

## 标准物质与标准品

## 牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶高准确度分析方法研究与标准物质研制

李瑶瑶<sup>1,2</sup>, 杨吉双<sup>3</sup>, 李秀琴<sup>1</sup>, 时玲<sup>1</sup>, 高燕<sup>\*1</sup>, 张庆合<sup>\*1</sup>

(1. 中国计量科学研究院 化学计量与分析科学研究所, 北京 100029;

2. 中国石油大学(北京) 化学工程与环境学院, 北京 102249; 3. 中国信息通信研究院, 北京 100191)

**摘要:**建立了基于液相色谱-同位素稀释质谱法(LC-IDMS)的牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶残留测定的高准确度分析方法,采用同位素稀释单点校准定量,恩诺沙星和磺胺嘧啶的加标回收率分别为 $(99.0 \pm 0.8)\%$ 和 $(100.4 \pm 1.2)\%$ ,基质效应因子分别为0.999 1和1.011 9。采用添加法制备牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶标准物质候选物,进行了标准物质均匀性检验、稳定性检验和定值,评定了不确定度。标准物质均匀性、稳定性良好,恩诺沙星特性量值为729 ng/g,扩展不确定度为42 ng/g ( $k=2$ ),磺胺嘧啶特性量值为413 ng/g,扩展不确定度为31 ng/g ( $k=2$ )。该标准物质的研制能够应用于食品中恩诺沙星和磺胺嘧啶等相关兽药残留检测的质量控制、方法开发和验证等领域,进而保障相关检测结果的准确性、可比性。

**关键词:**牛肉粉;恩诺沙星;磺胺嘧啶;同位素稀释质谱法;标准物质

**中图分类号:**TS210.7 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-3283(2024)05-0093-07

**DOI:**10.13822/j.cnki.hxsj.2023.0814

**Development of an Accurate Determination Method and Reference Material for Enrofloxacin and Sulfadiazine in Bovine Powder** LI Yao-yao<sup>1,2</sup>, YANG Ji-shuang<sup>3</sup>, LI Xiu-qin<sup>1</sup>, SHI Ling<sup>1</sup>, GAO Yan<sup>\*1</sup>, ZHANG Qing-he<sup>\*1</sup> (1. Division of Chemical Metrology and Analytical Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China; 2. College of Chemical Engineering and Environment, China University of Petroleum (Beijing), Beijing 102249, China; 3. China Academy of Information and Communications Technology, Beijing 100191, China)

**Abstract:** A liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry (LC-IDMS) method was established for the precise determination of enrofloxacin and sulfadiazine in bovine powder. Isotope dilution single point calibration method was applied for quantification. The matrix spiked recoveries of enrofloxacin and sulfadiazine were found to be  $(99.1 \pm 0.8)\%$  and  $(100.4 \pm 1.2)\%$ , respectively, with corresponding matrix effect factors of 0.999 1 and 1.011 9. To prepare the reference material, enrofloxacin and sulfadiazine standard solution were spiked into bovine muscle samples. Subsequently, the developed LC-IDMS method was utilized in homogeneity testing, stability testing, and value assignment. With an evaluation of the uncertainty of the reference material. The results indicated remarkable homogeneity and stability of enrofloxacin and sulfadiazine in bovine powder, characterized by values of 729 ng/g with uncertainty of 42 ng/g ( $k=2$ ), and 413 ng/g with uncertainty of 31 ng/g ( $k=2$ ), respectively. This reference material can play a pivotal role in quality control, method development, and validation of veterinary drug residue detection in food, thereby ensuring the accuracy and comparability in related detection outcomes.

**Key words:** bovine powder; enrofloxacin; sulfadiazine; isotope dilution mass spectrometry; reference material

收稿日期:2023-12-05;网络首发日期:2024-02-21

基金项目:国家市场监督管理总局科技计划资助项目(2021MK156);中央级公益性科研院所基本科研业务费资助项目(AKYZZ2117)。

作者简介:李瑶瑶(1999-),女,山东济宁人,硕士生,主要研究方向为环境化学。

通讯作者:高燕, E-mail: gaoyan@nim.ac.cn; 张庆合, E-mail: zhangqh@nim.ac.cn。

引用本文:李瑶瑶, 杨吉双, 李秀琴, 等. 牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶高准确度分析方法研究与标准物质研制[J]. 化学试剂, 2024, 46(5): 93-99。

