

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中
31 种产蛋期禁用兽药

朱万燕¹, 张鸿伟^{2*}, 车立志², 徐文远¹, 伦才智¹,
徐久飞¹, 徐 豪¹, 陈 伟¹

(1. 临沂海关综合技术服务中心, 山东 临沂 276034; 2. 青岛海关技术中心, 山东 青岛 266109)

摘要:采用改良的 QuEChERS 法进行前处理,建立了超高效液相色谱-串联质谱同时测定禽蛋(鸡蛋、鹅蛋、鸭蛋)中 9 类 31 种产蛋期禁用兽药(大环内酯类、解热镇痛类、磺胺类、抗菌增效类、抗球虫类、抗线虫类、喹诺酮类、四环素类、酰胺醇类)的检测方法,并对样品前处理和色谱条件进行了优化。称取 2.00 g 样品,先加入 2 mL 0.1 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液,涡旋 1 min,将样品充分分散,再用 8 mL 3% 乙酸乙腈提取,氯化钠(2 g)盐析,离心后,上清液采用十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈, 100 mg)、N-丙基乙二胺(PSA, 50 mg)和氨基(NH₂, 50 mg)吸附剂联合净化,待测分析物经 Waters CORTECS UPLC C₁₈ 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离,分别在正、负离子模式下采集,空白基质匹配标准曲线外标法定量。结果表明,31 种产蛋期禁用兽药在相应浓度范围内具有良好的线性关系,相关系数>0.99,检出限为 0.3~3.0 μg/kg,定量限为 1.0~10.0 μg/kg。在定量限、最大残留限量、2 倍最大残留限量 3 个添加水平下,3 种禽蛋基质中 31 种产蛋期禁用兽药的平均加标回收率为 61.2%~105.7%,相对标准偏差为 1.8%~17.6% (n=6)。利用所建立的方法对 30 份禽蛋样品(20 份鸡蛋、5 份鹅蛋和 5 份鸭蛋)进行检测,共有 1 份样品检出恩诺沙星。本方法简单、经济、实用,适用于禽蛋中多类产蛋期禁用兽药的同时测定。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; QuEChERS; 兽药; 禽蛋

中图分类号: O658 文献标识码: A

Simultaneous determination of 31 banned veterinary drugs during
egg-laying period in poultry eggs by ultra performance
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHU Wanyan¹, ZHANG Hongwei^{2*}, CHE Lizhi², XU Wenyuan¹,
LUN Caizhi¹, XU Jiufei¹, XU Hao¹, CHEN Wei¹

(1. Comprehensive Technology Center of Linyi Customs, Linyi 276034, China;
2. Technology Center of Qingdao Customs, Qingdao 266109, China)

Abstract: The consumption of poultry eggs has increased in recent years owing to the abundance of production and improvements in living standards. Thus, the safety requirements of poultry eggs have gradually increased. At present, few reports on analytical methods to determine banned veterinary drugs during egg-laying period in poultry eggs have been published. Therefore, establishing high-throughput and efficient screening methods to monitor banned veterinary drugs during egg-laying period is imperative. In this study, an analytical method based on ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) combined with QuEChERS-based techniques was developed for the simultaneous determination of 31 banned veterinary drugs encompassing nine drug classes (macrolides, antipyretic and

收稿日期: 2023-11-20

* 通讯联系人. E-mail: light04@126.com.

基金项目: 青岛市民生科技计划项目(18-6-1-107-nsh); 青岛海关科研项目(QK202017).

Foundation item: Qingdao Scientific and Technological Project for People's Livelihood (No. 18-6-1-107-nsh); Scientific Research Project of Qingdao Customs (No. QK202017).

analgesic drugs, sulfonamides, antibacterial synergists, anticoccidials, antinematodes, quinolones, tetracyclines, amphenicols) in different types of poultry eggs. The main factors affecting the response, recovery, and sensitivity of the method, such as the extraction solvent, purification adsorbent, LC separation conditions, and MS/MS parameters, were optimized during sample pretreatment and instrumental analysis. The 31 veterinary drug residues in 2.00 g eggs were extracted with 2 mL of 0.1 mol/L ethylene diamine tetraacetic acid disodium solution and 8 mL 3% acetic acid acetonitrile solution, and salted out with 2 g of sodium chloride. After centrifugation, 5 mL of the supernatant was cleaned-up using the QuEChERS method with 100 mg of octadecylsilane-bonded silica gel (C_{18}), 50 mg of *N*-propylethylenediamine (PSA), and 50 mg of NH_2 -based sorbents. After nitrogen blowing and redissolution, the 31 target analytes were separated on a Waters CORTECS UPLC C_{18} analytical chromatographic column (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) at a flow rate, column temperature, and injection volume of 0.4 mL/min, 30 $^{\circ}C$, and 5 μL , respectively. Among these analytes, 26 analytes were acquired in dynamic multiple reaction monitoring (MRM) mode under positive electrospray ionization (ESI^+) conditions using (A) 5 mmol/L ammonium acetate (pH 4.5) and (B) acetonitrile as mobile phases. The gradient elution program was as follows: 0–2.0 min, 12% B–30% B; 2.0–7.5 min, 30% B–50% B; 7.5–10.0 min, 50% B; 10.0–10.1 min, 50% B–100% B; 10.1–12.0 min, 100% B; 12.0–12.1 min, 100% B–12% B; The five other target analytes were acquired in MRM mode under negative electrospray ionization (ESI^-) conditions using (A) H_2O and (B) acetonitrile as mobile phases. The gradient elution program was as follows: 0–2.0 min, 12% B–40% B; 2.0–6.0 min, 40% B–80% B; 6.0–6.1 min, 80% B–100% B; 6.1–8.0 min, 100% B; 8.0–8.1 min, 100% B–12% B. Matrix-matched external standard calibration was used for quantification. The results showed that all the compounds had good linear relationships within their respective ranges, with correlation coefficients of >0.99 . The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) were 0.3–3.0 $\mu g/kg$ and 1.0–10.0 $\mu g/kg$, respectively. The average recoveries of the 31 banned veterinary drugs spiked at three levels (LOQ, maximum residue limit (MRL), and 2MRL) in poultry eggs ranged from 61.2% to 105.7%, and the relative standard deviations (RSDs) ranged from 1.8% to 17.6%. The developed method was used to detect and analyze banned veterinary drugs in 30 commercial poultry egg samples, including 20 eggs, 5 duck eggs, and 5 goose eggs. Enrofloxacin was detected in one egg with a content of 12.3 $\mu g/kg$. The proposed method is simple, economical, practical, and capable of the simultaneous determination of multiple classes of banned veterinary drugs in poultry eggs.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); QuEChERS; veterinary drugs; poultry egg

禽蛋因营养价值高,含有人体需要的优质蛋白和其他丰富的营养元素,在很早之前就被人们作为一种营养品食用。近年来,随着物质的丰富、人们生

活水平的提高,禽蛋的食用量日益增加,国人对禽蛋的安全要求也逐步提升。为提高禽蛋产量,个别禽类饲养者不遵守产蛋期的喂养规定,私自添加使用

引用本文:朱万燕,张鸿伟,车立志,徐文远,伦才智,徐久飞,徐豪,陈伟. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽蛋中31种产蛋期禁用兽药. 色谱, 2024, 42(5): 420–431.

