

· 实验技术及其应用 ·

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 45 种抗生素残留量

郝春慧, 崔伟, 陈雨露, 骆玲飞, 李琰

上海市闵行区疾病预防控制中心理化检验科, 上海 201101

摘要:目的 建立鸡蛋中 45 种抗生素残留量的 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱测定方法。方法 样品经 90% 乙腈水溶液(含 0.1% 甲酸)提取后,取上清液至 QuEChERS 管(150 mg HLB-P + 50 mg PSA)净化,净化液氮吹至近干,10% 甲醇水(含 0.1% 甲酸)定容。目标物经 BEH C18 柱(2.1 × 100 mm, 1.7 μm)分离,以 0.1% 甲酸水-0.1% 甲酸甲醇为流动相进行梯度洗脱,正离子多反应监测模式检测,基质匹配校准曲线法定量。结果 在 1.0 ~ 200 μg/L 的范围内,45 种目标分析物的回归方程均具有良好的线性关系。方法的检出限为 1.0 μg/kg,加标回收率为 69.2% ~ 109.6%,RSD 为 1.2% ~ 15.8%。结论 该方法操作简单、快速,准确度和精密度均较高,适用于鸡蛋中 45 种抗生素的同时检测。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 抗生素; 鸡蛋

中图分类号: R155.5; O657.71 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)21-3985-07

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202406227

QuEChERS-UHPLC-MS/MS method for determining residues of 45 antibiotics in eggs

HAO Chun-hui, CUI Wei, CHEN Yu-lu, LUO Ling-fei, LI Yan

Department of Physical and Chemical Testing, Minhang District Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 201101, China

Abstract: Objective To establish a QuEChERS-UHPLC-MS/MS method for the determination of residues of 45 antibiotics in eggs. **Methods** Samples were extracted using a 90% acetonitrile aqueous solution (containing 0.1% formic acid), and the supernatant was transferred to a QuEChERS tube (150 mg HLB-P + 50 mg PSA) for purification. The purified extract was concentrated to near dryness under nitrogen, and then reconstituted with 10% methanol aqueous solution (containing 0.1% formic acid). Target compounds were separated using a BEH C18 column (2.1 × 100 mm, 1.7 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid in water and 0.1% formic acid in methanol as the mobile phase. Detection was performed in positive ion multiple reaction monitoring mode, and quantification was achieved using matrix-matched calibration curves. **Results** Over the concentration range of 1.0 to 200 μg/L, all 45 target analytes exhibited good linear relationships in their regression equations. The method's limit of detection was 1.0 μg/kg, with spiked recoveries ranging from 69.2% to 109.6% and relative standard deviations (RSD) between 1.2% and 15.8%. **Conclusion** This method is simple, rapid, and exhibits high accuracy and precision, making it suitable for the simultaneous detection of 45 antibiotics in eggs.

Keywords: QuEChERS; UHPLC-MS/MS; Antibiotics; Eggs

鸡蛋因富含蛋白质、微量元素及多种维生素等营养物质,而被称为人类“理想的营养库”^[1]。我国鸡蛋产量及食用量均居于世界首位^[1]。在实际生产过程中,现代化的高密度养殖使得蛋鸡很容易得病,大部分养殖场为防止鸡生病,会直接在鸡饲料中投放抗生素,或用药过程中不遵守处方和药物使用说明书,或使用未经批准的抗生素,滥用抗生素且不遵守休药期^[1-5]。抗生素进入鸡体内,没有代谢掉的就会在其体

内沉积,内脏、鸡肉、鸡蛋中都会有抗生素的残留^[1-5]。人吃了含有抗生素的鸡蛋,可能会产生过敏反应、慢性毒性、破坏胃肠道菌群平衡等危害^[1-6]。长时间食用含有抗生素的鸡蛋,会使人体免疫力降低,形成耐药抗药体质^[1-9]。鸡蛋中抗生素残留量通常是微量的,而且可能会同时涉及较多品种的药物^[1]。目前,我国对鸡蛋中的抗生素残留量的研究较少,各种标准仍在完善中,有些项目的研究还是空白^[1]。因此,鸡蛋中多种类抗生素同时检测方法的开发刻不容缓。

目前,有很多鸡蛋中检出不同种类抗生素超过最大残留限量值的报道^[1-9]。国内文献中检测方法大多

作者简介:郝春慧(1987—),女,硕士,主管技师,研究方向:环境与食品卫生化学检验

通信作者:李琰,E-mail:lypoiuly-83@163.com

只针对鸡蛋中某一类或少数几类抗生素^[7-9], 国外文献中虽有多类别抗生素同时测定的方法^[10-14], 但其检测灵敏度不高或样品前处理较为复杂。本研究拟比较 QuEChERS 和固相萃取两种前处理方式, 采用液相色谱串联质谱仪同时测定鸡蛋中 19 种磺胺类、16 种喹诺酮类、6 种大环内酯类和 4 种四环素类共 45 种抗生素, 为鸡蛋中抗生素的日常监测和突发应急事件的应对提供可靠的技术支持。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

1.1.1 仪器 LC-30AD 超高效液相色谱仪 (日本 SHIMADZU); QTRAP4500 质谱仪 (美国 AB SCIEX); Direct-Q 3 超纯水仪器 (美国 Millipore)。