氟喹诺酮类药物 (Fluoroquinolones, FQs) 是一类以 4-喹诺酮为基本结构的抗生素类药物,磺胺类药物 (Sulfonamides, SAs) 是以对氨基苯磺酰胺为基本结构的抗生素类药物,两类药物均可应用于预防和治疗细菌感染性疾病,具备生物利用度高、抗菌谱广等特点<sup>[1-4]</sup>。但相关药物残留可能会导致细菌耐药性、过敏等不良反应<sup>[5,6]</sup>。

恩诺沙星 (Enrofloxacin, ENR) 和磺胺嘧啶 (Sulfadiazine, SDZ) 分别是典型的氟喹诺酮类药物和磺胺类药物,应用较为广泛,能够在动物体内累积。我国 GB 31650—2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》规定动物肌肉中恩诺沙星和环丙沙星总的最大残留限量为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,动物肌肉中包括磺胺嘧啶在内的磺胺类药物的总残留限量为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国农业部发布的 2020 年食用农产品市场监管部门抽检不合格情况分析汇总中,恩诺沙星和磺胺类药物均为市场销售畜禽类食品抽检中的主要不合格项目<sup>[7]</sup>,由于畜禽肉基体复杂,相关测量的准确度值得关注。

为保障测量结果的准确性和可比性,国际物质的量委员会 (CCQM) 开展了“牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶测量 (CCQM K141)”的国际关键计量比对<sup>[8]</sup>。基体标准物质可应用于分析方法开发、质量控制、方法验证等领域,保障检测数据质量<sup>[9,10]</sup>。本研究开发了基于液相色谱-同位素稀释质谱法的牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶高准确度分析方法,并制备牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶标准物质,开展均匀性检验、稳定性检验、定值和不确定度评定。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器与试剂

LC30A 型超高效液相色谱 (日本 Shimada 株式会社)-联用 API5500 型质谱 (美国 AB 公司); ME614S 型电子天平 (德国 Sartorius 公司); CR21GIII 型离心机 (日本 Hitachi 公司); Transsonic Digital S 型超声仪 (德国 Elma 公司); KS260 型振荡摇床, Eurostar 20 型匀浆仪 (德国 IKA 公司); Vortex-Genie 2 型涡旋混合器 (美国 Scientific Industries 公司); N-EVAP 111 型氮吹仪 (美国 Organomation Associates 公司); OASIS HLB 型固相萃取柱 (6 mL, 150 mg, 美国 Waters 公司)。

甲醇、乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 超纯

水 (18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ )、甲酸 (色谱纯) (赛默飞世尔科技有限公司); 三氯乙酸 ( $\geq 99.5\%$ , 德国 Sigma-Aldrich 公司); 磺胺嘧啶纯度标准物质 (GBW (E) 060901, 纯度 99.6%, 相对扩展不确定度 0.4% ( $k=2$ ))、恩诺沙星纯度标准物质 (GBW 10155, 纯度 99.6%, 相对扩展不确定度 0.2% ( $k=2$ )) (中国计量科学研究院);  $\text{D}_5$ -恩诺沙星同位素内标 (CH005, 化学纯度 99%, 同位素丰度  $>99.0\%$ , 德国 Witega 公司);  $^{13}\text{C}_6$ -磺胺嘧啶同位素内标 (S699052, 化学纯度 98%, 同位素丰度 99.8%, 加拿大 TRC 公司)。

### 1.2 标准溶液制备

准确称取恩诺沙星、磺胺嘧啶、恩诺沙星同位素内标及磺胺嘧啶同位素内标, 采用甲醇溶剂配制目标物及内标储备液。

采用甲醇溶剂, 配制恩诺沙星同位素内标及磺胺嘧啶同位素内标混合溶液。

以样品中的浓度为参考, 使校准工作溶液中的浓度与进样时样品中的浓度接近, 目标物与同位素标记物的峰面积接近 1, 采用 10% 甲醇-甲酸水配制校准工作溶液。

### 1.3 标准物质制备

采用添加法进行标准物质制备。购买 10 kg 牛肉, 采用绞肉机搅碎均质, 添加磺胺嘧啶和恩诺沙星, 搅拌混合, 冷冻干燥, 失水率 75%, 冻干牛肉粉进行粉碎后, 过 40 目筛; 混匀, 进行浓度初测; 棕色塑料瓶分装, 充氮后密封, 制备标准物质 200 瓶, 每瓶 3 g, 辐照后于温度  $<-18\text{ }^\circ\text{C}$  保存。

