

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2020.07.008

# 固相萃取净化/高效液相色谱-串联质谱法测定 饲料中7种大环内酯类药物含量

龚兰, 栾枫婷, 温天锐, 陈明, 邓博文, 张泽璟, 魏瑞成\*, 王冉\*

(江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 省部共建国家重点实验室培育基地-江苏省食品  
质量安全重点实验室, 江苏 南京 210014)

**摘要:**建立了添加剂预混合饲料、精料补充饲料、配合饲料和浓缩饲料中7种大环内酯类药物(替米考星、罗红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素)含量的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定方法。饲料样品经1%氨化乙腈提取, Oasis PRiME HLB固相萃取柱净化后, 采用ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)分离, 以0.1%甲酸水-乙腈为流动相梯度洗脱, 电喷雾离子源正离子模式下检测, 外标法定量。结果表明, 替米考星、螺旋霉素和红霉素的线性范围为0.5~50 μg/L( $r^2 > 0.99$ ), 罗红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和阿奇霉素的线性范围为0.25~50 μg/L( $r^2 > 0.99$ ); 7种待测物的检出限(LOD)为1.25~2.5 μg/kg, 定量下限为2.5~5.0 μg/kg, 5、10、50 μg/kg 3个加标浓度下的平均回收率为61.4%~103%, 批内和批间相对标准偏差为0.43%~15%。该方法简便、快速、灵敏, 基质干扰小, 适用于各类饲料中大环内酯类药物的常规监测和定量测定。

**关键词:** 大环内酯类药物; 饲料; 高效液相色谱-串联质谱; 固相萃取

中图分类号: O657.63; S816.17 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2020)07-0874-07

## Analysis of Macrolide Antibiotics in Feeds by High Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry Based on Solid Phase Extraction

GONG Lan, LUAN Feng-ting, WEN Tian-rui, CHEN Ming, DENG Bo-wen,  
ZHANG Ze-jing, WEI Rui-cheng\*, WANG Ran\*

(Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province – State Key Laboratory Breeding Base, Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** A high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC – MS/MS) was developed for the simultaneous determination of seven macrolide antibiotics, i. e. tilmicosin, roxithromycin, spiramycin, tylosin, erythromycin, clarithromycin and azithromycin in additive premix, concentrate supplement, complete feed and concentrated feed. The samples were extracted with 1% ammoniated acetonitrile solution, followed by Oasis PRiME HLB solid phase extraction for further purification. The analytes were separated on an ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) by gradient elution using 0.1% formic acid solution and acetonitrile as mobile phases, then analyzed by MS/MS with electrospray ionization in positive mode, and quantified by external standard method. Results showed that there were good linear relationships for 3 target analytes, i. e. tilmicosin, spiramycin and erythromycin in the concentration range of 0.5 – 50 μg/L ( $r^2 > 0.99$ ) and for the other 4 target analytes in the range of 0.25 – 50 μg/L ( $r^2 > 0.99$ ). The limits of detection and the limits of quantitation were in the ranges of 1.25 – 2.5 μg/kg and 2.5 – 5.0 μg/kg, respectively. At three spiked levels of 5, 10 and 50 μg/kg, the average recoveries for target compounds ranged from 61.4% to 103% with relative standard deviations of 0.43% – 15%. The developed method is simple, rapid, sensitive and low matrix interference, and it is suitable for the routine supervision and quantita-

收稿日期: 2020-03-04; 修回日期: 2020-04-26

基金项目: 农业部农业行业标准项目资助(028042911625)

\* 通讯作者: 魏瑞成, 博士, 研究员, 研究方向: 饲料质量安全, E-mail: weiruicheng@126.com  
王冉, 博士, 研究员, 研究方向: 饲料质量安全, E-mail: ranwang@jaas.ac.cn

tive detection of macrolide antibiotics in different feeds.

**Key words:** macrolide antibiotics; feed; high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; solid phase extraction

