

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.03.05

鸡蛋及牛奶中四环素类药物残留量的液相色谱-串联质谱测定法

张崇威¹, 李华岑¹, 陈 蔷¹, 彭 丽¹, 张振宇^{2*}, 吴志明¹

(1. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008; 2. 济源市畜产品质量监测检验中心, 河南济源, 459000)

[收稿日期] 2021-11-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 03-0035-11 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了一种测定鸡蛋及牛奶中四环素类药物残留量的液相色谱-串联质谱方法。样品经 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液提取, 经快速滤纸过滤, 并经加脱脂棉的 HLB 固相萃取柱净化, 洗脱液氮气吹至小于 1 mL, 加 30% 甲醇至 1 mL 并混匀, 液相色谱-串联质谱法检测, 基质匹配标液外标法定量。结果表明, 四环素类药物在 5~100 μg/kg 的浓度范围内呈现良好的线性关系。在鸡蛋及牛奶中四环素类药物的检测限均为 2 μg/kg, 定量限均为 5 μg/kg。在 LOQ~2MRL (多西环素为 LOQ~10LOQ) 添加浓度范围内, 四环素类药物的回收率均在 81.2%~110.0% 之间, 批内、批间变异系数均小于 11.4%。该方法各项技术指标均能满足残留检测要求, 且方法的重现性良好, 满足国内外兽药残留检测的相关规定。

[关键词] 鸡蛋; 牛奶; 四环素类; 残留; 液相色谱-串联质谱

Determination of Tetracyclines Residues in Eggs and Milk by Liquid Chromatography – mass Spectrometry

ZHANG Chong-wei¹, LI Hua-cen¹, CHEN Qiang¹, PENG Li¹, ZHANG Zhen-yu^{2*}, WU Zhi-ming¹

(1. Henan Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450008, China;

2. Jiyuan City Animal Product Quality Monitoring and Testing Center, Jiyuan, Henan 459000, China)

Corresponding author: ZHANG Zhen-yu, E-mail: 56828730@qq.com

Abstract: To establish a method for testing the tetracyclines residues in eggs and milk by liquid chromatography – tandem mass spectrometry, the samples were extracted with McIlvaine – Na₂EDTA buffer, filtered through fast filter paper, and purified by HLB solid phase extraction column with absorbent cotton. The eluent was blown with nitrogen to less than 1 mL, then added with 30% methanol solution to 1 mL and mixed, and tested by liquid chromatography – mass spectrometry, matrix matching solution external standard method for quantification. The results showed a good linear relationship between the range of 5 to 100 μg/kg concentrations. The detection limit

作者简介: 张崇威, 硕士, 从事兽药残留检测与研究。

通讯作者: 张振宇, E-mail: 56828730@qq.com

and the limit of quantification of tetracyclines were 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively both in eggs and in milk. The recoveries of tetracyclines were all between 81.2% and 110.0%, and the coefficients of variation within and between the batches were less than 11.4% when the concentration was at the range of LOQ to 2MRL (doxycycline: LOQ to 10LOQ). The technical indicators of this method can meet the requirements of residue testing, and the method has good reproducibility, and meets the relevant regulations of home and abroad on testing residues of veterinary drugs.

Key words: egg; milk; tetracycline; residues; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

四环素类药物属于对革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌均敏感的人工合成抗生素^[1-2],作用机理为其与细菌核蛋白体的 30 s 亚基团结合,阻止 aa-tRNA 同核蛋白体结合,从而阻止肽链延伸和细菌蛋白质合成^[3],作为一类广谱抗生素已被广泛应用于畜禽等养殖环节的疾病治疗中。但由于养殖户的滥用、盲用、不遵守休药期使用等多种原因,四环素类药物及其代谢物易在肝肾中富积并随乳汁分泌排出而流入食物链^[4],并且作为饲料添加剂,造成鸡蛋中药物残留问题不断增多,影响牙齿及骨骼发育、肠道菌群失调、细菌耐药以及环境污染等诸多问题^[5],因此,国内外都对四环素类药物残留实施了严格的监控^[6],我国在 GB31650-2019 中也明确规定:牛/羊奶中土霉素、金霉素、四环素单个或组合最大残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,鸡蛋中土霉素、金霉素、四环素单个或组合最大残留限量为 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$,多西环素为泌乳期禁用。目前尚无牛奶及鸡蛋中同时检测 4 种四环素类化合物残留检测的国标,且相关文献也较少,因此,对建立一种同时适用于牛奶及鸡蛋中 4 种四环素类药物残留检测方法具有重要意义。现有相关国标主要为 GB/T 21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法、农业部 1025 号公告-12-2008 鸡肉、猪肉中四环素类药物残留检测-液相色谱串联质谱法。前者定量限偏高,已与目前高灵敏度仪器不相符,且适用范围不包含鸡蛋基质,后者适用范围缺少多西环素物质。目前文献报道的方法主要有微生物法^[7-10]、免疫检测法^[11-13]、毛细管电泳法^[14-16]、薄层色谱法^[17]、高效液相色谱法^[1,3,18-24]、液质联用

