

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240226010

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 三氮唑残留

张璐^{1,2#}, 董立雅^{3#}, 刘通^{1,4}, 聂雪梅^{1,4}, 许博舟^{1,4}, 许秀丽^{1,4*}, 逯刚^{3*}

[1. 中国检验检疫科学研究院, 食品安全研究所, 北京 100176; 2. 重庆市计量质量检测研究院, 重庆 401123;
3. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500; 4. 中国检验检疫科学研究院, 国家市场监管重点实验室
(食品质量与安全), 北京 100176]

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)检测牛奶中痕量三氮唑残留的分析方法。**方法** 样品采用 1% 乙酸乙腈溶液振荡提取后, 在 -4℃ 条件下高速离心, 取上清液旋转蒸干, 以 10% 乙腈水溶液复溶, 用 UPLC-MS/MS 检测。采用 BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离, 以乙腈-0.1% 甲酸水溶液作为流动相梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 在正离子扫描及多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下分析, 外标法定量。**结果** 牛奶中三氮唑的检出限(limit of detection, LOD)为 5 μg/kg, 定量限(limit of quantification, LOQ)为 15 μg/kg, 在 20~1000 μg/L 质量浓度范围内线性良好, 相关系数(r)为 0.9993。将所研究的方法应用于实际牛奶样本中, 其日内加标回收率在 81.67%~85.49%, 日内精密度在 4.5%~5.5%, 日间加标回收率在 81.07%~85.12%, 日间精密度在 5.9%~8.2%。**结论** 本方法采用振荡提取加低温高速离心净化的前处理方法, 简单快速, 结合 UPLC-MS/MS, 可实现痕量水平残留的高灵敏度检测, 适用于牛奶中的三氮唑残留的快速检测, 为动物源性食品中三氮唑残留的定性定量分析提供技术参考。

关键词: 三氮唑; 牛奶; 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of diminazene in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Lu^{1,2#}, DONG Li-Ya^{3#}, LIU Tong^{1,4}, NIE Xue-Mei^{1,4},
XU Bo-Zhou^{1,4}, XU Xiu-Li^{1,4*}, LU Gang^{3*}

基金项目: 国家市场监督管理总局科技创新人才计划(青年拔尖人才)项目(QNBJ202322)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Talent Program of State Administration for Market Regulation (Young Top Talents) (QNBJ202322)

#张璐、董立雅为共同第一作者

#ZHANG Lu and DONG Li-Ya are Co-first Authors

*通信作者: 许秀丽, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 13146594637@163.com

逯刚, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究。E-mail: lugang@mengniu.cn

*Corresponding author: XU Xiu-Li, Ph.D, Professor, Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No. 11, Ronghua South Road, Daxing District, Beijing 100176, China. E-mail: 13146594637@163.com

LU Gang, Master, Senior Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd., Mengniu Dairy Industry in Shengle Economic Park, Helinghe, Hohhot 011500, China. E-mail: lugang@mengniu.cn

[1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 401123, China; 3. Inner Mongolia Meng-Niu Dairy (Group) Co., Ltd., Hohhot 011500, China; 4. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation, Beijing 100176, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of trace diminazene residues in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by oscillation with 1% acetic acid-acetonitrile, after high-speed centrifugation at -4°C , the liquid supernatant was dried by rotary evaporation and dissolved with 10% acetonitrile aqueous solution, and determined by UPLC-MS/MS. A BEH C_{18} column (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) was used for separation, and acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution was used as mobile phase for gradient elution, the elution flow rate was 0.2 mL/min. The positive ion scanning mode and multiple reaction monitoring (MRM) was used, and the external standardization method was used for the quantitative analysis. **Results** The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of diminazene in milk were 5 $\mu\text{g/kg}$ and 15 $\mu\text{g/kg}$, respectively. In the mass concentration range of 20–1000 $\mu\text{g/L}$, the linearity was good, with a correlation coefficient (r) of 0.9993. The recoveries ranged from 81.67% to 85.49% (intra-day) and 81.07% to 85.12% (inter-day) when applied in milk detection, with intra-day precisions of 4.5%–5.5% and inter-day precisions of 5.9%–8.2%. **Conclusion** This method adopts a pretreatment method of oscillation extraction and low-temperature high-speed centrifugation purification, which is simple and fast. By incorporating UPLC-MS/MS, high sensitivity detection of trace residues can be attained, making it suitable for the rapid detection of triazamidine residues in milk, providing technical reference for the qualitative and quantitative analysis of diminazene residues in animal derived foods.

