

同位素稀释/超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法测定牛蛙中 50 种兽药残留

王 强, 王旭峰, 蔡 楠, 关婉琪, 黄 珂*

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部水产品加工重点实验室, 广州 510300)

摘 要: **目的** 建立同位素稀释/超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)测定牛蛙中 50 种兽药残留的分析方法。**方法** 样品用 0.2%甲酸乙腈提取, 经快速滤过型净化(multi-plug filtration cleanup, m-PFC)固相萃取柱处理, 采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1%甲酸乙腈和 0.1%甲酸水溶液为流动相进行梯度洗脱, 目标物在正离子全信息串联质谱扫描方式(mass spectrometry, MS^E)下检测, 内标法定量。**结果** 50 种兽药在各自的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.995, 检出限为 0.5~1.0 μg/kg, 加标回收率为 79.4%~112.1%, 相对标准偏差为 3.7%~13.1%。**结论** 该方法前处理简单、结果准确, 适用于牛蛙中 50 种兽药残留的快速检测。

关键词: 同位素稀释; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法; 快速滤过型净化; 牛蛙; 兽药

Determination of 50 kinds of veterinary drug residues in *Rana catesbiana* by isotope dilution/ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry

WANG Qiang, WANG Xu-Feng, CAI Nan, GUAN Wan-Qi, HUANG Ke*

(Key Laboratory of Aquatic Product Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid determination of 50 kinds of veterinary drug residues in *Rana catesbiana* by isotope dilution/ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS). **Methods** The samples were extracted with 0.2% formic acid acetonitrile, treated with multi-plug filtration cleanup (m-PFC) solid phase extraction column, separated with Phenomenex Kinetex C₁₈ chromatographic column, gradient eluted with 0.1% formic acid-acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phase, and the target was detected under positive ion full information tandem mass spectrometry (MS^E) scanning mode, and quantified by internal standard method. **Results** The 50 kinds of veterinary drugs had good linear relationship within their respective mass concentration range, the correlation coefficient was greater than 0.995, and the limits of detection were 0.5–1.0 μg/kg, the average spiked recoveries were 79.4%–112.1%, and the relative

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD0901701)、广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项(2023KJ151)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD0901701), and the Guangdong Provincial Special Fund for Modern Agriculture Industry Technology Innovation Teams (2023KJ151)

*通信作者: 黄珂, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全检测与风险评估。E-mail: xiamike@163.com

*Corresponding author: HUANG Ke, Master, Associate Professor, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China. E-mail: xiamike@163.com

standard deviations were 3.7%–13.1%. **Conclusion** This method has simple pre-processing and accurate results, and is suitable for rapid determination of 50 kinds of veterinary drugs residues in *Rana catesbiana*.

KEY WORDS: isotope dilution; ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; multi-plug filtration cleanup; *Rana catesbiana*; veterinary drug

0 引言

近期, 农业农村部积极开展蛙类养殖违法违规用药专项整治行动, 加大对蛙类养殖中违规使用禁(停)用药、不遵守休药期规定等行为的打击力度, 确保蛙类产品食用安全。其中, 牛蛙(*Rana catesbiana*)是目前市场上消费量最大的养殖蛙类, 因其肉质洁白细嫩、蛋白质含量高、味道鲜美而深受广大消费者的喜爱^[1-3]。但是集约化的养殖过程中, 牛蛙容易发生红腿病、烂皮病和腐皮病等细菌性或真菌性的疾病, 为了避免经济损失, 养殖户往往存在不合理使用禁限用兽药抗生药的现象, 严重影响了该行业的健康发展^[4-5]。因此, 有必要针对牛蛙中的多种类兽药残留建立快速、准确、高通量的检测方法。

目前, 兽药多残留检测方法主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[6-8]、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[9-10]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[11-15]和液相色谱-高分辨质谱法(liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, LC-HRMS)(表 1)^[16-19]。超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS)属于高分辨质谱范畴, 其进样时可同时获取目标物及其特征碎片离子的精确分子质量(质量偏差 $<5 \times 10^{-6}$), 具有分析速度快、质量精度和分辨率高的优点, 非常适用于大批量样品中多种类兽药物质的快速确证分析^[20-23]。

但是, 由于待测物质种类多, 化学性质差异大, 样品的净化效果对方法的准确性和灵敏度影响显著^[24-25]。传统的样品前处理方法主要包括液液萃取法^[12]、固相萃取法^[16]和基质分散固相萃取法^[23]等, 这些方法存在操作烦琐、费时费力和成本较高等问题, 难以满足高通量快速检测的要求(表 1)。快速滤过型净化(multi-plug filtration cleanup, m-PFC)固相萃取是一种新型的通过式样品净化技术, 使用时无需活化和平衡柱体, 通过萃取小柱上的 C₁₈、乙二胺-N-丙基硅烷(primary secondary amine, PSA)和多壁碳纳米管等填料对样品提取液中的蛋白质、色素和脂肪酸等杂质进行有效的吸附从而降低样品基质的干扰^[26-27]。该技术操作简便, 一步完成净化处理, 例如涂祥婷等^[17]将 m-PFC 净化技术用于鱼肉中的 16 种全氟烷基化合物, 该方法在 0.50、2.00 和 5.00 μg/kg 的基质加标水平下, 平均回收率为

70.7%~110.1%, 相对标准偏差为 0.5%~12.8%。封腾望等^[15]采用滤过型净化柱建立了草鱼肌肉冻干粉中 4 种硝基咪唑类代谢物的快速分析方法, 该方法平均回收率为 81.3%~115.1%, 相对标准偏差为 1.5%~13.1%。而目前将 m-PFC 固相萃取结合高分辨质谱法用于同时检测牛蛙中多种类兽药的研究鲜有报道。

