

蛋及蛋制品中多药物残留快速检测技术研究

晏亮, 易路遥*, 章红, 熊雯, 虞雪军

(江西省药品检验检测研究院, 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室,
江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 南昌 330029)

摘要: **目的** 建立蛋及蛋制品中5类49种药物残留的QuEChERS方法并应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)高分辨质谱数据库快速定性筛查确证及参考定量。**方法** 采用5 mL 5%甲酸乙腈溶液提取, C₁₈与PSA吸附剂净化的QuEChERS方法进行前处理, 经Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)色谱柱分离, 以5 mmol/L 乙酸铵溶液(含0.1%甲酸)-乙腈为流动相, 梯度洗脱, Q-TOF-MS电喷雾正、负离子模式检测, 通过Waters Masslynx工作站的Chromalynx XS模块建立多种药物的精确质量数和全扫描碰撞诱导解离碎片离子高分辨质谱数据库。**结果** 49种药物呈现良好的线性关系, 相关系数均大于0.99, 检出限(S/N=3)为0.2~10 μg/kg, 回收率结果在69.4%~121.5%之间。**结论** 该方法简便、快速、灵敏, 适用于蛋及蛋制品中多类药物残留的同时检测。

关键词: 蛋及蛋制品; 多类药物残留; QuEChERS; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法; 高分辨质谱数据库

Studies of rapid determination for multi-residues of drugs in eggs and egg products

YAN Liang, YI Lu-Yao*, ZHANG Hong, XIONG Wen, YU Xue-Jun

(Jiangxi Institute For Drug Control, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Province Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the rapid qualitative screening and reference quantification of 5 kinds of 49 kinds of drug residues in eggs and egg products by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) high resolution mass spectrometry database. **Methods** The sample was extracted by 5 mL 5% formic acid acetonitrile solution, The pretreatment was performed with QuEChERS method purified by C₁₈ and PSA adsorbent, and the sample was separated by Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm) column. Using 5 mmol/L ammonium acetate solution (containing 0.1% formic acid) - acetonitrile as mobile phase, gradient elution, q-tof -MS electrospray positive and negative ion mode detection The accurate mass number and full scanning collision induced dissociation fragment ion high resolution mass spectrometry database was established by Chromalynx XS module of Waters Masslynx workstation. **Results** The correlation coefficients were all greater than 0.99, the detection limits (S/N=3) were

基金项目: 江西省食品药品监督管理局科技计划(2015SP04)、江西省科技计划项目(20142BBF60028)

Fund: Supported by the Jiangxi Food and Drug Administration Science and Technology Plan (2015SP04), and the Jiangxi Province Science and Technology Plan Project (20142BBF60028)

*通讯作者: 易路遥, 高级工程师, 主要研究方向为食品药品化妆品检验。E-mail: yao-161@163.com

*Corresponding author: YI Lu-Yao, Senior Engineer, Jiangxi Institute for Drug Control, 1566 Beijing East Road, Nanchang City, Jiangxi Province, China. E-mail: yao-161@163.com

0.2–10 g/kg, and the recoveries were 69.4%–121.5%. **Conclusion** This method is simple, rapid and sensitive, and is suitable for simultaneous detection of various drug residues in eggs and egg products.

KEY WORDS: eggs and egg products; multi-residues of drugs; QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry; accurate mass database

1 引言

蛋及蛋制品因其具有与人体组织相似的氨基酸组成,易于吸收、方便易得、质优价廉等特性而成为城乡居民餐桌上必不可少的日常食品,《中国居民膳食指南》推荐每周吃蛋 280~350 g^[1],每年我国蛋及蛋制品生产规模超过 2000 亿元,占世界总产量的 43%,居世界首位。因此,蛋及蛋制品是对保障和稳定居民生活具有极其重要意义的大宗农产品^[2]。作为近年中国居民食品营养健康大数据中最受关注的与营养相关的食品类别,人们不但关注蛋及蛋制品的营养和健康功能,且关注其质量安全。如“土鸡蛋”、绿色鸡蛋、有机鸡蛋等备受青睐,然而禽类的饲养环节会给蛋及蛋制品带来多种兽药残留的风险,部分饲养者为了避免禽病,违规加大兽药的用量或延长其使用时间,为减少产业经济损失、降低养殖成本不考虑休药期,为加快禽类生长违规使用雌激素类药物,对人体产生慢性和蓄积毒性、耐药性等危害。2015~2018 年全国监督抽检及评价监测的数据显示喹诺酮类及氯霉素类等项目均存在一定阳性。

本研究通过汇总调研,选择可能用于蛋鸡养殖、有较高检出风险的喹诺酮类、氯霉素类、磺胺类、四环素类、雌激素类等 5 类 49 种药物^[3,4],参考相关文献,采用改进的 QuEChERS 方法为前处理方法^[5-7],通过对提取、盐析、净化等条件进行优化,以方法的线性、检出限、回收率、基质效应等为指标进行方法学评价,结合超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱法联用技术,建立了蛋及蛋制品中 5 类 49 种药物残留的超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS) 一级精确质量数据库与相应全扫描碰撞诱导解离二级谱库方法。实际检测过程中,应用一级数据库对具有明显特征离子的药物进行鉴定,对疑似目标化合物进行二级确证,可以不依赖标准品而快速、准确地对蛋及蛋制品中的 5 类 49 种药物残留进行筛查定性并予以确证。建立了一种较好的蛋及蛋制品中多类药物残留同时检测的方法,以期对我国蛋及蛋制品的健康发展与安全监测起到推动与促进作用。

