

## 实验技术与方法

## 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

方力<sup>1</sup>, 邱凤梅<sup>2</sup>, 余新威<sup>1</sup>, 张志超<sup>1</sup>

(1. 舟山市疾病预防控制中心 浙江省海产品健康危害因素关键技术研究重点实验室, 浙江 舟山 316021;

2. 岱山县疾病预防控制中心, 浙江 舟山 316200)

**摘要:**目的 建立三氯乙酸诱导蛋白沉淀净化-超高效液相色谱-串联质谱快速定量检测牛奶中8种硝基咪唑类药物及其代谢物的方法。方法 牛奶样品经三氯乙酸蛋白沉淀后高速离心分层,中间层清液过0.22 μm聚四氟乙烯滤膜, Hypersil GOLD C18柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)分离,电喷雾离子化,选择反应监测(SRM)模式检测,基质匹配内标法定量。结果 在0.3~10.0 ng/ml浓度范围内,硝基咪唑类药物及其代谢物呈良好的线性关系,相关系数达到0.998 5以上;以3倍信噪比对应的浓度为检出限,方法检出限可达0.1~0.2 μg/kg;在0.5、2.0和5.0 μg/kg的加标水平,方法回收率为83.6%~111.8%,日内相对标准偏差为2.7%~9.1%,日间相对标准偏差为1.0%~9.3%。结论 该检测方法准确、快速、高效、低成本、易操作,能满足牛奶中硝基咪唑类药物及其代谢物残留高通量检测要求。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱;蛋白沉淀;硝基咪唑及其代谢物;牛奶;抗生素

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2019)01-0017-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.01.005

### Determination of nitroimidazoles and their metabolites in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

FANG Li<sup>1</sup>, QIU Fengmei<sup>2</sup>, YU Xingwei<sup>1</sup>, ZHANG Zhichao<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Health Risk Factors for Seafood of Zhejiang Province, Zhoushan Municipal District Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Zhoushan 316021, China;

2. Daishan Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Zhoushan 316200, China)

**Abstract: Objective** A method for the quantitative analysis of eight kinds of nitroimidazoles and their metabolites in milk by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with simple protein precipitation was established. **Methods** One gram milk sample was precipitated by trichloroacetic acid, and then stratified by high-speed centrifugation. The middle layer of the supernatant was filtered through a hydrophilic polytetrafluoroethylene membrane. The analytes were separated on a Hypersil GOLD C18 column (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm), and detected in selected reaction monitoring (SRM) mode via positive electrospray ionization. The matrix matching and internal standard method was used for quantification. **Results** The nitroimidazoles and their metabolites showed good linearity in the range of 0.3-10.0 ng/ml, and correlation coefficients were above 0.998 5. The limits of detection of the nitroimidazoles and their metabolites in milk were between 0.1 and 0.2 μg/kg. The recoveries at spiked levels of 0.5, 2.0 and 5.0 μg/kg were within 83.6%-111.8%, the intra-day relative standard deviation (RSD) were within 2.7%-9.1%, and the inter-day RSD were within 1.0%-9.3%. **Conclusion** The method was accurate, fast, cheap, easy, and could satisfy the requirements of high-throughput monitoring nitroimidazoles in milk.

**Key words:** Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; protein precipitation; nitroimidazoles and their metabolites; milk; antibiotic

收稿日期:2019-01-08

基金项目:舟山市科技计划项目(2017B31127);舟山市医药卫生科技计划项目(2017A01)

作者简介:方力 男 工程师 研究方向为理化检验

E-mail:fangli123@126.com

硝基咪唑类药物是一类抗生素和抗原虫药,主要用于预防和治疗家禽组织滴虫病、球虫病等疾病,同时也用作生长促进剂,以促进牛、猪、禽的生长及改善饲料转化率<sup>[1]</sup>。当前,硝基咪唑类药物及其代谢物主要包括甲硝唑(metronidazole, MNZ)、地美

