

固相萃取-UPLC-MS/MS同时测定鸡内金中68种兽药残留*

刘萌,张亮,陈芳芳,李志梅**,张崇生

(温州市食品药品检验科学研究院,温州 325000)

摘要 目的:建立固相萃取-超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法(UPLC-QQQ MS/MS法)测定中药鸡内金中68种兽药残留。方法:样品匀质后,经乙腈和含0.5%甲酸的乙腈进行2次提取,并经Oasis PRiME HLB固相萃取柱净化。采用Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(3.0 mm×150 mm, 1.8 μm)色谱柱分离,以乙腈和5 mmol·L⁻¹乙酸铵水溶液(含0.1%甲酸)体系为流动相进行梯度洗脱;ESI电离源,正、负离子模式,多反应监测(MRM),空白基质匹配标准曲线法定量。结果:68种兽药在一定质量浓度范围内线性关系良好, $r \geq 0.9958$;方法检测限(LOD)为0.1~3 μg·kg⁻¹,定量限(LOQ)为0.2~10 μg·kg⁻¹;3个浓度水平下(n=6)加样回收率在61.9%~121.5%,RSD为0.50%~8.4%。在50批鸡内金样品中共有5批检出兽药残留,检出的兽药残留包括金刚烷胺、多西环素、恩诺沙星、氟苯尼考。结论:本方法简便、快捷、准确、可靠,适用于鸡内金中多种兽药残留的测定。

关键词:固相萃取;超高效液相色谱串联质谱;兽药残留;鸡内金

中图分类号:R 917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2025)05-0889-12

doi:10.16155/j.0254-1793.2024-1214

UPLC-QQQ MS/MS with solid phase extraction for simultaneous determination of 68 veterinary drug residues in Galli Gigerii Endothelium Corneum*

LIU Meng, ZHANG Liang, CHEN Fang-fang, LI Zhi-mei**, ZHANG Chong-sheng

(Wenzhou Research Institute for Food and Drug Control, Wenzhou 325000, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of veterinary drug residues in Galli Gigerii Endothelium Corneum by ultra high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QQQ MS/MS) with solid-phase extraction. **Methods:** The samples were evenly dispersed, extracted with acetonitrile and acetonitrile containing 0.5% formic acid, and cleaned up with Oasis PRiME HLB solid phase extraction columns. The extracts were separated on Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (3.0 mm × 150 mm, 1.8 μm) using 5 mmol·L⁻¹ ammonium acetate and acetonitrile (containing 0.1% formic acid) as mobile phase by gradient elution. The detection of veterinary drug residues was detected by tandem mass spectrometry with positive electrospray ion source under multiple reaction monitoring (MRM) mode. The matrix-matched external standard method was used for the quantitation. **Results:** The method exhibited good linearities within a certain

* 浙江省市场监督管理局雏鹰计划核心项目(CY2022227);温州市重大科技创新攻关项目(ZN2021002)

** 通信作者 Tel: 13587409531; E-mail: 565508006@qq.com

第一作者 Tel: 13587627800; E-mail: 9709281@qq.com

concentration range $r \geq 0.9958$. The limits of detection (LODs) were in the range of $0.1\text{--}3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The limits of quantitation (LOQs) were in the range of $0.2\text{--}10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The good recovery values (61.9%–121.5%) were achieved for all the 68 veterinary drugs with RSDs ranging from 0.50% to 8.4% for spiking 3 different levels. Out of 50 batches of samples, 5 batches of Galli Gigerii Endothelium Corneum were found to contain veterinary drug residues, including amantadine, doxycycline, enrofloxacin, and florfenicol. **Conclusion:** This method proves suitable for the rapid determination of multiple veterinary drug residues in Galli Gigerii Endothelium Corneum, with a simple, quick, accurate and procedure.

Keywords: solid phase extraction; ultra high performance liquid chromatography–tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC–QQQ MS/MS); veterinary drug residues; Galli Gigerii Endothelium Corneum

鸡内金又名鸡食皮、鸡合子、化石胆,《神农本草经》记载其有健胃消食、涩精止遗、通淋化石的功效,常用于食积不消、呕吐泻痢、小儿疳积、遗尿、遗精、石淋涩痛、胆胀胁痛^[1],是我国传统消导药之一,可药食兼用,是应用较为广泛的一种中药饮片。据统计,269 882 张内科处方中,鸡内金使用频率达 9.68%,排在内科用药频率的第 35 位^[2]。2020 年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)和陕西、北京、江西、广西、湖南、浙江、上海七地的《中药饮片炮制规范》均有收载。2020 年版《中国药典》规定,鸡内金为雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 的干燥沙囊内壁^[3]。杀鸡后,取出鸡肫,立即剥下内壁,洗净,干燥,其炮制方法包括清炒、烫法、砂炒法、醋制法、盐炙。2020 年版《中国药典》收载的炮制品包括炒鸡内金和醋鸡内金,2015 年版《浙江省中药炮制规范》收载的炮制品有炒鸡内金。鸡内金的原料来自饲养家鸡,其养殖和产地初加工普遍缺乏统一的标准化操作规程,为提高家鸡的产量,养殖环节经常使用各类兽药。根据《食品安全国家标准》GB31650–2019,其中 39 种兽药只是在产蛋期禁用,且标准只对其在动物性食品中的最高残留限量进行了规定,存在部分兽药滥用、误用和不遵守休药期等现象。根据 2014—2022 年国家市场监督管理总局对鸡肉抽检结果统计^[4],发现兽药残留检出率为 1.5%,主要检出兽药包括五氯酚、尼卡巴嗪、呋喃唑酮代谢物、土霉素、恩诺沙星、金刚烷胺等,其中,五氯酚和恩诺沙星是近 3 年来检出频率最高的兽药。虽然《食品安全国家标准》GB31650–2019 规定了食品中兽药最大残留限量,但是 2020 年版《中国药典》未对动物类中药中的兽药残留进行规定,因此,有必要对鸡内金等动物类中药饮片中的兽药残留进行监测

和控制。

目前,液相色谱–质谱分析方法已成为同时检测多种兽药残留的重要手段^[5]。随着质谱检测技术的发展,质谱的类型逐渐由单级转向多级,相对于单级质谱,多级质谱具有灵敏度强,选择性高等优势。例如,四极杆–飞行时间质谱法^[6–8]、三重四极杆串联质谱法^[9–10]。为了去除杂质干扰、提高检测灵敏度、降低基质效应,QuEChERS 法被广泛应用于兽药残留检测的样品前处理^[11–13]。

本研究采用不同酸度的乙腈进行 2 次提取,提取液经固相萃取柱净化,采用超高效液相色谱–串联三重四极杆质谱(UPLC–QQQ MS/MS)技术,建立了鸡内金中多种兽药残留的检测方法,用于实际样品的定量分析,并评价炮制对鸡内金中兽药残留的影响。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1290/6470 UPLC–MS/MS 液相色谱–串联质谱仪,配 ESI 源(Agilent 公司),MS3BS025 漩渦混合器(IKA 公司),XS205DU 十万分之一电子天平(Metler Toledo 公司),CF16RX II 离心机(HITACHI 公司);Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(Waters 公司)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈、乙酸均为色谱纯(Merck 公司);水为超纯水;68 种兽药对照品:金刚烷胺(纯度 99.8%)、氯霉素(纯度 99.3%)、金霉素(纯度 93.4%)、西诺沙星(纯度 99.9%)、环丙沙星(纯度 99.4%)、克拉霉素(纯度 97.8%)、丹氟沙星(纯度 98.1%)、双氟沙星(纯度 94.5%)、二甲硝咪唑(纯度 98.9%)、4,4'-二硝基均二苯脲(纯度 95.7%)、盐酸多西环素(纯度 93.4%)、依诺沙星(纯度 92.7%)、恩诺沙星(纯度 99.8%)、红霉素(纯度 98.4%)、氟虫腈(纯

度 98.3%)、氟甲腈(纯度 93.3%)、氟虫腈亚砷(纯度 99.8%)、氟虫腈砷(纯度 99.4%)、氟罗沙星(纯度 99.7%)、氟苯尼考(纯度 99.1%)、氟苯尼考胺(纯度 99.9%)、氟甲喹(纯度 99.4%)、羟甲基甲硝咪唑(纯度 99.4%)、羟基异丙硝唑(纯度 98.9%)、羟基甲硝唑(纯度 99.5%)、林可霉素(纯度 95.8%)、洛美沙星(纯度 96.0%)、马波沙星(纯度 99.9%)、甲硝唑(纯度 99.8%)、诺氟沙星(纯度 98.1%)、氧氟沙星(纯度 99.8%)、奥比沙星(纯度 96.8%)、恶喹酸(纯度 99.2%)、土霉素盐酸盐(纯度 94.3%)、培氟沙星(纯度 99.7%)、金刚乙胺盐酸盐(纯度 99.6%)、罗红霉素(纯度 96.8%)、司帕沙星(纯度 99.7%)、苯甲酰磺胺(纯度 98.9%)、磺胺醋酰(纯度 99.3%)、磺胺氯哒嗪(纯度 99.1%)、磺胺嘧啶(纯度 99.7%)、磺胺二甲氧嘧啶(纯度 98.0%)、磺胺二甲基嘧啶(纯度 99.5%)、磺胺邻二甲氧嘧啶(纯度 99.7%)、磺胺脒(纯度 92.1%)、磺胺甲基嘧啶(纯度 99.5%)、磺