大环内酯类药物(MALs)是由链霉菌产生的弱碱性抗生素,对革兰氏阳性菌和支原体具有良好的抗菌活性,临床上广泛用于治疗畜禽动物敏感菌引起的呼吸道、消化道和泌尿生殖系统感染<sup>[1-3]</sup>。MALs在低剂量下具有良好的促生长作用,可缩短饲养周期、提高饲料回报率,其中泰乐菌素、替米考星、吉他霉素等已成为畜禽专用抗生素<sup>[2]</sup>。近年来,作为饲料添加剂的MALs成为我国乃至世界范围内需求量和销售速度增长最快的抗生素之一<sup>[4]</sup>。但长期使用这类抗生素不仅在动物体内造成残留,还会随粪便排出体外进而污染环境<sup>[5]</sup>,导致微生物菌群的失调和革兰氏阳性菌耐药性的增加,对动物及人类健康产生危害<sup>[6-7]</sup>。考虑到MALs抗药性在动物之间以及动物和人类间的传递性,欧盟委员会规定所有成员国禁止使用泰乐菌素、螺旋霉素、杆菌肽等抗生素饲料添加剂,规定在猪的肝、肾,家禽的肌肉、皮、脂肪、肝及肾中均不得检出泰乐菌素<sup>[8]</sup>。我国最新发布的GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定替米考星在动物组织和奶中的最大残留限量(MRL)为50~1 500 μg/kg,泰乐菌素在动物组织、奶和蛋中的MRL为50~300 μg/kg<sup>[9]</sup>。我国相继出台了《遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020年)》(国卫医发[2016]43号,简称行动计划)和药物饲料添加剂推出计划(中华人民共和国农业农村部公告第194号)等政策,规定自2020年7月1日起,饲料生产企业停止生产含有促生长类药物饲料添加剂的商品饲料<sup>[10-11]</sup>。但一些兽药饲料生产厂家和养殖户为了提高经济效益,违禁在饲料中添加此类药物。

目前,MALs的检测方法主要包括微生物法、毛细管电泳法、紫外分光光度法、液相色谱法(LC)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等<sup>[1,12-14]</sup>。其中,微生物法、毛细管电泳法、紫外分光光度法由于具有前处理复杂、灵敏度低、准确度低、检测种类受限等缺点,鲜有报道<sup>[12]</sup>。饲料检测的常用方法为电化学法<sup>[14]</sup>、LC法<sup>[6]</sup>、LC-MS/MS法<sup>[6]</sup>,近年来LC-MS/MS法因灵敏度高、检出限低、具有确证性等特点被广泛用于饲料中添加剂的测定<sup>[6]</sup>。目前采用LC-MS/MS法测定MALs的研究主要针对畜禽肉制品、水产品、牛奶、蜂蜜等动物源性食品,而以饲料为分析对象的相关研究较少<sup>[15-18]</sup>,其主要困难是源于饲料基质的复杂性和多样性,以及待测化合物的含量低<sup>[18]</sup>。我国目前尚未制定测定饲料中MALs的标准方法,因此亟待建立饲料中该类抗生素的测定方法。

本文采用固相萃取(SPE)净化,高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中替米考星、罗红霉素、螺旋霉素、泰乐菌素、红霉素、克拉霉素和阿奇霉素7种MALs的残留量。该方法准确、实用、杂质干扰小、基质效应低,能够检测多种饲料(添加剂预混合饲料、精料补充饲料、配合饲料、浓缩饲料)中目标化合物的含量,提高了检测范围和灵敏度,可为我国饲料质量安全检测和监管提供有力的技术支持。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

AB 6500 高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪(美国 SCIEX 公司),电子天平(感量 0.1 mg,瑞士 Mettler-Toledo 公司);高速冷冻离心机(美国 Eppendorf 公司);旋涡混合器(德国 IKA 公司);超声清洗仪(昆山超声仪器有限公司);N-EVAP-24 位氮吹浓缩装置(美国 Organomation 公司);Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL)、20 位固相萃取装置(美国 Waters 公司),0.22 μm 滤膜(美国 Agilent 公司);赛多利斯超纯水系统(德国 Sartorius 公司)。

标准物质:替米考星(TILM)、罗红霉素(ROM)、螺旋霉素(SPI)、泰乐菌素(TYL)、红霉素(ERM)、克拉霉素(CLA)、阿奇霉素(AZI)(纯度均≥95%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。

甲醇、乙腈(色谱级, Honeywell 公司);甲酸(色谱级, Sigma-Aldrich 公司);去离子水(屈臣氏公司);氨水、磷酸二氢钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

样品:添加剂预混合饲料、精料补充饲料、配合饲料、浓缩饲料(饲料企业馈赠)。

## 1.2 标准溶液配制

标准储备液(1.0 mg/mL): 分别准确称取适量的标准品, 用甲醇溶解并定容, 配成 1.0 mg/mL 的标准储备液, 于 -18 °C 下保存, 有效期 3 个月。

混合标准中间液(10 µg/mL): 分别准确移取标准储备液各 1.0 mL, 置于 100 mL 容量瓶中, 用水 - 甲醇(体积比 9 : 1) 稀释至刻度, 混匀。4 °C 下避光保存, 有效期 1 周。

混合标准工作液: 准确吸取混合标准中间液(10 µg/mL) 适量, 用水 - 甲醇(9 : 1) 稀释成质量浓度分别为 0.25、0.5、1、2、5、10、50 µg/L 的系列混合标准工作液, 现用现配。

## 1.3 样品前处理

准确称取 2.00 g 饲料样品(精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 1% 氨化乙腈, 超声 20 min, 涡旋振荡 5 min, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一 50 mL 离心管中; 下层残渣中加入 10 mL 1% 氨化乙腈, 重复提取 1 次。合并 2 次上清液, 量取 1.0~2.0 mL 上清液于另一 10 mL 离心管中, 40 °C 氮吹至近干, 加入 5 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 9.0) 溶解残渣, 待净化。

