

鸡肉中多种抗生素超高效液相-静电场轨道阱 高分辨质谱检测方法

潘晓东, 韩见龙, 陈尚

浙江省疾病预防控制中心理化与毒理检验所, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 基于平行反应监测 (PRM) 模式的超高效液相-静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap-MS) 法, 通过优化样品前处理方法建立鸡肉中抗生素残留的检测方法。**方法** 通过空白基质加标的鸡肉样品, 采用含乙二胺四乙酸二钠和甲酸的95%乙腈水溶液提取; 提取液采用C₁₈、PSA和GCB 3种填料的不同组合方式净化并选择抗生素回收率较高的组合; 采用UPLC-Q-Orbitrap-MS的PRM模式测定32种抗生素残留。**结果** 采用C₁₈填料净化提取液, 加标回收率>80%的抗生素数量最多, 基质效应为82.2%~112.6%。32种抗生素的检出限为0.8~5.8 μg/kg, 线性相关系数均>0.99, 加标回收率为71.3%~111.5%, 相对标准偏差为3.2%~14.2%。**结论** 该方法适用于鸡肉中多种抗生素的检测与定量分析。

关键词: 高分辨质谱; 静电场轨道阱; 抗生素残留; 平行反应监测

中图分类号: R155.5 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2023) 05-0456-04

Determination of antibiotic residues in chicken meat using ultra-high-performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry

PAN Xiaodong, HAN Jianlong, CHEN Qing

Department of Physicochemical and Toxicology, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To optimize the sample pretreatment and establish an ultra-high-performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Orbitrap-MS) assay based on the parallel reaction monitoring (PRM) mode for determination of antibiotic residues in chicken meat. **Methods** Blank matrix-spiked chicken meat samples were extracted with 95% acetonitrile aqueous solution containing Na₂EDTA and formic acid. The extraction solutions were cleaned up using different combinations of C₁₈, PSA and GCB fillers, and the combinations with a higher antibiotic recovery rate was screened. The residues of 32 antibiotics were determined using UPLC-Q-Orbitrap-MS based on the PRM mode. **Results** If the extraction solution was cleaned up using the C₁₈ filler, the largest number of antibiotics with a spiked recovery rate of >80% was seen, with matrix effects of 82.2% to 112.6%. The detection limits of 32 antibiotics were 0.8 to 5.8 μg/kg, with linear correlation coefficients of >0.99, spiked recovery rates of 71.3% to 111.5% and relative standard deviations of 3.2% to 14.2%. **Conclusion** The UPLC-Q-Orbitrap-MS assay is suitable for determination and quantitative analysis of multiple antibiotics in chicken meat.

Keywords: high-resolution mass spectrometry; orbitrap; antibiotic residue; parallel reaction monitoring

畜禽养殖常用兽药包括β-内酰胺类、磺胺类、喹诺酮类等化学合成抗菌及抗球虫类药物, 不规范使用可能导致药物残留^[1-3]。由于药物种类、代谢物繁多且类别间差异较大, 兽药残留检测具有一定挑战性。液相色谱-三重四极杆质谱法是目前检测鸡肉中

兽药残留的主要方法, 该方法依赖母离子和子离子的通道信息, 进行目标物的鉴别和定量分析, 具有灵敏度高、稳定性强、分析速度快的特点, 但分辨率较低, 在复杂基质的情况下可能出现假阳性结果。高分辨质谱具有较高的选择性和良好的重现性, 可通过兽药母离子的精确质量数和碎片离子对目标物进行筛查和定量^[4-5]。静电场轨道阱高分辨质谱仪可以实现多种采集模式^[6], 其中, 平行反应监测 (parallel reac-

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2023.05.021

作者简介: 潘晓东, 博士, 副研究员, 主要从事理化检验工作

通信作者: 陈尚, E-mail: qingchen@cde.zj.cn

tion monitoring, PRM) 是一种基于目标母离子的二级质谱离子响应的靶向定量采集模式, 适用于复杂样品基质。本研究基于 PRM 模式的超高效液相-静电场轨道阱高分辨质谱 (ultra high performance liquid phase quadrupole orbitrap mass spectrometry, UPLC-Q-Orbitrap-MS), 通过优化样品前处理过程建立检测鸡肉中多种抗生素残留的方法。

