

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240605002

# 固相萃取-液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中 27种兽药及代谢物残留量

孙梅梅<sup>1,2</sup>, 吴银良<sup>1,2\*</sup>

(1. 宁波市农业科学研究院, 宁波 315040; 2. 宁波市特色农产品质量安全检测与控制重点实验室, 宁波 315040)

**摘要:** **目的** 建立固相萃取-液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中27种兽药(磺胺类、喹诺酮类及苯并咪唑类药物)及代谢物残留量的分析方法。**方法** 匀质后的猪肉样品用80%乙腈溶液提取, 提取后用EMR-Lipid固相萃取小柱净化, 流出液直接进行上机测定, 采用ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离, 以0.1%甲酸溶液(含5 mmol/L乙酸铵)和乙腈作为流动相进行梯度洗脱, 电喷雾正离子模式下监测, 内标法定量。**结果** 27种化合物在0.075~50.000 μg/L范围内线性关系良好, 相关系数( $r^2$ )均高于0.9980, 方法检出限和定量限分别为0.06~0.30 μg/kg和0.20~1.00 μg/kg。27种兽药及代谢物在1.0、10.0和100.0 μg/kg添加浓度水平下平均添加回收率为88.5%~104.0%, 相对标准偏差为2.6%~8.0%。**结论** 该方法准确度和灵敏度高, 前处理简单快速, 适用于猪肉中磺胺类药物、喹诺酮类药物及苯并咪唑类药物的同时分析。

**关键词:** 猪肉; 磺胺类药物; 喹诺酮类药物; 苯并咪唑类药物; 固相萃取; 液相色谱-串联质谱法

## Simultaneous determination of 27 kinds of veterinary drugs and their metabolites in swine meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction

SUN Mei-Mei<sup>1,2</sup>, WU Yin-Liang<sup>1,2\*</sup>

(1. Academy of Ningbo Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China; 2. Ningbo Key Laboratory for Testing and Control for Characteristic Agro-product Quality and Safety, Ningbo 315040, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a simple and fast analytical method for simultaneous determination of residues of 27 kinds of veterinary drugs (sulfonamides, quinolones, and benzimidazoles) and their metabolites in swine meat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction. **Methods** The homogenized meat samples were extracted with 80% acetonitrile solution. After extraction, a solid phase extraction procedure was carried out with EMR-Lipid cartridge without activation procedure. Then, the effluent was collected and directly used for chromatographic separation on an ACQUITY UPLC HSS T3 column with a gradient elution of 0.1% formic acid in water with 5 mmol/L ammonium acetate/acetonitrile. The compounds were monitored in electrospray positive ion mode and quantified by internal standard method. **Results** Good linear relationship had

基金项目: 浙江省“领雁”研发攻关项目(2022C02028)

Fund: Supported by the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2022C02028)

\*通信作者: 吴银良, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为农产品中兽药残留分析。E-mail: wupaddyfield@sina.com

\*Corresponding author: WU Yin-Liang, Ph.D, Professor, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, No.19, Dehou Road, Yinzhou District, Ningbo 315040, China. E-mail: wupaddyfield@sina.com

been obtained ranging from 0.075 to 50.000  $\mu\text{g/L}$  for the 27 kinds of veterinary drugs and their metabolites, and the correlation coefficients ( $r^2$ ) were higher than 0.9980. The limits of detection and quantification were 0.06–0.30  $\mu\text{g/kg}$  and 0.20–1.00  $\mu\text{g/kg}$ , respectively. The average recoveries of 27 kinds of veterinary drugs and metabolites were 88.5%–104.0% and the relative standard deviations were 2.6%–8.0% at the concentrations of 1.0, 10.0 and 100.0  $\mu\text{g/kg}$ .

**Conclusion** The method has high accuracy and sensitivity, simple and fast pre-treatment, and is suitable for the simultaneous analysis of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in swine meat.

**KEY WORDS:** swine meat; sulfonamides; quinolones; benzimidazoles; solid phase extraction; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

## 0 引言

我国是世界肉类生产第一大国,且肉类产量呈总体上升趋势<sup>[1]</sup>。近十余年来,消费者日益重视农产品的质量和安全,而药物残留是影响肉类农产品质量安全的重要因素。磺胺类药物、喹诺酮类药物和苯并咪唑类药物是动物生产中常规使用药物,且每类药品种较多,使用量大。其中,磺胺类药物和喹诺酮类药物为人工合成的抗生素,在动物生产中主要用于治疗、预防动物疾病或促进动物生长;蓄积的药物残留会引起人体过敏反应,使细菌产生耐药性,甚至有致癌、致畸、致突变等风险。苯并咪唑类药物属于广谱、高效、低毒抗蠕虫药,对胃肠道线虫具有很强的驱杀作用;但实际动物实验显示该类药物有致畸和致突变作用。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》和 GB 31650.1—2022《食品安全国家标准 食品中 41 种兽药最大残留限量》规定猪肉中此 3 类药物的最大残留限量(maximum residue limits, MRLs)分别为 100  $\mu\text{g/kg}$ (磺胺类药物)、2.0~500.0  $\mu\text{g/kg}$ (喹诺酮类药物)和 10~150  $\mu\text{g/kg}$ (苯并咪唑类药物)。因此,为了保障我国动物性食品安全和畜牧业健康发展,有必要研究建立猪肉中磺胺类药物、喹诺酮类药物和苯并咪唑类药物残留分析方法。

