)洗脱 1, 溶剂为甲醇, 体积为 3 mL, 流速为 4 mL/min; (7)洗脱 2, 溶剂为乙腈, 体积为 3 mL, 流速为 4 mL/min; (8)洗脱 3, 溶剂为乙酸乙酯, 体积为 3 mL, 流速为 4 mL/min。洗脱液蒸干后用甲醇-乙腈-5 mmol/L 的乙酸铵(1:1:8, V:V:V)定容至 1.0 mL, 然后分别上机测定。

2 结果与分析

2.1 固相萃取小柱的筛选

配制浓度为 10 ng/mL(其中四环素类浓度为 100 ng/mL)的 6 类兽药混合标准溶液, 选取 HLB、LMS、Env 等 22 种固相萃取小柱, 在反相萃取、正相萃取和离子萃取 3 种萃取模式下, 运用全自动固相萃取仪进行萃取,

其中反相模式的上样液为纯水, 淋洗液为 10%甲醇-水, 洗脱液为甲醇; 正相模式的上样液为乙腈, 洗脱液为乙腈; 离子模式的上样液为 0.1 mol/L HCl, 淋洗液为纯水, 洗脱液为氯化甲醇(阳离子)或酸化甲醇(阴离子)。然后上机测定经过各种小柱萃取后的浓度。结果见表 2。

阳离子萃取模式比较适合孔雀石绿、喹诺酮和磺胺类这 3 类兽药, 回收率在 80%左右; 而正相萃取模式比较适合氯霉素和硝基呋喃代谢物类, 回收率大部分达到 70%左右。能满足氯霉素类、硝基呋喃代谢物类、孔雀石绿类、四环素类、喹诺酮和磺胺类 6 类兽药同时检测的只有反相萃取模式下的 HLB 和 ENV 小柱。这 2 种小柱对 6 类兽药中所有组分的检测回收均在 60%以上, 符合残留分析的要求。故初步选定为净化柱, 进一步考察净化效果。

表 2 22 种固相萃取小柱对 6 类兽药混合标准溶液的萃取结果

Table 2 Extraction results of 6 classes veterinary drugs mixed standard solution by 22 kinds of solid phase extraction cartridges

萃取机理	萃取小柱	检测结果/(ng/mL)					
		氯霉素类	硝基呋喃代谢物类	孔雀石绿类	四环素类	沙星类	磺胺类
反相萃取	HLB	9.4	7.8	6.4	69.3	9.4	8.1
	LMS	9.3	6.3	0.1	59.6	6.2	7.2
	PPL	8.4	7.3	6.1	108.9	3.1	8.3
	C8	9.5	8.4	6.6	43.3	6.9	9.0
	Focus	6.2	7.9	2.8	48.6	2.1	6.8
	ENV	9.1	7.9	6.4	73.7	10.3	8.8
离子萃取	MCX	0.0	0.0	8.19	13.0	8.3	7.7
	CBA	0.0	0.0	0.0	5.1	0.0	0.0
	C8/MCX	0.0	0.0	8.6	12.3	7.9	7.2
	MAX	0.0	0.0	0.0	36.3	0.0	3.1
	Prime	3.9	3.8	1.4	0.0	0.0	2.0
	NH2	2.6	4.1	3.0	0.0	0.0	1.0
	PSA	5.3	3.7	4.3	0.0	0.0	3.5
	NH ₂ /Carb	2.2	3.9	2.5	0.0	0.0	0.0
	SI	4.6	4.2	1.2	0.0	0.0	1.4
	Carb	3.9	4.1	1.8	0.0	0.0	2.1
正相萃取	CH	8.7	5.0	0.0	27.0	8.7	1.1
	CN	9.9	6.9	1.3	0.0	4.2	2.6
	OH	10.8	6.2	1.2	0.0	3.8	2.0
	AL-N	9.1	7.1	5.9	0.0	2.0	1.0
	AL-B	6.8	5.3	6.3	0.0	1.6	0.7
	PH	8.1	7.4	1.1	13.0	2.7	1.1