2 材料与方法

2.1 主要仪器与试剂

Xevo G2 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱仪 (美国 Waters 公司); VORTEX WX 涡旋混合器 (意大利

VELP 公司); ST16R 离心机 (美国 Thermo Fisher 公司); N-EVAP111 氮吹仪 (美国 Orgnomation 公司); KQ500E 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司)。

49 种标准品 (纯度均 > 90%, 德国 Sigma 公司及 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 乙酸铵、甲酸、乙腈、甲醇 (色谱纯, 德国 Sigma 公司); NaCl 为分析纯 (国药集团化学试剂有限公司); 十八烷基键合硅胶吸附剂 (C₁₈)、N-丙基乙二胺吸附剂 (PSA) (日本岛津公司)。

鲜蛋、皮蛋、咸蛋、蛋肠、蛋黄粉、蛋酱、卤蛋共 105 批 (市售)。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

分别精密称取 49 种标准品 10.0 mg, 用乙腈溶解并定容至 100 mL, 制得浓度为 100 μg/mL 的储备液。准确移取 49 种储备液 1.0 mL 于同一 50 mL 量瓶中, 用乙腈定容配成浓度为 2 μg/mL 混合标准液, 于 -20 °C 贮存。

2.2.2 样品前处理

提取: 称取 5 g (精确至 0.01 g) 去壳后经刀式混合研磨仪均质的样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 含 5% 甲酸的乙腈溶液, 陶瓷均质子, 涡旋振荡 60 s, 加入 4 g NaCl, 涡旋 30 s, 8000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清液, 待净化。

净化: 将 1 mL 上清液转移至 2 mL QuEChERS 净化管中 (含 PSA 50 mg、C₁₈ 50 mg), 涡旋 30 s, 10800 r/min 离心 1 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 上机分析。

2.2.3 仪器条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 进样体积 1 μL; 柱温 40 °C; 流动相: A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (含 0.1% 甲酸), B 为乙腈, 流速 0.4 mL/min; 采用梯度洗脱, 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	流动相体积分数/%	
	A	B
0	98	2
1.2	98	2
5	80	20
6	80	20
8	2	98
10	2	98
11	98	2
15	98	2

质谱条件: ESI 离子源; 正、负离子扫描; 扫描范围 100~1000 (m/z); 毛细管电压 3000 V; 干燥气温度 500 °C, 干燥气流速 1000 L/h; 锥孔气流速 50 L/h; 锥孔电压 40 V; 碰撞能 15~40 V; 采集时间 2.0~11.0 min。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

经对 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×50 mm, 1.7 μ m) 与 Agilent XDB C_{18} (4.6 mm×50 mm, 1.7 μ m) 2 种色谱柱的分离情况进行考察, 发现 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱所测化合物 10 min 内完全出峰, 且同分异构体分离较好, 所以本文选择 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱。对于流动相的组成

与比例, 本实验考察水、0.1%甲酸溶液、5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸)作为流动相 A, 甲醇、乙腈作为流动相 B 的分离效果, 结果, 目标物在乙腈中的灵敏度和离子化效应相较甲醇更高; 乙酸铵能有效改善色谱峰峰形; 甲酸能提供磺胺类、喹诺酮类、四环素类质谱离子化所需的 H^+ 离子, 保证化合物在质谱下的离子化, 提高分析响应值, 保证流动相有合适的 pH 值; 氯霉素类及雌激素类在该液相条件下也能达到检测要求。开始通过缓慢增加乙腈相比例的梯度洗脱程序, 将以极性化合物为主的大部分药物分离后, 再快速提高乙腈的比例以洗脱其它药物, 这样可缩短检测时间, 并经过流动相梯度配比使得不同种类的目标物得到充分分离。总离子流图(total ion current, TIC)见图 1、2。

