

超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中 9种大环内酯类抗生素

吴婉琴^{1,2}, 范小龙^{1,2}, 黄坤^{1,2}, 韩智^{1,2}, 朱晓玲^{1,2}, 朱松松^{1,2}, 刘国姣^{1,2}, 张亚珍^{1,2},
王会霞^{1,2}, 江丰^{1,2*}

(1. 湖北省食品质量安全监督检验研究院, 武汉 430075;
2. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 武汉 430075)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法测定9种大环内酯类抗生素药物的分析方法。**方法** 采用响应面法优化净化方法。样品经1%甲酸-乙腈提取, 提取液经50 mg C₁₈、80 mg N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、100 mg MgSO₄净化, Waters ACQUITY UPLC HSS T₃色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)进行分离, 采用电喷雾正离子多反应监测扫描(multiple reaction monitoring, MRM)模式下进行测定, 外标法定量。**结果** 其中8种抗生素线性范围1~50 ng/mL, 替米考星为5~50 ng/mL, 相关系数(r^2)在0.9910~0.9993之间。替米考星检出限为2.5 μg/kg, 定量限为10 μg/kg, 其余8种化合物检出限均为0.5 μg/kg, 定量限均为2 μg/kg。在低(替米考星10 μg/kg, 其他2 μg/kg)、中(替米考星20 μg/kg, 其他10 μg/kg)、高(替米考星40 μg/kg, 其他20 μg/kg)3个添加水平下进行加标回收实验, 9种抗生素平均回收率在81.30%~105.30%之间, 相对标准偏差在0.77%~2.41%之间($n=6$)。**结论** 该方法操作简单、净化效果好、灵敏度、准确度和精密度均符合多残留检测技术要求, 解决了大环内酯类抗生素检测提取过程过于繁琐的问题, 可为食品抗生素残留检测提供更方便、更快捷的检测方法支持。

关键词: 鸡肉; 响应面分析法; 超高效液相色谱-串联质谱法; 大环内酯类抗生素

Determination of 9 macrolides antibiotics in chicken by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WU Wan-Qin^{1,2}, FAN Xiao-Long^{1,2}, HUANG Kun^{1,2}, HAN Zhi^{1,2}, ZHU Xiao-Ling^{1,2}, ZHU Song-Song^{1,2},
LIU Guo-Jiao^{1,2}, ZHANG Ya-Zhen^{1,2}, WANG Hui-Xia^{1,2}, JIANG Feng^{1,2*}

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan 430075, China; 2. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test Office, Wuhan 430075, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 9 macrolide antibiotics by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The method was optimized by response surface methodology. Samples were extracted by 1% formic acid-acetonitrile, and the extract was purified by 50 mg C₁₈, 80 mg primary secondary amine (PSA) and 100 mg MgSO₄. The chromatographic

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1602300)

Fund: Supported by the National Key R & D Program of China (2018YFC1602300)

*通信作者: 江丰, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测与分析。E-mail: 349136833@qq.com

*Corresponding author: JIANG Feng, Master, Engineer, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, No.8, Yaojian 2nd Road, East Lake High-tech Development District, Wuhan 430075, China. E-mail: 349136833@qq.com

separation was performed on Waters ACQUITY UPLC HSS T₃ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) chromatographic column, monitored by electrospray positive ions multiple reaction monitoring scanning mode, and quantified by external standard method. **Results** The linear range of 8 antibiotics was 1-50 ng/mL, and tilmicosin was 5-50 ng/mL, and the correlation coefficient (r^2) was 0.9910-0.9993. The limit of detection of tilmicosin was 2.5 μg/kg, the limit of quantitative was 10 μg/kg, the limits of detection of the other 8 compounds were 0.5 μg/kg, and the limits of quantitative were 2 μg/kg. The recovery experiment of 9 antibiotics was tested at 3 levels: low (tilmicosin 10 μg/kg, others 2 μg/kg), medium (tilmicosin 20 μg/kg, other 10 μg/kg) and high (tilmicosin 40 μg/kg, others 20 μg/kg). The average recoveries of 9 antibiotics ranged from 81.30% to 105.30%, and the relative deviation ($n=6$) was 0.77%-2.41% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple, effective, sensitive, accurate and precise, which meets the requirements of multi-residue detection technology and can solve the problem that the detection and extraction process of macrolide antibiotics is too complicated, which can provide more convenient and faster detection method support for food safety detection.

