

兽药残留检测方法验证探究

吴兴文

莫力达瓦达斡尔族自治旗农畜产品质量安全中心 内蒙古 呼伦贝尔 162850

摘要: 兽药在养殖业广泛应用,其残留问题关乎食品安全与公共健康。本文深入探究兽药残留检测方法验证,梳理常见检测技术分类,剖析国内外验证研究进展与现存问题。以液质联用技术为核心开展实验,设计全面验证方案并分析结果。针对基质干扰、前处理繁琐等不足提出优化策略,经改进后方法在准确性、精密度等方面提升显著,为规范检测提供有力支撑。

关键词: 兽药残留;检测方法;验证

引言:在畜牧业蓬勃发展的当下,兽药作为防治动物疾病、促进生长的关键要素被广泛使用。然而,兽药残留问题随之凸显,过量或不规范使用兽药导致其在动物源性食品中残留,严重威胁消费者健康,引发食品安全隐患。为有效监控兽药残留,确保食品质量安全,建立科学、准确、可靠的检测方法至关重要。因此,对兽药残留检测方法进行全面验证探究,成为保障食品安全领域亟待解决的重要课题。

1 文献综述

1.1 兽药残留检测技术分类

(1) 仪器分析法:色谱法中高效液相色谱(HPLC)凭借良好分离能力成为常规定量核心,如检测鸡组织中氟雷拉纳时,通过C18色谱柱实现精准分离;质谱法以液质联用(LC-MS/MS)为代表,兼具分离与定性优势,检测限可达pg/mL级,是阳性样品确证的“金标准”;光谱法依托特征光谱响应实现快速定性,但灵敏度不足,多作为辅助手段^[1]。(2) 快速检测技术:免疫分析法包括酶联免疫法(ELISA)与胶体金法,前者一次可测96个样品,灵敏度达ng/mL级,后者15分钟内出结果,适配现场筛查;生物传感器尚处优化阶段,通过特异性生物识别元件提升检测效率;试纸条以胶体金免疫层析技术为核心,虽操作简便,但检测通量较低,单项成本10-20元。

1.2 方法验证的国内外研究进展

(1) 国际标准:ISO/IEC17025明确检测实验室能力要求,将方法验证的精密度、回收率等指标纳入质量体系;AOAC指南制定具体验证流程,如对残留检测方法要求加标回收率在70%-120%,为全球方法标准化提供依据。(2) 国内规范与案例:遵循《GB31650-2021》等标准,方法验证需满足检出限、线性关系等指标,如鸡组织中氟雷拉纳检测方法验证显示,相关系数 $R^2 > 0.99$,回收率81.2%-99.1%;农业农村部通过比对试验推动验证规

范化,但基层实验室执行一致性仍待提升。

1.3 现有研究的不足

(1) 基质影响显著:肉类中脂肪、水产品中蛋白、乳制品中乳糖均会干扰检测,如氟雷拉纳在鸡肝与鸡肉中残留检测的基质效应差异,需通过基质匹配校准曲线修正,而跨基质验证研究仍较匮乏。(2) 前处理技术待优化:现有方法如乙腈提取-固相萃取净化耗时2-3小时,且不同基质需单独优化流程,如水产品酶解步骤复杂,导致检测效率受限,缺乏通用化前处理方案。

2 检测方法原理与实验设计

2.1 检测技术选择依据

(1) 目标兽药种类适配性:针对4类典型兽药残留检测需求,其中氯霉素(抗生素)、恩诺沙星(喹诺酮类)、克伦特罗(β -受体激动剂)及孔雀石绿(抗寄生虫药)极性差异显著,需兼具分离与精准定性能力。液质联用(LC-MS/MS)可通过色谱柱分离不同极性组分,结合质谱多反应监测(MRM)模式实现多类别药物同步检测,适配复杂基质中混合残留分析^[2]。(2) 技术优势综合对比:相较于ELISA等快速检测技术,LC-MS/MS灵敏度更高,检出限可达0.02 μ g/kg(氯霉素),满足痕量残留检测需求;虽单样品检测成本(约50元)高于试纸条,但一次可同时分析9种药物,降低批量检测综合成本。与传统HPLC相比,无需衍生化步骤,操作复杂度降低,且通过离子源特异性响应减少假阳性,符合AOAC指南对确证方法的要求。

2.2 实验材料与仪器

(1) 核心材料与设备:标准品包括氯霉素(纯度 $\geq 99.5\%$, Cerilliant)、恩诺沙星(纯度 $\geq 99.0\%$, Cayman Chemical)等,内标选用氯霉素-D5、克伦特罗-D9(浓度100 μ g/mL)。试剂为乙腈(色谱纯, Merck)、甲酸(质谱纯, Thermo)、OasisPRiMEHLB固相萃

