QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定 水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物残留

温海滨^{*},林洁纯,叶靖怡,梁培荣,张婉梨,林腾奕 (广东省食品检验所,广州 510405)

摘 要:目的 建立 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography -tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时快速测定水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物残留量的 分析方法。**方法** 样品经乙腈提取,用乙二胺-N-丙基甲硅烷(primary secondary amine, PSA)和中性氧化铝吸附 剂净化,通过 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱分离,以 0.1%甲酸水溶液-乙 腈为流动相,采用电喷雾正离子模式,多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下分析,基质匹配 曲线外标法定量。结果 20种苯并咪唑类药物及其代谢物在 0.05~20.00 μg/L范围内线性关系良好($r^2 \ge 0.9991$),在空白样品基质中进行 3 个不同浓度水平的加标实验,平均回收率为 63.3%~105.8%,相对标准偏差为 0.1%~7.5% (*n*=6)。方法检出限为 0.1~0.5 μg/kg, 定量限为 0.3~2.0 μg/kg。**结论** 该方法操作简便、灵敏度高、准确可靠,适用于水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物的快速筛查。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 水产品; 苯并咪唑类药物

Simultaneous determination of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites residues in aquatic products by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WEN Hai-Bin^{*}, LIN Jie-Chun, YE Jing-Yi, LIANG Pei-Rong, ZHANG Wan-Li, LIN Teng-Yi

(Guangdong Provincial Institute of Food Inspection, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous and rapid determination of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites residues in aquatic products by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Methods The samples were extracted with acetonitrile, purified with primary secondary amine (PSA) and neutral alumina adsorbent, separated on a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm) chromatographic column using 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as the mobile phase under the electrospray ionization mode, analyzed in multiple reaction monitoring (MRM) mode, and quantified by external standard method of matrix matching curve. Results

*通信作者: 温海滨, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。E-mail: 626125738@qq.com

*Corresponding author: WEN Hai-Bin, Master, Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangdong Guangzhou 510405, China. E-mail: 626125738@qq.com

基金项目:广东省市场监督管理局科技项目(2021ZS04)、国家重点研发计划项目(2019YFC1606306-4)、广东省食品检验所科技创新基金项目(2019JS11)

Fund: Supported by the Science and Technology Project of Guangdong Administration for Market Regulation (2021ZS04), the National Key Research and Development Program of China (2019YFC1606306-4), and the Science and Technology Project of Guangdong Institute of Food Inspection (2019JS11)

The linear relationships of the 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites were good within the range of 0.05-20.00 μ g/L ($r^2 \ge 0.9991$). The spiked experiments at 3 kinds of different concentration levels in the blank sample matrix were performed, and the average recoveries were 63.3%–105.8%, and the relative standard deviations were 0.1%–7.5% (n=6). The limits of detection were 0.1–0.5 μ g/kg, and the limits of quantitation were 0.3–2.0 μ g/kg. **Conclusion** This method has the advantages of simplicity, high sensitivity and good reliability, which is suitable for the rapid detection of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites residues in aquatic products.

KEY WORDS: QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aquatic products; benzimidazoles

0 引 言

苯并咪唑类(benzimidazoles, BMZs)化合物是一类 由苯环和咪唑环组成的芳香族杂环化合物,具有抗寄生 虫、抗菌、抗病毒、抗癌和抗高血压等作用^[1],被广泛 用于农业、水产和禽畜养殖业。研究表明,苯并咪唑类 药物及其代谢物具有致畸和胚胎毒性作用^[2],高剂量或 长时间使用会导致该类药物在食用动物体内蓄积,通过 食物链传递进而影响人体健康,且在体内转化的代谢产 物仍具有毒理作用^[3-4]。目前,市面上依然存在约 20 余 种苯并咪唑类药物用于禽畜及水产养殖业中杀虫驱虫 使用的现象,为此我国及欧盟、美国、日本等国已将苯 并咪唑类药物列人限制使用的兽药目录中,并制订出苯 并咪唑类药物及其代谢物在不同动物体内(包括肌肉、组 织、奶等)的最高残留限量(maximum residue limit, MRL)^[1,5]。