胺对甲氧嘧啶(纯度 99.7%)、磺胺甲噻二唑(纯度 98.0%)、磺胺甲基异噁唑(纯度 98.3%)、磺胺甲氧哒嗪(纯度 99.2%)、磺胺间甲氧嘧啶(纯度 98.2%)、磺胺噁唑(纯度 98.0%)、磺胺硝苯(纯度 97.3%)、磺胺吡啶(纯度 99.7%)、磺胺喹噁啉(纯度 96.4%)、磺胺噻唑(纯度 96.3%)、磺胺二甲异嘧啶(纯度 95.0%)、磺胺二甲异噁唑(纯度 97.3%)、四环素盐酸盐(纯度 97.7%)、替米考星(纯度 98.5%)、甲砷霉素(纯度 99.8%)、替硝唑(纯度 99.9%)、甲氧苄啶(纯度 99.8%)、沙拉沙星(纯度 91.0%)、五氯酚(纯度 91.1%)，均购于上海安谱实验科技股份有限公司。

1.3 样品

50 批鸡内金采购于温州地区药品零售企业及药品批发企业，由温州市食品药品检验科学研究院按 2020 年版《中国药典》或 2015 年版《浙江省中药炮制规范》检验，结果均符合规定，其质量标准及炮制情况见表 1。

表 1 鸡内金样品信息

Tab. 1 The sample informations of *Galli Gigerii Endothelium Corneum*

| 样品编号 (sample No.) | 质量标准 (quality standards) | 炮制品 (processing product) |
|----------------------|---|---|
| 1~15 | 2020 年版《中国药典》一部(ChP 2020. Vol I) | 鸡内金(<i>Galli Gigerii Endothelium Corneum</i>) |
| 16~25 | 2020 年版《中国药典》一部(ChP 2020. Vol I) | 炒鸡内金(fried <i>Galli Gigerii Endothelium Corneum</i>) |
| 26~40 | 2015 年版《浙江省中药炮制规范》(Zhejiang Province Standards of Processing Chinese Crud Drugs 2015 Edition) | 鸡内金(<i>Galli Gigerii Endothelium Corneum</i>) |
| 41~50 | 2015 年版《浙江省中药炮制规范》(Zhejiang Province Standards of Processing Chinese Crud Drugs 2015 Edition) | 炒鸡内金(gried <i>Galli Gigerii Endothelium Corneum</i>) |

2 实验方法

2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (3.0 mm × 150 mm, 1.8 μm) 色谱柱，以乙腈(含 0.1% 甲酸)为流动相 A，5 mmol · L⁻¹ 乙酸铵水溶液(含 0.1% 甲酸)为流动相 B，梯度洗脱(0~0.5 min, 2%A; 0.5~1.8 min, 2%A → 15%A; 1.8~3.5 min, 15%A → 20%A; 3.5~6 min, 20%A → 25%A; 6~7 min, 25%A → 30%A; 7~11 min, 30%A → 35%A; 11~16 min, 35%A → 100%A; 16~26 min, 100%A)，流速 0.45 mL · min⁻¹，柱温 45 °C，进样量 5 μL。

2.2 质谱条件

离子源: ESI 电离源, 正、负离子模式, 离子源温度 350 °C, 干燥气温度 325 °C, 干燥气流速 8 L · min⁻¹; 雾化器压力 310 kPa, 毛细管电压 4 000 V, 喷嘴电压

500 V, 碎裂电压 166 V, 鞘气温度 350 °C, 鞘气流速 12 L · min⁻¹, 监测模式为多反应监测(MRM)。68 种兽药质谱采集参数见表 2。

2.3 混合对照品溶液的配制

分别取 68 种兽药对照品适量, 加甲醇溶解并稀释成质量浓度为 1.0 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液, -18 °C 储存 3 个月。临用前分别吸取各兽药对照品储备液适量混合, 用甲醇稀释成质量浓度为 1 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.4 供试品溶液的制备

取鸡内金粉末(过 120 目筛)约 2 g, 精密称定, 置于离心管中, 精密加入麦氏缓冲液(pH 5.0) 5 mL, 加入 3 mm 不锈钢珠 2 粒, 涡旋混合 1 min 后, 再精密加入乙腈 10 mL, 涡旋混合 1 min, 加入氯化钠 1 g 和硫酸钠 4 g, 8 000 r · min⁻¹ 离心 5 min。精密量取

表 2 68 种兽药的质谱采集参数

Tab. 2 The acquisition parameters of 68 veterinary drugs by mass spectrometry parameters

