

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241206003

高效液相色谱-串联质谱法同时定性和定量检测 牛奶中 106 种兽药残留

孙忠伟, 汪龙飞, 鲍 蕾*

[雀巢研发(中国)有限公司, 雀巢食品安全研究院, 北京 100016]

摘 要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)同时定性和定量检测牛奶中 106 种兽药残留的分析方法。**方法** 牛奶中的兽药经甲酸化乙腈提取后, 加入硫酸钠、氯化钠、二水柠檬酸三钠和柠檬酸氢二钠进行液-液分配, 离心后上清液经 C₁₈, 氮丙级乙二胺(primary secondary amine, PSA)和硫酸钠混合的分散式固相萃取填料(dispersive solid phase extraction, d-SPE)净化, 然后经过 HPLC-MS/MS 进样和采集数据。**结果** 在当前验证的目标筛查浓度(screening target concentration, STC)下, 100 种兽药通过了定性方法验证, 假阳性率和假阴性率都小于 5%; 74 种兽药通过了定量方法验证, 回收率满足 70%~120%的要求, 重现性标准偏差不大于 20%。**结论** 此方法适用于牛奶中多兽药的同时定性和定量检测, 可以应用于日常检测及合规性的判定。

关键词: 牛奶; 多兽药残留; 高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous qualitative and quantitative determination of 106 kinds of veterinary drug residues in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SUN Zhong-Wei, WANG Long-Fei, BAO Lei*

[Nestlé China Food Safety Institute, Nestlé Research & Development (China), Beijing 100016, China]

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous qualitative and quantitative detection of 106 veterinary drug residues in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** Veterinary drug residues in milk were extracted with a mixture of formic acid and acetonitrile followed by a liquid-liquid partition using sodium sulphate, sodium chloride and citrate salts. After centrifugation, supernatant was cleaned by dispersive solid phase extraction (d-SPE) which consists of a mixture of sodium sulphate, primary secondary amine (PSA) and C₁₈ sorbents. **Results** At current screening targeted concentration (STC), the 100 kinds of veterinary drug residues passed through the qualification validation criteria, with false positive and negative rate were both less than 5%; the 74 kinds of veterinary drug passed through the quantification validation criteria, with recovery rate met 70%–120% requirement and standard deviation of reproducibility was less than 20%. **Conclusion** The developed method can be applied for qualification and quantification of multi-veterinary drug residues in milk, and it also can be used for routine analysis and compliance check.

*通信作者: 鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。E-mail: Lei.Bao@rd.nestle.com

*Corresponding author: BAO Lei, Professor, Nestlé Research & Development (China), No.6, Jiuxianqiao Road, Chaoyang District, Beijing 100016, China. E-mail: Lei.Bao@rd.nestle.com

KEY WORDS: milk; multi-veterinary drug residues; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引 言

动物源性食品原料中的兽药残留一直是食品安全热点问题, 兽药残留超标不仅影响到人类的身体健康, 也会污染水和土壤等, 造成一些具有耐药性的细菌产生, 间接对人类的生命安全造成影响, 例如抗生素类兽药的滥用现象^[1-2]。

多项调研发现牛奶中多兽药残留仍然是我们需要关注的问题^[3-4]。为了控制兽药残留可能带来的食品安全问题, 近几年来我国的兽药限量法规不断完善, 目前牛奶中的兽药残留法规限量已经达到上百种。但是, 现有国标或行业标准中一个方法最多同时检测几种或十几种兽药残留, 例如 GB 29692—2013《牛奶中喹诺酮类药物多残留的测定 高效液相色谱法》、GB/T 22966—2008《牛奶和奶粉中 16 种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB/T 22965—2008《牛奶和奶粉中 12 种 β -兴奋剂残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》等。为了满足法规多兽药限量的要求, 提高检测效率, 开发一种能同时定性和定量检测多兽药残留的方法可以补充现有检测方法的缺失, 提高风险监控的能力^[5-6]。

目前常用的多兽药残留检测技术主要有两大类: (1) 以酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[7-9]、胶体金免疫层析法(immunochromatographic assay, ICA)^[10-11]和生物芯片技术(biosensor)^[12-13]等为代表的快速定性和半定量方法; (2) 以高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)和高效液相色谱-高分辨质谱技术(high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, HPLC-HRMS)为代表的多兽药定性和定量检测方法。快速方法具有操作简单及快速特点, 通常用于牛奶的初步筛查, 缺点是方法不能同时检测多种化合物, 缺乏精确定性和定量的能力, 发现阳性样品后需要进一步采用质谱技术确认^[14]。质谱技术具有精确定性和定量的能力, 近几年多用于多兽药检测方法的开发^[15-20]。相对于 HPLC-HRMS, HPLC-MS/MS 设备成本低并且对实验员技术操作能力要求更低, 普及性会更好, 方法也更容易推广。

QuEChERS 是一种通用的样品前处理技术, 适用于多组分不同极性的化合物同时处理, 多项研究证明 QuEChERS 样品前处理技术更适合食品基质中多兽药测定^[21-26]。本研究建立以改进的 QuEChERS 样品前处理结合 HPLC-MS/MS 对牛奶中 106 种兽药残留的定性和定量检测方法, 既可以应用于日常原料检测, 也能用于早期风险监测。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

市售常温奶购于当地超市。

甲醇、水、乙腈、甲酸(质谱纯, 德国 Merck 公司); 甲酸铵(分析纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); QuEChERS 提取盐包(4 g 硫酸钠+1 g 氯化钠+1 g 二水柠檬酸三钠+0.5 g 柠檬酸氢二钠)、净化盐包(0.9 g 硫酸钠+0.15 g C₁₈ 填料+0.05 g PSA 填料)、均质子(分析纯)(北京美正生物科技有限公司); 兽药标准品(天津 Alta 公司), 详见表 1。

