

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中 4种四环素类药物残留

刘善菁\*, 陆桂萍, 刘雨昕, 曲斌, 宋慧敏

(江苏省畜产品质量检验测试中心, 南京 210036)

**摘要:** **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肝中4种四环素类药物残留量的分析方法。**方法** 样品经弱酸性的Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine缓冲溶液提取, 硫酸溶液与钨酸钠溶液沉淀蛋白, HLB固相萃取柱净化, Waters ACQUITY HSS T3色谱柱分离, 0.1%甲酸水溶液与乙腈作为流动相梯度洗脱, 多反应监测正离子模式测定, 内标法定量。**结果** 4种四环素类药物在5~100 ng/mL范围内线性关系良好, 相关系数 $r^2$ 均大于0.990, 定量限为10 μg/kg, 在10~50 μg/kg添加水平上平均回收率在95.4%~111.2%范围内, 批内与批间相对标准偏差均小于10.1%。**结论** 该方法简便快速、结果准确、回收率高, 有效地克服了基质干扰与操作损耗对定量结果的影响, 适合大批量猪肝样品的快速定量分析。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 四环素; 内标法; 猪肝

## Determination of 4 kinds of tetracyclines residues in swine liver by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Shan-Jing\*, LU Gui-Ping, LIU Yu-Xin, QU Bin, SONG Hui-Min

(Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products, Nanjing 210036, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an analytical method for the simultaneous determination of 4 kinds of tetracyclines residues in swine liver by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with weakly acidic Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine buffer solution, followed by protein precipitation with sulfuric acid solution and sodium tungstate solution, purified with HLB solid-phase extraction column, and separated with Waters ACQUITY HSS T3 chromatographic column. Gradient elution was performed with 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile as the mobile phase, multi-reaction monitoring positive ion mode was used for determination, and internal standard method was used for quantification. **Results** The linear relationships of the 4 kinds of tetracyclines were good within the range of 5–100 ng/mL, with correlation coefficients  $r^2 > 0.990$ , and the limits of quantitation were 10 μg/kg. The average recoveries were within the range of 95.4% to 111.2% at the level of 10–50 μg/kg, and the relative standard deviations were less than 10.1% within and between batches. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and has high recovery rate, which effectively overcomes the influence of matrix interference and operation loss on quantitative results, and is suitable for rapid quantitative analysis of large quantities of swine liver samples.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; tetracycline; internal standard

\*通信作者: 刘善菁, 硕士, 兽医师, 主要研究方向为兽药残留检验检测的新技术新方法。E-mail: liushanjing\_1990@163.com

\*Corresponding author: LIU Shan-Jing, Master, Veterinarian, Jiangsu Quality Inspection and Testing Center for Animal Products, Nanjing 210036, China. E-mail: liushanjing\_1990@163.com

method; swine liver

## 0 引言

四环素类抗生素(tetracyclines, TCs)属于广谱抗生素,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌及部分厌氧菌都有很好的抗菌活性,其用途主要为:促生长、预防、治未病和治疗疾病<sup>[1-3]</sup>。由于 TCs 价格低廉,通常作为一线抗生素使用,特别是对于反刍动物和猪的疾病治疗,如:犊牛和仔猪肺炎、急性子宫感染、放线杆菌病、细菌性肠炎等<sup>[2,4]</sup>。目前 TCs 在我国畜禽养殖以及临床上使用相当广泛,甚至有滥用导致耐药现象的出现,因此需要更为强有力的监管监测手段对此类药物的使用进行有效控制。

各国政府都对 TCs 使用有严格规定。为遏制细菌耐药性,2020 年我国农业农村部发布第 194 号公告,明确规定禁止生产包括土霉素、金霉素在内的有促生长作用的药物作为饲料添加剂;GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中将四环素、土霉素、金霉素和多西环素界定为动物性食品允许使用但需制定最大限量的药物,猪肝中四环素、土霉素、金霉素单个或组合限量为 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,多西环素的限量为 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;国际食品法典、加拿大以及欧盟对猪肝中 TCs 限量分别为 600、600 和 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[1]</sup>。目前,国内外关于 TCs 残留的检测方法多种多样<sup>[5-7]</sup>: SHAHBAZI 等<sup>[8]</sup>应用酶联免疫法测定了鸡组织中 TCs 残留;KOWALSKI 等<sup>[9]</sup>应用毛细管电泳法测定了鱼组织中 TCs 残留;FENG 等<sup>[10]</sup>、EDUARDO 等<sup>[11]</sup>和 MAHBOOBEH 等<sup>[12]</sup>应用高效液相色谱法测定了动物性食品中 TCs。随着液质联用技术的飞速发展和相关行业标准的不断提高,同时可测定数十种乃至数百种化合物的多残留方法逐渐普及<sup>[13-14]</sup>,ZHANG 等<sup>[15]</sup>、MARILENA 等<sup>[16]</sup>应用液相色谱-串联质谱法测定了动物性食品中包括 TCs 在内的多种抗生素残留。在这些检测方法中,超高效液相色谱-串联质谱法<sup>[17]</sup>应用最为广泛,拥有更高的灵敏度和准确性。在 TCs 检测中,主要的难点在于提取效率不够高、回收率较低、基质复杂干扰较大。本研究在现有文献的基础上,改进了前处理与定量方法,使用 2 种同位素内标对猪肝中 4 种 TCs 进行定量,建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肝中 4 种四环素类药物残留量的分析方法,为高通量准确检测猪肝中 TCs 提供了方法依据和技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与设备

ACQUITYUPLC 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);5500Qtrap 质谱仪(美国 AB Sciex 公司);Heraeus

Multifuge X1R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);KS501 水平式振荡器、MS3 basic 涡旋混合器(德国 IKA 公司);MV5 全自动氮吹仪(美国 LabTech 公司);LINK BLOW 氮气发生器(浙江金浪科技有限公司);Oasis HLB 固相萃取净化柱(200 mg/6 mL, 美国 Waters 公司);Bond Elut C<sub>18</sub> 柱(200 mg/10 mL, 美国 Agilent 公司)。

