doi:10.11751/ISSN.1002 - 1280.2021.7.03

超高效液相色谱 - 三重四极杆/线性离子阱复合质谱法测定鸡蛋中黏菌素残留的研究

尹 晖,王亦琳,叶 妮,孙红洋,孙 雷*,王鹤佳

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2020 - 08 - 28　[文献标识码] A　[文章编号] 1002 - 1280 (2021)07 - 0014 - 08　[中图分类号] S859.84

[摘　要]　建立了鸡蛋中黏菌素残留检测的超高效液相色谱 - 三重四极杆/线性离子阱复合质谱方法(UPLC - QTRAP)。样品用 25% 甲醇提取后,正己烷去脂,固相萃取柱净化,上机测试。液相色谱条件:色谱柱为 BEH C18(50 mm × 2.1 mm,1.7 μm),流动相为 0.5% 甲酸水溶液 + 0.5% 甲酸乙腈溶液,梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 5 μL。质谱条件:电喷雾正离子源(ESI^+),采用多反应监测 - 信息依赖扫描 - 增强子离子扫描(MRM - IDA - EPI)方式采集。结果表明:在鸡蛋中,黏菌素 A 和黏菌素 B 在 20 ~ 800 ng/kg 基质匹配标准溶液浓度范围内均呈现良好的线性关系,相关系数(R^2)大于 0.990;鸡蛋中黏菌素 A 和黏菌素 B 的定量限均为 30 μg/kg,检测限为 10 μg/kg。鸡蛋中黏菌素 A 和黏菌素 B 在 30、150 和 300 μg/kg 三个添加浓度平均回收率都在 67.2% ~ 106% 之间,批内、批间 *RSD* 均小于 20%。该方法定性准确、灵敏度高、简便快捷,回收率和精密度满足残留检测要求。

[关键词]　黏菌素;鸡蛋;残留;超高效液相色谱 - 三重四极杆/线性离子阱复合质谱

Determination of Colistin Residue in Eggs by LC - QTRAP

YIN Hui, WANG Yi - lin, YE Ni, SUN Hong - yang, SUN Lei*, WANG He - jia

(*China Institute of Veterinary Drug Control*, *Beijing* 100081, *China*)

Corresponding author: *SUN Lei*, *E - mail*: 57469032@*qq.com*

Abstract: A LC - QTRAP method was established for the determination of colistin residue in eggs. The samples were extracted by water (25% methanol), the fat was removed by hexane, and purified with C18 SPE. LC conditions were as follows: the chromatography column is BEH C18 column of 50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm; mobile phase is water (0.5% formic acid) and acetonitrile (0.5% formic acid); flow rate is 0.4 mL/min; column temperature is 30 ℃; injection volume is 5 μL. Mass spectrometry conditions were ESI^+ and multi - reaction monitoring - information dependent acquisition - enhanced product ion (MRM - IDA - EPI) mode. The

作者简介: 尹 晖,助理研究员,从事兽药残留研究工作

通讯作者: 孙 雷。E - mail:57469032@qq.com

calibration curve of colistin were good linear from 20 to 800 ng/kg in eggs with the correlation coefficient R^2 over 0.990. The limit of quantification was 30 μg/kg, and the limit of detection was 10 μg/kg. The average recoveries of colistin from spiked eggs at three concentrations of 30, 150 and 300 μg/kg were between 60% ~ 120%, and intra - and inter - batch *RSD* were <20%.

