

DOI: [10.3724/j.1007-6336.2025-0105](https://doi.org/10.3724/j.1007-6336.2025-0105)

QuEChERS结合液相色谱-串联质谱法快速检测海洋生物样品中抗生素及其代谢产物

张伟琪¹, 王鑫磊¹, 任苏瑜¹, 卢爽¹,
吕敏^{2,3}, 丁晶¹, 常显波¹

(1.烟台大学 环境与材料工程学院, 山东 烟台 264005; 2.中国科学院烟台海岸带研究所, 山东 烟台 264003; 3.烟台市海洋生态环境核安全保障重点实验室, 山东 烟台 264003)

摘 要:本研究以四环素类、 β -内酰胺类、大环内酯类、磺胺类和喹诺酮类等 5 大类 19 种抗生素以及 5 种抗生素代谢产物为研究对象,建立典型海洋生物中抗生素及其代谢产物残留的前处理提取方法。比较不同提取方法(QuEChERS 方法、超声萃取-柱净化法)下目标物的提取回收率,优化前处理过程中的盐析剂和吸附剂。试验结果表明:QuEChERS 方法的提取效率优于超声萃取-柱净化法,且使用以氯化钠和硫酸钠为盐析剂、 C_{18} 为吸附剂的 QuEChERS 方法的回收率优于以硫酸镁和柠檬酸三钠为盐析剂的 QuEChERS 方法。优化后的方法对 24 种抗生素及其代谢产物的检出限为 $0.04 \sim 3.31 \mu\text{g/kg}$,回收率为 $60.23\% \sim 119.88\%$,相对标准偏差(RSD)为 $0.10\% \sim 29.79\%$ 。本研究可为研究抗生素及其代谢产物在海洋生物中的残留特征和环境行为提供技术支持。

关键词:QuEChERS 方法; 抗生素; 液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS); 海洋生物样品

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:1007-6336(2026)02-0165-10

Rapid detection of antibiotics and their metabolite in marine biological samples by QuEChERS with liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Zhang Weiqi¹, Wang Xinlei¹, Ren Suyu¹, Lu Shuang¹,
Lyu Min^{2,3}, Ding Jing¹, Chang Xianbo¹

(1.School of Environmental and Materials Engineering, Yantai University, Yantai 264005, China; 2.Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 3.Yantai Key Laboratory of Nuclear Safety Assurance of Marine Ecological Environment, Yantai 264003, China)

Abstract: In this study, 19 kinds of antibiotics in five categories (tetracyclines, β -lactams, macrolides, sulfonamides and quinolones) and 5 antibiotic metabolites were included as target analytes. A pretreatment extraction method for antibiotics and their metabolites residues in typical marine organisms (croaker, shrimp, clam) was established. The extraction recoveries of the targets under different extraction methods (QuEChERS method, Ultrasonic extraction-column purification method) were compared, and the salting-out and adsorbents

收稿日期:2025-06-24, 修订日期:2025-10-09

基金项目:国家自然科学基金项目(42477037, 42276168, 22506168); 山东省自然科学基金项目(ZR2023YQ032, ZR2021MD039, ZR2023QB022); 中国科学院青年创新促进会项目(2021212)

作者简介:张伟琪(2001—),女,山东滨州人,硕士研究生,研究方向为抗生素在海洋生物体内的生态毒性和富集, E-mail: 17554378636@163.com

通信作者:常显波(1978—),女,山东即墨人,博士,教授,研究方向为新型污染物的环境行为及生态毒性, E-mail: changxianbo@ytu.edu.cn

in the pretreatment process were optimized. The results showed that the recovery efficiency of the QuEChERS method was better than that of the Ultrasonic extraction-column purification method. In addition, the QuEChERS method using sodium chloride and sodium sulfate as salting agents as well as C_{18} as adsorbents showed a better extraction efficiency than the QuEChERS method using magnesium sulphate and trisodium citrate as salting agents. The detection limits of the optimized method for 24 antibiotics and metabolites were $0.04 \sim 3.31 \mu\text{g/kg}$, and the recoveries by the method were $60.23\% \sim 119.88\%$ with the relative standard deviations (*RSD*) of $0.10\% \sim 29.79\%$. The study provides technical support for the study of the residual characteristics and environmental behavior of antibiotics and their metabolites in marine organisms.

Key words: QuEChERS method; antibiotics; liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); marine organism samples

抗生素是一类具有抑菌或杀菌活性的药物,被广泛应用于人类医疗、畜牧业和水产养殖业等领域。据报道,2013年我国的抗生素生产量约为21万吨,使用量达16.2万吨^[1],其中,48%的抗生素被应用于人类临床,52%的抗生素用于水产养殖和畜牧业。由于不能够被生物体完全代谢,50%以上的抗生素被排放进入水体,使其在全球水体中被频繁检出,例如,在西太平洋地区国家的水体中共检出92种人用和兽用抗生素,而在东南亚国家的水体中检出了45种抗生素^[2]。河流径流和海水养殖业是海洋中抗生素污染的两个主要来源,导致海岸带甚至远海区域的抗生素污染^[3]。尽管残留在海洋环境中的抗生素及其代谢产物浓度通常处于痕量水平,但长期暴露于此环境中的动植物及微生物仍会受到不容忽视的影响,水体微生物群落的变化可能沿食物链放大,波及高营养级生物,从而破坏生态系统的平衡。

