

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240227006

Captiva EMR-Lipid 技术结合液相色谱-串联质谱法 测定畜禽肉及内脏中 4 种抗生素残留

申雷, 柳溪, 羊银, 史长生*

(天津市食品安全检测技术研究院, 天津市食品安全监测技术重点实验室, 天津 300308)

摘要: **目的** 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定畜禽肉及内脏中 4 种抗生素(新生霉素、莫匹罗星、丰加霉素、茴香霉素)残留的检测方法。**方法** 样品经 2% 甲酸乙腈溶液提取和增强型脂质去除(Captiva EMR-Lipid)固相萃取柱净化, 采用 Waters T3 色谱柱分离目标物, 流动相以乙腈和含 0.1% 甲酸 10 mmol/L 甲酸铵水溶液梯度洗脱, 并采用电喷雾离子源的正离子扫描模式, 空白基质匹配外标法定量。**结果** 新生霉素、莫匹罗星、丰加霉素、茴香霉素在 2.5~100.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.9950。方法的检出限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。当加标回收实验的添加量为 3.0~30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 新生霉素、莫匹罗星、丰加霉素、茴香霉素加标回收率为 76.3%~115.1%, 相对标准偏差均小于 8% ($n=6$), 在猪肉基质中日内精密度和日间精密度均小于 9% ($n=5$)。**结论** 本研究建立的检测方法, 样品前处理快速简便, 检测灵敏度高, 适用于市售畜禽肉及内脏中抗生素的风险筛查。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 抗生素; 畜禽肉及内脏; 固相萃取; 兽药残留

Determination of 4 kinds of antibiotics residues in meat and viscera of livestock and poultry by Captiva EMR-Lipid technology combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SHEN Lei, LIU Xi, YANG Yin, SHI Chang-Sheng*

(Tianjin Institute for Food Safety Inspection Technology, Tianjin Key Laboratory of Food Safety Monitoring Technology, Tianjin 300308, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 4 kinds of antibiotics (novobiocin, mupirocin, toyocamycin, and anisomycin) residues in meat and viscera of livestock and poultry by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with 2% formate acetonitrile solution, purified by enhanced matrix removal-lipid (Captiva EMR-Lipid) solid phase extraction column and separated by Waters T3 column. The mobile phase was eluted with a gradient of acetonitrile and 10 mmol/L formate ammonium aqueous solution containing 0.1% formic acid, the positive ion scanning mode of the electrospray

基金项目: 天津市食品安全检测技术研究院新羽科技计划项目(SJY2022S04)

Fund: Supported by the Project of Tianjin Institute for Food Safety Inspection Technology Xinyu Science and Technology Program (SJY2022S04)

*通信作者: 史长生, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全质量控制。E-mail: shchsheng@163.com

*Corresponding author: SHI Chang-Sheng, Senior Engineer, Tianjin Institute for Food Safety Inspection Technology, Tianjin Key Laboratory of Food Safety Monitoring Technology, Tianjin 300308, China. E-mail: shchsheng@163.com

ion source was used for quantitative detection, and blank matrix matching external standard method was used for analysis. **Results** The linear relationship between novobiocin, mupirocin, toyocamycin, and anisomycin was good in the range of 2.5–100.0 ng/mL, the correlation coefficient (r^2) was greater than 0.9950. The detection limit was 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the quantitative limit was 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recovery rates of novobiocin, mupirocin, toyocamycin, anisomycin were 76.3%–115.1% when 3.0–30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were added into the standard recovery experiment, the relative standard deviations were less than 8% ($n=6$), and the relative standard deviation s of intra-day and inter-day were less than 9% in the pork matrix ($n=5$). **Conclusion** The method established in this study is rapid, simple and sensitive, which is suitable for the risk screening of antibiotics in commercially available meat and viscera of livestock and poultry.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; antibiotics; meat and viscera of livestock and poultry; solid phase extraction; veterinary drug residues

0 引 言

抗生素在畜禽类动物饲养过程中的使用会给产品带来潜在有害物质,进而可能对人体健康产生不良影响^[1]。新生霉素,是分离自雪白链霉菌的老一代氨基香豆素类抗生素^[2],为一种强效的细菌脱氧核糖核酸促旋酶和真核 DNA 拓扑异构酶 II 的抑制剂^[3],作用机制是特异性靶向参与能量转移的促旋酶 B 亚基活性,进而干扰 DNA 合成并最终影响细菌生长,用于治疗耐药金黄色葡萄球菌、肺炎双球菌等多种感染^[4],还可改善肉鸡生长、减少肝脏毒性、降低胫骨软骨发育不良^[5]。莫匹罗星,是由荧光假单胞菌培养液产生的假单胞菌酸 A,被归为其他类抗生素,其抗菌作用主要是通过可逆性地与异亮氨酸转移 RNA 合成酶结合,阻止异亮氨酸渗入,中止细胞内含异亮氨酸的多肽链合成,对葡萄球菌和大多数链球菌具有较强抑菌活性^[6];丰加霉素,是由放线菌类产生的腺苷类似物,为一种核苷类抗生素^[7],可选择性抑制宫颈癌细胞、鸡胚胎细胞等真核生物细胞 mRNA 的合成,还能抑制反转录病毒的反转录酶活性,具有开发抗肿瘤、抗病毒药物的潜力^[8];茴香霉素,是由浅灰链霉菌产生的一种吡咯烷生物碱类抗生素^[9],可抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)和其他信号通路的途径,对小鼠 T 淋巴细胞反应性的抑制作用与地塞米松之间无明显差别^[10]。上述 4 种抗生素虽然在化学结构和作用机制方面有所差别,但均对真菌感染有治疗效果或对动物细胞合成有抑制作用,不排除其在畜禽类动物中添加的可能。

为对生产者使用抗生素类兽药的行为进行有效监管,国外监管部门已制定最大残留量(maximum residue limits, MRLs),关于新生霉素,美国规定牛、鸡、火鸡、鸭的初级产品组织中的限量为 1.0 mg/kg,乳中的限量为 0.1 mg/kg;欧盟规定乳中的限量为 0.05 mg/kg;日本规定鸡肉和鱼肉的限量为 0.05 mg/kg,乳中的限量为 0.08 mg/kg;关于莫匹罗星、丰加霉素、茴香霉素,未见相关规定。我国先后发

