超高效液相色谱–串联质谱法检测羊奶中硝基咪唑类药物残留量研究

仪虹伯，杨　戬*，张利俊，逯　刚，董立雅，杨　颖，李振侠

内蒙古蒙牛乳业集团股份有限公司，内蒙古呼和浩特 011500

摘　要：[目的]研发一项采用超高效液相色谱–串联质谱（UHPLC–MS/MS）技术精确检测羊奶中硝基咪唑类药物（包含甲硝唑、地美硝唑、洛硝哒唑及替硝唑等）残留量的方法。[方法]采用乙腈与柠檬酸缓冲液提取羊奶样品，随后用MCX阳离子交换固相萃取柱和PEP–2聚合物固相萃取柱净化处理。氮吹洗脱液至近干后，用含0.1%甲酸的水甲醇溶液定容至1 mL，用流相0.1%甲酸水溶液和乙腈渐变洗脱，色谱分离采用BEH C18柱（2.1 mm × 100 mm，1.7 μm）。质谱仪通过正离子多反应监测（MRM）模式实时检测，并运用外标法结合基质匹配标准曲线完成定量分析。[结果]在1 ~ 80 ng/mL浓度范围内，4 种硝基咪唑类药物残留量具有较好的线性关系，相关系数（r）均大于0.998；平均回收率在3 个加标水平下（1 μg/kg、2 μg/kg和10 μg/kg）为83.2% ~ 106.8%，相对标准偏差为1.8% ~ 20.1%，方法检出限为1 μg/kg。[结论]该方法操作简单、灵敏、准确，适用于羊奶中硝基咪唑类药物残留量的检测。

关键词：羊奶；硝基咪唑类药物；超高效液相色谱–串联质谱法

文章编号：1671–4393（2025）08–0088–06　　DOI:10.12377/1671–4393.25.08.14

0 引言

硝基咪唑类（nitroimidazoles）药物是含有5–硝基咪唑环结构的一类药物，包括甲硝唑（Metronidazole，MNZ）、替硝唑（Tindazole，TNZ）、洛硝哒唑（Ronidazole，RNZ）、塞克硝唑（Secnidazole，SNZ）、地美硝唑（Dimetridazole，

基金项目：国家重点研发计划项目（2022YFD1301005）

作者简介：仪虹伯（1988–），女，内蒙古呼和浩特人，蒙古族，硕士，工程师，研究方向为乳品检验技术；
张利俊（1985–），男，内蒙古呼和浩特人，本科，工程师，研究方向为乳品检验技术；
逯　刚（1978–），男，内蒙古呼和浩特人，硕士，高级工程师，研究方向为食品质量安全研究；
董立雅（1987–），女，北京人，硕士，工程师，研究方向为食品质量安全研究；
杨　颖（1986–），女，内蒙古扎兰屯人，本科，中级工程师，研究方向为食品安全和追溯系统；
李振侠（1997–），女，内蒙古包头人，本科，助理工程师，研究方向为乳品检测。
*通信作者：杨　戬（1992–），男，内蒙古呼和浩特人，本科，工程师，研究方向为乳品快速检测技术开发及应用。

中国乳业编辑阅读

DMZ等[1]，具有显著抗原虫、抗菌作用，主要用于防治滴虫病、球虫病等禽类组织疾病。此外，这类药物还作为生长促进剂以提高牛、猪及家禽生长速度，提高饲料利用效率[2]。长期摄入硝基咪唑类药物可能导致过敏反应，并具有潜在致畸和致突变风险[3]，对人体伤害较大，危害公共安全。依据《GB 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》，尽管地美硝唑和甲硝唑可用作治疗，但在动物源性食品样品中不得测出这些化合物[4]。欧盟与日本标准中也有同样要求[5]。美国针对食用动物有明确禁令，不得使用硝基咪唑类药物处理[6]。因此，开展对硝基咪唑类药物残留量精确测定方法的研究有重要意义。

