

基于改性壳聚糖膜净化的超高效液相色谱-四极杆/
静电场轨道阱质谱法测定牛奶中 5 种兽药残留

潘 旺¹, 张申平^{2*}, 王安琪², 胡 军¹, 周丽绘^{1*}

(1. 华东理工大学化学与分子工程学院, 上海 200237; 2. 上海市质量监督检验技术研究院,
国家市场监管重点实验室(乳及乳制品检测与监控技术), 上海 200233)

摘要:本研究通过在壳聚糖膜(chitosan membrane, CSM)表面接枝长碳链,获得了十八烷基三甲氧基硅烷改性的壳聚糖膜(C₁₈-CSM),将其作为分散固相萃取吸附剂对牛奶基质进行净化,并结合超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS)建立了牛奶中氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西泮和甲硝唑的测定方法。利用扫描电子显微镜、傅里叶变换红外光谱仪和接触角测试仪对 C₁₈-CSM 材料进行表征。对牛奶样品的前处理条件进行优化,最优条件如下:提取溶剂为 5% 甲酸乙腈,NaCl 用量为 1 g,萃取次数为 1 次,C₁₈-CSM 用量为 20 mg。采用 Hypersil GOLD VANQUISH 色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.9 μm)进行分离,以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸乙腈作为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min,进样量为 1 μL,柱温为 25 ℃,在电喷雾电离源正离子模式下进行检测。在优化的前处理条件下,5 种兽药在 0.5~100 μg/L 范围内具有良好的线性关系,相关系数(r^2)≥0.997 0,检出限(LOD)为 0.2 μg/L,定量限(LOQ)为 0.5 μg/L。5 种兽药在 3 个加标水平(0.5、1、5 μg/L)下的回收率为 79.5%~115%,日内精密密度为 7.0%~13% ($n=6$),日间精密密度为 1.3%~11% ($n=3$)。实验结果表明,本文所建立方法操作简便,准确可靠,能够满足牛奶中 5 种兽药残留的同时检测。

关键词:壳聚糖膜;分散固相萃取;超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱;兽药残留;牛奶

中图分类号:O658 **文献标识码:**A

Determination of five veterinary drug residues in milk by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap mass spectrometry based on modified chitosan membrane purification

PAN Wang¹, ZHANG Shenping^{2*}, WANG Anqi², HU Jun¹, ZHOU Lihui^{1*}

(1. School of Chemistry and Molecular Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Key Laboratory of Milk and Dairy Products Detection and Monitoring Technology for State Market Regulation, Shanghai 200233, China)

Abstract: Milk is an important consumer product with high nutritional value. The presence of veterinary drug residues in milk owing to the indiscriminate use of veterinary drugs may affect consumer health. In the mass spectrometric analysis of trace compounds, chromatographic co-eluting components easily interfere with the mass spectral signals obtained, affecting the accuracy of qualitative and quantitative analyses. Matrix purification is a promising method to reduce the matrix effect. Chitosan is a natural biopolymer with numerous active functional groups such as amino, acetyl, and hydroxyl groups; these groups can adsorb lipids through hydrophobic and electrostatic interactions. Chitosan also has the advantages of low production cost, stable

收稿日期:2023-08-02

* 通讯联系人.E-mail:lhzhou@ecust.edu.cn(周丽绘);E-mail:zhangsp1@sqi.org.cn(张申平).

基金项目:国家市场监管重点实验室(乳及乳制品检测与监控技术)项目(MDPDMT-2022-01).

Foundation item: Project of Key Laboratory of Milk and Dairy Products Detection and Monitoring Technology for State Market Regulation (No. MDPDMT-2022-01).

chemical properties, and convenient modification. Novel chitosan-based materials are promising candidates for lipid purification. In this study, a chitosan membrane was modified with trimethoxyoctadecylsilane (C_{18} -CSM). C_{18} -CSM was prepared through one-step hydrolysis and used as a dispersive solid phase extraction (DSPE) adsorbent to purify the matrix during milk pretreatment. We combined C_{18} -CSM with ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS) to develop an effective method for the extraction and determination of ofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, diazepam, and metronidazole in milk. C_{18} -CSM was characterized using scanning electron microscopy, Fourier transform infrared spectroscopy, and water contact angle testing. The results indicated that the material has a rough surface and uniformly dense cross-section. The water contact angle of C_{18} -CSM was 104° , indicating its good hydrophobicity. The pretreatment conditions (extraction solvent, dosage of NaCl, extraction frequency, and dosage of C_{18} -CSM) that influenced the recoveries of the five veterinary drugs were investigated in detail. The optimal conditions were established as follows: 5% formic acid in acetonitrile, 1 g NaCl, extraction 1 time, 20 mg C_{18} -CSM. Separation was performed on a Hypersil GOLD VANQUISH column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μ m). The mobile phase consisted of 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid in acetonitrile, and was flowed at a rate of 0.3 mL/min. The sample injection volume was 1 μ L, and the column temperature was maintained at 25 $^\circ$ C. Mass spectrometric analysis was performed in positive electrospray ionization mode. To verify the necessity of the purification material, the matrix effect was investigated using the matrix-matched standard curve method. The use of C_{18} -CSM reduced the matrix effects of the five necessity drugs from the range of -22% -8.8% to the range of -13% -3.6%, indicating that C_{18} -CSM is a highly efficient DSPE material. Under optimal conditions, the developed method showed good linearities within the range of 0.5-100 μ g/L, with correlation coefficients (r^2) $\geq$ 0.997 0. The limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were 0.2 μ g/L and 0.5 μ g/L, respectively. To assess the accuracy and precision of the method, we prepared milk samples with three spiked levels (low, medium, and high). The recoveries of the five veterinary drugs were ranged from 79.5% to 115%, and the intra-day and inter-day relative standard deviations were 7.0%-13% ($n=6$) and 1.3%-11% ($n=3$), respectively. This study provides a simple, accurate, and reliable method for the rapid and simultaneous determination of the five veterinary drug residues in milk.