目前,对于动物性食品中磺胺类药物、喹诺酮类药物以及苯并咪唑类药物的残留仪器定量分析方法主要集中在液相色谱法<sup>[2-6]</sup>和液相色谱-串联质谱方法。其中,液相色谱-串联质谱法为确证方法,起初以单类药物的分析检测为主<sup>[7-12]</sup>,但近十余年来,多类药物同步测定方法研究成为热点<sup>[13]</sup>。如李永琴等<sup>[14]</sup>建立了液相色谱-串联质谱法快速检测牛肉中 12 类 80 种兽药及其代谢物残留的方法;张飞等<sup>[15]</sup>建立了液相色谱-串联质谱法检测卤肉中金刚烷胺、磺胺类、喹诺酮类及氯霉素类等 36 种兽药残留的方法;吴彦蕾等<sup>[16]</sup>建立了液相色谱-串联质谱法检测喹诺酮类、磺胺类、硝基咪唑类、大环内酯类和苯并咪唑类 76 种兽药及其代谢物残留量的分析方法。在建立多类药物液相色谱-串联质谱同步测定方法中,前处理手段主要为固相萃取<sup>[17-19]</sup>和 QuEChERS 净化方法<sup>[20-23]</sup>,其中固相萃取方法通常需活化、淋洗和洗脱等步骤,洗脱液还需氮吹和复溶,操作相

对烦琐,用时较多。

本研究尝试利用 EMR-Lipid 通过型固相萃取柱,研究建立无需活化淋洗步骤的快速固相萃取净化方法,结合液相色谱-串联质谱仪对猪肉中 27 种兽药及代谢物残留量进行测定,为猪肉中监控磺胺类药物、喹诺酮类药物和苯并咪唑类药物提供更加快速准确的监控手段。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

Acquity UPLC-Xevo<sup>TM</sup> TQ MS 超高效液相色谱串联质谱仪(美国 Waters 公司); Acquity UPLC HSS T3 (100 mm $\times$  2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )色谱柱(美国 Waters 公司); Sigma 3K15 高速离心机(美国 Sigma 公司); Ultra-Tyrrax T25 型均质器、VORTEX3 旋涡混合仪(德国 IKA 公司); BS124S 分析天平(精度为 0.01 mg, 德国赛多利斯仪器公司); ME3002 电子天平(精度为 0.01 g, 瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 纯化系统(美国 Millipore 公司); 0.22  $\mu\text{m}$  有机相滤膜(北京迪科马科技有限公司); EMR-Lipid 固相萃取小柱(300 mg/3 mL, 美国 Agilent 公司)。

乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、磺胺二甲异噁唑、磺胺噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺氯噻嗪、磺胺喹噁啉、磺胺间二甲氧嘧啶、阿苯达唑、阿苯达唑砒、阿苯达唑亚砒、阿苯达唑-2-氨基砒、甲苯咪唑、5-羟甲基苯咪唑、氨基甲苯咪唑、氟苯达唑、2-氨基氟苯达唑、磺胺邻二甲氧嘧啶-D<sub>3</sub>、磺胺间二甲氧嘧啶-D<sub>6</sub>、磺胺喹噁啉-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、磺胺噻唑-D<sub>4</sub>、磺胺二甲嘧啶-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、磺胺间甲氧嘧啶-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、磺胺甲噁唑-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、磺胺嘧啶-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、诺氟沙星-D<sub>5</sub>、恩诺沙星-D<sub>5</sub>、环丙沙星-D<sub>8</sub>、氧氟沙星-D<sub>3</sub>、培氟沙星-D<sub>5</sub>、洛美沙星-D<sub>5</sub>、阿苯达唑-D<sub>3</sub>、阿苯达唑砒-D<sub>3</sub>、阿苯达唑亚砒-D<sub>3</sub>、阿苯达唑-2-氨基砒-D<sub>3</sub>、氟苯达唑-D<sub>3</sub>、2-氨基氟苯达唑-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>、甲苯咪唑-D<sub>3</sub>、5-羟甲基苯咪唑-D<sub>3</sub>、氨基甲苯咪唑-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>(含量均高于 95.0%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

猪肉空白样品均购于本地超市和农贸市场。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 溶液配制

标准溶液配制: 分别准确称取各标准品 10 mg, 用甲醇溶解并定容于 100 mL 容量瓶中, 配制成质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的标准储备液,  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  以下保存备用; 分别准确移取适量标准储备液, 用甲醇逐级稀释配制成 2.0  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准溶液和 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的混合内标标准溶液; 准确移取混合标准溶液、混合内标溶液适量, 用 0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)/乙腈配制质量浓度为 0.075、0.150、0.500、2.500、10.000 和 50.000  $\mu\text{g/L}$ , 内标质量浓度为 2.5  $\mu\text{g/L}$  的系列标准工作溶液。

0.5 mol/L 乙酸铵溶液: 准确称取乙酸铵 3.85 g, 用水溶解并稀释至 100 mL。0.1% 甲酸溶液: 准确移取甲酸 1 mL, 用水稀释定容至 1000 mL。0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵): 准确移取甲酸 1 mL 和 0.5 mol/L 乙酸铵溶液 10 mL, 用水稀释定容至 1000 mL。80% 乙腈溶液: 准确移取乙腈 800 mL, 用水稀释定容至 1000 mL。

### 1.2.2 样品的前处理

准确称取试样 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,

加入 100  $\mu\text{L}$  混合内标溶液, 然后加入 10 mL 80% 乙腈溶液, 用均质器以 10000 r/min 以上的速度均质 1 min, 再以 8000 r/min 离心 2 min, 移取上清液 4 mL 以 1~2 mL/min 的速度过 EMR-Lipid 固相萃取小柱, 收集过柱液, 混匀, 准确移取 0.25 mL 过柱液用 0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)稀释至 1.0 mL, 涡旋混匀, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤, 上机分析。

### 1.2.3 仪器条件

采用 Acquity UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) 分离; 流动相: A 相为 0.1% 甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵), B 相为乙腈; 柱温 40  $^\circ\text{C}$ ; 进样量 10  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序: 0~2.0 min, 80% A; 2.0~8.0 min, 80%~40% A; 8.0~8.1 min, 40%~5% A; 8.1~10.0 min, 5% A; 10~10.1 min, 5%~80% A; 10.1~13 min, 80% A。