KEY WORDS: chicken; response surface analysis; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; macrolide antibiotics

0 引言

大环内酯类抗生素(macrolides antibiotics, MAh)对革兰氏阳性菌、阴性球菌及支原体均有很好的抗菌作用^[1], 在临床上应用广泛。本类药物常用于预防动物患病^[2], 当用量不当或过大时会使其残留于动物性食品中, 人长期食用含有该类抗生素残留的动物性食品后易使细菌产生耐药性, 也会产生一定的毒性反应。欧美许多国家已经禁止在食品动物生产中添加大环内酯类抗生素, 我国农业部也已制定了本类药物在鸡肉中的最高残留限量^[3], 其中林可霉素允许最大残留量为 100 μg/kg; 替米考星允许最大残留量为 75 μg/kg; 红霉素、泰乐菌素、吉它霉素允许最大残留量均为 200 μg/kg。因此, 建立快速、可靠的方法来分析监测这类药物在动物性食品中的残留具有重要意义。

超高效液相串联质谱法具有高灵敏度和高选择性的特点, 现今已成为检测复杂动物组织样品中多类兽药残留的主流方法^[4-11]。但由于动物组织样品基质过于复杂, 影响样品检测, 因此为减小基质效应和提高待测物的提取率, 动物组织样品提取和净化过程需要耗费大量时间。QuEChERS 方法快速、简便、成本低廉、易于操作, 已逐步被应用于多类兽药残留检测^[12-15], 但找到其中最好的净化剂比例需要经过大量实验, 响应面法通过近似构造一个具有明确表达形式的多项式来表达隐式功能函数, 是一套统计方法, 用这种方法来寻找考虑了输入变量值的变异或不确定性之后的最佳响应值^[16], 通过合理的、最少的实验得到最佳条件。本研究利用超高效液相串联质谱法(ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)的高灵敏度和高选择性, 同时选择 QuEChERS 作为前处理提取方法并利用科学的统计方法优化前处理, 建立一种科学、准确、灵敏、高效的鸡

肉中大环内酯类抗生素的检测方法, 以期各食品检测机构对鸡肉中大环内酯类抗生素检测工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

9 种大环内酯类抗生素标准品包括替米考星、林可霉素、竹桃霉素、红霉素、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素(纯度 ≤ 98%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 氯化钠、无水硫酸镁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 吸附剂 C₁₈、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)(天津博纳艾杰尔公司)。

1.1.2 仪器与设备

UPLC 超高效液相色谱仪、TQ-S 三重四级杆质谱仪(美国 Waters 公司); Talboys 涡旋仪、Elma 超声仪、Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); XS204 电子天平、ME2002E 电子天平(梅特勒-托利多国际贸易上海有限公司); Allegra X-15R 离心机(美国贝克曼库尔特有限公司)。

1.1.3 样品来源

鸡肉样品均来自各大超市冷冻鸡肉, 均为日常抽检样品。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

准确称取试样 5.00 g 置于 50 mL 聚丙烯塑料离心管中, 加入 3 mL 水, 涡旋 2 min, 再加入 5 g 氯化钠, 准确加入 5 mL 1%甲酸乙腈(V/V), 充分混匀, 超声提取 2 min, 离心, 收集上清溶液于另一 50 mL 离心管中; 残渣中再准确加入 5 mL 1%甲酸乙腈, 重复上述步骤, 合并全部上清液。上清液中加入 5 mL 乙腈饱和的正己烷溶液, 混匀, 离心, 取乙

腈层溶液 2 mL 置于 15 mL 聚丙烯塑料离心管中, 加入 50 mg C₁₈、80 mg N-丙基乙二胺、100 mg MgSO₄, 涡旋混匀 1 min, 离心取上清液, 过微孔滤膜, 续滤液待上机测定。

1.2.2 标准溶液的制备

标准储备液: 分别精密称取 9 种抗生素标准品 10.0 mg 置于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 制成质量浓度为 1 mg/mL 标准储备液, 4 °C 保存。

混合标准中间液: 分别精密吸取 9 种抗生素标准储备液 100 μL 置于 100 mL 容量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 制成质量浓度为 1 μg/mL 的 9 种混合标准溶液, 4 °C 保存。

混合标准工作液: 分别吸取混合标准中间液适量, 取空白基质样品, 按 1.2.1 项下处理样品, 取过膜后的溶液稀释混合标准中间液, 制成质量浓度为 1、5、10、20、30、50 ng/mL 的空白基质标准工作液。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T₃ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 柱温: 40 °C; 进样体积: 2 μL。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液; 流速 0.3 mL/min。梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Program of the gradient elution

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.3	5	95
0.5	0.3	5	95
3	0.3	35	65
6	0.3	95	5
8	0.3	95	5
8.1	0.3	5	95
10	0.3	5	95

1.2.4 质谱条件

ESI 离子源; 正离子扫描; 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 2.5 kV; 锥孔电压: 50 V; 去溶剂温度: 350 °C; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气流量: 1000 L/Hr; 锥孔反吹气流量: 50 L/Hr; 9 种抗生素质谱参数见表 2。

