高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 7 种苯并咪唑类和 2 种硝基咪唑类药物残留

袁娟，顾贝贝，楼芸，姚倩，滕颖，赵威，张萍，王梦茹，费少姝，李青飞，许暄，黄佳敏，刘芸*

（南京海关动植物与食品检测中心，江苏南京 210001）

摘要：为同时测定多种基质中 7 种苯并咪唑类和 2 种硝基咪唑类药物残留量，建立了高效液相色谱-串联质谱法同时检测动物源性食品中三氯苯达唑酮、甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑、芬苯达唑、奥芬达唑、奥芬达唑砜、洛硝达唑和替硝唑残留量的方法。样品经盐酸羟胺溶液预处理以保护三氯苯哒唑酮，随后采用酸性乙腈提取，PRiME HLB 固相萃取柱净化，采用 C_{18} Core shell 色谱柱分离，以甲醇-体积分数 0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱；在电喷雾正离子模式下电离，选择反应监测（Selected Reaction Monitoring，SRM）模式检测，同位素内标法定量。7 种苯并咪唑类药物在 10~400 ng mL^{-1} 范围内线性关系良好（决定系数 R^2>0.99），检出限为 3 μg kg^{-1}，定量限为 10 μg kg^{-1}；2 种硝基咪唑类药物在 1~40 ng mL^{-1} 范围内线性关系良好（决定系数 R^2>0.99），检出限为 0.3 μg kg^{-1}，定量限为 1.0 μg kg^{-1}。在猪肉、鱼肉、鸡蛋、牛奶和蜂蜜五种基质中进行加标试验，在 1、2、10 倍定量限添加水平下的平均回收率范围为 71.3%~106.4%，相对标准偏差范围为 0.6%~9.2%。本方法操作简便、灵敏度高且基质覆盖范围广，可实现动物源性食品中多种苯并咪唑类和硝基咪唑类药物残留量的同步检测，能满足国际上严苛的限量要求，可为进出口食品安全监管工作提供可靠的技术支持。

关键词：动物源性食品；苯并咪唑类；硝基咪唑类；高效液相色谱-串联质谱法

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.7.0640

Determination of Residues of Seven Benzimidazoles and Two Nitroimidazoles in Animal-Derived Foods by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

YUAN Juan, GU Beibei, LOU Yun, YAO Qian, TENG Ying, ZHAO Wei, ZHANG Ping, WANG Mengru, FEI Shaoshu, LI Qingfei, XU Xuan, HUANG Jiamin, LIU Yun*

(Nanjing Customs Animal, Plant and Food Testing Center, Nanjing 210001, China)

Abstract: In order to simultaneously detect and quantify the residues of seven benzimidazole and two nitroimidazole drugs in multiple matrices, a method for the simultaneous detection of triclabendazole ketone, mebendazole, hydroxymebendazole, amino mebendazole, fenbendazole, oxfendazole, oxfendazole sulfone, ronidazole and tinidazole residues in animal-derived foods was established by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Samples were pretreated with hydroxylamine hydrochloride solution to protect triclabendazolone, then extracted with acidic acetonitrile, purified on a PRiME HLB solid phase extraction column, separated on a C_{18} Core shell column with gradient elution using methanol-0.1% formic acid in water as mobile phase. Ionization was performed in electrospray positive ion mode, detection was carried out in selected reaction monitoring mode (Selected Reaction Monitoring, SRM), and quantification was achieved by isotope internal standard method. The seven benzimidazoles showed good linearity in the range of 10~400 ng mL^{-1} (coefficient of determination R^2>0.99), with a limit of detection (LOD) of 3 μg·kg^{-1} and a limit of quantification (LOQ) of 10 μg·kg^{-1}; the two nitroimidazoles showed good linearity in the range of 1~40 ng mL^{-1} (R^2>0.99), with a limit of detection (LOD) of 0.3 μg·kg^{-1} and a limit of quantification (LOQ) of 1.0 μg·kg^{-1}. Spiked recovery tests were conducted in pork, fish, egg, milk and honey at three levels (1LOQ、2LOQ and 10LOQ). The average recoveries ranged from 71.3% to 106.4%, with relative standard deviations (RSDs) of

收稿日期：2026-04-23；修回日期：2026-07-07；接受日期：2026-07-08

基金项目：南京海关科研项目（2024KJ25；2026KJ28）

作者简介：袁娟（1987-），女，本科，高级工程师，研究方向：食品安全，E-mail：27882040@qq.com

通讯作者：刘芸（1985-），女，博士，正高级工程师，研究方向：食品掺假鉴别研究及农兽药残留分析，Email：412502603@qq.com

0.6%~9.2%. This method features simple operation, high sensitivity and a wide matrix coverage range. It enables the simultaneous detection of residues of multiple benzimidazoles and nitroimidazoles in animal-derived foods, meets the stringent international residue limits, and provides reliable technical support for the food safety supervision of import and export commodities.

Key words: animal-derived foods; benzimidazoles; nitroimidazoles; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

苯并咪唑类药物是一类应用广泛的合法驱虫药，主要用于防治动物线虫、绦虫等寄生虫感染[1-3]，常见种类包括三氯苯达唑（残留标志物为三氯苯哒唑酮）、甲苯咪唑、芬苯达唑、奥芬达唑等[4-6]。研究表明，该类药若使用不当或残留超标，不仅可能影响动物繁殖能力、诱导寄生虫产生耐药，还会对人类健康构成潜在风险[7-10]。洛硝哒唑、替硝唑属于硝基咪唑类抗菌药，虽然曾经被用于抗菌促生长[11,12]，但由于其代谢物已被证实具有致突变与潜在致癌性，我国及国际上绝大多数国家已明确禁止在食用动物（含蜜蜂）中使用，并将其列为禁用兽药[13,14]。

当前，我国兽药残留检测标准体系面临多重挑战：一是部分兽药检测标准存在缺失，例如三氯苯哒唑酮尚未建立食品相关检测标准；二是现有标准基质覆盖范围有限，如替硝唑仅针对饲料、虾、肉类和蜂产品制定了检测标准，其是否适用于其它水产品尚不明确；三是三氯苯哒唑酮、甲苯咪唑及代谢物羟基甲苯咪唑和氨基甲苯咪唑、奥芬达唑、芬苯达唑、奥芬达唑砜等 7 种苯并咪唑类及其代谢物的现有检测标准，未完全覆盖 GB 31650-2019 中规定的畜禽类基质。这 7 种苯并咪唑类和 2 种硝基咪唑类药物在国内的所有检测标准及基质适用情况，具体详见表 1。