目前, 苯并咪唑类药物常用的检测方法主要有高 效液相色谱法^[6-8]、液相色谱-串联质谱法^[9-11]、荧光分 析法^[12-14]、毛细管电泳法^[15-16]、免疫分析法^[17-18]等。 其中液相色谱-串联质谱法相对于其他方法,具有准确 性和灵敏度高,选择性和抗干扰性较强,可实现多目 标组分同时分析等优势,广泛应用于水产养殖产品中 兽药残留的分析测定。近年来国内外对苯并咪唑类药 物的研究主要集中于针对果蔬、禽畜肉组织、乳制品 等基质的分析检测,而对水产品中该类药物的分析报 道相对较少^[5],此外,我国现行标准 GB/T 22955-2008 《河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中苯并咪唑类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》中基质适用种类单一, 前处理过 程较为烦琐。因此,本研究采用具有快速高效、溶剂使 用量少等优势的 QuEChERS 净化技术,通过优化色谱和 质谱参数、样品前处理条件,建立超高效液相色谱-串联 质谱法同时快速测定水产品中 20 种苯并咪唑类药物及 其代谢物残留量的分析方法, 以期为水产品质量安全风 险监测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

沃特世 I-Class/Xevo TQ-S 超高效液相色谱-串联质谱联 用仪,配有电喷雾离子源(electronspray ionization, ESI)、 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); Multifuge X3R 高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗 器(东莞科桥超声波设备有限公司); GM-200 高效切割式粉 碎仪(德国莱驰公司); Vortex Genius 3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); AUTO EVA-60 自动氮吹仪(美国 Reeko 公司)。

20 种苯并咪唑类药物及其代谢物混合标准溶液(见表 1)(质量浓度为 100 μg/mL, 天津阿尔塔科技有限公司); 乙 腈、甲醇、乙酸、乙酸乙酯(色谱纯, 德国 Merck 公司); 乙 酸铵(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 甲酸(色 谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 正己烷、氯化 钠、无水硫酸钠、无水硫酸镁(分析纯, 广州化学试剂厂); 乙二胺-N-丙基甲硅烷(primary secondary amine, PSA)、十 八烷基键合硅胶吸附剂(ostade-cylsilane, ODS-C₁₈)(天津博 纳艾杰尔公司); 中性氧化铝吸附剂(Al-N)(国药集团化学 试剂有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

水产品购自本地市场。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

混合标准中间液:准确量取 100 µL 混合标准溶液于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 100 µg/L 混合标准 中间液,于-20 ℃冰箱保存备用。

流动相 A: 0.1%甲酸水溶液: 取 1.0 mL 甲酸, 用水溶 解并定容至 1000 mL。

1%乙酸乙腈溶液: 取 1.0 mL 乙酸, 用乙腈溶解并定 容至 100 mL。

1%甲酸乙腈溶液:取 1.0 mL 甲酸,用乙腈溶解并定 容至 100 mL。

50%乙腈水溶液:取 50 mL 乙腈于 100 mL 容量瓶中,

用水溶解并定容至100 mL。

30%乙腈水溶液: 取 30 mL 乙腈于 100 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至 100 mL。

30%甲醇水溶液: 取 30 mL 甲醇于 100 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容至 100 mL。

30%乙腈水(含 0.1%甲酸)溶液:取 20 mL 乙腈和 100 μL 甲酸,用水溶解并定容至 100 mL。

30%甲醇水(含 0.1%甲酸)溶液:取 20 mL 甲醇和 100 μL 甲酸,用水溶解并定容至 100 mL。

1.2.2 样品前处理

首先取适量新鲜的鱼、贝、虾样品进行预处理:鱼去 鳞去皮,沿脊背取肌肉等可食用部分;贝类去壳取肌肉部 分;虾去头去壳,取肌肉部分;采用四分法分样,用粉碎 机均质后备用。准确称取均质后的试样 2g(精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中,加入 4g 氯化钠和 5 mL 乙腈,涡旋混 合 1 min,超声提取 10 min,以 4000 r/min 离心 5 min,上清 液转移至另一 50 mL 离心管中,往残渣中加入 5 mL 乙腈 重复提取一次,合并 2 次上清液,涡旋混匀后转移至已含 有 100 mg PSA 和 100 mg 中性氧化铝吸附剂的 50 mL 离心 管中,涡旋振荡 1 min,以 8500 r/min 离心 10 min,取上清 液于 40 ℃氮气吹至干,用 2 mL 50%乙腈-水溶液复溶,涡 旋振荡 30 s,过 0.22 µm 滤膜后上机分析。

1.2.3 液相色谱-串联色谱条件

(1)液相色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱 程序: 0~0.80 min, 10% B; 0.80~4.50 min, 10%~100% B; 4.50~5.50 min, 100% B; 5.50~5.60 min, 100%~10% B; 5.60~7.00 min, 10% B; 流速: 0.350 mL/min; 柱温: 40 °C; 进 样量: 1 μL。