1 材料与方法

1.1 材料 鸡肉样品 (鸡胸肉) 购于农贸市场。取 200 g, 去皮, 剔除筋膜, 用组织匀浆机均质, 均分成 2 份, 分别装入洁净容器中密封、标记, 于 -18°C 以下冷冻存放。氯化钠、乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA) 为分析纯, 乙腈、甲酸为色谱纯, 均购自美国 Merck 公司。 C_{18} 填料 ($40\sim 63\ \mu\text{m}$)、石墨化碳黑 ($120\sim 400$ 目, GCB)、N-丙基乙二胺 (PSA), 均购自上海安谱实验科技股份有限公司。抗生素标准品 32 种, 购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司, 纯度均 $>95\%$ 。

1.2 前处理方法 采用分散固相萃取法进行前处理。取 4.0 g 均质样品于 50 mL 塑料离心管内, 加入 10 mL 含有 0.1% 甲酸的 95% 乙腈水溶液和 0.1 g Na_2EDTA , 震荡 1 min, 再加入 0.5 g 氯化钠, 涡旋混匀 15 s, 超声 15 min, 以 $10\ 000\times g$ 离心 5 min, 取上清液备用。另取 15 mL 离心管, 分别加入 3 种不同的填料组合: (1) 0.25 g C_{18} ; (2) 0.25 g C_{18} 和 0.25 g PSA; (3) 0.25 g C_{18} 、0.25 g PSA 和 0.25 g GCB。移入前述上清液 4 mL, 震荡 1 min, $10\ 000\times g$ 离心 5 min, 取上清液, 氮气吹至尽干, 采用 10% 甲醇水溶液 (含 0.1% 甲酸) 复溶至 1 mL。采用空白鸡肉基质加标 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 比较 32 种抗生素的加标回收率, 选择回收率较高的填料组合。

1.3 仪器条件 采用 Vanquish LC 液相色谱仪 (美国 Thermo 公司)、Waters Acquity BEH C_{18} 色谱柱 ($1.7\ \mu\text{m}$, $2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$)。流动相 A: 含 0.1% 甲酸的水, 流动相 B: 含 0.1% 甲酸的乙腈。梯度洗脱: 0~2 min, 3%B; 2~9 min, 100%B; 9~11 min, 100%B; 11~11.1 min, 3%B; 11.1~12 min, 3%B。流速: $0.4\ \text{mL}/\text{min}$; 柱温: 40°C ; 进样量: $2\ \mu\text{L}$ 。

采用 Q Exactive 高分辨质谱仪 (美国 Thermo 公司)。离子传输管温度: 320°C ; 鞘气 (氮气) 流速: $40\ \text{L}/\text{h}$; 辅助气 (氮气) 流速: $10\ \text{L}/\text{h}$; 喷雾电压: $4.0\ \text{kV}$; RF-lens 50。采用正离子扫描模式, PRM 监测模式, 一级质谱扫描范围: $m/z\ 200\sim 700$, 分辨率: $R=70\ 000$, C-trap 最大容量 (AGC target): 2×10^5 , 最大注入时间: 200 ms; 二级质谱分辨率: $R=$

$35\ 000$; TopN=10; 二级最低阈值: 104; 电荷离子排除: ≥ 2 ; 顶点激发: 2~8 s; 碰撞能量 NCE/step: 35、45、60 eV。

1.4 基质效应分析 采用空白鸡肉基质提取液和 50% 甲醇水溶液, 分别配制 $20\ \mu\text{g}/\text{L}$ 的抗生素标准溶液, 测定抗生素的质谱响应强度。基质效应=基质匹配标准溶液质谱响应/50% 甲醇水溶液标准溶液质谱响应。

1.5 方法学验证 采用空白鸡肉基质提取液, 配制 2、5、10、50、80、 $100\ \mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液进行定量校准, 以 3 倍信噪比的响应浓度计算方法的检出限。同时, 进行加标回收率和精密度实验, 加标量为 10、 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 分别重复测定 5 次。采用 Xcalibur 4.0 软件进行数据采集和定量分析。

2 结果

2.1 分散固相萃取优化结果 分散固相萃取法中分别采用 C_{18} 填料、 $\text{C}_{18}+\text{PSA}$ 填料、 $\text{C}_{18}+\text{PSA}+\text{GCB}$ 填料, 加标回收率 $>80\%$ 的抗生素数量分别有 27、21 和 20 种, 因此, 本研究选择 C_{18} 填料用于提取液的净化处理。

2.2 色谱-质谱检测结果 在 PRM 监测模式下, 32 种抗生素前体离子实际测得的质荷比与理论相比, 偏差均 $<5\times 10^{-6}$ 。各组分在 4.0~9.5 min 内出峰, 但不同组分的质谱响应差异较大, 如磺胺二甲氧嘧的质谱响应峰面积是磺胺多辛的 2 倍, 氧氟沙星的质谱响应峰面积是左氧氟沙星的 3 倍。32 种抗生素的检出限范围在 $0.8\sim 5.8\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 之间, 最低为萘啶酸, 最高为左氧氟沙星。见表 1。