本研究采用 m-PFC 结合 UPLC-Q-TOF-MS, 通过优化前处理方法和色谱质谱条件, 并使用同位素稀释法进行定量, 建立了同时测定牛蛙中 5 类共 50 种兽药(镇静剂类、硝基咪唑类、磺胺类、喹诺酮类和三苯甲烷类)的定性确证及定量检测方法, 以为行政监管部门开展蛙类养殖用药的监管提供一种新的技术手段。

表 1 不同仪器分析和样品前处理技术的评价
Table 1 Evaluation of different instrumental analysis and sample pretreatment techniques

方法	评价
HPLC	色谱分离要求高, 灵敏度低
GC-MS	样品前处理需要进行衍生化, 部分兽药不适用
LC-MS/MS	质谱分辨率和扫描速率相对较低, 多残留检测受限
LC-HRMS	精确质量数测定和高扫描速率, 高通量检测
液液萃取法	有机溶剂使用量大, 样品基质干扰强
固相萃取法	方法操作烦琐
基质分散固相萃取法	需要单独称量吸附剂, 成本高
快速滤过型净化法	无需活化、洗脱等步骤, 一步完成净化

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

30 份牛蛙样品(体重 100~150 g)购自于广州市和佛山市的水产批发市场。

50 种兽药和 18 种兽药内标物的标准品分别购自于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司、上海安谱公司和天津阿尔塔科技有限公司, 纯度为 91.2%~99.9%; 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司); m-PFC 固相萃取净化柱(200 mg/3 mL, 北京科德诺思技术有限公司); Captiva EMR-Lipid 固相萃取柱(300 mg/3 mL, 美国 Agilent 公司); 亮氨酸脑啡肽校正液

(200 $\mu\text{g/L}$)、Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(60 mg/3 mL)(美国 Waters 公司)。

1.2 仪器与设备

Xevo G2-XS Q-TOF 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪配电喷雾离子源(electrospray ionization source, ESI)、Masslynx 4.1 控制软件、UNIFI 1.8 数据处理软件、Waters BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)(美国 Waters 公司); Multifuge X4R Pro 台式高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Milli Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司); XP205DR 电子天平(精度 0.0001 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司); Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm)(广州太玮生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

牛蛙样品去头、皮和内脏, 取其可食肌肉部分, 切成块状后于绞肉机中制成匀浆试样, 备用。准确称取 2.00 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 5 mL 0.2% 甲酸乙腈, 漩涡振荡提取 5 min, 随后 5000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至另一个 50 mL 聚丙烯离心管中, 残渣再用 5 mL 0.2% 甲酸乙腈重复提取 1 次。合并两次提取液, 准确移取 4.0 mL 上层清液加载至 m-PFC 小柱上, 上端接助推杆后缓慢推动, 收集流出液。将流出液于 45°C 水浴下, 氮气吹至略低于 0.5 mL, 用 0.1% 甲酸水定容至 1.0 mL, 漩涡混合后, 12000 r/min 高速离心 5 min, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜到进样瓶中, 供 UPLC-Q-TOF-MS 测试。

1.3.2 标准溶液配制

标准溶液: 准确称取上述兽药标准品, 用甲醇溶解并

分别配制成 500 mg/L 的标准储备液, 于 -18°C 下避光保存, 保存期限为 6 个月。使用时根据需要将 50 种兽药和 18 种兽药内标的标准溶液分组, 并用甲醇稀释或混合至 1 mg/L 标准工作液, 所有工作液均置于 4°C 下避光保存。

1.3.3 色谱条件

液相色谱柱: Phenomenex Kinetex C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 流速: 0.4 mL/min; 柱温: 45°C; 进样体积: 10 μL ; 流动相: 0.1% 甲酸水溶液(A 相), 乙腈(含 0.1% 甲酸)(B 相)。梯度洗脱程序: 0~1 min, 5% B; 1~12 min, 5%~70% B; 12~15 min, 70%~95% B; 15~17 min, 95% B; 17~20 min, 95%~5% B。

1.3.4 质谱条件

电离方式: ESI, 正离子模式扫描; 毛细管电压: 1.0 kV; 离子源温度: 120°C; 锥孔电压: 40 V; 锥孔气流速: 50 L/h; 脱溶剂气温度: 50°C; 脱溶剂气流速 1000 L/h。数据采集模式: MS^E, 质量扫描范围: m/z 50~1200, 低碰撞能通道: 4 eV, 高碰撞能通道: 10~45 eV, 校正液为亮氨酸脑啡肽(质量浓度 200 $\mu\text{g/L}$, m/z 556.2771), 喷雾挡板切换间隔 10 s。

1.3.5 高分辨数据库的建立

在上述优化的仪器参数下, 通过 Q-TOF-MS 采集获取目标物的母离子精确质量数、保留时间和特征碎片离子质谱图等信息, 结合待测物的名称、分子式和结构式, 在 UNIFI 1.8 数据处理软件中同步建立本方法的高分辨数据库, 质谱分析参数如表 2 所示。定性确证时要求成功匹配母离子和一个特征碎片离子, 且质量准确度误差小于 5.0×10^{-6} , 保留时间偏差小于 0.2 min。定量时, 通过一级母离子的精确质量数对目标物的色谱峰进行积分, 质量偏差设置为 50 mDa, 用内标物校准进行定量分析。

表 2 50 种兽药及 18 种内标的质谱分析参数

Table 2 Mass spectrometric parameters for 50 kinds of veterinary drugs and 18 kinds of internal standards