2.2 淋洗液的选择

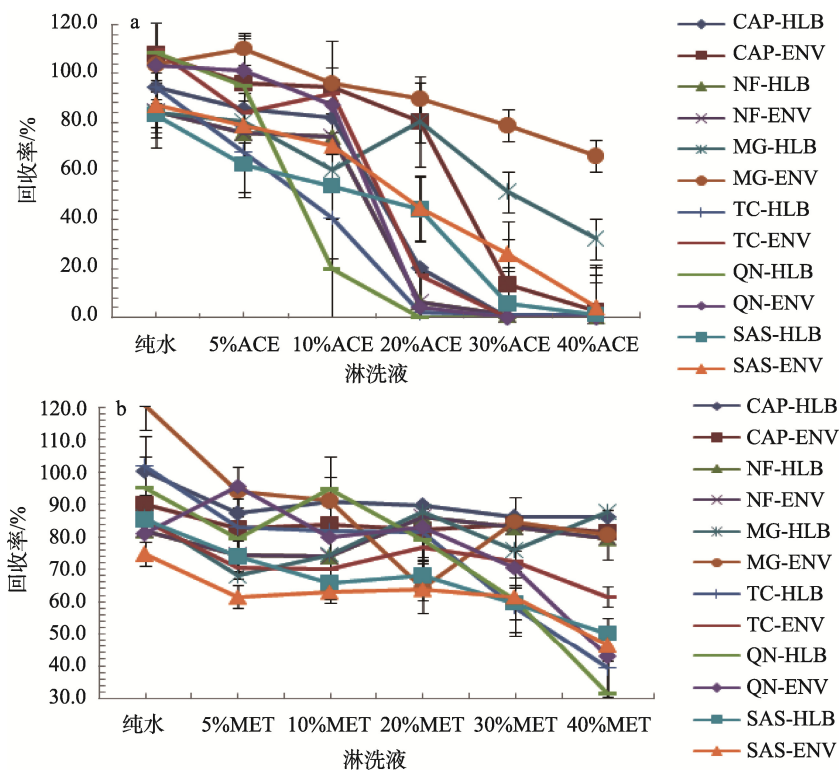
分别配制 5% 甲醇(methyl alcohol, MET)水、10% 甲醇水、20% 甲醇水、30% 甲醇水、40% 甲醇水、5% 乙腈(acetonitrile, ACE)-水、10% 乙腈-水、20% 乙腈-水、30% 乙腈-水、40% 乙腈-水和纯水 11 种淋洗液, 然后用 10 ng/mL 混合标准溶液采用全自动固相萃取仪萃取, 分别测定经 11 种淋洗溶液淋洗后的回收结果, 考察 HLB 和 ENV 2 种小柱的耐受能力, 得到图 1 的淋洗曲线图。

由图 1 可知, 用乙腈配制淋洗液, 2 种小柱最高只能耐

受 5% 的比例; 用甲醇配制淋洗液, 最高可以耐受 30% 的比例。无论是甲醇或乙腈, ENV 小柱均比 HLB 小柱耐受能力强, 故最终选定 ENV 小柱为萃取柱, 同时为保证个别特殊的指标有比较好的回收, 最终选定 10% 甲醇水作为淋洗液。

2.3 洗脱液的选择

选择甲醇、乙腈、乙酸乙酯、丙酮、二氯甲烷、正己烷 6 种溶液为洗脱液, 然后用 10 ng/mL 混合标准溶液过 ENV 小柱上全自动固相萃取仪萃取, 分别测定 6 种洗脱液洗脱后回收的结果, 得到 6 种不同洗脱液回收柱状图见图 2。



注: a. 乙腈溶液淋洗; b. 甲醇溶液淋洗。

图 1 在不同淋洗溶液下 6 类兽药的回收曲线图($n=6$)

Fig.1 Cures of 6 veterinary drugs recovery under different rinse solutions ($n=6$)

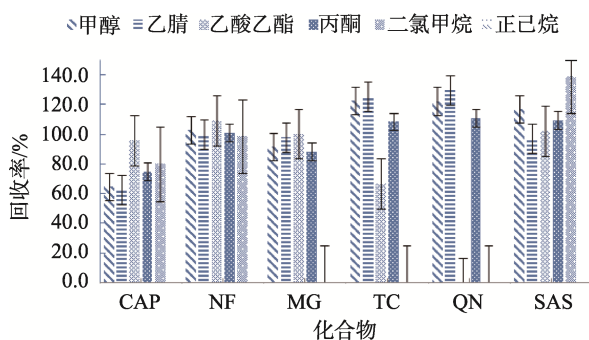


图 2 6 种不同洗脱液对不同种类兽药回收柱状图($n=6$)