Key words: colistin; eggs; residue; UPLC - QTRAP

近期,贵州首例鸡蛋被查出禁用药氟苯尼考案宣判,鸡蛋中的兽药残留问题和随之引发的食品安全问题再度引起社会关注。黏菌素(Colistin)属于多肽类抗生素,是 30 多种成分的混合物,主要成分为黏菌素 A 和黏菌素 B[1-2],其结构为由七环和末端的三肽组成的十肽菌素,对革兰氏阴性杆菌具有较强的抗菌作用,广泛应用于治疗猪及禽类肠道大肠杆菌感染,曾经作为饲料添加剂还有促进动物生长作用[3]。大量使用黏菌素会对动物的肾和神经系统造成较大的毒害性[4],并以药物原形或其代谢产物形式在动物可食性组织(如蛋、奶)中形成药物残留,影响食品质量安全,进而影响人类健康,因此欧盟制定了黏菌素在动物可食用组织中的最高残留限量标准[5],我国食品安全国家标准GB 31650 - 2019 中规定的黏菌素最高残留限量与欧盟一致,其中鸡蛋中黏菌素的残留标志物为黏菌素 A 和黏菌素 B 之和,最大残留限量(MRL)为 300 μg/kg[6]。目前鸡蛋中黏菌素残留检测方法的报道较少[7],文献报道多为对其他动物组织、牛奶、饲料中黏菌素残留检测方法[8-11]。我国也尚未发布动物性食品中黏菌素残留量测定的国家标准和行业标准。本研究应用三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术(QTRAP),在四极杆的高灵敏度基础上,增加了线性离子阱增强子离子扫描的定性功能,可以得到能够二次定性的 EPI 指纹图,进一步提高了兽药残留检测中痕量分析定性的准确度[12]。本研究拟建立一种检测鸡蛋中黏菌素残留的 UPLC - MS/MS 方法,应用最新的三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术(QTRAP),以为鸡蛋的食品安全监控提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　仪器和设备　Shimadzu 30A - 6500 QTRAP 液相色谱 - 串联质谱仪,日本岛津公司 - 美国 AB SCIEX 公司; XS105DU 分析天平,Mettler Toledo 公司;AE260 电子天平,Mettler Toledo 公司;Biofuge Strators 高速冷冻离心机,贺利氏公司;SIR4 涡旋混合器,IKA 公司;氮吹仪,Jnc 公司。

1.2　药品和试剂　黏菌素 A、黏菌素 B,纯度均 > 98%。来自日本明治制果药业株式会社;甲酸、乙腈为色谱纯,均购自 MERCK 公司;所用水为超纯水。

1.3　空白鸡蛋　从超市购买不同批次的鸡蛋,经检测筛选出不含黏菌素的鸡蛋,充分匀浆后用作空白鸡蛋。

1.4　对照溶液配制　精密称取黏菌素 A 和黏菌素 B 标准品适量,置于 10 mL 棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液;量取标准储备液适量,用甲醇稀释成 10 μg/mL 的标准工作液,再用甲醇稀释成 1 μg/mL 的标准工作液。

1.5　测定方法

1.5.1　色谱条件　色谱柱为 BEH C18(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相 A 相为 0.5% 甲酸水溶液,B 相为 0.5% 甲酸乙腈溶液,流动相梯度洗脱程序见表 1,柱温 30 ℃,进样量 5 μL。

表 1　流动相梯度洗脱程序

Tab 1　Gradient elution conditions of mobile phase

时间/min	流速/(mL · min^{-1})	A 相/%	B 相/%
0.01	0.4	95	5
0.50	0.4	95	5
3.00	0.4	50	50
3.01	0.4	5	95
4.00	0.4	5	95
4.01	0.4	95	5
5.50	0.4	95	5

1.5.2　质谱条件　电喷雾离子源(ESI$^+$),采用多反应监测 - 信息依赖扫描 - 增强子离子扫描(MRM - IDA - EPI)方式采集,电喷雾电压(IS)为 5500 V,离子源温度为 550 ℃,气帘气(CUR)为 30 psi,碰撞气(CAD)为高等(High),辅助气(GS1)为 50 psi,辅助气(GS2)为 60 psi;IDA 参数:动态背景扣除,从不排除之前的目标离子,触发阈值 100 cps;EPI 参数:扫描范围为 80 ~ 400 *m/z*,扫描速度 10000 Da/s,CE 为 20 eV,CES 为 5 eV。待测药物定性定量离子对及对应的去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)见表 2。

表 2　黏菌素定性定量离子对及对应的去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)

Tab 2　Qualitative ions, corresponding quota ions of Colistin and corresponding declustering potential(DP), collision energy(CE)