质谱条件: 电喷雾离子源正离子模式; 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 1.5 kV; 离子源温度: 150  $^\circ\text{C}$ ; 脱溶剂气温度: 500  $^\circ\text{C}$ ; 锥孔气流速: 50 L/h; 脱溶剂气流速: 1000 L/h; 倍增器电压: 650 V; 二级碰撞气: 氦气; 其他质谱条件详见表 1。

表 1 目标化合物的保留时间, 定性、定量离子对和碰撞能量

Table 1 Retention times, qualitative ion pairs, quantitative ion pairs and collision energy of target compounds

化合物种类	保留时间 /min	离子对 (m/z)	碰撞能量 /eV	化合物种类	保留时间 /min	离子对 (m/z)	碰撞能量 /eV
磺胺二甲异噁唑	5.26	268.2>156.0*	28	恩诺沙星	2.28	360.3>316.3*	20
		268.2>92.0	13			360.3>342.3	20
磺胺噻唑	1.74	256.0>92.0*	25	环丙沙星	1.75	332.1>288.1*	18
		256.0>156.0	15			332.1>314.1	22
磺胺间甲氧嘧啶	3.62	281.0>156.0	35	氧氟沙星	1.65	362.3>318.3	20
		281.0>92.0*	22			362.3>261.3*	30
磺胺甲噁唑	4.81	254.1>156.0*	15	诺氟沙星	1.60	320.1>276.1*	20
		254.1>92.0	25			320.1>233.1	25
磺胺甲噻二唑	2.68	271.1>156.0*	15	洛美沙星	2.01	352.1>265.1*	22
		271.1>92.0	25			352.1>308.1	16
磺胺二甲嘧啶	2.76	279.1>124.1	25	培氟沙星	1.71	334.1>290.1*	19
		279.1>186.0*	15			334.1>316.1	19
磺胺甲基嘧啶	2.20	265.1>92.0	25	阿苯达唑	7.69	266.3>234.0*	20
		265.1>156.0*	15			266.3>190.9	30
磺胺邻二甲氧嘧啶	4.66	311.2>156.0*	28	阿苯达唑砒	5.13	298.0>266.0	20
		311.2>92.1	18			298.0>224.0*	28
磺胺嘧啶	1.71	251.0>156.0	27	阿苯达唑亚砒	3.02	282.1>240.0	12
		251.0>92.0*	15			282.1>208.0*	23
磺胺氯哒嗪	4.18	285.0>155.9*	28	阿苯达唑-2-氨基砒	1.38	240.0>133.0*	25
		285.0>92.0	15			240.0>198.0	16
磺胺喹噁啉	6.16	301.1>156.1*	16	甲苯咪唑	7.15	296.1>264.1*	20
		301.1>92.2	30			296.1>105.1	32
磺胺间二甲氧嘧啶	6.14	311.2>156.0*	28	5-羟甲基苯咪唑	4.75	298.1>266.0*	20
		311.2>92.1	18			298.1>160.0	32
氨基甲苯咪唑	4.06	238.0>105.0	22	氟苯达唑	7.53	314.1>282.0*	24
		238.0>77.0*	30			314.1>123.0	35

表 1(续)

化合物种类	保留时间 /min	离子对 (m/z)	碰撞能量 /eV	化合物种类	保留时间 /min	离子对 (m/z)	碰撞能量 /eV
2-氨基氟苯达唑	4.80	256.0>95.0 256.0>123.0*	35 25	诺氟沙星-D <sub>5</sub>	1.58	325.1>281.1	20
磺胺间二甲氧嘧啶-D <sub>6</sub>	6.05	317.2>162.1	28	恩诺沙星-D <sub>5</sub>	2.28	365.2>321.2	24
磺胺喹噁啉- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	6.16	307.1>162.1	16	环丙沙星-D <sub>8</sub>	1.73	340.2>322.2	20
磺胺噻唑-D <sub>4</sub>	1.72	260.0>96.0	25	氟氧沙星-D <sub>3</sub>	1.65	365.0>261.3	30
磺胺二甲嘧啶- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	2.76	285.2>186.1	14	培氟沙星-D <sub>5</sub>	1.69	339.1>295.2	19
磺胺间甲氧嘧啶- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	3.65	287.0>97.9	35	洛美沙星-D <sub>5</sub>	1.99	357.3>270.2	20
磺胺甲噁唑- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	4.80	260.0>162.1	15	氨基甲苯咪唑- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	4.06	244.2>83.2	30
磺胺嘧啶- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	1.71	257.0>98.0	27	阿苯达唑-D <sub>3</sub>	7.68	269.3>234.0	20
磺胺邻二甲氧嘧啶-D <sub>3</sub>	4.61	314.1>156.0	18	氟苯达唑-D <sub>3</sub>	7.51	317.1>282.2	24
阿苯达唑砒-D <sub>3</sub>	5.11	301.0>224.0	28	2-氨基氟苯达唑- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	4.79	262.1>129.0	25
阿苯达唑亚砒-D <sub>3</sub>	2.98	285.1>208.0	23	甲苯咪唑-D <sub>3</sub>	7.12	299.1>264.1	20
阿苯达唑-2-氨基砒-D <sub>3</sub>	1.38	243.2>133.0	25	5-羟基甲苯咪唑-D <sub>3</sub>	4.75	301.1>266.2	20

注: \*为定量离子对。

### 1.3 数据处理

数据采用 MassLynx 软件进行采集和处理, 回收率、相对标准偏差和标准曲线线性方程采用 Excel 2010 进行处理, 并分别使用 Word 2010 和 Excel 2010 进行表格和图的绘制。

基质效应采用基质匹配标准溶液标准曲线斜率与溶剂标准溶液标准曲线斜率的比值进行评价, 比值介于 0.8~1.2 表示基质效应不明显, 高于 1.2 表示有明显基质增强效应, 低于 0.8 表示有明显基质抑制效应。