### 1.2 试剂与材料

乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(色谱纯,美国 Anaqua Chemicals Supply 公司);一水合柠檬酸、十二水合磷酸氢二钠、二水合乙二胺四乙酸二钠、钨酸钠、盐酸、硫酸、氢氧化钠、正己烷(分析纯,南京化学试剂有限公司);0.22  $\mu\text{m}$  水相微孔滤膜(天津津腾试剂有限公司);水为实验室自制去离子水(电阻率 $>18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ )。

标准品:盐酸四环素(tetracycline, TC, 96.9%)、盐酸土霉素(oxytetracycline, OTC, 88.8%)、盐酸金霉素(chlorotetracycline, CTC, 93.5%)、盐酸多西环素(doxycycline, DC, 85.2%)(中国兽医药品监察所);盐酸四环素-d6(tetracycline-d6, TC-d6, Major)、盐酸多西环素-d3(doxycycline-d6, DC-d3, 80%)同位素内标(美国 TRC 公司)。

### 1.3 标准溶液与试剂的配制

标准储备液的配制:精密称取 4 种四环素类标准品(盐酸盐需折算成药物原型),分别于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容,制成 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存,有效期 12 个月。

内标储备液的配制:精密称取 2 种四环素类内标(盐酸盐需折算成药物原型),分别于 50 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容,制成 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  标准储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光保存,有效期 12 个月。

标准工作液的配制:精密量取 4 种四环素类储备液 1 mL 于 100 mL 量瓶中,用乙腈稀释成 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准工作液。精密量取 2 种四环素类内标储备液 10 mL 于 100 mL 量瓶中,用乙腈稀释成 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合内标工作液。

Mcllvaine 缓冲溶液(pH 4.0)的配制:取 21.01 g 一水合柠檬酸,用水溶解并定容至 1000 mL,配制成 0.1 mol/L 柠檬酸溶液。取 71.63 g 十二水合磷酸氢二钠,用水溶解并定容至 1000 mL,配制成 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液。将 1000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液和 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液混匀,用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.0。

Na<sub>2</sub>EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液的制备:取 60.5 g 二水合乙二胺四乙酸二钠加入 1625 mL Mcllvaine 缓冲溶液中,超声使其溶解,摇匀。

0.35 mol/L 硫酸溶液: 取硫酸 9.50 mL, 加入适量水中并稀释至 500 mL。

7% 钨酸钠溶液: 取钨酸钠 35 g, 用水溶解并稀释至 500 mL。

50 批猪肝样品来自江苏、甘肃、青海、广东和江西超市及农贸市场。

## 1.4 实验方法

### 1.4.1 样品前处理

提取: 称取均质后的试料(2±0.02) g 于 50 mL 离心管中, 加入 20 μL 1 μg/mL 混合内标溶液, 加入 7 mL Na<sub>2</sub>EDTA-McIlvaine 缓冲溶液、1.5 mL 0.35 mol/L 硫酸溶液、1.5 mL 7% 钨酸钠溶液, 涡旋使之充分混合, 振荡提取 15 min, 4 °C 下 10000 r/min 离心 10 min。重复上述提取操作一遍, 合并 2 次上清提取液共 20 mL。

净化: HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化, 加入 10 mL 提取液上柱, 控制流速约 1 mL/min, 待样液流完后, 依次用 5 mL 水和 5 mL 正己烷淋洗, 真空抽干 2 min。用 5 mL 甲醇洗脱, 洗脱液于 40 °C 水浴中氮气吹干, 用 1 mL 初始流动相复溶, 过 0.22 μm 水相微孔滤膜, 供超高效液相色谱-串联质谱测定, 内标法定量。为说明本法所述定量关系, 以四环素为例, 添加水平为 10 μg/kg, 假设回收率为 100% 且试样本底为零, 则依据上述前处理方法所得上机测试液中四环素理论浓度应为 10 ng/mL。

### 1.4.2 液相色谱-质谱条件

#### (1) 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLCHSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相 A: 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B: 乙腈; 梯度洗脱程序: 0~1 min 保持 10% B; 1~5 min 线性变化到 60% B; 5~5.5 min 线性变化到 80% B; 5.5~6 min 线性变化到 10% B; 6~8.5 min 保持 10% B。流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μL。

#### (2) 质谱条件

正离子模式, 电喷雾离子源(electronic spray ion, ESI+); 喷雾电压: 5500 V; 质谱扫描方式: 多反应监测(multi reaction monitor, MRM); 离子源温度: 550 °C; 气帘气: 30 psi; 辅助气 1:50 psi; 辅助气 2:50 psi。待测药物定量定性离子对及对应的去簇电压(declustering potential, DP)和碰撞能量(collison energy, CE)见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理条件的优化

TCs 易溶于水, 易与金属离子、蛋白质发生螯合作用, 通常在弱酸性环境中比较稳定, 因此应在弱酸性环境中辅助以金属离子络合剂对待测试样中的 TCs 进行提取并同时除去蛋白等干扰物。文献报道中通常采用缓冲盐体

系进行提取, 如: 柠檬酸盐、琥珀酸盐、草酸盐和磷酸盐等, 其中最为常见的提取溶液是弱酸性的 Na<sub>2</sub>EDTA - McIlvaine 缓冲溶液<sup>[9]</sup>, 此外还有用强酸溶液(如: 高氯酸、三氯乙酸)或有机试剂(如: 乙腈)提取的方案<sup>[10]</sup>。强酸溶液和有机溶液虽沉淀蛋白效果较好, 但与后续固相萃取净化过程不匹配, 且无法提取出在基质中与金属离子螯合的待测物; 而缓冲溶液体系虽提取充分, 但沉淀蛋白等干扰成分能力较弱, 本研究参考相关文献<sup>[18]</sup>, 加入硫酸溶液和钨酸钠溶液作为沉淀剂, 获得了满意的提取效果。现行国标方法 GB 21317—2007《动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法》中, 使用冰水浴对样品进行超声提取后离心(<15 °C)。实际操作过程中发现, 冰水浴操作较为烦琐且仍需后续过滤操作。本研究添加了适量沉淀剂后, 并采用 4 °C 低温离心, 获得的上清液澄清透明, 无需过滤操作即可过柱上样, 不会产生柱堵塞现象, 同时进一步减少了操作过程中由过滤造成的损耗。

