

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

方灵, 韦航, 黄彪, 刘文静, 苏德森, 吴妙鸿, 傅建炜*

(福建省农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所, 福建 福州 350003)

摘要:建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)同时测定牛奶中5类(磺胺类、喹诺酮类、四环素类、氯霉素类和大环内酯类)38种抗生素的分析方法。牛奶样品以0.5% (体积分数)甲酸乙腈提取, 利用Oasis PRiME HLB固相萃取小柱进行净化, 经Acquity UPLC HSS T3柱(100 mm × 2.1 mm i. d., 1.8 μm)分离, 采用电喷雾离子源, 多反应监测模式(MRM)进行定性定量分析。结果表明, 38种抗生素在各自线性范围内呈良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于0.99, 定量下限为0.10~1.0 μg/kg; 在1.0、5.0、10.0 μg/kg加标水平下, 平均回收率为70.7%~94.9%, 相对标准偏差(RSD, $n=6$)为4.0%~9.4%。该方法操作简单、灵敏度高、重现性好, 适用于牛奶中多种抗生素残留的监测要求。

关键词:牛奶; 抗生素; 磺胺类; 喹诺酮类; 四环素类; 氯霉素类; 大环内酯类; 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)

中图分类号: O657.7; S859.84 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)06-0681-07

Simultaneous Determination of 38 Antibiotics Residues in Milk by Ultra-high Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry

FANG Ling, WEI Hang, HUANG Biao, LIU Wen-jing, SU De-sen,

WU Miao-hong, FU Jian-wei*

(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: An analytical method was developed for the simultaneous determination of 38 antibiotics residues in 5 classes of drugs, including sulfonamides, quinolones, tetracyclines, chloramphenicols and macrolides in milk by ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS). The samples were extracted with acetonitrile containing 0.5% (by volume) formic acid, and cleaned up with an Oasis PRiME HLB solid phase extraction column. The target components were separated using an Acquity UPLC HSS T3 column (100 mm × 2.1 mm i. d., 1.8 μm), then identified and quantified by UPLC – MS/MS with electrospray ion source (ESI) under multi-reaction ion monitoring (MRM) mode. Results showed that 38 antibiotics had good linear relationships in their respective linear ranges with correlation coefficients (r^2) higher than 0.99. The limits of quantitation for 38 antibiotics were between 0.10 μg/kg and 1.0 μg/kg. Average recoveries for 38 antibiotics in milk at spiked levels of 1.0, 5.0, 10.0 μg/kg ranged from 70.7% to 94.9%, with relative standard deviations (RSD, $n=6$) of 4.0% – 9.4%. With the advantages of easy operation, high sensitivity and good reproducibility, the method was applicable for the determination of antibiotics residues in milk.

Key words: milk; antibiotics; sulfonamides; quinolones; tetracyclines; chloramphenicols; macrolides; ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS)

收稿日期: 2018-12-10; 修回日期: 2019-01-29

基金项目: 福建省农科院科技创新团队资助项目(STIT2017-1-12); 国家农业基础性长期性科技工作农产品质量安全观测监测项目(ZX10SI405)

* 通讯作者: 傅建炜, 博士, 研究员, 研究方向: 农产品质量安全与风险评估, E-mail: 20281349@qq.com

抗生素主要用于预防和治疗细菌性感染类疾病,促进畜禽健康生长,以提高养殖质量和效率。在奶牛养殖中,抗生素主要用于治疗乳牛乳腺炎、腹泻等疾病^[1-2]。泌乳期乳牛若过量使用抗生素或停药期不足,可能导致牛奶中残留抗生素,并通过食物链对人体健康造成不良影响,如引起胃肠不适、过敏反应、肝功能损害等^[3-6]。此外,滥用抗生素或长期摄入含抗生素食品可能会产生细菌耐药性^[7-8],对人类健康危害更加严重,同时,抗生素残留对环境微生物群落也会产生影响,并通过食物链影响高级生物,破坏生态系统^[9]。为保障食品安全,我国农业部第 235 号公告规定了动物源性食品中抗生素的最大残留限量(MRL)^[10],许多国家及组织也制定了抗生素最大残留限量,限量标准日益严格。因此,建立一种快速、简便、灵敏的食品中抗生素检测方法十分必要。

