

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240402005

# 固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定 海参中62种兽药残留

汤水粉<sup>1\*</sup>, 钱卓真<sup>1</sup>, 周佳敏<sup>2</sup>, 王丽娟<sup>1</sup>, 刘海新<sup>1</sup>, 罗方方<sup>1</sup>, 位绍红<sup>1</sup>, 陈燕婷<sup>3</sup>

(1. 福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 厦门 361013;

2. 厦门华夏学院, 厦门 361024; 3. 福建省水产技术推广总站, 福州 350002)

**摘要:** **目的** 建立固相萃取结合高效液相色谱-串联质谱同时测定海参中62种药物的检测方法。**方法** 样品加水分散后经1.0%甲酸乙腈溶液提取, PEP固相萃取柱净化后, 采用Waters X-Bridge-C<sub>18</sub>色谱柱分离、0.2%甲酸水溶液-甲醇为流动相进行梯度洗脱, 使用选择离子监测模式检测。**结果** 62种兽药在0.50~100.00 ng/mL范围内呈现出良好的线性关系, 线性相关系数 $r^2$ 在0.9953~1.0000范围内。方法检出限为0.25~2.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 在3个不同浓度添加水平下, 62种兽药的平均回收率在70.3%~119.0%, 批内和批间的相对标准偏差( $n=5$ )为0.13%~14.90%, 均小于15.00%。将该方法应用于30批次海参样品的检测, 其中4批次样品的喹诺酮检测结果阳性, 检出量为5.30~28.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 与国家标准方法的检测结果相比, 该方法对于本次喹诺酮药物筛查的准确率为100%。**结论** 该方法灵敏度高, 准确度和精密度良好, 满足我国兽药残留检测要求, 可适用于海参中62种兽药多残留的定性定量分析检测。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱-串联质谱法; 海参; 兽药残留

## Determination of 62 kinds of veterinary drug residues in sea cucumber by solid phase extraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry

TANG Shui-Fen<sup>1\*</sup>, QIAN Zhuo-Zhen<sup>1</sup>, ZHOU Jia-Min<sup>2</sup>, WANG Li-Juan<sup>1</sup>, LIU Hai-Xin<sup>1</sup>,  
LUO Fang-Fang<sup>1</sup>, WEI Shao-Hong<sup>1</sup>, CHEN Yan-Ting<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361013, China; 2. Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024, China; 3. Fujian Fisheries Technology Extension Center, Fuzhou 350002, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous determination of 62 kinds of veterinary drugs in sea cucumber by solid phase extraction combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** The sample was extracted with 1.0% formic acid acetonitrile after dispersed with water. After purification by PEP solid-phase extraction column, 62 kinds of veterinary drugs were separated using Waters X-Bridge-C<sub>18</sub> column with 0.2% formic acid aqueous solution and methanol as mobile phase. Detection was performed using selective ion monitoring mode. **Results** The results showed that 62 kinds of veterinary drugs exhibited good linearity in the range of

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2021R1013008, 2021R10130012)

Fund: Supported by the Provincial Basic Public Welfare Research Project of Fujian (2021R1013008)

\*通信作者: 汤水粉, 工程师, 主要研究方向为渔业环境及水产品质量安全。E-mail: powder2005@126.com

\*Corresponding author: TANG Shui-Fen, Engineer, Fisheries Research Institute of Fujian, Dongdu Haishan Road, Xiamen 361013, China. E-mail: powder2005@126.com

0.50–100.00 ng/mL, with a correlation coefficient  $r^2$  in the range of 0.9953–1.0000. The detection limit of the method is 0.25–2.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Recovery test with 3 different addition contents showed the results in the range of 70.3%–119.0%, and all the relative standard deviation RSD ( $n=5$ ) were 0.13%–14.90%, less than 15.00%. At last the method was applied to detection of 30 sea cucumber samples, among which 4 samples contained quinolone with the amount range from 5.30–28.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Compared with the results of national standard method, the accuracy of this method for quinolone drug screening was 100% in this study. **Conclusion** This method has high sensitivity, good accuracy and precision, which meets the requirements of China's veterinary drug residue detection, and can be applied to the qualitative and quantitative detection of 62 kinds of veterinary drug residues in sea cucumbers.

**KEY WORDS:** solid phase extraction; liquid chromatography tandem mass spectrometry; sea cucumber; veterinary drug residues

## 0 引言

海参是无脊椎棘皮动物的一种, 具有很高的营养价值和药用价值, 是我国名贵的海产品之一<sup>[1–2]</sup>。随着海参养殖规模和产量的不断扩大, 为了治疗和预防疾病, 在生产及销售过程中, 存在误用或滥用各种兽药的现象, 如磺胺、喹诺酮、苯并咪唑、性激素类等。这些兽药容易在动物体内蓄积, 引起相应食材的污染。导致药物在人体内蓄积, 使人体产生耐药性、过敏反应或“三致”等危害, 影响人体健康<sup>[3–5]</sup>。因此, 国家越来越重视海参等水产品兽药残留的监管, 保障我国水产品质量安全。

目前, 兽药残留检测方法主要有免疫分析技术、气相色谱法、液相色谱法、液相色谱-串联质谱法等<sup>[6]</sup>。其中液相色谱-串联质谱法由于较强的选择性和较高的灵敏度, 近年来成为兽药残留检测的首选方法<sup>[7–8]</sup>。然而, 兽药的种类很多, 一个样品的多残留检测, 通常需要根据不同的标准方法进行, 导致完成检测所需的时间较长, 效率低。为此, 国内外研究人员致力于兽药残留的高通量筛查技术研究, 并广泛应用到畜<sup>[9–10]</sup>、禽<sup>[11]</sup>等动物肌肉<sup>[12–14]</sup>、乳制品<sup>[15–17]</sup>、鸡蛋<sup>[18]</sup>、水产及干制品<sup>[19–22]</sup>等领域。但是由于残留检测技术存在相对滞后的问题, 回收率偏低, 无法满足检测要求。再加上海参成分比较特殊, 以胶原蛋白为主, 其高度的交联性增加了提取的难度<sup>[2]</sup>。因此, 建立一种高通量的检测方法, 在筛查海参中兽药残留的同时, 其回收率能够满足定量分析检测的要求, 是当前兽药残留监测领域的重点。

本研究以典型兽药磺胺类、喹诺酮类、 $\beta$ -激动剂、苯并咪唑类、性激素类为主要研究对象, 建立一种可同时满足海参中多种兽药残留筛查和定性定量检测要求的高效液相色谱-串联质谱法。本研究检测方法的建立有利于提高检测效率, 降低监管成本, 为国内的检测机构和研究机构提供相关兽药残留检测方法参考, 也为建立水产品中多组分兽药残留检测标准提供技术支持, 对于更好的进行水产品质量安全监管有着重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

海参购于厦门市农贸市场。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Tidea 公司); 氯化钠, 无水硫酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 13 种苯并咪唑类标准混合液、15 种  $\beta$ -激动剂标准混合液、16 种喹诺酮类标准混合液、15 种磺胺类标准混合液、甲睾酮-D3 标准溶液、孕酮-D9 标准溶液、克伦特罗-D9 标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、4 种性激素类标准混合液(10.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )(北京曼哈格生物科技有限公司); 2 种磺胺同位素内标混合液、3 种喹诺酮同位素内标混合液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 天津阿尔塔科技有限公司)。