KEY WORDS: diminazene; milk; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

三氮唑，别名贝尼尔(Berenil)或血虫净，属于芳香双胍类药物，是畜牧养殖中常用的抗寄生虫药，和氮氨菲啶是国内外治疗锥虫病最常用的两种药物^[1]，对家畜的巴贝斯梨形虫病、泰勒梨形虫病、附红细胞体病等也有较好的治疗效果^[2–5]。由于三氮唑进入动物体内后代谢非常缓慢，不合理滥用导致它在动物体内残留蓄积，在肌肉、内脏、奶等动物源性食品中的残留可能威胁食品安全和消费者健康^[6–7]。随着消费者食品安全意识的提高，动物源性食品的兽药残留问题越来越受关注，国内外均制定了一系列的三氮唑限量标准。我国、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)和欧盟等都对三氮唑在动物源性食品中的最高残留限量进行了规定，其中我国规定的牛奶中的三氮唑残留限量(150 $\mu\text{g/kg}$)远低于牛肉(500 $\mu\text{g/kg}$)、牛肾(6000 $\mu\text{g/kg}$)和牛肝(12000 $\mu\text{g/kg}$)等动物源性食品^[8–9]。因此，开发三氮唑残留的精准检测方法是对牛奶等动物源性食品质量安全的重要保障。

目前，国内外报道的三氮唑检测方法主要有酶联免疫吸附法(enzyme-linked immune sorbent assay, ELISA)^[10–11]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[12–13]、胶体金免疫层析法^[14]、高分辨质谱法^[15]等，

其中针对生物样品或三氮唑药物制剂检测的研究较多，涉及动物源性食品中三氮唑残留检测的研究较少。ELISA和胶体金免疫层析法需筛选对应的特异性抗体，虽然特异性强、灵敏度高，但适用于快速筛查，难以用于痕量目标物检测的确证^[16]。HPLC需要使用固相萃取柱来进行富集和净化，样品前处理过程烦琐，操作时间较长，需要消耗较多的试剂和耗材^[17–19]。高分辨质谱法检测仪器成本较高，难以推广普遍使用^[20–21]。因此，开发一种快速、高灵敏的食品中痕量三氮唑残留检测方法很有必要。超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)结合了 HPLC 和质谱的优点，选择性好、灵敏度高，可实现高选择性和高准确度的目标物分析，适合用于痕量有害物质残留的检测。

因动物源性食品基质复杂，牛奶等乳品中蛋白质含量较高且有脂肪难以去除干净，进行仪器检测前通常需要经过较为烦琐的净化前处理过程，如固相萃取、液液萃取、固相微萃取等^[22–24]。张彤等^[25]采用分散固相萃取法结合 UPLC-MS/MS 检测畜禽肉中 23 种驱虫类药物残留量。汤晨^[26]用乙腈提取牛奶和奶粉中的三氮唑，用正己烷除脂净化 2 次，同时测定三氮唑和氮氨菲啶。JANG 等^[27]使用改良的快速极性(quick polar pesticides, QuPpE)提取/净化方法提取样品，并使用液相色谱串联质谱法分析饲料中的多种

兽药。上述前处理方法, 有的方法操作烦琐, 消耗较多试剂, 且三氮唑水溶性好, 其除水过程会影响回收率; 当与其他多种组分同时检测时, 因提取溶剂极性较弱, 导致三氮唑等极性较强物质的提取效率不高。因此有必要开发更为简单、快速的前处理净化方法。

本研究基于 UPLC-MS/MS 分离效能高、检测灵敏度高的特点, 以振荡提取结合低温高速离心的净化方式, 通过样品前处理、色谱和质谱条件的优化, 建立 UPLC-MS/MS 用于测定牛奶中三氮唑残留, 为动物源性食品中痕量三氮唑残留的定性与定量分析提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

三氮唑二盐酸盐(纯度 99.9%, 天津阿尔塔科技有限公司); 乙腈、甲醇、乙酸、甲酸、正己烷(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 无水硫酸镁、氯化钠、柠檬酸钠二水合物、柠檬酸氢钠(分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

SCIEX QTRAP 6500 + 三重四极杆液质联用系统(美国 SCIEX 公司); BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); KQ-500DE 超声波清洗仪(昆山市超声仪器公司); Vortex Genie 2 涡旋振荡器(美国 Vortex 公司); Allegra X-22R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 有限公司); PL203 电子天平(感量 0.001 g, 梅特勒-托利多仪器上海有限公司); SPS-ZY-0015 旋转蒸发仪(瑞士 BUCHI 公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 质谱条件

离子源: 电喷雾电离(electron spray ionization, ESI); 扫描方式: 正离子; 监测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 具体参数见表 1; 毛细管电压: 3.0 kV; 离子传输管温度: 350℃; 离子源温度: 500℃; 离子源电压: 4500 V。实验中所用气体均为高纯氮气。

表 1 质谱检测参数

Table 1 Mass spectrometry detection parameters

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留 时间/s	锥孔 电压/V	碰撞 能量/eV
三氮唑	282.0	135.1 254.1*	0.1	44	22 11

注: *为定量离子。

1.3.2 色谱条件

色谱柱为 BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流速为 0.2 mL/min, 进样体积为 5 μL, 柱温为 40℃, 样品盘温