ZHU Wanyan, ZHANG Hongwei, CHE Lizhi, XU Wenyuan, LUN Caizhi, XU Jiufei, XU Hao, CHEN Wei. Simultaneous determination of 31 banned veterinary drugs during egg-laying period in poultry eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(5): 420–431.

产蛋期禁用兽药,造成禽蛋中的兽药残留超标,损害人体健康^[1,2]。GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》^[3]明确规定一些兽药在 家禽产蛋期禁用,并且在 GB 31650. 1-2022《食品安全国家标准 食品中 41 种兽药最大残留限量》^[4]中进一步规定了产蛋期禁用兽药在禽蛋中的最大残留限量(MRL),表 1 列出了 31 种产蛋期禁用兽药的药物名称、药物种类及最大残留限量。这 31 种兽药或为已批准动物源性食品中最大残留限量规定的兽药,或为允许用于食品动物且不需要制定残留限量

表 1 31 种兽药的类别、名称及最大残留限量
Table 1 Classes, names and maximum residue limits (MRLs) of the 31 veterinary drugs

Class	Name	MRL* / (μg/kg)
Antinematodes	levamisole (左旋咪唑)	5
Antibacterial synergists	trimethoprim (甲氧苄啶)	10
Macrolides	tilmicosin (替米考星)	10
Quinolones	danofloxacin (达氟沙星)	10
	enrofloxacin (恩诺沙星)	10 ¹⁾
	ciprofloxacin (环丙沙星)	
	flumequine (氟甲喹)	10
	oxolinic acid (恶喹酸)	10
	sarafloxacin (沙拉沙星)	5
	lomefloxacin (洛美沙星)	2
	norfloxacin (诺氟沙星)	2
	ofloxacin (氧氟沙星)	2
Tetracyclines	pefloxacin (培氟沙星)	2
	doxycycline (多西环素)	10
Sulfonamides	sulfadimidine (磺胺二甲嘧啶)	10
	sulfadiazine (磺胺嘧啶)	10 ²⁾
	sulfathiazole (磺胺噻唑)	
	sulfamerazine (磺胺甲基嘧啶)	
	sulfameter (磺胺甲氧嘧啶)	
	sulfamonomethoxine (磺胺间甲氧嘧啶)	
	sulfachloropyridazine (磺胺氯哒唑)	
	sulfadoxine (磺胺邻二甲氧嘧啶)	
	sulfadimethoxine (磺胺二甲氧嘧啶)	
	sulfamethoxazole (磺胺甲基异噁唑)	
Amphenicols	sulfaquinoxaline (磺胺喹噁啉)	
	thiamphenicol (甲砒霉素)	10
	florfenicol-amine (氟苯尼考胺)	10 ³⁾
Anticoccidials	florfenicol (氟苯尼考)	
	toltrazuril sulfone (托曲珠利砒)	10
	diclazuril (地克珠利)	10
Antipyretic and analgesic drugs	aspirin (阿司匹林)	10

* From the limit regulations in GB 31650. 1-2022. 1) total of enrofloxacin and ciprofloxacin; 2) total of other sulfonamides; 3) total of florfenicol-amine and florfenicol.

的兽药,但均为家禽产蛋期禁用兽药,这说明国家对家禽产蛋期的用药控制更为严格,对禽蛋中兽药残留检测方法的性能指标要求更高。目前,专门检测 家禽产蛋期禁用兽药残留的方法报道还较少,因此建立禽类产蛋期禁用兽药残留的检测方法十分必要。

随着超高效液相色谱-串联质谱仪(UPLC-MS/MS)的普及,加之该设备具有灵敏度高、定性定量准确的特点,UPLC-MS/MS 已成为兽药残留测定的首选技术方法^[5-10]。QuEChERS 前处理方法具备简单、快速、成本低的特点,日益受到兽药残留检测人员的青睐^[11-16]。利用超高效液相色谱-串联质谱法进行鸡蛋中多药物残留分析虽有报道,但存在分析 药物种类不全、定量限高、基质单一等问题。例如, 方从容等^[12]报道的鸡蛋中多兽药残留检测方法不 包含解热镇痛类、抗球虫类等产蛋期禁用兽药,且强 力霉素、沙拉沙星、诺氟沙星、培氟沙星、洛美沙星、 恩诺沙星及氧氟沙星的检出限均高于 GB 31650. 1- 2022 中的最大残留限量要求。陈兴连等^[17]报道的 鸡蛋中多兽药残留检测方法不包含大环内酯类、解 热镇痛类、抗菌增效类、抗球虫类、抗线虫类、四环素 类产蛋期禁用兽药,且培氟沙星、洛美沙星的定量限 高于 GB 31650. 1-2022 中的最大残留限量要求。 Wang 等^[18]报道的鸡蛋中多残留检测方法不包含大 环内酯类、解热镇痛类、抗球虫类、抗线虫类、四环素 类等产蛋期禁用兽药。此外,现有检测方法检测样 品多为鸡蛋,检测基质比较单一。本工作采用 QuEChERS 前处理方法,建立了禽蛋中 31 种共 9 大类产蛋期禁用兽药的 UPLC-MS/MS 检测方法 (其中,因阿司匹林的活性成分是乙酰水杨酸,参照 标准 SN/T 1922-2007^[19],本工作实际检测的是阿司 匹林的代谢产物水杨酸),以期为禽蛋中产蛋期禁 用兽药的监督提供技术保障。

1 实验部分

1.1 仪器、材料与试剂

Agilent 1290-6470 型超高效液相色谱-串联质 谱仪(美国 Agilent 公司),配有电喷雾离子源 (ESI); CR22G III 型高速冷冻离心机(日本 HITA- CHI 公司); ULTRA-TURRAX T25 型均质器、GEN- IUS 3 涡旋混匀器和 HS260 型多用调速振荡器(德 国 IKA 公司); Caliper TurboVap LV 型氮吹仪(美 国 Caliper 公司)。

中性氧化铝、*N*-丙基乙二胺(PSA)、十八烷基硅烷键合硅胶(C_{18})、石墨化炭黑(GCB)、氨基(NH_2)吸附剂均购于天津 Bonna-Agela 公司。

