

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240318003

超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼肉中 48种抗生素

吴延灿¹, 唐 茜², 商鲁宁¹, 戚传勇^{1*}, 汪洪普¹, 董玉平¹

(1. 合肥市农产品质量检验中心, 合肥 230601; 2. 安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

摘要: **目的** 建立超声波提取、固相萃取柱净化, 结合超高效液相色谱-串联质谱法检测鱼肉中大环内酯类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和酰胺醇类等5大类48种抗生素的检测方法。**方法** 样品分别经乙二胺四乙酸二钠盐-磷酸盐缓冲液(ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt-McIlvaine, Na₂EDTA-McIlvaine)、磷酸盐缓冲液、乙腈/磷酸盐缓冲液进行提取, 合并提取液稀释至100 mL, 经亲水亲脂平衡柱(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)固相萃取净化后, 氮吹至近干后定容待测。以0.1%甲酸甲醇和0.1%甲酸溶液为流动相, 采用BEH C₁₈超高效液相色谱柱分离, 采用多反应监测正负离子切换模式检测。**结果** 该方法测定48种抗生素线性关系良好, 决定系数均大于等于0.9922, 方法检出限为0.02~0.47 μg/kg, 定量限为0.07~1.56 μg/kg。3个加标水平的回收率在69.2%~120.3%之间, 相对标准偏差范围为1.0%~14.3%。实际样品的检测结果也与标准方法的结果一致。**结论** 该方法简便快速、灵敏可靠, 适用于鱼肉中5大类48种抗生素药物残留的同时测定。**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 水产品; 抗生素; 固相萃取

Determination of 48 kinds of antibiotics in fish muscle by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Yan-Can¹, TANG Qian², SHANG Lu-Ning¹, QI Chuan-Yong^{1*},
WANG Hong-Pu¹, DONG Yu-Ping¹

(1. Hefei Inspection Center for Agricultural Products Quality of Anhui Province, Hefei 230601, China;
2. School of Resource & Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for detecting 48 kinds of antibiotics across 5 categories (macrolides, quinolones, sulfonamides, tetracyclines, and amide antibiotics) in fish meat using ultrasonic extraction, solid-phase extraction purification, and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted using ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt-McIlvaine (Na₂EDTA-McIlvaine) buffer solution, phosphate buffer, and a phosphate buffer-acetonitrile mixture. The combined extract was diluted to 100 mL, subjected to hydrophilic-lipophilic balance (HLB) solid-phase extraction, and then evaporated to near dryness under nitrogen before analysis. Separation was achieved using a BEH C₁₈ ultra performance liquid chromatography column with 0.1% formic acid in methanol as the mobile phase. The detection method employed multi-reaction monitoring with positive and

基金项目: 合肥市农业行业首席专家工作室项目(农作物重大病虫害防治)

Fund: Supported by the Chief Expert Workshop of Agriculture Industry in Hefei City (Prevention and Control of Major Crop Diseases and Pests)

*通信作者: 戚传勇, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: 727545160@qq.com

*Corresponding author: QI Chuan-Yong, Professor, Hefei Inspection Center for Agricultural Products Quality of Anhui Province, Hefei 230601, China. E-mail: 727545160@qq.com

negative ion switching. **Results** The method demonstrated excellent linearity in quantifying the 48 kinds of antibiotics, the determination coefficients were all greater than or equal to 0.9922. Limits of detection of method ranged from 0.02 to 0.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$, while limits of detection ranged from 0.07 to 1.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Recovery rates at 3 spiked levels ranged from 69.2% to 120.3%, with relative standard deviations ranging from 1.0% to 14.3%. The detection results of the actual sample were also consistent with the results of the standard method. **Conclusion** This method is characterized by its simplicity, speed, sensitivity, and reliability, rendering it suitable for the concurrent detection of 48 kinds of antibiotics spanning 5 categories in fish meat.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aquatic product; antibiotics; solid-phase extraction

0 引言

在水产养殖过程中, 抗生素主要用于预防和控制水产品的各种细菌性疾病, 也可以促进其生长发育^[1]。近年来, 随着集约化、高密度养殖模式推广, 进一步增加了水产品致病风险和耐药性, 也造成了抗生素滥用现象。我国是世界上最大的水产品生产和出口国之一^[2], 也是抗生素生产和使用大国^[3], 长期在水产养殖过程中投入大量的抗生素, 不仅会造成生物耐药性问题^[4]、环境污染问题^[5], 还会严重威胁人类身体健康^[6]。为了规范水产养殖中抗生素使用情况, 保障消费者身体健康, 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》对水产品中大环内酯类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和酰胺醇类等类别抗生素的限量标准进行了明确的要求。为准确监测水产品中各类别抗生素的残留现状, 从而合理地评估水产品抗生素残留对生态风险评价及食品安全的影响, 急需建立一种简单、准确、高效的抗生素多残留分析方法。

