

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.12.06

畜禽粪污中 7 种磺胺类和 8 种氟喹诺酮类兽药残留 UPLC-MS/MS 检测方法研究

宋艳红¹, 李燕秀², 冯俊吾^{1*}, 武晋孝¹, 赵平伟¹, 张薇¹, 米彦飞¹, 郭禹¹, 马晋东¹

(1. 山西省检验检测中心, 太原 030027; 2. 山西农业大学, 山西太谷 030801)

[收稿日期] 2022-07-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 11-0044-11 [中图分类号] S859.83

[摘要] 对猪、鸡、牛、羊粪污中同时测定 7 种磺胺类和 8 种氟喹诺酮类兽药残留的超高效液相色谱-串联质谱方法进行了研究。样品采用 2% 氯化乙腈 + 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 (50:50, V/V) 提取, 提取液浓缩后用磷酸盐缓冲液溶解, HLB 固相萃取小柱净化, 浓缩富集后用乙腈:0.1% 甲酸水溶液 (20:80, V/V) 复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 上机, 基质加标液外标法定量。结果显示, 猪、鸡、牛、羊粪污中 15 种兽药浓度在 1~100 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.994$)。方法的检出限为 20.0 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 50.0 $\mu\text{g/kg}$ 。在 50、100、500 $\mu\text{g/kg}$ 三个添加浓度下, 15 种兽药平均回收率为 60.5%~115.5%, 批内 RSD 为 1.2%~17.6%, 批间 RSD 为 0.2%~17.6%。该方法具有较好的准确度、精密度, 能快速、高效、方便、准确地测定猪、鸡、牛、羊粪污中 15 种兽药残留, 为进一步调查掌握我国畜禽养殖粪污中的残留兽药种类及残留量提供技术支撑。

[关键词] 超高效液相色谱-串联质谱法; 磺胺类; 氟喹诺酮类; 畜禽粪污

Study on UPLC-MS/MS Detection Method of 7 Sulfonamides and 8 Fluoroquinolones Veterinary Drug Residues in Livestock and Poultry Manure

SONG Yan-hong¹, LI Yan-xiu², FENG Jun-wu^{1*}, WU Jin-xiao¹, ZHAO Ping-wei¹,ZHANG Wei¹, MI Yan-fei¹, GUO Yu¹, MA Jin-dong¹

(1. Shanxi Provincial Inspection and Testing Center, Taiyuan 030027, China; 2. Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

Corresponding author: FENG Jun-wu, E-mail: sxdsjfw@163.com

Abstract: An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of 7 sulfonamides and 8 fluoroquinolones veterinary drug residues in pig, chicken, cattle and sheep manure was studied. The sample was extracted with 2% ammoniated acetonitrile + 0.1 mol/L

基金项目: 山西省重点研发计划项目 (201903D221006)

作者简介: 宋艳红, 本科, 高级兽医师, 从事兽药及兽药残留检测方法研究; 李燕秀, 硕士研究生, 从事动物疾病防控研究。李燕秀与宋艳红为并列第一作者。

通讯作者: 冯俊吾, E-mail: sxdsjfw@163.com

sodium hydroxide solution (50:50, V/V), then dissolved in phosphate buffer, purified by HLB solid phase extraction cartridge, concentrated and enriched with acetonitrile; 0.1% formic acid aqueous solution (20:80, V/V) was reconstituted, passed through a 0.22 μm microporous membrane, and tested on the machine. Quantification was performed using the matrix – spiked external standard method. The results showed that the concentration of 15 veterinary drugs in pig, chicken, cattle and sheep manure had a good linear relationship in the range of 1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 > 0.994$). The detection limit of the method was 20.0 $\mu\text{g/kg}$, and the quantification limit was 50.0 $\mu\text{g/kg}$. At three additive concentrations of 50, 100, and 500 $\mu\text{g/kg}$, the average recoveries of 15 veterinary drugs were 60.5% ~ 115.5%, the average intra – batch *RSD* was 1.2% ~ 17.6%, and the inter – batch *RSD* was 0.2% ~ 17.6%. The method has good accuracy and precision, and can quickly, efficiently, conveniently and accurately determine 15 kinds of veterinary drug residues in pig, chicken, cattle and sheep manure. It will provide strong technical support for further investigation of the kinds and residues of veterinary drugs in livestock and poultry breeding manure in China.

Key words: ultra – performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS); sulfonamide antibiotics; fluoroquinolone antibiotics; livestock and poultry manure