乙腈(色谱纯,美国 MREDA 公司);甲醇(色谱纯,美国 LabServ 公司);甲酸(色谱纯,天津市光复精细化工研究所);氯化钠(分析纯,天津博迪化工股份有限公司);乙二胺四乙酸二钠(EDTA)(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为由 Milli-Q IQ7000 纯水机(德国 Merck Millipore 公司)制得的超纯水。

地克珠利、托曲珠利砒、水杨酸标准物质购自北京曼哈格生物科技有限公司,纯度均大于 99.4%;其他 28 种兽药标准储备液均购自农业部环境保护科研监测所,质量浓度均为 100 mg/L。

1.2 标准溶液的配制

分别准确称取适量地克珠利、托曲珠利砒、水杨酸标准物质,用甲醇溶解定容,配制成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。其中,地克珠利和托曲珠利砒标准储备液有效期 12 个月,水杨酸标准储备液有效期 3 个月。

分别吸取 0.25 mL 左旋咪唑、沙拉沙星标准储备液,0.1 mL 洛美沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、培氟沙星标准储备液,0.5 mL 其余兽药的标准储备液于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,即得对应质量浓度分别为 0.5、0.2、1.0 mg/L 的 31 种兽药混合标准中间溶液。

1.3 样品前处理

称取 2.00 g 样品,置于 50 mL 离心管中,加入 2 mL 0.1 mol/L EDTA 溶液,涡旋 1 min,将样品充分分散,再加入 2 g 氯化钠和 8 mL 3% 乙酸乙腈,振荡提取 30 min,10 000 r/min 离心 5 min,取 5 mL 上清液待净化。

将 5 mL 上清液加入含有 100 mg C_{18} 、50 mg PSA 和 50 mg NH_2 吸附剂的 15 mL 离心管中,涡旋 1 min,10 000 r/min 离心 5 min,再取 4 mL 上清液于另一离心管中,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干,用 1 mL 乙腈-0.1% 甲酸水溶液(1:9, v/v)复溶,过 0.22 μm 滤膜,进行 UPLC-MS/MS 测定。

1.4 仪器工作条件

色谱条件 Waters CORTECS UPLC C_{18} 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm);柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.4 mL/min;进样量:5 μL ;正离子模式流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵(pH 4.5),B 为乙腈;梯度洗

脱程序:0~2.0 min, 12% B~30% B; 2.0~7.5 min, 30% B~50% B; 7.5~10.0 min, 50% B; 10.0~10.1 min, 50% B~100% B; 10.1~12.0 min, 100% B; 12.0~12.1 min, 100% B~12% B。负离子模式流动相:A 为水,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0~2.0 min, 12% B~40% B; 2.0~6.0 min, 40% B~80% B; 6.0~6.1 min, 80% B~100% B; 6.1~8.0 min, 100% B; 8.0~8.1 min, 100% B~12% B。

质谱条件 电喷雾离子源;动态多反应离子监测模式(dynamic MRM);干燥气温度:300 $^{\circ}\text{C}$;干燥气流速:12 L/min;雾化气压力:241 kPa;鞘气温度:300 $^{\circ}\text{C}$;鞘气流速:12 L/min;正离子模式下毛细管电压:3 500 V,喷嘴电压:0 V;负离子模式下毛细管电压:-3 000 V,喷嘴电压:-500 V;31 种目标化合物的保留时间、母离子、子离子、毛细管出口电压、碰撞能等参数见表 2。

1.5 基质效应(ME)的计算

基质是指样品提取液中除待测分析物以外的物质。基质共提物与目标分析物在 ESI 源中会发生竞争电离,从而出现干扰目标化合物的质谱信号,影响目标化合物响应强度的现象,即为基质效应。基质效应影响定量分析结果的准确性和可靠性,是方法建立过程中需要考察的一个重要参数。本工作以 $ME = (\text{基质标准曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率} - 1) \times 100\%$ 的值来表示基质效应的大小,负值表示存在抑制效应,正值表示存在增强效应,当比值在 $-20\% \sim 20\%$ 时,表示基质效应不明显^[17,20]。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件的优化

2.1.1 提取溶液的选择

兽药残留常用的提取溶剂有甲醇、乙腈、乙酸乙酯,相比之下,3 种溶剂中甲醇的极性最强,渗透组织的能力也更好,但提取的极性杂质也更多,此外甲醇去除蛋白质时形成的是絮状沉淀,悬浮于提取溶液中,不利于后续的净化;乙酸乙酯的极性低,渗透组织的能力差,对多类药物同时提取的提取效率不高;乙腈去除蛋白质、脂肪等的沉淀效果好,对多数目标物的提取效率高。综合 3 种溶剂的提取特点,结合目标基质,本工作选择乙腈作为提取溶剂。

本工作选取 3 种样品中基质最为复杂、预实验中基质效应最强的鸭蛋作为前处理优化的样品基质,以 ME 和提取回收率作为判定依据,考察了乙腈、

表 2 31 种兽药的参考保留时间、质谱参数、检出限和定量限
Table 2 Reference retention times (t_R), MS parameters, LODs and LOQs of the 31 veterinary drugs