Oasis PRiME HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 9.0) 活化, 上清样液全部过柱后, 用 5 mL 水淋洗、抽干, 6 mL 5% 氨化甲醇洗脱并收集洗脱液于 10 mL 离心管中, 45 °C 下氮吹至近干, 以 1.0 mL 水 - 甲醇(9 : 1) 复溶, 涡旋 30 s 后过 0.22 µm 滤膜于样品瓶中, 上机测定。

## 1.4 仪器条件

色谱条件: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 µm, 美国 Waters 公司); 柱温为 40 °C, 流速为 0.3 mL/min; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为乙腈; 进样量为 3 µL。洗脱梯度: 0~1 min, 10% B; 1~2 min, 10%~20% B; 2~5 min, 20%~50% B; 5~6 min, 50%~90% B; 6~7 min, 90% B; 7.01~10 min, 10% B。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 气帘气(CUR) 为 45 V, 碰撞气(CAD) 为 8 V, 离子源电压(IS) 为 5 500 V, 离子源温度(TEM) 为 500 °C, 雾化气(GS1) 压力为 344.8 kPa, 辅助气(GS2) 压力为 379.2 kPa, 扫描方式: 多反应监测模式(MRM), 母离子、子离子、去簇电压(DP) 和碰撞能量(CE) 见表 1。

表 1 7 种 MALs 的 MRM 质谱参数  
Table 1 MS parameters in multiple reaction monitoring(MRM) mode for 7 MALs

| Analyte              | Abbreviation | Parent ion<br>( <i>m/z</i> ) | Product ion<br>( <i>m/z</i> ) | Declustering<br>potential(V) | Collision<br>energy(V) |
|----------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------|
| Tilmicosin(替米考星)     | TILM         | 869.5                        | 696.3*, 174.3                 | 38, 38                       | 58, 65                 |
| Roxithromycin(罗红霉素)  | ROM          | 837.4                        | 679.4*, 158.2                 | 74, 74                       | 30, 43                 |
| Spiramycin(螺旋霉素)     | SPI          | 843.6                        | 174.2*, 540.5                 | 60, 60                       | 41, 43                 |
| Tylosin(泰乐菌素)        | TYL          | 916.5                        | 174.1*, 772.3                 | 87, 87                       | 49, 40                 |
| Erythromycin(红霉素)    | ERM          | 734.3                        | 576.3*, 158.2                 | 76, 76                       | 27, 36                 |
| Clarithromycin(克拉霉素) | CLA          | 748.5                        | 158.0*, 590.4                 | 50, 50                       | 36, 27                 |
| Azithromycin(阿奇霉素)   | AZI          | 749.5                        | 591.3*, 158.0                 | 60, 60                       | 28, 37                 |

\* quantitative ion

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

根据大环内酯类药物呈弱碱性和脂溶性的特性<sup>[16]</sup>, 本实验选取甲醇、乙腈、1% 氨化甲醇、3% 氨化甲醇、1% 氨化乙腈、3% 氨化乙腈、1% 甲酸甲醇、3% 甲酸甲醇、1% 甲酸乙腈、3% 甲酸乙腈作为提取溶剂, 考察其对大环内酯类药物回收率的影响。

结果表明, 红霉素、泰乐菌素和螺旋霉素在不同浓度的酸化溶液中回收率低于 70%, 这是由于大环内酯类药物在酸性甲醇和乙腈溶液中呈电离状态, 且不稳定所致<sup>[2]</sup>; 根据大环内酯类药物的 pKa 值, 弱碱性环境更有利于药物提取, 因此以 1% 氨化有机溶液作为提取溶剂时, 提取效率提高至 70% 以上,

且1% 氯化甲醇和1% 氯化乙腈的萃取效率高于3% 的氯化有机溶液。进一步对比了1% 氯化甲醇和1% 氯化乙腈对大环内酯类药物的提取回收率, 发现1% 氯化乙腈比1% 氯化甲醇更利于沉淀饲料中的蛋白, 7种药物的回收率为80.0%~93.8%, 且明显减少其他杂质的干扰<sup>[19]</sup>, 所以选定1% 氯化乙腈作为提取溶剂。

## 2.2 净化条件的优化

**2.2.1 净化方法的选择** 饲料的常用净化方法有液液萃取法和固相萃取法, 部分文献采用正己烷液液萃取法进行净化<sup>[13]</sup>, 但只能去除部分脂类, 对饲料中色素、其他脂类和小肽等杂质的去除效果较差, 本实验采用正己烷直接净化后质谱基线抬高, 仪器检测灵敏度降低。因此, 实验比较了HLB(200 mg/6 mL)、MCX(150 mg/6 mL)和C<sub>18</sub>(200 mg/3 mL)3种固相萃取净化柱的回收率。结果显示, 采用HLB柱净化后7种药物的回收率为60%~120%, C<sub>18</sub>柱的回收率为30%~108%, 而MCX柱的回收率均低于50%, 故实验选用HLB柱作为固相萃取净化柱。

