

# QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼和虾中苯巴比妥残留

黄佳佳<sup>1</sup>, 杨慧晴<sup>2</sup>, 温惠敏<sup>2</sup>, 邓龙<sup>1</sup>, 杨昭<sup>1</sup>, 李燕杰<sup>1</sup>, 丘婷婷<sup>2</sup>, 徐振林<sup>3\*</sup>

(1. 广东食品药品职业学院食品学院, 广州 510520; 2. 广东省绿色产品认证检测中心有限公司, 广州 510440;  
3. 华南农业大学食品学院, 广州 510642)

**摘要:** **目的** 建立 QuEChERS 样品前处理结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定鱼和虾中苯巴比妥残留的方法。**方法** 样品采用乙腈提取, 经乙二胺-N-丙基硅烷(primary secondary amine, PSA)、C<sub>18</sub>、石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)和无水硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>)净化, 使用 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm×2.1mm, 1.8 μm)分离, 以甲醇(A)-水(B)为流动相进行梯度洗脱, 在 UPLC-MS/MS 多反应监测模式下进行定性和定量分析。**结果** 方法在 0.5~100.0 μg/L 的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数( $r^2$ )为 0.9999, 检出限和定量限分别是 0.5、1.5 μg/kg。草鱼、鲈鱼、罗非鱼和南美白对虾 4 种常见鲜活水产品经 QuEChERS 前处理, 有效降低基质干扰, 表现为可忽略的弱基质效应。对以上 4 种样品进行加标回收实验, 平均回收率为 72.1%~96.7%, 相对标准偏差为 1.2%~12.3% ( $n=6$ )。**结论** 该方法操作简便快速、灵敏度高、准确性和精密度好, 可满足水产品鱼和虾中苯巴比妥残留快速筛查和定量分析的需求。

**关键词:** 苯巴比妥; 鱼; 虾; QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法

## Determination of phenobarbital residues in fish and shrimp by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HUANG Jia-Jia<sup>1</sup>, YANG Hui-Qing<sup>2</sup>, WEN Hui-Min<sup>2</sup>, DENG Long<sup>1</sup>, YANG Zhao<sup>1</sup>,  
LI Yan-Jie<sup>1</sup>, QIU Ting-Ting<sup>2</sup>, XU Zhen-Lin<sup>3\*</sup>

(1. College of Food Science, Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. Guangdong Test Center for Green Labelling Co., Ltd., Guangzhou 510440, China; 3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**ABSTRACT: Objective** To develop a method for the determination of phenobarbital residues in fish and shrimp

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(32061160473)、广东省普通高校重点研究项目(2019KJDXM002)、广东省普通高校青年创新人才类项目(2019GKQNCX063)、广东省食品检测创新团队项目(2021KCXTD077)、广东食品药品职业学院食品营养与检测教学创新团队项目(2020TD02)、广东食品药品职业学院科研项目(2017ZR024)

**Fund:** Supported by the National Natural Science Foundation of China (32061160473), the Key Research Projects of Colleges and Universities in Guangdong Province (2019KJDXM002), the Young Innovative Talents Project of Colleges and Universities in Guangdong Province (2019GKQNCX063), the Project of Food Testing Innovation Team in Guangdong Province (2021KCXTD077), the Food Nutrition and Testing Teaching Innovation Team Project of Guangdong Food and Drug Vocational College (2020TD02), and the Scientific Research Project of Guangdong Food and Drug Vocational College (2017ZR024)

\***通信作者:** 徐振林, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: jallent@163.com

\***Corresponding author:** XU Zhen-Lin, Ph.D, Professor, South China Agricultural University, No.483, Wushan Road, Tianhe District, Guangzhou 510642, China. E-mail: jallent@163.com

by pre-treatment of QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by acetonitrile solution, purified with primary secondary amine (PSA), C<sub>18</sub>, graphitized carbon black (GCB), anhydrous magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), and separated by Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> column (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) by gradient elution using methanol (A)-water (B) as mobile phase. The qualitative and quantitative analyses were carried out under the multiple reaction monitoring modes of UPLC-MS/MS. **Results** This method had good linear relationship in the range of 0.5–100.0 μg/L, and the correlation coefficient ( $r^2$ ) was 0.9999. The limits of detection and quantitation were 0.5 and 1.5 μg/kg, respectively. Four kinds of common fresh aquatic products including *Ctenopharyngodon idellus*, *Lateolabrax japonicus*, *Oreochromis mossambicus* and *Litopenaeus Vannamei* pre-treated with QuEChERS could effectively reduce matrix interference, showing a negligible weak matrix effect. The average recoveries of the above 4 kinds of samples were 72.1%–96.7%, and the relative standard deviations were 1.2%–12.3% ( $n=6$ ). **Conclusion** The proposed method is simple, fast, sensitive, accurate and precise, which is suitable for rapid and quantitative analysis of phenobarbital residues in fish and shrimp samples.