国内外对于 7 种苯并咪唑类及代谢物的限量要求，具体如表 2 所示。对比可知，我国部分兽药最大残留限量标准，相较于欧盟等国际标准更为宽松。而洛硝哒唑、替硝唑这 2 种硝基咪唑类药物，在国内外均属于禁用药物，因此不存在限量差异。这类限量标准的差异，在科学风险评估与国际贸易实践中可能引发多重隐患。从消费者健康层面来看，长期摄入残留量高于国际严格限量标准的动物源性食品，不仅易在人体内蓄积形成潜在健康风险，还会大幅削弱现行食品安全标准的管控与防护效能。从产业发展层面分析，相对宽松的残留限量标准，极易成为我国动物源性食品出口欧盟等严苛市场的技术性贸易壁垒。一旦产品被检出残留超标，不仅会面临扣留、通报等处罚，甚至可能被市场禁入，直接损害出口企业的经济利益，同时对我国农产品国际贸易的整体声誉造成负面影响。

表 1 7 种苯并咪唑类和 2 种硝基咪唑类药物的国内标准和基质适用情况

Table 1 Domestic standards and matrix applicability for 7 benzimidazoles and 2 nitroimidazoles

化合物	标准	适用基质
三氯苯达唑酮	无	/
甲苯咪唑及代谢物	GB 31656.15-2022、GB 31656.1-2021	鱼、虾和鳖可食组织
	GB/T 21324-2007	鸡肉、牛肉、猪肉、鸡肝、牛肝、猪肝
奥芬达唑/	GB/T 21324-2007	鸡肉、牛肉、猪肉、鸡肝、牛肝、猪肝
芬苯达唑/	GB/T 22972-2008	牛奶和奶粉
奥芬达唑砜	SN/T 1626-2019	牛肉、猪肝、午餐肉
替硝唑	SN/T 1626-2019	鸡肉、猪肉、牛肉、香肠、罐头、酱牛肉
	GB/T 21995-2008、农业农村部公告第 197 号-1-2019、2349 号-6-2015	饲料
	GB/T 22949-2008	蜂产品（蜂王浆、冻干粉及蜂蜜）
洛硝达唑	GB/T 21995-2008、农业农村部公告第 197 号-1-2019	饲料
	SN/T 1626-2019	鸡肉、猪肉、牛肉、香肠、罐头、酱牛肉
	SN/T 3155-2012	猪肉、虾、蜂蜜
	GB/T 23407-2009、GB/T23410-2009、GB/T 20744-2006、GB/T18932.26-2005、SN/T 2579-2010	蜂产品
	GB/T22982-2008	牛奶和奶粉
	GB/T 21318-2007	猪肉、鸡肉、牛肉、猪肝、鸡肝、牛肝、猪肾、牛肾、鱼肉、奶粉、蜂蜜

	SN/T 1928-2007	牛肉、猪肉、禽肉组织及其肝脏、肾脏、乳及乳制品、蜂蜜、水产品
	GB/T 23406-2009	肠衣

表 2 国内外苯并咪唑类药物最大残留限量

Table 2 Maximum residue limits (MRLs) for benzimidazoles in China and abroad

化合物	国内外标准要求			
	GB 31650-2019	欧盟	国际食品法典委员会	韩国
三氯苯达唑酮	10~850 μg kg^{-1}（牛和羊的肌肉、肝、肾、脂肪和奶）	10~250 μg kg^{-1}（反刍动物）	100~850 g kg^{-1}（反刍动物）	/
甲苯咪唑及代谢物	60~400 μg kg^{-1}（马和羊的肌肉、肝、肾、脂肪）	60~400 μg kg^{-1}（马和羊）	/	/
奥芬达唑、芬苯达唑	50~1 300 μg kg^{-1}（畜禽产品）	10~1 300 μg kg^{-1}（畜禽产品）	100~500 g kg^{-1}（畜禽产品）	50~500 g kg^{-1}（畜禽产品）

已有文献表明，针对苯并咪唑类和硝基咪唑类药物的检测方法主要包括液相色谱法、液相色谱-质谱联用法和酶联免疫吸附法等[15-20]。其中，液相色谱-串联质谱法凭借其特异性强、灵敏度高的特点，成为复杂基质中多残留同分析的核心技术手段，能够对目标物实现精准定性与定量检测。然而，目前能够同时兼顾这两类药物的检测方法较为匮乏。在样品前处理环节，虽已有固相萃取、QuEChERS、凝胶渗透色谱等技术手段可供选用[21-25]，但现方法普遍存在明显局限性：或仅适用于单一基质（如仅限水产品或乳制品），或目标化合物覆盖不全（如缺失三氯苯哒唑酮、替硝唑等关键物质）[26-30]。基于此，为切实满足当前兽药残留检测的实际需求、提升检测工作的效率与精准度，亟须建立一套可覆盖多种基质、包括全部相关目标物，且契合国际严格监管要求的多残留同步分析方法。本研究拟采用同位素内标法，采用 PRiME HLB 固相萃取柱净化作为前处理方法结合液相色谱-串联质谱术开展新鲜猪肉、鱼肉、鸡蛋、生牛乳和蜂蜜中 7 种苯并咪唑类和 2 种硝基咪唑类药物留量的定性定量方法研究，为进出口动物源性食品提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