进一步优化了HLB柱规格, 考察了HLB(200 mg/6 mL)、Oasis PRiME HLB(200 mg/6 mL)和HLB(60 mg/3 mL)的回收率, 结果表明TILM和SPI经HLB(60 mg/3 mL)净化后的回收率低于70%, 可能是由于该柱的填料量较少, 易造成其他杂质和目标物产生竞争性相互作用, 影响固相萃取柱的保留和洗脱; HLB(200 mg/6 mL)和Oasis PRiME HLB(200 mg/6 mL)对7种目标物的回收率均高于70%, 其中后者的回收率相对较高, 且可去除更多的脂类等杂质, 因此最终选择Oasis PRiME HLB(200 mg/6 mL)作为净化柱。

**2.2.2 pH值的影响** 在上样过程中, 目标物的离子化程度影响其在SPE的吸附效率, 实验发现, pH≤4和pH≥10的情况均不利于药物在固相萃取柱上的保留。比较了不同pH值(5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)的0.1 mol/L磷酸缓冲液对7种目标物回收率的影响(见图1), 结果显示, pH 9.0时7种目标物的回收率最佳(大于80%)。这是由于弱碱性条件下大环内酯类药物以分子状态存在, 易保留在固相萃取柱上。因此实验选择磷酸缓冲溶液的pH值为9.0。

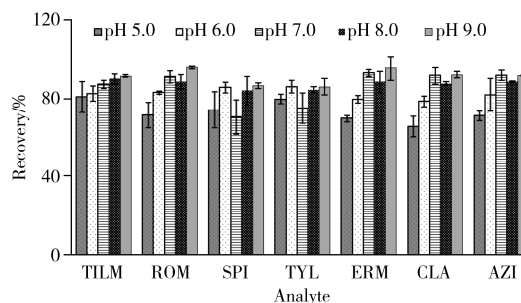


图1 不同pH值对固相萃取效果的影响(加标10 µg/kg)  
Fig 1 Effect of pH value on SPE efficiencies (spiked 10 µg/kg)

**2.2.3 洗脱条件的优化** HLB固相萃取柱的填料为亲脂性二乙烯苯和亲水性N-乙烯基吡咯烷酮两种单体按一定比例聚合而成的大孔共聚物, 能够保留多种极性差异较大的化合物<sup>[20]</sup>。实验考察了1% 甲酸甲醇、甲醇、3% 氯化甲醇和5% 氯化甲醇4种洗脱液的效果, 结果表明1% 甲酸甲醇和甲醇只能洗脱部分大环内酯类药物, 7种药物的回收率低于60%; 5% 氯化甲醇的洗脱能力最强, 7种药物的回收率均大于80%, 因此实验选择5% 氯化甲醇作为洗脱液。

## 2.3 质谱条件的优化

在ESI<sup>+</sup>扫描模式下, 分别对1 µg/mL的7种药物标准溶液进行母离子全扫描, 确定母离子的去簇电压, 对其子离子进行扫描, 选择丰度较高、干扰较小的两个子离子为定性离子, 丰度最高的离子作为定量离子, 并优化其碰撞能量。实验发现TILM、ROM、TYL、ERM、CLA和AZI均能形成[M+H]<sup>+</sup>的母离子, SPI除了形成[M+H]<sup>+</sup>的母离子m/z 843.6, 还形成m/z 422.6的母离子碎片, 经检测发现m/z 843.6受杂质干扰小且响应高, 因此选择m/z 843.6作为SPI的母离子。优化的质谱条件如“1.4”所示。

## 2.4 色谱条件的优化

大环内酯类药物属于极性化合物, 实验采用C<sub>18</sub>反相色谱柱进行分离。考察了分别以乙腈-0.1% 甲酸水、甲醇-0.1% 甲酸水、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵和甲醇-5 mmol/L 乙酸铵作为流动相时大环内酯类药物的分离情况, 结果表明: 0.1% 甲酸水作为水相比5 mmol/L 乙酸铵溶液更能明显改善目标物的峰形, 有助于碱性物质的分离, 并使目标化合物的保留时间提前<sup>[21]</sup>。进一步以0.1% 甲酸水作为水相, 发现当甲醇为有机相时7个目标物的峰形较差, 而乙腈能明显提高SPI和TILM的响应值, 峰形较