药物	定性离子对(*m/z*)	定量离子对(*m/z*)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
黏菌素 A	390.8 > 385.0 390.8 > 101.2	390.8 > 385.0	50 23	
黏菌素 B	386.2 > 380.1 386.2 > 101.0	386.2 > 380.1	55	15 23

1.5.3　定性与定量　定性时试样溶液中色谱峰的保留时间,应与校正溶液的保留时间一致,容许偏差为 ± 2.5%,试样溶液中的离子丰度比应与校正溶液的一致,容许偏差符合欧盟 2002/657/EC 决议要求。线性离子阱获得增强子离子扫描(EPI)谱图,应与校正溶液的 EPI 谱图匹配。定量方法采用基质匹配标准溶液外标法定量。

1.5.4　基质匹配标准曲线绘制　精密量取黏菌素标准工作液适量,用 0.5% 甲酸水溶液稀释成浓度为 10、25、50、100、200 和 400 ng/mL 的系列标准工作液,从中各取 1.0 mL,分别加入到空白鸡蛋试料经提取、净化和吹干后的残余物中,充分溶解,过滤,过 0.2 μm 滤膜后,作为浓度为 20、50、100、200、400 和 800 μg/kg 的系列基质匹配标准溶液上机测定。按所得峰面积与相应的对照溶液浓度作标准曲线,并计算回归方程及相关系数。

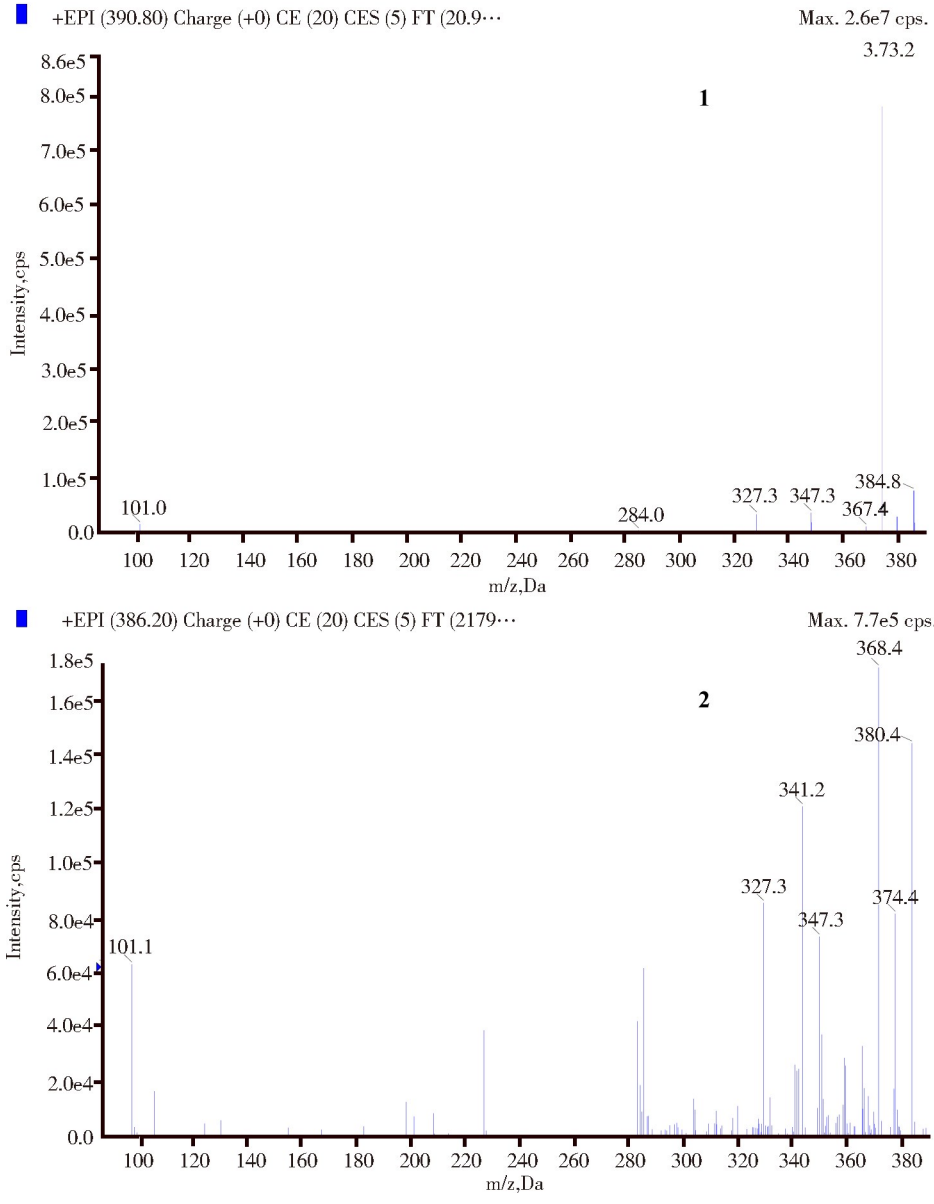
1.5.5　样品前处理过程　称取鸡蛋(5 ± 0.05)g 于 50 mL 离心管中,加入 25% 甲醇水溶液 25 mL,涡旋 2 min,再加入 1 mol/L 硫酸 2 mL,中速振荡 10 min,3000 r/min 离心 5 min,取上清液。向残渣中加入 25% 甲醇水溶液 15 mL,同样的方法重复提取 1 次,合并上清液。合并的提取液中加入正己烷 25 mL,振荡 5 min,5000 r/min 离心 10 min,弃上层正己烷,并将下层提取液定容至 50 mL,备用。Plexa 固相萃取柱依次用 10 mL甲醇、10 mL 水活化,取备用液 5 mL 过柱,然后用 10 mL 水洗涤,最后用 1% 甲酸:甲醇(1∶4,*V/V*)溶液 5 mL 洗脱,洗脱液于 40 ℃水浴氮气吹干。向残余物中加入 0.5% 甲酸水溶液 1.0 mL,充分溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜后供液相色谱 - 串联质谱测定。