海水中残留的抗生素能够逐渐在海洋生物体内累积。研究表明,多种抗生素即使在低浓度下也能发生生物积累^[4]。2000年至2009年,美国、加拿大、欧盟(EU)和日本均在海产品中检出多种抗生素残留^[5]。同一时期,在德国、美国、意大利和希腊沿海水域的153个海洋生物样本中检出红霉素、罗红霉素、氯霉素和磺胺甲噁唑残留,其中旧金山湾的磺胺甲噁唑检出频率最高,浓度为 $13 \sim 61 \text{ ng/L}$ ^[6]。海洋环境中残留的抗生素不仅会影响生物的生存、繁殖以及生态系统的群落结构和生态功能,也会对海产品消费者造成潜在风险^[7]。例如,如果抗生素在可食用动物体内的残留浓度足够高,可能会引起过敏或诱

发抗生素耐药菌的产生,导致耐药性疾病,引起人类健康问题。为了保护人类健康并避免上述潜在风险,欧盟等12个监管机构为鱼类和其他海产品等动物源性食品中的抗生素等药物制定了最大残留限量标准(MRLs)^[8]。海产品中抗生素残留的准确定量对于评估其环境影响和人类健康风险至关重要。

近年来,抗生素残留检测的定量验证方法取得了显著进展。然而,由于分析方法复杂且成本高,食品中抗生素残留控制的实施仍然受到限制^[9]。在前处理方法方面,QuEChERS具有快速、简便、经济、有效、可靠、安全等特点,在抗生素残留分析中发挥着至关重要的作用,是一种常用的提取残留物的方法。目前,研究人员^[10-11]已开始使用该方法处理生物样品中残留的抗生素。液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)在食品中多种抗生素残留的筛选和定量分析方面具有独特优势^[12]。尽管已有方法报道了海洋生物样品中抗生素残留的提取方法,但是由于抗生素种类繁多,理化性质(如溶解度、极性、稳定性)差异显著,这些方法往往只能有效提取某一类抗生素,难以实现海洋生物样品中多种类抗生素的同时提取。此外,多数抗生素代谢产物具有与其母体化合物相似或更高的生物活性^[13],也同样可能发生生物累积。因此,有必要在多残留分析方法中纳入抗生素代谢产物的检测。然而,现有方法主要聚焦于人或动物使用的抗生素药物,很少有方法涵盖抗生素代谢产物^[8]。

针对目前海洋生物样品中抗生素提取方法的不足,本研究旨在通过优化海洋生物样品中抗生素及其代谢产物的前处理方法,实现对海洋生

物体内 24 种抗生素及其主要代谢产物的同时提取测定, 为海洋生物样品中抗生素的测定提供有效方法, 填补同时从海洋生物样品中提取多种抗生素及其代谢产物的空白。同时, 该研究有助于保护水生态环境和保障海洋食品安全^[14]。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

真空冷冻干燥机(博医康实验仪器, 北京); 涡旋振荡器(Vortex Genie-2, 杭州仪宇仪器有限公司); 超声波清洗器(KQ5200E, 昆山市超声仪器有限公司); 离心机(Ependorf AG Hamburg, 德国); 真空固相萃取装置(美国 Supelco 公司); Milli-Q 超纯水系统(艾科浦, 中国); 氮吹仪(广州石泰环保科技有限公司, 中国); 液相色谱三重

四级杆串联质谱仪(AB SCIEX 4500, 美国)。

抗生素及其代谢产物清单见表 1。5 类 19 种抗生素及 5 种抗生素代谢产物标准品均购自德国 Dr.Ehrenstorfer 公司, 纯度均大于 98%。内标物恩诺沙星-D5(ERF-D5)、红霉素-N,N-二甲基-13C2(ERT-13C6)、氧氟沙星-D3(OFL-D3)、磺胺嘧啶-D4(SDZ-D4)、磺胺二甲氧嘧啶-D6(SFT-D6)、磺胺甲噁唑-13C6(SMX-13C6)、四环素-D6(TC-D6)、甲氧苄氨嘧啶-13C3(TMP-13C3)购于美国剑桥 CIL 公司, 纯度 $\geq 99\%$ 。试剂包括: 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 乙酸、甲酸、盐酸、二水合柠檬酸三钠、 Na_2SO_4 、无水 MgSO_4 、 NaCl 、 Na_2EDTA 、 Na_2HPO_4 (国药集团化学试剂有限公司); PSA 和 C_{18} (上海安谱实验科技股份有限公司)。Oasis HLB 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)

表 1 目标抗生素及其代谢产物信息
Tab.1 The information of target antibiotics and antibiotic metabolites

