

# ProElut PLS-A 联合 UPLC-MSMS 法测定能力验证

## 动物源性食品中多种兽药残留

肖献国

(长沙市农产品质量监测中心, 湖南 长沙 410003)

**摘要:** 建立一种通用的超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品中多种兽药残留的分析方法。采用含 0.2% 甲酸的 80% 乙腈水溶液添加陶瓷均质子快速提取动物源性食品中药物残留, ProElut PLS-A 固相萃取柱通过式净化, 40°C 氮吹至近干, 用 0.1% 甲酸水: 甲醇( $v/v = 9/1$ )复溶并定容, 采用超高效液相色谱-串联质谱仪多反应监测正离子模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行测定。结果显示以内标法定量, 14 种兽药定量限为 0.5~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 在空白样品中 3 个不同添加水平下, 平均回收率内标法为 88.1%~118.0%, RSD 为 0.8%~9.6%, 外标法添加回收率为 75.2%~115.3%, RSD 为 2.6%~11.2%, 准确度和精密度都符合 NY/T 1896-2010 标准要求。采用本研究分析方法同时参加四项不同基质、不同种类药物残留的能力验证, 所有结果都靠近添加回收率范围的中位, 令人满意。该方法简单可靠, 快速, 灵敏度高。可高效筛查动物源性食品中潜在兽药残留, 也可应用于实际样品检测。

**关键词:** ProElut PLS-A 净化;超高效液相色谱-串联质谱;能力验证;动物源性食品;多种兽药残留

## ProElut PLS-A combined with UPLC-MSMS method for the determination of multiple veterinary drug residues in food of animal origin

Xiao Xianguo

(Changsha Agricultural Products Quality Monitoring Center, Changsha 410003, China)

**Abstract:** Objective To develop a universal High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple veterinary drug residues in foods of animal origin. Methods Using 80% acetonitrile aqueous solution containing 0.2% formic acid and adding ceramic homoprotions to rapidly extract drug residues from animal-derived food, The

ProElut PLS-A solid phase extraction column was purified by formula and 40°C nitrogen was blown to near-dry state, The solution was redissolved with 0.1% formic acid water : methanol (V/V = 9/1) , The High-performance liquid chromatography was determined by ( multiple reaction monitoring,MRM ) . **Results** The quantitative limits of 14 kinds of veterinary drugs were 0.5-2.0 µg/kg by internal standard method, The average recoveries were 88.1% ~ 118.0% , RSD 0.8% ~ 9.6% by internal standard method, 75.2% ~ 115.3% , RSD 2.6% ~ 11.2% by external standard method, respectively, Accuracy and precision meet the requirements of the NY/T 1896 -2010 standard. The method of this study was used to verify the ability of four different kinds of drug residues in different substrates. All the results were close to the median of the recovery range. Conclusion The method is simple, reliable, fast and sensitive. It can effectively screen potential veterinary drug residues in food of animal origin, and can also be used in the detection of actual samples.

**Keywords:** ProElut PLS-A purification; High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; capability verification; food of animal origin; multiple veterinary drug residues

## 1 引言

兽药残留是指“兽药在动物源食品中药物残留”的简称，畜禽机体在用药后积蓄或存留在体内的原型药物或其代谢产物，一般规定其可食用部分的药物残留。近年来，在畜牧养殖、渔业生产等过程中存在一定的滥用、误用兽药现象，因为它们不会随食品加工而消失，其中一些兽药可以通过食物链的积累和生物自身代谢残存下来，如果超过一定程度，会对人体健康造成严重损害<sup>[1,2]</sup>，或对人体产生耐药性或过敏反应等副作用。而由兽药残留问题造成的技术性贸易壁垒也给实验室检测工作的带来了新的挑战和要求<sup>[3,4]</sup>。

实验室能力验证，是指利用实验室间指定检测数据的比对，确定实验室从事特定测试活动的技术能力，是对检测机构资质认定工作和农产品质量安全检测机构考核工作有效性的后续监督的重要措施<sup>[5,6]</sup>。近年来，越来越受到监督管理部门的重视。同时，检验检测机构为了促进自身的发展，也越来越多地主动寻求能力验证和能力比对的机会<sup>[7]</sup>。本中心实验室已连续两年参加了由农业农村部 and 湖南省农业农村厅组织的动物源性食品兽药残留的能力验证，均获得了满意的结果。在实际检测工作中，同一个检测项目相关的检测标准较多，涉及的前处理方法和所用仪器设备均有差异，需要根据检测目的和要求选择使用<sup>[8]</sup>。为了解决兽药残