Key words: chitosan membrane; dispersive solid phase extraction (DSPE); ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS); veterinary drug residues; milk

牛奶含有人体所需的多种营养物质,随着人们生活水平的提高,牛奶已成为我国需求量最大的一

种营养品。奶牛在养殖过程中的疾病预防、治疗及圈舍消毒均需使用抗生素或其他兽药,休药期管理

引用本文:潘旺,张申平,王安琪,胡军,周丽绘. 基于改性壳聚糖膜净化的超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱法测定牛奶中5种兽药残留. 色谱,2024,42(8):758-765.

PAN Wang, ZHANG Shenping, WANG Anqi, HU Jun, ZHOU Lihui. Determination of five veterinary drug residues in milk by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap mass spectrometry based on modified chitosan membrane purification. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(8): 758-765.

不严或挤奶设备污染都容易造成原料乳产生兽药残留,进而通过乳及乳制品等终端产品给消费者健康造成隐患。牛奶中残留的兽药可能会造成过敏反应、诱发细菌耐药性,甚至产生致畸、致癌等危害^[1,2]。根据《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019)^[3]对禁限用兽药的规定,牛奶中恩诺沙星和环丙沙星的最大残留限量之和为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,甲硝唑和地西泮不得在牛奶中检出。2022 年发布的《食品安全国家标准 食品中 41 种兽药最大残留限量》(GB 31650.1-2022)^[4]对禁限用兽药进行了增补,规定牛奶中氧氟沙星的最大残留限量为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。由此可见,针对牛奶中兽药残留的检测至关重要。

目前,超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)因具有灵敏度高、测量范围广、结果准确等优点而被广泛应用于兽药残留检测中^[5-9]。牛奶样品基质复杂,UHPLC-MS/MS 极易受到牛奶基质效应的影响,在检测过程中共洗脱基质组分可能会影响目标分析物的电离效率,导致信号受到抑制或增强,从而产生假阳性或假阴性结果,影响方法定性和定量的准确性^[10,11]。因此,在牛奶样品的前处理过程中,应尽量去除干扰基质,减少其对质谱检测器的污染。常用的前处理方法主要有液液萃取^[12,13]、固相萃取^[14,15]和分散固相萃取^[16,17],其中分散固相萃取以固相萃取为基础,具备便捷、价格低廉等优点,已在兽药残留分析中得到了广泛应用。常用的分散固相萃取材料包括十八烷基硅烷(C_{18})和乙二胺-*N*-丙基硅烷(PSA)等,其中 C_{18} 主要用于吸附脂肪等含有长碳链的样品基质^[18]; PSA 通常用于去除各种极性有机酸、色素、糖类、脂肪酸和其他一些可以与 PSA 形成氢键的基质共提取物等,但由于 PSA 是碱性物质,可能会导致酸性兽药的回收率偏低^[19]。上述前处理方法主要适用于理化性质相似的某一类兽药,随着对多种不同理化性质兽药残留检测和风险分析需求的增加,现有前处理方法及固相萃取材料已难以满足日渐复杂的基质净化和多种兽药检测要求,因此开发新型净化材料对于不同理化性质兽药的检测具有重要意义。

壳聚糖(chitosan, CS)是一种天然生物高分子聚合物,含有丰富的氨基、乙酰氨基和羟基等活性官能团,其可以通过疏水相互作用和静电相互作用来吸附脂质^[20,21],是一种高效的脂肪吸附剂。同时,壳聚糖具有易获得、易于化学修饰、化学性质稳定等

优点,以壳聚糖为基础的新型材料已成为一类极具潜力的分散固相萃取材料^[22]。有研究^[20]使用废弃虾壳合成了壳聚糖,并将其作为牛奶中多种兽药的分散固相萃取剂;牛奶样品经净化后,磺胺类、苯并咪唑类、大环内酯类等兽药的基质效应从 -40% ~ -10% 变为 -10% ~ 10%,表明壳聚糖能够有效降低牛奶样品的基质效应。Jung 等^[22]评估了壳聚糖、十八烷基二氧化硅、PSA 和增强型脂质去除材料(EMR)对牛肉基质中多类兽药的净化效果,结果发现,壳聚糖处理组中四环素类、磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类兽药均获得了良好的回收率。

