

同位素稀释-液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中13种镇静剂残留

杨洪生¹, 张秋云¹, 谭秀慧¹, 郑伟², 朱晓华¹, 陈慧敏³, 沈美芳^{1*}

(1. 江苏省淡水水产研究所, 南京 210017; 2. 江苏省产品质量监督检验研究院, 南京 210007;
3. 上海爱博才思分析仪器贸易有限公司, 上海 200335)

摘要: **目的** 建立同位素稀释-液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中13种镇静剂残留的方法。**方法** 样品采用乙腈-1%氨水溶液提取, 提取液经固相萃取柱(Oasis PRIME HLB柱)净化, 浓缩后用流动相定容。以1%甲酸水溶液和乙腈为流动相, 采用Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)分离后, 在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下测定, 内标法定量。**结果** 13种镇静剂在0.2~50 μg/L浓度范围内线性关系良好($r>0.99$), 检出限和定量限分别为0.1~0.2 μg/kg和0.3~0.5 μg/kg。在3个浓度加标水平下的平均回收率为84.0%~116.6%, 相对标准偏差为2.1%~9.9%。**结论** 该方法前处理简单、结果准确, 适用于水产品中13种镇静剂残留的快速检测。

关键词: 同位素稀释; 液相色谱-串联质谱法; 水产品; 镇静剂

Simultaneous determination of 13 kinds of sedative residues in aquatic products by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YANG Hong-Sheng¹, ZHANG Qiu-Yun¹, TAN Xiu-Hui¹, ZHENG Wei², ZHU Xiao-Hua¹,
CHEN Hui-Min³, SHEN Mei-Fang^{1*}

(1. Freshwater Fishery Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 2. Jiangsu Product Quality Testing and Inspection Institute, Nanjing 210007, China; 3. Shanghai AB Sciex Analytical Instrument Trading Co., Ltd., Shanghai 200335, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 13 kinds of sedative residues in aquatic products by isotope dilution-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with acetonitrile-1% ammonia solution. The extract was purified by solid phase extraction column (Oasis PRIME HLB column), and diluted with mobile phase after concentration, then separated by Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈ column (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) using 1% formic acid and acetonitrile as mobile phase, determined in multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by internal standard

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设项目(JATS[2020]329)、江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(19)3008)、江苏省“333 高层次人才培养工程”项目(BRA2019093)

Fund: Supported by the Jiangsu Modern Agricultural Industry Technology System Project (JATS[2020]329), Jiangsu Independent Innovation Project of Agricultural Science and Technology (CX(19)3007), and “333 High-level Talent Training Project” of Jiangsu Province (BRA2019093)

***通信作者:** 沈美芳, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全研究。E-mail: mfshen@163.com

***Corresponding author:** SHEN Mei-Fang, Professor, Aquatic Products Analysis and Testing Center of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China. E-mail: mfshen@163.com

method. **Results** The 13 kinds of sedatives had a good linear relationship within the concentration range of 0.2–50 $\mu\text{g/L}$ ($r>0.99$). The limits of detection and limits of quantitation were 0.1–0.2 $\mu\text{g/kg}$ and 0.3–0.5 $\mu\text{g/kg}$, respectively. Average recoveries for the analytes at 3 spiked levels ranged from 84.0% to 116.6% with relative standard deviations (RSDs) of 2.1%–9.9%. **Conclusion** The method has simple pretreatment and accurate results, and is suitable for the rapid detection of 13 sedative residues in aquatic products.

KEY WORDS: isotope dilution; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aquatic products; sedative

0 引言

镇静剂(sedative)是一类能够抑制中枢神经系统从而减弱生理机能、减轻或消除躁动、恢复安静的药物^[1-2]。近年来在畜禽或渔业养殖、运输过程中存在非法使用镇静剂,以减轻或消除动物在高密度养殖、长途运输等条件下应激反应,达到减低死亡率、促进生长的目的^[2-4]。过量摄入镇静剂易损害中枢神经、代谢系统等,出现头脑昏沉、记忆衰退等功能性问题,因此包括我国在内的许多国家和组织对镇静剂类药物在动物性食品中的使用和限量值作出了规定^[3-4],如 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》明确禁止氯丙嗪(chlorpromazine)、塞拉嗪(xylazine)等镇静剂不得在动物性食品中检出。