2.3 基质效应分析结果 通过比较空白鸡肉基质和 50% 甲醇水溶液, 32 种抗生素的基质效应为 $82.2\%\sim 112.6\%$; 其中磺胺甲噁唑、磺胺喹噁啉、西诺沙星呈现出基质增强效应, 其余 29 种抗生素均呈现出基质减弱效应。

2.4 方法学验证结果 32 种抗生素的线性相关系数均 >0.99 , 加标回收率为 $71.3\%\sim 111.5\%$, 相对标准偏差 (RSD) 为 $3.2\%\sim 14.2\%$ 。其中, 磺胺多辛、左氧氟沙星和莫西沙星的加标回收率 $<80\%$; 磺胺二甲基噁唑、磺胺多辛、青霉素 V、左氧氟沙星、马波沙星和莫西沙星的 RSD $>10\%$ 。见表 2。

2.5 方法应用 从市场采集 30 份鸡肉样品 (20 份鸡胸肉和 10 份鸡大腿肉), 采用上述方法检测抗生素, 结果显示, 有 2 份样品分别检出磺胺二甲氧嘧 [$(21.5\pm 0.8)\ \mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$] 和恩诺沙星 [$(19.6\pm 1.2)\ \mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$], 其余样品 32 种抗生素均未检出。

表 1 32 种抗生素的监测离子参数

Table 1 Ion parameters for monitoring of 32 antibiotics

抗生素	前体离子	碎片离子 m/z	保留时间/min	检出限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
萘啶酸	233.092 1	187.045 6/205.055 9	5.65	0.8
磺胺甲噁唑	254.059 4	108.042 1/156.007 5	4.93	1.2
磺胺喹噁啉	262.087 4	175.023 5/238.045 0	5.74	1.3
西诺沙星	263.066 2	217.055 5/235.065 6	4.93	1.5
磺胺二甲基噁唑	268.075 0	108.042 1/156.007 5	4.48	4.2
氟甲喹	301.075 3	89.058 2/133.082 7	4.12	1.5
磺胺二甲氧嘧	311.080 9	108.042 1/156.007 5	5.31	2.7
磺胺多辛	311.080 9	108.042 1/156.007 5	4.67	5.4
帕珠沙星	319.108 9	89.058 3/280.290 4	8.70	1.2
依诺沙星	321.135 8	234.097 7/257.132 9	4.34	2.1
培氟沙星	334.156 2	233.102 7/290.159 0	4.41	0.9
青霉素 G	335.106 0	160.038 8/176.066 3	5.69	1.2
青霉素 V	351.100 9	114.034 8/160.038 9	5.86	5.2
洛美沙星	352.146 7	237.077 3/265.108 1	4.42	1.5
达氟沙星	358.156 2	88.074 2/340.349 2	8.43	1.2
恩诺沙星	360.171 8	245.102 4/316.174 0	4.51	1.5
那氟沙星	361.155 8	283.080 4/343.146 7	5.61	1.3
氧氟沙星	362.151 1	284.084 1/344.139 7	5.61	1.9
左氧氟沙星	362.151 1	261.097 0/318.153 5	4.24	5.8
马波沙星	363.146 3	262.100 4/319.152 8	4.25	2.1
苯氧乙基青霉素	364.108 7	161.041 9/207.011 1	8.62	1.6
加替沙星	376.166 7	245.066 0/261.096 8	4.62	1.2
沙拉沙星	386.131 1	338.369 3/368.379 8	8.98	1.4
司帕沙星	393.173 3	251.080 2/292.118 1	4.72	1.4
奥比沙星	396.153 0	227.049 8/295.098 1	4.54	1.5
二氟沙星	400.146 7	299.091 6/356.148 0	4.73	1.7
苯唑青霉素	402.111 8	144.040 8/160.038 8	6.09	1.8
莫西沙星	402.182 4	353.979 7/364.460 9	4.09	4.6
头孢匹林	424.063 2	136.950 8/206.991 0	8.75	1.2
头孢唑林	454.029 5	89.058 1/372.157 0	9.02	1.5
阿洛西林	462.144 2	175.082 8/218.086 7	5.28	2.0
美洛西林	539.113 9	89.058 3/133.082 7	8.66	1.4

表 2 空白基质加标样品方法学验证结果 (n=5)

Table 2 Validation of blank matrix-spiked chicken meat samples (n=5)