简称Abbreviation	全称Compound	中文名称Chinese name	CAS编号CAS
PCV	Penicillin V	青霉素V	132-98-9
DesATM	Descladinose azithromycin	去克拉定糖阿奇霉素	117693-41-1
RXM	Roxithromycin	罗红霉素	80214-83-1
N-dmRXM	N-desmethyl roxithromycin	N-去甲基罗红霉素	118267-18-8
TYL	Tylosin	泰乐菌素	74610-55-2
CIP	Ciprofloxacin	环丙沙星	93107-08-5
ERF	Enrofloxacin	恩诺沙星	93106-60-6
OFL	Ofloxacin	氧氟沙星	82419-36-1
DMCTC	Demeclocycline	去甲金霉素	64-73-3
DOC	Doxycycline	多西环素	24390-14-5
TC	Tetracycline	四环素	64-75-5
4-epiTC	4-Epitetracycline	4-表四环素	79-85-6
MOC	Minocycline	米诺环素	13624-98-7
SDZ	Sulfadiazine	磺胺嘧啶	68-35-9
SFT	Sulfadimethoxine	磺胺间二甲氧嘧啶	122-11-2
TMP	Trimethoprim	甲氧苄氨嘧啶	738-70-5
3-dmTMP	3-Desmethyl trimethoprim	3-去甲基甲氧苄啶	27653-69-6
4-OH-TMP	4-Hydroxy trimethoprim	4-羟基甲氧苄啶	112678-48-5
SQX	Sulfaquinoxaline	磺胺喹噁啉	59-40-5
SCZ	Sulfachloropyridazine	磺胺氯吡嗪钠—水合物	1392129-96-2
SME	Sulfamethoxazole	磺胺对甲氧嘧啶	651-06-9
SFZ	Sulfamethazine	磺胺二甲嘧啶	57-68-1
SMX	Sulfamethoxazole	磺胺甲噁唑	723-46-6
SMR	Sulfamerazine	磺胺甲基嘧啶	127-79-7

和 Prime HLB 固相萃取柱(60 mg, 3 mL)购自美国 Waters 公司。0.22 μm PTFE 过滤器购于上海安谱实验科技股份有限公司。大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)、蛤蜊(*Venerupinnata*)样品均购自山东省烟台市烟大海鲜市场。

1.2 标准储备液的配制

以甲醇为溶剂,将 24 种抗生素及其代谢产物标准品配制成 1000 mg/L 的标准储备液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下避光储存。用甲醇将以上标准储备液稀释配制成 1 mg/L 的 24 种抗生素及其代谢产物的混合标准溶液,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用。使用前,以甲醇为溶剂,将 1 mg/L 的 24 种抗生素的混合标准溶液逐级稀释成 100 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、0.1 $\mu\text{g/L}$ 和 0.05 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液。

1.3 实验方法

将中国明对虾和蛤蜊去壳、大黄鱼去鱼皮后的可食用组织均质化,所有样品冻干处理,研磨成粉并过筛,保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至分析。冷冻干燥后药物稳定性的预实验结果显示,在冷冻干燥过程中没有化合物损失^[7]。

取 0.2 g 冻干海洋生物组织置于离心管中,然后在基质加标样品中分别加入 50 μL 1 mg/L 抗生素及其代谢产物的标准混合物,涡旋混合。每种生物都设置 1 个基质不加标样品和 3 个基质加标平行样品。

QuEChERS 方法:向样品中加入 EDTA-Mc Ilvaine 缓冲液和含 5% 乙酸的乙腈,涡旋 1 min 后超声 30 min,在 5000 r/min 转速下离心 10 min。在上清液中加入盐析剂,立即密封并剧烈振荡 3 min,在 5000 r/min 转速下离心 10 min。取上清液转移到棕色玻璃瓶中,氮吹至近干,加入甲醇复溶,过 0.22 μm PTFE 滤膜后待 LC-MS/MS 分析。

超声萃取-柱净化法:向样品中加入 8 mL 乙腈:水($v:v$)=8:2 的提取液,涡旋 1 min 后超声处理 30 min,于 5000 r/min 离心 10 min,收集上清液并转移到洁净离心管,重复上述提取步骤,合并两次提取所得上清液,进行柱净化。步骤如下:依次使用 10 mL 甲醇和 10 mL 超纯水活

化净化柱(Oasis HLB 或 Prime HLB),将合并后的提取液上样至活化好的净化柱,控制流速小于 5 mL/min。上样完毕后加入淋洗液淋洗小柱,收集全部洗脱液,氮吹至近干,加入甲醇复溶,经 0.22 μm PTFE 滤膜过滤后待 LC-MS/MS 分析。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC BEH-C₁₈ 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A 相为 0.01%(v/v)甲酸水溶液,B 相为乙腈溶液;流速:0.3 mL/min;柱温箱温度:35 $^{\circ}\text{C}$;样品室温度:15 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μL 。流动相梯度洗脱程序列于表 2。

表 2 梯度洗脱程序
Tab.2 Gradient elution program

时间/min	$\phi(\text{A})/\%$	$\phi(\text{B})/\%$
0.0	95	5
1.0	95	5
2.0	90	10
4.0	65	35
10.0	40	60
10.5	5	95
12.0	5	95
12.1	95	5
14.0	95	5