类别	化合物	分子式	保留时间 /min	实测精确 质荷比(m/z)	子离子(m/z)	内标物
喹诺酮类	环丙沙星	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	4.26	332.1405	288.1507, 245.1106	环丙沙星-d ₈
	奥比沙星	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃	4.66	396.1526	352.1529, 295.1046	环丙沙星-d ₈
	洛美沙星	C ₁₇ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	4.42	352.1462	265.1132, 308.1562	洛美沙星-d ₅
	达氟沙星	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	4.40	358.1556	283.1225, 314.1657	洛美沙星-d ₅
	氟罗沙星	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	4.09	370.1365	326.1468, 269.0883	诺氟沙星-d ₅
	诺氟沙星	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	4.14	320.1392	219.0558, 261.1019	诺氟沙星-d ₅
	氧氟沙星	C ₁₈ H ₂₀ FN ₃ O ₄	4.15	362.1503	318.1603, 261.1019	培氟沙星-d ₃
	培氟沙星	C ₁₇ H ₂₀ FN ₃ O ₃	4.21	334.1550	233.1076, 219.0919	培氟沙星-d ₃
	恩诺沙星	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	4.57	360.1712	316.1812, 245.1075	恩诺沙星-d ₅
	双氟沙星	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃	5.02	400.1459	299.0981, 251.0858	恩诺沙星-d ₅
	沙拉沙星	C ₂₀ H ₁₇ F ₂ N ₃ O ₃	4.95	386.1306	299.0982, 344.1410	恩诺沙星-d ₅
	司帕沙星	C ₁₉ H ₂₂ F ₂ N ₄ O ₃	5.07	393.1727	349.1824, 292.1245	恩诺沙星-d ₅
	氟甲喹	C ₁₄ H ₁₂ FNO ₃	7.79	262.0871	244.0769, 220.0406	恩诺沙星-d ₅
	恶喹酸	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	6.04	262.0706	244.0606, 234.0286	恩诺沙星-d ₅
	磺胺类	磺胺脒	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	0.86	215.0595	156.0108, 108.0456
甲氧苄啶		C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	3.82	291.1445	261.0976, 275.1133	磺胺多辛-d ₃
	磺胺二甲基异噻啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	4.26	279.0913	124.0866, 156.0110	磺胺多辛-d ₃

表2(续)

类别	化合物	分子式	保留时间 /min	实测精确 质荷比(m/z)	子离子(m/z)	内标物	
磺胺类	磺胺嘧啶	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	2.72	251.0586	156.0110, 108.0445	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺吡啶	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	3.36	250.0634	184.0863, 156.0111	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺噻唑	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂	3.29	256.0196	156.0111, 108.0447	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺甲噻啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	3.64	265.0745	156.0108, 172.0175	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺二甲噻唑	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	5.71	268.0745	156.0112, 108.0415	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺二甲噻啶	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	2.53	279.0913	124.0866, 186.0328	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺甲氧嗪	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	4.43	281.0696	156.0119, 215.0923	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺甲二唑	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂	4.36	271.0307	156.0119, 108.0451	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺间甲氧嘧啶	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	4.90	281.0695	156.0118, 108.0451	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺氯达嗪	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ O ₂ S	5.02	285.0191	156.0111, 108.0451	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺多辛	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	5.40	311.0806	156.0112, 108.0448	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺甲噻唑	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	5.36	254.0580	156.0117, 108.0450	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺二甲异噻唑	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	4.15	268.0741	156.0110, 113.0715	磺胺多辛-d ₃	
	磺胺苯酰	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	6.14	299.0455	156.0112, 108.0450	磺胺地索辛-d ₆	
	磺胺地索辛	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S	6.42	311.0799	156.0118, 108.0451	磺胺地索辛-d ₆	
	磺胺啉噻林	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	6.50	301.0740	156.0117, 108.0451	磺胺地索辛-d ₆	
	磺胺苯吡唑	C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	6.53	315.0914	158.0714, 222.0329	磺胺地索辛-d ₆	
	硝基 咪唑类	地美硝唑	C ₅ H ₇ N ₃ O ₂	2.17	142.0606	96.0681, 81.0456	地美硝唑-d ₃
		甲硝唑	C ₆ H ₉ N ₃ O ₃	1.75	172.0723	128.0453, 82.0527	甲硝唑-d ₄
洛硝哒唑		C ₆ H ₈ N ₄ O ₄	2.35	201.0610	140.0454, 110.0096	洛硝哒唑-d ₃	
羟甲基硝唑		C ₆ H ₉ N ₃ O ₄	1.30	188.0669	126.0306, 123.0552	羟甲基硝唑-d ₂	
羟甲基甲硝唑		C ₅ H ₇ N ₃ O ₃	1.67	158.0556	140.0455, 110.0485	羟甲基甲硝唑-d ₃	
4-硝基咪唑		C ₃ H ₃ N ₃ O ₂	0.96	114.0307	96.9618, 83.9519	羟甲基甲硝唑-d ₃	
2-甲硝咪唑		C ₄ H ₅ N ₃ O ₂	1.25	128.0464	111.0437, 82.0525	羟甲基甲硝唑-d ₃	
氯甲硝咪唑		C ₄ H ₄ ClN ₃ O ₂	3.33	162.0059	145.0031, 116.0134	洛硝哒唑-d ₃	
苯硝咪唑		C ₇ H ₅ N ₃ O ₂	3.07	164.0451	118.0527, 91.0413	洛硝哒唑-d ₃	
异丙硝唑		C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	4.41	170.0921	124.0996, 153.0898	洛硝哒唑-d ₃	
镇静剂类	地西洋	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	8.86	285.0783	154.0415, 222.1144	地西洋-d ₅	
	去甲地西洋	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	7.73	271.0633	140.0263, 226.0423	地西洋-d ₅	
	氯丙嗪	C ₁₇ H ₁₉ ClN ₂ S	7.84	319.1025	214.0391, 246.0138	氯丙嗪-d ₆	
	异丙嗪	C ₁₇ H ₂₀ N ₂ S	6.93	285.1414	198.0371, 86.0972	异丙嗪 d ₆	
三苯甲 烷类	孔雀石绿	C ₂₃ H ₂₄ N ₂	8.70	329.2010	313.1690, 208.1110	孔雀石绿-d ₅	
	隐色孔雀石绿	C ₂₃ H ₂₆ N ₂	7.83	331.2170	239.1531, 315.1852	隐色孔雀石绿-d ₆	
	地美硝唑-d ₃	C ₅ D ₃ H ₄ N ₃ O ₂	2.17	145.0799	99.0869		
甲硝唑-d ₄	C ₆ H ₅ D ₄ N ₃ O ₃	1.75	176.0986	128.0449			
洛硝哒唑-d ₃	C ₆ D ₃ H ₅ N ₄ O ₄	2.34	204.0803	143.0637			
羟甲基硝唑-d ₂	C ₅ H ₅ D ₂ N ₃ O ₃	1.30	190.0798	128.0423			
羟甲基甲硝唑-d ₃	C ₅ H ₄ D ₃ N ₃ O ₃	1.67	161.0764	143.0659			
地西洋-d ₅	C ₁₆ H ₈ ClD ₅ N ₂ O	8.80	290.1102	154.0420			
氯丙嗪-d ₆	C ₁₇ H ₂₀ Cl ₂ N ₂ S	6.92	291.1810	92.1337			
异丙嗪 d ₆	C ₁₇ H ₁₄ D ₆ N ₂ S	7.84	325.1428	246.0138			
同位素 内标	环丙沙星-d ₈	C ₁₇ H ₁₀ D ₈ FN ₃ O ₃	4.25	340.1925	296.2022		
	恩诺沙星-d ₅	C ₁₉ H ₁₇ D ₅ FN ₃ O ₃	4.56	365.2037	321.2144		
	诺氟沙星-d ₅	C ₁₆ H ₁₃ D ₅ FN ₃ O ₃	4.13	325.1723	281.1817		
	氧氟沙星-d ₃	C ₁₈ H ₁₇ D ₃ FN ₃ O ₄	4.15	365.1724	261.1050		
	培氟沙星-d ₃	C ₁₇ H ₁₇ D ₃ FN ₃ O ₃	4.20	337.1763	233.1092		
	洛美沙星-d ₅	C ₁₇ H ₁₄ D ₅ F ₂ N ₃ O ₃	4.40	357.1778	270.1447		
	磺胺多辛-d ₃	C ₁₂ H ₁₁ D ₃ N ₄ O ₄ S	5.37	314.0999	156.0112		
	磺胺地索辛-d ₆	C ₁₂ H ₈ D ₆ N ₄ O ₄ S	6.37	317.1205	162.1138		
	孔雀石绿-d ₅	C ₂₃ H ₁₉ D ₅ N ₂	8.70	334.2320	318.1811		
	隐色孔雀石绿-d ₆	C ₂₃ H ₂₀ D ₆ N ₂	7.83	337.2356	322.1926		

