

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

秦宇, 葛宇*

(上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 建立固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时检测禽蛋中12种禁用兽药残留的方法。**方法** 样品经1.0%甲酸乙腈提取, 经PRiME HLB固相萃取柱净化, 氮气浓缩至近干后, 残渣用流动相溶解, 目标物用ACQUITY UPLC®HSS T₃色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离, 以乙腈和0.02%甲酸+5 mmol/L乙酸铵水溶液为流动相进行梯度洗脱, 内标法定量。**结果** 12种兽药在0.50~300.00 μg/L范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.99, 检出限为0.05~1.50 μg/kg, 定量限为0.10~3.00 μg/kg。加标回收率为80.02%~114.24%, 相对标准偏差为2.09%~15.03%。**结论** 该方法前处理简单、准确、成本较低, 适用于禽蛋中兽药残留的高通量快速检测分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 固相萃取; 兽药残留; 禽蛋

Simultaneous determination of 12 kinds of banned veterinary drugs residues in poultry eggs by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

QIN Yu, GE Yu*

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 12 kinds of banned veterinary drug residues in poultry eggs by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted by 1.0% formic acid acetonitrile, and purified by the PRIME HLB solid phase extraction column. After concentrated to near dry with nitrogen, the residue was dissolved by mobile phase, and the target was separated with an ACQUITY UPLC®HSS T₃ column (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) using acetonitrile and 0.02% formic acid+5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution as mobile phase for gradient elution, quantified by the internal standard method. **Results** The 12 kinds of veterinary drugs had good linear relationships in the range of 0.50–300.00 μg/L, and the correlation coefficients were greater than 0.99, the limits of detection were 0.05–1.50 μg/kg, the limits of quantification were 0.10–3.00 μg/kg. The adding

基金项目: 上海市质量监督检验技术研究院项目(KY-2020-9-SP、上海市科技创新行动计划技术标准项目(19DZ2202400)

Fund: Supported by Program of Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research (KY-2020-9-SP), and the Technical Standard Project of Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (19DZ2202400)

***通信作者:** 葛宇, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测与评估。E-mail: geyu@sqi.org.cn

***Corresponding author:** GE Yu, Ph.D, Professor, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China. E-mail: geyu@sqi.org.cn

standard recoveries were 80.02%–114.24%, and the relative standard deviations were 2.09%–15.03%. **Conclusion** The method is simple, accurate and low-cost, and is suitable for the rapid determination of veterinary drugs residues in poultry eggs with high throughput.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase extraction; veterinary drugs residues; poultry eggs

0 引言

禽蛋作为大众消费食品,是人体补充蛋白质的优质来源;2020年,全国产蛋鸡的存栏数和禽蛋的产量均达到历史最高水平,禽蛋产量同比增长4.3%^[1]。禽蛋作为人民日常生活的必需品,其产品质量尤为重要。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》《中华人民共和国农业农村部公告 第250号》和《中华人民共和国农业农村部公告 第2292号》中指出:氯霉素、氟甲砜霉素(又称氟苯尼考)、甲硝唑、恩诺沙星(以恩诺沙星和环丙沙星之和计)、洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星及 β -受体兴奋剂类均在禽蛋中不得检出。上海市市场监督管理局2021年第16期省级食品安全抽检信息指出^[2]:禽蛋中氟苯尼考仍然有检出,且检出值为994 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。2022年1月10日,腾讯新闻《从兽药残留超标看蛋鸡养殖场兽药使用情况》^[3]一文中指出:自2020年来,根据29个新闻报道,禽蛋中检出恩诺沙星(以恩诺沙星与环丙沙星之和计)和氟苯尼考均有20多次不合格,甲硝唑和氧氟沙星均有5次以内报道出不合格。国家及地方抽检信息中关于禽蛋的产品危害因素分析揭示:禽蛋作为高消费的食品,其产品质量存在风险,有必要持续不断的建立快速高效的分析方法用以应对风险。据报道,禽蛋中兽药残留问题成为影响中国及国际市场中禽蛋的主要危险因素^[4–7]。

如何高效便捷地检测禽蛋中兽药残留成为近年来学者关注的问题,微生物法^[8–9]、分子印迹膜技术^[10]、双通道荧光检测技术^[11]、加速溶剂萃取技术^[12–13]、改性的三聚氰胺合成材料应用于基质纯化技术^[14]、免疫色谱技术^[15]、“快速、简易、廉价、有效、稳定、安全”的萃取方法(简称QuEChERS萃取技术)^[16–18]等新技术研究均有报道,在仪器设备分析使用方面,液相色谱-串联质谱仪已成为检测分析方法的主要平台^[19–22]。此外,多种兽药残留检测方法的建立也成为一种趋势^[23–27]。多兽药残留一定程度上可以解决高通量的问题,但多残留检测同样面临一些问题,其中之一在于多残留方法建立因需兼顾多种分析物及多种样品,无法对某一种样品或某一类化合物做出特别分析,由此导致某一类或几类化合物的平均回收率较低,对于提高方法对特定化合物或特定基质样品的分析带来挑战。PRiME HLB固相萃取净化技术,PRiME HLB固相萃取柱是一种新型的反相固相萃取吸附剂,与HLB固相萃取柱

相比,省略活化平衡等操作,对磷脂、小分子蛋白及有机酸类等具有良好的吸附作用,但目前应用PRiME HLB固相萃取柱对禽蛋基质中的多兽药残留的检测研究相对较少。

本研究立足禽蛋基质,以金刚烷胺、甲硝唑、氯霉素、甲砜霉素、氟苯尼考、恩诺沙星、环丙沙星、洛美沙星、培氟沙星、氧氟沙星、诺氟沙星及 β -受体兴奋剂类(克伦特罗)为研究对象,建立一种禽蛋中检出率较高或风险意识较高的化合物(12种禁用兽药)的分析方法,为政府或行业内监管禽蛋中禁限用兽药残留提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

