

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2024.02.07

# 通过式固相萃取结合高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱测定鸡蛋中 62 种兽药残留

侯轩, 王彬, 刘爱军, 黄晓兵, 柴娟, 张航俊, 陆春波\*

(浙江省动物疫病预防控制中心, 杭州 310000)

[收稿日期] 2023-06-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2024) 02-0040-10 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 建立了固相萃取结合高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(HPLC-QTOF)同时测定鸡蛋中 62 种兽药残留的方法。鸡蛋均质后经 90% 甲酸乙腈水溶液提取后, PRiME HLB 固相萃取小柱净化, 氮吹后复溶, 用(HPLC-QTOF)进行检测。62 种兽药在 0.5 ~ 500 ng/mL 浓度范围内线性关系良好( $r^2 \geq 0.99$ ), 回收率在 71.2% ~ 113% 之间, 日内变异系数范围为 1.3% ~ 14.3%, 日间变异系数范围为 4.2% ~ 18.3%, 检测限为 1.0 ~ 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 2.0 ~ 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法简便快捷、准确可靠, 适用于鸡蛋中 62 种兽药的同时测定。

**[关键词]** 鸡蛋; 通过式固相萃取; 高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱; 兽药残留

## Determination of 62 Veterinary Drug Residues in Eggs by Solid-phase Extraction Combined with High-performance Liquid Chromatography Quadrupole Time of Flight Mass Spectrometry

HOU Xuan, WANG Bin, LIU Ai-jun, HUANG Xiao-bing, CHAI Juan, ZHANG Hang-jun, LU Chun-bo\*

(Zhejiang Animal Disease Control and Prevention Center, Hangzhou 311100, China)

Corresponding author: LU Chun-bo, E-mail: hx881007@sina.com

**Abstract:** A method was established for the simultaneous determination of 62 veterinary drug residues in eggs using solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry (HPLC-QTOF). The homogenizing eggs were extracted with a 90% formic acid acetonitrile aqueous solution, purified with PRiME HLB solid-phase extraction column, and dissolved again after nitrogen blowing and detected by HPLC-QTOF. 62 veterinary drugs have good linear relationships ( $r^2 \geq 0.99$ ) within the concentration range of 0.5 ~ 500 ng/mL with recoveries ranging from 71.2% to 113%, intraday variation

基金项目: 浙江省重点研发计划项目(2020C02032)

作者简介: 侯轩, 硕士, 兽医师, 从事兽药、饲料与畜产品质量安全检测相关工作。

通讯作者: 陆春波。E-mail: hx881007@sina.com

coefficients ranging from 1.3 to 14.3%, intraday variation coefficients ranging from 4.2 to 18.3%, and the detection limit was 1.0 ~ 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , limit of quantitation was 2.0 ~ 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . This method is simple, fast, accurate, reliable and suitable for the simultaneous determination of 62 veterinary drugs in eggs.

**Key words:** eggs; solid phase extraction purification; high performance liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry; veterinary drug residues

随着物质生活水平的逐渐提高,人们对食品质量安全也越来越重视,其中畜产品兽药残留问题受到了社会各界的关注。鸡蛋作为一种重要的动物性食品,能够为人们提供大量的蛋白质以及各种维生素<sup>[1]</sup>,在人们日常饮食中占有重要的地位。在蛋鸡养殖过程中,抗生素作为一类天然、半合成或人工合成的化合物,因其具有促进动物生长、减少疾病发生率、提高饲料利用率等优点而广泛使用<sup>[2]</sup>,但若其使用不当则会造成鸡蛋抗生素残留超标。抗生素残留通过食物链富集进入人体后,会危害人类健康。目前我国已制定了一系列兽药限量标准<sup>[3-4]</sup>,对其用于畜禽动物的养殖加以限制或禁止,但兽药品种繁多,如何同时快速甄别与确证鸡蛋中多种抗生素残留,保障消费者健康安全显得意义重大。因此,针对鸡蛋建立一套高通量、高灵敏度、快速准确的兽药多残留测定方法具有重要的实际应用价值。

目前,动物源性食品中抗生素检测方法主要有免疫分析法<sup>[5-6]</sup>、高效液相色谱法<sup>[7-8]</sup>、气相-串联质谱法<sup>[9-10]</sup>、液相-串联质谱法<sup>[11-13]</sup>等。其中,液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)因其具有高通量、高灵敏度、抗干扰能力强的特点,越来越多地被广泛应用于食品中兽药残留的检测,但 LC-MS/MS 受限于其扫描速率及分辨率,对于同时测定多组分兽药分析的效果不佳。飞行时间质谱作为一类高分辨质谱,由于具有更快的扫描速率和更高的分辨率<sup>[14-16]</sup>,在抗基质干扰能力方面表现更强,可同时实现对数百种化合物的快速筛查和分析,进一步提高检验效率。

本研究拟采用通过式固相萃取样品前处理技术,该技术可同时减少鸡蛋中蛋白质、脂质、色素等杂质干扰,有效降低基质效应,还可免除活化与平衡步骤,减少前处理时间与成本,适合多组分检测

时大规模样品的净化。同时结合高分辨质谱检测的优势,可对 8 大类 62 种兽药化合物进行同时测定,建立一套快速准确的筛查确证分析方法。本方法具有简便快捷、覆盖目标物范围广、通量高且准确可靠的特点,适用于大批量鸡蛋中痕量兽药多残留的快速筛查与确证分析。

