

QuEChERS dSPE EMR-Lipid-LC-MS-MS 测定鸡蛋中 3 种聚醚类抗球虫药物残留

臧国栋, 符靖雯, 杨钦沾, 黄子敬, 陈孟君 (惠州市农产品质量安全监督检测中心, 广东惠州 516008)

摘要 [目的]利用 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除 EMR-Lipid 技术,建立了以 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 为前处理测定鸡蛋中 3 种聚醚类药物残留的液相色谱-质谱联用(LC-MS-MS)方法。[方法]鸡蛋经酸化乙腈提取, Bond Elut EMR-Lipid QuEChERS 净化, 采用 HPLC-MS-MS 上机检测。[结果]3 种聚醚类药物残留在 2.0~100.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系($r>0.999$), 回收率在 84.6%~107.0%。[结论]该方法前处理方便快捷、定量结果准确、再现性好, 适用于鸡蛋中 3 种聚醚类药物残留的测定。

关键词 QuEChERS; EMR-Lipid; 液相色谱串联质谱; 聚醚类
中图分类号 S851.34⁺7 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)32-0075-02

Determination of Three Kinds of Polyether Drug Residues in Eggs by QuEChERS dSPE EMR-Lipid-LC-MS-MS
ZANG Guo-dong, FU Jing-wen, YANG Qin-zhan et al (Huizhou Center for Agricultural Products Quality and Safety Supervision and Testing, Huizhou, Guangdong 516008)

Abstract [Objective] To establish a LC-MS-MS method for the determination of three kinds of polyether residues in eggs by QuEChERS dSPE EMR-Lipid as a pre-treatment using Agilent Bond Elut enhanced lipid removal EMR-Lipid technology. [Method] Egg was extracted by acidified acetonitrile, purified by Bond Elut EMR-Lipid QuEChERS, and detected by HPLC-MS-MS. [Result] There was a good linear relationship between the three kinds of polyether residues in the range of 2.0~100.0 $\mu\text{g/L}$, $r>0.999$. The recoveries ranged from 84.6% to 107.0%. [Conclusion] The method is convenient and accurate, and the quantitative results are accurate and reproducible. It is suitable for the determination of three kinds of polyether residues in eggs.
Key words QuEChERS; EMR-Lipid; Liquid phase tandem mass spectrometry; Polyether

聚醚类抗生素药物是现在使用最广泛的鸡用抗球虫药,在我国普遍用于治疗鸡球虫病。球虫病是由艾美球虫属原球虫感染所得^[1],可破坏家禽肠道的寄生虫疾病。感染球虫病后将会严重影响禽类的肉和蛋的产量,感染严重可导致禽类死亡。但过量添加聚醚类抗生素会增加动物肌肉和蛋中药物的残留,食用后会对人类身体健康不利,甚至可能会加重心血管患者的病情。目前报道的聚醚类抗生素残留检测方法,主要有比色法、微生物法^[2]、薄层法、免疫分析法^[3]、液相色谱法^[4-6]和液相色谱-串联质谱法^[7-13]。比色法、微生物法、薄层法和免疫学法只能检测单一的药物残留,且结果不够准确;液相色谱法需要衍生化,操作繁琐;而液相色谱-串联质谱法灵敏度高,基质效应小,是聚醚类抗生素比较理想的检测方法。笔者采用 Agilent Bond Elut 增强型脂质去除 EMR-Lipid 技术,建立了以 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 为前处理测定鸡蛋中 3 种聚醚类药物残留的高效液相色谱-串联质谱法,前处理过程简单快速,无需衍生,无需固相萃取净化,检出限较低,回收率好且再现性高,适用于鸡蛋中聚醚类抗生素残留的检测分析。

1 材料与方法

1.1 材料 Agilent G6460 三重串联四极杆质谱仪,美国 Agilent 公司,配电喷雾离子源,配 Agilent 1290 超高效液相色谱仪; TGL-16M 高速冷冻离心机,湘仪离心机公司;微孔滤膜(0.22 μm),天津津腾公司。莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素,纯度均大于 95.0%,均来自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;甲醇、

乙腈均为色谱纯, MERCK 公司;甲酸,色谱纯,广州化学试剂厂;试验用水为 Milli-Q 纯水仪净化的超纯水,美国密理博公司。

1.2 标准溶液制备 标物储备液:准确称取 3 种标准物质,用甲醇溶解配制成 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液, -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