(2)质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子模式; 监测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 1.0 kV; 离子源温度: 150 ℃; 脱溶剂气温度: 500 ℃; 脱溶剂气流速: 1000 L/h; 锥孔反吹气流速: 150 L/h; 其他质谱参数见表 1。

表 1 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物质谱参数 Table 1 Spectral parameters of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites

序号	化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔 电压/V	碰撞能量 /eV
1	阿苯达唑	266.1	234.0^{*}	30	18
		266.1	191.0	30	28
2	阿苯达唑亚砜	282.1	240.1^{*}	30	9
		282.1	222.1	30	17
3	阿苯达唑砜	298.1	159.1*	30	35
		298.1	224.1	30	26

序号	化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔 电压/V	碰撞 能量/eV
4	阿苯达唑-2-氨	240.1	133.2*	30	27
	基砜	240.1	198.1	30	18
5		313.1	203.1*	30	15
	吡喹酮	313.1	83.3	30	24
6		316.0	159.1*	30	27
	奥芬达唑	316.0	191.1	30	19
7	苯硫氨酯	447.0	383.0*	30	15
		447.0	415.0	30	11
8		300.0	268.0^{*}	30	18
	芬苯达唑	300.0	159.1	30	30
9		202.1	175.1*	30	24
	噻苯达唑	202.1	131.1	30	30
10		296.1	264.1*	30	20
	甲苯达唑	296.1	105.2	30	28
11		250.1	218.1*	30	17
	奥苯达唑	250.1	176.1	30	26
	44 - ++ > 1, -=++	248.1	216.1*	30	17
12	阳本达唑	248.1	173.1	30	30
10	一与大小咖	359.1	343.9*	30	24
13	二录本び唑	359.1	198.1	30	25
14	艺艺士政团	332.0	159.1*	30	36
14	分平达喹啉	332.0	300.0	30	20
15	氟苯达啉	314.1	123.1*	30	29
15	<u> 新平</u> 心空	314.1	282.0	30	19
16	氛其田茶咪啉	238.1	105.1*	30	27
	<u> </u>	238.1	133.1	30	35
17	5-羟基甲苯咪	298.1	160.1*	30	28
	唑	298.1	266.0	30	17
18	5-羟基噻苯咪	218.1	191.1*	30	22
	唑	218.1	147.0	30	28
	2-氨基氟苯达 唑	256.1	95.2 [*]	30	35
19		256.1	123.2	30	24
20		303.0	217.1*	30	24
	坎苯达唑	303.0	261.0	30	16

注: *为定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

采用质量浓度为 100 μg/L 的混合标准溶液进行质谱 优化,在正离子模式下进行质谱一级全扫描和子离子扫描, 得到各苯并咪唑类药物的分子离子峰([M+H]⁺)和特征碎片 离子峰,通过优化锥孔电压和碰撞能量,选择离子丰度最 高、基体干扰较小的离子对作为特征离子对,其中选择响 应信号强度最大的离子对作为定量离子对,进一步优化毛 细管电压等质谱参数,使其离子化效率达到最佳,20 种苯 并咪唑类药物及其代谢物的相关质谱参数见表 1。

2.2 色谱条件的优化

本研究在相同色谱条件下考察了 XBridge BEH C₁₈ (4.6 mm×100 mm, 2.5 µm)和 ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 µm)的分离效果,结果发现采用 XBridge BEH C₁₈ 色谱柱进行分离时洗脱时间较长,且可洗脱的目标 物数量较少,而采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱进行 分离时,不仅可以达到良好的分离效果,各药物峰形尖锐对称,而且可在 7 min 内完成一个样品的分析,提高了分析速度,见图 1。因此本研究选择使用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱进行实验。

本研究分别以乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相 考察了不同洗脱体系对目标物的色谱峰峰形以及响应强度 的影响。结果表明,以乙腈-水和乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶 液作为流动相时,目标组分信号响应强度较低,灵敏度下 降,当水相中加入甲酸后进行梯度洗脱时,各目标组分的 响应信号增强,且有较好色谱峰峰形,这说明了在流动相 中添加适量甲酸可显著提高苯并咪唑类药物的离子化效率, 提高检测灵敏度。当以甲醇作为流动相的有机相部分时, 苯硫氨酯因极性较弱而难以被洗脱下来,而乙腈可在短时 间内将其分离出来。因此,本研究最终选取乙腈-0.1%甲酸 水溶液作为流动相。

