

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240327008

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中 10 种氨基糖苷类药物残留

史沁芳, 田小艳, 余文琴, 谢川东, 蔡琼, 李珊*, 李潇

(重庆市计量质量检测研究院, 重庆 401123)

摘要: **目的** 建立了利用 QuEChERS 净化高效液相色谱-串联质谱法同时检测禽蛋中 10 种氨基糖苷类药物(潮霉素 B、阿米卡星、安普霉素、卡那霉素、庆大霉素 C1、庆大霉素 C1a、庆大霉素 C2、巴龙霉素、西索米星、奈替米星)残留的方法。**方法** 样品经 5% (V/V)三氯乙酸振荡提取, QuEChERS 净化, 采用 Amide 高效液相色谱柱分离, 以 1% (V/V)甲酸水和 90% (V/V)乙腈水进行梯度洗脱, 外标法定量。**结果** 在 20~1000 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99, 方法的检出限为 0.2 mg/kg, 定量限为 0.5 mg/kg, 对各种基质进行 1、2、10 倍定量限进行 3 水平的加标实验, 平均回收率为 63.6%~119.0% ($n=6$), 相对标准偏差为 1.0%~7.5%。利用该方法对市场销售的鸡蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋各 20 批次进行检测, 均未检出氨基糖苷类化合物。**结论** 该方法利用 QuEChERS 净化可以更简便、快速、准确的实现禽蛋中 10 种氨基糖苷类药物残留的检测。**关键词:** QuEChERS; 氨基糖苷类; 高效液相色谱-串联质谱法; 禽蛋

Determination of 10 kinds of aminoglycosides residues in poultry eggs by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SHI Qin-Fang, TIAN Xiao-Yan, YU Wen-Qin, XIE Chuan-Dong,
CAI Qiong, LI Shan*, LI Xiao

(Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 401123, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 10 kinds of aminoglycosides (hygromycin B, amikacin, apramycin, kanamycin, gentamycin C1, gentamycin C1a, gentamycin C2, paromomycin, sisomicin and netilmicin) residues in poultry eggs by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by shaking with 5% (V/V) trichloroacetic acid, purified by the QuEChERS method, separated by Amide high performance liquid chromatography column. Meanwhile, gradient elution was carried out with 1% (V/V) formic acid water and 90% (V/V) acetonitrile in water as mobile phase, which quantified by the external standard method. **Results** The linear relationships were pretty good when the mass concentration was 20–1000 $\mu\text{g/L}$. The correlation coefficients were all above 0.99. The limits of detection were 0.2 mg/kg, and the limits of quantitation were 0.5 mg/kg. Various matrices

基金项目: 重庆市计量质量检测研究院科研计划项目[2022(研)-15]

Fund: Supported by the Research Project of Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection [2022 (Yan)-15]

*通信作者: 李珊, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: 1134613595@qq.com

*Corresponding author: LI Shan, Master, Engineer, Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, No.3, North Yangliu Road, Yubei District, Chongqing 401123, China. E-mail: 1134613595@qq.com

were tested 1, 2, 10 quantitation limit for 3 levels of spiking experiments, the average recoveries were 63.6%–119.0% ($n=6$), and the relative standard deviations were 1.0%–7.5%. This method was used to test 20 batches of eggs, goose eggs, and quail eggs sold on the market, and no aminoglycosides were detected in any of them. **Conclusion** Using QuEChERS purification method, the detection of 10 kinds of aminoglycosides residues in poultry eggs can be realized more simply, quickly and accurately.

KEY WORDS: QuEChERS; aminoglycosides; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; poultry eggs

0 引言

氨基糖苷类药物(aminoglycosides, AGs)(图 1)是由氨基糖与氨基环醇通过氧桥连接而成的苷类抗生素,是一种广谱的抗菌药^[1-2]。因其价格低廉被广泛应用于畜牧业和养殖业,它不仅被用于疾病的治疗,还常被添加到动物的饲料中用于促进动物的生长发育^[3]。AGs 都有不同程度的耳毒性、肾毒性和神经肌肉阻滞作用^[4]。由于该类药结构稳定,不容易降解,在被动物食用后容易在动物体内残留,主要存在于肝脏、肾脏、肉、蛋、奶中^[5],因此需要建立禽蛋中 AGs 残留检测方法,来监测家禽动物食品的质量安全。

我国 2020 年实施的 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》和 2023 年实施的 GB 31650.1—2022《食品安全国家标准 食品中 41 种兽药最大

残留限量》对食品中部分 AGs 做出了限量规定。其中规定蛋中卡那霉素产蛋期禁用,但不包括鱼;新霉素的最大残留限量为 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$;鸡蛋中大观霉素的最大残留限量为 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$;潮霉素 B 允许作治疗用,但不得在动物性食品中检出。目前国内外报道的 AGs 的检测方法针对的基质主要集中在蜂蜜^[6-9]、乳制品^[10-14]、肉制品^[15-19]、水产品^[20-22]等基质,对于同时测定禽蛋中多种 AGs 残留量的检测方法较少^[23-26],且没有相关检验标准。目前针对食品中 AGs 残留的检测方法主要有微生物法^[27-29]、免疫分析法^[30-31]、色谱分析法^[32-37]等,其中微生物法对实验要求高,灵敏度低且重现性差;免疫分析法虽然灵敏度高,但是获取高灵敏度的抗体难度大;色谱分析法中高效液相色谱法针对无紫外吸收的 AGs 无法检测,气相色谱法需要衍生,步骤烦琐。近年来,高效液相色谱-串联质谱法因其定量准确、灵敏度高、重现性好、无需衍生等特点被广泛应用于