1.3 单因素实验

1.3.1 C₁₈ 吸附剂用量对各抗生素回收率的影响

在净化液体积 2 mL 及其他提取条件不变的情况下, 净化剂只选择 C₁₈, 分别称取 C₁₈ 吸附剂 50、75、100、125、150 mg, 探究不同 C₁₈ 吸附剂用量对各抗生素回收率的影响, 从而确定最佳 C₁₈ 吸附剂用量。

1.3.2 PSA 吸附剂用量对各抗生素回收率的影响

在净化液体积 2 mL 及其他提取条件不变的情况下, 净化剂只选择 PSA, 分别称取 PSA 吸附剂 50、75、100、125、150 mg, 探究不同 PSA 吸附剂用量对各抗生素回收

率的影响, 从而确定最佳 PSA 吸附剂用量。

表 2 9 种抗生素质谱检测条件
Table 2 MS detection conditions of 9 antibiotics

化合物	离子对(<i>m/z</i>)	锥孔电压	裂解电压
		/V	/V
林可霉素	407.2/126.3*; 407.2/359.2	40	25/20
竹桃霉素	688.30/158.2*; 688.30/544.3	42	24/16
红霉素	734.4/158.2*; 734.4/116.2	28	32/40
替米考星	869.4/174.2*; 869.4/132.1	100	46/46
泰乐菌素	916.5/174.1*; 916.5/101.1	57	40/45
克林霉素	425.2/126.1*; 425.2/377.2	30	25/17
螺旋霉素	422.2/174.1*; 422.2/101.0	30	20/20
吉它霉素	772.3/109.1*; 772.3/174.1	30	40/30
交沙霉素	828.5/109.0*; 828.5/174.2	57	40/32

注: *为定量离子。

1.3.3 无水 MgSO₄ 吸附剂用量对各抗生素回收率的影响

在净化液体积 2 mL 及其他提取条件不变的情况下, 净化剂只选择无水 MgSO₄, 分别称取无水 MgSO₄ 吸附剂 100、150、200、250、300 mg, 探究不同无水 MgSO₄ 吸附剂用量对各抗生素回收率的影响, 从而确定最佳无水 MgSO₄ 吸附剂用量。

2 结果与分析

2.1 质谱条件选择

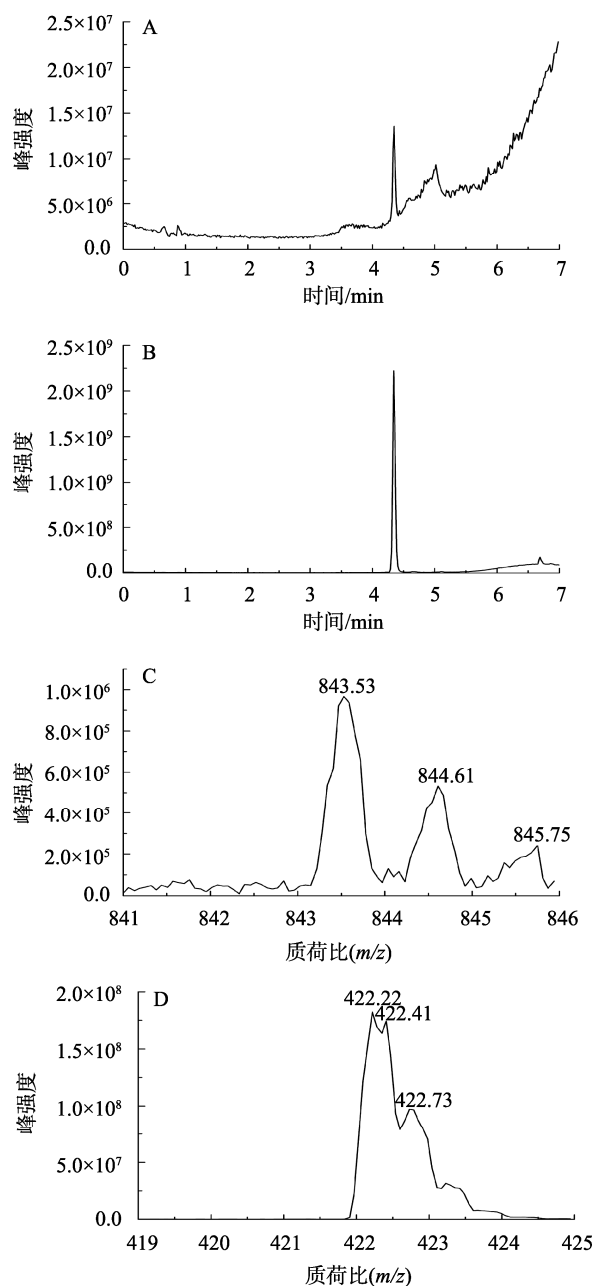
在电喷雾正离子模式下分别对 200 ng/mL 的单个标准溶液进行全扫描, 得到每种抗生素的母离子, 其中螺旋霉素母离子为[M+2H]²⁺, 螺旋霉素[M+H]⁺的母离子响应低于[M+2H]²⁺, 最后选择含有 2 个电荷的为母离子, 螺旋霉素母离子全扫离子流图见图 1。其余 8 种抗生素母离子均为[M+H]⁺, 然后对母离子进行二级质谱全扫描, 选择信号强度较大的 2 个碎片离子为特征子离子, 并优化得到每种抗生素的母离子和子离子所需的最佳锥孔电压和碰撞能量, 最后以多反应监测模式进行扫描。优化得到的质谱参数见表 2。

