

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中的67种禁用药物

陈容^{1,2}, 刘育形^{1,2}, 王泽林^{1,2}, 张晶^{1*}, 邵兵¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院, 沈阳 110001; 2. 北京市疾病预防控制中心, 食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013)

摘要: **目的** 建立固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry, SPE-UPLC-QqQ-MS/MS)测定禽蛋中的67种禁用药物残留的分析方法。**方法** 样品用 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲溶液提取, 加入钨酸钠沉淀蛋白, 经 Anavo HLB 固相萃取柱净化后采用 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离, 正离子模式以 0.1% 甲酸水溶液-甲醇为流动相、负离子模式以水-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 在 UPLC-QqQ-MS/MS 多反应监测模式下进行定性定量分析, 同位素内标法或基质匹配外标法定量。**结果** 67 种禁用药物在 0.1~100.0 μg/kg 范围内均呈现良好的线性关系, 相关系数 $r^2 \geq 0.99$, 方法的定量限范围为 0.1~0.5 μg/kg。平均加标回收率为 56.3%~110.1%, 相对标准偏差为 1.5%~16.8%。**结论** 本方法操作简单、准确性高、成本较低, 可实现禽蛋中禁用药物残留的高通量分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 固相萃取; 禁用药物; 禽蛋产品

Determination of 67 kinds of prohibited drugs in poultry eggs by solid phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Rong^{1,2}, LIU Yu-Xing^{1,2}, WANG Ze-Lin^{1,2}, ZHANG Jing^{1*}, SHAO Bing¹

(1. School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing 100013, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish an analytical method for the determination of 67 kinds of prohibited drug residues in poultry eggs by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry (SPE-UPLC-QqQ-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with McIlvaine-Na₂EDTA buffer solution and the proteins were precipitated with sodium tungstate. The separation was performed on an ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) after cleanup with by Anavo HLB solid phase extraction column. The gradient elution was performed in positive ion mode using 0.1% formic acid aqueous solution-methanol as mobile phase and in negative ion mode using water-acetonitrile as mobile phase. Qualitative and quantitative analysis

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1605700)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1605700)

*通信作者: 张晶, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品检测。E-mail: brightjing@163.com

*Corresponding author: ZHANG Jing, Ph.D, Professor, Beijing Center for Disease Control and Prevention, No.16, Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: brightjing@163.com

was performed in UPLC-QqQ-MS/MS multiple reaction monitoring mode, and quantitative analysis was performed by isotope internal standard method or matrix matching external standard method. **Results** The 67 kinds of prohibited drugs showed good linearity in the range of 0.1–100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ with the correlation coefficients $r^2 \geq 0.99$, and the limits of quantification were in the range of 0.1–0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries of the spiked samples were 56.3%–110.1% with the relative standard deviations of 1.5%–16.8%. **Conclusion** This method can be used for the high-throughput rapid detection of prohibited drug residues in poultry eggs with a simple, accurate, low-cost procedure.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; prohibited drugs; poultry egg products

0 引言

禽蛋含有丰富的蛋白质、脂肪、矿物质和维生素等营养物质,是人体补充优质蛋白的主要来源之一。据统计,2010年以来,中国禽蛋年产量均在3000万t以上,且呈逐年上升趋势^[1]。为确保相关产品的质量安全,保障消费者身体健康,《农业农村部公告第250号》明确规定了食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单,涵盖了 β -兴奋剂类及其盐、酯,氯霉素及其盐、酯等21种(类)药物。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》除规定氯丙嗪等9种允许治疗用但不得在动物性食品中检出的药物之外,还规定了蛋鸡产蛋期禁用的药物如氟苯尼考、恩诺沙星、磺胺、阿维拉霉素等34种(类)。可见,与畜禽肉类、乳制品和水产类相比,禽蛋涉及的禁用药物种类更多。

然而禽蛋检出禁用药物的报道仍然时有发生,如2021年重庆市、上海市等的市场监督管理部门通报禽蛋中检出恩诺沙星、氟苯尼考等药物残留^[2-3]。JI等^[4]检测了于2018—2019年期间随机抽取的电商销售的鸭蛋制品236个,发现咸鸭蛋中磺胺喹恶咪最高检出量为448.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,恩诺沙星最高检出量为563.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$,说明部分禽蛋产品仍存在质量安全隐患。作为样本监测和质量监管的基础,建立完善禽蛋中禁用药物的分析方法尤其重要。

液相色谱-串联质谱法和分析禽蛋等动物源性食品中药物残留的常用技术手段^[5-7],冯月超等^[8]使用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定了畜禽肉中44种食源性兴奋剂和6种孕激素;方从容等^[9]用超高效液相色谱-串联质谱法测定了鸡蛋中的125种兽药;张景然等^[10]使用该方法快速检测了动物肌肉组织中 β -受体激动剂。多兽药残留分析应用较为广泛的前处理方法为QuEChERS法^[11-13]和固相萃取法^[14-17],QuEChERS法因其基质适用性强、操作简单便捷等特点被广泛应用,但因其没有进行富集,故部分物质检出限较高,可能不适于禁用药物的测定;固相萃取法可对样品进行富集浓缩,更易于实现更低的检出限,可较好地满足禁用药物检测的要求。周春红等^[18]建立了牛奶中56种禁用药物的检测方法,但是目前针对禽蛋中禁用药物

的检测方法主要是针对某一两类^[19-21],高通量检测方法还鲜有报道。因此,本研究开发了一种基于固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry, SPE-UPLC-QqQ-MS/MS)对禽蛋中包括磺胺类、喹诺酮类、 β -受体激动剂类、抗球虫类等共67种禁用药物进行检测的分析方法,以期缩短检测周期,降低分析成本,为禽蛋产品禁用药物的监测提供可靠的技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究所涉及的鸡蛋样品从当地超市购买所得。