表 1 四环素类化合物及其内标物定量定性离子对、去簇电压和碰撞能量

Table 1 Quantitative and qualitative ion pair, declustering potential and collision energy of tetracyclines and their internal standard

药物	母离子 ( <i>m/z</i> )	子离子 ( <i>m/z</i> )	去簇电压 /V	碰撞能 量/V	保留时间 /min
四环素	445.4	410.2*	60	26	4.08
		154.0	60	36	
土霉素	461.3	426.3*	60	25	3.91
		443.4	60	16	
金霉素	479.2	444.4*	60	26	4.52
		462.4	60	23	
多西环素	445.4	428.4*	60	25	4.61
		154.0	60	36	
四环素-d6	451.4	416.2	60	25	4.08
多西环素-d3	448.4	431.4	60	26	4.61

注: \*为定量离子。

TCs 净化方法多种多样, 文献报道中涉及 QuEChERS 法<sup>[19-20]</sup>、盐析法<sup>[21]</sup>、液液萃取法<sup>[22]</sup>、分散固相萃取法<sup>[2]</sup>、分散液液微萃取法<sup>[23]</sup>、固相萃取法<sup>[2]</sup>等。其中固相萃取法应用最为广泛, 文献中涉及的固相萃取法包括 C<sub>18</sub> 柱、HLB 柱、分子印迹固相萃取柱<sup>[2]</sup>以及快速除脂净化的 PRiME HLB<sup>[18]</sup>和 EMR Lipid<sup>[24]</sup>等。虽然分子印迹固相萃取柱可以针对 TCs 特异性保留, 从而获得满意的回收率, 但是成本

较高; 2 种快速除脂净化小柱前处理速度快但回收相对较低, 更适合大批量样品的定性筛选, 定量准确性相对较差。因此本研究比较了  $C_{18}$  与 HLB 小柱的净化效果, 结果发现, 4 种 TCs 用 HLB 小柱净化的回收率比  $C_{18}$  小柱高 5%~10%, 并且过柱速度相对更快, 不易出现柱干涸和柱堵塞现象, 因此最终选用 HLB 小柱进行净化。

## 2.2 定量方法的选择

质谱分析过程中, 样品基质中的干扰组分会对目标待测物响应产生影响, 从而产生基质增强或基质抑制效应。通常情况下, 当基质效应 <80% 或 >120%, 就应当采取一定的手段消除基质干扰对定量准确性造成的误差。

猪肝基质的复杂性一直是残留分析的难点之一。研究发现, 猪肝对 TCs 基质抑制效应明显, 4 种 TCs 基质效应在 15%~34% 之间。因此, 必须采取合适的方法补偿基质效应。基质匹配校准曲线可有效校准基质效应, 而内标法能够同时校准基质效应并补偿提取效率, 因此内标法定量的准确度以及重现性最好。

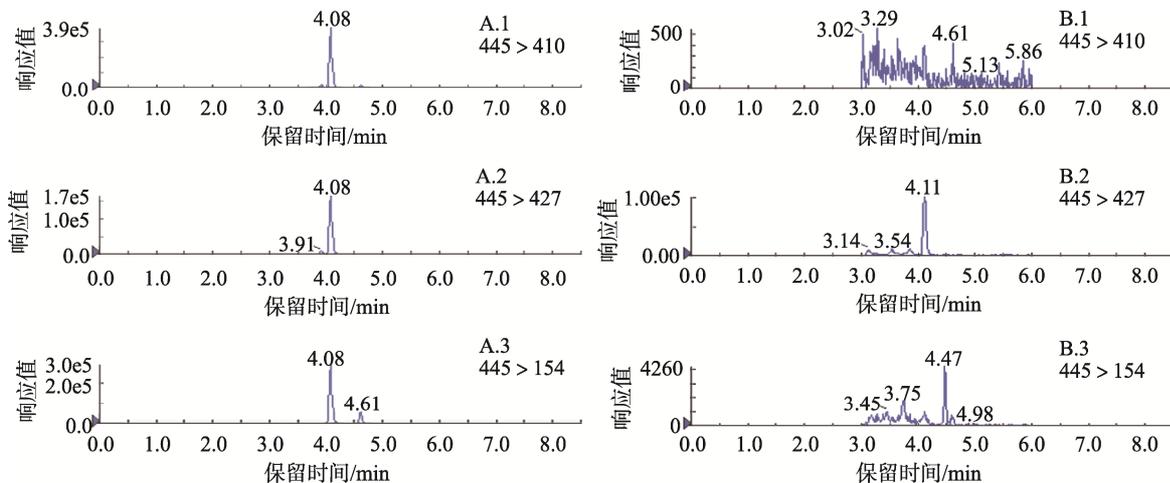
本研究分别考察了上述 2 种方法对基质效应的补偿效果。结果发现, 由于实验过程中的损失, 即使应用基质曲线进行校正, 依然不能获得满意的回收率; 并且由于猪肝基质的复杂性, 不同批次的猪肝表现出的基质抑制强度并不均一, 这可能与猪肝本身的含脂量、含水量等相关, 从而导致回收率偏差较大, 因此考虑通过内标法来对 TCs 进行校正。

通过实验发现, 四环素与土霉素保留时间仅相差 0.17 min, 金霉素与多西环素保留时间仅相差 0.09 min; 当用外标法进行计算时, 四环素与土霉素的回收率基本稳定在 50%~60% 之间, 金霉素与多西环素的回收率基本稳定在 20%~30% 之间。这一结果表明, 四环素与土霉素 2 种药