甲醇/水溶液(15:85, V/V)配制: 分别用量筒量取 15 mL 甲醇和 85 mL 水, 与 100 mL 试剂瓶混匀后备用。

表 1 兽药标准品信息
Table 1 Information on veterinary drug standards

兽药名称	产品货号	储存溶液质量浓度/(mg/mL)
10 种大环内酯类抗生素混合标准品	1ST47686	0.1
11 种喹诺酮类抗生素混合标准品	1ST47890	0.1
环丙沙星单标溶液	1ST5703	0.1
16 种噻苯唑啉类兽药混合标准品	1ST47280	0.1
地西洋和氯丙嗪混合标准品	1ST47923	0.1
24 种 β 受体激动剂混合标准品	1ST47343	0.1
25 种磺胺类药物混合标准品	1ST47344	0.1
4 种类固醇类激素混合标准品	1ST9277	0.1
甲砒霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺和氯霉素混合标准品	1ST47257	0.1
5 种硝基咪唑类混合标准品	1ST47803	0.1
6 种类固醇类混合标准品	1ST47655	0.1

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 超高效液相色谱仪(美国 Agilent 有限公司); Sciex 6500 串联三重四极杆质谱仪(美国 Sciex 有限公司); Multifuge X3R 离心机、Legend Micro 21R 离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); SPEX®SamplePrep Geno Grinder® 2010 样品均质机(美国 SPEX 公司); G-560 涡旋机(美国科技工厂); N-EVAPTM112 氮吹仪(美国 Organomation 公司); S100H 超声清洗机(德国 Elma 公司); AT200 分析天平(精度 0.01 g, 瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μ m)、UPLC BEH C₁₈ VanGuard (2.1 mm×5 mm, 1.7 μ m)(美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准工作溶液和目标筛查浓度

按照表 2 分别转移一定体积的混合储存溶液到 10 mL 的容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制混合标准溶液(现配现用)。

表 2 标准工作溶液的制备和 STC 的设定

Table 2 Preparation of standard working solution and setting of STC

兽药名称	STC/(μg/kg)	储存液转移 体积/μL	标准工作溶液 质量浓度/(μg/mL)
奥芬达唑	10	100	1.0
芬苯达唑	10		1.0
芬苯达唑砒	10		1.0
阿苯达唑	10		1.0
阿苯达唑-2-氨基砒	10		1.0
阿苯达唑亚砒	10		1.0
阿苯达唑砒	10		1.0
甲苯咪唑	10		1.0
氨基甲苯咪唑	10		1.0
5-羟基甲苯咪唑	10		1.0
噻苯哒唑	10	100	1.0
5-羟基噻苯哒唑	10		1.0
氟苯达唑	10		1.0
2-氨基氟苯达唑	10		1.0
坎苯达唑	10		1.0
丙氧苯咪唑	10		1.0
甲硝唑	10		1.0
二甲硝咪唑	10		1.0
罗硝唑	10		1.0
替硝唑	10		1.0
奥硝唑	10	100	1.0
苯甲酰磺胺	10		1.0
磺胺醋酞	10		1.0
磺胺氯哒嗪	10		1.0
磺胺嘧啶	10		1.0
磺胺邻二甲氧嘧啶	10		1.0
磺胺甲基嘧啶	10		1.0
磺胺对甲氧嘧啶	10		1.0
磺胺二甲基嘧啶	10		1.0
磺胺甲噻二唑	10		1.0
磺胺甲恶唑	10	100	1.0
磺胺甲氧哒嗪	10		1.0
磺胺恶唑	10		1.0
磺胺氯吡嗪	10		1.0
磺胺间二甲氧嘧啶	10		1.0
磺胺脒	10		1.0
磺胺间甲氧嘧啶	10		1.0
磺胺	10		1.0
磺胺硝苯	10		1.0
磺胺苯吡唑	10		1.0
磺胺吡啶	10	100	1.0
磺胺喹恶琳	10		1.0
磺胺噻唑	10		1.0
磺胺二甲异嘧啶	10		1.0
磺胺异恶唑	10		1.0
甲氧苄氨嘧啶	10		1.0
达氟沙星	2	100	1.0
恩诺沙星	2		1.0
双氟沙星	2		1.0

表 2(续)

兽药名称	STC/(μg/kg)	储存液转移 体积/μL	标准工作溶液 质量浓度/(μg/mL)
氟甲喹	2	100	1.0
洛美沙星	2		1.0
诺氟沙星	2		1.0
氧氟沙星	2		1.0
恶唑酸	2		1.0
培氟沙星	2		1.0
沙拉沙星	2		1.0
马波沙星	2		1.0
环丙沙星	10		1.0
红霉素	10		1.0
交沙霉素	10	100	1.0
吉他霉素	10		1.0
罗红霉素	10		1.0
螺旋霉素	10		1.0
替米考星	10		1.0
泰妙菌素	10		1.0
林可霉素	10		1.0
克林霉素	10		1.0
泰乐菌素	10		1.0
班布特罗	10		1.0
溴布特罗	10	100	1.0
西马特罗	10		1.0
西布特罗	10		1.0
克伦特罗	10		1.0
异克伦潘特	10		1.0
克伦普罗	10		1.0
氯丙那林	10		1.0
非诺特罗	10		1.0
福莫特罗	10		1.0
苯氧丙酚胺	10		1.0
马布特罗	10	100	1.0
马贲特罗	10		1.0
异丙喘宁	10		1.0
喷布特罗	10		1.0
苯乙醇胺 A	10		1.0
普萘洛尔	10		1.0
莱克多巴胺	10		1.0
利托君	10		1.0
沙丁胺醇	10		1.0
沙美特罗	10	100	1.0
特布他林	10		1.0
妥布特罗	10		1.0
齐帕特罗	10		1.0
卡巴多	10		1.0
脱氧卡巴氧	10		1.0
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	10	100	1.0
喹噁啉-2-羧酸	10		1.0
甲砒霉素	10		1.0
氟苯尼考	10		1.0
氟苯尼考胺	10		1.0
氯霉素	10		1.0
醋酸美仑孕酮	4		1.0
甲基睾丸酮	4		1.0
α-群勃龙	4	100	1.0
群勃龙	4		1.0
α-玉米赤霉醇	4		1.0
β-玉米赤霉醇	4		1.0

