

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240704001

QuEChERS-液相色谱-串联质谱法检测鲜蛋中 4种大环内酯类抗生素残留

李瑶菲^{1,2}, 陈冬东², 贾景建³, 余丽波³, 王一名³, 李存^{1*}, 彭涛^{2*}

[1. 天津农学院动物科学与动物医学学院, 天津 300384; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176;
3. 中检科(北京)测试认证有限公司, 北京 100176]

摘要: **目的** 建立 QuEChERS-液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定鲜蛋中泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A、替米考星的残留方法。**方法** 样品经 80%乙腈水溶液超声涡旋提取, 分析液经 QuEChERS 方法净化, 乙腈饱和正己烷去除脂肪, 以乙腈与 0.1%甲酸水(含 5 mmol 乙酸铵)为流动相进行梯度洗脱, 采用 ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱进行分离, 在电喷雾正离子(electrospray ionization, ESI+)模式, 多反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM) 模式下检测, 基质匹配内标法进行定量。**结果** 对于鲜蛋基质, 泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A 在 0.25~50.00 µg/kg, 替米考星在 0.50~50.00 µg/kg 的浓度与其相对应的峰面积之间线性关系良好, r^2 均大于 0.999, 在 3 种不同浓度添加水平下, 泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A、替米考星的平均回收率为 89.05%~109.82%, 相对标准偏差为 4.59%~11.46%。**结论** 该方法具有较高的准确度、精密度和灵敏度, 适用于检测鲜蛋中的泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A、替米考星。

关键词: 泰乐菌素 A; 泰万菌素; 红霉素 A; 替米考星; 鲜蛋; 液相色谱-串联质谱法; 抗生素残留

Determination of 4 kinds of macrolide antibiotics residues in fresh eggs by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Yao-Fei^{1,2}, CHEN Dong-Dong², JIA Jing-Jian³, YU Li-Bo³, WANG Yi-Ming³,
LI Cun^{1*}, PENG Tao^{2*}

[1. School of Animal Science and Animal Medicine, Tianjin University of Agriculture, Tianjin 300384, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;
3. China Inspection Department (Beijing) Test and certification Co., Ltd., Beijing 100176, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination the residues of tylosin A, tylvalosin, erythromycin A and tilmicosin in fresh eggs by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by ultrasonic vortex of 80% acetonitrile solution, the analytical

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100804)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100804)

*通信作者: 李存, 博士, 主要研究方向为食品安全研究。E-mail: hhlicun@163.com

彭涛, 博士, 主要研究方向为动物源性食品安全。E-mail: caiq_pengtao@126.com

*Corresponding author: LI Cun, Ph.D, Department of Animal Science, School of Animal Science and Animal Medicine, Tianjin University of Agriculture, No.22, Jinjing Road, Xiqing District, Tianjin 300384, China. E-mail: hhlicun@163.com

PENG Tao, Ph.D, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Ronghua South Road, Yizhuang Economic and Technological Development Area, Beijing 100176, China. E-mail: caiq_pengtao@126.com

solution was purified by QuEChERS method, and the fat was removed by acetonitrile saturated with n-hexane. The acetonitrile and 0.1% formic acid water (containing 5 mmol ammonium acetate) was used as mobile phase, the flow rate was set to 0.25 mL/min, gradient elution procedure, ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column separation, electrospray positive ion (ESI+) mode, multiple reaction ion monitoring (MRM) mode detection, and matrix matching internal standard method for quantification. **Results** For egg matrix, the linear relationship between tylosin A, tylvalosin, erythromycin A at 0.25 to 50.00 µg/kg, tilmicosin at 0.50 to 50.00 µg/kg and the corresponding peak area was good, and r^2 was greater than 0.999. At 3 different levels of addition, the average recoveries of tylosin A, tylvalosin, erythromycin A, tilmicosin were 89.05%–109.82%, and the relative standard deviations were 4.95%–11.46%. **Conclusion** The method exhibits a relatively high accuracy, precision and sensitivity, and is suitable for the detection of tylosin A, tylvalosin, erythromycin A and tilmicosin in fresh eggs.

KEY WORDS: tylosin A; tylvalosin; erythromycin A; tilmicosin; fresh egg; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; antibiotic residue

0 引言

鲜蛋是一种营养丰富的物质, 具有减轻肝脏损害等多种作用^[1], 2023 年我国禽蛋产量为 3563 万 t, 占据世界总产量的 1/3^[2-3]。中国报告大厅日前发布报告称, 中国养殖业畜牧及饲料行业抗生素使用量高达 9.7 万 t, 占国内抗生素消费总量 54%, 因此随之而来的食品安全问题也越加值得重视^[4]。其中大环内酯类抗生素(macrolides, MALs)因其突出的抗菌活性, 在临床上普遍应用于动物上呼吸道感染和消化道疾病的治疗^[5]。为保护公共健康, GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》及 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》先后明确规定泰乐菌素、泰万菌素、红霉素、替米考星在鲜蛋中的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)分别为 300、200、50、10 µg/kg。故对鲜蛋中 MALs 构建精准定量的残留检测方法具有深远意义。