动物源性食品中镇静剂残留检测的方法主要有酶联免疫法^[5-7]、液相色谱法^[8-9]和液相色谱-质谱联用法^[10-14]等。由于液相色谱-质谱联用法具有灵敏度高、选择性好、重现性好等特点而成为目前测定镇静剂类药物的主要检测方法^[10-11],但样品中的杂质能够影响目标物的离子化,抑制或增强目标物的响应,即所谓的基质效应(matrix effects, ME),通常采用基质匹配标准曲线来抑制基质效应,而同位素稀释法是补偿基质效应最理想的方法,既能够补偿基质效应的影响,又能同时有效克服样品前处理操作引入的误差,提高方法的准确性和重现性^[15-16]。目前关于动物源性食品中镇静剂残留检测方法多集中在畜禽产品^[9-13],而针对水产品中镇静剂残留的检测方法报道比较少^[14,17],如张璇等^[14]虽采用内标法建立了水产品中 12 种镇静剂的高效液相色谱-串联质谱测定方法,但主要针对是常见的苯二氮卓类镇静剂,且内标物仅选择了 3 种,其中仅地西洋-D5 就作为 9 种镇静剂的内标,具有一定的局限性;此外对于样品提取液的净化通常采用 HLB 柱、MCX 柱等固相萃取柱净化^[13-14],涉及到活化、上样、淋洗、洗脱等多个步骤,操作相对烦琐,因此有必要进一步优化样品前处理方法、液相色谱和质谱条件。本研究建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时测定水产品中 13 种镇静剂残留的方法,并利用同位素稀释方法,以期解决实际样品的基质效应问题,为不同类型水产品中镇静剂残留监测提供前处理简单、准确度和精密度高的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Triple Quad 5500 超高效液相色谱-三重四极杆质谱(美国 SCIEX 公司); Allegra X-30R 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Turbo Vap LV 全自动氮吹浓缩仪(瑞典 Biotage 公司); DMT-2500 涡旋混合器(常州金坛良友仪器有限公司); Milli-Q 纯水仪(德国 Merck 公司)。

乙酰丙嗪(acepromazine)、阿扎哌醇(azaperol)、阿扎哌隆(azaperone)、咪唑心安(carazolol)、氯丙嗪(chlorpromazine)、氟哌啶醇(haloperidol)、奋乃静(perphenazine)、异丙嗪(promethazine)、利血平(reserpine)、甲苯噻嗪(xylazine)标准品(纯度>97%,德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 氯氮平(clozapine)、氟哌利多(droperidol)、甲硫哒嗪(thioridazine)标准品(纯度 \geq 98%,加拿大 TRC 公司); 同位素内标 carazolol-D7、clozapine-D4(纯度>99%,加拿大 CDN 公司); 同位素内标 acepromazine-D6、azaperol-D4、azaperone-D4、chlorpromazine-D6、promethazine-D6、reserpine-D9、xylazine-D6(纯度>98%,德国 WITEGA 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司); 甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司); Oasis PRIME HLB 固相萃取小柱(150 mg/3 mL,美国 Waters 公司)。

实际样品为市售水产品(包括鲫鱼、鳊鱼、青虾、南美白对虾、中华绒螯蟹等)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

单标储备液:分别称取适量的 13 种镇静剂标准品和 9 种同位素内标标准品,用乙腈溶解并定容至 50 mL,其中 13 种镇静剂单标储备液质量浓度为 100 mg/L、9 种同位素内标单标储备液质量浓度为 50 mg/L,分别于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

混合标准工作液:分别移取适量各单标储备液,用乙腈-水(1:1, V:V)定容至 10 mL,其中 13 种镇静剂混合标准工作液质量浓度均为 1 mg/L,9 种同位素内标混合工作液的质量浓度为 100 $\mu\text{g/L}$,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2.2 样品前处理

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、南美白对虾(*Penaeus*

vannname)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)等水产品购自农贸市场, 分别取可食部分按照 GB/T 30891—2014《水产品抽样规范》附录 B 进行制样, -20 °C 保存备用。

称取 2 g (精确至 0.01 g) 样品于 50 mL 聚乙烯离心管, 加入 100 μg/L 同位素内标混合标准中间溶液 100 μL, 静置 10 min 后分别加入 5 mL 1% 氨水乙腈, 涡旋 2 min, 超声 10 min, 在 4 °C 下 8000 r/min 离心 10 min, 上清液过 PRIME HLB 固相萃取柱并收集, 再用 5 mL 1% 氨水乙腈重复提取 1 次。收集液于 40 °C 氮气吹至 1 mL 左右, 加入 1 mL 乙腈-0.1% 甲酸水溶液(1:1, V:V), 过 0.22 μm 尼龙滤膜, 待测。

1.2.3 色谱条件

Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm); 柱温 35 °C; 流速 0.4 mL/min; 进样量 2.0 μL。流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈。梯度洗脱: 0~1.0 min, 5% B; 1.0~5.0 min, 5% B~60% B; 5.0~7.0 min, 60% B; 7.0~7.1 min, 60% B~5% B; 7.1~10.0 min, 5% B。

1.2.4 质谱条件

电喷雾电离(electron spray ionization, ESI)源, 正离子扫描; 扫描方式: 多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM); 喷雾电压: 5500 V; 离子源温度(temperature, TEM): 350 °C; 气帘气(curtain gas, CUR)压力: 55 psi; 离子源气 1 (ion source gas 1, GS1)压力: 55 psi; 离子源气 2 (GS2)压力: 55 psi; 射入电压(entrance potential, EP): 10 V; 碰撞室射出电压(collision cell exit potential, CXP): 9 V; 其他质谱采集参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

乙酰丙嗪等镇静剂属于极性化合物, 易溶于乙腈等有机溶剂, 适合采用反相色谱柱进行分离。本研究考察了 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)、Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)和 Thermo Hypersil Gold C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.1 μm)在 0.1% 甲酸水溶液-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)-乙腈等流动相体系下的分离效果。结果显示 Agilent InfinityLab Poroshell 120 SB-C₁₈ 色谱柱在 0.1% 甲酸水溶液-乙腈流动相体系下对 13 种镇静剂及 9 种镇静剂同位素具有较好的分离度, 色谱法峰形尖锐, 且均能在 3~7 min 出峰, 这主要是由于 13 种镇静剂分子中均存在仲胺、叔胺等结构, 为弱碱性化合物^[5,17], 甲酸的存在有助于目标化合物的离子化, 提高信噪比, 且使目标化合物的保留时间提前, 因此选择 0.1% 甲酸水溶液-乙腈为流动相。13 种镇静剂及 9 种内标化合物的提取离子流色谱图见图 1。