金刚烷胺(amantadine)、甲硝唑(metronidazole)、克伦特罗(clenbuterol)、恩诺沙星(enrofloxacin)、环丙沙星(ciprofloxacin)、诺氟沙星(norfloxacin)、氧氟沙星(ofloxacin)、洛美沙星(lomefloxacin)、培氟沙星(pefloxacin)、氯霉素(chloramphenicol)、甲砜霉素(thiamphenicol)、氟苯尼考(flurfenicol)、氯霉素内标(chloramphenicol- d_5)、恩诺沙星内标(enrofloxacin- d_5)、环丙沙星内标(ciprofloxacin- d_8)、诺氟沙星内标(norfloxacin- d_5)、氧氟沙星内标(ofloxacin- d_5)、克伦特罗内标(clenbuterol- d_9)、甲硝唑内标(metronidazole- d_4)标准品(纯度大于98%,德国Dr. Ehrenstorfer公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国Fisher Chemical公司);甲酸(色谱纯,北京迪科马科技有限公司);乙酸铵、无水硫酸钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);Oasis PRiME HLB固相萃取柱、Oasis HLB固相萃取柱(200 mg, 6 mL, 美国Waters公司);实验室用水(超纯水,美国Millipore公司)。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC I-Class/Xevo TQ-XS液相色谱-串联质谱仪(带电喷雾离子源)、ACQUITY UPLC[®]HSS T₃柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国Waters公司);MSZO4S/Z型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);Centrifuge 5804高速离心机(德国Eppendorf公司);D-91126多管涡旋振荡器(德国Heidolph公司);Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司);N1氮吹浓缩仪(上海屹尧仪器科技发展有限公司);SK8210LHC超声波清洗机(上海科颀贸易有限公司);57250-U固相萃取装置(德国默克公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

标准储备液: 准确称取净含量相当于 10.00 mg(精确至 0.1 mg)的标准物质(内外分开配制)置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈溶解并定容, 储备液配制成质量浓度为 1.00 mg/mL, -18 °C 避光保存。

混合标准中间溶液: 分别移取一定量的标准储备液用乙腈配制标准工作溶液, 其中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的质量浓度为 1.00 mg/L, 金刚烷胺、甲硝唑、克伦特罗为 5.00 mg/L, 恩诺沙星、培氟沙星和洛美沙星为 10.00 mg/L, 诺氟沙星和氧氟沙星为 20.00 mg/L, 环丙沙星为 30.00 mg/L。

混合内标标准中间溶液: 分别移取一定量的标准储备液用乙腈配制混合内标标准工作溶液, 其中氯霉素内标的质量浓度为 1.00 mg/L, 金刚烷胺内标、甲硝唑内标、克伦特罗内标为 5.00 mg/L, 恩诺沙星内标为 10.00 mg/L, 诺氟沙星内标为 20.00 mg/L, 环丙沙星内标为 30.00 mg/L。

混合标准工作溶液: 分别移取一定量的标准储备液用乙腈配制标准工作溶液, 其中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的质量浓度为 0.10 mg/L, 金刚烷胺、甲硝唑、克伦特罗为 0.50 mg/L, 恩诺沙星、培氟沙星和洛美沙星为 1.00 mg/L, 诺氟沙星和氧氟沙星为 2.00 mg/L, 环丙沙星为 3.00 mg/L。

混合内标标准工作溶液: 分别移取一定量的标准储备液用乙腈配制混合内标标准工作溶液, 其中氯霉素内标的质量浓度为 0.10 mg/L, 金刚烷胺内标、甲硝唑内标、克伦特罗内标为 0.50 mg/L, 恩诺沙星内标为 1.00 mg/L, 诺氟沙星内标为 2.00 mg/L, 环丙沙星内标为 3.00 mg/L。

1.3.2 样品的采集与制备

禽蛋样品采自上海市农贸市场, 去壳, 置于研磨仪中搅拌均匀, 置于 4 °C 冰箱保存。

1.3.3 样品提取和净化

准确称取均质后的试样 5.00 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中, 加入内标混合工作溶液 50.0 μL; 加入 1.0% 甲酸乙腈 10 mL, 涡旋超声 5 min 后, 加入无水硫酸钠 5 g, 9000 r/min 离心 2 min, 取上清液置于另一离心管中, 剩余残渣再次加入 10 mL 1.0% 甲酸乙腈, 重复上次操作; 合并两次提取液通过 PRiME HLB 固相萃取柱, 保持 1 滴/s 流速, 收集流出液, 45 °C 氮气下吹干, 用流动相定容至 1.0 mL, 过 0.22 μm 氟乙烯滤膜, 供检测。

空白样品检测: 取阴性样品, 按上述前处理过程操作, 得到空白样品溶液。

1.3.4 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC®HSS T₃ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 柱温 30 °C, 样品室温度 15 °C, 进样体积 2 μL; 流动相 A 为 0.02% 甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵水溶液, B 为乙腈; 流速为 0.40 mL/min; 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Programs of gradient elution

时间/min	流动相	
	φ (A)/%	φ (B)/%
0.0	98.0	2.0
0.2	98.0	2.0
2.5	60.0	40.0
2.6	10.0	90.0
4.0	10.0	90.0
4.1	98.0	2.0
5.0	98.0	2.0

1.3.5 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源扫描(electrospray ionization, ESI); 电离方式: 正离子和负离子切换(ESI⁺和 ESI⁻), 扫描方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 脱溶剂温度: 500 °C; 毛细管电压: 3.0 kV; 脱溶剂气流速: 1000 L/h; 锥孔气流速: 150 L/h, 碰撞气流速: 1.5 L/h。