法^[25-30],近年由于固相萃取柱(SPE)结合液相色谱串联质谱仪的普及,以及其高通量、高灵敏度、高效率的特性,越来越成为残留检测的主要手段。现有国标及文献报道的四环素类残留检测的提取液均以水相 McIlvaine-Na₂EDTA 缓冲液为主,对于含有较细固体颗粒的样品,极易造成在前处理过程中 SPE 小柱净化浓缩时严重堵柱现象,无法继续过柱,造成实验失败。部分国标或文献采取部分提取液过柱的方法从而减少堵柱现象,但这大大降低了方法的灵敏度。本研究从优化前处理过程:将提取液过快速滤纸,并在 HLB 小柱内添加脱脂棉的方法,可将全部提取液净化浓缩,从而提高方法灵敏度,为四环素类残留的检测提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 Waters Acquity UPLC-Xevo TQ-S 三重四极杆串联质谱仪(配电喷雾离子源)(waters 公司);ES3200 型天平(感量 0.01 g)(METTLER 公司);S470-K 型酸度计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);3K-30 型台式高速冷冻离心机(德国 sigma 公司);TARGIN TECH VX-03 多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);TTL-DC II 型 24 位水浴氮吹仪;Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司);KQ 5800 B 型超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);IKA MS3 Basic 圆周振荡器(广州仪科实验室技术有限公司)。

1.2 对照品与试剂 四环素、土霉素、金霉素、多西环素标准品均购自中国兽医药品监察所,含量分别为 95.0%,97.6%,92.1%,85.2%。乙二胺四乙酸二钠(Na₂EDTA·2H₂O),优级纯;磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O),分析纯;柠檬酸(C₆H₈O₇·

H₂O), 分析纯。Mellvaine - Na₂EDTA 缓冲盐: 将 37.2 g C₆H₈O₇ · H₂O, 27.6 g Na₂HPO₄ · 12H₂O, 37.2 g Na₂EDTA · 2H₂O 溶于 1000 mL 水中, 混匀即得。甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯, 购自 Fluck 公司; HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL, 用前在管中加入适量脱脂棉), 天津市天兴达科技有限公司; 水为一级水。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制 分别精密称取 4 种四环素类药物各约 10 mg, 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 四环素类药物的标准贮备液。准确吸取 0.1 mL 标准贮备液至另一 10 mL 容量瓶中, 用 30% 甲醇溶解并稀释至刻度, 配制成 10 μg/mL 标准工作液。

1.3.2 样品采集与制备 鸡蛋采自超市, 牛奶采自奶牛养殖基地。经检测均无四环素类药物残留。将鸡蛋蛋清蛋黄均质匀浆, 同牛奶分别置于 50 mL 离心管备用。

1.3.3 样品前处理 提取: 取试料 2 g (精确至 ± 0.05 g), 于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 Mellvaine - Na₂EDTA 缓冲液 10 mL, 振荡 10 min, 低温(5 ℃) 14000 r/min 离心 10 min, 吸取上层液体于另一 50 mL 离心管中。重复用 10 mL Mellvaine - Na₂EDTA 缓冲液提取 1 次, 合并提取液并混匀, 低温(5 ℃) 14000 r/min 离心 10 min, 取鸡蛋试样上清液备用; 奶试样上清液经快速滤纸过滤后备用。净化: 固相萃取柱依次用甲醇、水各 3 mL 活化, 备用液过柱, 用水 3 mL, 5% 甲醇(V/V) 3 mL 淋洗, 抽干, 甲醇 3 mL 洗脱, 抽干, 收集洗脱液于带刻度的玻璃管中, 于 45 ℃ 下氮气吹至液体小于 1 mL, 加 30% 甲醇至 1.00 mL, 涡旋混匀, 溶液浓度超出曲线范围时需用空白基质复溶液(按该处理方法处理空白样品至“加 30% 甲醇至 1.00 mL”混匀即得) 稀释至溶液浓度在曲线浓度范围内, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.3.4 仪器条件 色谱参考条件: 色谱柱为 Waters Acquity BEH C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸水溶液。梯度洗脱程序见表 1; 柱温: 35 ℃; 进样量: 10 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min Time	流速/(mL · min ⁻¹) Flow rate	A/%	B/%	曲线 Curve
0	0.30	10	90	/
4.0	0.30	40	60	6
5.0	0.30	10	90	1

质谱参考条件: 离子源: 电喷雾(ESI)离子源; 扫描方式: 正离子; 检测方式: 多反应离子监测(MRM); 电离电压: 3.3 kV; 锥孔电压: 25 V; 源温: 150 ℃; 脱溶剂气温度: 450 ℃; 锥孔气流速: 150 L/h; 脱溶剂气流速: 800 L/h; 定性、定量离子对、离子源、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 定性、定量离子及对应的锥孔电压和碰撞能量

化合物名称 Compound	定性离子对(m/z) Qualitative	锥孔电压/V Cone volt	碰撞能量/eV Collision energy
土霉素	461.16 > 426.10	14.0	16.0
	461.16 > 283.02	14.0	36.0
四环素	445.16 > 153.99	2.0	24.0
	445.16 > 410.10	2.0	16.0
金霉素	479.16 > 153.99	2.0	24.0
	479.16 > 444.04	2.0	18.0
多西环素	445.18 > 153.99	34.0	28.0
	445.18 > 321.04	34.0	28.0

1.3.5 基质标准曲线的制备 准确量取标准溶液(1.3.1 项) 适量, 用 30% 甲醇稀释成浓度为 100 ng/mL 的标准中间液。分别准确量取标准中间液 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL 于空白基质洗脱液中(空白基质洗脱液: 按 1.3.3 项方法处理样品至“甲醇 3 mL 洗脱”时所收集的液体即为空白基质洗脱液, 下同), 并同样品同步处理后供液相色谱 - 串联质谱仪测定。按对照溶液浓度及相应峰面积作标准曲线, 并计算回归方程及相关系数。