表 1 13 种镇静剂及 9 种同位素内标的质谱参数
Table 1 MS parameters for the 13 kinds of sedatives and 9 kinds of isotope internal standards

| 化合物名称 | 母离子 (<i>m/z</i>) | 子离子 (<i>m/z</i>) | 碰撞能量 /eV | 去簇电压 /V |
|---------|-----------------------|-----------------------|-------------|------------|
| 乙酰丙嗪 | 327.2 | 254.1* | 32 | 90 |
| | | 86.1 | 25 | 90 |
| 乙酰丙嗪-D6 | 333.2 | 92.1 | 27 | 70 |
| 阿扎哌醇 | 330.2 | 121.1* | 31 | 100 |
| | | 312.2 | 23 | 100 |
| 阿扎哌醇-D4 | 334.2 | 121.1 | 32 | 80 |
| 阿扎哌隆 | 328.2 | 121.0* | 29 | 100 |
| | | 165.1 | 31 | 100 |
| 阿扎哌隆-D4 | 332.2 | 169.1 | 30 | 100 |
| 咪唑心安 | 299.1 | 116.2* | 27 | 100 |
| | | 222.1 | 27 | 100 |
| 咪唑心安-D7 | 306.2 | 123.2 | 28 | 90 |
| 氯丙嗪 | 319.2 | 58.1* | 64 | 80 |
| | | 86.2 | 25 | 80 |
| 氯丙嗪-D6 | 325.2 | 92.0 | 25 | 120 |
| 氯氮平 | 327.1 | 192.2* | 58 | 110 |
| | | 270.0 | 31 | 110 |
| 氯氮平-D4 | 331.1 | 272.2 | 34 | 100 |
| 氟哌利多 | 380.1 | 165.2* | 38 | 70 |
| | | 194.1 | 23 | 70 |
| 氟哌啶醇 | 376.1 | 123.0* | 57 | 100 |
| | | 165.0 | 33 | 100 |
| 奋乃静 | 404.1 | 143.1* | 39 | 80 |
| | | 171.1 | 33 | 80 |
| 异丙嗪 | 285.1 | 86.0* | 20 | 60 |
| | | 198.1 | 39 | 60 |
| 异丙嗪-D6 | 291.1 | 92.0 | 23 | 70 |
| 利血平 | 609.3 | 195.0* | 43 | 100 |
| | | 397.1 | 41 | 100 |
| 利血平-D9 | 618.3 | 204.2 | 50 | 90 |
| 甲硫哒嗪 | 371.1 | 98.1* | 55 | 90 |
| | | 126.0 | 31 | 90 |
| 甲苯噻嗪 | 221.2 | 90.0* | 31 | 110 |
| | | 164.1 | 35 | 110 |
| 甲苯噻嗪-D6 | 227.2 | 90.0 | 30 | 90 |

注: *为定量离子。

2.2 质谱条件的优化

13 种镇静剂的分子易与氢离子形成准分子离子 $[M+H]^+$ ，适合采用正离子模式进行测定^[17]。本研究将质量浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的镇静剂及其同位素标准溶液以流动注射的方式注入质谱仪中，在 ESI^+ 模式下，通过优化碰撞能量、去簇电压等质谱参数，得到每种化合物的分子离子峰 $[M+H]^+$ ，以分子离子为母离子，对其进行二级质谱扫描，选择干扰小、信噪比大的离子对作为定量定性离子对，以满足药物残留分析确证的要求。优化后的质谱条件见表 1。

2.3 提取溶剂的选择

13 种镇静剂易溶于乙腈、甲醇、乙酸乙酯等极性溶

剂，但在实验过程中发现极性强的甲醇提取后，提取液较浑浊，在后续的净化处理时易堵塞固相萃取柱，且在浓缩后，瓶壁上附着白色的蛋白质、脂肪等难以溶解的凝结物。考虑到乙腈对脂肪的溶解度小，且对蛋白质具有沉淀作用，是水产品中药物残留分析中最常见的提取溶剂，同时考虑到所检测的 13 种镇静剂为弱碱性化合物，适当提高提取剂的 pH 有利于目标化合物的提取^[17-18]，因此本研究考察了乙腈、1%氨水乙腈、5%氨水乙腈、10%氨水乙腈对 13 种镇静剂的提取效果。结果如图 2 所示，含有氨水的乙腈对镇静剂的提取效果在整体上要高于纯乙腈，但氨水比例的增加并没有使提取效果有较大的增加，同时氨水比例的增加会造成最后定容体积的增大，因此最终选择 1%氨水乙腈作为本方法的提取溶剂。