好,且无拖尾现象。采用梯度洗脱,可实现饲料中杂质与目标分析物的良好分离,同时缩短分离分析时间<sup>[22]</sup>。因此,本实验以 0.1% 甲酸水和乙腈为流动相进行梯度洗脱,保证良好的峰形和分离度(见图 2),这与文献研究结果一致<sup>[6,23]</sup>。

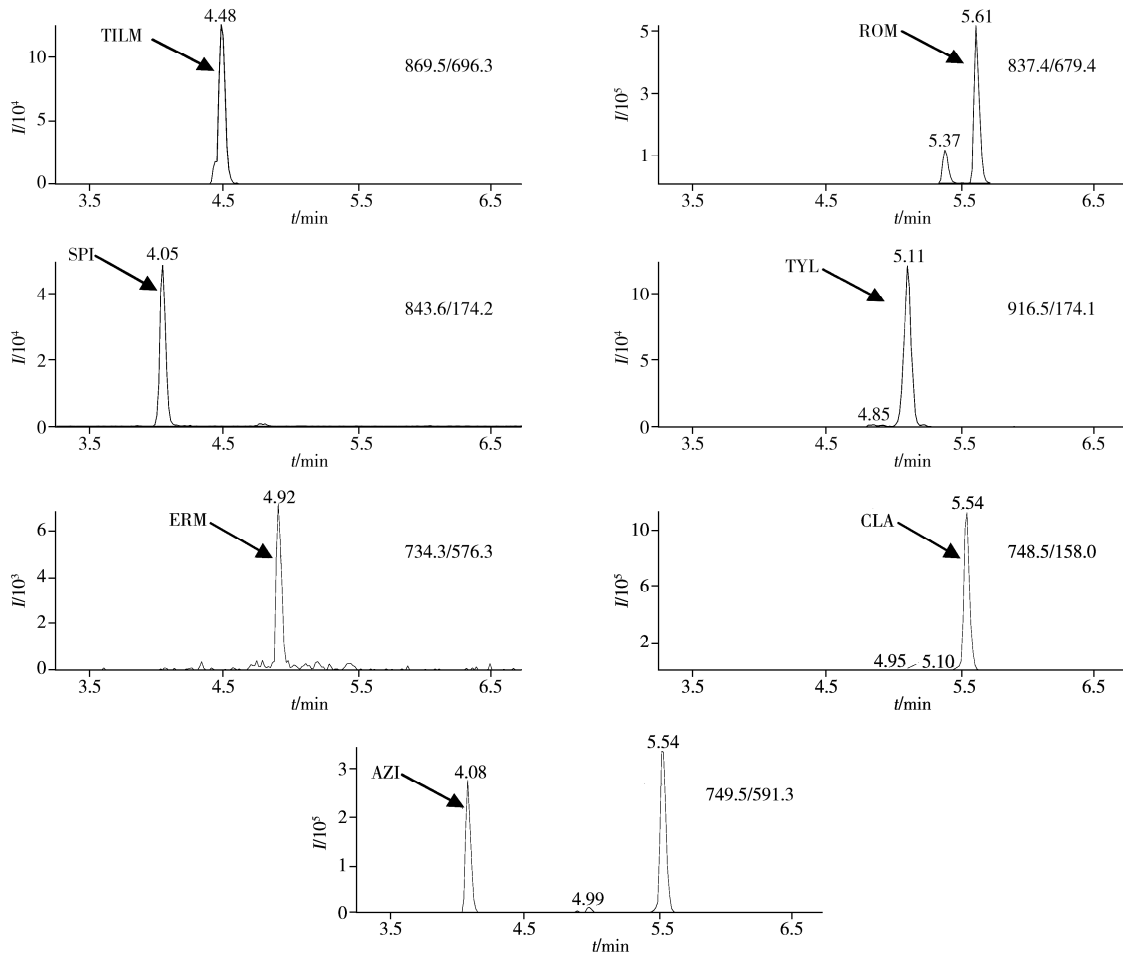


图 2 7 种待测药物标准品的 MRM 图(10  $\mu\text{g/L}$ )

Fig. 2 MRM chromatograms of 7 MALs mixed standard solution(10  $\mu\text{g/L}$ )

## 2.5 基质效应

饲料由玉米、小麦、麸皮、棉粕、豆粕等混合而成,基质复杂,样品经提取净化后仍可能存在较强的基质效应,因此需对前处理方法进行基质效应的评估<sup>[22]</sup>。