磺胺类和氟喹诺酮类广谱抗菌药作为畜牧业投入品,被广泛应用于畜禽养殖生产中,除治疗外,还可预防、促生长,提升动物源食品产量和质量^[1]。然因此类兽药在畜禽体内不能被完全吸收、代谢和降解,大部分残留药物及代谢物会随着畜禽粪污排出体外,进入自然环境中,这些同样具有生物活性^[2]的残留药物及代谢产物,会对环境、动植物和人体造成直接或者间接的危害。随着养殖业规模化、集约化飞速发展,我国畜禽粪污量同比大幅增加。据统计,目前我国年产畜禽粪污已达 40 亿吨^[3],畜禽粪污中兽药残留污染问题已经成为一个不容忽视的问题。因此,为了更好地掌握畜禽粪污中残留兽药的现状,有必要建立一种方便、高效、准确的畜禽粪污多兽药残留检测方法。目前,兽药残留检测方法通常有液相色谱法、微生物法、电化学检测、免疫分析法、高效液相色谱 – 质谱法、生物芯片法等^[4]。与其他检测方法相比,超高效液相色谱 – 质谱进行检测具有较高的特异性和灵敏度,抗干扰能力强,定量分析及定性分析更为准确^[5-7]。因此,本文拟利用固相萃取及超高效液相色谱 – 串联质谱技术,建立同时测定猪、鸡、牛、羊粪污中 7 种磺胺及 8 种氟喹诺酮类常用兽药的分析方法,为畜禽养殖场实时监测兽药使用情况提供技术支撑,对解决我国畜禽粪污中兽药残留污染问题具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 超高效液相色谱 – 串联质谱仪:UPLC TQ – S,美国 Waters 公司;电子天平:TP – 1102,1100 ~ 0.01 g,丹佛仪器有限公司;电子天平:BP211D,210 ~ 0.01 mg,北京赛多利斯天平有限公司;高速冷冻离心机:Biofuge stratos,德国郝黎氏公司;氮吹仪:N – EVAP,美国 Organomation Associates 公司;涡旋震荡器:MS – 3,德国 IKA 公司;固相萃取装置:SPE – 24,美国 Supelco 公司。

1.2 试药与试剂 磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲噁唑(SMZ)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺甲氧哒嗪(SMP)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺喹噁啉(SQ)、磺胺二甲氧嘧啶(SDM)(美国 Dr. E 公司,纯度分别为 99.2%、99.5%、99.4%、99.7%、94.2%、98.9%、99.4%);环丙沙星(Cipro.)、达氟沙星(Dano.)、恩诺沙星(Enro.)、沙拉沙星(Sara.)(美国 Dr. E 公司,纯度分别为 92.3%、94.2%、99.9%、85.82%);诺氟沙星(Nor.)、培氟沙星(Pe.)、洛美沙星(Lome.)、氧氟沙星(O.)(中国兽医药品监察所,纯度分别为 99.4%、99.6%、98.6%、99.5%);甲醇、乙腈、乙酸乙酯、氨水,色谱纯;其余均为分析纯;高纯氮;高纯氩;试验用水均为一级水;固相萃取柱:Oasis HLB(3cc/60 mg),美国 Waters 公司。

1.3 仪器条件

1.3.1 液相色谱条件 色谱柱:ACQUITY UPLC® BEH C18(1.7 μm,2.1×100 mm);流动相:A 为 0.1%的甲酸水,B 为 0.1%的甲酸乙腈。采用梯度洗脱,柱温:30℃;流速:0.3 mL/min;进样量:5 μL,梯度洗脱方法见表 1。

表 1 梯度洗脱表

Tab 1 Gradient elution table			
时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	A 流动相	B 流动相
0	0.300	95.0	5.0
2	0.300	85.0	15.0
5	0.300	60.0	40.0
7	0.300	5.0	95.0
7.1	0.300	95.0	5.0
9	0.300	95.0	5.0

1.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾正离子模式 (ESI+);检测方式:多反应监测(MRM);电离电

压:2.7 kV;源温:150℃;脱溶剂温度:350℃;脱溶剂气流量:800 L/h;锥孔气流量:150 L/h;碰撞气流量:0.15 mL/min;15 种兽药的定性/定量离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

1.4 样品制备

1.4.1 标准溶液的制备

1.4.1.1 单标储备液的配制 分别精密称取适量的各标准物质共计 15 种,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇超声使其溶解,放至室温,用甲醇稀释至刻度,摇匀,制成 1 mg/mL 的单标储备液。

1.4.1.2 混合标准储备液的配制 精密吸取上述 15 种 1 mg/mL 的单标储备液,各 0.1 mL,置同一 100 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得 1 μg/mL 的混合标准储备液。

表 2 15 种兽药的质谱参数

Tab 2 Mass spectrometric parameters of 15 veterinary drugs				
兽药名称	定性离子对 /(m/z)	定量离子对 /(m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
SD	251.20>91.9	251.20>155.9	30.0	25.0
	251.20>155.9			14.0
SMZ	254.2>92.0	254.2>92.0	30.0	26.0
	254.2>155.9			16.0
SM2	279.3>91.9	279.3>185.9	30.0	30.0
	279.3>185.9			16.0
SMP	281.2>91.9	281.2>155.9	30.0	28.0
	281.2>155.9			16.0
SMM	281.2>91.9	281.2>91.9	30.0	28.0
	281.2>156.0			18.0
SQ	301.2>91.9	301.2>155.9	30.0	30.0
	301.2>155.9			16.0
SDM	311.2>91.9	311.2>155.9	30.0	30.0
	311.2>155.9			20.0
Nor.	320.3>231.0	320.3>302.1	26.0	40.0
	320.3>302.1			20.0
Cipro.	332.3>231.2	332.3>314.2	30.0	36.0
	332.3>314.2			20.0
Pe.	334.3>290.1	334.3>316.1	38.0	17.0
	334.3>316.1			19.0
Lome.	352.3>265.1	352.3>265.1	38.0	22.0
	352.3>308.2			16.0
Dano.	358.3>96.0	358.3>340.1	30.0	25.0
	358.3>340.1			20.0
Enro.	360.3>245.1	360.3>316.2	46.0	26.0
	360.3>316.2			17.0
O.	362.3>261.2	362.3>261.2	30.0	25.0
	362.3>318.3			18.0
Sara.	386.3>299.1	386.3>299.1	30.0	26.0
	386.3>342.1			18.0