2.3 前处理条件的优化

2.3.1 样品提取条件优化

苯并咪唑类药物常用的提取溶液主要有乙腈、乙酸乙 酯和甲醇等^[11],本研究分别考察了乙腈、1%乙酸乙腈、1% 甲酸乙腈、甲醇和乙酸乙酯的提取效率。结果如图 2 所示, 采用甲醇作为提取液时,阿苯达唑、芬苯达唑、帕苯达唑、 三氯苯达唑等目标物回收率均低于 60%,且甲醇沉淀蛋白 效果较差,有较多的干扰物质被同时从基质中提取出来; 而使用乙酸乙酯提取时容易发生乳化现象,尤其对脂肪含 量较高的水产品基质进行提取时乳化现象更为严重,极大 影响了目标组分提取效果;乙腈的提取效果明显优于甲醇 和乙酸乙酯,同时乙腈具有良好的沉淀蛋白质的作用,有 利于后续的进一步净化处理。此外,酸性乙腈的提取效果 与甲醇基本一致,这有可能是采用酸性乙腈提取时基质杂 质干扰较大,造成较差的提取效率,因此本研究选择乙腈 作为样品提取溶剂。



在样品前处理过程中加入盐析剂,不仅有利于有机 相与水相分层,还能起到分散样品和沉淀部分蛋白质的作 用,同时也去除了部分水溶性杂质,从而提高目标组分的 回收率^[7]。本研究对比了无水硫酸钠、氯化钠和无水硫酸 镁的盐析效果,结果如图 3 所示,采用无水硫酸钠时阿苯 达唑、芬苯达唑、帕苯达唑和三氯苯达唑的回收率均低于 60%,使用无水硫酸镁时三氯苯达唑、氨基甲苯咪唑和 2-氨基氟苯达唑的回收率同样均低于 60%,而选用氯化钠时 不仅能获得较好的盐析效果,同时氯化钠能够较好去除水 溶极性基质干扰物^[7],因此选用氯化钠作为盐析剂。研究 进一步考察了盐析剂用量对盐析效果和提取效果的影响, 发现当盐析剂用量大于 3 g 时,随着其用量增加,各目标 物的提取效果逐渐下降,但当用量大于 4 g 时可获得良好 的盐析效果,综合考虑以上因素,本研究选择 4 g 氯化钠 作为盐析剂。

2.3.2 净化条件优化

为提高样品净化效率,减少提取液中的杂质对目标物的检测干扰,本研究采用 QuEChERS 净化方式。 QuEChERS 方法常用的净化填料有 PSA、C₁₈、无水硫酸镁、 无水硫酸钠等,其中 PSA 主要用于去除有机酸、极性色素、 金属离子以及一些酚类和糖类物质^[19];C₁₈ 吸附剂能有效 去除脂肪酸和固醇类等化合物^[20];无水硫酸镁、无水硫酸 钠则主要利用其盐析和除水作用。本研究对 C₁₈、PSA、中 性氧化铝以及无水硫酸钠和无水硫酸镁净化材料的净化效 果进行了考察,结果如图4所示,发现使用 C₁₈ 吸附剂时对

Fig.2

阿苯达唑、芬苯达唑、帕苯达唑和三氯苯达唑有较强的吸附作用,导致其损失较大;使用 PSA 吸附剂并结合无水硫酸钠或无水硫酸镁净化时发现样品复溶液较为浑浊,表明使用该净化组合未能获得较好的净化效果;而采用 PSA 和中性氧化铝吸附剂净化时可获得较好的净化效果和回收率,这是由于中性氧化铝吸附剂表面具有电中性,可吸附脂肪类富电子杂质,具有良好的除脂效果^[21]。因此本研究选用 PSA 和中性氧化铝吸附剂作为净化剂,并优化两者的用量,当 PSA 和中性氧化铝吸附剂用量各为 100 mg 时,各目标

物回收率和净化效果均为最优, 故选用此用量。

2.3.3 复溶液的筛选

本研究比较了 50%乙腈水溶液、30%乙腈水溶液、30% 甲醇水溶液、30%乙腈水溶液(含 0.1%甲酸)和 30%甲醇水 溶液(含 0.1%甲酸)对 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物回 收率的影响。结果发现当使用甲醇-水溶液或低比例乙腈水 溶液时部分目标物回收率偏低,而当乙腈和水的体积比例 为 1:1 时, 20 种药物的回收率均在 70.2%~106.1%之间,因 此选择 50%乙腈水溶液作为样品复溶液。