### 1.4 样品前处理

提取: 称取 0.25 g 样品, 精确至 0.000 1 g, 添加 0.75 g 水, 涡旋混匀, 平衡 0.5 h。加入内标溶液, 准确称重, 精确至 0.000 1 g, 涡旋混匀, 平衡 0.5 h。加入 10 mL 5% 三氯乙酸水溶液, 振荡 20 min 提取。重复提取 1 次, 合并提取液。低浓度样品取 1/5 提取液, 超纯水稀释至 20 mL 进行后续净化步骤。

净化: OASIS HLB 固相萃取柱经 6 mL 甲醇、6 mL 水活化后, 提取液过 HLB 柱, 6 mL 5% 甲醇水淋洗, 弃去淋洗液, 抽干后, 用 8 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 40  $^\circ\text{C}$  水浴, 氮气吹干, 残渣用 1 mL 溶液 ( $V(\text{甲醇}):V(0.1\% \text{甲酸水})=1:1$ ) 溶解, 涡旋混匀, 14 000 r/min 高速离心 10 min, 供 HPLC-MS/MS 测定。

## 1.5 仪器方法

色谱柱采用 X-Terra 色谱柱(3.5  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm $\times$ 100 mm), 进样量为 5  $\mu\text{L}$ 。流动相为 0.1% 甲酸水溶液(A) 和甲醇(B), 流速为 0.2 mL/min。流动相洗脱梯度为 0~0.5 min, 10% B; 0.5~3 min, 由 10% B 升至 30% B; 3~7 min, 30% B; 7~7.5 min, 由 30% B 升至 90% B; 7.5~10 min, 90% B; 10~11 min, 由 90% B 降至 10% B; 11~15 min, 10% B。

质谱采用电喷雾电离源(ESI), 工作模式为正离子模式, 电喷雾电压为 5 500 V, 离子源温度为 600  $^{\circ}\text{C}$ , 母离子、子离子及相应的质谱参数见表 1。

表 1 母离子、子离子及相应质谱参数<sup>注</sup>

| Tab.1 Parent ions, product ions and MS parameters |               |                 |      |          |
|---------------------------------------------------|---------------|-----------------|------|----------|
|                                                   | 母离子 ( $m/z$ ) | 子离子 ( $m/z$ )   | DP/V | CE/V     |
| 磺胺嘧啶                                              | 251.1         | 155.9*<br>107.8 | 46   | 21<br>31 |
| $^{13}\text{C}_6$ -磺胺嘧啶                           | 257.1         | 161.9*<br>113.8 | 46   | 21<br>31 |
| 恩诺沙星                                              | 360.2         | 316.2*<br>245.1 | 191  | 27<br>37 |
| D <sub>5</sub> -恩诺沙星                              | 365.2         | 321.2*<br>245.1 | 191  | 27<br>37 |

注: \* 代表定量离子。

## 2 结果与讨论

### 2.1 仪器方法优化

对于恩诺沙星及磺胺嘧啶的液相色谱质谱分析多采用 C18 色谱柱<sup>[11-14]</sup>, 本研究比较 XTerra C18、BEH C18 及 CSH C18 色谱柱, XTerra 能够实现恩诺沙星和磺胺嘧啶的分离, 且两种化合物峰型较好, 因此选用 XTerra 色谱柱。进行流动相条件优化, 添加甲酸以提高恩诺沙星及磺胺嘧啶的离子化效率, 进而提高响应和灵敏度, 经优化, 在水相中添加 0.1% 甲酸, 优化后色谱分离见图 1。

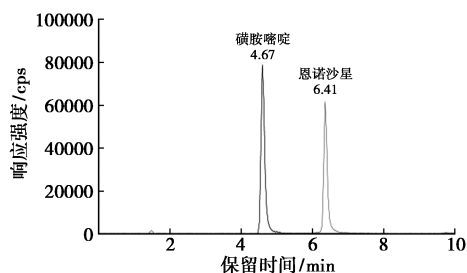


图 1 磺胺嘧啶、恩诺沙星色谱图

Fig.1 Chromatograms of enrofloxacin and sulfadiazine

优化恩诺沙星及磺胺嘧啶质谱参数, 对于恩诺沙星和磺胺嘧啶母离子进行去簇电压(Declustering Potential, DP)优化, 恩诺沙星在 191 V 时响应最高, 磺胺嘧啶在 46 V 时响应最高。恩诺沙星主要产生  $m/z$  316.2、245.1、203.0、188.9 的碎片离子, 对不同碎片离子进行碰撞能(Collision Energy, CE)的优化,  $m/z$  316.2、245.1 分别设置为定量及定性离子, 最佳碰撞能为 37 V 和 27 V。磺胺嘧啶产生  $m/z$  155.9、107.8、91.8、65.2 的碎片离子,  $m/z$  155.9 和 107.8 分别设置为定量及定性离子, 最佳碰撞能为 21 V 和 31 V。恩诺沙星和磺胺嘧啶的质谱参数见表 1。