混合工作液:准确量取上述各储备液适量,甲醇逐级稀释制备成 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准工作液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3 样品前处理 准确称取去壳搅拌均匀的鸡蛋样品 2.0 g 于 50 mL 离心管内, 然后加入 10 mL 5% 甲酸乙腈提取溶液, 涡旋 1 min, 8 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液待用。dSPE EMR-Lipid 吸附剂先用 5 mL 水活化, 加入 5 mL 上述待用上清液, 涡旋 1 min, 在 8 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 然后取 5 mL 上清液加入已装有 NaCl 和无水 Na_2SO_4 的 EMR-Polish 管中, 充分振动盐析, 8 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 取适量上层乙腈过 0.22 μm 滤膜, 供液质分析。

1.4 液相色谱条件 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C_{18} 柱(2.1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 1.8 μm), Agilent 公司; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 流速 0.3 mL/min; 进样量 5 μL ; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为甲醇; 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Mobile phase gradient elution program

时间 Time min	流速 Flow rate mL/min	A 相 Mobile phase A//%	B 相 Mobile phase B//%
0	0.3	5	95
8	0.3	15	85
9	0.3	5	95

1.5 质谱条件 电离方式为电喷雾电离源(ESI), 正离子模

基金项目 惠州市科技计划项目(20161117141959)。
作者简介 臧国栋(1984—),男,山西朔州人,硕士,从事兽药残留检测与研究。
收稿日期 2017-09-08

式扫描,多反应监测(MRM),离子源温度为350℃;气体为氮气;干燥气流速6 L/min;雾化器压力310 kPa;鞘气温度350℃;通过对毛细管电压、碰撞能等质谱参数的最佳优化,最终确定3种聚醚类药物质谱条件见表2。

表2 3种聚醚类药物的质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters of three kinds polyether drugs

分析物 Analyte	保留时间 Retention time//min	母离子 Molecular ion//m/z	子离子 Fragment ion//m/z	毛细管电压 Capillary voltage//V	碰撞能量 Collision energy//eV
莫能菌素 Monensin	2.322	693.3	479.3 [*] ;461.2	230;230	65;60
盐霉素 Lincomycin	2.892	773.4	513.3 [*] ;431.2	265;265	50;58
甲基盐霉素 Narasin	3.320	787.4	513.3 [*] ;431.2	255;255	55;55

注:^{*}表示定量离子
Note:^{*} denotes quantitative ion

2 结果与分析

2.1 线性关系及检出限 配制3种聚醚类药物混合标准溶液浓度从2.0~100.0 μg/L 进行分析,结果表明:在2.0、5.0、10.0、50.0、100.0 μg/L 的浓度范围内,3种药物都具有良好的线性,线性相关系数 r 大于0.999,记录各待测组分色谱峰

面积,以各组分的进样量为横坐标(X),各组分的峰面积为纵坐标(Y)进行回归分析,以3倍信噪比($S/N=3$)对应的浓度作为方法检出限(LOD),检出限为0.2~0.5 μg/kg,结果见表3。

2.2 回收率及精密度 在鸡蛋空白样品中添加2.0、5.0以

表3 回归方程、相关系数和检出限
Table 3 Regression equation, correlation coefficient and LOD

分析物 Analyte	线性范围 Linear range μg/L	回归方程 Regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	检出限 LOD μg/kg
莫能菌素 Monensin	2.0~100.0	$Y=41.538\ 684X+242.346\ 022$	0.999 6	0.2
盐霉素 Lincomycin	2.0~100.0	$Y=47.545\ 118X+246.427\ 283$	0.999 0	0.6
甲基盐霉素 Narasin	2.0~100.0	$Y=23.619\ 384X+125.241\ 323$	0.999 4	0.5

及10.0 μg/kg 3种聚醚类混合标准溶液,按“1.3”方法进行前处理,每个浓度做6个重复,得到方法平均回收率及精密度,结果如表4所示。3种聚醚类药物残留的平均回收率为84.6%~107.0%,RSD为1.4%~5.6%,鸡蛋空白添加质谱图见图1。

表4 3种聚醚类药物回收率及相对标准偏差($n=6$)
Table 4 Recovery rate and relative standard deviation of 3 kinds poly-ether drugs

分析物 Analyte	添加浓度 Spiked μg/L	平均回收率 Average recovery//%	相对标准偏差 RSD//%
莫能菌素 Monensin	2	92.9	2.2
	5	97.2	2.4
	10	95.3	2.5
盐霉素 Lincomycin	2	96.9	1.4
	5	87.2	1.9
	10	107.0	2.2
甲基盐霉素 Narasin	2	96.7	1.8
	5	97.4	5.6
	10	84.6	4.0