1.1.2 标准品和试剂 抗生素标准物质: 19 种磺胺类、16 种喹诺酮类、8 种大环内酯类标准溶液 (100 μg/ml, 溶剂为甲醇)、4 种四环素类固体标准品 (每种组分均为 100 μg) 均购自天津阿尔塔科技有限公司。甲醇 (色谱纯, 美国 Supelco); 乙腈 (色谱纯, 美国 Supelco); 甲酸 (色谱纯, 德国 CNW)。QuEChERS 净化管 (15 ml, 150 mg HLB-P + 50 mg PSA, 上海速谱)。

1.2 标准溶液的配制

1.2.1 抗生素的混合标准溶液 4 种四环素类固体标准品于使用前用 1.00 ml 水配制成 100 μg/ml 标准储备液, 连同购买的 100 μg/ml 标准溶液, 均在 -20 °C 避光保存。取浓度为 100 μg/ml 的 19 种磺胺类、16 种喹诺酮类、8 种大环内酯类、4 种四环素类标准溶液, 用 10% 甲醇水 (含 0.1% 甲酸) 稀释成 1 000 μg/L 的 45 种抗生素的混合标准使用液, 于 -20 °C 避光保存。临用前, 用 10% 甲醇水 (含 0.1% 甲酸) 配制成抗生素

浓度为 1.00、2.00、5.00、10.0、50.0、100 和 200 μg/L 的抗生素混合标准系列。

1.2.2 基质混合标准工作溶液 取 8 份经提取和净化的空白试样, 于 40 °C 水浴氮气吹干, 加入 1.00 ml 各浓度的标准系列溶液复溶, 微孔滤膜过滤。基质混合标准系列应现用现配。

1.3 样品前处理 准确称取 2.00 g 样品于 50 ml 离心管中, 加入 10.0 ml 90% 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 振荡 5 min, 超声提取 5 min, 15 000 × g 4 °C 离心 5 min, 取上清液待净化。将提取液全部转移至 QuEChERS 净化管 (150 mg HLB-P + 50 mg PSA) 中, 涡旋混匀 1 min, 15 000 × g 4 °C 离心 5 min, 取 5.00 ml 上清液, 40 °C 水浴氮吹至近干, 10% 甲醇水 (含 0.1% 甲酸) 定容至 1 ml, 微孔滤膜过滤, 待测。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件 ACQUITY UPLCBEH C18 色谱柱 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters)。流动相由 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸甲醇溶液 (B) 组成。梯度洗脱程序: 0 ~ 1.0 min, 10% B; 1.0 ~ 4.0 min, 30% B; 4.0 ~ 6.0 min, 50% B; 6.0 ~ 10.0 min, 70% B; 10.0 ~ 12.0 min, 95% B; 12.0 ~ 14.0 min, 95% ; 14.0 ~ 15.0 min, 10% B; 15.0 ~ 18.0 min, 10% B。流速为 0.35 ml/min; 进样体积: 10 μl; 自动进样器温度为 15 °C; 色谱柱温度为 40 °C。

1.4.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源, 正离子模式 (ESI+); 扫描模式: 多反应监测 (MRM); 离子源电压: 5 500 V; 离子源温度: 500 °C; 气帘气: 35 psi; 碰撞气: Medium; 辅助加热气: 50 psi。45 种抗生素经质谱、色谱优化后的质谱采集参数见表 1。

表 1 45 种抗生素的分子量、保留时间和质谱参数

Table 1 Molecular weight, retention time, and mass spectrometric parameters of 45 antibiotics

编号	抗生素名称	分子量	保留时间(min)	母离子	子离子	碰撞电压(V)	锥孔电压(V)
1	磺胺醋酰(Sulfacetamide)	214.24	1.97	215.1	155.9/92.1	14/29	60
2	磺胺嘧啶(Sulfadiazine)	250.28	2.78	251.0	108.0/91.9	32/34	50
3	磺胺噻唑(Sulfathiazole)	255.32	3.32	256.1	91.9/108.1	37/33	70
4	磺胺吡啶(Sulfapyridine)	249.29	3.58	250.0	184.0/108.0	24/33	70
5	磺胺甲基嘧啶(Sulfamerazine)	264.30	3.87	265.1	155.8/92.0	24/41	80
6	磺胺对甲氧嘧啶(Sulfameter)	280.31	4.55	281.0	92.0/108.0	43/33	60
7	磺胺甲噻二唑(Sulfamethizole)	270.33	4.71	271.1	155.7/91.9	19/38	10
8	磺胺二甲基嘧啶(Sulfamethazine)	278.33	4.78	279.1	186.0/124.2	25/29	70
9	甲氧苄啶(Trimethoprim)	290.32	4.86	291.1	260.9/123.1	34/33	90
10	磺胺甲氧吡嗪(Sulfamethoxy pyridazine)	280.30	5.03	281.0	156.2/92.0	24/38	60
11	氧氟沙星(Ofloxacin)	361.37	5.13	362.1	261.0/344.0	38/30	100
12	培氟沙星(Pefloxacin)	333.26	5.14	334.1	315.9/233.1	30/36	90
13	依诺沙星(Enoxacin)	320.32	5.17	321.1	303.0/231.9	27/47	110
14	诺氟沙星(Norfloxacin)	319.33	5.32	320.2	301.9/233.0	28/34	100
15	磺胺氯吡嗪(Sulfachloropyridazine)	284.72	5.32	285.1	156.0/91.9	23/41	20
16	四环素(Tetracycline)	444.35	5.37	445.1	409.9/427.0	26/19	20