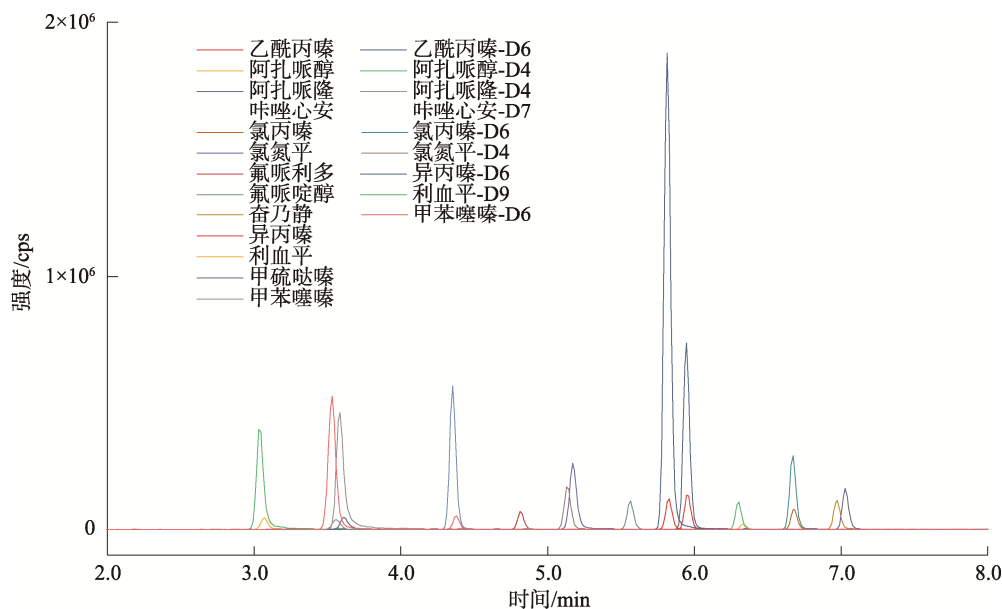
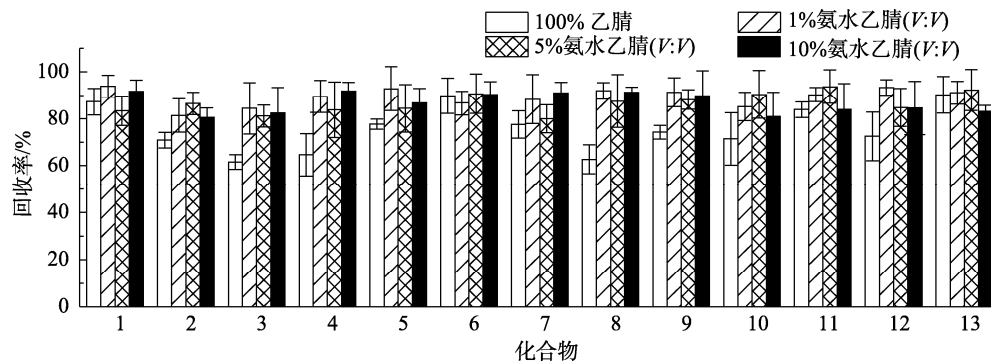


图 1 13 种镇静剂及 9 种内标化合物的提取离子流色谱图

Fig.1 Extracted ion chromatograms of the 13 kinds of sedatives and 9 kinds of isotope internal standards



注: 1: 乙酰丙嗪; 2: 阿扎哌醇; 3: 阿扎哌隆; 4: 咪唑心安; 5: 氯丙嗪; 6: 氯氮平; 7: 氟哌利多; 8: 氟哌啶醇; 9: 奋乃静; 10: 异丙嗪; 11: 利血平; 12: 甲硫哒嗪; 13: 甲苯噻嗪, 以下同。以草鱼为基质, 加标水平: 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

图 2 乙腈-氨水溶液对 13 种镇静剂回收率的影响($n=6$)

Fig.2 Effects of acetonitrile-ammonia water solution on recoveries of the 13 kinds of sedatives ($n=6$)

2.4 固相萃取小柱的选择

本研究考察了 Oasis PRIME HLB、Oasis HLB、MCX 3 种固相小柱对 13 种镇静剂的净化效果。Oasis HLB 柱和 MCX 柱等固相萃取小柱需要事先确定活化、平衡、洗脱的程序, 操作步骤烦琐, 而 Oasis PRIME HLB 柱可以对样品中造成基质干扰的脂肪和磷脂等非极性干扰物进行有效吸附, 并且无需活化和平衡步骤, 可以直接收集滤液用于后续处理^[19-20]。实验在优化 Oasis HLB 柱和 MCX 柱的固相萃取步骤的基础上, 考察了这 3 种固相萃取小柱的净化效果。结果如图 3 所示, MCX 柱对阿扎哌隆、氯丙嗪、氯氮平、异丙嗪和甲硫哒嗪等目标化合物净化效果较差 (<50%), 而 Oasis PRIME HLB 柱和 Oasis HLB 柱在镇静剂净化效果上无较大差异, 考虑到 Oasis PRIME HLB 柱在净化流程上的简便性, 因此, 本研究最终选择 Oasis PRIME HLB 柱作为净化用固相萃取小柱。