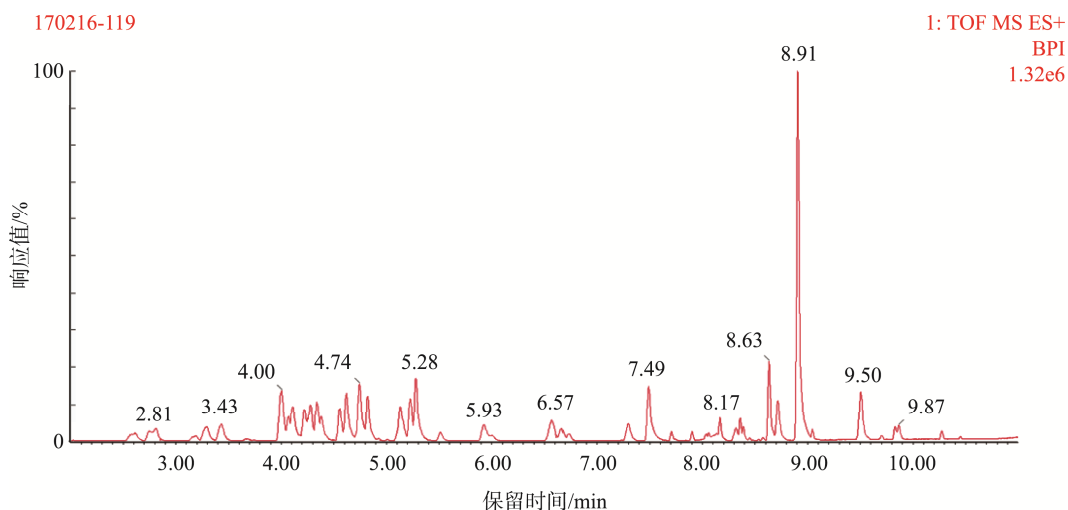


图 1 磺胺类、喹诺酮类、四环素类的总离子流图

Fig.1 Total ion flow diagram of sulfonamides, quinolones and tetracyclines

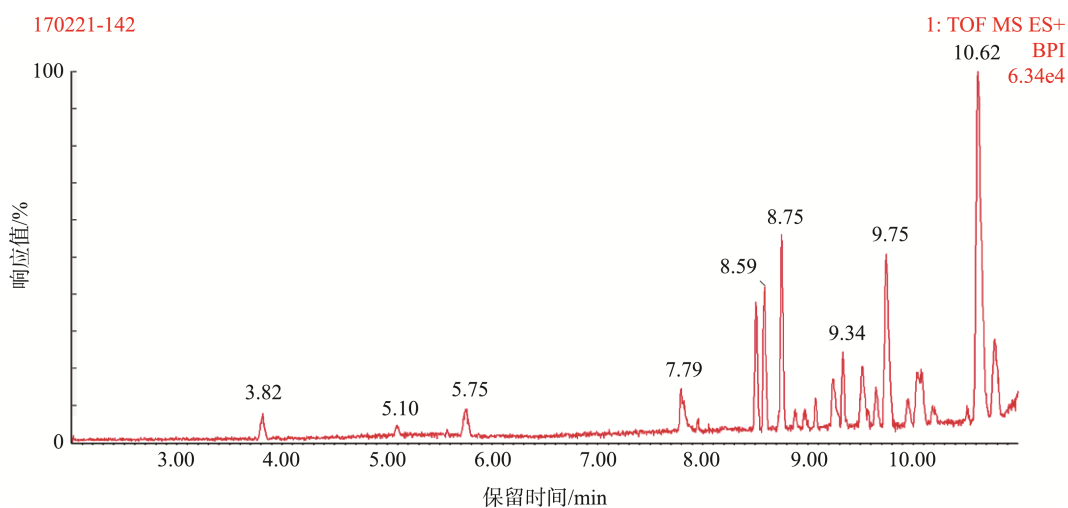


图 2 氯霉素类及雌激素类的总离子流图

Fig.2 Total ion flow of chloramphenicol and estrogen

3.2 数据库的构建及优化

配制 1000 ng/mL 的混合标准溶液, 在优化的色谱-质谱条件下进行一级质谱全扫描, 依据图 1、2 获得目标物的保留时间、母离子, 将目标物精确质量母离子在碰撞能量 15~40 V 下进行测定, 采集目标物的子离子信息, 通过

Masslynx 工作站的 Chromalynx XS 模块输入数据信息, 建立 49 种药物的一级精确质量及二级全扫描碰撞诱导解离高分辨质谱数据库, 如表 2。质量偏差窗口均低于 5×10^{-6} , 经考察日内与日间保留时间最大标准偏差, 保留时间窗口 0.50 min 时均未出现定性偏差。

表 2 49 种药物质谱数据库方法
Table 2 Method of mass spectral database for the 49 drugs

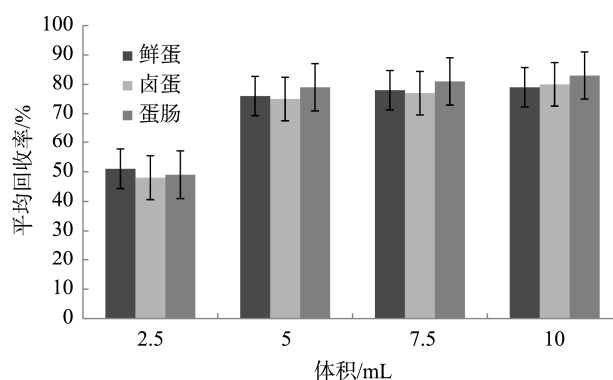
序号	名称	分子式	保留时间/min	母离子理论质量数	母离子实测质量数	质量偏差 ($\times 10^{-6}$)	子离子 1	子离子 2
1	磺胺吡啶	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	3.30	250.0650	250.0639	4.40	156.0108	184.0860
2	磺胺甲氧嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	4.29	281.0708	281.0701	2.49	156.0124	108.0450
3	磺胺甲基嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	3.43	265.0759	265.0750	3.40	108.0453	156.0112
4	磺胺二甲异唑	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	5.52	268.0756	268.0750	2.24	108.0424	156.0115
5	磺胺邻二甲氧嘧啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	5.15	311.0814	311.0806	2.57	156.0114	108.0446
6	磺胺噻唑	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	3.19	256.0214	256.0207	2.73	108.0445	156.0114
7	磺胺二甲异嘧啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	2.81	279.0916	279.0910	2.15	124.0875	186.0346
8	磺胺氯嘧啶	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	4.74	285.0213	285.0209	1.40	156.0097	108.0451
9	磺胺喹恶啉	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	6.76	301.0759	301.0749	3.32	156.0108	108.0441
10	磺胺间二甲氧基嘧啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	6.57	311.0814	311.0804	3.21	156.0772	108.0441
11	磺胺甲噻二唑	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	4.19	271.0323	271.0311	4.43	156.0107	108.0452
12	磺胺对甲基嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	4.09	281.0708	281.0710	0.71	156.0128	108.0443
13	磺胺甲恶唑	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	5.13	254.0599	254.0594	1.97	156.0121	108.0454
14	磺胺二甲嘧啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	4.08	279.0916	279.0911	1.79	124.0873	108.0450
15	磺胺嘧啶	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	2.62	251.0603	251.0596	2.79	156.0108	108.0444
16	甲氧苄啶	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	4.00	291.1457	291.1452	1.72	230.1166	261.0984
17	磺胺间甲氧嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	4.73	281.0708	281.0705	1.07	156.0135	108.4380
18	磺胺苯吡唑	C ₁₅ H ₁₄ O ₂ N ₄ S	6.68	315.0920	315.0912	2.54	158.0724	160.0873
19	沙拉沙星	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	3.58	386.1316	386.1312	1.04	299.0987	342.1405
20	二氟沙星	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	3.67	400.1473	400.1476	-0.75	356.1560	299.0984
21	环丙沙星	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	3.05	332.1410	332.1395	4.52	290.1672	233.1086
22	氧氟沙星	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	2.99	362.1516	362.1525	-2.49	261.1030	318.1608
23	依诺沙星	C ₁₅ H ₁₇ FN ₄ O ₃	2.86	321.1363	321.1362	0.31	303.1248	206.0724
24	司帕沙星	C ₁₉ H ₂₂ F ₂ N ₄ O ₃	3.68	393.1738	393.1739	-0.25	349.1830	292.1253
25	洛美沙星	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	3.19	352.1473	352.1461	3.41	265.1140	308.1558
26	诺氟沙星	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	2.96	320.1410	320.1404	1.87	233.1083	276.1510
27	氟罗沙星	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	2.98	370.1379	370.1382	-0.81	326.1465	269.0903
28	恩诺沙星	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	3.30	360.1723	360.1717	1.67	316.1809	245.1086