MALs 的前处理方法众多, 考虑到实验基质为鲜蛋, 而 QuEChERS 法比较适合处理含水量较高的样品, 建立在分散固相萃取的基础上, 利用填料与杂质的相互作用达到除杂的目的, 涵盖了 Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged 和 Safe。解决了 MALs 前处理过程过于复杂的问题, 目前已在不同基质兽药残留净化中得以广泛应用。其残留检测方法包括微生物法^[6-7]、毛细管电泳法^[8]、气相色谱-串联质谱法(gas chromatography-tandem mass spectrometry, GC-MS/MS)^[9-10]、高效液相色谱法^[11-12]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[13-14]和免疫测定法^[15]等。其中微生物检测方法成本低, 适用于大范围样品初筛^[16], 但测定结果受不同厂家和菌种批次等多种影响因素影响; 毛细管电泳法检测速度快但重现性差; 气相色谱-质谱法灵敏度高, 但衍生化步骤烦琐; 高效液相色谱法检测结果准确, 重现性好, 而对较为复杂的样本, 需联合其他技术才可满足检测需求;

LC-MS/MS 是按样品的不同性质对荷质比进行检测分析, 可准确测得目标物的含量, 且选择性高^[17], 因此该技术已被广泛运用于动物源性食品的残留检测^[14,18]。有关 MALs 检测的标准中, 如 KJ 202304《动物源性食品中红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、替米考星的快速检测 胶体金免疫层析法》, 检测鲜蛋中 MALs, 但其检测方法不采用 LC-MS/MS。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》、SN/T 1777.2—2007《动物源性食品中大环内酯类抗生素残留测定方法 第 2 部分: 高效液相色谱串联质谱法》、SN/T 4747.3—2017《进出口食用动物大环内酯类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》、GB 31660.1—2019《食品安全国家标准 水产品中大环内酯类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》等方法检测 MALs 残留的基质均不适用鲜蛋且不能同时检测 4 种目标物。MALs 残留检测方法的研究对象多为畜禽肉及其他组织, 除泰万菌素外, 鲜蛋中其他 MALs 的检测尚无相关国家检测标准。

鉴于此, 本研究采用 80%乙腈水溶液法提取、QuEChERS 法净化、LC-MS/MS 测定的方式, 建立鲜蛋中泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A、替米考星残留的分析方法, 以期对食品安全有效监管提供可靠的检测技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

LCMS-8050 液相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司); Waters BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 µm)、Waters BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 µm)(美国 Waters 公司); InertSustain C₁₈ HP (100 mm×2.1 mm, 3 µm)(日本 Shimadzu 公司); NBL223i 分析天平(精度 0.0001 g, 武汉艾德姆衡器有限公司); KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); LG-25M 冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司);

Vortex-Genie2 涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); ShimLab N8050 氮气发生器(上海岛津实验器材公司); EFAA-DC24-RT 氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司); STV-100 小型混匀仪(杭州茂丰科技有限公司); 0.22 μm 有机相微孔滤膜(天津津腾实验设备有限公司)。

1.2 材料与试剂

新鲜鸡蛋为市场售卖样品。

乙腈、甲醇、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 无水硫酸镁(MgSO_4)(分析纯, 福晨化学试剂有限公司); 乙酸铵(分析纯, 赛默飞世尔科技中国有限公司); 十八烷基硅烷键合硅胶(C_{18})、QuEChERS dSPE EMR-Lipid、N-丙基乙二胺(N-propyl ethylenediamine, PSA)(上海安谱实验科技股份有限公司); 石墨化炭黑(graphitized carbon black, GCB)(上海月旭科技股份有限公司); 实验用水均为实验室自制一级水。

标准品红霉素 A(纯度 85.00%)、泰乐菌素 A(纯度 98.00%)、替米考星(纯度 95.40%)、红霉素-D3(纯度 99.99%)(美国 TMstandard 公司); 泰万菌素(纯度 97.20%)(广州广电计量检测股份有限公司); 质控样鲜蛋粉中红霉素 A[特征值范围为(52.57 \pm 3.95) $\mu\text{g}/\text{kg}$, 中检科(北京)测试认证有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

将各标准品用甲醇溶解配制成质量浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单标准储备液与同位素内标工作液, 并根据需要用甲醇稀释成适当质量浓度的混合标准工作溶液, 于棕色储存瓶中保存。

1.3.2 样品前处理

制备: 新鲜鸡蛋去壳后置于匀浆机中, 蛋液充分均质后进行分装保存, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下密封储存备用。

提取: 称取(2.00 \pm 0.01) g 样品于 50 mL 离心管, 加入内标工作液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 40 μL 后涡旋 30 s。加入 10 mL 80%

乙腈水溶液, 2500 r/min 涡旋振荡 15 min, 超声提取 5 min, 10000 r/min 低温(-4 $^{\circ}\text{C}$)离心 5 min 后, 取上清液备用。