| 序号 (No.) | 化合物 (compound) | 相对分子质量 (relative molecular mass) | 母离子 (parent ion) <i>m/z</i> | 子离子 (daughter ion) <i>m/z</i> | 碰撞能量 (collision energy)/eV | 保留时间 (retention time)/min | 离子化模式 (ionization mode) |
|-------------|---|--|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 1 | 金刚烷胺 (amantadine) | 151.1 | 152.1 | 135.0 ⁺ , 77.1 | 20, 52 | 5.23 | [M+H] ⁺ |
| 2 | 氯霉素 (chloramphenicol) | 323.1 | 321.0 | 257.0 ⁺ , 152.1 | 12, 32 | 9.50 | [M-H] ⁻ |
| 3 | 金霉素 (chlortetracycline) | 478.1 | 479.1 | 444.0 ⁺ , 154.1 | 20, 32 | 8.03 | [M+H] ⁺ |
| 4 | 西诺沙星 (cinoxacin) | 262.1 | 263.1 | 245.0 ⁺ , 217.0 | 16, 24 | 8.51 | [M+H] ⁺ |
| 5 | 环丙沙星 (ciprofloxacin) | 331.1 | 332.1 | 314.0 ⁺ , 231.0 | 20, 48 | 5.34 | [M+H] ⁺ |
| 6 | 克拉霉素 (clarithromycin) | 747.5 | 748.5 | 158.0 ⁺ , 83.1 | 32, 56 | 13.71 | [M+H] ⁺ |
| 7 | 丹氟沙星 (canofloxacin) | 357.2 | 358.2 | 340.1 ⁺ , 82.1 | 24, 52 | 5.63 | [M+H] ⁺ |
| 8 | 双氟沙星 (difloxacin) | 399.1 | 400.1 | 382.1 ⁺ , 299.1 | 24, 32 | 7.02 | [M+H] ⁺ |
| 9 | 二甲硝咪唑 (dimetridazole) | 141.1 | 142.1 | 96.1 ⁺ , 81.1 | 16, 28 | 5.23 | [M+H] ⁺ |
| 10 | 4, 4'-二硝基均二苯脲 (4, 4'-dinitrocarbanilide) | 302.2 | 301.2 | 137.0 ⁺ , 107.0 | 12, 52 | 15.28 | [M-H] ⁻ |
| 11 | 多西环素 (doxycycline) | 444.2 | 445.2 | 428.1 ⁺ , 410.0 | 20, 20 | 5.91 | [M+H] ⁺ |
| 12 | 依诺沙星 (enoxacin) | 320.1 | 321.1 | 303.3 ⁺ , 231.8 | 20, 40 | 4.95 | [M+H] ⁺ |
| 13 | 恩诺沙星 (enrofloxacin) | 359.2 | 360.2 | 342.2 ⁺ , 316.2 | 24, 20 | 5.94 | [M+H] ⁺ |
| 14 | 红霉素 (erythromycin) | 733.5 | 734.5 | 576.3 ⁺ , 158.1 | 20, 32 | 11.38 | [M+H] ⁺ |
| 15 | 氟虫腈 (fipronil) | 437.2 | 435.1 | 330.1 ⁺ , 250.1 | 40, 24 | 16.16 | [M-H] ⁻ |
| 16 | 氟甲腈 (fipronil-desulfinyl) | 389.1 | 387.1 | 351.0 ⁺ , 282.1 | 36, 16 | 16.28 | [M-H] ⁻ |
| 17 | 氟虫腈亚砷 fipronil-sulfide) | 421.2 | 419.1 | 383.2 ⁺ , 262.0 | 48, 44 | 16.48 | [M-H] ⁻ |
| 18 | 氟虫腈砷 (fipronil-sulfone) | 453.2 | 451.1 | 282.1 ⁺ , 244.0 | 32, 56 | 16.44 | [M-H] ⁻ |
| 19 | 氟罗沙星 (fleroxacin) | 369.1 | 370.1 | 326.0 ⁺ , 268.9 | 20, 32 | 5.25 | [M+H] ⁺ |
| 20 | 氟苯尼考 (florfenicol) | 358.2 | 356.0 | 356.0 ⁺ , 185.1 | 48, 60 | 8.78 | [M-H] ⁻ |
| 21 | 氟苯尼考胺 (florfenicol amine) | 247.3 | 247.7 | 230.0 ⁺ , 130.0 | 16, 40 | 3.11 | [M+H] ⁺ |
| 22 | 氟甲喹 (flumequine) | 261.1 | 262.1 | 244.1 ⁺ , 202.0 | 20, 40 | 13.22 | [M+H] ⁺ |
| 23 | 羟甲基甲硝咪唑 (hydroxydimetridazole) | 157.1 | 158.1 | 140.0 ⁺ , 55.2 | 8, 18 | 4.22 | [M+H] ⁺ |
| 24 | 羟基异丙硝咪唑 (hydroxyipronidazole) | 185.2 | 186.1 | 168.0 ⁺ , 122.0 | 12, 36 | 6.27 | [M+H] ⁺ |
| 25 | 羟基甲硝咪唑 (hydroxymetronidazole) | 187.1 | 188.1 | 126.1 ⁺ , 123.1 | 16, 8 | 3.76 | [M+H] ⁺ |
| 26 | 异丙硝咪唑 (ipronidazole) | 169.2 | 170.1 | 124.1 ⁺ , 109.0 | 12, 8 | 9.20 | [M+H] ⁺ |
| 27 | 林可霉素 (lincomycin) | 406.2 | 407.2 | 359.2 ⁺ , 126.1 | 20, 36 | 4.33 | [M+H] ⁺ |
| 28 | 洛美沙星 (lomefloxacin) | 351.1 | 352.2 | 308.2 ⁺ , 265.0 | 16, 28 | 5.51 | [M+H] ⁺ |
| 29 | 马波沙星 (marbofloxacin) | 335.4 | 363.2 | 320.1 ⁺ , 72.2 | 16, 28 | 4.84 | [M+H] ⁺ |
| 30 | 甲硝咪唑 (metronidazole) | 171.1 | 172.1 | 128.1 ⁺ , 82.2 | 12, 24 | 4.14 | [M+H] ⁺ |
| 31 | 诺氟沙星 (norfloxacin) | 319.1 | 320.1 | 302.1 ⁺ , 231.1 | 24, 48 | 5.00 | [M+H] ⁺ |
| 32 | 氧氟沙星 (ofloxacin) | 361.1 | 362.2 | 318.2 ⁺ , 261.1 | 20, 32 | 5.07 | [M+H] ⁺ |
| 33 | 奥比沙星 (orbifloxacin) | 395.2 | 396.2 | 352.1 ⁺ , 295.1 | 20, 28 | 6.07 | [M+H] ⁺ |
| 34 | 噁唑酸 (oxolinic acid) | 261.1 | 262.1 | 244.0 ⁺ , 216.0 | 20, 32 | 12.79 | [M+H] ⁺ |
| 35 | 土霉素 (oxytetracycline) | 460.2 | 461.2 | 443.2 ⁺ , 426.1 | 12, 20 | 5.29 | [M+H] ⁺ |
| 36 | 培氟沙星 (pefloxacin) | 333.2 | 334.2 | 290.1 ⁺ , 233.1 | 20, 28 | 5.15 | [M+H] ⁺ |
| 37 | 金刚乙胺 (rimantadine) | 179.2 | 180.3 | 163.2 ⁺ , 121.2 | 16, 32 | 8.34 | [M+H] ⁺ |
| 38 | 罗红霉素 (roxithromycin) | 836.5 | 837.5 | 679.4 ⁺ , 158.0 | 24, 36 | 13.74 | [M+H] ⁺ |
| 39 | 沙拉沙星 (sarafloxacin) | 385.1 | 386.1 | 368.1 ⁺ , 342.1 | 24, 20 | 6.59 | [M+H] ⁺ |

表 2(续)

| 序号 (No.) | 化合物 (compound) | 相对分子质量 (relative molecular mass) | 母离子 (parent ion) <i>m/z</i> | 子离子 (daughter ion) <i>m/z</i> | 碰撞能量 (collision energy)/eV | 保留时间 (retention time)/min | 离子化模式 (ionization mode) |
|-------------|----------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 40 | 司帕沙星 (sparfloxacin) | 392.2 | 393.2 | 349.0 [*] , 292.1 | 20, 28 | 6.83 | [M+H] ⁺ |
| 41 | 苯甲酰磺胺 (sulfabenzamide) | 276.1 | 277.1 | 155.9 [*] , 92.0 | 12, 36 | 9.50 | [M+H] ⁺ |
| 42 | 磺胺醋酰 (sulfacetamide) | 214.0 | 215.0 | 156.0 [*] , 92.0 | 12, 28 | 2.89 | [M+H] ⁺ |
| 43 | 磺胺氯吡啶 (sulfachloropyridazine) | 284.0 | 285.0 | 156.0 [*] , 92.1 | 16, 36 | 7.50 | [M+H] ⁺ |
| 44 | 磺胺嘧啶 (sulfadiazine) | 250.1 | 251.1 | 108.1 [*] , 92.1 | 28, 32 | 4.61 | [M+H] ⁺ |
| 45 | 磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine) | 310.1 | 311.1 | 156.0 [*] , 92.1 | 20, 40 | 8.21 | [M+H] ⁺ |
| 46 | 磺胺二甲基嘧啶 (sulfadimidine) | 278.1 | 279.1 | 124.0 [*] , 92.1 | 28, 40 | 4.14 | [M+H] ⁺ |
| 47 | 磺胺邻二甲氧嘧啶 (sulfadoxine) | 310.1 | 311.1 | 156.0 [*] , 92.1 | 20, 36 | 8.21 | [M+H] ⁺ |
| 48 | 磺胺脒 (sulfaguanidine) | 214.1 | 215.1 | 156.0 [*] , 108.0 | 12, 24 | 2.89 | [M+H] ⁺ |
| 49 | 磺胺甲基嘧啶 (sulfamerazine) | 264.1 | 265.1 | 156.0 [*] , 92.1 | 16, 32 | 5.48 | [M+H] ⁺ |
| 50 | 磺胺对甲氧嘧啶 (sulfameter) | 280.3 | 281.1 | 215.1 [*] , 156.0 | 16, 16 | 6.26 | [M+H] ⁺ |
| 51 | 磺胺甲噻二唑 (sulfamethizole) | 270.0 | 271.0 | 156.0 [*] , 92.0 | 12, 32 | 6.04 | [M+H] ⁺ |
| 52 | 磺胺甲基异噁唑 (sulfamethoxazole) | 253.1 | 254.1 | 156.0 [*] , 92.1 | 16, 28 | 8.12 | [M+H] ⁺ |
| 53 | 磺胺甲氧吡啶 (sulfamethoxy pyridazine) | 253.1 | 281.1 | 108.1 [*] , 92.1 | 32, 36 | 6.26 | [M+H] ⁺ |
| 54 | 磺胺间甲氧嘧啶 (sulfamonomethoxine) | 280.1 | 281.0 | 156.0 [*] , 126.0 | 20, 24 | 7.05 | [M+H] ⁺ |
| 55 | 磺胺噁唑 (sulfamoxole) | 267.1 | 268.1 | 155.9 [*] , 108.0 | 16, 28 | 5.77 | [M+H] ⁺ |
| 56 | 磺胺硝苯 (sulfanitran) | 335.1 | 336.1 | 293.9 [*] , 156.0 | 8, 8 | 13.11 | [M+H] ⁺ |
| 57 | 磺胺吡啶 (sulfapyridine) | 249.1 | 250.1 | 156.0 [*] , 92.0 | 16, 28 | 5.14 | [M+H] ⁺ |
| 58 | 磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole) | 314.4 | 315.1 | 158.1 [*] , 92.0 | 16, 28 | 10.31 | [M+H] ⁺ |
| 59 | 磺胺喹噁啉 (sulfaquinolone) | 300.1 | 301.1 | 156.0 [*] , 92.0 | 16, 32 | 10.07 | [M+H] ⁺ |
| 60 | 磺胺噻唑 (sulfathiazole) | 255.0 | 256.0 | 156.0 [*] , 92.1 | 16, 32 | 4.77 | [M+H] ⁺ |
| 61 | 磺胺二甲异嘧啶 (sulfisomidine) | 278.1 | 279.1 | 124.1 [*] , 92.0 | 24, 36 | 4.14 | [M+H] ⁺ |
| 62 | 磺胺二甲异噁唑 (sulphisoxazole) | 267.3 | 268.1 | 156.0 [*] , 92.0 | 16, 36 | 5.77 | [M+H] ⁺ |
| 63 | 四环素 (tetracycline) | 444.2 | 445.2 | 410.1 [*] , 154.2 | 20, 32 | 5.74 | [M+H] ⁺ |
| 64 | 替米考星 (tilmicosin) | 868.6 | 869.6 | 696.4 [*] , 174.1 | 48, 48 | 9.43 | [M+H] ⁺ |
| 65 | 甲砜霉素 (thiamphenicol) | 356.2 | 354.0 | 158.0 [*] , 290.0 | 20, 44 | 5.94 | [M-H] ⁻ |
| 66 | 替硝唑 (tinidazole) | 247.1 | 248.1 | 121.0 [*] , 82.1 | 24, 52 | 5.66 | [M+H] ⁺ |
| 67 | 甲氧苄啶 (trimethoprim) | 290.1 | 291.2 | 261.1 [*] , 123.1 | 28, 28 | 4.93 | [M+H] ⁺ |
| 68 | 五氯酚 (pentachlorophenol) | 266.3 | 268.7 | 288.7 | 5 | 15.26 | [M-H] ⁻ |
| | | | 266.7 | 266.7 | 5 | | |
| | | | 264.7 | 264.7 | 5 | | |
| | | | 262.7 | 262.7 [*] | 5 | | |