67种标准品和22种同位素内标(纯度>98%,具体名称见表1,加拿大TRC公司/天津阿尔塔科技有限公司);甲醇、乙腈(色谱级,迪马科技有限公司);甲酸(纯度>99%,美国Acros公司);乙二胺四乙酸二钠盐(ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, Na_2EDTA)、盐酸、磷酸氢二钠、柠檬酸钠、钨酸钠、氯化钠、氯化锌、硫酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);氟化铵(纯度>99%,上海阿拉丁试剂有限公司);Oasis HLB (6 mL/200 mg)、Oasis PRIME HLB (6 mL/200 mg)固相萃取柱(美国waters公司);Anavo HLB SPE (6 mL/150 mg)、Anavo HMR-Lipid (6 mL/200 mg)固相萃取柱(北京纳纳科技有限公司);前处理及器皿洗涤用水由Milli-Q超纯水净化处理系统制备。

1.2 仪器与设备

ACQUITY™超高效液相色谱仪-Xevo®TQ-XS串联质谱仪(美国Waters公司);Allegra X-30R离心机(美国Beckman公司);Vortex-Genie 2涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司);Milli-Q超纯水器(美国Millipore公司);Mettler Toledo XPE 105电子天平(感量0.01 mg,瑞士梅特勒-托利多集团)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液的配制

分别称取适量标准品或其内标于10 mL容量瓶中,用含0.1%甲酸的甲醇溶液配制成1000 mg/L的混合标准品储备液,

-20°C保存;用甲醇将67种标准储备液配制成10 mg/L的混合标准中间液,将22种内标储备液配制成1 mg/L的混合内标中间液。再用含0.1%甲酸的甲醇水溶液(1:9, V:V)稀释至所需浓度。Mcllvaine-Na₂EDTA 缓冲溶液配制参考文献方法^[22]。称取4.62 g 钨酸钠二水合物,用水溶解并定容至200 mL,配制成7%钨酸钠溶液。

1.3.2 样品前处理

准确称取5 g(精确至0.01 g)混匀的鸡蛋样品于50 mL 聚丙烯离心管中,加入10 mL Mcllvaine-Na₂EDTA 缓冲液(pH 4.0),涡旋30 s,超声30 min,加入5 mL 7%钨酸钠水溶液和5 mL 0.2 mol/L 盐酸水溶液沉淀蛋白,静置10 min后于4°C下10000 r/min 离心10 min。将残渣用10 mL Mcllvaine-Na₂EDTA 重复提取一次,合并两次上清液,待净化。

将全部待净化液加入到 Anavo HLB (150 mg/6 mL)固相萃取柱中自然流下,然后用5 mL 水淋洗小柱,再依次用5 mL 甲醇、2 mL 2%氨水-甲醇溶液洗脱,将流速控制在1 mL/min 内,收集全部洗脱液于15 mL 聚丙烯离心管中,置于40°C水浴氮吹至近干,用0.5 mL 含0.1%甲酸的甲醇水溶液(1:9, V:V)复溶,在4°C下12000 r/min 离心5 min,取上清液进行UPLC-QqQ-MS/MS 分析。

1.3.3 仪器条件

(1)色谱条件

正离子模式: 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相为0.1%甲酸水, B 相为甲醇; 柱温: 40°C; 进样量: 5 μL; 流速: 0.35 mL/min。梯度洗脱程序: 0~1 min, 3%~10% B; 1~2.5 min, 10%~15% B; 2.5~5 min, 15% B; 5~7 min, 15%~30% B; 7~10.5 min, 30%~50% B;

10.5~12.5 min, 50%~100% B; 12.5~13.5 min, 100% B; 13.5~14 min, 100%~3% B; 14~14.5 min, 3% B。

负离子模式: 色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相为超纯水, B 相为乙腈; 柱温: 40°C; 进样量: 5 μL; 流速: 0.35 mL/min。梯度洗脱程序: 0~1 min, 10%~15% B; 1~2.5 min, 15%~50% B; 2.5~6 min, 50%~65% B; 6~7.5 min, 65%~95% B; 7.5~8 min, 95%~100% B; 8~8.5 min, 100% B; 8.5~8.6 min, 100%~10% B。

(2)质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 正、负离子模式; 多反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式扫描; 毛细管电压: 2.5 kV; 锥孔电压: 30 V; 离子源温度: 150°C; 脱溶剂气温度: 400°C; 脱溶剂气(N₂)流量: 800 L/h; 碰撞室压力: 3.2e⁻³ mbar。

1.4 数据分析

利用 Masslynx 4.2 进行质谱数据处理, Origin 2021 进行数据分析和图表绘制。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的确立

采用 Intelistart 对单个标准品进行质谱条件优化。分别在正、负离子模式下进行一级质谱全扫描, 优化锥孔电压, 确定目标物一级离子; 然后进行二级质谱全扫描, 通过优化碰撞能, 选择响应度最高的碎片离子作为目标物的定量离子, 次高的碎片离子作为目标物的定性离子, 详细质谱参数信息如表 1~2。

表 1 67 种目标物的质谱参数、线性范围及定量限
Table 1 Mass spectrum parameters, linear ranges and limits of quantitation of 67 kinds of target compounds