### 2.2 前处理方法优化

采用牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶阳性样品进行提取方法优化, 比较提取溶剂种类、提取次数、振荡时间、超声等条件的影响。

#### 2.2.1 提取方法优化

乙腈和酸化乙腈在磺胺类药物和喹诺酮类药物的提取中应用较为广泛<sup>[12-14]</sup>; 三氯乙酸溶液由于具备较强的提取能力和沉淀蛋白的能力, 在动物源食品中兽药的提取中也有较为广泛的应用<sup>[14,15]</sup>。本研究比较不同提取溶剂, 包括乙腈、1% 乙酸乙腈、1% 甲酸乙腈、5% 甲酸乙腈、0.1 mol/L 盐酸乙腈和 5% 三氯乙酸水溶液提取效率的差异(图 2a)。结果表明, 对于乙腈和酸化乙腈溶液, 随着酸度增加, 恩诺沙星和磺胺嘧啶提取效率增加; 三氯乙酸水溶液的提取结果与 0.1 mol/L 盐酸乙腈的提取结果具有较好的一致性。磺胺嘧啶的溶解度与 pH 有关, 而恩诺沙星在中性条件下易与水结合, 生成水合物结晶, 溶解度降低<sup>[16,17]</sup>。因此, 酸度的增加能够提高磺胺嘧啶和恩诺沙星的提取效率。与 0.1 mol/L 盐酸乙腈相比, 三氯乙酸水溶液避免了有机溶剂的使用, 且在后续固相萃取过程中可以避免浓缩过程直接进行净化, 绿色高效, 因此, 最终选择 5% 三氯乙酸水溶液作为提取溶剂。

比较振荡及超声等提取方式、提取时间、提取次数对结果的影响(图 2b)。结果表明, 增加提取次数、提取时间和超声等, 对提取结果的影响较小。振荡 20 min 提取 2 次, 能够对牛肉粉中的恩诺沙星和磺胺嘧啶进行充分提取。

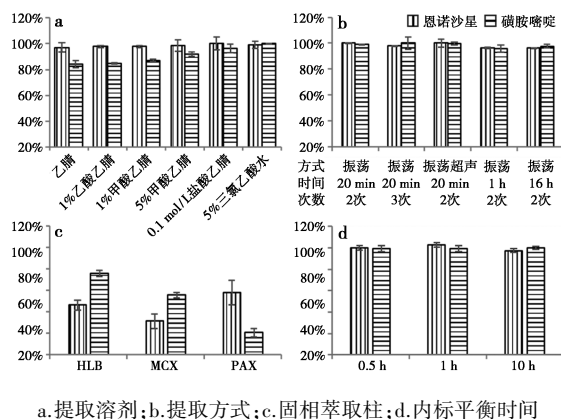
#### 2.2.2 净化方法优化

固相萃取柱净化与正己烷除脂是畜禽肉中氟喹诺酮类药物和磺胺类药物净化常用的方

法<sup>[14,18-20,21]</sup>,本研究比较 HLB、MCX 和 PAX 这 3 种固相萃取柱对于恩诺沙星和磺胺嘧啶两种化合物的绝对回收率,结果表明,相比 MCX 和 PAX 固相萃取柱,HLB 色谱柱对于两种化合物都具备较好的绝对回收率(图 2c),同位素内标校正后的加标回收率接近 100%,因此,选用 HLB 固相萃取柱进行净化。此外,本研究比较 HLB 固相萃取法及 HLB 固相萃取与正己烷除脂相结合两种方法的基质效应,采用 HLB 固相萃取法,恩诺沙星和磺胺嘧啶的基质效应因子分别为 0.91 和 0.95,采用 HLB 固相萃取与正己烷除脂相结合,恩诺沙星和磺胺嘧啶的基质效应因子分别为 0.93 和 0.94,结果表明,进一步正己烷除脂对基质效应无显著影响,因此,本研究采用 HLB 固相萃取柱净化。