### 1.2 仪器与设备

TSQ Altis Plus 高效液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾离子源)、HyperSep Retain-PEP 固相萃取柱(60 mg/3 mL)、Thermo Hypersil Gold-C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 3.0  $\mu\text{m}$ )(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Me203e 电子分析天平(精度 0.001 g, 梅特勒-托利多仪器有限公司); DT5-5 型低速台式离心机、GT16-3 医用离心机(北京时代北利离心机有限公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); 3-16R 台式高速冷冻离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司); TGL-16G 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂); DM130A 氮气发生器(上海登晨生物医疗科技有限公司); HSC-24B 水浴氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司); MS3 型旋涡混合器(德国 IKA 公司); Supelco24 固相萃取装置(美国 Supelco 公司); 0.22  $\mu\text{m}$  尼龙微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)。Waters X-Bridge-C<sub>18</sub> 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , 沃特世科技有限公司); Mega BE-C<sub>18</sub> 柱(1 mg/6 mL, 美国 Agilent 公司); 中性氧化铝柱(500 mg/3 mL, 天津欧姆尼基因科技有限公司)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 提取方法

称取 2.00 g(精确至 0.05 g)海参样品至 50 mL 离心管中,

先加入 100  $\mu\text{L}$  内标工作液, 用 0.5 mL 水分散混匀, 再加入 5 mL 的 1.0% 甲酸-乙腈溶液, 涡旋 1 min, 在 4°C 条件下, 以 12000 r/min 转速离心 5 min, 上清液转移至 50 mL 离心管中, 剩余部分再加入 5 mL 的 1.0% 甲酸-乙腈溶液重复提取一次, 合并 2 次上清液。在上清液中加入 4 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , 1 g  $\text{NaCl}$ , 充分漩涡混合, 6000 r/min 离心 4 min, 移取上清液, 待净化。

### 1.3.2 净化方法

固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化, 待溶液自然滴完后取 1 mL 上清液过柱, 弃去, 再取剩余的上清液过柱, 收集滤液, 于 40°C 下氮吹至近干, 用 10% 的乙腈溶液准确定容至 1 mL, 在 15000 r/min 条件下, 离心 5 min, 取上清液过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后上机检测。

### 1.3.3 空白基质溶液的制备

选取不含上述 62 种兽药的海参样品, 按照上述前处理步骤操作, 得到空白基质溶液。

### 1.3.4 标准溶液的配制

混合标准工作液: 准确量取适量各类标准储备液, 用甲醇配制成 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合标准溶液。再用甲醇稀释成 100 ng/mL 的混合标准工作液, -4°C 下避光保存。

混合内标工作液: 准确量取适量各内标储备液, 用甲醇配制成 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的混合内标溶液, 再用甲醇稀释成 100 ng/mL 的混合内标工作液, -4°C 下避光保存。

混合标准溶液系列: 准确吸取适量的混合标准工作液, 分别加入内标工作液 100  $\mu\text{L}$ , 用空白基质液配制成外标质量浓度为 0.50、1.00、2.00、4.00、5.00、10.00、20.00、40.00、100.00 ng/mL, 内标浓度均为 10.00 ng/mL 的混合标准溶液

系列, 上机检测。以质量浓度为横坐标, 药物峰面积或外标与内标的峰面积比值为纵坐标, 采用 Microsoft Excel 2013 处理, 得到各药物相应的标准曲线。

### 1.3.5 仪器条件

X-Bridge- $\text{C}_{18}$  色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 柱温 30°C; 进样体积 2  $\mu\text{L}$ ; 流速 0.3 mL/min; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相 B 为甲醇。梯度洗脱程序: 0~15 min (5%~95% B), 15~17 min (95% B), 17~17.1 min (95%~5% B), 17.1~20 min (5% B)。

电喷雾离子源, 正离子检测模式, 雾化温度 400°C, 离子传输管温度 350°C, 喷雾电压 3500 V, 鞘气 45 psi, 辅助气 1.67 L/min。

## 1.4 数据处理

实验采用 Thermo Xcalibur 4.5 软件采集数据, Thermo Trace Finder 5.1 软件进行标准曲线绘制和定量分析, 最后通过 Microsoft Excel 2013 软件绘制图形。

## 2 结果与分析

### 2.1 仪器工作条件的优化

#### 2.1.1 质谱条件的优化

吸取 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准混合液, 采用蠕动泵以 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  的流速进样, 依次优化电喷雾电压、离子源温度、辅气压力、鞘气压力以及碰撞能量等参数。兼顾各种化合物的综合灵敏度, 选取响应最强的子离子为定量离子, 响应次强的子离子为定性离子, 相关参数见表 1。

表 1 质谱参数

Table 1 MS parameters

| 目标物        | 母离子( $m/z$ ) | 子离子( $m/z$ ) | 碰撞能量/eV   | 对应的内标物  |
|------------|--------------|--------------|-----------|---------|
| 2-氨基氟苯达唑   | 256.1        | 95.1/123.1*  | 42.6/32.1 | 外标法     |
| 5-羟基噻苯咪唑   | 218.1        | 191.0/147.1* | 30.6/38.6 | 外标法     |
| 奥芬达唑       | 316.1        | 159.0/191.0* | 37.6/25.1 | 外标法     |
| 阿苯达唑砒      | 298.1        | 266.1/223.9* | 22.0/31.0 | 外标法     |
| 阿苯达唑亚砒     | 282.1        | 208.0/191.0* | 29.0/27.0 | 外标法     |
| 阿苯达唑-2-氨基砒 | 240.1        | 133.1/198.0* | 34.1/23.1 | 外标法     |
| 芬苯达唑       | 300.1        | 268.0/159.1* | 20.0/35.0 | 外标法     |
| 芬苯达唑砒      | 332.0        | 300.0/159.0* | 26.0/42.0 | 外标法     |
| 坎来达唑       | 303.2        | 217.0/261.0* | 32.1/21.1 | 外标法     |
| 氨基甲苯咪唑     | 238.0        | 77.0/105.0*  | 33.0/24.0 | 外标法     |
| 莱克多巴胺      | 302.2        | 164.1/284.1* | 18.6/14.6 | 克伦特罗-D9 |
| 班布特罗       | 368.3        | 294.1/312.1* | 22.1/16.6 | 克伦特罗-D9 |
| 溴布特罗       | 365.0        | 290.9/212.0* | 23.1/32.0 | 克伦特罗-D9 |
| 西布特罗       | 234.2        | 160.1/216.1* | 18.1/10.1 | 克伦特罗-D9 |
| 克伦特罗       | 277.1        | 203.0/259.0* | 16.9/12.1 | 克伦特罗-D9 |
| 克伦普罗       | 263.1        | 203.0/168.0* | 21.6/32.6 | 克伦特罗-D9 |
| 马布特罗       | 311.1        | 237.0/293.0* | 20.6/13.6 | 克伦特罗-D9 |
| 马贲特罗       | 325.2        | 237.0/217.0* | 20.6/30.6 | 克伦特罗-D9 |
| 喷布特罗       | 292.2        | 236.1/201.1* | 19.1/24.6 | 克伦特罗-D9 |