## 2 结果与分析

### 2.1 仪器条件的优化

已有研究及发表文献表明磺胺类、喹诺酮类和苯并咪唑类药物在酸性条件下较易质子化生成稳定的[M+H]<sup>+</sup>, 因此通常采用电喷雾正离子模式进行监测<sup>[24-29]</sup>。本研究以 0.1%甲酸溶液稀释配制 1.0 μg/mL 各单标标准溶液, 并利用仪器自带 Intellistart 软件进行了质谱条件优化, 优化后的质谱条件详见表 1。

对于液相色谱条件, 本研究利用 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱在以 0.1%甲酸溶液、0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)和 0.1%甲酸溶液(含 20 mmol/L 乙酸铵)分别作为水相, 乙腈和甲醇分别作为有机相条件下对这 3 类药物及其代谢产物的响应强度进行了研究。研究表明对于所有磺胺类药物和喹诺酮类药物以及 6 种苯并咪唑类药物和代谢产物, 0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)作为水相时响应强度最好, 响应强度约为 0.1%甲酸溶液和 0.1%甲酸溶液(含 20 mmol/L 乙酸铵)分别作为水相时响应强度的 1.3~4.7 倍和 1.5~9.0 倍; 乙腈和甲醇分别作为有机相对响应影响较小, 响应强度差异均在 30%以内。这与 HOU 等<sup>[22]</sup>利用 Acquity

BEH C<sub>18</sub> 色谱柱优化流动相研究结果基本一致。因此总体响应强度较好的是流动相为 0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)/乙腈和 0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)/甲醇。考虑到乙腈作为有机相时各物质出峰相对较快且响应强度相对较高的药物种类相对较多, 0.1%甲酸溶液(含 5 mmol/L 乙酸铵)/乙腈被最终选择作为本研究流动相。

### 2.2 提取条件的优化

对于已建立的多类药物残留分析方法, 提取液通常采用乙腈<sup>[25,27]</sup>或乙腈溶液<sup>[13-14,16-19]</sup>。因此本研究采用在猪肉空白样品中添加标准溶液的方式对乙腈和 80%乙腈溶液的提取效果进行了研究。样品量为 5 g, 提取液体积 10 mL, 1 次提取, 结果详见图 1。从图 1 中可见, 除少数药物(氟苯达唑、磺胺喹噁啉、5-羟基甲苯咪唑、甲苯咪唑和阿苯达唑)外, 80%乙腈溶液的提取效果(平均绝对回收率为 77.6%)好于乙腈的提取效果(平均绝对回收率为 72.4%)。考虑到溶剂节约使用及本研究采用同位素内标法定量, 最终 80%乙腈溶液作为本研究提取液。

### 2.3 净化条件的优化

为考察实验药物 EMR-Lipid 小柱过柱回收率, 实验利用猪肉空白样品经 80%乙腈溶液提取后加入标准溶液的方式研究了不同体积提取液(2.0 mL, 4.0 mL 和全部提取液)过柱回收率情况。研究结果表明, 2.0 mL 提取液过柱时氧氟沙星、恩诺沙星和培氟沙星的绝对回收率稍低于 82%, 这可能是由于小柱对这 3 种药物略有吸附, 其余条件下所有药物的过柱绝对回收率均在 91.5%~104.8%之间。为保证过柱回收率及减少过柱时间, 上样提取液体积定为 4.0 mL。与已有方法相比<sup>[17-19]</sup>, 本研究建立的 EMR-Lipid 过柱净化方法无需活化和淋洗, 净化时间仅为 3 min 左右, 远比传统

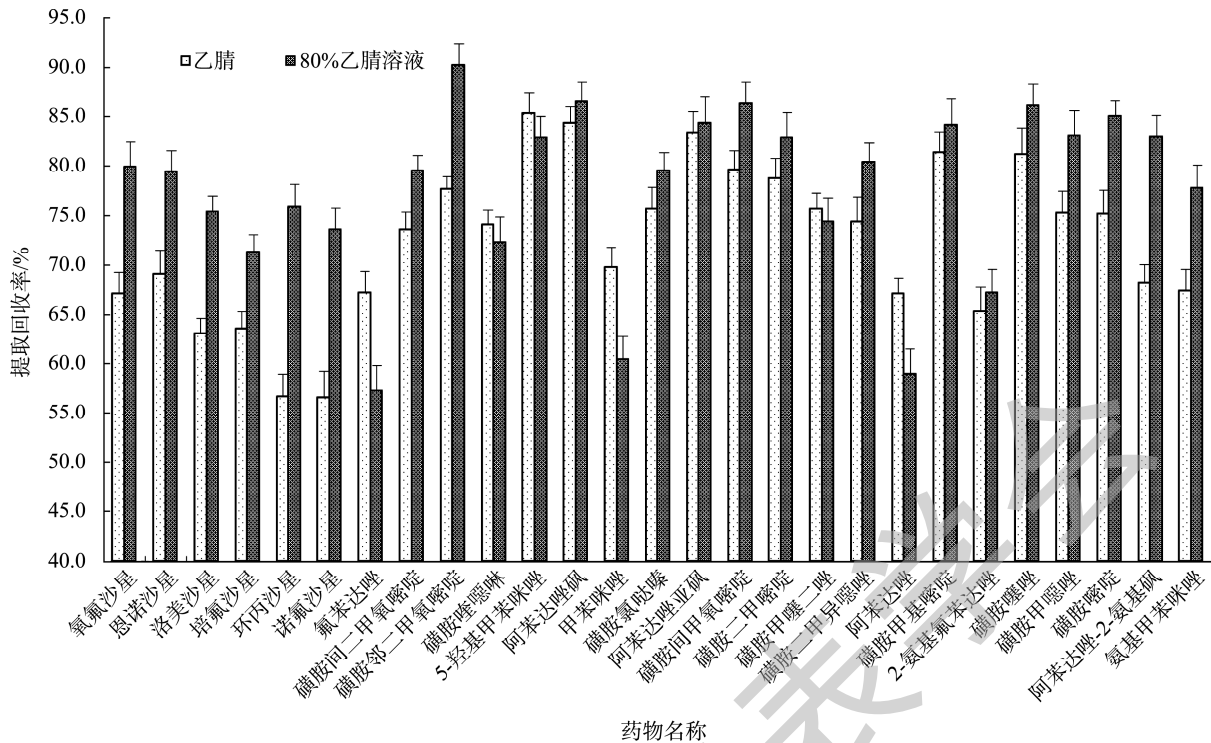


图1 不同提取液下猪肉空白样品添加实验结果(n=3)