1.4 数据处理

通过 Masslynx 4.1 控制软件进行数据采集, 采用 UNIFI 1.8 数据处理软件对检测结果进行定性和定量分析。利用 Excel 2010 软件进行数据分析和 Origin Pro 8.5 软件进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

电喷雾正离子模式下对 50 种兽药化合物和 18 种兽药内标物的标准溶液(20 $\mu\text{g/L}$)进行 MS^E 全扫描, MS^E 属于非数据依赖型采集模式, 质谱图谱窗口设为低碰撞能、高碰撞能以及亮氨酸脑啡肽校正液 3 个通道。其中, 低碰撞能和高碰撞能通道分别获取母离子和子离子的总离子流图, 校正液通道对质量轴偏差进行实时校正。实验比较了毛细管电压为 0.5~4.0 kV 时目标化合物提取离子色谱图的响应值, 其中分子量相对较低的硝基咪唑类物质受电压影响明显, 当毛细管电压大于 1.0 kV 后峰面积不断下降, 而其他化合物的峰面积变化不显著。进一步对锥孔电压、脱溶剂气流速和脱溶剂气温度等离子源参数进行优化, 使目标物获得最佳的质谱响应, 优化的质谱参数如 1.3.4 所示。

2.2 色谱条件优化

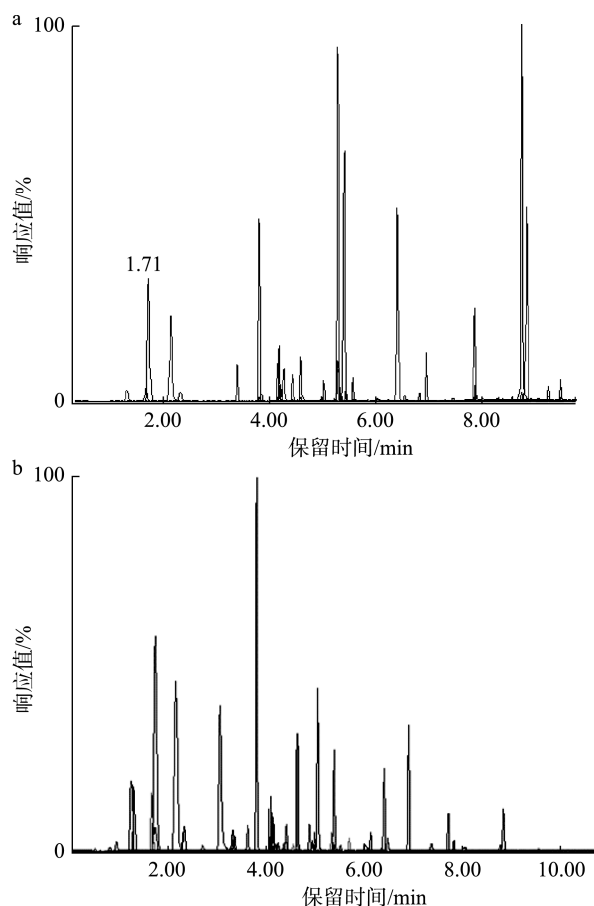
本研究选择超高效液相色谱常用的两款色谱柱 Phenomenex Kinetex C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm, 2.6 μm)和 Waters BEH C_{18} 柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)对 5 类兽药物质进行分离。结果显示(图 1a), 采用 Waters BEH C_{18} 柱时色谱柱压较高, 对保留能力较弱的硝基咪唑类物质的色谱峰型较差, 同时氟甲喹和恶喹酸等喹诺酮类物质有明显的拖尾现象。而使用 Phenomenex Kinetex C_{18} 柱时 50 种兽药化合物和 18 种兽药内标物的色谱峰峰形尖锐对称, 分离度好。实验进一步对流动相的比例组成进行了研究, 分别比较了水-甲醇和水-乙腈, 以及体系中甲酸浓度和乙酸铵添加对待测物色谱峰形和峰面积响应值等色谱行为的影响。结果表明, 乙腈对目标物的洗脱速率和分离度优于甲醇, 并且喹诺酮类物质的峰型更佳。水中添加 0.1% 的甲酸能够明显地提高大多数目标物的响应值, 而乙酸铵的添加对检测结果影响不大。图 1b 是在 0.1% 甲酸水溶液-0.1% 甲酸乙腈流动相体系下, 采用 Phenomenex Kinetex C_{18} 柱时 50 种兽药的提取离子色谱图, 其目标物保留时间稳定, 色谱峰灵敏度高, 满足实际样品中兽药多残留的检测要求。