1.3.6 方法灵敏度确定 采用空白样品中添加目标化合物的方法, 依据特征离子质量色谱峰信噪比 S/N ≥ 3 的浓度为方法检测限, S/N ≥ 10 的浓度为

方法定量限,添加适量标准溶液于 2 g 空白试样中,制备得到一定浓度的添加样品,经前处理后检测,在相应的保留时间,空白试样对所测药物无干扰,测定灵敏度。

1.3.7 准确度和精密度的测定 采用标准添加法,分别准确称取空白样品 2 g,添加一定体积的标准工作溶液,使样品中各药物浓度分别为 LOQ、1/2MRL、MRL、2MRL(土霉素、四环素及金霉素)与 LOQ、2LOQ、10LOQ(多西环素),按 1.3.3 项方法处理后进行测定,一日内每种药物每个添加浓度取 5 个平行样品分别进行测定,重复测定 3 d,外标法基质标准曲线定量,计算回收率和批内、批间相对标准偏差(RSD)。

2 结果与分析

2.1 基质匹配标准曲线 准确量取浓度为 100 ng/mL 的混合标准中间液 0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL 于空白基质洗脱液(1.3.5 项)中, N₂ 吹至小于 1 mL,加 30% 甲醇至 1.00 mL,充分混匀,过微孔滤膜,作为基质匹配标准溶液上机测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,基质匹配标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,4 种药物的回归方程及相关系数 r 见表 3,由表 3 可见,4 种药物在 5 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的浓度范围内呈现良好的线性关系,相关系数 r 均大于 0.9990。图 1 为空白鸡蛋中添加浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的特征离子质量色谱图。

表 3 回归方程相关系数

Tab 3 Standard curve and correlation coefficient

药物 Drugs	鸡蛋 egg		牛奶 milk	
	回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation(r)	回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation(r)
土霉素	$y = 52644.2x + 23078.6$	0.9993	$y = 76991.0x + 35464.3$	0.9996
四环素	$y = 51104.4x - 15069.4$	0.9997	$y = 84655.8x - 53.161.4$	0.9998
金霉素	$y = 21680.4x + 949.8$	0.9994	$y = 29458.4x + 3345.1$	0.9991
多西环素	$y = 5550.9x + 1313.6$	0.9991	$y = 6824.8x - 2570.6$	0.9994

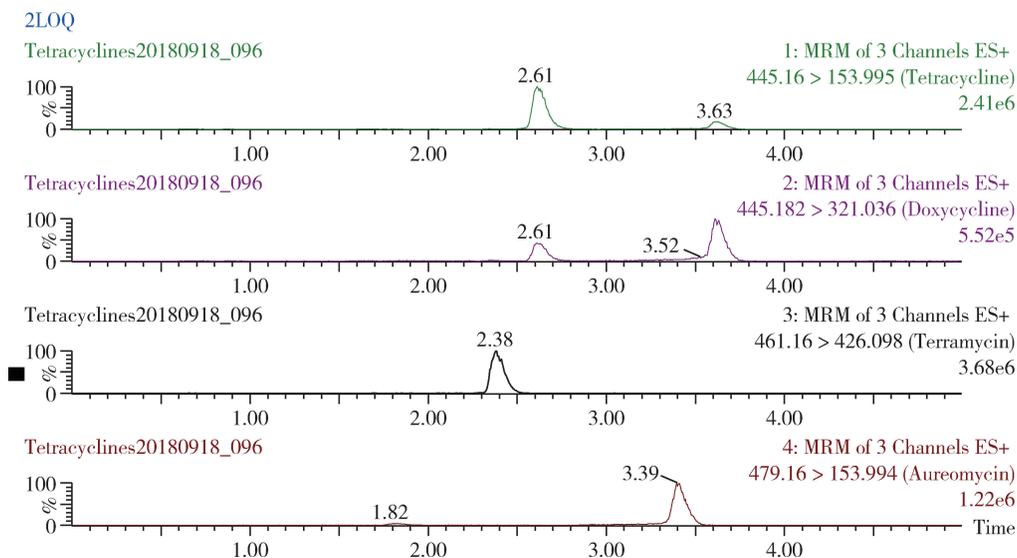


图 1 空白鸡蛋中添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 四环素类药物特征色谱图

Fig 1 Characteristic chromatogram of blank eggs with 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tetracyclines

2.2 方法灵敏度 按 1.3.3 项所述方法进行处理, 依据特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N \geq 3$ 的浓度为方法检测限, $S/N \geq 10$ 的浓度为方法定量限, 得出四

环素类化合物在鸡蛋及牛奶中的检测限均为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限均为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。空白鸡蛋中添加 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 四环素类药物的特征离子质量色谱图见图 2。

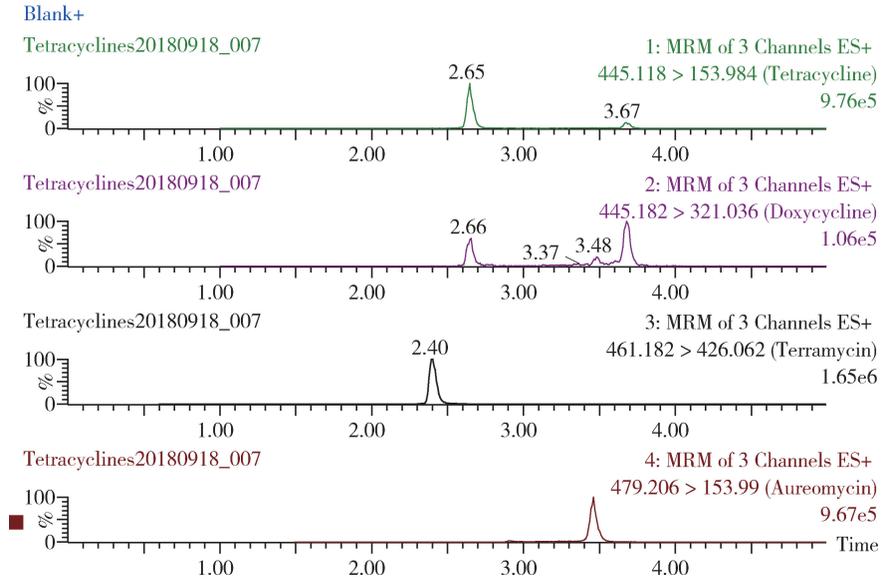


图 2 空白鸡蛋中添加 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 四环素类药物特征色谱图

Fig 2 Characteristic chromatogram of blank eggs with $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ tetracyclines