注: 目标筛查浓度(screening target concentration, STC)。

1.3.2 样品前处理

分别准确称取(10 ± 0.01) g 牛奶于 50 mL 离心管中, 向样品中加入 30 mL 乙腈及 30 μ L 的甲酸溶液, 并加入一袋氧化锆均质子, 使用均质机以 1500 r/min 均质 1.5 min。加入 QuEChERS 提取盐包后, 立即手摇或涡旋 1 min, 确认样品无结块, 以 1500 r/min 的速度混匀 3 min 后, 将样品转移至离心机, 在室温下以 $4000 \times g$ 离心 10 min 得上清液。取 6 mL 上清液与 15 mL 离心管中, 加入 QuEChERS 净化盐包, 使用均质机以 1500 r/min 的速度混匀 3 min, 转移至离心机, 在室温下以 $4000 \times g$ 离心 10 min。取 3 mL 上清液于 15 mL 的离心管中, 在 (40 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹干, 加 75 μ L 甲醇漩涡 30 s 后, 再加入 425 μ L 水漩涡 30 s 后, 超声 3 min, 最后转移至 1.5 mL 离心管中, 在 4°C 下以 $17000 \times g$ 离心 10 min, 将上清液转移到进样瓶中以备 HPLC-MS/MS 分析。

1.3.3 色谱条件

流动相 A: 水[0.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% (V/V)甲酸];
流动相 B: 甲醇[0.5 mmol/L 甲酸铵和 0.1% (V/V)甲酸]; 色

谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 保护柱: UPLC BEH C₁₈ VanGuard (2.1 mm×5 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL; 流速: 0.4 mL/min。

转换阀: 在 0.5~12.0 min 之间将洗脱液切换至质谱检测器, 0.5 min 之前和 12.0 min 之后洗脱液切换至废液。

梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 流动相 A 维持在 95%; 0.5~2.5 min, A 从 95%降低至 65%; 2.5~10.0 min, A 从 65%减至 0%; 10.0~12.0 min, A 维持在 0%; 12.0~12.5 min, A 从 0%升至 95%; 12.5~16.0 min, A 维持 95%不变。

1.3.4 质谱条件

电喷雾离子(electrospray ionization, ESI)源: 雾化气: 40 psi, 辅助气: 40 psi, 雾化气温度: 550 °C, 帘气流速: 30 psi, 正模式喷雾电压: 5000 V, 负模式喷雾电压: 4500 V, 碰撞气: Medium。采集模式为多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)扫描, 每个MRM采集时间窗口为 60 s, 每个兽药的MRM参数、保留时间及碰撞能量如表3所示。

表3 兽药母离子、子离子荷质比、保留时间及其他质谱参数相关信息

Table 3 Information related to the charge to mass ratio, retention time, and other mass spectrometry parameters of mother and daughter ions in veterinary drugs

兽药名称	保留时间/min	加荷方式	去簇电压/V	入口电压/V	母离子	子离子	碰撞能量/V
奥芬达唑	5.1	M+H	80	8	316	159	42
						191	28
芬苯达唑	7.2	M+H	100	8	300	268	29
						159	45
芬苯达唑砒	5.4	M+H	100	6	332	300	31
						159	50
阿苯达唑	6.3	M+H	100	8	266	234	26
						191	43
阿苯达唑-2-氨基砒	3.0	M+H	120	10	240	133	37
						198	26
阿苯达唑亚砒	4.3	M+H	40	10	282	240	18
						222	25
阿苯达唑砒	4.6	M+H	80	10	298	266	28
						159	47
甲苯咪唑	6.1	M+H	85	10	296	264	29
						105	43
氨基甲苯咪唑	4.5	M+H	135	10	238	105	34
						77	39
5-羟基甲苯咪唑	4.5	M+H	80	8	298	266	28
						224	35
噻苯哒唑	3.3	M+H	120	10	202	175	35
						131	43
5-羟基噻苯哒唑	3.0	M+H	165	10	218	191	34
						147	44
氟苯达唑	6.4	M+H	80	10	314	282	28
						123	45
2-氨基氟苯达唑	4.7	M+H	120	10	256	123	36
						95	41
坎苯达唑	5.0	M+H	60	10	303	261	25
						217	36
丙氧苯咪唑	5.1	M+H	70	10	250	218	24
						176	46
甲硝唑	2.3	M+H	30	10	172	128	19
						82	30

兽药名称	保留时间/min	加荷方式	去簇电压/V	入口电压/V	母离子	子离子	碰撞能量/V
二甲硝咪唑	2.5	M+H	40	10	142	96 81	22 32
罗硝唑	2.4	M+H	10	10	201	140 55	16 27
替硝唑	2.9	M+H	50	10	248	202 121	19 21
奥硝唑	3.5	M+H	70	10	220	128 82	22 40
苯甲酰磺胺	4.0	M+H	20	6	277	156 92	16 35
磺胺酯酰	2.0	M+H	20	10	215	156 92	14 30
磺胺氯吡嗪	3.5	M+H	40	4	285	156 92	22 38
磺胺嘧啶	2.4	M+H	50	10	251	156 108	20 30
磺胺邻二甲氧嘧啶	3.7	M+H	60	10	311	156 108	24 31
磺胺甲基嘧啶	2.9	M+H	60	10	265	156 108	23 32
磺胺对甲氧嘧啶	3.1	M+H	90	6	281	156 108	24 32
磺胺二甲基嘧啶	3.3	M+H	90	6	279	186 124	23 30
磺胺甲噻二唑	3.2	M+H	30	6	271	156 92	20 35
磺胺甲恶唑	3.6	M+H	40	6	254	156 108	20 30
磺胺甲氧吡嗪	3.3	M+H	80	6	281	156 108	23 33
磺胺恶唑	3.1	M+H	60	5	268	156 113	20 24
磺胺氯吡嗪	4.3	M+H	40	4	285	156 108	20 32
磺胺间二甲氧嘧啶	4.4	M+H	90	6	311	156 108	27 33
磺胺脒	1.0	M+H	30	4	215	156 92	16 30
磺胺间甲氧嘧啶	3.7	M+H	80	10	281	156 108	25 32
磺胺	1.1	M+H	60	6	174	93 92	30 25
磺胺硝苯	5.6	M+H	80	10	336	156 108	16 32
磺胺苯吡唑	4.2	M+H	70	6	315	108 92	36 35
磺胺吡啶	2.8	M+H	40	11	250	156 108	21 30
磺胺喹恶啉	4.7	M+H	60	6	301	156 108	23 33
磺胺噻唑	2.6	M+H	40	10	256	156 108	20 28
磺胺二甲异嘧啶	2.4	M+H	100	6	279	124 186	27 23
磺胺异恶唑	3.7	M+H	50	5	268	156 113	19 20
甲氧苄氨嘧啶	3.1	M+H	100	8	291	230 123	32 33