度为 4℃。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1%甲酸水溶液, 按所列梯度洗脱程序条件进行分离。梯度洗脱程序: 0 min, 5% A; 6.0 min, 40% A; 8.0 min, 60% A; 12.0~13 min, 100% A; 13.1~15.0 min, 5% A。

1.3.3 样品前处理

将混合均匀的牛奶 3 g(精确至 0.01 g)放入 50 mL 的离心管中, 然后加入 15 mL 的 1%乙酸乙腈溶液, 进行 2 min 涡旋后超声 5 min, 在-4℃的条件下, 以 10000 r/min 的速度离心 10 min, 最后将上清液转移到 50 mL 的鸡心瓶中。在前述的离心管中。再一次加入 15 mL 的 1%乙酸乙腈溶液。按照上述步骤重复, 合并上层清液, 然后在 50℃的条件下旋转蒸干。将残留物用 1 mL 的 10%乙腈水溶液复溶, 然后转移到 1 mL 的离心管中, 在-4℃的条件下, 10000 r/min 离心 10 min。最后取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 供高效液相色谱-串联四极杆质谱仪分析。

1.3.4 标准曲线

准确量取三氮唑标准物质 1 mL, 用 10%乙腈水溶液稀释定容至 10 mL, 配制得到标准储备溶液, 质量浓度为 10 mg/L, 在-20℃下避光保存, 备用。取适量标准储备溶液, 用 10%乙腈水溶液配制成溶剂标准工作溶液, 其质量浓度分别为 20、50、100、200、500、1000 μg/L。按 1.3.1 的方法对空白牛奶样品进行样品前处理, 得到基质提取液, 再用该基质提取液作稀释液, 配制基质匹配标准工作溶液, 其质量浓度分别为 20、50、100、200、500、1000 μg/L, 现用现配。

按上述方法分别配制系列溶剂标准工作溶液和基质匹配标准工作溶液, 以相同检测条件上机测试, 以三氮唑质量浓度(X, μg/L)为横坐标, 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 以评价基质效应。

1.3.5 方法学评价

在空白牛奶样品中分别添加一系列不同浓度的三氮唑标准溶液, 同一条件下进行前处理和测定, 以信噪比大于 3 确定方法检出限, 以信噪比大于 10 确定方法定量限。分别添加 15、50 和 150 μg/kg 即低、中、高 3 个水平的标准工作溶液至空白牛奶样品中, 进行加标回收实验, 每个添加水平做 6 个平行, 连续测定 3 d, 评价方法的回收率及日内精密度和日间精密度。

1.4 数据处理

采用 Microsoft Excel 2010 进行数据统计和分析, 采用 Origin 2021 软件进行图表绘制。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

本研究根据三氮唑的分子结构, 通过对质量浓度为 10 mg/L 的三氮唑标准溶液进行全扫描, 在电喷雾正离子

模式下,考虑 $[M+H]^+$ 模式,从而确定母离子为 282.0。再经过二级质谱扫描,调整碰撞电压,选择 2 个稳定且响应较高的离子作为子离子,如图 1 所示,选取 135.1 和 254.1 两个离子作为子离子,其中 254.1 为定量离子。最后,对选取的 282.0/135.1 和 282.0/254.1 离子对进行锥孔电压和碰撞电压等参数的优化,得到最优的质谱参数见表 1。

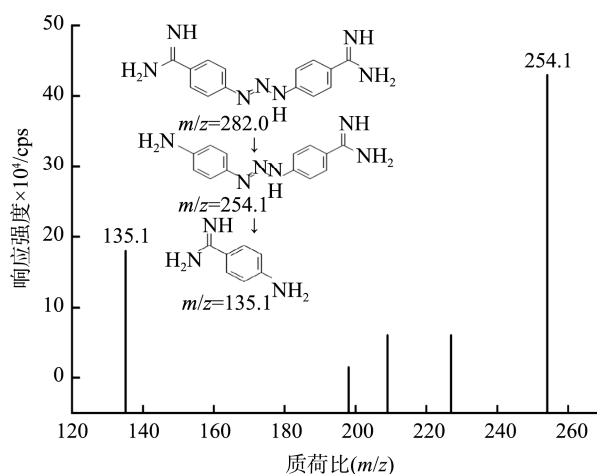


图1 三氮脒的二级碎片质谱图

Fig.1 Fragment mass spectra of diminazene

2.2 色谱条件的优化

为了获得更好的峰形和灵敏度,并形成稳定的 $[M+H]^+$ 加合离子,本研究比较了纯乙腈、5%乙腈水溶液、10%乙腈水溶液和 10%甲醇水溶液共 4 种溶剂溶解三氮脒标准物质的色谱图。结果如图 2 所示,当三氮脒被纯乙腈溶解时会出现双峰现象,而 5%乙腈水溶液、10%甲醇水溶液作为溶剂时,响应不够高,峰形不好。其中 10%乙腈为溶剂时的强度最高,峰形最好,因此确定 10%乙腈水溶液为三氮脒标准品的溶剂。