2.3 方法准确度及精密度 在空白鸡蛋及牛奶中添加土霉素、四环素、金霉素的 LOQ、 $1/2\text{MRL}$ 、 MRL 、 2MRL 及多西环素 LOQ、 2LOQ 、 10LOQ 等不同浓度的添加量进行回收率实验, 结果汇总见表 4、表 5, 可知, 四环素类药物在该添加浓度水平范围内,

在鸡蛋基质中回收率范围为 $81.5\% \sim 110.0\%$ 之间, 在牛奶基质中回收率 $81.2\% \sim 109.8\%$ 之间, 批内批间 RSD 均小于 11.4% 。结果表明本方法定量准确, 重复性好。

表 4 空白鸡蛋中添加四环素类药物回收率试验结果

Table 4 Recoveries of tetracyclines added to blank eggs

化合物 Compound	添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ Concentration $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	批次 Batch	回收率/% Recovery (%)					批内平均回收率/% Average recovery within batch (%)	批内 RSD /% RSD within batch (%)	平均回收率/% Average recovery (%)	批间 RSD /% RSD between batches (%)
土霉素	5	I	109.5	99.0	108.8	101.6	87.7	101.3	8.7	96.6	7.4
		II	93.5	104.5	97.6	96.6	92.7	97.0	4.8		
		III	95.5	87.2	88.3	96.6	89.5	91.4	4.7		
	200	I	90.3	105.5	106.8	90.9	97.9	98.3	7.9	99.0	7.6
		II	104.5	100.5	106.0	99.0	107.3	103.4	3.5		
		III	86.2	105.1	102.1	97.9	85.5	95.4	9.5		
	400	I	105.6	98.5	87.9	105.9	89.1	97.4	8.9	98.5	6.9
		II	97.8	108.5	105.5	90.9	103.4	101.2	6.9		
		III	96.6	90.2	102.1	94.3	100.9	96.8	5.0		
	800	I	88.0	92.7	101.6	85.9	91.1	91.8	6.6	93.3	6.4
		II	102.9	101.1	96.3	97.7	86.6	96.9	6.5		
		III	95.2	82.9	93.2	92.8	92.1	91.2	5.3		

续表

化合物 Compound	添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ Concentration $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	批次 Batch	回收率/% Recovery(%)					批内平均回收 率/% Average recovery within batch(%)	批内 RSD/% RSD within batch(%)	平均回收 率/% Average recovery (%)	批间 RSD/% RSD between batches (%)
四环素	5	I	106.4	93.2	109.8	98.2	95.4	100.6	7.1	101.7	7.5
		II	94.0	107.1	107.9	89.5	89.3	97.6	9.5		
		III	108.6	109.9	102.9	103.7	109.3	106.9	3.1		
	200	I	88.8	96.5	107.1	88.7	103.1	96.8	8.6	99.8	8.5
		II	107.4	99.2	89.3	91.5	98.5	97.2	7.3		
		III	108.3	108.8	109.7	109.9	90.2	105.4	8.1		
	400	I	100.0	94.1	94.7	96.6	106.1	98.3	5.0	97.9	5.7
		II	107.6	96.9	93.8	93.1	98.1	97.9	5.9		
		III	94.1	92.4	109.8	94.7	96.9	97.6	7.2		
	800	I	95.3	104.1	100.9	87.3	92.	96.0	7.0	96.7	6.5
		II	104.2	92.2	89.7	106.6	92.1	97.0	8.1		
		III	104.5	91.6	100.7	92.8	95.5	97.0	5.6		
金霉素	5	I	84.2	92.9	98.3	82.5	91.4	89.9	6.5	94.5	8.9
		II	95.0	104.3	96.8	89.8	108.3	98.8	7.4		
		III	86.1	108.4	102.6	87.7	88.6	94.7	10.1		
	200	I	89.5	98.8	100.4	99.3	95.3	96.6	4.4	96.4	8.0
		II	108.1	81.5	98.2	100.1	103.6	98.3	10.1		
		III	85.3	88.6	91.3	107.1	98.5	94.2	8.7		
	400	I	96.4	106.3	110.0	105.7	102.0	104.1	5.1	98.2	9.4
		II	103.1	87.1	81.8	88.6	102.1	92.5	9.6		
		III	104.0	107.0	87.5	87.1	103.9	97.9	9.8		
	800	I	105.1	83.9	99.5	99.4	105.8	98.7	9.0	96.8	8.4
		II	103.3	86.9	90.7	94.7	109.6	97.0	9.6		
		III	96.1	105.0	86.7	88.2	97.3	94.7	7.8		
多西环素	5	I	82.8	97.4	85.5	106.2	93.9	93.2	10.1	94.8	7.6
		II	97.1	97.8	97.3	91.3	108.8	98.4	6.5		
		III	93.7	90.1	100.4	85.6	94.5	92.8	5.9		
	10	I	101.0	105.2	108.5	100.2	90.4	101.1	6.8	100.4	6.3
		II	98.4	105.3	87.3	104.2	99.7	99.0	7.3		
		III	101.9	105.2	96.1	94.1	108.3	101.1	5.9		
	50	I	82.7	90.5	95.2	93.4	82.7	88.9	6.6	92.6	9.7
		II	84.7	84.6	106.1	94.2	82.6	90.5	10.9		
		III	109.3	84.0	101.4	96.2	101.0	98.4	9.5		