### 2.2.3 内标平衡时间优化

同位素内标与基体的充分混合能够保障同位素稀释质谱法(IDMS)的准确性。本研究考察了内标平衡时间 0.5、1、10 h 下结果的差异(图 2d)。结果表明,平衡时间对恩诺沙星和磺胺嘧啶的回收率影响较小,因此,采用 0.5 h 平衡时间。



a. 提取溶剂; b. 提取方式; c. 固相萃取柱; d. 内标平衡时间

图 2 前处理方法优化

Fig.2 Optimization of pretreatment method

### 2.3 基质效应评价

在 LC-MS/MS 分析中,当目标物和基质共流出物竞争时,会发生离子抑制或离子增强效应,该现象被称为基质效应,基质效应的存在会影响定量的准确性<sup>[22]</sup>。提取和净化方法、液相色谱条件等都会影响基质效应。柱后注射和前处理后添加的方法常被用于评价基质效应,其中,后者可以定量评价基质效应。本研究采用基体匹配校准溶液和校准溶液的响应之比来定量评价基质效应。基质效应(ME)因子的值大于 1 为基质增强,基质

效应因子的值小于 1 为基质抑制。

采用空白牛肉粉进行基质效应评价,结果表明,恩诺沙星和磺胺嘧啶均表现为较弱的基质抑制效应,恩诺沙星 ME 为 0.907 5,同位素标记内标校正后 ME' 为 0.999 1;磺胺嘧啶 ME 为 0.949 1,同位素内标校正后 ME' 为 1.011 9。两种化合物经 IDMS 方法校正后的基质效应接近 1,同位素稀释法能够降低基质效应对于定量结果的影响,本研究同位素内标校正后基质效应对牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶 IDMS 定量结果的影响可忽略。

### 2.4 定量方法比较

比较校准溶液单点法和基质匹配校准溶液单点法两种定量方法,单点法计算见公式(1)。

$$C = (A_i/A_s) \times (A_i/A_i)_{std} \times (M_i/M_i)_{std} \times (M_i/W)_s \quad (1)$$

其中:  $C$  为样品中目标物的浓度, ng/g;  $std$  为校准溶液,  $s$  为样品,  $A_i$  为目标物峰面积,  $A_i$  为同位素内标峰面积,  $M_i$  为目标物的质量, ng;  $M_i$  为同位素内标的质量, ng;  $W$  为样品重量, g。

校准溶液单点法恩诺沙星和磺胺嘧啶的结果分别为 729、413 ng/g, 基质匹配单点法结果分别为 726、414 ng/g。结果表明,两种定量方法结果没有显著差异,由于校准溶液单点法操作简便,本研究中采用校准溶液单点法进行牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶定量。

### 2.5 方法验证

以三倍信噪比的方法计算检出限,磺胺嘧啶的仪器检出限为 0.002 ng/g,恩诺沙星为 0.01 ng/g;牛肉粉中磺胺嘧啶的方法检出限为 0.01 ng/g,牛肉粉中恩诺沙星方法检出限为 0.05 ng/g。在 0.05~50 ng/g 范围内,添加 2 ng/g 同位素内标,进行恩诺沙星和磺胺嘧啶线性考察,得到的恩诺沙星标准曲线方程为  $y = 1.049 5x - 0.008 6$  ( $R^2 = 1.000 0$ ),磺胺嘧啶标准曲线方程为  $y = 0.920 2x + 0.020 6$  ( $R^2 = 0.999 6$ )。

根据上述确认的前处理条件,在进行空白牛肉样品恩诺沙星和磺胺嘧啶加标回收率考察,恩诺沙星和磺胺嘧啶加标浓度分别为 730、410 μg/kg。结果表明(表 2),二者同位素稀释法加标回收率分别为 (99.0±0.8)% 和 (100.4±1.2)%。回收率结果较好,满足标准物质定值需求。

本研究建立的方法应用于“牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶测量(CCQM K141)”的国际关键计量比对,牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶测定结果均取得国际等效一致<sup>[8]</sup>。