化合物	ESI	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能/eV	线性范围/(μg/L)	定量限/(μg/kg)	校正内标
喹诺酮类								
达氟沙星	+	8.93	358.1	339.9*/95.9	22/20	0.1~100.0	0.1	恩诺沙星-D ₅
二氟沙星	+	9.15	400	356.0*/382.0	17/18	0.1~100.0	0.1	沙拉沙星-D ₈
恩诺沙星	+	8.85	360.1	316.1*/244.9	16/24	0.1~100.0	0.1	恩诺沙星-D ₅
氟甲喹	+	11.80	262.2	261.8*/243.7	6/15	0.1~100.0	0.1	/
噁喹酸	+	11.80	402	143.9*/160.0	30/17	0.1~100.0	0.1	/
沙拉沙星	+	9.38	386.1	298.9*/324	26/16	0.1~100.0	0.1	沙拉沙星-D ₈
四环素类								
多西环素	+	11.30	445	153.9*/428.1	32/19	0.1~50.0	0.5	多西环素-D ₃
大环内酯类								
替米考星	+	11.45	869.6	174.2*/696.5	45/40	0.5~100.0	0.5	替米考星-D ₃
β-内酰胺类抗生素								
阿莫西林	+	3.80	366.4	114.1*/208.0	20/18	0.5~100.0	0.5	/
氨苄西林	+	8.66	350	106.0*/192.0	20/15	0.5~100.0	0.5	/
青霉素	+	12.2	335.1	217.0*/70.0	12/25	0.5~100.0	0.5	/
万古霉素								
万古霉素	+	6.30	724.5	144.0*/100.0	15/20	0.2~100.0	0.5	万古霉素-D ₁₀

表 1(续)

化合物	ESI	保留时间 /min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能 /eV	线性范围 /($\mu\text{g/L}$)	定量限 /($\mu\text{g/kg}$)	校正内标
氯霉素类								
甲矾霉素	-	2.62	354.1	185.0*/290.0	18/12	0.1~100.0	0.1	甲矾霉素-D ₃
氯霉素	-	3.17	321	152.0*/257.0	17/11	0.1~100.0	0.1	氯霉素-D ₃
氟苯尼考	-	3.13	356	185.0*/336.0	18/10	0.1~100.0	0.1	氟苯尼考-D ₃
磺胺类								
磺胺二甲基嘧啶	+	8.62	285.1	155.9*/108.1	12/12	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺间甲氧嘧啶	+	7.73	281	156.0*/126.0	16/16	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺甲噁二唑	+	7.92	271	156.0*/108.0	14/14	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺二甲嘧啶	+	7.86	279	124.0*	19	0.1~50.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺甲基嘧啶	+	6.47	265.1	156.0*/172.0	15/15	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺吡啶	+	5.60	250	156.0*/184.0	16/16	0.1~100.0	0.1	磺胺嘧啶-D ₄
磺胺噻唑	+	5.29	256.1	156.0*/108.0	20/20	0.1~100.0	0.1	磺胺嘧啶-D ₄
磺胺嘧啶	+	4.40	251	156.0*/108.0	15/15	0.1~100.0	0.1	磺胺嘧啶-D ₄
磺胺胍	+	3.55	215	156.0*/108.0	15/20	0.1~100.0	0.1	磺胺嘧啶-D ₄
周效磺胺	+	9.18	311	156.0*/108.0	15/15	0.1~100.0	0.1	甲恶唑-D ₄
甲恶唑	+	8.79	254	156.0*/108.0	14/14	0.1~50.0	0.1	甲恶唑-D ₄
甲氧苄啶	+	7.64	291	261.0*/230.0	25/15	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺醋酰钠	+	3.55	215	156.0*/92.2	10/20	0.1~100.0	0.1	磺胺嘧啶-D ₄
磺胺甲氧噻唑	+	7.60	281	156.0*/126.0	16/16	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺间二甲氧嘧啶	+	8.13	311	108.0*	20	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
磺胺苯吡唑	+	10.22	315.1	158.2*/92.2	28/30	0.1~100.0	0.1	甲恶唑-D ₄
磺胺对甲氧嘧啶	+	8.81	281	156.0*/126.0	16/16	0.1~100.0	0.1	甲恶唑-D ₄
磺胺二甲异唑	+	9.17	268	156.0*/113.0	14/16	0.1~100.0	0.1	甲恶唑-D ₄
醋磺胺甲二唑	+	7.77	271	156.0*/108.0	22/35	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
苯甲酰磺胺	+	9.58	276.9	156.0*/108.0	15/20	0.1~100.0	0.1	甲恶唑-D ₄
磺胺二甲唑	+	9.15	268.1	156.0*/113.1	16/14	0.1~100.0	0.1	甲恶唑-D ₄
磺胺索嘧啶	+	7.79	279	186.0*	16	0.1~100.0	0.1	磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆
其他								
氨苯砜	+	7.84	249.1	92.0*/155.6	25/15	0.1~100.0	0.1	氨苯砜-D ₈
抗球虫类								
地美硝唑	+	4.41	142.1	96.0*/81.0	16/20	0.1~100.0	0.1	地美硝唑-D ₃
洛硝达唑	+	4.29	201	140.0*/55.0	10/22	0.1~100.0	0.1	洛硝达唑-D ₃
替硝唑	+	6.49	248	121.0*/128.0	12/18	0.1~100.0	0.1	地美硝唑-D ₃
甲硝唑	+	3.92	172	128.0*/ 82.0	14/20	0.1~100.0	0.1	甲硝唑- ¹⁵ N ¹³ C
左旋咪唑	+	5.25	205.1	91.0*/178.0	30/20	0.1~100.0	0.1	地美硝唑-D ₃
β -受体激动剂类								
克伦丙罗	+	7.88	263.1	245.0*/203.0	14/20	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
克伦西罗	+	11.85	304.9	287.2*/188.3	10/20	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
克伦潘特盐酸盐	+	9.97	291.1	203.0*/273.0	10/15	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
丙卡特罗	+	6.37	291.2	273.2*/231.1	12/18	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
马布特罗	+	9.77	311.1	237.1*/217.1	15/25	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
西布特罗	+	4.91	234.2	160.1*/ 217	10/15	0.1~50.0	0.1	西布特罗-D ₉
班布特罗	+	10.28	368.1	294.3*/312.3	10/16	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
溴布特罗	+	9.68	365.1	290.9*/217.1	20/25	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
特布他林	+	3.71	226.1	152.0*/125.0	16/26	0.1~100.0	0.1	西马特罗-D ₇
沙丁胺醇	+	3.81	240.2	148.1*/222.1	12/20	0.1~100.0	0.1	沙丁胺醇-D ₃
氯丙那林	+	8.48	214	118.0*/154.0	22/18	0.1~100.0	0.1	氯丙那林-D ₇