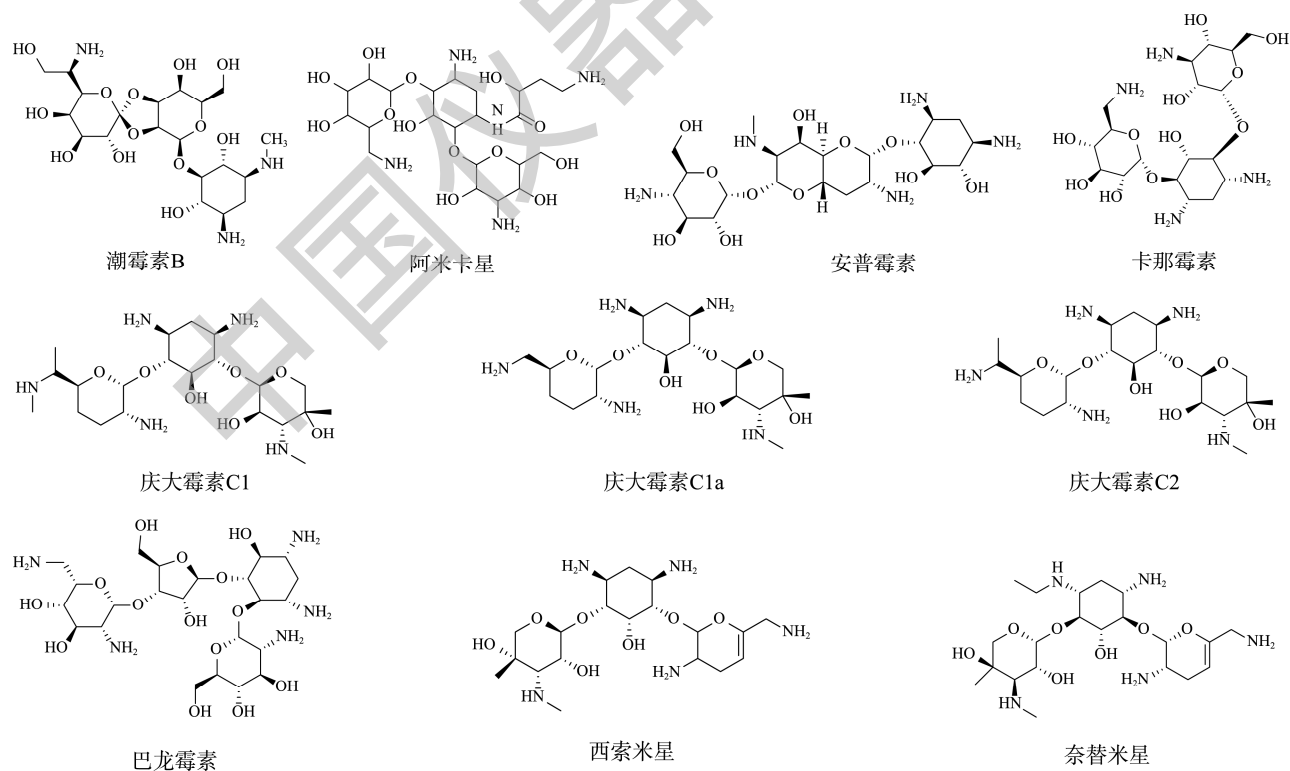


图1 10种AGs的结构式

Fig.1 Structure of 10 kinds of AGs

食品中 AGs 残留的检测。针对禽蛋中 AGs 残留的检测,为解决其在色谱中无保留、无紫外吸收、灵敏度低及基质干扰大的技术难点,目前大多数采用的是盐溶液进行提取,固相萃取法进行净化,使用亲水性液相色谱柱以及流动相中加入离子对试剂来增强目标物在色谱柱中的保留^[38]。该方法不仅前处理复杂耗时,对质谱系统损害较大而且对于个别物质依旧存在回收率、灵敏度低等问题。

QuEChERS 是 ANASTASSIADES 等^[39]于 2003 年在基质分散固相萃取(matrix solid-phase dispersion, MSPD)的基础上研究建立的分散固相萃取技术。相比于原来的农药残留前处理分析方法,该方法具有稳定性好、回收率高、操作简单、分析时间短等显著优势。但 QuEChERS 在兽药残留领域的应用还比较有限,主要由于兽药残留的基质复杂、化学性质各异。众多研究^[40-42]将 QuEChERS 应用到了鸡蛋中部分兽药残留的检测前处理中,但未见 AGs 相关应用。

本研究拟采用振荡提取, QuEChERS 净化, Amide 高效液相色谱柱分离,以常规流动相进行梯度洗脱,外标法定量,利用高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中 10 种 AGs 残留,以期解决当前检测禽蛋中 AGs 前处理复杂,需要使用高盐流动相等问题,为食品中 AGs 残留检测方法的开发研究提供借鉴和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

潮霉素 B (hygromycin B, HYGRO, 纯度 90.2%)、阿米卡星 (amikacin, AMIKA, 纯度 98.4%)、安普霉素 (apramycin, APRA, 纯度 84.2%)、卡那霉素 (kanamycin, KANA, 纯度 80.2%)、庆大霉素 C1 (gentamycin C1, GENTA C1, 纯度 57.7%)、庆大霉素 C1a (gentamycin C1a, GENTA C1a, 纯度 99.9%)、庆大霉素 C2 (gentamycin C2, GENTA C2, 纯度 57.7%)、巴龙霉素 (paromomycin, PAR, 纯度 66.5%)、西索米星 (sisomicin, SISO, 纯度 59.8%)、奈替米星 (netilmicin, NETI, 纯度 90.2%) (北京纳百生物科技有限公司); 乙腈 (色谱纯, 北京百灵威科技有限公司); 甲酸 (色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司); C₁₈ 填料 [华谱生物科技(重庆)有限公司]。

1.2 仪器与设备

AB Sciex Triple Quad 5500 液质联用仪 (美国 AB SCIEX 公司); 3K15 台式冷冻离心机 (德国 Sigma 公司); TG-16S 高速离心机 (四川蜀科仪器有限公司); QUINTIX224-1CN 电子天平 [感量 0.01 g, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; Vortex3 型涡旋振荡器、Ks4000i 振荡器 (德国 IKA 公司); KQ-500DE 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); PP020XXM1 & PH2XXXM1 超纯水机 (英国 ELGA 公司); Hypersil GOLD™ C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); BEH HILIC 色

谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、XBridge® Amide 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) (美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

标准储备液的配制: 称取适量的 10 种标准品, 分别溶于 10 mL 乙腈:水:乙酸 (20:78:2, V/V/V) 混合溶液中, 配制相应浓度的标准储备液, 于塑料管冷冻保存。

混合标准中间液的配制: 准确移取各标准储备液, 混合, 用乙腈:水:乙酸 (20:78:2, V/V/V) 混合溶液稀释, 配制质量浓度为 10 mg/L 的混合标准中间液。