三氯苯达唑酮（Ketotriclabendazole，CAS 号：1201920-88-8）、甲苯咪唑（Mebendazole，CAS 号：31431-39-7）、羟基甲苯咪唑（5-Hydroxymebendazole，CAS 号：60254-95-7）、氨基甲苯咪唑（Mebendazole-amine，CAS 号：52329-60-9）、奥芬达唑（Oxfendazole，CAS 号：53716-50-0）、芬苯达唑（Fenbendazole，CAS 号：43210-67-9）、奥芬达唑砜（Oxfendazole sulfone，CAS 号：54029-20-8）、洛硝达唑（Ronidazole，CAS 号：7681-76-7）、替硝唑（Tinidazole，CAS 号：19387-91-8）、洛硝达唑-D3（Ronidazole-D_3，CAS 号：1015855-87-4）、芬苯达唑-D3（Fenbendazole-D_3，CAS 号：1228182-47-5）、甲苯咪唑-D3（Mebendazole-D_3，CAS 号：1173021-87-8）、羟基甲苯咪唑-D3（5-Hydroxymebendazole-D_3，CAS 号：1173020-86-4）等标准物质（纯度大于 99.0%），ALTA 天津阿尔塔；甲酸（色谱纯），上海阿拉丁生化科技股份有限公司；甲醇、乙腈均为色谱纯，上海安谱实验科技股份有限公司；乙腈、氯化钠均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司；氯化羟胺（分析纯），南京化学试剂股份有限公司。

耗材：WQ PRiME HLB 固相萃取柱（60 mg、3 mL，武汉蔚启科技有限公司；微孔滤膜：尼龙、聚醚砜（0.22 μm），天津市津腾实验设备有限公司。

试验用水：超纯水（自制）。

试验基质：新鲜猪肉、鱼肉、鸡蛋、生牛乳和蜂蜜（均来自各大超市与企业送检），猪肉、鱼肉和鸡蛋绞碎均质后-20 ℃保存，生牛乳 0~4 ℃冷藏保存，蜂蜜常温保存。

1.2 仪器与设备

TSQ Quantum Ultra AM 三重四级杆质谱仪，美国赛默飞世尔科技有限公司；4-21R 医用离心机，湖南恒诺仪器设备有限公司；Heal Force Smart-N15VF 超纯水系统，上海力新仪器有限公司，HP-M20 多管涡旋振荡器，华派

科仪仪器有限公司；Auto Vap s60 氮吹仪，美国 ATR 公司。

1.3 标准溶液的配制

标准储备液：准确称取适量三氯苯达唑酮、甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑、芬苯达唑、奥芬达唑、奥芬达唑砜、洛硝达唑、替硝唑标准物质，用乙腈（色谱纯）配制成浓度为 1 mg mL^{-1} 的标准储备液，4 ℃以下保存。

混合标准中间液：准确吸取一定量的标准储备溶液，用体积比为 3:7 的甲醇-水溶液逐级稀释洛硝达唑、替硝唑的质量浓度为 1 μg·mL^{-1}，甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑、三氯苯达唑酮、芬苯达唑、奥芬达唑、奥芬达唑砜的质量浓度为 10 μg·mL^{-1} 的混合中间液，4 ℃以下保存。

同位素内标储备液：准确称取适量甲苯咪唑-D3、芬苯达唑-D3、洛硝达唑-D3、羟基甲苯咪唑-D3，用乙腈（色谱纯）配制成质量浓度为 10 μg·mL^{-1} 的内标储备液，4 ℃以下保存。

混合同位素内标中间液：准确吸取一定量的同位素内标储备液，用体积比为 3:7 的甲醇-水溶液逐级稀释成洛硝达唑-D3 质量浓度为 100 ng mL^{-1}，芬苯达唑-D3、甲苯咪唑-D3、羟基甲苯咪唑-D3 质量浓度为 1 μg·mL^{-1} 的混合内标中间液，4 ℃以下保存。

混合标准工作液：分别吸取一定量的混合标准中间液和混合同位素内标中间液，用体积比为 3:7 的甲醇-水溶液逐级稀释成洛硝达唑、替硝唑的质量浓度为 1、2、4、10、20、40 ng mL^{-1}，甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑、三氯苯达唑酮、芬苯达唑、奥芬达唑、奥芬达唑砜的质量浓度为 10、20、40、100、200、400 ng mL^{-1} 的系列标准曲线，洛硝达唑-D3 的质量浓度均为 4 ng mL^{-1}，芬苯达唑-D3、甲苯咪唑-D3、羟基甲苯咪唑-D3 的质量浓度均为 40 ng mL^{-1}，现用现配。

1.4 样品前处理

提取：称取样品 2 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 40 μL 混合内标中间溶液，于涡旋混匀器上快速混合 30 s，加入 5 mL 体积分数 20%盐酸羟胺溶液、10 mL 体积分数 2%酸性乙腈溶液和 5 g 氯化钠，涡旋混匀；超声提取 15 min 后 8 000 r min^{-1} 离心 5 min，取全部上清液待用。

净化：PRiME HLB 固相萃取小柱使用前依次用 10 mL 甲醇、10 mL 水通过，静置活化 30 min。取全部上清液过柱，接收流出液，45 ℃氮吹至干。

复溶：检测目标物为三氯苯达唑酮时，以体积比为 1:1 的乙腈-水溶液 1.0 mL 复溶，检测目标物除三氯苯达唑酮外的其他化合物时，以体积比为 3:7 的甲醇-水溶液 1.0 mL 复溶，过 0.22 μm 水相和有机相滤膜至进样瓶中，待进样分析。

1.5 色谱及质谱条件

1.5.1 液相色谱条件

色谱柱：C_{18} Core shell 色谱柱（100 mm×4.6 mm×2.6 μm）；柱温：25 ℃；进样量：25 μL；流动相：A 相：体积分数 0.1%甲酸水溶液；B 相：甲醇；流速：0.6 mL min^{-1}；梯度洗脱程序：0~2.5 min，体积分数 5% B；2.5~6.5 min，体积分数 90% B；6.5~8.5 min，体积分数 5% B。

1.5.2 质谱条件

电离模式：电喷雾离子源（ESI）；扫描模式：正离子扫描；检测方式：选择反应监测（Selected Reaction Monitoring，SRM）；电喷雾电压：4 800 V；离子源温度：350 ℃。化合物的离子对参数如表 3 所示。

表 3 目标物的保留时间、离子对和碰撞能参数

Table 3 Retention times, ion pairs, and collision energy parameters of target compounds

化合物	保留时间/min	定量离子/(*m/z*)	定性离子/(*m/z*)	碰撞能量/eV
三氯苯达唑酮	6.12	331.0	168.0	30
		329.0	168.0*	27
甲苯咪唑	5.30	296.0	105.0*	45
			77.2	50

