DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251010006
引用格式: 李聪, 郑懿, 林彬, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 7 种兽药残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(4): 113–120.
LI C, ZHENG Y, LIN B, *et al*. Determination of 7 kinds of veterinary drug residues in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(4): 113–120. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 7 种兽药残留量

李 聪*, 郑 懿, 林 彬, 刘雪芹, 王红亮, 王赤华
(黄冈市疾病预防控制中心, 湖北省卫健委食品安全风险监测重点实验室, 黄冈 438000)

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时测定牛奶中环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星(3 种氟喹诺酮类药物)、氯霉素、甲砜霉素、氟苯尼考(3 种酰胺醇类)、氮氨菲啶(1 种抗锥虫药)7 种兽药残留的方法。**方法** 牛奶样品经乙腈/0.5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液(1:1, *V*:*V*)提取, 正己烷净化, 氮气吹干, 运用 UPLC-MS/MS 对牛奶样本中 7 种兽药进行同时测定, 基质匹配外标法定量。**结果** 牛奶基质中 7 种兽药的线性范围为 1.0~200.0 μg/L, 线性关系良好(r^2 均大于 0.993), 检出限为 0.08~0.44 μg/kg, 定量限为 0.28~1.46 μg/kg。牛奶基质对 7 种兽药均产生增强的基质效应。7 种兽药在低、中、高 3 个浓度水平的加标回收率分别为 47.44%~117.89%、82.34%~112.84%、73.15%~117.69%, 相对标准偏差为 1.46%~8.26%。采用该方法对 9 份市售牛奶样本进行分析, 均未检出 7 种兽药残留。**结论** 该方法灵敏度高, 操作简便, 能够满足牛奶中 7 种兽药的快速准确检测。

关键词: 牛奶; 兽药残留; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 7 kinds of veterinary drug residues in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Cong*, ZHENG Yi, LIN Bin, LIU Xue-Qin, WANG Hong-Liang, WANG Chi-Hua
(*Huanggang Municipal Center for Disease Control and Prevention*, *Key Laboratory of Food Safety Risk Monitoring for Health Commission of Hubei Province*, *Huanggang* 438000, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 7 kinds of veterinary drug residues, including ciprofloxacin, enrofloxacin, ofloxacin (3 kinds of fluoroquinolones), chloramphenicol, thiamphenicol, flufenicol (3 kinds of amphenicols) and isometamidium (1 kind of antitrypanosomal drugs) in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Milk samples were extracted by the mixture of acetonitrile and 0.5 mmol/L ammonium formate in methanol (1:1, *V*:*V*), purified by n-hexane, dried by nitrogen. The 7 kinds of veterinary drug residues in milk samples were detected by UPLC-MS/MS

收稿日期: 2025-10-10
基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2025AFB453); 黄冈市疾控人才发展专项(42110022237T000000187)
第一作者/*通信作者: 李聪(1988—), 男, 博士, 主管技师, 主要研究方向为食品安全和环境卫生。E-mail: licongsam@126.com

and quantified by matrix matching external standard method. **Results** The linear range of 7 kinds of veterinary drugs in milk was 1.0–200.0 μg/L with good linearity (r^2 were all greater than 0.993). The limits of detection were 0.08–0.44 μg/kg, and the limits of quantitation were 0.28–1.46 μg/kg. Milk matrix had an enhanced matrix effect on all 7 kinds of veterinary drugs. The recoveries of 7 kinds of veterinary drugs at low, medium and high concentrations were 47.44%–117.89%, 82.34%–112.84%, 73.15%–117.69%, respectively. The relative standard deviations were 1.46%–8.26%. This method was used to analyze 9 samples of commercially available milk, and no residues of 7 kinds of veterinary drugs were detected in any of them. **Conclusion** This method is highly sensitive and easy to operate, and can meet the rapid and accurate detection requirements of seven kinds of veterinary drugs in milk.

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

0 引 言

牛奶营养丰富，是人民群众消费量非常高的饮品之一。为了预防和治疗奶牛疾病，畜牧场在饲养的过程中会使用兽药来降低奶牛发病率，阻断疾病传播[1−3]。常见的兽药有抗生素药物、抗球虫药、抗线虫药、抗锥虫药等[4−6]。虽然兽药会残留在奶牛体内，甚至在牛奶中，但是合理使用兽药不仅可以促进畜牧业的正常发展，而且还能保障乳制品的食品安全[7−8]。一旦兽药被滥用，长时间食用兽药残留量超标的牛奶或乳制品，这些药物就会在人体内蓄积[9−11]，可能会导致细菌耐药性增强、器官功能损害等一系列问题[12−14]。因此，加强对牛奶中各类兽药残留量的监测具有重要意义。