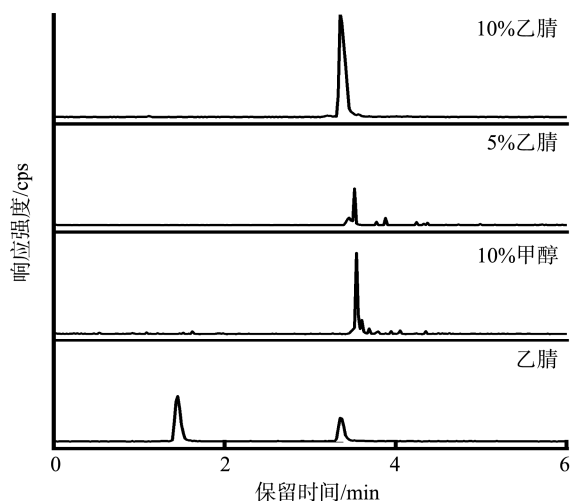


图2 不同溶剂中三氮脒标准品的提取离子流色谱图

Fig.2 Extracted ion chromatograms of diminazene in different solvents

三氮脒含有两个苯甲脒基团,是一种极性较强的碱性化合物,容易与酸性硅羟基结合而发生色谱分离的拖尾现象,因此考虑选择反相色谱柱 BEH C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)来进行色谱分离。实验考察了乙腈-0.1%甲酸水作为流动相时三氮脒的分离效果和峰型情况,并以 1 mg/L 三氮脒标准溶液进样,对流动相梯度洗脱条件进行了优化。结果表明,在优化后的梯度洗脱程序下,三氮脒可在 3.3 min 出峰,保留时间短且峰形尖锐,因此选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 提取溶剂的选择

不同食品基质成分差异较大,会影响三氮脒在样品中的分布,因而不同样品基质会极大影响三氮脒的提取效果。目前已见报道的动物源性食品中三氮脒的提取溶剂有甲醇、乙腈等有机溶剂,也有三氯乙酸溶液、磷酸溶液等酸溶液。虽然酸溶液能有效地去除大多数样品中的蛋白质,但目标物的回收率较低^[28],且提取后的样品上清液中杂质较多。三氮脒极性较强,乙腈去除牛奶中蛋白质的效果较好^[19]。为达到最佳提取效果,本研究将 4 种不同的提取溶剂即乙腈、5%乙腈水溶液、80%乙腈水溶液和 1%乙酸乙腈溶液的提取效率进行了比较。本研究进行了 20、50、100 μ g/kg 3 个浓度的加标回收实验,每个浓度 3 组平行,采用 4 种不同的提取溶剂振荡提取,提取溶剂使用量均为 10 mL,比较其回收率。结果如图 3A 所示,当采用乙腈和 80%乙腈水作为提取溶剂时,三氮脒的回收率在 40%~46%之间;5%乙腈水提取时,回收率为 50%~57%;而采用 1%乙酸乙腈时的回收率最好,为 67%~70%,这可能是由于三氮脒具有两个强碱性脒基而呈碱性,一定的酸性环境更容易使其溶解,利于提取^[28],也可能是由于牛奶中的蛋白质之间构成了一种胶束体系,而一定量的酸能使胶束结构瓦解,从而使蛋白质更易析出^[8]。本研究因此选择了 1%乙酸乙腈作为最佳提取溶剂。

2.3.2 提取溶剂用量的选择

在确定提取溶剂后,研究了提取溶剂的使用量。分别考察了在 20、50、100 μ g/kg 3 个添加浓度下,不同提取剂用量(5、10、15、20 mL)对回收率的影响,每个浓度做 3 组平行。结果如图 3B 所示,随着提取剂使用量的增加,每种添加浓度的三氮脒回收率均相应提高,并且超过 15 mL 后趋于稳定。考虑到减少后续提取剂旋转蒸干的时间和减少化学试剂的使用,最终选择提取溶剂使用量为 15 mL。

2.3.3 净化方式的选择

本研究考察了混合盐包、正己烷脱脂、低温高速离心 3 种净化方式对牛奶中三氮脒回收率的影响,从而建立一个快速、高效的样品净化处理方法。进行了 20、50、100 μ g/kg 3 个浓度的添加回收实验,每个浓度做 3 个平行,