羟基甲苯咪唑	4.35	298.0	160.0*	50
			266.0	20
氨基甲苯咪唑	4.18	238.0	105.1*	37
			77.2	25
奥芬达唑	4.85	332.0	159.0*	31
			191.0	31
芬苯达唑	4.35	300.0	268.0*	20
			159.0	20
奥芬达唑砜	4.93	332.0	300.0*	20
			159.0	45
洛硝达唑	2.83	201.2	140.0*	12
			55.2	25
替硝唑	3.39	248.2	121.1*	16
			128.0	20
洛硝达唑-D_3	2.83	204.2	143.1	15
芬苯达唑-D_3	4.35	303.0	268.0	20
甲苯咪唑-D_3	5.30	299.0	105.1	32
羟基甲苯咪唑-D_3	4.35	301.1	266.0	20

注：*为定量离子。

1.6 数据分析

所有表格和图均采用 Office 2024 版本自带的 Word（版本号：14.0.7268.5000）、Excel（版本号：14.0.7268.5000）完成；数据均采用 6 平行

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 色谱条件的优化

本研究以 7 种苯并咪唑类化合物（三氯苯达唑酮、甲苯咪唑、羟基甲苯咪唑、氨基甲苯咪唑、奥芬达唑、芬苯达唑、奥芬达唑砜）及 2 种硝基咪唑类化合物（洛硝达唑、替硝唑）为目标分析物，开展液相色谱分离条件优化。由于 9 种目标物极性区间跨度较大，咪唑结构易发生峰拖尾、相邻组分共流出等问题，试验对比了不同有机相（甲醇和乙腈）、水相改性添加剂（0.1%甲酸水溶液、水）、梯度洗脱程序及对组分分离度、峰形对称性与质谱响应的影响。综合各目标物色谱行为、分离效果与检测灵敏度，最终确定最优流动相体系为体积分数 0.1%甲酸水溶液-甲醇，该体系可有效改善碱性咪唑类物质拖尾现象，实现 9 种化合物基线分离，峰形尖锐对称，满足多残留同步定量分析要求。

2.1.2 质谱参数的优化

将 9 种目标化合物及其同位素内标的标准溶液通过流动注射方式导入质谱仪，首先采用全扫描模式确定各目标物的母离子，随后对筛选出的母离子进行二级质谱扫描，从而得到产物离子，进一步优化相关质谱参数，最终得到目标物的二级质谱图。在 SRM 模式下，选择丰度较高的离子对为定性和定量离子对，并对其碰撞能量等条件进行优化，具体参数如表 3 所示。需要特别说明的是，三氯苯达唑酮存在 2 个相对丰度较高的母离子，这与其分子式中含有三个氯离子有关，氯元素在自然界存在两种天然同位素 ^{35}Cl（丰度比 75.77%）和 ^{37}Cl（丰度比 24.23%）。因此，与多数化合物仅含单一主要母离子不同，三氯苯达唑酮会形成质荷比不同的两个母离子，9 种目标物的结构如图 1 所示。

咪唑类化合物分子结构中含有碱性含氮基团，其母核咪唑环上的氮原子具有碱性特征。在酸性电喷雾液滴环境中，该氮原子可作为质子受体，容易结合一个质子（H^+），形成稳定的带正电准分子离子$[M+H]^+$。这一质子化

过程是咪唑类化合物最自然、最优势的电离路径，使其在正离子模式下能产生强而稳定的母离子信号，为后续的离子碎片化及选择反应监测奠定良好基础，进而实现目标物的高灵敏度定量分析。

三氯苯达唑酮的结构分子中含有三个氯原子，同时兼具苯并咪唑结构特有的碱性 N，以及受氯原子活化形成的酸性 N-H 基因，基于结构特征分析，该化合物理论上正、负离子模式均可用。在同样 10 ng·mL^{-1} 浓度下，结果见图 2 所示，其正离子模式下的信号强度显著高于负离子模式，因此，最终确定采用正离子模式进行后续检测分析。