净化: 将全部提取液转移到已称取 100 mg C_{18} 、100 mg PSA、10 mg GCB 和 900 mg MgSO_4 的 50 mL 离心管中, 2500 r/min 涡旋混合 2 min 后, 于 10000 r/min 低温(-4 $^{\circ}\text{C}$)离心 5 min, 将全部上清液转移至 15 mL 离心管内, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气吹干, 用 1 mL 初始流动相复溶, 涡旋混合 30 s, 超声 5 min, 加入 2 mL 乙腈饱和正己烷去脂, 涡旋混匀, 10000 r/min 低温(-4 $^{\circ}\text{C}$)离心 3 min, 取下层清液过 0.22 μm 滤膜用于上机测定。

1.3.3 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A: 0.1% 甲酸水(含 5 mmol 乙酸铵); 流动相 B: 乙腈; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 5 μL ; 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	20	80
3.0	30	70
5.0	50	50
6.0	60	40
6.5	70	30
7.0	80	20
8.0	80	20
10.0	20	80
11.0	20	80

1.3.4 质谱条件

电离模式: 电喷雾正离子扫描(electrospray ionization, ESI+); 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 4 kV; 离子源温度: 300 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气流量: 3 L/min; 辅助加热气流量: 10 L/min; 其他质谱条件如表 2 所示。

表 2 大环内酯类药物物质谱条件
Table 2 Mass spectrum conditions of macrolide drug

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	Q1 扫描电压/V	碰撞能/eV	Q3 扫描电压/V
红霉素 A	734.30	576.30	-26	-20	-20
	734.30	158.15*	-20	-32	-16
泰乐菌素 A	916.50	772.45	-26	-30	-22
	916.50	174.15*	-26	-39	-18
泰万菌素	1042.50	174.20	-30	-44	-19
	1042.50	109.20*	-30	-47	-21
替米考星	869.50	696.55	-24	-42	-26
	869.50	174.10*	-24	-44	-18
红霉素-D ₃	738.50	580.50*	-10	-20	-29

注: *为定量离子对。

1.4 数据处理

每组样品重复操作 3 次, 以平均值±标准偏差表示最终结果。研究数据通过岛津 Labsolutions5.114 软件分析, Excel 2007 制表, 用 SPSS 22.0 进行显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, 用 Origin 2019 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

配制质量浓度为 50 ng/mL 的大环内酯类药物单标准溶液依次注入质谱系统, 分别在正(+)和负(-)ESI 模式下, 进行全扫描获取数据。实验结果表明, 在 ESI+模式下, MALs 表现出比 ESI-模式更高的敏感性, 这是由于 MALs 分子中存在氮原子易于接收质子, 并形成带正电荷的离子^[19], 因此选择 ESI+模式。Q1 扫描筛选各化合物母离子后进行二级质谱、MRM 扫描。在子离子扫描中, 筛选响应较高的子离子。在进行 MRM 扫描时, 调整电压以选取响应高且稳定性良好的一对子离子作为定量离子及定性离子。优化的质谱参数见表 2。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 色谱柱的选择

本研究对比了 Waters BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Waters BEH C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、InertSustain C₁₈ HP (100 mm×2.1 mm, 3 μm) 常用 3 种 C₁₈ 色谱柱对目标物泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A、替米考星, 发现 Waters BEH C₁₈ 柱分离效果最好且出峰时间理想。罗燕^[20]、李盛安等^[21]在研究超高效液相色谱-串联质谱法检测不同基质中 MALs 的残留量时也发现 Waters BEH C₁₈ 柱的检测灵敏度高、色谱峰型较好, 因此选择 Waters BEH C₁₈ 柱进行方法研究。

2.2.2 流动相的选择

化合物的峰型和保留时间受流动相组成的影响, 考虑 MALs 为碱性化合物, 含有叔胺基团, 为提高离子化效率、增强检测信号, 可在流动相中添加适量甲酸^[13], 故选用 0.1%甲酸乙腈、乙腈、甲醇分别与 0.1%甲酸水组合以考察 3 种有机流动相下待测物的出峰情况, 发现使用甲醇时样品电离不完全并且峰形不光滑, 对比 0.1%甲酸乙腈与乙腈谱图表明, 乙腈峰形更为对称、分离度综合效果优于 0.1%甲酸乙腈, 最终有机相选择乙腈。在此条件下, 仍存在个别目标峰形出现拖尾现象, 是由于其结构中含有仲胺基。研究表明^[22], 流动相中加入低浓度的挥发性盐类可改善此现象, 因此尝试在 0.1%甲酸水中加入 2、5、10 mmol/L 3 个浓度的乙酸铵, 考察峰形情况。结果表明, 加入乙酸铵的化合物响应值明显高于未加入乙酸铵的流动相, 且乙酸铵比例为 5 mmol/L 时, 待测物分离程度更好, 这是因为在流动相中添加乙酸铵可以促进目标物的离子化。流动相最终确定为乙腈和 0.1%甲酸水(含 5 mmol/L 乙酸铵)。图 1 为 4 种药物在该体系下总离子色谱图。