目前，检测硝基咪唑类药物残留量采用的技术主要包括酶联免疫法[7]、气相色谱-质谱联用法[8]、高效液相色谱法[9, 10]和液相色谱-串联质谱法[1, 2, 5, 11, 12]等。其中，大批量样品快速筛查常使用酶联免疫法，但易出现假阳性或假阴性；气相色谱-质谱联用法需衍生处理样品，操作复杂，影响因素较多，结果稳定性较弱；液相色谱法的检测灵敏度相对较低；而液相色谱-串联质谱法因其出色的选择性、特异性、高灵敏度以及较强的抗干扰能力，被广泛应用于检测硝基咪唑类药物残留量。

羊奶富含蛋白质、脂肪、乳糖、矿物质和多种维生素，是乳制品加工原料中的第二大奶源，占比近20%[13]。羊奶中酪蛋白与乳清蛋白比例类似于人类乳汁，且其主要蛋白质成分——酪蛋白颗粒和脂肪球比牛奶的体积更小，更易被人体吸收[14]。目前，较多研究聚焦牛奶、饲料、猪肉、禽蛋、畜禽血浆等中的硝基咪唑类药物残留量检测方法， 而羊奶与牛奶的营养成分和维生素、矿物质含量存在显著差异[15]，但羊奶中硝基咪唑类药物残留量检测的相关研究较少。因此，建立一种检测羊奶中硝基咪唑类药物残留量的方法，对日常风险监测及监管有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

羊奶，内蒙古呼和浩特市某羊场；乙腈（质谱级）、甲醇（色谱纯），美国赛默飞世尔公司；甲酸（质谱级），北京汇海科仪科技有限公司；异丙醇、氨水、一水合柠檬酸、六水合氯化镁分析纯，福晨（天津）化学试剂有限公司；替硝唑标准品（CAS号：19387-91-8，纯度≥98%）、甲硝唑标准品（CAS号：443-48-1，纯度≥95%）、洛硝哒唑标准品（CAS号：7681-76-7，纯度≥95%）、地美硝唑标准品（CAS号：551-92-8，纯度≥95%）、HLB固相萃取柱（60 mg/3 cc）、MCX阳离子交换固相萃取柱（60 mg/3 cc）、PEP-2 SPE聚合物固相萃取柱（60 mg/3 cc），天津博纳艾杰尔科技有限公司；超纯水由Milli-Q 超纯水系统制得。

超高效液相色谱-质谱联用仪[UPLC-TQD电喷雾离子源（ESI）]，美国Waters 公司；台式高速冷冻离心机（Z-36HK），德国HERMLE公司；旋涡混合仪（MS3 BASIC）及旋转蒸发仪（RV 10V），德国IKA公司；超声波清洗机（SB-4200DT），中国宁波新芝生物科技股份有限公司；氮气干燥系统（N-EVAP24），美国Organomation公司；Milli-Q超纯水机，美国Millipore公司；固相萃取装置，天津市恒奥科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 溶液配制

柠檬酸缓冲液（pH值2.5）：称取10.6 g一水合柠檬酸和10.2 g六水合氯化镁，450 mL水溶解后将调节pH值至2.5（可用氨水调节），加水定容至500 mL。

甲醇-氨水溶液（95+5，体积比）：分别量取95 mL甲醇和5 mL氨水并混匀。使用前配制。

水甲醇溶液（95+5，体积比）：分别量取95 mL水及5 mL甲醇，将两者混匀，使用前配制。

0.1%甲酸水溶液：准确量取1 mL甲酸于1 L容量瓶中，定容至1 L，混匀。

含0.1%甲酸的2 mmol/L乙酸铵水溶液：称取0.154 g乙酸铵，加入约800 mL超纯水，搅拌使乙酸铵完全溶解，准确加入1 mL甲酸，混匀，加水定容至1L，混匀。

中国乳业线上阅读

硝基咪唑类药物标准储备溶液（100.0 μg/mL）：准确称取对应质量标准品（精确至0.1 mg），溶解于甲醇溶液，定容至配置浓度为100.0 μg/mL，−18 ℃以下冷冻保存。