注:A 为 0.01%(v/v)甲酸水溶液;B 为乙腈

1.4.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描模式:正离子;检测方式:多反应监测(MRM);离子源温度:550 $^{\circ}\text{C}$;喷雾电压(IS):5500 V;碰撞气(CAD):High;气帘气(CUR):207 kPa(30 psi);雾化气:345 kPa(50 psi);辅助气:345 kPa(50 psi)。各目标物的质谱参数列于表 3。

2 结果与讨论

2.1 前处理方法的比较与优化

近年来,超声萃取-柱净化法和 QuEChERS 方法广泛应用于生物样品中抗生素残留分析。其中,超声萃取-柱净化法具有操作简单、处理时间短等优点,可同时提取目标物并且去除基质干扰,是一种安全、高效、重复性好的抗生素残

表 3 测定 24 种目标物和 8 种内标的质谱参数

Tab.3 MS parameters of the 24 target compounds and eight internal standards

简称	全称	保留时间(t_R)/min	母离子/ $m\cdot z^{-1}$	子离子/ $m\cdot z^{-1}$	解簇电压DP/V	碰撞能量CE/eV
PCV	Penicillin V	6.73	351.1	228.9*	110	23
				87.0		46
DesATM	Descladinose azithromycin	5.11	591.3	158.2*	128	42
				116.0		67
RXM	Roxithromycin	7.14	837.4	679.4*	98	29
				158.2		29
N-dmRXM	N-desmethyl roxithromycin	6.95	823.9	522.3*	108	38
				665.4		31
TYL	Tylosin	6.22	916.5	174.1*	101	35
				772.0		35
CIP	Ciprofloxacin	4.47	332.2	245.0*	65	35
				314.0		35
ERF	Enrofloxacin	4.72	360.1	245.1*	64	37
				342.2		37
OFL	Ofloxacin	4.41	362.2	318.1*	80	26
				261.1		38
DMCTC	Demeclocycline	5.05	465.4	430.3*	78	31
				385.3		24
DOC	Doxycycline	5.41	445.3	428.2*	93	28
				410.3		35
TC	Tetracycline	4.75	445.1	410.1*	45	25
				427.1		30
4-epiTC	4-Epitetracycline	4.74	445.1	410.2*	117	28
				392.0		34
MOC	Minocycline	4.76	458.2	441.3*	101	35
				352.0		40
SDZ	Sulfadiazine	3.81	251.0	156.1*	46	35
				91.9		23
SFT	Sulfadimethoxine	6.04	310.9	218.0*	56	25
				155.9		27
TMP	Trimethoprim	4.37	291.6	230.1*	93	31
				261.0		35
3-dmTMP	3-Desmethyl trimethoprim	3.80	277.2	123.0*	121	59
				261.0		34
4-OH-TMP	4-Hydroxy trimethoprim	4.32	307.1	139.2*	104	27
				181.1		27
SQX	Sulfaquinoxaline	6.04	301.1	156.1*	72	24
				108.0		38
SCZ	Sulfachloropyridazine	5.98	285.2	92.0*	65	37
				156.0		22
SME	Sulfamethoxazole	4.89	281.2	156.1*	68	25
				108.1		33
SFZ	Sulfamethazine	4.84	279.0	186.1*	61	28
				124.0		33
SMX	Sulfamethoxazole	5.52	254.3	108.0*	61	30
				156.0		21
SMR	Sulfamerazine	4.42	265.0	156.0*	41	24
				107.8		35
ERF-D5	Enrofloxacin-D5	4.43	365.2	321.2	103	28.98
OFL-D3	Ofloxacin-d3	4.42	365.1	321.3	116	25.63
SFT-D6	Sulfadimethoxine-D6	5.00	317.3	162.1	84	31.90
SMX-13C6	Sulfamethoxazole-(phenyl-13C6)	5.00	260.0	162.0	77	21.00
ERT-13C6	Erythromycin (N,N-dimeyhyl-13C6)	5.00	738.0	162.0	117	37.00
SDZ-D4	Sulfadiazine-D4	5.00	255.0	160.0	73	22.35
TC-D6	Tetracycline-D6	5.18	451.1	416.0	92	28.25
TMP-13C3	13C3-Trimethoprim	4.35	294.1	262.0	98	34.36

注: *为定量离子

留分离方法^[15-16]。本研究选择两款市售净化柱,分别是 Oasis HLB 净化柱和 Prime HLB 净化柱进行对比分析。其中, Oasis HLB 净化柱具有高回收率和良好重复性的优点^[17]; Prime HLB 净化柱的新型过滤器过滤快速且易于操作,适合分析含有大量磷脂化合物的肉类或牛奶样品,并且 Prime HLB 的提取原理与传统的 HLB 萃取不同, Prime HLB 萃取工艺仅包含一个步骤^[18]。QuEChERS 方法具有快速、简便、经济、有效、安全等特点,也是一种常见的提取残留物的方法,本研究使用无水 MgSO_4 和柠檬酸三钠作为盐析剂进行 QuEChERS 提取分析。从图 1 的提取回收率结果来看,超声萃取后使用 Prime HLB 净化柱的回收率为 0.00%~10.11%, Oasis HLB 净化柱的回收率为 1.53%~88.32%,两款净化柱均不满足《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017)^[19]要求(回收率范围为 60%~120%); QuEChERS 方法的回收率为 30.09%~111.56%,部分目标物(如 DMCTC)的回收率小于 60%,但其精密度为 1.26%~29.24%,满足《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017)要求(低浓度下精密度小于 30%)。后续实验将 QuEChERS 方法作为首选方法进行优化。