布 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留量》、农业农村部公告第 250 号、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》,但上述标准和公告中均未规定这 4 种抗生素在动物源性食品中是禁用或限用,仅有原国家质量监督检验检疫总局公告(2002 年第 37 号)规定鸡肉中新生霉素的限量为 1.0 mg/kg,以及山东省畜牧办公室制定的《山东省禁用限用兽药名录》规定水产品养殖禁用新生霉素。

动物源食品中关于抗生素兽药残留常见的 3 类检测方法为:(1)微生物法(生长抑制筛选法^[11]、微生物受体检测法^[12]、短小芽孢杆菌法^[13]);(2)免疫学法(酶联免疫法^[14]、胶体金法^[15]、荧光偏振免疫法^[16]、生物传感器法^[17]、量子点应用法^[18]、毛细管电泳法^[19]);(3)理化法(薄层色谱法^[20]、液相色谱法^[21]、气相色谱-质谱法^[22]、液相色谱-质谱法^[23–24])。但微生物法、免疫学法和薄层色谱法的特异性差,假阳性率较高,液相色谱法灵敏度不够高且消耗有机试剂量大,气相色谱-质谱法不适用于高沸点且难挥发的抗生素类化合物,目前常用设备仍为液相色谱-串联质谱仪。关于新生霉素的检测方法,国内有 SN 0674—1997《出口肉及肉制品中新生霉素残留量检验方法 滤纸片法》,但根据国家认监委办公室关于公布 2013 年检验检疫行业标准复审结论的通知,该方法技术已作废,国外 THOMPSON 等^[25]采用液相色谱-串联质谱法并以乙腈沉淀蛋白来测定鲜牛乳中的新生霉素;关于莫匹罗星的检测方法,国内胡玉芬等^[26]采用液相色谱-串联质谱法测定不同软膏中的莫匹罗星,国外 GALAL 等^[27]采用液相色谱法测定二元药剂混合物中的莫匹罗星;关于丰加霉素的检测方法,国外 RI 等^[28]采用高分辨电喷雾电离质谱鉴定放线菌菌株的发酵液中丰加霉素;关于茴香霉素的检测方法,国内张晶等^[29]采用液相色谱-串联质谱法分析链霉菌株发酵产物中的茴香霉素,国外 TOLIĆ 等^[30]采用液相色谱-串联质谱法测定组织和血清中茴香霉素的浓度。上述方法大部分应用于药品、生物制品等领域,不

适用于畜禽肉及内脏等基质复杂的食品。

Captiva EMR-Lipid 净化柱是近些年新研发的增强型脂质去除固相萃取柱, 它的优点是通过疏水作用和体积排阻, 有效去除磷脂等非极性脂质对于检测的干扰, 减少基质效应(matrix effect, ME), 已有多篇报道^[31-33]利用该技术结合液相色谱-串联质谱仪, 建立动物源食品中喹诺酮类、氯霉素类、林可霉素类、大环内酯类抗生素残留检测方法。因此, 本研究拟结合该净化技术, 构建一种可同时测定畜禽肉及内脏中 4 种抗生素的液相色谱-串联质谱法, 是对各类抗生素残留检测方法的补充与完善, 可为食品安全监管提供有针对性的技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

畜禽肉及内脏(本地市售)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Meker 公司); 甲酸(色谱纯, 上海梯希爱化成工业发展有限公司); 乙酸铵(色谱纯, 美国 Supelco 公司); 甲酸铵(色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 新生霉素钠(纯度 88.5%)、莫匹罗星(纯度 96%)、丰加霉素(纯度 97.5%)、茴香霉素(纯度 98.9%)(美国 Panphy 公司); Captiva EMR-Lipid (600 mg/6 mL, 美国 Agilent 公司); Oasis Prime HLB (200 mg/6 mL)、Atlantis®UPLC®T₃ (2.1 mm×150 mm, 3 μm)(美国 Waters 公司); 有机系滤膜 (0.22 μm, 美国 Pall 公司)。

1.2 仪器与设备

LCMS-8045 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(日本 Shimadzu 公司); MS204TS/02 电子分析天平(0.1 mg, 瑞士 Mettler Toledo 公司); CPA225D 电子分析天平(0.01 mg, 德国 Sartorius 公司); CNW24 管固相萃取真空装置(上海安谱科学仪器有限公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司); H-2100R 高速冷冻离心机(湖南湘潭湘仪仪器有限公司); MIX-25P 迷你混合仪(杭州米欧仪器有限公司); YS1030 超声波清洗机(深圳云奕科技股份有限公司); N-EVAP-112 氮吹仪(美国 Organomation 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 溶液配制

分别精密称取新生霉素钠、莫匹罗星、丰加霉素、茴香霉素标准物质 11.70、10.42、10.26、10.11 mg(精确至 0.1 mg), 用甲醇溶解, 超声 10 min 后冷却到室温, 用甲醇定容至 100 mL 容量瓶, 摇匀后得到质量浓度为 100 μg/mL 标准物质储备液(其中, 新生霉素钠以新生霉素计)。分别移取各标准物质储备液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中, 加入乙腈定容至刻度后摇匀, 得到质量浓度为 1.0 μg/mL 混合标准物质中间液。再依次量取混合标准物质中间液 25、50、100、250、500、1000 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用空白基质提取

液稀释并定容至刻度, 得到混合标准工作曲线, 质量浓度依次为 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 ng/mL。