12 种禁用兽药的监测离子对(Q1/Q3)、锥孔电压(cone)、碰撞能量(collision energies, CE)见表 2。

1.3.6 数据处理

本研究采用 Excel 2016 进行提取效率, 净化方式, 回收率、线性关系、相对标准偏差及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 质谱参数的优化

配制质量浓度为 1.00 μg/mL 的 12 种禁用兽药和 7 种同位素内标的混合标准溶液, 采用注射泵直接进样的方式注入质谱仪。采用 ESI⁺和 ESI⁻扫描方式进行一级质谱分析, 确定母离子[M+H]⁺和[M+H]⁻得到其对应的锥孔电压。对母离子进行二级质谱扫描, 优化碰撞能 CE 值, 选取相对丰度较高且稳定的 2 个特征碎片离子为定性、定量离子, 以满足欧盟 657/2002/EC 号指令对于禁用药物液相色谱-质谱方法定性检测的规定, 即满足 1 个母离子、至少 2 个子离子共 4 个识别点数的要求。本实验 12 种禁用兽药和 7 种同位素内标的质谱参数见表 2。

2.1.2 流动相的优化

研究对象涉及 5 类兽药化合物, 化学结构差异较大, 使用等度洗脱较难实现理想的分离效果。本研究采用 ACQUITY UPLC®HSS T₃ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱对目标物进行梯度洗脱, 同时考察了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵、乙腈-0.01% 甲酸+5 mmol/L 乙酸铵、乙腈-0.02% 甲酸+5 mmol/L 乙酸铵、乙腈-0.05% 甲酸+5 mmol/L

乙酸铵作为流动相时, 目标物的分离效果。结果表明, 甲醇-水和乙腈-水作为流动相时, 目标物色谱分离度差, 突出表现在喹诺酮类药物色谱峰峰宽且对称性差; 为改善色谱峰型, 对流动相的水相进行加缓冲盐处理, 色谱峰形一定程度上得到改善, 但依然表现出峰宽较大, 分离度差; 当对缓冲盐相进行加甲酸处理后, 目标化合物的峰形集中变窄, 正模式下的化合物响应提高, 负模式下响应变低。本研究对甲酸的浓度进行优化, 最终选择 0.02% 甲酸水+5 mmol/L 乙酸铵和乙腈作为流动相, 图 1 为此流动相下质谱采集的色谱图。

表 2 12 种禁用兽药残留的质谱参数

Table 2 Mass parameters of 12 kinds of forbidden veterinary drugs

序号	化合物	扫描方式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能/eV
1	金刚烷胺	+	152	135* 93	30	12 23
2	甲硝唑	+	172	128* 82	24	13 20
3	克伦特罗	+	277	203* 128	30	15 15
4	诺氟沙星	+	320	276* 302	50	15 19
5	环丙沙星	+	332	288* 314	35	18 22

表 2(续)

序号	化合物	扫描方式	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能/eV
6	洛美沙星	+	352	265* 308	40	22 12
7	恩诺沙星	+	360	312* 342	40	18 18
8	氧氟沙星	+	362	318* 261	25	20 30
9	培氟沙星	+	334	290* 312	42	19 19
10	氯霉素	-	321	156* 257	20	18 10
11	甲砒霉素	-	326	189* 290	42	22 12
12	氟甲砒霉素	-	356	336* 185	36	10 18
13	甲硝唑-d ₄	+	176	128*	5	18
14	金刚烷胺-d ₆	+	158	141*	35	17
15	克伦特罗-d ₉	+	286	204*	20	18
16	诺氟沙星-d ₅	+	325	307*	40	30
17	环丙沙星-d ₈	+	340	322*	40	20
18	恩诺沙星-d ₅	+	365	321*	40	20
19	氯霉素-d ₅	-	326	157*	42	18