表 3(续)

兽药名称	保留时间/min	加荷方式	去簇电压/V	入口电压/V	母离子	子离子	碰撞能量/V
达氟沙星	3.5	M+H	110	6	358	255	50
						283	31
恩诺沙星	3.4	M+H	100	6	360	316	26
						245	37
双氟沙星	3.6	M+H	100	6	400	299	38
						356	26
氟甲喹	5.8	M+H	90	6	262	244	20
						202	43
洛美沙星	3.5	M+H	80	6	352	265	32
						237	45
诺氟沙星	3.3	M+H	80	6	320	276	22
						233	33
氧氟沙星	3.2	M+H	100	6	362	318	25
						261	35
恶喹酸	4.6	M+H	62	10	262	160	49
						216	33
培氟沙星	3.2	M+H	80	6	334	290	24
						233	34
沙拉沙星	3.7	M+H	80	6	386	299	35
						342	24
马波沙星	3.2	M+H	80	10	363	319	24
						262	36
环丙沙星	3.4	M+H	104	5	332	314	28
						245	31
红霉素	6.2	M+H	100	10	734	158	35
						576	26
交沙霉素	6.8	M+H	70	10	828	174	40
						229	40
吉他霉素	6.2	M+H	60	13	772	109	88
						215	27
罗红霉素	7.1	M+H	160	13	837	680	30
						158	41
螺旋霉素	4.4	M+H	40	13	422	174	42
						142	37
替米考星	5.2	M+H	40	11	870	696	50
						174	54
泰妙菌素	6.0	M+H	143	9	494	192	28
						119	55
林可霉素	3.1	M+H	117	10	407	126	33
						359	24
克林霉素	5.3	M+H	100	10	425	126	33
						377	25
泰乐菌素	6.2	M+H	113	12	916	174	47
						773	39
班布特罗	4.3	M+H	150	10	368	294	26
						312	19
溴布特罗	4.1	M+H	55	10	365	291	25
						347	16
西马特罗	2.1	M+H	22	8	220	160	22
						143	31
西布特罗	2.6	M+H	30	6	234	160	19
						143	32
克伦特罗	3.7	M+H	30	10	277	203	22
						132	37
异克伦潘特	4.7	M+H	30	10	291	188	29
						217	23
克伦普罗	3.3	M+H	20	10	263	203	23
						132	35
氯丙那林	3.7	M+H	30	10	214	154	23
						118	35

表 3(续)

兽药名称	保留时间/min	加荷方式	去簇电压/V	入口电压/V	母离子	子离子	碰撞能量/V
非诺特罗	2.7	M+H	60	10	304	135 107	23 33
福莫特罗	3.8	M+H	60	5	345	149 121	24 35
苯氧丙酰胺	3.4	M+H	70	9	302	164 121	20 28
马布特罗	4.2	M+H	60	9	311	237 217	23 35
马贲特罗	4.7	M+H	50	7	325	237 217	21 34
异丙喘宁	1.6	M+H	30	10	212	194 152	15 22
喷布特罗	6.8	M+H	100	10	292	236 201	21 27
苯乙醇胺 A	3.8	M+H	80	10	345	149 121	25 37
普萘洛尔	5.1	M+H	80	10	260	116 183	24 22
莱克多巴胺	3.4	M+H	60	10	302	107 164	33 22
利托君	2.8	M+H	43	9	288	121 150	28 25
沙丁胺醇	2.3	M+H	25	8	240	148 166	23 18
沙美特罗	6.9	M+H	90	5	416	398 380	20 25
特布他林	2.2	M+H	33	10	226	152 107	21 40
妥布特罗	4.1	M+H	30	8	228	154 172	21 16
齐帕特罗	2.3	M+H	40	11	262	202 185	24 30
卡巴多	3.7	M+H	40	10	263	231 90	17 36
脱氧卡巴多	5.2	M+H	60	10	231	199 143	15 28
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	4.0	M+H	20	10	189	143 145	22 19
喹噁啉-2-羧酸	3.8	M+H	35	10	175	129 157	22 13
甲砒霉素	3.1	M+H	80	10	356	308 229	20 30
氟苯尼考	3.7	M-H	-30	-10	356	336 185	-12 -24
氟苯尼考胺	1.0	M+H	20	12	248	230 130	15 30
氯霉素	4.5	M-H	-20	-10	321	257 152	-19 -27
醋酸美仑孕酮	8.3	M+H	60	10	397	337 279	18 25
甲基睾丸酮	7.8	M+H	80	10	303	285 97	22 29
α -群勃龙	7.1	M+H	60	6	271	253 199	27 32
群勃龙	6.8	M+H	90	10	271	253 199	27 32
α -玉米赤霉醇	7.3	M-H	-30	-8	321	277 303	-30 -28
β -玉米赤霉醇	6.7	M-H	-30	-8	321	277 303	-30 -28

1.3.5 定性方法验证实验设计

对于同一个样品分别称取 3 份牛奶样品, 一份牛奶不进行加标, 记作空白样品。一份牛奶加标 1 倍的 STC, 记作 1×STC。1 份牛奶加标 2 倍的 STC, 记作 2×STC。每种兽药的 STC 值如表 2 所示。3 份样品分别按照 1.3.3 进行样品前处理, 并以每种兽药的第一个子离子的峰面积作为响应值进行如下计算。分别按公式(1)、(2)计算各个兽药的空白响应比值($R_{SB/S1}$)和加标响应比值($R_{S1/S2}$)。