物的保留行为较为相似; 而金霉素与多西环素较为相似, 因此可以采用一种内标用于校正四环素与土霉素, 另一种内标校正金霉素与多西环素, 既可以获得满意的实验结果, 又可以节约实验成本。本研究最终选择了 2 种同位素内标校正 4 种 TCs: 四环素-d6 对四环素和土霉素进行校正, 多西环素-d3 对金霉素和多西环素进行校正, 4 种四环素类化合物在相应内标物的校正下均获得了超过 90% 回收率, 显著提高了定量准确性, 获得了满意的结果。

## 2.3 定性离子的选择

GB 21317—2007 中, 四环素定量定性离子分别为:  $445>410$ ;  $445>427$ 。实际检测过程中发现, 某些猪肝基质会在定性离子  $445>427$  保留时间附近产生一个响应很强的干扰峰, 完全掩盖了四环素定性离子, 导致离子丰度比失真, 只能依靠定量离子  $445>410$  进行定性判断以及定量, 因此需要更为合适的离子作为定性离子。经过质谱条件优化与筛查, 最终选择了  $445>154$  作为新的定性离子, 虽然与同分异构体多西环素的定性离子分子量相同, 但完全可以依靠保留时间进行区分。当选择  $445>410$ 、 $445>154$  作为四环素定量、定性离子时, 阳性添加样品保留时间与离子丰度比均与标准溶液一致, 从而避免了原定性离子干扰峰的存在对结果判定造成的影响。如图 1 所示: 图 1A 为四环素标准溶液中  $445>410$ 、 $445>427$  和  $445>154$  3 组离子对的色谱图, 图 1B 为一阴性猪肝样品对应的 3 组离子对色谱图。由图 1 可以看出, 四环素出峰时间为 4.08 min, 阴性样品的  $445>427$  离子对在 4.11 min 处有一个明显的干扰峰, 仅相差 0.03 min, 而  $445>154$  和定量离子对  $445>410$  则没有此干扰峰, 相隔如此近的干扰峰容易造成误判, 导致假阳性结果, 因此选择  $445>154$  作为新的定性离子很有必要。



注: A. 标准溶液; B. 阴性猪肝样品。

图 1 四环素定性定量离子比较

Fig.1 Comparison of qualitative and quantitative ions of tetracyclines

## 2.4 方法学验证

### 2.4.1 标准曲线与线性范围

分别准确吸取 1.3 中混合标准工作液(1  $\mu\text{g/mL}$ )50、100、200、500、1000  $\mu\text{L}$  于 10 mL 容量瓶中, 加入 200  $\mu\text{L}$  混合内标工作液(1  $\mu\text{g/mL}$ ), 用初始流动相稀释并定容至刻度, 混匀, 配制成内标质量浓度为 20  $\text{ng/mL}$ 、外标质量浓度为 5、10、20、50、100  $\text{ng/mL}$  的系列标准工作溶液。

以待测物特征离子质量色谱峰面积与对应内标物特征离子质量色谱峰面积的比值为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 内标法进行校准定量(四环素和土霉素以四环素-d6 为内标, 金霉素和多西环素以多西环素-d3 为内标), 绘制标准曲线, 并计算回归方程和相关系数。相应的标准曲线、线性范围、线性回归方程及相关系数( $r^2$ )见表 2。结果表明: 四环素、土霉素、金霉素和多西环素在各自线性范围内, 线性关系良好,  $r^2$  均大于 0.990。

### 2.4.2 方法的检出限和定量限

采用空白猪肝基质加标的方法制备一系列已知低浓度的猪肝样品, 并通过比较其与空白样品的信号, 用以评价方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)。当信噪比  $S/N > 3$  和信噪比  $S/N > 10$  时, 对应的加标水平分别作为方法的检出限和定量限。于

空白猪肝样品中添加四环素混合标准工作液, 制备成加标水平分别为 1、2、5 和 10  $\mu\text{g/kg}$  的空白加标样品, 前处理后上机测定, 结果发现, 当加标水平为 5  $\mu\text{g/kg}$  时, 测得四环素、土霉素、金霉素和多西环素的信噪比均大于 3; 当加标水平为 10  $\mu\text{g/kg}$  时, 测得四环素、土霉素、金霉素和多西环素的信噪比均大于 10。因此, 确定本方法猪肝中 4 种四环素类化合物的检出限为 5  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 10  $\mu\text{g/kg}$ 。

### 2.4.3 方法的准确度和精密度

采用标准添加法考察, 分别向空白猪肝中添加 3 个不同水平(定量限、2 倍定量限、5 倍定量限)的 TCs 混合标准工作液进行回收率实验, 各浓度进行 5 个加标样品平行实验, 分别考察 3 批次, 按照 1.4.1 样品前处理方法处理后上机测定, 内标法定量, 计算回收率, 并用相对标准偏差值(relative standard deviation, RSD)评价批内和批间精密度。空白猪肝样品的色谱图见图 2, 阳性添加(添加量为 10  $\mu\text{g/kg}$ )色谱图见图 3。

结果表明, 猪肝中四环素、土霉素、金霉素和多西环素在 10、20、50  $\mu\text{g/kg}$  3 个添加水平上的回收率在 95.4%~111.2% 范围内, 批内与批间 RSD 均小于 10.1%, 符合定量分析方法的要求。结果见表 3。

表 2 四环素类药物线性范围、标准曲线、相关系数、定量限和检测限

目标化合物	线性范围/(ng/mL)	标准曲线回归方程	相关系数( $r^2$ )	定量限/( $\mu\text{g/kg}$ )	检测限/( $\mu\text{g/kg}$ )
四环素	5~100	$Y=0.0790X+0.00522$	0.999	10	5
土霉素	5~100	$Y=0.0774X-0.0378$	0.999	10	5
金霉素	5~100	$Y=0.0134X-0.0157$	0.996	10	5
多西环素	5~100	$Y=0.0496X-0.0383$	0.995	10	5