将“1.2”配制的 10  $\mu\text{g/L}$  混合标准工作液,添加至按照“1.3”制备的小猪配合饲料、猪浓缩饲料、鸡预混合饲料、牛羊精补饲料和鱼配合饲料的空白基质中,配制成 10  $\mu\text{g/L}$  大环内酯类药物的空白基质混合标准液。以空白基质中标准物质的峰面积(A)和相对应浓度的溶剂标准物质的峰面积(B)之比考察基质效应( $\text{ME}\% = \text{A}/\text{B} \times 100\%$ )<sup>[12]</sup>。若比值在 80% ~ 120% 范围内,则表明基质效应不明显<sup>[19]</sup>。结果表明在最佳前处理条件下,TYL 在小猪配合饲料、猪浓缩饲料和鱼配合饲料中表现出较弱的基质效应(ME 为 101% ~ 114%),但在鸡预混合饲料和牛羊精补饲料中存在中等强度的基质增强效应(ME 为 131% ~ 141%);其余 6 种药物在小猪配合饲料、猪浓缩饲料、鸡预混合饲料、牛羊精补饲料和鱼配合饲料中存在较弱的基质抑制或增强效应(ME 为 80% ~ 133%)。说明本实验采取的固相萃取柱净化和减少净化上样量的方式可有效降低基质干扰、提高灵敏度,这与其他检测方法中全部样液过柱净化相比,既节省净化时间,又可有效去除杂质<sup>[6,24]</sup>。为了消除基质效应带来的定量偏差,采用基质混合标准工作液进行定量<sup>[25]</sup>。

## 2.6 方法验证

称取 2 g 空白样品,按照“1.3”处理后,加入“1.2”中不同质量浓度的混合标准工作液复溶,配成系列质量浓度的基质混合标准工作液,采用外标法进行定量计算。以目标物的峰面积(Y)对其质

量浓度( $X$ ,  $\mu\text{g/L}$ ) 进行回归分析, 结果表明在小猪配合饲料、牛羊精补饲料、猪浓缩饲料、鸡预混合饲料和鱼配合饲料中, 替米考星、螺旋霉素和红霉素的线性范围为  $0.5 \sim 50 \mu\text{g/L}$ , 罗红霉素、泰乐菌素、克拉霉素和阿奇霉素的线性范围为  $0.25 \sim 50 \mu\text{g/L}$ , 相关系数( $r^2$ ) 均大于  $0.99$ 。以空白样品 3 倍信噪比( $S/N$ ) 时的质量浓度为检出限(LOD), 以 10 倍信噪比( $S/N$ ) 时的质量浓度为定量下限(LOQ), 得到 7 种物质的 LOD 为  $1.25 \sim 2.5 \mu\text{g/kg}$ , LOQ 为  $2.5 \sim 5.0 \mu\text{g/kg}$ 。代表性基质小猪配合饲料中 7 种目标物的线性关系、检出限及定量下限见表 2。本方法的检出限( $1.25 \sim 2.5 \mu\text{g/kg}$ ) 低于其他相关文献<sup>[6,23-24]</sup>, 灵敏度更高。

表 2 小猪配合饲料中 7 种 MALs 的线性关系、检出限及定量下限  
Table 2 Linear relations, LODs and LOQs of 7 MALs in piglet compound feed

| Analyte | Linear equation                             | Correlation coefficient( $r^2$ ) | Linear range( $\mu\text{g/L}$ ) | LOD( $\mu\text{g/kg}$ ) | LOQ( $\mu\text{g/kg}$ ) |
|---------|---|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| TILM    | $Y = 1.68 \times 10^4 X - 4.77 \times 10^2$ | 0.999 9                          | 0.5 ~ 50                        | 2.5                     | 5.0                     |
| ROM     | $Y = 5.05 \times 10^4 X + 5.78 \times 10^3$ | 0.998 2                          | 0.25 ~ 50                       | 1.25                    | 2.5                     |
| SPI     | $Y = 9.26 \times 10^3 X - 3.01 \times 10^2$ | 0.992 4                          | 0.5 ~ 50                        | 2.5                     | 5.0                     |
| TYL     | $Y = 3.05 \times 10^4 X + 3.74 \times 10^3$ | 0.997 3                          | 0.25 ~ 50                       | 1.25                    | 2.5                     |
| ERM     | $Y = 4.00 \times 10^3 X + 1.50 \times 10^3$ | 0.997 7                          | 0.5 ~ 50                        | 2.5                     | 5.0                     |
| CLA     | $Y = 2.63 \times 10^5 X + 4.26 \times 10^4$ | 0.997 2                          | 0.25 ~ 50                       | 1.25                    | 2.5                     |
| AZI     | $Y = 8.36 \times 10^4 X + 1.13 \times 10^4$ | 0.998 2                          | 0.25 ~ 50                       | 1.25                    | 2.5                     |

## 2.7 回收率与相对标准偏差

在添加剂预混合饲料、精料补充饲料、配合饲料和浓缩饲料空白样品中添加  $5$ 、 $10$ 、 $50 \mu\text{g/kg}$  3 个浓度水平的 7 种目标物混合标准溶液, 重复进行 3 次实验。结果表明, 4 种饲料基质中 7 种药物的回收率为  $61.4\% \sim 103\%$ , 批内和批间的相对标准偏差(RSD) 为  $0.43\% \sim 15\%$ , 其中配合饲料中 7 种大环内酯类药物的加标回收率和 RSD 见表 3。本方法的准确性和精密度均较为理想, 能够满足饲料中大环内酯类药物的定性和定量分析要求。