本研究以十八烷基三甲氧基硅烷改性的壳聚糖膜(trimethoxyoctadecylsilane modified chitosan membrane, C_{18} -CSM)作为分散固相萃取材料,对牛奶样品基质进行净化,并结合超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS)建立了牛奶中 5 种兽药(氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西泮和甲硝唑)残留的检测方法。该方法灵敏且准确度高,为复杂基质中兽药残留的分析检测提供了思路。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Thermo Q Exactive PLUS 超高效液相色谱-质谱联用系统(包含 VANQUISH VF-P10-A 液相色谱系统及 Orbitrap 高分辨质谱)、NEXUS-470 傅里叶变换红外光谱分析仪、Helios G4 UC 型扫描电子显微镜(美国 Thermo Fisher 公司);90-1 型恒温磁力搅拌器(上海泸西分析仪器有限公司);TGL-16C 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);SI-0246 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司);KS PBC B2 氮气浓缩仪(上海冠森生物科技有限公司);KSJ 系列真空干燥箱(上海精宏试验设备有限公司);DZF-6050 电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

壳聚糖(分析纯,中黏度:200~400 $\text{mPa} \cdot \text{s}$,上海博飞美科化学科技有限公司);乙酸(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);正硅酸乙酯(分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);NaOH、十八烷基三甲氧基硅烷(分析纯,上海麦克林生化科技有限公司);无水乙醇、氨水、无水 MgSO_4 、NaCl(分析纯,上海泰坦科技股份有限公司);甲酸(色谱纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,上海

星可高纯溶剂有限公司);氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西洋和甲硝唑标准溶液(100 μg/mL,天津阿尔塔科技有限公司);C₁₈(天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

1.2 CSM 和 C₁₈-CSM 的合成

1.2.1 CSM 的合成

参考文献[23]报道方法合成 CSM。首先将 0.3 g 壳聚糖粉末溶于 10 mL 3% 乙酸水溶液中,在室温下进行搅拌,得到均相、透明的壳聚糖溶液,静置消泡,再将溶液倒入玻璃培养皿中,于 80 ℃鼓风干燥箱中干燥;待溶液全部蒸发后将培养皿取出,将得到的膜从玻璃培养皿中揭下,并置于 0.5 mol/L 氢氧化钠水溶液中浸泡 0.5 h,再用超纯水洗至中性,置于 30 ℃真空干燥箱中干燥,完全干燥后即得到 CSM。

1.2.2 C₁₈-CSM 的合成

参考文献[24]中的方法,在碱性条件下通过一步水解法制备 C₁₈-CSM。取 0.2 g CSM 置于含有 30 mL 乙醇、1.75 mL 正硅酸乙酯、1.75 mL 十八烷基三甲氧基硅烷的混合溶液中,之后将预先混匀的氨水(3.4 mL)和超纯水(15 mL)快速加入上述溶液中,在室温下搅拌 4 h;将膜从溶液中取出,用乙醇洗涤,以除去表面未接枝的十八烷基三甲氧基硅烷,之后在 30 ℃真空干燥箱中完全干燥即得到 C₁₈-CSM;用标准切纸刀将 C₁₈-CSM 裁剪成 5 mm×5 mm 的正方形膜,待用。

1.3 样品前处理

量取 5 mL 牛奶,置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 5% 甲酸乙腈,涡旋 30 s,使之充分混合,之后加入 1 g NaCl 和 1 g 无水 MgSO₄,涡旋 30 s,在 5 000 r/min 下离心 5 min;准确量取 2 mL 上清液于含有 20 mg C₁₈-CSM 的离心管中,涡旋 1 min,取 1.8 mL 上清液,并在 50 ℃下用氮气将其溶剂吹干,再加入 180 μL 乙腈复溶,在 9 600 r/min 下离心 5 min,将上清液转移至进样瓶中,进行 UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS 分析。

1.4 基质匹配混合标准溶液的配制

分别移取适量 100 μg/mL 氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西洋和甲硝唑标准溶液,用甲醇进行逐级稀释,配制成质量浓度分别为 1 mg/L 和 100 μg/L 的混合标准中间液;按照 1.3 节步骤处理空白牛奶样品,用空白牛奶样品提取液将 1 mg/L 和 100 μg/L 的混合标准中间液稀释成系列质量浓度(0.5、1、5、10、20、50、100 μg/L)的基质匹配混合标准溶液。

1.5 基质效应的计算

使用基质匹配混合标准溶液和纯溶剂混合标准溶液来评价基质效应(ME),其中纯溶剂混合标准溶液使用 50% 乙腈水来配制,按照 $ME = (S_m/S_s - 1) \times 100\%$ 来计算基质效应;其中, S_m 为基质匹配混合标准曲线的斜率, S_s 为纯溶剂混合标准曲线的斜率。若 $-20\% \leq ME \leq 20\%$,表示存在弱基质效应;若 $ME < -20\%$ 或 $ME > 20\%$,表示存在强基质效应。

1.6 仪器条件

1.6.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil GOLD VANQUISH 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm);柱温: 25 ℃;流速: 0.3 mL/min;流动相: A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为 0.1% 甲酸乙腈。梯度洗脱程序: 0~1 min, 5% B; 1~15 min, 5% B~95% B; 15~17 min, 95% B~5% B。进样量: 1 μL。