氟喹诺酮类药物(如环丙沙星、恩诺沙星、氧氟沙星等)和酰胺醇类药物(如氯霉素、甲砜霉素、氟苯尼考等)是两类常用的抗生素药物[15−17]，氮氨菲啶则是治疗锥虫病的常用药物[4,18]。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》和 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》规定牛奶中恩诺沙星和环丙沙星残留限量之和为 100 μg/kg，氧氟沙星、甲砜霉素、氮氨菲啶的残留限量分别是 2、50、100 μg/kg，氯霉素被禁止在食品动物中使用，氟苯尼考也被禁止在泌乳期的牛羊中使用。随着食品安全国家标准的更新，会有更多种类的兽药要求被检测并规定其残留限量，开发简便快速的多种类兽药残留分析方法具有重要意义。

目前，超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)是牛奶中多兽药残留的主要检测方法[19−21]。虽然国家标准方法没有印发同时检测氟喹诺酮类和酰胺醇类多药物残留的方法[15]，但是关于牛奶或乳制品中多种类抗生素残留的研究较多[22−24]。孙忠伟等[25]建立 UPLC-MS/MS 同时定性和定量检测牛奶中 106 种兽药残留的方法，在前处理时使用 C_{18}、氮丙级乙二胺和 Na_2SO_4 混合的固相萃取填料净化牛奶；胡飞杰等[26]使用新型固相萃取结合 UPLC-MS/MS 测定了乳品中 8 种兽药(氟喹诺酮类和酰胺醇类药物)的残留量。此外，开发牛奶中抗寄生虫药的检测方法也是研究热点之一[4]。氮氨菲啶和三氮脒均是治疗锥虫病的常用药物，已有相关研究却报道了测试方法[27−28]。然而，检测氟喹诺酮类、酰胺醇类兽药的国家标准方法，如农业部 1025 号公告-14-2008《动物性食品中氟喹诺酮类药物残留检测 高效液相色谱法》和 GB 31658.2—2021《食品安全国家标准 动物性食品中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》采用固相萃取柱净化样本，操作复杂，耗时较长。GB 31660.8—2019《食品安全国家标准 牛可食性组织及牛奶中氮氨菲啶残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》需要多次萃取与净化，文献[27–28]中的方法则需要固相萃取柱净化，不够简便快速。

鉴于此，本研究建立一种 UPLC-MS/MS 同时测定牛奶中氟喹诺酮类、酰胺醇类药物和氮氨菲啶的分析方法，为动物源性食品中多种兽药的检测方法提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

样品为市售牛奶，9 份均是全脂灭菌奶，分别是伊利、蒙牛、光明、三元品牌的产品。

环丙沙星溶液、恩诺沙星溶液、氧氟沙星溶液、氟苯尼考溶液(质量浓度 100 mg/L，以甲醇为溶剂，天津阿尔塔科技有限公司)；氯霉素溶液标准物质、甲砜霉素溶液标准物质、氯化氮氨菲啶溶液标准物质(质量浓度 100 mg/L，以甲醇为溶剂，北方伟业计量集团有限公司)；乙腈、甲醇(色谱纯，美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；氟化铵、甲酸铵(分析纯)、甲酸(色谱纯)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

1290-6475 型超高效液相色谱-串联质谱仪(配电喷雾离子源)、Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 2.7 μm)(美国 Agilent 公司)；ME204/02 型

分析天平[精度 0.1 mg, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司]; MX-S 型涡旋振荡器(北京大龙公司); Neofuge 15R 型离心机(上海力康公司); 2300TH 型超声波清洗器(上海安谱公司); MFV-24Plus 型智能氮吹仪(广州得泰公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

1.3　标准曲线溶液的配制

分别取 7 种标准溶液 0.1 mL, 用甲醇定容至 10 mL, 配制成混合标准中间液(1 mg/L)。取适量混合标准中间液, 用空白牛奶基质溶液稀释, 配制成兽药质量浓度分别为 1.0、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、200.0 mg/L 的基质匹配混合标准系列溶液。

1.4　样品处理

准确称取 5 g 牛奶试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20 mL 提取液, 乙腈/0.5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液(1:1, *V*:*V*)混匀, 置于振荡器振荡 10 min, 然后加入 10 mL 正己烷, 涡旋混匀 10 min, 6000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷, 吸出提取液于 50 mL 具塞离心管中。残渣重复提取 1 次, 合并 2 次提取液, 60 ℃氮吹至干。加入 3 mL 80%甲醇水溶液, 涡旋混匀, 超声 5 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, 供 UPLC-MS/MS 仪测定。以未检出 7 种兽药残留的牛奶作为基质样本, 按上述步骤制备牛奶基质的提取液, 用于配制 7 种兽药基质匹配标准溶液。

1.5　仪器条件

色谱条件: Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 2.7 μm); 柱温 35 ℃; 流量 0.30 mL/min; 进样量 5 μL; 流动相 A 为含 0.1%甲酸/4.5 mmol/L 甲酸铵/0.5 mmol/L 氟化铵的混合水溶液, B 为甲醇。梯度洗脱程序: 0~4 min 时, B 由 10%升至 40%; 4~8 min 时, B 保持在 40%; 8~10 min 时, B 由 40%升至 60%; 10~12 min 时, B 由 60%升至 100%; 保持至 18 min。