目前,抗生素的检测方法主要有微生物法、生物传感法^[11-12]、酶联免疫法^[13-14]、液相色谱法^[15-17]、液相色谱-串联质谱法^[18-21]等。但微生物法、生物传感法及酶联免疫法的特异性不高,灵敏度较差;液相色谱法存在检测抗生素种类有限、检出限高等缺点。超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)因分析效率高、灵敏度高等优势,成为抗生素残留分析的主流检测方法。王浩等^[21]利用液相色谱-串联质谱在 30 min 内测定了牛奶中 5 类 35 种抗生素残留,李宁等^[19]开发了牛奶中 4 类 25 种抗生素残留的检测方法。但已有方法存在操作繁琐、耗时较长、检测抗生素种类或数量相对较少,以及不适于样品快速筛查分析的不足。抗生素残留问题日渐突出,由此带来的潜在风险引起了社会公众广泛关注,为确保我国食品和环境安全,探索一种快速、高效、灵敏的多种类抗生素残留同时测定方法迫在眉睫。

本文以奶牛养殖业中常用的抗生素为研究对象,针对不同种类抗生素理化性质的差异,优化了提取溶剂和净化条件,考察了基质效应,建立了同时测定牛奶中 5 类(磺胺类、喹诺酮类、四环素类、氯霉素类、大环内酯类)38 种抗生素残留的 UPLC-MS/MS 方法。本方法成功应用于实际牛奶样品中目标抗生素的测定,可为牛奶中多类别、多组分抗生素的快速筛查提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters Acquity UPLC H-Class Xevo TQ-S 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司);涡旋振荡器(德国 IKA 公司);HGC-36A 氮吹仪(天津恒奥有限公司);KQ-500DE 超声仪(昆山市超声仪器有限公司);Anke TDL-5-A 离心机(上海安亭科学仪器厂);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司)。

甲醇、乙腈(均为 HPLC 级,德国 Merck 公司);甲酸(HPLC 级,上海麦克林公司);Oasis PRiME HLB(60 mg, 3mL)固相萃取小柱(美国 Waters 公司);磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺异噁唑、磺胺苯酰、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺喹噁啉、磺胺间二甲氧嘧啶、丹诺沙星、氧氟沙星、依诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、培氟沙星、洛美沙星、恩诺沙星、氟罗沙星、沙拉沙星、司帕沙星、奥比沙星、双氟沙星、噁唑酸、氟甲喹、四环素、土霉素、强力霉素、金霉素、氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、红霉素、罗红霉素标准物质购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度均 $\geq 98\%$ 。

1.2 标准溶液的配制

准确称取各标准物质适量,分别用甲醇溶解并定容至 10 mL,配制成质量浓度均为 1 mg/mL 的单标储备液;量取各单标储备液 0.1 mL 至同一 10 mL 容量瓶中,以甲醇定容并混匀,配制成质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准工作溶液,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下密闭保存。准确移取一定量的混合标准工作溶液,配制成系列空白样品基质匹配标准溶液,现用现配。

1.3 样品前处理

准确称取 1.00 g 牛奶样品至 15 mL 聚丙烯离心管中,加入 5 mL 0.5% (体积分数)甲酸乙腈溶液,涡旋振荡后超声 10 min,以 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,待净化。

Oasis PRiME HLB 固相萃取小柱经 5 mL 乙腈-水溶液(体积比 1:1)活化平衡后,上样,流速为 1 mL/min,用 5 mL 乙腈-水溶液(1:1)洗脱,收集流出液,在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下氮吹近干,用初始流动相溶解并

定容至 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜后, 待 UPLC-MS/MS 分析。

1.4 液相色谱与质谱条件

色谱条件: Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm i. d., 1.8 μm); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 2 μL ; 流动相: A 为 0.1% (体积分数) 甲酸水溶液, B 为甲醇。梯度洗脱程序: 0~0.20 min, 95% A; 0.20~2.50 min, 95%~50% A; 2.50~4.50 min, 50%~5% A; 4.50~4.51 min, 5%~95% A; 4.51~8.00 min, 95% A。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI); 待测磺胺类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类抗生素为正离子模式, 毛细管电压: 2.5 kV; 氯霉素类抗生素为负离子模式, 毛细管电压: -2.5 kV; 多反应监测模式(MRM)检测; 离子源温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂温度: 600 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气和锥孔气均为氮气, 流速分别为 1 000、150 L/h; 碰撞气为氩气(纯度 > 99.999%), 流速为 0.15 mL/min。其他质谱参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 色谱与质谱条件的优化

5 类抗生素在不同离子模式下的响应不同, 磺胺类、喹诺酮类、四环素类、大环内酯类抗生素在正离子模式下响应较强, 而氯霉素类在负离子模式下响应较强。因此, 本研究选择正、负离子模式同时监测以提高效率。

