

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241210001

引用格式: 陈颖, 曹苏仙, 倪梅林, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测羊肉中20种大环内酯类和林可胺类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 132-140.

CHEN Y, CAO SX, NI ML, *et al.* Determination of 20 kinds of macrolides and lincomasides residues in mutton by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 132-140. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法检测羊肉中 20种大环内酯类和林可胺类药物残留

陈颖^{1,2}, 曹苏仙^{1,2}, 倪梅林², 贾江钢^{1,2}, 陈倩倩^{1,2}, 方科益^{2*}

(1. 宁波中盛产品检测有限公司, 宁波 315000; 2. 宁波海关技术中心, 宁波 315000)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测羊肉样品中20种大环内酯类和林可胺类兽药残留的方法。**方法** 试验先用乙腈提取, 上清液浓缩至近干后, 样品再用50%甲醇水溶液提取, 合并两次的提取液, 用pH为8.0的弱碱性缓冲溶液稀释后经HLB固相萃取柱浓缩净化, 甲醇/5 mmol/L乙酸铵溶液(1:1, V:V)定容, 采用正离子多反应监测模式检测, 基质液配制标准曲线。方法对20种化合物的色谱质谱参数进行了优化, 比较了不同流动相和定容液的分离效果, 同时考察了提取溶剂、净化方式对目标化合物的提取效率和净化效果的影响。**结果** 20种大环内酯类化合物和林可胺类化合物在各自的线性范围内, 线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于0.999, 回收率为64.7%~94.2%, 相对标准偏差在3.8%~11.0%之间。**结论** 该方法具有准确、灵敏、高效等特点, 可用于羊肉中20种大环内酯类和林可胺类化合物的同时检测。

关键词: 大环内酯类; 林可胺类; 超高效液相色谱-串联质谱法; 复定溶液; HLB固相萃取

Determination of 20 kinds of macrolides and lincomasides residues in mutton by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

CHEN Ying^{1,2}, CAO Su-Xian^{1,2}, NI Mei-Lin², JIA Jiang-Gang^{1,2},
CHEN Qian-Qian^{1,2}, FANG Ke-Yi^{2*}

(1. Ningbo Joysun Product Testing Service Company, Ningbo 315000, China;
2. Technology Center of Ningbo Customs, Ningbo 315000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for analysis of 20 kinds of macrolides and lincomasides in mutton by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were

收稿日期: 2024-12-10

基金项目: 宁波市自然科学基金资助项目(2022J199); 宁波市公益性研究计划项目(2024S125)

第一作者: 陈颖(1985—), 女, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全和污染物残留分析。E-mail: 396158719@qq.com

*通信作者: 方科益(1984—), 男, 正高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全和污染物残留分析。E-mail: 30028788@qq.com

initially extracted with acetonitrile, and the supernatant was concentrated to near dryness. The residues were further extracted with 50% methanol, and the 2 extracts were combined and diluted with a weak alkaline buffer solution (pH 8.0). The mixture was then concentrated and purified using an HLB solid-phase extraction cartridge. A methanol/5 mmol/L ammonium acetate solution (1:1, V:V) was used for final dilution. Detection was performed in positive ion multiple reaction monitoring mode. A matrix-matched standard curve was prepared for quantification. Chromatographic and mass spectrometry parameters were optimized for the 20 kinds of target compounds, while the effects of different mobile phases, extraction solvents, and purification methods on extraction efficiency and purification quality were thoroughly investigated. **Results** The 20 kinds of macrolides and lincomasides demonstrated excellent linearity within their respective ranges, with correlation coefficients (r^2) exceeding 0.999. Recoveries ranged from 64.7% to 94.2%, the relative standard deviation was between 3.8% and 11.0%. **Conclusion** The developed method is sensitive, accurate, and suitable for the simultaneous detection of 20 kinds of macrolides and lincomasides in mutton.

KEY WORDS: macrolides; lincomasides; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solutions for reconstitution; HLB solid-phase extraction

0 引言

大环内酯类药物作为由链霉菌或小单孢菌产生的光谱抗菌剂,分为大环内酯抗生素(如红霉素)和大环内酯驱虫药(阿维菌素类)^[1-4];林可胺类抗生素(包括林可霉素、克林霉素等)同样源自链霉菌代谢产物,在肉羊养殖中作为疾病防控与促生长剂被广泛应用^[2-3]。然而养殖环节普遍存在的过量用药或者休药期违规现象,导致两类药物在动物源性食品中的残留风险显著增加。我国 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》明确规定了其最高残留限量,但现有检测技术仍存在亟待突破的瓶颈。

本实验室对多地区羊肉样本的监督抽检和风险监测发现,大环内酯类(多拉菌素、替米考星等)和林可胺类药物残留普遍存在,不仅会威胁消费者健康安全,还会增加耐药菌的数量^[5]。当前针对羊肉基质的标准检测方法存在诸多局限性:(1)标准检测方法目标物涵盖范围不全,完成检测需多个前处理,费时费资源,检测效率低。如 SN/T 5359—2021《出口动物源食品中阿奇霉素残留量的测定 液相色谱—质谱/质谱法》仅能检测一种阿奇霉素、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》涵盖9种化合物、GB 31658.16—2021《食品安全国家标准 动物性食品中阿维菌素类药物残留量的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法》也仅能检测4种大环内酯驱虫药;(2)部分目标物如吡利霉素、塞拉菌素,缺乏专属标准检测方法。针对食品检测的相关文献报道显示,高效液相色谱法^[6-11]可实现阿维菌素类药物的测定,但受限于多数目标物缺乏特征紫外吸收^[12]及衍生化过程复杂^[10],难以满足多组分残留检测要求。尽管液相色谱-串联质谱法(liquid

chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)凭借高灵敏度优势被广泛采用^[13-18],但现有方法普遍存在化合物涵盖面不够全;传统固相萃取柱对强极性化合物的净化效率不足,且纯有机相定容引发的溶剂效应显著影响定性定量的准确性等问题。因此,建立羊肉基质中大环内酯类和林可胺类化合物同时检测的方法是十分必要的。