硝基咪唑类药物标准中间溶液（1.0 μg/mL）：用甲醇作为稀释液，将各标准储备溶液稀释至浓度为1.0 μg/mL的中间液，4 ℃以下避光冷藏保存。

1.2.2 样品制备

准确称取5 g（精确至0.01 g）均匀混合样品于50 mL离心管中，分别加入30 mL乙腈、2 mL异丙醇、10 mL柠檬酸缓冲溶液，超声提取10 min，4 000 r/min离心5 min后，上清液倒入旋蒸瓶中。重复提骤并将提取液合并于旋蒸瓶，加入6 mL异丙醇，（40±2）℃旋转浓缩至瓶中液体约5 mL，转移至离心管，用5 mL柠檬酸缓冲液润洗旋蒸瓶内壁，洗液一同转入离心管，8 500 r/min冷冻离心10 min，经0.45 μm有机相滤膜过滤，待净化。

按照从上到下的顺序安装PEP−2柱和MCX柱，依次用3 mL甲醇、3 mL水和3 mL柠檬酸缓冲液活化。将待净化样品溶液转移至固相萃取柱顶部，控制流速为0.5 mL/min，使溶液流经柱子。用3 mL柠檬酸缓冲液、3 mL水和3 mL水甲醇溶液依次淋洗柱子。抽干5 min后，依次用4 mL甲醇和6 mL甲醇−氨水溶液洗脱柱上目标成分，并将所有洗脱液收集至玻璃试管中。

用氮气在（40±2）℃吹干洗脱液后加入1.0 mL含0.1%甲酸的水甲醇溶液，振荡至残渣充分溶解。溶液经0.22μm滤膜过滤后用于后续的超高效液相色谱−质谱分析。

分别称取6 份约5 g阴性样品（精确至0.01 g）于50 mL离心管中，按标准曲线最终定容浓度分别加入硝基咪唑类药物标准中间溶液，余下操作同1.2.2，制备基质标准曲线。

1.2.3 仪器条件

（1）色谱条件

采用BEH C18色谱柱（100 mm×2.1 mm，粒径1.7 μm）；色谱柱温箱温度35 ℃；液相流速0.3 mL/min；混合流动相：A为0.1%甲酸水溶液，B为乙腈；采取的梯度洗脱方案：0～0.5 min内使用90%A相流动；0.6～6 min内改为10%A相；在6.01 min前转回至90%A相；6.01～7 min内持续保持90%A相；梯度洗脱过程中实行线性变化；进样体积为10 μL。

（2）质谱条件

离子源为电喷雾离子源（Electron spray ionization，ESI），正离子工作状态；离子源温度120 ℃；检测方式为多重反应监控（Multiplereaction monitoring，MRM）模式；去溶剂温度450 ℃；毛细管电压3 kV；锥孔气流（氮气）50 L/h；去溶剂气流（氮气）550 L/h。4 种硝基咪唑类药物质谱参数见表1。

表 1 硝基咪唑类药物质谱参数

硝基咪唑类药物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	保留时间（min）	锥孔电压（V）	碰撞电压（eV）
甲硝唑	172.0	81.96	1.67	27	24
	172.0	127.99		27	12
地美硝唑	141.9	80.90	1.99	30	22
	141.9	96.00		30	14
洛硝哒唑	201.0	110.00	2.01	17	13
	201.0	140.00		17	9
替硝唑	247.9	121.00	2.45	29	15
	247.9	128.00		29	20

1.2.4 计算公式

按下式计算样品中甲硝唑、替硝唑、洛硝哒唑和地美硝唑残留量。

$$X = \frac{c \times V}{m}$$

式中：X：样品中待测物含量，单位μg/kg；

c：从标准曲线中读出的待测物浓度，单位ng/mL；

V：样液最终定容体积，单位mL；

m：样品称量质量，单位g。

测量所得数据为平行样本测试平均值，且所得数值精确至小数点后三位。

中国乳业线上阅读

2 结果与讨论

2.1 质谱条件选择

将4 种硝基咪唑类药物对照品混制成浓度为1 100 ng/mL的标准中间液，并注射至超高效液相色谱-质谱联用仪进行检测。通过初级扫描识别和确定母离子，同时调节优化毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、去溶剂温度及进入锥孔的气流速度等质谱分析关键参数。之后执行母离子的子离子扫描，并记录相应的子离子峰图。在这些子离子中，挑选出信号与噪声比例最佳且受干扰最少的一个离子进行定量分析，而另一个离子则用于硝基咪唑类药物的定性分析。优化后的质谱参数见表1。