续表 2

序号	名称	分子式	保留时间/min	母离子理论质量数	母离子实测质量数	质量偏差($\times 10^{-6}$)	子离子 1	子离子 2
29	奥比沙星	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃	3.40	396.1535	396.1528	1.77	295.1043	352.1625
30	培氟沙星	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃ S	3.02	334.1567	334.1567	0.00	290.1662	233.1087
31	达氟沙星	C ₂₀ H ₂₄ FN ₃ O ₆ S	3.19	358.1567	358.1556	3.07	316.1818	245.1083
32	氟甲喹	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	5.28	262.0879	262.0873	2.29	244.0771	202.0302
33	噁唑酸	C ₁₃ H ₁₁ FNO ₅	4.19	262.0715	262.0707	3.05	244.0601	216.0301
34	四环素	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	3.24	445.1611	445.1609	0.45	410.1233	154.0496
35	甲烯土霉素	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	4.12	443.1454	443.1436	4.06	426.1194	201.0550
36	去甲金霉素	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₂ O ₈	3.60	465.1065	465.1078	2.80	448.0763	430.0671
37	金霉素	C ₂₂ H ₂₃ C ₁₂ N ₂ O ₈	4.04	479.1221	479.1229	1.67	444.0850	154.0471
38	4-差向土霉素	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	3.02	461.1560	461.1578	3.90	426.1169	444.1315
39	美满霉素	C ₂₃ H ₂₇ ClN ₃ O ₇	2.81	458.1927	458.1915	2.62	441.1658	352.1189
40	4-差向四环素	C ₂₂ H ₂₅ ClN ₂ O ₈	4.04	481.1378	481.1358	4.16	446.0840	154.0506
41	4-差向金霉素	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈	3.70	479.1221	479.1235	2.92	444.0856	462.0959
42	强力霉素	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈	4.27	445.1611	445.1601	2.25	428.1334	410.1209
43	土霉素	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	3.02	461.1560	461.1577	3.69	426.1169	444.1315
44	甲矾霉素	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	3.82	353.9970	353.9976	1.69	185.0276	119.0497
45	氯霉素	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	5.75	321.0045	321.0056	3.43	152.0342	121.0286
46	氟苯尼考	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	5.10	355.9926	355.9941	4.21	185.0274	119.0496
47	己烯雌酚	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	7.79	267.1385	267.1372	4.87	237.0915	251.1070
48	双烯雌酚	C ₁₈ H ₁₈ O ₂	8.51	265.1229	265.1218	4.15	249.0914	235.0759
49	己烷雌酚	C ₁₈ H ₂₂ O ₂	8.59	269.1542	269.1531	4.09	119.0494	134.0735

3.3 提取溶剂的选择

对于 5 类 49 种药物残留的检测, 检测标准及文献报道的提取溶剂一般采用甲酸乙腈^[8]、乙腈^[9]、乙酸乙酯^[10]、0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲液(pH 4.0)^[11]等, 由于涉及多类药物, 为保证提取效果, 本实验考察了各溶剂的提取效率, 结果, 磷酸盐缓冲液对多种药物溶解性较差, 乙酸乙酯组织渗透能力较差, 且会萃取出很多的油性物质; 乙腈对 5 类药物均有一定的溶解性, 且沉淀蛋白质能力、对组织渗透力强, 具有共提物低和蛋白沉降作用好等特点, 酸性条件下的乙腈可以进一步改善萃取的效率。当使用 5% 甲酸乙腈时, 49 种药物的平均回收率较好, 各目标物回收率均达 65% 以上。考察取样量和提取溶剂的比例, 比较不同体积(2.5、5、7.5、10 mL)5% 甲酸乙腈时 49 种药物的平均回收率, 结果见图 3, 5、7.5、10 mL 无明显差异, 但随体积增大, 共萃取干扰物增多, 且检出限降低, 最终确定提取溶剂选用 5 mL 含 5% 甲酸乙腈。