$R_{SB/S1}$ =空白样品中兽药的响应值/1×STC 样品中兽药的响应值 (1)

$R_{S1/S2}$ =1×STC 样品中兽药的响应值/2×STC 样品中兽药的响应值 (2)

分别将 $R_{SB/S1}$ 和 $R_{S1/S2}$ 的值与实验中设定的阈值($V_{cut-off}$)进行比较, 当样品中 $R_{S1/S2} \leq V_{cut-off}$, 该兽药在 1×STC 样品中被判定为假阴性(FN); 当样品中 $R_{SB/S1} \geq V_{cut-off}$, 该抗生素在空白样品中被判定为假阳性(FP)。参考之前的研究^[27], 本研究中的阈值定为 0.2。本研究选取 28 个牛奶样品进行方法验证的研究, 依据欧盟《兽药残留筛查方法验证指南》方法性能考察参数规定, FP 和 FN 同时满足小于 5%, 则证明此方法适用于此兽药在牛奶中的筛查目的。

1.3.6 定量方法验证实验设计

同 1.3.5 样品称取和处理方式, 兽药定量采用一点标准加入法进行计算, 将 1×STC 的加标样品作为测试样品, 用 2×STC 样品定量 1×STC 样品中的各个兽药浓度 W , 计算如式(3):

$$W_i = \frac{\text{Area}_{\text{unspiked}}}{(\text{Area}_{\text{spiked}} - \text{Area}_{\text{unspiked}})} \times \text{Conc}_{\text{added}} \quad (3)$$

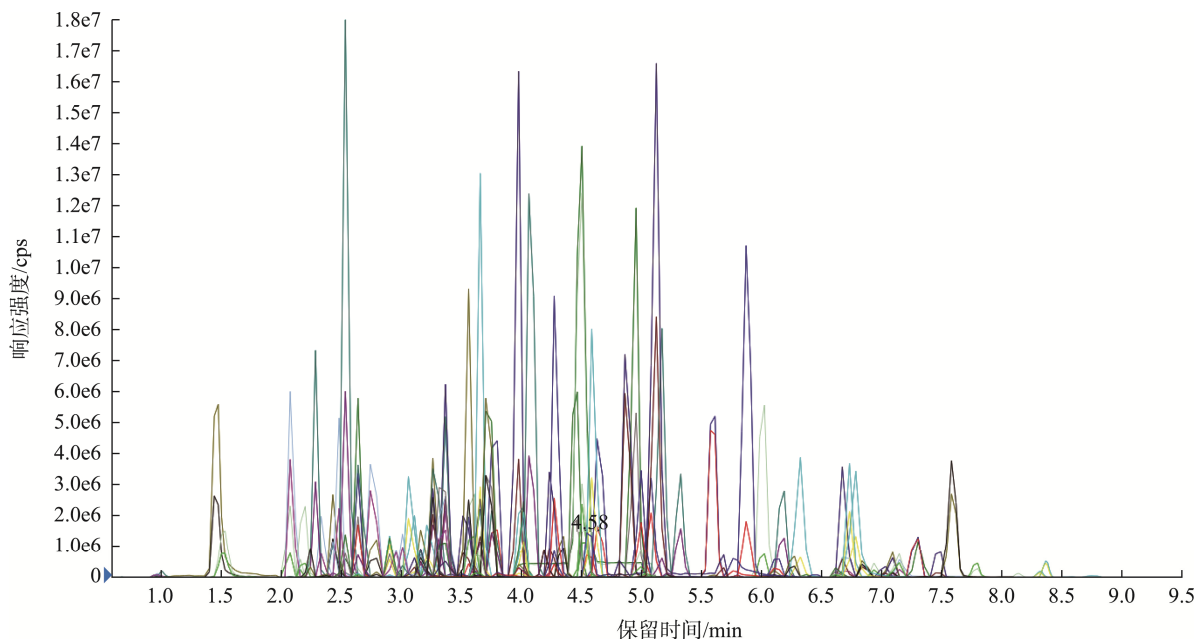


图 1 加标牛奶样品中的兽药总离子流色谱图

Fig.1 Total ion chromatogram of veterinary drugs in spiked milk samples

其中, W_i 为各个兽药在 1×STC 样品中的浓度($\mu\text{g/kg}$); $\text{Area}_{\text{unspiked}}$ 为 1×STC 样品中兽药定量离子峰的峰面积; $\text{Area}_{\text{spiked}}$ 为 2×STC 样品中兽药定量离子峰的峰面积; $\text{Conc}_{\text{added}}$ 为 2×STC 样品中兽药的加标浓度($\mu\text{g/kg}$)。

然后用公式(3)计算得到的 1×STC 样品中各个兽药的浓度除以理论值得到回收率数据。参考 SANTE/12682/2019《Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed》农药残留方法验证要求, 当兽药的回收率 70%~120%, 实验室内重现性不大于 20%时, 认为此兽药可以用此方式进行定量。

2 结果与分析

2.1 STC 的设定

如果目标兽药在 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》中有最大残留限量(maximum residue limit, MRL)要求, 则本研究中此类兽药的 STC 小于或等于 MRL。如果本研究中的兽药没有 MRL 要求, 则 STC 统一设置为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 定性筛查

106 种兽药的总离子流色谱图如图 1 所示, 样品中兽药的确认是通过分析色谱图中每种兽药的保留时间和离子对信号实现。结果如表 4, 100 种兽药通过定性筛查要求。其中芬苯达唑和马波沙星假阳性概率(FP)和假阴性概率(FN)都未能满足验证要求, 主要是由于此两种兽药在当前 STC 下, 质谱响应太低, 可能未达到最低检出限水平, 空白基质也有干扰情况存在, 因此 FP 和 FN 都未满足验证需求; 替

硝唑和诺氟沙星的 FP 未能通过验证要求, 主要是因为有些空白基质本底中也存在这两种兽药, 因而造成假阳性情况出现; 磺胺对甲氧嘧啶和喷布特罗未能通过 FN 验证要求, 主要是由于此两种兽药在当前情况下的质谱响应过低。