留检测中由于标准方法理解不到位和操作熟练程度较低,出现检验结果有偏差的问题,我们根据《能力验证作业指导书》<sup>[9,10]</sup>和日常畜禽水产品中兽药残留检测经验及相关文献,结合国家检验标准方法进行实验,通过优化前处理方法和仪器条件,同时测定多类兽药残留量。旨在为高效识别样品中潜在兽药,评价动物源食品的整体安全性提供重要的技术手段<sup>[11,12]</sup>。同时,本文对2020年参加的农业农村部畜禽类产品中氟喹诺酮类药物和 $\beta$ -受体激动剂残留检测能力验证以及农业农村部水产品中氟喹诺酮类药物和湖南省农业农村厅水产品中孔雀石绿残留检测能力验证的实验过程及结果进行分析,希望为同类食品质检机构提高动物源性食品中兽药残留的检测能力和能力验证整体水平提供参考。

## 2 材料与amp;方法

### 2.1 样品

样品由能力验证组织机构提供,本次畜禽产品中兽药和违禁添加物残留检测能力验证每个项目提供2个平行双样,均为空白添加样品,不提供空白样品。 $\beta$ -受体激动剂项目为牛肉样品,每个牛肉样品2.00g,编号为 $\beta$ 58;氟喹诺酮类药物项目为鸡肉样品,每个鸡肉样品2.00g,编号为F58。水产品中氟喹诺酮类药物项目样品为鲤鱼肉,样品、空白各约30g,编号为F25。水产品中孔雀石绿项目样品为草鱼肉,样品、空白各约30g,编号为SYZ20\_K9。所有样品均为塑料瓶包装,常温运输,-18℃保存。

### 2.2 试剂与amp;仪器

诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、培氟沙星、洛美沙星、达氟沙星、沙拉沙星、克伦特罗、沙丁胺醇、莱克多巴胺、氯丙那林、孔雀石绿、隐色孔雀石绿以及所有内标(纯度均 $\geq$ 95%,德国Dr. Ehrenstorfer公司);甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯,德国默克公司);实验室用水(实验室一级水);固相萃取柱(ProElut PLS-A 6 mL)(迪马科技有限公司);ProMax醋酸纤维素针头式过滤器 13mm 0.22 $\mu$ m CA(迪马科技有限公司);QuEChERS陶瓷均质子(迪马科技有限公司);超声仪(中国昆山超声仪器有限公司);电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司),感量0.1 mg;Vortex3涡旋仪(德国IKA公司);CF5RE离心机(日本日立公司);N-EVAP-12氮吹仪(美国Orngnamation公司);UPLC-Hclass-TQD液相色谱串联质谱仪(美国沃特世公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 标准溶液配制

(1) 标准储备液的配制:分别准确称取适量的标准品,用甲醇溶解并定容,难溶解的

添加适量甲酸并超声助溶，配置成 1.0 mg/mL 的标准储备液，于-18℃冰箱中避光保存。有效期半年。

(2) 混合标准中间液（1μg/mL）的配制：分别准确移取标准储备液各 0.1 mL，用甲醇定容至 100ml，4℃下避光保存。有效期一个月。

(3) 混合标准工作液的配制：根据实验需要,用 0.1%甲酸水：甲醇（v/v=9/1）配制适宜浓度的标准工作液，现用现配。

内标的标准储备液、混合标准中间液配制方法相同，混合标准工作液各类兽药只配一个浓度。

### 2.3.2 样品前处理

准确称取样品(2±0.05) g, 于 50 mL 离心管中, 加入适量内标混合标准中间液(1μg/mL) 涡旋混匀, 先加一粒陶瓷均质子, 再加入 8 mL 含 0.2%甲酸的 80%乙腈水溶液提取, 涡旋 30 s, 超声 10 min, 10000 r/min 低温 (5℃) 离心 5 min, 取上清液 5mL 直接过固相萃取柱 (ProElut PLS-A 6 mL), 收集滤过液, 再准确量取 4.0 mL 样液, 40℃氮吹至近干, 用 0.1%甲酸水：甲醇 (v/v=9/1) 复溶并定容至 1.0 mL, 过 0.22μm 滤膜, 待上机检测。

### 2.3.3 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 40℃; 流速: 0.25mL/min; 进样量: 2 μL; 流动相 A (0.1%甲酸水) 与 B (0.1%甲酸甲醇) 梯度洗脱, 梯度洗脱程序如表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution procedure

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	Curve
起始	0.25	98	2	起始
0.5	0.25	98	2	6
8.0	0.25	2	98	6
10.5	0.25	2	98	6
13.5	0.25	98	2	1
17	0.25	98	2	6

### 2.3.4 质谱条件

电喷雾离子 (ESI+) 源正离子模式, 多反应监测 (MRM); 毛细管电压: 1.5 kV; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂气温度: 450 °C; 脱溶剂气流速度: 750 L/h; 锥孔气: 150 L/h; 碰撞气流速: 0.12 mL/min。各化合物母离子、定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量, 见表 2。