Drug	t_R /min	ESI	Parent ion (m/z)	Product ions (m/z)	Fragmentor/V	CEs/eV	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/($\mu\text{g/kg}$)
Levamisole	2.28	+	205.3	178.1 [*] , 91.2	100	20, 45	0.6	2.0
Trimethoprim	2.51	+	291.4	230.2 [*] , 123.2	120	25, 30	0.9	3.0
Tilmicosin	4.01	+	870.0	174.0 [*] , 132.1	200	50, 50	0.9	3.0
Danofloxacin	2.79	+	358.3	340.3 [*] , 82.0	100	25, 42	0.9	3.0
Enrofloxacin	2.99	+	360.0	245.0 [*] , 316.0	120	27, 27	0.9	3.0
Ciprofloxacin	2.62	+	332.0	314.0 [*] , 231.0	120	25, 25	0.9	3.0
Flumequine	5.92	+	262.3	244.2 [*] , 202.1	110	20, 40	0.9	3.0
Oxolinic acid	4.27	+	262.3	244.1 [*] , 216.0	100	20, 35	0.9	3.0
Sarafloxacin	3.22	+	385.9	299.0 [*] , 342.1	100	15, 25	0.9	3.0
Lomefloxacin	2.77	+	352.0	265.0 [*] , 308.3	120	10, 20	0.6	2.0
Norfloxacin	2.58	+	320.0	302.1 [*] , 233.0	120	24, 24	0.3	1.0
Ofloxacin	2.62	+	362.0	261.0 [*] , 318.0	120	26, 26	0.3	1.0
Pefloxacin	2.74	+	334.0	233.0 [*] , 290.1	100	10, 20	0.6	2.0
Doxycycline	3.41	+	445.0	428.2 [*] , 154.0	120	27, 40	3.0	10.0
Sulfadimidine	3.10	+	279.0	186.0 [*] , 156.3	120	22, 20	0.9	3.0
Sulfadiazine	2.32	+	251.0	156.0 [*] , 108.3	80	16, 22	0.9	3.0
Sulfathiazole	2.46	+	256.0	156.0 [*] , 108.1	80	15, 25	0.9	3.0
Sulfamerazine	2.76	+	265.0	156.0 [*] , 172.1	120	18, 20	0.9	3.0
Sulfameter	3.14	+	281.0	156.0 [*] , 215.1	100	18, 18	0.9	3.0
Sulfamonomethoxine	3.44	+	281.0	156.0 [*] , 126.1	120	20, 25	0.9	3.0
Sulfachloropyridazine	3.60	+	285.7	156.0 [*] , 108.1	80	12, 22	0.9	3.0
Sulfadoxine	3.80	+	311.0	156.0 [*] , 108.2	140	25, 30	0.9	3.0
Sulfadimethoxine	4.74	+	311.0	156.0 [*] , 108.0	140	25, 30	0.9	3.0
Sulfamethoxazole	3.91	+	254.0	156.0 [*] , 108.1	100	15, 25	0.9	3.0
Sulfaquinoxaline	4.70	+	301.0	156.0 [*] , 108.1	80	15, 27	0.9	3.0
Florfenicol-amine	1.32	+	247.9	230.1 [*] , 130.0	110	10, 15	0.9	3.0
Thiamphenicol	2.65	-	354.0	290.0 [*] , 185.2	110	10, 25	0.3	1.0
Florfenicol	3.38	-	356.0	336.0 [*] , 185.1	100	10, 15	0.3	1.0
Toltrazuril sulfone	5.72	-	456.5 ^{* #}		120	0	1.5	5.0
Diclazuril	6.05	-	407.0	336.0	120	20	1.5	5.0
			405.0	334.0 [*]	120	20		
Salicylic acid	2.17	-	137.0	93.0 [*] , 65.3	80	15, 35	0.9	3.0

* Quantitative ion. Salicylic acid; metabolites of aspirin. # It is difficult to obtain suitable product ions of toltrazuril sulfone, so the parent ion was used for quantification.

水-乙腈、0.1 mol/L EDTA 溶液-乙腈、0.1 mol/L EDTA 溶液-3% 乙酸乙腈 4 种提取溶液的提取效果 (加入提取溶液时,先加水相,涡旋 1 min 后,再加有机相)。具体方法:分别用 4 种提取溶剂按照 1.3 节步骤提取、净化不含有待测兽药的鸭蛋样品,获得空白基质溶液,配制系列基质标准溶液,同时配制相同浓度的系列溶剂标准溶液,进样测定,计算其各自的 ME,结果见表 3;在不含有待测兽药的鸭蛋样品中添加标准溶液,获得目标分析物浓度相同的添加样品,用 4 种提取溶剂按相同的步骤提取、净化,进样测定,再用各自的基质标准曲线校正,计算每类药物的平均回收率,结果见图 1。

从基质效应看,单独用乙腈提取时基质效应最大,只有 12 种兽药基质效应不明显,15 种兽药存在明显的基质抑制效应,4 种兽药存在明显的基质增

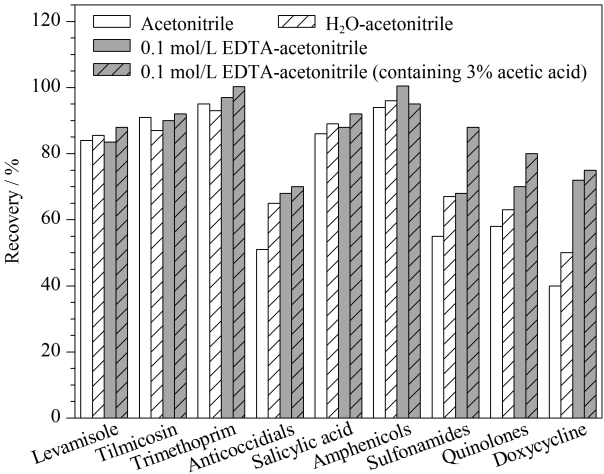


图 1 不同提取溶液对每类药物平均回收率的影响
Fig. 1 Effect of different extraction solvents on the average recovery of each kind of drugs

强效应。在水-乙腈、0.1 mol/L EDTA 溶液-乙腈、0.1 mol/L EDTA 溶液-3% 乙酸乙腈 3 种提取溶液中,基质效应不明显的兽药数量均为 17,表明在这 3 种提取溶液中,兽药的基质效应相差不大,且明显好于纯乙腈提取溶剂。

从提取回收率看,左旋咪唑、替米考星、甲氧苄啶、水杨酸、酰胺醇类药物在 4 种提取溶液中回收率相差不大,而其他 4 类兽药在纯乙腈中的提取回收率普遍低于其他 3 种提取体系(低 10%~15%),这可能是因为在提取前,加入水相,使基质充分分散更有利于待测兽药的提取,另外,盐析分层时水相可以带出部分水溶性杂质,降低基质干扰,各待测兽药在乙腈提取溶剂中的基质效应高于其他 3 种体系的基质效应也说明了这一点。水相中不加 EDTA 时,强力霉素的回收率不高于 40%,加入 2 mL 0.1 mol/L

EDTA 溶液后,强力霉素的回收率达到 65% 以上,喹诺酮类药物的回收率也有所增加,这是由于强力霉素和喹诺酮类药物易与金属离子络合,加入 EDTA 溶液后,金属离子优先与 EDTA 发生络合反应,从而将强力霉素和喹诺酮类药物释放出来。酸化乙腈有利于磺胺、喹诺酮类化合物分配在乙腈中,提取回收率都有所提高,磺胺类药物的回收率提高 20% 左右。综合考虑所有待测兽药,本工作选用 0.1 mol/L EDTA 溶液-3% 乙酸乙腈(2:8, v/v)作为提取溶液。

2.1.2 净化剂的选择

本工作选取 QuEChERS 方法中常用的净化剂 C₁₈、PSA、NH₂、中性氧化铝、GCB 进行实验。将质量浓度均为 1.0 mg/L 的 31 种兽药混合标准中间溶液(见 1.2 节)稀释为质量浓度均为 20 μg/L 的

表 3 不同提取溶液对 31 种兽药基质效应的影响
Table 3 Effect of different extraction solvents on the matrix effects of the 31 veterinary drugs %