2.3 定量筛查

74 种兽药通过了定量方法验证的要求, 32 种兽药未能

通过定量验证要求, 说明这些兽药并不适合单点标准加入法定量。主要是由于一部分兽药响应过低, 以及另一部分兽药在当前 1×STC 至 2×STC 范围内质谱响应不成线性, 从而造成回收率和重现性不能满足验证要求, 因此这类兽药的定量数据只能作为参考, 不能用于合规性的判断。相对于国标方法一次只能检测几种或十几种的兽药, 此方法可以做到同时检测 74 种兽药, 很大程度上提高了检测效率。

表 4 牛奶中兽药定性和定量验证结果
Table 4 Veterinary drug residues qualification and quantification results in milk

兽药名称	STC/(μg/kg)	FP/%	FN/%	是否达到目标(Y/N)	回收率/%	重复性/%	是否达到目标(Y/N)
奥芬达唑	10	0	0	Y	119	10	Y
芬苯达唑	10	21	25	N	-69	-1122	N
芬苯达唑砒	10	0	0	Y	116	7	Y
阿苯达唑	10	0	0	Y	115	19	Y
阿苯达唑-2-氨基砒	10	0	0	Y	107	20	Y
阿苯达唑亚砒	10	0	0	Y	120	19	Y
阿苯达唑砒	10	0	0	Y	118	18	Y
甲苯咪唑	10	0	0	Y	116	9	Y
氨基甲苯咪唑	10	0	0	Y	115	16	Y
5-羟基甲苯咪唑	10	0	0	Y	152	26	N
噻苯哒唑	10	0	0	Y	118	14	Y
5-羟基噻苯哒唑	10	0	0	Y	110	15	Y
氟苯达唑	10	0	0	Y	116	18	Y
2-氨基氟苯达唑	10	0	0	Y	120	20	Y
坎苯达唑	10	0	0	Y	120	12	Y
丙氧苯咪唑	10	0	0	Y	118	20	Y
甲硝唑	10	0	0	Y	120	17	Y
二甲硝咪唑	10	4	0	Y	112	10	Y
罗硝唑	10	0	0	Y	110	10	Y
替硝唑	10	12	0	N	138	29	N
奥硝唑	10	0	0	Y	138	26	N
苯甲酰磺胺	10	0	0	Y	184	34	N
磺胺醋酰	10	0	0	Y	180	30	N
磺胺氯哒嗪	10	0	0	Y	149	43	N
磺胺嘧啶	10	0	0	Y	120	18	Y
磺胺邻二甲氧嘧啶	10	0	0	Y	148	25	N
磺胺甲基嘧啶	10	0	0	Y	117	20	Y
磺胺对甲氧嘧啶	10	0	11	N	-59	-852	N
磺胺二甲嘧啶	10	0	0	Y	143	25	N
磺胺甲噻二唑	10	0	0	Y	120	15	Y
磺胺甲恶唑	10	0	0	Y	186	34	N
磺胺甲氧哒嗪	10	0	0	Y	158	25	N
磺胺恶唑	10	0	0	Y	110	20	Y
磺胺氯吡嗪	10	0	0	Y	130	112	N
磺胺间二甲氧嘧啶	10	0	0	Y	114	19	Y
磺胺脒	10	0	0	Y	115	10	Y
磺胺间甲氧嘧啶	10	0	0	Y	115	10	Y
磺胺	10	0	0	Y	120	18	Y
磺胺硝苯	10	0	0	Y	113	12	Y
磺胺苯吡唑	10	0	0	Y	154	27	N
磺胺吡啶	10	0	0	Y	176	40	N
磺胺喹恶啉	10	0	0	Y	144	22	N
磺胺噻唑	10	0	0	Y	242	61	N

表 4(续)

兽药名称	STC/(μg/kg)	FP/%	FN/%	是否达到目标(Y/N)	回收率/%	重复性/%	是否达到目标(Y/N)
磺胺二甲异噻唑	10	0	0	Y	160	44	N
磺胺异恶唑	10	0	0	Y	157	24	N
甲氧苄氨嘧啶	10	0	0	Y	138	25	N
达氟沙星	2	0	0	Y	102	12	Y
恩诺沙星	2	0	0	Y	106	14	Y
双氟沙星	2	0	0	Y	112	12	Y
氟甲唑	2	0	0	Y	106	10	Y
洛美沙星	2	0	0	Y	106	12	Y
诺氟沙星	2	25	0	N	0	0	N
氧氟沙星	2	0	0	Y	0	0	N
恶唑酸	2	0	4	Y	106	8	Y
培氟沙星	2	0	0	Y	101	15	Y
沙拉沙星	2	0	0	Y	111	9	Y
马波沙星	2	100	7	N	132	2502	N
环丙沙星	10	0	0	Y	107	12	Y
红霉素	10	0	0	Y	113	14	Y
交沙霉素	10	0	0	Y	110	20	Y
吉他霉素	10	0	0	Y	110	18	Y
罗红霉素	10	0	0	Y	99	18	Y
螺旋霉素	10	0	0	Y	113	18	Y
替米考星	10	0	0	Y	85	15	Y
泰妙菌素	10	0	0	Y	85	16	Y
林可霉素	10	4	0	Y	118	20	N
克林霉素	10	0	0	Y	120	19	Y
泰乐菌素	10	0	0	Y	113	22	N
班布特罗	10	0	0	Y	119	9	Y
溴布特罗	10	0	0	Y	110	17	Y
西马特罗	10	0	0	Y	118	19	Y
西布特罗	10	0	0	Y	193	42	N
克伦特罗	10	0	0	Y	119	10	Y
异克伦潘特	10	0	0	Y	116	18	Y
克伦普罗	10	0	0	Y	120	19	Y
氯丙那林	10	0	0	Y	116	6	Y
非诺特罗	10	0	0	Y	140	30	N
福莫特罗	10	0	0	Y	120	14	Y
苯氧丙酚胺	10	0	0	Y	119	14	Y
马布特罗	10	0	0	Y	118	15	Y
马贲特罗	10	0	0	Y	113	13	Y
异丙喘宁	10	0	0	Y	113	15	Y
喷布特罗	10	0	14	N	100	37	N
苯乙醇胺 A	10	0	0	Y	120	12	Y
普萘洛尔	10	8	4	Y	148	158	N
莱克多巴胺	10	0	0	Y	118	11	Y
利托君	10	0	0	Y	120	19	Y
沙丁胺醇	10	0	0	Y	120	11	Y
沙美特罗	10	0	4	Y	106	20	Y
特布他林	10	0	0	Y	115	7	Y
妥布特罗	10	0	0	Y	118	20	Y
齐帕特罗	10	0	0	Y	114	8	Y
卡巴多	10	0	0	Y	158	28	N
脱氧卡巴多	10	0	0	Y	119	18	Y
3-甲基喹噁啉-2-羧酸	10	0	0	Y	110	6	Y
喹噁啉-2-羧酸	10	0	0	Y	102	11	Y