**表 2 母离子、定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量**

**Table 2 parent ion, qualitative and quantitative ion pairs and corresponding hole voltage and collision**

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	energy	
			锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
诺氟沙星	320.2	302.2*, 276.2	35	20,15
环丙沙星	332.2	314.2*, 288.2	37	20,15
培氟沙星	334.2	290.2*, 233.2	37	20,25
洛美沙星	352.1	265.1*, 308.1	40	25,15
恩诺沙星	360.3	342.3*, 316.3	40	20,20
氧氟沙星	362.2	318.2*, 261.2	40	15,25
达氟沙星	358.1	340.2*, 283.1	40	25,25
沙拉沙星	386.1	342.1*, 299.1	40	18,25
克伦特罗	277	203*, 259.1	23	15,10
沙丁胺醇	240.2	148*, 222.1	25	20,10
莱克多巴胺	302	164*, 107	25	15,30
氯丙那林	214.1	154*, 196.1	25	18,10
孔雀石绿	329.2	313.2*, 208.1	62	35,35
隐色孔雀石绿	331.1	316.1*, 239.1	47	20,32
诺氟沙星-D5	325.2	307.2*, 281.2	35	20,15
环丙沙星-D8	340.2	322.2*, 296.2	37	20,15
培氟沙星-D5	339.2	295.2*, 238.1	35	18,25
洛美沙星-D5	357.1	270.2*, 313.2	40	25,17
恩诺沙星-D5	365.3	347.3*, 321.3	40	20,20

氧氟沙星-D3	365.2	321.2*, 261.2	38	20,28
达氟沙星-D3	361.2	343.2*, 283.1	40	25,25
沙拉沙星-D8	394.2	350.2*, 303.2	40	20,25
克伦特罗-D9	286.1	204*, 268	23	15,10
沙丁胺醇-D3	243.1	151.1*, 225.2	23	20,10
莱克多巴胺-D6	308.2	168.1*, 107	30	15,30
氯丙那林-D7	221.1	155*, 203.1	25	18,12
孔雀石绿-D5	334.2	318.2*, 213.2	67	37,35
隐色孔雀石绿-D6	337.1	322.2*, 240.1	48	20,32

注：\* 为定量离子

### 2.3.5 样品检测

氟喹诺酮项目混合标准工作液配制为 1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、120.0 $\mu\text{g/L}$ ，内标物混标浓度为 40.0 $\mu\text{g/L}$ ； $\beta$ -受体激动剂项目、孔雀石绿项目混合标准工作液配制为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{g/L}$ ，内标物混标浓度为 4.0 $\mu\text{g/L}$ ；内标法绘制标准工作曲线，测试样品后，内标法定量。同时采用空白基质（市场上购买）配制相应标准曲线，测试样品后，外标法定量。每个样品进行 3 次重复测定。

## 3 结果与分析

### 3.1 提取液的选择及优化

乙腈被广泛作为优选有机溶剂，其具有沉淀蛋白的能力，并能提供杂质较少的提取液<sup>[13]</sup>。为了最大限度提取不同种类的兽药，实验中使用甲酸酸化的乙腈溶液提取目标化合物。由于过高的甲酸添加量会对磺胺类等化合物回收率有影响，故本实验中选取添加 0.2% 的甲酸于提取液中，实验设定含 0.2% 甲酸的 90% 乙腈水、含 0.2% 甲酸的 80% 乙腈水、含 0.2% 甲酸的 70% 乙腈水 3 种提取液，比较其对各类目标化合物的平均回收率的影响，发现含 0.2% 甲酸的 80% 乙腈水最为合适，回收率（75-120%）高也利于后续净化过柱和氮吹<sup>[14]</sup>。本实验在样品前处理中添加陶瓷均质子涡旋 30s，相比较传统的 QuEChERS 提取方法要求剧烈振摇样品 1 分钟，解决了动物源性样品遇酸化乙腈易结块而可能会引发均一性和回收率不佳的情况。本实验证明了在样品提取过程中，加入均质子，有利于样品萃取过程的均匀性，提高检测化合物的回收率（外标法定量回收率平均提高了 10% 左右）。如图 1 所示。