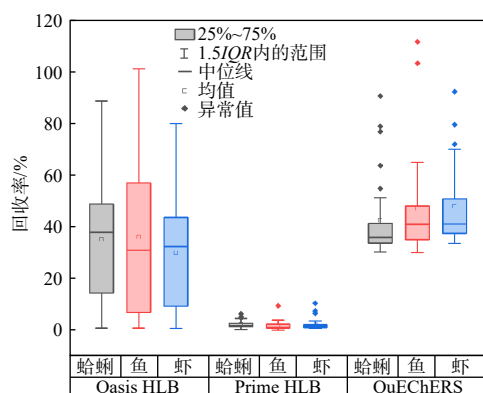


图1 3种净化方式(Oasis HLB固相萃取柱、Prime HLB固相萃取柱、QuEChERS方法)下目标物的回收率($n=3$)

Fig. 1 Recoveries of the target compounds of three cleanup methods (Oasis HLB solid-phase purification columns, Prime HLB solid-phase purification columns, QuEChERS method) ($n=3$)

2.2 盐析剂的优化

QuEChERS 方法因其高效、简便的特点,应用范围不断扩大,已成为抗生素残留分析的常用方法,并在多种污染物分析中广泛应用^[20]。在 QuEChERS 萃取中使用盐析剂和脱水剂的主要作用是去除样品基质中的水分,从而促进有机相和水相之间的分离^[21]。常用的试剂包括 NaCl 、无水 Na_2SO_4 和无水 MgSO_4 。本研究对比了两种盐析剂组合(无水 MgSO_4 +柠檬酸三钠和 NaCl +无水 Na_2SO_4)对目标物回收率的影响。结果表明(图 2), NaCl +无水 Na_2SO_4 的提取效果优于无水 MgSO_4 +柠檬酸三钠。已有研究显示, MgSO_4 具有吸水、团聚、产热的特性^[21],并且 Mg^{2+} 易与四环素类药物形成难溶的螯合物^[22],导致四环素类、喹诺酮类、磺胺类和大环内酯类化合物的回收率降低^[23]。因此,本研究选择 NaCl +无水 Na_2SO_4 作为盐析剂进行后续试验。然而,该组合对部分抗生素(DMCTC、DOC、TC、TYL)的回收率小于 60%,需进一步优化。根据 Serra-Compte 等^[24]的研究,在提取溶剂中加入 1% 的甲酸可显著提高四环素类抗生素的回收率,后续可通过实验验证该优化方案的可行性。此外,为进一步提高目标物的回收率,本研究还引入吸附剂进行优化。

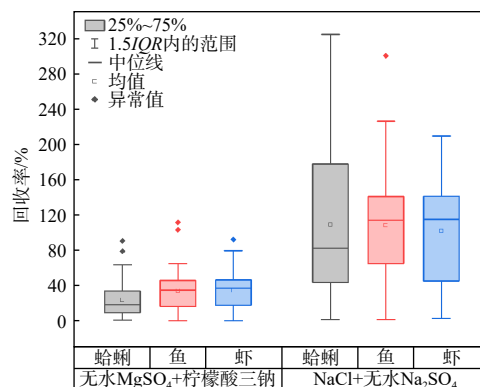


图2 QuEChERS方法中两种盐析剂组合条件下目标物的回收率($n=3$)

Fig. 2 Recoveries of the target compounds in the QuEChERS method with two combinations of salting-out agents ($n=3$)

2.3 吸附剂的优化

萃取后,为降低基质效应,采用吸附剂对含

目标物的有机相进行进一步吸附净化。常用的吸附剂包括 PSA、C₁₈ 和石墨化炭黑 (GCB)。PSA 常用于去除脂肪酸、糖、有机酸、脂类和某些色素; C₁₈ 则用于吸附基质中的非极性成分和脂肪^[25]; GCB 保留平面物质, 用于去除色素^[26]。为了确保最小的基质效应并实现最佳回收率, 根据目标物的物理化学性质选择合适的吸附剂至关重要。值得注意的是, GCB 对极性分子的亲和力增强, 导致回收率降低^[27]。Wang 等^[28] 对 7 种净化吸附剂类型进行了比较分析, 即 50 mg C₁₈、100 mg C₁₈、200 mg C₁₈、25 mg PSA、50 mg PSA、25 mg PSA-100 mg C₁₈ 和 25 mg PSA-200 mg C₁₈, 结果表明, 加入 25 mg PSA 会导致 β-内酰胺类抗生素的回收率降低, 200 mg C₁₈ 具有良好的回收率, 可以有效减轻基质干扰。图 3 的回收率结果显示, 加入 200 mg C₁₈ 的提取效果 (60.23% ~ 119.88%) 优于未加入吸附剂的提取效果 (47.49% ~ 153.27%), 满足《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017)^[19] 要求, 能够同时有效提取 24 种抗生素及其主要代谢产物。