表 5 空白牛奶中添加四环素类药物回收率试验结果

Tab 5 Recoveries of tetracyclines added to blank milk

化合物 Compound	添加浓度/ Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次 Batch	回收率/% Recovery					批内平均回收 率/% Average recovery within batches	批内 RSD/% RSD within batches	平均回 收率/% Average recovery	批间 RSD/% RSD between batches
土霉素	5	I	94.9	88.7	85.4	89.7	95.0	90.7	4.6	95.9	7.4
		II	86.1	94.3	99.8	108.9	102.5	98.3	8.8		
		III	97.3	99.0	107.5	90.6	99.2	98.7	6.1		
	50	I	89.7	107.8	92.3	90.4	98.6	95.8	7.9	96.2	7.4
		II	103.1	88.5	98.6	99.6	96.2	97.2	5.6		
		III	92.9	85.3	109.5	91.1	99.9	95.7	9.7		
	100	I	106.0	106.4	91.5	96.0	102.6	100.5	6.5	101.0	6.4
		II	106.2	109.4	88.3	103.3	107.4	102.9	8.2		
		III	99.7	95.7	107.9	97.3	96.6	99.4	5.0		
	200	I	100.2	91.3	93.3	104.2	89.4	95.7	6.6	95.8	6.5
		II	93.1	82.6	100.8	99.1	94.5	94.0	7.6		
		III	97.6	102.7	99.6	87.0	100.8	97.6	6.3		
四环素	5	I	91.0	107.6	103.6	101.1	104.4	101.5	6.2	98.0	5.6
		II	93.1	98.9	95.0	95.3	104.8	97.4	4.8		
		III	97.0	88.1	99.5	94.1	96.7	95.1	4.6		
	50	I	92.0	103.1	107.7	107.3	88.8	99.8	8.8	100.4	7.3
		II	93.7	108.8	91.7	94.0	94.2	96.5	7.2		
		III	107.1	97.3	107.9	107.6	104.2	104.8	4.2		
	100	I	94.8	91.9	92.1	104.3	89.0	94.4	6.2	100.0	6.4
		II	107.8	100.5	92.7	107.1	107.4	103.1	6.4		
		III	104.0	98.1	104.9	103.8	101.0	102.4	2.7		
	200	I	96.9	97.8	104.9	100.7	85.7	97.2	7.3	96.1	6.0
		II	87.2	102.5	96.4	95.5	95.0	95.3	5.7		
		III	97.0	100.3	96.2	85.7	99.1	95.6	6.1		
金霉素	5	I	90.4	87.8	99.2	87.5	87.8	90.6	5.5	94.3	9.2
		II	83.9	107.5	93.4	109.5	107.7	100.4	11.2		
		III	102.8	93.3	89.0	88.6	86.7	92.1	7.0		
	50	I	103.6	81.2	106.5	99.8	92.9	96.8	10.4	96.8	10.1
		II	99.6	90.2	105.5	81.4	82.9	91.9	11.4		
		III	95.4	109.5	109.8	101.2	92.4	101.6	7.8		
	100	I	91.7	87.9	99.4	98.9	86.9	93.0	6.4	4.3	8.2
		II	91.2	87.7	104.6	83.0	100.4	93.4	9.6		
		III	99.7	105.5	86.9	86.5	104.3	96.6	9.6		
	200	I	100.1	96.5	98.4	85.3	90.4	94.1	6.5	94.3	6.7
		II	96.7	95.0	98.2	105.8	101.8	99.5	4.3		
		III	92.2	94.9	87.4	85.4	86.1	89.2	4.7		
多西环素	5	I	109.3	99.8	107.9	86.9	97.0	100.2	9.0	99.6	8.4
		II	90.6	105.0	97.7	88.3	102.5	96.8	7.5		
		III	109.2	107.6	87.0	108.6	96.8	101.8	9.6		
	10	I	109.3	94.3	108.4	109.2	86.6	101.6	10.3	98.2	8.8
		II	89.9	106.1	96.2	90.4	101.6	96.9	7.3		
		III	89.4	91.2	88.3	103.6	108.0	96.1	9.4		
	50	I	101.6	103.2	83.2	105.4	88.7	96.4	10.2	95.2	10.0
		II	86.2	84.2	85.7	89.6	105.1	90.2	9.5		
		III	84.7	105.0	109.3	94.4	101.4	99.0	9.8		

3 讨论与结论

3.1 提取溶剂及添加量的选择 考虑到四环素类药物具有较强的极性,易与金属离子螯合形成配合物^[31],影响其溶解性,且易与生物样品中的蛋白质形成共轭物,以上两点造成提取困难,回收率低,同时还需考虑到沉淀蛋白的操作,因此,提取生物样品时往往需加入金属络合剂和强酸或酸性去蛋白试剂,Michael^[32]报道了沉淀蛋白的多种处理方式,如溶剂萃取、有机溶剂与酸性化合物混合提取、1%三氯乙酸等,本研究在考虑这些方法的同时,也考察了乙酸锌和亚铁氰化钾(1:1)、硫酸铵、低浓度硫酸水溶液等,均不同程度使回收率明显降低,甚至无法检测到目标物,例如加入硫酸水溶液,而有机溶剂易造成蛋白变性,提取率低。因此,拟采用含金属络合剂的酸性水相提取液。本方法参考了国家标准(GB/T 22990-2008、农业农村部 1025 号公告-12-2008、GB/T 21317-2007)、美国农业部 FSIS 官方的分析方法以及其他的相关文献,提取液采用了 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(pH 4.0)进行提取。依据 GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测中附录 F 检测方法确认的技术要求,本研究对已制定最高残留限量的四环素、土霉素、金霉素的添加量在 LOQ、1/2MRL、MRL、2MRL 水平,对禁用物质多西环素的添加量在 LOQ、2LOQ、10LOQ 水平,且回收率均满足该规范的要求。