本研究以羊肉为样本,选择林可霉素、竹桃霉素、克林霉素、泰妙菌素、阿奇霉素、泰乐菌素、螺旋霉素、红霉素、替米考星、罗红霉素、吉他霉素、吡利霉素、交沙霉素、埃玛菌素、乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、多拉菌素、莫西丁克、塞拉菌素、伊维菌素20种药物为目标化合物,通过乙腈初提结合50%甲醇水溶液复提实现广谱提取,通过HLB固相萃取柱的宽极性保留特性优化基质净化过程;优化上样和淋洗条件(水相比比例调节)提升极性化合物回收率;优化复定溶液和流动相,配合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)进行多残留同步分析。为这20种化合物的残留检测提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与材料

LC-30 AD 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); SCIEX 4500 串联四极杆-线性离子阱质谱联用仪(美国 SCIEX 公司); ME 403E 电子天平(精度 0.01 g)、MS 205DU 电子天平(精度 0.0001 g)(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Milli-Q 超纯水系统(美国密理博公司); ST 40R 离心机(美国赛默飞世尔科技公司); Auto Vap S60 多样品自动浓缩仪(美国 ATR 公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司); 乙酸铵、甲酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司); HLB 固相萃取柱

(500 mg/6 mL, 上海安谱实验科技股份有限公司); Luna Omega C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm, 美国phenomenex 公司); 0.22 μm 微孔滤膜(迪马科技有限公司)。

20 种标准品: 林可霉素(林可霉素盐酸盐水合物, 纯度 96.8%)、竹桃霉素(纯度 95.0%)、克林霉素(纯度 99.2%)、泰妙菌素(延胡索酸泰妙菌素, 纯度 97.7%)、阿奇霉素(纯度 98.0%)、泰乐菌素(泰乐菌素酒石酸盐, 纯度 99.5%)、螺旋霉素(纯度 98.2%)、红霉素(mixture A/B/C, 纯度 92.2%)、替米考星(纯度 95.5%)、罗红霉素(纯度 96.8%)、埃玛菌素(甲氨基阿维菌素苯甲酸盐, 纯度 97.0%)、乙酰氨基阿维菌素(纯度 95.0%)、阿维菌素(阿维菌素 B1a, 纯度 98.3%)、多拉菌素(纯度 99.2%)、莫西丁克(纯度 98.1%)、塞拉菌素(纯度 98.5%)、伊维菌素(纯度 95.0%)(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

样品为抽检羊肉, 经实验室检测结果呈阴性。

1.2 样品提取与净化

1.2.1 提取

称取(5.00±0.01) g 肌肉样品于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈, 涡旋 5 min, 超声 15 min, 5000 r/min 离心 3 min, 取上清液于另一 50 mL 离心管中, 40 °C 氮气吹至近干。其次, 样品残渣加入 10 mL 50% 甲醇/水(1:1, V:V, 下同), 复提一次, 5000 r/min 离心 3 min, 取上清液至上述氮

气吹干的离心管中, 进行合并, 并加入 20 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH 8.0), 获得样品提取液。

1.2.2 净化

HLB 固相萃取柱依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 水进行活化。将上述样品提取液完全转入活化的 HLB 固相萃取柱, 再用 6 mL 20% 甲醇水溶液淋洗, 弃淋洗液。最后用 5 mL 甲醇进行洗脱, 收集洗脱液, 40 °C 氮气吹干。准确加入 1 mL 甲醇/5 mmol/L 乙酸铵溶液(1:1, V:V, 下同)定容, 过 0.22 μm 滤膜, UPLC-MS/MS 检测。

1.3 UPLC-MS/MS 条件

1.3.1 液相色谱条件

色谱柱: 费罗门 C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm), 柱温 40 °C, 进样量 5 μL, 流速 0.3 mL/min, 梯度洗脱条件: A 相为 0.1% 甲酸甲醇; B 相为 0.1% 甲酸水溶液, 0~3.0 min: 5%~30% A; 3.0~8.0 min: 30%~90% A; 8.0~8.1 min: 90%~5% A; 8.1~10.0 min: 5% A 保持不变。

1.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 4500 V; 离子源温度: 550 °C; 气帘气: 30 psi; 碰撞气: Medium; 辅助气 1: 55 psi; 辅助气 2: 55 psi; 20 种化合物的定性定量离子对、去簇电压、碰撞能量、保留时间见表 1。

表 1 20 种化合物的保留时间和质谱条件

Table 1 Retention times and optimized spectrometric parameters of 20 kinds of compounds

化合物名称	化合物分类	加合方式	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
红霉素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	3.48	734.3	158.2	60	32
					576.4*		27
吉他霉素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	3.50	772.3	174.2*	90	40
					109.1		45
螺旋霉素	大环内酯抗生素	[M+2H] ²⁺	2.50	422.4	142.2	60	41
					174.2*		45
替米考星	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	2.66	869.4	174.2	83	50
					696.5*		25
泰乐菌素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	3.30	916.2	174.2*	30	48
					772.5		42
阿奇霉素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	2.51	749.5	591.3*	130	29
					158.2		58
林可霉素	林可胺类	[M+H] ⁺	2.24	407.2	125.9*	72	30
					359.2		24
罗红霉素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	3.84	837.7	679.9	150	28
					158.2*		47
竹桃霉素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	2.81	688.4	158.2	50	47
					544.3*		28
交沙霉素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	3.64	828.3	174.2*	64	42
					109.1		42
吡利霉素	林可胺类	[M+H] ⁺	2.72	411.1	112.0*	100	25
					363.0		14
克林霉素	林可胺类	[M+H] ⁺	2.77	425.2	125.9*	35	28
					377.3		25
泰妙菌素	大环内酯抗生素	[M+H] ⁺	3.23	494.5	192.1	115	37
					119.2*		52
阿维菌素	大环内酯驱虫药	[M+Na] ⁺	5.19	895.3	751.1*	121	60
					449.2		63
伊维菌素	大环内酯驱虫药	[M+Na] ⁺	6.61	897.4	753.1*	213	62
					329.1		70