质谱条件: 双喷射流电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 正/负离子扫描; 干燥气温度 250 ℃, 干燥气流量 10 L/min; 鞘气温度 350 ℃, 鞘气流量 12 L/min; 雾化器压力 40.0 psi; 毛细管喷雾电压正(4000 kV)、负(3000 kV); 多反应监测模式。

1.6　数据处理

采用 Agilent MassHunter 工作站进行数据采集和定性定量分析。

2　结果与分析

2.1　色谱条件的选择

考虑 7 种兽药的极性, 本研究分别选用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 2.7 μm)、Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱(3.0 mm×150 mm, 3.5 μm)、Zorbax SB-Aq 色谱柱(3.0 mm×100 mm, 1.8 μm)进行液相色谱条件的优化。Zorbax SB-Aq 色谱柱采用烷基反相键合相, 具有亲水表面, 对亲水性化合物的保留效果非常好, 但 7 种兽药经过此柱分离后会呈现峰形拖尾的现象。Poroshell 120 EC-C_{18} 和 Zorbax Eclipse Plus C_{18} 色谱柱均采用十八烷基硅烷键合相, 但前者采用的是表面多孔颗粒填料, 后者是全多孔颗粒填料。相较而言, Poroshell 120 EC-C_{18} 色谱柱效更高, 可以实现更高的分离度。结果表明, 7 种兽药在 InfinityLab Poroshell 120 EC-C_{18} 柱中的分离效果最佳, 且色谱峰形良好。优化流动相成分时, 考虑到氟喹诺酮类药物在甲醇中的分离度较好, 本研究选用水-甲醇体系作为流动相, 考察不同的改进剂对 7 种兽药分离效果和响应强度的影响。选用甲醇作为流动相 B 相, 分别使用 0.1%甲酸水溶液、0.1%甲酸/5 mmol/L 甲酸铵混合水溶液、0.1%甲酸/4.5 mmol/L 甲酸铵/0.5 mmol/L 氟化铵混合水溶液作为流动相 A 相进行色谱分析。结果表明, A 相酸性越高, 离子化效率越强, 响应值也越大。此外, 加入氟化铵后的 A 相可以改善氯化氮氨菲啶色谱峰拖尾的现象, 因此, 选择 0.1%甲酸/4.5 mmol/L 甲酸铵/0.5 mmol/L 氟化铵混合水溶液和甲醇作为流动相。优化进样量时, 分别进样 3、5、10 μL 溶液, 结果表明进样 5 μL 时氧氟沙星和氟苯尼考的响应值最高, 而且氟喹诺酮类物质没有出现过载的峰形。综合考虑 7 种兽药的分离度、色谱峰形、响应值等因素, 优化后的色谱条件是: 色谱柱为 InfinityLab Poroshell 120 EC-C_{18} 柱, 流动相 A、B 相分别为 0.1%甲酸/4.5 mmol/L 甲酸铵/0.5 mmol/L 氟化铵混合水溶液和甲醇, 进样量为 5 μL。在此条件下, 进样 25 μg/L 的基质混合标准溶液, 7 种兽药的色谱图见图 1。

2.2　质谱条件的选择

取 7 种兽药的混合标准溶液(1000 μg/L), 选择正、负离子模式分别对目标物进行母离子扫描、二级质谱分析, 寻找母离子、定量离子、定性离子, 优化去簇电压和碰撞能量。优化后的质谱参数见表 1。

2.3　样品前处理条件优化

乙腈和甲醇可以沉淀牛奶基质中的蛋白质, 具有良好的抗基质干扰效果, 而且抗生素药物在乙腈、甲醇这类极性有机溶剂中的溶解性较好, 因此选择乙腈或甲醇作为提取液的主要成分。此外, 牛奶基质中还含有油脂, 使用正己烷萃取, 净化基质中的油脂是常见的处理方式。本研究先选用甲醇、0.1%甲酸的甲醇溶液、乙腈、0.1%甲酸的乙腈溶液作为牛奶的提取液。但使用甲醇或 0.1%甲酸的甲醇溶液时, 提取液中有大量悬浮的蛋白质, 离心和过滤均难以去除悬浮的蛋白质, 无法满足 UPLC-MS/MS 仪器的测试要求, 故放弃这 2 种提取液。参考 GB 31660.8—2019 使用甲