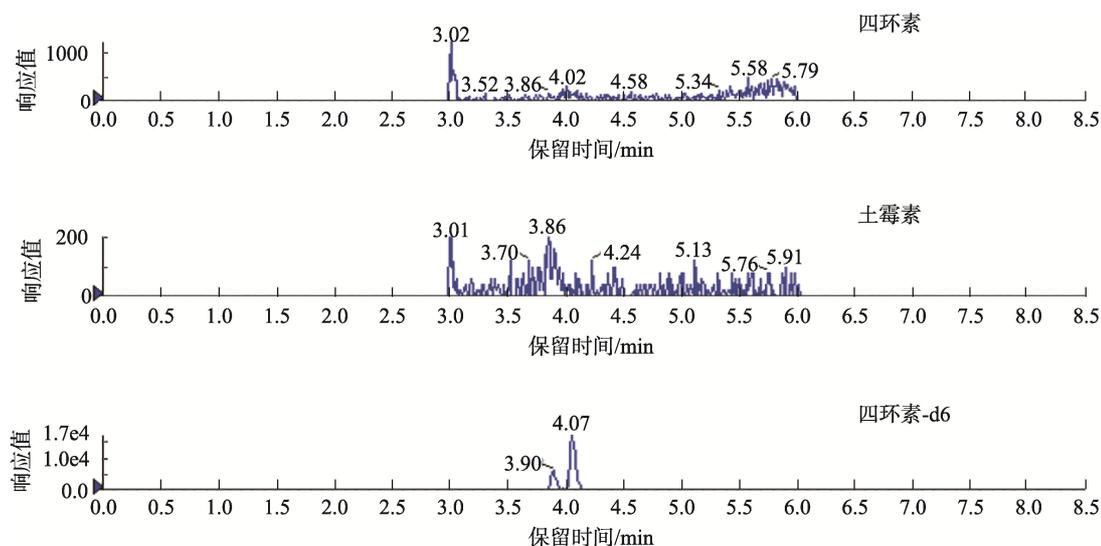


图 2 空白猪肝样品中四环素类药物的色谱图

Fig.2 Chromatogram of tetracyclines in blank swine liver samples

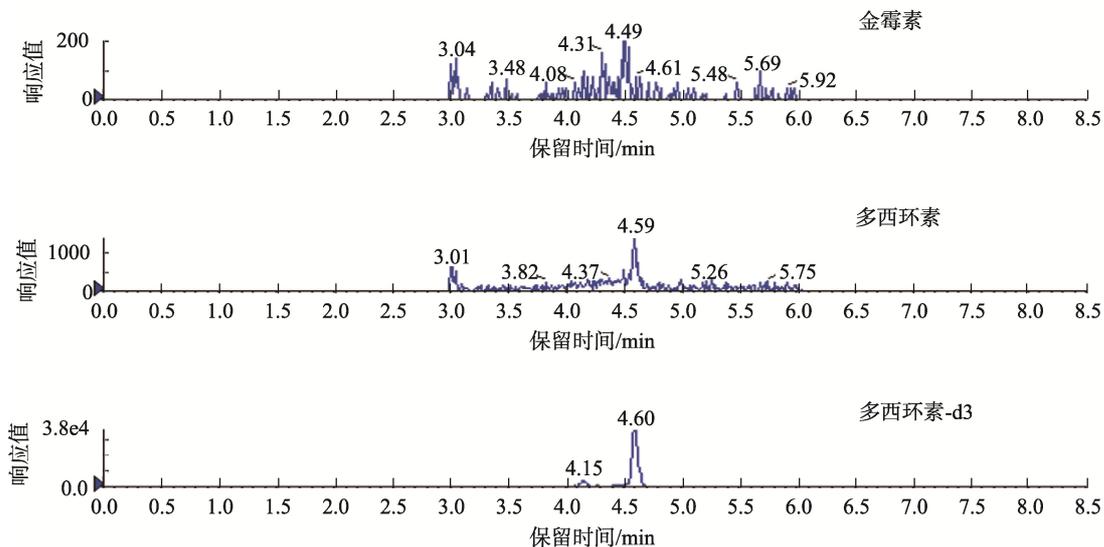


图 2(续) 空白猪肝样品中四环素类药物的色谱图  
Fig.2 Chromatogram of tetracyclines in blank swine liver samples