表 4(续)

兽药名称	STC/(μg/kg)	FP/%	FN/%	是否达到目标(Y/N)	回收率/%	重复性/%	是否达到目标(Y/N)
甲砒霉素	10	0	0	Y	153	47	N
氟苯尼考	10	0	0	Y	112	10	Y
氟苯尼考胺	10	0	0	Y	110	15	Y
氯霉素	10	0	0	Y	97	8	Y
醋酸美仑孕酮	4	0	0	Y	99	22	N
甲基睾九酮	4	0	0	Y	111	12	Y
α-群勃龙	4	0	0	Y	120	20	Y
群勃龙	4	0	0	Y	113	18	Y
α-玉米赤霉醇	4	0	0	Y	115	25	Y
β-玉米赤霉醇	4	0	0	Y	111	10	Y

3 结 论

本研究验证了牛奶中 106 种兽药定性和定量同时检测的方法。定性判定采用空白样本和 1×STC 信号响应比率判断，消除了质谱基质效应的问题，减少了假阳性和假阴性的概率。在当前设定的 STC 条件下，100 种兽药通过了定性方法验证的要求。定量采用单点标准加入法方式时，74 种兽药通过了方法验证的要求。其中 16 种磺胺类药物未能通过定量验证，回收率和重现性标准偏差数据均高于验证要求，此现象可能与样品前处理未能去除干扰物质以及牛奶本底含有此类磺胺类药物有关系。因此，牛奶中磺胺类兽药的定量，可以采用选择性更专一的样品前处理方式，以便去除干扰物质，例如固相萃取可以作为磺胺类药物分析的前处理方式^[28-30]。除磺胺类药物之外，实验证明单点标准加入法定量方式，消除了样品提取过程的回收率及基质效应的影响，更能准确定量样品中的兽药残留。此方法兼顾定性和定量的功能，可以应用于日常检测和合规性判定。

参考文献

[1] MESFIN YM, MITIKU BA, TAMRAT A, *et al.* Veterinary drug residues in food products of animal origin and their public health consequences: A review [J]. *Vet Med Sci*, 2024, 10(6): 1–16.

[2] WARD MA, AL-AKAIDJ MAH, HASSAN WA, *et al.* Antibiotics used in food animals: A review [J]. *Al-Salam J Med Sci*, 2024, 3(2): 9–15.

[3] HAN RW, YU ZN, ZHEN TY, *et al.* Survey of veterinary drug residues in raw milk in Hebei Province, China [J]. *J Food Prot*, 2017, 80(11): 1890–1896.

[4] 雷诗懿, 张坤, 唐焱嫣, 等. 牛奶中的兽用抗生素残留研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2024, 45(6): 402–410.

LEI SY, ZHANG K, TANG HY, *et al.* Research progress on antibiotic veterinary drug residues in milk [J]. *World Note Antibiot*, 2024, 45(6): 402–410.

[5] 张倩勉, 黄海霞. 食品兽药残留检测现状分析及标准体系构建思路[J]. 饲料工业, 2024, 45(21): 169–176.

ZHANG QM, HUANG HYX. Current analysis of food veterinary drug residue detection and construction of standard system [J]. *Feed Ind*, 2024,

45(21): 169–176.

[6] 王伟, 李晓芹, 胡文涛, 等. 动物源性食品中兽药残留检测技术研究进展[J]. 食品工业, 2023, 44(12): 229–236.

WANG W, LI XQ, HU WT, *et al.* Research progress in the detection technology of veterinary drug residues in food of animal origin [J]. *Food Ind*, 2023, 44(12): 229–236.

[7] 李文辉, 于寒冰, 方芳, 等. 四类兽药残留检测 ELISA 试剂盒的质量评价[J]. 畜牧与兽医, 2023, 55(11): 51–58.

LI WH, YU HB, FANG F, *et al.* Evaluation of the quality and performance of the ELISA kit for detection of four categories veterinary antibiotic residues [J]. *Anim Husb Veter Med*, 2023, 55(11): 51–58.

[8] 那冠琼. 多肽类抗生素、吩噻嗪类和新型“瘦肉精”等兽药的免疫快速检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.

NA GQ. Rapid immunoassay for detecting polypeptide antibiotics, phenothiazines, new “clenbuterol” and other veterinary drugs [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2020.

[9] 龚易昕悦, 谢静, 刘沙. ELISA 法在食品安全分析中的最新(2017—)应用进展[J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(9): 234–240.

GONGYI XY, XIE J, LIU S. The latest application of ELISA method in food safety analysis (2017—) [J]. *China Food Addit*, 2022, 33(9): 234–240.

[10] 贾先春, 周嘉明, 智军海, 等. 胶体金免疫层析法高通量测定动物肌肉组织中多兽药残留[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(5): 967–978.

JIA XC, ZHOU JM, ZHI JH, *et al.* High-throughput determination of multiple veterinary drug residues in animal muscle tissues by colloidal gold immunochromatographic assay [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2024, 47(5): 967–978.

[11] 陈琳琳. 动物源性食品中抗寄生虫类及抗精神类药物的免疫快速检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.

CHEN LL. Rapid immunoassay for detecting antiparasitic and antipsychotic drugs in animal-derived food [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.