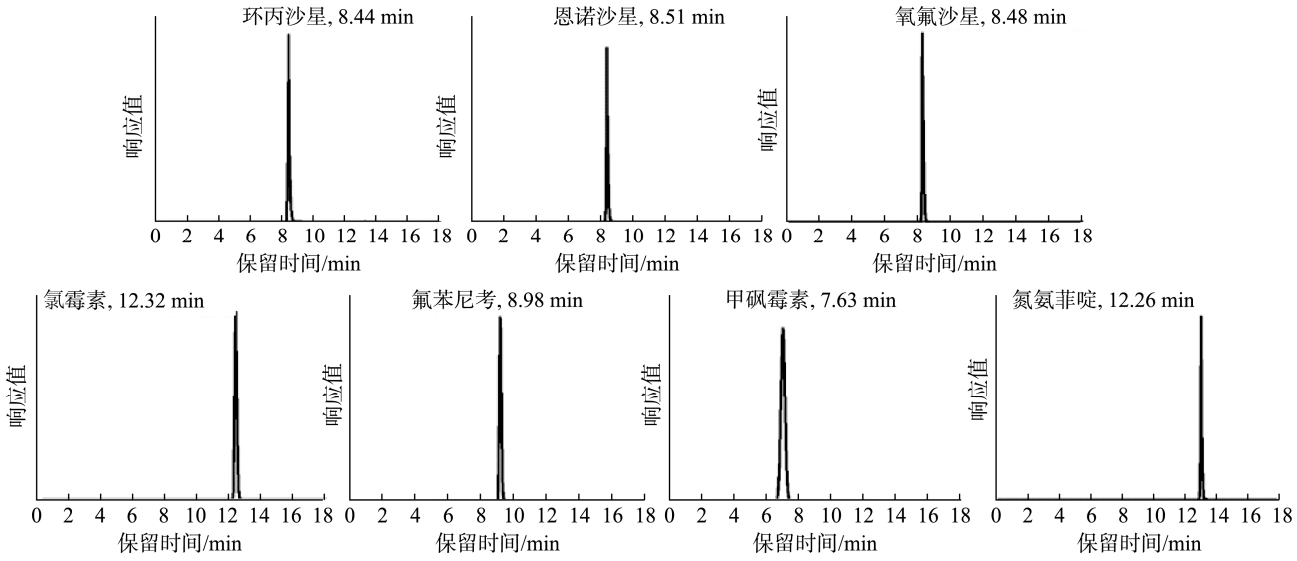


图 1 7 种兽药在最佳实验条件下的色谱图

Fig.1 Chromatogram of 7 kinds of veterinary drugs under optimal experimental condition

表 1 7 种兽药的保留时间和质谱参数

Table 1 Retention times and mass spectrometry parameters of 7 kinds of veterinary drugs

兽药	保留时间/min	电离模式	离子对(*m*/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV	驻留时间/ms
环丙沙星	8.44	ESI+	332.1/314*	149	20	100
			332.1/288		25	100
			332.1/245		40	100
			332.1/231		48	100
氧氟沙星	8.48	ESI+	362.2/318.2*	149	20	100
			362.2/261.1		40	100
恩诺沙星	8.51	ESI+	360.2/342.2*	156	16	100
			362.2/316.2		20	100
			362.2/245.1		32	100
氟苯尼考	8.98	ESI-	355.9/335.9*	117	20	100
			355.9/185.0		5	100
氯霉素	12.32	ESI-	321.0/257.0*	107	15	100
			321.0/152.0		10	100
甲砜霉素	7.63	ESI-	353.9/290.0*	107	20	100
			353.9/185.0		10	100
氮氨菲啶	12.26	ESI+	460.3/313.2*	120	20	100
			460.3/298.1		30	100

注: *代表定量离子。

酸铵的甲酸溶液, 本研究选用乙腈(a)、0.1%甲酸的乙腈溶液(b)、0.5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液(c)、乙腈/0.5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液(1:1, *V*:*V*) (d)作为提取液, 分别对同一种牛奶样品进行提取实验(每一份样品都加入 75 μg/L 混合标准溶液), 然后加入正己烷净化, 并再重复提取一次, 平行测定 6 次, 计算 7 种兽药的回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表 2。完全不含乙腈的提取液 c 的加标回收率最小, 说明乙腈相较于甲醇具有更好的提取效果。此外, 提取液 a 和提取液 b 的差异说明酸性较强的提取液效果更好, 氮氨菲啶是偏碱性药物, 酸性环境更利于从牛奶中提取出来[27]。在 4 种提取液中, 提取液 b 和提取液 d 的效果相对较好, 7 种兽药的加标回收率基本满足检测分析的要求。但使用提取液 d 后环丙沙星的回收率高于使用提取液 b, 因此选用提取液 d 作为牛奶样品的提取液。

表 2　7 种兽药经过不同提取方法的回收率和 RSDs (*n*=6)

Table 2　Recoveries and RSDs of 7 kinds of veterinary drugs after different extraction process (*n*=6)

兽药	提取液 a		提取液 b		提取液 c		提取液 d	
	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%
环丙沙星	67.29	3.69	82.01	3.57	48.71	3.83	90.91	3.14
恩诺沙星	97.02	4.41	106.82	4.93	80.11	4.23	102.96	2.37
氧氟沙星	102.29	1.66	106.63	2.56	73.22	4.18	103.96	1.96
甲砜霉素	97.91	4.11	95.79	5.40	67.68	2.82	102.04	2.13
氯霉素	98.71	5.91	104.80	5.71	71.73	3.44	117.69	2.18
氟苯尼考	107.83	6.35	107.25	5.41	83.05	4.97	116.02	2.02
氮氨菲啶	62.48	4.60	75.29	4.44	50.30	3.34	73.15	4.39