## 1 材料与amp;方法

1.1 试剂与耗材 甲醇、乙腈(色谱纯,Meck公司);甲酸、乙酸铵(色谱纯,阿拉丁公司);PRiME HLB 固相萃取小柱(200 mg/6 mL, Waters 公司);聚四氟乙烯针式滤膜(0.22  $\mu\text{m}$ , Green Mall 公司)等。

62 种兽药标准物质(喹诺酮类 13 种、磺胺类 21 种、大环内酯类 10 种、硝基咪唑类 6 种、酰胺醇类 3 种、硝基呋喃类 4 种、喹噁啉类 4 种、林可胺类 1 种)分别购于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司、美国 Sigma 公司和中国食品药品检定研究院。

1.2 仪器与设备 Agilent 1290-6550 高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(配双喷雾器电喷雾源),美国 Agilent 公司;Agilent MassHunter 软件工作站,美国 Agilent 公司;XS205 分析天平,美国 Mettler Toledo 公司;KQ-500E 超声仪,昆山市超声仪器有限公司等。

1.3 样品前处理 称取已均质的鸡蛋样品  $2 \pm 0.02 \text{ g}$  于 50 mL 离心管中,准确加入 10 mL 甲酸乙腈溶液(甲酸、乙腈、水体积比为 0.1:90:10),涡旋振荡提取 1 min,超声提取 10 min,10000 r/min 离心 5 min,收集全部上层提取液过 PRiME HLB 固相萃取柱,收集滤液,准确吸取 5 mL 滤液于另一带刻度离心管中,40  $^{\circ}\text{C}$  氮气吹至 1 mL 以下,残渣用 0.2% 甲酸水定容至 1.0 mL,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜后,供 HPLC-QTOF 测定。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件 采用 Waters ACQUITY T<sub>3</sub>, 1.7 μm, 100 mm × 2.1 mm 色谱柱, 柱温 25 °C, 进样量 2 μL, 流动相条件见表 1。

表 1 HPLC-QTOF 流动相条件

Tab 1 HPLC-QTOF Mobile Phase Conditions

时间/ min	流速/ (mL · min <sup>-1</sup> )	含 5 mmol/L 乙酸钠的 0.2% 甲酸水溶液	含 5 mmol/L 乙酸钠的 0.2% 甲酸甲醇溶液
0.0	0.5	95	5
1.0	0.5	95	5
4.0	0.5	60	40
10.0	0.5	40	60
12.0	0.5	95	5
15.0	0.5	95	5

1.4.2 质谱条件 质谱采用 Dual AJS ESI 源, 扫描方式为正离子、负离子全扫描。电离源温度 120 °C, 毛细管电压 3000 V, 喷嘴电压 200 V, 干燥器温度 250 °C, 鞘气温度 320 °C。一级质谱数据采集为全扫描模式, 扫描范围:  $m/z$  100 ~ 1 000 Da, 采集速率为 1.5 spectra/s。二级质谱数据采集为目标离子采集模式, 碰撞能量为 10、20 和 40 eV, 扫描范围:  $m/z$  50 ~ 1000 Da, 采集速率为 2.5 spectra/s。采集数据的同时连续导入参比溶液, 对仪器质量轴进行实时校正, 参比离子为  $m/z$  121. 0509 和  $m/z$  922. 0098。62 种化合物质谱参数见表 2。

表 2 62 种化合物测定信息

Tab 2 Determination Information of 62 Compounds

化合物名称	分子式	保留时间 /min	母离子 ( $m/z$ )	特征子离子 ( $m/z$ )	扫描 模式	检测限 /(μg · kg <sup>-1</sup> )	定量限 /(μg · kg <sup>-1</sup> )
依诺沙星	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	7.66	321.1357	232.0509/303.1244	正离子		
氧氟沙星	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	7.74	362.1510	318.1612/261.1034	正离子		
奥比沙星	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> F <sub>3</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.75	396.153	352.1631/295.1053	正离子		
环丙沙星	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.80	332.1405	231.0556/314.1290	正离子		
洛美沙星	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.82	352.1467	334.1348/265.1140	正离子		
培氟沙星	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.82	334.1561	316.1445/233.1077	正离子		
恩诺沙星	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6.90	360.1718	342.1602/286.0974	正离子		
沙拉沙星	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.90	386.1310	299.0979/368.1205	正离子		
二氟沙星	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.94	400.1467	299.0976/382.1349	正离子		
丹诺沙星	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	6.99	358.1561	340.1441/255.0555	正离子		
诺氟沙星	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	7.02	320.1405	231.0551/302.1285	正离子		
司帕沙星	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	6.14	396.153	352.1631/295.1053	正离子		
氟甲喹	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> FNO <sub>3</sub>	7.65	262.0874	244.0763/174.0342	正离子		
磺胺嘧啶	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	8.31	251.0597	156.0108/108.0437	正离子		
磺胺二甲基异噁唑	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	8.37	279.091	124.0869/186.0332	正离子		
磺胺噻唑	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	8.39	256.0209	239.1487/156.0110	正离子	1.0	2.0
磺胺吡啶	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	8.56	250.0644	156.0108/184.0863	正离子		
磺胺甲基嘧啶	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	8.71	265.0753	156.0110/113.0707	正离子		
磺胺二甲恶唑	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	8.82	268.0750	113.0705/156.0110	正离子		
磺胺甲噻二唑	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	8.86	271.0318	197.0776/156.0110	正离子		
磺胺对甲氧嘧啶	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	8.94	281.0703	156.0114/215.0927	正离子		
磺胺二甲嘧啶	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	8.98	279.0910	124.0865/186.0331	正离子		
磺胺甲氧哒嗪	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	9.29	281.0703	156.0114/215.0927	正离子		
磺胺甲恶唑	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	9.1	254.0594	156.0108/156.0108	正离子		
磺胺氯哒嗪	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	9.13	285.0207	211.0939/156.0110	正离子		
磺胺异恶唑	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	9.24	268.0750	211.0939/156.0110	正离子		
磺胺邻二甲氧嘧啶	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	9.32	311.0808	245.1031/156.0110	正离子		
磺胺间甲氧嘧啶	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S	10.16	281.0703	156.0114/215.0927	正离子		
磺胺苯甲酰	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	9.43	277.0641	156.0114/108.0444	正离子		
磺胺苯吡唑	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	9.5	315.0910	222.0332/160.0869	正离子		
磺胺氯吡嗪	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> ClN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	9.71	285.0207	156.0110/123.0411	正离子		
磺胺二甲氧基嘧啶	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S	9.79	311.0808	245.1031/156.0110	正离子		