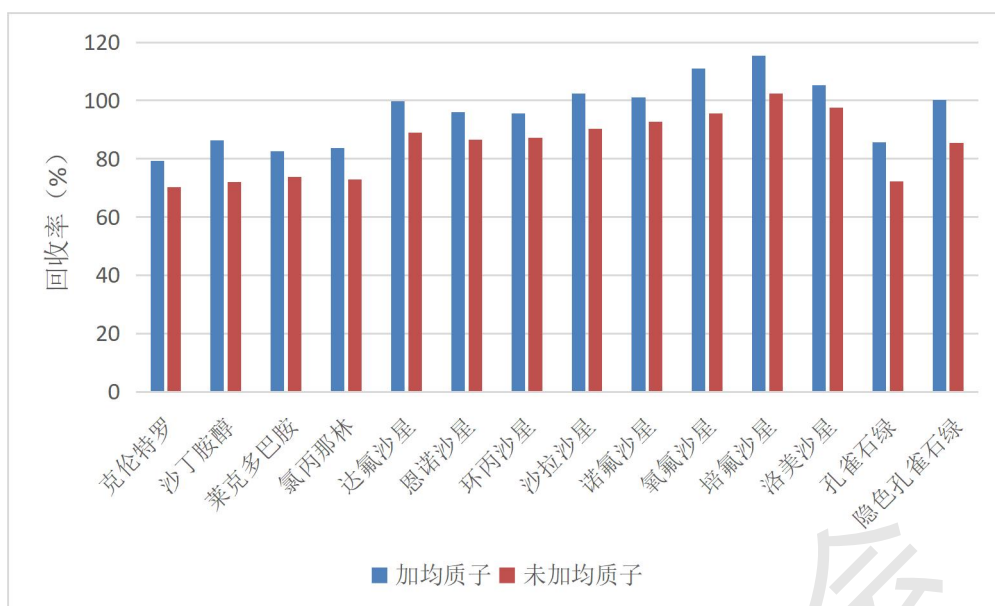


图1 添加均质子对外标法定量回收率的影响

Fig. 1 effect of adding homogeneous protons on external standard quantitative recovery

### 3.2 净化方式的选择

动物源样品基质较为复杂,大量存在于动物源性样品中的磷脂,干扰部分化合物分析定量,影响色谱柱寿命及仪器维护成本<sup>[15]</sup>。本实验使用了新型材料的固相萃取柱(ProElut PLS-A 6 mL)净化样品,能有效去除磷脂等干扰杂质。同时,采用通过式净化策略能极大提高样品分析通量,并且经过特殊设计的ProElut PLS-A流速更快且不容易被堵,净化时间由30 min缩短至3min,也极大的提高了效率。经测试,样品经ProElut PLS-A净化后14种兽药残留回收率(外标法)均不低于75%,

### 3.3 仪器条件的优化

#### 3.3.1 色谱柱的选择

本实验对比了ACQUITYUPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)两种反相色谱柱的分离效果,发现HSS T3色谱柱可以有效分离以上14种化合物,且具有更好的高水相及酸碱的耐受性。因此选用此款色谱柱进行检测分析。

#### 3.3.2 流动相的选择

有文献表明向流动相中加入甲酸可促进正离子模式下目标化合物的电离,增强响应信号<sup>[14-15]</sup>。实验中设计了两种流动相体系0.1%甲酸甲醇-0.1%甲酸水,0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水与不加甲酸的体系比较。结果发现加甲酸的两种体系灵敏度和分辨率提高、响应值提高,但两种体系间无显著差异。0.1%甲酸甲醇-0.1%甲酸水体系峰型无拖尾且对称,分离

效果也好，作为本实验流动相的最终选择。

### 3.3.3 质谱条件的选择

为获得最佳质谱条件以保证定性定量的准确性,实验前预实验中先对仪器质量轴进行了校正。并对比了不同毛细管电压、离子源温度、脱溶剂气温度、锥孔气流速等仪器条件对目标化合物响应值的影响,发现毛细管电压: 1.5 kV; 离子源温度: 120 °C; 脱溶剂气温度: 450 °C; 脱溶剂气流速度: 750 L/h; 锥孔气流速: 150 L/h; 碰撞气流速: 0.12 mL/min 最为理想。最终保存为仪器方法。本实验逐一使用单个标准品进样调手动谐优化质谱参数,最终确定母离子质荷比及锥孔电压,各子离子质荷比以及碰撞能量,选择离子丰度较高、无干扰的子离子作为目标化合物的定量离子和定性离子。同位素内标的定量离子与外标物的定量离子尽量做到相同。详见表 2。

## 3.4 检测方法的选择

近年来,动物源性食品中超痕量兽残检测方法的研究逐渐发展为 2 个方面,一是通过建立快速处理样品前处理技术,节约样品分析时间和成本;二是提高样品痕量检测的灵敏度及建立多残留同步检测方法<sup>[16]</sup>。本次能力验证四个项目分别推荐参考 4 个国家标准<sup>[17-20]</sup>, 4 个国家标准方法前处理技术、灵敏度、定量方式、适用范围等各不相同,为了解决这个操作繁琐问题,本次能力验证实验统一了快速处理样品前处理技术,建立多残留同步检测方法。各标准方法同本实验方法比较详见表 3。