1.5.6　方法灵敏度确定　将适量黏菌素标准工作液加入到空白鸡蛋中,经上述方法进行前处理后,用 UPLC - QTRAP 检测,观察药物特征离子质量色谱峰信噪比(*S/N*)和对应药物浓度,*S/N* > 3 者为方法的检测限,*S/N* > 10 者为方法的定量限。

1.5.7　准确度和精密度的测定　采用标准添加法,在空白鸡蛋试料中分别添加 30、150、300 μg/kg 三个不同浓度药物进行回收率试验,各浓度进行 5 个样品平行试验,重复 3 次,求平均回收率、批内、批间 *RSD*。

2　结果与分析

2.1　定性分析　本研究使用 MRM - IDA - EPI 扫描模式,当 MRM 通道采集的信号超过 100 cps 时触发 EPI 增强离子扫描,在保留时间 2.05 ~ 2.17 min 左右获得 3 个不同碰撞能量(15、20、25 eV)的 EPI 谱图,得到更多子离子信息。将空白鸡蛋添加试样和黏菌素标准溶液的 EPI 谱图进行比对,得到 6 个匹配的子离子,表明本方法定性高度准确。黏菌素基质匹配标准溶液和空白鸡蛋添加试样的 EPI 谱图见图 1 ~ 图 2。



1. 黏菌素 A；2. 黏菌素 B

1. Colistin A；2. Colistin B

图 1　黏菌素基质匹配标准溶液的 EPI 谱图

Fig 1　EPI(Enhanced Product Ion) of Colistin in matrix – matched standard solution