(续表)

编号	抗生素名称	分子量	保留时间(min)	母离子	子离子	碰撞电压(V)	锥孔电压(V)
17	环丙沙星(Ciprofloxacin)	331.34	5.51	332.1	314.0*/230.8	28/47	90
18	磺胺甲基异噁唑(Sulfamethoxazole)	253.28	5.51	254.1	91.9*/107.9	37/34	70
19	土霉素(Oxytetracycline)	460.62	5.51	461.2	425.8*/201.0	28/51	20
20	磺胺间甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine)	280.30	5.59	281.1	125.9*/108.0	26/35	70
21	恩诺沙星(Enrofloxacin)	359.39	5.64	360.1	316.1*/245.0	27/37	90
22	洛美沙星(Lomefloxacin)	351.36	5.80	352.1	265.0*/237.0	31/46	110
23	磺胺邻二甲氧嘧啶(Sulfadoxine)	310.33	5.86	311.0	156.0*/91.9	25/41	60
24	奥比沙星(Orbifloxacin)	395.38	5.89	396.2	294.9*/378.0	33/28	110
25	磺胺二甲基异噁唑(Sulfisoxazole)	267.30	5.89	268.1	112.9*/92.1	20/40	70
26	双氟沙星(Difloxacin)	399.24	5.93	400.1	382.0*/299.0	30/39	90
27	沙拉沙星(Sarafloxacin)	385.13	6.09	386.1	367.9*/342.0	32/27	110
28	磺胺苯酰(Sulfabenzamide)	276.31	6.19	277.1	156.2*/92.0	17/36	70
29	磺胺苯吡唑(Sulfaphenazole)	314.36	6.51	315.1	158.0*/131.1	37/66	80
30	克林沙星(Clinafloxacin)	365.79	6.54	366.1	347.9*/304.8	27/30	90
31	司帕沙星(Sparfloxacin)	392.40	6.55	393.2	291.9*/250.7	36/43	120
32	西诺沙星(Cinoxacin)	262.22	6.67	263.1	245.0*/216.9	22/31	80
33	金霉素(Chlortetracycline)	478.75	6.79	479.1	444.1*/153.9	29/36	80
34	磺胺间二甲氧嘧啶(Sulfadimethoxine)	310.33	6.83	311.1	156.0*/107.9	26/37	80
35	恶喹酸(Oxolinic acid)	261.23	7.02	262.1	244.0*/215.9	41/41	50
36	磺胺喹恶啉(Sulfaquinoxaline)	300.34	7.05	301.1	156.0*/92.0	23/41	80
37	多西环素(Doxycycline)	444.21	7.65	445.1	428.0*/409.9	27/34	10
38	萘啶酸(Nalidixic acid)	232.24	7.95	233.1	187.0*/159.0	34/44	60
39	替米考星(Tilmicosin)	869.13	7.98	869.6	696.4*/174.1	57/54	30
40	氟甲喹(Flumequine)	261.25	8.23	262.1	244.0*/202.0	26/45	70
41	磷酸竹桃霉素(Oleandomycin phosphate)	687.86	8.36	688.3	544.2*/158.0	23/35	30
42	泰乐菌素(Tylosin)	916.10	9.14	916.5	772.3*/174.2	42/48	40
43	克拉霉素(Clarithromycin)	747.95	10.36	748.5	590.1*/158.0	28/35	40
44	阿奇霉素(Azithromycin)	748.98	10.37	749.6	591.1*/157.9	27/33	20
45	罗红霉素(Roxithromycin)	837.05	10.57	837.6	679.3*/158.0	31/40	40

注:* 为定量离子。

2 结果

2.1 质谱条件的优化 将 45 种抗生素混合标准溶液用 50%乙腈水溶液(含 0.1%甲酸)稀释成 200 $\mu\text{g/L}$,以针泵进样形式注入离子源,在 ESI^+ 模式下进行母离子扫描。45 种待测抗生素的前体离子均以 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 形式存在。在确定的母离子条件下再进行子离子扫描,选取响应值较高的子离子,建立离子对。在 MRM 模式下分别优化其锥孔电压和碰撞电压,完成质谱条件的建立。混标中同分异构体化合物的质谱参数,可通过配制独立的单标溶液来确认。母离子 m/z 为 281.0 的磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧嘧啶和磺胺对甲氧嘧啶以及母离子 m/z 为 311.0 的磺胺间二甲氧嘧啶和磺胺邻二甲氧嘧啶,母离子碰撞产生的子离子几乎完全一致,无法通过质谱参数来进行区分,只能通过待测物的色谱行为来确认。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 流动相的选择 考察流动相组成分别为 0.1%甲酸水(A)+0.1%甲酸乙腈(B)及 0.1%甲酸水