考察了 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm i. d., 1.8 μm)和 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm i. d., 1.7 μm)对 38 种抗生素的分离效果。结果显示, 经 Acquity UPLC HSS T3 色谱柱分离后 38 种抗生素的峰形相对更佳, 这是由于 HSS T3 柱为硅胶基质色谱柱, 适用于较宽极性范围的物质分析, 对于同时分析多种目标物的效果相对更佳。

通过质谱扫描分析, 分别对各抗生素进行正离子、负离子扫描, 确定各目标物的分子离子, 再对分子离子进行二级质谱扫描(子离子扫描), 对锥孔电压、碰撞能量等参数进行优化, 选择响应强度较高的子离子为特征离子。设定驻留时间及采集通道, 确保色谱峰采集点数在 12 点以上, 以得到准确的定量结果。各抗生素的母离子、子离子、锥孔电压、碰撞能量见表 1。

表 1 38 种抗生素的质谱参数
Table 1 MS parameters for 38 antibiotics

Class	Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Sulfonamides	Sulfacetamide (SC, 磺胺醋酐)	2.36	215.0	108.0/156.0*	30	18/12
	Sulfapyridine (SPD, 磺胺吡啶)	2.85	250.0	108.0/156.1*	30	25/16
	Sulfadiazine (SDZ, 磺胺嘧啶)	2.63	251.0	91.8/156.0*	30	27/15
	Sulfamethoxazole (SMX, 磺胺甲噁唑)	3.48	254.1	92.0/156.1*	30	26/16
	Sulfathiazole (STZ, 磺胺噻唑)	2.74	256.0	92.1/156.0*	30	25/15
	Sulfamerazine (SMR, 磺胺甲基噻唑)	2.99	265.0	91.8/156.1*	30	28/15
	Sulfisoxazole (SIX, 磺胺异噁唑)	3.61	268.0	92.0/155.9*	30	28/13
	Sulfabenzamide (SB, 磺胺苯酰胺)	3.77	277.1	91.8/155.9*	30	25/15
	Sulfamethazine (SMZ, 磺胺二甲基噻唑)	3.29	279.2	124.2/186.2*	30	17/20
	Sulfamonomethoxine (SMM, 磺胺间甲氧噻唑)	3.56	281.0	92.2/156.0*	30	35/22
	Sulfamethoxyppyridazine (SMP, 磺胺甲氧吡嗪)	3.32	281.0	92.0/156.0*	35	25/15
	Sulfachloropyridazine (SCP, 磺胺氯吡嗪)	3.46	285.1	92.2/155.9*	30	28/15
	Sulfaquinoxaline (SQX, 磺胺喹噁啉)	4.07	301.1	92.2/156.1*	30	30/16
	Sulfadimethoxine (SDM, 磺胺间二甲氧噻唑)	3.99	311.1	91.8/156.1*	36	32/20
	Quinolones	Danofloxacin (DAN, 丹诺沙星)	3.34	358.2	96.0/314.1*	32
Ofloxacin (OFL, 氧氟沙星)		3.17	362.3	261.3/318.3*	25	30/20
Enoxacin (ENO, 依诺沙星)		3.19	321.1	232.0*/303.1	40	30/35
Norfloxacin (NOR, 诺氟沙星)		3.24	320.1	233.0/276.1*	40	25/20
Ciprofloxacin (CIP, 环丙沙星)		3.30	332.1	288.1/314.1*	42	18/22
Pefloxacin (PEF, 培氟沙星)		3.17	334.1	290.1/316.1*	42	19/19
Lomefloxacin (LOM, 洛美沙星)		3.39	352.1	265.1*/308.1	39	22/16
Enrofloxacin (ENR, 恩诺沙星)		3.34	360.2	245.0/316.1*	32	20/22
Fleroxacin (FLE, 氟罗沙星)		3.08	370.4	269.1/326.3*	34	25/19
Sarafloxacin (SAR, 沙拉沙星)		3.50	386.2	299.1/342.1*	45	18/27

(续表 1)