1.3.2 高效液相色谱-串联质谱条件

色谱柱: XBridge® Amide (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm); 流动相: A 相为 1% 甲酸水, B 相为 90% 乙腈水; 柱温: 40°C; 进样量: 20 μL; 流速: 0.3 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 90% B; 1.0~2.0 min, 90%~65% B; 2.0~3.0 min, 65%~55% B; 3.0~8.0 min, 55%~40% B; 8.0~9.0 min, 40% B; 9.0~9.5 min, 40%~90% B; 9.5~11.5 min, 90% B; 12.0 min。质谱离子源为电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI)(+), 10 种 AGs 的质谱参数见表 1。

1.3.3 样品处理

(1) 提取

参考 ARSAND 等^[11]的方法, 并进行了优化。准确称取 2 g 试样于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 10 mL 5% 三氯乙酸 (trichloroacetic acid, TCA) 提取液 (乙腈:水=1:1, V/V), 振摇提取 20 min, 5°C, 4000 r/min 离心 10 min, 移取上清液 1.0 mL 于离心管中, 将其置于 -20°C 条件下冷冻 10 min, 冷冻液在 12000 r/min 离心 5 min, 转移上清液于另一离心管中, 待净化。

(2) 净化

待净化液加入 100 mg 十八烷基硅烷 (octadecyl silane, C₁₈) 填料, 涡旋混匀, 12000 r/min 离心 5 min, 上清液经微孔滤膜过滤, 移取 500 μL 过滤液于进样小瓶中, 再加入 500 μL 流动相 A, 混匀, 供高效液相色谱-串联质谱法分析使用。

1.3.4 基质匹配标准工作溶液

分别称取 7 份鸡蛋, 鹅蛋, 鹌鹑蛋的空白样品, 按照 1.3.3(1)和(2)操作步骤, 得到空白基质提取液。用空白基质提取液配制质量浓度为 20、50、100、200、500、800、1000 μg/L 的基质匹配标准工作溶液。

1.3.5 基质效应研究

在化学分析中, 基质指的是样品中除被分析物以外的组分。基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰, 并影响分析结果的准确性, 这些影响和干扰被称为基质效应 (matrix effect, ME)。本研究采用溶剂曲线的斜率和基质匹配标准曲线的斜率比值对不同组分的 ME 进行评价^[43]。计算方法为: $ME = (\text{空白基质标曲斜率} / \text{溶剂标曲斜率} - 1) \times 100\%$ 。

表 1 10 种 AGs 的质谱参数
Table 1 Mass spectrum parameters of 10 kinds of AGs

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	DP/V	CE/eV
HYGRO	528.0	528.0/352.1*	90	32
		528.0/177.1		37
AMIKA	586.4	586.4/264.2*	95	33
		586.4/425.6		28
APRA	540.0	540.0/217.2*	85	35
		540.0/378.2		25
KANA	485.1	485.1/163.1*	72	36
		485.1/324.2		22
GENTA C1	478.2	478.2/322.0*	90	20
		478.2/157.0		29
GENTA C1a	450.2	450.2/322.0*	70	18
		450.2/160.0		27
GENTA C2	464.2	464.2/322.0*	70	18
		464.2/160.0		31
PAR	616.3	616.3/163.1*	100	45
		616.3/293.2		35
SISO	448.0	448.0/254.0*	80	27
		448.0/271.0		25
NETI	476.0	476.0/458.1*	90	25
		476.0/299.0		20

注: *代表定量离子; 去簇电压(declustering potential, DP); 碰撞能量(collision energy, CE)。

1.4 数据处理

高效液相色谱-串联质谱采集的数据经 SIEX OS 软件处理获得 AGs 的定量结果, 采用 Excel 2016 和 Origin 9.0 进行数据分析和图表绘制。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

研究对比了 Hypersil GOLD™ C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.9 μm)、BEH HILIC (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 和 XBridge® Amide (2.1 mm×100 mm, 3.5 μm) 3 种类型的色谱柱。AGs 为强极性化合物, 使用无离子对试剂流动相在常见的反相 Hypersil GOLD™ C₁₈ 色谱柱中无保留, 需要在流动相中加入七氟丁酸等离子对试剂与 AGs 结合形成疏水型离子对, 才能增强保留, 但离子对试剂与色谱柱固定相结合会产生不可逆吸附, 影响色谱柱使用寿命, 污染离子源, 降低质谱灵敏度。BEH HILIC 色谱柱虽然其为亲水性色谱柱但是其固定相中的硅醇基与 AGs 之间产生了强氢键作用和离子交换作用导致峰形较宽、较差。XBridge® Amide 色谱柱虽然同为亲水性色谱柱, 但其酰胺基为中性基团, 因此离子交换作用较小可以实现对各个目标化合物的保留且具有良好的峰形(图 2)。因此, 本研究最终选定 XBridge® Amide 柱作为分析色谱柱。

2.2 提取条件的优化

禽蛋基质复杂, 含有大量的蛋白质和磷脂类物质;