续表

化合物名称	分子式	保留时间 /min	母离子 ( <i>m/z</i> )	特征子离子 ( <i>m/z</i> )	扫描 模式	检测限 /( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	定量限 /( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )
磺胺喹噁啉	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	9.92	301.0753	269.1353/156.0110	正离子		
螺旋霉素	C <sub>43</sub> H <sub>74</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub>	5.91	843.5213	174.1130/54.03167	正离子		
阿奇霉素	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>	6.12	749.5158	591.4204/158.1173	正离子		
替米考星	C <sub>46</sub> H <sub>80</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub>	6.37	869.5733	695.4820/435.2907	正离子		
竹桃霉素	C <sub>35</sub> H <sub>61</sub> NO <sub>12</sub>	6.82	688.4266	544.3464/158.1174	正离子		
泰乐菌素	C <sub>46</sub> H <sub>77</sub> NO <sub>17</sub>	7.38	916.5264	772.4471/174.1132	正离子		
吉他霉素	C <sub>39</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>14</sub>	7.83	786.4634	558.3273/174.1125	正离子		
克拉霉素	C <sub>38</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>13</sub>	7.50	748.4841	158.1174/590.3884	正离子		
红霉素	C <sub>37</sub> H <sub>67</sub> NO <sub>13</sub>	8.18	734.4685	576.3725/158.1175	正离子		
交沙霉素	C <sub>42</sub> H <sub>69</sub> NO <sub>15</sub>	8.44	828.4723	174.1125/109.0648	正离子		
罗红霉素	C <sub>41</sub> H <sub>76</sub> N <sub>2</sub> O <sub>15</sub>	9.07	837.5318	679.4365/158.1175	正离子		
羟基甲硝唑	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4.25	188.067	123.0553/144.0404	正离子		
羟基地美硝唑	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	4.59	158.056	140.0455/55.0417	正离子		
甲硝唑	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	4.84	172.0716	128.0454/155.0689	正离子		
替硝唑	C <sub>8</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	5.14	248.0699	154.0611/110.0838	正离子		
地美硝唑	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	5.30	142.0611	112.0631/56.0494	正离子		
奥硝唑	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	5.72	201.06174	140.0450/95.0493	正离子		
甲矾霉素	C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>5</sub> S	5.25	353.9970	185.0267/290.0258	负离子	2.0	5.0
氟苯尼考	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> Cl <sub>2</sub> FNO <sub>4</sub> S	5.78	355.9927	119.0485/78.9841	负离子		
氯霉素	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> ClN <sub>2</sub>	6.59	321.0050	174.9548/152.0336	负离子		
呋喃妥因	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	5.389	237.0265	152.0089/124.0026	负离子		
呋喃西林	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	5.566	197.0309	150.0296/124.0264	负离子		
呋喃他酮	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	4.83	325.1140	281.1251/252.0984	正离子		
呋喃唑酮	C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	5.566	226.0458	139.0135/122.0104	正离子		
喹乙醇	C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	4.815	264.0979	143.0597/212.0817	正离子		
乙酰甲喹	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5.731	219.0764	143.0601/102.6330	正离子		
卡巴氧	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	5.974	263.0774	197.0458/231.0513	正离子		
喹烯酮	C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	7.575	307.1077	131.0493/273.1026	正离子		
林可霉素	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S	5.041	407.2210	126.1270/286.0842	正离子		
甲氧苄啶	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	5.268	291.1451	123.0660/230.1161	正离子		

1.4.3 高分辨质谱库的建立 针对 62 种待测化合物,在 Agilent MassHunter 软件工作站项下的谱图数据库软件(PCDL)中录入各化合物的中文名称、CAS 号、分子式等基本信息;采用本研究建立的液相、质谱条件对 62 种化合物标准溶液进行测定,得到各化合物的保留时间、母离子精确质量数、子离子特征图谱等信息,将所有信息导入 PCDL 中,建立 62 种化合物高分辨质谱谱库。