表1(续)

化合物名称	化合物分类	加合方式	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
埃玛菌素	大环内酯驱虫药	[M+H] ⁺	4.51	886.5	82.1*	50	110
					158.1		60
乙酰氨基阿维菌素	大环内酯驱虫药	[M+H] ⁺	5.13	914.4	185.9*	30	23
					298.2		29
莫西丁克	大环内酯驱虫药	[M+H] ⁺	5.93	640.4	498.3	95	19
					528.3*		15
多拉菌素	大环内酯驱虫药	[M+NH ₄] ⁺	5.91	916.5	331.1*	60	65
					593.3		45
塞拉菌素	大环内酯驱虫药	[M+H] ⁺	6.13	770.5	626.4	83	20
					608.4*		25

注: *为定量离子。

1.4 基质匹配标准工作溶液的绘制

将20种标准品用甲醇配制成1.0 mg/mL的单标, 将林可霉素、竹桃霉素、克林霉素、泰妙菌素、阿奇霉素、泰乐菌素、螺旋霉素、红霉素、替米考星、罗红霉素、吉他霉素、吡利霉素、交沙霉素13种化合物配制成10 μg/mL的混合储备液, 将埃玛菌素、乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、多拉菌素、莫西丁克、塞拉菌素、伊维菌素7种化合物配制成10 μg/mL的单一储备液于-20 °C保存。

采用阴性羊肉样品作为空白基质, 按照1.2步骤进行样品前处理和净化, 得到空白基质液。精确吸取各类标准品, 用空白基质液配制成含林可霉素、竹桃霉素、克林霉素、泰妙菌素、阿奇霉素、泰乐菌素、螺旋霉素、红霉素、替米考星、罗红霉素、吉他霉素、吡利霉素、交沙霉素、埃玛菌素0.1 μg/mL, 乙酰氨基阿维菌素、阿维菌素、多拉菌素、莫西丁克、塞拉菌素、伊维菌素0.2 μg/mL的混合标准溶液, 标准工作液现用现配。

分别吸取混合标准溶液10、20、50、100、200、500 μL, 用空白基质液定容到1 mL, 配制成混合标准工作液进行测定。

1.5 数据处理

数据采集和色谱图绘制采用SCIEX OSVersion 3.0软件, 处理数据和相关图表采用Excel 2016软件。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

分别对适当浓度的20种化合物的标准溶液在正负离子模式下进行母离子扫描, 确定扫描方式和母离子后, 对其进行子离子扫描, 选择两对响应比较高、干扰比较小的离子分别为定性离子和定量离子, 并分别优化其去簇电压和碰撞能量。

大环内酯类和林可胺类抗生素在正离子模式下, 主要的加合方式为[M+H]⁺, 螺旋霉素母离子[M+2H]²⁺比[M+H]⁺响应高, 螺旋霉素分子中两个碱性氨基在离子化过程中依次质子化, 形成双电荷离子[M+2H]²⁺, 因此选择[M+2H]²⁺作为母离子。红霉素、竹桃霉素、罗红霉素、阿奇霉素子离子中产生响应强度较高的(m/z 158.2)特征碎片离子, 替米考星、吉他霉素、交沙霉素、泰乐菌素和螺旋霉素子离子中产生响应强度较高的(m/z 174.2)特征碎片离子。虽然有其他文献研究阿维菌素类化合物在负离子模式下检测^[19], 但是本方法发现阿维菌素类化合物在负离子模式下灵敏度比较低, 伊维菌素、阿维菌素、多拉菌素和乙酰氨基阿维菌素4种化合物在正负离子模式下的MRM色谱图对比情况见图1。7种阿维菌素类化合物在正离子

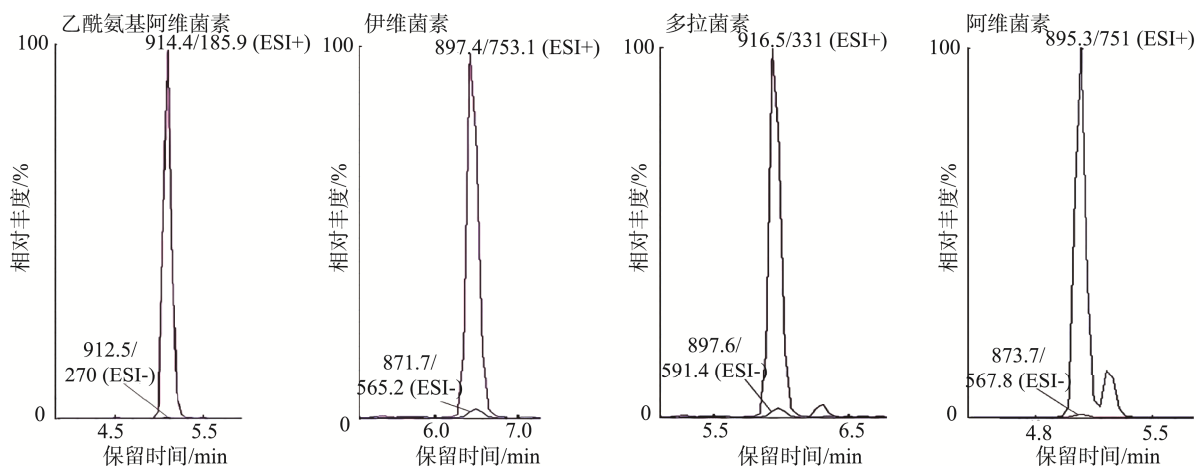


图1 4种化合物在正负离子模式下的MRM色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 4 kinds of compounds in positive and negative ion modes