1.3.2 样品前处理

称取混合均匀样品 5.0 g(精确至 0.01g), 置于 50 mL 透明塑料离心管中, 加入 9 mL 2%甲酸乙腈溶液、1 mL 水、1 个均质子, 涡旋振荡 5 min 使得样品充分分散后超声提取 10 min, 5000 r/min 离心 5 min, 取离心后的上层有机溶液 5 mL, 待净化。将 5 mL 上清液全部加载至 Captiva EMR-Lipid (600 mg/6 mL) 柱子, 并用 1.0 mL 2%甲酸乙腈冲洗固相萃取小柱, 收集全部流出液于 40°C 氮吹至近干, 用 90%乙腈水定容至 1 mL, 定容液经 0.22 μm 有机微孔滤膜过滤后上机测定。

1.3.3 仪器条件

色谱柱: Atlantis®UPLC®T₃ (150 mm×2.1 mm, 3 μm)。流动相: A: 含 0.1%甲酸的 10 mmol/L 甲酸铵水溶液, B: 乙腈, 采用二元梯度洗脱, 具体程序见表 1。流速: 0.3 mL/min, 柱温: 35°C, 进样量: 5 μL。质谱参数: 离子源: 电喷雾离子源正模式(electro spray ionization, ESI⁺); 离子源温度: 525°C; 电喷雾电压: 3000 V; 干燥气流速: 10.0 L/min; 雾化气流速: 3.0 L/min; 加热气流速: 10.0 L/min。

表 1 流动相二元梯度洗脱程序
Table 1 Binary gradient elution procedure for mobile phase

时间/min	A/%	B/%
0.0	90	10
1.0	90	10
2.0	40	60
8.0	40	60
9.0	10	90
10.0	10	90
10.1	90	10
12.0	90	10

1.4 数据处理

利用液相色谱-串联质谱仪工作站(LabSolutions 5.97)和 WPS 2024 软件对实验数据进行处理。

2 结果与分析

2.1 质谱参数选择

2.1.1 新生霉素

新生霉素 CAS 号为 303-81-1, 分子式为 C₃₁H₃₆N₂O₁₁, 分子量为 612.624, 由苯甲酸衍生物、香豆素和诺维糖 3 个结构单元构成, 应用液相色谱-串联质谱仪对该化合物的电喷雾电离多级质谱裂解方式进行研究, 发现一级质谱中特征信号为 [M+H]⁺ m/z 613.2, 二级质谱中特征信号为 [M+H]⁺ m/z 218.0 和 m/z 396.1, 即在诺维糖和香豆素两个结构单元之间产生断裂, 确定定量离子对为 613.2/218.0, 定性离子对为 613.2/396.1, 见图 1。

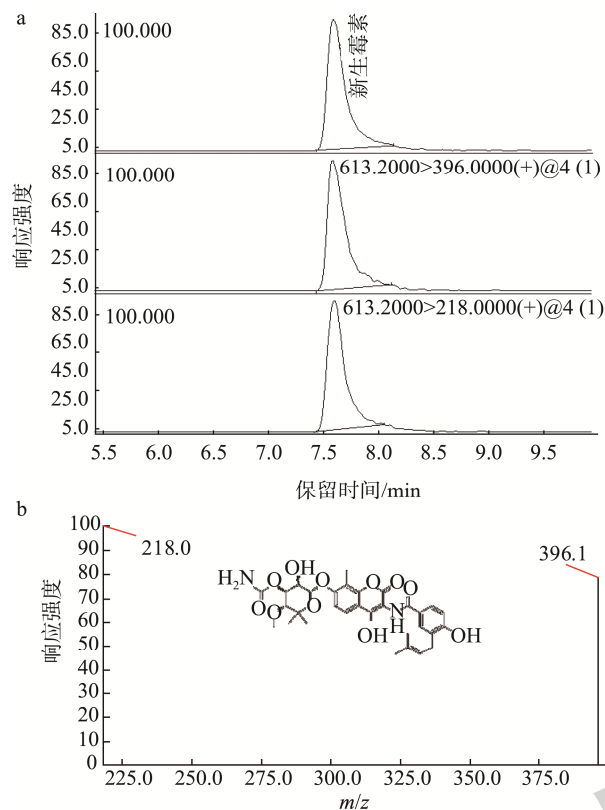


图1 新生霉素的离子流图和相对离子丰度图

Fig.1 Ion flow and relative ion abundance diagram of novobiocin

2.1.2 莫匹罗星

莫匹罗星 CAS 号为 12650-69-0, 分子式为 $C_{26}H_{44}O_9$, 分子量为 500.622, 应用液相色谱-串联质谱仪对该化合物的电喷雾电离多级质谱裂解方式进行研究, 发现一级质谱中特征信号为 $[M+H]^+$ m/z 501.3, 二级质谱中特征信号为 $[M+H]^+$ m/z 326.7、 m/z 291.0 和 m/z 308.9, 确定定量离子对为 501.3/326.7, 定性离子对为 501.3/291.0, 见图 2。

2.1.3 丰加霉素

丰加霉素 CAS 号为 606-58-6, 分子式为 $C_{12}H_{13}N_5O_4$, 分子量为 291.263, 应用液相色谱-串联质谱仪对该化合物的电喷雾电离多级质谱裂解方式进行研究, 发现一级质谱中特征信号为 $[M+H]^+$ m/z 292.1, 二级质谱中特征信号为 $[M+H]^+$ m/z 160.0 和 m/z 143.1, 确定定量离子对为 292.1/160.0, 定性离子对为 292.1/143.1, 见图 3。

2.1.4 茴香霉素

茴香霉素 CAS 号为 22862-76-6, 分子式为 $C_{14}H_{19}NO_4$, 分子量为 265.305, 应用液相色谱-串联质谱仪对该化合物的电喷雾电离多级质谱裂解方式进行研究, 发现一级质谱中特征信号为 $[M+H]^+$ m/z 266.2, 二级质谱中特征信号为 $[M+H]^+$ m/z 121.0、 m/z 206.0 和 m/z 188.1, 确定定量离子对为 266.2/121.0, 定性离子对为 266.2/206.0, 见图 4。