Fig.2 Histogram of different kinds of veterinary drug recovery with 6 different eluents ($n=6$)

由图 2 可知, 不同溶液对不同兽药的洗脱能力不同。其中正己烷对 6 类兽药均无法洗脱; 乙酸乙酯对氯霉素类和硝基呋喃代谢物类洗脱能力较好; 甲醇、乙腈对孔雀石绿类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类洗脱能力较好。故选择甲醇、乙腈、乙酸乙酯 3 种溶液为洗脱液, 分 3 步洗脱, 保证各类兽药均有较好的回收率。

2.4 衍生溶液和定容液的选择

由于硝基呋喃代谢物无法直接测定, 需衍生化处理。因此, 衍生液的选择十分关键。本研究比较了快速衍生条件下, 10 ng/mL 硝基呋喃代谢混合标准溶液在 0.2 mol/L 盐酸、0.1 mol/L 柠檬酸-EDTA 缓冲液(MC 缓冲液, pH=4.0)、0.2 mol/L 乙酸钠、1% 磷酸、1% 三氯乙酸和 5% 三氯乙酸 6

种溶液的衍生效果, 发现 5%三氯乙酸为衍生液, 样品衍生后溶液比较清澈, 上机测试响应峰面积最好, 结果见表 3。故选 5%三氯乙酸为衍生溶液。

表 3 在 6 种不同衍生液中硝基呋喃代谢物响应峰面积
Table 3 Peak area of nitro furan metabolite response in 6 different in derivative solutions

衍生溶液	峰面积(A)			
	呋喃西林代谢物	呋喃它酮代谢物	呋喃妥因代谢物	呋喃唑酮代谢物
0.2 mol/L HCL	3180.9	21168.2	2645.8	4377.9
0.1 mol/L MC	4388.7	8492.4	668.4	2550.7
0.2mol/L 乙酸钠	3558.5	32432.1	1920.7	5797.4
1% H ₄ PO ₄	1025.4	3650.1	375.6	849.8
1% TCA	4568.9	35581.4	920	14217.6
5% TCA	5642.5	52904.1	5086.7	20448.5

另外, 本研究比较了甲醇-水、乙腈-水、甲醇

-5 mmol/L 乙酸铵、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵、甲醇-乙腈-水、甲醇-乙腈-5 mmol/L 乙酸铵等不同流动相组合作为定容液对测试结果的影响, 发现 5 mmol/L 乙酸铵对孔雀石绿类影响比较大, 同时考虑各类兽药的溶解性, 最终选择甲醇-乙腈-5 mmol/L 乙酸铵(1:1:8, V:V:V)为定容液。

2.5 方法检出限与校准曲线

取空白罗非鱼样品 6 份, 按照表 4 校准曲线的标准系列分别加入适量的混合标准溶液, 然后按 1.3 方法处理, 上机检测, 得到基质校准曲线和回归方程。以 $S/N > 10$ 作为定量检出限的标准, 确定方法的检出限。53 种兽药检出限介于 0.20~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 间, 相关系数 $r \geq 0.9954$, 所有检测项目的检出限均低于或等于国家标准限值。

2.6 回收率与精密度

分别以空白的罗非鱼和猪肉为基质样品, 每种基质样品分别制备 1 倍检出限、2 倍检出限和 10 倍检出限 3 个浓度的加标样品各 6 份, 然后按 1.3 进行处理, 上机测试, 结果见表 5。加标回收率为 65%~118%间, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 1.1%~17.5%。回收率和准确度符合残留分析的要求。

表 4 方法的检出限、校准曲线、回归方程和相关系数

Table 4 Limits of detection, calibration curves, regression equations and correlation coefficients of this method