## 2 结果与分析

2.1 液相色谱条件的优化 考察了流动相组分、比例对待测化合物测定的影响。本研究流动相 A 为含 5 mmol/L 乙酸铵的 0.2% 甲酸水溶液,B 相为含 5 mmol/L 乙酸铵的 0.2% 甲酸甲醇溶液,分别采用 0.1% 和 0.2% 甲酸添加量进行了分析,发现

0.2% 的甲酸水乙酸铵溶液和甲酸甲醇溶液做流动相所得化合物的峰型更好。由于此方法筛选的化合物种类较多,各种药物的极性强弱、在色谱柱上保留强度以及洗脱的时间长短均不相同,若使用等度洗脱的方法无法得到非常理想的峰形,因此本研究选择梯度洗脱,具体色谱条件见表 1。

2.2 质谱条件的优化 配制浓度为 20 ng/mL 的 62 种化合物的混合标准溶液,优化最佳的电离源温度、毛细管电压、鞘气温度、干燥器温度等质谱条件,用 HPLC-Q-TOF 测定。采用 MS 全扫描模式采集各化合物的一级质谱信息,Target-MS/MS 模式采集二级质谱信息,确定了 62 种化合物的实测母离子精确质量数、保留时间、特征子离子精确质量数等质谱参数,具体见表 2。

2.3 基质效应考察 鸡蛋脂类、蛋白丰富,在化合物质谱分析中可能出现基质效应的情况。对 62 种化合物在鸡蛋中基质效应情况进行了考察。其中,酰胺醇类、喹噁啉类药物表现为基质抑制效应。为保证实验结果的准确,本研究采用基质匹配标准曲线以消除或减弱基质效应对定量分析结果的影响。

2.4 定量方法确定 为获得准确可靠的定量结果,待测样品采取全扫描模式(FULL-MS)进行初步筛查后,疑似阳性样品采取目标离子模式(Target-MS)进行二级质谱数据采集,该模式利用三重四极杆对目标化合物的母离子进行选择与裂解,确保扫描速率与扫描时间的同时,可有效减少杂质干扰、提高检测灵敏度,保证定量结果准确。

2.5 标准曲线、检出限及定量限 按 1.3 项处理

空白样品后,采用鸡蛋空白提取液配制 62 种化合物的标准工作液,供 HPLC-QTOF 检测。以目标化合物色谱峰面积及其对应化合物浓度绘制标准曲线,获得待测物质的线性回归方程,取信噪比  $S/N = 3$  的样品浓度为方法检出限(LOD),取信噪比  $S/N = 10$  的样品浓度为方法定量限(LOQ)。62 种化合物浓度在 0.5 ~ 500 ng/mL 范围内,鸡蛋中 62 种化合物的线性关系良好( $r^2 \geq 0.99$ ),方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别在 1.0 ~ 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 2.0 ~ 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  范围内,均满足检测需求。

2.6 方法的回收率、精密度 分别在各化合物定量限、2 倍定量限及 10 倍定量限浓度添加水平下进行添加回收实验,每个浓度设 5 个平行,重复 3 次。计算添加回收率及变异系数,结果见表 3。

表 3 鸡蛋中 62 种化合物的回收率( $n=5$ )

Tab 3 Recovery rates of 62 compounds in eggs ( $n=5$ )

药物名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数	药物名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数
依诺沙星	2.0	94.0%	7.8%	7.5%	二氟沙星	2.0	89.1%	12.8%	9.3%
	4.0	93.8%	5.4%	4.2%		4.0	107%	11.0%	2.0%
	40.0	87.3%	6.0%	5.4%		40.0	101.0%	10.9%	6.6%
氧氟沙星	2.0	104%	8.1%	6.8%	丹诺沙星	2.0	83.0%	7.0%	6.4%
	4.0	102%	5.7%	2.5%		4.0	102%	13.3%	3.3%
	40.0	96.4%	9.2%	6.2%		40.0	94.8%	9.1%	7.7%
奥比沙星	2.0	97.8%	8.8%	5.6%	诺氟沙星	2.0	85.0%	14.6%	6.3%
	4.0	97.7%	9.4%	7.2%		4.0	108%	16.0%	8.5%
	40.0	95.2%	17.0%	8.9%		40.0	79.1%	18.3%	10.9%
环丙沙星	2.0	98.7%	10.8%	8.0%	司帕沙星	2.0	89.7%	9.6%	7.1%
	4.0	104%	9.8%	5.4%		4.0	106%	9.8%	3.8%
	40.0	97.7%	10.2%	7.7%		40.0	92.7%	10.2%	7.2%
洛美沙星	2.0	100%	16.6%	8.9%	氟甲喹	2.0	90.1%	8.1%	5.3%
	4.0	105%	16.9%	12.6%		4.0	106%	13.2%	7.5%
	40.0	84.3%	13.4%	7.3%		40.0	96.1%	10.4%	5.1%
培氟沙星	2.0	105%	14.4%	4.6%	恩诺沙星	2.0	83.7%	18.0%	5.3%
	4.0	104%	8.2%	8.0%		4.0	103%	12.9%	8.1%
	40.0	90.2%	6.7%	7.4%		40.0	89.5%	18.0%	6.1%
沙拉沙星	2.0	93.2%	9.3%	7.4%	磺胺嘧啶	2.0	90.4%	14.6%	1.8%
	4.0	106%	8.3%	6.3%		4.0	107%	11.6%	7.7%
	40.0	99.0%	8.7%	7.6%		40.0	98.6%	15.3%	5.2%