 注 (note): ^{*}. 定量离子 (quantitative ion)

上清液 2 mL, 待用。在离心管中精密加入含 1% 甲酸的乙腈 2 mL, 涡旋混合 1 min, 8 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 精密量取上清液 2 mL, 与第 1 次提取的上清液合并。过 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱, 重力自流, 收集流出液, 用 80% 乙腈 3 mL 冲洗萃取小柱, 合并流出液。流出液于 45 °C 氮吹近干, 加 60% 乙腈 1 mL 复溶, 涡旋混合 1 min, 过 0.22 μm PTFE 滤

膜, 作为供试品溶液。取“2.3”项下不同体积的混合对照品溶液, 并用空白样品同法制成的空白基质溶液, 稀释制成基质匹配标准溶液, 用于 UPLC-MS/MS 分析。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性范围、检测限和定量限 精密取“2.3”项下不同体积混合对照品溶液适量, 用空白基质溶液配

制成质量浓度分别为 0、1、5、10、20、50、200 ng·mL⁻¹ 的系列对照品溶液,进样测定。采用外标定量法,以各化合物浓度为横坐标,各化合物定量离子响应值为

纵坐标,进行线性回归,得标准曲线;以信噪比均> 3 时的浓度为检测限,信噪比均> 10 时的浓度为定量限。结果见表 3。

表 3 线性方程及相关系数(*r*),检测限、定量限、基质效应

Tab. 3 The linear equations and correlation coefficients(*r*), limits of detection(LOD), limits of quantity (LOQ) and matrix effect

| 序号 (No.) | 化合物 (compound) | 线性方程 (linear equation) | <i>r</i> | LOD/ (ng·mL ⁻¹) | LOQ/ (ng·mL ⁻¹) | 基质效应 (matrix effect)/% |
|-------------|---|---|----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 1 | 金刚烷胺 (amantadine) | $Y=1.081 \times 10^5 X+2.617 \times 10^4$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | -8.7 |
| 2 | 氯霉素 (chloramphenicol) | $Y=1.093 \times 10^3 X+5.873 \times 10^2$ | 0.998 2 | 0.2 | 0.5 | -14.6 |
| 3 | 金霉素 (chlortetracycline) | $Y=1.859 \times 10^2 X-4.225 \times 10^1$ | 0.998 7 | 1 | 5 | 16.8 |
| 4 | 西诺沙星 (cinoxacin) | $Y=1.080 \times 10^5 X-4.440 \times 10^4$ | 0.998 9 | 0.2 | 0.5 | -42.2 |
| 5 | 环丙沙星 (ciprofloxacin) | $Y=1.670 \times 10^4 X+8.840 \times 10^3$ | 0.999 3 | 0.3 | 1 | 100.7 |
| 6 | 克拉霉素 (clarithromycin) | $Y=9.167 \times 10^4 X-3.971 \times 10^4$ | 0.997 3 | 0.1 | 0.5 | -28.3 |
| 7 | 丹氟沙星 (canofloxacin) | $Y=6.002 \times 10^4 X-9.413 \times 10^3$ | 0.999 5 | 0.3 | 1 | 63.7 |
| 8 | 双氟沙星 (difloxacin) | $Y=3.505 \times 10^4 X-1.192 \times 10^4$ | 0.999 6 | 0.4 | 1 | -3.9 |
| 9 | 二甲硝咪唑 (dimetridazole) | $Y=3.525 \times 10^3 X-2.211 \times 10^3$ | 0.999 4 | 0.7 | 2 | 1.0 |
| 10 | 4, 4'-二硝基均二苯脲 (4, 4'-dinitrocarbanilide) | $Y=1.171 \times 10^4 X-7.737 \times 10^2$ | 0.999 6 | 0.1 | 0.5 | -13.2 |
| 11 | 多西环素 (doxycycline) | $Y=7.211 \times 10^2 X-1.790 \times 10^2$ | 0.999 8 | 0.3 | 1 | 17.7 |
| 12 | 依诺沙星 (enoxacin) | $Y=3.697 \times 10^4 X+9.790 \times 10^2$ | 0.999 6 | 0.6 | 2 | 108.5 |
| 13 | 恩诺沙星 (enrofloxacin) | $Y=6.618 \times 10^4 X-2.070 \times 10^4$ | 0.999 6 | 0.3 | 1 | -6.8 |
| 14 | 红霉素 (erythromycin) | $Y=6.043 \times 10^4 X-3.631 \times 10^4$ | 0.997 5 | 0.3 | 1 | -37.2 |
| 15 | 氟虫腓 (fipronil) | $Y=6.167 \times 10^3 X+3.109 \times 10^3$ | 0.997 7 | 0.2 | 0.5 | 88.9 |
| 16 | 氟甲腓 (fipronil-desulfinyl) | $Y=2.348 \times 10^4 X-1.870 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.2 | 0.5 | 9.0 |
| 17 | 氟虫腓亚砷 (fipronil-sulfide) | $Y=1.349 \times 10^4 X-3.591 \times 10^3$ | 0.999 2 | 0.1 | 0.5 | 27.8 |
| 18 | 氟虫腓砷 (fipronil-sulfone) | $Y=1.383 \times 10^4 X-1.539 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.2 | 0.5 | -4.6 |
| 19 | 氟罗沙星 (floxacin) | $Y=6.440 \times 10^4 X-5.630 \times 10^3$ | 0.999 8 | 0.2 | 0.5 | -5.0 |
| 20 | 氟苯尼考 (florfenicol) | $Y=3.435 \times 10^3 X-1.217 \times 10^3$ | 0.996 0 | 3 | 10 | -7.3 |
| 21 | 氟苯尼考胺 (florfenicol amine) | $Y=5.787 \times 10^3 X+3.610 \times 10^3$ | 0.996 1 | 0.2 | 0.5 | 5.2 |
| 22 | 氟甲喹 (flumequine) | $Y=1.649 \times 10^5 X-2.777 \times 10^4$ | 0.998 3 | 0.4 | 1 | -17.4 |
| 23 | 羟甲基甲硝咪唑 (hydroxydimetridazole) | $Y=5.271 \times 10^3 X-2.453 \times 10^3$ | 0.999 4 | 0.3 | 1 | -8.2 |
| 24 | 羟基异丙硝唑 (hydroxyipronidazole) | $Y=8.985 \times 10^3 X-4.000 \times 10^3$ | 0.999 6 | 0.2 | 0.5 | 2.2 |
| 25 | 羟基甲硝唑 (hydroxymetronidazole) | $Y=8.474 \times 10^2 X+8.928 \times 10^1$ | 0.997 4 | 0.2 | 0.5 | -49.9 |
| 26 | 异丙硝唑 (ipronidazole) | $Y=6.934 \times 10^3 X-2.813 \times 10^3$ | 0.993 2 | 0.2 | 0.5 | -16.2 |
| 27 | 林可霉素 (lincomycin) | $Y=5.653 \times 10^4 X-4.586 \times 10^3$ | 0.999 4 | 0.2 | 0.5 | -30.2 |
| 28 | 洛美沙星 (lomefloxacin) | $Y=3.706 \times 10^5 X-1.894 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.4 | 1 | -1.5 |
| 29 | 马波沙星 (marbofloxacin) | $Y=8.297 \times 10^4 X-1.235 \times 10^4$ | 0.999 4 | 0.3 | 1 | 4.6 |
| 30 | 甲硝唑 (metronidazole) | $Y=1.941 \times 10^4 X-1.081 \times 10^4$ | 0.998 8 | 0.1 | 0.2 | -3.1 |
| 31 | 诺氟沙星 (norfloxacin) | $Y=1.409 \times 10^4 X+4.868 \times 10^3$ | 0.999 5 | 0.3 | 1 | 145.8 |
| 32 | 氧氟沙星 (ofloxacin) | $Y=8.826 \times 10^4 X-1.515 \times 10^4$ | 0.999 3 | 0.3 | 1 | 10.7 |
| 33 | 奥比沙星 (orbifloxacin) | $Y=6.713 \times 10^4 X-5.368 \times 10^3$ | 0.999 3 | 0.2 | 0.5 | -14.7 |
| 34 | 噁唑酸 (oxolinic acid) | $Y=4.247 \times 10^5 X+9.243 \times 10^3$ | 0.999 3 | 0.3 | 1 | -16.1 |
| 35 | 土霉素 (oxytetracycline) | $Y=3.259 \times 10^2 X-2.754 \times 10^2$ | 0.999 7 | 0.7 | 2 | 73.7 |
| 36 | 培氟沙星 (pefloxacin) | $Y=3.294 \times 10^4 X-5.310 \times 10^3$ | 0.999 6 | 0.3 | 1 | -1.3 |