**KEY WORDS:** phenobarbital; fish; shrimp; QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

## 0 引言

苯巴比妥(phenobarbital, PB)属于巴比妥类安眠镇静药物,对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统有明显的抑制作用,使用剂量不同会出现镇静、催眠、抗惊厥和麻醉作用<sup>[1]</sup>。早期苯巴比妥被用于辅助活鱼运输<sup>[2]</sup>,通过直接肌肉注射或投放于饲养的水中<sup>[3]</sup>,以减少运输过程中因应激反应而受伤甚至死亡,提高成活率,减少经济损失。然而食入含苯巴比妥残留的动物组织,可导致头晕、恶心、呕吐,长期摄入可能产生耐受性和成瘾性<sup>[4]</sup>,给食用者的健康及生命安全带来威胁。我国在《中华人民共和国农业部公告第 176 号》中已经禁止其在饲料和动物饮用水中使用<sup>[5]</sup>。然而目前尚未颁布动物源性食品组织中残留苯巴比妥检测标准方法。因此,建立高灵敏度的水产品中痕量苯巴比妥的检测方法十分必要。

目前高效液相色谱法<sup>[4,6-7]</sup>、超高效液相色谱法<sup>[8-9]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[1,10]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[5,11]</sup>、毛细管电泳法<sup>[12]</sup>、荧光分析法<sup>[13]</sup>、免疫分析法<sup>[14-15]</sup>等技术应用于人体尿液、血浆、胃内容物、饲料、保健食品及部分动物源性食品中苯巴比妥的检测。超高效液相色谱-质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)灵敏度高、稳定性好、定性定量更准确,被广泛用于水产品中痕量有害物质的分析<sup>[16-18]</sup>。然而水产品基质复杂,样品前处理影响检测方法的准确性和灵敏度。液-液萃取方法快速高效,却较难消除水产品中的色素、脂肪和蛋白质等因素的干扰<sup>[19]</sup>。现有国家标准 GB 31660.1—2019《食品安全国家标准 水产品中大环内酯类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》、GB 31656.6—2021《食品安全国家标准 水产品中丁香酚残留

量的测定 气相色谱-质谱法》和 GB 31656.11—2021《食品安全国家标准 水产品中土霉素、四环素、金霉素、多西环素残留量的测定》使用的固相萃取法(solid phase extraction, SPE)操作烦琐,固相萃取柱净化用时长且成本高,在大批量水产品安全筛查中不具优势。QuEChERS (quick, easy, cheap, rugged, safe)操作简便快速,利用不同吸附剂与样品提取液直接作用,可减少样品中色素、脂肪和蛋白质对检测过程的影响<sup>[20]</sup>,适用于食品中痕量污染物的测定<sup>[21-23]</sup>。因此,本研究建立 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定水产品鱼和虾中苯巴比妥残留的检测方法,采用 QuEChERS 进行样品前处理净化,优化提取方式、时间和净化剂的组合与配比,考察该方法下不同鲜活鱼类及虾的基质种类的基质效应,简化样品前处理操作,降低基质影响,在水产养殖业麻醉剂残留问题突发的情况下,为水产品中苯巴比妥检测标准的建立及市场安全监管提供技术参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)、南美白对虾(*Litopenaeus Vannamei*)市购。

苯巴比妥标准溶液(1.0 mg/mL, 上海安谱实验科技股份有限公司); 甲醇、乙腈、乙酸乙酯(色谱纯, 美国 FISHER 公司); 无水硫酸镁(以下简称 MgSO<sub>4</sub>)、乙二胺-N-丙基硅烷(primary secondary amine, PSA)、石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)、C<sub>18</sub> 吸附剂(分析纯, 天津博纳艾杰尔科技有限公司)。