模式下,可以形成 $[M+H]^+$ 、 $[M+NH_4]^+$ 和 $[M+Na]^+$ 等多种加合方式的离子。流动相和定容试剂均会影响加合方式的稳定性和灵敏度,分析方法中 7 种化合物在流动相为 0.1%甲酸溶液-0.1%甲酸甲醇梯度洗脱,定容液为甲醇/5 mmol/L 乙酸铵溶液的情况下,阿维菌素、伊维菌素形成更稳定灵敏度更高的 $[M+Na]^+$ 峰,埃玛菌素、莫西丁克、乙酰氨基阿维菌素、塞拉菌素形成 $[M+H]^+$ 峰,多拉菌素形成 $[M+NH_4]^+$ 峰。

若一次性在单一通道对多种化合物的定性和定量离子对进行全部扫描,扫描频率往往会出现不足的情况。大环内酯类和林可胺类化合物出峰时间集中在 2~8 min,采用 Scheduled MRM 模式中的 ENABLED 模式,MRM detection window 设置为 45 s,各离子对均具备足够的扫描频率与点数,保障了每种化合物都可实现高灵敏度的精准定量检测。通过优化得到的 20 种化合物的加合方式、保留时间、母离子、去簇电压、碰撞能量、定量离子和定性离子见表 1。

2.2 复定溶液的优化

复定溶液的组成对目标化合物的峰型和灵敏度有着显著的影响。针对这 20 种化合物的复溶,在相关研究中常采取多种不同的溶液体系。甲醇^[20-22]、0.1%甲酸乙腈^[16,23]、0.1%氨水乙腈^[24]或者甲醇、乙腈与一定比例的水混合相^[13-15,25-27]多被用作复定溶液。本研究发现红霉素、螺旋霉素、阿奇霉素、泰乐菌素等化合物在不同复定溶液中的响应差别较大,在酸性溶剂中响应显著降低。选择红霉素为目标物,对比了 0.1%甲酸水溶液、0.1%甲酸甲醇、0.1%甲酸乙腈、甲醇/5 mmol/L 乙酸铵溶液、甲醇以及乙腈作为复定溶液时,红霉素的出峰和响应情况,结果见图 2。当红霉素为 5 ng/mL 时,甲醇溶液呈现最强响应,甲醇/5 mmol/L 乙酸铵溶液次之;酸性条件下响应显著降低,0.1%甲酸溶液中的响应值仅为甲醇溶液的百分之一左右。

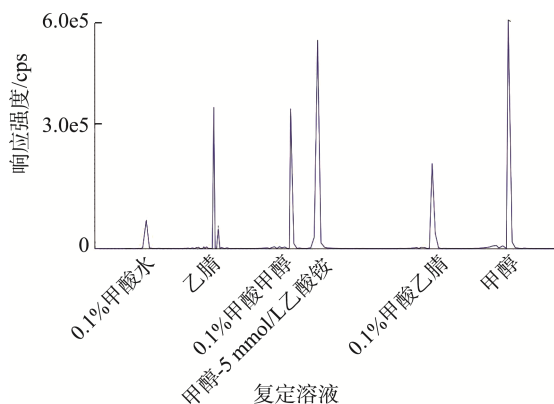


图 2 相同质量浓度的红霉素标准溶液(5 ng/mL)在 6 种不同的复定溶液中的色谱图

Fig.2 Chromatograms of erythromycin standard solution with the same mass concentration in 6 kinds of different reconfirmation solutions (5 ng/mL)

在 20 种混合标准溶液检测中,若用甲醇、乙腈、0.1%甲酸乙腈、0.1%甲酸甲醇等高比例有机相作为复定溶液,吡利霉素、阿奇霉素、螺旋霉素、林可霉素由于出峰时间早,溶剂效应明显,出现色谱峰拖尾、前沿或出现多个小峰。当以甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液为复定溶液时,20 种目标化合物的灵敏度和峰型均能达到要求,并且在此条件下,红霉素的峰型和响应均稳定,因此,最终选择甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液作为复定溶液。

2.3 流动相的优化

流动相的构成及比例影响化合物的出峰时间及响应情况^[22]。大环内酯和林可胺类化合物大都含有叔胺基团,叔胺基团中的孤对电子具有较强的亲核性,产生较强的正离子信号,流动相中加入甲酸有助于形成稳定的 $[M+H]^+$ 加合离子,提高正离子模式下的离子化效率。因此本研究对比了 4 种不同的流动相体系对化合物的影响,分别是:5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸)-0.1%甲酸甲醇、5 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸)-0.1%甲酸乙腈、0.1%甲酸-0.1%甲酸甲醇和 0.1%甲酸-0.1%甲酸乙腈。研究发现流动相中加入乙酸铵,替米考星、泰妙菌素、莫西丁克等化合物的响应值有所降低;而在以甲醇作为有机相的体系中,大环内酯类化合物的灵敏度和峰型都优于乙腈体系。因此,选择 0.1%甲酸-0.1%甲酸甲醇为最优流动相体系,进行梯度洗脱。结果表明该体系能够获得理想而稳定的色谱峰,实现最优的离子响应强度。

2.4 提取溶剂的优化

本研究选取的 20 种化合物的极性存在较大差异,提取试剂及提取步骤对目标物的回收率影响较大。根据相关文献资料,红霉素、吉他霉素、阿维菌素等化合物,往往采用乙腈^[6-8,10,14-15]作为提取试剂进行提取;也有采用酸化乙腈^[12,15,25-26]、氨化乙腈^[16,19-21]、甲醇或乙腈和一定比例的水相混合^[13,17,22,28]进行提取。由于红霉素、螺旋霉素、阿奇霉素、泰乐菌素等化合物在酸性溶液中不稳定,本研究首先将中性试剂乙腈作为提取溶剂。