图 3 不同体积提取溶剂中的平均回收率($n=3$)Fig. 3 The average recoveries in extraction solvents by different volumes ($n=3$)

3.4 净化条件的选择

目前, 文献及标准采取的净化方式主要是固相萃取、液液萃取、凝胶渗透色谱、QuEChERS 等^[5-14], 固相萃取需要根据药物类别选择不同种类的 SPE 柱及净化与洗脱溶

剂,以保证净化后的回收率,且检验成本较高,操作繁琐。液液萃取提取简单,但基质效应较为严重,难以解决多类药物在两种溶剂中的溶解性差别使部分药物回收较差。凝胶渗透色谱净化效果好,但耗时长、检测效率低。本研究采用 QuEChERS 基质分散固相萃取,选择 NaCl、C₁₈ 和 PSA 为净化试剂,考察其净化效果。以鲜蛋基质中 5 类 49 种药物(具体名称详见表 2)的平均回收率作为评价依据,以 C₁₈、PSA、NaCl 为三因素,根据 QuEChERS 常用净化剂使用量选择三水平,设计 L₉(3³)三因素三水平实验,通过正交找到最优提取剂与净化粉末组合,详情如表 3 所示。

表 3 正交实验设计表
Table 3 Orthogonal test designs table

实验号	A: NaCl/g	B: PSA/mg	C: C ₁₈ /mg	药物平均回收率/%
1	1	25	25	75.7
2	1	50	50	85.3
3	1	100	100	76.8
4	2	25	50	82.5
5	2	50	100	83.4
6	2	100	25	79.1
7	4	25	100	80.2
8	4	50	25	83.0
9	4	100	50	84.1
T ₁	79.267	79.467	79.267	81.067
T ₂	81.667	83.900	83.967	81.133
T ₃	82.433	80.000	80.133	80.767
R	3.166	4.433	4.700	0.766

结果表明,影响回收率的因素主次为 C₁₈>PSA>NaCl,考察 A、B、C 三因素在三个水平上的变化,A₃、B₂、C₂ 时目标化合物平均回收率的均值分别最高为 82.4%、83.9%、84.0%,即最佳提取净化组合为 4 g NaCl、50 mg PSA、50 mg C₁₈(A₃B₂C₂)。

3.5 基质效应的考察

本研究通过对比 49 种目标化合物在鲜蛋、皮蛋、咸蛋、蛋肠、蛋黄粉、蛋酱、卤蛋 7 种不同基质提取液和乙腈中的标准曲线斜率比值来评价基质效应,在鲜蛋基质中 14 种磺胺类为 0.76~0.87,15 种喹诺酮类为 0.71~1.02,10 种四环素类为 0.36~0.71,氯霉素类及雌激素类为 0.94~1.05,即四环素类抑制效应明显,磺胺类、喹诺酮类少量抑制,氯霉素类及雌激素类基质效应不明显。磺胺类、喹诺酮类在另外 6 种蛋制品基质中基质效应为 1.45~2.36,蛋黄粉、蛋酱中均大于 2,增强效应明显;四环素类在 0.55~1.15 之

间,主要表现为较不明显的抑制;氯霉素类及雌激素类在 0.88~1.04 之间,基质效应仍不明显。鲜蛋成分复杂,目标物的共流出组分较多,基质抑制效应较强,而咸蛋、皮蛋等蛋制品通过盐析及重金属变性等加工制作使鲜蛋中的蛋白质变性凝固,成分性状改变较大,导致与鲜蛋有明显差别,有较为明显的基质增强效应。为较好地消除基质影响,本研究采用基质标准溶液用于方法学验证的定量。

3.6 方法学实验

3.6.1 准确度与精密度

分别在 7 种基质阴性样品中添加 49 种混合标准溶液进行 3 个水平(低、中、高)的回收实验以验证方法的准确性,添加水平分别为 20、50、200 μg/kg,每个水平进行 6 次平行实验。7 种基质的回收率结果在 69.4%~121.5%之间,对大多数目标药物有良好的回收率。另外,RSD 结果低于 20%,方法精密度较好。通过在中浓度添加水平下进行了连续 3 d 的方法重复性实验,结果 7 种基质的回收数据 RSD 结果低于 20%,方法的重现性较好。

3.6.2 标准曲线和检出限

使用 7 种基质的空白阴性样品按实验方法制得空白基质溶液,分别精密吸取系列混合标准工作液各 500 μL,加空白基质溶液 500 μL 混匀后上机检测,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制基质标准曲线,计算回归方程和相关系数。以鲜蛋、卤蛋、蛋肠为例,喹诺酮类线性范围为 5.0~500 μg/L,磺胺类、氯霉素类及雌激素类线性范围为 10~500 μg/L,四环素类线性范围为 20~500 μg/L,线性方程及相关系数见表 4。结果表明,49 种药物相关系数均 ≥ 0.99,呈现良好的线性关系。在基质空白样品中添加标准溶液,添加水平为 0.2~20 μg/kg,以 S/N ≥ 3 确定本方法的检出限(limit of detection, LOD),所得 7 种基质的 49 种药物检出限结果中,占 96.5%的 LOD ≤ 5 μg/kg。