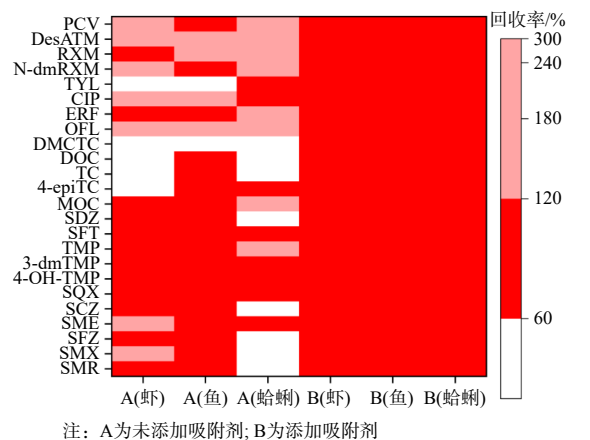


图 3 QuEChERS 方法是否使用吸附剂对目标物回收率的影响 (n=3)

Fig. 3 Effects of the QuEChERS method with or without adsorbents on the recoveries of the target compounds (n=3)

2.4 线性方程、检出限、定量限、加标回收率及相对标准偏差

在 LC-MS/MS 确认的实验条件下, 取海洋生物空白样品按样品制备处理后得到空白基质, 分

别加入 9 种不同质量浓度的混合标准溶液, 在上述质谱条件下进行测定。以目标物的质量浓度为横坐标, 把目标物的峰面积与其对应的定量内标的峰面积比值作为纵坐标, 建立标准曲线。以 3 倍和 10 倍信噪比 (S/N) 对应的质量浓度确定检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。

19 种抗生素和 5 种抗生素代谢产物的线性方程、相关系数 (R^2)、LOD 及 LOQ 列于表 4, 加标回收率及相对标准偏差 (RSD) 列于表 5。结果显示, 所有目标化合物均线性良好, 其标准溶液的曲线回归系数 (R^2) 均大于 0.99。采用 QuEChERS 方法进行提取试验的 LOD 及 LOQ 分别为 0.04 ~ 3.31 μg/kg 和 0.13 ~ 11.03 μg/kg。总体而言, 主要抗生素的 LOD 和 LOQ 与以往海洋生物样品中多残留分析的研究结果相当或低于这些结果^[25], 说明本方法具有较高的灵敏度。通过在工作溶液中添加特定浓度的抗生素, 验证了所有抗生素的最低检测限^[29]。本研究目标物的加标回收率为 60.23% ~ 119.88%, 满足《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017)^[19] 要求 (回收率范围为 60% ~ 120%)。另外, 本方法所有目标物的精密度结果均符合《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017)^[19] 对精密度的要求 (低浓度下精密度小于 30%)。

结果表明, 使用 NaCl 和无水 Na₂SO₄ 作为盐析剂并加入 200 mg C₁₈ 作为吸附剂的 QuEChERS 方法能够对海洋生物中的目标抗生素及其代谢产物进行有效提取。后续的氮吹浓缩步骤既未影响目标物的稳定性, 也未降低回收率。在质谱分析之前, 对样品还进行了额外的过滤处理。结果表明, 该方法简单、有效、快速, 只需通过 QuEChERS 进行提取, 随后对样品进行蒸发和过滤, 此外, 样品分析的成本也显著降低, 整个分析过程的总时间少于 3 h。

2.5 实际样品测试

采用本研究建立的方法对渤海采集的 42 种底栖生物进行提取检测, 样品类型包括脊索动物、软体动物、甲壳动物。结果表明, 每个样品均检出多种抗生素及其代谢产物残留, 但均未检出泰乐菌素 (TYL), 检出频次较高的抗生素及其

表4 抗生素和抗生素代谢物的线性方程、相关系数(R^2)、 LOD 及 LOQ Tab.4 Calibration curve with correlation coefficient(R^2), limits of detection($LODs$) and limits of quantification($LOQs$) of antibiotics and antibiotic metabolites

抗生素	线性方程	R^2	$LOD/\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$LOQ/\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
PCV	$y=7471x+538$	0.9933	0.73	2.43
DesATM	$y=5225x+63$	0.9994	2.28	7.60
RXM	$y=15251x-101$	0.9994	0.59	1.97
N-dmRXM	$y=5074x-155$	0.9992	1.85	6.17
TYL	$y=2991x-156$	0.9979	0.63	2.10
CIP	$y=4671x+16743$	0.9931	0.16	0.53
ERF	$y=5507x-621$	0.9951	0.45	1.50
OFL	$y=59x+2193$	0.9904	0.87	2.90
DMCTC	$y=1412x+737$	0.9918	0.81	2.70
DOC	$y=3318x-166$	0.9910	0.56	1.87
TC	$y=8350x-379$	0.9917	1.90	6.33
4-epiTC	$y=10809x-26.60$	0.9901	1.33	4.43
MOC	$y=2235x-8754$	0.9979	1.98	6.60
SDZ	$y=28405x+201$	0.9945	1.20	4.00
SFT	$y=13194x+158$	0.9992	1.51	5.03
TMP	$y=5551x+576$	0.9927	0.98	3.27
3-dmTMP	$y=14616x+713$	0.9951	0.28	0.93
4-OH-TMP	$y=6823x+595$	0.9965	2.54	8.47
SQX	$y=25665x+156$	0.9931	1.51	5.03
SCZ	$y=8824x-146$	0.9944	3.31	11.03
SME	$y=16298x-201$	0.9938	0.04	0.13
SFZ	$y=25469x-567$	0.9942	1.84	6.13
SMX	$y=23424x+408$	0.9936	0.10	0.33
SMR	$y=6113x+11$	0.9961	0.28	0.93