表 1(续)

化合物	ESI	保留时间 /min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能 /eV	线性范围 /($\mu\text{g/L}$)	定量限 /($\mu\text{g/kg}$)	校正内标
西马特罗	+	3.35	220.1	160.1*/143	15/24	0.1~100.0	0.1	西马特罗-D ₇
克伦特罗	+	8.92	277.1	203.0*/132.0	15/15	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
妥布特罗	+	9.63	228.1	154.0*/172.0	15/12	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
福莫特罗	+	9.35	345.1	149.0*/327.1	14/18	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
莱克多巴胺	+	8.39	302.2	164.1*/284.2	15/12	0.1~50.0	0.1	莱克多巴胺-D ₅
非诺特罗	+	6.65	304.2	135.1*/107.0	20/18	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
可乐啶	+	5.49	230.0	44.1*/167.0	22/30	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
异克伦潘特	+	9.92	291.0	188.0*/216.9	22/16	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
克仑赛罗	+	10.57	291.1	273.0*/188.0	10/20	0.1~100.0	0.1	克伦特罗-D ₉
镇静剂类								
地西洋	+	12.93	284.9	192.7*/153.6	25/22	0.1~100.0	0.1	地西洋-D ₅
非甾体抗炎药								
水杨酸	-	2.26	136.9	65.0*/93.0	22/15	0.1~100.0	0.5	/
农药								
呋喃丹	+	12.12	222.1	123.0*/165.0	12/20	0.1~100.0	0.1	/
杀虫脒	+	7.73	197.1	117.2*/152.2	25/15	0.5~100.0	0.5	/

注: *为定量离子, 下同; 内标质量浓度为 1 $\mu\text{g/L}$; /表述无此项。

表 2 22 种内标物的质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters of 22 kinds of internal standards

内标物名称	ESI	保留时间 /min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能 /eV
地美硝唑-D ₃	+	4.25	145	99*/83	16/20
甲硝唑- ¹⁵ N ¹³ C	+	3.92	176.0	132.0*/86.0	14/20
洛硝达唑-D ₃	+	4.29	204.0	143.0*/58.0	10/22
氯丙那林-D ₇	+	8.44	221.0	154.0*	22
西马特罗-D ₇	+	3.35	227	161*	18
西布特罗-D ₉	+	4.91	244	162*	10
沙丁胺醇-D ₃	+	3.81	243	151*	16
氨苯砜-D ₈	+	7.84	257	96*	25
磺胺嘧啶-D ₄	+	4.40	255	160*	15
甲恶唑-D ₄	+	8.79	258	160*	14
克伦特罗-D ₉	+	8.92	286	245*/204	15/15
地西洋-D ₅	+	12.93	290	154*/197	22/25
磺胺二甲基嘧啶- ¹³ C ₆	+	8.62	291.1	162*/114	12/12
莱克多巴胺-D ₅	+	8.37	307	121*/167	20/12
恩诺沙星-D ₅	+	8.85	365.11	321*/245	16/24
沙拉沙星-D ₈	+	9.38	394	303*/350	26/16
多西环素-D ₃	+	11.30	448	431*/155	19/32
万古霉素-D ₁₀	+	6.30	728.7	100*/144	20/15
替米考星-D ₃	+	11.45	873	160*/696.5	40/40
甲砜霉素-D ₃	-	2.62	357	188.0*/293.0	18/12
氯霉素-D ₅	-	3.17	326	157.0*/262.0	17/11
氟苯尼考-D ₃	-	3.13	359.0	188.0*/339.0	18/10

选择反相色谱柱 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)对 67 种目标化合物进行分离, 有机相比较了甲醇、乙腈, 水相比较了 0.1%甲酸、水、1mmol/L 氟化铵水溶液。结果表明, 正离子模式采用甲醇-0.1%甲酸水进行梯度洗脱、负离子模式采用乙腈-超纯水进行梯度洗脱时, 目标物的响应值和分离度最好。在此条件下目标物呈现的分离度和响应值较为理想, 符合分析要求(图 1)。

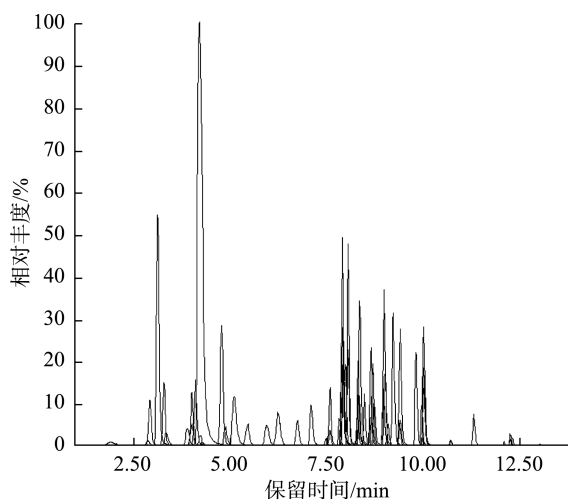


图 1 正离子模式条件下目标物的总离子流图
Fig.1 Total ion chromatogram of the targets in positive ion mode