化合物	检出限($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性范围(ng/mL)	回归方程	相关系数
CAP	0.2	0.25, 0.5, 1, 2.5, 5.0	$Y=0.333558X-0.0125452$	0.9992
Flor	1.0	1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 2.5	$Y=0.407589X-0.0935457$	0.9973
TAP	1.0	1.25, 2.5, 5.0, 12.5, 2.5	$Y=0.129584X-0.00519947$	0.9991
SEM	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=0.71695X+0.0398223$	0.9988
AOZ	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=0.659264X-0.0147414$	0.9999
AHD	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=0.601715X-0.0157836$	0.9977
AMOZ	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=0.571025X-0.0129732$	0.9994
MG	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=1.84985X-0.00730604$	0.9999
LMG	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=1.25578X-0.00811963$	0.9999
CV	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=1.67245X+0.00329754$	0.9995
LCV	0.5	0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10	$Y=1.30639X-0.0479077$	0.9982
TC	5.0	5.0, 10, 20, 50, 100	$Y=558.968X-702.785$	0.9975
DC	5.0	5.0, 10, 20, 50, 100	$Y=673.475X-1062.82$	0.9955
CTC	5.0	5.0, 10, 20, 50, 100	$Y=285.665X-312.869$	0.9982
OTC	5.0	5.0, 10, 20, 50, 100	$Y=389.684X-675.851$	0.9967
OFL	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.53065X-0.0551277$	0.9993
Dano	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.269491X-0.137066$	0.9982
MB	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.241835X-0.0234297$	0.9983

表 4(续)

化合物	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性范围/(ng/mL)	回归方程	相关系数
NOR	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.15308X-0.0294967$	0.9979
CIP	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.220286X-0.0449146$	0.9992
ENRO	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.635052X+0.0361649$	0.9993
DIF	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.172921X-0.0382565$	0.9992
SARA	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.20066X-0.0387504$	0.9995
OA	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.286526X-0.0377592$	0.9966
FQ	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.574629X-0.0305298$	0.9988
PeF	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.229149X+0.0193624$	0.9998
Lome	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.15337X-0.0265222$	0.9988
Obi	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.303353X-0.071833$	0.9984
ENO	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.188944X-0.0905946$	0.9986
SDZ	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.284861X-0.0176347$	0.9996
SFZ	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.108703X+0.00127001$	0.9999
SDMD	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.653591X-0.0585895$	0.9998
SMR	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.159892X-0.00315296$	0.9996
SDM	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=1.53856X-0.144144$	0.9974
SQX	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.094235X-0.0202627$	0.9954
SMMX	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.221853X-0.0321125$	0.9970
SMZ	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.224184X+0.0574488$	0.9998
TMP	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.162031X-0.00913006$	0.9994
SMOD	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.711098X-0.0591953$	0.9999
SCPD	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.177809X+0.00221472$	0.9999
SDO	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.812312X-0.0945975$	0.9961
SFM	1.0	1.0, 2.0, 4.0, 10, 20	$Y=0.707969X-0.0811002$	0.9987

表 5 在罗非鱼和猪肉两种基质中 3 个浓度下加标回收率和精密度($n=6$)
 Table 5 Recoveries and RSD at 3 concentrations in tilapia and pork substrates ($n=6$)

化合物	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	罗非鱼		猪肉	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
CAP	0.25	116.0	8.7	113.3	9.6
	0.50	100.7	4.6	103.0	2.9
	2.50	101.9	2.8	99.2	2.7
Flor	1.25	116.9	9.8	118.0	5.3
	2.50	110.1	7.6	107.1	8.5
	12.5	104.5	4.7	105.8	2.9
TAP	1.25	100.4	6.8	99.3	10.1
	2.50	100.6	7.2	102.1	12.8
	12.5	98.0	6.8	94.7	7.5

表 5(续)