抗生素	加标回收率/%		RSD/%	相关系数
	加标	加标		
	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		
萘啶酸	90.2	95.4	3.2	0.999 2
磺胺甲噁唑	95.3	111.5	6.2	0.996 8
磺胺喹噁啉	94.2	107.2	4.2	0.995 8
西诺沙星	93.7	110.5	5.2	0.999 1
磺胺二甲基噁唑	74.5	80.1	11.2	0.990 8
氟甲喹	82.6	90.3	7.3	0.998 6
磺胺二甲氧嘧	85.2	93.4	5.2	0.996 6
磺胺多辛	71.3	75.6	14.2	0.990 2
帕珠沙星	86.3	92.5	7.1	0.998 7
依诺沙星	84.6	90.5	5.2	0.996 2
培氟沙星	81.2	94.1	6.2	0.997 7
青霉素 G	79.5	94.2	9.2	0.997 2
青霉素 V	72.9	84.6	13.5	0.990 6
洛美沙星	85.1	88.5	4.3	0.999 2
达氟沙星	86.2	89.7	3.7	0.995 3
恩诺沙星	88.3	93.4	4.6	0.994 2
那氟沙星	82.5	91.6	4.9	0.997 4
氧氟沙星	89.3	95.3	5.6	0.996 3
左氧氟沙星	74.2	76.3	12.8	0.990 7
马波沙星	80.6	88.2	10.1	0.996 5
苯氧乙基青霉素	86.9	96.3	4.9	0.997 1
加替沙星	87.3	90.2	3.9	0.998 0
沙拉沙星	88.1	90.5	8.2	0.997 3
司帕沙星	86.0	91.7	4.7	0.995 4
奥比沙星	84.5	87.9	6.6	0.993 9
二氟沙星	80.2	84.9	7.2	0.998 2
苯唑青霉素	83.6	90.5	8.0	0.996 4
莫西沙星	74.3	76.5	13.8	0.990 5
头孢匹林	90.5	97.6	7.6	0.997 1
头孢唑林	90.3	95.1	5.2	0.996 3
阿洛西林	88.2	94.7	4.1	0.993 4
美洛西林	89.8	95.5	6.3	0.998 2

3 讨论

畜禽养殖过程中使用的抗生素具有不同的理化性质, 例如喹诺酮类和磺胺类不易溶于水, 青霉素类易溶于水^[7-9]。为了克服这些困难, 本研究采用分散固相萃取法进行样品前处理。提取溶液选择含 0.1% 甲酸的 90% 水溶液, 并添加 Na_2EDTA , 起到抗氧化、稳定的作用。由于鸡肉基质非常复杂, 经提取后, 提取液中还含有磷酸、多肽和氨基酸等小分子杂质, 这些杂质可干扰色谱分离及质谱的离子化, 因此还需要对提取溶液进行净化。本研究比较了 C_{18} 、PSA 和

GCB 3 种填料的净化效果, 发现使用 C_{18} 填料, 32 种抗生素的加标回收率相对较高。

本研究针对色谱和质谱检测条件也做了一些优化调整。将色谱柱温提高至 40 $^{\circ}\text{C}$, 以降低流动相的黏度和极性, 并使用 1.7 μm 小颗粒填料的色谱柱提高分离效果。在质谱参数中, 将一级质谱扫描范围限定在 m/z 200~700, 仅监测 1 价离子的电荷离子, 采用 NCE/step 碰撞模式, 减少样品基体的质谱干扰。采用的 PRM 模式是一种选择性较强的靶向分析方法, 通

过四极杆定向监测目标母离子,同时获取母离子产生的所有碎片离子,并提取精准质量的碎片离子作为定量离子。PRM与三重四极杆SRM或MRM通道监测模式相类似,均可用于食品基质中的兽药残留检测。

方法学验证结果显示,32种抗生素的检出限为0.8~5.8 μg/kg,基质加标回收率为71.3%~111.5%,RSD为3.2%~14.2%,提示该方法能够满足鸡肉中抗生素药物残留的定量检测要求。

参考文献

- [1] 陈兴连,李倩,王志飞,等.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡肉和鸡蛋中25种兽药残留[J].质谱学报,2021,42(6):1046-1058.
- [2] 潘晓东,吴平谷,姜维.超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素[J].中国食品卫生杂志,2014,26(6):572-574.
- [3] 张弛,任君,陈达炜,等.分散微固相萃取-超高效液相色谱-高分辨质谱法测定火锅底料中罂粟壳生物碱[J].中国食品卫生杂志,2021,33(1):29-35.