表 1(续)

| 目标物         | 母离子( $m/z$ ) | 子离子( $m/z$ ) | 碰撞能量/eV   | 对应的内标物      |
|-------------|--------------|--------------|-----------|-------------|
| 苯乙醇胺 A      | 345.2        | 150.1/118.1* | 26.6/34.6 | 外标法         |
| 利托君         | 288.2        | 270.1/121.1* | 15.6/26.6 | 外标法         |
| 妥布特罗        | 228.2        | 154.0/172.0* | 20.1/14.6 | 克伦特罗-D9     |
| 福莫特罗        | 345.2        | 149.1/327.1* | 23.6/15.6 | 克伦特罗-D9     |
| 拉贝特罗        | 329.2        | 311.1/162.0* | 30.1/21.0 | 克伦特罗-D9     |
| 沙美特罗        | 416.3        | 380.2/232.1* | 21.6/25.1 | 克伦特罗-D9     |
| 达氟沙星        | 358.2        | 340.1/314.2* | 15.0/20.0 | 环丙沙星-D8     |
| 双氟沙星        | 400.1        | 299.1/356.1* | 32.0/22.0 | 环丙沙星-D8     |
| 恩诺沙星        | 360.2        | 316.1/342.1* | 21.0/24.0 | 恩诺沙星-D5     |
| 氟罗沙星        | 370.2        | 326.1/269.0* | 22.6/31.1 | 诺氟沙星-D5     |
| 加替沙星        | 376.0        | 332.0/261.0* | 16.0/20.0 | 诺氟沙星-D5     |
| 洛美沙星        | 352.2        | 265.0/308.1* | 27.6/19.6 | 环丙沙星-D8     |
| 马波沙星        | 363.2        | 72.1/320.1*  | 30.0/18.0 | 诺氟沙星-D5     |
| 诺氟沙星        | 320.2        | 302.0/276.1* | 24.0/20.0 | 诺氟沙星-D5     |
| 氧氟沙星        | 362.1        | 318.1/261.1* | 22.0/31.0 | 诺氟沙星-D5     |
| 环丙沙星        | 332.2        | 314.1/231.0* | 23.0/43.0 | 环丙沙星-D8     |
| 奥比沙星        | 396.2        | 352.1/295.0* | 21.1/28.1 | 环丙沙星-D8     |
| 恶唑酸         | 262.0        | 244.0/216.0* | 22.0/34.0 | 恩诺沙星-D5     |
| 培氟沙星        | 334.2        | 316.1/290.1* | 24.6/21.1 | 诺氟沙星-D5     |
| 沙拉沙星        | 386.2        | 368.1/342.1* | 26.0/21.0 | 恩诺沙星-D5     |
| 司帕沙星        | 393.2        | 349.1/292.1* | 22.6/29.1 | 恩诺沙星-D5     |
| 苯甲酰磺胺       | 277.1        | 156.0/92.0*  | 12.6/25.6 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺氯哒嗪       | 285.0        | 156.0/108.0* | 18.0/29.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺吡啶        | 250.1        | 156.0/184.1* | 20.0/22.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺间二甲氧嘧啶    | 311.1        | 156.1/108.1* | 25.0/34.0 | 磺胺间二甲氧嘧啶-D6 |
| 磺胺嘧啶        | 251.1        | 156.0/108.1* | 19.0/29.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶    | 311.1        | 92.1/108.1*  | 34.0/31.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺对甲氧嘧啶     | 281.1        | 156.0/108.1* | 21.0/31.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺二甲氧嘧啶     | 279.1        | 124.1/204.0* | 29.0/21.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺甲噻二唑      | 271.0        | 156.0/108.1* | 18.0/29.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺甲噻唑       | 254.0        | 156.0/92.1*  | 20.0/31.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺甲氧哒嗪      | 281.1        | 156.0/108.1* | 21.0/31.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺间甲氧嘧啶     | 281.1        | 155.9/108.1* | 21.0/30.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺二甲异嘧啶     | 279.1        | 186.0/124.1* | 20.0/27.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 磺胺二甲异噻唑     | 268.1        | 156.0/113.1* | 17.0/20.0 | 磺胺间二甲氧嘧啶-D6 |
| 磺胺苯吡唑       | 315.1        | 158.1/222.1* | 37.1/25.0 | 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 |
| 睾酮          | 289.2        | 97.1/109.1*  | 26.6/28.6 | 甲基睾酮-D3     |
| 美雄酮         | 301.1        | 121.0/149.0* | 26.8/16.4 | 甲基睾酮-D3     |
| 甲基睾酮        | 303.2        | 109.0/97.0*  | 31.1/29.6 | 甲基睾酮-D3     |
| 孕酮          | 315.3        | 97.1/109.1*  | 26.6/29.1 | 孕酮-D9       |
| 克伦特罗-D9     | 286.3        | 204.0        | 17.4      | 内标物         |
| 环丙沙星-D8     | 340.2        | 322.3        | 22.0      | 内标物         |
| 恩诺沙星-D5     | 365.2        | 347.3        | 22.5      | 内标物         |
| 诺氟沙星-D5     | 325.3        | 307.3        | 21.8      | 内标物         |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 | 314.0        | 156.0        | 18.8      | 内标物         |
| 磺胺间二甲氧嘧啶-D6 | 317.1        | 162.1        | 23.8      | 内标物         |
| 甲基睾酮-D3     | 306.2        | 109.2        | 29.3      | 内标物         |
| 孕酮-D9       | 324.3        | 100.1        | 25.2      | 内标物         |

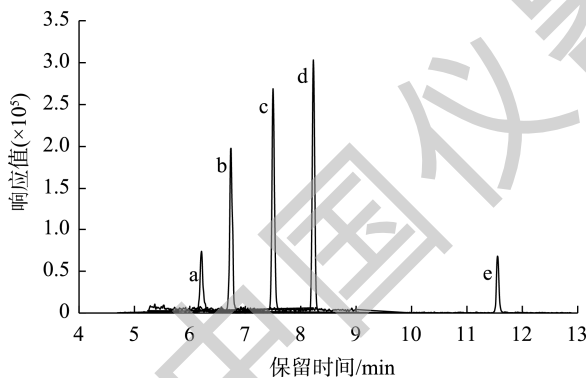
注: \*为定性离子。

### 2.1.2 色谱柱的选择

常用的色谱柱有正相色谱柱和反相色谱柱, 兽药残留分析使用较多的是反相色谱柱。本研究比较了 Thermo Hypersil Gold-C<sub>18</sub> (150 mm×2.1 mm, 3.0 μm)和 Waters X Bridge-C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 3.5 μm)两种色谱柱对目标物的分离效果。当使用 Thermo Hypersil Gold-C<sub>18</sub> 柱时, 62 种化合物无法达到有效的分离, 而使用 Waters X Bridge-C<sub>18</sub> 柱对 62 种目标物的分离效果优于 Thermo Hypersil Gold-C<sub>18</sub> 柱, 因此选用 X bridge-C<sub>18</sub> 柱作进一步优化。

### 2.1.3 流动相的选择

乙腈、甲醇和水溶液是色谱分离常用的流动相。本研究分别比较了水-乙腈和水-甲醇作为流动相对目标物分离度的影响。结果表明, 水-甲醇体系对于目标化合物具有更高的色谱分离度。这可能是由于乙腈的洗脱能力较强, 部分目标物洗脱过快而达不到理想的分离效果。另外, 在流动相中加入甲酸, 可提供电喷雾离子源在四极杆内离子化所需的氢离子, 促进化合物在离子源内离子化, 提高检测灵敏度<sup>[23]</sup>。因此, 本研究分别在水溶液中加入 0.20%的甲酸和 0.05%的甲酸。结果表明, 0.20%的甲酸水溶液-甲醇能有效改善峰型, 对称性好, 峰型尖锐, 无裂峰、拖尾等现象; 甲酸浓度降至 0.05%时, 虽然大部分化合物峰型较好, 但是部分化合物仍存在拖尾、肩峰、响应值低的现象。因此本研究选择 0.20%甲酸水溶液-甲醇作为流动相。图 1 是在优化的仪器条件下部分化合物的标准色谱图。