化合物	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	罗非鱼		猪肉	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
SEM	0.5	91.6	14.2	98.0	14.5
	1.0	85.7	4.2	98.0	11.7
	5.0	88.0	7.0	92.6	8.6
AOZ	0.5	86.3	9.3	85.3	7.7
	1.0	89.8	6.9	87.5	4.7
	5.0	92.8	3.8	86.6	2.9
AHD	0.5	91.7	9.8	98.3	10.9
	1.0	94.0	8.5	99.3	8.8
	5.0	93.7	10.2	94.7	7.2
AMOZ	0.5	101.7	7.6	89.0	8.6
	1.0	83.7	8.1	87.8	10.9
	5.0	82.0	3.0	85.1	9.2
MG	0.5	102.0	12.0	95.7	11.1
	1.0	86.5	13.8	95.0	13.1
	5.0	90.3	11.2	88.3	12.8
LMG	0.5	94.7	7.2	95.3	6.0
	1.0	91.7	1.1	94.2	2.5
	5.0	93.6	2.1	92.9	2.0
CV	0.5	92.0	4.6	97.3	4.9
	1.0	71.8	4.2	81.8	4.1
	5.0	97.6	3.9	101.0	3.0
LCV	0.5	95.3	13.0	97.7	10.7
	1.0	92.5	6.7	94.0	7.8
	5.0	89.1	8.2	87.5	7.6
TC	10	89.2	9.0	91.2	8.2
	20	70.2	10.9	72.2	12.0
	100	75.4	7.5	73.6	8.5
DC	10	79.4	13.0	77.8	8.8
	20	69.3	14.1	72.0	14.8
	100	83.7	9.4	84.3	13.0
CTC	10	69.4	2.6	70.0	2.1
	20	94.2	3.6	89.8	3.4
	100	75.7	9.8	75.7	8.9
OTC	10	93.1	9.5	91.4	12.9
	20	77.7	7.4	77.1	7.9
	100	74.8	3.2	73.8	3.5

表5(续)

化合物	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	罗非鱼		猪肉	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
OFL	1.0	104.0	14.7	100.7	16.5
	2.0	96.1	4.7	100.3	5.3
	10	83.9	7.3	86.5	4.9
Dano	1.0	109.7	2.6	106.0	5.7
	2.0	101.7	4.1	105.8	4.3
	10	85.2	3.4	80.7	7.2
MB	1.0	86.0	12.8	97.8	13.4
	2.0	93.7	7.4	91.0	8.0
	10	92.1	2.4	93.9	2.6
NOR	1.0	106.8	7.6	98.3	14.6
	2.0	80.8	8.5	93.4	6.4
	10	90.7	5.0	94.8	7.8
CIP	1.0	97.3	15.0	91.7	13.7
	2.0	98.9	10.7	96.5	6.8
	10	98.6	8.7	92.9	10.6
ENRO	1.0	90.8	8.7	94.0	12.1
	2.0	98.4	5.4	98.5	11.4
	10	109.4	5.6	109.3	6.0
DIF	1.0	94.5	6.9	91.2	10.3
	2.0	87.7	11.3	89.8	6.3
	10	96.1	10.0	101.4	5.3
SARA	1.0	103.8	4.5	102.5	8.1
	2.0	98.4	5.6	99.2	5.6
	10	105.3	4.4	109.8	2.0
OA	1.0	97.7	12.8	98.5	10.5
	2.0	103.5	6.2	99.0	11.0
	10	104.5	4.9	109.1	5.7
FQ	1.0	95.7	10.2	95.2	8.6
	2.0	97.8	10.4	93.6	8.9
	10	105.7	6.5	107.3	4.2
PeF	1.0	93.3	9.5	73.3	10.3
	2.0	93.8	11.4	99.4	11.1
	10	98.6	11.7	93.8	8.8
Lome	1.0	98.8	7.7	109.2	4.4
	2.0	101.8	10.5	100.2	7.4
	10	109.4	5.3	111.9	2.6
Obi	1.0	101.0	7.0	106.3	4.4
	2.0	108.1	5.9	105.7	5.6
	10	106.4	9.0	102.9	5.3

表 5(续)