3.7 实际样品的应用

应用建立的 QuEChERS 预处理与数据库方法对已使用国家标准^[15-19]测定的 105 批市售蛋及蛋制品进行比对,数据库筛查与原定性结果均一致,未出现假阳性与假阴性,3 批鲜蛋分别检出氟苯尼考、恩诺沙星及氧氟沙星,定量值无显著性差异。见表 5。

4 结论

本文应用 QuEChERS 样品预处理与四极杆飞行时间串联质谱数据库方法,建立了蛋及蛋制品中磺胺类、喹诺酮类、氯霉素类、四环素类、雌激素类 5 类共计 49 种药物的快速筛查与确证技术。本方法快速、简便、准确,并可利用建立的药物质谱信息库快速筛查定性,提高了工作效率,降低了分析成本,对蛋及蛋制品的安全监督与风险监测尤其是应急检测有着重大意义。

表 4 49 种药物在 3 种基质下的线性方程、相关系数(r^2)及检出限
Table 4 Linear equations, correlation coefficients, detection limit of the 49 drugs under 3 substrates

名称	鲜蛋基质			卤蛋基质			蛋肠基质		
	线性方程	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性方程	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性方程	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
磺胺吡啶	$Y=2.14861X-6.18989$	0.9986	1.5	$Y=4.41766X+33.1147$	0.9997	1	$Y=4.86877X+48.1294$	0.9961	1
磺胺甲氧嘧啶	$Y=1.83314X+30.6329$	0.9924	1.5	$Y=3.75767X+18.2208$	0.9909	1	$Y=3.83915X+14.8965$	0.9939	1
磺胺甲基噻唑	$Y=2.28376X-2.10895$	0.9977	1.5	$Y=4.49065X+13.8005$	0.9990	1	$Y=5.06849X+60.2898$	0.9968	1
磺胺二甲异唑	$Y=0.901186X-3.91505$	0.9986	3	$Y=1.8918X-1.09771$	0.9992	2	$Y=1.95753X+21.7348$	0.9996	2
磺胺邻二甲氧嘧啶	$Y=3.87062X+17.2284$	0.9963	1	$Y=8.24166X+22.1604$	0.9953	0.5	$Y=8.38783X+19.7266$	0.9935	0.5
磺胺噻唑	$Y=0.719366X-2.51264$	0.9977	4	$Y=1.80224X-4.70433$	0.9996	2	$Y=1.83198X+17.2202$	0.9982	2
磺胺二甲异噻唑	$Y=2.66402X-13.7325$	0.9980	1	$Y=4.98365X+12.2382$	0.9978	1	$Y=5.26853X+45.8957$	0.9990	0.5
磺胺氯吡啶	$Y=0.420677X+0.987954$	0.9905	5	$Y=0.906367X+28.9426$	0.9977	4	$Y=0.985988X+19.4406$	0.9947	4
磺胺噻恶林	$Y=0.791389X-3.9489$	0.9993	4	$Y=1.86361X-6.61124$	0.9964	2	$Y=1.90062X+11.3285$	0.9969	2
磺胺间二甲氧基噻唑	$Y=3.38589X-13.8458$	0.9988	1	$Y=6.38024X+15.778$	0.9988	0.5	$Y=6.44729X+63.9374$	0.9997	0.5
磺胺甲噻二唑	$Y=0.591914X-2.61498$	0.9960	5	$Y=1.26896X+36.242$	0.9962	3	$Y=1.40892X+12.5827$	0.9987	3
磺胺对甲基噻唑	$Y=1.63347X+25.4266$	0.9966	2	$Y=3.29714X+15.9431$	0.9934	1	$Y=3.63026X+12.9619$	0.9926	1
磺胺甲恶唑	$Y=1.15306X+16.2972$	0.9964	3	$Y=2.62074X+50.2084$	0.9982	1.5	$Y=2.67172X+68.7282$	0.9963	1.5
磺胺二甲噻唑	$Y=2.76232X+34.0539$	0.9956	1	$Y=5.68732X+17.2393$	0.9929	0.5	$Y=6.26368X+16.8911$	0.9947	0.5
磺胺苯吡啶	$Y=1.28396X-1.40963$	0.9989	2.5	$Y=3.20029X+43.4048$	0.9971	1	$Y=3.40599X+43.4523$	0.9971	1
甲氧苄啶	$Y=5.8922X-20.2392$	0.9990	0.5	$Y=11.5482X+88.9261$	0.9999	0.5	$Y=12.2141X+13.3887$	0.9969	0.5
磺胺间甲氧嘧啶	$Y=1.05817X-1.27272$	0.9959	3	$Y=1.99466X+30.766$	0.9980	2	$Y=2.18435X+31.4418$	0.9969	1.5
磺胺苯吡啶	$Y=1.83566X-4.48686$	0.9993	1.5	$Y=3.53231X+23.6403$	0.9998	1	$Y=3.64744X+35.077$	0.9993	1
恶唑酸	$Y=1.7084X-1.59815$	0.9997	0.5	$Y=4.78498X-21.16$	0.9987	0.3	$Y=4.4037X+35.135$	0.9983	0.3
氟甲唑	$Y=4.88704X-20.2765$	0.9990	0.3	$Y=11.7435X+74.1241$	0.9995	0.2	$Y=10.976X+13.7199$	0.9974	0.2
甲磺酸达氟沙星	$Y=4.0928X-16.2345$	0.9987	0.3	$Y=10.1496X-8.22189$	0.9977	0.2	$Y=8.91015X+16.2939$	0.9992	0.2
甲磺酸培氟沙星	$Y=5.90442X-26.3183$	0.9975	0.3	$Y=9.14163X+64.5059$	0.9968	0.2	$Y=8.99364X+96.0965$	0.9962	0.2
奥比沙星	$Y=3.27774X-10.9742$	0.9986	0.3	$Y=8.46428X-7.91957$	0.9990	0.2	$Y=8.41864X+21.6736$	0.9972	0.2