结果如图 3C 所示。当采用混合盐包净化方法(在 15 mL 提取液中加入 2.5 g 无水硫酸镁、0.6 g 氯化钠、0.6 g 柠檬酸钠二水合物、0.3 g 柠檬酸氢钠)时,回收率低于 10%,可能是因为无水硫酸镁吸水放热使牛奶蛋白凝固,从而吸附了大量待测物质,另外三氮唑水溶性好,吸水过程也影响了回收率,同时,三氮唑属于极性较大物质,混合盐包使用相对非极性的溶剂进行提取,一些中等极性和极性的物质提取效率不高^[29]。当采用正己烷进行脱脂时,将 4 g 氯化钠和 10 mL 饱和正己烷加入提取液中,进行液液分配,将正己烷层弃去,将剩余溶液收集后进行旋蒸,观察到旋蒸后氯化钠析出,同时剩余较多脂肪和残渣,表明净化效果不好,最终三氮唑回收率仅有 15%~20%。采用低温高速离心的方法,即在-4℃条件下 10000 r/min 高速离心 10 min 后取上清液旋转蒸干,剩余残渣较少,回收率达 82%~85%,色谱图显示无干扰,此方法利于沉淀蛋白质、脂肪等杂质,同时也避免了因加入盐或有机溶剂提取后三氮唑回收率降低的情况。因此选择低温高速离心的方法,既简化了前处理步骤,

又大大缩短了分析时间,提高了回收率且试剂消耗更少。

2.4 基质效应

按 1.3.2 所述方法配制系列溶剂标准工作溶液和基质匹配标准工作溶液,以相同检测条件上机测试并绘制标准曲线。以三氮唑质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)为横坐标,峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到三氮唑的溶剂标准曲线线性回归方程为 $Y=593.80X-4782.55$, 相关系数(r)为 0.9993; 基质匹配工作曲线线性回归方程为 $Y=692.35X-2353.97$, 相关系数(r)为 0.9989。

基质效应计算公式为: 基质效应 = (基质匹配标准曲线斜率-溶剂标准曲线斜率)/溶剂标准曲线斜率 $\times 100\%$ 。当基质效应在-20%~20%之间时为弱基质效应; 如果基质效应在-50%~-20%或 20%~50%之间,则为中等基质效应; 基质效应 $\geq 50\%$ 或 $\leq -50\%$ 时为强基质效应^[30]。结果表明,牛奶基质中的三氮唑基质效应为 17%,为弱基质效应,因此本研究采用溶剂标准曲线进行线性回归拟合。

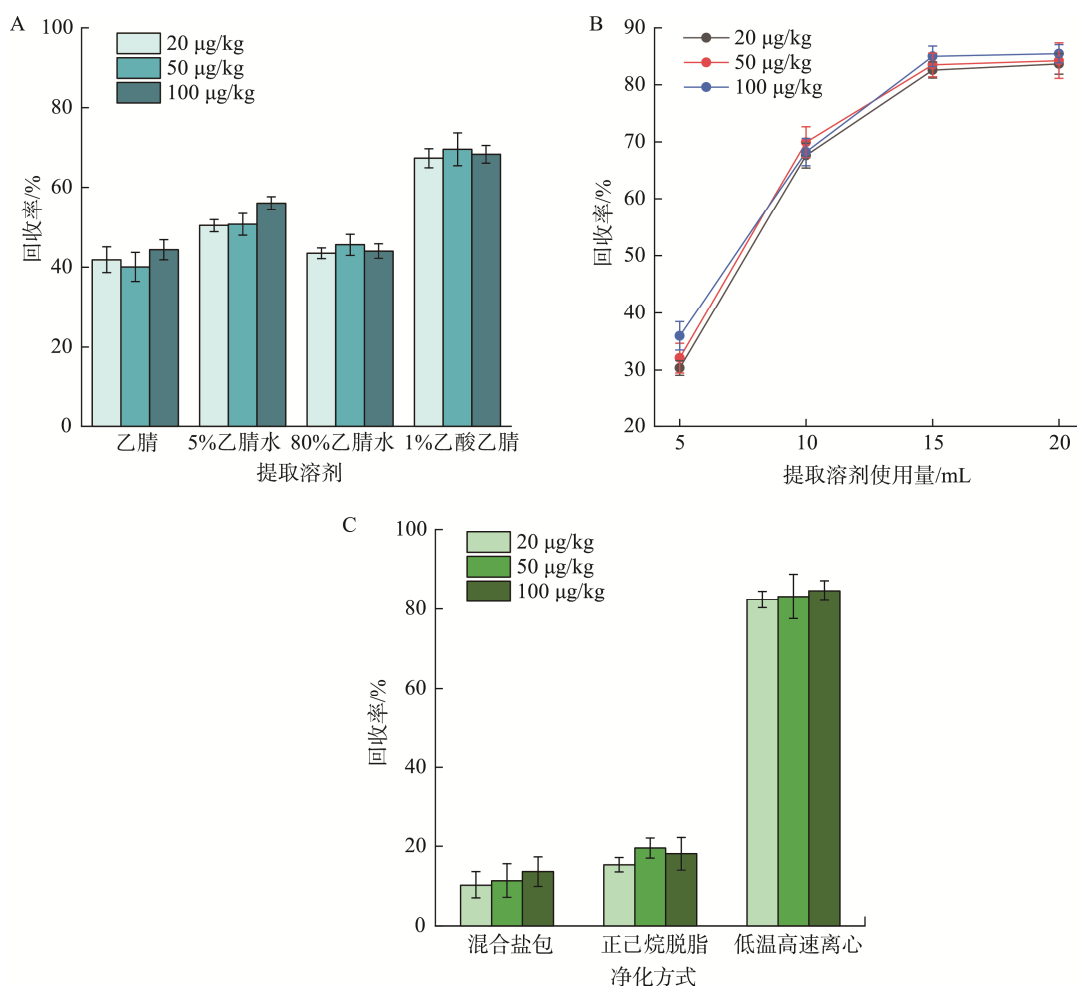


图3 前处理条件的优化($n=3$)