注: a: 环丙沙星; b: 克林特罗; c: 磺胺间二甲氧嘧啶; d: 2-氨基氟苯达唑; e: 睾酮。

图1 部分标准品(5 ng/mL)选择离子流图

Fig.1 Selected reaction monitoring chromatograms of the derivative of several standard (5 ng/mL)

## 2.2 提取方法优化

### 2.2.1 提取溶剂的选择

现有的研究中, 甲醇、乙腈和乙酸乙酯常被用来作为兽药残留的提取溶剂。其中甲醇属于强极性溶剂, 提取过程中会带出较多的杂质, 净化困难; 乙酸乙酯的极性较弱, 是很多化合物的常用提取溶剂, 但是无法覆盖本研究全部

化合物的提取; 而乙腈极性范围较宽, 穿透组织能力强, 对蛋白质等杂质有较好的沉淀效果, 同时对本研究中所涉及的磺胺类、喹诺酮类、苯并咪唑类、 $\beta$ -激动剂、性激素类等 5 类药物均有较好的溶解性, 所以乙腈为本研究较适合的提取溶剂<sup>[24-26]</sup>。考虑到很多化合物在海参体内与胶原蛋白具有较强的结合作用, 增加了提取的难度, 需要加适量的酸进行水解<sup>[24]</sup>。如  $\beta$ -激动剂, 采用酸水解法可实现畜禽肉等动物源食品中  $\beta$ -受体激动剂类药物的定量检测分析<sup>[27-28]</sup>; 而磺胺类、喹诺酮类兽药均呈酸碱两性, 在酸性提取溶剂下, 也更易被萃取<sup>[29-30]</sup>。因此本研究采用甲酸乙腈溶液作为提取剂。由于海参成分以胶原蛋白为主, 具有较高的交联性, 因此在提取之前, 加入水相, 对样品进行基质分散, 有利于提取液更好地渗透到样品组织。同时, 水相可以调整提取液极性, 有利于极性较大的兽药的提取<sup>[31]</sup>。

本研究通过调整体积比, 考察 0.07%、0.25%、0.50%、1.00%等不同浓度的甲酸-乙腈溶液对 62 种化合物的提取效果。结果表明, 浓度为 1.00%的甲酸乙腈溶液作为提取剂的情况下效果最好(图 2)。因此, 选用对于绝大多数目标化合物提取回收率较高的 1.00%甲酸-乙腈溶液作为提取溶液。随后在提取液中加入无水硫酸钠和氯化钠, 以达到脱水 and 盐析作用, 进一步将提取液中大量的杂质沉淀于水相, 减少杂质干扰<sup>[32]</sup>。

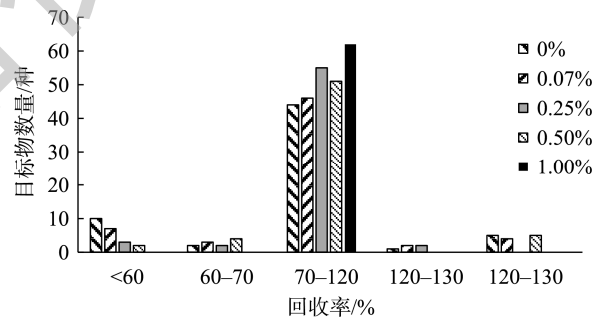


图2 提取剂对兽药提取回收率的影响

Fig.2 Effects of extractants on the extraction recovery of veterinary drug

### 2.2.2 净化方法的选择

本研究比较了 QuEChERS 净化粉以及 C<sub>18</sub>、PEP 和中性氧化铝 3 种固相萃取柱的净化效果。结果显示, 不同净化方法对 62 种兽药回收率有显著的影响: 直接使用 QuEChERS 粉包净化时回收率低, 这可能与 QuEChERS 粉包的壁面损失和吸附作用有关<sup>[24]</sup>; 而中性氧化铝对目标物有一定的吸附作用, 导致回收率最低, 大部分回收率 70.0%以下<sup>[33-34]</sup>; C<sub>18</sub>和 PEP 的净化效果明显增加, 回收率均在 70.0%~120.0%之间。但 C<sub>18</sub>净化时峰型较差, 个别组分有肩峰, 可能是净化不彻底导致的杂质干扰。而 PEP 作为吸附剂时, 清除掉样品中的大部分蛋白质、脂肪及磷脂干扰物, 同时可以降低质谱分析中的基质效应, 不仅净化效果

好, 而且峰形好。因此, 最终选择 PEP 柱进行净化。

### 2.3 样品基质效应的消除

由于生物样品中存在的有机或无机成分较复杂, 可能会直接影响目标物的离子化效率, 导致离子增强或抑制, 即基质效应。为了消除基质效应, 本研究采用空白样品提取液来配制标准曲线, 以提高定量准确度。

### 2.4 方法学验证

#### 2.4.1 线性方程和检出限

按照设定的仪器条件对系列标准溶液进行检测, 分别以各组分的峰面积或峰面积比值( $Y$ )为纵坐标, 目标化合物的质量浓度( $X$ , ng/mL)为横坐标绘制标准曲线。结果如表 2 所示, 在系列浓度范围内, 62 种兽药均呈现出良好的线性, 相关系数( $r^2$ )为 0.9953~1.0000。以 3 倍信噪比确定检出限, 62 种兽药检出限范围在 0.25~2.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

#### 2.4.2 回收率和精密度

称取 2.00 g(精确至 0.05 g)匀浆后的海参样品, 加入适量的混合药物标准工作液和 100  $\mu\text{L}$  内标工作液, 使加标量分别为检出限、2.50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 5.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3 个不同的加标量水平, 然后按同样的样品前处理方法进行提取、净化以及高效液相色谱-串联质谱检测, 计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。每个添加水平平行测定 5 次( $n=5$ ), 考察方法的准确度及精密度, 所得结果见表 3。

62 种兽药的平均回收率在 70.3%~119.0%, 批内 RSD ( $n=5$ )为 0.13%~14.70%。同时选取加标量为 5.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  进行方法重现性考察, 批间 RSD ( $n=5$ )为 1.74%~14.90%。该方法加标回收率、批内 RSD、批间 RSD 均符合当前水产品兽药残留检测标准要求, 表明该方法具有较好的精密度和稳定性, 可应用于大批量海参样品中多兽药残留分析检测。