2.3 样品前处理过程的优化

2.3.1 提取溶剂的选择

分别用乙酸乙酯、乙腈、乙腈:水(8:2, V:V)、0.2% 甲酸乙腈和 0.5% 甲酸乙腈作为提取溶剂, 对牛蛙样品中 5 类兽药进行加标回收实验, 以试样加标测定值与试样浓度之

差除以加标量(10 $\mu\text{g/kg}$)计算平均加标回收率。结果显示(图 2), 乙酸乙酯提取样品时喹诺酮类和三苯甲烷类的回收率较低, 平均回收率低于 50%。提取剂使用乙腈时针对镇静剂类和三苯甲烷类的回收率优于乙腈:水(8:2, V:V)。研究报告, 水产品中兽药多残留的检测中, 向有机提取剂中添加适量的甲酸可以提升目标物提取率, 主要是在酸性的溶剂环境下容易增强待测物的极性并提高质子化效率^[28]。徐媛原等^[11]检测水产品中多组分兽药的实验结果表明, 采用 1% 甲酸的乙腈溶液的提取效果优于乙腈。本方法结果显示, 使用 0.2% 甲酸乙腈可以显著提高喹诺酮类和三苯甲烷类的回收率, 而乙腈中的甲酸含量增加到 0.5% 时目标物的回收率没有明显的改变。综合考虑, 本研究选择 0.2% 甲酸乙腈作为提取溶剂。



注: a. Waters BEH C_{18} 色谱柱; b. Phenomenex Kinetex C_{18} 色谱柱。

图 1 不同色谱柱对 50 种兽药分离效果的影响(20 $\mu\text{g/L}$)

Fig.1 Effects of different chromatographic columns on the separation of 50 kinds of veterinary drugs (20 $\mu\text{g/L}$)

2.3.2 净化条件的确定

本研究分别选用 3 种不同类型的固相萃取柱(m-PFC、PRiME HLB 和 EMR-Lipid)对目标物的净化效果和加标回收率进行比较。分别移取 2 mL 样品提取液至固相萃取柱,

其中 m-PFC 柱上端借助推杆后缓慢推动收集流出液,而 PRiME HLB 柱和 EMR-Lipid 柱中待净化液体凭重力自然流出并收集^[28-29]。结果显示(图 3), EMR-Lipid 柱对硝基咪唑类物质的回收率偏高,而三苯甲烷类物质的回收率偏低。采用 m-PFC 柱时,牛蛙样品中的 5 类兽药的整体回收率优于 PRiME HLB 柱。主要的原因可能是牛蛙样品的提取液颜色较深,而 m-PFC 柱的吸附填料中含有多壁碳纳米管,可有效地吸附样品基质中的色素、脂肪等干扰物质,经 m-PFC 柱净化后,样品提取液颜色较浅,净化效果好^[17,26]。本研究进一步对 m-PFC 柱的上样液体积进行了优化,分别移取 1~5 mL 提取液进行净化,比较目标物的平均回收率和色谱峰响应值。结果显示,上样体积为 4 mL 时待测物回收率稳定、整体响应值高,因此本方法选取 4 mL 提取液进行 m-PFC 净化。

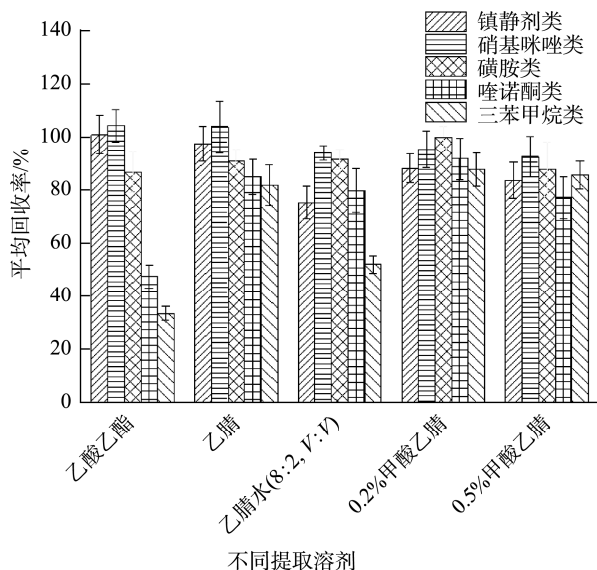


图 2 不同提取溶剂对目标物平均回收率的影响($n=3$)

Fig.2 Effects of different extraction solvents on average recoveries of target analytes ($n=3$)