2.2 样品前处理优化

2.2.1 提取溶剂的选择

由于 67 种目标药物主要为中性或偏碱性, 因此考虑用酸性的缓冲液或酸性有机溶剂进行提取。本研究考察了

乙酸-乙酸钠缓冲液、Mcllvaine- Na_2EDTA 缓冲液、0.2%甲酸-乙腈(3:1, $V:V$) 3 种提取溶剂对鸡蛋加标样品的提取效果。从表观上看, 乙酸-乙酸钠缓冲液和 Mcllvaine- Na_2EDTA 缓冲液体系的上清液较浑浊; 乙腈体系的蛋白沉淀效果较好, 上清液较澄清。回收率如图 2 所示, 乙酸-乙酸钠缓冲液体系有 20 种目标物的回收率低于 60%; Mcllvaine- Na_2EDTA 缓冲液和 0.2%甲酸-乙腈(3:1, $V:V$) 体系分别有 6 种和 14 种目标物的回收率在 60%以下。尽管 0.2%甲酸-乙腈(3:1, $V:V$) 体系的回收率也在可接受的水平, 但使用该体系提取时, 后续的固相萃取步骤会导致多种药物无法保留, 虽然氮吹浓缩或旋蒸去除乙腈可改善该问题, 但需花费较长时间, 且不绿色环保, 故选择 Mcllvaine- Na_2EDTA 缓冲液作为本研究的提取溶剂。

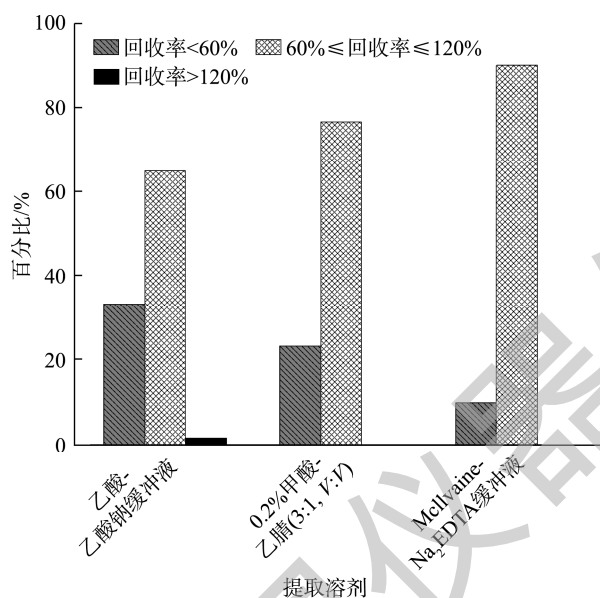


图 2 采用不同提取溶剂时鸡蛋基质中不同回收率范围的目标物个数($n=2$)

Fig.2 Target compounds with different recoveries ranges using different extraction solvents in the egg ($n=2$)

2.2.2 蛋白沉淀剂的选择

虽然 Mcllvaine- Na_2EDTA 缓冲液的提取效果较好, 但其对禽蛋蛋白质等基质干扰物的沉淀能力较弱, 离心后的提取液仍有少许浑浊, 会堵塞 SPE 小柱, 因此需对提取液进行蛋白沉淀。本研究采用盐析法沉淀蛋白, 比较了氯化钠、氯化锌^[23]、钨酸钠^[24]、硫酸铵^[25]共计 4 种无机盐类蛋白沉淀剂。样品经提取离心后, 参考文献用量, 分别在上清液加入 5 mL 7%钨酸钠溶液、5 mL 饱和氯化钠溶液、2 g 氯化锌、2 g 硫酸铵进行蛋白沉淀。如图 3 所示, 加入钨酸钠的提取液最澄清, 蛋白沉淀效果最好; 硫酸铵组的上清液最浑浊, 蛋白沉淀效果最差。从回收率(图 4)结果来看, 氯化钠、氯化锌、硫酸铵组分别有 3 种、5 种和 14 种目标物

的回收率低于 50%, 钨酸钠组中仅一种物质的回收率低于 50%。综上, 选择 7%钨酸钠溶液作为本研究的蛋白沉淀剂。

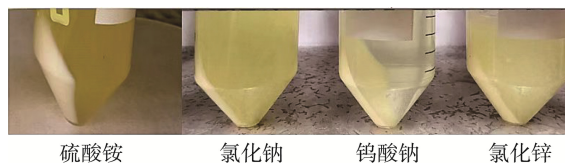


图 3 不同蛋白沉淀剂的沉淀效果

Fig.3 Precipitation effects of different protein precipitating agents

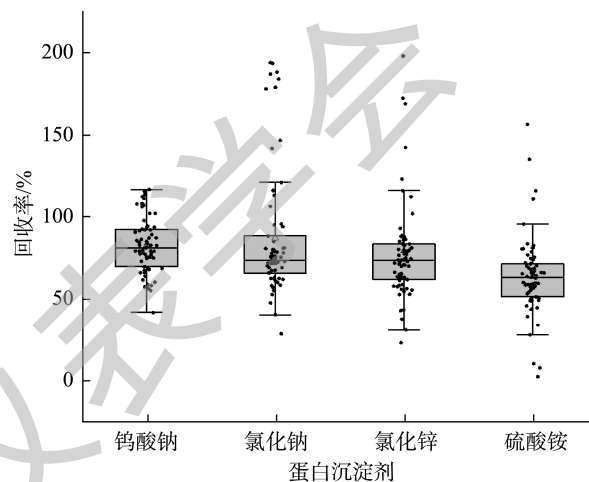


图 4 不同蛋白沉淀剂的回收率($n=2$)