(A)+0.1%甲酸甲醇(B)时的分离效果。流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈时,磺胺甲氧嘧啶与磺胺对甲氧嘧啶在同一时间出峰,无法实现色谱分离。流动相 B 为 0.1%甲酸甲醇时,两组同分异构体(磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲氧嘧啶和磺胺对甲氧嘧啶以及磺胺间二甲氧嘧啶和磺胺邻二甲氧嘧啶)均能实现有效的色谱分离。因此用 0.1%甲酸水(A)+0.1%甲酸甲醇(B)作为流动相,梯度洗脱程序下在 18 min 内可以有效分离 45 种抗生素。

2.2.2 色谱柱的选择 观察 ACQUITY UPLC[®] BEH C18 色谱柱(2.1 \times 100 mm, 1.7 μm , 美国 Waters)及 ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱(2.1 \times 100 mm, 1.8 μm , 美国 Waters)的分离效果,45 种抗生素均能实现有效分离,但大部分待测物在 BEH C18 柱上的质谱响应值更高,且出峰时间更早,故本实验拟采用 BEH C18 色谱柱。各抗生素的 MRM 总离子流图见图 1,图中峰编号与表 1 中化合物编号一致。

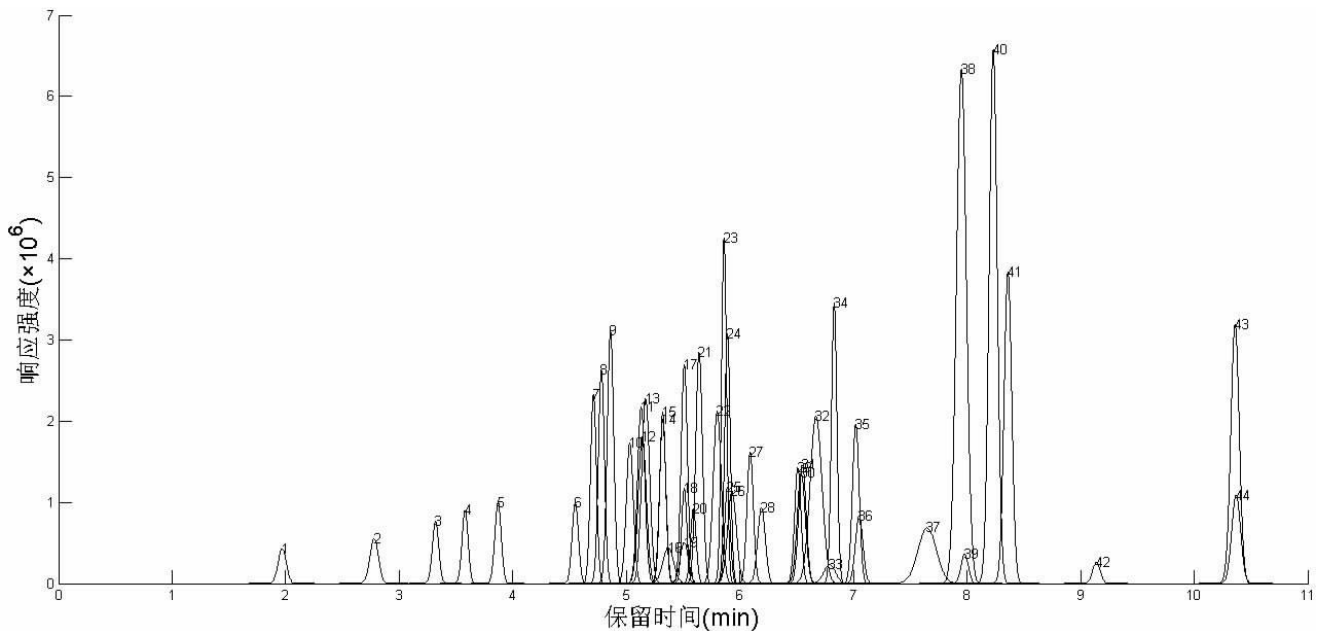


图 1 鸡蛋中 45 种抗生素添加水平为 100 μg/kg 的总离子流图

Figure 1 Total ion chromatogram of 45 antibiotics added to eggs at a level of 100 μg/kg

2.3 基质效应的评价 采用基质提取后添加法进行基质效应的考察,根据公式:基质效应(ME)=(样品基质提取后加标峰面积 - 样品提取后基质峰面积)/同等加标浓度的标准溶液峰面积,采用 100 μg/kg 添加水平进行基质效应评价,45 种待测抗生素的 ME 值在 0.42 ~ 3.20 之间。其中有 28 种抗生素 ME 值小于 0.8,存在强基质抑制效应;有 8 种抗生素 ME 值大于 1.2,存在强基质增强效应;仅有 9 种抗生素 ME 值在 0.8 ~ 1.2,为一般基质效应。目前常采用样品稀释、基质匹配校正、同位素内标校正等方法来降低基质效应。由于 45 种抗生素的同位素内标制作成本高,不易获得,因此采用基质匹配校准曲线法来定量,即用不含抗生素的鸡蛋基质提取物来配制校准曲线。