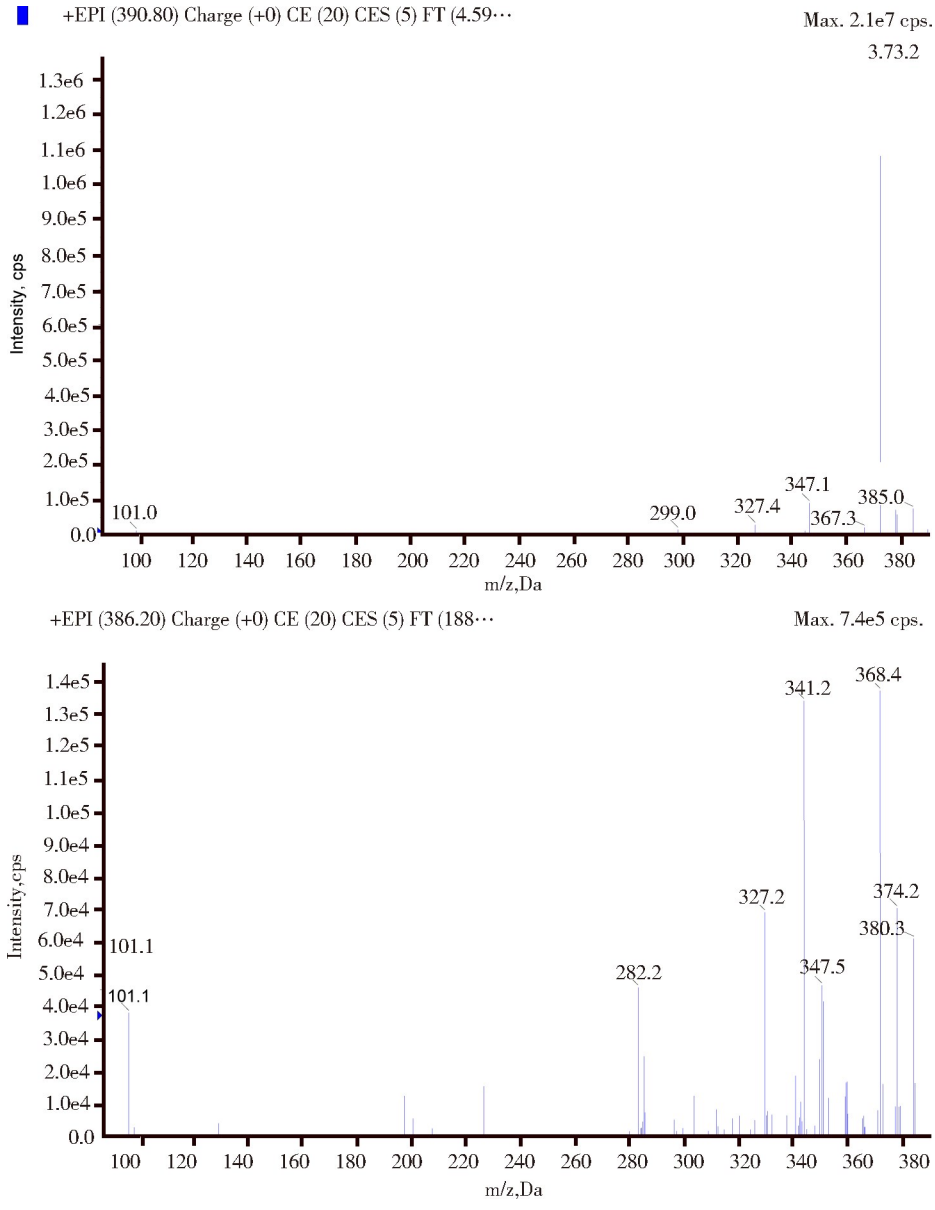
2.2　基质匹配标准曲线　按照上述系列基质匹配标准溶液浓度进行线性回归，得到的回归方程及相关系数见表 3。从表中可以看出，鸡蛋中黏菌素在 20 ~ 800 μg/kg 的浓度范围内呈现良好的线性关系，R^2 大于 0.990。

2.3　方法灵敏度　按上述方法进行处理，当添加浓度为 30 μg/kg 时，测得黏菌素的 S/N > 10，说明方法定量限为 30 μg/kg；当添加浓度为 10 μg/kg 时，测得黏菌素的 $S/N > 3$，说明方法检测