Drug	Acetonitrile	H ₂ O-acetonitrile	0.1 mol/L EDTA-acetonitrile	0.1 mol/L EDTA-acetonitrile (containing 3% acetic acid)
Levamisole	-73.4	-46.8	-42.4	-44.7
Trimethoprim	-63.7	-53.6	-51.4	-50.2
Tilmicosin	56.3	68.9	76.2	73.5
Danofloxacin	-45.5	-30.5	-34.1	-35.9
Enrofloxacin	-48.7	-21.3	-13.5	-15.0
Ciprofloxacin	-62.3	-52.2	-49.5	-47.4
Flumequine	-37.8	-17.4	-14.6	-12.4
Oxolinic acid	30.3	18.9	25.7	26.5
Sarafloxacin	-42.0	-50.0	-48.7	-54.3
Lomefloxacin	-14.3	-17.1	-16.2	-18.7
Norfloxacin	-53.3	-41.4	-37.8	-39.8
Ofloxacin	-19.2	-13.5	-16.7	-17.3
Pefloxacin	-42.7	-32.5	-28.8	-27.1
Doxycycline	35.5	38.7	30.6	26.6
Sulfadimidine	-30.8	-27.6	-32.4	-35.0
Sulfadiazine	12.4	8.9	4.6	0
Sulfathiazole	-33.4	-28.7	-33.9	-37.6
Sulfamerazine	-40.5	-36.4	-42.0	-44.0
Sulfameter	-23.2	-13.6	-16.7	-18.8
Sulfamonomethoxine	-20.9	-16.2	-15.6	-14.6
Sulfachloropyridazine	-15.1	-8.4	-10.4	-9.1
Sulfadoxine	-13.8	-15.3	-14.1	-13.0
Sulfadimethoxine	16.7	13.8	16.4	17.6
Sulfamethoxazole	-15.4	-12.3	-14.5	-10.9
Sulfaquinoxaline	23.6	-8.7	-6.7	-3.9
Florfenicol-amine	-60.6	-57.0	-64.0	-72.0
Thiamphenicol	-15.2	-14.7	-12.6	-16.3
Florfenicol	-18.9	-12.6	-11.9	-8.9
Toltrazuril sulfone	-14.4	-16.5	-18.3	-17.8
Diclazuril	-17.6	-15.3	-12.6	-11.0
Salicylic acid	-11.7	-11.7	-13.8	-15.1

31 种兽药混合标准溶液,分别加入不同量的 C_{18} 、PSA、 NH_2 、中性氧化铝、GCB 净化剂,涡旋、离心、过滤后进样测定,通过比较加入净化剂前后待测兽药响应的变化,来判断净化剂对待测兽药的吸附性。结果表明, C_{18} 对待测兽药基本没有吸附; NH_2 的用量为 15 g/L 时对待测兽药的吸附可以忽略不计,但随着用量的增加,对磺胺类化合物及地克珠利和托曲珠利产生不同程度的吸附,且对喹诺酮类化合物的峰形有干扰;PSA 的用量超过 30 g/L 时,对氟甲喹、恶喹酸和部分磺胺产生不同程度的吸附;中性氧化铝对喹诺酮类化合物和水杨酸吸附严重;GCB 对大部分待测兽药吸附严重。

C_{18} 主要吸附脂肪等非极性干扰物,PSA 和 NH_2 作用相似,都能够去除极性干扰物质,但随着 PSA、 NH_2 用量的增加,会对待测兽药产生不同程度的吸附。本研究采用 PSA 和 NH_2 组合使用的方式,这样每种净化剂的用量不大,不会对待测兽药产生吸附,而又尽可能地去除极性干扰物。实验进一步比较了净化剂的用量对净化效果的影响,使用不含待测兽药的空白样品按照所述前处理步骤提取,移取 4 mL 空白提取液,分别加入不同量的 C_{18} 、PSA、 NH_2 进行净化、浓缩、复溶,制备基质标准曲线,计算各自的基质效应。结果表明, C_{18} 的用量为 100 mg 和 200 mg 时,基质效应相差不大,均有 13 种兽药基质效应不明显 ($-20\% \leq ME \leq 20\%$);当加入 50 mg PSA 和 50 mg NH_2 后,17 种兽药的基质效应不明显,此外氟甲喹的基质效应由 95% 降到 45%,且回收率也能满足分析要求。因此最终选择 100 mg C_{18} + 50 mg PSA + 50 mg NH_2 作为净化剂。

2.2 色谱条件的选择

本工作比较了不同粒径、不同长度的 4 种反相色谱柱: Eclipse Plus C_{18} (150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm)、Waters CORTECS UPLC C_{18} (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)、XBridge peptide BEH C_{18} (100 mm × 2.1 mm, 3.5 μm) 和 Eclipse Plus C_{18} (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm),同时考察了正离子模式下,乙腈-0.1% 甲酸溶液、乙腈-0.1% 甲酸溶液 (含 5 mmol/L 乙酸铵)、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液 (pH 4.5)、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液 (pH 4.5) 4 种流动相体系对 31 种兽药出峰情况的影响。结果表明,31 种待测兽药在 Waters CORTECS UPLC C_{18} (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 这款实心核颗粒色谱柱上的峰形好,色谱峰更为尖锐,色谱分离效果更好;当

有机相为甲醇时,容易出现前伸峰或拖尾峰,峰形展宽;当有机相为乙腈、水相为 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (用乙酸调 pH 为 4.5) 时,待测分析物的峰形要好于另外两种有机相为乙腈的流动相体系。此外,负离子模式下,当有机相为乙腈、水相为纯水时,待测分析物的响应均能满足检测需求。因此,最终选定 Waters CORTECS UPLC C_{18} (150 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 为分析柱,乙腈-5 mmol/L 乙酸铵 (pH 4.5) 为正离子模式流动相,乙腈-水为负离子模式流动相。

采用优化的色谱柱和流动相,31 种兽药均能在 7 min 内出峰,所有待测兽药的峰形、响应良好。此外,母离子、子离子均相同的磺胺邻二甲氧嘧啶和磺胺二甲氧嘧啶两种同分异构体也能实现完全分离。空白基质加标样品中 31 种兽药的 MRM 色谱图见图 2。从图 2 可以看出,样品基质不干扰待测兽药的测定。

2.3 基质效应考察

不同样品产生的基质效应可能会不同,本工作考察了鸡蛋、鹅蛋和鸭蛋 3 种样品的基质效应。选取不含有待测兽药的空白样品,按 1.3 节方法处理,获得基质空白提取液,配制成相同浓度的系列基质匹配标准溶液,进样测定,分别获得鸡蛋、鹅蛋、鸭蛋的基质匹配标准曲线和溶剂标准曲线,采用 1.5 节公式计算,31 种兽药的基质效应见图 3。从图 3 可看到,31 种兽药在不同样品中其基质效应差异较大,鸭蛋的基质效应最大,鸡蛋的基质效应最小。此外,在鸡蛋、鹅蛋、鸭蛋 3 种样品中基质效应不明显的兽药种类数量分别为 22、19、17,其余兽药均存在明显的基质抑制或基质增强效应。为保证实验结果的准确性,本研究选用基质匹配标准曲线外标法定量,最终实验结果表明,此定量方法可以有效消除基质效应的影响。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系、检出限和定量限