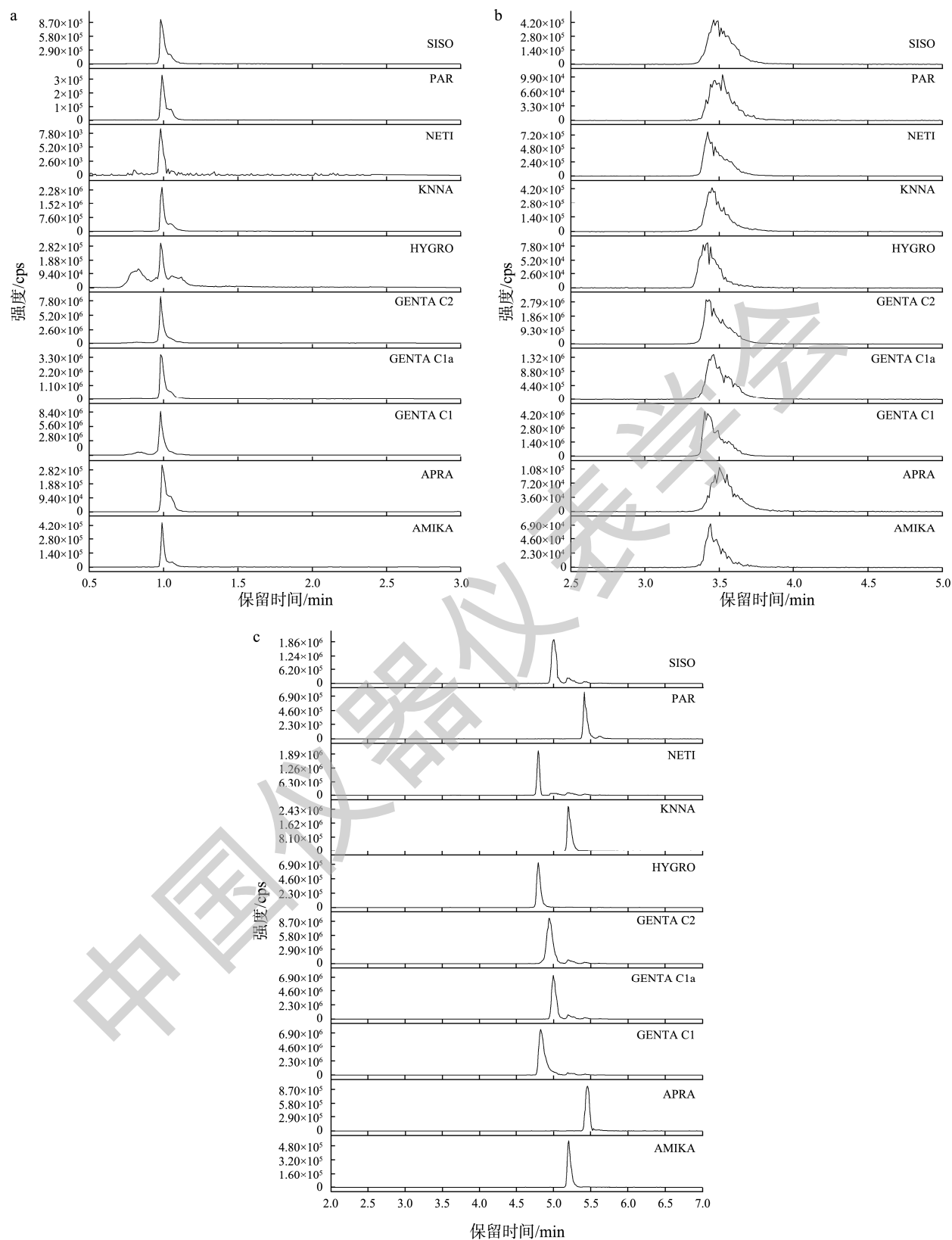
AGs 极性大, 为弱碱性化合物, 易溶于水难溶于有机溶剂, 在水中又容易质子化不利于提取, 因此, 分析 AGs 的关键就是去除禽蛋中富含的蛋白质和脂肪物质干扰让 AGs 从基质中游离出来, 进入提取溶剂中, 从而提高回收率。

2.2.1 乙二胺四乙酸的选择

乙二胺四乙酸二钠(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)作为螯合剂可以防止 AGs 与金属离子的快速螯合。分别用 0、50、100、150 μL 150 mmol/L EDTA 缓冲盐提取 5 mg/kg 的鸡蛋空白加标样品, 10 种 AGs 的回收率见图 3。由图 3 可以看出 4 种组分(AMIKA、APRA、KANA、PAR)不添加 EDTA 回收率高, 6 种组分(HYGRO、GENTA C1、GENTA C1a、GENTA C2、SISO、NETI)不添加 EDTA 和添加 150 μL 回收率相差不大。实验结果表明就算不加入 EDTA 也不影响禽蛋类基质中氨基糖苷类药物的提取效果, 本着绿色实验原则, 选择前处理不添加 EDTA 缓冲盐。

2.2.2 TCA 浓度的选择

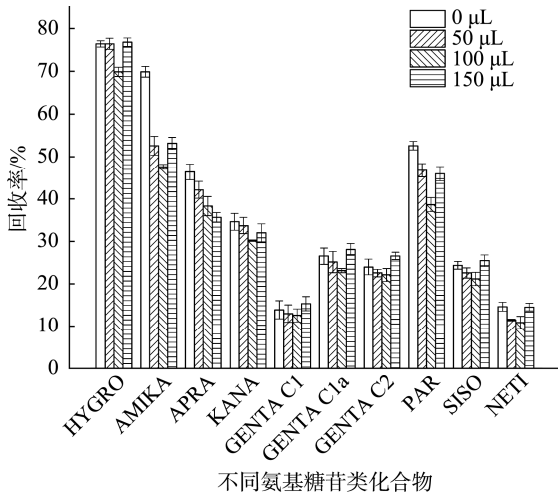
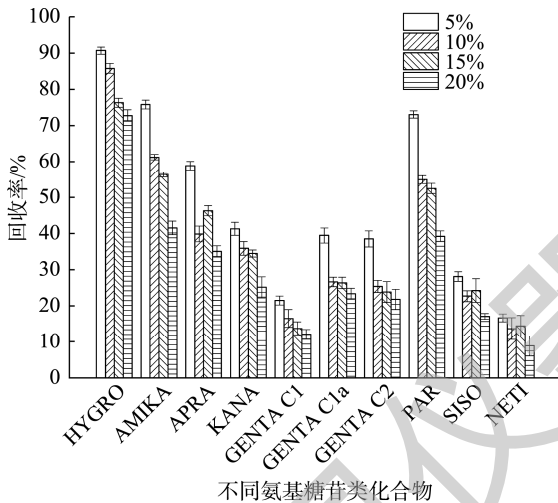
TCA 作为蛋白质变性剂可以与蛋白质形成不溶性盐, 这种反应导致蛋白质结构发生改变, 从而暴露出较多的疏水性基团, 使得蛋白质分子聚集并沉淀。TCA 已被广泛用于提取生物基质中的抗生素, 以消除分析中基质的潜在干扰。本研究分别考察了 5%、10%、15%、20%浓度的 TCA 对 10 种 AGs 回收率的影响(图 4)。由图 4 可得随着 TCA 浓度的增加 10 种 AGs 的回收率明显下降, 可能由于高浓度的 TCA 影响了 AGs 的离子化效率, 与其竞争电荷从而导致回收率下降。因此本研究最终选择了 5%TCA 作为提取溶剂。



注: a为ThermoFisher Scientific C₁₈; b为Waters BEH HILIC; c为Waters XBridge[®] Amide。

图2 不同色谱柱的提取离子流图

Fig.2 Extracted ion chromatograms of different columns

图3 EDTA对鸡蛋中10种AGs加标回收率的影响($n=3$)Fig.3 Effects of EDTA on the recoveries of 10 kinds of AGs in eggs ($n=3$)图4 TCA对鸡蛋中10种AGs加标回收率的影响($n=3$)Fig.4 Effects of TCA on the recoveries of 10 kinds of AGs in eggs ($n=3$)