表 3 配合饲料样品中 7 种 MALs 的加标回收率和相对标准偏差( $n=5$ )  
Table 3 Average recoveries and relative standard deviations of 7 MALs in complete feed( $n=5$ )

| Analyte | 5 $\mu\text{g/kg}$ |               |               | 10 $\mu\text{g/kg}$ |               |               | 50 $\mu\text{g/kg}$ |               |               |
|---------|--------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|---------------------|---------------|---------------|
|         | Recovery (%)       | Intra-RSD (%) | Inter-RSD (%) | Recovery (%)        | Intra-RSD (%) | Inter-RSD (%) | Recovery (%)        | Intra-RSD (%) | Inter-RSD (%) |
| TILM    | 73.6               | 4.1           | 5.4           | 75.3                | 11            | 14            | 77.3                | 7.7           | 8.9           |
| ROM     | 74.9               | 3.9           | 2.9           | 88.9                | 4.1           | 1.3           | 82.8                | 2.2           | 11            |
| SPI     | 65.6               | 2.3           | 4.9           | 73.4                | 6.0           | 4.4           | 82.3                | 5.4           | 4.7           |
| TYL     | 65.0               | 5.4           | 2.4           | 66.1                | 0.43          | 5.6           | 81.7                | 3.0           | 4.3           |
| ERM     | 89.6               | 1.3           | 7.6           | 85.3                | 9.0           | 14            | 85.0                | 8.3           | 5.1           |
| CLA     | 78.0               | 3.6           | 14            | 91.2                | 2.2           | 5.5           | 83.0                | 2.9           | 4.7           |
| AZI     | 78.7               | 4.4           | 5.9           | 90.8                | 2.3           | 7.6           | 82.9                | 3.0           | 2.9           |

## 2.8 实际样品检测

采用所建立的方法对市售不同类型的 20 份饲料(中期肉鸡配合饲料、肉鸡预混合饲料、鱼配合饲料、肉羊肉牛专用精补饲料、猪浓缩饲料、猪预混合饲料) 进行检测, 在 1 份中期肉鸡配合饲料中检出泰乐菌素, 含量为  $1.69 \text{ mg/kg}$ , 其他饲料均未检出目标物。

## 3 结 论

大环内酯类药物为碱性化合物, 在酸性条件下部分药物不稳定, 本实验采用 1% 氨化乙腈为提取溶剂, Oasis PRiME HLB 柱进行净化, 结合高效液相色谱-串联质谱检测不同种类饲料中 7 种大环内酯类药物。该方法的检出限为  $1.25 \sim 2.5 \mu\text{g/kg}$ , 定量下限为  $2.5 \sim 5.0 \mu\text{g/kg}$ , 回收率为  $61.4\% \sim 103\%$ , 批内和批间 RSD 为  $0.43\% \sim 15\%$ 。方法简便、灵敏度高、基质干扰小, 能满足不同饲料样品的测定要求, 可为饲料质量安全监管提供技术支撑。