3.2 净化条件选择 参照国标 GB/T 21317-2007、农业农村部 1025 号公告-12-2008 等,本试验优先选择规格为 60 mg/3 mL 的 HLB 固相萃取柱,但在试验过程中出现严重堵柱现象,通过对比 Waters HLB 与国产 HLB 固相萃取柱,同时采用低温高速离心,发现国产 HLB 柱过柱过程优于 Waters HLB。在过滤环节,本研究比较了定性滤纸与定量滤纸的差别,定量滤纸出现堵塞现象,而快速定性滤纸过滤效果明显且过程顺利,同时在净化柱内添加脱脂棉后,堵柱现象明显改善,取得了满意效果。但鸡蛋过滤纸后,在过固相萃取柱时出现了严重堵柱现象,反而未过滤纸的提取液比较容易过萃取

柱,考虑为鸡蛋式样中的脂溶性物质较多,利于试样的过柱,故鸡蛋采取提取液经高速冷冻离心后直接过柱。此操作使得四环素类药物在鸡蛋及牛奶中回收率范围在 81.2%~110.0%之间,批内、批间变异系数均小于 11.4%,定量限为 5 μg/kg。优于 E Yoshida^[31]等报道的牛奶基质中四环素类药物回收率范围为 70%~120%、变异系数小于 25%、定量限为 10 μg/kg 以及 Michael^[32]等报道的鸡蛋基质中四环素类回收率范围为 45%~55%、定量限为 10~50 μg/kg。净化效果显著。

3.3 质谱条件优化 将适当浓度的四环素类单标溶液进样,以正离子模式进行一级质谱图扫描,发现各化合物的[M+H]⁺峰较强,选择[M+H]⁺作为母离子,进行子离子扫描,并从中选择响应值较高的两个子离子分别是定量离子和定性离子。根据欧盟 2002/657/EC 要求,要确证该类物质至少需要 3 个识别点(IP),因此,分别选择了母离子以及对应的两个响应较强的子离子作为定性定量依据,这样一个母离子 1 个 IP 点,对应两个子离子分别 1.5 个 IP 点,满足 3 个 IP 点的要求,符合了欧盟有关法规的要求。另外,实验比较了氮气吹干后加 1.00 mL 30% 甲醇复溶及氮气吹至小于 1.00 mL 后加 30% 甲醇定容至 1.00 mL,后者方法回收率明显提高,考虑原因为四环素类特别是多西环素药物在高温干燥的环境下分解速度加快。

4 实际样品检测

采用本方法对市场上购买的 98 批鸡蛋及 100 批牛奶样品进行检测分析,结果显示:9 批鸡蛋样品检出土霉素,结果为 5.68~53.2 μg/kg,3 份鸡蛋检出金霉素,结果为 8.51~26.5 μg/kg,3 批鸡蛋检出多西环素,结果为 11.6~256 μg/kg。1 批牛奶检出多西环素,结果为 11.1 μg/kg。说明在养殖环节中存在使用该类药物的现象,此方法可用于鸡蛋及牛奶中四环素类化合物残留的测定,降低食品安全隐患。

本研究通过优化样品提取净化分离条件,建立了利用液相色谱-串联质谱检测鸡蛋及牛奶中四环素类药物残留量的方法,与国标 GB/T 21317-

2007 及农业农村部 1025 号公告 - 12 - 2008 方法相比,提高了方法灵敏度,弥补了国标方法适用基质范围窄的问题,重现性好,操作简便,能够满足对鸡蛋及牛奶中四环素类药物残留分析检测,为兽药残留检测工作提供技术支持。

参考文献:

- [1] 高广慧,李阳,孙晓娟,等. HPLC 法测定牛羊肉中土霉素、四环素、金霉素残留量[J]. 食品研究与开发,2013,34(16): 94-96.
Gao G H, Li Y, Sun X J, *et al.* Determination of Oxytetracycline, Tetracycline and Chlortetracycline Residues in Beef and Mutton by HPLC[J]. Food Research and Development, 2013, 34(16): 94-96.
- [2] 孟娟,杨永红. 超高效液相色谱-串联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(06):546-549.
Meng J, Yang Y H. Simultaneous determination of tetracyclines and quinolones residues in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2012, 24(06): 546-549.
- [3] 高旭东,陈士恩,叶永丽,等. 高效液相色谱法测定畜禽肉及三文鱼中土霉素、四环素和金霉素残留[J]. 食品安全质量检测学报 2014,5(02):369-376.
Gao X D, Chen S E, Ye Y L, *et al.* Determination of terramycin, minocycline and aureomycin in livestock, poultry meat and salmon by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection 2014, 5(02): 369-376.
- [4] 杨红梅,王浩,刘艳琴,等. 高效液相色谱-质谱联用测定乳制品中 6 种四环素类抗生素[J]. 中国乳品工业,2007,(11): 50-52.
Yang H M, Wang H, Liu Y Q, *et al.* Determination of minocycline, Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, methacycline and doxycycline in milk products with LC-MS[J]. Chinese Dairy Industry, 2007, (11): 50-52.
- [5] 钟伟龙,吴云普,吕飞,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中四环素类药物残留[J]. 农业灾害研究,2012,(01):33-35.
Zhong W L, Wu Y P, Lv F, *et al.* Determination of Tetracyclines Residue in Feed by UPLC-MS/MS[J]. Study on Agricultural Hazards, 2012, (01): 33-35.
- [6] 李佩佩,陈雪昌,张小军,等. 高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中 3 种四环素类药物残留量[J]. 广州化工,2012,40(06):105-107.
Li P P, Chen X C, Zhang X J, *et al.* Simultaneous Determination of 3 Tetracyclines Residues in Aquatic Products by HPLC with Fluorescence Detection [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2012, 40(06): 105-107.
- [7] Cat harina Y W A, wen hong L, A bridging study between Liquid chromatography and microbial inhibition assay method for determining amoxicillin residues in catfish muscle[J]. Journal of AOAC International, 1998, 81(1): 3.
- [8] 陆孙琴,李轶,黄晶晶,等. 污水处理厂二级出水中总异养菌群对 6 种抗生素的耐受性研究[J]. 环境科学,2011,11(32): 3419-3424.
Lu S Q, Li Z, Huang J J, *et al.* Antibiotic Resistance of Bacteria to 6 Antibiotics in Secondary Effluents of Municipal Wastewater Treatment Plants [J]. Environmental Science, 2011, 11(32): 3419-3424.
- [9] 刘兴泉,冯震,姚蕾,等. 采用高通量微生物法检测四种抗生素在鸡蛋中的残留[J]. 现代食品科技,2011,27(4): 465-467.
Liu X Q, Feng Z, Yao L, *et al.* Analysis of Tetracycline and Neomycin Antibiotic Residues in Eggs using throughout Microbial Assay[J]. Modern Food Technology 2011, 27(4): 465-467.
- [10] 邢进,冯育芳,岳秉飞,等. 微生物法检测实验动物血清中的抗生素残留[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(4): 57-60.
Xing J, Feng Y F, Yue B F, *et al.* Antibiotic residue monitoring in laboratory animal serum by microbial inhibition test [J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2013, 23(4): 57-60.
- [11] 李嘉嘉,赵振升,张代宝,等. 四环素残留的免疫学检测方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(03):227-230.
Li J J, Zhao Z S, Zhang D B, *et al.* Research Progress on Immunoassay in Tetracycline Residues [J]. China Animal Husbandry and Veterinary, 2013, 40(03): 227-230.
- [12] 国占宝,武玉香,田文礼,等. 食品中四环素类残留的酶联免疫检测试剂盒的研制[J]. 食品科学,2011,32(02): 333-337.
Guo Z B, Wu Y X, Tian W L, *et al.* Development of A New ELISA Kit for Tetracycline Residue Detection in Foods [J]. Food Science, 2011, 32(02): 333-337.
- [13] 林杰,黄晓蓉,郑晶,等. 放射免疫法快速检测猪尿样中的四环素类药物残留[J]. 饲料工业,2009,30(15):45-47.
Lin J, Huang X R, Zheng J, *et al.* Detection of tetracyclines in pork urine by radioimmunoassay method [J]. Feed Industry, 2009, 30(15): 45-47.
- [14] 玛尔江·巴哈提别克,薛云云,王彦,等. 应用加压毛细管电