注: *为定量离子。

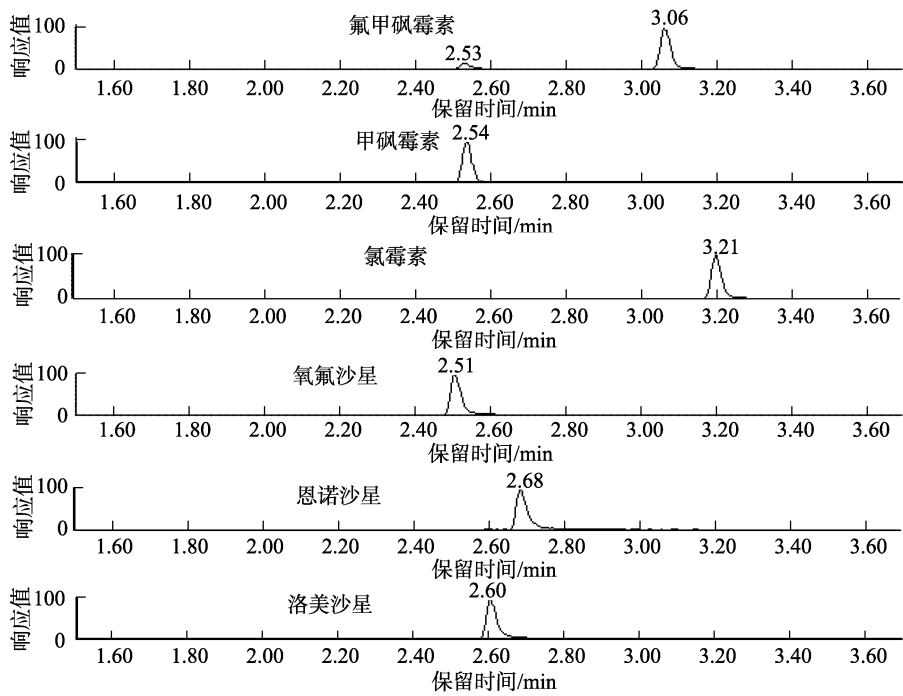


图 1 12 种禁用兽药的多反应监测模式下的色谱图

Fig.1 Chromatograms of 12 kinds of forbidden veterinary drugs in MRM mode

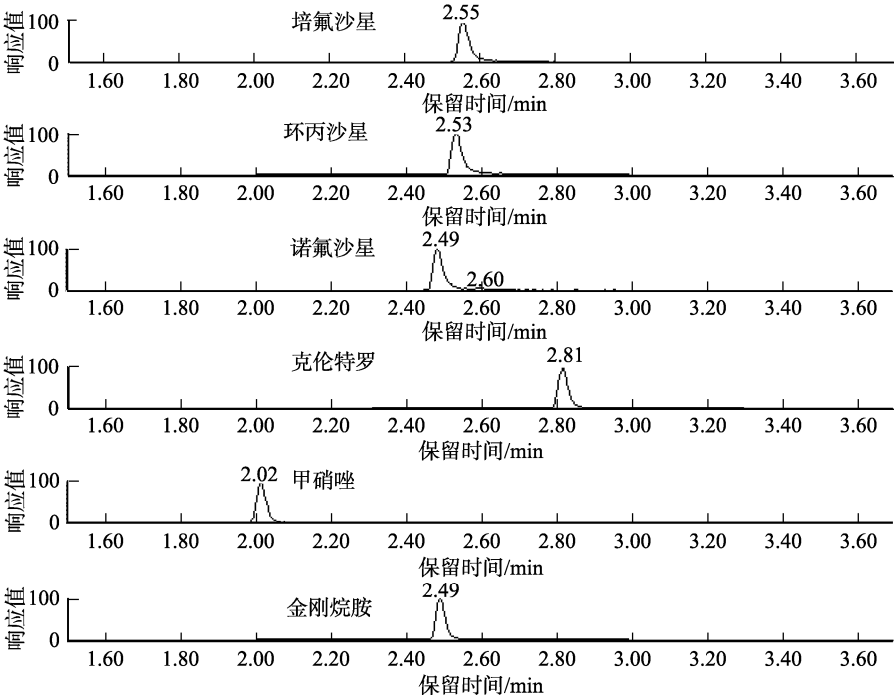


图 1(续) 12 种禁用兽药的多反应监测模式下的色谱图
Fig.1 Chromatograms of 12 kinds of forbidden veterinary drugs in MRM mode

2.2 前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂的优化

方从容等^[27]用乙腈-水溶液(含 0.10 mol/L 乙二胺四乙酸溶液)提取溶剂建立了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中 11 类 125 种兽药残留分析。覃玲等^[28]用 5%甲酸乙腈为提取溶剂建立了分散固相萃取结合液相色谱-串联质谱法同时测定 13 类 42 种兽药残留的方法。由此可见乙腈多用于残留分析动物源性食品中待测物的提取, 因为其具有极性大、穿透力强和沉淀蛋白的特点。甲酸的加入可以使生物体内活性酶失活或者降低其活性, 同时使其目标物呈离子状态进而提高目标物从生物体内的溶出率, 可以有效提高效率; 本研究以鸡蛋为研究载体, 针对 5 类 12 种兽药化合物的性质, 采用空白基质加标 5.0 μg/kg 的 12 种兽药混合标准溶液, 以外标法考察了乙腈和甲酸乙腈对目标物提取效果的影响, 同时考虑到过高浓度的甲酸可能会造成部分化合物的降解^[29], 本研究考察甲酸浓度范围为 0.5%~5.0%。

实验结果如表 3 所示; 本研究为分析提取效率定义相对提取率为研究参数, 相对提取率以甲酸乙腈提取后响应值与乙腈提取响应值的比值计, 数值大于 1 则提高目标物的提取效率, 反之抑制。研究表明: 4 种甲酸比例的甲酸乙腈对金刚烷胺的平均相对提取率为 1.81、甲硝唑为 0.91、克伦特罗为 1.56、诺氟沙星为 4.50、环丙沙星为 2.05、培氟沙星为 0.69、洛美沙星为 0.69、恩诺沙星为 1.35、氧氟沙星为 1.59、氯霉素为 1.07、甲砒霉素为 1.18、氟甲砒霉素为 1.20。从数据可以看出, 甲酸会抑制甲硝唑、培氟沙

星和洛美沙星的提取, 提高其他 9 种兽药的提取效率(其中对氯霉素类无明显影响)。4 种甲酸浓度对目标物的平均相对提取率: 0.5%甲酸乙腈为 1.53, 1.0%为 1.92, 2.0%为 1.59 和 5.0%为 1.16; 由此可得, 随甲酸浓度的增加, 相对提取率呈现先增后减的趋势且 1.0%甲酸乙腈对 12 种目标物的平均提取效率最高。从化合物角度分析, 金刚烷胺、诺氟沙星、环丙沙星和氟甲砒霉素等 5 种回收率最优的甲酸浓度为 1.0%。综合以上分析, 本研究选择 1.0%甲酸乙腈作为最终提取溶剂。

2.2.2 超声时间的影响

超声波具有极端的物理特性, 能促使基质组织破壁变形; 实验比较了超声提取 5、10 和 20 min 对 12 种禁用兽药提取效率的影响。结果如表 4 所示: 结果表明超声时间对目标物的影响差异不大, 超声 5 min 即可获得较好回收率, 本研究选择超声时间为 5 min。