用空白基质提取液配制系列浓度的标准溶液,以待测兽药定量离子的峰面积 (Y) 对质量浓度 (X , $\mu g/L$) 绘制标准曲线,得到线性方程及相关系数,31 种兽药在各自的线性范围内具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.99。

因不同样品的基质效应不同,本工作选用基质效应最大的鸭蛋样品作为基质,来确定方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)。在空白鸭蛋样品

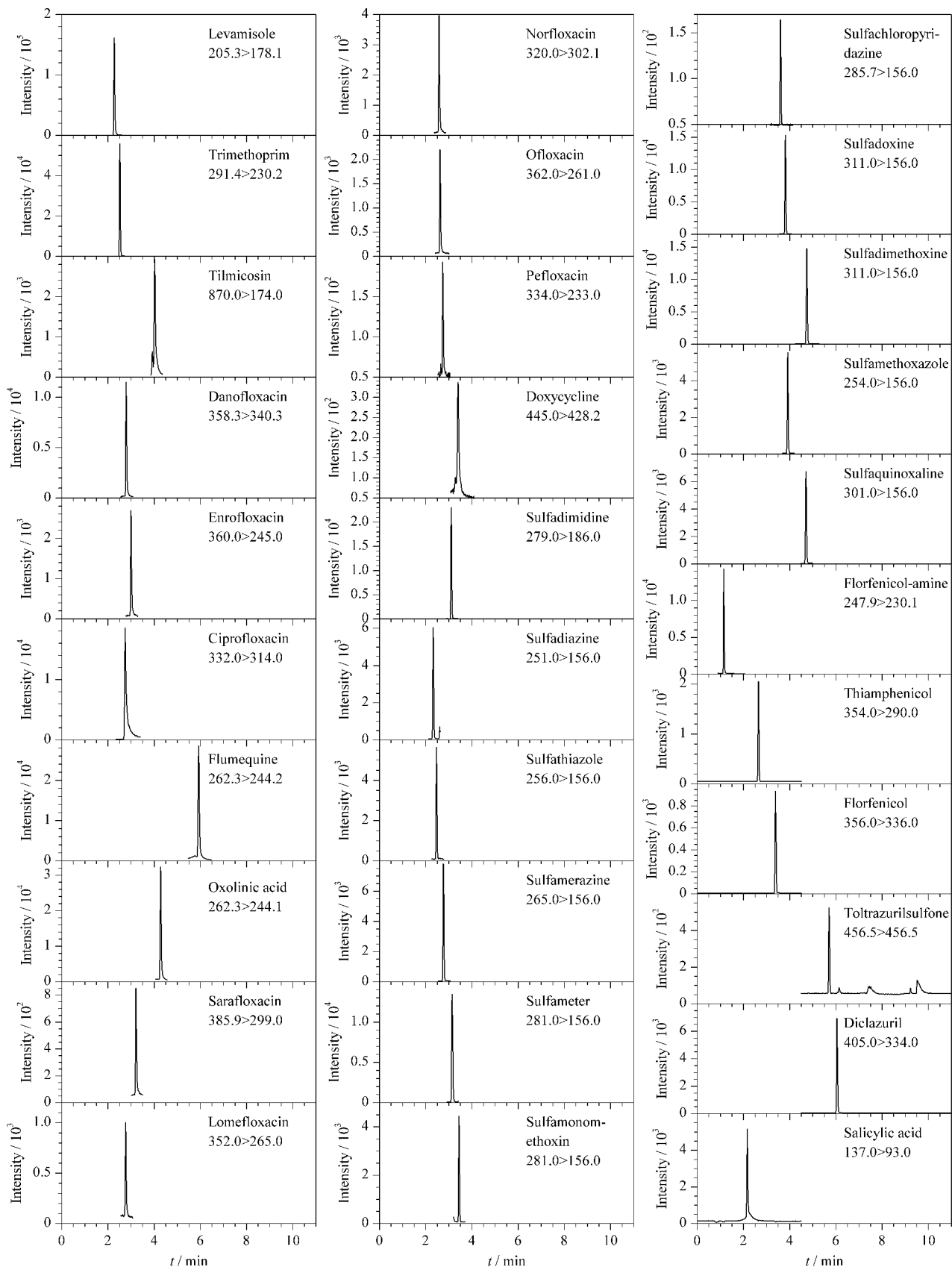


图 2 空白基质加标样品中 31 种兽药的 MRM 色谱图

Fig. 2 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of the 31 veterinary drugs spiked in a blank matrix sample

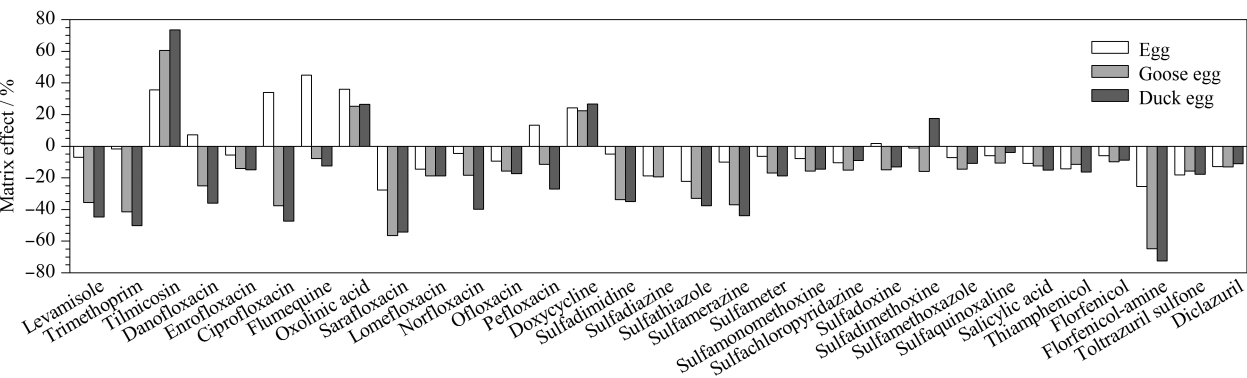


图 3 31 种兽药的基质效应
Fig. 3 Matrix effects of the 31 veterinary drugs

中添加低浓度待测兽药,进行样品处理后进样测定,取定量离子的信噪比($S/N \geq 3$)时的含量作为检出限,取定量离子的 $S/N \geq 10$ 时的含量作为定量限,31 种兽药的检出限和定量限见表 2。从表 2 可以看到,31 种兽药的检出限为 0.3~3.0 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 1.0~10.0 $\mu\text{g/kg}$,均小于或等于 GB 31650.1-2022 中各兽药的最大残留限量。