目前, 关于环境样品中抗生素检测方法的研究报道较多^[7-10], 而针对动物源性样品中抗生素检测方法的研究报道则相对较少, 主要有酶联免疫法^[11-12]、液相色谱法^[13-16]、液相色谱-串联质谱法^[17-22]等。其中, 液相色谱-串联质谱法因其检测灵敏度高、抗干扰能力强、分析时间短, 并且能同时分析多种目标物, 更适用于复杂基质中多类别抗生素的测定^[23-25]。目前, 已经制定了一些动物源性食品中抗生素的方法标准, 例如 GB 31658.17—2021《食品安全国家标准 动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》采用液相色谱-串联质谱法对动物源性食品中四环素、磺胺类和喹诺酮类药物残留量进行了测定, GB 31656.11—2021《食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素和多西环素残留量的测定》分别采用高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法对水产品中 4 种四环素类抗生素进行了测定, 但是目前还鲜有方法能同时测定大环内酯类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和酰胺醇类等 5 大类抗生素。因此本研究建立同时测定水产品

中大环内酯类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和酰胺醇类等 5 大类抗生素的超高效液相色谱-串联质谱法, 以期为水产品质量安全风险监测提供高效、快速、准确的分析方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

10 份鱼肉样品采自野外河道。

乙腈、甲醇(色谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲酸(纯度 99%, 色谱纯, 美国 ACS 化学试剂); 氨水(优级纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙二胺四乙酸二钠盐-磷酸盐缓冲液(ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt-McIlvaine, $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$)缓冲液(pH 4.0, 深圳市博林达科技有限公司); 磺胺醋酰等 48 种抗生素标准溶液(1000 mg/L)(上海安谱实验科技股份有限公司); KH_2PO_4 (分析纯)、 H_3PO_4 (纯度 85%, 色谱纯)(天津市大茂化学试剂厂); 实验用水均为 Millipore 超纯水系统制备。

磷酸盐缓冲液的配制: 27.2 g KH_2PO_4 与 1.3 mL H_3PO_4 用超纯水定容至 1 L (pH 2.5)。

1.2 仪器与设备

Waters ACQUITY UPLC Xevo TQ 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(配有电喷雾离子源)、ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); Hettich ROTINA380 离心机(德国 Hettich Zentrifugen 公司); Multi-Pulse Vortexer VB424 24 位涡旋振荡器(德国 Wiggins 公司); DC-24-RT 氮吹仪、亲水亲脂平衡柱(hydrophilic-lipophilic balance, HLB)固相萃取柱(200 mg/6 mL)、亲水性聚四氟乙烯滤膜(polytetrafluoroethylene membrane, PTFE) (0.22 μm)(上海安谱实验科技股份有限公司); PL2002-IC 电子天平[精度 0.01 g, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

1.3 前处理方法

1.3.1 提取

称取 2 g 经均质机均质后的鱼肉样品(鲜重), 加

Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液 10 mL, 涡旋提取 1 min 后再超声提取 10 min, 4500 r/min 离心 5 min, 收集上清液; 残渣再分别用 10 mL 磷酸盐缓冲液和 10 mL 乙腈/磷酸盐缓冲液 (V:V=1:1) 重复提取 2 次, 合并 3 次提取液, 定容到 100 mL 后混匀, 调 pH 3~3.5, 待净化。

1.3.2 净化

萃取柱 (HLB, 200 mg/6 mL) 预先用 6 mL 甲醇、6 mL 超纯水进行活化。过柱时, 流速控制在 5~6 mL/min 左右, 样品富集完毕后, 用 10 mL 超纯水清洗萃取柱, 负压抽干。用 3 mL 甲醇和 3 mL 5% 氨水的甲醇对目标物进行洗脱, 收集的洗脱液于 50°C 下氮吹至近干, 然后用乙腈/0.2% 甲酸水 (V:V=1:1) 定容至 0.5 mL, 过 0.22 μm 亲水性 PTFE 滤膜 (金色), 待分析。

1.4 仪器检测条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸水: 甲醇=98:2 (V:V) 溶液, 流动相 B 为 0.1% 甲酸甲醇; 梯度洗脱程序: 0~0.25 min, 90% A; 0.25~4.50 min, 90%~60% A; 4.51~6.00 min, 20%~5% A; 6.00~8.00 min, 5% A; 8.01~9.00 min, 90% A。流速: 0.35 mL/min; 柱温: 40°C; 进样量: 3 μL。

1.4.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源 (electrospray ionization, ESI); 电离模式: 正负离子切换模式; 离子源温度: 150°C; 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔反吹气流量: 50 L/h; 脱溶剂气温度: 500°C; 脱溶剂气流量: 900 L/h; 监测模式: 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式。

1.5 数据处理

采用 Masslynx 4.1 对质谱检测数据进行分析处理, WPS Office 2023 对实验数据进行整理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 质谱和色谱条件的优化

2.1.1 质谱条件的优化

配制 1 mg/L 各抗生素组分单一标准溶液, 采用 Masslynx 软件的 InListstart 功能, 自动优化正负电离模式、优化母离子、子离子、锥孔电压以及碰撞能等质谱条件, 以获得目标化合物离子对最优响应, 优化后选择的离子对、锥孔电压、碰撞能等信息如表 1 所示。其中, 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考在负离子模式下响应更优, 因此检测采用了正负离子切换模式。

2.1.2 色谱条件的优化

在确定质谱参数后, 首先比较了 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 和 ACQUITY BEH C₁₈ 色

谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 对 48 种抗生素的分离效果, 结果发现, BEH C₁₈ 的保留时间更加分散, 有助于分段扫描分配到更多的扫描时间, 因此选用 BEH C₁₈ 色谱柱进行分离。然后对 0.1% 甲酸和 5 mmol 乙酸铵体系进行了比较, 发现在 0.1% 甲酸体系下, 绝大部分化合物的响应更优, 因此选用 0.1% 甲酸作为水相。在选择乙腈作为有机相时, 无法通过调整流动相梯度来实现磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶的色谱分离。考虑到它们的母离子和子离子均一致, 如果不能实现色谱分离将无法准确性、定量。而改用 0.1% 甲醇作为有机相, 则可以实现色谱分离, 因此本方法选用 0.1% 甲醇作为有机相。48 种抗生素的保留时间见表 1。

2.2 样品前处理方法优化

2.2.1 提取方法的优化

选择乙腈、Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液 (pH 4.0) 和磷酸盐缓冲液作为提取溶剂, 对鱼肉中的 48 种抗生素进行提取。结果发现, Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液能显著提高四环素类的回收率^[26], 而乙腈和磷酸盐缓冲液对喹诺酮以及磺胺类化合物有较高的回收率。在提取过程中增加乙腈的用量, 过柱时溶液的有机相比例过高, 导致磺胺类化合物的回收率显著降低; 并且鱼肉组织中脂肪和蛋白含量高^[27], 有机相过多还会造成提取的杂质过多而导致柱子堵塞。但提取过程不使用乙腈, 则会显著降低大环内酯类等抗生素的回收率^[28]。综合考虑不同类别抗生素的特性, 因此最终选择用 10 mL Na₂EDTA McIlvaine 缓冲液、10 mL 磷酸盐缓冲液和 10 mL 乙腈/磷酸盐缓冲液 (V:V=1:1) 作为提取剂。

2.2.2 净化方法的优化

HLB 小柱是抗生素净化中最常用的固相萃取小柱, 根据之前的研究结果选用 HLB 小柱作为净化柱, 甲醇作为洗脱溶剂。比较不同洗脱溶液和洗脱体积时发现, 当洗脱溶剂甲醇中加入 5% 氨水时, 能显著提高喹诺酮类的回收率^[29], 这说明喹诺酮类化合物在碱性条件下更容易洗脱。当洗脱溶剂量达到 3 mL 甲醇和 3 mL 5% 氨水的甲醇时, 已满足回收率的要求, 因此不再增加更多的洗脱溶剂, 以免洗脱更多杂质和增加氮吹时间。

2.3 线性范围与检出限

在优化后的检测条件下进行了方法学考察。配制了 48 种抗生素的基质匹配标准溶液, 进样量为 3 μL, 以目标组分的峰面积 (Y) 对相应的质量浓度 (X, μg/L) 绘制标准曲线, 结果如表 2 所示。48 种抗生素在 1~200 μg/L 质量浓度范围内线性关系良好, 决定系数 (r^2) 均大于等于 0.9922。对低浓度鱼肉 (鲤鱼) 空白基质匹配标准溶液进行分析, 以 3 倍信噪比 (S/N) 确定方法 LODs, 以 10 倍信噪比 (S/N) 确定方法 LOQs。结果如表 2 所示, 48 种抗生素的 LODs 为 0.02~0.47 μg/kg, LOQs 为 0.07~1.56 μg/kg, 说明该分析方法灵敏度高, 满足检测需求。

表 1 48 种抗生素残留组分的质谱条件
Table 1 Mass spectrum conditions of 48 kinds of residual components of antibiotics