2.2 提取液和净化剂的选择

提取液: 乙腈是最适合提取宽范围极性的多残留农药、兽药的溶剂, 多数研究者使用乙腈或含 1% 乙酸(甲酸)的乙腈作为提取液提高提取率。由于大环内酯都是在正离子模式下电离, 所以加入甲酸保持提取液和流动相一致, 有利于离子化。因此本研究采用 1% 甲酸乙腈作为提取液。

净化剂: 净化剂一般包括 PSA、C₁₈、NH₂ 吸附剂、无水 MgSO₄、NaCl、石墨化碳(graphitized carbon black, GCB)。NaCl 促使提取液中的待测物从水相转移到有机相中; 无水 MgSO₄ 在净化的过程中可吸取多余的水分; PSA 和 C₁₈ 能清

除许多基质成分, 如来自样品共萃取物的脂肪酸、部分蛋白质、某些色素和糖类; NH_2 吸附剂可以除去样品中磺酸根等强阴离子, 一般用于农药残留; GCB 减少或去除叶绿素, 兽药残留基质不存在叶绿素, 所以基本上不使用 GCB。因此本研究最后选择 PSA、 C_{18} 、无水 MgSO_4 、 NaCl 作为净化剂。



注: A: 螺旋霉素 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 全扫离子流图; B: 螺旋霉素 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 全扫离子流图; C: 螺旋霉素 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 精确母离子; D: 螺旋霉素 $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ 精确母离子。

图 1 螺旋霉素母离子全扫离子流图

Fig.1 Chromatograms of MS of spiramycin

2.3 单因素实验结果

在分别单独使用 C_{18} 吸附剂、PSA 吸附剂、无水 MgSO_4

吸附剂情况下考察各抗生素的回收率, 其中单独使用 C_{18} 吸附剂和单独使用 PSA 吸附剂的结果相同。随着吸附剂用量的增加, 基质效应逐渐减弱, 各抗生素的回收率也逐渐提高。但当吸附剂用量超过 125 mg 时, 各抗生素回收率逐渐保持稳定, 可能由于在净化体积固定为 2 mL 后, 吸附剂吸附能力达到饱和。对于无水 MgSO_4 吸附剂用量, 结果表明其用量对各抗生素回收率的影响较小, 可能是其主要作用为吸附水分, 对基质净化影响较小, 但在 C_{18} 吸附剂、PSA 吸附剂同时净化的条件下, 水分会对 C_{18} 及 PSA 吸附有影响, 因此需加入无水 MgSO_4 。

2.4 响应面法对净化剂用量的优化

在单因素实验结果上, 采用 Design-Expert 软件中的 Box-Behnken 设计响应面实验, 优化选取 PSA(50~100 mg)、 C_{18} (50~100 mg)、无水 MgSO_4 (100~300 mg) 3 个影响因素, 以各抗生素提取回收率为指标, 采用 3 因素 3 水平的响应曲面分析方法进行实验, 实验方案及结果见表 3, 以 9 种抗生素中林可霉素为例, 方差分析见表 4。

由表 4 可知, 模型 $P < 0.05$, 与响应值关系为差异显著; 决定系数 $r^2 = 0.913$, 修正后的 $r^2 = 0.955$, 说明该模型可以解释 95.55% 的响应值变化, 拟合度精确; 失拟项 $P = 0.3416$, 差异不显著 ($P > 0.05$); 可见, 该模型较稳定且误差小, 适用于各参数在一定范围内响应值的预测。根据 F 值可知, 各因素相应抗生素回收率的影响程度大小顺序为 MgSO_4 用量 $>$ PSA 用量 $>$ C_{18} 用量。由表 4 建立的回归模型进行二次多项式回归分析, 可得出如下方程: $Y = 88.14 - 1.41A - 1.47B + 6.14C - 4.08AB + 3.10AC - 5.37BC - 3.32A^2 - 5.75B^2 + 2.83C^2$ 。通过 Design-expert 的优化功能可得到 9 种大环内酯抗生素最佳回收率的组合: 50 mg C_{18} 、76.99 mg PSA、100 mg MgSO_4 , 此时各抗生素回收率在 85% 以上, 根据实际操作情况将各参数调整为: 50 mg C_{18} 、80 mg PSA、100 mg MgSO_4 , 各抗生素回收率与该模型预测值差异不显著 ($P > 0.05$), 说明该模型较可靠。