本实验方法内标法测定的结果回收率在 88.1%~118.0%之间,外标法测定的结果回收率在 75.2%~115.3%之间,准确度和精密度、方法灵敏度完全符合 NY/T 1896-2010《兽药残留实验室质量控制规范》中兽药残留检测方法性能标准要求<sup>[21]</sup>。实际检测工作中,由于内标法是通过测量内标物及被测组分的峰面积的相对值来进行计算的,因而在一定程度上消除了操作条件等的变化所引起的误差。因不需要配制基质标准曲线,适合大批量不同类型样品的处理。内标法的缺点是操作程序较为麻烦,每次分析时内标物和试样都要准确称量,有时寻找合适的内标物也有困难,无形中增加了测试成本。外标法简便,但进样量要求十分准确,而且要严格控制在与标准物相同的操作条件下进行,而且对仪器的重现性和操作条件的稳定性要求高,否则得不到准确的测量结果。近年来由于检测仪器大量更新换代,自动进样器的普遍使用,外标法对仪器条件的严苛要求问题得到了根本解决,因此日常工作中,检测大批量同一类型样品应用外标法就能够满足要求,也简单省事。但对于精密度要求比较高、结果准确度会产生重大影响、实验室条件不是很理想的等条件下,用内标法还是必要的<sup>[22]</sup>。所以本次能力验证采用内标法定量。



表 3 动物源性食品中兽药残留检测推荐标准与实验方法比较

Table 3 Comparison of recommended standards and experimental methods for detection of veterinary drug residues in food of animal origin

检测项目	检测标准	适用范围	净化方法	检测方法	灵敏度 (定量限) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量方式
畜禽产品中 $\beta$ -受体激动 剂	农业部 1025 号 公告-18-2008	猪肝、猪肉、 牛奶、鸡蛋	乙酸乙酯、叔丁基甲醚 2 次液液萃取,MCX 固相 萃取柱净化	LC- MS/MS	0.5	外标法
畜禽产品中 喹诺酮类药 物	GB/T 21312-2007	猪肉、猪肝、 猪肾、牛奶、 鸡蛋等	HLB 柱固相萃取	LC- MS/MS	动物组织: 3.0 (恩诺沙星)、 8.0 (环丙沙星)、 6.0(沙拉沙星 )	外标法
水产品中喹 诺酮类药物	农业部 1077 号 公告-1-2008	鲜活水产品 及其制品	正己烷脱脂	LC- MS/MS	2.0	内标法
水产品中孔 雀石绿和结 晶紫	GB/T 19857-2005	鲜活水产品 及其制品	中性氧化铝柱固相萃取; 提取液与二氯甲烷液液 分配、中性氧化铝柱串接 MCX 柱固相萃取	LC- MS/MS	0.5	内标法(D5- 孔雀石绿、 D6-隐色孔 雀石绿)
动物源食品 中 $\beta$ -受体激 动剂、喹诺酮 类药物、孔雀 石绿等	本方法	动物源食品	固相萃取柱 (ProElut PLS-A 6 mL) 净化样品	LC- MS/MS	喹诺酮类药物 1.0、 $\beta$ -受体激动 剂、孔雀石绿 0.5 喹诺酮类药物 2.0、 $\beta$ -受体激动 剂、孔雀石绿 0.5	内标法 (同 位素内标) 外标法

### 3.5 实验结果

本次能力验证实验采用内标法定量，实验结果如表 4，此次能力验证结果均以添加回收率作为判定标准。所有结果都靠近回收率范围的中位，令人满意。说明实验采用的检测方法灵敏、快速、简单可靠。

表 4 本次能力验证结果

Table 4 results of this proficiency test

样品编号/ 名称	项目名称	测定值/平均 值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	真值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 (%)	判定标准 (回收率范围)	判定结果
<b><math>\beta</math>58/牛肉</b>	克伦特罗	未检出	ND			合格
	沙丁胺醇	2.98	3	99.3	70-120%	合格
	莱克多巴胺	4.78	5.5	86.9	70-120%	合格
	氯丙那林	未检出	ND			合格
<b>F58/鸡肉</b>	达氟沙星	未检出	ND			合格
	恩诺沙星	70.5	85	82.9	60-120%	合格
	环丙沙星	77.3	90	85.9	60-120%	合格
	沙拉沙星	未检出	ND			合格
<b>F25/鲤鱼</b>	诺氟沙星	26.20	25	104.8	70-120%	合格
	氧氟沙星	14.26	14	101.9	70-120%	合格
	培氟沙星	未检出	ND			合格
	洛美沙星	未检出	ND			合格
	恩诺沙星	未检出	ND			合格
	环丙沙星	未检出	ND			合格
<b>SYZ20_K9/ 草鱼</b>	孔雀石绿	未检出	ND			合格
	隐色孔雀石绿	2.98	3	99.3	70-120%	合格

注: ND 为未添加, 理论上为未检出。

### 3.6 标准曲线的绘制

本实验用 0.1% 甲酸水: 甲醇 ( $v/v=9/1$ ) 配制内标法标准曲线溶液, 氟喹诺酮项目浓度点为 1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0、120.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 内标物混标浓度为 40.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ ;  $\beta$ -受体激动剂项目、孔雀石绿项目浓度点为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 内标物混标浓度为 4.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。同时用市售空白样品经本方法前处理后得到的空白基质溶液, 配制相同浓度点的外标法标准曲线。经测定, 14 个目标化合物在各自范围内呈现良好的线性关系, 相关系数均在 0.995 以上, 线性回归方程和相关系数结果见表 5。