2.2 色谱条件选择

硝基咪唑类药物属于中等极性化合物，在C18色谱柱上表现出较强保留能力[16]。因此，本研究采取ACQUITY UPLCBEH C18（直径2.1 mm、长度100 mm、粒径1.7 μm）色谱柱进行试验分析，依据《SN/T 2624—2010 动物源性食品中多种碱性药物残留量的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》[17]和徐媛原等[18]研究建议，选用0.1%甲酸水溶液与乙腈、水与甲醇溶液以及含0.1%甲酸的2 mmol/L乙酸铵水溶液与甲醇混合的流动相，通过超高效液相色谱-质谱联用技术鉴定分析4 种硝基咪唑类药物的标准混合物。结果显示，加入乙酸胺的流动相体系导致色谱峰展宽，响应下降，乙腈和甲醇两种流动相体系均能有效检测4 种硝基咪唑类药物，而乙腈的系统压力低于甲醇，因此本研究选用0.1%甲酸水溶液-乙腈作为流动相体系，调整梯度洗脱程序得到各硝基咪唑类药物定性、定量离子标准色谱图（图1）。

2.3 净化条件优化

固相萃取技术是分离和富集药物残留的常用方法，其工作原理是利用固体吸附剂使目标分析物吸附其上，实现与其他基体以及干扰物分离，并依次

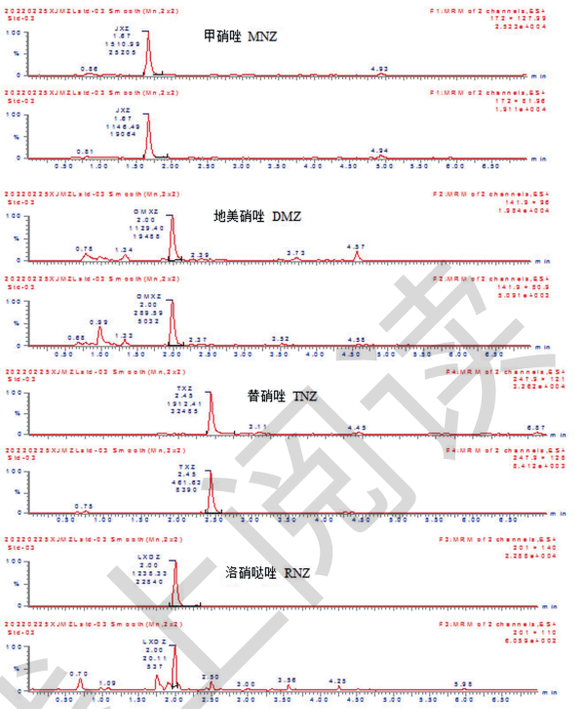


图1 4 种硝基咪唑类药物定性、定量离子标准色谱图

通过淋洗、洗脱一系列操作，最终实现对目标分析物的分离与富集[19]。本研究比较PEP-2柱和MCX柱串联与HLB柱和MCX柱串联对样品进行净化，结果表明，使用HLB柱和MCX柱串联净化后的地美硝唑重现性差，回收率较低，且操作过程中样液较难过柱，耗时长；使用PEP-2柱和MCX柱串联净化效果好，回收率高，精密度稳定，样液过柱顺畅，净化时间短，因此选用PEP-2柱和MCX柱串联对样品进行富集净化。

2.4 线性范围和检出限

据1.2.2样品预处理方式，向未含待测物的基质样品中添加一定浓度的标准混合物，配成浓度介于1～80 ng/mL的混合基质标准溶液系列。检测后，以硝基咪唑类药物的浓度值为X轴，以相应化合物的色谱峰面积为Y轴，构建基质相关的标准曲线。选取空白样品进行小浓度加标处理后，参照《GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南》[20]中信噪比（S/N=3）法评估计算待测物的检出限，结果见表2。