图 2 不同提取溶剂对 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物回收效果影响的比较(*n*=3) Comparison of the effects of different extraction solvents on the recoveries of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites (*n*=3)



图 3 盐析剂对 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物回收效果影响的比较(n=3) Fig.3 Comparison of the effects of salting-out agents on the recoveries of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites (n=3)



图 4 净化材料对 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物回收效果影响的比较(n=3) Fig.4 Comparison of the effects of purification materials on the recoveries of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites (n=3)

2.4 基质效应

Table 2

基质效应(matrix effect, ME)是与目标分析物共同从 样品中萃取出来的内源性物质导致目标分析物的检测信号 强度发生不同程度变化的现象,包括基质增强效应和基质 抑制效应^[22-23],能影响仪器的灵敏度和分析结果的准确性, 因而有必要对基质效应进行评价。本方法通过配制溶剂绘 制标准溶液曲线和基质匹配溶液标准曲线^[24],用以判断基 质效应的影响,计算公式为:ME(%)=(基质匹配标准溶液 曲线斜率/溶剂标准溶液曲线斜率-1)×100%,负值表示基 质抑制效应,正值表示基质增强效应,绝对值越大则表示 基质效应越强。本研究对草鱼、白贝和南美白对虾进行了 基质效应评估,该方法基质效应为-27.4%~8.9%。鉴于此, 本研究采用基质匹配曲线外标法定量。

2.5 方法线性范围、检出限及定量限

在上述实验条件下,采用空白基质溶液逐级稀释配制一系列不同浓度的混合标准工作液,以苯并咪唑类药物 及其代谢物响应峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X,μg/L)为 横坐标绘制标准工作曲线。结果表明,苯并咪唑类药物及 其代谢物在 0.05~20.00 μg/L 浓度范围内线性关系良好,相 关系数(r²)均大于等于 0.9991,线性方程见表 2。利用阴性 基质样品做加标回收实验,以 3 倍信噪比为检出限,10 倍 信噪比为定量限,得到每种苯并咪唑类药物及其代谢物的 检出限和定量限,本方法检出限为 0.1~0.5 μg/kg,定量限 为 0.3~2.0 μg/kg,说明该方法具有良好的灵敏度。

表 2 水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物标准曲线线性方程

Table 2 Elinear canoration equations of the 20 kinds of benzhindazores and then inclaborites in aquate products					
化合物	草鱼	白贝	南美白对虾		
阿苯达唑	$Y=1.44\times10^{5}X-884$	$Y = 1.42 \times 10^5 X + 2.01 \times 10^3$	$Y=1.26\times 10^{5}X-242$		
阿苯达唑亚砜	<i>Y</i> =2.68×10 ⁴ <i>X</i> +233	<i>Y</i> =2.81×10 ⁴ <i>X</i> +349	<i>Y</i> =2.90×10 ⁴ <i>X</i> +775		
阿苯达唑砜	$Y = 5.04 \times 10^4 X - 154$	$Y = 5.57 \times 10^4 X + 526$	<i>Y</i> =5.26×10 ⁴ <i>X</i> +746		
阿苯达唑-2-氨基砜	<i>Y</i> =3.64×10 ⁴ <i>X</i> +100	<i>Y</i> =3.50×10 ⁴ <i>X</i> +179	<i>Y</i> =2.86×10 ⁴ <i>X</i> +893		
吡喹酮	<i>Y</i> =5.93×10 ⁴ <i>X</i> +9.26	$Y = 4.99 \times 10^{4} X + 1.66 \times 10^{4}$	$Y = 5.19 \times 10^4 X - 182$		
奥芬达唑	<i>Y</i> =4.83×10 ⁴ <i>X</i> +772	<i>Y</i> =5.27×10 ⁴ <i>X</i> +771	<i>Y</i> =4.96×10 ⁴ <i>X</i> +684		
苯硫氨酯	<i>Y</i> =6.97×10 ⁴ <i>X</i> -296	$Y = 5.35 \times 10^4 X + 593$	<i>Y</i> =4.35×10 ⁴ <i>X</i> +514		
芬苯达唑	$Y=1.25\times10^{5}X+1.48\times10^{3}$	$Y = 1.39 \times 10^5 X + 347$	$Y = 9.87 \times 10^4 X + 1.17 \times 10^3$		
噻苯达唑	<i>Y</i> =6.13×10 ⁴ <i>X</i> +379	$Y = 5.97 \times 10^4 X$ -7.19	<i>Y</i> =5.78×10 ⁴ <i>X</i> +129		
甲苯达唑	$Y = 8.67 \times 10^4 X - 402$	$Y = 9.11 \times 10^4 X + 350$	$Y = 8.00 \times 10^4 X + 1.22 \times 10^3$		