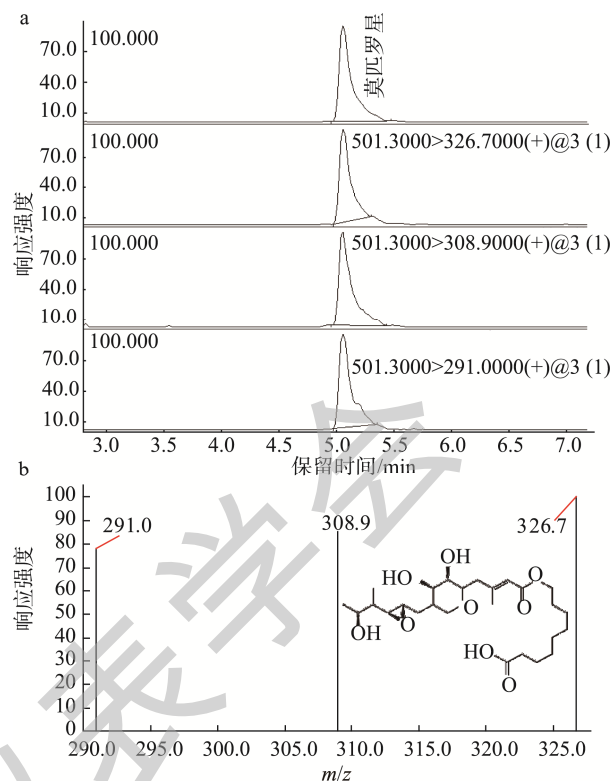


图2 莫匹罗星的离子流图和相对离子丰度图

Fig.2 Ion flow and relative ion abundance diagram of mupirocin

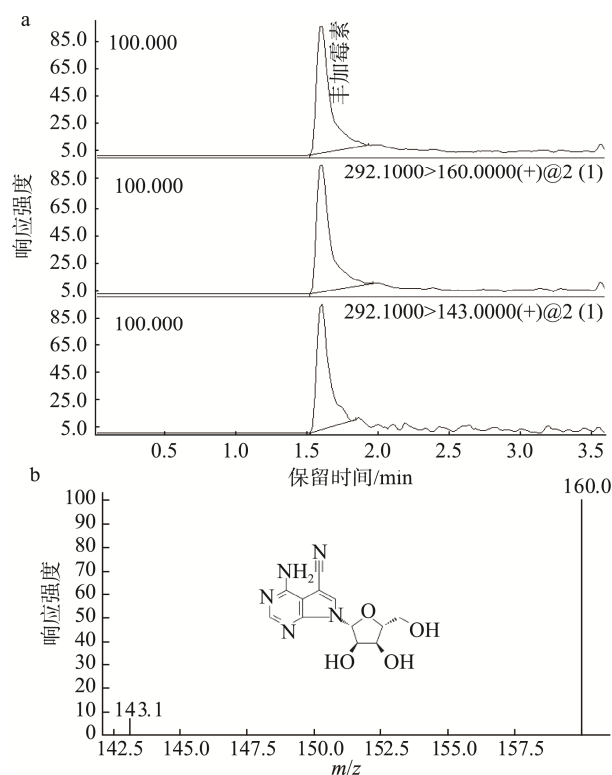


图3 丰加霉素的离子流图和相对离子丰度图

Fig.3 Ion flow and relative ion abundance diagram of toyocamycin

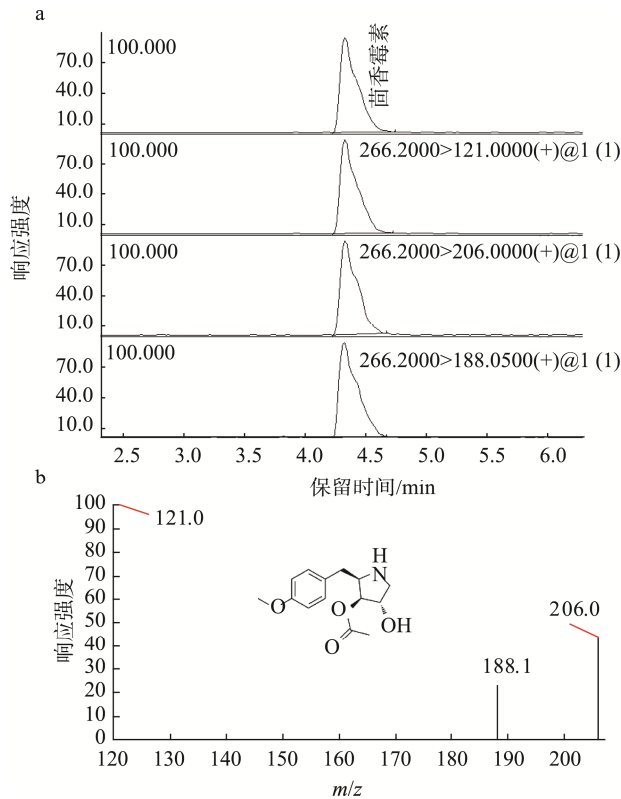


图4 茴香霉素的离子流图和相对离子丰度图

Fig.4 Ion flow and relative ion abundance diagram of anisomycin

2.2 液相色谱条件优化

在流动相系统选择中,选择3组流动相:0.1%甲酸溶液-乙腈、含0.1%甲酸的10 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈、含0.1%甲酸的20 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈,采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式,分别对质量浓度

为100 ng/mL混合标准物质工作液进行实验,表2结果显示,0.1%甲酸的10 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈流动相的目标物平均响应值最高、其次是0.1%甲酸的20 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈,最低是0.1%甲酸溶液-乙腈。综上,4种抗生素药物在液相色谱梯度洗脱程序下得到有效分离,并采用MRM正模式进行定性定量测定,结果显示色谱峰形良好,灵敏度高,利于分辨;同时对空白溶剂与标物溶液交替进样,无交叉干扰。

2.3 样品前处理条件优化

2.3.1 提取溶液的优化

本研究探究了乙腈、80%乙腈和2%甲酸乙腈的提取效率。表3结果显示,2%甲酸乙腈的平均回收率为94.9%,高于乙腈(平均回收率为90.7%)及80%乙腈提取溶液(平均回收率为88.5%),且实验中发现样品在2%甲酸乙腈中较易散开,离心后无明显浑浊现象,从而提高了结果准确性。因此选择2%甲酸乙腈作为提取溶液。