硝唑 (dimetridazole, DMZ)、洛硝哒唑 (ronidazole, RNZ)、奥硝唑 (ornidazole, ONZ)、替硝唑 (tinidazole, TNZ)、塞克硝唑 (secnidazole, SNZ)、甲硝唑的代谢物羟甲基甲硝唑 (hydroxyl metronidazole, MNZOH)、地美硝唑和洛硝哒唑的共同代谢物羟甲基甲硝咪唑 (2-hydroxymethyl-1-methyl-5-nitroimidazole, HMMNI) 等。由于这类化合物含有的硝基杂环类化合物具有潜在致癌、致畸和致突变作用,我国农业部第 235 号公告将地美硝唑和甲硝唑列为允许用作治疗、但不得在食品中检出的兽药<sup>[2-3]</sup>。牛奶作为一种高营养价值食品,深受百姓的喜爱。当前关于牛奶中硝基咪唑类药物残留检测方法鲜有报道<sup>[4-5]</sup>,为了进一步加强相关食品安全问题的监管,开发快速、准确、高效检测牛奶中硝基咪唑类药物残留的方法尤为必要。

硝基咪唑类药物残留的检测方法主要有酶联免疫法<sup>[6]</sup>、气相色谱-质谱联用法<sup>[7]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5]</sup>及液相色谱-串联质谱法<sup>[8-11]</sup>。酶联免疫法易产生假阳性,适用于快速筛查;液相色谱法检测灵敏度相对较低,抗干扰能力弱;气相色谱-质谱联用法需衍生处理,干扰因素多;液相色谱-串联质谱法有灵敏度高、抗干扰性强等优势。

针对食品中硝基咪唑类药物残留检测的前处理手段主要有液液萃取法、固相萃取法、凝胶渗透色谱法、分散固相萃取法等<sup>[1,8-11]</sup>。上述净化方法存在溶剂消耗量大、操作繁琐、使用成本高等缺陷。本试验基于牛奶基质的特点,利用三氯乙酸蛋白沉淀净化手段,建立了超高效液相色谱-串联质谱快速定量检测牛奶中 8 种常见硝基咪唑类药物及其代谢物残留的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

TSQ Vantage 三重四极杆质谱仪[配有电喷雾离子 (ESI) 源]、Ultimate 3000 超高效液相色谱仪均购自美国 Thermo,微量高速离心机,多管涡旋混合器,Milli-Q 超纯水处理系统(18.2 M $\Omega$ ·cm,德国 Merck)。

甲硝唑 (C15201000)、地美硝唑 (C12772000)、羟甲基甲硝咪唑 (C12772050)、洛硝哒唑 (C16815500)、奥硝唑 (C15746000)、替硝唑 (C17584000)、氘代甲硝唑(甲硝唑-D4, C15201001) 标准品均购自德国 Dr. Eherstorfer,氘代替硝唑(替硝唑-D5, T443902,加拿大 TRC),塞克硝唑 (S0911,日本 TCI),羟甲基甲硝咪唑 (NM008-10,德国 Witega),甲酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,三氯乙酸(分析纯)。孔径 0.22  $\mu$ m 亲水聚四氟乙烯 (PTFE) 滤膜(上海

安谱公司)。超纯水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 样品采集及制备

牛奶样品为舟山市当地市售全脂牛奶,牛奶中蛋白质和脂肪含量分别为 3.0~3.6 g/100 ml 和 3.3~4.4 g/100 ml。准确称取(1.0 $\pm$ 0.01) g 牛奶样品置于 2 ml 具塞离心管中,加入 20  $\mu$ l 内标溶液(内标浓度为 100 ng/ml)和 40  $\mu$ l 400 mg/ml 三氯乙酸溶液,涡旋混合 1 min,15 000 r/min 离心 5 min(离心力为 20 627 g),取适量中间层清液过 0.22  $\mu$ m 滤膜,待进样。

#### 1.2.2 标准溶液的配制

称取不含目标化合物的牛奶样品于离心管中,按照 1.2.1 中步骤进行预处理,得到空白基质溶液。

准确称取适量 8 种硝基咪唑类药物及其代谢物标准物质和 2 种氘代内标物质,分别用乙腈溶解定容,配制成 100  $\mu$ g/ml 的标准储备液。分别取适量的标准储备液,用 0.1% 甲酸水溶液稀释制备成 100 ng/ml 混合标准使用液;取适量的氘代内标标准储备液,用 0.1% 甲酸水溶液稀释制备成 100 ng/ml 混合内标使用液。分别准确吸取 3、5、10、20、50、100  $\mu$ l 混合标准使用液和 20  $\mu$ l 混合内标使用液,用空白基质溶液定容至 1.0 ml,配制成质量浓度为 0.3、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 ng/ml 的系列标准工作液。