抗生素	离子模式 ESI	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能/V
磺胺醋酰	+	1.40	215.0	156.0*/108.0	0.050	17	12/18
磺胺吡啶	+	2.16	250.0	156.0*/108.0	0.026	25	16/25
磺胺嘧啶	+	1.73	251.0	156.0*/92.0	0.050	25	15/27
磺胺甲恶唑	+	3.53	254.0	156.0*/92.0	0.006	25	16/26
磺胺噻唑	+	1.97	256.0	156.0*/92.0	0.050	23	15/25
噁唑酸	+	5.13	262.0	244.0*/216.0	0.011	24	19/30
氟甲唑	+	5.47	262.1	202.0*/244.0	0.007	26	32/21
磺胺甲基嘧啶	+	2.35	265.0	156.0*/92.0	0.017	26	15/28
磺胺二甲异恶唑	+	3.86	268.0	156.0*/92.0	0.006	22	13/28
磺胺甲噻二唑	+	2.89	271.0	156.0*/92.0	0.006	19	15/30
磺胺二甲嘧啶	+	2.96	279.1	186.0*/92.0	0.006	30	16/28
磺胺间甲氧嘧啶	+	2.78	281.0	156.0*/92.0	0.006	27	22/35
磺胺甲氧哒嗪	+	3.13	281.0	156.0*/215.0	0.006	30	30/25
磺胺对甲氧嘧啶	+	3.59	281.0	156.0*/215.0	0.006	25	20/30
磺胺氧哒嗪	+	3.38	285.1	156.0*/92.0	0.006	22	15/28
甲氧苄啶	+	2.81	291.0	230.0*/123.0	0.006	35	25/27
磺胺喹噁啉	+	5.21	301.1	156.1*/92.2	0.011	23	16/30
磺胺多辛	+	3.83	311.0	156.0*/92.0	0.006	27	15/32
磺胺间二甲氧嘧啶	+	4.94	311.1	156.0*/92.0	0.011	28	20/32
磺胺苯吡唑	+	4.55	315.0	160.0*/156.0	0.025	30	25/25
诺氟沙星	+	3.15	320.1	233.0*/276.1	0.006	32	25/20
依诺沙星	+	3.04	321.1	232.0*/303.1	0.006	32	30/35
环丙沙星	+	3.31	332.1	314.1*/288.1	0.006	32	18/22
培氟沙星	+	3.03	334.1	316.1*/290.1	0.006	34	20/18
洛美沙星	+	3.55	352.1	265.1*/308.1	0.006	31	22/16
达氟沙星	+	3.45	358.2	340.2*/96.0	0.006	34	23/25
恩诺沙星	+	3.43	360.2	316.1*/245.0	0.006	32	22/20
氧氟沙星	+	3.01	362.1	261.1*/318.1	0.006	31	25/20
麻保沙星	+	2.68	363.1	72.0*/320.0	0.006	27	20/15
氟罗沙星	+	2.78	370.1	326.1*/269.1	0.006	34	19/25
加替沙星	+	4.09	376.1	332.1*/289.1	0.036	34	19/28
沙拉沙星	+	3.86	386.2	342.1*/299.1	0.006	37	18/27
司帕沙星	+	4.41	393.2	349.1*/292.1	0.025	37	20/24
二氟沙星	+	3.69	400.2	356.1*/299.0	0.006	37	21/27
强力霉素	+	5.37	445.2	428.2*/154.0	0.007	25	20/28
四环素	+	3.25	445.3	410.2*/154.0	0.006	22	20/26
土霉素	+	3.37	461.2	426.2*/443.1	0.006	22	19/13
金霉素	+	4.67	479.3	444.2*/462.2	0.025	27	20/18
酮康唑	+	5.41	531.1	243.9*/81.8	0.007	58	34/38
脱水红霉素	+	5.42	716.5	158.1*/82.9	0.007	22	28/48
红霉素	+	5.41	734.4	158.1*/576.3	0.007	29	30/20
克拉霉素	+	5.44	748.4	158.2*/590.4	0.007	40	30/18
阿奇霉素	+	5.33	749.4	158.1*/116.0	0.007	48	38/40
罗红霉素	+	5.44	837.5	158.0*/679.2	0.007	37	30/20
泰乐霉素	+	5.39	916.5	174.1*/101.1	0.007	57	40/45
氯霉素	-	4.77	321.0	257.1*/152.1	0.012	25	12/18
甲砒霉素	-	2.68	353.8	290.0*/184.9	0.007	32	12/20
氟苯尼考	-	3.62	355.9	336.0*/185.0	0.006	24	10/18

注: *定量离子; + 正离子; - 负离子。

表 2 48 种抗生素的线性范围、标准曲线、决定系数(r^2)及检出限和定量限Table 2 Linear ranges, linear regression equations, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of 48 kinds of antibiotics

抗生素	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	标准曲线方程	决定系数(r^2)	LODs/($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/($\mu\text{g/kg}$)
磺胺醋酰	1~200	$Y=363.62X+960.97$	0.9976	0.20	0.67
磺胺吡啶	1~200	$Y=395.06X+257.29$	0.9997	0.22	0.74
磺胺嘧啶	1~200	$Y=416.78X+405.39$	0.9995	0.14	0.47
磺胺甲恶唑	1~200	$Y=238.52X+310.05$	0.9986	0.16	0.52
磺胺噻唑	1~200	$Y=478.67X-483.94$	0.9997	0.08	0.25
噻唑酸	1~200	$Y=1296.4X+147.3$	0.9998	0.09	0.30
氟甲唑	1~200	$Y=1411.9X+7067.6$	0.9946	0.12	0.39
磺胺甲基嘧啶	1~200	$Y=264.1X+163.59$	0.9997	0.10	0.32
磺胺二甲异恶唑	1~200	$Y=271.06X+166.65$	0.9996	0.10	0.32
磺胺甲噻二唑	1~200	$Y=257.75X+23.482$	0.9997	0.11	0.35
磺胺二甲嘧啶	1~200	$Y=322.27X+638.78$	0.9982	0.03	0.10
磺胺间甲氧嘧啶	1~200	$Y=138.51X+154.49$	0.9981	0.08	0.25
磺胺甲氧哒嗪	1~200	$Y=66.632X-6.4256$	0.9994	0.03	0.09
磺胺对甲氧嘧啶	1~200	$Y=332.66X-473.17$	0.9997	0.04	0.12
磺胺氯哒嗪	1~200	$Y=191.48X-92.547$	1.0000	0.04	0.14
甲氧苄啶	1~200	$Y=735.07X+1038.1$	0.9993	0.04	0.12
磺胺喹噁啉	1~200	$Y=263.04X-193.98$	0.9992	0.13	0.42
磺胺多辛	1~200	$Y=464.01X+537.36$	0.9991	0.06	0.20
磺胺间二甲氧嘧啶	1~200	$Y=710.34X+61.012$	0.9999	0.09	0.29
磺胺苯吡唑	1~200	$Y=348.48X+322.48$	0.9995	0.16	0.54
诺氟沙星	1~200	$Y=96.583X+196.92$	0.9974	0.13	0.42
依诺沙星	1~200	$Y=211.37X+833.68$	0.9922	0.16	0.54
环丙沙星	1~200	$Y=302.52X-210.75$	0.9997	0.09	0.30
培氟沙星	1~200	$Y=477.92X-526.32$	0.9994	0.09	0.29
洛美沙星	1~200	$Y=735.69X+9.0895$	0.9999	0.05	0.15
达氟沙星	1~200	$Y=493.13X-1354.4$	0.9985	0.10	0.34
恩诺沙星	1~200	$Y=452.66X+188.94$	1.0000	0.10	0.32
氧氟沙星	1~200	$Y=684.54X+2824$	0.9947	0.06	0.20
麻保沙星	1~200	$Y=285.32X+610.94$	0.9987	0.27	0.89
氟罗沙星	1~200	$Y=243.32X+98.053$	0.9997	0.16	0.52
加替沙星	1~200	$Y=332.45X-209.64$	0.9999	0.07	0.22
沙拉沙星	1~200	$Y=92.141X+77.381$	0.9976	0.10	0.34
司帕沙星	1~200	$Y=750.36X-35.939$	1.0000	0.03	0.09
二氟沙星	1~200	$Y=167.96X-27.779$	0.9996	0.02	0.07
强力霉素	1~200	$Y=299.55X+147.93$	1.0000	0.17	0.57
四环素	1~200	$Y=17.239X-28.915$	0.9991	0.31	1.02
土霉素	1~200	$Y=46.482X+19.791$	0.9961	0.02	0.07
金霉素	1~200	$Y=24.43X-17.095$	0.9995	0.15	0.49
酮康唑	1~200	$Y=116.66X+724.4$	0.9978	0.26	0.87
脱水红霉素	1~200	$Y=951.57X+3256.8$	0.9947	0.10	0.34
红霉素	1~200	$Y=1318.7X+440.69$	0.9997	0.13	0.42
克拉霉素	1~200	$Y=1200.8X+4951$	0.9949	0.07	0.24
阿奇霉素	1~200	$Y=238.03X-451.54$	0.9978	0.12	0.40
罗红霉素	1~200	$Y=687.13X+300.13$	0.9999	0.15	0.49
泰乐霉素	1~200	$Y=310.7X+944.06$	0.9926	0.20	0.65
氯霉素	1~200	$Y=28.22X+161.84$	0.9947	0.29	0.96
甲砒霉素	1~200	$Y=29.25X+115.47$	0.9969	0.35	1.16
氟苯尼考	1~200	$Y=58.891X+264.71$	0.9940	0.47	1.56