1.6.2 质谱条件

离子源: 电喷雾电离(ESI)源,正离子扫描模式;喷雾电压: 3 200 V;离子源温度: 325 ℃;鞘气(N₂)流速: 40 arb;辅助气(N₂)流速: 10 arb;辅助气温度: 300 ℃。其他质谱分析参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 C₁₈-CSM 的表征

CSM 和 C₁₈-CSM 的红外光谱图如图 1 所示, 3 350 cm⁻¹处的宽吸收峰归属于 O-H 和 N-H 键的伸缩振动,表明 CSM 和 C₁₈-CSM 中均含有大量的

表 1 5 种兽药的保留时间和质谱参数
Table 1 Retention times and MS parameters of the five veterinary drugs

Compound	Retention time/min	Quantitative ion (<i>m/z</i>)	Qualitative ions (<i>m/z</i>)
Metronidazole	2.43	285.07892	222.11470, 193.08830, 154.04150
Ofloxacin	4.22	362.15106	318.16123, 261.10338
Ciprofloxacin	4.33	360.17170	316.18197, 245.10847
Enrofloxacin	4.61	332.14050	288.15067, 245.10847, 231.05643
Diazepam	8.97	172.07167	128.04545

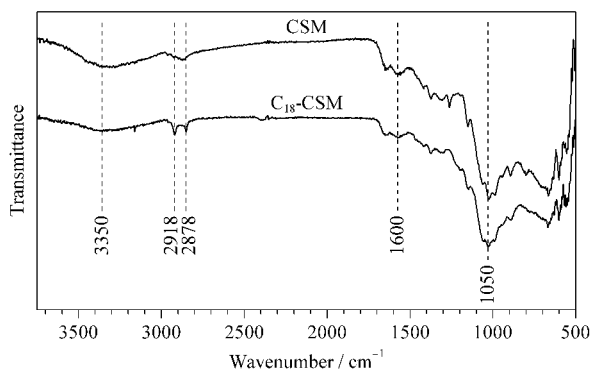


图 1 CSM 和 C₁₈-CSM 的傅里叶变换红外光谱图

Fig. 1 Fourier transform infrared spectra of the chitosan membrane (CSM) and trimethoxyoctadecylsilane modified CSM (C₁₈-CSM)

氨基和羟基;1 600 cm⁻¹处为壳聚糖乙酰基中 C=O 的伸缩振动峰。对比二者的红外光谱图可以看出, C₁₈-CSM 在 1 050 cm⁻¹处产生了 Si-O 键的特征吸收峰,且其在 2 918 cm⁻¹和 2 878 cm⁻¹处的 C-H 键伸缩振动峰明显增强,以上结果证明了 C₁₈-CSM 的成功制备。

采用扫描电子显微镜对 CSM 和 C₁₈-CSM 的微观形貌进行观察。从二者的扫描电镜图(图 2a 和 2b)中可以观察到,CSM 的表面形貌均匀、光滑、平整,没有孔隙,而 C₁₈-CSM 的表面形貌粗糙。图 2c 为 C₁₈-CSM 的横截面扫描电镜图,可观察到其横截面是均匀、致密的。