表 2 牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶加标回收率

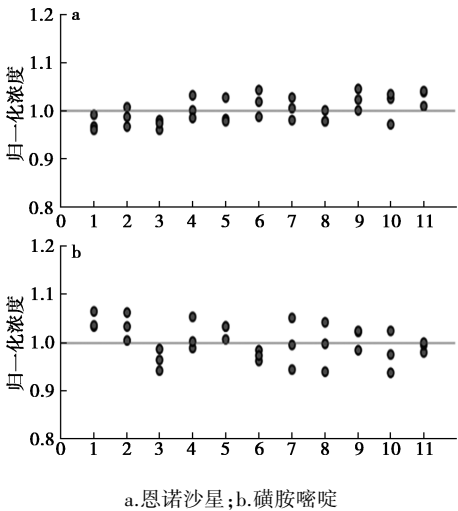
Tab.2 Matrix spiked recoveries of enrofloxacin and sulfadiazine in bovine powder

| 序号  | 恩诺沙星/% | 磺胺嘧啶/% |
|-----|--------|--------|
| 1   | 99.5   | 99.6   |
| 2   | 98.1   | 98.8   |
| 3   | 99.0   | 101.6  |
| 4   | 98.0   | 101.6  |
| 5   | 100.0  | 99.9   |
| 6   | 99.3   | 100.9  |
| 平均值 | 99.0   | 100.4  |
| SD  | 0.8    | 1.2    |

2.6 标准物质均匀性检验、稳定性检验与定值

2.6.1 均匀性检验

均匀性是标准物质的基本属性,用于描述标准物质特性的空间分布特征。本研究根据 JJF 1006《一级标准物质技术规范》和 JJF 1343《标准物质的定值及均匀性、稳定性评估》,对标准物质进行均匀性检验。采用简单随机抽样的方式,从标准物质的 200 个包装中抽取 11 个包装,每个包装取 3 个子样进行瓶间和瓶内均匀性检验。结果表明, $F < F_{0.05}(10,22)$ ,标准物质均匀。



a.恩诺沙星;b.磺胺嘧啶

图 3 均匀性检验结果

Fig.3 Result of homogeneity test

2.6.2 稳定性检验

稳定性是标准物质的基本属性,用于描述标准物质的特性量值随时间变化的性质。本研究依据 JJF 1006《一级标准物质技术规范》和 JJF 1343《标准物质的定值及均匀性、稳定性评估》,进行短期和长期稳定性检验。

采取同步稳定性评估的方法,考察在运输条件为 4℃、室温((20±5)℃)、50℃这 3 个条件下,保存 14 d 标准物质的短期稳定性。恩诺沙星

特性量值在 50℃条件下呈下降趋势(图 4),在 4℃和室温((20±5)℃)条件下特性量值均稳定。因此,需使用冰袋运输,确保在运输过程中恩诺沙星和磺胺嘧啶特性量值的稳定性。

采取经典稳定性评估的方法,考察在贮存条件(≤-18℃)下,保存 24 个月标准物质的长期稳定性。恩诺沙星和磺胺嘧啶在该贮存条件下 24 个月内特性量值均稳定。

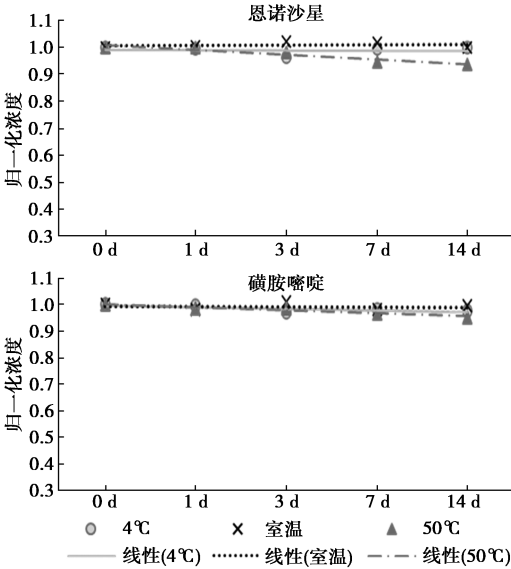


图 4 短期稳定性检验结果

Fig.4 Result of short-time stability test

2.6.3 标准物质定值

采用本研究中优化的经国际比对验证的高准确度同位素稀释质谱法(IDMS)定值。恩诺纯度标准物质(GBW 10155,99.6%, $U=0.2\%$ )及磺胺嘧啶纯度标准物质(GBW(E)060901,99.6%, $U=0.4\%$ )为国家有证标准物质,满足检测溯源和质量控制要求。采用 IDMS 单点校准方法。定值工作由本实验室 2 名试验人员,分别独立进行定值测定。独立测量数据经夏皮罗-威尔克法检验为正态分布,用狄克法和格拉布斯法判定没有离群值,2 组结果等精度。恩诺沙星及磺胺嘧啶定值结果分别为 729、413 ng/g。