注: 检出限(limits of detection, LODs); 定量限(limits of quantification, LOQs)。

2.4 基质效应

鱼肉组织样品复杂, 在前处理过程中保留在待测液中的各种外源物, 会对目标化合物的电喷雾离子化程度产生很大影响^[30], 从而影响定量结果的准确性, 因此本研究还考察了目标化合物的基质效应(matrix effect, ME)。分别用纯溶剂和鱼肉空白样品提取液配制等质量浓度的标准溶液(质量浓度为 50 μg/L), 各连续进样 3 针。结果如表 3 所示, 氯霉素等 25 种抗生素表现为弱基质效应($0.8 \leq ME \leq 1.2$), 磺胺醋酰等 13 种抗生素表现为中等强度基质效应($0.5 < ME < 0.8$ 或 $1.2 < ME < 1.5$), 克拉霉素等 10 种表现为强基质效应($ME \leq 0.5$ 或 $1.5 \leq ME$)。考虑到一半的抗生素表现为中等强度基质效应或强基质效应,

为了保证检测结果的准确度, 在实际样品的检测过程中, 需要使用基质匹配标准溶液才能有效地消除基质效应对检测结果的干扰。

2.5 回收率和精密度

考虑到目前针对鱼类抗生素残留的限量值标准较多, 因此本研究选择鱼肉(鲤鱼)作为代表样品, 开展方法验证。在空白鱼肉样品中添加 3 个浓度水平进行回收率实验, 浓度依次为 2.5、10.0、50.0 μg/kg, 每个水平平行测定 6 次, 按上述方法进行提取、净化, 并采用基质匹配外标法定量, 计算平均回收率和精密度。结果如表 3 所示, 48 种抗生素的回收率在 69.2%~120.3%之间, RSDs 范围为 1.0%~14.3%, 满足抗生素多残留分析的要求。

表 3 3 个添加水平下鱼肉中 48 种抗生素残留组分的回收率、精密度($n=6$)以及 ME ($n=3$)
Table 3 Recoveries and precisions ($n=6$) of 48 kinds of antibiotics in fish at 3 levels and ME ($n=3$)