Fig.1 Fortified experimental results with blank pork samples under different extraction solution (n=3)

的固相萃取方法方便快捷,同时也比通常需要净化后离心步骤的 QuEChERS 方法<sup>[20-21]</sup>更加简单。

## 2.4 基质效应

提取净化条件建立后,对 27 种药物及其代谢产物在 0.075~50.000  $\mu\text{g/L}$  范围内的溶剂标准溶液和基质匹配标准溶液进行了分析,按外标法进行定量,同时为考察基质效应对基质匹配标准溶液标准曲线斜率与溶剂标准溶液标准曲线斜率的比值进行了计算。经计算各化合物的比值在 0.82~1.09 之间,表明基质效应均较弱,说明方法整体净化效果较好。

## 2.5 方法学验证

### 2.5.1 线性范围

对 1.2.1 配制标准系列工作溶液进行分析。以目标化合物的定量离子对峰面积与相应内标物(磺胺二甲异噻唑采用磺胺邻二甲氧嘧啶- $\text{D}_3$  定量,磺胺甲噻二唑、磺胺甲基噻唑和磺胺氯吡嗪采用磺胺间二甲氧嘧啶- $\text{D}_6$  定量)的离子对峰面积比值为纵坐标(Y),标准溶液质量浓度为横坐标(X,  $\mu\text{g/L}$ ),绘制标准曲线,结果详见表 2。结果显示,27 种药物及其代谢产物在 0.075~50.000  $\mu\text{g/L}$  范围内线性良好,相关系数( $r^2$ )均在 0.9980 以上。

表 2 目标化合物的线性方程和相关系数

Table 2 Linear equations and correlation coefficients of target compounds

化合物名称	线性方程	相关系数( $r^2$ )	化合物名称	线性方程	相关系数( $r^2$ )
磺胺二甲异噻唑	$Y=0.1485X+0.0074$	0.9993	氧氟沙星	$Y=0.4939X+0.0039$	0.9988
磺胺噻唑	$Y=0.8342X+0.0145$	0.9987	诺氟沙星	$Y=0.4899X+0.0045$	0.9990
磺胺间二甲氧嘧啶	$Y=0.8699X+0.0175$	0.9990	洛美沙星	$Y=0.5336X+0.0078$	0.9986
磺胺甲噻唑	$Y=0.4598X+0.0039$	0.9985	培氟沙星	$Y=0.4378X+0.0028$	0.9989
磺胺甲噻二唑	$Y=0.3848X+0.0016$	0.9992	阿苯达唑	$Y=0.7660X+0.0069$	0.9990
磺胺二甲噻唑	$Y=0.5640X+0.0087$	0.9994	阿苯达唑砷	$Y=1.4147X+0.0238$	0.9987
磺胺甲基噻唑	$Y=0.7030X+0.0057$	0.9986	阿苯达唑亚砷	$Y=1.1185X+0.0070$	0.9994
磺胺邻二甲氧嘧啶	$Y=0.5537X+0.0036$	0.9987	阿苯达唑-2-氨基砷	$Y=0.5611X+0.0040$	0.9989
磺胺嘧啶	$Y=0.4735X+0.0042$	0.9996	甲苯咪唑	$Y=1.4327X+0.0073$	0.9992
磺胺氯吡嗪	$Y=0.3756X+0.0069$	0.9987	5-羟基甲苯咪唑	$Y=1.6217X+0.0261$	0.9991
磺胺噻唑	$Y=0.4148X+0.0027$	0.9990	氟苯达唑	$Y=2.0055X+0.0131$	0.9992
磺胺间二甲氧嘧啶	$Y=0.5599X+0.0056$	0.9992	氨基甲苯咪唑	$Y=0.9384X+0.0051$	0.9988
恩诺沙星	$Y=1.0128X+0.0020$	0.9993	2-氨基氟苯达唑	$Y=0.5615X+0.0032$	0.9994
环丙沙星	$Y=0.3098X+0.0063$	0.9986			

### 2.5.2 方法准确度、精密度和灵敏度

方法准确度和精密度实验采用猪肉空白样品中添加标准溶液的方式进行测定, 添加浓度分别为 1.0、10.0 和 100.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 每个浓度设置 6 个平行样品, 其中准确度用回收率表示, 精密度用相对标准偏差表示, 实验结果见表 3, 添加实验样品图谱见图 2。灵敏度采用检出限和定量限表示, 其中检出限为 3 倍信噪比时的浓度, 定量限为 10 倍信噪比浓度, 结果也详见表 3。从表 3 可知, 3 个浓度添加回收率在 88.5%~104.0%之间, 相对标准偏差在 2.6%~8.0%之间, 检出限在 0.06~0.30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之间, 定量限在 0.20~1.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  之