#### 1.2.3 仪器条件

色谱: Hypersil GOLD C18 色谱柱(100 mm  $\times$  2.1 mm,1.9  $\mu$ m);流动相:A 为 0.1% 甲酸水,B 为乙腈;流速 0.3 ml/min。梯度洗脱程序:0~3.0 min,5% B;2.0~9.0 min,5% B~50% B;9.0~9.2 min,50% B~5% B;9.2~11.0 min,5% B。进样量 10  $\mu$ l。

质谱:离子源:ESI 源,正离子模式;扫描模式:选择反应监测(SRM)模式;喷雾电压 3.0 kV;汽化温度 300  $^{\circ}$ C;离子传输温度 325  $^{\circ}$ C;鞘气(氮气)压力 45 arb(310 kPa);辅助气(氮气)压力 15 arb(103 kPa);碰撞气:高纯氩气,压力为 1.5 mTorr。优化后 8 种硝基咪唑类药物及其代谢物的质谱参数见表 1。运行开始时,色谱柱流出液经六通切换阀切换至废液中,直到 2.0 min 六通阀切换至质谱,质谱同时从 2.0 min 开始采集数据,直到 8.0 min 采集结束,同时六通切换阀又将柱流出液切换至废液中。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱和质谱条件的选择

#### 2.1.1 色谱分离条件的选择

硝基咪唑类药物及其代谢物是一种中等极性

表 1 硝基咪唑类药物及其代谢物的质谱参数

Table 1 MS parameters of nitroimidazoles and their metabolites

化合物	保留时间 /min	母离子 /( <i>m/z</i> )	子离子 /( <i>m/z</i> )	透镜电压 /V	碰撞能量 /eV	对应内标物
羟甲基硝唑	2.67	188.1	126.1*/123.1	60	16/12	甲硝唑-D4
甲硝唑	3.36	172.0	128.0*/82.0	60	11/21	甲硝唑-D4
羟甲基甲硝唑	3.39	158.1	140.1*/112.1	64	10/20	甲硝唑-D4
地美硝唑	3.85	142.1	96.2*/81.2	62	15/25	甲硝唑-D4
洛硝哒唑	5.06	201.1	140.1*/110.2	43	8/14	甲硝唑-D4
塞克硝唑	6.01	186.1	128.1*/82.2	60	14/21	替硝唑-D5
替硝唑	6.77	248.1	121.1*/128.1	80	15/19	替硝唑-D5
奥硝唑	7.30	220.1	128.1*/82.2	73	16/31	替硝唑-D5
甲硝唑-D4	3.28	176.1	128.1*	53	14	—
替硝唑-D5	6.72	253.1	126.1*	80	15	—

注: \* 表示定量离子;—表示无对应内标物

小分子化合物,国内外很多文献<sup>[8-11]</sup>已证实反相 C18 柱适合该类化合物的分离与检测。本试验比较了 Hypersil GOLD C18(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 和 Acquity UPLC BEH C18(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 超高效反相色谱柱对目标化合物的分离效果。结果显示,两根色谱柱均能较好地实现目标物的分离,相比之下, Hypersil GOLD C18 柱填料粒径更大,

系统压力负荷较低,易操作。本试验对比了 0.1% 甲酸水-乙腈和 0.1% 甲酸水-甲醇组成的流动相体系,结果发现 0.1% 甲酸水-乙腈组成的流动相体系分离所得的色谱峰更加尖锐,且造成的色谱系统压力更低。综上所述,本试验采用 Hypersil GOLD C18 色谱柱,0.1% 甲酸水-乙腈作为流动相分离待测组分(见图 1)。