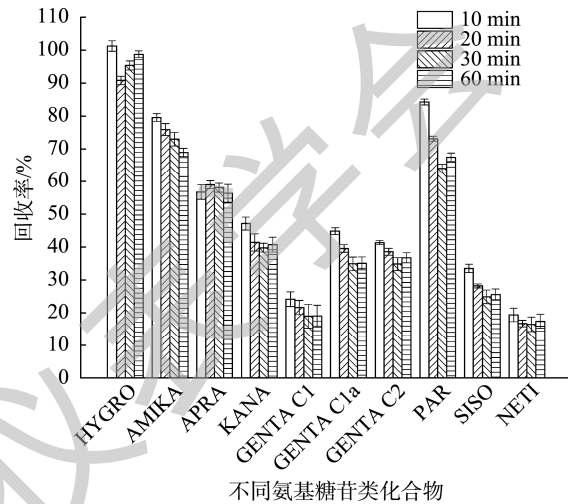
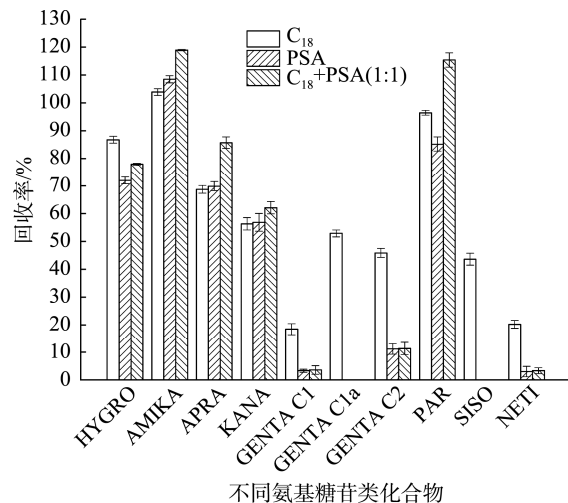
2.2.3 冷冻时长的选择

由于禽蛋基质复杂,目标化合物提取难度大,为了提高禽蛋中蛋白质和脂肪的沉淀效果,除了使用TCA沉淀蛋白,本研究还使用了冷冻法。比较了在 -20°C 分别冷冻10、20、30、60 min 10种AGs的回收率,见图5。实验结果表明延长冷冻时间并没有达到提高回收率的目的,在较短的冷冻时间内已经能够达到沉淀蛋白质的作用,因此选择冷冻10 min。

2.3 QuEChERS 净化条件的优化

QuEChERS净化技术中,其中无水硫酸镁用于吸附试样中的少量水分,硅胶基伯胺仲胺键合相吸附剂(primary secondary amine, PSA)用于吸附有机酸、脂肪酸、糖类, C_{18} 用于吸附脂类等非极性干扰物如脂肪,石墨化碳黑

(graphitized carbon black, GCB)能除去色素和固醇类物质的干扰。由于AGs溶于水,且禽蛋基质中没有色素,本研究仅考察了PSA、 C_{18} 对目标化合物回收率的影响(图6),包括(a) 25 mg C_{18} ; (b) 25 mg PSA; (c) 25 mg C_{18} +25 mg PSA。结果发现加入PSA会导致部分组分完全没有回收,可能原因是PSA吸附杂质的同时还吸附了目标物,因此最终仅选择了 C_{18} 作为净化剂。本研究还进一步比较了加入不同 C_{18} 含量对回收率的影响(图7),结果表明加入100 mg C_{18} 各组分回收率最为理想。

图5 冷冻时间对鸡蛋中10种AGs加标回收率的影响($n=3$)Fig.5 Effects of freezing time on the recoveries of 10 kinds of AGs in eggs ($n=3$)图6 不同净化条件对10种AGs的加标回收率统计($n=3$)Fig.6 Statistical analysis of recoveries of 10 kinds of AGs with different purification conditions ($n=3$)

2.4 基质效应

本研究通过溶剂曲线斜率和基质匹配标准曲线的斜率比来评价各个化合物在不同基质条件下的ME。当 $\text{ME} \approx 0$

时, 表明无明显 ME; 当 ME>0 时, 表明有基质增强效应; 当 ME<0 时, 表明有基质抑制效应。由图 8 可知, 只有鹌鹑蛋中的 PAR 组分有基质增强效应, 其余组分无论在何种基质下均为基质抑制效应, 其中 HYGRO、AMIKA、PAR 的|ME|小于 30%, 其余组分均显示很强的 ME。因此, 为提高定量的准确性, 消除 ME 带来的影响, 本研究采用了空白基质溶液配制标准曲线。

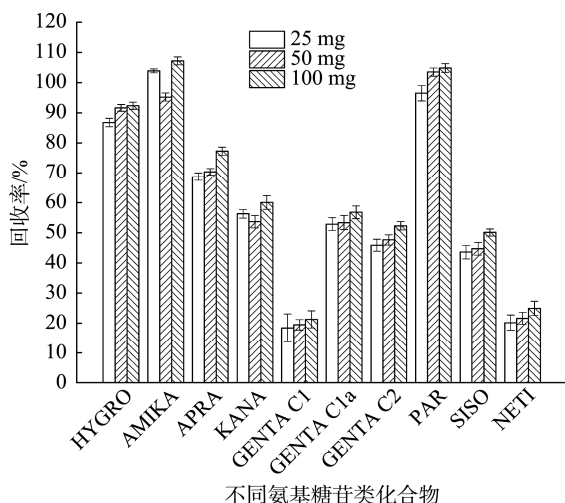


图7 不同C₁₈含量对10种AGs的加标回收率统计(n=3)
Fig.7 Statistical analysis of recoveries of 10 kinds of AGs with different C₁₈ contents (n=3)

2.5 方法学验证

2.5.1 检出限、定量限和线性关系

准确移取一定量的混合标准中间液, 用空白基质提取液逐级稀释成质量浓度为 20、50、100、200、500、800、1000 μg/L 的基质混合标准工作溶液, 供高效液相色谱-串联质谱仪测定, 以质量浓度为横坐标, 定量离子的峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得出线性回归方程。通过向空白基质溶液中加入标准物质, 以标准曲线最低点的 3 倍倍