## 1.2 仪器与设备

1290II型超高效液相色谱仪、6470 型三重四极杆串联质谱仪[配电喷雾离子源、Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 美国安捷伦公司]; EFAA- HM-01 型多管漩涡混合仪(上海安谱实验科技股份有限公司); AR1502CN 型电子天平(0.01 g, 上海奥豪斯仪器有限公司); TW223L 型电子天平(0.001 g, 日本岛津公司); HR/T20MM 型高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); FBF-2000 型氮吹仪(北京八方世纪科技有限公司); AK-080S 型超声波清洗机(深圳钰洁公司); Milli-Q 型纯水机(美国 Millipore 公司)。

## 1.3 方法

### 1.3.1 标准溶液的配制

准确吸取 1.0 mL 质量浓度为 1.0 mg/mL 的苯巴比妥标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容至刻度, 得到 0.1 mg/mL 的苯巴比妥标准储备液。再准确吸取 1.0 mL 苯巴比妥标准储备液于 100 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 得到 1.0 μg/mL 的标准中间溶液, -18℃保存。检测时, 使用 50%甲醇分别配制质量浓度为 0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00 μg/L 的苯巴比妥标准工作溶液, 4℃储存备用。

### 1.3.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 相为甲醇, B 相为水, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 10.0 μL; 柱温: 30.0℃。

表 1 UPLC 洗脱程序  
Table 1 UPLC elution procedures

时间/min	A/%
0.00~1.50	60~50
1.51~2.00	50~50
2.01~3.00	50~60

### 1.3.3 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 扫描方式: 负离子扫描; 毛细管电压: 2000 V; 鞘气温度: 350℃; 鞘气流速: 12 L/min; 干燥气温度: 350℃; 干燥气流速: 6 L/min; 雾化气压力: 35 psi; 检测方式为多反应监

测扫描(multiple reaction monitoring, MRM)。其他质谱参数见表 2。

### 1.3.4 样品前处理

制备: 罗非鱼、草鱼和鲈鱼每批购 3 尾以上, 南美白对虾每批购 30 尾以上。样品预处理参考 GB/T 30891—2014 《水产品抽样规范》中: 养殖及捕捞水产品的试样制备。罗非鱼、草鱼和鲈鱼清洗后去除头、鱼鳞和内脏, 沿骨取可食用部分, 绞碎混合均匀备用; 南美白对虾清洗后去除虾头、虾壳和肠腺, 取食用组织, 绞碎混合均匀备用。

提取: 准确称取样品(2.00±0.05) g 置于 50 mL 离心管中, 加入 10.0 mL 乙腈和 2.0 g MgSO<sub>4</sub>, 涡旋混匀, 振荡提取 5 min, 4℃条件下 10000 r/min 离心 5 min, 吸取 8.0 mL 上清液于 15 mL 离心管中待净化。

净化: 在上述上清液中加入净化剂为 0.1 g PSA、0.1 g GCB、0.1 g C<sub>18</sub> 和 0.3 g MgSO<sub>4</sub>, 涡旋混匀, 振荡 5 min, 4℃条件下 10000 r/min 离心 5 min, 准确吸取 4.0 mL 上清液, 氮气吹干, 用 1.0 mL 50%甲醇溶液复溶, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 待 UPLC-MS/MS 检测。

### 1.3.5 数据处理

本研究所有数据均在 Agilent 公司的 MassHunter Version B.08.00 软件下采集, 采用 MassHunter Version B.07.01 SP2/Build 7.1.524.2 软件对检测结果进行定性和定量分析。采用 Excel 2019 进行数据统计和图表制作。