续表 4

名称	鲜蛋基质			卤蛋基质			蛋肠基质		
	线性方程	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性方程	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性方程	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
恩诺沙星	$Y=2.08902X-4.55284$	0.9976	0.5	$Y=12.4006X+14.7712$	0.9994	0.2	$Y=12.0643X+75.7049$	0.9962	0.2
氟罗沙星	$Y=2.92657X-5.4918$	0.9972	0.3	$Y=6.6752X+37.1573$	0.9987	0.3	$Y=6.80373X+56.2778$	0.9970	0.3
诺氟沙星	$Y=5.55993X-6.53053$	0.9994	0.3	$Y=4.80862X+5.76296$	0.9976	0.3	$Y=4.90474X+61.195$	0.9967	0.3
洛美沙星	$Y=3.63825X-4.88108$	0.9983	0.3	$Y=6.80834X-18.7131$	0.9993	0.3	$Y=6.83122X-12.7082$	0.9985	0.3
司帕沙星	$Y=3.80431X-6.76555$	0.9981	0.3	$Y=12.4961X+19.6876$	0.9990	0.2	$Y=11.9876X+12.6784$	0.9974	0.2
依诺沙星	$Y=2.17046X-3.54569$	0.9962	0.5	$Y=7.68344X+50.174$	0.9964	0.2	$Y=8.13057X+13.6676$	0.9966	0.2
氧氟沙星	$Y=4.10909X-11.2019$	0.9981	0.3	$Y=7.824X-3.27046$	0.9995	0.2	$Y=7.87633X+50.0261$	0.9974	0.2
环丙沙星	$Y=1.58476X-4.26009$	0.9977	0.5	$Y=5.4273X-24.3952$	0.9969	0.3	$Y=5.40816X+16.8159$	0.9988	0.3
盐酸二氟沙星	$Y=4.10794X-9.49542$	0.9957	0.3	$Y=9.29576X+14.2296$	0.9994	0.2	$Y=8.85851X+20.4749$	0.9932	0.2
盐酸沙拉沙星	$Y=4.07633X-4.71632$	0.9982	0.3	$Y=4.38375X+3.76594$	0.9996	0.3	$Y=3.9223X+29.2635$	0.9981	0.5
四环素	$Y=0.190829X-0.40747$	0.9945	5	$Y=0.423858X-1.14484$	0.9935	3	$Y=0.434884X-1.69183$	0.9977	3
土霉素	$Y=0.239918X-1.07761$	0.9914	5	$Y=0.451941X-1.01404$	0.9924	3	$Y=0.458678X-1.66894$	0.9965	3
盐酸金霉素	$Y=0.226156X-0.66704$	0.9945	5	$Y=0.416381X-1.14288$	0.9917	3	$Y=0.429995X-1.57482$	0.9994	3
4-差向四环素	$Y=0.201418X-0.78089$	0.9927	5	$Y=0.313941X+24.9186$	0.9973	5	$Y=0.336314X+32.3276$	0.9990	4.5
美满霉素	$Y=0.2248X-0.70292$	0.9906	5	$Y=0.648597X-3.06079$	0.9925	2.5	$Y=0.50512X-11.0111$	0.9934	3
4-差向土霉素	$Y=0.109874X+1.6687$	0.9919	10	$Y=0.0970115X+2.65303$	0.9942	10	$Y=0.0986083X-0.19937$	0.9949	10
4-差向金霉素	$Y=0.108448X-0.39025$	0.9982	10	$Y=0.25931X-1.15215$	0.9939	5	$Y=0.250149X-0.7674$	0.9992	5
盐酸去甲金霉素	$Y=0.125918X-0.31587$	0.9966	10	$Y=0.218662X-0.60236$	0.9961	5	$Y=0.21468X-0.48462$	0.9962	5
盐酸甲烯土霉素	$Y=0.355307X+3.34677$	0.9968	5	$Y=0.540784X-2.50936$	0.9981	3	$Y=0.618713X-2.81978$	0.9957	2
盐酸强力霉素	$Y=0.28652X-1.03647$	0.9916	5	$Y=0.365419X+8.9822$	0.9944	4	$Y=0.471572X-2.27706$	0.9966	3
己烷雌酚	$Y=0.549676X+0.418619$	0.9908	1	$Y=0.510463X+7.8506$	0.9994	1	$Y=0.507687X+10.5551$	0.9983	1
双烯雌酚	$Y=1.12632X-1.59839$	0.9986	0.5	$Y=1.06852X-4.75588$	0.9997	0.5	$Y=1.06294X+0.691592$	1.0000	0.5
己烯雌酚	$Y=0.942797X-4.11619$	0.9974	0.5	$Y=0.901452X-2.88783$	0.9992	0.5	$Y=0.884772X+0.166051$	0.9984	0.5
氟苯尼考	$Y=0.155023X+3.91885$	0.9957	4	$Y=0.152005X+4.51752$	0.9926	4	$Y=0.134442X+9.09153$	0.9909	4
氯霉素	$Y=0.412042X+13.9355$	0.9991	1.5	$Y=0.398961X+10.431$	0.9960	1.5	$Y=0.399264X+15.028$	0.9974	1.5
甲砒霉素	$Y=0.270123X+14.1882$	0.9905	2	$Y=0.262871X+12.4985$	0.9903	2	$Y=0.247153X+15.0037$	0.9916	2.5