1.4.1.3 混合标准工作液的配制 分别精密吸取 500、1000 μL,置于不同 10 mL 容量瓶中,用复溶液 1 μg/mL 的混合标准储备液 10、20、50、100、200、定容,摇匀,即得浓度为 1、2、5、10、20、50、100

ng/mL 的混合标准工作液。

1.4.2 试液的制备

1.4.2.1 提取液的配制 分别取 2% 氨化乙腈 50 mL 和 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 50 mL, 充分混匀, 即得。

1.4.2.2 磷酸盐缓冲液的配制 精密称取 0.8 g 磷酸二氢钾和 0.2 g 磷酸氢二钾, 加 80 mL 水充分溶解后, 定容至 100 mL, 混匀, 即得。

1.4.2.3 酸性洗脱液的配制 取 1 mL 甲酸, 置 100 mL 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 混匀, 即得。

1.4.2.4 碱性洗脱液的配制 取 2 mL 的浓氨水, 加入 50 mL 甲醇、50 mL 乙酸乙酯, 混匀, 即得。

1.4.2.5 复溶液的配制 取 20 mL 乙腈, 加入 80 mL 0.1% 甲酸水, 混匀。

1.4.3 空白粪污样品的筛选 选择太原市及周边多家猪、鸡、牛、羊养殖场, 通过现场确认以及畜禽用药原始记录, 有针对性地选取 30 d 内未使用过磺胺类和氟喹诺酮类药物的养殖场进行新鲜空白粪污样品的采集, 方法确立前使用顾欣等建立的猪粪便中兽药残留量检测方法^[6]进行样品前处理, 上液质联用仪检测, 选择对 15 种兽药均无明显干扰的样品作为相应基质的空白样品。

1.4.4 样品溶液的制备 采集的新鲜粪污样品, 充分混匀, 置 -20 ℃ 冷冻保存。检测时, 称取完全解冻的粪污样品 1.00 ± 0.02 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入提取液 10 mL, 充分涡旋 30 s, 震荡 5 min, 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 5 min, 移出上清液。剩余残渣再加 10 mL 提取液重复提取一次, 合并两次上清液, 混匀, 作为备用液 1。

精密吸取 2 mL 备用液 1 于 10 mL 离心管中, 40 ℃ 水浴条件下氮吹至近干。加入 3 mL 磷酸盐缓冲液溶解, 涡旋 30 s, 4 ℃ 下 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为备用液 2。

取 HLB 固相萃取小柱 (3cc/60 mg) 依次用 3 mL 甲醇、3 mL 磷酸盐缓冲液进行活化。取备用液 2 过柱, 用 3 mL 5% 甲醇水溶液进行淋洗, 抽干。用 2 mL 酸性洗脱液洗脱, 抽干, 作洗脱液 1。再用 2 mL 碱性洗脱液洗脱, 抽干, 作洗脱液 2。收集洗脱液 1、2 于同一个 15 mL 离心管中。于 40 ℃ 水浴条件下氮吹至近

干, 用 1 mL 复溶液溶解残渣, 溶液过 0.22 μ m 滤膜 (聚四氟乙烯膜), 供 UPLC-MS/MS 检测分析。

1.4.5 基质匹配标准溶液的制备 准确称取猪、鸡、牛、羊空白粪污样品各 6 份, 每份 1.00 g (精确至 0.01 g), 按照 1.4.4 项下的方法进行提取、净化、氮吹, 于六份空白样品中分别加入 1 mL 的 1、2、5、10、20 (猪、鸡、羊粪污)、50 (牛粪污)、100 ng/mL 的混合标准工作液复溶, 充分震荡, 使残渣溶解, 制成浓度为 1、2、5、10、20 (猪、鸡、羊粪污)、50 (牛粪污)、100 μ g/mL 的基质匹配标准溶液。进行超高效液相色谱-串联质谱测定, 每个浓度溶液重复进样三次。获得 15 种兽药的基质匹配标准溶液浓度和峰面积, 分别作为横坐标和纵坐标, 绘制出相对应的目标兽药标准曲线。

1.4.6 空白样品溶液的制备 准确称取已初步筛选好的空白猪、鸡、牛、羊粪污样品 1.00 ± 0.02 g (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 照 1.4.4 项下步骤同步平行操作, 得空白样品溶液。

1.4.7 检出限 (LOD) 与定量限 (LOQ) 分别称取猪、鸡、牛、羊粪污空白样品各 1 g, 精密加入一定体积的混合标准储备液, 按照 1.4.4 项下步骤处理样品, 上机, 计算信噪比 (S/N), 以响应值最弱的组分信噪比为 3 时, 对应的添加浓度为方法的检出限, 以响应值最弱的组分信噪比为 10 时, 对应的添加浓度为方法的定量限。