2.3.2 固相萃取柱的优化

本研究选用Captiva EMR-Lipid和Oasis PRiME HLB两种固相萃取小柱,对两者的净化效果进行比较,以4种抗生素加标回收率的高低作为评价参数。Captiva EMR-Lipid基于体积排阻和疏水相互作用机制,能够高选择性、高效去除脂质,可确保大大减少离子抑制对目标分析物的影响,从而显著改善方法可靠性和稳定性。Oasis PRiME HLB吸附剂可简化固相萃取操作,其利用反相保留特性和水可浸润性,操作流程更简单,无需活化和平衡步骤,可以较少操作步骤获得更洁净的样品。表4结果显示,Captiva EMR-Lipid柱的平均回收率为96.3%,而Oasis PRiME HLB柱的平均回收率为87.2%,因此,选用Captiva EMR-Lipid作为净化柱进行样品净化。

表2 100 ng/mL混合标准物质溶液在3组流动相条件下的响应值

Table 2 Response of 100 ng/mL mixed standard substance solution under 3 mobile phase conditions

流动相种类	新生霉素响应值	莫匹罗星响应值	丰加霉素响应值	茴香霉素响应值	平均值
0.1%甲酸溶液-乙腈	269642	102680	214330	861248	361975
含0.1%甲酸的10 mmol/L 甲酸铵溶液-乙腈	370364	197199	608809	1280200	614143
含0.1%甲酸的20 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈	273613	131609	302681	1459363	541817

表3 不同提取溶液的平均回收率

Table 3 Average recoveries of different extraction solutions

抗生素种类	乙腈		80%乙腈		2%甲酸乙腈	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
新生霉素	85.1	1.8	81.5	0.1	89.9	1.4
莫匹罗星	94.0	1.7	91.1	0.2	101.0	2.9
丰加霉素	85.8	2.3	84.6	2.2	87.5	0.7
茴香霉素	98.0	1.1	97.0	0.4	101.2	0.8
平均值	90.7	6.6	88.5	7.3	94.9	7.1

注: 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。

2.3.3 洗脱溶液的优化

本研究对比了 3 种方式, 包括直接收集流出液(未洗脱)、1 mL 乙腈洗脱、1 mL 2%甲酸乙腈洗脱。表 5 结果显示, 1 mL 2%甲酸乙腈洗脱方式的回收率最高(为 93.9%), 1 mL 乙腈冲洗柱子的回收率其次(为 87.2%), 直接收集流出液(未洗脱)的回收率相对最低(为 84.2%), 因此选用 1 mL 2%甲酸乙腈作为洗脱液。

2.3.4 定容溶剂的优化

样品经过提取、净化和浓缩后, 最后选择合适的定容溶剂对分析测试结果有重要影响, 因为在色谱分析中, 使用不恰当的定容溶剂, 可能会出现溶剂效应, 比如产生延展的色谱峰, 分叉的溶剂峰, 降低目标物的响应值。本研究选择了 1 mL 95%乙腈、1 mL 90%乙腈、1 mL 80%乙腈共 3 种定容溶剂对加标回收率的影响。3 种定容溶剂均未出现溶剂效应, 表 6 结果显示 1 mL 90%乙腈的回

收率最高(92.2%), 1 mL 95%乙腈和 1 mL 80%乙腈的回收率分别为 88.6%和 86.5%, 因此选用 1 mL 90%乙腈为定容溶剂。

2.4 方法学验证

2.4.1 基质效应

本研究的 ME ($ME=b/a$), 通过在空白样品提取液以及空白溶剂中分别加入相同浓度的标准物质, 测定其响应值, 并通过比值来评价, a 代表空白溶剂中各抗生素的响应值, b 表示空白样品提取液中各抗生素的响应值。ME<1 表示该样品基质对各抗生素起抑制效果; ME>1 表示该样品基质对各抗生素起增强效果。如表 7 结果显示, 4 种抗生素的 ME 均小于 1, 表明样品对各抗生素为抑制作用, 因此, 为有效降低 ME 对实验结果的不利影响, 采取基质加标曲线来校正回收率。

表 4 不同固相萃取柱的平均回收率
Table 4 Average recoveries of different solid phase extraction columns

抗生素种类	Captiva EMR-Lipid		Oasis PRiME HLB	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
新生霉素	95.6	0.5	87.1	2.6
莫匹罗星	97.2	3.9	93.1	0.8
丰加霉素	88.0	0.6	77.7	0.8
茴香霉素	104.6	2.4	91.0	0.1
平均值	96.3	6.8	87.2	7.3

表 5 不同洗脱溶液的平均回收率
Table 5 Average recoveries of different elution solutions

抗生素种类	未洗脱		乙腈		2%甲酸乙腈	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
新生霉素	82.9	2.5	77.7	4.9	95.6	0.5
莫匹罗星	89.4	0.9	92.2	0.8	96.2	0.5
丰加霉素	78.9	2.4	81.7	2.4	89.0	2.7
茴香霉素	85.8	0.1	97.1	0.4	94.7	2.4
平均值	84.2	5.1	87.2	9.7	93.9	3.6

表 6 不同定容溶剂的平均回收率
Table 6 Average recoveries of different fixed volume solvent

抗生素种类	95%乙腈		90%乙腈		80%乙腈	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
新生霉素	92.0	0.3	99.2	2.9	81.3	1.0
莫匹罗星	88.0	2.0	95.5	0.3	87.9	1.7
丰加霉素	82.6	5.0	87.0	1.3	86.0	0.8
茴香霉素	91.9	1.9	87.2	2.0	90.8	1.0
平均值	88.6	5.0	92.2	6.3	86.5	4.4

表 7 4 种抗生素的基质效应
Table 7 Matrix effect of 4 kinds of antibiotics

基质种类	新生霉素 ME 值	莫匹罗星 ME 值	丰加霉素 ME 值	茴香霉素 ME 值	平均值
猪肉	0.75	0.87	0.87	0.78	0.82
猪肝	0.84	0.82	0.86	0.82	0.83