中国乳业线上阅读

表 2 方法的线性方程、相关系数和检出限

硝基咪唑类药物	线性拟合方程	相关系数（r）	检出限（μg/kg）
甲硝唑	y=251.341x+34.663 3	0.999 6	1.0
地美硝唑	y=100.957x−71.305 4	0.998 6	1.0
洛硝哒唑	y=123.019x−76.190 7	0.999 3	1.0
替硝唑	y=216.363x−32.181 8	0.999 1	1.0

在1～80 ng/mL浓度范围内，4 种硝基咪唑待测物表现出良好的线性关系，其相关系数均≥0.998。本方法4 种硝基咪唑在羊奶中检出限为1 μg/kg。

2.5 回收率和精密度

以空白基质样品为本底，加入对应浓度标准品进行回收率、精密度试验。选择方法测定低限、2倍测定低限和10倍测定低限（1、2和10 μg/kg）3 个浓度点，每个浓度点测定7 次为平行样，结果见表3。

表 3 方法的回收率和精密度

硝基咪唑类药物	加标浓度（μg/kg）	平均回收率（%）	精密度（实验室内变异系数 CV%）
甲硝唑	1	93.6	7.3
	2	85.2	4.9
	10	101.1	20.1
地美硝唑	1	101.7	2.0
	2	106.8	6.6
	10	83.2	6.6
洛硝哒唑	1	96.5	13.7
	2	91.3	7.3
	10	101.6	18.8
替硝唑	1	90.0	6.1
	2	100.6	1.8
	10	96.5	17.5

4 种硝基咪唑类药物平均回收率为83.2%～106.8%，精密度在1.8%～20.1%间波动，满足GB/T 27417—2017 [20]中规定，即回收率在60%～120%之间；精密度范围：对含量在0.1～1 μg/kg的被测物，精密度（实验室内变异系数CV%）≤30%；对含量在1～10 μg/kg时的被测物，精密度（实验室内变异系数CV%）≤21%。

3 结论

本研究建立并优化使用超高效液相色谱−质谱联用技术对羊奶中硝基咪唑类药物（甲硝唑、替硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑）残留量检测方法。通过乙腈和柠檬酸缓冲液提取样品，并通过MCX阳离子交换固相萃取柱和PEP−2聚合物固相萃取柱净化，浓缩后进入仪器检测。该方法灵敏度高、重复性良好、干扰低、准确性高，适用于羊奶基质中硝基咪唑类药物的常规检测。

参考文献

[1] 刘开，郭建博，薛晓文，等.超高效液相色谱−串联质谱法测定动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物的残留量的研究[J].食品安全质量检测学报，2020，11（19）：6751−6758.

[2] 方力，邱凤梅，余新威，等.超高效液相色谱−串联质谱法检测牛奶中硝基咪唑类药物及其代谢物残留[J].中国食品卫生杂志，2019，31（1）：17−22.

[3] Chen D，Delmas J M，Hurtaud−Pessel D，et al.Development of a multi−class method to determine nitroimidazoles，nitrofurans，pharmacologically active dyes and chloramphenicol in aquaculture products by liquid chromatography−tandem mass spectrometry[J].Food Chemistry，2020，311：125924.

[4] 中华人民共和国农业农村部.GB 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量［S］.

[5] 凌莉，曲良娇，梁素丹，等.超高效液相色谱−串联质谱法测定鸡肉和鸡蛋中5 种硝基咪唑类药物残留量[J].现代预防医学，2022，49（16）：3029−3035.

[6] Code of Federal Regulations.PART 530—EXTRALABEL DRUG USE IN ANIMALS.[EB/OL].https：//www.ecfr.gov/current/title−21/part−530.2025−8−15.

[7] 张弛，潘家荣，帅瑞琪，等.动物性食品中硝基咪唑类兽药多残留酶联免疫检测方法的建立[J].核农学报，2016，30（2）：323−331.

[8] 陈培荣，刘锦妮，李洵，等.饲料中硝基咪唑类药物的GC−MS检测方法[J].江苏农业科学，2013，41（7）：292−293.