表 2 线性方程和检出限  
Table 2 Linear equations and detection limit

| 目标物        | 线性范围/(ng/mL) | 线性方程  | 相关系数   | 检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |
|------------|--------------|---|--------|---------------------------------|
| 2-氨基氟苯达唑   | 0.50~40.00   | $Y=1.09 \times 10^5 X - 1.41 \times 10^4$       | 0.9999 | 0.25                            |
| 5-羟基噻苯唑啉   | 1.00~40.00   | $Y=2.41 \times 10^5 X - 2.96 \times 10^4$       | 0.9997 | 0.50                            |
| 阿苯达唑砒      | 1.00~40.00   | $Y=3.13 \times 10^5 X + 7.84 \times 10^3$       | 0.9998 | 0.50                            |
| 阿苯达唑亚砒     | 4.00~100.00  | $Y=2.40 \times 10^4 X - 1.94 \times 10^3$       | 0.9978 | 2.00                            |
| 阿苯达唑-2-氨基砒 | 0.50~40.00   | $Y=1.48 \times 10^5 X + 4.18 \times 10^3$       | 0.9996 | 0.25                            |
| 芬苯达唑       | 0.50~40.00   | $Y=2.83 \times 10^5 X + 1.69 \times 10^4$       | 1.0000 | 0.25                            |
| 芬苯达唑砒      | 1.00~40.00   | $Y=4.28 \times 10^4 X - 1.16 \times 10^4$       | 0.9994 | 0.50                            |
| 奥芬达唑       | 0.50~40.00   | $Y=8.49 \times 10^4 X - 1.40 \times 10^4$       | 0.9997 | 0.25                            |
| 丙氧苯咪唑      | 0.50~40.00   | $Y=2.74 \times 10^5 X - 3.30 \times 10^4$       | 0.9999 | 0.25                            |
| 坎来达唑       | 0.50~40.00   | $Y=1.55 \times 10^5 X - 2.12 \times 10^4$       | 0.9999 | 0.25                            |
| 氟苯达唑       | 1.00~40.00   | $Y=1.09 \times 10^5 X - 1.41 \times 10^4$       | 0.9999 | 0.50                            |
| 氨基甲苯咪唑     | 0.50~40.00   | $Y=9.96 \times 10^4 X - 9.17 \times 10^3$       | 0.9997 | 0.25                            |
| 甲苯咪唑       | 0.50~40.00   | $Y=1.60 \times 10^5 X - 1.44 \times 10^4$       | 0.9999 | 0.25                            |
| 班布特罗       | 0.50~40.00   | $Y=8.36 \times 10^{-2} X + 7.65 \times 10^{-3}$ | 0.9996 | 0.25                            |
| 溴布特罗       | 2.00~100.00  | $Y=1.13 \times 10^{-2} X + 1.86 \times 10^{-4}$ | 0.9986 | 1.00                            |
| 西布特罗       | 0.50~40.00   | $Y=5.11 \times 10^{-2} X + 8.14 \times 10^{-3}$ | 0.9992 | 0.25                            |
| 克伦特罗       | 1.00~40.00   | $Y=3.59 \times 10^{-2} X + 7.59 \times 10^{-3}$ | 0.9994 | 0.50                            |
| 克伦普罗       | 2.00~100.00  | $Y=9.32 \times 10^{-3} X + 3.51 \times 10^{-3}$ | 0.9989 | 1.00                            |
| 马布特罗       | 0.50~40.00   | $Y=5.36 \times 10^{-2} X + 6.50 \times 10^{-3}$ | 0.9995 | 0.25                            |
| 马贲特罗       | 0.50~40.00   | $Y=5.61 \times 10^{-2} X + 8.29 \times 10^{-3}$ | 0.9992 | 0.25                            |
| 喷布特罗       | 0.50~40.00   | $Y=6.67 \times 10^{-2} X + 9.92 \times 10^{-3}$ | 0.9991 | 0.25                            |
| 苯乙醇胺 A     | 1.00~40.00   | $Y=3.35 \times 10^4 X - 6.07 \times 10^3$       | 0.9993 | 0.50                            |
| 莱克多巴胺      | 1.00~40.00   | $Y=2.62 \times 10^{-2} X + 8.23 \times 10^{-3}$ | 0.9953 | 0.50                            |
| 利托君        | 1.00~40.00   | $Y=9.40 \times 10^4 X - 7.63 \times 10^3$       | 0.9997 | 0.50                            |
| 福莫特罗       | 1.00~40.00   | $Y=1.58 \times 10^5 X + 3.06 \times 10^4$       | 0.9993 | 0.50                            |
| 拉贝特罗       | 2.00~100.00  | $Y=3.26 \times 10^{-2} X + 3.51 \times 10^{-3}$ | 0.9991 | 1.00                            |
| 沙美特罗       | 2.00~100.00  | $Y=1.57 \times 10^{-2} X + 5.15 \times 10^{-4}$ | 0.9996 | 1.00                            |
| 妥布特罗       | 0.50~40.00   | $Y=7.33 \times 10^{-2} X - 7.01 \times 10^{-3}$ | 0.9990 | 0.25                            |
| 达氟沙星       | 5.00~100.00  | $Y=2.67 \times 10^{-2} X + 2.14 \times 10^{-2}$ | 0.9983 | 2.50                            |
| 双氟沙星       | 4.00~100.00  | $Y=2.88 \times 10^{-2} X + 8.38 \times 10^{-3}$ | 0.9985 | 2.00                            |
| 恩诺沙星       | 2.00~100.00  | $Y=5.79 \times 10^{-2} X + 3.73 \times 10^{-2}$ | 0.9955 | 1.00                            |
| 氟罗沙星       | 4.00~100.00  | $Y=5.31 \times 10^{-2} X + 1.51 \times 10^{-2}$ | 0.9994 | 2.00                            |
| 加替沙星       | 4.00~100.00  | $Y=3.33 \times 10^{-2} X + 2.31 \times 10^{-2}$ | 0.9968 | 2.00                            |
| 洛美沙星       | 4.00~100.00  | $Y=6.00 \times 10^{-2} X + 3.67 \times 10^{-2}$ | 0.9977 | 2.00                            |
| 马波沙星       | 4.00~100.00  | $Y=3.79 \times 10^{-2} X + 3.77 \times 10^{-3}$ | 0.9978 | 2.00                            |

表 2(续)