Fig.4 Recoveries of different protein precipitating agents ($n=2$)

进一步对钨酸钠的用量进行了优化。称取 2 g 鸡蛋样品, 用 10 mL Mcllvaine- Na_2EDTA 缓冲液提取离心后, 上清液分别加入 1、3、5、10 mL 7%钨酸钠溶液, 结果表明(图 5), 加入 5 mL 7%钨酸钠溶液时, 提取液最澄清, 蛋白沉淀效果最好; 加入量提高到 10 mL 时, 澄清度与 5 mL 时相当, 最终确定钨酸钠溶液的用量为 5 mL。

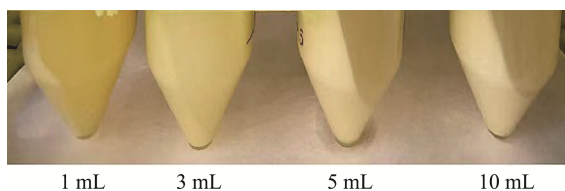


图 5 不同体积钨酸钠的蛋白沉淀效果

Fig.5 Precipitation effects of different volumes of sodium tungstate

2.2.3 固相萃取柱的选择

禽蛋中含有的磷脂等成分会对目标物的分析造成干扰^[26], 本研究选用 HLB 固相萃取柱净化, 该类小柱对非极性至中等极性的酸性、中性、碱性化合物均有较好的回收率, 已广泛应用于动物源性食品的药物残留分析中^[27-29]。本研究比较了几种不同厂家、不同类型 HLB 柱的净化效果, 其中 Prime HLB 为 HLB 和除磷脂材料 Ostra 复配而成, 可

以去除蛋白、盐、磷脂等 95% 以上的基质干扰物; HMR 为 HLB 与增强型脂质去除材料 EMR-Lipid 复配而成。结果如图 6 所示。

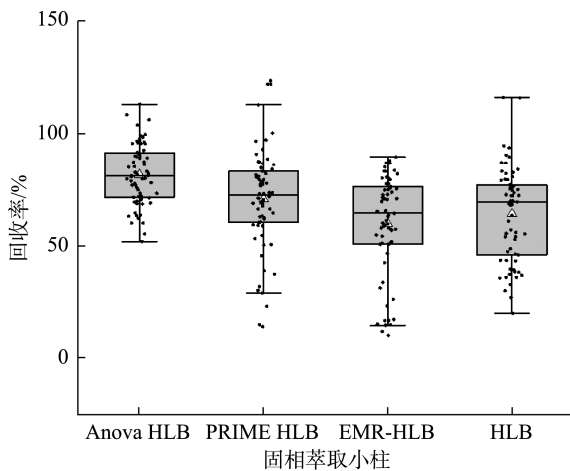


图 6 不同固相萃取柱的回收率($n=2$)

Fig.6 Recoveries of different solid phase extraction columns ($n=2$)

使用 Anavo HLB 净化时, 大部分目标物的回收率高于其他组, 在 52.1%~113.2% 之间, 且在过柱时, 提取液可以快速、稳定地通过, 而 Oasis HLB 过柱时, 流速较慢, 有局部堵塞现象, 这可能是其回收率比 Anavo HLB 低的原因之一。文献报道^[30]采用 EMR-Lipid 填料进行禽蛋样品的 QuEChERS 净化时可较好地去除脂类, 降低基质效应, 但是本研究结果显示采用 PrimeHLB 小柱或者 HMR 小柱时回收率都有所降低, 如西马特罗、沙丁胺醇、氟甲喹等 15 种药物(图 7), 且总体上基质效应改善不明显。推测是因为

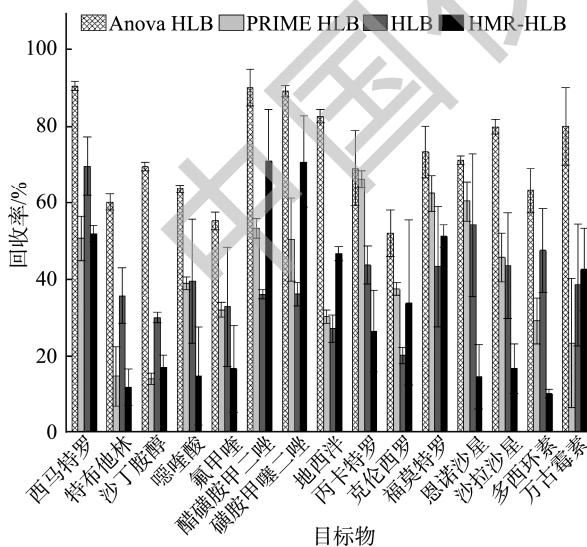


图 7 鸡蛋提取液中 15 种目标物经不同固相萃取柱富集净化的回收率($n=3$)

Fig.7 Recoveries of 15 kinds of target compounds in egg extracts purified by different solid phase extraction columns ($n=3$)

文献中采用乙腈体系进行样本提取, 提取液中的脂类含量较高, 更适合 EMR 类材料进行后处理, 但本研究的提取液为缓冲盐类, 脂类溶解度低, 因此提取出的脂类较少, 在该体系中, 部分目标物会被 EMR 吸附, 造成回收率降低。综上, 选择 Anavo HLB 柱进行富集净化。

2.3 方法验证

2.3.1 基质效应评价

本研究通过基质标准曲线斜率与溶剂标准曲线斜率的比值来考察了各目标物的基质效应。比值在 80%~120% 范围内可忽略不计, 大于 120% 为基质增强, 小于 80% 为基质抑制。本方法的基质效应在 53.6%~121.6% 之间, 其中有 53.7% 的目标物存在基质抑制, 44.8% 的目标物无显著影响, 1.5% 的目标物存在基质增强效应。本研究采用内标校正曲线或基质空白提取液配制标准曲线来消除基质效应的影响。