2.4.2 标准曲线、检出限、定量限

本研究采用空白样品提取液配制标准溶液,以较少基质干扰对结果准确度带来的不利影响。仪器数据处理工作站绘制标准工作曲线,其中,横坐标为 4 种抗生素定量离子对的质量浓度(X , ng/mL),纵坐标为色谱质谱峰的峰面积(Y)。分别量取标准物质中间液(1.0 $\mu\text{g/mL}$) 25、50、100、250、500、1000 μL ,用空白基质提取液稀释并定容至 10 mL,制得基质混合标准曲线,质量浓度依次为 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0 ng/mL。检出限(limit of detection, LOD)为 3 倍信噪比($S/N=3$)对应的空白样品加标浓度,同理,定量限(limit of quantitation, LOQ)为 10 倍信噪比($S/N=10$)。实验结果见表 8,4 种抗生素在 2.5~100.0 ng/mL 范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均大于 0.9950,方法 LOD 为 1.0 $\mu\text{g/kg}$,

LOQ 为 3.0 $\mu\text{g/kg}$ 。上述结果表明,本研究建立的方法对 4 种抗生素均具有较高的响应值和灵敏度,可用于畜禽肉及内脏中 4 种抗生素的高通量检测。

2.4.3 回收率和相对标准偏差

本研究选取了猪肉、牛肉、羊肉、鸡肉、猪肝、鸡肝共 6 种空白样品,在 3.0、6.0、30.0 $\mu\text{g/kg}$ 加标浓度下测定 4 种抗生素的加标回收率,平行测定($n=6$),基质匹配外标法进行定量,通过软件计算,得到平均回收率与 RSDs 见表 9。结果显示,当加标回收实验的添加量为 3.0~30.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,4 种抗生素的平均加标回收率为 76.3%~115.1%,RSDs 均小于 8% ($n=6$)。上述结果表明,该方法具有较高的准确度,可以满足畜禽肉及内脏中 4 种抗生素的定量分析。

表 8 4 种抗生素的线性回归方程、相关系数
Table 8 Linear regression equations, correlation coefficients of 4 kinds of antibiotics

基质种类	化合物	线性回归方程	相关系数
猪肉	新生霉素	$Y=6548.07X-2358.57$	0.9974
	莫匹罗星	$Y=3206.94X-890.331$	0.9965
	丰加霉素	$Y=9160.78X-7820.16$	0.9987
	茴香霉素	$Y=8687.17X+627.121$	0.9961
牛肉	新生霉素	$Y=5980.18X+5200.53$	0.9994
	莫匹罗星	$Y=3389.59X-3849.97$	0.9979
	丰加霉素	$Y=7216.40X-4062.52$	0.9994
	茴香霉素	$Y=7608.62X-795.474$	0.9993
羊肉	新生霉素	$Y=7104.99X-11593.2$	0.9965
	莫匹罗星	$Y=3537.61X-4959.05$	0.9966
	丰加霉素	$Y=4636.19X-1735.62$	0.9998
	茴香霉素	$Y=6911.99X-4796.21$	0.9993
鸡肉	新生霉素	$Y=8005.52X-8042.90$	0.9995
	莫匹罗星	$Y=3620.74X-2773.52$	0.9986
	丰加霉素	$Y=5715.34X-4710.76$	0.9998
	茴香霉素	$Y=7115.46X-3165.26$	0.9998
猪肝	新生霉素	$Y=8009.28X-7126.68$	0.9988
	莫匹罗星	$Y=3750.56X-2106.44$	0.9992
	丰加霉素	$Y=6698.53X-5661.32$	0.9994
	茴香霉素	$Y=7493.55X+5660.72$	0.9969
鸡肝	新生霉素	$Y=8499.72X-4683.18$	0.9999
	莫匹罗星	$Y=3730.01X-1700.21$	0.9997
	丰加霉素	$Y=7115.48X-10354.8$	0.9993
	茴香霉素	$Y=7812.24X-2887.55$	0.9962

2.4.4 日内精密度和日间精密度的

使用同一台仪器, 在 1 d 内的不同时间段处理 3 批次样品(低、中、高浓度), 每个浓度样品 5 个进行日内精密度实验; 连续 3 d, 每天处理 1 批次样本(低、中、高浓度), 每个浓度样本 5 个进行日间精密度实验。实验结果见表 10, 4 种组分在猪肉基质中日内 RSDs 和日间 RSDs 均小于 9% ($n=5$)。上述结果表明, 该方

法具有较高的稳定性和可靠性, 可用于 4 种抗生素的风险筛查。

2.5 实际样品测定

在市场上随机采购 20 批猪肉、15 批牛肉、10 批羊肉、15 批鸡胸肉、15 批猪肝、5 批鸡肝, 按照所建立的方法, 对 4 种抗生素进行测试, 结果均未发现阳性样品。

表 9 6 种动物源食品的平均加标回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 9 Average recoveries and RSDs of 6 kinds of animal-derived foods ($n=6$)