噪比(S/N≥3)确定方法的检出限(limit of detection, LOD)为 0.2 mg/kg, 以标准曲线最低点的 10 倍信噪比(S/N≥10)确定方法的定量限(limit of quantitation, LOQ)为 0.5 mg/kg, 相关系数(correlation coefficients, r)均大于 0.99, 满足实验要求。10 种 AGs 在不同基质条件下的检出限、定量限、回归方程、线性相关系数见表 2。

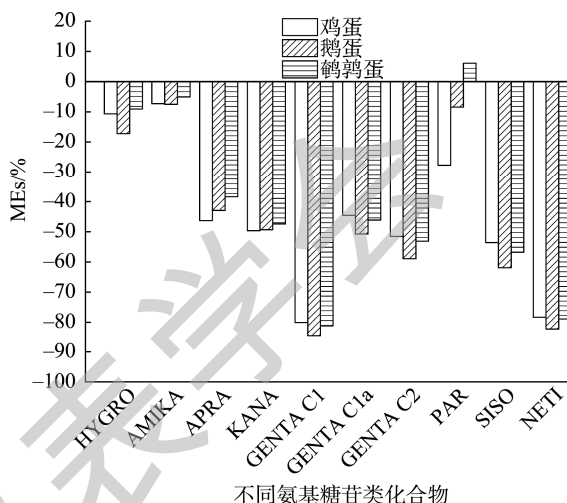


图8 10种AGs MEs的评价图
Fig.8 MEs of 10 kinds of AGs

2.5.2 回收率和精密度

分别对鸡蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋 3 种空白基质进行 1、2、10 倍定量限进行低、中、高 3 水平的加标实验, 每个水平做 6 个平行试验, 结算加标回收率与相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs), 实验结果见表 3, 由表 3 可知, 鸡蛋的平均回收率为 72.1%~119.0%, RSDs 为 1.7%~7.5%; 鹅蛋的平均回收率为 76.8%~100.2%, RSDs 为 1.2%~5.8%; 鹌鹑蛋的平均回收率为 63.6%~117.3%, RSDs 为 1.0%~4.9%。准确度与精密度满足实验要求。

表 2 10 种 AGs 的回归方程、相关系数、LODs 及 LOQs
Table 2 Calibration equations, correlation coefficients, LODs, and LOQs of 10 kinds of AGs

化合物	检出限 (mg/kg)	定量限 (mg/kg)	鸡蛋		鹅蛋		鹌鹑蛋	
			线性方程	相关系数	线性方程	相关系数	线性方程	相关系数
HYGRO			Y=968.53X+9503.82	0.9980	Y=897.57X+4528.43	0.9984	Y=985.38X-7580.86	0.9969
AMIKA			Y=799.37X+7858.78	0.9973	Y=797.22X+2682.76	0.9989	Y=818.88X-9813.79	0.9982
APRA			Y=706.03X-791.92	0.9994	Y=749.84X-355.08	0.9997	Y=808.69X-14712.76	0.9989
KANA			Y=1988.60X+10802.89	0.9988	Y=2001.58X+83.03	0.9994	Y=2073.02X-25767.04	0.9995
GENTA C1	0.2	0.5	Y=6823.14X-9487.74	0.9994	Y=5334.18X-26793.60	0.9990	Y=6452.20X-1.14e5	0.9988
GENTA C1a			Y=8484.94X+9699.56	0.9993	Y=7545.26X+4542.88	0.9994	Y=8251.07X-9.40e4	0.9987
GENTA C2			Y=11592.85X+5.66e4	0.9988	Y=9816.33X+19077.76	0.9995	Y=11216.22X-1.08e5	0.9974
PAR			Y=1103.80X+859.63	0.9996	Y=1397.50X-6990.61	0.9994	Y=1619.336X-3.30e4	0.9947
SISO			Y=2561.39X-4398.26	0.9993	Y=2102.14X+4737.89	0.9990	Y=2386.21X-29559.67	0.9977
NETI			Y=517.68X-4054.02	0.9998	Y=426.43X-4946.40	0.9966	Y=504.41X-10676.14	0.9991

表 3 10 种 AGs 在不同添加水平下的回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and RSDs of 10 kinds of AGs at different spiked levels ($n=6$)

化合物	加标量/(mg/kg)	鸡蛋		鹅蛋		鹌鹑蛋	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
HYGRO	0.5	97.6	2.6	100.2	2.4	117.3	2.3
	1.0	86.7	4.5	96.2	4.1	105.2	4.2
	5.0	98.4	3.0	89.6	2.2	95.1	2.2
AMIKA	0.5	97.0	5.8	93.2	1.9	117.1	2.3
	1.0	89.0	7.5	92.1	4.2	98.9	3.8
	5.0	103.9	3.3	88.1	3.0	90.6	2.1
APRA	0.5	110.4	2.8	83.4	5.8	101.6	3.2
	1.0	106.2	3.8	82.7	3.3	83.5	3.1
	5.0	112.3	1.7	83.3	3.4	74.7	4.9
KANA	0.5	102.5	4.7	95.1	4.4	115.8	2.5
	1.0	89.0	2.8	91.2	3.6	91.8	2.0
	5.0	109.2	2.0	82.3	1.2	84.6	2.4
GENTA C1	0.5	92.5	2.4	97.8	1.4	116.7	1.8
	1.0	72.1	4.2	85.9	4.6	91.0	1.0
	5.0	99.1	4.1	80.6	2.3	91.6	2.2
GENTA C1a	0.5	93.9	2.9	92.0	2.5	111.2	1.3
	1.0	76.8	2.5	84.9	1.2	90.7	2.7
	5.0	92.7	2.4	82.2	2.2	90.0	2.0
GENTA C2	0.5	96.2	2.5	94.4	2.7	111.1	3.3
	1.0	73.7	3.0	88.5	1.9	91.7	2.6
	5.0	94.1	2.8	83.7	2.0	91.8	2.5
PAR	0.5	116.0	4.1	96.0	1.3	100.1	2.3
	1.0	112.4	4.9	82.9	2.7	74.5	3.0
	5.0	116.8	2.2	80.2	3.0	63.6	3.2
SISO	0.5	98.4	6.4	89.1	3.6	112.5	3.4
	1.0	74.6	3.2	81.6	3.4	88.0	1.0
	5.0	99.5	2.0	83.0	2.8	90.0	2.9
NETI	0.5	111.0	3.2	100.2	2.8	115.0	2.1
	1.0	79.5	3.9	87.5	2.6	89.1	4.8
	5.0	119.0	2.2	76.8	2.7	92.2	3.8