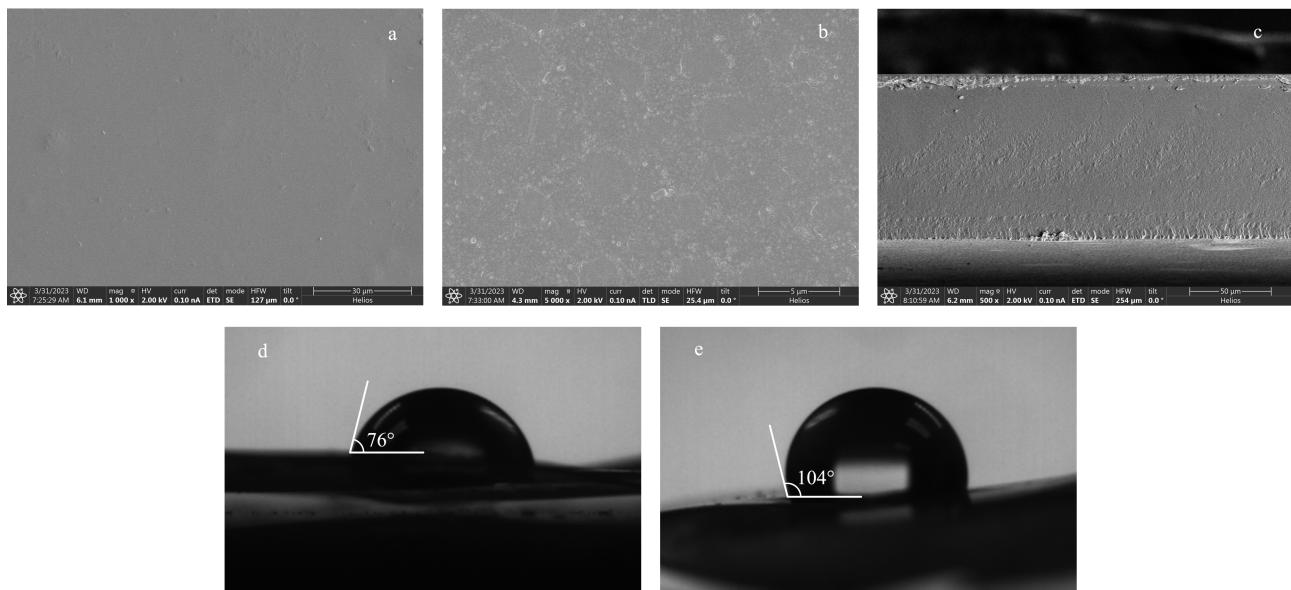


图 2 (a) CSM 表面、(b) C₁₈-CSM 表面和 (c) C₁₈-CSM 横截面的扫描电镜图及 (d) CSM 和 (e) C₁₈-CSM 的水接触角图

Fig. 2 Scanning electron microscopy images of (a) CSM surface, (b) C₁₈-CSM surface and (c) C₁₈-CSM cross section, and water contact angles of (d) CSM and (e) C₁₈-CSM

CSM 和 C₁₈-CSM 的水接触角测试结果如图 2d 和 2e 所示,经十八烷基三甲氧基硅烷修饰后, C₁₈-CSM 的水接触角可达 104°,表明其表面成功接枝了长链烷烃,具有一定的疏水性。

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂

乙腈是最常用的提取溶剂,将乙腈与适量的甲酸混合,可以提高两性兽药的回收率;与乙腈相比,经酸化处理后的乙腈溶液还可以有效降低样品提取溶液中的蛋白质含量^[25,26]。实验考察了不同体积分数(0、1%、3%、5%、8%、10%)的甲酸乙腈对 5 种兽药提取回收率的影响。从图 3a 中可以看出,随着甲酸体积分数的增加(0~5%),氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星和甲硝唑的回收率逐渐增加;当甲酸的体积分数为 5% 时,5 种兽药均获得了良好的回收率;继续增加甲酸的体积分数,5 种兽药的回收率均有所下降,因此最终选用 5% 甲酸乙腈作为提取溶剂。

2.2.2 NaCl 用量

在前处理步骤中加入 NaCl 可以降低兽药在水相中的溶解度,使更多的兽药转移至有机相中,从而使回收率增大^[27,28]。实验考察了不同 NaCl 用量(0、1、2 g)对 5 种兽药回收率的影响。从图 3b 中可以看出,不添加 NaCl 时,5 种兽药的回收率较低;当 NaCl 用量为 1 g 时,5 种兽药的回收率均明显提高;当 NaCl 用量为 2 g 时,氧氟沙星、恩诺沙星和环丙