2.5 基质效应的评价

基质效应普遍存在于生物样品的液相色谱-串联质谱法定量分析中, 为有效消除基质效应的影响, 采用同位素稀释方法是目前最有效的方法, 这主要是由于同位素内标

与待测物结构和理化性质最为相似, 在色谱和质谱上有相似的特征, 能够有效抵消样品在离子化时的基质效应^[16]。本研究采用公式(1)来评价 13 种镇静剂在不同基质中的基质效应(ME)^[11,16]:

$$ME(\%) = \left(\frac{\text{基质匹配标准曲线的斜率}}{\text{溶剂标准曲线的斜率}} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

当 ME 值为负值时表示存在基质抑制效应, ME 值为正值时表示存在基质增强效应; 绝对值越大则基质效应越强, 通常 ME 值超过 20%, 表明基质效应较大, 应采取适当措施来降低基质效应, 以提高结果的准确性。

实验结果(图 4、5)表明, 13 种镇静剂在不同基质中的基质效应不同。采用外标法时, 草鱼和南美白对虾基质中除阿扎哌隆的基质效应大于 20%外, 其余镇静剂均未超过 20%, 而中华绒螯蟹基质中阿扎哌隆、阿扎哌隆、咪唑心安等多个镇静剂的基质效应超过了 20%, 这可能由于蟹黄中蛋白质、脂肪等含量非常高, 成分复杂^[21], 严重影响目标化合物的离子化。采用内标法时, 13 种镇静剂在草鱼、南美白对虾和中华绒螯蟹 3 种基质中的基质效应均在 20% 以内, 有效抑制了基质效应, 因此选用内标法来抑制基质效应, 确保结果的可靠性。

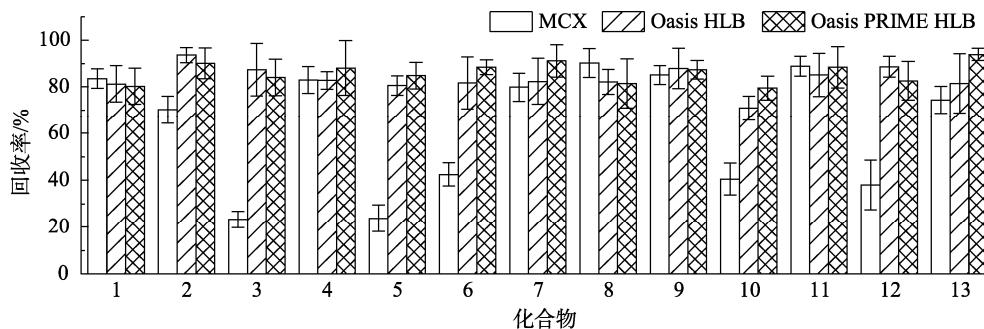


图 3 不同固相萃取小柱对样品提取液的净化作用(n=6)
Fig.3 Purification effects of different SPE cartridges on extraction solutions (n=6)

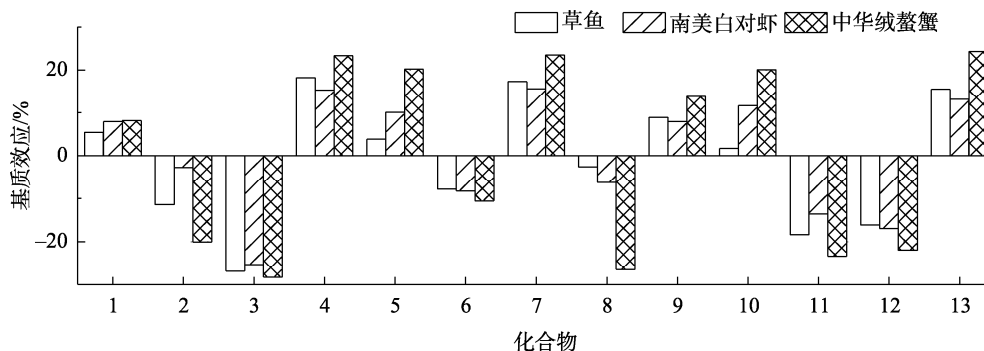


图 4 外标法测定 13 种镇静剂时的基质效应
Fig.4 Matrix effects of the 13 kinds of sedatives with external standard method