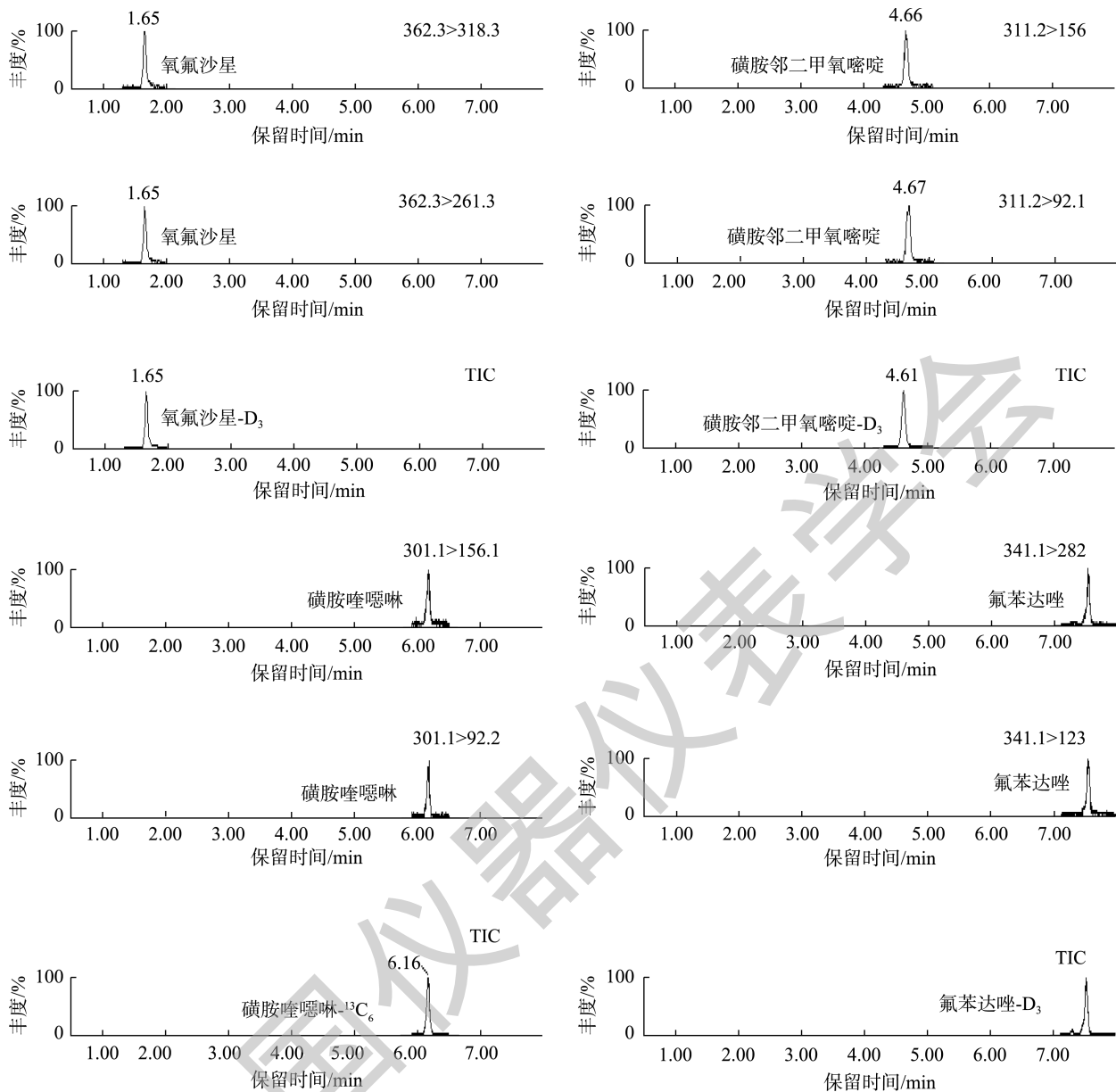
间。从本研究结果看, 相关药物因采用内标法定量, 回收率明显好于周雯鹏等<sup>[30]</sup>以及李永琴等<sup>[14]</sup>建立的外标法定量的液相色谱-串联质谱分析方法的回收率, 同时所有药物定量限均在 0.5 MRL 以下。

### 2.6 实际样品检测

利用本研究建立的方法对 2024 年 3 月实验室随机在本地超市和农贸市场购买的 10 份猪肉样品进行分析检测。结果显示, 有 1 份样品有氧氟沙星检出(检出值 0.74  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。检出药物低于相应限量值, 其他药物均无检出。

表 3 猪肉中目标化合物的添加回收率、相对标准偏差、检出限和定量限  
Table 3 Recoveries, relative standard deviations, limits of detection and limits of quantitation of target compounds in pork