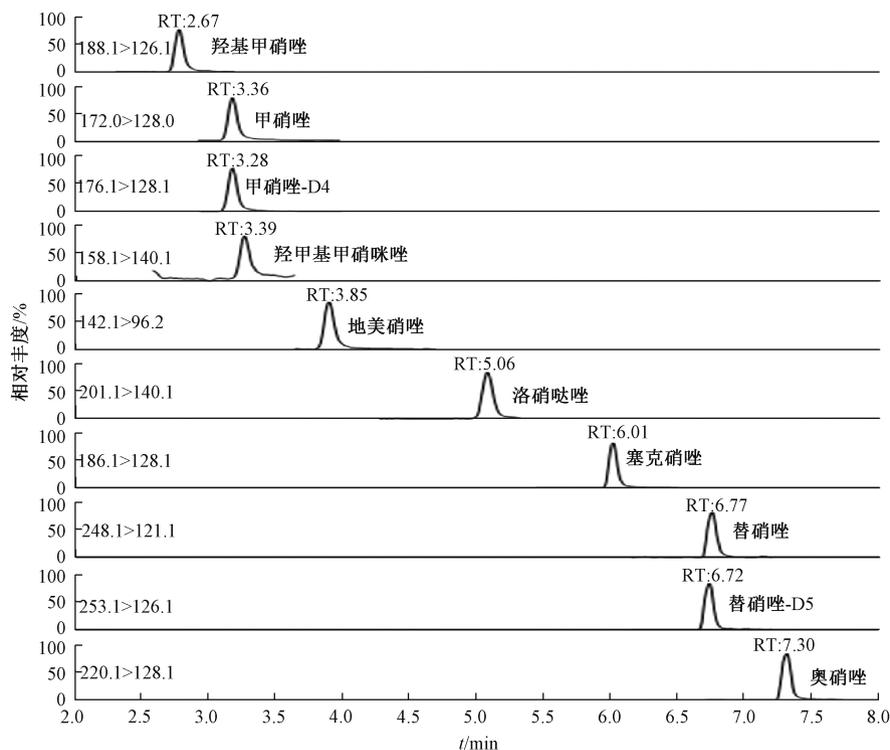


图 1 硝基咪唑类药物及其代谢物的 SRM 色谱图

Figure 1 SRM chromatograms of nitroimidazoles and their metabolites

### 2.1.2 质谱条件的选择

试验中以 1.0 mg/L 混合标准中间液为对象,采用流动注射的方式在电喷雾正离子模式下进行质谱参数的优化。选择干扰小、信噪比大的离子对作为定性或定量离子对。优化后的透镜电压、碰撞能量、定性和定量离子对见表 1。

### 2.2 前处理条件的优化

牛奶基质主要由水、蛋白质、脂肪、碳水化合物等物质组成。基于牛奶基质的特点,去除基质中的乳蛋白和乳脂肪是样品净化的关键点。常见的蛋白质沉淀剂有有机溶剂、酸、重金属离子等。本试验首先考虑了有机溶剂乙腈、甲醇作为蛋白质沉淀

剂用于牛奶基质样品的净化。结果发现,甲醇对牛奶基质的蛋白质沉淀效果最差,经处理后样品溶液仍呈乳白色;乙腈作为蛋白质沉淀剂时,当样品中乙腈的占比达50%以上时,蛋白质沉淀效果明显,但样品溶液中有溶剂的比例过高,导致色谱分析时出现明显的溶剂效应,目标物色谱峰变宽、拖尾。

三氯乙酸是一种良好的蛋白质沉淀剂,广泛应用于蛋白质的检测<sup>[12-13]</sup>。本试验选取质量浓度为400 mg/ml 三氯乙酸溶液当作蛋白质沉淀剂,比较了10、20、40、60、80  $\mu\text{l}$  三氯乙酸溶液加入量对样品净化效果和目标化合物回收率的影响(见图2)。结果显示,当三氯乙酸加入量为10和20  $\mu\text{l}$  时样品蛋白质沉淀不完全,溶液层浑浊,净化效果差,影响部分目标化合物的回收率。当三氯乙酸加入量增加至40  $\mu\text{l}$  时,样品净化效果明显改善,各目标化合物的加标回收率均在84%~108%之间。三氯乙酸加入量继续增加,样品溶液的pH值明显降低,影响液

相色谱柱的使用寿命;因此,本试验选用40  $\mu\text{l}$  三氯乙酸溶液作为蛋白质沉淀剂。

牛奶基质样品经三氯乙酸溶液处理后高速离心分层,样品被分成三层,最上层为密度较低的乳脂肪层,中间层为溶液层,底层为乳蛋白层,中间层清液用于样品分析。中间层清液取样时注意先用移液器枪头向上层乳脂肪层轻轻地拨出一个小洞,再将枪头往下伸入中间溶液层,吸取适量清液过滤膜。样品经三氯乙酸处理后能有效去除牛奶中乳脂肪、乳蛋白等基质干扰物,能有效达到牛奶基质样品净化的目的。此外,考虑到高浓度三氯乙酸是强酸性溶液,经三氯乙酸处理后的样品溶液是否也呈强酸性,超出色谱柱的使用要求。结果显示,经40  $\mu\text{l}$  三氯乙酸溶液处理后样品溶液的pH值在2~3之间,符合一般色谱柱pH值在2~8之间的要求。同时该前处理方法未使用有机溶剂,有效避免了有机溶剂对试验操作者身体的影响。