2.3.2 方法的定量限、加标回收率及精密度

采用基质空白提取液配制基质标准曲线, 在上述优化后的条件下进行 UPLC-QqQ-MS/MS 分析, 以目标物的质量浓度为横坐标($X, \mu\text{g/L}$)、相应峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归。如表 1 所示, 67 种目标物在 0.1~100.0 $\mu\text{g/kg}$ 线性范围内, 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 相关系数 r^2 在 0.990~0.999 之间。通过对空白基质进行加标分析, 以信噪比 (S/N)=3 为检出限(limit of detection, LOD), 信噪比(S/N)=10 为定量限(limit of quantitation, LOQ), 67 种禁用药物的 LODs 范围为 0.03~0.17 $\mu\text{g/kg}$; LOQs 范围为 0.1~0.5 $\mu\text{g/kg}$ (表 1), 本方法具有良好的定性和定量分析能力。

对不含目标物的鸡蛋样品进行 LOQ、2 倍 LOQ、10 倍 LOQ 3 个浓度水平的加标实验, 每个浓度设 6 个平行组, 在优化后的条件下进行分析, 计算目标物的平均回收率及精密度。结果表明, 3 个浓度水平的加标样品平均回收率在 56.3%~110.1% 之间, 加标样品测定结果的相对标准偏差在 1.5%~16.8% 之间, 准确度和精密度符合多兽药残留检测要求。

2.4 实际样品检测

用本方法对北京市采集的 46 件鸡蛋样品进行了检测, 共有 4 件样品检测出了禁用药物, 其中 2 件样品检出了氨苄西林, 检出水平分别为 29.9 $\mu\text{g/kg}$ 和 68.6 $\mu\text{g/kg}$; 1 件样品检出了恩诺沙星, 检出水平为 1.04 $\mu\text{g/kg}$; 1 件样品中同时检出了磺胺二甲嘧啶和磺胺索嘧啶, 检出水平分别为 3.31 $\mu\text{g/kg}$ 、2.20 $\mu\text{g/kg}$ 。GB 31650—2019 规定这些药物均为产蛋期禁用, 因此这些样品可能存在安全隐患; 若以 10 $\mu\text{g/kg}$ 作为产蛋期禁用药物的限量, 则有 2 件样品不合格, 占比为 4.35%, 说明禽蛋中禁用药物的残留问题应引起关注。

3 结论

本研究通过对样品提取、蛋白沉淀、富集净化等条件

进行优化比较,建立了 SPE-UPLC-QqQ-MS/MS 同时检测禽蛋中 67 种禁用药物。选择蛋白沉淀效果最好的沉淀剂来沉淀蛋白,用净化效果最好、回收率最高的 Anavo HLB 固相萃取柱净化,结果准确,并应用到了实际样品的检测中,发现市售样品中存在磺胺、氨基西林等禁用药物。与现有的禽蛋中禁用药物研究^[31]相比,本方法可实现禽蛋中不同类别的禁用药物同时前处理和分析,禁用药物的覆盖率更高,从而缩短了检测周期,降低了检测成本,可为禽蛋产品质量安全监测提供参考。

参考文献

- [1] 刘颖,李述刚,李秀婷,等. 新冠疫情防控常态化背景下中国禽蛋产业发展的现状及对策[J]. 食品与机械, 2021, 37(6): 224–228.
LIU Y, LI SG, LI XT, *et al.* Problems and countermeasures on the development of poultry egg industry in China under the normalized background of COVID-19 control and prevention [J]. Food Mach, 2021, 37(6): 224–228.
- [2] http://scjgj.cq.gov.cn/zfxqk_225/fdzdgknr/jdcj/spaq_1/jcjsx/202104/t20210419_9190585.html [Z].
- [3] https://www.cqn.com.cn/ms/content/2021-02/24/content_8668704.htm [Z].
- [4] JI X, XU Y, WANG J, *et al.* Multi residue determination of antibiotics in ready-to-eat duck eggs marketed through e-commerce stores in China and subsequent assessment of dietary risks to consumers [J]. J Food Sci, 2021, 86(5): 2145–2162.
- [5] PETERS RJ, BOLCK YJ, RUTGERS P, *et al.* Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(46): 8206–8216.
- [6] LI IC, YANG WY, CHOU CH, *et al.* Analysis of steroid hormones in shell eggs from layer breeds common to Taiwan by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci Nutr, 2019, 7(7): 2319–2326.
- [7] DASENAKI ME, THOMAIDIS NS. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2015, 880: 103–121.
- [8] 冯月超,王建凤,侯帆,等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中 44 种食源性兴奋剂和 6 种孕激素[J]. 色谱, 2022, 40(5): 409–422.
FENG YC, WANG JF, HOU F, *et al.* Determination of 44 foodborne stimulants and 6 progestogens in meat by QuEChERS and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2022, 40(5): 409–422.
- [9] 方从容,高洁,王雨昕,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 125 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119–1131.
FANG CR, GAO J, WANG YX, *et al.* Determination of 125 veterinary drugs residues in eggs by QuEChERS-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(11): 1119–1131.
- [10] 张景然,张建柱,杨影. 新型净化材料结合 QuEChERS 技术用于动物肌肉组织中 β -受体激动剂的快速检测[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(10): 3097–3105.
ZHANG JR, ZHANG JZ, YANG Y. Rapid determination of β -agonists in meat by QuEChERS technology with a new purification material [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(10): 3097–3105.
- [11] WANG B, XIE K, LEE K. Veterinary drug residues in animal-derived foods: Sample preparation and analytical methods [J]. Foods, 2021, 10(3): 555.
- [12] HUANG Y, SHI T, LUO X, *et al.* Determination of multi-pesticide residues in green tea with a modified QuEChERS protocol coupled to HPLC-MS/MS [J]. Food Chem, 2019, 275: 255–264.
- [13] 方真,曲栗,古淑青,等. 加速溶剂萃取-QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定药食同源性食品中 16 种真菌毒素[J]. 色谱, 2020, 38(7): 782–790.
FANG Z, QU S, GU SQ, *et al.* Determination of 16 mycotoxins in drug and food homologous products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with accelerated solvent extraction and QuEChERS [J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(7): 782–790.
- [14] XU X, XU X, HAN M, *et al.* Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multi walled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS [J]. Food Chem, 2019, 276: 419–426.
- [15] 张居舟,李静. 在线固相萃取-同位素稀释/超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 26 种喹诺酮类化合物[J]. 分析测试学报, 2021, 40(10): 1417–1424.
ZHANG JZ, LI J. Simultaneous determination of 26 quinolones in honey by UPLC-MS/MS with on-line solid-phase extraction and isotope dilution [J]. J Instrum Anal, 2021, 40(10): 1417–1424.
- [16] PIĄTKOWSKA M, GBYLIK-SIKORSKA M, GAJDA A, *et al.* Multiresidue determination of veterinary medicines in lyophilized egg albumen with subsequent consumer exposure evaluation [J]. Food Chem, 2017, 229: 646–652.
- [17] CASTILLA-FERNÁNDEZ D, MORENO-GONZÁLEZ D, BENEITO-CAMBRA M, *et al.* Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UPLC-MS/MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(7): 1433–1442.
- [18] 周春红,许晓辉. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱多反应监测模式测定奶粉中 56 种违禁药物残留[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(18): 250–257.
ZHOU CH, XU XH. Determination of 56 drug residues in milk powder by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(18): 250–257.
- [19] WANG C, LI X, YU F, *et al.* Multi-class analysis of veterinary drugs in eggs using dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2021, 334: 127598.
- [20] TANG Y, WANG X, LU Y, *et al.* Qualitative and quantitative determination of tilmicosin in poultry eggs by gas chromatography tandem