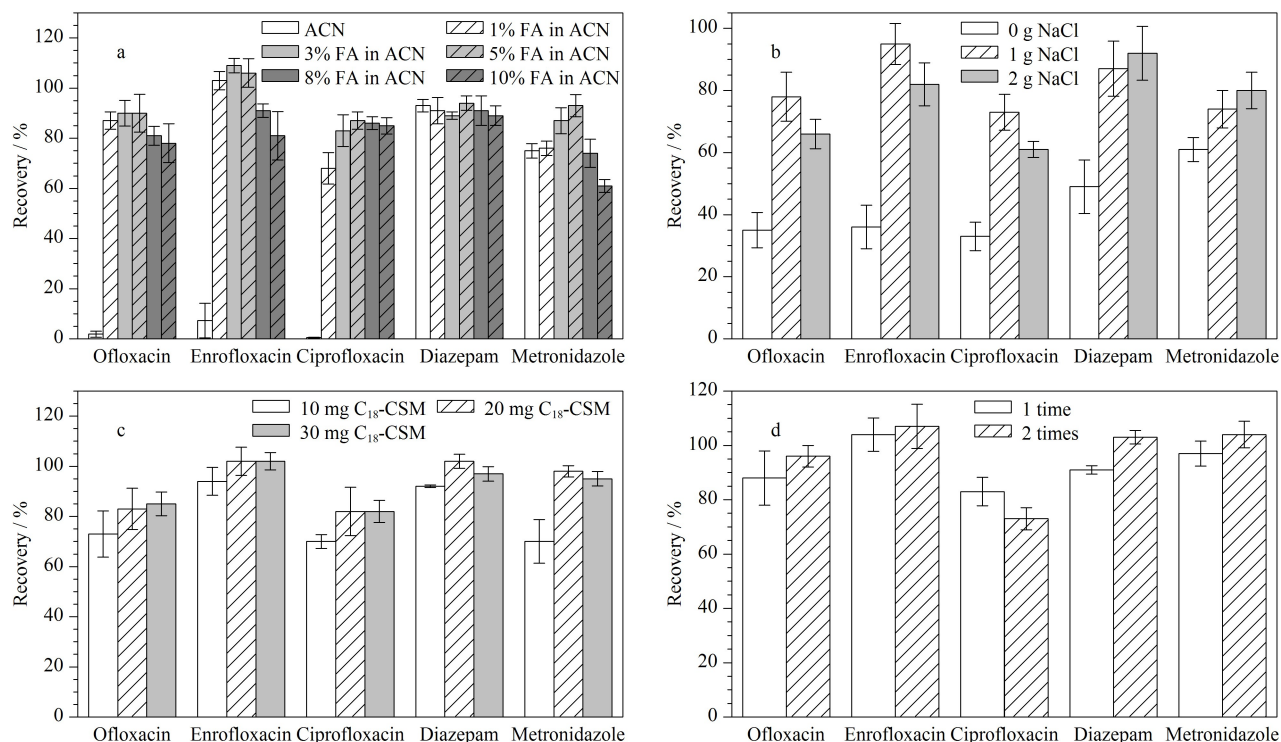


图 3 (a) 不同体积分数的甲酸乙腈、(b) NaCl 用量、(c) C₁₈-CSM 用量、(d) 萃取次数对 5 种兽药回收率的影响 ($n=3$)

Fig. 3 Effects of (a) formic acid in acetonitrile with different volume fractions, (b) amount of NaCl, (c) amount of C₁₈-CSM and (d) extraction times on the recoveries of the five veterinary drugs ($n=3$)

沙星的回收率反而降低,这可能是由于 NaCl 在促进兽药转移至有机相的同时,也能够促进基质成分的转移,当过量使用 NaCl 时会导致基质效应增大,兽药的回收率降低^[17]。因此最终确定 NaCl 的用量为 1 g。

2.2.3 C₁₈-CSM 用量

为了降低基质效应并获得良好的回收率,实验考察了不同 C₁₈-CSM 用量 (10、20、30 mg) 对 5 种兽药回收率的影响。如图 3c 所示,当 C₁₈-CSM 的用量为 20 mg 时,5 种兽药均获得了良好的回收率;继续增加 C₁₈-CSM 的用量,地西洋和甲硝唑的回收率明显降低,因此最终选用 20 mg C₁₈-CSM 用于牛奶样品的前处理。

2.2.4 萃取次数

实验考察了萃取次数 (1、2 次) 对 5 种兽药回收率的影响。结果如图 3d 所示,经两次萃取后,除环丙沙星外,氧氟沙星、恩诺沙星、地西洋和甲硝唑的回收率均有所增加,但恩诺沙星、地西洋和甲硝唑的回收率大于 100%,可能是由于两次萃取操作会同时增加基质组分的萃取量。因此,为了兼顾 5 种兽药的回收率及样品前处理效率,选择萃取次数为 1 次。

2.3 吸附剂性能对比

商业分散固相萃取吸附剂 C₁₈ 是样品前处理过程中的常用吸附剂。在相同实验条件下,对 C₁₈、CSM 和 C₁₈-CSM 的萃取效果进行比较,结果如图 4 所示。将 C₁₈-CSM 作为分散固相萃取吸附剂时,5 种兽药的萃取效果最好。此外,使用 C₁₈-CSM 萃取 5 种兽药时,无需利用离心操作,分离过程简便、快捷。因此,本研究合成的 C₁₈-CSM 能够满足牛奶样品的前处理要求。

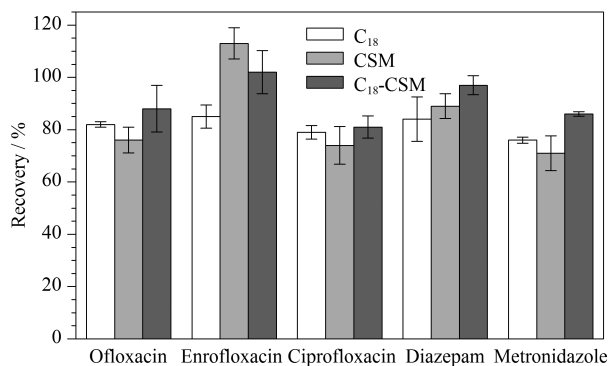


图 4 不同吸附剂材料对 5 种兽药回收率的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Effects of different adsorbent materials on the recoveries of the five veterinary drugs ($n=3$)

2.4 方法学考察

2.4.1 线性范围、检出限与定量限

在定性实验中,若目标兽药与相应标准品色谱峰的保留时间相对误差在±2.5%以内,并且二者碎片离子的质量数相对误差在±5×10⁻⁶以内,则可认为该兽药被检出^[29]。在空白牛奶样品中加入适量 100 μg/L 混合标准中间液,逐级稀释后进行测定。以信噪比(*S/N*)≥3 且符合上述定性要求的最低质量浓度为检出限(LOD);以 *S/N*≥10 且满足《实验室质量控制规范 食品理化检测》(GB/T 27404-2008)^[30]中精密度和准确度要求的最低质量浓度为定量限(LOQ)。结果如表 2 所示,5 种兽药在 0.5~100 μg/L 内线性关系良好,相关系数(*r*²)均≥0.997 0, LOD 和 LOQ 分别为 0.2 μg/L 和 0.5 μg/L。

表 2 5 种兽药的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限
Table 2 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients (*r*²), limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of the five veterinary drugs