2.4　线性关系、检出限与定量限

按照仪器工作条件依次测试基质匹配混合标准溶液, 以 7 种兽药的质量浓度为横坐标(X, μg/L), 其对应的峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。结果显示, 7 种兽药在 1.0~200.0 μg/L 的范围内具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)均大于 0.993。分别以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)计算检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ), 7 种兽药的 LODs 为 0.08~0.44 μg/kg, LOQs 为 0.28~1.46 μg/kg, 见表 3。将本研究与文献方法进行对比, 结果见表 4。在前处理上, 本研究和文献方法基本都采用提取和除脂净化的方式, 提取液的选择受多种因素的影响, 但除脂净化大多采用固相萃取或正己烷液液萃取的方法。相较于烦琐的固相萃取柱净化步骤, 本研究使用正己烷除脂操作简便。此外, 相比于其他文献只检测 1 个类别的兽药, 本研究同时检测 3 个类别的 7 种兽药, 具有更广的适用范围。而且本研究降低了氟喹诺酮类和氮氨菲啶的 LOD, 尤其是氮氨菲啶, 本研究明显提高了牛奶基质中的检测灵敏度。此外, 本研究氟喹诺酮类和氮氨菲啶的 LOD 也低于 GB/T 21312—2007《动物源性食品中 14 种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》和 GB 31660.8—2019 的值。本研究酰胺醇类兽药的 LOD 高于其他文献, 结果不是很理想, 尤其是氯霉素, LOD 还高于 GB 31658.20—2022《食品安全国家标准 动物性食品中酰胺醇类药物及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》的值, 说明本研究仍需进一步改进。本研究甲砜霉素和氟苯尼考的 LOD 低于国标方法。综合比较 7 种兽药的 LOD, 本研究具有良好的灵敏度, 能够满足牛奶中多兽药分析的要求。

2.5　方法的准确度与精密度

按照实验方法对空白牛奶样品进行低、中、高 3 个浓度水平的加标回收实验。氧氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星的低水平加标浓度为 5.0 μg/L, 其余 4 种兽药为 7.5 μg/L。7 种兽药的中、高水平加标浓度分别为 15.0 μg/L、75.0 μg/L。每个加标浓度水平平行测定 6 次, 计算回收率和 RSD。结果见表 3, 低、中、高 3 个浓度水平的加标回收率分别为 47.44%~117.89%、82.34%~112.84%、73.15%~117.69%, RSDs 为 1.46%~8.26%, 准确度与精密度良好, 符合实际检测需求。

表 3　7 种兽药在牛奶基质中的 LODs、LOQs、回收率和 RSDs (*n*=6)

Table 3　LODs, LOQs, recoveries and RSDs of 7 kinds of veterinary drugs in milk matrix (*n*=6)

兽药	LODs/(μg/kg)	LOQs/(μg/kg)	5.0 μg/L 或 7.5 μg/L		15.0 μg/L		75.0 μg/L	
			平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%
环丙沙星	0.13	0.42	66.51	8.19	90.78	2.35	90.91	3.14
恩诺沙星	0.42	1.40	71.11	8.26	83.12	1.46	102.96	2.37
氧氟沙星	0.13	0.44	117.03	4.18	88.34	2.43	103.96	1.96
甲砜霉素	0.29	0.98	47.44	6.58	86.24	1.59	102.04	2.13
氯霉素	0.38	1.28	117.89	5.17	112.84	4.06	117.69	2.18
氟苯尼考	0.44	1.46	77.72	4.01	109.77	2.71	116.02	2.02
氮氨菲啶	0.08	0.28	91.77	4.41	82.34	2.66	73.15	4.39

表 4 本研究与文献方法的比较

Table 4 Comparison between the detection method in this study and published methods

样品	待测物	前处理方式	LOD/(μg/kg)	文献
牛奶	氟苯尼考	2%氨化乙酸乙酯+正己烷除脂	0.5	[21]
牛奶	氟喹诺酮类	1%甲酸乙腈溶液+HLB 固相萃取柱	0.6	[24]
牛肌肉	氮氨菲啶	60%乙腈水溶液+WCX 固相萃取柱	10	[27]
牛奶	氮氨菲啶	50%乙酸水溶液/乙腈(1:499, *V*:*V*)+正己烷除脂	5	[28]
鸡肉、鸡蛋	酰胺醇类	80%乙腈水溶液+HLB 固相萃取柱	0.05~0.10	[29]
鸡蛋	酰胺醇类	氨水/乙酸乙酯(1:30, *V*:*V*)+正己烷除脂	0.05~0.15	[30]
猪肉、鸡肉	氟喹诺酮类	1%甲酸乙腈溶液+增强型脂质去除净化剂	1.0	[31]
禽蛋	氟喹诺酮类	C_{18} 固相萃取柱	1.5~6.7	[32]
牛奶	氮氨菲啶	乙腈/0.5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液(1:1, *V*:*V*)+正己烷除脂	0.08	本研究
	酰胺醇类		0.29~0.44	
	氟喹诺酮类		0.13~0.42	