表 3(续)

| 序号 (No.) | 化合物 (compound) | 线性方程 (linear equation) | <i>r</i> | LOD/ (ng·mL ⁻¹) | LOQ/ (ng·mL ⁻¹) | 基质效应 (matrix effect)/% |
|-------------|----------------------------------|---|----------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 37 | 金刚乙胺 (rimantadine) | $Y=9.256 \times 10^4 X-5.884 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | 0.0 |
| 38 | 罗红霉素 (roxithromycin) | $Y=2.727 \times 10^4 X-1.180 \times 10^4$ | 0.998 5 | 0.2 | 0.5 | -17.2 |
| 39 | 沙拉沙星 (sarafloxacin) | $Y=1.781 \times 10^4 X-3.932 \times 10^3$ | 0.999 0 | 0.3 | 1 | 9.9 |
| 40 | 司帕沙星 (sparfloxacin) | $Y=6.255 \times 10^4 X-2.441 \times 10^4$ | 0.999 7 | 0.3 | 1 | -10.7 |
| 41 | 苯甲酰磺胺 (sulfabenzamide) | $Y=9.860 \times 10^3 X-3.723 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | -2.5 |
| 42 | 磺胺醋酰 (sulfacetamide) | $Y=9.676 \times 10^3 X-2.522 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.6 | 2 | 0.1 |
| 43 | 磺胺氯吡嗪 (sulfachloropyridazine) | $Y=4.746 \times 10^3 X-2.021 \times 10^3$ | 0.999 8 | 0.2 | 0.5 | 11.4 |
| 44 | 磺胺嘧啶 (sulfadiazine) | $Y=9.565 \times 10^3 X-4.661 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | 11.2 |
| 45 | 磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine) | $Y=2.441 \times 10^4 X-1.383 \times 10^4$ | 0.999 8 | 0.2 | 0.5 | 7.8 |
| 46 | 磺胺二甲基嘧啶 (sulfadimidine) | $Y=4.415 \times 10^4 X-1.646 \times 10^4$ | 0.999 0 | 0.2 | 0.5 | -16.7 |
| 47 | 磺胺邻二甲氧嘧啶 (sulfadoxine) | $Y=1.315 \times 10^4 X-6.322 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.2 | 0.5 | -0.7 |
| 48 | 磺胺脒 (sulfaguandine) | $Y=8.070 \times 10^3 X-2.678 \times 10^3$ | 0.999 8 | 0.2 | 0.5 | 1.5 |
| 49 | 磺胺甲基嘧啶 (sulfamerazine) | $Y=9.572 \times 10^3 X-3.500 \times 10^3$ | 0.999 8 | 0.2 | 0.5 | 1.5 |
| 50 | 磺胺对甲氧嘧啶 (sulfameter) | $Y=1.969 \times 10^4 X-8.110 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.2 | 0.5 | 25.8 |
| 51 | 磺胺甲噻二唑 (sulfamethizole) | $Y=6.058 \times 10^3 X-2.443 \times 10^3$ | 0.999 6 | 0.2 | 0.5 | 1.5 |
| 52 | 磺胺甲基异噁唑 (sulfamethoxazole) | $Y=8.508 \times 10^3 X-4.536 \times 10^3$ | 1.000 0 | 0.2 | 0.5 | 10.4 |
| 53 | 磺胺甲氧吡嗪 (sulfamethoxy pyridazine) | $Y=1.055 \times 10^3 X-2.883 \times 10^2$ | 0.999 1 | 0.7 | 2 | -15.1 |
| 54 | 磺胺间甲氧嘧啶 (sulfamonomethoxine) | $Y=4.919 \times 10^3 X-2.387 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | 3.9 |
| 55 | 磺胺噁唑 (sulfamoxole) | $Y=6.533 \times 10^3 X-2.688 \times 10^3$ | 1.000 0 | 0.2 | 0.5 | 5.9 |
| 56 | 磺胺硝苯 (sulfanitran) | $Y=2.423 \times 10^1 X-5.358$ | 0.995 8 | 2 | 10 | -25.8 |
| 57 | 磺胺吡啶 (sulfapyridine) | $Y=1.101 \times 10^4 X-9.653 \times 10^3$ | 0.999 7 | 0.2 | 0.5 | -9.5 |
| 58 | 磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole) | $Y=1.091 \times 10^4 X-3.947 \times 10^3$ | 0.999 4 | 0.2 | 0.5 | 45.7 |
| 59 | 磺胺喹噁啉 (sulfaquinoxaline) | $Y=5.703 \times 10^3 X-3.025 \times 10^3$ | 0.999 5 | 0.2 | 0.5 | 3.2 |
| 60 | 磺胺噻唑 (sulfathiazole) | $Y=7.445 \times 10^3 X-3.899 \times 10^3$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | 25.4 |
| 61 | 磺胺二甲异嘧啶 (sulfisomidine) | $Y=9.322 \times 10^3 X-4.960 \times 10^3$ | 0.999 3 | 0.2 | 0.5 | 37.7 |
| 62 | 磺胺二甲异噁唑 (sulphisoxazole) | $Y=9.831 \times 10^3 X-1.426 \times 10^4$ | 0.999 9 | 0.2 | 0.5 | 22.1 |
| 63 | 四环素 (tetracycline) | $Y=6.682 \times 10^1 X-1.003 \times 10^2$ | 0.999 0 | 0.4 | 1 | 232.0 |
| 64 | 替米考星 (tilmicosin) | $Y=1.387 \times 10^3 X+1.013 \times 10^3$ | 0.983 3 | 0.2 | 0.5 | -44.1 |
| 65 | 甲砜霉素 (thiamphenicol) | $Y=3.404 \times 10^3 X+6.654 \times 10^1$ | 0.999 2 | 0.2 | 0.5 | 49.6 |
| 66 | 替硝唑 (tinidazole) | $Y=2.412 \times 10^3 X-1.238 \times 10^3$ | 0.999 6 | 0.3 | 1 | -0.2 |
| 67 | 甲氧苄啶 (trimethoprim) | $Y=5.827 \times 10^4 X-1.980 \times 10^4$ | 0.999 5 | 0.2 | 0.5 | -14.8 |
| 68 | 五氯酚 (pentachlorophenol) | $Y=5.808 \times 10^3 X+1.282 \times 10^4$ | 0.999 5 | 0.2 | 0.5 | 10.2 |

2.5.2 基质效应的计算 基质效应是由于基质共提物与目标化合物在离子源中竞争电离,影响目标化合物响应强度的现象,影响定量分析结果的准确性和可靠性。取“2.3”项下系列浓度混合对照品溶液和“2.4”项下基质匹配标准溶液,按“2.1”“2.2”项下条件注入仪器,以各化合物的质量浓度 *X* 为横坐标,各成分峰面积 *Y* 为纵坐标,绘制标准曲线,并计算基质效应。基质效应 (ME)=(基质匹配混合标准溶液标准曲线的斜率 / 无基质匹配混合标准溶液曲线斜率 - 1) × 100%, 结果见表 3。ME < 0, 表示

存在抑制效应; ME > 0, 表示存在增强效应; 当 ME 在 -20%~20% 时, 表示基质效应不明显^[14]。本文中 21 个化合物存在明显基质效应, 因此, 采用空白基质匹配标准曲线用于定量计算, 以确保测定结果准确。

2.5.3 回收率试验 取空白样品 2.0 g, 共 18 份, 按低、中、高 3 个加样水平, 分别加入质量浓度为 1 μg·mL⁻¹ 的混合对照品溶液 2、100、200 μL, 即添加水平分别为 1、50、100 μg·kg⁻¹, 进行回收率试验, 计算各添加水平的收率和 RSD, 结果见表 4。

表 4 回收率试验结果 (n=6)