2.4.2 回收率和精密度

在不含有待测兽药的鸡蛋、鸭蛋、鹅蛋样品中做 3 个水平(LOQ、MRL、2MRL)的加标回收率试验,每个水平平行做 6 次,以对应的基质标准曲线定量,计算各待测兽药的平均回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表 4。31 种兽药在 3 种禽蛋中的平均回收率为 61.2%~105.7%,RSD 为 1.8%~17.6%,符合 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》^[21]中对回收率和精密度的要求。

表 4 鸡蛋、鹅蛋和鸭蛋样品中 31 种兽药的平均回收率和相对标准偏差 ($n=6$)
Table 4 Average recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the 31 veterinary drugs in egg, goose egg and duck egg samples ($n=6$)

Drug	Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Egg		Goose egg		Duck egg	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Levamisole	2	90.1	8.0	92.3	7.3	83.2	8.9
	5	81.8	10.2	85.3	6.4	88.0	7.3
	10	98.3	4.2	95.2	7.0	91.2	10.0
Trimethoprim	3	75.5	2.0	82.3	3.4	73.4	6.3
	10	78.5	1.8	90.2	7.6	84.2	5.5
	20	93.5	5.9	84.3	5.1	78.1	4.8
Tilmicosin	3	81.6	13.8	78.3	10.9	80.4	11.1
	10	93.6	15.2	85.4	7.5	86.8	9.1
	20	95.2	11.9	90.1	9.4	92.0	10.3
Danofloxacin	3	80.7	15.0	83.5	8.9	81.3	7.4
	10	84.7	6.1	76.7	11.2	77.8	6.6
	20	85.9	4.1	80.6	7.2	90.3	3.8
Enrofloxacin	3	73.5	11.3	70.7	10.6	69.3	9.8
	10	77.9	7.9	80.6	8.5	75.9	6.3
	20	81.6	2.8	78.2	6.7	82.3	8.0
Ciprofloxacin	3	69.4	12.3	72.3	8.9	68.5	11.8
	10	76.1	8.3	80.2	10.2	75.4	9.8
	20	82.0	5.5	78.9	7.7	83.7	5.6
Flumequine	3	83.3	7.2	90.5	8.4	87.4	9.4
	10	92.9	7.9	86.7	5.1	84.3	6.5
	20	102.3	3.8	95.6	6.3	96.0	5.8
Oxolinic acid	3	92.3	14.2	88.6	9.3	89.1	12.3
	10	86.9	8.7	96.3	11.5	86.7	8.9
	20	94.2	5.4	94.0	8.4	84.0	9.7

表 4 (续)
Table 4 (Continued)

Drug	Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Egg		Goose egg		Duck egg	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Sarafloxacin	3	71.7	15.2	67.5	13.3	66.2	16.4
	5	73.3	7.9	72.3	9.4	70.8	13.2
	10	81.6	3.2	78.2	6.8	74.3	8.9
Lomefloxacin	2	71.0	9.4	70.4	8.5	68.3	9.6
	4	75.3	11.9	69.8	6.8	73.6	7.3
	8	79.7	6.5	78.6	5.3	81.0	8.4
Norfloxacin	1	73.2	5.6	68.5	8.5	65.7	11.0
	2	78.1	3.4	73.8	4.8	68.4	7.6
	4	83.5	4.8	79.1	6.4	75.5	4.8
Ofloxacin	1	79.7	6.9	80.3	5.8	76.7	7.8
	2	85.3	5.0	84.5	3.3	80.6	5.0
	4	90.4	3.2	91.6	4.1	87.6	6.1
Pefloxacin	2	79.7	14.5	70.3	15.8	61.2	9.4
	4	79.8	12.8	74.9	10.4	70.5	8.7
	8	86.4	12.1	81.7	8.8	78.9	10.2
Doxycycline	10	69.2	14.7	70.3	12.3	66.8	13.4
	20	67.2	10.3	68.4	9.2	72.3	11.6
	40	73.5	6.3	75.9	10.5	74.0	8.7
Sulfadimidine	3	91.7	5.6	88.6	11.3	85.7	8.9
	10	86.8	11.9	97.5	8.7	90.6	3.4
	20	94.7	10.3	104.5	5.1	97.3	4.0
Sulfadiazine	3	68.7	10.6	68.5	12.3	70.4	10.6
	10	71.4	12.0	74.3	8.9	73.0	8.2
	20	73.9	6.4	81.5	6.0	82.0	7.7
Sulfathiazole	3	71.2	5.9	69.0	12.1	67.4	9.8
	10	76.7	13.9	73.1	8.7	75.0	7.9
	20	76.0	6.4	77.2	5.9	80.4	6.0
Sulfamerazine	3	74.1	16.3	76.5	13.5	72.3	12.3
	10	80.4	12.8	82.4	11.3	78.5	9.9
	20	85.4	9.4	90.1	8.8	85.7	6.8
Sulfameter	3	71.7	10.9	82.3	8.4	78.4	6.5
	10	84.1	13.4	87.6	7.6	80.2	4.5
	20	84.5	8.2	93.5	5.4	88.0	2.1
Sulfamonomethoxine	3	79.5	3.6	80.6	5.6	82.3	6.5
	10	88.1	10.1	90.3	6.0	79.1	4.8
	20	85.7	6.9	102.1	4.4	89.7	3.9
Sulfachloropyridazine	3	77.0	17.6	73.4	12.3	70.9	8.9
	10	78.2	14.7	82.1	8.7	82.3	7.4
	20	84.2	7.0	79.3	6.5	86.4	6.0
Sulfadoxine	3	83.3	8.2	78.3	7.8	83.1	8.2
	10	87.2	12.4	86.0	8.4	86.7	9.1
	20	92.0	5.7	95.5	6.0	92.4	5.5
Sulfadimethoxine	3	87.5	2.7	83.5	6.5	79.6	7.3
	10	86.9	10.5	90.5	4.8	85.4	8.0
	20	90.8	5.0	93.0	3.0	92.4	7.1
Sulfamethoxazole	3	72.3	6.9	70.3	8.4	72.6	6.8
	10	84.3	13.4	77.8	6.3	80.1	7.5
	20	89.0	4.0	86.7	5.0	84.5	6.0
Sulfaquinoxaline	3	61.7	8.2	63.4	10.5	65.0	8.2
	10	66.1	12.2	70.3	8.3	69.4	9.4
	20	75.6	4.1	76.0	5.6	75.7	7.0

表 4 (续)
Table 4 (Continued)