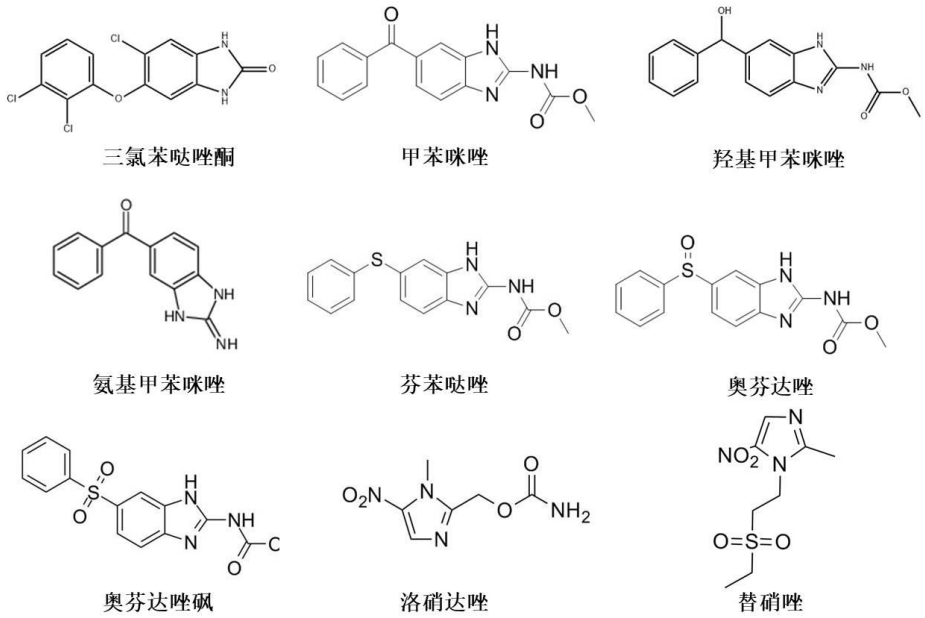


图 1 9 种目标物质的化学结构

Fig.1 Chemical structures of 9 target substances

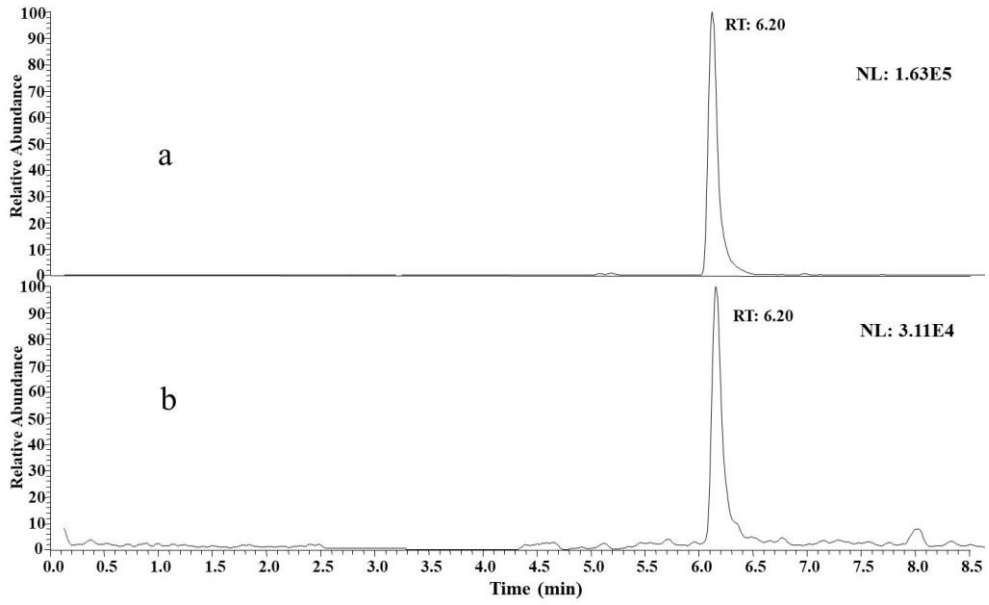


图 2 三氯苯哒唑酮分别在正离子（a）和负离子（b）模式下的色谱图

Fig.2 Chromatograms of triclabendazolone in positive ion mode (a) and negative ion mode (b)

2.2 前处理方法优化

2.2.1 提取溶剂的优化

在动物源性食品中苯并咪唑类和硝基咪唑类药物残留检测领域，除三氯苯达唑酮外，其余目标物均有类似的

可参考检测标准。考虑到不同的提取溶剂对目标物的选择性存在差异，本研究选用了乙酸乙酯、乙腈和酸性乙腈作为提取溶剂开展实验。实验结果表明，采用乙酸乙酯作为提取溶剂时，提取液中裹挟的油脂杂质含量较多，可能会对后续的检测造成基质干扰；酸性乙腈对除三氯苯达唑酮外的目标物提取效果较好，可实现目标物的高效富集。而三氯苯达唑酮因其分子结构特殊，既含有酮肟基团（C=N-O-R），又含有多个氯原子，其酮肟基团在酸性条件下相对不稳定，容易发生水解或开环反应，降解为三氯苯达唑亚砜等代谢产物，导致目标物回收率极低。

针对这一问题，本研究引入盐酸羟胺作为保护剂。它是一种强亲核试剂，可与三氯苯达唑酮的酮肟基团发生特异性反应，生成结构更稳定的中间体，从而有效抑制目标物的降解。本研究以加标回收率作为提取溶剂优化的核心评价指标，以鱼肉为基质，洛硝哒唑和替硝唑在 2 μg kg^{-1}，其他化合物在 20 μg kg^{-1} 加标水平下测定 9 种目标物回收率如表 4 所示。基于此，本研究最终确定提取方案为：先向样品中加入盐酸羟胺溶液，再采用酸性乙腈进行提取，三氯苯达唑酮的提取效果得到了显著提升。

表 4 不用提取溶剂对目标物的回收率比较

Table 4 Comparison of analyte recoveries without extraction solvent

目标物	乙酸乙酯/%	乙腈/%	酸性乙腈/%	加入保护剂后，再加酸性乙腈/%
三氯苯达唑酮	74.3	75.5	50.8	90.0
甲苯咪唑	90.8	93.7	93.5	93.5
羟基甲苯咪唑	93.5	94.2	94.0	94.9
氨基甲苯咪唑	80.4	82.6	83.1	82.5
奥芬达唑	92.3	90.8	92.5	92.1
芬苯达唑	91.6	91.3	91.0	91.4
奥芬达唑砜	83.8	84.3	83.3	84.1
洛硝达唑	96.5	97.6	97.1	98.8
替硝唑	97.8	99.2	98.4	99.0