2.6 基质效应

牛奶基质复杂，含有较多物质，这些物质对目标分析物的浓度测试产生干扰作用为基质效应。向空白基质溶液和纯溶剂中分别添加相同含量的待测物，它们响应值的比值反映基质效应的强弱。分别在 50.0、100.0、200.0 μg/L 3 个质量浓度时计算牛奶对 7 种兽药的基质效应，结果显示 7 种兽药的基质效应为 109.65%~157.68%，见表 5。基质效应大于 115%为基质增强效应，牛奶基质对 7 种兽药均表现为基质增强效应。本研究采用液液萃取作为样品前处理方法，某些兽药的加标回收率大于 115%，与同样使用液液萃取的文献结果是一致的[7,30]，可能是基质中的脂类放大了电喷雾电离程度，导致基质增强效应。目前检测氮氨菲啶的方法或者文献均没有报道其内标物质，无法使用内标法对 7 种兽药进行定量测试，因此，采用基质匹配标准曲线可以确保分析结果的准确性和可靠性。

2.7 稳定性

为了评估基质匹配标准曲线适用的环境条件，将添加了 100 μg/L 兽药标准品的基质溶液分别于–20、4、20 ℃温度下放置 7 d，以基质溶液放置 7 d 后的测试浓度相比于初始浓度的相对偏差评估其稳定性，结果见表 5。基质溶液在–20 ℃和 4 ℃温度下放置 7 d 后析出大量白色沉淀，非常浑浊，无法进行分析测试。基质溶液在 20 ℃下放置 7 d 后，兽药的测试浓度相对偏差的绝对值远大于 5%，说明基质溶液在此温度下非常不稳定。因此，为保证测试结果的准确性，基质匹配标准溶液应当现用现配。

2.8 实际样品检测

按照实验方法，分别对产地为黑龙江、新疆、湖北、河北、宁夏、河南的 9 份灭菌全脂牛奶样品进行检测，结果显示 7 种兽药均未在这 9 份牛奶样品中检出。

表 5 7 种兽药在牛奶中的基质效应和牛奶基质溶液的稳定性

Table 5 Matrix effects of 7 kinds of veterinary drugs in milk and stability of milk matrix solution

兽药	基质效应/%	20 ℃储存时牛奶基质溶液的稳定性		
		初始值/(μg/L)	7 d 后测试值/(μg/L)	相对偏差/%
环丙沙星	121.13~137.97	100	77.61	–22.39
恩诺沙星	109.65~120.71	100	51.84	–48.16
氧氟沙星	131.22~144.75	100	82.43	–17.57
甲砜霉素	150.32~157.68	100	63.47	–36.53
氯霉素	127.99~133.56	100	119.58	19.58
氟苯尼考	139.59~150.58	100	73.38	–26.62
氮氨菲啶	139.34~147.63	100	68.44	–31.56

3 结 论

本研究基于 UPLC-MS/MS 开发了一种同时检测牛奶中氟喹诺酮类、酰胺醇类兽药和氮氨菲啶的分析方法。本研究采用液液萃取法，一次性完成 7 种兽药的萃取与净化，大幅简化了前处理操作。本研究中氟喹诺酮类兽药的 LODs 为 0.13~0.42 μg/kg, LOQs 为 0.42~1.40 μg/kg，酰胺醇类兽药的 LODs 为 0.29~0.44 μg/kg, LOQs 为 0.98~1.46 μg/kg,

氮氨菲啶的 LOD 为 0.08 μg/kg, LOQ 为 0.28 μg/kg, 相比于其他研究团队的方法, 本研究降低了氟喹诺酮类兽药和氮氨菲啶的 LOD 与 LOQ。本研究也存在不足, 甲砜霉素在低浓度水平的加标回收率较低, 氯霉素的检测灵敏度较低, 需要在后续的工作中继续优化。

综上, 本研究方法简便、高效、灵敏, 对开发牛奶中多兽药残留的检测方法具有借鉴意义, 为检测动物制品中更广泛的兽药残留提供参考依据。

参考文献

[1] 张宇, 崔勇. 动物源性食品中抗菌药物残留检测技术的研究进展[J]. 中国卫生工程学, 2023, 22(5): 717–720.
ZHANG Y, CUI Y. Research progress on detection of antimicrobial residues in animal-origin foods [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2023, 22(5): 717–720.

[2] 陈秀英, 李爱军, 李明阳, 等. 动物源性食品中兽药残留前处理及检测技术研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2025, 52(4): 1914–1923.
CHEN XY, LI AIJ, LI MY, *et al*. Research progress on pretreatment and detection of veterinary drug residues in food of animal origin [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 52(4): 1914–1923.

[3] 劳柏豪, 张静娴, 于泓, 等. 动物源性食品中禁用兽药监管及检测策略研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(22): 236–247.
LAO BH, ZHANG JX, YU H, *et al*. Research progress on regulatory and detection strategies for prohibited veterinary drugs in animal-derived foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(22): 236–247.