样品类型	抗生素种类	加标量 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标量 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		加标量 30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
猪肉	新生霉素	102.3	2.6	108.8	5.4	95.5	5.7
	莫匹罗星	100.5	3.0	83.5	5.2	93.1	2.0
	丰加霉素	76.3	5.3	81.3	2.4	78.8	3.2
	茴香霉素	103.1	3.1	107.1	3.6	93.4	2.4
牛肉	新生霉素	108.9	7.0	101.2	4.9	106.4	3.2
	莫匹罗星	97.6	3.1	92.0	4.1	97.8	3.4
	丰加霉素	95.1	2.8	88.2	3.0	88.5	2.3
	茴香霉素	107.1	2.6	109.8	4.4	98.7	1.5
羊肉	新生霉素	109.1	4.2	108.9	3.9	94.9	5.2
	莫匹罗星	103.6	3.8	95.2	7.5	96.1	1.6
	丰加霉素	97.9	3.6	109.9	2.1	100.7	2.8
	茴香霉素	113.1	3.6	109.1	3.8	101.9	1.0
鸡肉	新生霉素	90.9	5.1	108.7	4.0	104.9	1.3
	莫匹罗星	98.4	2.8	101.0	2.5	96.2	1.4
	丰加霉素	94.0	2.1	103.4	4.6	107.1	3.3
	茴香霉素	107.0	3.8	113.7	2.4	104.6	2.5
猪肝	新生霉素	111.0	5.7	110.9	2.3	97.1	3.3
	莫匹罗星	85.0	5.2	100.5	3.0	90.4	1.2
	丰加霉素	106.9	4.4	109.4	2.5	106.5	2.6
	茴香霉素	99.6	6.3	108.4	1.8	99.5	1.3
鸡肝	新生霉素	105.2	4.0	110.9	2.2	95.8	2.2
	莫匹罗星	96.7	3.1	105.6	1.2	91.5	2.4
	丰加霉素	102.6	2.4	110.3	2.6	102.2	4.9
	茴香霉素	110.4	3.9	115.1	3.5	97.5	2.1

表 10 日内精密度和日间精密度实验($n=5$)
Table 10 Intraday precision and daytime precision experiments ($n=5$)

抗生素种类	低浓度 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		中浓度 6.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$		高浓度 30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	日内 RSDs/%	日间 RSDs/%	日内 RSDs/%	日间 RSDs/%	日内 RSDs/%	日间 RSDs/%
新生霉素	6.1	5.7	5.3	5.7	4.2	4.3
莫匹罗星	4.7	5.3	4.8	4.1	1.9	3.1
丰加霉素	5.2	6.9	5.8	7.6	3.1	6.4
茴香霉素	5.3	5.8	8.4	8.8	7.9	7.9

3 结 论

本研究结合 Captiva EMR-Lipid 净化技术, 建立测定畜禽肉及内脏中 4 种抗生素兽药残留的检测方法。通过优化与分析前处理方法中的提取溶剂、净化条件、ME 等。结果显示, 样品经过 2% 甲酸乙腈溶液提取, 以 Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱净化, 基质匹配外标法定量, 方法在 2.5~100.0 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)均大于 0.9950。该方法的 LOD 为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 为 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在加标量为 3.0~30.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的水平范围内, 加标回收率为 76.3%~115.1%, RSDs 均小于 8% ($n=6$), 在猪肉基质中日内精密度和日间精密度均小于 9% ($n=5$)。本研究建立的检测方法, 样品前处理快速简便, 检测灵敏度高, 适用于市售畜禽肉及内脏中抗生素的风险筛查。

该法相较国内外研究, 在测定乳中新生霉素的基础上, 检测项目从 1 种抗生素扩展为 4 种, 样品基质从生乳扩展到禽肉及内脏, 且采用操作快速简便的 Captiva EMR-Lipid 固相萃取方式对样品净化步骤进行优化, 其中有关新生霉素的方法学实验, 可为 SN 0674—1997 的标准更新提供参考。

参考文献

- CHEN ZY. Hazards and detection techniques of veterinary drug residues in animal-origin food [J]. E3S Web Conf, 2021, 271: 1–9.
- KLIMKO CP, WELKOS SL, SHOE JL, *et al.* Efficacy of treatment with the antibiotic novobiocin against infection with *Bacillus anthracis* or *Burkholderia pseudomallei* [J]. Antibiotics, 2022, 11(12): 1685–1685.
- 刘洋, 吴丽贤, 林燕芳, 等. 新生霉素结构单元合成与抗肿瘤活性[J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(1): 36–38.
LIU Y, WU LX, LIN YF, *et al.* Synthesis the structure unit in novobiocin and study antitumor activity [J]. J Fujian Med Univ, 2008, 42(1): 36–38.
- 梁倩莹, 蔡洁莹, 赵博欣, 等. 新生霉素抑制 TRPV1 表达并改变辣椒素膜间转运的研究[J]. 中国药理学杂志, 2021, 56(24): 1991–1996.
LIANG QY, CAI JY, ZHAO BX, *et al.* Novobiocin affects the intracellular permeability of capsaicin by inhibiting the expression of TRPV1 [J]. China Pharm J, 2021, 56(24): 1991–1996.
- NANI F, IQBAL MK, ZHANG H, *et al.* Clinical efficiency and safety of Hsp90 inhibitor novobiocin in avian tibial dyschondroplasia [J]. J Vet Pharmacol Ther, 2018, 41(6): 902–911.
- 李子烜, 黄吉, 孙震晓. 莫匹罗星剂型改造研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2023, 44(1): 13–18.
LI ZH, HUANG J, SUN ZX. Progress on formulation modification of mupirocin [J]. World Notes Antibiot, 2023, 44(1): 13–18.
- XU J, SONG ZQ, XU XH, *et al.* ToyA, a positive pathway-specific regulator for toyocamycin biosynthesis in *Streptomyces diastatochromogenes* 1628 [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(17): 7071–7084.
- 申屠旭萍, 于冰, 李丹婷, 等. HPLC 法测定发酵液中丰加霉素的研究[J]. 中国计量大学学报, 2013, 24(3): 215–218.
SHENTU XP, YU B, LI DT, *et al.* Identification and quantification of toyocamycin in fermentation broth by HPLC [J]. J China Univ Metrol, 2013, 24(3): 215–218.
- 郑晓青. 茴香霉素生物合成机理的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2017.
ZHENG XQ. Revealling the biosynthetic mechanism of antibiotic anisomycin [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University, 2017.
- 朱雁飞. 茴香霉素对小鼠 T 淋巴细胞活性的调节[J]. 牡丹江医学院学报, 2010, 31(3): 15–17.
ZHU YF. Effects of anisomycin on the reactivity of T lymphocytes in mice [J]. J Mudanjiang Med Univ, 2010, 31(3): 15–17.
- TORSTEN B, TERENCE P, AURORE B, *et al.* Developing a microbiological growth inhibition screening assay for the detection of 27 veterinary drugs from 13 different classes in animal feeding stuffs [J]. Food Addit Contam A, 2013, 30(11): 1870–1887.
- CHARM SE, CHI R. Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk: Collaborative study [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1988, 71(2): 304–316.
- TUMINI M, NAGEL GO, ALTHAUS LR. Microbiological bioassay using *Bacillus pumilus* to detect tetracycline in milk [J]. J Dairy Res, 2015, 82(2): 248–255.
- LUO JP, ZHANG BJ, WANG LH, *et al.* Rapid and sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of neomycin residues in milk [J]. Biomed Environ Sci, 2016, 29(5): 374–378.
- LIN L, XU LG, KUANG H, *et al.* Ultrasensitive and simultaneous detection of 6 nonsteroidal anti-inflammatory drugs by colloidal gold strip sensor [J]. J Dairy Sci, 2021, 104(3): 2529–2538.
- HE T, LIU J, WANG JP. Development of a dihydropteroate synthase-based fluorescence polarization assay for detection of sulfonamides and studying its recognition mechanism [J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(46): 13953–13963.
- PENG YP, HE YW, SHEN YF, *et al.* Fluorescence nanobiosensor for simultaneous detection of multiple veterinary drugs in chicken samples [J]. J Anal Test, 2021, 6(2): 1–12.
- SHENG W, LI SJ, LIU Y, *et al.* Visual and rapid lateral flow immunochromatographic assay for enrofloxacin using dyed polymer microspheres and quantum dots [J]. Microchim Acta, 2017, 184(11): 4313–4321.
- LARA FJ, GARCÍA-CAMPAÑA AM. Improved sensitivity to determine antibiotic residues in chicken meat by in-line solid-phase extraction coupled to capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry [J]. Method Mol Biol, 2022, 2531: 227–241.
- KHATTAB F, RIAD S, REZK M, *et al.* Simultaneous determination of sulphadiazine sodium and trimethoprim in medicated fish feed, fish tissues and in their veterinary pharmaceutical formulation by thin-layer chromatography-densitometry [J]. JPC-J Planar Chromat, 2014, 27(2): 113–119.
- MOATS WA, LESKINEN L. Determination of novobiocin residues in milk, blood, and tissues by liquid chromatography [J]. J-Assoc Off Anal Chem, 1988, 71(4): 776–778.
- LIU SY, TANG YJ, LU Y, *et al.* Qualitative and quantitative determination of decoquinone in chicken tissues by gas chromatography tandem mass spectrometry [J]. Molecules, 2023, 28(9): 1–19.
- 甄建辉, 田浩, 艾连峰, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水体中 8 种典