| 目标物      | 线性范围/(ng/mL) | 线性方程  | 相关系数   | 检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) |
|----------|--------------|---|--------|---------------------------------|
| 诺氟沙星     | 4.00~100.00  | $Y=4.08 \times 10^{-2} X + 3.15 \times 10^{-2}$ | 0.9971 | 2.00                            |
| 氧氟沙星     | 2.00~100.00  | $Y=6.67 \times 10^{-2} X + 2.21 \times 10^{-2}$ | 0.9989 | 1.00                            |
| 环丙沙星     | 2.00~100.00  | $Y=3.23 \times 10^{-4} X + 3.96 \times 10^{-4}$ | 0.9984 | 1.00                            |
| 奥比沙星     | 2.00~100.00  | $Y=7.93 \times 10^{-2} X + 6.81 \times 10^{-3}$ | 0.9990 | 1.00                            |
| 恶喹酸      | 2.00~100.00  | $Y=0.17 X - 0.15$                               | 0.9981 | 1.00                            |
| 培氟沙星     | 4.00~100.00  | $Y=8.09 \times 10^{-2} X - 1.83 \times 10^{-3}$ | 0.9993 | 2.00                            |
| 沙拉沙星     | 4.00~100.00  | $Y=4.92 \times 10^{-2} X + 1.97 \times 10^{-2}$ | 0.9981 | 2.00                            |
| 司帕沙星     | 4.00~100.00  | $Y=5.87 \times 10^{-2} X + 2.21 \times 10^{-2}$ | 0.9983 | 2.00                            |
| 苯甲酰磺胺    | 1.00~40.00   | $Y=4.10 \times 10^{-2} X + 4.68 \times 10^{-3}$ | 0.9991 | 0.50                            |
| 磺胺氯哒嗪    | 4.00~100.00  | $Y=1.69 \times 10^{-2} X + 3.79 \times 10^{-3}$ | 0.9994 | 2.00                            |
| 磺胺嘧啶     | 4.00~100.00  | $Y=1.82 \times 10^{-2} X + 2.89 \times 10^{-3}$ | 0.9997 | 2.00                            |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 4.00~100.00  | $Y=6.02 \times 10^{-2} X - 1.38 \times 10^{-2}$ | 0.9989 | 2.00                            |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶 | 2.00~100.00  | $Y=3.48 \times 10^{-2} X + 8.79 \times 10^{-4}$ | 0.9999 | 1.00                            |
| 磺胺对甲氧嘧啶  | 2.00~100.00  | $Y=2.19 \times 10^{-2} X + 4.61 \times 10^{-3}$ | 0.9971 | 1.00                            |
| 磺胺二甲嘧啶   | 1.00~40.00   | $Y=5.53 \times 10^{-2} X + 5.36 \times 10^{-3}$ | 0.9997 | 0.50                            |
| 磺胺甲噻二唑   | 2.00~100.00  | $Y=2.07 \times 10^{-2} X + 2.27 \times 10^{-3}$ | 0.9996 | 1.00                            |
| 磺胺甲噁唑    | 4.00~100.00  | $Y=1.36 \times 10^{-2} X + 6.96 \times 10^{-3}$ | 0.9967 | 2.00                            |
| 磺胺甲氧哒嗪   | 2.00~100.00  | $Y=2.31 \times 10^{-2} X - 1.50 \times 10^{-3}$ | 0.9984 | 1.00                            |
| 磺胺间甲氧嘧啶  | 4.00~100.00  | $Y=1.95 \times 10^{-2} X + 3.51 \times 10^{-3}$ | 0.9986 | 2.00                            |
| 磺胺苯吡唑    | 4.00~100.00  | $Y=1.96 \times 10^{-2} X + 2.87 \times 10^{-3}$ | 0.9993 | 2.00                            |
| 磺胺吡啶     | 5.00~100.00  | $Y=2.49 \times 10^{-2} X + 4.21 \times 10^{-3}$ | 0.9990 | 2.50                            |
| 磺胺二甲异嘧啶  | 2.00~100.00  | $Y=3.50 \times 10^{-2} X + 6.50 \times 10^{-3}$ | 0.9994 | 1.00                            |
| 磺胺二甲异噁唑  | 4.00~100.00  | $Y=5.23 \times 10^{-2} X - 2.12 \times 10^{-2}$ | 0.9972 | 2.00                            |
| 睾酮       | 2.00~100.00  | $Y=6.31 \times 10^{-2} X + 7.34 \times 10^{-3}$ | 0.9996 | 1.00                            |
| 美雄酮      | 2.00~100.00  | $Y=2.22 \times 10^{-4} X - 4.54 \times 10^{-3}$ | 0.9997 | 1.00                            |
| 甲基睾丸酮    | 2.00~100.00  | $Y=4.00 \times 10^{-2} X + 8.20 \times 10^{-3}$ | 0.9993 | 1.00                            |
| 孕酮       | 4.00~100.00  | $Y=3.45 \times 10^{-2} X + 1.36 \times 10^{-3}$ | 0.9976 | 2.00                            |

表 3 62 种兽药的回收率和相对标准偏差(%)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of 62 kinds of veterinary drug (%)

| 目标物        | 检出限加标 |       | 2.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |      | 5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |      | 批间 RSD |
|------------|-------|-------|------------------------------|------|------------------------------|------|--------|
|            | 回收率   | RSD   | 回收率                          | RSD  | 回收率                          | RSD  |        |
| 2-氨基氟苯达唑   | 88.2  | 0.13  | 77.6                         | 1.86 | 85.3                         | 1.13 | 13.50  |
| 5-羟基噻苯哒唑   | 99.3  | 13.90 | 70.8                         | 5.09 | 99.5                         | 0.54 | 13.00  |
| 阿苯达唑砒      | 88.0  | 14.40 | 78.8                         | 0.98 | 102.0                        | 0.44 | 6.28   |
| 阿苯达唑亚砒     | 76.4  | 4.99  | 82.2                         | 6.08 | 108.0                        | 0.56 | 13.00  |
| 阿苯达唑-2-氨基砒 | 80.3  | 14.60 | 70.8                         | 3.54 | 91.7                         | 0.58 | 12.30  |
| 芬苯达唑       | 79.4  | 6.72  | 80.3                         | 6.84 | 79.6                         | 1.58 | 14.70  |
| 芬苯达唑砒      | 113.0 | 3.49  | 82.5                         | 3.44 | 102.0                        | 1.02 | 13.20  |
| 奥芬达唑       | 99.3  | 7.26  | 81.3                         | 1.81 | 118.0                        | 0.49 | 6.41   |
| 丙氧苯咪唑      | 95.7  | 7.62  | 78.7                         | 1.58 | 71.1                         | 0.77 | 11.20  |
| 坎来达唑       | 94.3  | 11.60 | 80.9                         | 2.01 | 82.6                         | 0.63 | 14.70  |
| 氟苯达唑       | 75.3  | 14.30 | 74.3                         | 2.60 | 85.2                         | 1.47 | 13.40  |
| 氨基甲苯咪唑     | 81.6  | 8.65  | 75.7                         | 4.37 | 88.3                         | 0.93 | 13.20  |
| 甲苯咪唑       | 89.0  | 7.22  | 79.4                         | 2.94 | 89.6                         | 1.59 | 14.10  |
| 班布特罗       | 99.1  | 10.80 | 114.0                        | 1.39 | 93.4                         | 0.44 | 12.80  |
| 溴布特罗       | 100.0 | 8.30  | 88.7                         | 3.87 | 97.7                         | 0.43 | 6.60   |
| 西布特罗       | 79.1  | 13.60 | 99.5                         | 6.44 | 107.0                        | 0.55 | 10.40  |
| 克伦特罗       | 92.0  | 8.07  | 104.0                        | 2.67 | 90.0                         | 0.36 | 3.64   |
| 克伦普罗       | 98.2  | 11.90 | 109.0                        | 7.11 | 104.0                        | 0.48 | 13.90  |
| 马布特罗       | 94.8  | 6.12  | 110.0                        | 3.45 | 92.3                         | 0.28 | 12.10  |
| 马贲特罗       | 90.6  | 5.55  | 109.0                        | 1.40 | 91.3                         | 0.30 | 1.74   |
| 喷布特罗       | 82.2  | 6.99  | 111.0                        | 5.52 | 78.4                         | 1.62 | 14.00  |

表 3(续)