续表

药物名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数	药物名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数
磺胺吡啶	2.0	108%	5.8%	2.9%	磺胺噻唑	2.0	88.4%	9.8%	7.4%
	4.0	102%	9.8%	10.0%		4.0	107%	10.8%	4.8%
	40.0	94.0%	15.2%	9.3%		40.0	102%	7.7%	5.5%
磺胺甲基嘧啶	2.0	89.6%	11.7%	7.6%	磺胺二甲基异嘧啶	2.0	81.3%	6.5%	6.3%
	4.0	104%	12.7%	8.8%		4.0	100%	6.9%	4.8%
	40.0	93.0%	16.2%	13.7%		40.0	88.6%	5.8%	2.3%
磺胺二甲恶唑	2.0	112%	17.8%	6.8%	磺胺甲噻二唑	2.0	89.8%	9.1%	6.3%
	4.0	102%	11.8%	3.2%		4.0	110%	11.3%	5.9%
	40.0	105%	11.6%	7.3%		40.0	98.8%	9.7%	10.7%
磺胺对甲氧嘧啶	2.0	96.3%	8.9%	9.7%	磺胺二甲嘧啶	2.0	83.9%	13.4%	4.1%
	4.0	92.0%	6.1%	4.2%		4.0	105%	16.5%	6.6%
	40.0	80.4%	5.5%	3.7%		40.0	90.3%	8.8%	7.5%
磺胺甲氧哒嗪	2.0	93.6%	16.6%	8.7%	磺胺甲恶唑	2.0	90.1%	13.0%	5.0%
	4.0	102%	15.2%	11.9%		4.0	113%	16.5%	5.7%
	40.0	87.4%	15.8%	9.2%		40.0	88.2%	14.5%	6.2%
磺胺氯哒嗪	2.0	77.7%	7.9%	6.8%	磺胺异恶唑	2.0	87.2%	6.8%	6.8%
	4.0	88.6%	7.6%	9.5%		4.0	99.4%	11.1%	10.9%
	40.0	74.0%	11.0%	5.4%		40.0	89.4%	13.6%	10.3%
磺胺邻二甲氧嘧啶	2.0	77.1%	13.0%	4.5%	磺胺间甲氧嘧啶	2.0	81.1%	7.8%	7.5%
	4.0	92.6%	11.2%	10.7%		4.0	98.2%	6.6%	6.0%
	40.0	72.8%	15.1%	8.9%		40.0	87.9%	8.5%	8.3%
磺胺苯甲酰	2.0	77.4%	9.8%	4.1%	磺胺苯吡唑	2.0	76.0%	8.0%	10.0%
	4.0	99.2%	11.3%	6.9%		4.0	99.1%	7.0%	7.2%
	40.0	79.0%	6.6%	4.5%		40.0	96.3%	6.8%	7.1%
磺胺氯吡嗪	2.0	77.2%	4.2%	1.3%	磺胺二甲氧基嘧啶	2.0	81.9%	6.7%	8.5%
	4.0	93.5%	9.3%	11.2%		4.0	96.3%	8.8%	6.9%
	40.0	79.2%	5.3%	5.1%		40.0	93.0%	6.6%	5.3%
磺胺喹噁啉	2.0	73.2%	6.8%	1.8%	螺旋霉素	2.0	79.2%	12.1%	8.8%
	4.0	92.5%	9.5%	6.5%		4.0	101%	6.3%	5.3%
	40.0	78.7%	6.5%	4.1%		40.0	103%	8.2%	9.4%
阿奇霉素	2.0	73.4%	6.1%	3.6%	替米考星	2.0	71.2%	7.4%	1.5%
	4.0	93.0%	9.7%	7.0%		4.0	85.3%	11.9%	8.2%
	40.0	82.4%	11.5%	5.4%		40.0	73.6%	10.3%	6.0%
竹桃霉素	2.0	74.8%	12.0%	8.9%	泰乐菌素	2.0	89.0%	8.6%	6.4%
	4.0	88.6%	7.6%	5.9%		4.0	104%	7.2%	6.2%
	40.0	77.3%	8.6%	6.2%		40.0	88.4%	8.0%	7.1%
吉他霉素	2.0	73.6%	8.3%	1.5%	克拉霉素	2.0	79.6%	8.4%	4.8%
	4.0	94.4%	11.0%	10.1%		4.0	102%	8.3%	10.3%
	40.0	71.3%	9.8%	5.4%		40.0	103%	9.2%	8.6%