2.2.2 定容溶剂的优化

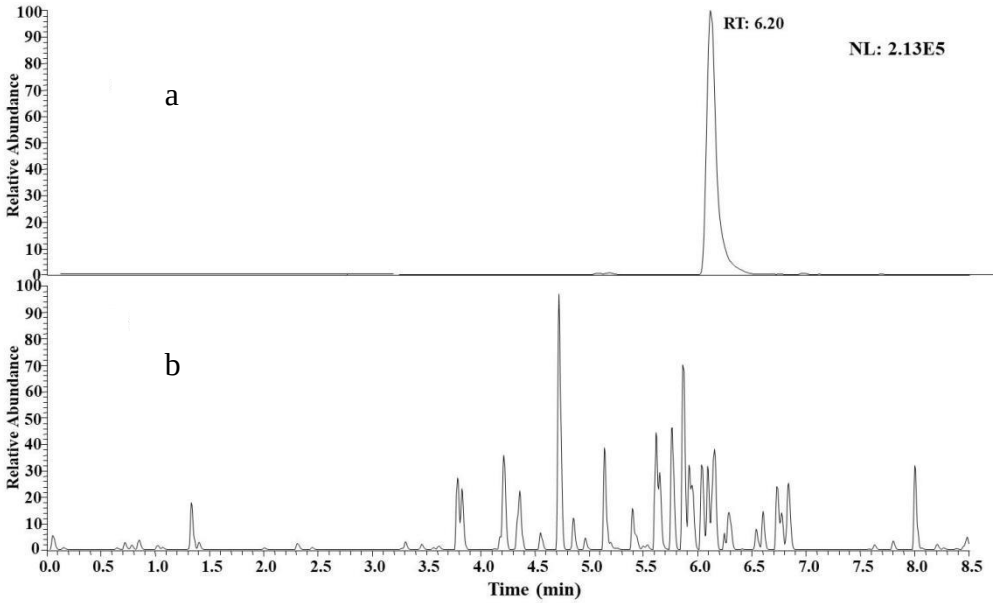


图 3 三氯苯哒唑酮采用不同定容溶剂的色谱图

Fig.3 Chromatograms of triclabendazolone using different reconstitution solvents

注：a: 乙腈-水（1:1）b: 甲醇-水（3:7）。

三氯苯达唑酮水溶性较差，微溶于甲醇，采用甲醇-水（3:7）体系定容时，回收率很低，这是由于该溶剂对三氯苯达唑酮的溶解能力不足，导致部分目标物无法完全溶解，进而影响回收率。改用乙腈-水（1:1）体系进行定容后，三氯苯达唑酮的回收率得到显著提升；但与此同时，甲苯咪唑、芬达咪唑、奥芬达唑、洛硝达唑和替硝唑等其余目标化合物，在该溶剂体系下的回收率却不如甲醇-水（3:7）体系。

为兼顾三氯苯达唑酮与其他目标物的检测需求，确保所有化合物均能获得理想回收率，本研究在实际检测中采用了差异化定容策略：针对三氯苯达唑酮，采用乙腈-水（1:1）作为定容溶剂；针对其余目标物，则采用甲醇-水（3:7）进行定容。这种针对性的定容方式可最大程度地满足不同化合物的检测要求溶解特性，有效提升整个检测方法的准确性和可靠性。三氯苯哒唑酮采用不同定容溶剂的色谱图如图 3 所示，定容后浓度均为 10 ng mL^{-1}。

在优化的色谱质谱条件下，浓度为 10 ng mL^{-1} 苯并咪唑类和硝基咪唑类药物标准溶液的提取离子流色谱图如图 4 所示，明显看出目标物质得到较好分离，响应值均较高，该条件可以用于后续分析。

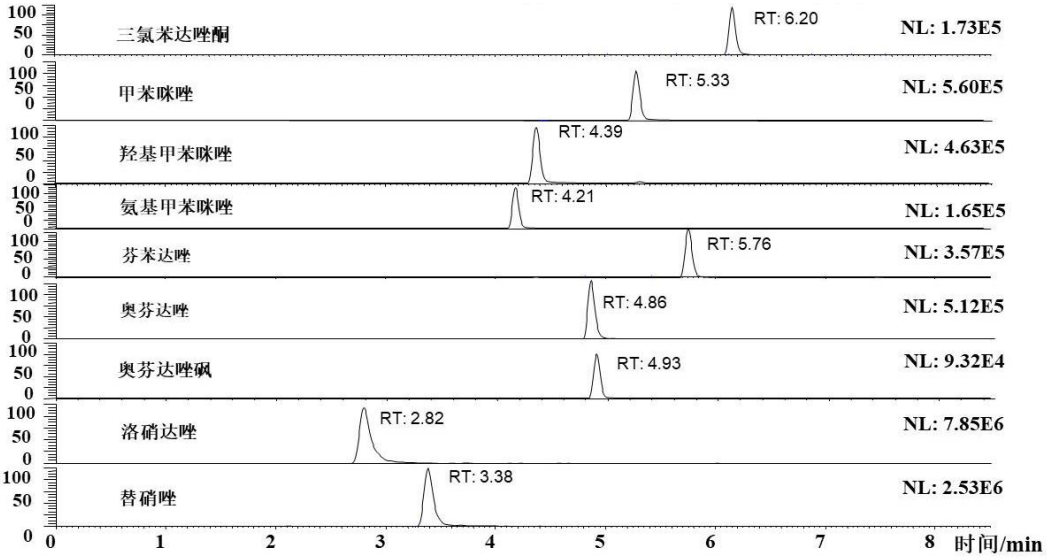


图 4 各化合物优化后的色谱图

Fig.4 Optimized chromatograms of each compound

2.3 方法学评价

试验过程中首先采用外标法进行考察，发现目标物回收率均较低，采用同位素内标法定量分析，可有效校正样品前处理损失、仪器响应波动以及复杂样品基质带来的信号抑制作用，大幅降低基质效应对定量结果造成的偏差，显著提升方法准确度与重复性。

2.3.1 线性范围及检出限

基于上述优化好的色谱质谱条件下，配制标准浓度点，对 7 种苯并咪唑类和 2 种硝基咪唑类目标物进行测定，采用内标法定量。进行线性回归分析，并以信噪比 S/N≥3 对应标准溶液的浓度为检出限（Limit of Detection，LOD），以信噪比 S/N≥10 对应标准溶液的浓度为定量限（Limit of Quantification，LQD），数据详见表 5。

结果表明：7 种苯并咪唑类化合物在 10~400 ng mL^{-1} 质量浓度范围内线性良好，2 种硝基咪唑类化合物在 1~40 ng mL^{-1} 质量浓度范围内线性良好，决定系数 R^2>0.99。

表 5 各化合物的线性方程、相关系数和定量限

Table 5 Linear equations, correlation coefficients, and limits of quantification (LOQs) of each compound

化合物	内标物质	回归方程式	决定系数 R^2	线性范围/(ng mL^{-1})	定量限/(μg kg^{-1})	检出限/(μg kg^{-1})
三氯苯达唑酮	甲苯咪唑-D3	y=-0.005 240 54+0.001 495 76x	0.997 4	10~400	10	3.0
甲苯咪唑	甲苯咪唑-D3	y=0.053 285 5+0.065 619 3x	0.999 2	10~400	10	3.0
氨基甲苯咪唑	羟基甲苯咪唑-D3	y=-0.038 287 1+0.012 673 3x	0.999 0	10~400	10	3.0
羟基甲苯咪唑	羟基甲苯咪唑-D3	y=0.017 863 7+0.013 153x	0.996 7	10~400	10	3.0
奥芬达唑	芬苯达唑-D3	y=-1.557 79+0.456 796x	0.996 5	10~400	10	3.0
芬苯达唑	芬苯达唑-D3	y=0.296 147+0.369 262x	0.999 0	10~400	10	3.0
奥芬达唑砜	芬苯达唑-D3	y=-0.612 177+0.090 507 4x	0.998 0	10~400	10	3.0
洛硝达唑	洛硝达唑-D3	y=-0.013 451 3+0.261 413x	0.999 7	1~40	1.0	0.3
替硝唑	洛硝达唑-D3	y=-0.081 617 1+0.329 007x	0.997 6	1~40	1.0	0.3