- mass spectrometry after derivatization with acetic anhydride [J]. *Food Chem*, 2022, 384: 132572.
- [21] SUO D, ZHANG S, SONG Z, *et al.* Simultaneous determination of 21 sulfonamides in poultry eggs using ionic liquid-modified molecularly imprinted polymer SPE and UPLC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2022, 27(15): 4953.
- [22] 朱燕燕, 马桂娟, 汤丽华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定豆制品中 11 种喹诺酮类药物的残留量[J]. *理化检验-化学分册*, 2022, 58(4): 416-423.
- ZHU YY, MA GJ, TANG LH, *et al.* Determination of 11 quinolones residues in soybean products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phys Test Chem Anal Part B*, 2022, 58(4): 416-423.
- [23] 孙佳林, 金瑞, 张晶, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中的 17- β -雌二醇[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(23): 9000-9005.
- SUN JL, JIN R, ZHANG J, *et al.* Determination of 17- β -estradiol in pork liver by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(23): 9000-9005.
- [24] 刘善菁, 陆桂萍, 刘雨昕, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中 4 种四环素类药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(11): 4379-4387.
- LIU SJ, LU GP, LIU YX, *et al.* Determination of 4 kinds of tetracyclines residues in swine liver by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(11): 4379-4387.
- [25] 吴天鸽, 黄文君, 冯嘉轩. 三氯醋酸/丙酮沉淀法与硫酸铵沉淀法去除血浆高丰度蛋白效果的对比研究[J]. *重庆医学*, 2020, 49(23): 3876-3879.
- WU TG, HUANG WJ, FENG JX. Comparative study on the effect of TCA/acetone-precipitation and ammonium sulfate precipitation in removing plasma high-abundance protein [J]. *Chongqing Med*, 2020, 49(23): 3876-3879.
- [26] 莫迎, 盘正华, 蒋湘, 等. 多壁碳纳米管 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中兽药多残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(16): 5443-5452.
- MO Y, PAN ZH, JIANG X, *et al.* Determination of veterinary drug residues in eggs by multiwalled carbon nanotube QuEChERS combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(16): 5443-5452.
- [27] WANG H, LI X, SHAO M, *et al.* Simultaneous determination of 9 environmental pollutants including bisphenol A in vegetable oil by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Method*, 2021, 13(31): 3527-3534.
- [28] CASTILLA-FERNÁNDEZ D, MORENO-GONZÁLEZ D, BENEITO-CAMBRA M, *et al.* Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(7): 1433-1442.
- [29] 马丽莎, 尹怡, 田斐, 等. PRIME HLB 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 5 种硝基咪唑[J]. *分析实验室*, 2021, 40(11): 1304-1308.
- MA LS, YIN Y, TIAN F, *et al.* Determination of five nitroimidazoles residues in aquatic products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with PRIME HLB solid phase extraction [J]. *Anal Lab*, 2021, 40(11): 1304-1308.
- [30] LUO P, LIU XH, KONG F, *et al.* Simultaneous determination of 169 veterinary drugs in chicken eggs with EMR-Lipid clean-up using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2019, 11(12): 1.
- [31] 秦宇, 葛宇. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中 12 种禁用兽药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(7): 2258-2266.
- QIN Y, GE Y. Simultaneous determination of 12 kinds of banned veterinary drugs residues in poultry eggs by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(7): 2258-2266.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



陈容, 硕士研究生, 主要研究方向为营养与食品卫生。

E-mail: rong20221212@163.com



张晶, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: brightjing@163.com