1.4.8 准确度和精密度样品溶液的制备 称取猪、鸡、牛、羊空白粪污样品各 54 份, 每份 1 g, 分成 3 批, 每批均精密加入一定体积的混合标准储备液, 涡旋混匀, 制成 50、100、500 μ g/kg 低、中、高三个不同添加浓度的加标样品, 每个浓度做 6 个平行样, 按 1.4.4 项下步骤处理样品, 照 1.3 项下仪器条件上机测定, 用单点外标法定量, 计算回收率和相对标准偏差; 其中采用同批 6 个回收率数据计算批内相对标准偏差, 采用 3 批平均回收率数据计算批间相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 基质效应 取上述 1.4.5 项下制备的 10 ng/mL 各基质匹配标准溶液, 以及 1.4.1.3 项下纯溶剂配制的相同浓度的混合标准工作液, 按照 1.3 项下仪

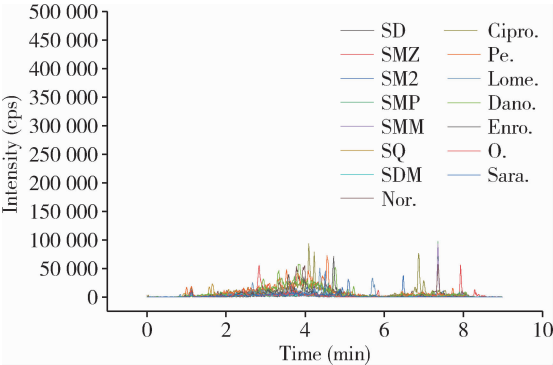


图 2 空白猪粪污样品溶液色谱图

Fig 2 Chromatogram of sample solution of blank pig manure

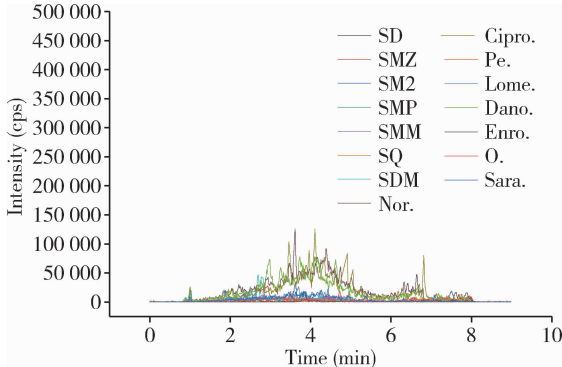


图 4 空白鸡粪污样品溶液色谱图

Fig 4 Chromatogram of sample solution of blank chicken manure

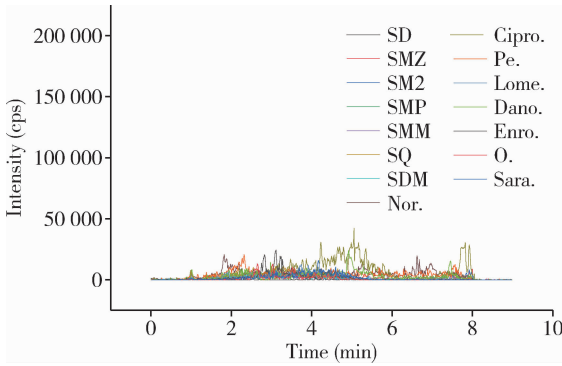


图 6 空白牛粪污样品溶液色谱图

Fig 6 Chromatogram of sample solution of blank cattle manure

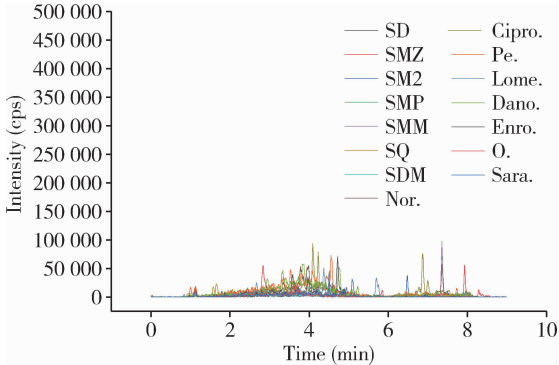


图 3 猪粪污基质匹配标准溶液色谱图 (浓度 50 µg/kg)

Fig 3 Chromatogram of matched standard solution of pig manure matrix (concentration 50 µg/kg)

注:1 - SD、2 - Nor.、3 - O.、4 - Cipro.、5 - Pe.、6 - Dano.、7 - Lome.、8 - SM2、9 - Enro.、10 - SMP、11 - Sara.、