| 目标物      | 检出限加标 |       | 2.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |       | 5.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ |      | 批间 RSD |
|----------|-------|-------|------------------------------|-------|------------------------------|------|--------|
|          | 回收率   | RSD   | 回收率                          | RSD   | 回收率                          | RSD  |        |
| 苯乙醇胺 A   | 99.9  | 6.21  | 79.0                         | 4.23  | 84.1                         | 1.36 | 12.40  |
| 莱克多巴胺    | 85.7  | 6.30  | 93.0                         | 14.70 | 98.8                         | 0.63 | 7.07   |
| 利托君      | 87.3  | 9.38  | 74.0                         | 3.85  | 78.6                         | 0.49 | 12.70  |
| 妥布特罗     | 87.8  | 12.20 | 101.0                        | 4.18  | 85.7                         | 0.25 | 14.00  |
| 福莫特罗     | 74.6  | 11.00 | 104.0                        | 4.90  | 82.1                         | 1.36 | 10.50  |
| 拉贝特罗     | 97.3  | 11.50 | 106.0                        | 4.65  | 97.5                         | 0.45 | 6.24   |
| 沙美特罗     | 99.0  | 14.50 | 107.0                        | 6.00  | 91.8                         | 1.94 | 12.90  |
| 达氟沙星     | 99.3  | 7.34  | 99.3                         | 7.34  | 98.9                         | 0.38 | 13.70  |
| 双氟沙星     | 70.3  | 7.15  | 103.0                        | 8.54  | 86.2                         | 0.87 | 10.60  |
| 恩诺沙星     | 103.0 | 14.60 | 108.0                        | 3.97  | 94.0                         | 0.58 | 7.90   |
| 氟罗沙星     | 101.0 | 7.07  | 102.0                        | 4.43  | 94.3                         | 0.97 | 10.60  |
| 加替沙星     | 96.7  | 7.09  | 96.7                         | 7.09  | 92.3                         | 0.86 | 3.54   |
| 洛美沙星     | 77.3  | 2.70  | 93.0                         | 0.33  | 94.1                         | 7.59 | 12.90  |
| 马波沙星     | 80.2  | 10.30 | 92.6                         | 8.45  | 84.0                         | 0.99 | 12.60  |
| 诺氟沙星     | 84.1  | 7.51  | 114.0                        | 5.21  | 98.5                         | 0.46 | 14.60  |
| 氧氟沙星     | 79.3  | 9.27  | 101.0                        | 4.32  | 94.0                         | 0.98 | 11.20  |
| 环丙沙星     | 109.0 | 5.46  | 110.0                        | 4.24  | 103.0                        | 0.75 | 11.40  |
| 奥比沙星     | 91.3  | 8.91  | 87.3                         | 3.84  | 90.9                         | 0.67 | 7.81   |
| 恶唑酸      | 75.5  | 4.51  | 80.1                         | 10.20 | 100.0                        | 0.36 | 12.90  |
| 培氟沙星     | 88.8  | 7.30  | 114.0                        | 5.52  | 93.4                         | 0.63 | 11.20  |
| 沙拉沙星     | 87.8  | 10.50 | 101.0                        | 11.50 | 101.0                        | 0.91 | 12.50  |
| 司帕沙星     | 82.8  | 8.70  | 85.5                         | 12.50 | 91.0                         | 0.62 | 14.60  |
| 苯甲酰磺胺    | 99.0  | 7.45  | 113.0                        | 9.02  | 95.3                         | 1.15 | 8.65   |
| 磺胺氯吡嗪    | 95.1  | 6.76  | 104.0                        | 5.13  | 102.0                        | 0.75 | 10.10  |
| 磺胺嘧啶     | 103.0 | 2.87  | 107.0                        | 5.33  | 116.0                        | 0.46 | 4.40   |
| 磺胺间二甲氧嘧啶 | 111.0 | 2.10  | 115.0                        | 5.54  | 106.0                        | 0.43 | 8.16   |
| 磺胺邻二甲氧嘧啶 | 107.0 | 6.56  | 112.0                        | 4.65  | 108.0                        | 0.61 | 9.05   |
| 磺胺对甲氧嘧啶  | 95.5  | 12.20 | 98.5                         | 7.28  | 102.0                        | 1.18 | 14.90  |
| 磺胺二甲嘧啶   | 114.0 | 2.20  | 114.0                        | 1.72  | 77.1                         | 0.35 | 5.01   |
| 磺胺甲噻二唑   | 99.2  | 6.60  | 98.7                         | 10.20 | 91.0                         | 1.34 | 14.40  |
| 磺胺甲噁唑    | 98.8  | 9.01  | 119.0                        | 3.20  | 112.0                        | 0.91 | 10.50  |
| 磺胺甲氧吡嗪   | 104.0 | 6.90  | 96.6                         | 11.20 | 92.8                         | 1.05 | 14.00  |
| 磺胺间甲氧嘧啶  | 92.2  | 11.50 | 100.0                        | 10.20 | 95.8                         | 1.15 | 14.60  |
| 磺胺苯吡唑    | 103.0 | 6.86  | 109.0                        | 4.43  | 95.9                         | 1.19 | 10.90  |
| 磺胺吡啶     | 97.6  | 6.44  | 97.6                         | 6.44  | 105.0                        | 1.24 | 14.50  |
| 磺胺二甲异嘧啶  | 102.0 | 13.00 | 94.9                         | 10.60 | 110.0                        | 1.52 | 13.20  |
| 磺胺二甲异噁唑  | 103.0 | 5.26  | 96.7                         | 10.40 | 84.8                         | 1.90 | 13.00  |
| 睾酮       | 74.7  | 5.02  | 117.0                        | 3.90  | 104.0                        | 1.23 | 12.60  |
| 美雄酮      | 91.3  | 5.25  | 103.0                        | 8.87  | 97.5                         | 0.80 | 12.40  |
| 甲基睾丸酮    | 103.0 | 2.05  | 111.0                        | 3.27  | 103.0                        | 0.39 | 14.10  |
| 孕酮       | 106.0 | 2.54  | 115.0                        | 3.62  | 105.0                        | 0.39 | 7.09   |

## 2.5 实际样品分析

应用本研究建立的检测方法, 抽取 30 批次海参样品进行兽药残留分析。4 批次样品的喹诺酮检测结果阳性, 其中 2 批次样品检出环丙沙星, 含量分别为 11.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 28.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 2 批次样品检出氧氟沙星, 分别为 5.30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 19.20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。同时采用国家标准方法农业部 1077 号公告-1-2008 对 30 批次海参样品中的喹诺酮类药物残留进行

分析, 4 批次样品的检测结果阳性。通过与标准方法的检测结果比对发现, 该方法对本次喹诺酮药物残留的筛查准确率为 100%。

## 3 结论

本研究提出了 QuEChERS 固相萃取结合高效液相色谱-串联质谱同时测定海参样品中 62 种兽药定性定量分析



检测的方法。该方法前处理简单,准确度高,与传统的兽药筛查方法相比,弥补了方法回收率低的不足;将该方法应用于海参样品的测定,同时采用国家标准方法对检测结果进行验证,结果表明该方法对于本次喹诺酮类药物残留的筛查准确率为 100%,可为日常海参样品中多种兽药残留的快速定性定量检测分析提供实用的方法参考。但是由于方法的局限性,对于青霉素类和头孢类等药物,提取效果并不理想,因此需要对其进行进一步调整和完善,达到同时提取更多目标物的目的,以期水产品中的兽药残留检测提供更高效的方法。