2.6 实际样品检测

采用本方法对市场鸡蛋、鹅蛋、鹌鹑蛋各 20 批次进行检测,根据定性和定量分析,所测样品中均未检出以上 10 种 AGs 残留。

3 结论

本研究建立了禽蛋中 10 种 AGs 残留的高效液相色谱-串联质谱分析方法。该方法采用了快速、简单、廉价、高效、稳定、安全的 QuEChERS 净化技术,较传统前处理操作更加简便快捷,避免使用了固相萃取小柱净化,同时流动相仅使用了常规有机试剂,更能有效降低质谱系统损耗,在时间和成本上更适用于实际大批量样品操作。该方法的检出限为 0.2 mg/kg,定量限为 0.5 mg/kg,各基质平均回收率为 63.6%~119.0%。该方法适用于禽蛋中 AGs 残留的分析检测,同时也可为其他食品中兽药残留检测方法的

开发研究提供借鉴和依据。

参考文献

- [1] 栾枫婷, 龚兰, 朱磊, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蛋和奶中氨基糖苷类药物残留[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(4): 1033-1042.
LUAN FT, GONG L, ZHU L, *et al.* Determination of aminoglycoside residues in eggs and milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Jiangsu J Agric Sci*, 2021, 37(4): 1033-1042.
- [2] 马凯, 蔡芳叶, 黄永桥, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中九种氨基糖苷类药物残留[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(18): 203-208.
MA K, CAI FY, HUANG YQ, *et al.* Detection of nine aminoglycosides residues in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(18): 203-208.
- [3] 刘晓霞. 动物源性食品中氨基糖苷类抗生素残留分析方法研究[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2011.
LIU XX. Study on the determination of aminoglycosides in foods of animal origin [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2011.

- [4] 何强, 张颖, 任秀敏. 氨基糖苷类药物耳毒性机制研究[J]. 河北医科大学学报, 2017, 38(12): 1484–1488.
HE Q, ZHANG Y, REN XM. Study on the mechanism of ototoxicity of aminoglycoside drugs [J]. J Hebei Med Univ, 2017, 38(12): 1484–1488.
- [5] WANG J, MACNEIL JD, KAY JF. Chemical analysis of antibiotic residues in food [M]. Hoboken: John Wiley & Sons, 2011.
- [6] 吴云辉, 严丽娟, 沈鹭英, 等. 混合型离子交换液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 5 种氨基糖苷类抗生素残留[J]. 色谱, 2019, 37(5): 499–504.
WU YH, YAN LJ, SHEN LY, *et al.* Determination of five aminoglycoside residues in honey using mixed-mode ion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(5): 499–504.
- [7] PERKONS I, PUGAJEVA I, BARTKEVICS V. Simultaneous screening and quantification of aminoglycoside antibiotics in honey using mixed-mode liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectroscopy with heated electrospray ionization [J]. J Sep Sci, 2018, 41(16): 3186–3194.
- [8] PERIN M, BAMET LS, DA-COSTA JS, *et al.* Determination of different antimicrobial classes residues in honey using a simple LLE technique and clean-up dispersive SPE couple LC-MS/MS: Application in sample of different regions from Brazil [J]. Food Anal Methods, 2023, 16(6): 1099–1109.
- [9] 魏莉莉, 薛霞, 刘艳明, 等. 亲水作用色谱-串联质谱法测定蜂蜜中链霉素和双氢链霉素残留[J]. 色谱, 2019, 37(7): 735–741.
WEI LL, XUE X, LIU YM, *et al.* Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in honey by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(7): 735–741.
- [10] 刘育彤, 白艳梅, 谢瑞龙, 等. 免疫亲和固相萃取-液相色谱串联质谱测定乳制品中的 11 种氨基糖苷类药物[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 240–246.
LIU YX, BAI YM, XIE RL, *et al.* Determination of 11 aminoglycosides residues in dairy products by liquid chromatography tandem mass spectrometry after immunoaffinity SPE [J]. Chin J Food Hyg, 2022, 34(2): 240–246.
- [11] ARSAND JB, JANK L, MARTINS MT, *et al.* Determination of aminoglycoside residues in milk and muscle based on a simple and fast extraction procedure followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry [J]. Talanta, 2016, 154: 38–45.
- [12] 王敏, 马颖清, 汪弘康, 等. 分子印迹固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 11 种氨基糖苷类抗生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 7969–7976.
WANG M, MA YQ, WANG HK, *et al.* Determination of 11 kinds of aminoglycosides in milk by molecularly imprinted solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(20): 7969–7976.
- [13] 王一冉. 基质固相分散-HILIC-MS/MS 法测定乳制品中 5 种氨基糖苷类抗生素残留[J]. 中国乳品工业, 2021, 49(6): 56–59.
WANG YR. Determination of five aminoglycosides residues in dairy products by MSPD-HILIC-MS/MS [J]. Chin Dairy Ind, 2021, 49(6): 56–59.
- [14] BOGIALLI S, CURINI R, DICORCIA A, *et al.* Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2005, 1067(1-2): 93–100.
- [15] 郭亚娟, 付晓燕, 王武强, 等. 动物源性食品中 10 种氨基糖苷类药物残留量的测定[J]. 现代食品, 2020, (1): 204–208.
GUO YJ, FU XY, WANG WQ, *et al.* Determination of 10 kinds of aminoglycosides residues in animal-derived foods [J]. Mod Food, 2020, (1): 204–208.
- [16] ZHU Z, LIU GH, WANG F, *et al.* Development of a liquid chromatography tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of 15 aminoglycoside residues in porcine tissues [J]. Food Anal Methods, 2016, 9(9): 2587–2599.
- [17] TAO YF, CHEN DM, YU H, *et al.* Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chem, 2012, 135(2): 676–683.
- [18] LEHOTAY SJ, MASTOVSKA K, LIGHTFIELD AR, *et al.* Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2013, 1313: 103–112.
- [19] KAUFNANN A, BUTCHER P, MARDEN K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices [J]. Anal Chim Acta, 2012, 711: 46–53.
- [20] 李佩佩, 何鹏飞, 严忠雍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中 10 种氨基糖苷类药物残留[J]. 广东海洋大学学报, 2023, 43(2): 104–112.
LI PP, HE PF, YAN ZY, *et al.* Simultaneous determination of 10 kinds of aminoglycosides in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2023, 43(2): 104–112.
- [21] GBYLIK M, POSYNIK A, MITROWSKA K, *et al.* Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013, 30(6): 940–948.
- [22] LI ZZ, LIU YY, CHEN XJ, *et al.* Affinity-based analysis methods for the detection of aminoglycoside antibiotic residues in animal-derived foods: A review [J]. Foods, 2023, 12: 1587–1611.
- [23] 魏莉莉, 薛霞, 武传香, 等. 混合型离子交换液相色谱-串联质谱法检测鸡蛋中 10 种氨基糖苷类药物残留[J]. 色谱, 2021, 39(12): 1374–1381.
WEI LL, XUE X, WU CX, *et al.* Determination of ten aminoglycoside residues in eggs by mixed-mode ion exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2021, 39(12): 1374–1381.
- [24] WU Q, SHABBIR MAB, PENG DP, *et al.* Microbiological inhibition-based method for screening and identifying of antibiotic residues in milk, chicken egg and honey [J]. Food Chem, 2021, 363: 130074–130084.
- [25] 徐丽佳, 刘笑, 张秀芹, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测鸡蛋中残留的氨基糖苷类药物[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 301–305.
XU LJ, LIU X, ZHANG XQ, *et al.* Determination of aminoglycoside residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(2): 301–305.