2.3.2 回收率和精密度

依据 GB/T 27404-2026《实验室质量控制规范 食品理化检测》进行低、中、高浓度水平加标试验。在空白样品中分别添加 1、2、10 倍定量限水平的混合标准溶液，每个水平的样品做 6 个平行样测试，具体结果如表 6 所示。结果表明：三个加标水平下待测组分平均回收率介于 71.3%~106.4%之间，相对标准偏差范围为 0.6%~9.2%。表明所建立的方法准确度和精密度均满足分析检测要求。

表 6 不同基质中各化合物加标回收率和精密度

Table 6 Recoveries and precisions of each compound in different matrices (RSD, *n*=6)

化合物	添加水平 /(μg kg^{-1})	平均回收率/%					RSD/%				
		猪肉	牛奶	鸡蛋	鱼肉	蜂蜜	猪肉	牛奶	鸡蛋	鱼肉	蜂蜜
三氯苯达唑酮	10	80.9	79.4	77.4	85.9	82.1	3.8	6.0	7.2	3.1	5.8
	20	95.2	88.0	100.1	92.0	93.4	6.0	4.3	5.8	3.8	3.3
	100	98.7	86.3	92.1	101.9	97.5	5.8	4.8	3.2	5.0	5.8
甲苯咪唑	10	81.5	101.9	81.8	86.9	86.2	2.3	0.6	2.5	2.4	2.9
	20	92.1	90.2	101.3	93.5	92.7	2.4	2.9	1.5	2.9	2.5
	100	105.7	78.4	94.6	93.6	103.7	1.7	2.3	1.8	1.9	3.0
羟基甲苯咪唑	10	105.4	106.4	75.8	91.5	102.5	1.9	1.6	1.7	2.6	2.4
	20	89.7	105.2	90.2	74.9	84.7	1.3	4.0	1.4	3.5	2.0
	100	103.2	105.4	94.1	82.0	91.9	2.1	1.5	4.3	2.8	2.8
氨基甲苯咪唑	10	71.3	71.8	87.4	70.0	91.5	3.5	2.0	2.8	5.5	3.9
	20	80.7	86.3	103.0	82.5	95.1	2.7	4.7	0.7	2.4	1.9
	100	92.9	91.8	91.4	96.1	99.8	1.6	3.6	2.2	1.7	1.9
芬苯达唑	10	98.5	77.5	79.7	88.0	85.8	2.0	1.3	1.5	7.3	5.5
	20	91.8	73.1	85.3	71.4	86.2	2.4	2.5	1.6	2.1	4.9
	100	99.2	74.8	80.3	93.2	73.6	3.3	3.2	1.8	2.8	6.4
奥芬达唑	10	106.0	104.7	80.4	106.2	98.4	3.5	3.0	5.4	2.1	4.1
	20	77.0	89.7	75.8	72.1	88.0	4.1	4.2	4.3	3.0	6.9
	100	86.0	94.9	85.8	79.5	95.4	7.5	2.7	2.5	2.8	4.8
奥芬达唑砜	10	93.7	94.9	84.1	81.3	87.1	6.0	7.1	7.0	5.8	6.9
	20	95.5	97.6	95.5	84.1	85.1	3.7	3.8	7.2	3.7	9.2
	100	100.2	98.5	88.5	86.9	82.0	4.8	5.8	3.0	5.2	6.8
洛硝达唑	1	99.1	94.5	93.5	101.5	99.0	3.9	6.9	4.9	4.5	7.8
	2	90.0	92.6	86.2	98.8	99.0	2.4	4.0	4.2	4.2	4.1
	10	90.4	92.6	76.8	105.4	72.5	6.4	6.5	6.6	4.3	3.4
替硝唑	1	93.6	99.2	102.3	93.7	94.3	5.5	5.9	2.8	4.1	7.3
	2	106.3	90.8	90.2	99.0	88.2	5.3	5.6	7.8	5.1	6.9
	10	99.7	77.3	89.2	102.6	80.6	5.7	3.4	4.5	4.5	7.7

2.4 实际样品中目标物的检测情况

本方法以江苏省超市和企业送检收集的 217 批次动物源性食品为研究对象，分析动物源性食品中苯并咪唑类和硝基咪唑类药物的使用情况，其中包括 49 批次畜禽肉，43 批次水产品，38 批次禽蛋，20 批次生牛乳和 18 批次蜂蜜。其中检出有苯并咪唑类药物的样品有 3 批次，检出硝基咪唑类药物的样品有 1 批次。具体检出数值详见表 7，检出率为 1.84%。可见，部分养殖者为缩短养殖周期、降低疫病损失，存在超剂量、超范围用药物现象，在市场监管中，要持续关注动物源性食品中苯并咪唑类和硝基咪唑类药物的使用情况，保障食品安全。

表 7 不合格样品具体检出情况

Table 7 The specific detection details of non-compliant samples

序号	样品名称	检测项目	检出值/(μg kg^{-1})	判定标准	限值
1	牛里脊肉	三氯苯达唑酮	2.17	GB 31650-2019	250 μg·kg^{-1}
2	猪肉	甲苯咪唑	11.30	GB 31650-2019	禁用
3	草鸡蛋	洛硝达唑	1.25	农业农村部公告第 250 号	禁用
4	百花蜜	替硝唑	1.23	农业农村部公告第 250 号	禁用

3 结论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱检测方法，可实现动物源性食品中 7 种苯并咪唑类与 2 种硝基咪唑类药物残留的同步测定。样品经盐酸羟胺溶液预处理以保护三氯苯哒唑酮，随后采用酸性乙腈进行提取，提取液经 PRiME HLB 固相萃取柱净化、氮吹浓缩后，采用差异化复溶策略：检测三氯苯达唑酮时，以乙腈-水溶液（1:1）复溶，检测其余目标化合物时，则用甲醇-水溶液（1:1）复溶。目标物的分离采用甲醇-体积分数 0.1%甲酸水溶液梯度洗脱方式，在电喷雾正离子模式下，以选择反应监测模式进行数据采集，并通过同位素内标法进行定量分析。该方法创新性地实现了全部相关目标物的全覆盖检测，且各项技术指标均满足国际监管要求；兼具操作简便、灵敏度高、基质覆盖范围广的优势，填补了该领域多残留协同检测的技术空白，可为进出口食品安全监管工作提供可靠的技术支持。

参考文献

[1] 庄燕君,吴映璇,欧阳少伦,等.高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 19 种苯并咪唑类药物及代谢物残留[J].食品安全质量检测学报,2025,16(21):210-219.