注: y 为目标物定量离子的峰面积; x 为质量浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)表5 抗生素和抗生素代谢物的加标回收率及相对标准偏差($n=3$)Tab.5 Spiked recoveries and $RSDs$ of antibiotics and antibiotic metabolites($n=3$)

抗生素	蛤蜊		大黄鱼		中国明对虾	
	回收率/%	RSD /%	回收率/%	RSD /%	回收率/%	RSD /%
PCV	119.88	14.80	99.27	29.65	93.56	25.26
DesATM	91.88	14.93	99.27	20.56	98.36	28.92
RXM	115.44	29.72	118.16	2.95	114.76	6.40
N-dmRXM	83.66	24.01	108.25	29.66	117.25	1.21
TYL	63.09	27.99	65.34	29.37	72.91	29.83
CIP	115.67	0.35	113.35	10.03	90.76	19.04
ERF	117.69	15.77	115.03	27.54	104.63	18.98
OFL	103.69	2.99	115.41	27.32	98.42	25.42
DMCTC	67.89	7.09	83.30	4.73	61.32	5.02
DOC	79.45	8.44	68.65	4.86	61.21	21.67
TC	61.54	27.65	63.37	3.04	69.01	19.72
4-epiTC	61.42	29.11	77.36	17.52	67.43	11.07

抗生素	蛤蜊		大黄鱼		中国明对虾	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
MOC	86.12	26.64	92.49	27.73	104.03	12.05
SDZ	96.97	29.41	84.55	25.89	80.43	29.44
SFT	110.27	19.68	93.21	25.34	60.23	23.21
TMP	119.33	0.10	117.13	2.26	116.13	29.43
3-dmTMP	95.78	4.66	73.05	26.07	71.61	28.05
4-OH-TMP	112.58	10.54	98.59	24.13	113.13	28.38
SQX	115.78	17.31	89.64	25.19	61.10	28.74
SCZ	115.26	22.53	95.76	20.12	66.65	22.35
SME	82.16	27.32	119.67	24.51	76.99	29.30
SFZ	101.07	27.06	67.03	29.79	60.78	29.42
SMX	113.87	29.01	105.76	20.33	64.66	26.15
SMR	99.05	28.47	83.66	29.23	60.29	29.42

代谢产物有氟沙星(OFL, 1.04 ~ 148.76 ng/g)、多西环素(DOC, 22.20 ~ 63.76 ng/g)、磺胺甲基嘧啶(SMR, 0.53 ~ 9.03 ng/g)、N-去甲基罗红霉素(N-dmRXM, 0.01 ~ 0.18 ng/g)、4-羟基甲氧苄啶(4-OH-TMP, 0.02 ~ 0.13 ng/g), 同时, 检出四环素类抗生素的残留量超过国家标准《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650—2019)规定的最大残留限量值(四环素类抗生素在水生生物中的最大残留量不得大于 30 μg/kg)。图 4 为渤海底栖生物样品中典型抗生素及其代谢产物的检出频率和检出浓度。

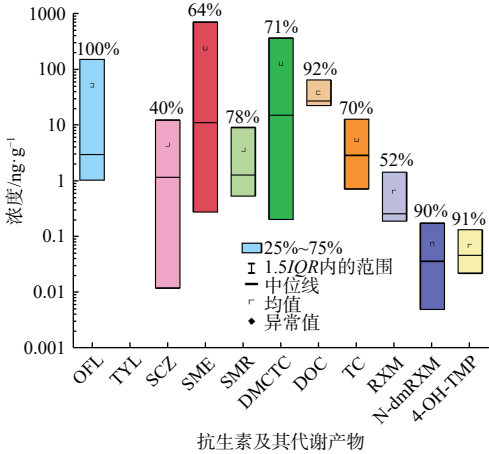


图 4 渤海底栖生物样品中典型抗生素及其代谢产物的检出频率和检出浓度

Fig. 4 Detection frequency and concentration of typical antibiotics and their metabolites in benthic samples from the Bohai Sea

3 结论

本研究建立了一种基于 QuEChERS 处理结合 LC-MS/MS 检测生物样品中多种抗生素及其代谢产物的方法, 有效克服了因目标物物理化学性质差异导致的方法回收率低与覆盖范围窄的问题, 实现了多种目标物的高效同步提取与测定。QuEChERS 前处理方法具有快速、简便、廉价且无须额外净化步骤的特性, 与超声萃取-柱净化法相比, 对大多数目标物展现出更高的准确性、回收率和良好重现性。该方法应用于渤海底栖生物体内残留抗生素及其代谢产物的检测, 结果显示, 海洋底栖生物中氧氟沙星(OFL)和多西环素(DOC)的残留量分别高达 148.80 ng/g 和 63.80 ng/g。本研究结果为相关残留标准的制定与补充以及海产品安全保障提供了重要的数据支撑和技术依据, 在海洋环境监测与风险评估中具有显著的应用价值。

参考文献:

[1] Zhi S L, Zhou J, Liu H X, et al. Simultaneous extraction and determination of 45 veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2020, 1154: 122286.