2.5 基质效应评价

基质效应是由基质中的共提干扰物(非目标化合物)与目标化合物竞争电离所致^[17-18]。在配置电喷雾源的 LC-MS 定性定量分析中, 基质效应影响仪器的灵敏度和重复性, 从而影响检测结果的准确度。为评价基质效应, 分别制备空白基质标准曲线(添加含量为 1、5、10、20、30、50 ng/mL)以及相应含量的溶剂标准曲线。根据基质标准曲线与溶剂标准曲线的斜率比值来评价基质效应^[19-20]。若比值在 0.8~1.2 范围内, 则表明基质效应不明显, 实验结果见表 5, 替米考星的比值为 1.23, 其余 8 种抗生素比值在 0.8~1.2 范围内, 表明本研究的前处理方法可有效去除脂肪等引起的基质效应。但为了获得更加准确的定量结果, 本研究仍采用空白基质匹配标准曲线以抵消基质效应。

表3 Box-Behnken 实验方案及结果
Table 3 Scheme and results of Box-Behnken experiment

实验号	C ₁₈ /mg	PSA/mg	MgSO ₄ /mg	泰乐菌素 回收率/%	替米考星 回收率/%	交沙霉素 回收率/%	吉它霉素 回收率/%	红霉素 回收率/%	竹桃霉素 回收率/%	克林霉素 回收率/%	螺旋霉素 回收率/%	林可霉素 回收率/%
1	150	100	100	87.50	119.75	93.10	88.65	112.65	90.50	78.10	93.15	80.30
2	100	100	200	86.50	116.30	95.60	88.90	105.20	90.20	64.40	85.65	84.60
3	100	100	200	86.75	106.05	92.85	90.65	93.00	92.75	75.25	90.60	83.80
4	100	100	200	86.40	101.95	94.30	89.35	93.15	93.65	75.40	90.15	87.90
5	150	50	200	74.90	79.30	78.90	79.30	81.20	83.40	82.40	81.00	79.70
6	50	100	300	87.00	105.50	95.65	90.05	82.20	92.45	75.00	83.35	88.80
7	100	50	100	91.00	128.45	92.05	92.75	95.30	91.10	89.20	106.75	75.40
8	150	150	200	78.05	81.30	80.20	81.60	82.30	78.80	75.40	66.30	69.70
9	100	150	300	75.65	96.10	91.75	79.30	94.30	87.60	64.50	59.25	84.30
10	50	150	100	79.10	79.90	92.20	82.35	98.95	92.35	67.35	72.80	86.60
11	100	150	100	82.95	104.70	91.75	84.35	116.10	87.55	91.00	82.65	82.10
12	50	100	100	91.25	115.85	95.80	92.25	109.50	91.80	78.65	97.50	83.40
13	100	100	200	85.60	91.95	92.15	86.30	92.20	91.90	72.70	87.35	91.60
14	100	100	200	84.25	93.45	90.35	84.35	86.85	93.90	72.90	88.45	92.80
15	100	50	300	84.00	119.00	91.30	87.60	110.45	80.45	71.90	98.05	99.10
16	50	50	200	76.00	80.30	80.30	81.20	79.90	82.10	82.25	79.80	80.30
17	150	100	300	89.30	83.95	98.10	89.75	84.30	94.20	72.00	84.40	98.10

2.6 线性方程、检出限与定量限

按 1.2.2 项方法配制 6 个水平的基质匹配混合标准溶液, 在选定的色谱条件和质谱参数下进行检测。以目标化合物定量离子的峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X , ng/mL)

为横坐标绘制工作曲线。以添加回收化合物峰响应值为 3 倍噪音的添加浓度为样品的检出限(limit of detection, LOD), 以 10 倍噪音的添加浓度为定量限(limit of quantitation, LOQ), 结果见表 5。空白样品及空白基质加标样品中各化合物总离子流图见图 2、图 3。