- 色谱技术检测鸡蛋中四环素类兽药残留的研究[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(07): 536-539+561.
- Ma E J · BHTBK, Xue Y Y, Wang Y, *et al.* Pressurized capillary electrochromatography for analysis of tetracyclines insecticides in egg[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2011, 36(07): 536-539+561.
- [15] 玛尔江·巴哈提别克, 王彦, 王玉红, 等. 应用加压毛细管电色谱技术检测鸡蛋中四环素类兽药残留的研究[A]. 中国化学会色谱专业委员会、北京理化分析测试技术学会北京色谱学会. 全国生物医药色谱学术交流会(2010 景德镇)论文集[C]. 中国化学会色谱专业委员会、北京理化分析测试技术学会北京色谱学会; 中国化学会, 2010: 2.
- Ma E J · B H T B K, Wang Y, Wang Y H, *et al.* Pressurized capillary electrochromatography for analysis of tetracyclines insecticides in egg[A]. Chinese Society of Chemical Chromatography Professional Committee, Beijing Society of Physical and Chemical Analysis and Testing Technology Beijing Society of Chromatography. Proceedings of National Biomedical Chromatography Academic Exchange Conference (2010 Jingdezhen) [C]. Chromatography Professional Committee of Chinese Chemical Society, Beijing Society of Physical and Chemical Analysis and Testing Technology Beijing Chromatography Society; Chinese Chemical Society, 2010: 2.
- [16] 邵钰秀, 余云娟, 肖晶, 等. 电堆积毛细管电泳法检测食品中四环素类抗生素残留[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2013, 33(02): 161-166.
- Shao Y X, Yu Y J, Xiao J, *et al.*, Chen G H. Analysis of tetracycline antibiotic residues in food by capillary electrophoresis with stacking [J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2013, 33(02): 161-166.
- [17] 陈丽, 潘文庆, 马晓康. 5 种四环素类抗生素快速鉴别方法的建立[J]. 中国药师, 2010, 13(06): 893-894.
- Chen L, Pan W Q, Ma X K. Establishment of rapid identification methods for five tetracycline antibiotics [J]. The Chinese Medicine, 2010, 13(06): 893-894.
- [18] 邵金良, 杨东顺, 王丽, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定乳及乳制品中土霉素、四环素和金霉素残留[J]. 分析试验室, 2014, 33(10): 1202-1205.
- Shao J L, Yang D S, Wang L, *et al.* Solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of three tetracyclines in milk and its products [J]. Analysis Laboratory, 2014, 33(10): 1202-1205.
- [19] 宋戈, 郑伟. 高效液相色谱法测定乳及乳制品中多种四环素类药物残留[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(08): 40-42.
- Song G, Zheng W. Determination of various tetracycline antibiotics residues in milk and dairy products [J]. Chinese Dairy Industry, 2012, 40(08): 40-42.
- [20] 陈士恩, 程燕平, 阿依木古丽, 等. 固相萃取-高效液相色谱检测牛肉中四环素类抗生素残留[J]. 西北民族大学学报(自然科学版), 2011, 32(01): 62-67.
- Chen S E, Cheng Y P, A Y M G L, *et al.* Solid-Phase Extraction-high Performance Liquid Chromatographic Detection Tetracycline Class Antibiotic Residues in Beef [J]. Journal of Northwest University for Nationalities (Natural Science), 2011, 32(01): 62-67
- [21] 洪波, 曾春芳, 高峰, 等. 高效液相色谱-紫外法测定水产品中四环素类、喹诺酮类抗生素残留[J]. 湖南农业科学, 2013, (21): 81-84.
- Hong B, Zeng C F, Gao F, *et al.* Determination of Tetracycline and Quinolone Antibiotics Residues in Aquatic Products by HPLC-UV [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2013, (21): 81-84.
- [22] 褚洪潮, 陈文生, 张权, 等. SPE-HPLC 同时测定鲜牛奶中四环素类和氯霉素抗生素残留[J]. 食品工业, 2014, 35(06): 259-262.
- Chu H C, Chen W S, Zhang Q, *et al.* Determination of TCs and CP Residues in Milk by SPE-HPLC [J]. The Food Industry, 2014, 35(06): 259-262.
- [23] 赖克强, 陆勤丰, 丛健. 基质固相分散-高效液相色谱法测定鱼肉中四环素类药物残留的研究[J]. 分析试验室, 2009, 28(S): 29-31.
- Lai K Q, Lu Q F, Cong J. Determination of tetracycline residues in fish by matrix solid phase dispersion-high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2009, 28(S): 29-31.
- [24] 卢坤, 童群义. 高效液相色谱法同时检测蜂蜜中的 5 类抗生素残留[J]. 分析测试学报, 2011, 11: 1320-1328.
- Lu K, Tong Q Y. Simultaneous Determination of 5 Classes of Antibiotics Residues in Honey Using High Performance Liquid Chromatography [J]. Journal of Analytical Testing, 2011, 11: 1320-1328.
- [25] 乐渊, 刘春华, 李萍萍, 等. UPLC-MS/MS 法测定鸡蛋中四环素类抗生素残留[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, (09): 72-74.
- Le Y, Liu C H, Li P P, *et al.* Determination of tetracycline antibiotic residues in eggs by UPLC-MS/MS method [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary, 2013, (09): 72-74.
- [26] 连英杰, 吴敏, 黎翠玉, 等. 直接提取-超高压液相色谱-电

- 喷雾串联质谱法检测原料奶及奶制品中的四环素类抗生素 [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(02): 489 - 495.
- Lian Y J, Wu M, Li C Y, *et al.* Determination of tetracycline antibiotics residues in milk and dairy products by direct extraction - UPLC - ESI - MS/MS [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2013, 4(02): 489 - 495.
- [27] 蔡英华, 薛毅, 张玥, 等. UPLC - MS/MS 法测定动物源性食品中 4 个四环素类药物和 10 个 β 受体激动剂类药物残留 [J]. 药物分析杂志, 2014, 34(07): 1223 - 1230.
- Cai Y H, Xue Y, Zhang Y, *et al.* Determination of 4 tetracyclines residues and 10 β - agonist residues in animal - derived food by UPLC - MS /MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34(07): 1223 - 1230.
- [28] 刘艳萍, 冷凯良, 王清印, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定水产品中的 4 种四环素类药物残留量 [J]. 海洋科学, 2009, 33(04): 34 - 39.
- Liu Y P, Leng K L, Wang Q Y, *et al.* Determination of four tetracyclines residues in aquatic products by High Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry [J]. Marine Science, 2009, 33(04): 34 - 39.
- [29] 贺蕴普, 贺德春, 王志良, 等. 养殖废水中四环素 HPLC 分析方法的 研究 [J]. 广州化学, 2011, 36(01): 26 - 31.
- He Y P, He D C, Wang Z L, *et al.* Research of Analytical Method about Tetracyclines of Wastewater in Pig Farm by HPLC [J]. Guangzhou Chemistry, 2011, 36(01): 26 - 31.
- [30] Johnston L, Mackay L, Croft M. Determination of quinolones and fluoroquinolones. in fish tissue and seafood by high performance liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometric detection [J]. J Chromatography, 2002, 982(1): 97 - 109.
- [31] E Yoshida, T Shibuya, C Kurokawa, *et al.* Study of simultaneous determination of residual veterinary drugs including tetracycline antibiotics in milk and dairy products [J]. Journal of the Food Hygienic Society of Japan, 2009, 50(5): 216 - 222.
- [32] Michael perez - Rodriguez, Roberto Gerardo Pellerano, Leonardo Pezza, *et al.* An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination [J]. Talanta, 2018, 182: 1 - 21.

(编辑: 侯向辉)