Fig.3 Optimization of the pretreatment conditions ($n=3$)

2.5 方法学评价

2.5.1 线性关系、检出限与定量限

按 1.3.4 所述方法配制系列浓度的溶剂标准工作溶液上机测试,并以三氮唑质量浓度(X, mg/L)为横坐标,峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。结果表明,在 20~1000 μg/L 范围内三氮唑的线性良好,相关系数(*r*)为 0.9993。在空白牛奶样品中分别添加一系列不同浓度的三氮唑标准溶液,同一条件下进行前处理和测定,以信噪比大于 3 确定方法检出限,以信噪比大于 10 确定方法定量限,三氮唑的方法检出限和定量限分别为 5 μg/kg 和 15 μg/kg,低于 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中牛奶的三氮唑最大残留限量 150 μg/kg,且低于 GB 31658.18—2022《食品安全国家标准 动物性食品中三氮唑残留量的测定 高效液相色谱法》中牛奶和羊奶的检出限(10 μg/kg)与定量限(20 μg/kg),说明该方法可满足牛奶中三氮唑的检测要求,且比现行 GB 31658.18—2022 中的高效液相色谱法具有更低的检出限和定量限。

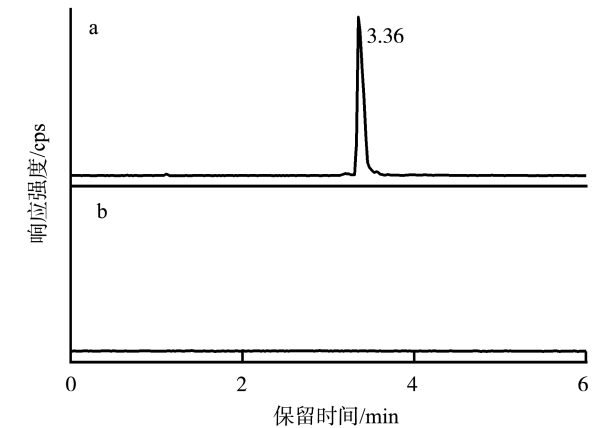
2.5.2 回收率与精密度

分别添加低、中、高 3 个水平的标准工作溶液至空白牛奶样品中,添加量分别为 15、50 和 150 μg/kg,进行加标回收实验,每个添加水平做 6 个平行,计算平均回收率,并计算平行样的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs),以评价方法的日内精密度。连续测定 3 d,计算 RSDs 以评价方法的日间精密度。实验结果如表 2 所示,牛奶样品中三氮唑的日内实验的回收率为 81.67%~85.49%,日内精密密度为 4.5%~5.5%,日间实验的回收率为 81.07%~85.12%,日间精密密度为 5.9%~8.2%。实验结果表明,本方法回收率和精密密度均满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范食品理化检验》的要求,说明本方法重复性和再现性好,可用于实际牛奶样品中三氮唑的检测分析。

图 4 为三氮唑在空白样品和牛奶中添加浓度 150 μg/kg 时的提取离子流色谱图,三氮唑出峰峰形好,无基质干扰,空白样品色谱图表明空白样品在三氮唑保留时间内无干扰峰出现。

表 2 牛奶中三氮唑的加标回收率、日内精密度和日间精密密度
Table 2 Spiked recoveries, intra-day precisions and inter-day precisions of diminazene in milk

添加水平/(μg/kg)	日内(<i>n</i> =6)			日间(<i>n</i> =3)		
	检测结果/(μg/kg)	回收率/%	日内精密密度/%	检测结果/(μg/kg)	回收率/%	日间精密密度/%
15	12.25	81.67	5.5	12.16	81.07	8.2
50	41.68	83.36	4.9	42.25	84.50	6.7
150	128.24	85.49	4.5	127.68	85.12	5.9



注: a: 150 μg/kg 添加样品; b: 牛奶空白样品。

图 4 牛奶中三氮唑的提取离子流色谱图

Fig.4 Extracted ion chromatograms of diminazene in milk

2.6 实际样品检测

随机采集 20 份市售牛奶样品,采用此方法进行前处理和上机定量检测。结果显示,所采集的牛奶样品中三氮唑测定值均低于方法检出限,未发现残留情况,符合 GB 31650—2019 限量要求。由此可见,该方法对牛奶样品有