Tab. 4 The results of recovery experiments

| 序号 (No.) | 化合物 (compound) | 低 (low) | | 中 (middle) | | 高 (high) | |
|-------------|--|----------------------|-----------|----------------------|-----------|----------------------|-----------|
| | | 回收率 (recovery) /% | RSD/ % | 回收率 (recovery) /% | RSD/ % | 回收率 (recovery) /% | RSD/ % |
| 1 | 金刚烷胺 (amantadine) | 110.0 | 1.6 | 103.5 | 2.2 | 106.0 | 1.6 |
| 2 | 氯霉素 (chloramphenicol) | 101.7 | 0.89 | 101.9 | 1.1 | 109.0 | 0.86 |
| 3 | 金霉素 (chlortetracycline) | 61.9 | 7.3 | 82.6 | 4.4 | 92.2 | 6.1 |
| 4 | 西诺沙星 (cinoxacin) | 101.4 | 2.9 | 94.5 | 4.8 | 101.5 | 3.4 |
| 5 | 环丙沙星 (ciprofloxacin) | 92.9 | 1.0 | 93.1 | 2.7 | 99.9 | 1.0 |
| 6 | 克拉霉素 (clarithromycin) | 115.0 | 7.4 | 75.1 | 6.7 | 79.6 | 7.8 |
| 7 | 丹氟沙星 (canofloxacin) | 103.3 | 1.8 | 94.0 | 2.9 | 103.7 | 1.3 |
| 8 | 双氟沙星 (difloxacin) | 95.9 | 3.8 | 90.5 | 4.6 | 98.7 | 1.9 |
| 9 | 二甲硝咪唑 (dimetridazole)* | 116.5 | 7.2 | 111.7 | 5.9 | 108.1 | 1.8 |
| 10 | 4, 4'-二硝基均二苯脲 (4, 4'-dinitrocarbanilide) | 88.0 | 4.4 | 104.7 | 1.5 | 99.7 | 1.8 |
| 11 | 多西环素 (doxycycline) | 110.1 | 2.7 | 97.2 | 2.4 | 108.6 | 5.7 |
| 12 | 依诺沙星 (enoxacin)* | 90.6 | 3.6 | 83.3 | 5.0 | 85.4 | 5.3 |
| 13 | 恩诺沙星 (enrofloxacin) | 110.7 | 6.0 | 103.3 | 3.8 | 114.3 | 2.1 |
| 14 | 红霉素 (erythromycin) | 105.0 | 1.3 | 83.2 | 4.1 | 91.3 | 6.4 |
| 15 | 氟虫腓 (fipronil) | 108.0 | 6.6 | 102.1 | 2.8 | 101.0 | 1.1 |
| 16 | 氟甲腓 (fipronil-desulfinyl) | 108.4 | 3.2 | 96.4 | 1.5 | 99.4 | 1.5 |
| 17 | 氟虫腓亚砷 (fipronil-sulfide) | 112.9 | 2.6 | 110.8 | 1.6 | 93.1 | 6.2 |
| 18 | 氟虫腓砒 (fipronil-sulfone) | 112.7 | 0.73 | 112.6 | 3.9 | 85.4 | 3.1 |
| 19 | 氟罗沙星 (fleroxacin) | 106.0 | 8.2 | 103.1 | 2.5 | 104.7 | 2.0 |
| 20 | 氟苯尼考 (florfenicol)** | 106.2 | 2.3 | 102.5 | 2.0 | 109.5 | 1.8 |
| 21 | 氟苯尼考胺 (florfenicol amine) | 105.0 | 5.4 | 101.5 | 2.1 | 97.0 | 2.8 |
| 22 | 氟甲喹 (flumequine) | 104.7 | 6.4 | 92.5 | 2.0 | 102.9 | 2.0 |
| 23 | 羟甲基甲硝咪唑 (hydroxydimetridazole) | 111.3 | 1.4 | 105.1 | 2.0 | 108.1 | 1.8 |
| 24 | 羟基异丙硝唑 (hydroxyipronidazole) | 109.8 | 1.5 | 105.4 | 0.95 | 104.4 | 2.2 |
| 25 | 羟基甲硝唑 (hydroxymetronidazole) | 121.5 | 8.3 | 115.8 | 7.6 | 104.3 | 4.9 |
| 26 | 异丙硝唑 (ipronidazole) | 109.3 | 2.5 | 104.6 | 0.56 | 107.3 | 2.4 |
| 27 | 林可霉素 (lincomycin) | 101.5 | 4.2 | 86.0 | 0.98 | 103.3 | 1.1 |
| 28 | 洛美沙星 (lomefloxacin) | 102.0 | 2.1 | 92.7 | 1.0 | 100.1 | 1.0 |
| 29 | 马波沙星 (marbofloxacin) | 99.8 | 5.5 | 92.4 | 0.82 | 107.2 | 1.0 |
| 30 | 甲硝唑 (metronidazole) | 85.5 | 5.7 | 78.4 | 4.9 | 65.9 | 6.2 |
| 31 | 诺氟沙星 (norfloxacin) | 102.2 | 5.3 | 96.4 | 5.9 | 107.6 | 0.79 |
| 32 | 氧氟沙星 (ofloxacin) | 102.4 | 1.8 | 91.6 | 0.81 | 98.4 | 0.98 |
| 33 | 奥比沙星 (orbifloxacin) | 99.4 | 4.4 | 100.2 | 1.2 | 100.0 | 1.8 |
| 34 | 噁啉酸 (oxolinic acid) | 97.7 | 2.2 | 100.0 | 1.0 | 97.3 | 0.57 |
| 35 | 土霉素 (oxytetracycline)* | 92.6 | 2.7 | 84.9 | 0.94 | 90.6 | 0.68 |
| 36 | 培氟沙星 (pefloxacin) | 94.1 | 5.9 | 90.8 | 5.1 | 98.2 | 4.1 |
| 37 | 金刚乙胺 (rimantadine) | 108.4 | 2.8 | 101.1 | 1.3 | 100.4 | 2.1 |

表 4(续)

| 序号 (No.) | 化合物 (compound) | 低 (low) | | 中 (middle) | | 高 (high) | |
|-------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|-----------|
| | | 回收率 (recovery) / % | RSD/ % | 回收率 (recovery) / % | RSD/ % | 回收率 (recovery) / % | RSD/ % |
| 38 | 罗红霉素 (roxithromycin) | 97.6 | 1.1 | 100.0 | 0.63 | 100.1 | 1.2 |
| 39 | 沙拉沙星 (sarafloxacin) | 98.6 | 1.6 | 96.7 | 1.0 | 104.6 | 1.2 |
| 40 | 司帕沙星 (sparfloxacin) | 106.0 | 2.7 | 97.9 | 1.6 | 101.5 | 1.3 |
| 41 | 苯甲酰磺胺 (sulfabenzamide) | 111.4 | 1.4 | 102.1 | 0.92 | 101.1 | 1.0 |
| 42 | 磺胺醋酰 (sulfacetamide)* | 119.4 | 3.0 | 118.0 | 0.80 | 116.7 | 0.99 |
| 43 | 磺胺氯哒嗪 (sulfachloropyridazine) | 104.1 | 0.75 | 98.0 | 0.97 | 103.3 | 0.48 |
| 44 | 磺胺嘧啶 (sulfadiazine) | 96.2 | 2.0 | 97.6 | 0.85 | 99.6 | 1.1 |
| 45 | 磺胺二甲氧嘧啶 (sulfadimethoxine) | 104.8 | 4.7 | 99.2 | 1.6 | 101.4 | 1.0 |
| 46 | 磺胺二甲基嘧啶 (sulfadimidine) | 92.1 | 2.4 | 85.8 | 0.97 | 90.5 | 1.7 |
| 47 | 磺胺邻二甲氧嘧啶 (sulfadoxine) | 99.7 | 5.6 | 98.3 | 3.8 | 101.3 | 2.2 |
| 48 | 磺胺脒 (sulfaguanidine) | 104.4 | 1.0 | 98.4 | 0.91 | 95.2 | 1.0 |
| 49 | 磺胺甲基嘧啶 (sulfamerazine) | 100.9 | 1.3 | 100.0 | 2.8 | 100.0 | 1.9 |
| 50 | 磺胺对甲氧嘧啶 (sulfameter) | 104.6 | 1.7 | 103.0 | 2.0 | 102.0 | 8.4 |
| 51 | 磺胺甲噻二唑 (sulfamethizole) | 99.7 | 1.8 | 95.4 | 1.5 | 100.6 | 0.92 |
| 52 | 磺胺甲基异噁唑 (sulfamethoxazole) | 103.1 | 3.1 | 95.6 | 1.0 | 99.4 | 0.57 |
| 53 | 磺胺甲氧哒嗪* (sulfamethoxy-pyridazine) | 111.9 | 5.8 | 85.8 | 1.6 | 89.4 | 2.5 |
| 54 | 磺胺间甲氧嘧啶 (sulfamonomethoxine) | 104.0 | 4.8 | 98.4 | 1.4 | 100.9 | 1.2 |
| 55 | 磺胺噁唑 (sulfamoxole) | 103.9 | 3.3 | 92.8 | 1.2 | 98.7 | 0.90 |
| 56 | 磺胺硝苯 (sulfanitran)** | 97.7 | 6.6 | 95.9 | 6.0 | 97.7 | 5.3 |
| 57 | 磺胺吡啶 (sulfapyridine) | 105.8 | 5.1 | 98.4 | 2.4 | 102.3 | 2.4 |
| 58 | 磺胺苯吡唑 (sulfaphenazole) | 113.5 | 4.1 | 105.5 | 5.8 | 108.4 | 1.8 |
| 59 | 磺胺喹噁啉 (sulfaquinolaxine) | 98.2 | 4.7 | 94.7 | 4.9 | 97.5 | 2.7 |
| 60 | 磺胺噻唑 (sulfathiazole) | 99.5 | 4.9 | 93.7 | 1.6 | 100.5 | 1.4 |
| 61 | 磺胺二甲异嘧啶 (sulfisomidine) | 74.2 | 6.9 | 93.6 | 1.1 | 104.7 | 1.3 |
| 62 | 磺胺二甲异噁唑 (sulphisoxazole) | 112.6 | 1.6 | 116.7 | 2.2 | 118.1 | 1.6 |
| 63 | 四环素 (tetracycline) | 101.7 | 0.89 | 90.0 | 1.1 | 97.1 | 0.86 |
| 64 | 替米考星 (tilmicosin) | 102.7 | 7.3 | 105.4 | 4.4 | 102.4 | 6.1 |
| 65 | 甲砒霉素 (thiamphenicol) | 99.5 | 2.9 | 100.6 | 4.8 | 107.8 | 3.4 |
| 66 | 替硝唑 (tinidazole) | 102.9 | 1.0 | 102.9 | 2.7 | 98.7 | 1.0 |
| 67 | 甲氧苄啶 (trimethoprim) | 112.7 | 7.4 | 100.4 | 6.7 | 103.5 | 7.8 |
| 68 | 五氯酚 (pentachlorophenol) | 104.3 | 1.8 | 99.4 | 2.9 | 100.3 | 1.3 |