表 5 阳性样品中测得含量比较
Table 5 Concentration of drugs in samples

	检出残留兽药	本方法测得结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	原标准测得结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
鲜蛋 1	氟苯尼考	34	29
鲜蛋 2	恩诺沙星	4.7	5.2
鲜蛋 3	氧氟沙星	1.9	2.4

参考文献

- [1] 中国营养学会. 中国居民膳食指南(2016)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
Chinese society of nutrition. Dietary guidelines for Chinese residents (2016) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016.
- [2] 国务院办公厅. 中国食物与营养发展纲要(2014-2020 年)[M]. 北京: 人民出版社, 2014.
General office of the state council. Outline of China's food and nutrition development (2014-2020) [M]. Beijing: People's Publishing House, 2014.
- [3] GB 2749-2015 食品安全国家标准 蛋与蛋制品[S].
GB 2749-2015 National food safety standard-Eggs and egg products [S].
- [4] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量: 农业部 235 号公告[A]. 2002.
Ministry of agriculture of the people's republic of China. Maximum residue limit of veterinary drugs in animal food: Notice no. 235 of ministry of agriculture [A]. 2002.
- [5] Li XJ, Yu H, Peng RF, *et al.* Determination of 19 sulfonamides residues in pork samples by combining QuEChERS with dispersive liquid-liquid microextraction followed by UHPLC-MS/MS [J]. *J Separ Sci*, 2017, 40(6): 1377-1384.
- [6] Kung TA, Tsal CW, Ku BC, *et al.* A generic and rapid strategy for determining trace multi-residues of sulfonamides in aquatic products by using an improved QuEChERS method and liquid chromatography-electrospray quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 175(11): 189-196.
- [7] 朱万燕, 张欣, 杨娟, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法同时测定猪肉中多类兽药残留[J]. 色谱, 2015, 33(9): 1002-1008.
Zhu WY, Zhang X, Yang J, *et al.* Simultaneous determination of veterinary drug residues in pork by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 33(9): 1002-1008.
- [8] 高何刚, 王瑞, 杜赛, 等. 液相色谱-质谱/质谱联用在磺胺和喹诺酮类兽药残留检测中的应用概述[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(12): 1821-1823.
Gao HG, Wang R, Du S, *et al.* Application of liquid chromatography-mass spectrometry combined with mass spectrometry in the detection of sulfanilamide and quinolone veterinary drug residues [J]. *Chin J Health Lab*, 2017, 27(12): 1821-1823.
- [9] 高洁, 陈达伟, 丁宇琦, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定畜产品中残留的 22 种磺胺类药物[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 28-34.
Gao J, Chen DW, Ding YQ, *et al.* Determination of 22 sulfonamides in animal products by SPE - UPLC-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2008, 30(1): 28-34.
- [10] Orlando EA, Costa RAG, Losekann ME, *et al.* UPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1035: 8-15.
- [11] 孟娟, 杨永红. 超高效液相色谱-串连质谱法同时测定牛奶中 7 种四环

素和 14 种喹诺酮类药物残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(6): 546-549.

Meng J, Yang YH. Simultaneous determination of 7 tetracycline and 14 quinolones residues in milk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2012, 24(6): 546-549.

- [12] 李雅丽, 胥传来. 喹诺酮类药物残留检测方法[J]. 食品科学, 2017, 28(11): 628-633.
Li YL, Xu CL. Detection method of quinolone residues [J]. *Food Sci*, 2017, 28(11): 628-633
- [13] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, *et al.* Determination of nitrofurans and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 862: 41-52.
- [14] 韩智, 王会霞, 龚蕾, 等. UPLC-MS/MS 同时测定红糖中 9 种雌性激素[J]. 食品与机械, 2019, 35(5): 96-100.
Han Z, Wang HX, Gong L, *et al.* Simultaneous determination of 9 kinds of estrogen in brown sugar by UPLC-MS/MS [J]. *Food Mach*, 2019, 35(5): 96-100.
- [15] GB/T 22338-2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定[S].
GB/T 22338-2008 Determination of chloramphenicol residues in food of animal origin [S].
- [16] GB/T 22338-2008 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法[S].
GB/T 22338-2008 Determination of sulfanilamide residues in food of animal origin by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [S].
- [17] GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20366-2006 Determination of quinolone residues in animal products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [18] GB/T 20766-2006 牛猪肝肾和肌肉组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20766-2006 Determination of residual amounts of corn gibberellic alcohol, corn gibberellic ketone, diethylstilbestrol, hexane stilbestrol and diethylstilbestrol in liver, kidney and muscle tissues of cattle and pigs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [19] GB/T 21312-2007 动物源性食品中喹诺酮类药物残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S].
GB/T 21312-2007 Method for determination of quinolone drug residues in food of animal origin-Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



晏 亮, 主管药师, 主要研究方向为食品药品化妆品检验。
E-mail: 77416006@qq.com



易路遥, 高级工程师, 主要研究方向为食品药品化妆品检验。
E-mail: yao-161@163.com