Class	Compound	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Tetracyclines	Sparfloxacin (SPA, 司帕沙星)	3.72	393.3	292.1/349.3*	37	24/20
	Orbifloxacin (ORB, 奥比沙星)	3.47	396.1	295.1*/352.1	40	22/14
	Difloxacin (DIF, 双氟沙星)	3.43	400.2	282.2*/356.1	37	27/21
	Oxolinic acid (OXO, 噁唑酸)	4.14	262.0	216.0*/244.0	30	30/19
	Flumequine (FLU, 氟甲喹)	4.45	262.1	202.0/244.0*	35	35/15
	Doxycycline (DXC, 强力霉素)	4.08	445.2	154.0/428.2*	30	20/28
	Tetracycline (TC, 四环素)	3.28	444.7	410.2*/427.3	30	18/14
	Oxytetracycline (OTC, 土霉素)	3.33	460.7	426.2*/444.2	34	18/18
	Chlortetracycline (CTC, 金霉素)	3.82	479.3	444.2*/462.2	30	20/18
	Chloramphenicols	Chloramphenicol (CAP, 氯霉素)	4.03	320.9	152.2*/257.2	58
Thiamphenicol (TAP, 甲砜霉素)		3.14	354.1	184.9*/226.9	60	18/12
Florfenicol (FFC, 氟苯尼考)		3.60	356.2	185.1*/336.0*	58	16/8
Macrolides	Erythrocin (ERY, 红霉素)	4.33	734.5	158.1*/576.5	30	32/20
	Roxithromycin (ROX, 罗红霉素)	4.47	937.6	158.1*/679.5	40	35/20

* quantitative ion

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂的优化 抗生素残留分析的常用提取溶剂为乙腈、乙腈-水溶液、酸化乙腈等^[22-23]。乙腈为中等极性溶剂,与多数抗生素的极性接近,且能使蛋白质变性沉淀。分别考察了乙腈、0.1% 甲酸乙腈、0.2% 甲酸乙腈、0.5% 甲酸乙腈、1.0% 甲酸乙腈 5 种提取溶剂对目标抗生素的提取效率。在空白牛奶样品中添加 38 种抗生素混合标准溶液,按照相同方法分析处理,进行加标回收试验。结果显示,采用 0.5% 甲酸乙腈提取时,38 种抗生素的平均回收率相对较高,回收率为 76.1%~91.0%。因此选择 0.5% 甲酸乙腈为提取溶剂。

2.2.2 净化方法的优化 牛奶中富含的蛋白质及脂肪不仅会干扰目标物的分析,也会影响色谱柱寿命,因此需对样品进行净化处理。分别比较了 Oasis PRiME HLB、C₁₈ 固相萃取小柱和 QuEChERS 试剂管对目标抗生素的净化效果(见图 1)。结果表明,经 Oasis PRiME HLB 柱净化后,大部分目标化合物的回收率高于 C₁₈ 柱和 QuEChERS 试剂管。这可能是由于 Oasis PRiME HLB 柱中亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙基吡咯烷酮聚合成的固相填料可以很好地吸附脂质,净化效果相对较好,因此选择 Oasis PRiME HLB 柱净化样品。

2.3 基质效应

基质效应(Matrix effect, ME)是基质中除目标物以外的其他成分对目标物分析的影响。由于其他成分与目标组分在离子化过程中存在竞争,改变了目标物的电离效率,使目标物的离子响应强度降低或增强,从而影响分析结果的准确性。通过考察空白样品基质中标准溶液的信号强度(A)与纯溶剂中相同浓度标准溶液信号强度(B)的比值来评价本方法的基质效应,即 $ME = A/B \times 100\%$ 。结果显示,大部分目标抗生素存在不同程度的基质效应,其中诺氟沙星、依诺沙星、环丙沙星、洛美沙星、丹诺沙星、沙拉沙星以及 4 种四环素类抗生素存在较强的基质增强效应,少部分抗生素存在轻微的基质抑制效应。为降低基质效应影响,提高检测结果的准确性,本研究采用空白样品基质匹配标准溶液建立标准曲线,对基质效应进行校正。

2.4 线性范围与定量下限

根据每种抗生素的响应值,配制系列质量浓度的空白样品基质匹配标准溶液,在最佳条件下进行测定,以目标物定量离子的峰面积(Y)为纵坐标,对应质量浓度为横坐标(X)绘制标准曲线,外标法定