2.3 提取溶液的选择

MALs 易溶于甲醇、乙腈等极性溶剂, 本研究首先选用甲醇、乙腈 2 种提取方式, 结果显示在相同前处理下, 甲醇提取的提取液更为浑浊。查阅资料^[23]后, 尝试在加入提取液前先添加 2 mL 水至样品中, 加水之后甲醇提取液浑浊现象有所改善, 但氮吹时有脂质及蛋白附着于管壁难以达到吹干效果, 且经初始流动相复溶后, 部分脂质及蛋白质依旧存在于复溶液中, 经乙腈饱和和正己烷去脂后依旧不够澄清, 为避免对仪器的损害以及减少杂质的干扰, 有机提取试剂选择乙腈体系。通过文献^[24-26]可知在乙腈中加适量水和酸可减少由共沉淀引起的目标物损失, 以提高提

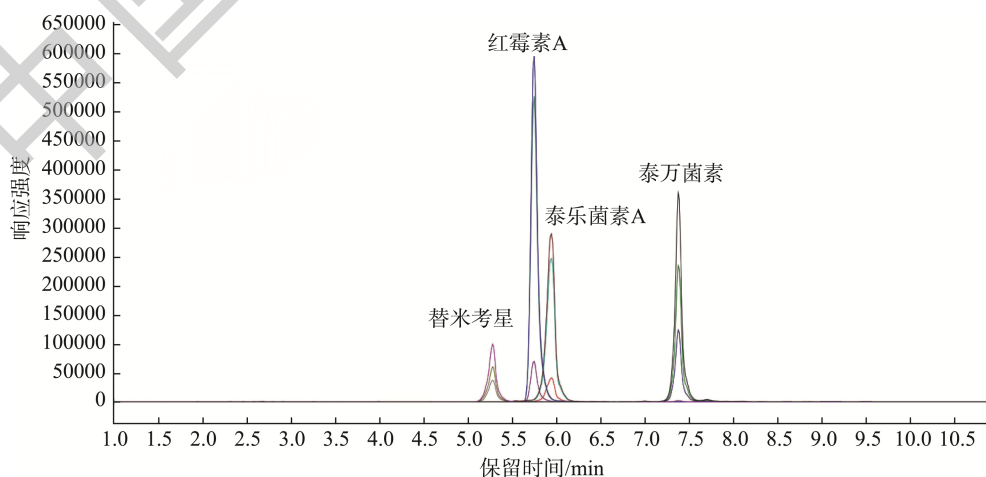


图 1 4 种药物在乙腈-0.1%甲酸水(含 5 mmol 乙酸铵)体系下总离子色谱图

Fig.1 Total ion chromatogram of 4 kinds of drugs in acetonitrile-0.1% formic acid water (5 mmol ammonium acetate) system

取效率。乙腈水溶液体积分数小于 60% 时无法引起蛋白质完全变性, 而纯乙腈又易使蛋白质变性、结团而包裹药物, 导致提取效率偏低。在酸性条件下, MALs 易发生质子化倾向, 有机物易转移到水相, 因此有陈彦宏等^[25]认为酸化溶剂更有利于提取, 本研究选取 0.1% 甲酸乙腈、乙腈、90% 乙腈、80% 乙腈、70% 乙腈和 60% 乙腈 6 种提取试剂进行比较。方法拟采用内标法对回收率进行校正, 为更直观地比较各提取试剂, 故在优化时未添加内标, 采用药物的绝对回收率进行比较, 图 2 为 6 种不同提取试剂的回收率。图 2 显示, 提取溶液为 0.1% 甲酸乙腈时红霉素 A 回收率较低; 提取溶液为纯乙腈时回收率最低, 归因于乙腈使蛋白质快速变性而导致的。整体而言, 提取试剂根据回收率结果选择 80% 乙腈水。

2.4 净化条件的选择

净化的主要目的是减少鲜蛋中其他成分干扰目标物的测定, 本研究分别尝试了 QuEChERS 法与固相萃取法, 综合考虑固相萃取小柱需要活化及洗脱、溶剂使用量大等因素, 因此本研究选用 QuEChERS 法净化样品。此方法的要点在于选择适当的吸附剂, 常用净化材料包括 PSA、C₁₈、GCB 等。其中 C₁₈ 对非极性成分具有高效吸附能力, 如脂类、糖类等, 适合吸附亲脂型化合物, 但 C₁₈ 过量会吸附相似药物; PSA 主要吸附有机酸、糖类、脂肪酸和极性有机酸; GCB 通常用于去除色素; 无水 MgSO₄ 则用于吸附试样中的微量水分^[26-29]。

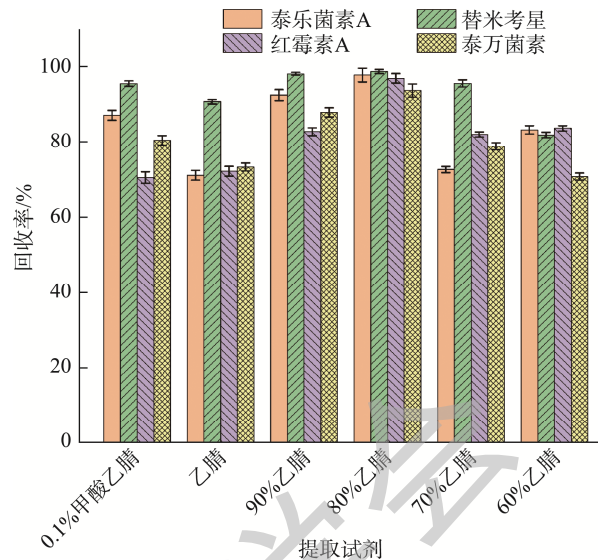


图 2 不同提取试剂对 4 种药物回收率的影响

Fig.2 Effects of different extraction solvents on extraction recoveries of 4 kinds of drugs