表 5 14 种兽药的线性回归方程和相关系数

Table5 Linear regression equations and correlation coefficients of 14 veterinary drugs

序号	化合物	线性方程	相关系数	线性方程	相关系数
		(内标法)		(外标法)	
1	克伦特罗	$Y=0.892265X-0.0791229$	0.9981	$Y=451.048X-36.3024$	0.9999
2	沙丁胺醇	$Y=0.560727X+0.0244168$	0.9983	$Y=459.537X+5.38879$	0.9995
3	莱克多巴胺	$Y=0.812591X-0.0400167$	0.9969	$Y=568.749X-73.4851$	0.9983
4	氯丙那林	$Y=0.896182X+0.0391325$	0.9996	$Y=563.936X-32.7141$	0.9997
5	达氟沙星	$Y=0.794203X+7.23857$	0.9988	$Y=163.558X+686.167$	0.9963
6	恩诺沙星	$Y=1.23701X+3.66397$	0.9985	$Y=163.173X-100.076$	0.9977
7	环丙沙星	$Y=0.866536X-1.55439$	0.9993	$Y=188.283X+174.811$	0.9958
8	沙拉沙星	$Y=1.16915X+2.80804$	0.9958	$Y=45.8974X+18.3286$	0.9955
9	诺氟沙星	$Y=0.997477X-0.615652$	0.9975	$Y=164.077X-435.875$	0.9974
10	氧氟沙星	$Y=0.883063X-1.06282$	0.9997	$Y=172.095X-245.021$	0.9985
11	培氟沙星	$Y=0.668885X+0.623058$	0.9961	$Y=74.6138X-122.119$	0.9992
12	洛美沙星	$Y=1.0117X-0.103859$	0.9980	$Y=184.087X-165.631$	0.9972
13	孔雀石绿	$Y=0.980732X-0.149401$	0.9997	$Y=1935.13X-212.237$	0.9993
14	隐色孔雀石绿	$Y=0.656032X-0.068161$	0.9997	$Y=272.64X+90.92$	0.9966

### 3.7 回收率和精密度

本实验进行了添加回收实验来检验方法的准确度和精密度。根据检测项目的 MRL 要求和历年能力验证添加水平情况,在空白样品中添加 3 个不同水平的添加样品 每个水平设 5 个平行,采用本实验方法进行测定,14 种兽药的内、外标法回收率数据统计结果见表 6。实验结果表明,本方法在 3 个浓度的添加回收率内标法为 88.1%~118.0%,RSD 为 0.8%~9.6%,外标法添加回收率为 75.2%~115.3%,RSD 为 2.6%~11.2%。方法准确度和精密度均可满足检测要求。

表6 14种兽药不同定量方法的准确度和精密度实验结果(n=5)

Table6 Accuracy and precision experimental results of different quantitative methods for 14 veterinary drugs (n=5)

序号	化合物	添加水平 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	内标法		外标法	
			平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
1	克伦特罗	1.0,5.0,10.0	91.2,92.9,95.5	6.7,6.0,4.8	75.2,78.8,79.3	7.8,8.9,5.2
2	沙丁胺醇	1.0,5.0,10.0	99.8, 100.7, 100.2	8.5,9.3,5.6	75.3,79.8,85.2	10.5,9.4,7.3
3	莱克多巴胺	1.0,5.0,10.0	98.2, 102.3,101.1	2.8,1.5,2.7	78.9,77.5,82.7	5.6,4.4,6.2
4	氯丙那林	1.0,5.0,10.0	88.1,90.2,91.3	9.6, 8.2,6.6	80.6,82.1,83.7	11.2,9.9,7.5
5	达氟沙星	5.0,20.0,100.0	107.8,110.2,115.1	8.9,7.6,5.3	110.2,107.5, 99.8	10.6,7.2,3.1
6	恩诺沙星	5.0,20.0,100.0	93.8,100.5,110.4	7.6,8.9,5.2	85.8,88.2,96.1	8.6,4.2,5.4
7	环丙沙星	5.0,20.0,100.0	105.7,99.8,115.6	3.8,2.5,4.8	80.9,88.3,95.6	5.4,5.6,4.4
8	沙拉沙星	5.0,20.0,100.0	100.2,108.1,118.0	7.8,3.2,6.9	108.1,100.3,102.5	9.9,6.8,3.5
9	诺氟沙星	5.0,20.0,100.0	99.6,101.1,105.7	5.6,7.2,3.6	82.3,77.7,101.1	5.9,6.7,2.6
10	氧氟沙星	5.0,20.0,100.0	102.3, 102.5,99.5	2.6,5.3,4.5	110.2,103.4,110.9	5.4,7.1,8.9
11	培氟沙星	5.0,20.0,100.0	93.8,95.6,102.5	6.6,7.2,4.3	100.0,102.1,115.3	3.2,5.4,4.7
12	洛美沙星	5.0,20.0,100.0	95.3,101.9,104.2	7.7,5.1,3.2	100.2,105.7,105.3	9.6,5.4,5.2
13	孔雀石绿	1.0,5.0,10.0	99.2,103.0,110.0	5.6,4.3,3.3	76.6,80.4,85.6	5.5,4.9,3.8
14	隐色孔雀石绿	1.0,5.0,10.0	99.4,100.0,101.1	2.5,1.8,0.8	89.3,93.5,100.2	4.3,4.5,2.9