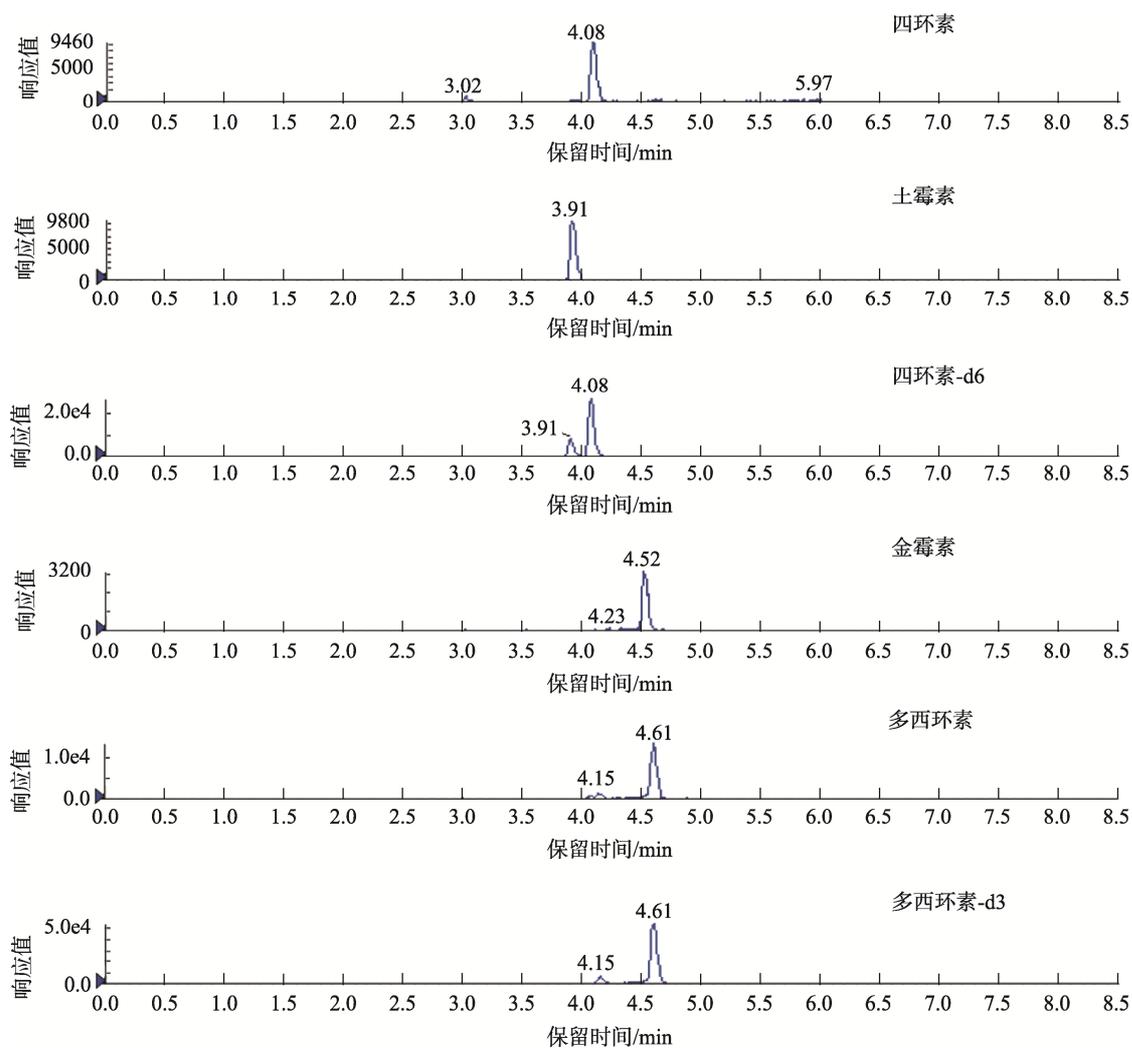


图 3 空白猪肝添加四环素类药物色谱图(10 µg/kg)  
Fig.3 Chromatogram of blank swine liver supplemented with tetracyclines (10 µg/kg)

## 2.5 实际样品分析

应用本研究建立的方法对来自江苏、甘肃、青海、广东和江西超市及农贸市场的 50 批猪肝样品进行了检测。其中金霉素检出 4 批, 样品含量在 12.6~52.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间; 多西环素检出 12 批, 样品含量在 23.4~128.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间, 四

环素和土霉素未检出, 实际样品色谱图见图 4、5, 图 4 为检出金霉素的猪肝样品, 图 5 为检出多西环素的猪肝样品。GB 31650—2019 中, 规定猪肝中多西环素的限量为 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 四环素、土霉素和金霉素单个或组合限量为 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本文涉及的 50 批猪肝样品均符合国家限量规定。

表 3 空白猪肝中四环素类药物的添加回收率( $n=5$ )  
Table 3 Recoveries of tetracyclines in swine liver spiked samples ( $n=5$ )

化合物	添加水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	批次						批间 RSD/%
		I		II		III		
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	
四环素	10	106.4	7.2	101.0	8.2	103.2	7.4	7.4
	20	105.6	6.1	98.4	6.9	99.4	2.9	6.1
	50	101.0	4.6	105.4	2.5	111.2	1.5	5.0
土霉素	10	101.1	6.1	95.4	8.2	104.8	6.9	7.7
	20	96.8	8.3	103.2	8.4	103.2	8.1	8.3
	50	106.0	5.0	103.4	7.6	102.8	6.8	6.2
金霉素	10	106.2	7.6	106.2	5.9	101.6	7.5	6.9
	20	99.2	10.1	105.6	5.5	106.2	6.4	7.6
	50	101.4	3.2	104.0	7.8	102.6	6.8	5.9
多西环素	10	99.2	5.2	99.8	8.7	96.6	4.7	6.2
	20	97.8	5.2	98.6	5.6	100.6	6.4	5.5
	50	98.2	5.4	98.4	8.1	100.4	5.7	6.4