在空白羊肉样品中加标,添加水平为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,结果表明由于乙腈容易使蛋白快速变性,样品容易结团,提取不充分,林可霉素、螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星的回收率低于 50%(见图 3),另外 16 种化合物的回收率为 65%~110%。

为了进一步提高林可霉素、螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星这 4 种化合物的提取效率,采用甲醇、50%甲醇水溶液、50%乙腈水溶液进行复提取,研究发现,采用 10 mL 50%甲醇水溶液复提,合并 2 次提取液后,20 种化合物的回收率达到 75%~110%,林可霉素、螺旋霉素、阿奇霉素、替米考星这 4 种化合物回收率为 75%~80%(见图 3),能满足实际检测的需求。因此,选择第一次提取时用 10 mL 乙

腈作为提取溶液, 第二次则采用 10 mL 50% 甲醇水溶液, 以实现 20 种化合物的高效提取。

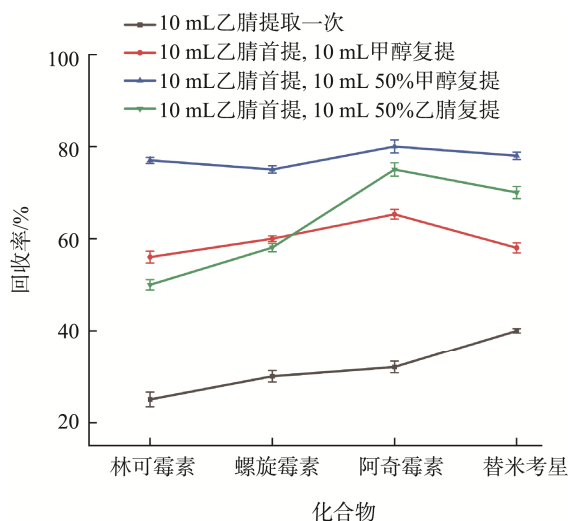


图 3 不同提取方式下 4 种化合物的回收率($n=3$)
Fig.3 Recoveries of 4 kinds of compounds under different extraction solutions ($n=3$)

2.5 SPE 净化条件的优化

羊肉样品中富含的蛋白质、脂肪和矿物质不仅影响目标物的定性定量, 还会污染色谱柱和离子源。本研究采用兼具疏水性二乙烯基苯和亲水性 N-乙基基吡咯烷酮结构的 HLB 固相萃取柱, 其宽极性保留特性适用于大环内酯类与林可胺类药物的净化处理。

按照 2.4 前处理获得的空白阴性样品提取液中, 分别添加 20 种化合物的标准溶液(添加水平为 5 ng/mL), 对上样溶液及淋洗液进行了优化。实验发现提取液直接上样后用甲醇洗脱时, 林可霉素、螺旋霉素等极性较强的化合物, 回收率不足 30%。通过改进方法: 将首次乙腈提取液浓缩近干后与二次提取的 50% 甲醇溶液合并, 经 20 mL 磷酸缓冲溶液(pH 8.0)稀释上样[总上样体积 30 mL, 甲醇含量 16.7% (V:V)], 目标物回收率显著提升至 85%~105%。

淋洗条件研究表明, 当采用 5 mL 30% 和 40% 甲醇水溶液作为淋洗液时, 林可霉素、螺旋霉素等 5 种化合物回收率低于 50%, 而其余 15 种保持 70% 以上。对比不同浓度淋洗液发现, 0%、10%、20% 甲醇水溶液均能保证 20 种化合物回收率大于 80%。其中 20% 甲醇水溶液在实现高效净化的同时, 5 种关键药物(林可霉素、螺旋霉素、阿奇霉素、莫西丁克和红霉素)的回收效果达到最佳平衡(见图 4), 因此选定 20% 甲醇水溶液为最优淋洗条件。

2.6 基质效应的评价

在运用 UPLC-MS/MS 进行分析测定时, 样品里的内源性物质及外源性物质可能会干扰分析物的离子化与去溶剂化进程, 致使其质谱响应出现波动, 或升高或降低, 进而引

发基质效应(matrix effects, ME)^[29]。ME 在质谱分析中普遍存在, 影响分析结果的准确性^[30]。计算公式为 $ME = (\text{基质匹配标准曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率} - 1) \times 100\%$ 。ME 为正, 表明基质增强; ME 为负, 表明基质抑制^[29-30]。若 $|ME| \leq 20\%$, 表明 ME 不明显; $20\% < |ME| \leq 50\%$, 表明 ME 中等; $|ME| > 50\%$, 表明 ME 较强^[31]。

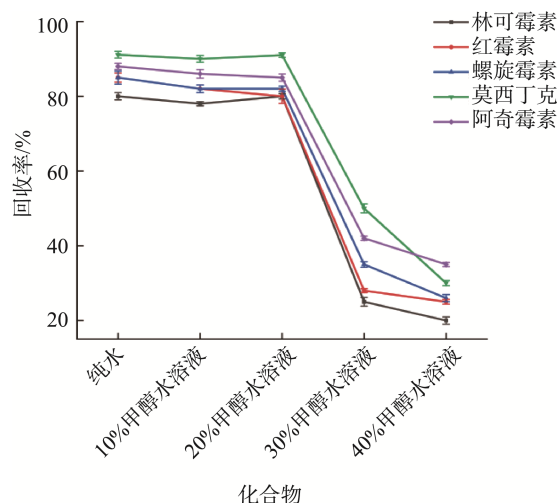


图 4 不同浓度的甲醇淋洗液对回收率的影响($n=3$)
Fig.4 Effects of methanol concentration in rinsing solution on recoveries ($n=3$)