化合物名称	回收率/% (n=6)			相对标准偏差/% (n=6)			检出限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
	1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
磺胺二甲异噁唑	97.5	93.8	98.4	3.6	6.1	5.2	0.15	0.50
磺胺噻唑	101.0	98.5	94.6	4.1	4.4	4.9	0.30	1.00
磺胺间甲氧嘧啶	93.7	95.2	89.5	3.8	3.7	5.1	0.30	1.00
磺胺甲噁唑	98.6	96.1	95.8	2.6	6.2	4.3	0.15	0.50
磺胺甲噻二唑	104.0	99.9	93.1	4.1	3.5	5.8	0.30	1.00
磺胺二甲嘧啶	94.6	99.4	101.0	6.0	3.7	3.1	0.15	0.50
磺胺甲基嘧啶	98.2	94.4	98.6	5.2	6.3	4.4	0.15	0.50
磺胺邻二甲氧嘧啶	96.8	101.0	96.2	7.3	4.3	6.4	0.30	1.00
磺胺嘧啶	91.5	93.5	94.2	4.9	3.5	5.8	0.10	0.30
磺胺氯吡嗪	100.0	90.5	94.2	7.5	4.5	6.2	0.30	1.00
磺胺喹噁啉	91.1	96.5	96.4	8.0	3.6	7.1	0.30	1.00
磺胺间二甲氧嘧啶	102.0	95.8	88.5	5.4	4.5	3.9	0.30	1.00
恩诺沙星	103.0	102.0	93.2	5.7	3.8	4.7	0.15	0.50
环丙沙星	95.8	95.5	91.8	5.3	3.3	4.1	0.15	0.50
氧氟沙星	98.0	95.3	93.2	6.2	6.8	5.8	0.15	0.50
诺氟沙星	96.5	96.8	95.2	5.7	4.1	6.3	0.15	0.50
洛美沙星	102.0	92.4	98.7	6.0	6.5	4.8	0.15	0.50
培氟沙星	95.6	98.2	102.0	7.7	4.5	5.6	0.15	0.50
阿苯达唑	98.6	92.4	93.2	5.3	5.5	6.1	0.10	0.30
阿苯达唑砒	96.2	93.0	97.2	4.8	4.6	5.2	0.15	0.50
阿苯达唑亚砒	93.5	99.2	97.3	6.0	3.9	5.6	0.30	1.00
阿苯达唑-2-氨基砒	93.6	98.4	91.4	4.7	3.3	5.9	0.30	1.00
甲苯咪唑	102.0	91.3	97.7	5.5	6.3	4.7	0.10	0.30
5-羟基甲苯咪唑	94.7	94.0	96.3	3.6	4.8	5.2	0.06	0.20
氟苯达唑	102.0	93.3	99.4	6.6	5.1	5.5	0.30	1.00
氨基甲苯咪唑	96.8	95.9	95.8	3.8	4.9	4.7	0.15	0.50
2-氨基氟苯达唑	101.0	98.5	95.4	5.2	4.8	6.9	0.15	0.50



注: TIC 为总离子流色谱图(total ion chromatogram)。

图 2 猪肉添加样品代表性化合物的 MRM 色谱图(1.0 µg/kg)

Fig.2 MRM chromatograms of representative compounds in pork samples (1.0 µg/kg)

### 3 结论

本研究通过对前处理和仪器等条件的优化,建立了猪肉中磺胺类药物、喹诺酮类药物和苯并咪唑类药物残留通过型固相萃取-液相色谱-串联质谱分析方法。样品经 80%乙腈溶液提取,EMR-Lipid 小柱快速净化,内标法定量。该方法前处理简单、灵敏度高、准确度和重现性好,为猪肉中监控磺胺类、喹诺酮类和苯并咪唑类药物残留提供了准确快速的技术监管手段。

### 参考文献

- [1] 王硕,林秀蔚,王保印,等.基于灰色 GM(1, 1)模型的我国肉类产量预测分析[J].黑龙江八一农垦大学学报,2023,35(4): 39-44.  
WANG S, LIN XW, WANF BY, *et al.* Prediction and analysis of meat yield based on grey GM(1, 1) model [J]. J Heilongjiang Bayi Agric Univ, 2023, 35(4): 39-44.
- [2] LIU T, MA L, JIANG Y, *et al.* Simultaneous determination of four quinolones in honey by nickel/aluminum-layered double hydroxide-based air assisted dispersive solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography [J]. J Food Measure Charact, 2022, 16: 5023-5031.