表 4 林可霉素方差分析结果
Table 4 Analysis of variance of lincomycin

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	772.4349	9	85.8261013	4.3329478	0.0331	显著
$A-C_{18}$	15.96125	1	15.96125	0.8058069	0.3992	
$B-PSA$	17.405	1	17.405	0.8786949	0.3798	
$C-MgSO_4$	301.3513	1	301.35125	15.213778	0.0059	
AB	66.4225	1	66.4225	3.3533531	0.1097	
AC	38.44	1	38.44	1.940651	0.2062	
BC	115.5625	1	115.5625	5.8341958	0.0464	
A^2	46.41011	1	46.4101053	2.3430234	0.1697	
B^2	138.9685	1	138.968526	7.0158537	0.0330	
C^2	33.72168	1	33.7216842	1.7024459	0.2332	
残差	138.6545	7	19.8077857			
失拟项	73.5425	3	24.5141667	1.5059692	0.3416	不显著
纯误差	65.112	4	16.278			
总偏差	911.0894	16				

表 5 9 种抗生素线性回归方程、线性范围、相关系数(r^2)、检出限和定量限以及基质效应
Table 5 Linear regression equations, linear ranges, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs and matrix effects of 9 antibiotics

化合物	回归方程	线性范围/(ng/mL)	相关系数(r^2)	检出限/(μ g/kg)	定量限/(μ g/kg)	基质效应
林可霉素	$Y=49321.6X-7062.43$	1~50	0.9991	0.5	2	0.84
竹桃霉素	$Y=34523.7X-1649.9$	1~50	0.9987	0.5	2	0.94
红霉素	$Y=17178.8X+8866.63$	1~50	0.9990	0.5	2	0.87
替米考星	$Y=230.316X-249.253$	5~50	0.9931	2.5	10	1.23
泰乐菌素	$Y=8636.57X-790.79$	1~50	0.9993	0.5	2	0.79
克林霉素	$Y=43062.3X-4593.86$	1~50	0.9910	0.5	2	0.82
螺旋霉素	$Y=7932.49X-7780.73$	1~50	0.9978	0.5	2	0.86
吉它霉素	$Y=10126.2X-775.712$	1~50	0.9983	0.5	2	0.97
交沙霉素	$Y=14905.8X+974.737$	1~50	0.9985	0.5	2	0.94

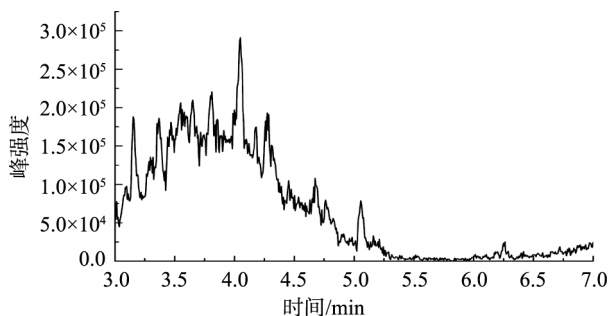


图2 空白基质样品图
Fig.2 Chromatogram of blank sample

2.7 回收率和精密度

以空白基质样品进行低(1倍定量限:替米考星 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其他 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、中(替米考星 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其他 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、高(替米考星 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其他 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)3个水平

加标,按上述前处理方法及测定条件进行回收率实验,每个水平测定6次,结果见表6。结果表明,各抗生素平均回收率为 81.30%~105.30%,相对标准偏差(relative standard deviations, RSD)为 0.77%~2.41%,说明该方法具有良好的准确度和精密度。

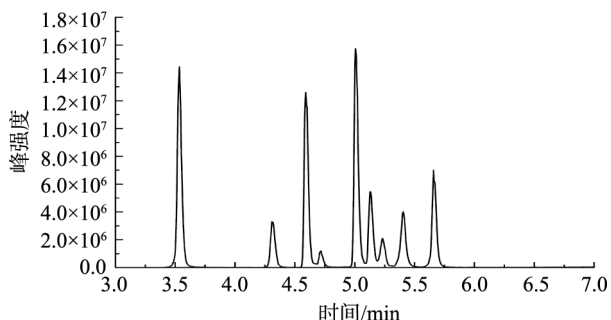


图3 9种抗生素总离子流图
Fig.3 Chromatogram of total ion chromatograms of 9 antibiotics

表6 鸡肉空白样品中9种抗生素的加标回收率以及精密度($n=6$)
Table 6 Recovery rate and precision of 9 antibiotics in chicken blank samples ($n=6$)

化合物	加标水平/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$			平均回收率/%			RSD/%		
	低	中	高	低	中	高	低	中	高
林可霉素	2	10	20	89.60	96.84	97.50	0.98	1.23	0.89
竹桃霉素	2	10	20	86.70	94.65	91.30	2.06	1.12	0.77
红霉素	2	10	20	84.30	97.64	96.50	1.06	1.02	0.97
替米考星	10	20	40	81.30	96.20	105.30	1.12	2.41	0.88
泰乐菌素	2	10	20	86.80	98.10	94.56	1.31	1.61	1.01
克林霉素	2	10	20	98.20	97.60	93.20	1.41	1.32	0.97
螺旋霉素	2	10	20	93.60	96.70	102.30	0.98	1.16	1.11
吉它霉素	2	10	20	87.60	97.10	96.80	1.21	2.41	0.99
交沙霉素	2	10	20	88.90	94.40	94.80	1.04	1.25	0.89