### 2.3 基质效应

本试验采用基质匹配工作曲线与纯溶剂标准曲线的斜率之比来评价检测方法的基质效应(ME),当ME值大于1时表示存在基质增强效应,ME值小于1时表示存在基质抑制效应,如恰好为1则表示不存在基质效应。由表2可知,牛奶基质中羟甲基硝唑和洛硝唑基本上不存在基质效应;甲硝唑、羟甲基甲硝唑和地美硝唑呈现弱基质增强效应;塞克硝唑、替硝唑和奥硝唑呈现弱基质抑制效应。牛奶这种复杂基质样品经三氯乙酸净化处理后各目标化合物的基质效应均在可接受范围内,这表明三氯乙酸蛋白质沉淀法虽然净化手段简单,但是净化效果较好。此外,本试验采用基质匹配内标法测定实际样品,也在一定程度上补偿了基质效应产生的影响。

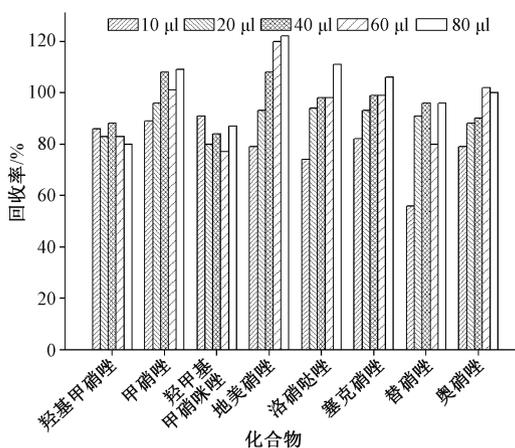


图2 三氯乙酸加入量对牛奶中硝基咪唑类药物及其代谢物回收率的影响

Figure 2 Influence of trichloroacetic acid addition on the recoveries of nitroimidazoles and their metabolites in milk

表2 方法的线性范围、线性方程、相关系数、检出限、定量限和基质效应

Table 2 Linear range, regression equations, correlation coefficients, and matrix effects (ME) of the method

化合物	线性范围 /(ng/ml)	线性方程	相关系数 $r^2$	检出限 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	ME
羟甲基硝唑	0.5~10.0	$y = 0.0845x + 0.0023$	0.999 6	0.2	0.5	0.99
甲硝唑	0.3~10.0	$y = 0.3377x + 0.0118$	0.999 6	0.1	0.3	1.12
羟甲基甲硝唑	0.5~10.0	$y = 0.1326x + 0.0183$	0.998 5	0.2	0.5	1.14
地美硝唑	0.3~10.0	$y = 0.3252x - 0.0008$	0.999 2	0.1	0.3	1.28
洛硝唑	0.3~10.0	$y = 0.1121x + 0.0020$	0.999 3	0.1	0.3	1.02
塞克硝唑	0.3~10.0	$y = 0.8332x + 0.0560$	0.998 5	0.1	0.3	0.85
替硝唑	0.3~10.0	$y = 0.0825x + 0.0096$	0.999 7	0.1	0.3	0.82
奥硝唑	0.3~10.0	$y = 0.4029x + 0.0278$	0.999 7	0.1	0.3	0.86

### 2.4 工作曲线及检出限

按1.2.2方法配制基质标准溶液并对其进行分析,以硝基咪唑类药物及其代谢物浓度为横坐标、目标化合物峰面积与对应内标峰面积的比值为纵

坐标绘制基质工作曲线(见表2)。结果表明,在0.3~10.0 ng/ml浓度范围内目标化合物线性相关性良好,相关系数( $r^2$ )均大于0.998 5。在本试验条件下,根据3倍信噪比下峰响应值、取样量和进样

量,得出牛奶基质中羟甲基甲硝唑和羟甲基甲硝咪唑的检出限为 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,其他目标化合物的检出限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;羟甲基甲硝唑和羟甲基甲硝咪唑的定量限为 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,其他目标化合物的定量限为 0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 2.5 回收率和精密度