- [3] WANG SH, ZHANG XH, ZHANG SH, *et al.* Determination of benzimidazoles in beef by molecularly imprinted boron nitride composite based dispersive solid phase microextraction and ultra performance liquid chromatography [J]. *Microchem J*, 2022, 179: 107523.
- [4] PREMARATHNE JMKJK, SATHARASINGHE DA, GUNASENA ARC, *et al.* Establishment of a method to detect sulfonamide residues in chicken meat and egg by high-performance liquid chromatography [J]. *Food Control*, 2017, 72: 276–282.
- [5] MOUDGIL P, BEDI JS, AULAKH RS, *et al.* Validation of HPLC multi-residue method for determination of fluoroquinolones, tetracycline, sulphonamides and chloramphenicol residues in bovine milk [J]. *Food Anal Methods*, 2019, 12: 338–346.
- [6] AHMED MBM, TAHA AA, MEHAYA FMS, *et al.* Method validation and risk assessment for sulfonamides and tetracyclines in bees' honey from Egypt, Libya and Saudi Arabia [J]. *Environ Geochem Health*, 2023, 45: 997–1011.
- [7] TOUSSAINT B, CHEDIN M, BORDIN G, *et al.* Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry I. laboratory-validated method [J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1088: 32–39.
- [8] XIA X, DONG Y, LUO P, *et al.* Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 878: 3174–3180.
- [9] 李倩, 汤凯洁, 冀坤霞, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定水产品中 15 种磺胺类药物残留[J]. *食品与生物技术学报*, 2024, 43(1): 36–47.
- LI Q, TANG KJ, JI KX, *et al.* Simultaneous determination of 15 sulfonamides residues in aquatic products by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. *J Food Sci Biotech*, 2024, 43(1): 366–347.
- [10] 王小乔, 许晓辉, 张虹艳, 等. 分散固相萃取-UPLC-MS/MS 法测定水蛭中 10 种磺胺类药物残留[J]. *食品与药品*, 2023, 25(3): 211–216.
- WANG XQ, XU XH, ZHANG HY, *et al.* Simultaneous determination of ten kinds of sulfonamide residues in leeches by DSPE-UPLC-MS/MS [J]. *Food Drug*, 2023, 25(3): 211–216.
- [11] 王小乔, 李坚, 许晓辉, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定海龙中 11 种磺胺类抗菌药物残留分析[J]. *测试技术与仪器*, 2023, 29(1): 16–22.
- WANG XQ, LI J, XU XH, *et al.* Determination of 11 sulfonamide antibacterial drug residues in *syngnathus* by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry combined with dispersed solid phase extraction [J]. *Anal Testing Technol Instrum*, 2023, 29(1): 16–22.
- [12] 余海芬, 徐桦, 吴真善, 等. PRiME HLB 前处理技术联合超高效液相色谱-三重四极杆质谱系统检测水产品中 17 种磺胺类药物残留[J]. *现代食品*, 2024, 30(1): 213–215, 224.
- YU HF, XU H, WU ZS, *et al.* PRiME HLB pretreatment technology combined with ultra-high performance liquid chromatography-triple quad mass spectrometry system for the detection of 17 sulfonamide residues in aquatic products [J]. *Mod Food*, 2024, 30(1): 213–215, 224.
- [13] PARK H, CHOI SY, KANG HS, *et al.* Multi residue determination of 96 veterinary drug residues in domestic livestock and fishery products in South Korea [J]. *Aquaculture*, 2022, 553: 738064.
- [14] 李永琴, 卜宁霞, 陈娟, 等. HPLC-MS/MS 法同时测定牛肉中 80 种兽药及其代谢物[J]. *食品科学技术学报*, 2022, 40(1): 140–149.
- LI YQ, BU NX, CHEN J, *et al.* Determination of 80 veterinary drug residues and their metabolites in beef by HPLC-MS/MS [J]. *J Food Sci Technol*, 2022, 40(1): 140–149.
- [15] 张飞, 王远, 马小宁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测猪肉中 36 种兽药残留[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(13): 340–348.
- ZHANG F, WANG Y, MA XN, *et al.* Determination of 36 veterinary drug residues in cooked meat by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(13): 340–348.
- [16] 吴彦蕾, 苏敏, 周纯洁, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中 76 种兽药及其代谢物[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(20): 311–321.
- WU YL, SU M, ZHOU CJ, *et al.* Simultaneous determination of 76 veterinary drugs and their metabolites in pork by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44(20): 311–321.
- [17] ZHU Y, JIANG X, SHEN D, *et al.* A one-step solid-phase extraction with UHPLC-MS/MS for fast and accurate determination of multi-class veterinary drugs in animal muscles [J]. *Food Chem*, 2023, 428: 136712.
- [18] 杨巧慧, 刘中良, 陈亚, 等. 一步净化结合超高效液相色谱串联质谱同时测定雅鱼中 13 类 54 种兽药残留[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(3): 242–252.
- YANG QH, LIU ZL, CHEN Y, *et al.* One-step purification combined with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of residues of 54 veterinary drugs belonging to 13 classes in “Ya-Fish” [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2024, 45(3): 242–252.
- [19] 李晓芹, 丁洪流, 何新叶, 等. UPLC-MS/MS 同时测定动物源性食品中 114 种兽药残留[J]. *食品工业*, 2021, 42(7): 310–316.
- LI XQ, DING HL, HE XY, *et al.* Simultaneous determination of 114 veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin by UPLC-MS/MS [J]. *Food Ind*, 2021, 42(7): 310–316.
- [20] JUNG YS, KIM DB, NAM TG, *et al.* Identification and quantification of multi-class veterinary drugs and their metabolites in beef using LC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2022, 382: 132313.
- [21] VARENINA I, BILANDZIC N, LUBURIC DB, *et al.* Determination of quinolones, macrolides, sulfonamides and tetracyclines in honey using QuEChERS sample preparation and UHPLC-MS/MS analysis [J]. *Food Control*, 2023, 148: 109676.
- [22] JI B, YANG L, REN C, *et al.* A modified QuEChERS method based on a reduced graphene oxide-coated melamine sponge for multiresidue analysis of veterinary drugs in mutton by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2024, 433: 137376.
- [23] 刘进玺, 王铁良, 胡京枝, 等. QuEChERS 结合 HPLC-MS/MS 同时测定鱼肉中多种兽药残留[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(19): 252–257.
- LIU JX, WANG TL, HU JZ, *et al.* Determination of veterinary drug residues in fish by QuEChERS method with HPLC-MS/MS [J]. *Food Ferment Ind*, 2021, 47(19): 252–257.
- [24] HOU XL, CHEN G, ZHU L, *et al.* Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk [J]. *J Chromatogr B*, 2014, 962: 20–29.
- [25] HAJRULAI-MUSLIU L Z, UZUNOV L R, JOVANOVIĆ S, *et al.*



- Determination of veterinary drug residues, mycotoxins, and pesticide residues in bovine milk by liquid chromatography electrospray ionisation–tandem mass spectrometry [J]. *J Vet Res*, 2022, 66: 215–224.
- [26] MELEKHIN AO, TOLMACHEVA VV, GONCHAROV NO, *et al.* Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hypercrosslinked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2022, 387: 132866.
- [27] HUANG X, ZHU P, SUN Q, *et al.* Multi-residue analysis of eight veterinary drugs in buffalo milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anim Prod Sci*, 2023, 63(14): 1435–1444.
- [28] XU X, LV J, ZHOU J, *et al.* Improved matrix purification using a graphene oxide-coated melamine sponge for UPLC-MS/MS-based determination of 37 veterinary drugs in milks [J]. *Anal Method*, 2024, 16: 856–863.
- [29] 董曼曼, 李卓, 张艳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测动物源性食品中 22 种兽药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(6): 6363–6370.
- DONG MM, LI Z, ZHANG Y, *et al.* Simultaneous determination of 22 kinds of veterinary drug residues in animal-derived food by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(6): 6360–6370.
- [30] 周雯鹏, 马腾洲, 清江, 等. 固相萃取一步式净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中 46 种兽药的残留量[J]. *理化检验-化学分册*, 2022, 58(12): 1415–1424.
- ZHOU WP, MA TZ, QING J, *et al.* Simultaneous determination of residues of 46 veterinary drugs in livestock and poultry meat by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with one-step purification of solid phase extraction [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2022, 58(12): 1415–1424.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

### 作者简介



孙梅梅, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品质量安全检测。  
E-mail: 2798886379@qq.com



吴银良, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为农产品中农兽药残留分析。  
E-mail: wupaddyfield@sina.com

中国仪器仪表学会