2.2.3 净化方式的选择

关于禽蛋中兽药残留的测定方法中的净化方式多样, 主要集中在正己烷冷冻除脂^[30], QuEChERS 法^[31], 分散固相萃取法^[28]等。本研究比较了鸡蛋样品经甲酸乙腈提取后, 进行 5 种净化方式进行处理: 正己烷(hexyl hydride, HEX), HLB 固相萃取法(以下简称 HLB)、正己烷和 HLB 固相萃取组合法(以下简称 HEX+HLB)、PRiME HLB 固相萃取法(以下简称 PRiME HLB)、正己烷和 PRiME HLB 固相萃取组合法(以下简称 HEX+PRiME HLB), 加标含量为 5 倍定量限水平, 分别计算其回收率, 结果如表 5 所示。从实验角度

表 3 鸡蛋中 12 种禁用兽药在 5 种不同提取溶剂下的相对提取率						
Table 3 Relative extraction rates of 12 kinds of forbidden veterinary drugs in egg with 5 kinds of different extraction solvents						
项目名称	不同提取溶剂的相对提取率					
	乙腈	0.5%甲酸乙腈	1.0%甲酸乙腈	2.0%甲酸乙腈	5.0%甲酸乙腈	4 种甲酸乙腈的平均值
金刚烷胺	1.00	2.28	2.56	1.33	1.06	1.81
甲硝唑	1.00	1.09	1.00	0.83	0.73	0.91
克伦特罗	1.00	1.21	2.00	2.04	0.99	1.56
诺氟沙星	1.00	4.51	5.70	4.76	3.01	4.50
环丙沙星	1.00	1.42	2.79	2.37	1.63	2.05
培氟沙星	1.00	0.65	0.75	0.67	0.68	0.69
洛美沙星	1.00	0.64	0.75	0.67	0.68	0.69
恩诺沙星	1.00	1.49	1.45	1.40	1.08	1.35
氧氟沙星	1.00	1.72	1.63	1.65	1.37	1.59
氯霉素	1.00	0.94	1.14	1.11	1.09	1.07
甲砒霉素	1.00	1.45	1.35	1.17	0.73	1.18
氟甲砒霉素	1.00	0.98	1.95	1.00	0.87	1.20
平均值	1.00	1.53	1.92	1.59	1.16	

表 4 超声时间对 12 种禁用兽药提取效率的影响			
Table 4 Effects of ultrasonic time on extraction efficiencies of 12 kinds of forbidden veterinary drugs			
化合物名称	12 种兽药的回收率/%		
	5 min	10 min	20 min
金刚烷胺	90.17	92.38	95.78
甲硝唑	95.21	93.51	95.74
克伦特罗	94.63	90.49	93.81
诺氟沙星	89.48	92.77	90.87
环丙沙星	90.82	87.92	92.78

表 4(续)			
化合物名称	12 种兽药的回收率/%		
	5 min	10 min	20 min
培氟沙星	93.13	90.83	92.37
洛美沙星	101.21	108.18	107.42
恩诺沙星	106.17	101.47	103.63
氧氟沙星	90.77	91.47	92.11
氯霉素	98.43	96.73	97.91
甲砒霉素	95.81	94.91	90.49
氟甲砒霉素	94.68	90.90	91.68

表 5 5 种净化方式对 12 种兽药的回收率的影响(n=3)					
Table 5 Effects of 5 kinds of purification methods on recovery rates of 12 kinds of veterinary drugs (n=3)					
项目名称	不同净化方式下的回收率 (回收率±相对标准偏差)%				
	HLB	HEX+HLB	PRiME HLB	HEX	HEX+PRiME HLB
金刚烷胺	65.69±3.37	52.42±2.33	76.21±4.05	60.41±4.88	66.02±5.14
甲硝唑	65.41±6.11	52.21±3.97	69.68±2.15	49.29±5.38	47.11±3.17
克伦特罗	64.92±2.32	97.79±5.44	94.77±4.31	71.76±4.87	85.17±5.31
诺氟沙星	79.87±7.04	75.32±5.05	94.57±8.03	98.07±10.22	79.66±4.29
环丙沙星	68.62±6.23	71.43±5.11	100.32±7.05	119.28±10.18	85.04±8.31
培氟沙星	77.58±3.31	59.79±2.05	91.69±4.22	86.76±4.39	67.91±5.09
洛美沙星	63.71±8.15	37.88±5.06	73.43±5.86	36.82±5.14	27.39±4.19
恩诺沙星	74.70±6.16	44.11±5.97	70.28±6.79	47.02±4.09	30.88±3.87
氧氟沙星	68.12±7.77	40.61±2.04	74.11±5.93	48.03±4.64	35.48±2.99
氯霉素	118.79±8.29	55.09±3.99	84.68±6.31	57.17±4.96	131.49±9.98
甲砒霉素	121.72±6.33	82.77±6.11	120.41±7.97	133.16±11.32	124.2±12.31
氟甲砒霉素	111.77±10.97	125.18±7.76	94.08±6.17	137.02±10.87	125.66±11.87
平均值	81.74	66.22	87.02	78.73	75.50

观察净化效果可以看出待上机的定容液澄清程度: HEX+HLB>HLB>HEX+PRiME HLB>PRiME HLB>HEX, 其中经 HEX 净化后, 样品溶液同时出现浑浊状态; 从实验结果的平均回收率来看: PRiME HLB (87.02%)>HLB (81.74%)>HEX (78.73%)>HEX+PRiME HLB (75.50%)>HEX+HLB (66.22%), HEX 净化后的回收率在 36.82%~137.02%之间, PRiME HLB 为 69.68%~120.41%, HLB 为 63.71%~121.72%, HEX+PRiME HLB 为 27.39%~131.49%, HEX+HLB 为 37.88%~125.18%。从回收率的结果可以分析得出, HEX 的加入影响了固相萃取的效果, 同时单纯 HEX 净化得不到满意的结果, 比较了 HLB 和 PRiME HLB 的净化发现, PRiME HLB 的净化效果优于 HLB, 故本研究选择 PRiME HLB 固相萃取柱进行净化, 结果与郭德华等^[32]建立的液相色谱-四极杆飞行时间质谱法测定禽蛋及蛋制品中氟虫腈及其代谢物的快速筛查方法所用的净化方式相同。