2.4 前处理条件的优化

2.4.1 提取溶剂的选择 考察提取溶剂乙腈水溶液(含 0.1%甲酸)中乙腈比例分别为 10%、30%、50%、70%、90%对抗生素添加水平为 100 μg/kg 时回收率的影响。结果显示,随着提取溶液中乙腈比例的增加,各待测物的回收率有显著的提升,乙腈比例为 90% 时各待测抗生素的回收效果最好,在 54.3% ~ 109.6% 之间。因此,采用 90% 乙腈水溶液(含 0.1%甲酸)来提取蛋液,待净化分析。

2.4.2 净化方式的选择 比较 QuEChERS (150 mg HLB-P + 50 mg PSA)和固相萃取(HLB-P 填料)两种净化方式对抗生素添加水平为 100 μg/kg 时回收率的影响。QuEChERS 净化后的回收率在 54.3% ~ 109.6% 之间,SPE 净化后的回收率在 31.6% ~ 109.4% 之间。磺胺二甲基异噁唑、金霉素、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉、替米考星、泰乐菌素、克拉霉素、阿奇霉素和罗红霉素共 9 种抗生素用 QuEChERS 净化后的回收率比 SPE 净化高出 20% 以上,故采用 QuEChERS 处理方法净化样品。

2.5 方法验证

2.5.1 校准曲线和检出限 本法采用基质匹配校准曲线法,四大类共 45 种抗生素的线性范围、相关系数见表 2。线性范围为 1.0 ~ 200 μg/L,相关系数均大于 0.995。称取 11 份无抗鸡蛋加标后制成各待测组分浓度为 2 μg/kg 抗生素加标样,经样品前处理后本法分析。检出限的计算公式为 MDL = S × t_(n-1,0.01),其中 S 表示标准偏差,n 值为 11,t_(n-1,0.01)代表显著性水平为 0.01 (单侧)且自由度为 10 时的 t 值。查询 t 界值表,单侧 t_{0.01,10}=2.76。经计算,45 种抗生素的检出限在 0.1 ~ 0.7 范围内,均低于 1.0 μg/kg,故用本方法测定 45 种抗生素的检出限统一为 1.0 μg/kg。

表 2 方法的回归方程、相关系数及加标回收率(n=7)

Table 2 Regression equations, correlation coefficients, and spiked recoveries of the method (n=7)

编号	化合物名称	回归方程	相关系数(r)	加标 2 μg/kg		加标 10 μg/kg		加标 100 μg/kg	
				回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
1	磺胺醋酰	y=20 045x+17 281	0.998 0	76.9	15.7	84.6	11.7	83.0	4.2
2	磺胺嘧啶	y=3.390 × 10 ⁴ x - 910	1.000 0	76.6	6.5	71.0	8.9	72.9	7.9
3	磺胺噻唑	y=3.634 × 10 ⁴ - 1 884	0.997 5	79.8	7.9	77.6	7.1	73.4	4.4

(续表)