较好的适用性。

3 结 论

本研究建立了一种 UPLC-MS/MS 测定牛奶中三氮唑残留的分析方法,采用 1%乙酸乙腈振荡提取,−4℃低温高速离心,取上清液旋转蒸干,用 10%乙腈水溶液定容后供 UPLC-MS/MS 测定。通过对色谱-质谱参数、前处理条件的优化,检测方法灵敏度提高,检出限和定量限分别为 5 μg/kg 和 15 μg/kg。与现行 GB 31658.18—2022 的液相色谱法相比,本方法整体检测时间更短,检出限更低,通过对选定特征离子定性和定量,有效去除杂质干扰,检测结果更加准确。与现有报道的 UPLC-MS/MS 法相比,本方法前处理操作更简单,使用有机溶剂更少,采用低温高速离心的方式,省去了烦琐的萃取净化过程,方法学评价和实际样品测定结果良好,适用于牛奶中三氮唑残留的检测,可满足现行的限量标准检测要求。消费者对兽药残留和食品安全的关注日益强烈,但动物源性食品中三氮唑等杀虫药残留检测的相关研究还比较缺乏,本方法的建立可为动物源性食品中三氮唑残留的实际检测工作提供技术参考。

参考文献

- [1] SAHIN A, ASENCIO C, IZOTTE J, *et al.* The susceptibility of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* to isometamidium chloride and its synthetic impurities [J]. *Vet Parasitol*, 2014, 203(3/4): 270–275.
- [2] 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 AIQ, QIN Y, *et al.* Research progress on detection of antiparasites in milk and dairy products [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(2): 64–73.
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
Commision of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary pharmacopoeia of the People's Republic of China* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2015.
- [4] STAROVEROV SA, SIDORKIN VA, FOMIN AS, *et al.* Biodynamic parameters of micellar diminazene in sheep erythrocytes and blood plasma [J]. *J Vet Sci*, 2011, 12(4): 303–307.
- [5] 陶艳华, 李四红, 潘虹, 等. 贝尼尔治疗奶牛附红细胞体病的疗效观察[J]. *湖北畜牧兽医*, 2014, (7): 17–18.
TAO YH, LI SH, PAN H, *et al.* Observation on therapeutic effect of berenil on cow eperythrozoonosis [J]. *Hubei J Anim Vet Sci*, 2014, (7): 17–18.
- [6] GENG CQ, HUANG YQ, LI B, *et al.* Point-of-care testing of chloramphenicol in food production using smartphone-based electrochemical detector [J]. *J Anal Test*, 2023, 7(1): 33–39.
- [7] PAN F, GAO LJ, ZHU KH, *et al.* Regional selection of insecticides and fungal biopesticides to control aphids and thrips and improve the forage quality of alfalfa crops [J]. *J Interg Arg*, 2023, 22(1): 185–194.
- [8] 丁姗姗. 动物源性食品中三氮唑及氯氰碘柳胺残留的 HPLC 检测方法研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
DING SS. Determination of diminazene and closantel in animal derived food by HPLC [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2011.
- [9] 孙星雅, 刘睿, 张素霞, 等. 中国与欧盟和美国牛奶中兽药残留限量标准的对比研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(24): 9317–9325.
SUN XY, LIU R, ZHAN SX, *et al.* Comparative study of veterinary drug residue limit standards for milk in China, the European Union and the United States [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(24): 9317–9325.
- [10] CHAO MJ, XU XX, LIU LQ, *et al.* Ultrasensitive immunochromatographic strip assay for the detection of diminazene [J]. *Analyst*, 2021, 146: 4927–4933.
- [11] CHEN LL, SUN YN, HU XF, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of diminazene in milk [J]. *Food Addit Contam A*, 2020, 37(10): 1667–1677.
- [12] 金录胜, 陈莎莎, 李树纲, 等. 反相高效液相色谱法测定三氮唑类物质的方法学研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2010, 29(6): 41–43.
JIN LS, CHEN SS, LI SG, *et al.* Determination on related substances in diminazene acetate by RP-HPLC [J]. *J Tradit Chin Vet Med*, 2010, 29(6): 41–43.
- [13] 周冉卉, 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唑和氯化氮氮菲啉残留[J]. *色谱*, 2017, 35(9): 995–1002.
ZHOU YH, ZENG ZL, YU JX, *et al.* Simultaneous determination of diminazeneacetate and isometamidium chloride residues in cattle tissues by high performance liquid chromatography with solid-phase extraction [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(9): 995–1002.
- [14] 陈琳琳. 动物源性食品中抗寄生虫类及抗精神类药物的免疫快速检测方法研究[D]. 无锡: 江南大学, 2022.
CHEN LL. Rapid immunoassay for detecting antiparasitic and antipsychotic drugs in animal-derived food [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [15] 于倩倩. 牛奶中多兽药残留的高分辨质谱筛查方法的优化[D]. 长春: 吉林大学, 2023.
YU QQ. Optimization of high resolution mass spectrometry screening method for multi-veterinary drug residues in milk [D]. Changchun: Jilin University, 2023.
- [16] 张烁, 周爽, 裴晓燕, 等. 免疫亲和柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 16 种真菌毒素比较研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(3): 234–242.
ZHANG S, ZHOU S, PEI XY, *et al.* Comparative study of immunoaffinity columns combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of 16 kinds of mycotoxins in milk [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(3): 234–242.
- [17] FAIST V, DRUSCH S, KIESNER C, *et al.* Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl chloride [J]. *Int Dairy J*, 2000, 10(5): 339–346.
- [18] 赵吉祥, 李博, 路文华, 等. 猪血浆样品中三氮唑质量浓度的高效液相色谱测定方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2014, 44(1): 93–97.
ZHAO JX, LI B, LU WH, *et al.* Development of high performance liquid chromatography for determination of the level of diminazene diacetate in swine plasma samples [J]. *Chin Vet Sci*, 2014, 44(1): 93–97.
- [19] 刘瑾, 曾振灵, 余静贤, 等. 牛乳中三氮唑残留高效液相色谱检测方法的建立[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(5): 533–536.
LIU J, ZENG ZL, YU JX, *et al.* Development of high performance liquid chromatography method for the detection of diminazene-diacetate residue in milk [J]. *Chi Vet Sci*, 2012, 42(5): 533–536.
- [20] LIU T, MU GD, HE MY, *et al.* Dual-use ionization source for direct and sensitive detection of trace carbamates residue [J]. *Food Chem*, 2024, 437(1): 1–8.
- [21] ROCCETTI G, GHILARDELLI F, MASOERO F, *et al.* Screening of regulated and emerging mycotoxins in bulk milk samples by highresolution mass spectrometry [J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2025.
- [22] WANG YF, MU GD, WANG XJ, *et al.* Fast construction of core-shell structured magnetic covalent organic framework as sorbent for solid-phase extraction of zearalenone and its derivatives prior to their determination by UHPLC-MS/MS [J]. *Microchim Acta*, 2021, 188: 246.
- [23] 刘通, 母国栋, 姚桂红, 等. 共价有机聚合物固相微萃取结合高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中黄曲霉毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(18): 66–73.
LIU T, MU GD, YAO GH, *et al.* Determination of aflatoxins in milk by covalent organic polymer solid phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(18): 66–73.
- [24] 刘娟娟, 史冉冉, 王新全, 等. 磁性萃取净化同步处理-液相色谱-串联质谱法分析牛奶中多农药残留[J]. *分析化学*, 2023, 51(8): 1322–1331.
LIU JJ, SHI RR, WANG XQ, *et al.* Analysis of multiple pesticides residue in milk by magnetic extraction and purification technology combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*,