续表

药物名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数	药物名称	添加浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	平均回收率	日间变异系数	日内变异系数
	2.0	81.9%	6.8%	4.2%		2.0	88.6%	8.5%	6.3%
红霉素	4.0	99.1%	12.8%	9.1%	交沙霉素	4.0	105%	6.2%	8.5%
	40.0	83.8%	7.6%	3.6%		40.0	95.4%	8.3%	5.6%
罗红霉素	2.0	84.8%	10.1%	3.8%		2.0	85.2%	8.1%	6.0%
	4.0	81.3%	16.0%	8.5%	羟基甲硝唑	4.0	103%	7.1%	5.9%
	40.0	79.5%	9.1%	3.9%		40.0	92.0%	7.8%	7.0%
羟基地美硝唑	2.0	73.2%	8.8%	4.8%		2.0	83.6%	7.2%	8.5%
	4.0	85.9%	7.0%	6.9%	甲硝唑	4.0	106%	9.0%	7.2%
	40.0	73.0%	12.8%	11.4%		40.0	98.9%	9.2%	8.1%
替硝唑	2.0	81.2%	5.5%	5.4%		2.0	82.4%	10.0%	1.7%
	4.0	97.2%	10.0%	7.7%	地美硝唑	4.0	104%	13.7%	4.5%
	40.0	78.8%	11.8%	11.3%		40.0	86.6%	17.4%	6.8%
奥硝唑	2.0	78.9%	5.2%	3.8%		5.0	72.6%	12.9%	2.8%
	4.0	88.3%	8.0%	9.2%	甲砒霉素	10.0	85.6%	10.0%	7.3%
	40.0	81.1%	5.8%	6.2%		50.0	85.0%	13.9%	9.0%
氟苯尼考	5.0	87.5%	11.6%	3.7%		5.0	97.0%	9.0%	7.0%
	10.0	93.8%	12.9%	7.2%	氯霉素	10.0	94.6%	8.5%	8.2%
	50.0	77.5%	11.3%	9.0%		50.0	88.2%	14.5%	10.2%
呋喃妥因	5.0	73.8%	6.0%	2.4%		5.0	97.0%	9.0%	7.0%
	10.0	93.0%	12.2%	7.0%	呋喃西林	10.0	94.6%	8.5%	8.2%
	50.0	80.2%	9.0%	6.5%		50.0	88.2%	14.5%	10.2%
呋喃他酮	5.0	81.7%	7.3%	6.6%		5.0	97.0%	10.5%	3.0%
	10.0	104%	10.2%	10.1%	呋喃唑酮	10.0	96.9%	12.2%	5.7%
	50.0	77.4%	16.6%	8.1%		50.0	94.4%	10.9%	2.4%
喹乙醇	5.0	75.0%	10.2%	7.6%		5.0	102%	13.7%	11.6%
	10.0	96.1%	8.7%	8.4%	乙酰甲喹	10.0	98.0%	12.9%	8.9%
	50.0	84.0%	14.0%	13.0%		50.0	90.0%	9.9%	10.8%
卡巴氧	5.0	75.2%	8.7%	5.5%		5.0	95.9%	14.1%	5.9%
	10.0	90.1%	9.6%	5.0%	喹烯酮	10.0	95.4%	12.2%	4.0%
	50.0	83.5%	11.5%	6.8%		50.0	90.7%	12.6%	14.3%
林可霉素	5.0	77.1%	7.7%	1.3%		5.0	99.5%	16.3%	8.9%
	10.0	89.9%	8.3%	6.3%	甲氧苄啶	10.0	98.2%	13.7%	6.1%
	50.0	80.2%	8.3%	5.0%		50.0	92.1%	10.4%	11.3%

2.7 实际样品检测 应用建立的分析方法,对浙江省内市面上售卖的 150 份鸡蛋样品进行测定,其中 1 批次鸡蛋检出恩诺沙星,含量为 5.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该检测结果表明,本方法能满足对鸡蛋中 62 种化合物有效监控的需要。

### 3 讨论与小结

3.1 液相条件的优化 因待检化合物存在同分异构体,仅靠质谱分析很难将所有化合物有效定性,故对液相条件进行了优化。一是考察了流动相组成对化合物灵敏度和离子化效率的影响,发现在流

动相中添加 0.1% 甲酸及 5 mmol/L 乙酸铵,可以有效提高化合物在正离子和负离子模式下的离子化效率,提高灵敏度。二是对流动相比例进行了考察,发现采用梯度洗脱能保证待测化合物的有效分离。如待测化合物磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧

哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶为同分异构体,分子式为  $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ ,采取 1.4.1 项液相条件进行分析,保留时间分别为 8.94、9.29、10.16 min,得到有效分离,进一步保证化合物定性的准确,具体见图 1。

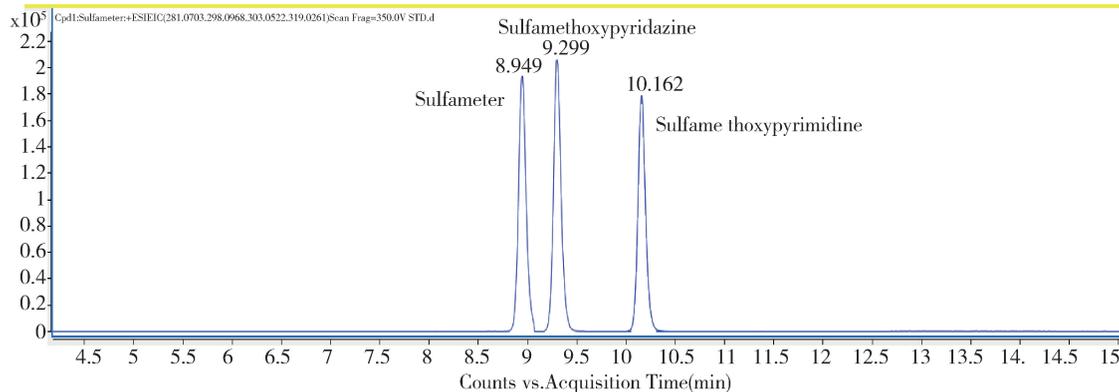


图 1 磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶标准溶液 (10 ng/mL)