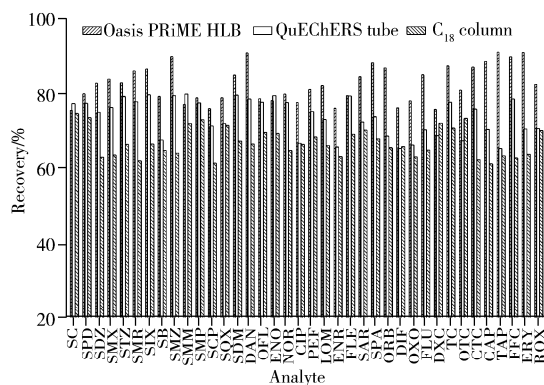


图 1 不同净化方法对 38 种抗生素回收率的影响

Fig. 1 Effect of different purification method on recoveries of 38 antibiotics

量。以定量离子 10 倍信噪比 ($S/N = 10$) 得到定量下限 (LOQ), 方法的线性范围、LOQ 结果见表 2。结果显示, 38 种目标抗生素在各自线性范围内呈良好的线性关系, 相关系数 (r^2) 均大于 0.99, LOQ 为 0.10 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 回收率及相对标准偏差

在空白牛奶基质中分别添加 1.0、5.0、10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平的混合标准溶液, 按照相同方法处理后进行 UPLC-MS/MS 测定, 每个水平重复测定 6 次, 计算回收率及相对标准偏差 (RSD)。由表 2 可知, 在 3 个加标水平下, 38 种目标抗生素的平均回收率为 70.7% ~ 94.9%, RSD 为 4.0% ~ 9.4%。在 LOQ 加标水平下, 空白牛奶基质中添加目标化合物后的总离子流色谱图见图 2。结果表明, 该方法能满足牛奶中 38 种抗生素残留的日常检测要求。

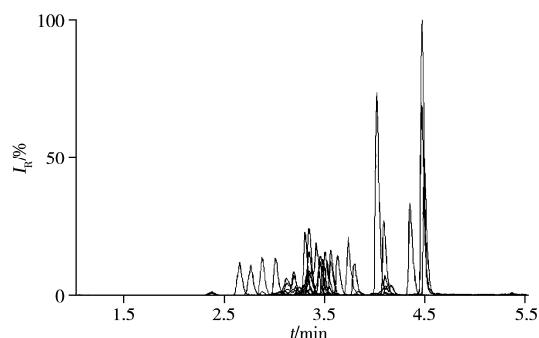


图 2 空白牛奶样品中 38 种抗生素的总离子流图 (定量下限加标水平)

Fig. 2 Total ion chromatogram of 38 antibiotics in a blank milk sample (spiked with LOQ level)

结果表明, 该方法能满足牛奶中 38 种抗生素残留的日常检测要求。

表 2 38 种抗生素的线性范围、定量下限、加标回收率及相对标准偏差 ($n = 6$)

Table 2 Linear ranges, LOQs, recoveries and relative standard deviations of 38 antibiotics ($n = 6$)

Compound	Linear range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Spiked 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		Spiked 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
			Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
SC	0.50 ~ 100	0.50	77.4	8.2	84.2	5.0	87.3	5.1
SPD	0.10 ~ 50	0.10	76.5	5.7	84.0	6.3	84.0	4.7
SDZ	0.10 ~ 50	0.10	80.5	6.6	84.1	5.1	81.2	5.4
SMP	0.10 ~ 50	0.10	79.4	7.6	77.8	7.0	94.5	6.7
STZ	0.10 ~ 50	0.10	75.8	6.7	77.6	6.9	90.3	5.5
SMR	0.10 ~ 50	0.10	85.2	6.9	76.7	6.1	93.1	4.4
SIX	0.10 ~ 50	0.10	83.6	5.7	81.3	7.0	70.9	5.4
SB	0.10 ~ 50	0.10	66.7	6.4	82.7	5.4	73.5	5.1
SMZ	0.10 ~ 50	0.10	78.2	6.0	78.5	7.4	87.2	6.5
SMM	0.10 ~ 50	0.10	83.4	7.2	76.1	6.7	86.5	5.2
SMP	0.10 ~ 50	0.10	78.7	7.1	83.6	6.8	88.6	6.7
SCP	0.10 ~ 50	0.10	85.2	5.5	79.5	5.4	86.4	4.6
SQX	0.10 ~ 50	0.10	75.9	9.4	77.6	5.8	71.2	4.2
SDM	0.10 ~ 50	0.10	82.6	5.5	80.6	7.2	73.7	4.9
DAN	0.50 ~ 100	0.50	82.4	6.3	83.4	6.8	79.4	4.0
OFL	0.10 ~ 50	0.10	79.8	5.8	80.2	5.2	85.3	5.1
ENO	0.50 ~ 100	0.50	82.7	8.1	81.1	8.3	84.8	6.2
NOR	0.50 ~ 100	0.50	79.8	7.0	78.3	7.4	82.3	4.9
CIP	0.50 ~ 100	0.50	78.0	6.8	79.2	6.0	89.0	5.7
PEF	0.10 ~ 50	0.10	77.4	6.7	84.3	7.5	91.8	4.8
LOM	0.10 ~ 50	0.10	81.0	7.9	80.0	6.4	81.7	5.7
ENR	0.10 ~ 50	0.10	80.2	5.9	78.6	4.0	74.8	4.5
FLE	0.10 ~ 50	0.10	76.4	6.2	82.6	5.7	90.7	6.1
SAR	0.10 ~ 50	0.10	85.2	4.9	82.9	5.1	94.9	5.4
SPA	0.10 ~ 50	0.10	80.1	5.6	79.6	5.1	84.7	4.2
ORB	0.10 ~ 50	0.10	81.0	5.1	78.5	5.9	87.9	5.8
DIF	0.10 ~ 50	0.10	79.7	5.5	79.3	4.4	82.6	4.7
OXO	0.50 ~ 100	0.50	79.9	6.3	83.7	6.6	88.9	4.8
FLU	0.50 ~ 100	0.50	76.0	7.8	82.9	7.5	90.2	6.1
DXC	1.00 ~ 100	1.0	75.7	6.4	83.8	6.0	73.9	6.6
TC	1.00 ~ 100	1.0	77.1	7.0	80.1	6.3	82.3	5.4
OTC	0.50 ~ 100	0.50	68.0	7.9	79.3	7.2	87.0	6.0
CTC	1.00 ~ 100	1.0	87.4	6.7	75.1	5.5	94.0	4.3
CAP	0.50 ~ 100	0.50	77.5	7.3	76.1	6.3	87.7	5.5
TAP	1.00 ~ 100	1.0	70.7	5.0	80.8	5.0	93.2	5.2
FFC	0.50 ~ 100	0.50	76.1	7.7	77.9	7.8	75.7	4.9
ERY	0.10 ~ 50	0.10	84.5	8.4	84.2	6.7	87.3	4.0
ROX	0.10 ~ 50	0.10	76.9	6.4	84.0	5.3	84.0	4.7