表 3　鸡蛋中黏菌素基质匹配标准曲线

Tab 3　Matrix – matched standard curve of Colistin in Eggs

药物	浓度范围/(μg · kg^{-1})	回归方程	R^2
黏菌素 A	20 ~ 800	$y = 7302.9x - 79321$	0.9983
黏菌素 B		$y = 7442x + 56345$	0.9968



1. 黏菌素 A; 2. 黏菌素 B

1. Colistin A; 2. Colistin B

图 2　空白鸡蛋添加黏菌素试样的 EPI 谱图

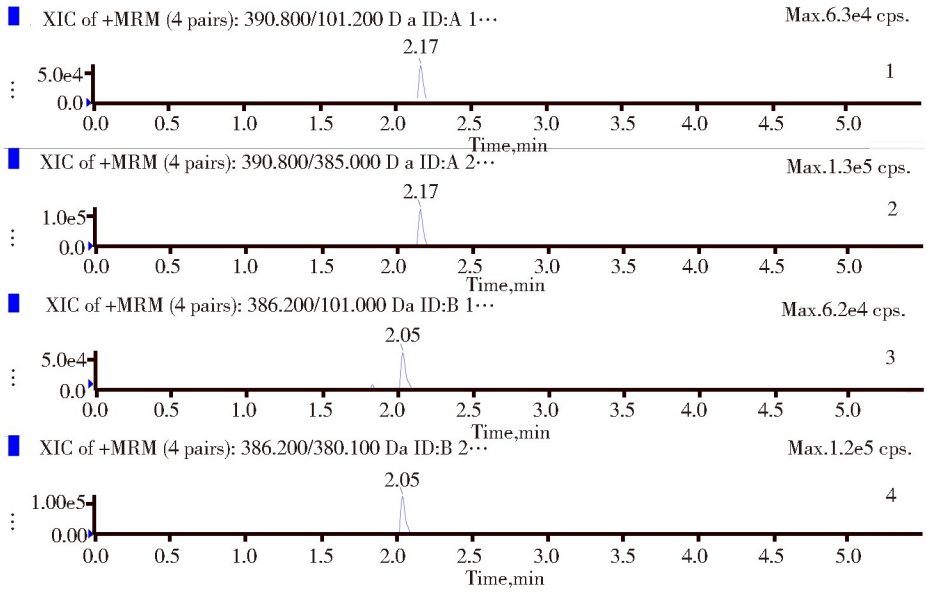
Fig 2　EPI(Enhanced Product Ion) of Colistin in blank eggs spiked samples

限为 10 μg/kg。30 μg/kg 空白鸡蛋添加试样中黏菌素的特征离子质量色谱图见图 3。

2.4　方法的回收率和精密度　在空白鸡蛋中添加低、中、高三个不同浓度的黏菌素进行回收率试验，结果汇总见表 4。可以看出，空白鸡蛋中黏菌素 A 和黏菌素 B 在 30 ~ 300 μg/kg 添加浓度范围内的回收率为 67.2% ~ 106%，批内、批间 *RSD* 均 <20%。

3　讨论与结论

3.1　提取溶剂的选择　黏菌素属于多肽类抗生素，分子结构中含有多个氨基，极性较强，易溶于水，可以使用极性溶剂进行提取，经过比较试验，本研究采用 25% 甲醇作为样品的提取液，结果表明提取充分，回收率较高。



1. 黏菌素 A(390.8 > 101.2)；2. 黏菌素 A(390.8 > 385.0)；3. 黏菌素 B(386.2 > 101.0)；4. 黏菌素 B(386.2 > 380.1)

1. Colistin A(390.8 > 101.2)；2. Colistin A(390.8 > 385.0)；3. Colistin B(386.2 > 101.0)；4. Colistin B(386.2 > 380.1)

图 3　空白鸡蛋添加试样溶液中得到的特征离子质量色谱图(30 μg/kg)

Fig 3　Qualitative ions of Colistin in Eggs(30 μg/kg)