### 参考文献

- [1] 侯虎, 孙江, 薛长湖, 等. 海参胶原纤维形态及胶原蛋白理化性质研究[J]. 现代食品科技, 2013, 299(7): 1491-1495.  
HOU H, SUN J, XUE CH, *et al.* Collagen fibers morphology and physical and chemical properties of collagen of sea cucumber [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, 299(7): 1491-1495.
- [2] 肖枫, 曾名勇, 董士远, 等. 海参胶原蛋白的研究进展[J]. 水产科学, 2005, 24(3): 39-41.  
XIAO F, ZENG MY, DONG SY, *et al.* Research progress in sea cucumber collagen [J]. Fish Sci, 2005, 24(3): 39-41.
- [3] 张桂云, 杨伟强, 林振宇. 分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法检测水产品中多种兽药残留[J]. 福州大学学报(自然科学版), 2019, 47(3): 424-429, 434.  
ZHANG GY, YANG WQ, LIN ZY. Determination of multiple veterinary drug residues in aquatic products based on the combination of DSPE method and UPLC-MS/MS [J]. J Fuzhou Univ (Nat Sci Ed), 2019, 47(3): 424-429, 434.
- [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.  
TAN 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] WU HT, ZHAO JF, WAN JQ. A review of veterinary drug residue detection: Recent advancements, challenges and future directions [J]. Sustain, 2023, 15: 10413.
- [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.* Determination of 64 veterinary drug residues in aquatic products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2017, 35(12): 1266-1275.
- [7] JONGEDIJK E, FIFEIK M, STERK S, *et al.* Use of high-resolution mass spectrometry for veterinary drug multi-residue analysis [J]. Food Control, 2023, 145: 109-488.
- [8] 汤水粉, 钱卓真, 位绍红, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中硝基咪唑类药物残留量[J]. 渔业研究, 2022, 44(1): 60-68.  
TANG SF, QIAN ZZ, WEI SH, *et al.* Determination of nitroimidazole drug residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS) [J]. J Fish Res, 2022, 44(1): 60-68.
- [9] KHALED A, BELINATO JR, PAWLISZYN J. Rapid and high-throughput screening of multi-residue pharmaceutical drugs in bovine tissue using solid phase microextraction and direct analysis in real time-tandem mass spectrometry (SPME-DART-MS/MS) [J]. Talanta, 2020, 217: 121095
- [10] LI XW, CHI QC, XIA SJ, *et al.* Untargeted multi-residue method for the simultaneous determination of 141 veterinary drugs and their metabolites in pork by high-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2020, 1634: 461671.
- [11] KHALED A, GIONFRIDDO E, SINGH V, *et al.* Development and validation of a fully automated solid phase microextraction high throughput method for quantitative analysis of multiresidue veterinary drugs in chicken tissue [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1056: 34-46.
- [12] 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 WL, 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 (Pt B: Chem Anal), 2022, 58(12): 1415-1424.
- [13] 郭添荣, 万渝平, 孙利, 等. 通过式固相萃取结合超高效液相色谱-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查畜禽肉中 108 种兽药残留[J]. 分析化学, 2022, 50(2): 271-277.  
GUO TR, WAN YP, SUN L, *et al.* Rapid screening and confirmation of 108 kinds of veterinary drug residues in livestock and poultry meat by solid phase extraction purification and liquid chromatography coupled with quadrupole/orbitrap mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2022, 50(2): 271-277.
- [14] ZHU YJ, JIANG X, SHEN DN, *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.
- [15] ZHU WX, YANG JZ, WANG ZX, *et al.* Rapid determination of 88 veterinary drug residues in milk using automated turborflow online clean-up mode coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2016, 48: 401-411.
- [16] 张炯恺. 高效液相色谱-串联质谱法快速测定乳制品中 90 种兽药的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 1076-1081.  
ZHANG JK. Rapid determination of 90 veterinary drug residues in dairy products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(4): 1076-1081.
- [17] KENJERIC L, SULYOK M, MALACHOVA A, *et al.* Development and validation of an LC-MS/MS multi-class method for the determination of 15 different classes of veterinary drug residues in milk and poultry feed [J]. Food Chem, 2024: 138834.
- [18] 方从容, 高洁, 王雨昕, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 125 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119-1131.  
FANG CR, GAO J, WANG YX, *et al.* Determination of 125 veterinary drugs residues in eggs by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(11): 1119-1131.
- [19] 王强, 王旭峰, 蔡楠, 等. 同位素稀释/超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法测定牛蛙中 50 种兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2023,

- 14(1): 187–195.
- WANG Q, WANG XF, CAI N, *et al.* Determination of 50 kinds of veterinary drug residues in *Rana catesbiana* by isotope dilution/ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(1): 187–195.
- [20] 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.* Simultaneous determination of 15 categories and 107 kinds of veterinary drugs in aquatic products by pass-through purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(22): 8240–8246.
- [21] LI JC, ZHOU RD, YANG GG, *et al.* Novel filter-press single-step cleanup approach facilitated rapid screening and accurate quantification of 112 veterinary drugs in aquatic products [J]. *Food Chem*, 2023, 19: 100846.
- [22] TURNIPSEED SB, STOREY JM, MADSON MR, *et al.* Application and evaluation of a high-resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug residues in incurred fish and imported aquaculture samples [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410: 5529–5544.
- [23] 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.
- [24] 卞华, 秦宇, 虞成华, 等. 复合式提取净化体系结合超高效液相色谱-串联质谱法检测畜禽肉中 120 种抗生素药物残留[J]. *色谱*, 2019, 37(2): 162–176.
- BIAN H, QIN Y, YU CH, *et al.* Simultaneous determination of 120 veterinary antibiotics in meat by combined pretreatment system coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(2): 162–176.
- [25] 张林田, 陆奕娜, 黄学泓, 等. 通过式净化-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 42 种兽药残留[J]. *分析科学学报*, 2020, 36(1): 81–87.
- ZHANG LT, LU YN, HUANG XH, *et al.* Determination of 42 kind of veterinary drug residues in animal derived products by passing purification-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Anal Sci*, 2020, 36(1): 81–87.
- [26] 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.* System of simultaneous extraction and cleaning of 99 veterinary drugs in food [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(6): 506–517.
- [27] 冯月超, 王建凤, 侯帆, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中 44 种食源性兴奋剂和 6 种孕激素[J]. *色谱*, 2022, 40(5): 409–422.
- FENG YC, WANG JF, HOU F, *et al.* Determination of 44 foodborne stimulants and 6 progestogens in meat by QuEChERS and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2022, 40(5): 409–422.
- [28] 刘新辉, 马小岭, 季秋红. 超高效液相色谱-串联质谱法检测动物源性食品中的  $\beta$ -受体激动剂类和喹诺酮类药物[J]. *邵阳学院学报(自然科学版)*, 2020, 17(2): 55–66.
- LIU XH, MA XL, JI QH. Application of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in determination of  $\beta$ -agonists and quinolones in foodstuff of animal origin [J]. *J Shaoyang Univ (Nat Sci Ed)*, 2020, 17(2): 55–66.
- [29] 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.
- XIONG 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.
- [30] 侯建波, 谢文, 陈笑梅, 等. 液相色谱-串联质谱-同位素稀释法同时测定猪肉中 54 种药物残留[J]. *质谱学报*, 2012, 33(1): 12–54.
- HOU JP, XIE W, CHEN XM, *et al.* Simultaneous determination of 54 drugs residues in pork by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and isotopes dilution technique [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2012, 33(1): 12–54.
- [31] 郝杰, 姜洁, 余建龙, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中多种兽药残留[J]. *食品科学*, 2017, 38(12): 266–272.
- HAO J, JIANG J, YU JL, *et al.* Simultaneous determination of multi-veterinary drug residues in animal-origin food by solid phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2017, 38(12): 266–272.
- [32] 薛良辰, 蔡勤仁, 郑璇, 等. QuEChERS-GPC-GC\_MS 同时测定鱼肉中 9 种羟基类兽药残留[J]. *质谱学报*, 2017, 38(6): 655–663.
- XUE LC, CAI QR, ZHENG X, *et al.* Determination of 9 hydroxy veterinary drug residues in fish by QuEChERS-GPC-GC/MS [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2017, 38(6): 655–663.
- [33] 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.
- [34] 卜明楠, 石志红, 康健, 等. QuEChERS 结合 LC-MS/MS 同时测定虾肉中 72 种兽药残留[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(5): 552–558.
- BU MN, SHI ZH, KANG J, *et al.* Simultaneous determination of 72 veterinary drugs in shrimp by modified QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2012, 31(5): 552–558.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

## 作者简介



汤水粉, 工程师, 主要研究方向为渔业环境及水产品质量安全。

E-mail: powder2005@126.com