2.6 实际样品分析

采用所建立的方法对采自养殖场及市场的 15 个牛奶样品进行抗生素残留分析。由表 3 可知, 共检出磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、噻啶酸、丹诺沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、奥比沙星 8 种抗生素, 其含量分别为 0.13~3.37 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.12~8.60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.12~4.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.32~0.99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.45~0.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.13~1.91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、0.12~3.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.10~0.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 未超过我国兽药残留的最高限量标准(磺胺类总量限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 丹诺沙星为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 恩诺沙星为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

表 3 牛奶样品中抗生素的含量($n=3$)
Table 3 Contents of antibiotics in milk samples($n=3$) $w/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$

Milk sample	SDZ	SMP	SCP	OXO	DAN	ENR	SAR	ORB
Sample 1	1.18 ± 0.05*	0.30 ± 0.04	4.71 ± 0.13	0.61 ± 0.25	0.86 ± 0.06	0.19 ± 0.08	-	0.11 ± 0.10
Sample 2	-**	0.19 ± 0.08	-	0.73 ± 0.08	0.62 ± 0.11	0.18 ± 0.09	0.12 ± 0.06	0.12 ± 0.05
Sample 3	0.22 ± 0.02	0.12 ± 0.04	-	0.37 ± 0.10	0.75 ± 0.25	0.19 ± 0.04	-	0.10 ± 0.01
Sample 4	0.13 ± 0.06	8.60 ± 1.01	-	0.50 ± 0.10	0.68 ± 0.37	0.13 ± 0.09	-	0.12 ± 0.06
Sample 5	2.38 ± 0.74	0.92 ± 0.36	0.24 ± 0.20	0.63 ± 0.21	0.65 ± 0.11	-	0.21 ± 0.03	0.10 ± 0.12
Sample 6	0.93 ± 0.28	0.61 ± 0.29	0.12 ± 0.03	0.48 ± 0.23	0.64 ± 0.07	0.15 ± 0.05	-	0.10 ± 0.05
Sample 7	1.43 ± 0.42	0.46 ± 0.13	-	-	0.62 ± 0.05	0.25 ± 0.04	0.22 ± 0.08	0.13 ± 0.11
Sample 8	0.98 ± 0.35	2.23 ± 1.04	0.18 ± 0.09	0.97 ± 0.53	0.66 ± 0.20	0.13 ± 0.09	0.45 ± 0.13	0.10 ± 0.04
Sample 9	2.74 ± 0.68	0.50 ± 0.20	0.15 ± 0.07	0.72 ± 0.05	0.76 ± 0.31	0.15 ± 0.09	-	0.10 ± 0.07
Sample 10	0.14 ± 0.09	0.22 ± 0.10	-	0.32 ± 0.02	0.59 ± 0.17	0.16 ± 0.03	-	0.10 ± 0.08
Sample 11	0.15 ± 0.05	0.20 ± 0.11	0.14 ± 0.05	0.99 ± 0.04	0.74 ± 0.11	0.20 ± 0.04	-	0.10 ± 0.02
Sample 12	1.91 ± 0.07	3.08 ± 1.15	-	-	0.45 ± 0.08	1.91 ± 0.14	3.08 ± 0.05	0.11 ± 0.06
Sample 13	3.37 ± 0.83	3.17 ± 1.23	1.51 ± 0.10	0.67 ± 0.12	0.81 ± 0.18	0.14 ± 0.06	-	0.11 ± 0.05
Sample 14	2.96 ± 0.91	0.53 ± 0.31	-	0.44 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.16 ± 0.05	-	0.10 ± 0.04
Sample 15	0.26 ± 0.10	1.97 ± 0.74	-	0.49 ± 0.05	0.82 ± 0.03	0.15 ± 0.06	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.03