2.8 实际样品检测

采用本研究所建立的方法,对购自市场及超市的20批次鸡肉样品进行全面筛查分析。检测结果显示,2批次鸡肉样品检出替米考星,残留量分别为 15.71、26.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1批次鸡肉样品检出林可霉素,残留量为 57.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 其余批次鸡肉样品均未检出抗生素。为验证本方法的可靠性,对阳性鸡肉样品采用 GB/T 20762—2006《畜禽肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[21]方法中内标法进行验证,替米考星检出为

16.31、25.16 $\mu\text{g}/\text{kg}$,林可霉素为 59.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$,可见2种方法的测定结果非常接近,表明本法适用于鸡肉中抗生素残留的定性筛查及定量测定。

3 结论

本研究建立了 QuEChERS-LC-MS 同时测定鸡肉中大环内酯类抗生素多残留的分析方法。与现行国家标准及行业标准相比,该方法能实现同时分析多类药物残留、大大缩短检测周期、节约检测成本。本研究操作方法简便、快速、准确,其灵敏度、准确度和精密度均符合多残留检测

技术的要求, 为各食品检测机构提供了简单快速的筛选方法来应对大批量的鸡肉中兽药日常监控, 为保证人民饮食安全提供技术支持。

参考文献

- [1] 王秀茹. 大环内酯类药物的性质、特点及应用[J]. 兽医导刊, 2018, (19): 54-55.
WANG XR. Properties, characteristics and application of macrolides [J]. Vet Orient, 2018, (19): 54-55.
- [2] 李雪红, 张煌涛, 占秀梅. 动物性食品中大环内酯类抗生素残留分析综述[J]. 草食家畜, 2006, (3): 10-12.
LI XH, ZHANG HT, ZHAN XM. Analysis of macrolide antibiotics residues in animal food [J]. Grass-Feed Livest, 2006, (3): 10-12.
- [3] 中华人民共和国农业部公告 235 号. 动物源性食品中兽药残留最高残留限量[S].
Announcement No. 235 of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Maximum residue limits of veterinary drugs in animal derived foods [S].
- [4] 吴家鑫, 刘敏, 尚飞, 等. 超高效液相色谱串联高分辨四极杆飞行时间质谱法快速筛选鉴别猪血浆中的大环内酯类抗生素[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(9): 46-52.
WU JX, LIU M, SHANG F, *et al.* Rapid screening and identification of macrolide antibiotics in pig plasma by ultra performance liquid chromatography tandem high resolution quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. Chin J Vet Drug, 2018, 52(9): 46-52.
- [5] 韩绣竹, 杨文腰, 玄兵, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中 6 种大环内酯及林可酰胺类抗生素残留[J]. 现代畜牧兽医, 2017, (7): 1-9.
HAN JZ, YANG WY, XUAN B, *et al.* Objective to establish a method for simultaneous determination of six macrolide and lincomamine residues in feed by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Mod J Anim Husb Vet, 2017, (7): 1-9.
- [6] 王硕, 张晶, 邵兵. 超高效液相色谱-串联质谱测定污泥中氯霉素、磺胺类、喹诺酮类、四环素类与大环内酯类抗生素[J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 179-185.
WANG S, ZHANG J, SHAO B. Determination of chloramphenicol, sulfonamides, quinolones, tetracyclines and macrolide antibiotics in sludge by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(2): 179-185.
- [7] 王炼, 黎源倩, 张礼春. 超高效液相色谱同时测定奶粉和牛奶中 β -内酰胺、喹诺酮和大环内酯类抗生素的残留[J]. 分析实验室, 2011, 30(6): 23-27.
WANG L, LI YQ, ZHANG LC. Simultaneous determination of β -lactam, quinolone and macrolide antibiotics in milk powder and milk by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30(6): 23-27.
- [8] 严丽娟, 张峰, 方恩华, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物饲料中的大环内酯类和林可酰胺类抗生素[J]. 色谱, 2010, 28(11): 1038-1042.
YAN LJ, ZHANG F, FANG EH, *et al.* Determination of macrolides and lincomycin antibiotics in animal feed by ultra performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(11): 1038-1042.
- [9] 刘正才, 杨方, 林永辉, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定鳊鱼中大环内酯类和林可酰胺类抗生素残留量的研究[J]. 福建分析测试, 2010, 19(3): 1-5.
LIU ZC, YANG F, LIN YH, *et al.* Study on determination of residues of macrolides and lincosamides antibiotics in eel by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. Fujian Anal Test, 2010, 19(3): 1-5.
- [10] 王凤美, 陈军辉, 林黎明, 等. UPLC-MS/MS 法对动物源性食品中 12 种大环内酯类抗生素残留的测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(7): 784-788, 793.
WANG FM, CHEN JH, LIN LM, *et al.* Determination of 12 macrolide antibiotics residues in animal derived foods by UPLC-MS/MS [J]. J Instrum Anal, 2009, 28(7): 784-788, 793.
- [11] WU JX, ZHANG G, SONG M, *et al.* Determination of gamithromycin in an injection by ultra performance liquid chromatography-tandem quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. Pharmazie, 2016, 71(7): 378-381.
- [12] 金钥, 孙延斌, 梅连瑞, 等. 水产品中 14 种抗生素药物残留检测方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(17): 129-134.
JIN Y, SUN YB, MEI LR, *et al.* Establishment of a method for the determination of 14 antibiotic residues in aquatic products [J]. Food Res Dev, 2018, 39(17): 129-134.
- [13] 谢瑜杰, 陈辉, 彭涛, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱测定牛奶中 6 种玉米赤霉烯酮类毒素[J]. 食品科学, 2018, 12(26): 1-11.
XIE YJ, CHEN H, PENG T, *et al.* Determination of six zearalenone toxins in milk by QuEChERS high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2018, 12(26): 1-11.
- [14] 崔丽丽, 闫梅霞, 逢世峰, 等. 灵芝中 18 种农药的 QuEChERS-气相色谱-串联质谱快速检测技术[J]. 食品科学, 2019, 40(12): 326-331.
CUI LL, YAN MX, PANG SF, *et al.* Rapid determination of 18 pesticides in *Ganoderma lucidum* by QuEChERS gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2019, 40(12): 326-331.
- [15] 郝杰, 邵瑞婷, 姜洁, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋、鸡肉中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 食品科学, 2019, 40(2): 318-323.
HAO J, SHAO RT, JIANG J, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites residues in chicken meat and eggs by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2019, 40(2): 318-323.
- [16] 王永菲, 王成国. 响应面法的理论与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2005, (3): 236-240.
WANG YF, WANG CG. Theory and application of response surface methodology [J]. J Cent U Natl (Nat Sci Ed), 2005, (3): 236-240.
- [17] 蒋平香, 王勤志, 滕建文, 等. 响应面法优化猪肉重组工艺配方[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(10): 168-173.
JIANG PX, WANG QZ, TENG JW, *et al.* Optimization of pork reconstitution process formula by response surface methodology [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(10): 168-173.
- [18] PAUL J. TAYLOR. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. Clin Biochem, 2005, 38(4): 328-334.
- [19] TOMOYUKI T, MIKI K, MASAHIRO N. Compensation of matrix effects in gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticides using a