2.7 标准物质不确定度评定

标准物质定值结果的不确定度由三部分组成,分别为标准物质的均匀性引入的不确定度、标准物质的稳定性引入的不确定度、标准物质的定值过程带来的不确定度。

2.7.1 均匀性引入的不确定度  $u_{\text{ho}}$

采用单因素方差对恩诺沙星和磺胺嘧啶的均匀性检验结果进行统计分析。结果表明,恩诺沙

星和磺胺嘧啶的组间方差均大于组内方差,均匀性引入的不确定度计算见公式(2)。

$$u_{bb} = s_{bb} = \sqrt{(s_1^2 - s_2^2)/n} \quad (2)$$

其中, $u_{bb}$ 为均匀性引入的不确定度, $s_{bb}$ 为组间标准偏差, $s_1^2$ 为组间方差; $s_2^2$ 为组内方差; $n$ 为组内测量次数。

恩诺沙星和磺胺嘧啶均匀性引入的不确定度分别为 1.45% 和 1.78%。

### 2.7.2 稳定性引入的不确定度 $u_s$

采用线性模型对恩诺沙星和磺胺嘧啶的稳定性结果进行统计分析,稳定性引入的不确定度计算见公式(3)。

$$u_s = s_{(\beta_1)} \times t \quad (3)$$

其中: $u_s$ 为稳定性引入的不确定度, $s_{(\beta_1)}$ 为斜率的标准偏差, $t$ 为保存期限。

恩诺沙星和磺胺嘧啶稳定性引入的不确定度分别为 2.71% 和 2.81%。

### 2.7.3 定值过程引入的不确定度 $u_{IDMS}$

定值过程引入的不确定度包括随机效应带来的不确定度和系统效应带来的不确定度。

随机效应带来的不确定度由色谱-质谱仪器的稳定性、面积测量的重复性、溶液浓度和进样体积的差异等对测量结果造成的误差,体现在测量重复性中,由 2 个操作人员共 12 次测量结果的相对标准偏差表示。

系统效应带来的不确定度主要由恩诺沙星/磺胺嘧啶校准溶液浓度、校准溶液中恩诺沙星/磺胺嘧啶质量、校准溶液中同位素内标的质量、样品中同位素内标的质量、样品称量以及回收率引入的不确定度 5 个部分引入。

恩诺沙星和磺胺嘧啶定值过程引入的不确定度分别为 2.81% 和 2.46%。

### 2.7.4 不确定度合成

合成不确定度计算见公式(4)。

$$u_{rel} = \sqrt{u_{bb}^2 + u_s^2 + u_{IDMS}^2} \quad (4)$$

相对扩展不确定度计算见公式(5)。

$$U_{rel} = k \times u_{rel}, k = 2 \quad (5)$$

表 3 标准物质不确定度评定

Tab.3 Uncertainty evaluation of the reference material

| 不确定度                       | 恩诺沙星 | 磺胺嘧啶 |
|----------------------------|------|------|
| $u_{bb}/\%$                | 1.45 | 1.78 |
| $u_s/\%$                   | 2.71 | 2.81 |
| $u_{IDMS}/\%$              | 2.81 | 2.46 |
| $u_{rel}/\%$               | 4.17 | 4.14 |
| $U_{rel}(k=2)/\%$          | 8.34 | 8.28 |
| $U(k=2)/(ng \cdot g^{-1})$ | 61   | 35   |

恩诺沙星和磺胺嘧啶的相对扩展不确定度分别为 8.34% 和 8.28%,扩展不确定度分别为 61 ng/g 和 35 ng/g(表 3)。

## 3 结论

本研究基于液相色谱-同位素稀释质谱法建立了牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶的测定方法,通过对提取和净化条件的优化来提高提取效率和回收率,方法准确度高,同位素稀释质谱法的应用降低了基质效应的影响。将该方法应用于国际计量比对,恩诺沙星和磺胺嘧啶结果均取得国际互认。研制了牛肉粉中恩诺沙星和磺胺嘧啶标准物质,该标准物质均匀性、稳定性良好,能够应用于食品中相关兽药残留检测的质量控制、方法开发和验证等领域,进而保障相关检测结果的准确、可比。