2.3 方法学评价

2.3.1 线性范围与检出限

按 1.3 节方法配制 6 个水平的混合标准溶液, 在选定的色谱条件和质谱参数下进行检测。以目标化合物的定量离子的峰面积(*Y*)为纵坐标、质量浓度(*X*, μg/L)为横坐标绘制工作曲线, 12 种兽药 的峰面积与质量浓度在各自的线性范围内的线性关系良好, 相关系数 *r* 为 0.992~0.998。以定量离子信噪比 *S/N*=3 计算样品的检出限(limits of detection, LOD), *S/N*=10 计算样品的定量限(limits of detection quantitation, LOQ), 结果见表 6。12 种兽药的检出限在 0.05~1.50 μg/kg 之间, 定量限在 0.10~3.00 μg/kg 之间。3 种氯霉素类化合物的定量限达到 0.10 μg/kg, 与 GB/T 22338—2008《动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定》

第二法中规定的测定低限相同; 金刚烷胺、甲硝唑和克伦特罗为 0.50 μg/kg, 分别与 GB 31660.5—2019《动物性食品中金刚烷胺残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB/T 21318—2007《动物源食品中硝基咪唑残留量检验方法》和 GB/T 22286—2008《动物源性食品中多种 β-受体激动剂残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》相同; 洛美沙星、恩诺沙星和培氟沙星为 1.00 μg/kg, 诺氟沙星和氧氟沙星为 2.00 μg/kg, 环丙沙星为 3.00 μg/kg, 小于 GB/T 21312—2007《动物源性食品中 14 种喹诺酮类药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》中的定量限。

2.3.2 回收率与精密度

12 种兽药的加标回收实验按 1.3 节样品前处理方法, 向空白基质中分别加入低、中、高 3 个水平的混合标准溶液进行加标回收率的测定(*n*=6)。根据添加样品于标准品中各种组分的峰面积计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)均列于表 7 中。结果表明, 禽蛋中 12 种兽药平均加标回收率为 80.02%~114.24%, RSDs 为 2.09%~15.03%, 符合多残留样品分析的要求。

2.4 实际样品检测

应用所建立的方法对上海市农贸市场的禽蛋样品进行了 200 批次分析检测, 其中鸡蛋 100 批次, 鸭蛋 50 批次和鹌鹑蛋 50 批次。检测结果显示: 6 批次样品检出阳性化合物, 其中鸡蛋中共计检出 2 批次, 检出氟甲砜霉素 1 批次, 检出值依次为 0.98 μg/kg; 氧氟沙星 1 批次, 检出值为 10.22 μg/kg。鸭蛋中检出 1 批次甲硝唑, 检出值为 5.19 μg/kg。鹌鹑蛋检出 3 批次, 其中检出氟甲砜霉素 1 批次, 检出值为 3.19 μg/kg, 检出 1 批次金刚烷胺, 检出值 50.20 μg/kg, 检出甲硝唑 1 批次, 检出值为 4.98 μg/kg。总体合格率为 97.00%。

表 6 禽蛋中 12 种禁用兽药的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 6 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (*r*²), limits of detection and limits of quantitation of 12 kinds of veterinary drugs in poultry egg

化合物名称	线性范围/(μg/L)	线性方程(<i>r</i> ²)	LODss/(μg/kg)	LOQs/(μg/kg)
金刚烷胺	2.50~50.00	<i>Y</i> =0.624367 <i>X</i> +0.371743 (0.995)	0.25	0.50
甲硝唑	2.50~50.00	<i>Y</i> =0.724278 <i>X</i> +0.0911221 (0.997)	0.25	0.50
克伦特罗	2.50~50.00	<i>Y</i> =0.380848 <i>X</i> +0.0349035 (0.992)	0.25	0.50
诺氟沙星	10.00~200.00	<i>Y</i> =2.74317 <i>X</i> +2.08833 (0.995)	1.00	2.00
环丙沙星	15.00~300.00	<i>Y</i> =1.7005 <i>X</i> +0.940587 (0.995)	1.50	3.00
洛美沙星	5.00~100.00	<i>Y</i> =19432.5 <i>X</i> +363.948 (0.996)	0.50	1.00
恩诺沙星	5.00~100.00	<i>Y</i> =0.378602 <i>X</i> -0.009211 (0.998)	0.50	1.00
氧氟沙星	10.00~200.00	<i>Y</i> =20599.5 <i>X</i> -2279.79 (0.997)	1.00	2.00
培氟沙星	5.00~100.00	<i>Y</i> =22548.9 <i>X</i> -1561.29 (0.998)	0.50	1.00
氯霉素	0.50~10.00	<i>Y</i> =0.294792 <i>X</i> +0.0349035 (0.992)	0.05	0.10
甲砜霉素	0.50~10.00	<i>Y</i> =362.779 <i>X</i> +92.1132 (0.995)	0.05	0.10
氟甲砜霉素	0.50~10.00	<i>Y</i> =1463.5 <i>X</i> +428.881 (0.995)	0.05	0.10

表 7 禽蛋中 12 种兽药的平均加标回收率及 RSDs(n=6)
Table 7 Average recoveries and RSDs of 12 kinds of veterinary drugs in poultry eggs (n=6)