- 型喹诺酮类抗生素[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(7): 2230–2235.
- ZHEN JH, TIAN H, AI LF, *et al.* Determination of 8 kinds of typical quinolones antibiotics by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in water [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(7): 2230–2235.
- [24] 张敏, 王鸽, 马晓冲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳中 6 种兽药残留[J]. 食品工业科技, 2022, 43(5): 255–261.
- ZHANG M, WANG G, MA XC, *et al.* Determination of 6 kinds of veterinary drug residues in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(5): 255–261.
- [25] THOMPSON TS, NOOT DK, KENDALL JD. Surveillance study of novobiocin and phenylbutazone residues in raw bovine milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam A*, 2010, 27(8): 1104–1111.
- [26] 胡玉芬, 王丽娟, 薛富民. 液相色谱-质谱联用测定不同软膏中的莫匹罗星[J]. 山东科学, 2019, 32(3): 118–122.
- HU YF, WANG LJ, XUE FM. Determination of mupirocin in different ointments by HPLC-MS [J]. *Shandong Sci*, 2019, 32(3): 118–122.
- [27] GALAL MM, ABDULLAH SA, MOHAMED OY, *et al.* Greenness assessment of two chromatographic methods developed for the determination of mupirocin in two binary mixtures along with its impurity [J]. *BMC Chem*, 2023, 17(1): 145–145.
- [28] RI M, TASHIRO E, OIKAWA D, *et al.* Identification of toyocamycin, an agent cytotoxic for multiple myeloma cells, as a potent inhibitor of ER stress-induced XBP1 mRNA splicing [J]. *Blood Cancer J*, 2012, 2(7): e79.
- [29] 张晶, 崔宇琼, 夏焕章. 单组分茴香毒素 C 突变株的获得[J]. 沈阳药科大学学报, 2011, 28(8): 616–620.
- ZHANG J, CUI YQ, XIA HZ. A mutant strain of single component anisomycin C obtained by strain mutagenesis [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2011, 28(8): 616–620.
- [30] TOLIĆ L, GRUJIĆ S, MOJOVIĆ M, *et al.* Determination of anisomycin in tissues and serum by LC-MS/MS: Application to pharmacokinetic and distribution studies in rats [J]. *RSC Adv*, 2016, 6(95): 92479–92489.
- [31] 胡飞杰, 张露, 徐美玲, 等. 新型固相萃取结合超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱分析乳品中 8 种兽药残留[J]. 食品与发酵科技, 2022, 58(2): 124–129.
- HU FJ, ZHANG L, XU ML, *et al.* Analysis of 8 veterinary drug residues in dairy products by a new solid phase extraction column combined with ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ferment*, 2022, 58(2): 124–129.
- [32] 许均图, 陈德斌, 陈燕, 等. Captiva EMR-Lipid 小柱净化-超高效液相色谱串联质谱法快速测定鸡肉中 12 种兽药残留[J]. 现代食品, 2022, 28(23): 151–154.
- XU JT, CHEN DB, CHEN Y, *et al.* Determination of veterinary drug residues in chicken by Captiva EMR-Lipid small column purification-ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Mod Food*, 2022, 28(23): 151–154.
- [33] DELIA C, DAVID M, MIRIAM B, *et al.* Critical assessment of two sample treatment methods for multiresidue determination of veterinary drugs in milk by UHPLC-MS/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2019, 411(7): 1433–1442.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

作者简介



申 雷, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测技术。
E-mail: shenlei_0425@163.com



史长生, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全质量控制。
E-mail: shchsheng@163.com