combination of matrix matching and multiple isotopically labeled internal standards [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1524: 233–245.

- [20] ZIPEI Z, RUOJIE Z, HANG X, *et al.* Development of a standardized food model for studying the impact of food matrix effects on the gastrointestinal fate and toxicity of ingested nanomaterials [J]. *Nano Impact*, 2019, 13: 13–25.
- [21] GB/T 20762—2006 畜禽肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、替米考星、泰乐菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
- GB/T 20762—2006 Determination of lincomycin, oleandomycin, erythromycin, tilmicosin, tylosin, clindamycin, spiramycin, kitasamycin and josamycin residues in livestock and poultry muscles-LC-MS-MS method [S].

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介

吴婉琴, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测与分析。
E-mail: 429371379@qq.com

江 丰, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测与分析。
E-mail: 349136833@qq.com

“茶学研究”专题征稿函

茶叶源于中国, 与咖啡、可可并称为世界三大饮料。茶叶可鲜食, 也可以加工精制备用, 具有降压、提神等多种保健功能, 且含有多种有机化学成分和无机矿物元素。国内外对茶叶市场需求稳定增长, 我国的茶产业增长潜力巨大, 茶已成为社会生活中不可缺少的健康饮品和精神饮品。

鉴于此, 本刊特别策划了“茶学研究”专题, 主要围绕茶叶的贮藏保鲜、精深加工、品质评价、生物化学和功能性成分、香气成分分析、污染物分析检测、茶树生长代谢、茶叶资源的质量标准化等方面展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 本刊主编吴永宁研究员特别邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。

本专题计划在 2021 年 3 月出版, 请在 2021 年 1 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

希望您能够通过各种途径宣传此专题, 并积极为本专题推荐稿件和约稿对象。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(注明茶学研究专题)

E-mail: jfoodsq@126.com(注明茶学研究专题)

《食品安全质量检测学报》编辑部