抗生素	鱼		回收率 ² /%			RSDs/%		
	ME ¹	RSDs/%	2.5 μg/kg	10.0 μg/kg	50.0 μg/kg	2.5 μg/kg	10.0 μg/kg	50.0 μg/kg
磺胺醋酰	0.78	2.0	73.8	69.8	78.8	9.7	6.5	3.4
磺胺吡啶	1.01	3.5	83.2	79.3	83.0	5.6	4.5	7.4
磺胺嘧啶	1.17	1.9	92.8	88.0	84.2	6.8	6.7	9.0
磺胺甲恶唑	1.02	1.3	88.6	80.5	88.2	5.3	3.2	4.7
磺胺噻唑	1.18	1.4	89.4	81.3	76.3	6.0	5.9	7.7
噁啉酸	1.78	4.0	96.7	87.9	86.8	7.2	9.0	5.1
氟甲唑	0.46	1.3	92.7	90.7	89.1	8.1	8.0	6.3
磺胺甲基嘧啶	0.97	0.9	81.4	74.0	86.0	3.9	3.8	8.5
磺胺二甲异恶唑	1.15	0.8	79.2	77.6	84.7	3.5	3.4	5.5
磺胺甲噻二唑	1.02	3.4	79.3	73.9	79.4	7.8	9.6	6.6
磺胺二甲嘧啶	1.13	0.8	75.5	74.0	82.6	5.8	5.7	8.5
磺胺间甲氧嘧啶	0.88	2.2	83.4	86.6	82.6	4.1	1.1	5.1
磺胺甲氧哒嗪	1.16	6.3	82.3	80.7	77.1	5.6	8.4	6.3
磺胺对甲氧嘧啶	1.40	6.7	92.7	90.9	88.1	7.2	7.0	6.0
磺胺氯哒嗪	0.96	8.2	82.4	80.8	85.0	6.8	6.6	10.7
甲氧苄啶	1.04	2.5	89.2	87.4	83.0	8.5	3.5	6.4
磺胺喹噁啉	1.47	4.2	69.2	69.9	74.6	11.5	10.3	3.0
磺胺多辛	1.01	2.0	86.0	84.4	89.0	8.1	11.1	9.5
磺胺间二甲氧嘧啶	2.50	5.6	81.8	83.1	83.5	6.6	8.6	9.6
磺胺苯吡唑	1.06	2.0	83.7	76.1	77.5	6.5	4.4	7.1
诺氟沙星	1.02	0.5	113.0	93.6	91.4	8.5	8.3	8.1
依诺沙星	1.22	2.4	86.7	78.8	90.9	7.1	6.9	11.8
环丙沙星	1.12	1.0	91.3	85.8	84.5	8.8	7.7	7.9
培氟沙星	1.30	5.5	105.8	96.2	90.2	2.9	1.9	11.3
洛美沙星	0.94	1.4	94.0	94.6	91.7	4.4	3.4	6.4
达氟沙星	1.22	5.3	104.3	94.9	86.8	8.0	7.9	7.9
恩诺沙星	1.29	0.9	100.2	96.5	82.5	12.6	10.4	4.8
氧氟沙星	1.03	2.3	100.1	91.0	83.2	5.9	5.8	6.3
麻保沙星	0.65	0.6	79.4	77.9	85.9	3.9	3.8	3.9

表 3(续)

抗生素	鱼		回收率 ² /%			RSDs/%		
	ME ¹	RSDs/%	2.5 μg/kg	10.0 μg/kg	50.0 μg/kg	2.5 μg/kg	10.0 μg/kg	50.0 μg/kg
氟罗沙星	0.82	0.6	86.8	85.1	89.0	7.5	5.4	6.1
加替沙星	1.06	1.8	91.4	89.6	92.0	13.6	14.3	1.0
沙拉沙星	1.05	5.9	78.9	77.4	86.0	7.5	5.4	5.8
司帕沙星	1.02	5.9	88.7	87.0	86.6	3.6	2.6	5.6
二氟沙星	1.19	3.4	88.6	86.9	92.3	6.5	5.4	7.4
强力霉素	0.57	4.0	103.9	101.9	86.1	7.9	5.8	10.8
四环素	1.86	5.8	91.1	89.3	84.8	6.0	4.9	8.4
土霉素	1.73	5.8	88.4	86.6	87.5	5.7	4.6	4.2
金霉素	1.81	0.9	92.1	90.3	77.0	8.2	9.0	9.8
酮康唑	0.52	1.4	79.4	99.5	71.8	5.5	6.3	4.9
脱水红霉素	0.49	0.9	120.3	118.0	107.2	3.2	4.2	1.8
红霉素	0.97	2.5	79.4	77.8	72.1	4.1	3.0	4.0
克拉霉素	0.28	0.7	112.4	102.2	93.3	6.5	8.3	5.8
阿奇霉素	0.67	0.4	82.5	89.7	87.3	7.4	8.2	13.3
罗红霉素	1.46	2.2	91.0	97.8	95.8	4.6	5.5	4.2
泰乐霉素	0.48	7.0	92.5	100.5	98.6	5.9	6.8	5.3
氯霉素	0.82	3.9	86.9	94.4	76.4	5.4	7.2	4.4
甲砒霉素	1.52	2.7	90.6	98.5	88.7	3.6	4.5	7.9
氟苯尼考	1.28	5.4	94.8	103.1	87.8	2.8	3.6	5.0

注: 1. $ME=A/B$, 式中: A 表示样品基质中添加相同含量分析物的响应值; B 表示在纯溶剂中分析物的响应值。2. 回收率 $\% = C_1/C_0 \times 100\%$, 式中: C_1 为空白样品中添加抗生素的测定值, $\mu\text{g}/\text{kg}$; C_0 为空白样品提取液添加同量抗生素的测定值, $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。

2.6 实际样品的检测

为考证本方法的可靠性, 同时了解自然水体中水产品中抗生素残留情况, 采用本研究建立的方法对 10 份野生鱼样品进行了检测。结果发现, 有 1 份黄颡鱼样品中检出诺氟沙星, 含量为 $3.2 \mu\text{g}/\text{kg}$; 1 份鲫鱼样品中检出氧氟沙星, 含量为 $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。采用 GB 31658.17—2021 对这两份样品进行了复检, 结果黄颡鱼样品中诺氟沙星含量为 $3.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 鲫鱼样品中氧氟沙星含量为 $2.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定性结果也一致, 这说明本研究建立的方法可用于鱼肉样品中抗生素残留的定性筛查及定量测定。