鲜蛋样品中含有大量磷脂、蛋白质、脂溶性色素、氨基酸和一些矿物质等, 因此本研究选用 PSA、C₁₈、GCB 和无水 MgSO₄ 作为吸附剂, 并对净化材料设置不同比例进行实验。按照 1.3.2 节前处理方法, 取 1.0 μg/mL 混合标准溶液 40 μL 添加至空白鲜蛋样品, 各净化材料对化合物回收率影响如图 3 所示。首先对比添加量为 0、50、100、150、200 mg C₁₈ 的吸附效果(图 3A), 发现其含量对红霉素 A 回

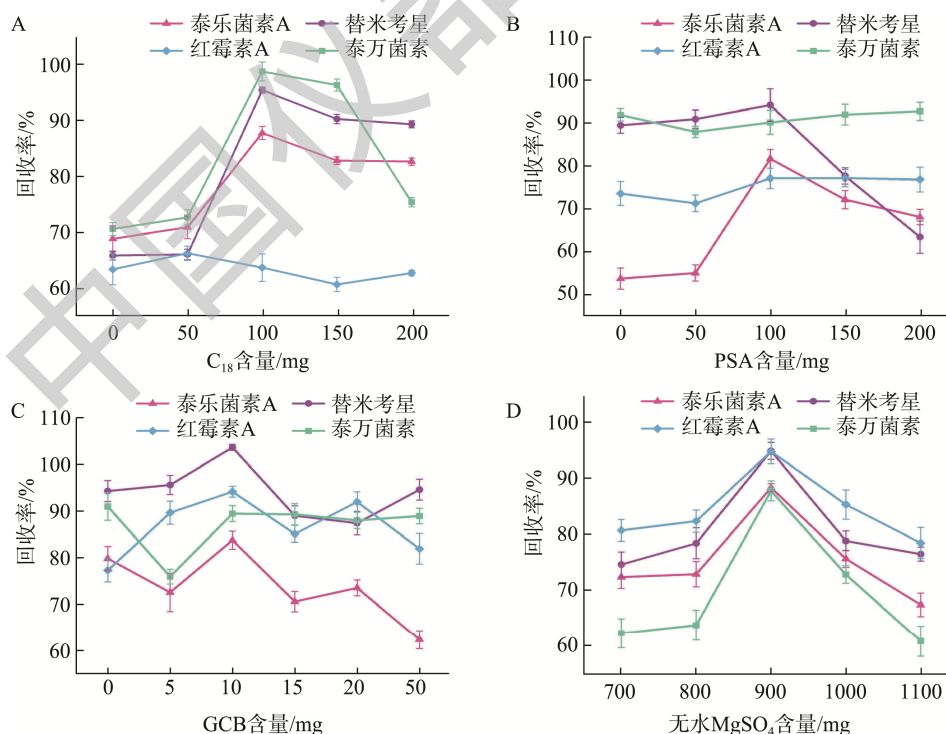


图 3 各净化材料对化合物回收率影响

Fig.3 Effects of each purification material on the compound recovery rates

收率影响不显著, 当 C_{18} 含量为 100 mg 时, 泰乐菌素 A、替米考星和泰万菌素的回收率最高, 之后随着 C_{18} 含量的继续增加, 回收率呈现负增加, 因此初步确定 C_{18} 含量为 100 mg。在此基础上, 考察添加量为 0、50、100、150、200 mg PSA 的回收效果(图 3B), 发现泰万菌素回收率在 50 mg 起随着 PSA 含量增加而缓慢增长, 泰乐菌素 A、替米考星则在 100 mg 时回收率最高, 当其含量大于 100 mg 时红霉素 A 回收率变化不显著, 综合考虑选择 PSA 添加量为 100 mg。添加 100 mg C_{18} , 100 mg PSA 的基础上, 对比添加量为 0、5、10、15、30、50 mg 的 GCB 对回收率的影响, 图 3C 中结果显示 4 种化合物均在 GCB 添加量为 10 mg 时回收率较为满意, 故选择 GCB 的添加量为 10 mg。在已有净化基础上, 添加不同含量的无水 $MgSO_4$ (700、800、900、1000、1100 mg)(图 3D), 各目标化合物回收率均在添加 900 mg 无水 $MgSO_4$ 时表现较好, 因此选择无水 $MgSO_4$ 的添加量为 900 mg。综上, 最终净化材料为 100 mg PSA、100 mg C_{18} 、10 mg GCB 和 900 mg 无水 $MgSO_4$ 。