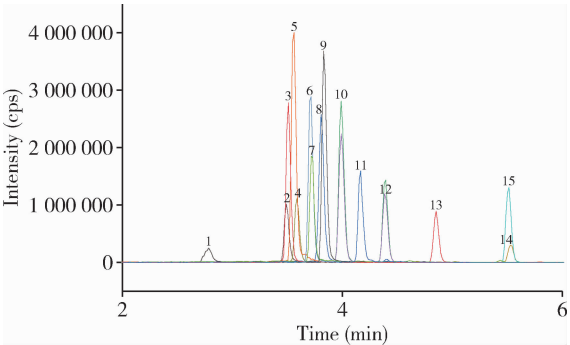


图 5 鸡粪污基质匹配标准溶液色谱图 (浓度 50 µg/kg)

Fig 5 Chromatogram of matched standard solution of chicken manure matrix (concentration 50 µg/kg)

注:1 - SD、2 - Nor.、3 - O.、4 - Cipro.、5 - Pe.、6 - Dano.、7 - Lome.、8 - SM2、9 - Enro.、10 - SMP、11 - Sara.、12 - SMM、13 - SMZ、14 - SQ、15 - SDM。

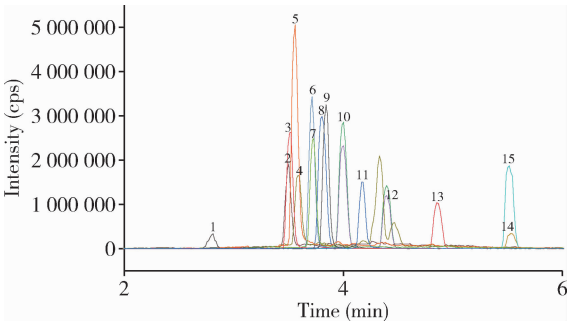


图 7 牛粪污基质匹配标准溶液色谱图 (浓度 50 µg/kg)

Fig 7 Chromatogram of matched standard solution of cattle manure matrix (concentration 50 µg/kg)

1 - SD、2 - Nor.、3 - O.、4 - Cipro.、5 - Pe.、6 - Dano.、7 - Lome.、8 - SM2、9 - Enro.、10 - SMP、11 - Sara.、12 - SMM、13 - SMZ、14 - SQ、15 - SDM。

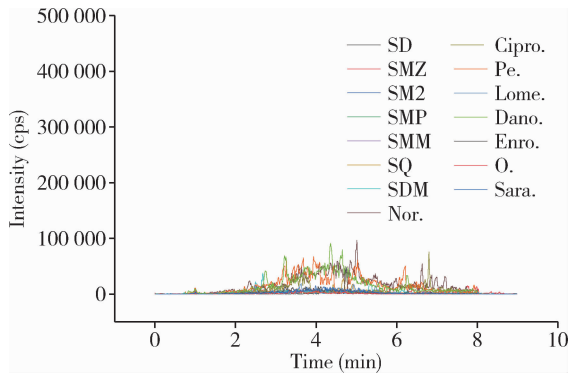


图 8 空白羊粪污样品溶液色谱图

Fig 8 Chromatogram of sample solution of blank sheep manure

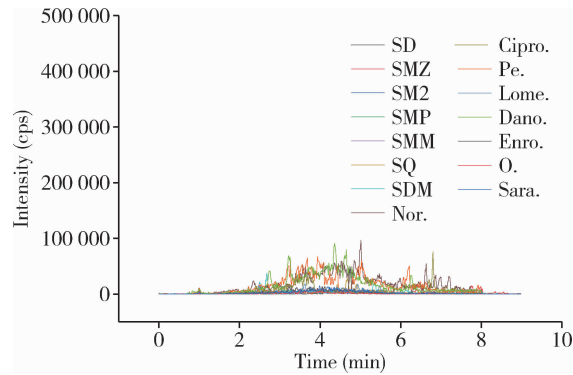


图 9 羊粪污基质匹配标准溶液色谱图(浓度 50 µg/kg)

Fig 9 Chromatogram of matched standard solution of sheep manure matrix (concentration 50 µg/kg)

1 – SD、2 – Nor.、3 – O.、4 – Cipro.、5 – Pe.、6 – Dano.、7 – Lome.、8 – SM2、9 – Enro.、10 – SMP、11 – Sara.、12 – SMM、13 – SMZ、14 – SQ、15 – SDM。

表 4 猪、鸡、牛、羊粪污中 15 种兽药添加回收率与精密度

Tab 4 Recovery and RSD of 15 veterinary drugs added to pig, chicken, cattle and sheep manure