编号	化合物名称	回归方程	相关系数(r)	加标 2 μg/kg		加标 10 μg/kg		加标 100 μg/kg	
				回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
4	磺胺吡啶	$y=3.760 \times 10^4x+2\ 544$	0.998 9	73.2	9.4	74.4	9.1	72.9	4.5
5	磺胺甲基嘧啶	$y=5.232 \times 10^4x+13\ 523$	0.998 4	73.7	10.2	74.2	7.4	73.5	6.9
6	磺胺对甲氧嘧啶	$y=4.171 \times 10^4x+1\ 618$	0.998 3	80.1	8.4	80.2	11.5	78.6	3.6
7	磺胺甲噻二唑	$y=5.234 \times 10^4x+20\ 646$	0.996 6	70.0	9.4	75.5	8.5	73.1	9.6
8	磺胺二甲基嘧啶	$y=7.910 \times 10^4x+24\ 470$	0.996 5	76.8	13.7	74.1	6.4	76.4	5.3
9	甲氧苄啶	$y=1.098 \times 10^5x+27\ 076$	0.997 9	97.1	11.1	97.5	13.6	87.6	4.9
10	磺胺甲氧噻嗪	$y=8.382 \times 10^4x+3\ 469$	0.998 7	82.8	13.0	81.6	11.4	80.8	5.2
11	氧氟沙星	$y=9.536 \times 10^4x+7\ 631$	0.999 0	80.8	6.9	81.3	8.9	82.6	7.0
12	培氟沙星	$y=8.610 \times 10^4x+1.176 \times 10^5$	0.997 6	81.3	13.2	77.6	13.1	89.5	6.0
13	依诺沙星	$y=1.572 \times 10^5x+9.210 \times 10^4$	0.996 5	83.8	10.5	86.8	15.5	88.2	6.5
14	诺氟沙星	$y=1.067 \times 10^5x+4.046 \times 10^4$	0.999 2	85.9	12.0	85.2	9.0	82.0	5.0
15	磺胺氯噻嗪	$y=8.536 \times 10^4x+19\ 598$	0.999 2	78.7	4.0	75.5	6.4	78.4	4.5
16	四环素	$y=8.546 \times 10^4x+3\ 006$	0.998 7	69.2	10.6	71.6	2.5	72.6	11.6
17	环丙沙星	$y=1.157 \times 10^5x+2.172 \times 10^5$	0.998 9	71.3	12.0	79.5	12.7	92.4	5.5
18	磺胺甲基异噁唑	$y=3.164 \times 10^4x+1\ 132$	0.999 9	86.2	10.1	84.2	7.4	83.6	7.4
19	土霉素	$y=7.029 \times 10^4x-3.801 \times 10^4$	0.999 2	73.6	8.0	73.3	13.2	80.8	3.7
20	磺胺间甲氧嘧啶	$y=4.149 \times 10^4x+31\ 799$	0.999 7	88.0	11.5	80.9	9.8	77.8	1.2
21	恩诺沙星	$y=261\ 679x-59\ 289$	0.999 2	82.9	8.0	87.7	14.5	87.6	14.5
22	洛美沙星	$y=8.525 \times 10^4x-20\ 462$	0.998 8	90.6	8.6	84.7	6.6	89.7	4.3
23	磺胺邻二甲氧嘧啶	$y=1.385 \times 10^5x+6.251 \times 10^4$	0.999 5	76.2	7.8	87.7	10.5	86.9	6.3
24	奥比沙星	$y=8.457 \times 10^4x+7.716 \times 10^4$	0.996 3	82.1	10.2	89.9	8.0	91.9	4.6
25	磺胺二甲基异噁唑	$y=3.878 \times 10^4x+3.500 \times 10^4$	0.996 9	85.6	13.1	82.4	6.7	88.6	10.2
26	双氟沙星	$y=6.698 \times 10^4x+2.341 \times 10^5$	0.998 2	85.3	12.2	79.1	5.9	88.6	7.1
27	沙拉沙星	$y=7.404 \times 10^4x+4\ 878$	0.995 9	90.7	13.3	81.3	9.9	81.5	8.9
28	磺胺苯酰	$y=4.222 \times 10^4x+9\ 739$	0.997 9	71.6	13.3	72.4	4.9	79.0	7.3
29	磺胺苯吡唑	$y=5.664 \times 10^4x+1.057 \times 10^5$	0.999 5	105.7	8.6	85.4	6.6	85.4	2.1
30	克林沙星	$y=6.584 \times 10^4x+12\ 115$	0.999 7	83.3	6.7	80.3	12.4	81.4	1.9
31	司帕沙星	$y=6.054 \times 10^4x-576$	0.999 2	90.4	6.5	81.2	8.2	88.3	8.2
32	西诺沙星	$y=1.573 \times 10^5x-3.423 \times 10^4$	0.999 2	94.6	8.6	84.8	9.8	90.6	5.6
33	金霉素	$y=5.872 \times 10^4x-4.344 \times 10^4$	0.997 4	75.0	11.4	75.8	6.8	75.4	8.2
34	磺胺间二甲氧嘧啶	$y=1.109 \times 10^5x+3.188 \times 10^4$	0.997 5	72.7	13.2	81.9	9.3	82.7	6.7
35	恶喹酸	$y=7.300 \times 10^4x-3\ 706$	0.996 2	84.9	15.8	80.9	12.3	84.6	3.3
36	磺胺喹恶啉	$y=5.630 \times 10^4x+9\ 446$	0.998 3	76.4	11.8	79.2	12.1	83.0	9.8
37	多西环素	$y=8.792 \times 10^4x-1.515 \times 10^5$	0.998 8	87.8	8.3	81.5	8.0	81.5	4.1
38	萘啶酸	$y=2.419 \times 10^5x+1.979 \times 10^5$	0.996 6	81.3	11.5	109.6	10.9	104.5	8.3
39	替米考星	$y=9\ 340x+1\ 021$	0.998 7	87.6	9.9	93.1	13.0	94.1	6.2
40	氟甲喹	$y=2.193 \times 10^5x+1.299 \times 10^6$	0.995 1	75.7	4.7	89.9	5.1	93.1	10.7
41	磷酸竹桃霉素	$y=1.621 \times 10^5x+8\ 083$	0.997 9	76.5	7.8	84.6	8.8	90.4	5.9
42	泰乐菌素	$y=13\ 014x+7\ 348$	0.998 7	74.9	8.4	82.3	12.3	85.9	6.7
43	克拉霉素	$y=1.588 \times 10^5x+1.461 \times 10^5$	0.995 3	77.4	10.0	101.6	7.1	101.7	7.6
44	阿奇霉素	$y=6.612 \times 10^4x+17\ 597$	0.997 9	85.5	12.7	93.8	12.7	92.8	2.1
45	罗红霉素	$y=1.749 \times 10^5x+8.007 \times 10^4$	0.998 1	78.8	2.2	91.1	6.3	95.7	4.9

2.5.2 精密度和准确度 以无抗鸡蛋为本底, 进行加标回收及精密度试验, 分别添加低 (2 μg/kg)、中 (10 μg/kg)、高 (100 μg/kg) 三个浓度水平, 各添加水平平行测定 7 次, 计算平均回收率和相对标准偏差 (RSD), 结果见表 2。四大类共 45 种抗生素的平均回收率为 69.2% ~ 109.6%, 相对标准差为 1.2% ~ 15.8%。