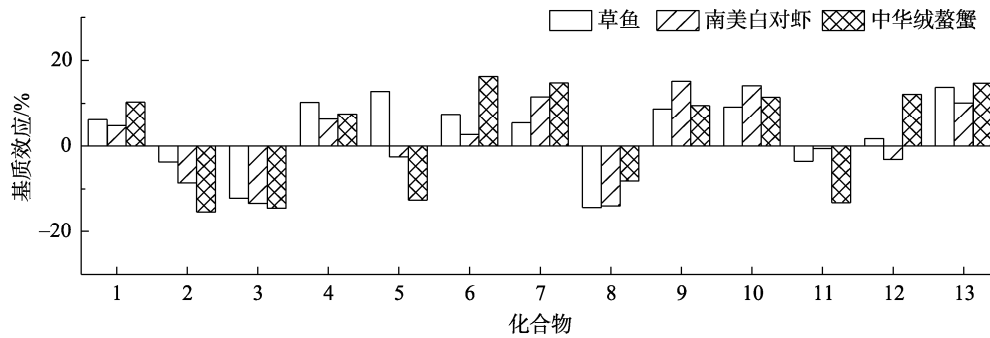


图 5 内标法测定 13 种镇静剂时的基质效应

Fig.5 Matrix effects of the 13 kinds of sedatives with internal standard method

2.6 标准曲线和定量限

以空白基质逐级稀释配制不同质量浓度的混合标准工作溶液,其中内标质量浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 。在 1.2.3~1.2.4 的分析条件下,以各化合物的质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)为横坐标,以峰面积与对应内标的峰面积比值为纵坐标(Y),得到各化合物的标准曲线,结果如表 2 所示。同时基于基质匹配标准曲线,根据信噪比、仪器稳定性及方法的适用性,确定检出限 (limits of detection, LOD) 和定量限 (limits of quantitation, LOQ)。13 种镇静剂在 0.2~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均大于 0.99,检出限为 0.1~0.2 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.3~0.5 $\mu\text{g/kg}$,方法灵敏度高,能够满足水产品中多种镇静剂残留的痕量分析。

2.7 准确度与精密度

选取不含待测物且充分匀浆的 3 种典型水产品作为空白基质,分别按照高中低 3 个浓度水平进行加标回收率测定,其中每个样品中均加入 100 $\mu\text{g/L}$ 同位素内标混合标准中间溶液 100 μL ,每个水平在相同条件下平行测定 6 次,各化合物的回收率和精密度见表 3。结果表明,13 种镇静剂的平均回收率为 84.0%~116.6%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.1%~9.9%。本方法的准确度和

精密度均符合实验要求。

表 2 13 种镇静剂的线性方程
Table 2 Linear equations of the 13 kinds of sedatives

| 化合物名 | 线性方程 |
|------|----------------------|
| 乙酰丙嗪 | $Y=0.23255X+0.01319$ |
| 阿扎哌醇 | $Y=0.11301X+0.00748$ |
| 阿扎哌隆 | $Y=0.08546X+0.00521$ |
| 咪唑心安 | $Y=0.11018X+0.00487$ |
| 氯丙嗪 | $Y=0.28198X+0.01587$ |
| 氯氮平 | $Y=1.41890X+0.17514$ |
| 氟哌利多 | $Y=0.13578X+0.01017$ |
| 氟哌啶醇 | $Y=0.08578X+0.00666$ |
| 奋乃静 | $Y=0.49552X+0.03118$ |
| 异丙嗪 | $Y=0.05147X+0.00252$ |
| 利血平 | $Y=0.19769X+0.01532$ |
| 甲硫哒嗪 | $Y=0.38576X+0.02409$ |
| 甲苯噻嗪 | $Y=0.15572X+0.01218$ |

表 3 不同基质中 13 种镇静剂的加标回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Recoveries and precisions of 13 kinds of sedatives in the different matrices ($n=6$)

| 化合物名称 | 添加水平/ $(\mu\text{g/kg})$ | 草鱼 | | 南美白对虾 | | 中华绒螯蟹 | |
|-------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% |
| 乙酰丙嗪 | 0.5 | 111.7 | 5.9 | 95.4 | 7.7 | 94.4 | 7.1 |
| | 2.5 | 90.1 | 5.9 | 103.4 | 4.3 | 109.2 | 3.3 |
| | 10.0 | 109.2 | 3.7 | 96.2 | 7.8 | 105.3 | 3.1 |
| 阿扎哌醇 | 0.5 | 88.1 | 3.7 | 105.8 | 9.8 | 92.8 | 4.7 |
| | 2.5 | 88.6 | 3.6 | 94.5 | 6.8 | 93.0 | 3.5 |
| | 10.0 | 108.9 | 9.8 | 114.5 | 9.4 | 92.9 | 2.5 |
| 阿扎哌隆 | 0.5 | 110.5 | 4.1 | 101.9 | 8.6 | 89.2 | 7.2 |
| | 2.5 | 108.8 | 7.9 | 84.7 | 4.1 | 94.8 | 4.0 |
| | 10.0 | 103.4 | 9.6 | 86.7 | 6.1 | 84.0 | 9.1 |

表 3(续)