2.5 基质效应

基质效应(matrix effect, ME)普遍存在于残留分析实验, 干扰检测结果准确性, 即使实验上机样液经前处理也依旧会有干扰物质, 如鲜蛋残留的胆固醇及脂质等, 本研究采用基质匹配曲线与溶剂标准曲线线性方程斜率比的计算结果进行评价^[17]。ME 按公式 $ME=K1/K2$ 计算, 其中 $K1$ 和 $K2$ 分别为基质匹配曲线斜率和溶剂标准曲线斜率, 当 ME 为 0.8~1.2 时, 说明 ME 不明显; 当 $ME>1.2$ 时, 表明产生基质增强效应; 当 $ME<0.8$ 时, 表明产生基质抑制效应。为减弱基质效应影响, 可通过改善前处理净化方法、同位素内标法、基质匹配曲线法等措施以消除 ME。

用空白样品经 1.3.2 节前处理净化后分别将 0.5、1.0、2.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 混合标准工作液复溶

绘制的基质匹配曲线和以初始流动相绘制对应浓度的溶剂曲线进行计算。表 3 中结果表明, 化合物中存在不同程度的基质抑制效应, 需采取措施补偿基质效应^[30]。

2.6 线性范围与灵敏度

本研究采用基质添加标准曲线进行定量, 同时应用同位素内标方法校正回收率, 降低 ME 对药物定量分析结果的干扰, 提高结果定量准确性。分别量取 1.0 mL 质量浓度为 0.5、1.0、2.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 的混合标准工作溶液添加到 7 份空白样品中, 加入内标工作液 40 μ L, 按照 1.3.2 节前处理过程后进行 LC-MS/MS 测定。以各目标物与内标的峰面积比值为纵坐标, 目标物的质量浓度为横坐标进行线性回归分析。结果显示泰乐菌素 A、红霉素 A、泰万菌素在 0.25~50.00 μ g/kg、替米考星在 0.50~50.00 μ g/kg 范围内均呈现较强的线性关系, 相关系数(r^2)大于 0.999。向各空白样品添加不同浓度的标准物质, 并以信噪比 $S/N \geq 3$ 确定本方法的检出限(limit of detection, LOD), 泰乐菌素 A、红霉素 A、泰万菌素为 0.1 μ g/kg, 替米考星为 0.2 μ g/kg。以 $S/N \geq 10$ 确定本方法的定量限(limit of quantitation, LOQ)可得泰乐菌素 A、红霉素 A、泰万菌素为 0.5 μ g/kg, 替米考星为 1.0 μ g/kg(表 4)。

2.7 精密度与回收率

据 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范食品理化检测》对于食品已制定 MRL 的要求, 向阴性试样加入适量混合标准溶液和 40 μ L 内标工作液, 使泰乐菌素 A、红霉素 A、泰万菌素溶液浓度为 0.5、5.0、100.0 μ g/kg, 替米考星溶液浓度为 1.0、10.0、100.0 μ g/kg, 按 1.3.2 节前处理方法进行添加回收实验, 每个添加水平设置 6 组平行, 根据测定结果计算平均回收率和精密度, 见表 5。方法采用内标法定量, 分析物回收率为 89.05%~109.82%, 相对标准偏差为 4.59%~11.46%。该方法精密度、准确度均满足痕量实验分析要求。

表 3 4 种化合物的 MEs
Table 3 MEs of 4 kinds of compounds

药物	溶剂曲线方程	相关系数(r^2)	基质匹配曲线方程	相关系数(r^2)	MEs/%
红霉素 A	$Y=372761X-439864$	0.9969	$Y=297198X-173880$	0.9994	0.8
泰乐菌素 A	$Y=342329X-226.651$	0.9991	$Y=208195X-58145.0$	0.9992	0.6
替米考星	$Y=44124.5X-29296.2$	0.9969	$Y=36571.7X+6113.34$	0.9998	0.8
泰万菌素	$Y=289839X-252371$	0.9986	$Y=189312X+13013.4$	0.9999	0.7

表 4 4 种大环内酯类抗生素标准曲线方程、检出限和定量限
Table 4 Standard curves, limits of detection and limits of quantification of 4 kinds of macrolide antibiotics

药物名称	线性范围(μ g/kg)	基质添加标准曲线回归方程	相关系数(r^2)	LODs(μ g/kg)	LOQs(μ g/kg)
泰乐菌素 A	0.25~50.00	$Y=0.06841X-0.01748$	0.9995	0.1	0.5
红霉素 A	0.25~50.00	$Y=0.13273X-0.04010$	0.9998	0.1	0.5
替米考星	0.50~50.00	$Y=0.01683X+0.00543$	0.9995	0.2	1.0
泰万菌素	0.25~50.00	$Y=0.06121X+0.01583$	0.9997	0.1	0.5

表 5 鲜蛋中大环内酯类抗生素检测的回收率和相对标准偏差
Table 5 Recoveries and relative standard deviation of macrolide antibiotics detection in fresh eggs