3 讨论

未来兽药残留检测的趋势是快速、简便、准确以及高通量^[14]。该试验将Agilent公司新产品dSPE EMR-Lipid去除脂质增强型产品结合标准QuEChERS方法,应用于含脂量高的鸡蛋样品,获得了理想的除脂净化效果,相比于GB/T 20364—2006《动物源产品中聚醚类残留量的测定》^[15],前处理过程简单快速,不需要固相萃取净化,定量结果准确,回收

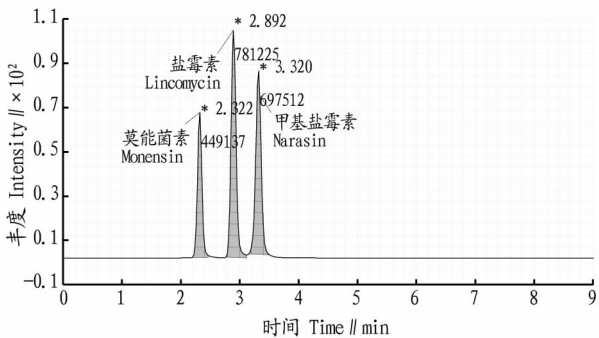


图1 鸡蛋空白添加10 μg/kg 3种兽药TIC图
Fig.1 Egg blank add 3 kinds of veterinary drugs 10 μg/kg TIC map

率高,能够满足平时检测或大批量筛查的需要。

参考文献

[1] 刘贤勇,索勋.鸡球虫病及其控制策略[J].中国农业科技导报,2006,8(5):31-37.
[2] 李娜,孙洁,祁克宗,等.鸡肌肉组织中盐霉素残留的微生物法检测研究[J].饲料工业,2008,29(3):45-48.
[3] HAGREN V,PEIPPO P,TUOMOLA M,et al. Rapid time-resolved fluoroimmunoassay for the screening of monensin residues in eggs[J]. Anal Chim Acta,2006,557(1/2):164-168.
[4] 项新华,涂晓明,贾明宏,等.高效液相色谱法检测动物组织中马杜霉素残留[J].中国公共卫生,2002,18(1):101-102.
[5] 陈明,陈美琴,耿志明,等.鸡蛋中聚醚类抗生素残留检验方法研究[J].中国食品学报,2006,6(5):124-128.
[6] 陈明,耿志明,王冉,等.饲料中聚醚类抗生素的柱后衍生同时测定方法研究[J].中国饲料,2005(20):27-29.

时间)和水平进行正交试验,因素水平设计如表 2 所示。

表 2 真空低温油炸藕片加工工艺正交试验因素水平
Table 2 The factors and levels of orthogonal test of vacuum low-temperature frying lotus root crisp processing technology

水平 Level	因素 Factor		
	切片厚度 (A) Slice thickness mm	油炸温度 (B) Frying temperature//℃	油炸时间 (C) Frying time min
1	2	80	40
2	3	90	50
3	4	100	60

2.2.2 正交试验结果分析。由表 3 可以看出,油炸藕片感官评价的最优方案为 A₂B₂C₁,从极差 R 可分析出,各因素对真空油炸藕片感官影响的大小依次为油炸时间、油炸温度、切片厚度。最佳试验方案与优方案不重合,故对优方案进行试验,试验所得藕片感官评分为 92 分,含油量为 10.8%,优于最佳试验方案。含油量的最优方案为 A₁B₁C₁,从极差 R 可分析出,各因素对真空油炸藕片含油量影响的影响大小为 C>B>A,与感官评价结果相同;最佳试验方案所得藕片感官评分 76 分,含油量为 13.1%。综合以上试验结果,最终确定试验方案为 A₂B₂C₁,即切片厚度 3 mm,油炸温度 90℃,油炸时间 40 min。

3 结论

综上所述,通过单因素试验和正交试验得出低温真空油炸藕片的最佳工艺为莲藕经过筛选、清洗去皮、切片至 3 mm、烫漂、沥水、冷冻,在 90℃下真空油炸 40 min,脱油,包装成品。各因素对真空油炸藕片的影响大小依次为油炸时间、油炸温度、切片厚度。所得藕片产品色泽金黄、组织形态完整,且有油炸藕片独特的香味,口感酥脆不油腻,含油量为 10.8%。