| 化合物名称 | 添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 草鱼 | | 南美白对虾 | | 中华绒螯蟹 | |
|-------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% | 回收率/% | RSD/% |
| 咪唑心安 | 0.5 | 97.4 | 6.2 | 110.0 | 9.3 | 105.6 | 7.6 |
| | 2.5 | 102.6 | 3.5 | 109.4 | 5.7 | 99.8 | 9.2 |
| | 10.0 | 85.7 | 7.7 | 107.4 | 7.4 | 110.1 | 3.1 |
| 氯丙嗪 | 0.5 | 114.2 | 8.4 | 90.6 | 4.7 | 84.8 | 4.9 |
| | 2.5 | 84.6 | 4.3 | 106.0 | 8.5 | 94.8 | 4.3 |
| | 10.0 | 94.3 | 9.9 | 113.1 | 7.5 | 107.9 | 5.8 |
| 氯氮平 | 0.5 | 107.8 | 3.2 | 114.7 | 8.0 | 111.1 | 8.2 |
| | 2.5 | 112.1 | 4.5 | 87.0 | 3.3 | 85.9 | 4.9 |
| | 10.0 | 116.6 | 7.6 | 84.2 | 7.8 | 112.9 | 3.3 |
| 氟哌利多 | 0.5 | 88.5 | 5.5 | 116.5 | 4.8 | 99.0 | 2.6 |
| | 2.5 | 86.4 | 5.7 | 112.6 | 6.8 | 97.7 | 7.9 |
| | 10.0 | 98.1 | 9.0 | 103.2 | 4.0 | 109.4 | 8.4 |
| 氟哌啶醇 | 0.5 | 112.0 | 2.1 | 111.3 | 6.1 | 99.5 | 3.5 |
| | 2.5 | 112.9 | 6.8 | 114.8 | 9.4 | 88.0 | 9.2 |
| | 10.0 | 115.6 | 5.7 | 85.6 | 2.6 | 87.5 | 3.5 |
| 奋乃静 | 0.5 | 91.5 | 3.6 | 107.4 | 9.4 | 113.0 | 8.4 |
| | 2.5 | 112.9 | 9.4 | 101.9 | 4.5 | 109.1 | 5.0 |
| | 10.0 | 114.9 | 2.6 | 84.1 | 9.3 | 94.0 | 3.7 |
| 异丙嗪 | 0.5 | 116.5 | 6.7 | 98.2 | 6.1 | 94.3 | 3.3 |
| | 2.5 | 103.9 | 5.1 | 112.7 | 9.3 | 85.2 | 3.8 |
| | 10.0 | 99.3 | 8.7 | 104.5 | 3.7 | 98.9 | 4.0 |
| 利血平 | 0.5 | 100.4 | 5.6 | 92.3 | 9.7 | 86.3 | 6.8 |
| | 2.5 | 109.7 | 3.9 | 115.9 | 7.6 | 94.1 | 6.8 |
| | 10.0 | 100.0 | 8.4 | 101.5 | 9.5 | 113.3 | 9.3 |
| 甲硫哒嗪 | 0.5 | 87.7 | 5.6 | 86.1 | 3.8 | 111.0 | 9.1 |
| | 2.5 | 98.0 | 6.0 | 93.3 | 5.2 | 103.3 | 6.9 |
| | 10.0 | 107.3 | 3.5 | 98.0 | 8.0 | 116.1 | 9.4 |
| 甲苯噻嗪 | 0.5 | 98.0 | 6.8 | 90.1 | 2.8 | 94.1 | 6.6 |
| | 2.5 | 92.1 | 8.2 | 99.0 | 4.1 | 85.8 | 2.8 |
| | 10.0 | 110.1 | 3.2 | 95.2 | 4.9 | 108.4 | 6.5 |

2.8 实际样品检测

应用本方法对 20 批次不同来源的市售水产品(包括鲫鱼、鳊鱼、青虾、南美白对虾、中华绒螯蟹等)进行了检测,结果显示,有 1 批次鲫鱼样品中检出氯丙嗪,残留量为 $0.93 \mu\text{g}/\text{kg}$,其余批次样品中均未检出镇静剂。

3 结 论

本研究通过优化前处理方法和仪器条件,建立了液相色谱-串联质谱法测定水产品中 13 种镇静剂残留量的测定方法。试样的提取溶液采用 Oasis PRIME HLB 柱净化,

在保证样品的净化效率的基础上,省去了活化、洗脱等步骤,缩短了前处理时间,同时采用同位素稀释和基质标准曲线,有效抑制了基质效应的干扰,提高了测定结果的准确性和重复性。通过方法学验证和实际样品的检测,表明该方法简单快速、准确灵敏,满足水产品中多种镇静剂类药物残留的同时快速定量定性分析的需要。