表 2(续)

化合物	草鱼	白贝	南美白对虾
奥苯达唑	$Y=1.52\times10^{5}X-1.45\times10^{3}$	$Y = 1.47 \times 10^5 X + 3.01 \times 10^3$	<i>Y</i> =1.42×10 ⁵ <i>X</i> +19.0
帕苯达唑	$Y=1.59\times10^{5}X-1.13\times10^{3}$	$Y = 1.71 \times 10^5 X + 49$	<i>Y</i> =1.60×10 ⁵ <i>X</i> -202
三氯苯达唑	$Y = 4.79 \times 10^4 X + 1.02 \times 10^3$	<i>Y</i> =4.44×10 ⁴ <i>X</i> +737	$Y=3.97\times10^{4}X+1.25\times10^{3}$
芬苯达唑砜	$Y = 5.30 \times 10^4 X$ -708	<i>Y</i> =6.42×10 ⁴ <i>X</i> +302	$Y = 5.34 \times 10^4 X + 3.87 \times 10^3$
氟苯达唑	$Y = 4.66 \times 10^4 X + 1.45 \times 10^3$	$Y = 5.37 \times 10^4 X - 145$	<i>Y</i> =3.74×10 ⁴ <i>X</i> +201
氨基甲苯咪唑	<i>Y</i> =3.81×10 ⁴ <i>X</i> -446	$Y = 3.58 \times 10^4 X + 1.43 \times 10^3$	<i>Y</i> =3.46×10 ⁴ <i>X</i> +205
5-羟基甲苯咪唑	$Y = 1.65 \times 10^4 X - 109$	<i>Y</i> =1.62×10 ⁴ <i>X</i> +668	$Y=1.25\times10^{4}X+612$
5-羟基噻苯咪唑	<i>Y</i> =3.78×10 ⁴ <i>X</i> +123	<i>Y</i> =3.74×10 ⁴ <i>X</i> -310	<i>Y</i> =3.46×10 ⁴ <i>X</i> +398
2-氨基氟苯达唑	$Y=3.19\times10^{4}X+40.1$	$Y = 3.14 \times 10^4 X + 1.00 \times 10^3$	<i>Y</i> =2.56×10 ⁴ <i>X</i> +577
坎苯达唑	<i>Y</i> =1.56×10 ⁶ <i>X</i> +950	<i>Y</i> =1.42×10 ⁵ <i>X</i> +999	<i>Y</i> =1.20×10 ⁵ <i>X</i> +955

2.6 回收率和精密度考察

选用草鱼、白贝和南美白对虾阴性基质样品分别进行 3个加标水平的加标回收实验(阿苯达唑亚砜、阿苯达唑砜、 阿苯达唑-2-氨基砜、奥芬达唑、甲苯达唑、帕苯达唑、芬 苯达唑砜、氟苯达唑、5-羟基甲苯咪唑、2-氨基氟苯达唑 和坎苯达唑为 0.1、0.2 和 1.0 μg/kg; 阿苯达唑、奥苯达唑 和 5-羟基噻苯咪唑为 0.2、0.4 和 2.0 µg/kg; 吡喹酮、苯硫 氨酯、芬苯达唑、噻苯达唑、三氯苯达唑和氨基甲苯咪唑 为 0.5、1.0 和 5.0 μg/kg), 按上述优化方法进行样品前处理, 每个浓度水平做 6 次平行测定。实验结果表明, 草鱼、白 贝、南美白对虾基质中20种药物的平均加标回收率分别为 63.3%~104.3%、67.2%~103.1%、63.5%~105.8%,相对标准 偏差(n=6)为 0.1%~7.5%。其中 20 种苯并咪唑类药物及其 代谢物在草鱼、白贝和南美白对虾基质中的平均回收率为 阿苯达唑 63.3%~90.9%、阿苯达唑亚砜 80.4%~104.3%、阿 苯达唑砜 71.0%~99.5%、阿苯达唑-2-氨基砜 73.1%~89.3%、 吡喹酮 70.0%~103.1%、奥芬达唑 86.6%~103.1%、苯硫氨 酯 75.3%~100.0%、芬苯达唑 79.8%~99.0%、噻苯达唑 76.4%~92.0%、甲苯达唑 64.6%~96.8%、奥苯达唑 78.1%~97.4%、帕苯达唑 73.4%~94.8%、三氯苯达唑 69.2%~82.8%、芬苯达唑砜 80.8%~100.8%、氟苯达唑 63.5%~93.4%、氨基甲苯咪唑 73.7%~88.0%、5-羟基甲苯咪 唑 71.6%~99.8%、5-羟基噻苯咪唑 66.1%~82.0%、2-氨基 氟苯达唑 72.8%~100.6%、坎苯达唑 71.5%~105.8%。表明 本方法具有较好的重现性和准确性,可满足水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物残留量的测定。