* average value ± standard deviation; ** not detected

3 结 论

本研究建立了 UPLC-MS/MS 同时测定牛奶中 5 类(磺胺类、喹诺酮类、四环素类、氯霉素类和大环内酯类)38 种抗生素残留的分析方法, 对提取溶剂、净化方式等因素进行了优化。在最佳条件下, 38 种抗生素在各自线性范围内具有良好的线性关系, LOQ 为 0.10~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在低、中、高 3 个加标水平下的平均回收率为 70.7%~94.9%, RSD 为 4.0%~9.4%, 各指标均满足分析检测的要求。该方法对于牛奶中多类别、多组分抗生素残留的分析监测、快速筛查具有参考意义。

参考文献:

- [1] Erskine R J, Wagner S, DeGraves F J. *Vet. Clin. N. Am. Food A*, **2003**, 19(1): 109-138.
- [2] McEwen S A, Fedorka-Cray P J. *Clin. Infect. Dis.*, **2002**, 34(3): 93-106.
- [3] Dibner J J, Richards J D. *Poult. Sci.*, **2005**, 84: 634-643.
- [4] Castanon J I R. *Poult. Sci.*, **2007**, 86: 2466-2471.
- [5] Tollefson L, Miller M A. *J. AOAC Int.*, **2000**, 83: 245-254.
- [6] Serratos J, Blass A, Mongrell B, Rigau T, Tortades M, Tolosa E, Aguilar C. *J. Rev. Sci. Technol.*, **2006**, 25: 637-653.
- [7] Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, 67: 1494-1502.
- [8] Li J, Wang T, Shao B, Shen J Z, Wang S C, Wu Y N. *Environ. Health Perspect.*, **2012**, 120: 1144-1149.
- [9] Leclercq S, Mian F M, Stanisz A M, Bindels L B, Cambier E, Ben-Amram H, Koren O, Forsythe P, Bienstock J. *Nat. Commun.*, **2017**, 8: 1-12.
- [10] No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Animal Food(农业部 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留限量). <http://yz.hz-agri.gov.cn/upload-Files/2005-10/1130221564406.doc>.
- [11] Lan L Y, Yao Y, Ping J F, Ying Y B. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 91: 504-514.
- [12] Knecht B G, Strasser A, Dietrich R, Martlbauer E, Niessner R, Weller M G. *Anal. Chem.*, **2004**, 76(3): 646-654.
- [13] Jester E L, Abraham A, Wang Y S, Kathleen R, Steven M P. *Food Chem.*, **2014**, 145: 593-598.

(下转第 692 页)