[4] 张申平, 王安琪, 秦宇, 等. 乳及乳制品中抗寄生虫药检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(2): 64–73.
ZHANG SP, WANG ANQ, QIN Y, *et al*. Research progress on detection of antiparasites in milk and dairy products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(2): 64–73.

[5] 刘成文, 曾懿, 孙丽萍. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中硝基呋喃类代谢物、三苯甲烷类、磺胺类、喹诺酮类和酰胺醇类药物残留[J]. 农产品质量与安全, 2023(4): 8074–8093.
LIU CW, ZENG Y, SUN LP. Simultaneous determination of nitrofuran metabolites, tri-phenylmethane, sulfonamides, quinolones and amphenicols in aquatic products by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Quality and Safety of Agro-Products, 2023(4): 8074–8093.

[6] 王鼎南, 吴新雅, 李诗言, 等. 通过式固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中多种氟喹诺酮类和苯二氮䓬类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 26–36.
WANG DN, WU XY, LI SY, *et al*. Determination of multiple fluoroquinolones and benzodiazepines in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pass-through solid phase extraction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 26–36.

[7] 高家政, 尹营, 霍思宇, 等. 牛奶中四环素类药物残留检测技术研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(8): 19–25.
GAO JZ, YIN Y, HUO SY, *et al*. Research progress on detection of tetracycline residues in milk [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2024(8): 19–25.

[8] 韩伟. 鸡蛋中喹诺酮残留量检测方法分析研究[J]. 广州化工, 2025, 53(15): 96–98.
HAN W. Analysis and research on detection method of quinolone residues in eggs [J]. Guangzhou Chemical Industry, 2025, 53(15): 96–98.

[9] 徐新, 孙文芳, 徐杰, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定人尿液中 40 种抗生素的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2023, 59(5): 591–598.
XU X, SUN WF, XU J, *et al*. Simultaneous determination of residues of 40 antibiotics in human urine by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2023, 59(5): 591–598.

[10] 张楠, 唐增煦, 王莉莉, 等. 超高效液相色谱-串联质谱筛查确证尿液中磺胺、喹诺酮与四环素抗生素[J]. 分析测试学报, 2023, 42(10): 1343–1350.
ZHANG N, TANG ZX, WANG LL, *et al*. Study on the method for the identification of sulfanilamide, quinolone and tetracycline in urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(10): 1343–1350.

[11] 李颖, 黄鑫, 邹子玉, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱同时测定鸡粪中 27 种抗生素[J]. 环境化学, 2023, 42(12): 4185–4194.
LI Y, HUANG X, ZOU ZY, *et al*. Simultaneous determination of 27 antibiotics in chicken manure based on solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(12): 4185–4194.

[12] 王姝婷, 黄希汇, 刘少颖, 等. 市售鸡肉与鸡蛋中四环素类抗生素残留调查与膳食暴露风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(7): 1063–1066.
WANG ST, HUANG XH, LIU SY, *et al*. Investigation and dietary exposure risk assessment of tetracycline antibiotics residues in eggs and chicken sold on the market [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(7): 1063–1066.

[13] 肖永华, 革丽亚, 粱高道, 等. 湖北省鸡肉和鸡蛋中多组分抗生素残留分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 292–296.
XIAO YH, GE LY, LIANG GD, *et al*. Occurrence of multi-antibiotics in chicken and egg samples in Hubei [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 292–296.

[14] 汪海珍, 许红霞, 李朔, 等. 动物源性食品中酰胺醇类兽药残留检测的样品前处理技术研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2023, 57(7): 68–76.
WANG HZ, XU HX, LI S, *et al*. Research progress of sample pretreatment technology for detection of amphenicols drugs residues in animal-derived food [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2023, 57(7): 68–76.

[15] 管凡荀, 高鹏飞, 汤亚云, 等. 基于液相色谱和液质联用法的动物源性食品中氟喹诺酮类与酰胺醇类药物残留检测研究进展[J]. 食品工业科技, 2023, 44(6): 448–458.
GUAN FX, GAO PF, TANG YY, *et al*. Research progress on residue detection of methods of fluoroquinolones and amphenicols in animal-derived foods based on liquid chromatographic and liquid chromatographic mass spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 44(6): 448–458.

[16] 陈伟妍, 何洁怡, 彭嘉宜, 等. 液质联用仪在动物源食品中喹诺酮类和磺胺类药物残留检测方法的研究[J]. 中国食品工业, 2022(17): 108–111, 116.
CHEN WY, HE JY, PENG JY, *et al*. Study on the detection of quinolones

and sulfonamides residues in animal-origin foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Food Industry, 2022(17): 108–111, 116.

[17] 张振宇, 崔海燕, 王勇. 动物源性食品中酰胺醇类药物残留检测研究进展[J]. 食品与机械, 2024, 41(2): 233–239.
ZHANG ZY, CUI HY, WANG Y. Research progress in the detection of amide alcohol drugs in animal-origin foods [J]. Food & Machinery, 2024, 40(2): 233–239.