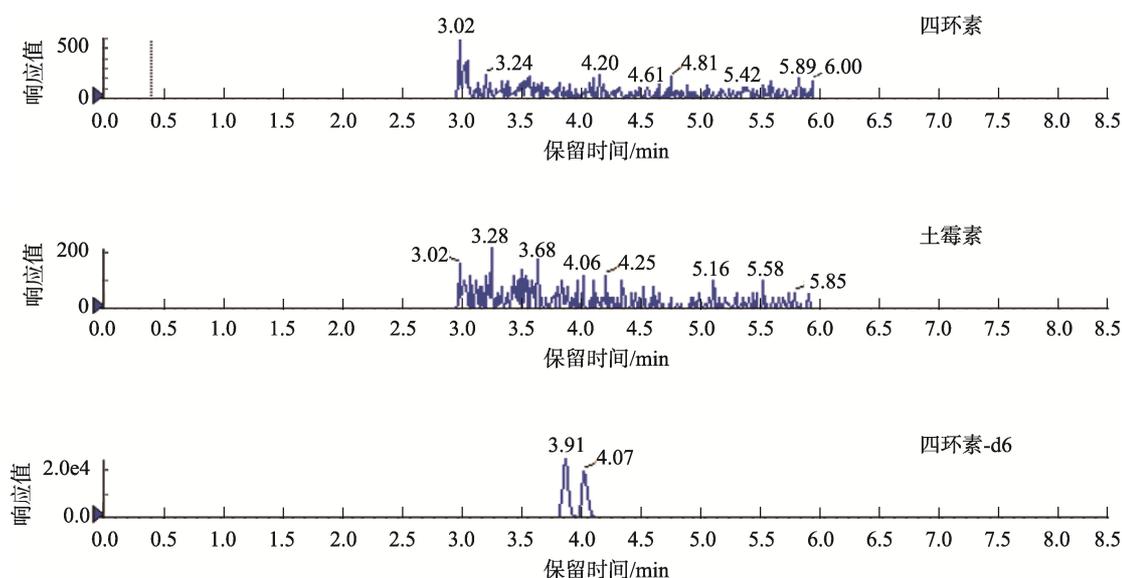


图 4 检出金霉素的猪肝样品色谱图

Fig.4 Chromatogram of swine liver samples with chlortetracycline detected

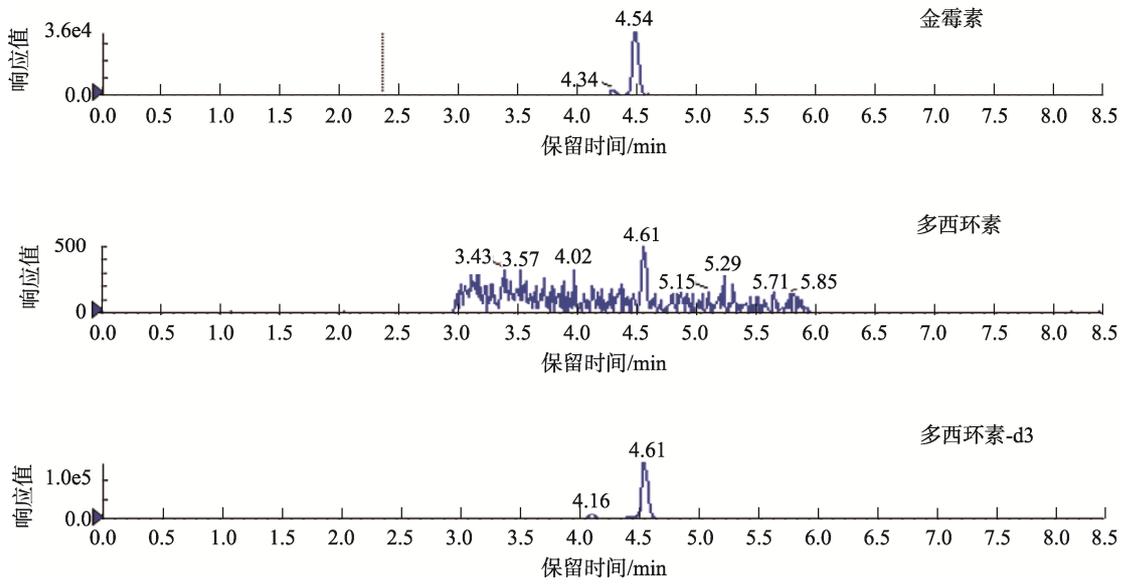


图 4(续) 检出金霉素的猪肝样品色谱图  
Fig.4 Chromatogram of swine liver samples with chlortetracycline detected

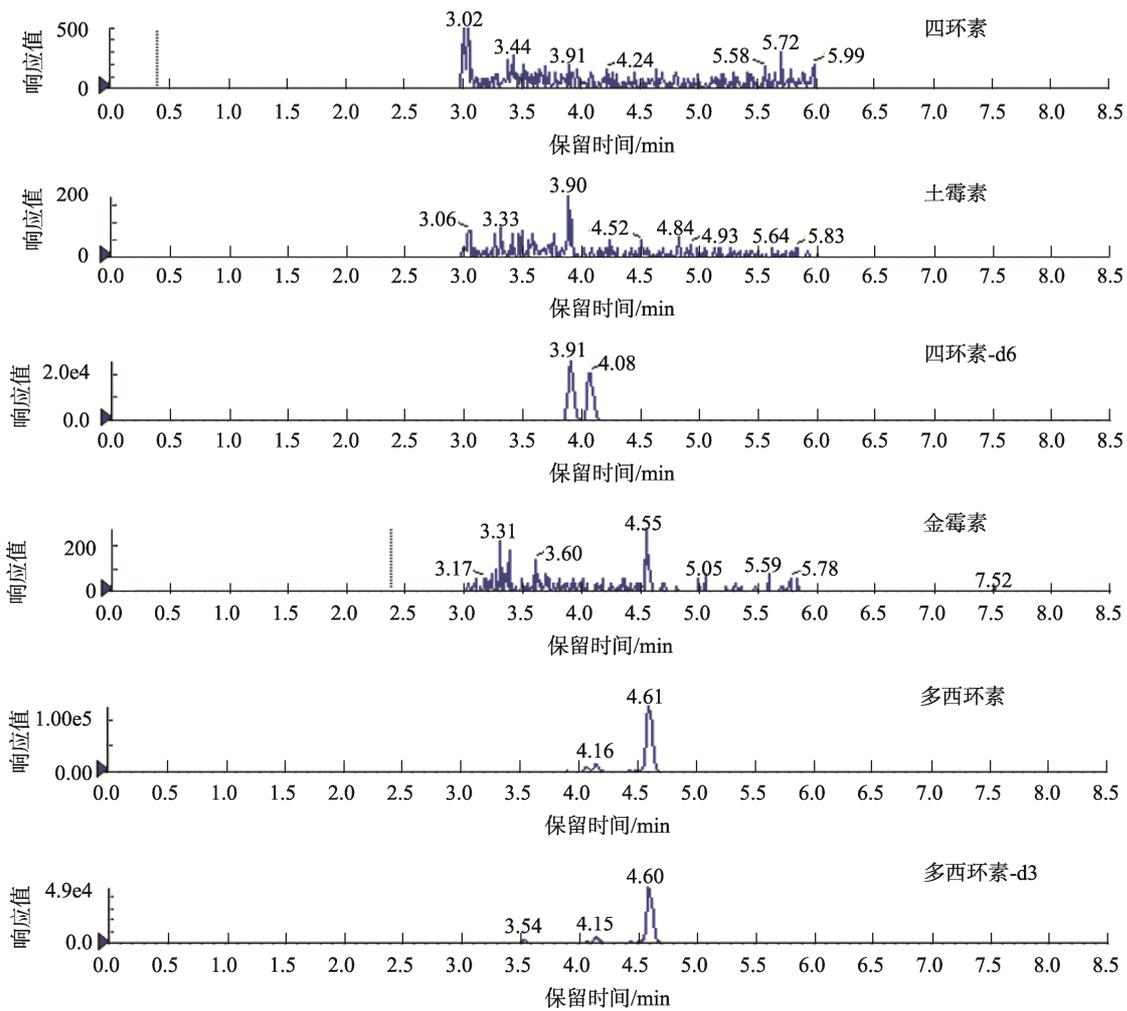


图 5 检出多西环素的猪肝样品色谱图  
Fig.5 Chromatogram of swine liver samples with doxycycline detected