2.6 实际样本的检测 采用该方法对在上海市某区大型商超和农贸市场采购的 36 份鸡蛋样品进行检测, 共 8 份样品有不同种类的抗生素检出, 检出率为 22.2%, 涉及的指标为环丙沙星、恩诺沙星、甲氧苄啶和多西环素, 检出率分别为 11.1%、16.7%、2.8%、11.1%。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》规定恩诺沙星、甲氧苄

啶、多西环素在禽蛋中的最大残留限量均为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其中恩诺沙星是以恩诺沙星与环丙沙星之和参与评价^[15]。有 3 份样品抗生素含量超标, 超标率为 8.3%, 其中恩诺沙星超标率为 8.3% (含量水平为 20.4、57.5 和 275 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、甲氧苄啶超标率为 2.8% (含量水平为 14.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

3 讨论

在质谱条件优化过程中, 发现磺胺类化合物因其结构中特异的桥键部分 ($-\text{SO}_2-$) 断裂所致, 其典型特征碎片离子为 m/z 92、 m/z 108 和 m/z 156^[6]。抗生素的稳定性与稀释溶剂关系很大, 四环素类抗生素在水溶液中稳定性明显优于甲醇, 因此本方法用纯水来配制四环素类标准溶液^[6]。在摸索质谱参数时用 50% 乙腈水溶液稀释抗生素标准物质, 用 10% 甲醇水 (含 0.1% 甲酸) 稀释混合标准溶液, 可减少甲醇对抗生素稳定性的影响^[6]。在流动相中添加 0.1% 甲酸作为改进剂, 可以提高待测物在 ESI+ 模式下的灵敏度, 而在水相和有机相中均加入 0.1% 甲酸, 可以避免梯度洗脱时甲酸比例的改变所造成的影响^[6]。

在样品前处理条件优化过程中, 发现随着提取溶液中乙腈比例的增加, 待测抗生素的回收率均有显著的提高, 可能与有机溶剂能促进蛋白质分子的聚集和沉淀有关。乙腈可与水互溶, 在溶解于水的同时从蛋白质分子周围的水化层中夺走水分子, 破坏蛋白质分子的水膜, 而发生沉淀现象。QuEChERS 比 SPE 净化效果更好, 可能与鸡蛋蛋白质含量高易导致萃取小柱堵塞, 从而影响回收率有关^[7]。

本研究通过优化仪器参数和前处理条件, 建立了 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中 45 种抗生素的检测方法。方法前处理操作简单、耗材少、重复性高、灵敏度高、准确度高, 可满足常规实验室快速大批量测定禽蛋中抗生素的需求。

利益冲突声明 本研究不存在任何利益冲突

参考文献

- [1] 张萍. 鸡蛋中抗生素类药物残留的研究进展[J]. 北方药学, 2015, 12(4): 90-91, 92.
Zhang P. Research progress on antibiotic residues in eggs[J]. Journal of North Pharmacy, 2015, 12(4): 90-91, 92.(In Chinese)
- [2] 侯学文, 邢燕, 高慧, 等. 山东省市售鸡蛋中抗生素残留及暴露风险评估[J]. 预防医学论坛, 2023, 29(9): 651-655.
Hou XW, Xing Y, Gao H, et al. Risk assessment on antibiotic residues and exposure in commercially available eggs in Shandong province[J]. Preventive Medicine Tribune, 2023, 29(9): 651-655.(In Chinese)
- [3] 刘孟文, 杨欢欢, 赵一鹏, 等. 陕西省 329 份市售鸡肉和鸡蛋中四环素类抗生素残留调查 [J]. 现代预防医学, 2019, 46(17): 3131-3133.

- Liu MW, Yang HH, Zhao YP, et al. Residues of tetracycline antibiotics in 329 chicken and eggs on market, Shaanxi [J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(17): 3131-3133.(In Chinese)
- [4] 肖永华, 革丽亚, 梁高道, 等. 湖北省鸡肉和鸡蛋中多组分抗生素残留分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 292-296.
Xiao YH, Ge LY, Liang GD, et al. Occurrence of multi-antibiotics in chicken and egg samples in Hubei [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 292-296.(In Chinese)
- [5] 王姝婷, 黄希汇, 刘少颖, 等. 市售鸡肉与鸡蛋中四环素类抗生素残留调查与膳食暴露风险评估 [J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(7): 1063-1066.
Wang ST, Huang XH, Liu SY, et al. Investigation and dietary exposure risk assessment of tetracycline antibiotics residues in eggs and chicken sold on the market[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(7): 1063-1066.(In Chinese)
- [6] 郝春慧, 崔伟, 骆玲飞, 等. 水中 52 种抗生素全自动固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定 [J]. 中国公共卫生, 2024, 40(3): 382-388.
Hao CH, Cui W, Luo LF, et al. Determination of 52 antibiotics in water through a fully automated solid-phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry system[J]. Chinese Journal of Public Health, 2024, 40(3): 382-388.(In Chinese)
- [7] 王敏娟, 胡佳薇, 田丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中 21 种喹诺酮及四环素类抗生素残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(4): 473-476.
Wang MJ, Hu JW, Tian L, et al. Simultaneous determination of quinolone and tetracycline residues in eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27 (4): 473-476.(In Chinese)
- [8] 李磊, 周贻兵, 张权, 等. QuEChERS 净化超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鸡蛋中 13 种喹诺酮类抗生素[J]. 现代预防医学, 2018, 45(24): 4482-4486, 4490.
Li L, Zhou YB, Zhang Q, et al. Rapid determination of 13 quinolones antibiotics in eggs by QuEChERS purification combined with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Preventive Medicine, 2018, 45 (24): 4482-4486, 4490.(In Chinese)
- [9] 廖艳华, 周劭桓, 林文斯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 11 种喹诺酮类抗生素残留的样品前处理方法优化 [J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(8): 910-914, 921.
Liao YH, Zhou SH, Lin WS, et al. Optimization of sample pretreatment method for determination of 11 quinolone antibiotic residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, 28(8): 910-914, 921.(In Chinese)
- [10] Paoletti F, Sdogati S, Barola C, et al. Development and validation of a multiclass confirmatory method for the determination of over 60 antibiotics in eggs using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry[J]. Food Control, 2021, 127: 108109.
- [11] Zhou J, Xu JJ, Cong JM, et al. Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk[J]. Journal of Chromatography a, 2018, 1532: 20-29.
- [12] Yang Y, Li X, Lin J, et al. A modified QuEChERS-based