Compound	Linear equation	<i>r</i> ²	LOD/ (μg/L)	LOQ/ (μg/L)
Ofloxacin	$Y = 1.873 \times 10^5 X + 7.583 \times 10^5$	0.9970	0.2	0.5
Enrofloxacin	$Y = 3.145 \times 10^5 X + 6.146 \times 10^5$	0.9987	0.2	0.5
Ciprofloxacin	$Y = 1.912 \times 10^5 X + 3.693 \times 10^5$	0.9986	0.2	0.5
Diazepam	$Y = 4.063 \times 10^5 X + 8.914 \times 10^5$	0.9993	0.2	0.5
Metronidazole	$Y = 1.906 \times 10^5 X + 3.174 \times 10^5$	0.9990	0.2	0.5

Y: peak area; *X*: mass concentration, μg/L. The linear ranges of the five veterinary drugs were 0.5–100 μg/L.

2.4.2 基质效应

当使用 ESI 作为电离源时,牛奶中的基质组分会与目标分析物共同被洗脱,这可能会影响目标分析物的电离效率,造成信号响应的抑制或增强,从而影响方法定量的准确性^[31]。本文考察了 C₁₈-CSM 对 5 种兽药基质效应的影响,结果如图 5 所示。经 C₁₈-CSM 净化后,5 种兽药的基质效应从 -22%~8.8% 变为 -13%~3.6%,结果表明 C₁₈-CSM 能够有效降低 5 种兽药的基质效应。

2.4.3 回收率与精密度

在空白牛奶样品中添加不同体积的 100 μg/L 混合标准中间液,制备成 1LOQ、2LOQ 和 10LOQ 3 个加标水平的牛奶样品,进行加标回收试验,每个加标水平平行测定 6 次,回收率结果见表 3。计算相对标准偏差,得到日内精密度(*intra-day* RSD);连续测定 3 天,计算日间精密度(*inter-day* RSD),结果如表 3 所示。5 种兽药在 3 个加标水平下的回收

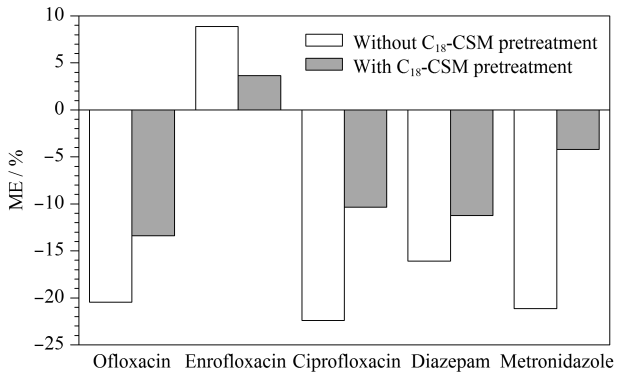


图 5 牛奶样品中 5 种兽药的基质效应
Fig. 5 Matrix effects (MEs) of the five veterinary drugs in milk samples

率为 79.5%~115%,日内精密度为 7.0%~13%,日间精密度为 1.3%~11%。实验结果表明,本方法的准确度和精密度满足 GB/T 27404-2008^[30]要求,可用于牛奶中 5 种兽药残留的检测分析。

表 3 5 种兽药的回收率和日内、日间精密度
Table 3 Recoveries, intra- and inter-day RSDs of the five veterinary drugs

Compound	Spiked level/ (μg/L)	Recovery/ % (<i>n</i> = 6)	Intra-day RSD/% (<i>n</i> = 6)	Inter-day RSD/% (<i>n</i> = 3)
Ofloxacin	0.5	95.0	13	3.4
	1	104	7.1	1.3
	5	112	9.5	3.2
Enrofloxacin	0.5	93.1	8.5	11
	1	115	13	8.8
	5	115	11	7.3
Ciprofloxacin	0.5	105	12	7.9
	1	90.6	7.0	8.3
	5	103	11	8.7
Diazepam	0.5	79.8	9.8	9.8
	1	91.0	9.5	5.8
	5	83.2	9.0	9.0
Metronidazole	0.5	97.8	9.2	4.3
	1	79.5	7.0	1.4
	5	81.0	10	4.2

2.5 与其他方法的比较

与其他文献报道方法相比,本方法具有相对低的定量限、较宽的线性范围和良好的回收率,结果见表 4。本方法能够用于牛奶中氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西泮和甲硝唑的准确测定,为牛奶样品中兽药的残留分析提供了高效、灵敏的分析方法。

2.6 实际样品分析

在超市随机选取 20 份不同品牌的牛奶样品,采用本方法进行测定,结果表明,所有样品均未检出氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西泮和甲硝唑残留。

表 4 本方法与文献报道的牛奶中兽药检测方法的比较
Table 4 Comparison of this method with reported methods for the determination of veterinary drugs in milk

Adsorption material	Detection method	Compounds	Linear range/ ($\mu\text{g/L}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/L}$)	Recoveries/%	Ref.
C ₁₈	UPLC-MS/MS	ofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin	1–100	1	79.3–119	[1]
HLB	UPLC-MS/MS	ofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin	1–200	1	83.6–119	[7]
		metronidazole	0.1–10	0.1		
HLB	UPLC-MS/MS	ofloxacin	0.5–10	0.8	66.3–91.5	[32]
		enrofloxacin, ciprofloxacin		0.1		
SPE column*	HPLC-MS	metronidazole	2.0–50	0.5	71.1–92.1	[33]
		diazepam		0.2		
C ₁₈ -CSM	UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS	ofloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, diazepam, metronidazole	0.5–100	0.5	79.5–115	this work

* cation exchange and polystyrene-divinylbenzene SPE column.