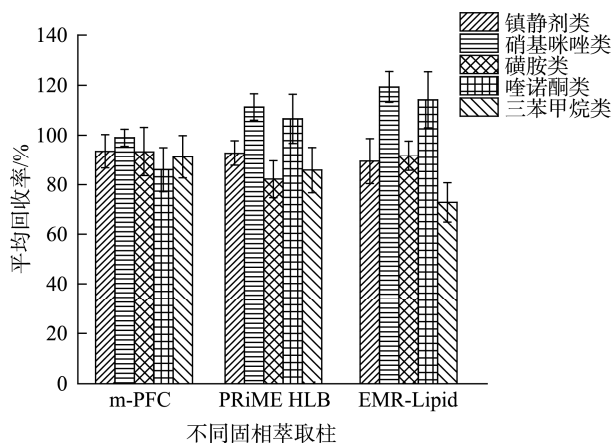


图 3 不同固相萃取柱对目标物平均回收率的影响($n=3$)

Fig.3 Effects of different solid phase extraction columns on average recoveries of target analytes ($n=3$)

2.4 基质效应

空白的牛蛙样品按照 1.3.1 方法进行预处理,随后分别绘制待测物的基质匹配标准曲线和纯溶剂标准曲线,通过两种曲线斜率的比值来考察基质效应(matrix effect, ME)。当 $ME < 0.8$ 时,表现为基质抑制效应;当 $ME > 1.2$ 时,则为基质增强效应;若 $0.8 < ME < 1.2$,可认为基质效应不显著^[30]。结果表明(表 3),牛蛙样品经过 m-PFC 净化处理和内标法校正后,50 种兽药的基质效应均在 0.85~1.15 范围内,基质效应不显著,实际检测时无需绘制基质工作曲线。

2.5 方法学验证

将标准品混合储备液用乙腈:0.1%甲酸水(5:5, V:V)进行逐级稀释,配制成 6 个系列浓度水平的标准工作液,按优化的仪器条件进行测定。以各组分的质量浓度(X , $\mu\text{g/L}$)为横坐标,以待测物质和内标峰面积的比值为纵坐标(Y),线性拟合后绘制标准工作曲线,内标物的选择如表 2 所示。以定量离子信噪比(S/N)大于 3 获取方法的检出限(limits of detection, LODs)。向阴性的牛蛙样品中分别添加低、中、高 3 个水平的混合标准溶液,按照 1.3.1 方法进行样品前处理,用所建立的方法测定,每个添加浓度重复测定 6 次。结果表明(表 3),5 类兽药在相应质量浓度范围内呈现良好线性关系,相关系数(r)均大于 0.995。牛蛙样品中的加标回收率为 79.4%~112.1%,相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 3.7%~13.1%,LODs 为 0.5~1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。本方法的准确度和灵敏度分别满足农业部 1077 号公告-1-2008《水产品中 17 种磺胺类及 15 种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB/T 21318—2007《动物源食品中硝基咪唑残留量检验方法》、SN/T 3235—2012《出口动物源食品中多类禁用药物残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》和 GB/T 19857—2005《水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》的检测要求。

2.6 实际样品分析

采用本研究建立的方法对广东省内水产批发市场采购的 30 份牛蛙样品进行检测,结果显示(表 4),4 份样品中检出恩诺沙星,2 份样品中检出环丙沙星,1 份样品中检出甲硝唑。阳性样品 5 中甲硝唑的提取离子色谱图和质谱图见图 4。分别采用农业部 1077 号公告-1-2008 和 GB/T 21318—2007 对阳性样品进行确证分析。与国家标准方法相比,本方法检测结果基本一致,两者相对偏差小于 15%,所建立的方法适用于牛蛙中多种药物残留的快速定量分析。

3 结论

本研究采用 m-PFC 固相萃取柱净化与 UPLC-Q-TOF-MS 相结合的方式,建立了牛蛙中镇静剂类、硝基咪唑类、磺胺类、喹诺酮类和三苯甲烷类共 50 种兽药残留的

快速测定方法。优化了色谱和质谱条件, 构建了高分辨数据库并结合同位素内标, 比较了不同类型的滤过式固相萃取柱对检测结果的影响。本方法针对牛蛙中 50 种兽药的最低检出限为 0.5~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 加标回收率为 79.4%~112.1%,

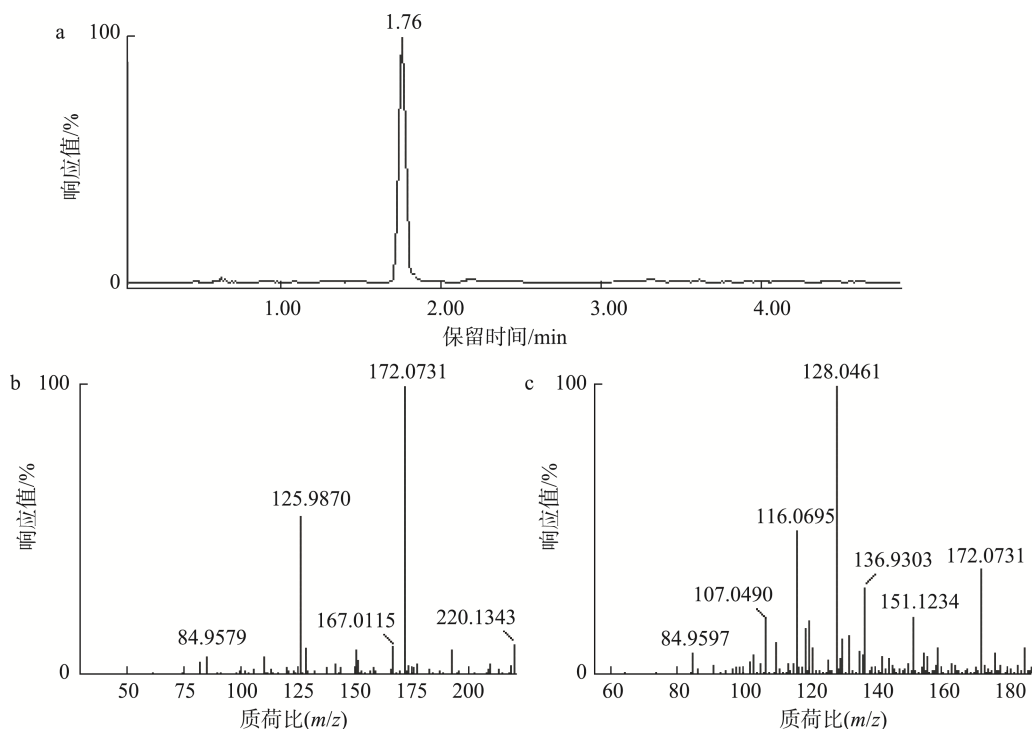
RSDs 低于 15%。实际阳性样品的检测结果, 与国家标准规定的液相色谱-串联质谱法保持一致, 方法简单快速、准确灵敏, 为进一步开展牛蛙中兽药多残留的快速筛查提供了一种有效技术手段。