实验分别用溶剂和空白基质溶液配制混合标准溶液, 以浓度为横坐标(X, ng/mL), 峰面积为纵坐标(Y)做标准曲线, 用两条曲线的斜率来计算 ME。结果如表 2 所示, 林可霉素、竹桃霉素、克林霉素、泰妙菌素、阿奇霉素、螺旋霉素、红霉素、罗红霉素、交沙霉素、埃玛菌素、阿维菌素、多拉菌素、莫西丁克、塞拉菌素、伊维菌素 15 种化合物为基质抑制效应, 吉他霉素、替米考星、泰乐菌素、吡利霉素、乙酰氨基阿维菌素 5 种化合物为基质增强效应。20 种化合物的 ME 为 -19.3%~18.2%, $|ME|$ 均小于 20%, 无明显 ME, 可以用于测定。

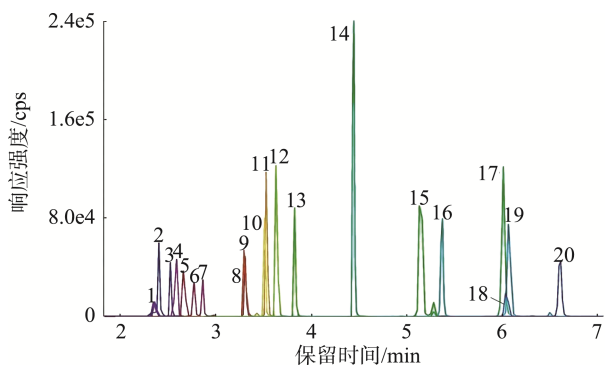
2.7 线性范围、检出限、定量限以及加标回收率

以化合物的峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X, ng/mL)绘制标准曲线回归方程。以色谱峰的信噪比大于 3 作为方法的检出限(limit of detection, LOD), 色谱峰的信噪比大于 10 为方法的定量限(limit of quantitation, LOQ), 向空白样品中添加 1 倍 LOQ、2 倍 LOQ、10 倍 LOQ 3 个浓度的加标回收试验, 每组 6 个平行, 按照方法 1.2 前处理。计算公式为回收率/%=(加标样品中测得的目标物含量-空白样品中目标物的本底含量)/加标量 $\times 100\%$ 。20 种化合物的 LOD、LOQ、回收率、精密度结果见表 2。20 种化合物曲线相关系数均大于 0.999, 线性良好; 林可霉素、竹桃霉素、克林霉素、泰妙菌素、阿奇霉素、泰乐菌素、螺旋霉素、红霉素、替米考星、罗红霉素、吉他霉素、

表 2 20 种化合物的线性范围、相关系数、LODs、LOQs、回收率、精密度($n=6$)和 MEs
Table 2 Linear ranges, correlation coefficients, LODs, LOQs, recoveries, accuracies ($n=6$) and MEs of 20 kinds of compounds

目标化合物	线性范围 (ng/mL)	r^2	LODs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%			精密度/%			MEs/%
					LOQ	2 LOQ	10 LOQ	LOQ	2 LOQ	10 LOQ	
红霉素	1~50	0.9994	0.2	0.5	70.4	76.7	77.4	9.8	4.7	7.7	-18.6
吉他霉素	1~50	0.9992	0.2	0.5	80.5	81.6	84.7	5.9	6.2	8.4	6.9
螺旋霉素	1~50	0.9992	0.2	0.5	64.7	70.5	73.4	8.1	5.9	7.7	-10.3
替米考星	1~50	0.9993	0.2	0.5	75.6	79.4	83.5	9.4	6.4	8.1	11.3
泰乐菌素	1~50	0.9998	0.2	0.5	79.4	81.5	90.4	8.5	9.2	8.4	3.13
阿奇霉素	1~50	0.9992	0.2	0.5	73.5	78.3	78.9	4.2	9.7	8.3	-6.1
林可霉素	1~50	0.9999	0.2	0.5	67.5	70.3	70.9	5.3	4.9	3.8	-2.0
罗红霉素	1~50	0.9998	0.2	0.5	83.2	85.4	92.6	7.0	8.2	5.4	-13
竹桃霉素	1~50	0.9997	0.2	0.5	80.4	79.6	85.4	7.1	8.8	9.7	-19.3
交沙霉素	1~50	0.9998	0.2	0.5	80.5	84.6	92.0	9.8	10.0	8.7	-18.9
吡利霉素	1~50	0.9998	0.2	0.5	79.5	78.3	78.9	11.0	9.4	5.6	18.2
克林霉素	1~50	0.9997	0.2	0.5	83.2	89.6	91.4	9.8	11.0	8.6	-4.8
泰妙菌素	1~50	0.9995	0.2	0.5	68.9	75.7	81.3	8.9	9.8	10.0	-18
阿维菌素	2~100	0.9998	0.5	1.0	78.2	85.2	91.4	8.4	8.7	7.5	-7.5
伊维菌素	2~100	0.9998	0.5	1.0	80.3	89.1	92.6	5.8	6.7	7.4	-10.3
埃玛菌素	1~50	0.9999	0.2	0.5	82.4	90.1	94.2	7.3	7.4	6.8	-19
乙酰氨基 阿维菌素	2~100	0.9997	0.5	1.0	86.5	90.4	92.1	7.9	8.2	9.3	17
莫西丁克	2~100	0.9994	0.5	1.0	83.4	86.8	91.6	5.6	7.2	8.5	-18.6
多拉菌素	2~100	0.9993	0.5	1.0	79.5	84.3	92.0	9.0	8.6	7.1	-18.6
塞拉菌素	2~100	0.9998	0.5	1.0	80.3	82.1	90.4	8.2	9.5	11.0	-16.7

吡利霉素、交沙霉素、埃玛菌素的 LOD 为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其余 6 种化合物的 LOD 为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 相应的 LOQ 分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本研究的加标回收率在 64.7%~94.2% 之间, 相对标准偏差在 3.8%~11.0% 之间, 满足 20 种目标化合物的检测。加标样品中 20 种化合物(添加水平: 2 倍定量限)定量离子对的 MRM 色谱图见图 5。