## 2 结果与分析

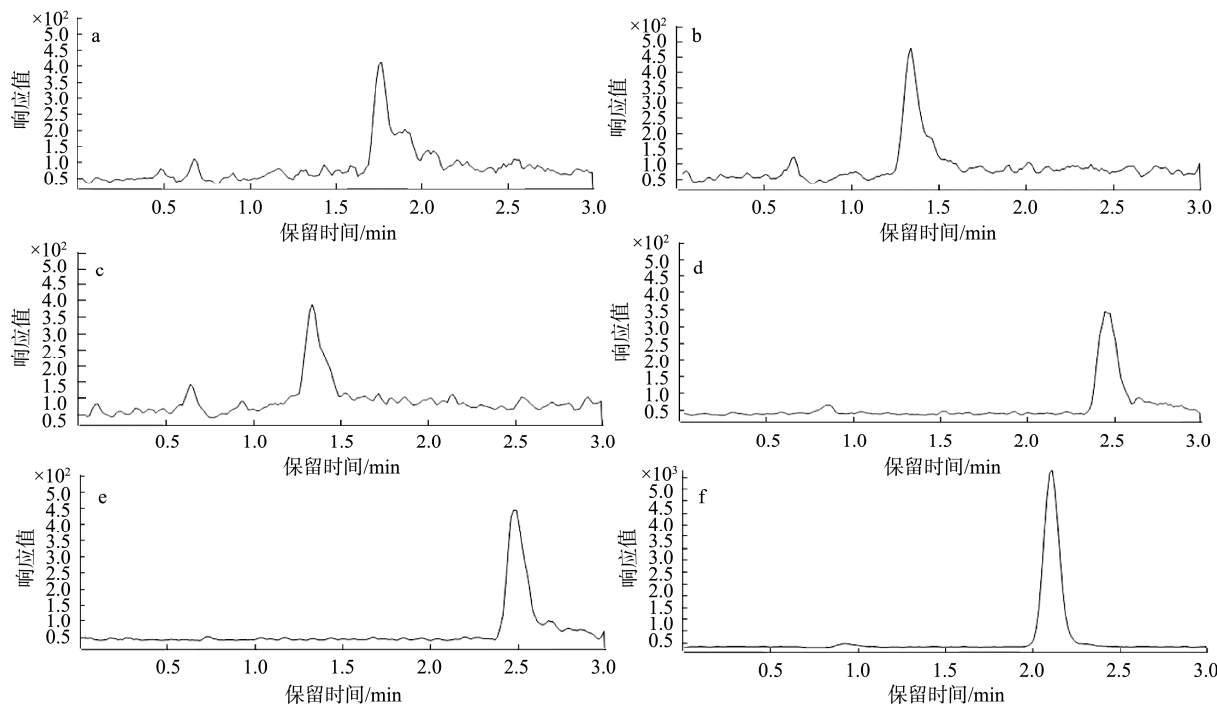
### 2.1 UPLC-MS/MS 条件优化

#### 2.1.1 色谱条件的优化

本研究考察乙腈和甲醇有机体系与含 0.1%甲酸水溶液、5 mmol/L 乙酸铵溶液以及纯水水相体系, 在 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱上, 对苯巴比妥色谱峰峰形及响应强度的影响, 如图 1 所示。使用乙腈为有机流动相时(图 1a~c), 基线噪声大, 苯巴比妥过早出峰且峰形差。使用甲醇为有机流动相时(图 1d~f), 基线噪声较小, 以甲醇-水为流动相体系时苯巴比妥响应值最高(图 1f), 峰形对称, 因此选用甲醇-水作为苯巴比妥检测的流动相体系。

表 2 质谱分析参数  
Table 2 Mass spectrometry analysis parameters

化合物	母离子( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> )	驻留时间/ms	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
苯巴比妥	231.0	85.0	150	70	10
		42.1	150	70	22
		188.1	150	70	8