## 参考文献:

- [1] Zhang J P, Liu Y, Dai J, Niu W M, Wang H X. *Sci. Technol. Food Ind.* (张敬平, 刘晔, 戴军, 钮伟民, 王洪新. 食品工业科技), **2009**, 2(7): 292 – 295.
- [2] Wang F M, Chen J H, Lin L M, Tang Z X. *J. Instrum. Anal.* (王凤美, 陈军辉, 林黎明, 汤志旭. 分析测试学报), **2009**, 28(7): 784 – 788.
- [3] Sismotto M, Paschoal J A R, Teles J A, de Rezende R A E, Reyes F G R. *J. Food Compos. Anal.*, **2014**, 24: 153 – 162.
- [4] Li Y, Shao B, Xu S H. *Chin. J. Health Lab. Technol.* (李岩, 邵兵, 徐锁洪. 中国卫生检验杂志), **2005**, 15(10): 1275 – 1277.
- [5] Wu D, Han M L, Zou D X, Wang X M, Gao M, Qiu T L. *Chin. J. Anal. Chem.* (吴丹, 韩梅琳, 邹德勋, 王旭明, 高敏, 仇天雷. 分析化学), **2017**, 45(9): 1389 – 1396.
- [6] Yan L J, Zhang F, Fang E H, Guo Y N, Zhou Y, Lin L Y, Chu X G. *Chin. J. Chromatogr.* (严丽娟, 张峰, 方恩华, 郭彦妮, 周昱, 林立毅, 储晓刚. 色谱), **2010**, 28(11): 1038 – 1042.
- [7] Sun L, Zhang L, Wang S H, Wang X. *J. Instrum. Anal.* (孙雷, 张骊, 王树槐, 汪霞. 分析测试学报), **2009**, 28(9): 1058 – 1061.
- [8] Zhang M, Gong Y S, Ma G J. *J. Anim. Sci. Vet. Med.* (张眉, 龚月生, 马国际. 畜牧兽医杂志), **2009**, 28(3): 41 – 43.
- [9] GB 31650 – 2019. National Food Safety Standard – Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准).
- [10] National Health Commission of the People's Republic of China. No. 43 Bulletin of National Health Commission of the People's Republic of China in 2016(中华人民共和国国家卫生健康委员会. 国卫医发[2016]43号). [2020 – 03 – 04]. [http://www.gov.cn/xinwen/2016 – 08/25/content\\_5102348.htm](http://www.gov.cn/xinwen/2016 – 08/25/content_5102348.htm).
- [11] Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. No. 194 Bulletin of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China(农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告 第194号). [2020 – 03 – 04]. [http://www.moa.gov.cn/nybg/2019/201907/202001/t20200103\\_6334292.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2019/201907/202001/t20200103_6334292.htm).
- [12] Zhang X G, Liu D, Liu H R, Li Q, Li L L, Wang L X, Zhang Y. *Chin. J. Chromatogr.* (张晓光, 刘东, 刘红冉, 李强, 李立理, 王丽霞, 张岩. 色谱), **2017**, 35(10): 1055 – 1061.
- [13] Xu J Z, Chu X G, Hu X Z, Ding T, Wu B, Shen C Y, Jiang Y. *Chin. J. Anal. Lab.* (徐锦忠, 储晓刚, 胡小钟, 丁涛, 吴斌, 沈崇钰, 蒋原. 分析实验室), **2009**, 28(12): 26 – 30.
- [14] de la Huebra M J G, Vincent U, von Holst C. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43: 1628 – 1637.
- [15] Jia W, Wang H, Shi L, Xu X L, Chu X G. *J. Instrum. Anal.* (贾玮, 王菡, 石琳, 许秀丽, 储晓刚. 分析测试学报), **2018**, 37(8): 981 – 988.
- [16] Wang H T, Zhang R, Duan H A, Yao Y L. *Chin. J. Anal. Lab.* (王海涛, 张睿, 段宏安, 姚燕林. 分析实验室), **2008**, 27(7): 98 – 101.
- [17] Zhang Y, Li X Q, Li H M, Zhang Q H, Gao Y, Li X J. *Trends Anal. Chem.*, **2019**, 110: 344 – 356.
- [18] Robert C, Gillard N, Brasseur P Y, Ralet N, Dubois M, Delahaut P. *Food Control*, **2015**, 50: 509 – 515.
- [19] Sun S S, Zhu L J, Hu Y X, Liu Y F, Xu L. *Chin. J. Chromatogr.* (孙珊珊, 朱丽君, 胡延喜, 刘玉峰, 徐亮. 色谱), **2019**, 37(2): 150 – 158.
- [20] Yu P Y, Chen C S, Liu H B, Deng Y L, Xue N D. *Chin. J. Chromatogr.* (余佩瑶, 陈传胜, 刘寒冰, 邓艳玲, 薛南冬. 色谱), **2019**, 37(5): 518 – 524.
- [21] Li Y, Su X O, Wang P L, Fan X, Wang R G, Wang X. *Chin. J. Anal. Chem.* (李阳, 苏晓鸥, 王培龙, 樊霞, 王瑞国, 王骁. 分析化学), **2014**, 42(4): 525 – 530.
- [22] Wang R G, Su X O, Cheng F F, Wang P L, Fan X, Zhang W. *Chin. J. Anal. Chem.* (王瑞国, 苏晓鸥, 程芳芳, 王培龙, 樊霞, 张维. 分析化学), **2015**, 43(2): 264 – 270.
- [23] Han J Z, Yang W Y, Xuan B, Ma L, Li X N. *Mod. J. Anim. Husb. Vet. Med.* (韩鏖竹, 杨文腰, 玄兵, 马雷, 李欣楠. 现代畜牧兽医), **2017**, 7: 1 – 9.
- [24] Zhao Y, Liu Y, Jin Y, Xu Y H, Zhong Y, Jiang S, Li X D, Zeng F, Zhou J N. *Chin. J. Chromatogr.* (赵颖, 刘瑜, 金雁, 徐宜宏, 钟钰, 蒋施, 李晓东, 曾凡, 周健南. 色谱), **2012**, 30(9): 908 – 914.
- [25] Qian Z Z, Tang S F, Liang Y, Wei S H, Luo F F, Chen S. *J. Chin. Mass Spectrom. Soc.* (钱卓真, 汤水粉, 梁焱, 位绍红, 罗方方, 陈思. 质谱学报), **2019**, 40(4): 356 – 368.

(责任编辑: 丁 岩)