### 3 结 论

本研究通过对提取溶液、净化方式、离子选择以及定量方法的优化,建立了简单高效的超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肝中 4 种四环素类药物的方法。前处理方法简单,首次应用 2 种同位素内标对猪肝基质中四环素类药物残留进行定量,结果准确,回收率超过 90%,相比原国标方法显著提高定量准确性,有效避免了基质抑制与操作环节损失对定量结果准确性的影响,解决了原国标方法离子选择上可能由于某些特殊基质造成的假阳性现象,成本合理可控,适合大批量猪肝样品的快速定量分析。

### 参考文献

- [1] RODRÍGUEZ MP, PELLERANO RG, PEZZA L, *et al.* An overview of the main foodstuff sample preparation technologies fortetracycline residue determination [J]. *Talanta*, 2018, 182(5): 1–21.
- [2] 于康震, 沈建忠. 食品中抗菌药物残留的化学分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.  
YU KZ, SHEN JZ. Chemical analysis of antibiotic residues in food [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018.
- [3] JUN C, GUANG GY, WEN JD. Antibiotic residues in food: extraction, analysis, and human health concerns [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(27): 7569–7586.
- [4] DUBRELL E, MOMPÉLAT S, KROMER V, *et al.* Dye residues in aquaculture products: Targeted and metabolomics mass spectrometric approaches to track their abuse [J]. *Food Chem*, 2019, 294(10): 355–367.
- [5] CASTILLA FD, MORENO GD, BENEITO CM, *et al.* Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(1): 1433–1442.
- [6] BEIBEI W, XU Z, LI JC, *et al.* Functionalized persistent luminescence nanoparticle-based aptasensor for autofluorescence-free determination of tetracyclines in food samples [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(4): 2589–2595.
- [7] WEI F, XIAOYUE G, MINGWU Z, *et al.* Development and evaluation of a preliminary screening assay for antibiotic residues in meat [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2021, 193(7): 1129–1146.
- [8] SHAHBAZI Y, AHMADI F, KARAMI N. Screening, determination and confirmation of tetracycline residues in chicken tissues using four-plate test, ELISA and HPLC-UV methods: Comparison between correlation results [J]. *Food Agric Immunol*, 2015, 26(2): 821–834.
- [9] KOWALSKI P. Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 47(1): 487–493.
- [10] FENG MX, WANG GN, YANG K, *et al.* Molecularly imprinted polymer-high performance liquid chromatography for the determination of tetracycline drugs in animal derived foods [J]. *Food Control*, 2016, 69(6): 171–176.
- [11] EDUARDO AO, ANA VS. Extraction of tetracycline antibiotic residues from fish filet: Comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1307(9): 111–118.
- [12] MAHBOOBEH H, MEHDI R, AHMAD A. Variation in bioactive compounds, antioxidant and antibacterial activity of Iranian *Chrysanthemum morifolium* cultivars and determination of major polyphenolic compounds based on HPLC analysis [J]. *J Food Sci Technol*, 2021, 58(6): 1538–1548.
- [13] TURNIPSEED SB, STOREY JM, WU IL, *et al.* Extended liquid chromatography high-resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug, pesticides and human pharmaceutical residues in aquaculture fish [J]. *Food Addit Contam*, 2019, 36(3): 1501–1514.
- [14] WANG J, LEUNG D, CHOW W, *et al.* Target screening of 105 veterinary drug residues in milk using UHPLC/ESI Q-orbitrap multiplexing data independent acquisition [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(2): 5373–5389.
- [15] ZHANG Z, LI X, DING S, *et al.* Multiresidue analysis of sulfonamides, quinolones, and tetracyclines in animal tissues by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2016, 204(8): 252–262.
- [16] MARILENA ED, NIKOLAOS ST. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 672(1–2): 93–102.
- [17] YAN Z, LIXIA F, YANJIE D, *et al.* Determination of sulfonamide residues in livestock and poultry manure using carbon nanotube extraction combined with UPLC-MS/MS [J]. *Food Anal Method*, 2021, 14(6): 641–652.
- [18] 张婧, 潘娟, 严凤, 等. 基于 PRiME HLB 前处理技术的鸡蛋中四环素类药物的快速筛选方法研究[J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52(3): 52–57.  
ZHANG J, PAN J, YAN F, *et al.* PRiME HLB based effective screening method for tetracyclines in eggs [J]. *Chin J Vet Drug*, 2018, 52(3): 52–57.
- [19] ÁNGEL GM, DAVID MG, FRANCISCO JA, *et al.* Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS [J]. *J Pham Biomed Anal*, 2018, 155(6): 27–32.
- [20] PENA HN, MONTEMURRO N, BARCELO D. Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system [J]. *Talanta*, 2019, 199(7): 370–379.
- [21] DAVID MG, ANA MG. Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2017, 221(4): 1763–1769.
- [22] LEHOTAY SJ, LIGHTFIELD AR. Extract-and-inject analysis of veterinary drug residues in catfish and ready-to-eat meats by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J AOAC Int*, 2020, 103(2): 584–606.
- [23] MOOKANTSASO, DUBE S, NINDI MM. Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2016, 148(2): 321–328.
- [24] KHEDR T, RYAD L, YOUSSEF AO. Testing the validity of reference standard materials and stock solutions of veterinary drugs using LC-MS/MS [J]. *Food Addit Contam*, 2019, 36(3): 405–412.

(责任编辑: 张晓寒)

### 作者简介



刘善菁, 硕士, 兽医师, 主要研究方向为兽药残留检验检测的新技术新方法。  
E-mail: liushanjing\_1990@163.com