[12] 祁兵, 陈柔希, 杨晓君, 等. 基于生物芯片技术的生乳中兽药检测方法验证及其应用[J]. 乳业科学与技术, 2024, 47(2): 42–48.

QI B, CHEN RH, YANG XJ, *et al.* Verification and application of biochip for detection of veterinary drug residues in raw milk [J]. *J Dairy Sci Technol*, 2024, 47(2): 42–48.

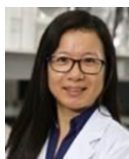
[13] 苗小草, 陈万义, 张娟, 等. 生物芯片在食品检测中的应用进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(1): 114–121.

MIAO XC, CHEN WY, ZHANG J, *et al.* Application progress of biochip

- in food detection [J]. *J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed)*, 2017, 38(1): 114–121.
- [14] LE-BIZEC B, PINEL G, ANTIGNAC JP. Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(46): 8016–8034.
- [15] MELEKHIN AO, TOLMACHEVA VV, GONCHAROV NO, *et al.* Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hyper cross linked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2022, 387: 132866.
- [16] 李晓芹, 丁洪流, 何新叶, 等. UPLC-MS/MS 同时测定动物源性食品中 114 种兽药残留[J]. *食品工业*, 2021, 42(7): 310–316.
- LI XQ, DING HL, HE XY, *et al.* Simultaneous determination of 114 veterinary drug residues in foodstuffs of animal origin by UPLC-MS/MS [J]. *Food Ind*, 2021, 42(7): 310–316.
- [17] 陈锡龙, 赵贵, 黄鑫, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 20 种常用兽药残留量的研究[J]. *中国乳业*, 2022(6): 60–67.
- CHEN XL, ZHAO G, HUANG X, *et al.* Determination of residues of 20 veterinary drugs in Milk by UPLC-MS/MS [J]. *China Dairy Ind*, 2022(6): 60–67.
- [18] DESMARCHELIER A, BESSAIRE T, SAVOY MC, *et al.* Screening of 152 veterinary drug residues in animal source foods by LC-MS/MS, multilaboratory validation study: Final action 2020.04 [J]. *J AOAC Int*, 2024, 107(4): 617–631.
- [19] 王佳琪, 李剑军, 李超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测畜产品中 67 种兽药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(14): 93–104.
- WANG JQ, LI JJ, LI C, *et al.* Simultaneous determination of 67 kinds of veterinary drug residues in livestock products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(14): 93–104.
- [20] 凌蕾, 唐德红, 骆书娜, 等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱仪筛查动物源性食品中 165 种兽药残留[J]. *现代畜牧科技*, 2024, 52(11): 35–38.
- LING L, TANG DH, LUO SN, *et al.* Screening of 165 animal drug residues in food of animal origin by ultra chromatography-time of flight mass spectrometry [J]. *Mod Anim Husb Sci Technol*, 2024, 52(11): 35–38.
- [21] 杨黎, 蓝娜娜, 黄高武, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法测定八角中 222 种农药及其代谢物残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(19): 54–67.
- YANG L, LAN YY, HUANG GW, *et al.* QuEChERS combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of 222 kinds of pesticides and their metabolites residues in star anise [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(19): 54–67.
- [22] 魏宁果, 贾亦森, 范芳芳, 等. 基于 QuEChERS 原则的样品处理技术在动物源性食品兽药残留分析中的应用[J]. *化学分析计量*, 2024, 33(9): 124–132.
- WEI NG, JIA YS, FAN FF, *et al.* Application of sample pretreatment technology based on QuEChERS principles in the analysis of veterinary drug residues of animal-derived food [J]. *Chem Anal Meter*, 2024, 33(9): 124–132.
- [23] PERESTRELO R, SILVA P, PORTO-FIGUEIRA P, *et al.* QuEChERS-fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1070: 1–28.
- [24] SANTANA-MAYORA, SOCAS-RODRIGUEZ B, HERRERA-HERRERA AV, *et al.* Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis [J]. *Trend Anal Chem*, 2019, 116: 214–235.
- [25] KIM L, LEE D, CHO HK, *et al.* Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals [J]. *Trend Environ Anal*, 2019, 22: e00063.
- [26] ZHANG CY, DENG YC, ZHENG JF, *et al.* The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review [J]. *Trend Anal Chem*, 2019, 118: 517–537.
- [27] 于倩倩, 汪龙飞, 鲍蕾. 高效液相色谱-高分辨质谱法定性筛查牛奶中 49 种 β -内酰胺类抗生素残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(4): 162–169.
- YU QQ, WANG LF, BAO L. Qualitative screening of 49 kinds of β -lactam antibiotic residues in milk by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(4): 162–169.
- [28] 李丹娜, 王建山. 通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 13 种磺胺类药物[J]. *食品科技*, 2023, 48(11): 305–311.
- LI DN, WANG JS. Determination of 13 sulfonamide drugs in animal-derived foods by pass-through solid-phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci Technol*, 2023, 48(11): 305–311.
- [29] 高娜, 丁青青, 吴一鸣, 等. 生牛乳中磺胺类药物高通量检测方法的研究[J]. *中国奶牛*, 2024(4): 42–45.
- GAO N, DING QQ, WU YM, *et al.* Research on high throughput determination of sulfonamide drug residues in milk [J]. *China Dairy Cattle*, 2024(4): 42–45.
- [30] 王晓茵, 武云龙, 孙晓亮, 等. 超高效液相色谱-荧光法同时测定鸡肉中 14 种喹诺酮类和 16 种磺胺类药物残留[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(10): 46–53.
- WANG XY, WU YL, SUN XL, *et al.* Simultaneous determination of 14 quinolones and 16 sulfonamides residues in chicken by ultra-high-performance liquid chromatography-fluorescence method [J]. *Chin J Veter Med*, 2023, 59(10): 46–53.

(责任编辑: 于梦娇 安香玉)

作者简介



孙忠伟, 硕士, 主要研究方向为食品安全及产品配方开发。

E-mail: zhongwei.sun@rd.nestle.com



鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为食品安全与标准。

E-mail: Lei.Bao@rd.nestle.com