Drug	Spiked/ ($\mu\text{g/kg}$)	Egg		Goose egg		Duck egg	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Florfenicol-amine	3	85.3	7.4	83.5	6.1	81.0	8.0
	10	88.0	8.2	90.2	3.4	87.3	6.7
	20	90.1	6.1	89.2	4.6	92.2	3.1
Thiamphenicol	1	93.9	10.8	89.4	6.7	90.4	6.5
	10	99.7	10.3	95.0	5.2	93.5	4.7
	20	101.9	2.3	105.7	2.8	96.1	2.5
Florfenicol	1	86.6	11.4	83.4	9.3	85.6	10.3
	10	85.0	4.1	87.2	7.6	90.7	8.7
	20	96.9	1.9	93.5	5.9	91.5	6.2
Toltrazuril sulfone	5	63.4	10.6	65.3	8.6	67.4	9.7
	10	66.4	8.3	72.1	7.8	69.0	10.3
	20	68.5	8.0	74.0	5.5	65.2	7.3
Diclazuril	5	68.4	10.2	70.4	8.3	66.3	10.2
	10	74.3	7.0	68.5	9.9	72.1	8.7
	20	75.0	6.2	74.6	6.8	76.0	7.0
Salicylic acid	3	73.1	11.4	76.4	12.4	80.2	13.5
	10	83.5	3.1	73.1	13.0	82.1	11.7
	20	88.2	4.2	85.3	9.4	89.0	8.7

2.5 实际样品的测定

应用本工作建立的方法,对从超市和农贸市场采集的 20 批次鸡蛋、5 批次鸭蛋和 5 批次鹅蛋进行检测。结果显示,1 批次鸡蛋中检出恩诺沙星,结果为 12.3 $\mu\text{g/kg}$,其 MRM 色谱图见图 4。为验证本文方法,应用标准方法 GB/T 21312-2007^[22],对检出恩诺沙星的阳性样品进行复检,结果为 11.7 $\mu\text{g/kg}$ 。显示本工作建立的方法可有效用于禽蛋基质中相关药物的监测分析。

3 结论

本工作针对禽蛋样品,采用改良的 QuEChERS 法对样品进行处理,并结合超高效液相色谱-串联质谱,建立了 31 种产蛋期禁用兽药同时检测的方法。本方法操作简单,经济实用,检出限低,准确度高,重复性好,能满足 GB 31650. 1-2022 标准规定的限量控制要求,可以为禽蛋质量安全监测提供有效可靠的技术支持。

参考文献:

[1] Wu Y J. Jilin Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021(11): 51
吴亚军. 吉林畜牧兽医, 2021(11): 51

[2] Wang H J, Hao L H, Gu H, et al. Chinese. Journal of Veterinary Drug, 2021, 55(10): 64
王鹤佳, 郝利华, 谷红, 等. 中国兽药杂志, 2021, 55(10): 64

[3] GB 31650-2019

[4] GB 31650. 1-2022

[5] Zhang W, Xiao M, Wu D, et al. Journal of Instrumental Analysis, 2022, 41(12): 1751
张微, 肖曼, 吴丹, 等. 分析测试学报, 2022, 41(12): 1751

[6] Qin Y, Ge Y. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(7): 2258
秦宇, 葛宇. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2258

[7] Dong W T, Zeng Y, Wu X C, et al. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(20): 7582
董文婷, 曾勇, 吴晓翠, 等. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7582

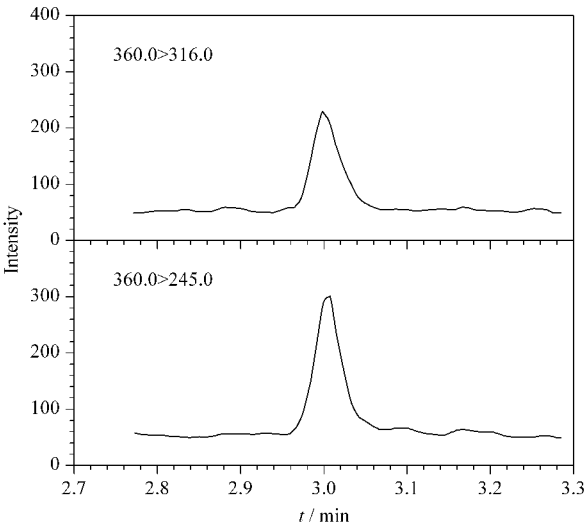


图 4 阳性样品中恩诺沙星的 MRM 色谱图

Fig. 4 MRM chromatograms of enrofloxacin in a positive sample

- [8] Bian H, Qin Y, Yu C H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(2): 162
卞华, 秦宇, 虞成华, 等. 色谱, 2019, 37(2): 162
- [9] Huang L Y, Zou Y, Lu Q, et al. Journal of Food Science, 2018, 39(16): 295
黄丽英, 邹圆, 陆强, 等. 食品科学, 2018, 39(16): 295
- [10] Feng Y C, Ding Q, Wang J F, et al. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2021, 40(11): 1298
冯月超, 丁奇, 王建凤, 等. 分析试验室, 2021, 40(11): 1298
- [11] Jin H, Zhao C, Zheng G M, et al. Journal of Instrumental Analysis, 2022, 41(6): 835
金慧, 赵城, 郑光明, 等. 分析测试学报, 2022, 41(6): 835
- [12] Fang C R, Gao J, Wang Y X, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2018, 36(11): 1119
方从容, 高洁, 王雨昕, 等. 色谱, 2018, 36(11): 1119
- [13] Ning X, Jin S M, Gao W C, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(8): 1297
宁宵, 金邵明, 高文超, 等. 分析化学, 2018, 46(8): 1297
- [14] Mo Y, Pan Z H, Jiang X, et al. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(16): 5443
莫迎, 盘正华, 蒋湘, 等. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(16): 5443
- [15] Huang K, Fan X L, Cao Q, et al. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(16): 261
黄坤, 范小龙, 曹琦, 等. 食品与发酵工业, 2019, 45(16): 261
- [16] Xie Y S, Wang B, Lei C N, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(7): 622
解迎双, 王波, 雷春妮, 等. 色谱, 2023, 41(7): 622
- [17] Chen X L, Li Q, Wang Z F, et al. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2021, 42(6): 1046
陈兴连, 李倩, 王志飞, 等. 质谱学报, 2021, 42(6): 1046
- [18] Wang C F, Li X W, Yu F G, et al. Food Chem, 2021, 334(1): 127598
- [19] SN/T 1922-2007
- [20] Luo R L, Wu Z S, Liang C Q, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(12): 1076
罗瑞涟, 吴正双, 梁炽琼, 等. 色谱, 2022, 40(12): 1076
- [21] GB/T 27417-2017
- [22] GB/T 21312-2007