3 结论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中 48 种抗生素的方法。样品采用超声波提取、固相萃取柱净化, 实现了一次前处理、一次检测就可以在 9 min 内完成对大环内酯类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类和酰胺醇类 5 大类抗生素的同时测定。对比其他方法, 该方法具有提取净化快、分析时间短、检测项目多等优点, 并且方法 LOQs 远低于标准^[5]对于水产品中抗生素残留限量值的规定, 能满足检测分析的需求, 为相关的检测机构开展

水产品中抗生素风险监测提供了有力的技术支持。

参考文献

- [1] 赵巧灵, 张薇英, 汤海凤, 等. 快速溶剂萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定养殖鱼肌肉中 19 种磺胺类药物残留[J]. 食品科技, 2019, 44(12): 335-341.
ZHAO QL, ZHANG WY, TANG HF, *et al.* Determination of 19 kinds of sulfonamides residues in cultured fish muscle with accelerated solvent extraction by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci Technol, 2019, 44(12): 335-341.
- [2] 李贞金, 张洪昌, 沈根祥, 等. 水产养殖水、沉积物中抗生素检测方法优化及残留特征研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(1): 209-219.
LI ZJ, ZHANG HC, SHEN GX, *et al.* Optimization of antibiotic detection methods and residual characteristics in aquaculture water and sediment [J]. Asian J Ecotox, 2020, 15(1): 209-219.
- [3] ZHI S, ZHOU J, ZHANG Z, *et al.* Determination of 38 antibiotics in raw and treated wastewater from swine farms using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2022, 45(9): 1525-1537.
- [4] 张鸾月, 赵婉婉, 吴伟. 水产养殖环境中抗生素抗性基因污染及其研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2015, (6): 10.
ZHANG QY, ZHAO WW, WU W. Antibiotics resistance gene pollution and its research progress achieved in aquaculture environment [J]. J Agric Sci Technol, 2015, (6): 10.