## 4 结论

本次能力验证实验建立了采用含0.2%甲酸的80%乙腈水溶液添加陶瓷均质子快速提取,用迪马科技ProElut PLS-A 固相萃取柱通过式净化,液质联用仪同时测定动物源性食品中14种兽药残留量的方法。本方法灵敏、快速、简单可靠,定量限为0.5~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,添加回收率内标法为88.1%~118.0%,RSD为0.8%~9.6%,外标法添加回收率为75.2%~115.3%,RSD为2.6%~11.2%,准确度和精密度符合NY/T 1896-2010《兽药残留实验室质量控制规范》中兽药残留检测方法性能标准要求。采用本研究分析方法同时参加四项不同基质、不同种类药物残留的能力验证,所有结果都靠近添加回收率范围的中位,令人满意。

在痕量的兽药残留分析检测中,基质效应是影响检测结果准确度和精密度主要因素之一<sup>[23,24]</sup>。动物源性食品基质复杂,检测标准众多,前处理过程相对繁琐,本次能力验证实验通

过对动物源性食品中部分兽药残留检测标准,包括  $\beta$ -受体激动剂类、孔雀石绿和结晶紫、喹诺酮类药物 3 类化合物,进行优化。统一了快速处理样品前处理技术,建立多残留同时检测方法。并给出了内外标定量方式的适用情况。符合当前动物源性食品中兽药残留分析检测的发展方向,也为进一步探索多类型兽药残留同时检测打下了基础。

#### 参考文献:

- [1] Farré M, Picó Y, Barceló D. Application of ultra-high pressure liquid chromatography linear ion-trap orbitrap to qualitative and quantitative assessment of pesticide residues[J]. J Chromatogr A, 2014, 1328: 66–79.
- [2] Fan S, Zhao P, Yu C, et al. Simultaneous determination of 36 pesticide residues in spinach and cauliflower by LC-MS/MS using multi-walled carbon nanotubes-based dispersive solid-phase clean-up [J]. Food Addit Contam, 2013, 31(1): 73–82.
- [3] 田雪珍, 郭建帮, 庞培. 人畜共患病、兽药残留对动物性食品安全的影响[J]. 广东畜牧兽医科技, 2016, (6): 27-30.
- [4] Tian XZ, Guo JB, Pang PP. Effects of zoonosis and veterinary drug residues on animal food safety [J]. Guangdong Anim Husb Vet Sci Technol, 2016, (6): 27-30.
- [5] 梁赛君. 浅谈兽药残留的现状与危害[J]. 畜禽业, 2018, (6): 57.
- [6] Liang SJ. Discussion on the present situation and harm of veterinary drug residues in [J]. Livestock Poul Ind, 2018, (6): 57.
- [7] CNASRL 02:2011 能力验证规则[S].
- [8] CNASRL 02:2011Capacity verification rules[S].
- [9] 屈媛媛, 李文, 张蔓. 实验室能力验证基础知识辨析及应用[J]. 医疗装备, 2013, 26(4): 3-5.
- [10] Qu YY, Li W, Zhang M. Basic Knowledge Identification and application of laboratory proficiency testing [ J ] . Medical equipment, 26(4)2013:3-5.
- [11] 李云, 苏青, 肖妙等. 兽药残留实验室能力验证与实验室比对初探[J]. 食品与营养科学, 2017, 6(1):32-36.
- [12] Li Y, Su Q, Xiao M, et al. Preliminary study on competence verification and laboratory comparison of veterinary drug residue laboratory[J]. Food and nutrition science, 2017,6(1) : 32-36.