兽药名称		添加浓度 /(μg·kg ⁻¹)	猪粪污			鸡粪污			牛粪污			羊粪污		
			平均回 收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	平均回 收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	平均回 收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%	平均回 收率/%	批内 RSD/%	批间 RSD/%
磺胺类	SD	50	75.8	6.1	7.1	87.2	6.2	2.2	64.5	3.3	3.6	90.7	6.5	7.6
		100	79.5	3.9	7.3	77.2	16.7	5.6	69.7	5.3	12.2	79.0	10.8	12.1
		500	79.5	3.4	4.6	107.5	5.1	2.0	63.2	4.2	3.3	93.4	7.4	13.5
	SMZ	50	84.3	16.0	11.4	84.1	9.4	3.3	68.5	5.7	5.4	86.0	5.2	3.2
		100	80.4	12.2	14.4	82.3	12.7	2.1	62.1	2.3	1.2	94.6	6.4	9.6
		500	76.0	11.3	8.0	79.8	6.6	1.1	76.4	3.6	3.5	98.1	3.8	4.2
	SM2	50	78.5	6.0	3.1	83.7	2.5	0.4	62.9	3.1	3.8	80.7	2.1	4.6
		100	81.9	4.0	11.1	70.9	9.5	2.0	61.5	3.6	2.3	89.7	8.5	5.6
		500	80.5	3.1	4.3	86.3	3.2	1.0	68.2	1.8	6.1	91.0	3.4	2.7
SMP	50	78.6	6.6	4.6	83.1	1.7	0.5	63.6	2.8	3.7	83.4	2.7	4.4	
	100	82.3	4.5	12.6	70.2	8.8	3.5	61.1	3.7	2.2	85.1	3.7	4.3	
	500	77.5	3.4	3.8	82.0	2.1	1.1	65.8	2.3	3.5	90.0	3.8	6.3	
SMM	50	82.1	11.4	9.5	85.7	4.4	0.2	64.7	3.6	3.3	84.3	2.6	4.0	
	100	82.9	5.1	12.0	76.6	7.7	2.8	61.8	1.8	0.9	90.0	4.6	6.9	
	500	77.5	6.1	3.4	78.9	1.7	0.6	72.1	1.5	0.9	90.0	3.0	3.6	
SQ	50	76.5	15.2	13.9	80.6	16.5	4.5	69.7	7.7	12.4	68.2	4.7	10.5	
	100	79.7	12.2	11.9	82.9	15.4	6.9	64.4	3.1	5.5	80.2	8.0	12.3	
	500	71.6	10.7	8.4	83.5	12.1	2.2	78.0	5.7	4.8	82.5	6.9	7.0	
SDM	50	89.1	17.4	15.1	87.3	17.6	7.0	73.3	9.6	14.2	78.2	5.5	15.6	
	100	86.4	14.6	12.0	91.2	16.3	3.2	67.1	5.5	11.7	91.1	9.5	9.7	
	500	77.1	13.4	10.4	93.9	13.3	3.4	87.4	5.9	6.9	92.3	4.8	5.4	

续表													
兽药名称	添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	猪粪污			鸡粪污			牛粪污			羊粪污		
		平均回 收率/%	批内 <i>RSD</i> /%	批间 <i>RSD</i> /%	平均回 收率/%	批内 <i>RSD</i> /%	批间 <i>RSD</i> /%	平均回 收率/%	批内 <i>RSD</i> /%	批间 <i>RSD</i> /%	平均回 收率/%	批内 <i>RSD</i> /%	批间 <i>RSD</i> /%
Nor.	50	99.8	8.0	6.1	101.5	4.6	0.5	62.7	3.6	2.6	61.6	2.0	2.3
	100	93.5	5.7	2.2	82.3	8.7	2.6	60.8	1.5	0.5	61.1	2.9	1.2
	500	89.0	6.5	10.9	114.2	3.2	1.4	62.5	2.9	1.3	64.3	4.6	3.1
Cipro.	50	93.7	7.2	1.0	99.5	3.9	1.4	68.2	6.6	6.5	62.8	4.1	1.3
	100	95.0	5.3	4.7	86.0	9.8	2.8	63.7	2.2	3.8	60.8	1.5	1.4
	500	87.1	4.7	12.5	112.6	3.1	1.2	63.8	4.2	0.8	63.3	3.6	4.0
Pe.	50	107.9	6.9	8.9	96.1	1.6	1.2	78.7	8.6	4.6	102.7	2.8	3.8
	100	102.4	6.2	4.5	96.1	7.6	0.5	74.5	4.7	6.0	104.6	2.1	3.7
	500	109.1	2.5	8.5	113.2	1.7	0.7	86.5	3.1	5.3	109.1	2.9	4.4
氟 喹 诺 酮 类	50	106.4	6.5	9.5	99.9	3.0	1.5	77.7	5.4	7.3	83.7	2.0	3.7
	Lome. 100	105.0	5.1	4.4	90.7	4.8	1.9	71.5	3.4	5.7	92.9	2.3	1.7
	500	99.8	2.7	6.1	106.6	1.8	0.2	86.9	2.0	3.3	101.0	2.2	9.2
Dano.	50	104.1	8.8	7.9	103.7	4.1	1.9	71.5	8.3	6.0	94.9	3.0	6.8
	100	106.1	5.0	4.2	93.0	7.8	2.8	65.4	5.2	3.4	90.1	3.7	6.4
	500	102.2	4.5	1.3	113.7	2.9	2.2	78.8	3.5	5.4	99.0	5.1	11.2
Enro.	50	101.5	7.5	11.6	91.8	1.8	1.0	73.2	8.0	5.1	87.3	2.8	5.2
	100	104.5	5.2	2.6	95.7	9.0	2.6	71.2	5.7	6.8	89.1	2.9	3.1
	500	104.4	4.0	4.5	96.1	1.6	0.4	83.7	2.7	4.6	98.5	2.0	15.4
O.	50	106.9	6.8	4.5	97.4	2.1	0.6	79.1	7.2	6.6	100.2	2.1	5.6
	100	105.1	5.3	3.5	94.9	7.0	2.9	77.0	5.3	7.0	104.1	1.2	2.8
	500	106.2	2.4	5.6	102.2	1.4	1.3	92.8	2.3	6.1	115.5	2.7	4.1
Sara.	50	90.0	8.0	15.3	79.7	4.4	0.9	63.4	4.0	4.9	60.5	2.0	0.6
	100	78.5	5.9	12.2	83.0	7.3	2.6	62.4	1.8	2.7	61.5	3.0	1.7
	500	76.4	5.3	9.6	81.9	2.7	1.2	61.2	1.7	0.6	67.4	5.0	17.6