化合物	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	罗非鱼		猪肉	
		回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
ENO	1.0	104.2	10.3	108.7	8.3
	2.0	95.8	6.0	99.8	3.3
	10	88.7	3.0	84.3	11.8
SDZ	1.0	103.2	5.6	98.2	5.6
	2.0	96.0	6.4	98.2	6.1
	10	97.0	3.4	98.2	3.6
SFZ	1.0	96.0	8.0	95.3	8.5
	2.0	102.4	6.3	100.6	5.2
	10	97.1	7.0	93.5	11.8
SDMD	1.0	105.2	16.3	101.5	5.0
	2.0	100.8	8.2	101.0	11.4
	10	95.4	3.5	95.1	3.1
SMR	1.0	95.3	15.7	92.3	7.6
	2.0	97.3	12.0	103.4	8.7
	10	82.8	8.6	81.8	13.3
SDM	1.0	96.3	8.2	104.8	5.9
	2.0	100.9	6.6	100.6	7.3
	10	94.2	4.0	92.6	3.2
SQX	1.0	94.0	17.4	76.3	16.0
	2.0	66.1	11.8	68.6	10.8
	10	70.8	11.7	72.5	9.6
SMMX	1.0	98.3	11.1	100.7	7.6
	2.0	94.6	10.1	99.0	5.7
	10	96.4	6.8	97.3	4.5
SMZ	1.0	72.5	6.7	77.0	10.5
	2.0	90.3	5.4	92.5	13.7
	10	100.3	6.4	98.4	2.6
TMP	1.0	98.0	17.5	101.8	15.0
	2.0	98.1	10.5	101.3	10.6
	10	87.5	5.1	85.9	5.9
SMOD	1.0	95.5	10.5	103.8	9.5
	2.0	104.7	9.5	105.8	7.4
	10	81.0	3.0	75.4	6.2
SCPD	1.0	96.2	10.4	97.7	7.9
	2.0	104.4	3.9	100.5	9.5
	10	102.3	3.8	100.7	7.1
SDO	1.0	67.2	11.0	65.0	3.0
	2.0	70.9	10.3	76.2	11.0
	10	84.5	7.0	82.5	10.7
SFM	1.0	99.3	10.5	102.2	5.1
	2.0	108.4	8.8	105.8	9.9
	10	81.7	3.0	75.8	6.6

2.7 样品检测

本研究运用该方法对实验室内 2000 多批次的水产品样品进行 6 类 53 种常见兽药残留的检测, 检出不合格样品 13 批次, 不合格项目涉及氯霉素、氟苯尼考、呋喃西林代谢物、呋喃它酮代谢物、恩诺沙星、磺胺嘧啶等, 检测结果介于 0.20~873 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。

3 结论

本研究建立的全自动固相萃取-液相色谱串联质谱法检测 6 类 53 种常见兽药残留的方法, 只需进行一次前处理即可实现对氯霉素类、硝基呋喃代谢物类、四环素类、喹诺酮类和磺胺类 6 类兽药残留的检测, 把需要 2 d、提取 6 次的前处理工作, 缩短至 40 min、1 次提取完成, 具有前处理简单、检测结果准确、节能环保等特点, 可以实现自动化与标准化, 同时可以减少试剂耗材的使用量、提高检验效率、加快进出口商品和货物的通关速度、缩短通关时间, 值得推广和应用。