注: 1. 林可霉素; 2. 螺旋霉素; 3. 阿奇霉素; 4. 替米考星; 5. 吡利霉素; 6. 克林霉素; 7. 竹桃霉素; 8. 泰妙菌素; 9. 泰乐菌素; 10. 红霉素; 11. 吉他霉素; 12. 交沙霉素; 13. 罗红霉素; 14. 埃玛菌素; 15. 乙酰氨基阿维菌素; 16. 阿维菌素; 17. 多拉菌素; 18. 莫西丁克; 19. 塞拉菌素; 20. 伊维菌素。

图 5 加标样品溶液中 20 种化合物的 MRM 色谱图(2 倍定量限)
Fig.5 MRM chromatogram of 20 kinds of compounds in the spiked sample solution (2 times of the LOQ)

2.8 实际样品的检测

采用本研究建立的方法, 对抽检的 20 批次羊肉样品进行筛查分析。检测结果显示 1 批次羊肉样品中检出替米考星, 含量为 21.47 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 1 批次羊肉样品检测出多拉菌素, 含量为 8.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 其余批次样品均未检出。为验证本方法的可靠性, 分别采用 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、吉他霉素、交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》和 GB 31658.16—2021《食品安全国家标准动物性食品中阿维菌素类药物残留量的测定 高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法》(第二法)对阳性羊肉样品中的替米考星和多拉菌素进行验证, 检测结果分别为 23.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 9.44 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。替米考星和多拉菌素项目方法比对的相对差值为 10.5% 和 13.9%, 表明本方法适用于羊肉中大环内酯类和林可胺类化合物的测定。

3 结论

本研究用乙腈初提羊肉样品, 浓缩后用 50% 甲醇水溶液复提, 经磷酸缓冲溶液(pH 8.0)稀释后, 再用 HLB 固相萃取柱净化。通过优化质谱参数、色谱参数、复定溶剂、流动相、提取溶液以及固相萃取净化条件, 建立了羊肉基

质中大环内酯类和林可胺类 20 种化合物残留的超高效液相-串联质谱分析方法。实验结果显示 20 种化合物的回收率在 64.7%~94.2%之间, 相对标准偏差小于 15%; 阳性样品用本方法与标准方法比对, 相对差值小于 15%, 符合 GB/T 27404—2008 的要求。该方法灵敏度高、准确性好, 可为羊肉中大环内酯类和林可胺类化合物的检测提供技术支持。

参考文献

- [1] RUBIES A, ANTKOWIAK S, GRANADOS M, *et al.* Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples [J]. *Food Chemistry*, 2015, 181: 57–63.
- [2] TAO YF, YU G, CHEN DM, Determination of 17 macrolide antibiotics and avermectins residues in meat with accelerated solvent extraction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2012, 897: 64–71.
- [3] ENEJOH OS, SULEIMAN MM. Anthelmintics and their application in veterinary medicine [J]. *Research in Medical & Engineering Sciences*. 2017, 2: 117–126.
- [4] KINSELLA B, LEHOTAY SJ, MASTOVSKA K, *et al.* New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 637: 196–207.
- [5] 田红静, 刘通, 王秀娟, 等. 动物源性食品中抗生素残留的快速检测方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(11): 3391–3397.
TIAN HJ, LIU T, WANG XJ, *et al.* Rapid determination of antibiotic residues in animal derived foods [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(11): 3391–3397.
- [6] 林洋, 郁蕉竹, 许文雅, 等. C₃₀ 色谱柱 HPLC 法分析测定蔬菜中阿维菌素残留量[J]. *食品工业*, 2022, 43(11): 274–277.
LIN Y, YU JZ, XU WY, *et al.* Determination of avermectin residue in vegetables by high performance liquid chromatography on C₃₀ column [J]. *The Food Industry*, 2022, 43(11): 274–277.
- [7] 张伟, 舒均喜, 郑妍, 等. QuEChERS-高效液相色谱法检测牛肉中的阿维菌素类药物残留[J]. *动物医学进展*, 2017, 38(11): 56–60.
ZHANG W, SHU JX, ZHENG Y, *et al.* Determination of avermectins residues in beef by QuEChERS-high performance liquid chromatography [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(11): 56–60.
- [8] WANG J, LIU GJ, ZHU BQ, *et al.* Universal quantification method of degradation impurities in 16-membered macrolides using HPLC-CAD and study on source of the impurities [J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2020, 184: 113170.
- [9] 张元, 谷岩, 贾宏新, 等. 固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定蔬菜中阿维菌素的残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(8): 1958–1961.
ZHANG Y, GU Y, JIA HX, *et al.* Determination of avermectin residue in vegetables by solid-phase extraction with ultraviolet detection coupled to high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(8): 1958–1961.
- [10] 张玉洁, 沈昕, 李丹, 等. 阿维菌素类药物残留检测衍生化研究[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(7): 18–22.
ZHANG YJ, SHEN X, LI D, *et al.* Derivatization of avermectin in residues detection [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2020, 54(7): 18–22.
- [11] 曲悠扬, 勇艳华, 于洋, 等. 高效液相色谱法测定小油菜中阿维菌素的残留量[J]. *农药科学与管理*, 2022, 43(3): 23–27.
QU YY, YONG YH, YU Y, *et al.* Detection of abamectin residues in rape by HPLC [J]. *Pesticide Science and Administration*, 2022, 43(3): 23–27.
- [12] 赵红帅, 谷学新, 夏敏, 等. 大环内酯类抗生素的分析方法[J]. *化学通报*, 2005, 68(8): w089.
ZHAO HS, GU XX, XIA M, *et al.* Analysis methods for macrolide antibiotics [J]. *Chemistry*, 2005, 68(8): w089.
- [13] 尹晖, 王亦琳, 孙雷, 等. UPLC-MS/MS 法检测禽蛋中 10 种大环内酯类药物多残留的研究[J]. *中国兽医杂志*, 2020, 56(8): 77–83.
YIN H, WANG YL, SUN L, *et al.* Determination of macrolides residue in poultry eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(8): 77–83.
- [14] 王亚会, 李祥波. 液质联用法测定部分原料中的阿维菌素[J]. *食品工业*, 2023, 44(7), 317–320.
WANG YH, LI XB. Determination of avermectin residues in some raw materials by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *The Food Industry*, 2023, 44(7): 317–320.
- [15] 李宏娟, 张养东, 李曼, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定羊奶中 5 种阿维菌素类药物残留的研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021(17): 77–82, 88.
LI HJ, ZHANG YD, LI M, *et al.* Study on the determination of five avermectin residues in goat milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2021(17): 77–82, 88.
- [16] 赵志勇, 张艳梅, 鄂恒超, 等. 固相萃取净化结合液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中 5 种阿维菌素类化合物[J]. *分析实验室*, 2022, 41(6): 720–725.
ZHAO ZY, ZHANG YM, E HC, *et al.* Determination of five avermectins in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with solid-phase extraction [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2022, 41(6): 720–725.
- [17] 侯轩, 陈凯, 虞一聪, 等. HPLC-QTOF 和 HPLC-MS/MS 测定中兽药制剂非法添加 9 种大环内酯类药物的方法研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2023, 42(6): 47–51.
HOU X, CHEN K, YU YC, *et al.* Determination of 9 macrolides illegal addition in Chinese veterinary medicine preparations by HPLC-QTOF and HPLC-MS/MS [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2023, 42(6): 47–51.
- [18] 马俊美, 孙磊, 曹梅荣, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定猪肉中 9 种大环内酯类抗生素[J]. *食品科学*, 2020, 41(4): 273–279.
MA JM, SUN L, CAO MR, *et al.* Determination of nine macrolide antibiotics in pork samples by ultra performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Food Science*,