[2] Bortone B, Jackson C, Hsia Y, et al. High global consumption of potentially inappropriate fixed dose combination antibiotics: Analysis of data from 75 countries[J]. *Plos One*, 2021, 16(1): e0241899.

- [3] Xie H J, Du J, Chen J W. Concerted Efforts Are Needed to Control and Mitigate Antibiotic Pollution in Coastal Waters of China[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(2): 88.
- [4] Peng T W, Song B, Wang Y C, et al. Trophic transfer of sulfonamide antibiotics in aquatic food chains: A comprehensive review with a focus on environmental health risks[J]. *Environmental Pollution*, 2025, 369: 125823.
- [5] Love D C, Rodman S, Neff R A, et al. Veterinary drug residues in seafood inspected by the European Union, United States, Canada, and Japan from 2000 to 2009[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(17): 7232-7240.
- [6] Gaw S, Thomas K V, Hutchinson T H. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2014, 369(1656): 20130572.
- [7] Odeyemi O A, Amin M, Dewi F R, et al. Prevalence of Antibiotic-Resistant Seafood-Borne Pathogens in Retail Seafood Sold in Malaysia: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. *Antibiotics*, 2023, 12(5): 829.
- [8] Jayasinghe G D T M, Szpunar J, Lobinski R, et al. Determination of Multi-Class Antibiotics Residues in Farmed Fish and Shrimp from Sri Lanka by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)[J]. *Fishes*, 2023, 8(3): 154.
- [9] Vakh C, Tobiszewski M. Greenness assessment of analytical methods used for antibiotic residues determination in food samples[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2023, 166: 117162.
- [10] Aissaoui Y, Jiménez-Skrzypek G, González-Sálamo J, et al. Determination of Multiclass Antibiotics in Fish Muscle Using a QuEChERS-UHPLC-MS/MS Method[J]. *Foods*, 2024, 13(7): 1081.
- [11] 赵娜, 梁嘉诚, 时丽艳, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定有机肥料中 10 种氟喹诺酮类药物残留[J]. *色谱*, 2019, 37(3): 313-318.
- [12] 孙晓龙, 杨青, 王洪波, 等. 基于 LC-MS/MS 法建立快速检测 8 种氨基糖苷类抗生素的方法[J]. *中国药理学杂志*, 2024, 59(15): 1438-1444.
- [13] García-Galán M J, González Blanco S, López Roldán R, et al. Ecotoxicity evaluation and removal of sulfonamides and their acetylated metabolites during conventional wastewater treatment[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 437: 403-412.
- [14] Han Q F, Zhang X R, Xu X Y, et al. Antibiotics in marine aquaculture farms surrounding Laizhou Bay, Bohai Sea: Distribution characteristics considering various culture modes and organism species[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 760: 143863.
- [15] Koesukwiwat U, Jayanta S, Leepipatpiboon N. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1140(1/2): 147-156.
- [16] Khatibi S A, Hamidi S, Siahi-Shadbad M R. Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(20): 3361-3382.
- [17] Vargas-Muñoz M A, Boudenne J L, Coulomb B, et al. Automated method for the solid phase extraction of tetracyclines in wastewater followed by fluorimetric determination[J]. *Talanta*, 2024, 270: 125544.
- [18] Wang J F, Fan X J, Liu Y, et al. Extraction optimization of sixteen cephalosporins in milk by filtered solid phase extraction and ultra high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Methods*, 2017, 9(8): 1282-1289.
- [19] GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].
- [20] Zhang C Y, Deng Y C, Zheng J F, et al. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: a review[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 118: 517-537.
- [21] Yang Y, Liu L J, Li X, et al. Development of a simple UPLC-MS/MS method coupled with a modified QuEChERS for analyzing multiple antibiotics in vegetables and applied to pollution assessment[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024, 129: 106135.
- [22] 韩璿烜, 罗芸, 叶恩里克·金恩斯, 等. 改良 QuEChERS/超高效液相色谱-质谱联用技术快速筛查 5 类常见水果蔬菜中 15 种典型农药残留[J]. *食品科技*, 2022, 47(5): 297-303.
- [23] De Oliveira Paula R A, De Souza Gondim C, Schmidt E M, et al. Critical Evaluation of Two Qualitative Analytical Approaches for Multiclass Determination of Veterinary Drugs in Bovine Muscle Using UHPLC-Q-Orbitrap: The Wind of Change in Brazilian Monitoring[J]. *Molecules*, 2023, 28(10): 4150.