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

- 2023, 51(8): 1322–1331.
- [25] 张彤, 徐宜宏, 付海滨, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 同时测定畜禽肉中 23 种驱虫类药物残留量[J]. 饲料工业, 2024, 45(3): 120–126.
ZHANG T, XU YH, FU HB, *et al.* Determination of 23 vermifuge residues in livestock and poultry meat by QuEChERS-UPLC-MS/MS [J]. Feed Ind, 2024, 45(3): 120–126.
- [26] 汤晨. UPLC-MS/MS 测定牛奶中三氮唑和氮氮菲啉残留[J]. 食品工业, 2023, 44(9): 240–243.
TANG C. Determination of diminazene aceturate and isometamidium chloride in milk by UPLC-MS/MS [J]. Food Ind, 2023, 44(9): 240–243.
- [27] JANG S, SEO H, KIM H, *et al.* Development of a quantitative method for detection of multiclass veterinary drugs in feed using modified QuPPe extraction and LC-MS/MS [J]. Molecules, 2022, 27(14): 4483.
- [28] 周雨卉. 牛组织中抗锥虫药物三氮唑和氯化氮氮菲啉的 HPLC-UV 检测方法研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017.
ZHOU YH. Determination of antitrypanosomal drugs of diminazene aceturate and isometamidium chloride in cattle tissue by HPLC-UV [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017.
- [29] PERESTRELO R, SILVA P, PORTO-FIGUEIRA P, *et al.* QuEChERS-fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. Anal Chim Acta, 2019, 1070: 1–28.
- [30] 童兰艳, 许博舟, 聂雪梅, 等. 液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱法测定牛奶中 22 种真菌毒素[J]. 色谱, 2023, 41(11): 986–994.
TONG LY, XU BZ, NIE XM, *et al.* Determination of 22 mycotoxins in milk by liquid chromatography-quadrupole/orbitrap mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2023, 41(11): 986–994.

作者简介



张 璐, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品及食品相关产品检测。
E-mail: zhanglucqjc@163.com



董立雅, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究。
E-mail: dongliya@mengniu.cn



许秀丽, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: 13146594637@163.com



逯 刚, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究。
E-mail: lugang@mengniu.cn