## 参考文献:

- [1] ROCHA D G, SANTOS F A, DA SILVA J C C, et al. Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry[J]. *J. Chromatogr. A*, 2015, **1379**: 83-91.
- [2] 魏丹, 张菊, 国明, 等. 基于磁性金属有机骨架材料磁性固相萃取-高效液相色谱-串联质谱测定环境水中痕量磺胺类药物残留[J]. *分析试验室*, 2022, **41**(4): 397-402.
- [3] ZHAO H, LIU S, CHEN J, et al. Biological uptake and depuration of sulfadiazine and sulfamethoxazole in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Chemosphere*, 2015, **120**: 592-597.
- [4] FERNANDO HUERTAS-PEREZ J, ARROYO-MANZANARES N, HAVLIKOVA L, et al. Method optimization and validation for the determination of eight sulfonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2016, **124**: 261-266.
- [5] LI X, ZHANG Y, ZHOU X, et al. The plasmid-borne quinolone resistance protein QnrB, a novel DnaA-binding protein, increases the bacterial mutation rate by triggering DNA replication stress [J]. *Mol. Microbiol.*, 2019, **111**(6): 1 529-1 543.
- [6] BARAN W, ADAMEK E, ZIEMIANSKA J, et al. Effects of

- the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health [J]. *J. Hazard. Mater.*, 2011, **196**:1-15.
- [7] 中华人民共和国农业农村部, 2020 年食用农产品市场监管部门抽检不合格情况分析汇总. 2020. [http://www.jgs.moa.gov.cn/gzjb/202102/t20210218\\_6361714.htm](http://www.jgs.moa.gov.cn/gzjb/202102/t20210218_6361714.htm).
- [8] WINDUST A, MCRAE G, MEIJA J, et al. High polarity analytes in food-enrofloxacin and sulfadiazine in bovine tissue (CCQM-K141) [J]. *Metrologia*, 2019, **56**(1A): 8 005.
- [9] 卢德华, 薄梦, 吴雪, 等. 标准物质领域发展现状及趋势[J]. 化学试剂, 2022, **44**(10): 1 403-1 410.
- [10] 时玲, 国振, 赵光亮, 等. 降糖类口服液甲苯磺丁脲等 5 种非法添加物基体标准物质的研制[J]. 化学试剂, 2022, **44**(12): 1 824-1 829.
- [11] 陈兴连, 林涛, 刘兴勇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定鱼和虾中多类禁、限用兽药残留[J]. 色谱, 2020, **38**(5): 538-546.
- [12] 许晓辉, 徐惠昌, 王小乔, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定海螵蛸中 9 种磺胺类药物残留量[J]. 化学试剂, 2021, **43**(11): 1 546-1 550.
- [13] 汪建妹, 徐彦, 周敏, 等. UiO-67 分散固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 6 种大环内酯类兽药残留[J]. 分析试验室, 2023, **42**(3): 350-354.
- [14] MARAZUELA M D, BOGIALLI S. A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2009, **645**(1-2): 5-17.
- [15] 王京, 王庆龄, 叶佳明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源食品中 30 种兽药残留[J]. 分析试验室, 2016, **35**(8): 955-960.
- [16] DELGADO D R, MARTINEZ F. Solubility and preferential solvation of sulfadiazine in methanol+water mixtures at several temperatures [J]. *Fluid Phase Equilibri.*, 2014, **379**: 128-138.
- [17] KARANAM M, CHOUDHURY A R. Structural landscape of pure enrofloxacin and its novel salts: Enhanced solubility for better pharmaceutical applicability [J]. *Cryst. Growth Des.*, 2013, **13**(4): 1 626-1 637.
- [18] 包懿, 刘斌, 刘洋, 等. 食品中喹诺酮类药物残留检测方法的研究进展[J]. 分析化学, 2022, **50**(10): 1 444-1 455.
- [19] 刘少颖, 王兴龙, 任韧, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定淡水鱼中 18 种喹诺酮类和氯霉素类抗生素[J]. 中国卫生检验杂志, 2023, **33**(9): 1 049-1 052; 1 066.
- [20] 刘培勇, 张惠, 米之金, 等. 两步液液萃取-固相萃取净化结合高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 11 种磺胺类兽药残留[J]. 色谱, 2019, **37**(10): 1 098-1 104.
- [21] 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): 1 309-1 318.
- [22] LI X Q, YANG Z, ZHANG Q H, et al. Evaluation of matrix effect in isotope dilution mass spectrometry based on quantitative analysis of chloramphenicol residues in milk powder[J]. *Anal. Chim. Acta*, 2014, **807**: 75-83.