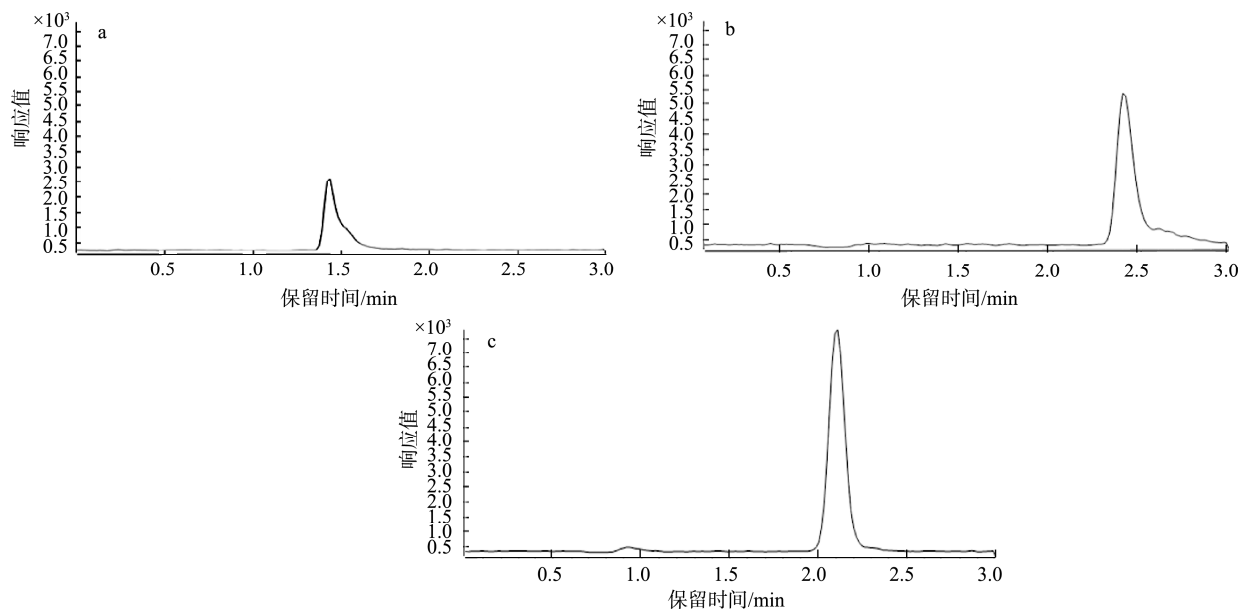
注: a 为乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液体系; b 为乙腈-0.1%甲酸水体系; c 为乙腈-水体系; d 为甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液体系; e 为甲醇-0.1%甲酸水体系; f 为甲醇-水体系。

图 1 不同流动相体系对苯巴比妥峰形的影响(10 μg/L)

Fig.1 Effects of different mobile phase systems on phenobarbital peak shape (10 μg/L)

考察 3 款常用色谱柱分别是 Agilent Hilic Plus (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Agilent SB-Aq (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 和 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)对苯巴比妥(10 μg/L)的分离效果。如图 2 所示, 苯巴比妥在 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱上得到较

好的分离, 峰形对称, 其他两款色谱柱色谱峰拖尾现象明显。因此选用 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱进行检测分析。此外, 苯巴比妥在 30°C柱温时响应强度优于 35°C, 故选择色谱柱柱温 30°C进行测定。



注: a 为 Agilent Hilic Plus (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱; b 为 Agilent SB-Aq (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱; c 为 Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub> (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)色谱柱。

图 2 不同色谱柱对苯巴比妥分离效果的影响(10 μg/L)

Fig.2 Effects of different chromatographic columns on the separation of phenobarbital (10 μg/L)

### 2.1.2 质谱条件的优化

以甲醇-水为流动相体系,使用两通连接质谱,在电喷雾负离子监测模式下对苯巴比妥标准溶液(10  $\mu\text{g/L}$ )进行一级质谱扫描,得到母离子为 231.0;然后对母离子进行二级质谱扫描,通过优化碰撞能量获得丰度比较高的子离子 42.1、188.1 和 85.0,对锥孔电压和驻留时间等质谱参数进行优化,质谱分析参数如表 2 所示。选取 231.0/42.1 ( $m/z$ )作为苯巴比妥定量离子对,231.0/188.1 ( $m/z$ )和 231.0/85.0 ( $m/z$ )作为定性离子对;同时采用多反应监测模式进行高灵敏度定性定量分析。

## 2.2 QuEChERS 样品前处理优化

本研究选择市场常见易购且食用率高的鲜活水产品草鱼和南美白对虾作为代表样品,对提取溶剂、提取方式及净化剂的配比和用量进行优化。

### 2.2.1 提取溶剂确定

苯巴比妥分子中包含苯环,中等极性,常用提取溶剂有甲醇<sup>[24-25]</sup>、乙腈<sup>[5]</sup>和乙酸乙酯<sup>[6]</sup>。按 1.3.4 方法,苯巴比妥以 10  $\mu\text{g/kg}$  添加至阴性草鱼和南美白对虾中,进行样品加标回收实验,考察乙酸乙酯、乙腈、0.1%甲酸乙腈和甲醇对水产品中苯巴比妥的提取效果。研究表明,甲醇的提取液混浊,回收率最低(图 3a)。这可能是甲醇沉淀蛋白质效果较差,有较多的干扰物质被同时提取出来<sup>[26]</sup>。相比乙酸乙酯,使用乙腈提取时,两种基质中苯巴比妥回收率较高,分别为 86.0%和 75.4%。乙腈穿透力强,对水产品中脂肪等非极性成分提取能力弱并可沉淀蛋白,样品提取液中蛋白质含量更少。有研究<sup>[27-28]</sup>表明使用酸化乙腈可提高目标物回收率,但本研究中 0.1%甲酸乙腈提取草鱼和南美白对虾效果不及乙腈,其原因可能是酸化乙腈在提取水产品尤其是南美白对虾中苯巴比妥时溶解出较多物质(色谱图中杂质峰多),干扰大,从而影响提取效率。因此选择乙腈作为样品提取溶剂。