注 (note): *. 添加水平分别为 2、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (add levels at 2, 50, and 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$); **. 添加水平分别为 10、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (add levels at 10, 50, and 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

2.6 样品检测

取表 1 中的鸡内金样品,按“2.4”项下方法配制供试品溶液并在本文色谱、质谱条件下进行测定,其中 5 批样品检出兽药残留,检出率为 8.3%(表 5)。

检出的兽药残留主要包括喹诺酮类抗生素、抗病毒药物等。检出兽药残留种类及检出率与我国多地鸡肉中兽药残留监测结果^[15-16]相符。

表 5 阳性样品检测结果

Tab. 5 The detection results of positive sample

| 样品编号 (sample No.) | 兽药残留 (veterinary drug residues) / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) | | | |
|----------------------|--|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | 金刚烷胺 (amantadine) | 多西环素 (doxycycline) | 恩诺沙星 (enrofloxacin) | 氟苯尼考 (florfenicol) |
| S2 | 25 | ND | 57 | ND* |
| S9 | ND | ND | ND | 67 |
| S28 | ND | ND | 67 | ND |
| S33 | ND | ND | ND | 37 |
| S37 | ND | 48 | ND | ND |

注 (note): ND. 未检出 (not detected)

3 讨论

3.1 提取溶剂优化

肌肉等蛋白质含量较高的样品中兽药残留的提取溶剂主要为乙腈,并通过加入低浓度的 EDTA 避免兽药和金属离子的络合^[17]。但由于鸡内金细粉含水量低,先用含 EDTA 的麦氏缓冲液 (pH 5.0) 对其进行浸泡,有利于提取溶剂渗入及降低杂质干扰,利于后续溶剂提取。对于喹诺酮类等两性化合物,加入低浓度的甲酸,可提高兽药在提取溶剂中溶解度^[18]。本文对比乙腈中添加不同浓度甲酸 (0.1%、0.2%、0.5%、1%) 对 68 种兽药回收率的影响,发现含 0.2% 甲酸的乙腈对喹诺酮类、四环素类等目标化合物具有最佳提取效果,回收率在 80%~120%。但大多数磺胺类化合物回收率 < 60%,可能是由于磺胺类为弱碱性化合物,在过高的酸性环境中提取会产生相当程度的损失。本文采用 2 次提取的方式,即分别采用乙腈和含 0.2% 甲酸的乙腈进行提取,合并提取液,用于后续净化。经过 2 次提取,大多数目标化合物的回收率在 80%~120%。

3.2 净化方式优化

动物源性样品中兽药残留测定时,常选择 C₁₈、PSA^[19]、Oasin PRiME HLB^[20]、Bond Elut HLB SPE 作为净化萃取柱,基于待测物质不被填料吸附,而磷脂、蛋白质、脂肪等干扰物被吸附于固相萃取填料的特性,实现样液分离与净化。本文选择以上 4 种净化方式,比较其对净化效果的影响,结果表明, Oasin PRiME HLB 对大多数目标化合物回收率在 80%~120%,净化效果最佳。其原因可能是鸡内金几乎不含脂肪,主

要成分为蛋白质和磷脂, Oasin PRiME HLB 对长链结构物质 (如磷脂、游离脂肪酸、甘油三酯等) 具有较强的吸附作用^[21]。

3.3 炮制对兽药残留的影响

50 批样品测定结果显示,炒鸡内金中均未检出兽药残留。根据 2020 年版《中国药典》,炒鸡内金由鸡内金清炒或烫法炒至鼓起^[3]。文献报道的炒鸡内金炮制工艺有:炒制时间 120 s,炒制温度 215 °C;金沙烫锅底温度 200~201 °C,炮制时间 60 s;200 °C 烤制 5 min^[22]。由于炒鸡内金的炮制温度达 200 °C 以上,因此,鸡内金的炒制过程可能会引起兽药分解。本文制备兽药残留量 200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 鸡内金模拟样品,考察其在 200 °C 加热不同时间后兽药残留量的变化,结果 (图 1) 大部分兽药残留量可以在 200 °C 加热 5 min 时明显下降,但不同种类兽药残留量降解速度差异较大,其中,四环素类抗生素降解较为显著。

将“2.6”项下阳性样品按照文献 [22] 报道的炮制工艺,于 200 °C 烤制 5 min,比较炮制前后兽药残留量变化,结果见表 6。发现兽药残留虽明显减少,但仍高于定量限。

4 结论

本文建立了鸡内金中 68 种兽药残留测定方法,通过不同酸碱性溶剂进行 2 次提取,并经固相萃取柱净化和 UPLC-MS/MS 法分析。该方法操作简便、快速,净化效果好,灵敏度高,准确度高,可以用于动物类中药的兽药残留研究和监管。同时也发现,炒制可以降低鸡内金兽药残留量,为鸡内金的炮制工艺优化提供了依据。