[18] 季宝成, 杨澜瑞, 韩雨, 等. 动物源性食品兽药多残留检测中基质净化与液相色谱-质谱联用技术研究进展[J]. 轻工学报, 2023, 38(5): 8–16.
JI BC, YANG LR, HAN Y, *et al*. Research progress on matrix purification combined with LC-MS method for the detection of veterinary drug residues in animal-origin derived foods [J]. Journal of Light Industry, 2023, 38(5): 8–16.

[19] 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]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(5): 255–261.

[20] 张逸雪. 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱法检测牛奶及其制品中恩诺沙星、头孢拉定、阿莫西林和氯霉素残留[J]. 分析仪器, 2022(4): 20–25.
ZHANG YX. Determination of enrofloxacin, cefradine, amoxicillin and chloramphenicol residues in milk and its products by UPLC-MS/MS [J]. Analytical Instrumentation, 2022(4): 20–25.

[21] 徐舒然. 液相色谱-串联质谱法测定乳品中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留量[J]. 食品安全导刊, 2024(27): 51–53.
XU SR. Determination of flufenicol and flufenicol amine residues in dairy products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2024(27): 51–53.

[22] 严祖浩, 李晓薇, 夏曦. 牛奶中 69 种兽药残留的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱快速筛查[J]. 分析测试学报, 2023, 42(10): 1309–1318.
YAN ZH, LI XW, XIA X. Rapid screening of 69 veterinary drug residues in milk by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-off light mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(10): 1309–1318.

[23] 何誉, 董叶箐, 余鹏飞, 等. 市售牛奶中抗生素的残留检测分析[J]. 中国食品工业, 2024(9): 71–73.
HE Y, DONG YJ, YU PF, *et al*. Detection of antibiotic residues in commercial milk [J]. China Food Industry, 2024(9): 71–73.

[24] 张瑞婷. 超高效液相串联质谱法测定牛奶中 8 种氟喹诺酮类兽药残留[J]. 食品安全导刊, 2023(16): 115–117.
ZHANG RT. Determination of 8 fluoroquinolones veterinary drug residues in milk by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2023(16): 115–117.

[25] 孙忠伟, 汪龙飞, 鲍蕾. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(24): 30–41.
SUN ZW, WANG LF, BAO L. Simultaneous qualitative and quantitative determination of 106 kinds of veterinary drug residues in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(24): 30–41.

[26] 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]. Food and Fermentation Science & Technology, 2022, 58(2): 124–129.

[27] 周雨卉, 曾振灵, 余静贤, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛组织中三氮脒和氯化氮氨菲啶残留[J]. 色谱, 2017, 35(9): 995–1002.
ZHOU YH, ZENG ZL, YU JX, *et al*. Simultaneous determination of diminazene aceturate and isometamidium chloride residues in cattle tissues by high performance liquid chromatography with solid-phase extraction [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(9): 995–1002.

[28] 汤晨. UPLC-MS/MS 测定牛奶中三氮脒和氮氨菲啶残留[J]. 食品工业, 2023, 44(9): 240–243.
TANG C. Determination of diminazene aceturate and isometamidium chiorde in milk by UPLC-MS/MS [J]. The Food Industry, 2023, 44(9): 240–243.

[29] 张苏珍, 陶威, 葛敏, 等. 鸡肉和鸡蛋中 4 种酰胺醇类药物残留的液相色谱-三重四级杆串联质谱分析[J]. 现代农业科技, 2024(1): 159–163.
ZHANG SZ, TAO W, GE M, *et al*. Analysis of four amphenicol residues in chicken and eggs by UPLC-MS/MS [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2024(1): 159–163.

[30] 卜宁霞, 陈娟, 李永琴, 等. 鸡蛋中酰胺醇类药物及其代谢物残留检测超高效液相色谱-串联质谱法建立[J]. 药物分析杂志, 2022, 42(9): 1625–1633.
BU NX, CHEN J, LI YQ, *et al*. Determination of amphenicol antibiotics and metabolite residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2022, 42(9): 1625–1633.

[31] 秦宇, 薛峰, 俞君杰, 等. 增强型脂质去除净化剂结合液质联用法同时测定水产和畜禽产品中氟喹诺酮和磺胺类药物残留[J]. 食品与机械, 2025, 41(1): 63–73.
QIN Y, XUE F, YU JJ, *et al*. Determination of quinolones and sulfonamides residues in aquatic products and livestock products with enhanced matrix removal-lipid adsorbent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food and Machinery, 2025, 41(1): 63–73.

[32] 郭博文, 沈俊琪, 张晨煦, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定禽蛋中 7 种氟喹诺酮残留[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(7): 158–163.
GUO BW, SHEN JQ, ZHANG CX, *et al*. Detection of seven fluoroquinolones residues in poultry eggs by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Food Research and Development, 2025, 46(7): 158–163.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)