化合物名称	样品名称	1 倍定量限		2 倍定量限		5 倍定量限	
		回收率 /%	RSDs /%	回收率 /%	RSDs /%	回收率 /%	RSDs /%
金刚烷胺	鸡蛋	104.42	6.14	103.37	4.79	101.28	3.93
	鸭蛋	98.19	3.26	99.21	4.78	104.08	3.13
	鹌鹑蛋	102.52	4.53	104.10	3.91	101.87	2.09
甲硝唑	鸡蛋	114.24	8.56	105.57	4.51	101.58	4.15
	鸭蛋	104.08	5.85	99.08	4.98	95.86	5.01
	鹌鹑蛋	101.23	6.32	102.07	5.34	93.82	3.98
克伦特罗	鸡蛋	107.02	4.28	101.92	5.75	105.95	5.09
	鸭蛋	104.21	2.15	109.46	5.15	96.44	4.65
	鹌鹑蛋	97.37	3.26	103.58	4.76	98.54	4.19
诺氟沙星	鸡蛋	86.30	9.05	92.20	14.3	89.72	8.35
	鸭蛋	97.22	8.54	90.58	5.98	90.61	7.11
	鹌鹑蛋	90.66	6.78	92.07	6.15	94.08	6.54
环丙沙星	鸡蛋	83.30	7.09	107.14	12.22	86.87	7.93
	鸭蛋	79.98	6.15	89.20	9.11	95.08	6.31
	鹌鹑蛋	87.21	7.16	90.18	9.01	93.21	7.19
洛美沙星	鸡蛋	92.92	10.22	87.07	7.12	79.86	8.17
	鸭蛋	90.33	10.13	92.42	5.98	90.08	7.16
	鹌鹑蛋	91.71	8.15	90.07	6.11	93.22	6.19
恩诺沙星	鸡蛋	103.32	7.72	106.51	9.09	111.69	7.91
	鸭蛋	92.28	6.92	101.43	5.68	94.13	3.98
	鹌鹑蛋	90.32	5.67	94.22	5.22	97.22	5.11
氧氟沙星	鸡蛋	89.89	8.69	84.77	8.71	80.68	8.12
	鸭蛋	90.27	7.11	92.22	4.28	90.94	7.91
	鹌鹑蛋	91.29	6.27	90.18	5.18	87.22	6.11
培氟沙星	鸡蛋	104.77	15.03	98.08	4.29	82.41	8.41
	鸭蛋	92.33	7.11	91.17	5.09	80.02	5.98
	鹌鹑蛋	87.38	9.16	90.19	5.11	86.02	5.11
氯霉素	鸡蛋	102.20	8.31	95.23	7.52	98.21	3.89
	鸭蛋	101.21	4.11	94.16	5.09	90.28	4.07
	鹌鹑蛋	98.27	4.09	95.89	6.01	92.88	3.01
甲矾霉素	鸡蛋	90.88	9.21	87.48	9.09	109.92	9.67
	鸭蛋	87.31	7.25	89.32	8.18	102.31	5.86
	鹌鹑蛋	88.03	6.08	88.28	7.08	103.22	6.13
氟甲矾霉素	鸡蛋	109.01	8.51	108.37	3.95	101.41	9.11
	鸭蛋	101.18	6.22	87.32	3.44	94.79	6.28
	鹌鹑蛋	86.26	8.22	94.92	4.11	92.73	5.18

3 结 论

本研究优化了 12 种禁用兽药的质谱和色谱条件、探索了样品提取及净化方式, 得出最优方法参数。建立了以 1.0%甲酸乙腈提取, Oasis PRiME HLB 净化, 采用内标标准曲线法定量, 超高效液相色谱-串联质谱法正负同时扫描测定禽蛋中 12 种兽药残留的分析方法。并将此方法用于市售禽蛋进行检测应用, 从检出化合物的类型来看, 禽蛋中检出禁用物质种类较为分散, 单一类别的方法检测的成本较高, 本研究建立的方法可以对多种检出较高禁用化合物进行同时检测分析, 降低了检测处理时间、节约成本、提升工作效率, 为禽蛋中多兽药残留分析检测标准的建立提供技术支持。

参考文献

[1] 农业农村部畜牧兽医局, 全国畜牧总站. 2020 年蛋鸡产业发展形势及 2021 年展望[J]. 中国畜牧业, 2021, (1): 42-43.
National Animal Husbandry General Station of Animal Husbandry and Veterinary Bureau of Ministry of Agriculture and Rural Areas. Development situation of layer industry in 2020 and prospect in 2021 [J]. China Animal Husb, 2021, (1): 42-43.

[2] <http://scjgj.sh.gov.cn/922/20210428/2c9bf2f67915dec40179175330a42e1b.html> [Z].

[3] <https://xw.qq.com/cmsid/20220110A06E6K00> [Z].

[4] JI X, XU Y, WANG J, *et al.* Multiresidue 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] TEGLIA CM, GUIEZ M, CULZONI MJ, *et al.* Determination of residual enrofloxacin in eggs due to long term administration to laying hens. Analysis of the consumer exposure assessment to egg derivatives [J]. Food Chem, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129279

[6] BAHRAMIANFARD H, DERA KHSHANDEH A, NAZIRI Z, *et al.* Prevalence, virulence factor and antimicrobial resistance analysis of *Salmonella enteritidis* from poultry and egg samples in Iran [J]. BMC Vet Res, 2021, 17(1): 196.

[7] GBYLIK-SIKORSKA M, LEBKOWSKA-WIERUSZEWSKA B, GAJDA A, *et al.* Transfer of enrofloxacin, ciprofloxacin, and lincomycin into eggshells and residue depletion in egg components after multiple oral administration to laying hens [J]. Poult Sci, 2021, 100(9): 101341.