[2] CHEN D, TAO Y, LIU Z, et al. Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk [J]. Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences, 2010, 878(28): 2928-2932.

[3] SUN H, YU Q W, HE H B. Nickel oxide nanoparticle-deposited silica composite solid-phase extraction for benzimidazole residue analysis in milk and eggs by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2016, 64: 356-363.

[4] GARCIA-GOMEZ D, GARCIA-HERNANDEZ M, RODRIGUEZGONZALO E, et al. A fast and reliable method for the quantitative determination ofbenzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012, 404(10): 2909-2914.

[5] LAN C, YUAN Z, YU Z, et al. Pretreatment and determination methods for benzimidazoles: An update since 2005 [J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1644: 462068.

[6] 刘国华,何玉榆,陈彤,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残留量的方法优化[J].国外畜牧学(猪与禽),2023,43(4):96-101.

[7] ZHANG Z, WU Y, LI X, et al. Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2017, 217: 182-190.

[8] 翟纹静,徐振东,陈娟,等.鸡肉中 16 种苯并咪唑及其代谢物残留量快速检测方法的研究[J].中国家禽,2018,40(18):40-44.

[9] 刘琪,朱馨乐,孙雷,等.高效液相色谱-串联质谱法检测猪肝中苯并咪唑类药物及其代谢物的残留量[J].中国兽药杂志,2010,44(2):1-6.

[10] 乔勇升,王萍,黄银波,等.固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱同时测定乳制品中的苯并咪唑类药物及其代谢物残留量[J].食品工业科技,2024,45(13):221-229.

[11] 陈明,汤宇,邵明诚,等.高效液相色谱法检测蜂蜜中替硝唑药物残留研究[J].蜜蜂杂志,2010,30(1):9-11.

[12] 富玥.高效液相色谱-串联质谱法检测猪肝中硝基咪唑类药物残留量[J].现代食品,2022,28(3):171-175.

[13] LI X W, KE Y B, WANG Y Y, et al. Confirmatory analysis of nitroimidazoles and hydroxy metabolites in honey by dispersive-solid phase extraction and Ultra-High Performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. [J]. Molecules (basel, switzerland), 2018, 23(12): 3350.

[14] 冷凯良,孙伟红,王志杰,等.HPLC-APCI(+)MS/MS 内标法测定水产品中的 3 种硝基咪唑类药物残留量[J].渔业科学进展,2009,30(5):88-93.

[15] CHEN D M, TAO Y F, ZHANG H H, et al. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry with pressurized liquid extraction method for the determination of benzimidazole residues in edible tissues. [J]. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2011, 879(19): 1659-1667.

[16] BISTOLETTI M, MORENO L, ALVAREZ L, et al. Multiresidue HPLC method tomeasure benzimidazole anthelmintics in plasma and egg from laying hens. Evaluation of albendazole metabolites residue profiles [J]. Food Chemistry, 2011, 126: 793-800.

[17] 冯丽凤,叶梦薇,林浩学,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 9 种苯并咪唑类药物残留[J].福建分析测试,2022,31(6):35-40.

[18] WANG Y, LI X, ZHANG Z, et al. Simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles, and chloramphenicol components in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 280-287.

[19] 刘洪斌.苯并咪唑类兽药残留 LC-MS/MS 方法及 ELISA 方法的建立[D].北京:中国农业科学院,2011.

[20] RUYCK D H, DAESELEIRE E, RIDDER D H , et al. Development and validation of a liquid chromatographic–electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 976(1-2): 181-194.

[21] XIA X, WANG Y, WANG X, et al. Validation of a method for simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles and chloramphenicols in swine tissues by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2013, 1292: 96-103.

[22] 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性食品中硝基咪唑药物及其代谢物[J].色谱,2018,36(5):431-438.

[23] LIU Y, LI J, MA Y, et al. Recent advances in toxicology, extraction, and analytical techniques for benzimidazole veterinary drug residues in food [J]. Food Chemistry, 2026, 508(PA): 148310.

[24] 王华,刘虹虹,罗达龙,等.QuEChERS dSPE EMR-Lipid-UPLC-MS/MS 测定蜂蜜中 4 种硝基咪唑药物残留[J].食品安全导刊,2022,13:91-95.

[25] 林永辉,李耀平,陈祥明,等.固相萃取法和凝胶渗透色谱法测定鳗鱼中苯并咪唑类药物残留[J].食品科学,2009,30(8):177-181.

[26] XIA X, LI X, DING S, et al. Determination of 5-nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in swine kidney by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 637(1-2): 79-86.

[27] TEJADA-CASADO C, MORENO-GONZÁLEZ D, LARA J F, et al. Determination of benzimidazoles in meat samples by capillary zone electrophoresis tandem mass spectrometry following dispersive liquid–liquid microextraction [J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1490: 212-219.

[28] XU Y, LI Z G, YANG H, et al. A magnetic solid phase extraction based on UiO-67@GO@Fe3O4 coupled with UPLC-MS/ MS for the determination of nitroimidazoles and benzimidazoles in honey [J]. Food Chemistry, 2022, 373(Part B):131512.

[29] 李蓉,杨璐齐,罗阳丹,等.QuEChERS/UPLC-Q-OrbitrapHRMS 法测定水产及水产加工品中 16 种苯并咪唑类与 13 种硝基咪唑类药物残留[J].分析测试学报,2018,37(5):547-555.

[30] 郭德华,邓晓军,赵善贞,等.固相萃取-高效液相色谱/串联质谱同时检测动物源性食品中 76 种兽药残留[J].分析化学,2010,38(3):318-324.