真空油炸过程中,除了切片厚度、油炸温度和油炸时间对藕片的品质有重要的影响,真空度、脱油转速和时间等也能影响藕片质量。由于该试验所用真空油炸机为小型试验机,不具备调节真空度和脱油转速的功能,因此不对此方面再做赘述。

表 3 真空低温油炸藕片加工工艺正交试验结果分析

Table 3 Orthogonal test results of vacuum low-temperature frying lotus root crisp processing technology

试验号 Test No.	因素 Factor			感官评分 (Y ₁) Sensory score//分	含油量 (Y ₂) Oil content %
	切片厚度 (A) Slice thickness mm	油炸温度 (B) Frying temperature ℃	油炸时间 (C) Frying time min		
1	1	1	1	76	13.1
2	1	2	2	79	10.0
3	1	3	3	75	11.5
4	2	1	2	74	11.2
5	2	2	3	82	11.7
6	2	3	1	89	11.3
7	3	1	3	77	10.9
8	3	2	1	83	11.5
9	3	3	2	78	11.9
K _{1(Y₁)}	76.67	75.67	82.67		
K _{2(Y₁)}	81.67	81.33	77.00		
K _{3(Y₁)}	79.33	80.67	78.00		
R _(Y₁)	5.00	5.66	5.67		
K _{1(Y₂)}	11.53	11.73	11.97		
K _{2(Y₂)}	11.40	11.07	11.03		
K _{3(Y₂)}	11.43	11.57	11.37		
R _(Y₂)	0.13	0.67	0.93		

真空低温油炸技术生产藕片,是将原料莲藕置于真空负压和低温下进行油炸和脱水,这种加工技术既可以避免氧化作用,降低产品含油量,又可以有效地抑制油炸过程中产生丙烯酰胺等致癌物质,同时最大程度地保存了物料原有的色、香、味和营养物质,顺应了人们对营养、健康食品的需求。

参考文献

[1] 朱定和,夏文水. 莲藕食品的加工现状与发展[J]. 食品工业科技,2002,23(8):99-100.
[2] 钮福祥,王红杰,徐飞,等. 果蔬真空油炸脱水技术研究及果蔬脆片产业发展概况[J]. 中国食物与营养,2012,18(2):24-29.
[3] 张愫,范柳萍. 真空低温油炸技术原理及其特点[N]. 中国食品报,2003-06-25.
[4] 钮福祥,徐飞,孙健,等. 真空低温油炸对果蔬营养成分的影响[J]. 中国食物与营养,2011,17(10):65-67.
[5] 张文君,何慧,聂志奎,等. 油炸藕片加工工艺和质构特性研究[J]. 食品科学,2012,33(10):141-145.
[6] 李洁,王清章,谭正林,等. 前处理改善油炸藕片质量的研究[J]. 食品科学,2007,28(6):138-141.
[7] 何建军,张莉会,关键,等. 真空低温油炸藕片的工艺研究[J]. 食品研究与开发,2017,38(8):60-64.
[8] 张晓鸣. 食品感官评定[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010:112-113.

(上接第 76 页)

[7] DUBREIL-CHÉNEAU E, BESSIRAL M, ROUDAUT B, et al. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216:8149-8157.
[8] RAMSEY E D, REES A T, WEI G, et al. Direct aqueous supercritical fluid extraction coupled on-line with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of polyether ionophore antibiotics in water[J]. J Chromatogr A, 2010, 1217(20):3348-3356.
[9] VINCENT U, CHEDIN M, YASAR S, et al. Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry Part I. Application to targeted feed[J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 47(4/5):750-757.
[10] 毕言锋,徐倩,王树槐,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中的 4 种聚醚类抗球虫药物残留[J]. 分析试验室,2009,28(7):17-21.

[11] 梁春来,程林丽,沈建忠,等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法检测鸡组织中 5 种聚醚类药物残留[J]. 色谱,2009,27(6):815-819.
[12] 薄海波,雒丽丽,曹彦忠,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶和奶粉中 6 种聚醚类抗生素残留量[J]. 分析化学,2009,37(8):1161-1166.
[13] DUBOIS M, PIERRET G, DELAHAUT P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. J. Chromatogr B, 2004, 813(1/2):181-189.
[14] KINSELLA B, O'MAHONY J, MALONE E, et al. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis[J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(46):7977-8015.
[15] 国家质量监督检验检疫总局. 动物源产品中聚醚类残留量的测定:GB/T 20364-2006[S]. 北京:中国标准出版社,2006.