Fig 1 Sulfameter, Sulfamethoxypridazine and sulfamethoxyprimidine Standard solution (10 ng/mL)

3.2 提取条件的优化 本研究对纯乙腈、乙腈:水:甲酸 (90:10:0.1, V/V/V)、乙腈:水:甲酸 (80:20:0.1, V/V/V) 3 种提取剂进行了考察。3 种提取剂对 8 大类 62 种兽药的提取效果,见图 2。结果表明,乙腈-水体系提取效率明显高于纯乙腈,可能是乙腈-水体系有效沉淀蛋白的同时,

还具有更强的渗透力,可有效提取基质中的待测化合物;90% 甲酸乙腈水溶液提取效果与 80% 甲酸乙腈水溶液提取效果差别不大,但提取液过 Prime HLB 小柱后还需氮吹,考虑到氮吹效果,减少氮吹时间,选择乙腈:水:甲酸 (90:10:0.1, V/V/V) 作为提取液。

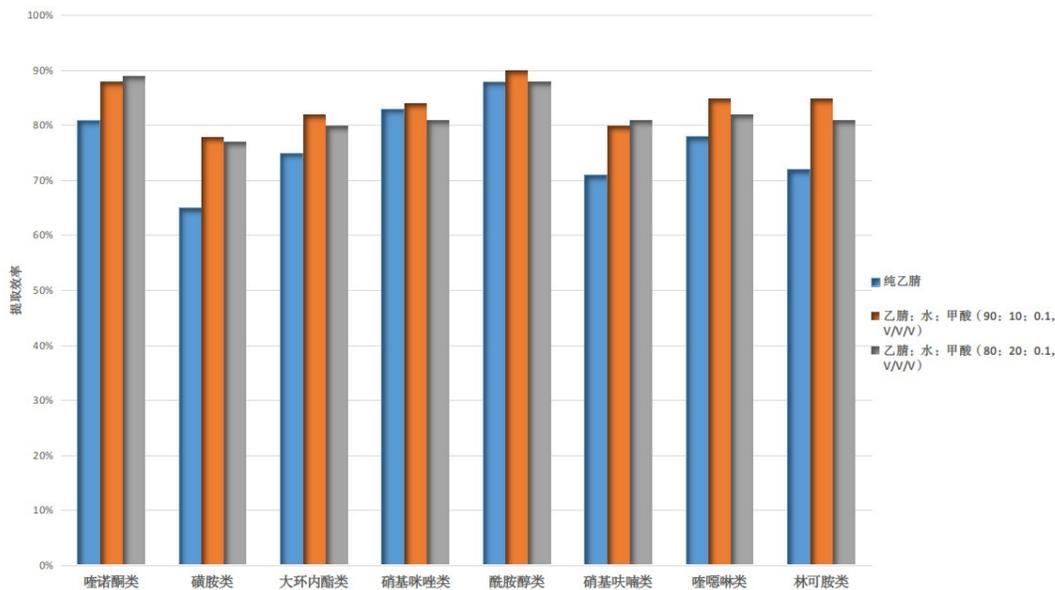


图 2 不同提取液提取效率 (添加浓度为 10 μg/kg)

Fig 2 Extraction efficiency of different extraction solutions (added concentration of 10 μg/kg)

本研究采用通过式固相萃取与高分辨质谱技术相结合的检测方式,建立了同时测定鸡蛋中 62 种兽药残留的分析方法,并进行了方法学验证,回收率在 71.2% ~ 113% 之间,日内变异系数范围为 1.3% ~ 14.3%, 日间变异系数范围为 4.2% ~ 18.3%, 检测限为 1.0 ~ 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 2.0 ~ 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法操作简便,灵敏度高,适用于大批量鸡蛋中痕量兽药多残留的快速测定。