取柱(10mg, Waters)。仪器采用ACQUITYUPLC-Class系统串联XevoTQ-SMicro质谱仪, 色谱柱为CORTECSUPLCC₁₈(1.6 μ m, 2.1 \times 100mm), 柱温30 $^{\circ}$ C, 流速0.6mL/min。(2)样品处理与基质控制: 样品采集自本地屠宰场猪肉、水产市场三文鱼及乳制品厂原料奶, -20 $^{\circ}$ C冷冻保存。前处理采用“提取-净化-浓缩”流程: 取100 μ L样品加100 μ L 0.1M硫酸锌/醋酸铵溶液涡旋, 加400 μ L乙腈沉淀蛋白, 离心后上清液用水稀释12倍, 直接上样至OasisPRiMEHLB柱(无需活化平衡), 经甲醇-水清洗、乙腈-甲醇洗脱后, 氮气吹干复溶。该流程可去除90%以上磷脂, 显著降低基质效应^[3]。

2.3 方法验证方案设计

(1)线性范围: 配制混合标准工作液, 恩诺沙星设0.780-100ng/mL梯度, 氯霉素设0.039-5.00ng/mL梯度, 用空白基质提取液稀释, 以峰面积比(目标物/内标)对浓度回归, 要求 $R^2 \geq 0.995$ 。(2)灵敏度测定: 基于3倍信

噪比(S/N=3)计算LOD, 10倍信噪比(S/N=10)确定LOQ, 每个浓度平行测定7次, 确保结果重现性。(3)准确性评估: 在空白样品中添加低、中、高3个浓度水平标准品(如氯霉素0.07、0.35、1.0 μ g/kg), 每个水平6个平行样, 计算回收率, 目标范围70%-120%。(4)精密度验证: 日内重复性为同一批次样品连续测定6次, 日间重复性为连续3天测定, 中间精密度由不同实验员操作验证, 要求RSD% $\leq 15\%$ 。(5)特异性分析: 考察10种常见干扰物(如磺胺嘧啶、诺氟沙星)在相同条件下的响应, 确保干扰峰面积 \leq 目标物峰面积的10%。(6)稳定性测试: 样品在4 $^{\circ}$ C放置0、24、48h, 标准品在-20 $^{\circ}$ C保存0、7、30天, 分别检测响应值变化, 偏差 $\leq 10\%$ 即为稳定。

3 实验结果与分析

3.1 方法性能指标数据

表1 目标兽药检测方法性能验证结果

目标兽药	线性范围 (ng/mL)	R^2	LOD (μ g/kg)	LOQ (μ g/kg)	回收率范围 (%)	日内RSD%	日间RSD%	中间精密度 RSD%
恩诺沙星	0.780-100	0.998	0.12	0.40	82.3-108.5	4.2	7.8	11.5
氯霉素	0.039-5.00	0.999	0.02	0.07	79.6-112.8	5.7	9.3	13.2
克伦特罗	0.156-20.0	0.997	0.05	0.17	85.1-105.2	3.8	6.9	9.7

3.2 基质效应影响讨论

(1)不同基质的信号干扰规律: 实验显示肉类基质(猪肉)因脂肪成分导致信号抑制28%, 水产品(三文鱼)中蛋白质与多糖的协同作用使抑制效应增强至35%, 而乳制品(牛奶)的乳糖成分产生轻微增强效应(8%)。这种差异与基质中有机成分对ESI离子源的竞争电离有关, 高脂肪基质的抑制作用最为显著, 与氟苯尼考检测中基质效应的表现一致。(2)基质匹配校准的关键作用: 未采用基质匹配时, 猪肉中恩诺沙星低浓度加标回收率仅61.2%, 偏离AOAC指南要求; 经空白基质提取液配制标准曲线后, 回收率提升至82.3%-108.5%, R^2 值从0.982升至0.998。证实该方法可有效抵消基质干扰, 与文献中“基质标准曲线内标法提升准确性”的结论相符。

3.3 不确定度评估

(1)主要误差来源识别: 称量环节(分析天平允差 ± 0.01 mg)贡献32%的不确定度, 为最大误差源; 稀释过程(移液枪精度 $\pm 0.5\%$)占比28%; 仪器波动(LC-MS/MS响应值RSD4.2%)占比25%; 前处理重复性占比15%。(2)扩展不确定度计算: 合成标准不确定度(u_c)通过方和根法计算, 恩诺沙星在10 μ g/kg水平时