参考文献

- [1] 惠芸华, 蔡友琼, 于慧娟. 镇静类药物在活鱼运输中的应用研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2014, 4(2): 26-31.
HUI YH, CAI YQ, YU HJ. Current status of the research on application of sedative drugs in transport of live fish [J]. Chin Fisher Qual Stand, 2014, 4(2): 26-31.
- [2] 严丽娟, 张洁, 潘晨松, 等. 超高效液相色谱-飞行时间质谱法高通量筛查乳制品中20种镇静剂[J]. 分析化学, 2013, 41(1): 31-35.
YAN LJ, ZHANG J, PAN CS, *et al.* High throughput screening of tranquilizers in dairy products using ultra performance liquid chromatography coupled to high resolution time-of-flight mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2013, 41(1): 31-35.
- [3] 李蓉, 杨璐齐, 张鹏云, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查水产及水产加工品中24种镇静剂类药物[J]. 色谱, 2018, 36(2): 125-135.
LI R, YANG LQ, ZHANG PY, *et al.* Rapid screening of 24 tranquilizer drugs in fish and fishery products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectroscopy [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(2): 125-135.
- [4] 刘家阳, 黄旭, 贾宏新. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定畜肉中16种镇静剂类兽药残留[J]. 分析测试学报, 2017, 36(3): 305-311.
LIU JY, HUANG X, JIA HX. Simultaneous determination of 16 sedative residues in livestock products by solid phase extraction/ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(3): 305-311.
- [5] 冯静, 邹森, 陈曦, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测牛肉中16种镇静剂类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(10): 3091-3096.
FENG J, ZOU M, CHEN X, *et al.* Determination of 16 sedative residues in beef by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(10): 3091-3096.
- [6] WANG J, WANG Y, PAN Y, *et al.* Preparation of a generic monoclonal antibody and development of a highly sensitive indirect competitive ELISA for the detection of phenothiazines in animal feed [J]. Food Chem, 2017, 221(15): 1004-1013.
- [7] PENG CF, DUAN XH, SONG SS, *et al.* Parts per trillion detections of 7-aminonitrazepam by nano-enhanced ELISA [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(10): 19474-19483.
- [8] LI PD, HAN HR, ZHAI XH, *et al.* Simultaneous HPLC-UV determination of ketamine, xylazine, and midazolam in canine plasma [J]. J Chromatogr Sci, 2012, 50(2): 108-113.
- [9] 魏晋梅, 罗玉柱, 白云旭. 高效液相色谱法同时测定羊肉中11种镇静剂类药物[J]. 食品工业科技, 2014, (10): 95-97.
WEI JM, LUO YZ, BAI YX. Simultaneous high performance liquid chromatographic determination of 11 common sedatives in mutton [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, (10): 95-97.
- [10] 渠岩, 路勇, 冯楠, 等. 基质固相分散-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定畜禽肉中残留的13种镇静药物[J]. 食品科学, 2012, 33(8): 252-255.
QU Y, LU Y, FENG N, *et al.* Determination of thirteen sedative residues in meat by matrix solid phase dispersion-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2012, 33(8): 252-255.
- [11] 张烁, 周爽, 陈达炜, 等. 畜肉中10种镇静剂残留的超高效液相色谱-串联质谱测定方法[J]. 分析测试学报, 2014, 33(11): 1213-1218.
ZHANG S, ZHOU S, CHEN DW, *et al.* Determination of ten sedative residues in livestock products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(11): 1213-1218.
- [12] 徐迪, 马康, 单吉浩, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物尿液中5种镇静剂类药物残留[J]. 核农学报, 2020, 34(9): 2045-2050.
XU D, MA K, SHAN JH, *et al.* Determination of five sedative drug residues in animal urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Nucl Agric Sci, 2020, 34(9): 2045-2050.
- [13] 胡海山, 张云伟, 赵淑娥, 等. 液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中5种镇静剂类药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(20): 5319-5323.
HU HS, ZHANG YW, ZHAO SE, *et al.* Determination of 5 kinds of sedative drug residues in animal-derived foods by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(20): 5319-5323.
- [14] 张璇, 杨光昕, 孔聪, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中镇静剂及其代谢物残留[J]. 分析化学, 2021, 49(3): 460-467.
ZHANG X, YANG GX, KONG C, *et al.* Determination of tranquilizer and their metabolites residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2021, 49(3): 460-467.
- [15] 张宏康, 王中媛, 杨启津, 等. 同位素稀释质谱法在食品分析中的应用研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 280-288.
ZHANG HK, WANG ZY, YANG QJ, *et al.* Recent advances in application of isotopic dilution mass spectrometry in food analysis [J]. Food Sci, 2018, 39(23): 280-288.
- [16] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展[J]. 质谱学报, 2011, 32(6): 321-332.
WANG LQ, HE LM, CENG ZL, *et al.* Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chin Mass Spectr Soc, 2011, 32(6): 321-332.
- [17] 何晓明, 余鹏飞, 刘强欣, 等. 改良 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中的13种镇静剂[J]. 食品工业科技, 2020, 41(24): 203-209.
HE XM, YU PF, LIU QX, *et al.* Simultaneous determination of 13 sedative residues in aquatic products by modified QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2020, 41(24): 203-209.
- [18] 侯建波, 谢文, 钱艳, 等. 分散固相萃取净化/液相色谱-串联质谱法同时测定蜂王浆中双甲脒、单甲脒及其代谢物[J]. 分析测试学报, 2019, 38(4): 455-460.

- HOU JB, XIE W, QIAN Y, *et al.* Simultaneous determination of amitraz, semi amitraz and their metabolites in royal jelly by dispersive solid-phase extraction/liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2019, 38(4): 455-460.
- [19] 王梦颖, 陈焯超, 涂凤琴, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间高分辨质谱用于乳液类化妆品中 9 种抗过敏违禁药物的筛查和定量分析[J]. *色谱*, 2020, 38(12): 1423-1430.
- WANG MY, CHEN YC, TU FQ, *et al.* Screening and quantitative analysis of nine illicit antiallergics in emulsion cosmetics by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight high-resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, 38(12): 1423-1430.
- [20] 牛宇敏, 王彬, 杨润晖, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定尿液与血清中 23 种双酚类化合物[J]. *分析测试学报*, 2020, 39(6): 715-721.
- NIU YM, WANG B, YANG RH, *et al.* Simultaneous determination of 23 bisphenol analogs and their halogenated derivatives in urine and serum by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2020, 39(6): 715-721.
- [21] 曹振杰, 付春鹏, 周嗣泉, 等. 中华绒螯蟹“蟹黄”与“蟹膏”的营养成分

比较分析[J]. *水产科学*, 2017, 36(2): 178-182.

CAO ZJ, FU CP, ZHOU SQ, *et al.* Comparison of nutritional components in gonads of male and female Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* [J]. *Fish Sci*, 2017, 36(2): 178-182.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介

杨洪生, 主要研究方向为环境科学。
E-mail: yhs713@163.com

沈美芳, 研究员, 主要研究方向为水产品质量安全研究。
E-mail: mfshen@163.com