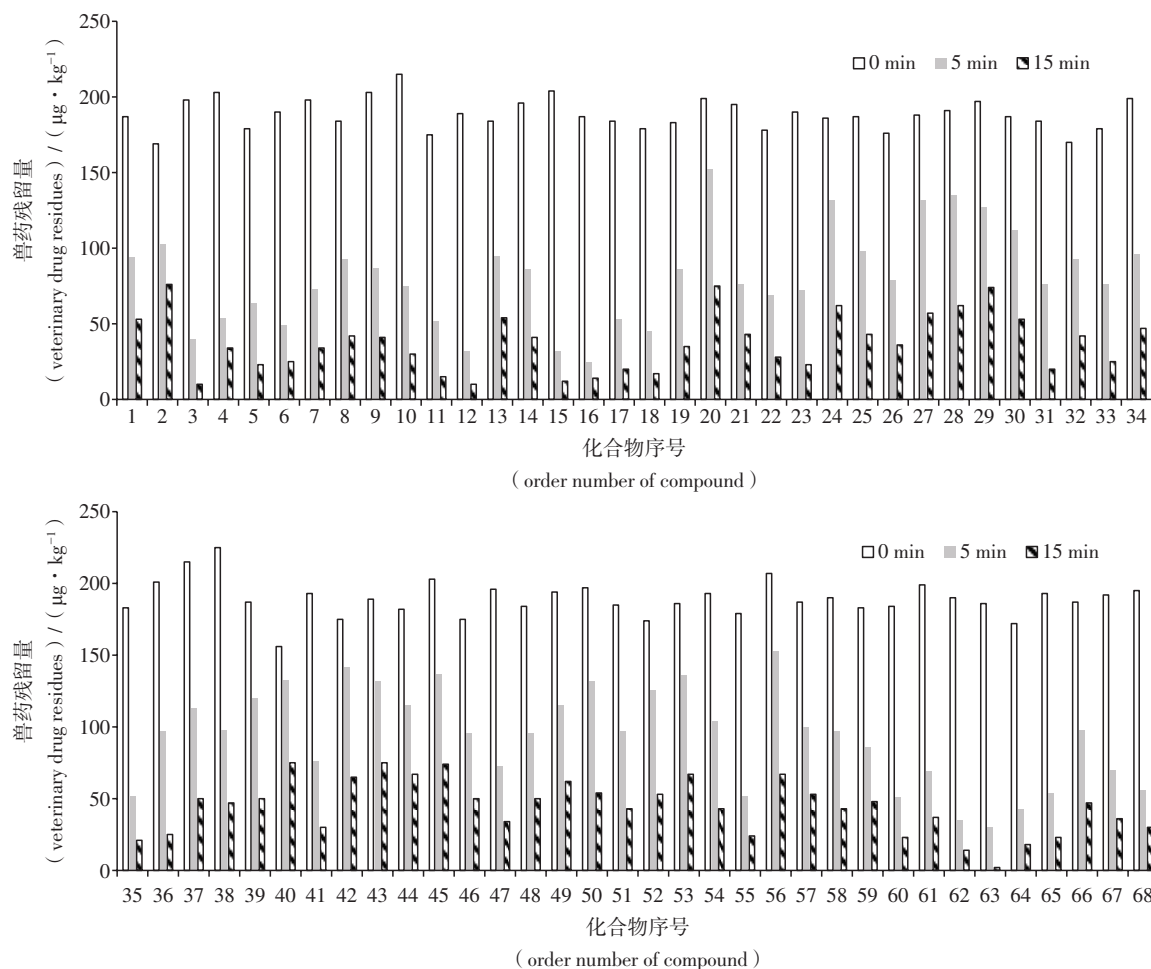


图 1 加热对兽药残留的影响

Fig. 1 The effects of heating on veterinary drug residues

表 6 阳性样品炮制后兽药残留

Tab. 6 Veterinary drug residues of positive samples after processing

| 样品编号 (sample number) | 炮制后兽药残留 (veterinary drug residues after processing) / (μg · kg ⁻¹) | | | |
|-------------------------|--|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | 金刚烷胺 (amantadine) | 多西环素 (doxycycline) | 恩诺沙星 (enrofloxacin) | 氟苯尼考 (florfenicol) |
| S2 | 17 | ND | 30 | ND |
| S9 | ND | ND | ND | 33 |
| S28 | ND | ND | 28 | ND |
| S33 | ND | ND | ND | 18 |
| S37 | ND | 21 | ND | ND |

注 (note): ND. 未检出 (not detected)

参考文献

[1] 王楠, 顾笑妍, 吴怡, 等. 鸡内金的临床应用及药理作用研究概况 [J]. 江苏中医药, 2021, 53 (1): 77
WANG N, GU XY, WU Y, *et al.* Research overview of clinical application and pharmacological action of Jineijin [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med*, 2021, 53 (1): 77

[2] 杨洪军. 中药饮片用法与用量标准研究 [M]. 福州: 福建科技出版社, 2011: 325
YANG H. Research on the Usage and Dosage Standards of Traditional Chinese Medicines Prepared in Ready-to-Use Forms [M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 2011: 325
[3] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部 [S]. 2020: 202

- ChP 2020. Vol I [S]. 2020; 202
- [4] 国家市场监督管理总局食品安全抽检监测司. 国家市场监督管理总局食品安全抽检结果公布查询系统 [DB/OL]. (2024-10-10) [2024-10-10]. <https://spcjsac.gsxt.gov.cn/>
General Administration of Market Supervision The Food Safety Sampling Inspection Result Publication and Query System of the State Administration for Market Regulation [DB/OL]. (2024-10-10) [2024-10-10]. <https://spcjsac.gsxt.gov.cn/>
- [5] TSAGKARIS AS, NELIS JLD, ROSS GMS, *et al.* Critical assessment of recent trends related to screening and confirmatory analytical methods for selected food contaminants and allergens [J]. *TrAC Trends Anal Chem*, 2019, 121 (12): 115688
- [6] PESREN M, HAKME E, NINGA E, *et al.* Analysis of veterinary drug- and pesticide residues in pig muscle by LC-Q TOF-MS [J]. *Food Control*, 2023, 148 (6): 109656
- [7] HOU X, XU X, XU XY, *et al.* Application of a multiclass screening method for veterinary drugs and pesticides using HPLC-QTOF-MS in egg samples [J]. *Food Chem*, 2020, 309 (1): 125746
- [8] LI XW, CHI QC, XIA SX, *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 (1): 461671
- [9] MELEKHIN AO, TOLMACHEVA VV, GONCHAROV NO, *et al.* Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hypercrosslinked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2022, 387 (1): 132866
- [10] ABDULLAH AT, SAEED A, SARAH AS, *et al.* Fast simultaneous determination of 23 veterinary drug residues in fish, poultry, and red meat by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Arab J Chem*, 2022, 15 (10): 104116
- [11] OLIVEIRA ARIAS JL, SCHNEIDER A, BATISTA-ANDRADE JA, *et al.* Chitosan from shrimp shells: a renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk [J]. *Food Chem*, 2018, 240 (1): 1243
- [12] XU X, XU XY, HAN M, *et al.* Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2019, 276 (1): 419
- [13] YANG M, YI J, WEI C, *et al.* Rapid determination of nitrofurantol metabolites residues in honey by ultrasonic assisted derivatization-QuEChERS-high performance liquid chromatography / tandem mass spectrometry [J]. *J. Food Compos Anal*, 2022, 114 (10): 104812
- [14] 邱巧丽, 陈晓红, 潘胜东, 等. 基于通过型固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛蛙中9种雌激素 [J]. *色谱*, 2022, 40 (7): 669
QIU QL, CHEN XH, PAN SD, *et al.* Simultaneous determination of nine estrogens in bullfrogs using filtered solid phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. [J]. *Chin J Chromatogr*, 2022, 40 (7): 669
- [15] 马洁, 罗莎, 赵帅, 等. 2016—2022年天津市市售猪肉、鸡肉中兽药残留监测结果分析及膳食暴露评估 [J]. *现代预防医学*, 2023, 50 (15): 2848
MA J, LUO S, ZHAO S, *et al.* Analysis of surveillance results and dietary exposure assessment of veterinary drug residues in pork and chicken sold in Tianjin from 2016 to 2022 [J]. *Mod Prev Med*, 2023, 50 (15): 2848
- [16] 关心慧, 郑君杰, 方芳, 等. 基于抽检数据的北京市鸡蛋安全状况分析与对策探析 [J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59 (6): 321
GUAN XH, ZHENG JJ, FANG F, *et al.* Analysis and countermeasure exploration of egg safety in Beijing based on sampling inspection data [J]. *Chin J Anim Sci*, 2023, 59 (6): 321
- [17] SIKAND V, TONG P, VINK S, *et al.* Physicochemical properties of skim milk powders prepared with the addition of mineral chelators [J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99 (6): 4146
- [18] 吴彦蕾, 苏敏, 周纯洁, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测猪肉中76种兽药及其代谢物 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44 (20): 311
WU YL, SU M, ZHOU CJ, *et al.* Simultaneous determination of 76 veterinary drugs and their metabolites in pork by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2023, 44 (20): 311
- [19] 季宝成, 杨澜瑞, 程迎新, 等. 改良 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定乌鸡肉中35种兽药残留 [J]. *质谱学报*, 2023, 44 (6): 807
JI BC, YANG LR, CHENG YX, *et al.* Determination of thirty-five veterinary drug residues in black chicken by modified QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2023, 44 (6): 807
- [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
ZHANG W, XIAO M, WU D, *et al.* Simultaneous determination of 37 kinds of prohibited veterinary drug residues in aquacultural “non-pharmaceutical” inputs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2022, 41 (12): 1751
- [21] 杨霄, 谢仲桂, 李小玲, 等. 通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定沉积物中草铵膦、草甘膦及其代谢物 [J]. *色谱*, 2025, 43 (2): 155
YANG X, XIE ZG, LI XL, *et al.* Determination of glufosinate, glyphosate and their metabolites in sediment by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through solid-phase extraction, [J]. *Chin J Chromatogr*, 2025, 43 (2): 155
- [22] 孙爱萍, 袁波, 杨玉军, 等. 鸡内金炮制的现代研究进展 [J]. *中南药学*, 2018, 16 (6): 807
SUN AP, YUAN B, YANG YJ, *et al.* Advances in modern research on Corneum processing [J]. *Cent South Pharm*, 2018, 16 (6): 807

(本文于2024年10月18日收到)