- [5] 葛林科, 杨妍, 曹胜凯, 等. 抗生素不同解离形态在水环境中的光化学行为[J]. 中国科学:化学, 2022, 52(12): 2183–2200.
GE LK, YANG Y, CAO SK, *et al.* Aqueous environmental photochemical behavior of different antibiotic dissociation forms [J]. *Sci Sin Chim*, 2022, 52(12): 2183–2200.
- [6] 刘子言, 厉文辉. 婴幼儿配方奶粉中 22 种抗生素污染特征及暴露风险[J]. 环境化学, 2023, 42(7): 2200–2209.
LIU ZY, LI WH. Study on pollution characteristics and human exposure of 22 antibiotic in infant milk powder [J]. *Environ Chem*, 2023, 42(7): 2200–2209.
- [7] 赵超群, 梁晶晶, 李志梅, 等. 在线富集-超高效液相色谱-线性离子阱串联质谱法测定饮用水中 38 种抗生素残留[J]. 分析试验室, 2023, 42(8): 1066–1073.
ZHAO CQ, LIANG JJ, LI ZM, *et al.* Determination of 38 antibiotic residues in drinking water by on-line enrichment-ultra performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2023, 42(8): 1066–1073.
- [8] SHEN F, XU YJ, WANG Y, *et al.* Rapid and ultra-trace levels analysis of 33 antibiotics in water by on-line solid-phase extraction with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1677: 463304.
- [9] HOLTON E, KASPRZYK-HORDERN B. Multiresidue antibiotic-metabolite quantification method using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for environmental and public exposure estimation [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(23): 5901–5920.
- [10] SURIYAH A, MOHD AB, ABEER H, *et al.* Profiling of antibiotic residues in soil and vegetables irrigated using pharmaceutical-contaminated water in the Delhi stretch of the Yamuna River, India [J]. *Water*, 2023, 15(23): 4197.
- [11] KUPRIENKO OS, VASHKEVICH II, ZILBERMAN AI, *et al.* The dependence of the group specificity of immunoenzyme determination of penicillins in milk on the temperature and duration of antibiotic cross reactions with polyclonal antibodies [J]. *Appl Biochem Micro*, 2023, 59(6): 959–967.
- [12] SANG P, LU G, YU D, *et al.* Simultaneous determination of antibiotics, mycotoxins, and hormones in milk by an 8-17 DNzyme-based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(39): 12681–12688.
- [13] LAKEW A, ASSEFA T, WOLDEYOHANNES M, *et al.* Development and validation of liquid chromatography method for simultaneous determination of multiclass seven antibiotic residues in chicken tissues [J]. *BMC Chem*, 2022, 16(1): 1–15.
- [14] WANG Y, LI J, JI L, *et al.* Simultaneous determination of sulfonamides antibiotics in environmental water and seafood samples using ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. *Molecules*, 2022, 27(7): 2160.
- [15] SEKKIEN A, SWILAM N, EBADA SS, *et al.* Polyphenols from *Tamarix nilotica*: LC-ESI-MSn profiling and *in vivo* antifibrotic activity [J]. *Molecules*, 2018, 23(6): 1411.
- [16] ABDULWASIU AB, ISRAEL OE, SUNDAY OO, *et al.* Evaluation of antibiotic use and analysis of ciprofloxacin and gentamicin residue in fish samples from farms in Lagos, Nigeria [J]. *Environ Monit Assess*, 2024, 196: 127.
- [17] 丁奇, 王建凤, 冯月超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定鱼肠道内容物中 32 种抗生素残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1141–1149.
DING Q, WANG JF, FENG YC, *et al.* Determination of 32 kinds of antibiotic residues in fish intestinal content by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(4): 1141–1149.
- [18] 方灵, 韦航, 黄彪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中 38 种抗生素残留[J]. 分析测试学报, 2019, 38(6): 681–686, 692.
FANG L, WEI H, HUANG B, *et al.* Determination of 38 antibiotic residues in drinking water by on-line enrichment-ultra high performance liquid chromatography-linear ion trap tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(6): 681–686, 692.
- [19] 刘思思, 杜鹏, 陈景文, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱-串联质谱联用测定莱州湾海水养殖区野生鱼肌肉中 19 种抗生素及 2 种磺胺代谢产物残留[J]. 色谱, 2014, 32(12): 1320–1325.
LIU SS, DU J, CHEN JW, *et al.* Determination of 19 antibiotic and 2 sulfonamide metabolite residues in wild fish muscle in mariculture areas of Laizhou Bay using accelerated solvent extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(12): 1320–1325.
- [20] 张微, 肖曼, 吴丹, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产养殖“非药品”投入品中 37 种禁限兽药[J]. 分析测试学报, 2022, 41(12): 1751–1757.
ZHANG W, XIAO M, WU D, *et al.* Simultaneous determination of 37 kinds of prohibited veterinary drug residues in aquaculture “Non-pharmaceutical” inputs by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41(12): 1751–1757.
- [21] YE H, LI S, XI Y, *et al.* Highly sensitive determination of antibiotic residues in aquatic products by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Antibiotics*, 2022, 11(10): 1427.
- [22] ZHU MH, ZHAO HX, XIA DM, *et al.* Determination of 21 antibiotics in sea cucumber using accelerated solvent extraction with in-cell clean-up coupled to ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2018, 258: 87–94.
- [23] XIAO YT, LIU SY, GAO Y, *et al.* Determination of antibiotic residues in aquaculture products by liquid chromatography tandem mass spectrometry: recent trends and developments from 2010 to 2020 [J]. *Separations*, 2022, 9(2): 35.
- [24] 张楠, 唐增煦, 王莉莉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱筛查确证尿液中磺胺、喹诺酮与四环素抗生素[J]. 分析测试学报, 2023, 42(10): 1343–1350.
ZHANG N, TANG ZX, WANG LL, *et al.* Study on the method for the identification of sulfanilamide, quinolone and tetracycline in urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2023, 42(10): 1343–1350.
- [25] 马丽丽, 郭昌胜, 胡伟, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定土壤中氟喹诺酮、四环素和磺胺类抗生素[J]. 分析化学, 2010, 38(1): 21–26.
MA LL, GUO CS, HU W, *et al.* Simultaneous extraction and determination of eighteen fluoroquinolone, tetracycline and sulfonamide antibiotics from

- soils using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(1): 21–26.
- [26] 姚喜梅, 夏薇佳, 刘靖, 等. 液相色谱-串联质谱法检测猪肉中 3 种新型四环素类药物[J]. *农产品质量与安全*, 2018, (6): 60–63.
YAO XM, XIA WJ, LIU J, *et al.* Detection of 3 new tetracycline drugs in pork by LC-MS/MS [J]. *Qual Saf Agro-prod*, 2018, (6): 60–63.
- [27] 杨愿愿, 李偲琳, 赵建亮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水、沉积物和生物样品中 57 种全多氟化合物[J]. *分析化学*, 2022, 50(8): 15.
YANG YY, LI SL, ZHAO JL, *et al.* Determination of 57 kinds of per-and polyfluoroalkyl substances in water, sediments and biological samples by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2022, 50(8): 15.
- [28] 李涛, 王策, 徐兆安, 等. 基于分散固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定沉积物中大环内酯类抗生素[J]. *环境化学*, 2022, 41(1): 231–240.
LI T, WANG C, XU ZAN, *et al.* Determination of macrolide antibiotics in the sediment based on dispersed solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Environ Chem*, 2022, 41(1): 231–240.
- [29] 杨常青, 王龙星, 侯晓虹, 等. 大辽河水系河水中 16 种抗生素的污染水平分析[J]. *色谱*, 2012, 30(8): 756–762.
YANG CQ, WANG LX, HOU XH, *et al.* Analysis of pollution levels of 16 antibiotics in the river water of Daliao River water system [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(8): 756–762.
- [30] 张申平, 秦宇, 葛宇, 等. 蜂蜜中抗生素残留分析的样品前处理方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(14): 4559–4565.
ZHANG SP, QIN Y, GE Y, *et al.* Research progress of sample pretreatment methods for the analysis of antibiotic residues in honey [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(14): 4559–4565.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

作者简介



吴延灿, 农艺师, 主要研究方向为农产品质量与安全。

E-mail: wuyan1989@163.com



戚传勇, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: 727545160@qq.com

中国仪器仪表学会