结果显示,在 50、100、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个添加浓度下,猪、鸡、牛、羊粪污中 15 种兽药平均回收率为 60.5% ~ 115.5%,批内 *RSD* ($n = 6$) 为 1.2% ~ 17.6%,批间 *RSD* ($n = 3$) 为 0.2% ~ 17.6%。结果表明,该方法准确度、精密度良好。

2.5 样品测定 随机抽取从养殖场采回的 8 个畜禽粪污样品,用已建立的分析方法进行测定,每份样品取 2 个平行样,结果取平均值(表 5)。

由表 5 结果可知,恩诺沙星检出率 75%,环丙沙星检出率 62.5%,磺胺间甲氧嘧啶和诺氟沙星检出率均为 25%,磺胺二甲基嘧啶、达氟沙星和氧氟

沙星检出率均为 12.5%,其余组分未检出。因数据有限无法体现山西省畜禽粪污兽药残留真实状况,需积累更多的样品数据,利用专业的统计学软件进行全方位多角度地分析。

3 讨论与结论

3.1 提取条件的选择 目前抗菌药物的提取主要采用有机试剂,部分使用无机试剂进行提取。甲醇、乙腈等有机试剂极性很强,但是有一定的毒性作用,试验过程中曾采用水相提取试剂,分别采用磷酸盐缓冲液两次提取以及 EDTA 溶液和磷酸盐缓冲液分步提取的方式,后者较前者的回收率高,但

表 5 畜禽粪污样品中 15 种兽药残留检测结果 (n=2)

Tab 5 Detection results of 15 veterinary drug residues in livestock and poultry manure samples (n=2)								
兽药名称	样品/(μg·kg ⁻¹)							
	猪粪污 1	猪粪污 2	鸡粪污 1	鸡粪污 2	牛粪污 1	牛粪污 2	羊粪污 1	羊粪污 2
SD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SMZ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SM2	ND	ND	113.5	ND	ND	ND	ND	ND
SMP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SMM	138.8	260.8	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
SDM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nor.	ND	ND	ND	ND	42.1	ND	490.0	ND
Cipro.	3350.6	118.7	ND	894.3	524.4	ND	140.0	ND
Pe.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lome.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dano.	ND	ND	ND	ND	ND	25.4	ND	ND
Enro.	7531.6	626.1	ND	2713.8	1537.7	ND	49.8	31.4
O.	ND	ND	ND	ND	901.7	ND	ND	ND
Sara.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND 代表未检出或检测结果低于检出限。

是回收率未达到 60% 以上,考虑与提取试剂的使用顺序有关,决定将 EDTA 和磷酸盐缓冲液区分前后顺序进行提取。结果:先用 EDTA 溶液再用磷酸盐缓冲液提取时,整体回收率未达到 60% 以上,先用磷酸盐缓冲液再用 EDTA 溶液提取时,磺胺类回收率达 60%,氟喹诺酮仍然无法达到 60% 以上,因此,决定采用有机试剂进行提取,根据磺胺类和氟喹诺酮类抗菌药物的理化特性,采用碱性有机试剂进行提取,并对提取液和震荡时间进行考察。改变单一变量,以回收率作为评价指标,确定最终前处理方法。试验过程中发现震荡时间过长回收率略有降低,可能是震荡时间过长导致抗菌药物发生降解,影响提取效果,同涂宏建,钱诗颖等研究结果一致^[8-9]。最终通过对比回收率确定将 2% 氨化乙腈 + 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 (50: 50, V/V) 作为提取液,震荡 5 min 进行提取,回收率能够满足要求。

3.2 净化条件的选择 为了确定固相萃取方法步骤,课题组先后对固相萃取柱类型 (C18 柱、HLB3cc、HLB6cc)、复溶液、洗脱液以及淋洗液进行

了一一考察。在保持其他前处理方法步骤一致的情况下,只改变单一变量,以回收率结果作为评价指标,选回收率高的变量为最终确定的方法。其中针对洗脱液的筛选优化,程家兴验证不同种类洗脱液对磺胺类和氟喹诺酮类的洗脱效果不同,结果酸性甲醇的洗脱效果总体较好^[10]。但本试验单独采用酸性洗脱液或者碱性洗脱液,均不能使磺胺类和氟喹诺酮类的回收率达到“双赢”的结果,经多次反复试验,考虑到目标抗菌药物具有酸碱两性,最终采取酸性、碱性洗脱液分步洗脱的方式,两类目标抗菌药物的回收率均能同时满足要求。最终确定最佳的净化方式是提取液过 HLB3cc 固相萃取柱,5% 甲醇水溶液淋洗,酸性洗脱液 (1% 甲酸甲醇) 和碱性洗脱液 (甲醇/乙酸乙酯/氨水, 50/50/2, V/V/V) 分步洗脱,浓缩,最后选用乙腈:0.1% 甲酸水 (20/80, V/V) 进行复溶。