3 结论

本研究以 C₁₈-CSM 作为分散固相萃取材料,结合 UHPLC-Q/Exactive Orbitrap MS,建立了牛奶中氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西洋和甲硝唑 5 种兽药残留的分析方法。C₁₈-CSM 吸附剂的合成方法简单,成本低,基质去除率高,能够有效降低牛奶样品的基质效应。所建方法操作简单,线性范围宽,定量限低,可满足牛奶中氧氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、地西洋和甲硝唑的分析要求。

参考文献:

[1] Guo X, Tian H, Yang F, et al. Front Nutr, 2022, 9: 879518

[2] Zhang C, Deng Y, Zheng J, et al. TrAC-Trends Anal Chem, 2019, 118: 517

[3] GB 31650-2019

[4] GB 31650. 1-2022

[5] Khaled A, Singh V, Pawliszyn J. J Agric Food Chem, 2019, 67(46): 12663

[6] Gonzalez-Jartin J M, Rodriguez-Canas I, Alfonso A, et al. Food Chem, 2021, 356: 129647

[7] Wang H, Liu Q J, Han P. The Food Industry, 2020, 41(8): 312

王卉, 刘庆菊, 韩平. 食品工业, 2020, 41(8): 312

[8] Luo R L, Wu Z S, Liang C Q, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(12): 1076

罗瑞涟, 吴正双, 梁焱琼, 等. 色谱, 2022, 40(12): 1076

[9] Shang W W, Suo D C, Li T, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(8): 712

商伟伟, 索德成, 李桐, 等. 色谱, 2022, 40(8): 712

[10] Melekhin A O, Tolmacheva V V, Goncharov N O, et al. Food Chem, 2022, 387: 132866

[11] Hu M, Ben Y, Wong M H, et al. J Agric Food Chem, 2021, 69(5): 1656

[12] Kaufmann A, Butcher P, Maden K, et al. J AOAC Int, 2022, 105(4): 1030

[13] Li J, Ren X, Diao Y, et al. Food Chem, 2018, 257: 259

[14] Salis S, Rubattu N, Rubattu F, et al. Molecules, 2022, 27

(19): 6162

[15] Zheng J, Ye C, Wang P, et al. Drug Test Anal, 2021, 13(1): 148

[16] Li H, Wu J, Bai J, et al. Molecules, 2023, 28(14): 5307

[17] Tang Y, Meng H, Wang W, et al. Food Chem: X, 2023, 17: 100611

[18] Koloka O, Koulama M, Hela D, et al. Molecules, 2023, 28(16): 6130

[19] Izzo L, Narváez A, Castaldo L, et al. J Dairy Sci, 2022, 105(4): 2948

[20] De Oliverira Arias J L, Schneider A, Batista-Andrade J A, et al. Food Chem, 2018, 240: 1243

[21] Deng Q, Sun L, Zhu T. Anal Methods, 2019, 11(27): 3460

[22] Jung Y S, Kim D B, Nam T G, et al. Food Chem, 2022, 382: 132313

[23] Rekik S B, Gassara S, Bouaziz J, et al. Appl Clay Sci, 2017, 143: 1

[24] Xie J, Zhang L, Liu B, et al. ACS Appl Mater Inter, 2020, 13(1): 1956

[25] Li X, Fang Z, He X, et al. Int J Food Prop, 2021, 24(1): 1658

[26] Mehl A, Hudel L, Bucker M, et al. J Agric Food Chem, 2022, 70(35): 10886

[27] Perestrelo R, Silva P, Porto-Figueira P, et al. Anal Chim Acta, 2019, 1070: 1

[28] Saito-Shida S, Sakai T, Nemoto S, et al. Food Addit Contam A, 2017, 34(7): 1153

[29] Ministry of Agriculture. No. 289 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. (2020-05-08) [2023-08-02]. http://www.xmsyj.moa.gov.cn/zwfw/202005/t20200508_6343353.htm

农业部. 中华人民共和国农业部公告第 289 号. (2020-05-08) [2023-08-02]. http://www.xmsyj.moa.gov.cn/zwfw/202005/t20200508_6343353.htm

[30] GB/T 27404-2008

[31] Tripathy V, Sharma K K, Yadav R, et al. J Environ Sci Heal B, 2019, 54(5): 394

[32] Chen X L, Zhao G, Huang X, et al. China Dairy, 2022(6): 60

陈锡龙, 赵贵, 黄鑫, 等. 中国乳业, 2022(6): 60

[33] Guo D H, Deng X J, Zhao S Z, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2010, 38(3): 318

郭德华, 邓晓军, 赵善贞, 等. 分析化学, 2010, 38(3): 318