2.7 实际样品测定

按照本研究所建立的方法对市售的罗非鱼、桂花鱼、 草鱼、白贝、蛏子、花甲、罗氏虾、小龙虾、沙虾等 100 批次常见水产品进行苯并咪唑类药物及其代谢物残留量的 测定,在一份沙虾中检出芬苯达唑,含量为 5.05 μg/kg,其 余样品均未检出或低于定量限。由于本次实际样品分析中 检出芬苯达唑,说明其作为一种较好的驱虫剂,存在在水 产养殖中使用的情况,因此在日后检测中应加强对水产品 中该类物质的风险监测。

3 结 论

本研究通过前处理和色谱条件的优化,采用 QuEChERS 净化技术,结合超高效液相色谱-串联质谱法 建立了同时快速测定水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其 代谢物残留的分析方法,并进行了方法学考察。该方法操 作简便,灵敏度高且稳定,测定结果准确可靠,适用于批 量水产品中 20 种苯并咪唑类药物及其代谢物的快速同时 检测,为水产品质量安全风险监测提供了方法参考和技术 支持。

参考文献

- CHEN L, ZHANG Y, ZHOU Y, *et al.* Pretreatment and determination methods for benzimidazoles: An update since 2005 [J]. J Chromatogr A, 2021, 1644: 462068.
- [2] LI S, LIANG Q, AHMED SAH, et al. Simultaneous determination of five benzimidazoles in agricultural foods by core-shell magnetic covalent organic framework nanoparticle-based solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography [J]. Food Anal Methods, 2020, 13(5): 1111–1118.
- [3] 张仟春,杨燕群,苏姚,等.固相微萃取/高效液相色谱联用分析食品 中痕量苯并咪唑[J].分析测试学报,2017,36(6):718-724. ZHANG QC, YANG YQ, SU Y, et al. Determination of trace benzimidazoles in foods by solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Instrm Anal, 2017, 36(6): 718-724.
- [4] ZHENG F, XIAO HM, ZHU QF, et al. Profiling of benzimidazoles and related metabolites in pig serum based on SiO₂@NiO solid-phase

extraction combined precursor ion scan with high resolution orbitrap mass spectrometry [J]. Food Chem, 2019, 284: 279–286.

- [5] 朱姗姗, 连思雨, 李丽娜, 等. 液相色谱和液质联用法分析食品中苯并 咪唑类药物残留的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(10): 385–395. ZHU SS, LIAN SY, LI LN, *et al.* Research progress on analysis of benzimidazole residues in food based on chromatography-mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(10): 385–395.
- [6] DAR SA, NAUTIYAL V, PHULIA V, et al. Determination of benzim idazoles in fish plasma by chromatographic method and their effects on metabolic and antioxidative enzymes activity [J]. Aquaculture, 2018, 486: 57–63.
- [7] TEJADA-CASADO C, LARA FJ, GARCÍA-CAMPAÑA AM, et al. Ultra -high performance liquid chromatography with fluorescence detection following salting-out assisted liquid–liquid extraction for the analysis of benzimidazole residues in farm fish samples [J]. J Chromatogr A, 2018, 1543: 58–66.
- [8] 邹游, 邵琳智, 吴映璇. 高效液相色谱法测定鸡组织中苯并咪唑类药 物残留标志物[J]. 色谱, 2019, 37(10): 1112–1117.
 ZOU Y, SHAO LZ, WU YX. Determination of benzimidazoles residue markers in chicken tissue by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(10): 1112–1117.
- [9] XU N, DONG J, YANG YB, et al. Development of a liquid chromatog raphy-tandem mass spectrometry method with modified QuEChERS extraction for the quantification of mebendazole and its metabolites, albendazole and its metabolites, and levamisole in edible tissues of aquatic animals [J]. Food Chem, 2018, 269: 442–449.
- [10] 陈瑞,杨志伟,朱凤妹,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶和 奶粉中五种苯并咪唑类药物[J]. 核农学报, 2020, 34(8): 1776–1784. CHEN R, YANG ZW, ZHU FM, et al. Determination of five benzimidazoles in milk and milk powder by UPLC-MS-MS [J]. J Nucl Agric Sci, 2020, 34(8): 1776–1784.
- [11] 陈思敏, 吴映璇, 蓝草, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定乳制品 中苯并咪唑类药物及其代谢物的残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2020, 56(5): 553–564.
 CHEN SM, WU YX, LAN C, *et al.* UHPLC-MS/MS determination of