参考文献

- [1] 孙文敬. 部分兽药残留 ELISA 检测方法的建立及纳米功能探针的应用研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2017.
SUN WJ. Establishment of ELISA detection methods for some veterinary drug residues and application research of nano-functional probes [D]. Tianjin: Tianjin Medical University, 2017.
- [2] 陈健, 林杰, 黄晓蓉, 等. 放射免疫法检测鳗鱼中磺胺类药物残留[J]. 水产科学, 2007, (5): 282-284.
CHEN J, LIN J, HUANG XR, *et al.* Detection of sulfonamide residues in eels by radioimmunoassay [J]. *Fish Sci*, 2007, (5): 282-284.
- [3] 罗昭军. 高效液相色谱-紫外串联荧光检测法测定猪肉中两类 11 种兽药残留的研究[J]. 广西畜牧兽医学报, 2018, 34(5): 247-249.
LUO ZJ. Determination of two types of 11 veterinary drug residues in pork by high performance liquid chromatography-ultraviolet tandem fluorescence detection [J]. *Guangxi J Anim Husbandry Vet Med*, 2018, 34(5): 247-249.
- [4] 黄子敬, 陈孟君, 符靖雯, 等. PTV-GC-MS/MS 及 UPLC-MS/MS 测定水产品中多种农兽药残留[J]. 化学研究与应用, 2018, 30(8): 1376-1387.
HUANG ZJ, CHEN MJ, FU JW, *et al.* PTV-GC-MS/MS and UPLC-MS/MS determination of multiple pesticide and veterinary drug residues in aquatic products [J]. *Chem Res Appl*, 2018, 30(8): 1376.
- [5] 孙晓杰, 高金芳, 李兆新, 等. 通过式净化-液相色谱-串联质谱快速筛查水产品中 15 类 107 种兽药多残留的方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(22): 8240-8246.
SUN XJ, GAO JF, LI ZX, *et al.* Research on rapid screening of 15 types of 107 veterinary drugs in aquatic products with multi-residue methods through purification-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(22): 8240-8246.
- [6] 李蓉, 杨璐齐, 张鹏云, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱同时检测水产品中 64 种兽药残留[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1266-1275.
LI R, YANG LQ, ZHANG PY, *et al.* Simultaneous detection of 64 veterinary drug residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(12): 1266-1275.
- [7] 张凤凤. 兽药多残留样品前处理技术研究情况[J]. 中国畜禽种业, 2018, 14(9): 71.
ZHANG FF. Research on pretreatment technology of multi-residue samples of veterinary drugs [J]. *Chin Livest Poul Breed*, 2018, 14(9): 71.
- [8] 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 foods by dispersive solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(9): 880-888.
- [9] 雷攀明. 固相萃取法快速分析畜禽肉中多种兽药残留量[J]. 食品安全导刊, 2021, (3): 99-102.
LEI PM. Rapid analysis of multiple veterinary drug residues in livestock and poultry meat by solid phase extraction [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2021, (3): 99-102.
- [10] JEAN L, ANTUNIELLE S, JAHIR A, *et al.* Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk [J]. *Food Chem*, 2018, 240: 1243-1253.
- [11] 赵雯, 彭黔荣, 冯贵涛, 等. 分子印迹固相萃取技术在食品的农药和兽药残留检测中的应用进展[J]. 中国调味品, 2017, 42(5): 157-162.
ZHAO W, PENG QR, FENG GT, *et al.* Application progress of molecularly imprinted solid phase extraction technology in the detection of pesticide and veterinary drug residues in food [J]. *Chin Cond*, 2017, 42(5): 157-162.
- [12] 李双, 陈树兵, 李露青, 等. 食品中 99 种兽药的一步式提取净化体系[J]. 色谱, 2018, 36(6): 506-517.
LI S, CHEN SB, LI LQ, *et al.* One-step extraction and purification system of 99 veterinary drugs in food [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(6): 506-517.
- [13] 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 YL, YEN, *et al.* UPLC-Qtrap high-throughput screening and quantification methods for 92 veterinary drug residues in pork [J]. *Chin J Vet Drug*, 2017, 51(9): 36-42.
- [14] 张毅, 岳振峰, 郭文, 等. 动物源性食品中药物多残留分析的研究进展[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 213-221.
ZHANG Y, YUE ZF, GUO W, *et al.* Research progress of drug multi-residue analysis in animal-derived foods [J]. *Food Sci*, 2016, 37(1): 213-221.
- [15] 朱万燕, 张欣, 杨娟, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法同时测定猪肉中多类兽药残留[J]. 色谱, 2015, 33(9): 1002-1008.
ZHU WY, ZHANG X, YANG J, *et al.* Simultaneous determination of multiple veterinary drug residues in pork by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(9): 1002-1008.
- [16] 莫迎, 盘正华, 蒋湘, 等. 多壁碳纳米管 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中兽药多残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5443-5452.

MO Y, PAN ZH, JIANG X, *et al.* Determination of multi-residues of veterinary drugs in eggs by multi-walled carbon nanotube QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(16): 5443–5452.

- [17] 郭海霞, 肖桂英, 张禧庆, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中 121 种兽药[J]. *色谱*, 2015, 33(12): 1242–1250.

GUO HX, XIAO GY, ZANG XQ, *et al.* Simultaneous detection of 121 veterinary drugs in pork by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(12): 1242–1250.

- [18] 曹亚飞, 康健, 常巧英, 等. QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定奶酪中多类兽药残留[J]. *色谱*, 2015, 33(2): 132–139.

CAO YF, KANG J, CHANG QY, *et al.* Quick determination of multiple veterinary drug residues in cheese with QuEChERS combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(2): 132–139.

- [19] 臧国栋, 黄子敬, 陈孟君, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测水产品中 49 种农兽药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(9): 2147–2153.

ZANG GD, HUANG ZJ, CHEN MJ, *et al.* Simultaneous detection of 49 pesticide and veterinary drug residues in aquatic products by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(9): 2147–2153.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



梁倩文, 助理工程师, 主要研究方向为进出口食品安全检验检测。

E-mail: MTC_1001@163.com

刘 辉, 高级工程师, 主要研究方向为进出口食品安全检测。

E-mail: MMCL668@163.com