3.3 方法优化 本课题建立的检测方法能兼顾磺胺类及氟喹诺酮类药物均达到满意的回收率,且方法稳定性、精密度良好。对比国内外抗菌药物残留

液质联用检测方法^[11-12],后期需要在确保杂质净化效果的前提下,进一步简化前处理步骤,提高方法的检测限,以便能建立更加高效、准确、快速、灵敏的畜禽粪污抗菌药残留检测方法。

本研究建立了一种 SPE-UPLC-MS/MS 同时适用于猪、鸡、牛、羊粪污中 7 种磺胺类、8 种氟喹诺酮类兽药残留检测方法。通过考察,该方法准确度、精密度良好,方法可行。该方法的建立为后期进行山西省不同地区不同规模的养殖场粪污中的抗菌药物检测提供技术支撑,并为进一步研究兽药在环境中的迁移,对环境的影响提供检测方法和数据支持。

参考文献:

- [1] Kirchhelle C. Pharming animals; a global history of antibiotics in food production (1935 - 2017)[J]. Palgrave Communications, 2018, 4(1): 1 - 13.
- [2] Aust M O, Godlinski F, Travis G R, *et al.* Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle[J]. Environ Pollut, 2008, 156(3): 1243 - 1251.
- [3] 武淑霞, 刘宏斌, 黄宏坤, 等. 我国畜禽养殖粪污产生量及其资源化分析[J]. 中国工程科学, 2018, 20(5): 103 - 111. Wu Shuxia, Liu Hongbin, Huang Hongkun, *et al.* Analysis on the amount and utilization of manure in livestock and poultry breeding in China[J]. Strategic Study of CAE, 2018, 20(5): 103 - 111.
- [4] 顾苗苗. 畜产品中兽药残留检测方法的研究[J]. 畜禽业, 2021, 32(12): 50 - 51. Gu Miaomiao. Study on detection method of veterinary drug residue in animal products[J]. Livestock and poultry industry, 2021, 32(12): 50 - 51.
- [5] 万位宁, 陈 熹, 居学海, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时检测禽畜粪便中多种抗生素残留[J]. 分析化学, 2013, 41(7): 993 - 999. Wan Weining, Chen Xi, Ju Xuehai, *et al.* Simultaneous determination of residual antibiotics in livestock manure by solid phase Extraction - Ultra - high Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2013, 41(7): 993 - 999.
- [6] 顾 欣, 张 鑫, 严 凤, 等. 基于 UPLC-MS/MS 同时测定猪粪便中 5 种兽药残留量的研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(10): 32 - 36. Gu Xin, Zhang Xin, Yan Feng, *et al.* Simultaneous determination of five veterinary drug residues in swine manure by Ultra - performance Liquid Chromatography - andem Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(10): 32 - 36.
- [7] 曾 桥, 吕生华, 李 祥, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽粪便中多种抗生素残留[J]. 陕西科技大学学报, 2020, 38(4): 52 - 57. Zeng Qiao, Lu Shenghua, Li Xiang, *et al.* Determination of 6 kinds of antibiotics residues in animal manure by QuEChERS - Ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Journal of Shaanxi University of Science, 2020, 38(4): 52 - 57.
- [8] 涂宏建, 陆 伟, 贾福怀, 等. 涡旋振荡提取-高效液相色谱-紫外检测法测定铁叶酸片中的叶酸含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3721 - 3726. Tu Hongjian, Lu Wei, Jia Fuhuai, *et al.* Determination of folic acid in iron - folic acid tablets by vortex oscillation extraction - high performance liquid chromatography - ultraviolet detection method[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(9): 3721 - 3726.
- [9] 钱诗颖, 蓝雅琼, 刘 倩, 等. 响应面优化超高效液相色谱-串联质谱法同时测定有机肥中 14 种磺胺类抗生素[J]. 华东理工大学学报(自然科学版), 2021, 47(2): 209 - 216. Qian Shiying, Lan Yaqiong, Liu Qian, *et al.* Response surface optimization of Ultra - High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry method for simultaneous determination of 14 kinds of sulfonamide antibiotics in organic fertilizers[J]. Journal of east china university of science and technology, 2021, 47(2): 209 - 216.
- [10] 程家兴. 超高效液相色谱串联质谱检测水中抗生素及果蔬中的霉菌毒素[D]. 北京: 北京化工大学, 2019. Cheng Jiaxing. Detection of antibiotics in surface water and mycotoxins in fruits and vegetables by Ultra Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2019.
- [11] Anumol T, Lehotay S J, Stevens J, *et al.* Comparison of veterinary drug residue results in animal tissues by ultrahigh - performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole or quadrupole - time - of - flight tandem mass spectrometry after different sample preparation methods, including use of a commercial lipid removal product[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2017, 409(10): 2639 - 2653.