表 4　空白鸡蛋中黏菌素添加回收试验结果

Tab 4　Recoveries of Colistin in Eggs spiked samples

药物	添加浓度/($\mu g \cdot kg^{-1}$)	批次	回收率/%					平均回收率/%	批内 *RSD*/%	批间 *RSD*/%
黏菌素 A	30.0	Ⅰ	95.7	85.3	97.7	102	83.6	92.9	8.71	8.18
		Ⅱ	87.0	99.3	101	99.2	84.1	94.0	8.32	
		Ⅲ	101	106	95.4	86.1	86.2	94.9	9.27	
	150	Ⅰ	83.1	84.4	78.3	84.5	79.7	82.0	3.44	4.42
		Ⅱ	85.5	81.7	92.8	83.1	86.1	85.9	4.99	
		Ⅲ	79.2	86.3	80.7	85.3	87.1	83.7	4.22	
	300	Ⅰ	86.9	85.9	89.3	86.3	87.8	87.2	1.53	2.01
		Ⅱ	87.4	87.1	85.8	85.8	86.2	86.5	0.87	
		Ⅲ	91.5	84.7	86.3	85.9	89.3	87.5	3.16	
黏菌素 B	30.0	Ⅰ	83.0	72.9	86.8	85.2	73.2	80.2	8.35	8.18
		Ⅱ	75.6	83.5	86.0	84.1	73.6	80.6	6.91	
		Ⅲ	89.1	85.3	80.6	72.6	68.7	79.3	10.8	
	150	Ⅰ	73.8	74.2	67.2	69.8	71.8	71.4	4.07	4.55
		Ⅱ	75.6	71.9	78.7	74.9	76.5	75.5	3.28	
		Ⅲ	68.0	68.7	71.5	71.0	70.5	69.9	2.15	
	300	Ⅰ	75.6	73.9	76.1	74.9	75.3	75.1	1.12	1.97
		Ⅱ	71.8	72.8	74.7	73.2	72.5	73.0	1.50	
		Ⅲ	76.1	74.3	76.7	74.6	75.9	75.5	1.34	

3.2　净化条件的选择　鸡蛋样品中含有蛋白质和脂肪等大量杂质,会对检测结果产生基质效应,本研究通过高速离心去除蛋白质等大量杂质的干扰,采用正己烷去除脂肪,有效地提取黏菌素药物残留。固相萃取法是常见的净化方式,黏菌素可采用 Strata - X[7] 或 HLB[13] 固相萃取柱净化,考虑到黏菌素分子结构中含有多个氨基,经过比较试验,本研究采用聚合阳离子交换 Plexa 固相萃取柱净化,可以有效吸附基质中的中性和酸性干扰物,降低基质效应。

3.3　定性分析　根据欧盟 2002/657/EC 要求,要确证黏菌素至少需要 3 个识别点(IP),在大多数检测方法中,一般选定母离子及两个响应较强的子离子作为定性定量依据,母离子是 1 个 IP 点,两个子离子分别是 1.5 个 IP 点,共 4 个 IP 点,满足检测要求。本研究采用 QTRAP 质谱仪特有的 MRM - IDA - EPI 扫描模式,对目标母离子进行 EPI 增强子离子扫描,在保留时间左右获得更多子离子的信息,得到黏菌素子离子的特征性 EPI 指纹谱图,该谱图具有高度特异性,将空白鸡蛋添加试样和黏菌素标准溶液的 EPI 谱图进行比对后,进行二次定性,得到母离子和 6 个匹配的子离子,共 10 个 IP,极大地提高了定性的准确性。

本研究利用超高效液相色谱 - 三重四极杆/线性离子阱复合质谱技术建立了鸡蛋中黏菌素的残留检测方法,前处理方法简便快速,定量准确,EPI 指纹图二次定性特异性强,极大提高了定性的准确性,为鸡蛋的食品质量安全监控提供了重要的技术支持。

参考文献:

[1] 苏 萌,艾连峰,段文仲, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定动物源食品中粘杆菌素、多粘菌素 B 的残留量[J]. 分析试验室, 2012, 31(3):73 - 77.
Su M, Ai L F, Duan W Z, *et al*. Determination of colistin and polymyxin B residues in animal derived foods by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2012, 31(3):73 - 77.