本研究以牛奶基质为研究对象,考察方法的回收率和日内、日间相对标准偏差(*RSD*)。准确称取空白牛奶 1.0 g,设定 3 个添加水平 0.5、2.0 和 5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,根据 1.2 方法进行检测,测定回收率和 *RSD*。由表 3 可知,8 种硝基咪唑类药物及其代谢物的回收率在 83.6%~111.8% 之间,日内 *RSD* 为 2.7%~9.1%,日间 *RSD* 为 1.0%~9.3%。

## 2.6 检测方法比对

为了进一步验证本检测方法的准确性,将本检测方法 with GB/T 22982—2008《牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、地美硝唑及其代谢物残留的测定 液相色谱-串联质谱》<sup>[14]</sup> 方法进行比对。由于未发现实际阳性牛奶样品,因此比对试验采用空白牛奶加入适量混合标准溶液制备成各目标物浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的牛奶加标样品,样品充分混合后放置过夜。分别采用本检测方法和国标方法对样品进行前处理,用本方法所建立的仪器方法测定,检测结果如表 4 所示。由此可得,经本方法和国标方法处理后各目标物均可取得理想的回收率和精密度(回收率均在 85%~110% 之间,*RSD* 均小于 10%)。国标方法虽规定适用于牛奶中 5 种硝基咪唑类药物及

表 3 方法的回收率和 *RSD*

化合物	加标水平 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	日内( $n=6$ )		日间( $n=3$ )	
		回收率/%	<i>RSD</i> /%	回收率/%	<i>RSD</i> /%
羟甲基甲硝唑	0.5	107.6	6.3	98.4	8.4
	2.0	99.3	6.4	98.3	1.0
	5.0	89.0	5.6	89.2	1.7
甲硝唑	0.5	101.3	4.4	97.8	3.3
	2.0	108.4	3.1	106.0	2.5
	5.0	98.7	3.5	97.7	1.0
羟甲基甲硝咪唑	0.5	98.8	5.1	97.8	9.3
	2.0	103.5	4.7	98.9	5.0
	5.0	98.1	5.2	92.3	6.0
地美硝唑	0.5	101.6	7.1	96.1	7.1
	2.0	105.5	2.7	102.2	3.9
	5.0	94.1	5.1	92.1	3.5
洛硝哒唑	0.5	95.6	3.4	92.6	2.8
	2.0	100.6	3.3	97.3	3.3
	5.0	92.1	4.0	91.0	1.3
塞克硝唑	0.5	93.8	8.2	91.4	4.5
	2.0	110.3	3.0	111.8	1.4
	5.0	101.8	4.6	103.0	2.6
替硝唑	0.5	91.2	8.4	87.3	1.5
	2.0	98.6	9.1	102.4	4.0
	5.0	101.1	4.8	99.3	4.0
奥硝唑	0.5	88.4	8.9	83.6	1.0
	2.0	90.7	6.2	92.5	2.9
	5.0	83.7	4.3	85.1	3.6

其代谢物的测定,但本研究发现另外 3 种硝基咪唑类药物(塞克硝唑、替硝唑和奥硝唑)同样也适用。国标方法采用乙酸乙酯提取、强阳离子交换小柱净化、氮吹浓缩等前处理步骤,试验操作繁琐耗时。对比国标方法,本检测方法前处理过程相对简便、易操作。

表 4 检测方法比对结果

Table 4 Results of method comparison

化合物	加标水平 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	本方法( $n=3$ )			国标方法( $n=3$ )		
		检测值 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 /%	<i>RSD</i> /%	检测值 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 /%	<i>RSD</i> /%
羟甲基甲硝唑	2.0	2.08	104.2	6.2	1.71	85.6	3.8
甲硝唑	2.0	1.97	98.4	1.3	1.89	94.7	0.1
羟甲基甲硝咪唑	2.0	1.91	95.7	7.8	2.06	102.9	3.5
地美硝唑	2.0	2.05	102.7	4.9	1.82	90.9	1.5
洛硝哒唑	2.0	2.05	102.4	4.0	1.99	99.7	7.4
塞克硝唑	2.0	1.97	98.4	1.3	1.84	92.2	9.8
替硝唑	2.0	1.94	97.2	4.9	2.17	108.7	3.6
奥硝唑	2.0	1.76	88.1	8.8	1.97	98.4	3.3