表 3 牛蛙样品中 5 类药物的检出限、回收率、精密度和基质效应($n=6$)
Table 3 LODs, recoveries, precisions and ME of 5 categories of drugs in *Rana catesbiana* samples ($n=6$)

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g}/\text{L})$	加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	RSDs/%	LODs/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	ME
镇静剂类	0.5~50.0	2, 10, 20	88.7~103.5	4.5~12.9	0.5	0.91~1.07
硝基咪唑类	0.5~50.0	2, 10, 20	90.3~112.1	5.4~13.1	0.5	0.85~0.91
磺胺类	1~100	5, 20, 50	79.4~97.3	4.2~10.6	1.0	0.87~1.09
喹诺酮类	1~100	5, 20, 50	81.6~107.6	5.9~11.5	1.0	0.95~1.15
三苯甲烷类	0.5~50.0	2, 10, 10	83.3~89.2	3.7~9.5	0.5	0.88~0.99

表 4 本方法与标准方法测定阳性样品的对比
Table 4 Comparison of positive samples determined by this method and standard method

样品序号	检出项目	国家标准测定值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	本方法测定值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	偏差/%
样品 1	恩诺沙星	52.1	57.9	11.1
样品 1	环丙沙星	6.32	6.65	5.2
样品 2	恩诺沙星	29.2	26.7	-8.6
样品 3	恩诺沙星	15.5	14.5	-6.5
样品 4	恩诺沙星	62.3	67.0	7.5
样品 4	环丙沙星	13.1	12.5	-4.6
样品 5	甲硝唑	2.76	3.01	9.1



注: a. 提取离子色谱图; b. 一级质谱图; c. 二级质谱图。

图 4 阳性样品中甲硝唑的色谱图和质谱图

Fig.4 Chromatogram and mass spectrograms of metronidazole in positive samples

参考文献

- [1] 李潇, 王玲, 张春晓, 等. 啤酒酵母粉替代部分鱼粉对牛蛙生长、抗氧化能力以及肝脏和肠道组织形态学的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(4): 1864-1876.
- LI X, WANG L, ZHANG CX, *et al.* Effects of partially replacing fish meal with Brewer's yeast meal on growth, antioxidant capacity, and liver and intestine tissue morphology of bullfrog [*Rana (Lithobates) catesbeiana*] [J]. Chin J Anim Nutr, 2019, 31(4): 1864-1876.
- [2] 邱巧丽, 陈晓红, 潘胜东, 等. 基于通过型固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛蛙中 9 种雌激素[J]. 色谱, 2022, 40(7): 669-676.
- QIU QL, CHEN XH, PAN SD, *et al.* Simultaneous determination of nine estrogens in bullfrogs using filtered solid phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2022, 40(7): 669-676.
- [3] ZHANG CX, HUANG KK, WANG L, *et al.* Apparent digestibility coefficients and amino acid availability of common protein ingredients in the diets of bullfrog, *Rana (Lithobates) catesbeiana* [J] Aquaculture, 2015, 437(1): 38-45.
- [4] 戚建华, 刘韵怡, 童文涛, 等. 牛蛙腐皮病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 南方农业学报, 2020, 51(2): 461-469.
- QI JH, LIU YY, TONG WT, *et al.* Isolation and identification of the pathogen of rot skin disease in *Rana catesbeiana* and its drug sensitive test [J]. J South Agric, 2020, 51(2): 461-469.
- [5] 高博. 我国牛蛙产业现状及前景分析[D]. 厦门: 集美大学, 2017.
- GAO B. The status and analysis of prospects of bullfrog industry in our country [D]. Xiamen: Jimei University, 2017.
- [6] CHEN A, GUO HY, LUAN JY, *et al.* The electrospun polyacrylonitrile/covalent organic framework nanofibers for efficient enrichment of trace sulfonamides residues in food samples [J]. J Chromatogr A, 2022, 1668: 462917.
- [7] NIU ZL, SUN YQ, YANG Y, *et al.* Self-synthesized TiO₂ nanoparticles-pH-mediated dispersive solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for the determination of quinolones in biological matrices [J]. J Environ Sci Health, 2022, 57(8): 656-666.
- [8] HONG JW, LIU XM, YANG XY, *et al.* Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by magnetic solid-phase extraction for determination of quinolones [J]. Mikrochim Acta, 2021, 189(1): 8.
- [9] GUO YW, XIE X, DIAO ZX, *et al.* Detection and determination of spectinomycin and lincomycin in poultry muscles and pork by ASE-SPE-GC-MS/MS [J]. J Food Comp Anal, 2021, 101: 103979.
- [10] 薛良辰, 蔡勤仁, 郑璇, 等. QuEChERS-GPC-GC/MS 同时测定鱼肉中 9 种羟基类兽药残留[J]. 质谱学报, 2017, 38(6): 655-663.
- XUE LC, CAI QR, ZHENG X, *et al.* Determination of 9 kinds of hydroxy veterinary drug residues in fish by QuEChERS-GPC-GC/MS [J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2017, 38(6): 655-663.
- [11] 徐媛原, 林敏霞, 李凯华, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 50 种兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(16): 6384-6392.
- XU YY, LIN MX, LI KH, *et al.* Determination of 50 kinds of veterinary drug residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(16): 6384-6392.
- [12] HUA Y, YAO Q, LIN J, *et al.* Comprehensive survey and health risk assessment of antibiotic residues in freshwater fish in Southeast China [J]. J Food Comp Anal, 2022, 114: 104821.
- [13] WANG XL, JIAO YN, WANG GL, *et al.* Occurrence of quinolones in cultured fish from Shandong Province, China and their health risk assessment [J]. Mar Pollut Bull, 2022, 180: 113777.
- [14] CHEN DM, DELMAS JM, 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 Chem, 2020, 311: 125924.
- [15] 封腾望, 王新新, 穆树荷, 等. 滤过型净化-超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱法测定草鱼肌肉冻干粉中 4 种硝基喹啉类代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(13): 4180-4187.
- FENG TW, WANG XX, MU SH, *et al.* Determination of 4 kinds of nitrofurans metabolites in grass carp muscle lyophilized powder by pass-through cleanup-ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole/compound linear ion trap mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(13): 4180-4187.
- [16] 李帆, 罗金文, 王峰, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速筛查畜禽类产品中 50 种违禁药物残留[J]. 现代食品科技, 2022, 38(6): 304-311.
- LI F, LUO JW, WANG F, *et al.* Quick screening and simultaneous determination of 50 kinds of doping residues in livestock by ultra performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. Mod Food Sci Technol, 2022, 38(6): 304-311.
- [17] 涂祥婷, 杨鸿波, 郭峰, 等. 超高效液相色谱-高分辨质谱法同时测定鱼肉中 16 种全氟烷基化合物[J]. 分析化学, 2021, 49(4): 528-537.
- TU XT, YANG HB, GUO F, *et al.* Simultaneous determination of 16 kinds of perfluoroalkyl substances in fish muscle by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2021, 49(4): 528-537.
- [18] LI XW, CHI QC, XIA SJ, *et al.* Untargeted multi-residue method for the simultaneous determination of 141 veterinary drugs and their metabolites in pork by high-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2020, 1634: 461671.
- [19] PETRARCA MH, BRAGA P, REYSS F, *et al.* Exploring miniaturized sample preparation approaches combined with LC-QTOF-MS for the analysis of sulfonamide antibiotic residues in meat- and/or egg-based baby foods [J]. Food Chem, 2022, 366: 130587.
- [20] HOU X, XU X, XU XY, *et al.* Application of a multiclass screening method for veterinary drugs and pesticides using HPLC-QTOF-MS in egg