- [13] 孙伟红, 刘欢, 邢丽红, 等. 水产品兽药残留检测技术标准解析及能力验证工作探讨[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(2): 11-18.
- [14] Sun WH, Liu H, Xing LH, et al. Standards analysis of detection techniques and discussion of proficiency testing for veterinary drug residues in aquatic products [J]. Chin Fish Qual Stand, 2017, 7(2): 11-18.
- [15] 畜禽产品中违禁添加物和兽药残留检测能力验证作业指导书,2020.
- [16] Practice guide for 2020 validation of the ability to detect prohibited additives and veterinary drug residues in livestock and poultry products.
- [17] 水产品中药物残留检测能力验证作业指导书,2020.
- [18] Practice guide for proficiency testing of drug residues in aquatic products, 2020.
- [19] 马立利, 刘 聪, 高丽娟, 等. 动物源性食品中兽药残留检测标准解析与能力验证工作探讨[J]. 食品安全质量检测学报.2019, 10(11): 3236-3248.
- [20] MaLL, Liu C, Gao LJ, et al. analysis of standards for the determination of veterinary drug residues in foods of animal origin and discussion on the verification of competence [J]. Journal of food safety and quality inspection. 2019, 10 (11): 3236-324.
- [21] 易泽夫, 杨韶红, 邓清林, 等. 湖南省农产品质检机构能力验证工作分析及发展建议[J]. 湖南农业科学, 2018, (3): 98-102.
- [22] Yi ZF, Yang SH, Deng QL, et al. Analysis and development suggestions on capacity rification of agricultural product quality inspection institutions in Hunan province [J]. Hunan Agric Sci, 2018, (3): 98-102.
- [23] MASIA A, SUAREZ-VARELA M M, LLOPIS-GONZALEZ A, et al. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-massspectrometry: A review [J]. Anal Chim Acta, 2016,936:40-61.
- [24] 龚兰, 赵航, 栾枫婷, 等.改进的 PRiME HLB 法联合高效液相色谱-串联质谱法快速测定鸡肉中 37 种兽药残留[J]. 农产品质量与安全, 2020(6): 54-62,68.
- [25] Gong L, Zhao H, Luan FT et al. Rapid determination of 37 veterinary drug residues in chicken by modified PRiME HLB method combined with High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Quality and safety of agricultural products, 2020(6): 54-62,68.
- [26] 金晓峰, 焦仁刚, 赵贵, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡肉中 43 种兽药残

- 留[J].食品安全质量检测学报. 2019, 10(11): 3343-3355.
- [27] Jin XF, Jiao RG, Zhao G, et al. Simultaneous determination of 43 veterinary drug residues in chicken by High-performance liquid chromatography[J]. Journal of food safety and quality inspection. 2019, 10(11): 3343-3355.
- [28] 周晖, 陈燕, 迟秋池, 等. 动物源性食品中多种兽药残留检测的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报. 2019, 10(15): 2889-2895.
- [29] Zhou H, Chen Y, Chi QC, et al. Advances in determination of multiple veterinary drug residues in foods of animal origin [J]. Journal of food safety and quality inspection. 2019, 10(15): 2889-2895.
- [30] 农业部 1025 号公告-18-2008 动物源性食品中 $\beta$ -受体激动剂残留检测 液相色谱-串联质谱法[S].
- [31] Ministry of agriculture bulletin 1025-18-2008 Detection of receptor agonist residues in foods of animal origin, liquid chromatography-tandem mass spectrometry[S].
- [32] GB/T 21312-2007 动物源性食品中 14 种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S].
- [33] GB/T 21312-2007 method for the determination of 14 quinolones residues in foods of animal origin, liquid chromatography-tandem mass spectrometry[S].
- [34] 农业部 1077 号公告-1-2008 水产品中 17 种磺胺类及 15 种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- [35] Ministry of agriculture bulletin 1077-1-2008 determination of 17 sulfonamides and 15 quinolones residues in aquatic products, liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [36] GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定[S].
- [37] GB/T 19857-2005 determination of Malachite Green and crystal violet residues in aquatic products [S].
- [38] NY/T 1896-2010 兽药残留实验室质量控制规范[S].
- [39] NY/T 1896-2010 quality control specification for veterinary drug residue laboratory[S].
- [40] 内标法及外标法方法、原理、优缺点[S].实验与分析.
- [41] Internal and external standard methods, principles, advantages and disadvantages[S]. Experiment and analysis.

- [42] 吴 景, 易泽夫 , 张贵群 等: 果蔬汁中氯氰菊酯、多效唑、啞蟊灵含量测定能力验证结果分析[J]. 食品安全质量检测学报. 2020, 11(13): 4437-4442.
- [43] Wu J, Yi ZF, Zhang GQ, et al. Analysis of the results of the determination of Pyridaben, paclobutrazol and Pyridaben in fruit and vegetable juices. Journal of food safety and quality inspection. 2020, 11(13): 4437-4442.
- [44] 宋梓豪, 石会娟, 王鹏袁, 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
- [45] Song ZH, Shi HJ, Wang PY et al. Study on the detection methods of 26 sulfonamides and their synergists in honey[J]. Quality and Safety of Agricultural Products. 2021 (1): 60—66.

中国仪器仪表学报