药物	加标值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	相对标准 偏差/%
泰乐菌素 A	0.5	89.05	8.92
	5.0	96.81	7.91
	100.0	98.76	5.02
替米考星	1.0	99.80	7.27
	10.0	102.55	5.44
	100.0	109.82	6.42
红霉素 A	0.5	102.33	9.59
	5.0	109.25	6.64
	100.0	105.79	5.32
泰万菌素	0.5	92.18	11.46
	5.0	104.23	6.49
	100.0	99.58	4.59

2.8 质控样品检测

质控样品是将已知值及不确定度的待测物加入到基质中配制而成,用于方法验证。将鲜蛋粉中红霉素 A 的质控样通过本研究方法进行检测分析,该质控样品特征值为 $52.57 \mu\text{g}/\text{kg}$,特征值范围为 $(52.57 \pm 3.95) \mu\text{g}/\text{kg}$,根据不确定度公式得合成不确定度为 7.52%。使用此质控样通过本研究方法进行检测,设置 3 组平行,红霉素 A 检测值取平均值为 $54.95 \mu\text{g}/\text{kg}$,在合理范围内,证明此方法可行。

3 结论

本研究通过对仪器和前处理条件进行优化处理,建立了一种 LC-MS/MS 结合 QuEChERS 法同时测定鲜蛋中泰乐菌素 A、泰万菌素、红霉素 A 及替米考星 4 种大环内酯类抗生素残留的方法。通过 80%乙腈水溶液提取目标物,QuEChERS 法对提取液进行净化,乙腈饱和正己烷除脂,由 LC-MS/MS 检测,并通过内标法对目标物进行定性定量分析。本方法首次涵盖了第一代到第三代大环内酯类抗生素的检测,且相比现有可参考方法操作简单、回收率高、灵敏度高、重现性好,可为日常鲜蛋中大环内酯类抗生素残留分析提供技术参考。

参考文献

[1] CAROLINE D, ARJEN G, YORAN W, *et al.* Brominated dioxins in egg, broiler, and feed additives: Significance of bioassay-directed screening for identification of emerging risks in food [J]. *Foods*, 2024, 13(9): 931.

[2] 于焱峰. 中国工程院院士陈坚: 发展替代蛋白产业,顺势而为方能有作为[N]. 每日经济新闻, 2024-5-21(2).
YU YF. CHEN J, academician of Chinese Academy of Engineering: Developing the alternative protein industry can only follow the trend [N]. *National Business Daily*, 2024-5-21(2).

[3] 章勇. 流感袭来, 中国禽业何以平稳度过? [N]. *中国畜牧兽医报*, 2023-08-13(3).
ZHANG Y. How can China's poultry industry pass smoothly after the flu hit? [N]. *China Animal Husbandry and Veterinary News*, 2023-8-13(3).

[4] LIMA É, OLIVEIRA M, FREITAS A. Antibiotics in intensive egg production: Food Safety tools to ensure regulatory compliance [J]. *Food Chem*, 2023(3): 100548

[5] YI Z, XU X, MENG X, *et al.* Emerging markers for antimicrobial resistance monitoring [J]. *Chin Chem Lett*, 2023, 34(10): 71-82.

[6] 王珂. 两种微生物抑制法检测抗生素残留优化与改良的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2020.
WANG K. Study of antibiotic residue optimization and improvement by two microbial inhibition methods [D]. Shihezi: Shihezi University, 2020.

[7] WU Q, PENG DP, LIU QY, *et al.* A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotics residues in milk, chicken egg and honey [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 436.

[8] HONG YQ, GUO Y, CHEN GH, *et al.* Determination of five macrolide antibiotic residues in milk by micellar electrokinetic capillary chromatography with field amplified sample stacking [J]. *J Food Saf*, 2018, 38(1): 12382.

[9] 王旭堂. 禽肉、猪肉及禽蛋中替米考星残留气相色谱-串联质谱检测方法的研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
WANG XT. Gas chromatography and tandem mass spectrometry detection method in poultry meat, pork and eggs [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2021.

[10] TAKATSUKI K, USHIZAWA I, SHOJI T. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single-ion monitoring [J]. *J Chromatogr A*, 1987, 391: 207-217.

[11] MULALAPELE T, XI J. Detection and inactivation of allergens in soybeans: A brief review of recent research advance [J]. *Grain Oil Sci Technol*, 2021, 4(4): 191-200.

[12] ISMAIL G, HAWARI K, JABER F, *et al.* Optimization of a multi-residue screening method for the detection of 71 antimicrobial residues in milk products: The case of labneh [J]. *Food Anal Method*, 2023, 16: 1512-1528.

[13] 魏莉莉, 程志, 丁一, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中林可酰胺和大环内酯类抗生素及其代谢物残留[J/OL]. 分析试验室, 1-10. [2024-05-27]. <https://doi.org/10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2023.051003>
WEI LL, CHENG Z, DING Y, *et al.* Livestock and poultry meat for lincosamide and macrolide antibiotics and their metabolites residues by UHPLC-tandem mass spectrometry [J/OL]. *Chin J Anal Lab*, 1-10. [2024-05-27]. <https://doi.org/10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2023.051003>

[14] BO W, YA LZ, SHU YL, *et al.* Quantitative analysis of erythromycin, its major metabolite and clarithromycin in chicken tissues and eggs via QuEChERS extraction coupled with ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem: X*, 2024, 22: 101468.