- samples [J]. *Food Chem*, 2020, 309: 125746.
- [21] ZHU C, LAI G, JIN Y, *et al.* Suspect screening and untargeted analysis of veterinary drugs in food by LC-HRMS: Application of background exclusion-dependent acquisition for retrospective analysis of unknown xenobiotics [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2022, 210: 114583.
- [22] LI YJ, DING WH. Determination of benzotriazole and benzothiazole derivatives in human urine by eco-friendly deep eutectic solvent-based ultrasound-assisted liquid-liquid microextraction followed by ultrahigh performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Environ Pollut*, 2021, 284: 117530.
- [23] MONTEMURRO N, JOEDICKE J, PEREZ S. Development and application of a QuEChERS method with liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry for the determination of 50 wastewater-borne pollutants in earthworms exposed through treated wastewater [J]. *Chemosphere*, 2021, 263: 128222.
- [24] OFRYDOPOULOU A, NANNOU C, EVGENIDOU E, *et al.* Sample preparation optimization by central composite design for multi class determination of 172 emerging contaminants in wastewaters and tap water using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2021, 1652: 462369.
- [25] KIM E, PARK S, PARK H, *et al.* Determination of anthelmintic and antiprotozoal drug residues in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2021, 26(9): 2575.
- [26] MENG ZJ, LI Q, CONG JH, *et al.* Rapid screening of 350 pesticide residues in vegetable and fruit juices by multi-plug filtration cleanup method combined with gas chromatography-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Foods*, 2021, 10(7): 1651.
- [27] JIA XQ, YIN SJ, XU JH, *et al.* An efficient method to simultaneously analyze multi-class organic pollutants in human serum [J]. *Environ Pollut*, 2019, 251: 400–406.
- [28] 孙晓杰, 高金芳, 李兆新, 等. 通过式净化-液相色谱-串联质谱快速筛查水产品中 15 类 107 种兽药多残留的方法研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(22): 8240–8246.
- SUN XJ, GAO JF, LI ZX, *et al.* Simultaneous determination of 15 categories and 107 kinds of veterinary drugs in aquatic products by pass-through purification and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(22): 8240–8246.
- [29] 郭添荣, 万渝平, 孙利, 等. 通过式固相萃取结合超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查畜禽肉中 108 种兽药残留[J]. *分析化学*, 2022, 50(2): 271–289.
- GUO TR, WAN YP, SUN L, *et al.* Rapid screening and confirmation of 108 kinds of veterinary drug residues in livestock and poultry meat by solid phase extraction purification and liquid chromatography coupled with quadrupole/orbitrap mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2022, 50(2): 271–289.
- [30] LI XW, GUO P, SHAN YW, *et al.* Determination of 82 veterinary drugs in swine waste lagoon sludge by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1499: 57–64.

(责任编辑: 于梦娇 黄周梅)

作者简介

王 强, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为水产品质量安全检测与风险评估。
E-mail: wangqiang@scsfri.ac.cn

黄 珂, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水产品质量安全检测与风险评估。
E-mail: xiamike@163.com