- [4] 唐晓琴,赵舰,贺丽迎,等.72种生物碱高分辨质谱数据库建立与应用[J].中国食品卫生杂志,2020,32(3):228-233.
- [5] 潘晓东,黄百芬,张京顺,等.猪肉中16种β-内酰胺类抗生素UPLC-Q-Orbitrap检测方法研究[J].预防医学,2019,31(11):1100-1104.
- [6] CHEN Q, PAN X D, HUANG B F, et al. Quantification of 16β-lactams in chicken muscle by QuEChERS extraction and UPLC-Q-Orbitrap-MS with parallel reaction monitoring [J]. J Pharmaceut Biomed, 2017, 145: 525-530.
- [7] 刘善菁,宋慧敏,曲斌,等.液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法测定牛奶中8种氨基糖苷类抗生素残留[J].中国兽药杂志,2022,56(8):46-57.
- [8] 韩梅,焦颖,郭灵安,等.QuEChERS-超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时测定生姜中21种喹诺酮类抗生素残留[J].食品安全质量检测学报,2021,12(23):9251-9259.
- [9] 吴明媛,余焘,谢宗升,等.液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查海水中大环内酯类抗生素[J].理化检验(化学分册),2021,57(5):444-449.

收稿日期:2023-01-04 修回日期:2023-04-17 本文编辑:徐文璐

(上接第455页)

实验期间大鼠正常饮食、活动,未出现异常症状和体征,结合高剂量组雄性大鼠体重、进食量、食物利用率和血生化指标结果,推测高剂量组雄性大鼠总食物利用率降低可能是机体的一种正常反应,是铁皮石斛的保健功能,而非毒性^[15-16],但仍需进一步研究证实。

本研究按照铁皮石斛在饲料中的最大允许掺入量^[7]进行实验设计,确定雌性大鼠最大未观察到有害作用剂量等于高剂量,为8.0 g/kg体重,以100倍安全系数计算,人体每日铁皮石斛推荐食用量为0.08 g/kg体重。雄性动物最大有害作用剂量尚需进一步研究确定。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家药典委员会.中华人民共和国药典(2020版)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.
- [2] ZOU R C, WANG Q, SUN J, et al. Research progress in *Dendrobium officinale* polysaccharides in China in the latest decade [J]. Food Res Dev, 2018, 39: 209-214.
- [3] 赵斌,邓仙梅,刘敬.我国近5年铁皮石斛多糖研究概况[J].亚太传统医药,2021,19(9):192-201.
- [4] TANG H X, ZHAO T W, SHENG Y J, et al. *Dendrobium officinale* Kimura et Migo: a review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and industrialization [J/OL]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017 [2023-04-07]. <https://doi.org/10.1155/2017/7436259>.

- [5] 王雨,刘佳,苑洁,等.铁皮石斛的亚慢性毒性研究[J].毒理学杂志,2020,34(3):270-275.
- [6] 李姿,刘敏,胡嘉想,等.铁皮石斛对大鼠血液生化指标影响的研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(11):3579-3583.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准90天经口毒性试验:GB 15193.13-2015[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [8] 栾洁,辛甜,储智勇,等.不同来源铁皮石斛多糖,微量元素及氨基酸含量分析[J].时珍国医国药,2014,25(7):728-729.
- [9] 秦子芳,谭晓妍,宁慧娟,等.不同生长年限铁皮石斛多糖含量与特性分析[J].食品科学,2018,39(6):189-193.
- [10] 曾瑶,陆安静,谭道鹏,等.不同栽培方式铁皮石斛多糖含量的对比分析[J].遵义医科大学学报,2020,43(2):174-178.
- [11] 韩瑜,张久磊,王芳,等.铁皮石斛不同部位、不同时期药用成分分布规律分析[J].时珍国医国药,2015,26(12):3014-3016.
- [12] 朱丽娜,刘贤武,朱红云,等.五种不同基源石斛对小鼠肠推进及胃排空的影响[J].中药与临床,2012,3(1):11-14.
- [13] 谢果珍,唐圆,宁晓妹,等.铁皮石斛多糖对正常小鼠肠道菌群的影响[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2021,47(4):449-454.
- [14] JANDHYALA S M, TALUKDAR R, SUBRAMANYAM C, et al. Role of the normal gut microbiota [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(29): 8787-8803.
- [15] 孙乐,陈晓梅,吴崇明,等.铁皮石斛多糖药理活性研究进展[J].药学学报,2020,55(10):2322-2329.
- [16] 刘雪娜,吴雪娇,刘顺航,等.铁皮石斛的药理作用及其保健食品研发进展[J].保鲜与加工,2021,21(10):144-150.

收稿日期:2023-02-22 修回日期:2023-04-07 本文编辑:吉兆洋