[15] 李向梅. 牛奶中四种大环内酯类药物残留免疫检测技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
LI XM. Immunological detection technology of four macrolides residues in milk [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.

- [16] HARGOL Z, KASHANIAN S, NAZARI M. A label-free carbohydrate-based electrochemical sensor to detect *Escherichia coli* pathogenic bacteria using d-mannose on a glassy carbon electrode [J]. *Biosensors*, 2023, 13(6): 619.
- [17] FRANCISCO M, PABLO M, CARMEN I, *et al.* Determination of nitrofurans metabolites and nifurpirinol in animal tissues and eggs by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry validated according to Regulation (EU) 2021/808 [J]. *Heliyon*, 2024, 10(6): 27889.
- [18] WAN YZ, HONG WZ, LI ZC, *et al.* Simultaneous determination of 31 banned veterinary drugs during egg-laying period in poultry eggs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2024, 42(5): 420–431.
- [19] 李敏, 黄梦凡, 孙福红, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定水中 16 种大环内酯和林可酰胺类抗生素[J/OL]. *环境化学*, 1-9. [2024-05-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1844.X.20240202.1414.004.html>
- LI M, HUANG MF, SUN FH, *et al.* UPLC tandem mass spectrometry simultaneously measured 16 macrolide and lincosamide antibiotics in water [J/OL]. *Environ Chem*, 1-9. [2024-05-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1844.X.20240202.1414.004.html>
- [20] 罗燕. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中 6 种大环内酯类药物残留量[J]. *饲料博览*, 2018(9): 52–56.
- LUO Y. Six macrolide residues in chicken by uHPLC-tandem mass spectrometry [J]. *Feed Rev*, 2018(9): 52–56.
- [21] 李盛安, 何国成, 陈楠, 等. 高效液相色谱-质谱法测定脆肉鲩中大环内酯类药物的残留[J]. *农业与技术*, 2022, 42(20): 112–115.
- LI SAN, HE GC, CHEN N, *et al.* Determination of macrolide residues in crisped grass carp by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Agric Technol*, 2022, 42(20): 112–115.
- [22] YUANXIN S. Methods to reduce matrix effect corresponding to different methods [C]. *Proceedings of the 2nd International Conference on Biological Engineering and Medical Science (part3)*, 2022.
- [23] 王露露, 罗娇依, 冯赛赛, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测预制调理羊肉串中 15 种杂环胺[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(4): 49–58.
- WANG LL, LUO JY, FENG SS, *et al.* Rapid detection of 15 heterocyclic amines in preformed prepared lamb kebabs by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(4): 49–58.
- [24] QIONG L, JUN W, YUAN YJ, *et al.* Rapid determination of 3',4'-dimethoxy flavonol-3- β -D-glucopyranoside in rat plasma by LC-MS/MS method followed by protein precipitation [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1086: 47–55.
- [25] 陈彦宏, 王宇, 钟玉心, 等. 增强型脂质去除固相萃取-液相色谱串联质谱法测定畜禽产品中泰万菌素和 3-O-乙酰泰万菌素残留量[J/OL]. *分析试验室*, 1-11. [2024-05-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2017.TF.20230920.1427.002.html>
- TF.20230920.1427.002.html
- CHEN HY, WANG Y, ZHONG YX, *et al.* Determination of tyvalosin and 3-O-acetyltylosin residues by enhanced lipid removal solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry [J/OL]. *J Anal Lab*, 1-11. [2024-05-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2017.TF.20230920.1427.002.html>
- [26] 靳智. 乙腈在食品检测中的研究进展[J]. *现代食品*, 2021(14): 206–209.
- JIN Z. Progress of acetonitrile in food detection [J]. *Mod Food*, 2021(14): 206–209.
- [27] CAMPANHARO S, DASILVA A, BLEUZEN A, *et al.* The association of modified QuEChERS and DLLME to offer high analytical detectability to assess residual depletion profile of erythromycin in fish [J]. *Food Chem*, 2022, 405: 134852.
- [28] 邵丽, 王晓, 张伟, 等. QuEChERS 方法应用研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2023, 51(24): 9–18.
- SHAO L, WANG X, ZHANG W, *et al.* QuEChERS Progress in method application [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2023, 51(24): 9–18.
- [29] WANG H, TIAN H, AI LF, *et al.* Screening and quantification of 146 veterinary drug residues in beef and chicken using QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2023, 408: 135207–135207.
- [30] 王震. 牛可食性组织和奶中新霉素残留量的 HPLC-MS/MS 检测方法研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
- WANG Z. HPLC-MS/MS detection method of neomycin residue in bovine edible tissue and milk [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



李瑶菲, 硕士研究生, 主要研究方向为动物食品安全研究。
E-mail: 1947980582@qq.com



李存, 博士, 主要研究方向为食品安全研究。
E-mail: hhlicun@163.com



彭涛, 博士, 主要研究方向为动物源性食品安全。
E-mail: caiq_pengtao@126.com