- National Health Commission of the People's Republic of China. GBZ 89-2024 Diagnostic standard for occupational mercury poisoning[S]. Beijing: Standards Press of China, 2024.(In Chinese)
- [21] Cho GJ, Park HT, Shin JH, et al. The relationship between blood Mercury level and osteoporosis in postmenopausal women [J]. Menopause (New York, N.Y.), 2012, 19(5): 576-581.
- [22] Tang YC, Yi Q, Wang SH, et al. Normal concentration range of blood Mercury and bone mineral density: a cross-sectional study of National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2005-2010 [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2022, 29(5): 7743-7757.
- [23] Elturki MA. Using peromyscus leucopus as a biomonitor to determine the impact of heavy metal exposure on the kidney and bone mineral density: results from the tar creek superfund site[J]. PeerJ, 2022, 10: e14605.
- [24] Xu K, Gao BQ, Liu TF, et al. Association of blood Mercury levels with bone mineral density in adolescents aged 12-19 [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2023, 30(16): 46933-46939.
- [25] Yadav MC, Simao AMS, Narisawa S, et al. Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: a unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2011, 26(2): 286-297.
- [26] 蔺建英,王文英. 妊娠期低水平铅暴露对新生儿血清钙、骨钙素及骨碱性磷酸酶的影响 [J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(3): 222-224.
- Lin JY, Wang WY. Effect of low-level lead exposure during pregnancy on serum calcium, osteocalcin and bone alkaline phosphatase in neonates [J]. Journal of Clinical Pediatrics, 2011, 29 (3): 222-224.(In Chinese)
- [27] Brzóska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. Disorders in bone metabolism of female rats chronically exposed to Cadmium [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, 202(1): 68-83.
- [28] Yachiguchi K, Sekiguchi T, Nakano M, et al. Effects of inorganic Mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the Marine teleost as a model system of bone [J]. Zoological Science, 2014, 31(5): 330-337.
- [29] Hicks DG, O'Keefe RJ, Reynolds KJ, et al. Effects of Lead on growth plate chondrocyte phenotype [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 1996, 140(1): 164-172.
- [30] 石凯丽,马宏,王文英,等. 铅对儿童骨代谢的影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2004, 12(2): 109-111.
- Shi KL, Ma H, Wang WY, et al. Influence of Lead on bone metabolism of preschool children[J]. Chinese Journal of Child Health Care, 2004, 12(2): 109-111.(In Chinese)

收稿日期:2024-05-08

(上接第 3990 页)

- UPLC-MS/MS method for rapid determination of multiple antibiotics and sedative residues in freshwater fish[J]. Food Chemistry: X, 2024, 22: 101268.
- [13] Gajda A, Nowacka-Kozak E, Gbylik-Sikorska M, et al. Multi-residues UHPLC - MS/MS analysis of 53 antibacterial compounds in poultry feathers as an analytical tool in food safety assurance [J]. Journal of Chromatography B, 2019, 1104: 182-189.
- [14] Moretti S, Dusi G, Giusepponi D, et al. Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat [J]. Journal of Chromatography a, 2016, 1429: 175-188.
- [15] 国家市场监督管理总局. 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[S]. 北京: 中国农业出版社, 2022.
- State Administration for Market Regulation. GB 31650.1-2022 National food safety standard - Maximum residue limits for 41 veterinary drugs in foods[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2022.

收稿日期:2024-06-18

读者·作者·编者

优先征集国家、省部级基金项目 及重点攻关项目论文启事

为了提高本刊的学术水平, 促进本刊发展, 特向各医学院校、医院、医学科研机构广泛征集国家、省部级自然科学基金资助项目和重点攻关项目的论文, 范围包括基础医学、预防医学和临床医学各专业的论著、调查报告、技术与方法等。对上述专业范围的基金项目或攻关项目产出的文稿须在首页下注明项目名称、项目编号, 并提交有关证明的复印件, 本刊一经审查合格, 将优先发表, 免收审稿费。

欢迎积极撰文, 踊跃投稿。