[2] 代重山, 李继昌, 李 健, 等. 硫酸黏菌素毒性及其残留检测研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(2):56 - 60.
Dai C S, Li J C, Li J, *et al*. Progress on the Toxicity and Residue Determination of Colistin Sulfate[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(2):56 - 60.

[3] Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2017, 30(2): 557 - 596.

[4] 王 影, 李艳然, 韩镌竹, 等. 多黏菌素耐药性的研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 200 - 206.
Wang Y, Li Y R, Han J Z, *et al*. Progress in drug resistance of polymyxin[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 200 - 206.

[5] European Union. Amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feeding stuffs as regards the withdrawal of authorisation for certain growth promoters[J]. Official Journal of the European Communities, 1998, 3: 347.

[6] GB 31650 - 2019. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S].
GB 31650 - 2019. National Standard - Maximum residue limits for veterinary drugs in foods[S].

[7] 曾建勇, 刘 红, 梁雪琪, 等. 鸡蛋内黏菌素类药物残留量检测方法的建立[J]. 河南农业科学, 2014, 43(1): 131 - 135.
Zeng J Y, Liu H, Liang X Q, *et al*. Determination of Colistions Residues in Eggs by High Performance Liquid Chromatography - tandem M ass Spectrometry[J]. Journal of Henan Agricutural Sciences, 2014, 43(1): 131 - 135.

[8] 梁雪琪, 刘 红, 何凤芹. 液相色谱 - 串联质谱法测定牛奶中黏杆菌素和多黏菌素 B 的残留量[J]. 现代农业科技, 2013, (22): 260 - 268.
Liang X Q, Liu H, He F Q. Determination of Colistin and Polymycin B Residues in Milk by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spetrometry[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2013, (22): 260 - 268.

[9] 贾 涛. 液相色谱 - 串联质谱法测定饲料中硫酸黏菌素[J]. 饲料广角, 2014, 000(003): 37 - 39.
Jia T. Determination of Colistin Sulfate in Feed by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry[J]. Feed China, 2014, 000(003): 37 - 39.

[10] 刘佳佳, 金 芬, 佘永新, 等. 液相色谱串联质谱法测定牛奶中 5 种多肽类抗生素[J]. 分析化学, 2011, 39(5): 652.
Liu J J, Jin F, She Y X, *et al*. Simultaneous Determination of 5 Peptide Antibiotics in Bovine Milk Samples by Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2011, 39(5): 652.

[11] 丁焕中, 吴洁珊, 武 力, 等. 动物组织黏菌素残留柱前衍生化高效液相色谱 - 荧光检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(5):461 - 464.
Ding H Z, Wu J S, Wu L, *et al*. Development of high performance liquid chromatography - fluorescence with pre - column derivatization for detection of colistin residue in animal tissue[J]. Veterinary Science in China, 2009, 39(5):461 - 464.

[12] 刘 柱, 华 颖, 徐潇颖. 同位素稀释 - 超高效液相色谱 - 线性离子阱串联质谱分析谷物及其制品中呕吐毒素及其衍生物和代谢物[J]. 分析化学, 2016, 44(11): 1728 - 1734.
Liu Z, Hua Y, Xu X Y, *et al*. Analysis of deoxynivalenol and related derivatives and metabolites in cereal and cereal products by ultra performance liquid chromatography - quadrupole linear ion trap mass spectrometry with isotopic dilution [J]. Chinese J Anal Chem, 2016, 44(11): 1728 - 1734.

[13] 耿 宁, 卢 剑. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定肌肉组织中 4 种兽药残留[J]. 肉类研究, 2017, 31(8):39 - 43.
Geng N, Lu J. Simultaneous Determination of Four Veterinary Drugs in Edible Muscle Tissues by High Performance Liquid Chromatography - Ttandem Mass Spectrometry [J]. Meat Research, 2017, 31(8):39 - 43.

(编 辑:侯向辉)