## 参考文献:

- [1] Kang J, Park S J, Park H C, *et al.* Multiresidue Screening Of Veterinary Drugs In Meat, Milk, Egg, And Fish Using Liquid Chromatography Coupled With Ion Trap Time - Of - Flight mass spectrometry[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 182 (2): 635 - 652
- [2] Ibarra Is, Miranda J M, Perez - silva I, *et al.* Sample Treatment Based On Molecularly Imprinted Polymers For The Analysis Of Veterinary Drugs In Food Samples: A Review [J]. *Anal Methods*, 2020, 12: 2958 - 2977.
- [3] 中华人民共和国农业农村部. GB31650 - 2019 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量. Ministry Of Agriculture And Rural Affairs Of The Ministry Of Agriculture And Rural Affairs. GB31650 - 2019 National Food Safety Standards - Maximum Residue Limits For 41 Veterinary Drugs In Food.
- [4] 中华人民共和国农业农村部. GB31650.1 - 2022 食品安全国家标准食品中 41 种兽药最大残留限量. Ministry Of Agriculture And Rural Affairs Of The Ministry Of Agriculture And Rural Affairs. GB31650.1 - 2022 National Food Safety Standards - Maximum Residue Limits For Veterinary Drugs In Food.
- [5] 阿说阿沙,邹文佳,付婧洁,等. 荧光免疫分析法在牛奶抗生素残留检测中的研究进展[J]. *中国兽医杂志*, 2019, 55 (9): 61 - 63.  
A Shuo A S, Zou W J, Fu J J, *et al.* Research Progress Of Fluorescence Immunoassay In The Detection Of Antibiotic Residues In Milk [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2019, 55 (9): 61 - 63
- [6] 胡佳丽,刘小雷,于东升. 动物源食品中  $\beta$  - 内酰胺类抗生素残留的检测现状[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41 (1): 226 - 231.  
Hu J L, L X L, Yu D S. The Current Status On The Detection Of  $\beta$  - lactam Antibiotics Residues In Animal - derived Food [J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2014, 41 (1): 226 - 231.
- [7] 王晓芳,李涛,杨春亮,等. 猪肉中二甲胺四环素的反相 - 高效液相色谱测定[J]. *分析科学学报*, 2011, 27 (6): 811 - 813.  
Wang X F, Li T, Yang C L, *et al.* Determination Of Minocycline In Meat Using Reversed - Phase High Performance Liquid Chromatography [J]. *Journal of Analytical Science*, 2011, 27 (6): 811 - 813.
- [8] 杨娜娜,王庚南,刘静,等. 高效液相色谱测定鸡蛋中 4 种喹诺酮类药物[J]. *河北农业大学学报*, 2014, 37 (6): 101 - 105.  
Yang N N, Wang G N, Liu J, *et al.* The Determination Of Four Kinds Of Quinolones In Eggs By High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [J]. *Journal Of Agricultural University Of Hebei*, 2014, 37 (6): 101 - 105.
- [9] 邵会,冷凯良,周明莹,等. 水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺多残留的同时测定—GC/MS 法[J]. *渔业科学进展*, 2015, 36 (3): 137 - 141.  
Shao H, Leng K L, Zhou M Y, *et al.* Simultaneous Determination Of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol And Florfenicol Amine Residues In Aquatic Products With Gas Chromatography/ Mass Spectrometry [J]. *Progress In Fishery Sciences*, 2015, 36 (3): 137 - 141.
- [10] 劳哲,江恩源,朱国强. 在线凝胶渗透色谱 - 气相色谱串联质谱法测定动物源性食品中氯霉素[J]. *分析实验室*, 2020, 39 (6): 726 - 730.  
Lao Z, Jiang E R, Zhu G Q. Determination Of Chloramphenicol In Animal Derived Food By On - line Gel Permeation Chromatography - gas Chromatography - tandem Mass Spectrometry [J]. *Chinese Journal Of Analysis Laboratory*, 2020, 39 (6): 726 - 730.
- [11] Wang X R, Yang S P, Li Y, *et al.* Optimization And Application Of Parallel Solid - phase Extraction Coupled With Ultra - high Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry For The Determination Of 11 Aminoglycoside Residues In Honey And Royal Jelly [J]. *Journal Of Chromatography*, 2018, 1542: 28 - 36.
- [12] 张航俊,张晓丽,阮鑫,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法研究猪组织中磺胺间甲氧嘧啶和磺胺二甲嘧啶的消除规律[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12 (12): 4838 - 4844.  
Zhang H J, Zhang X L, Ruan X, *et al.* Study On Elimination Regularity Of Sulfamonomethoxine And Sulfadimidine In Pig Tissues By High Performance Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry [J]. *Journal Of Food Safety And Quality*, 2021, 12 (12): 4838 - 4844.

- [13] 刘培勇,张惠,米之金,等. 两步液液萃取-固相萃取净化结合高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 11 种磺胺类兽药残留[J]. 色谱,2019,37(10):1098-1104.  
Liu P Y, Zhang H, Mi Z J, *et al.* Determination Of 11 Sulfonamides In Pork By Two-step Liquid-liquid Extraction-solid Phase Extraction Purification Coupled With High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry [J]. Chinese Journal Of Chromatography, 2019, 37 ( 10 ): 1098-1104.
- [14] 郭添荣,叶梅,柯欢,等. 高分辨质谱在动物源食品兽药残留检测中的应用[J]. 食品科技,2020,45(7):371-377.  
Guo T R, Ye M, Ke H, *et al.* Application Of High Resolution Mass Spectrometry In The Detection Of Veterinary Drug Residues In Animal Foods[J]. Food Science And Technology, 2020, 45 ( 7 ): 371-377.
- [15] 吴炜亮,李晓明,朱文亮,等. 飞行时间质谱技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品与机械,2015,31(3):236-241.  
Wu W L, Li X M, Zhu W L, *et al.* The Development Of time Of Flight Mass And Its Applications On Food Quality And Safety Detection[J]. Food & Machinery, 2015, 31 ( 3 ): 236-241.
- [16] 绳慧珊,张新忠,王新茹,等. 飞行时间质谱技术在水果、蔬菜与茶叶中农药残留分析中的应用[J]. 分析测试学报,2018,37(2):139-153.  
Shen H S, Zhang X Z, Wang X R, *et al.* Applications Of Time Of Flight Mass Spectrometry In Analysis On Pesticide Residues In Fruits, Vegetables And Tea[J]. Journal Of Instrumental Analysis, 2018, 37 ( 2 ): 139-153.

(编辑:侯向辉)