- 2020, 41(4): 273–279.
- [19] OZDEMIR N, KAHRAMAN T. Rapid confirmatory analysis of avermectin residues in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2016, 24(1): 90.
- [20] 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.
- WANG FM, CHEN JH, LIN LM, *et al.* Determination of 12 macrolide antibiotics residues in products of animal origin by ultra performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2009, 28(7): 784–788.
- [21] KYUNG-HEE YOO, DA-HEE PARK, AM ABDEL-ATY, *et al.* Development of an analytical method for multi-residue quantification of 18 anthelmintics in various animal-based food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021(11): 68–76.
- [22] 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胺类和大环内酯类抗生素及其代谢物残留[J]. *分析试验室*, 2024, 43(7): 1017–1023.
- WEI LL, CHENG ZH, DING Y, *et al.* Simultaneous determination of lincosamides, macrolides and their metabolites residues in livestock and poultry meat by UHPLC-MS/MS [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2024, 43(7): 1017–1023.
- [23] CHEN JY, MEI GM, ZHANG XJ, *et al.* Dispersive solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry—a rapid and accurate method for detecting 10 macrolide residues in aquatic products [J]. *Foods*, 2024, 13: 866.
- [24] 杨明, 伊鋈, 陈丹, 等. 氧化锌 QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 7 种林可酰胺类与大环内酯类兽药残留[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(8): 974–979.
- YANG M, YI Y, CHEN D, *et al.* Determination of seven lincosamides and macrolides residues in honeys by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with ZnO QuEChERS [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2020, 39(8): 974–979.
- [25] 汪建妹, 徐彦, 周敏, 等. UiO-67 分散固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 6 种大环内酯类兽药残留[J]. *分析试验室*, 2023, 42(3): 350–354.
- WANG JM, XU Y, ZHOU M, *et al.* Dispersive solid phase extraction based on UiO-67 coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of six macrolides residues in pork [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2023, 42(3): 350–354.
- [26] 刘永涛, 余琳雪, 王桢月, 等. 改良的 QuEChERS 结合高效液相色谱-串联质谱同时测定水产品中 7 种阿维菌素类药物残留[J]. *色谱*, 2017, 35(12): 1276–1285.
- LIU YT, YU LX, WANG ZY, *et al.* Simultaneous determination of seven avermectin residues in aquatic products by modified QuEChERS combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(12): 1276–1285.
- [27] SARA KHEIRANDISH, SHOKOUFEH GOUDARZI, MARYAM AMIRAHMADI, *et al.* Method validation for simultaneous determination of macrolides, quinolones, and sulfonamides antibiotics in Iranian yogurt samples by SPE clean-up and UHPLC-MS/MS [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 193: 109103.
- [28] 李瑶菲, 陈冬东, 贾景建, 等. 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[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 19(15): 20–27.
- LI YF, CHEN DD, JIA JIA JJ, *et al.* Determination of 4 kinds of macrolide antibiotics residues in fresh eggs by QuEChERS-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 19(15): 20–27.
- [29] 刘晓云, 陈笑艳, 钟大放. 液相色谱-串联质谱生物分析方法的基质效应和对策[J]. *质谱学报*, 2017, 38(4): 388–399.
- LIU XY, CHEN XY, ZHONG DF. Matrix effects and countermeasure of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in bioanalysis [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2017, 38(4): 388–399.
- [30] HAYAMA T. Matrix effects in mass spectrometry analysis [J]. *Analytical Sciences*, 2020, 36(10): 1151.
- [31] 孙佳林, 牛宇敏, 高群, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定灰尘中 26 种双酚类化合物[J]. *色谱*, 2023, 41(5): 417–425.
- SUN JL, NIU YM, GAO Q, *et al.* Determination of 26 bisphenols in dust by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(5): 417–425.

(责任编辑: 蔡世佳 韩晓红)