- [26] NOWACKA-KOZAK E, GAJDA A, GBYLIK-SIKORSKA M. Analysis of aminoglycoside antibiotics: A challenge in food control [J]. *Molecules*, 2023, 28(12): 4595–4612.
- [27] 郭文欣, 王国忠, 李朝华, 等. 链霉素在牛奶中残留检测[J]. *中国兽药杂志*, 2001, 35(2): 24–26.
GUO WX, WANG GZ, LI CH, *et al.* Detection of streptomycin residue in milk [J]. *Chin J Vet Drug*, 2001, 35(2): 24–26.
- [28] WU Q, PENG D, LIU QY, *et al.* A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotics residues in milk, chicken egg and honey [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 436–446.
- [29] GAUDIN V, RAULT A, HEDOU C, *et al.* Strategies for the screening of antibiotic residues in eggs: comparison of the validation of classical microbiological method with an immunobiosensor method [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2017, 34(9): 1510–1527.
- [30] 秦燕, 鲍伦军, 朱柳明. 鸡肝中链霉素残留的 2 种免疫分析法[J]. *华南农业大学学报*, 2003, 24(4): 88–91.
QIN Y, BAO LJ, ZHU LM. The determination of streptomycin residue in chicken liver with two immunoassay methods [J]. *J South Chin Agric Univ*, 2003, 24(4): 88–91.
- [31] 何方洋, 万字平, 丁双阳, 等. 链霉素胶体金快速检测试纸条的研制[J]. *中国动物检疫*, 2008, 25(5): 29–31.
HE FY, WAN ZP, DING SY, *et al.* Research and development of immunochromatographic colloid gold strips for rapid detection of streptomycin [J]. *Chin J Anim Quarant*, 2008, 25(5): 29–31.
- [32] 姜莉, 赵守成. 柱后衍生-荧光检测高效液相色谱法快速测定鲜牛奶中链霉素残留量[J]. *分子科学学报*, 2005, 21(1): 20–24.
JIANG L, ZHAO SC. Rapid determination of streptomycin residues in milk with post column derivatization liquid chromatography [J]. *J Mol Sci*, 2005, 21(1): 20–24.
- [33] 薛晓锋, 吴黎明, 陈兰珍, 等. 蜂王浆中链霉素残留的提取、净化及液相色谱测定方法研究[J]. *食品科学*, 2008, 19(21): 487–489.
XUE XF, WU LM, CHEN LZ, *et al.* Study on extraction, purification and chromatographic analysis of streptomycin residue in royal jelly [J]. *Food Sci*, 2008, 19(21): 487–489.
- [34] 杜玥, 杨慧元, 徐伟东. 亲水作用色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的链霉素和双氢链霉素[J]. *中国抗生素杂志*, 2009, 34(11): 669–677.
DU Y, YANG HY, XU WD. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry [J]. *J Chin Antibiot*, 2009, 34(11): 669–677.
- [35] ZHANG XP, WANG JJ, WU QH, *et al.* Determination of kanamycin by high performance liquid chromatography [J]. *Molecules*, 2019, 24: 1902–1925.
- [36] KARGIN ID, SOKOLOVA LS, PIROGOV AV, *et al.* HPLC determination of tetracycline antibiotics in milk with post-column derivatization and fluorescence detection [J]. *Mater*, 2016, 52(14): 1365–1369.
- [37] PIECH T, MAJER-DZIEDZIC B, KOSTRUBA A, *et al.* Thin-layer chromatography-direct bioautography as an alternative method for screening of antibiotic residues in milk: A comparative study [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2016, 39: 292–297.
- [38] 梁飞燕, 曾坚, 韦植元, 等. 食品中氨基糖苷类残留检测技术难点及解决对策研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(8): 3258–3265.
LIANG FY, ZENG J, WEI ZY, *et al.* Research progress on technical difficulties and countermeasures of detection of aminoglycoside residues in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(8): 3258–3265.
- [39] ANASTASSIADES M, LEHOTAY SJ, ŠTAJNBAHE D, *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(2): 412–431.
- [40] 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.
- [41] 王娇, 李庆霞, 韵小娟, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 38 种药物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(8): 2503–2510.
WANG J, LI QX, YUN XJ, *et al.* Determination of 38 kinds of veterinary drugs in eggs by QuEChERS and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(8): 2503–2510.
- [42] 李巧莲, 刘鑫, 刘瀛, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中金刚烷胺和金刚乙胺残留量[J]. *现代食品*, 2022, 28(20): 185–190.
LI QL, LIU X, LIU Y, *et al.* Determination of amantadine and rimantadine residues in eggs by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food*, 2022, 28(20): 185–190.
- [43] MATUSZEWSKI BK, CONSTANZER ML, CHAVEZ-ENG CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3019–3030.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



史沁芳, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: 619250064@qq.com



李珊, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: 1134613595@qq.com