## 2.7 实际样品检测

应用本方法对舟山地区市售 10 份牛奶样品进行检测,所有样品中 8 种硝基咪唑类药物及其代谢物的浓度均低于检出限。

## 3 小结

本方法采用三氯乙酸净化、超高效液相色谱分离、三重四极杆质谱检测,实现快速定量检测牛奶中 8 种硝基咪唑类药物及其代谢物残留。本方法成

本低、操作简便、灵敏度高、重现性好,适用于牛奶基质中硝基咪唑类药物及其代谢物残留的应急检测或日常高通量检测。

## 参考文献

- [1] 陈瑞春,艾连峰,郭春海,等.液相色谱同位素稀释串联质谱法测定牛奶和奶粉中 3 种硝基咪唑类禁用兽药及其代谢物的残留量[J].中国食品卫生杂志,2011,23(6):543-549.
- [2] 汪纪仑,王大菊,杨自军,等.硝基咪唑类药物残留检测方

- 法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2007, 41(8): 31-33.
- [3] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第235号[EB/OL]. (2002-12-24) [2018-12-20]. [http://www.moa.gov.cn/zwllm/nybz/200803/t20080304\\_1028649.htm](http://www.moa.gov.cn/zwllm/nybz/200803/t20080304_1028649.htm).
- [4] 张毅, 岳振峰, 蓝芳, 等. 分散固相萃取净化与液相色谱/串联质谱法测定牛奶中8类禁用药物残留[J]. 分析化学, 2012, 40(5): 724-729.
- [5] 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(2): 447-451.
- [6] 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.
- [7] 何东, 李秀英, 洗燕萍, 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.
- [8] 方力, 邱凤梅, 余新威, 等. 基质分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测动物源食品中硝基咪唑类药物及其代谢物[J]. 色谱, 2018, 36(5): 431-438.
- [9] 刘永明, 曹彦忠, 李金, 等. 液相色谱-串联质谱法快速测定蜂蜜中3种硝基咪唑类药物残留[J]. 色谱, 2010, 28(6): 596-600.
- [10] 祝子铜, 雷美康, 彭芳, 等. 快速溶剂萃取-凝胶渗透色谱净化-LC/MS/MS结合测定蜂花粉中硝基咪唑类药物[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 522-529.
- [11] 黎翠玉, 吴敏, 严丽娟, 等. 高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(1): 17-22.
- [12] 徐伟, 聂四平, 李军, 等. 甲醛-三氯乙酸沉淀-凯氏定氮法测定牛奶中真蛋白质[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(1): 31-34.
- [13] 王海静, 朱风华. 三氯乙酸法与硫酸铜法测定饲料真蛋白比较[J]. 饲料研究, 2012(11): 69-71.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 牛奶和奶粉中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝唑及其代谢物残留的测定 液相色谱-串联质谱法; GB/T 22982—2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

## 实验技术与方法

# 同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定植物性食品中11种杀菌剂残留量

赵紫微, 刘柏林, 谢继安, 王秀莉, 单晓梅

(安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601)

**摘要:**目的 建立快速同时测定植物性食品中11种杀菌剂残留量的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。方法 植物性食品经乙腈提取,经匀浆和高速离心后采用 QuEChERS 试剂净化,用 HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行分离,以 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相,电喷雾电离,正离子扫描(ESI<sup>+</sup>),多反应监测(MRM)模式检测目标物,同位素内标法定量。结果 11种杀菌剂在 0.1~50.0 μg/L 浓度范围内具有良好的线性,相关系数( $r^2$ )均大于 0.999 1,检出限为 0.2~2.0 μg/kg,平均回收率范围为 63.1%~116.3%,相对标准偏差(RSD)均小于 12.1%。结论 该方法操作简单快速、灵敏度高、准确性好,适用于对大批量植物性食品中多种杀菌剂的快速测定。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱; 杀菌剂; 植物性食品; 同位素内标; 农药残留; 食品污染物

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2019)01-0022-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.01.006

## Rapid determination of 11 fungicide residues in plant foods by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standards

ZHAO Ziwei, LIU Bolin, XIE Ji'an, WANG Xiuli, SHAN Xiaomei

(Anhui Center for Disease Control and Prevention, Anhui Hefei 230601, China)

**Abstract: Objective** To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for rapid and simultaneous determination of 11 fungicide residues in plant foods. **Methods** The plant foods were extracted by acetonitrile with homogenate and high speed centrifugation and purified by QuEChERS reagent. The 11 fungicides were separated on a HSS T3 column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid water-acetonitrile as