residual amounts of benzimidazoles and its metabolites in dairy products [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2020, 56(5): 553–564.

- [12] DERAYEA SM, HAMAD AA, ALI R, et al. Investigating erythrosine B as a fluorimetric probe for the determination of benzimidazole drugs via facile complexation reaction [J]. Microchem J, 2019, 149: 104024.
- [13] CAI Y, HE X, CUI PL, et al. Molecularly imprinted microspheres based multiplexed fluorescence method for simultaneous detection of benzimidazoles and pyrethroids in meat samples [J]. Food Chem, 2020, 319: 126539.
- [14] OUYANG Q, WANG L, AHMAD W, et al. A highly sensitive detection of carbendazim pesticide in food based on the upconversion-MnO₂ luminescent resonance energy transfer biosensor [J]. Food Chem, 2021, 349: 129157.
- [15] BOL SHAKOV DS, AMELIN VG, TRET YAKOV AV. Determination of polar pesticides in soil by micellar electrokinetic chromatography using QuEChERS sample preparation [J]. J Anal Chem, 2014, 69(1): 89–97.

- [16] XU L, LUAN F, WANG LJ, et al. Capillary zone electrophoresis method for determination of mebendazole and levamisole hydrochloride in a combined tablet and a comparison with a LC method [J]. J AOAC Int, 2014, 97(1): 128–132.
- [17] GUO LL, WU XL, LIU LQ, et al. Gold nanoparticle-based paper sensor for simultaneous detection of 11 benzimidazoles by one monoclonal antibody [J]. Small, 2018, 14(6): 1701782.
- [18] KOUKOUVINOS G, KARACHALIOU CE, RAPTIS I, et al. Fast and sensitive determination of the fungicide carbendazim in fruit juices with an immunosensor based on white light reflectance spectroscopy [J]. Biosensors, 2021, 11(5): 153.
- [19] 王东斌, 汪春明. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中啶 磺草胺的残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(9): 3799–3806.
 WANG DB, WANG CM. Determination of pyroxsulam in the grain crops by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(9): 3799–3806.
- [20] 黄松,刘佳,陈彦宏,等.改良 QuEChERS 法在农药多残留检测中的应用[J].食品安全质量检测学报,2019,10(12):3683–3688.
 HUANG S, LIU J, CHEN YH, *et al.* Application of the modified QuEChERS in the multi-class pesticide residues [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(12): 3683–3688.
- [21] 邱世婷,侯雪,韩梅,等.基质固相分散萃取-超高效液相色谱串联质 谱法检测大米中 27 种农药残留量[J].食品安全质量检测学报,2020, 11(13):4219-4225.

QIU ST, HOU X, HAN M, *et al.* Determination of 27 kinds of pesticides residues in rice by matrix solid phase dispersion extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(13): 4219–4225.

- [22] FREITAS A, BARBOSA J, RAMOS F. Matrix effects in ultra -high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry antibiotic multi-detection methods in food products with animal origins [J]. Food Anal Methods, 2016, 9(1): 23–29.
- [23] RAPOSO F, BARCELÓ D. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints [J]. TrAC Trends Anal Chem, 2021, 134: 116068.
- [24] BUSTAMANTE-RANGEL M, DELGADO-ZAMARREÑO MM, RODRÍ GUEZ-GONZALO E. Simple method for the determination of anthelmintic drugs in milk intended for human consumption using liquid chromatography –tandem mass spectrometry [J]. J Sci Food Agric, 2021. DOI: 10.1002/ jsfa.11361

(责任编辑:张晓寒郑丽)



温海滨, 为食品安全⁴ E-mail:

温海滨,硕士,工程师,主要研究方向 为食品安全与质量分析。 E-mail: 626125738@qq.com