[8] WU Q, SHABBIR MAB, PENG D, *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.

[9] WU Q, PENG D, LIU Q, *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.

[10] YUAN Y, YUAN X, HANG Q, *et al.* Dummy molecularly imprinted membranes based on an eco-friendly synthesis approach for recognition and extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin in egg samples [J]. J Chromatogr A, 2021, 1653: 462411.

[11] GUO Y, HE Z, CHEN J, *et al.* Simultaneous determination of tetracyclines and fluoroquinolones in poultry eggs by uple integrated with dual-channel-fluorescence detection method [J]. Molecules, 2021, 26(18):

- 5684.
- [12] WANG B, XIE X, ZHAO X, *et al.* Development of an accelerated solvent extraction-ultra-performance liquid chromatography-fluorescence detection method for quantitative analysis of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry eggs [J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1830.
- [13] WANG B, PANG M, ZHAO X, *et al.* Development and comparison of liquid-liquid extraction and accelerated solvent extraction methods for quantitative analysis of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry eggs [J]. *J Mass Spectrom*, 2019, 54(6): 488–494.
- [14] XU X, ZHAO W, JI B, *et al.* Application of silanized melamine sponges in matrix purification for rapid multi-residue analysis of veterinary drugs in eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2022, 369: 130894.
- [15] WANG Z, HU S, BAO H, *et al.* Immunochromatographic assay based on time-resolved fluorescent nanobeads for the rapid detection of sulfamethazine in egg, honey, and pork [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 101(2): 684–692.
- [16] JI B, ZHAO W, XU X, *et al.* Development of a modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method based on melamine sponge for multi-residue analysis of veterinary drugs in milks by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1651: 462333.
- [17] HAN K, HUA J, ZHANG Q, *et al.* Multi-residue analysis of fipronil and its metabolites in eggs by SinChERS-based UHPLC-MS/MS [J]. *Food Sci Anim Res*, 2021, 41(1): 59–70.
- [18] XU X, XU XY, HAN M, *et al.* Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chem*, 2019, 276: 419–426.
- [19] LEHOTAY SJ. Comparison of analyte identification criteria and other aspects in triple quadrupole tandem mass spectrometry: Case study using UHPLC-MS/MS for regulatory analysis of veterinary drug residues in liquid and powdered eggs [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021. DOI: 10.1007/s00216-021-03380-x
- [20] CHOI JM, ZHENG W, ABDELATY AM, *et al.* Residue analysis of tebufenozide and indoxacarb in chicken muscle, milk, egg and aquatic animal products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2019, 33(7): e4522.
- [21] GBYLIK-SIKORSKA M, GAJDA A, NOWACKA-KOZAK E, *et al.* Multi-class procedure for analysis of 50 antibacterial compounds in eggshells using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2021, 26(5): 1373.
- [22] 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.
- [23] DESMARCHELIER A, BESSAIRE T, SAVOY MC, *et al.* Screening of 154 veterinary drug residues in foods of animal origin using LC-MS/MS: First action 2020.04 [J]. *J AOAC Int*, 2021, 104(3): 650–681.
- [24] 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.
- [25] WANG K, LIN K, HUANG X, *et al.* A simple and fast extraction method for the determination of multiclass antibiotics in eggs using LC-MS/MS [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 65(24): 5064–5073.
- [26] HU M, BEN Y, WONG MH, *et al.* Trace analysis of multiclass antibiotics in food products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Method development [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(5): 1656–1666.
- [27] 方从容, 高洁, 王雨昕, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中 125 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(11): 1119–1131.
- FANG CR, GAO J, WANG YX, *et al.* QuEChERS-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of 125 veterinary drug residues in egg [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(11): 1119–1131.
- [28] 覃玲, 董亚蕾, 王钢力, 等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定常见动物源性食品中 42 种兽药残留[J]. 色谱, 2018, 36(9): 880–888.
- QIN L, DONG YL, WANG GL, *et al.* Determination of 42 veterinary drug residues in common animal derived foods by dispersive solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(9): 880–888.
- [29] 张科明, 梁飞燕, 邓鸣, 等. QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中多类兽药残留[J]. 色谱, 2012, 34(9): 860–867.
- ZHANG KM, LIANG FY, DENG M, *et al.* Rapid determination of various veterinary drug residues in pork by QuEChERS combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 34(9): 860–867.
- [30] 贺利民, 黄显会, 方炳虎, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉组织和禽蛋中残留的 11 种甾体激素类药物[J]. 色谱, 2008, 26(6): 714–719.
- HE LM, HUANG XH, FANG BH, *et al.* Determination of 11 steroid hormones residues in animal muscle tissue and eggs by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2008, 26(6): 714–719.
- [31] 邓武剑, 吴卫东, 赵旭, 等. 气相色谱-三重四极杆质谱法快速检测禽蛋中氟虫腈及其代谢物[J]. 色谱, 2018, 36(6): 547–551.
- DENG WJ, WU WD, ZHAO X, *et al.* Rapid determination of fipronil and its metabolites in eggs by gas chromatography triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(6): 547–551.
- [32] 郭德华, 时逸吟, 李优, 等. 固相萃取-液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速筛查禽蛋及蛋制品中氟虫腈及其代谢物[J]. 色谱, 2017, 35(12): 1212–1223.
- GUO DH, SHI YY, LI Y, *et al.* Rapid screening of fipronil and its metabolites in poultry eggs and egg products by solid phase extraction liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(12): 1212–1223.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



秦宇, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。
E-mail: qinyu@sqi.org.cn



葛宇, 博士, 教授级高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测与评估。
E-mail: geyu@sqi.org.cn