[9] 于敏，张美娟，张河霞，等.高效液相色谱法测定牛奶中硝基咪唑类残留量[J].食品安全质量检测学报，2018，9

中国乳业线上阅读

（2）：447–451.
[10] 何东，李秀英，冼燕萍，等.气相色谱–质谱法测定祛痘化妆品中4 种硝基咪唑类化合物[J].分析测试学报，2015，34（8）：911–916.
[11] 张丽媛，周剑，王敏，等.液相色谱–串联质谱法测定鸡肉和鸡蛋中3 种硝基咪唑类药物[J].食品安全质量检测学报，2019，10（14）：4508–4514.
[12] 汤水粉，钱卓真，位绍红，等.高效液相色谱–串联质谱法测定水产品中硝基咪唑类药物残留量[J].渔业研究，2022，44（1）：60–68.
[13] 马华威，赖艳玲，韦志.羊乳发展前景及广西羊乳产业发展潜力[J].中国乳业，2016（2）：34–37.
[14] 金嫘，白丽娟，彭小雨，等.采用电子鼻检测羊奶中的牛奶掺入[J].食品与发酵工业，2015，41（4）：165–168.
[15] 董梅，李璐，罗叶丽，等.UPLC–MS/MS测定羊奶中氯霉素、甲砜霉素、氟苯尼考[J].食品工业，2022，43（9）：297–300.
[16] 杨霄，万译文，黄华伟，等.分散固相萃取–超高效液相色谱–串联质谱法测定水产品中5 种硝基咪唑类和6 种苯二氮卓类药物[J].色谱，2022，40（7）：625–633.
[17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.SN/T 2624—2010 动物源性食品中多种碱性药物残留量的检测方法 液相色谱–质谱/质谱法[S].
[18] 徐媛原，张微，张杨，等.超高效液相色谱–串联质谱法测定水产品中硝基咪唑类药物及其代谢物[J].饲料博览，2022（5）：59–63.
[19] 朱姗姗，吴澎，徐双双，等.基于色谱–质谱法分析食品中硝基咪唑类药物残留的研究进展[J].食品工业科技，2020，41（22）：326–334.
[20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S].

Study on the Detection of Nitroimidazole Drug Residues in Goat Milk by Ultra–performance Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry in Series

YI Hongbo，YANG Jian*，ZHANG Lijun，LU Gang，DONG Liya，YANG Ying，LI Zhenxia

Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co.，Ltd.，Hohhot Inner Mongolia 011500

Abstract: [Objective]Develop a technology for the precise detection of nitroimidazole drug residues in goat milk using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry （UHPLC-MS/MS）, including metronidazole, dimetridazole, ronidazole and tinidazole, etc.[Method]The Goat milk samples were extracted with acetonitrile and citric acid buffer solution, and then purified by MCX cation exchange solid-phase extraction column and PEP-2 polymer solid-phase extraction column.After the nitrogen purge eluent was nearly dry, it was made up to 1 mL with a water-methanol containing 0.1% formic acid， and eluted gradually with 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile in the flow phase. Chromatographic separation was accomplished on a BEH C18 column（2.1 mm×100 mm, 1.7 μm chromatographic column）. The mass spectrometer conducted real-time detection through the positive ion multiple reaction monitoring（MRM）mode and completed quantitative analysis by external standard method combined with the matrix-matched standard curve.[Result]Within the concentration range of 1~80 ng/mL, the four nitroimidazole drugs had a good linearity, with correlation coefficients（r）were all greater than 0.998.The average recovery rate was 83.2%~106.8% at three spiked levels（1.0 μg/kg, 2.0 μg/kg and 10.0 μg/kg）, the relative standard deviation（RSD）was 1.8%~20.1%.The detection limit of the method 1 μg/kg.[Conclusion]This method is simple to operate, sensitive and accurate, and is suitable for the detection of nitroimidazole drugs（metronidazole, tinidazole, dimedinidazole, ronidazole） residues in goat milk.

Keywords: goat milk; nitroimidazole drug; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

中国乳业线上阅读