- [6] Gomez - Oliven L M, Mendoza - Zenil Y P, SanJuan - Reyes N, Galar - Martinez M, Ramirez - Duran N, Martin - Doimeadios R C R, Rodriguez - Farinas N, Islas - Flores H, Elizalde - Velazquez A, Garcia - Medina S, Perez - Pasten B S. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2017**, 135: 98 - 105.
- [7] Panhwar A H, Tuzen M, Kazi T G. *Talanta*, **2018**, 178(1): 588 - 593.
- [8] Bondy S C. *Toxicology*, **2014**, 315(6): 1 - 7.
- [9] Altunay N, Yildirim E, Gurkan R. *Food Chem.*, **2018**, 245(15): 586 - 594.
- [10] Py - daniel K R, Calvo J, Infante C C M, Pires Junior O R, Moya S E, Azevedo R B. *Talanta*, **2018**, 179: 156 - 166.
- [11] Li J M, Jia B S, Zhai Q Z, Tian L X. *Rock Miner. Anal.* (李景梅, 贾宝山, 翟庆洲, 田丽霞. 岩矿测试), **2006**, (1): 64 - 67.
- [12] Wang W G, Li R, Song T W, Zhang C J, Zhao Y. *Spectrochim. Acta A*, **2016**, 164: 133 - 138.
- [13] Guha S, Lohar S, Sahana A, Banerjee A, Safin D A, Babashkina M G, Mitoraj M P, Bolte M, Garcia Y, Mukhopadhyay S K, Das D. *Dalton Trans.*, **2013**, 42: 10198 - 10207.
- [14] Mameli M, Aragoni M C, Arca M, Atzori M, Bencini A, Bazzicalupi C, Blake A J, Caltaqirone C, Devillanova F A, Garau A, Hursthouse M B, Isaia F, Lippolis V, Valtancoli B. *Inorg. Chem.*, **2009**, 48(19): 9236 - 9249.
- [15] Velmurugan K, Raman A, Easwaramoorthi S, Nandhakumar R. *RSC Adv.*, **2014**, 4(67): 35284 - 35289.
- [16] Wen X Y, Fan Z F. *Anal. Chim. Acta*, **2016**, 945: 75 - 84.
- [17] Jung H S, Ko K C, Lee J H, Kim S H, Bhuniya S, Lee J Y, Kim Y, Kim S J, Kim J S. *Inorg. Chem.*, **2010**, 49(18): 8552 - 8557.
- [18] Tayade K, Sahoo S K, Chopra S, Singh N, Bondhopadhyay B, Basu A, Patil N, Attarde S, Kuwar A. *Inorg. Chim. Acta*, **2014**, 421: 538 - 543.
- [19] Han T Y, Feng X, Tong B, Shi J B, Chen L, Zhi J G, Dong Y P. *Chem. Commun.*, **2012**, 48: 416 - 418.

(责任编辑: 盛文彦)

(上接第686页)

- [14] Lamar J, Petz M. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 586(1): 296 - 303.
- [15] Liu Y D, Zhang Q, Chen W S, Hong L. *J. Instrum. Anal.* (刘彦东, 张权, 陈文生, 洪亮. 分析测试学报), **2015**, 34(3): 362 - 366.
- [16] Wang Q, Wang X F, Zhao D H, Huang K, Li Z G, Li Y X, Yang H L, Li L D. *Food Sci.* (王强, 王旭峰, 赵东豪, 黄珂, 黎智广, 李永贤, 杨宏亮, 李刘冬. 食品科学), **2016**, 37(16): 249 - 253.
- [17] Christodoulou E A, Samanidou V F, Papadoyannis I N. *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30(16): 2676 - 2686.
- [18] Zhou Y R, Li D N, Wu J P, Yan F, Pan J, Zhang J, Gu X. *J. Instrum. Anal.* (周悦榕, 李丹妮, 吴剑平, 严凤, 潘娟, 张婧, 顾欣. 分析测试学报), **2017**, 36(8): 1010 - 1017.
- [19] Li N, Zhang Y L, Lin T, Wang J L, Liu H C. *J. Instrum. Anal.* (李宁, 张玉龙, 林涛, 王继良, 刘宏程. 分析测试学报), **2016**, 35(6): 714 - 718.
- [20] Zhang Z W, Li X W, Ding S Y, Jiang H Y, Shen J Z, Xia X. *Food Chem.*, **2016**, 204: 252 - 262.
- [21] Wang H, Zhao L, Yang H M, Pan H Y, Shi H L, Qian C, Zhang S. *Chin. J. Chromatogr.* (王浩, 赵丽, 杨红梅, 潘红艳, 史海良, 钱聪, 张杉. 色谱), **2015**, 33(9): 995 - 1001.
- [22] Abdallah H, Arnaudguilhem C, Jaber F, Lobinski R. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1355: 61 - 72.
- [23] Gao Y Y, Zhang Z H, Liu X, Lu X Y, Yan H, He Y, Yang D J, Yun H. *Chin. J. Chromatogr.* (高洋洋, 张朝晖, 刘鑫, 卢晓宇, 严华, 何悦, 杨大进, 云环. 色谱), **2014**, 32(5): 524 - 528.

(责任编辑: 丁岩)