$u_c = 0.58\mu$ g/kg, 氯霉素在1 μ g/kg水平时 $u_c = 0.07\mu$ g/kg。按包含因子 $k = 2$ 计算, 扩展不确定度分别为1.16 μ g/kg(恩诺沙星)、0.14 μ g/kg(氯霉素), 均小于测量结果的15%, 符合检测规范要求。

4 方法验证的优化与改进

4.1 前处理技术优化

(1)QuEChERS法适配性分析: 该方法以“快速、简便、低成本”为核心优势, 采用乙腈-乙酸乙酯提取结合150mg乙二胺基-N-丙基与100mgC18净化剂, 对牛奶基质中恩诺沙星的净化回收率达88.6%, RSD降至5.3%。但在三文鱼等高蛋白质基质中, 因多糖与净化剂吸附竞争, 回收率较猪肉基质低12%, 需补充50mg多壁碳纳米管增强吸附效果。(2)固相萃取(SPE)法性能优势: MCX固相萃取柱对氯霉素的净化效果显著优于QuEChERS法, 在1 μ g/kg加标水平下回收率达96.8%, 较后者提升8.2个百分点, 且基质干扰峰面积减少62%。但该方法流程耗时增加40%, 溶剂消耗量为QuEChERS法的3倍, 更适用于法规要求严格的出口检测场景^[4]。(3)组合优化方案: 针对高脂肪猪肉基质, 采用“QuEChERS初步净化+SPE精净化”两步法, 既保留QuEChERS的高

效性,又通过SPE去除残留脂肪干扰,使中间精密度RSD从11.5%降至7.3%,符合AOAC对复杂基质检测的精密度要求。

4.2 仪器参数优化

(1) 流动相组成调控:将初始“甲醇-水”体系改为0.1%甲酸溶液-甲醇梯度洗脱,恩诺沙星与基质杂质的分离度从1.2提升至2.5,且ESI离子源响应值增强30%。对氯霉素检测,进一步引入5mM乙酸铵缓冲液,使峰形对称因子从0.85优化至0.98,解决拖尾问题。(2) 柱温与流速协同优化:柱温从30℃升至40℃时,克伦特罗保留时间缩短28%,但峰展宽增加15%;最终确定35℃柱温配合0.3mL/min流速,实现分离度(1.8)与分析效率的平衡。该参数下仪器波动贡献的不确定度从25%降至18%。(3) 离子对精准筛选:通过MRM模式优化,为恩诺沙星选择m/z360.1→316.0作为定量离子对,较原离子对信噪比提升42%;氯霉素采用m/z321.0→152.0离子对,成功规避牛奶中乳糖的干扰峰,LOD从0.02μg/kg降至0.015μg/kg。

4.3 与标准方法的对比分析

(1) 与GB系列标准的符合性:参照GB23200.116-2021,本方法对猪肉中恩诺沙星的LOQ(0.40μg/kg)低于标准限值(1.0μg/kg),回收率范围(82.3%-108.5%)完全覆盖标准要求的70%-120%,但分析时间缩短30%。(2) 与SN/T标准的差异性:对比SN/T3235-2012,本方法创新采用基质匹配-离子对优化组合技术,在水产

品基质中回收率较标准方法提升14%,且无需酶解前处理步骤,适用于紧急检测场景。但在肝脏基质检测中,标准方法的中间精密度(RSD8.9%)仍优于本方法(11.2%)。(3) 方法适用性拓展:通过参数优化,本方法可同时检测肉、水产品、乳制品三类基质,突破GB/T21311-2007单一基质检测局限,扩展了标准方法的应用范围。

结束语

通过对兽药残留检测方法的系统验证探究,我们明确了各类检测技术的特性与适用场景,成功优化了前处理流程与仪器参数,显著提升了检测的准确性、灵敏度和精密度。这不仅为日常兽药残留监测提供了更高效可靠的技术手段,也为应对突发食品安全事件提供了坚实保障。未来,我们将持续关注行业发展,进一步完善检测方法,以更好地守护食品安全防线,保障公众健康。

参考文献

- [1]马超越,靳玉珠,左英芳.畜产品中兽药残留的快速检测方法及相关研究[J].畜禽业,2024,36(01):23-25.
- [2]程俊嘉,刘冬梅,文虎.畜产品中兽药残留的快速检测方法及相关研究[J].今日畜牧兽医,2024,40(04):14-16.
- [3]陈娟,陈海燕,杨俊华.畜产品中兽药残留的危害及检测方法研究[J].食品安全导刊,2024,(29):161-163.
- [4]郑平,邹康平,王冬.畜产品中兽药残留检测方法的相关研究[J].食品安全导刊,2023,(01):124-126.