### 2.2.2 提取方式确定

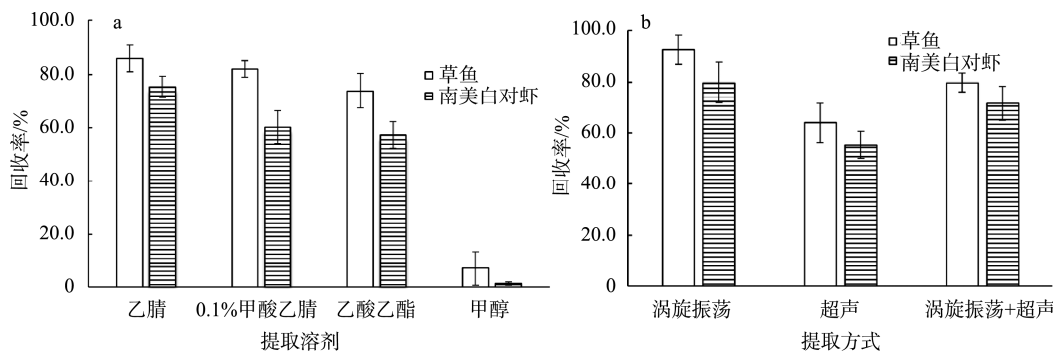
按 1.3.4 方法,苯巴比妥以 10  $\mu\text{g/kg}$  添加至阴性草鱼和南美白对虾中,进行样品加标回收实验,考察涡旋振荡 5 min、超声提取 5 min 及先涡旋振荡 2.5 min 再超声 2.5 min

的提取效果。如图 3b 所示,样品提取方式以涡旋振荡 5 min 样品的回收率最高。样品提取过程中发现超声易使鱼肉和虾肉结团,虾肉更为明显,而涡旋振荡有助于样品更好地分散在提取溶剂中,增大接触面积,回收率更高。因此选用涡旋振荡作为样品提取方式。

### 2.2.3 净化剂的确定

水产品基质复杂,含大量脂溶性杂质,检测过程虽使用已优化的提取溶剂乙腈,但不可避免地提取出其中极性较大的杂质。为减少杂质对样品检测的干扰和仪器的污染,确保方法准确性和提高灵敏度,本研究对样品提取液进行净化。QuEChERS 前处理方法应用于水产品基质净化效果良好,有利于痕量残留药物的检测<sup>[29-30]</sup>。常用的净化剂  $\text{C}_{18}$  对油脂和一些非极性基质成分去除效果较好,PSA 能吸附水产品如鱼肉中极性化合物和有机酸等<sup>[31-32]</sup>, $\text{MgSO}_4$  可以有效吸附样品中的水分,GCB 可去除样品提取液中色素成分,但在水产品中较少使用<sup>[33]</sup>。

按 1.3.4 方法,苯巴比妥以 10  $\mu\text{g/kg}$  添加至阴性草鱼和南美白对虾中,进行样品加标回收实验,以苯巴比妥回收率来确定净化剂的组合和比例。净化效果如图 4 所示,PSA、GCB 和  $\text{C}_{18}$  分别两两复配可以有效的净化样品中的杂质,但南美白对虾基质中苯巴比妥的回收率偏低,通过多种净化剂复配同时降低各种吸附剂的使用量,以 8.0 mL 样品提取液中添加 0.1 g PSA+0.1 g  $\text{C}_{18}$ +0.1 g GCB+0.3 g  $\text{MgSO}_4$  组合的净化效果最佳,如图 4 所示,图谱基线平整,杂质峰少,且苯巴比妥响应强度最高,草鱼和南美白对虾中苯巴比妥回收率分别为 92.6%和 75.4%,相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)不大于 6.1%(表 3),可满足检测需要。结合 0.1 g GCB 的使用可有效去除鱼及虾样品提取液中的杂质,吸附尤其是南美白对虾提取液中的色素,且不影响苯巴比妥的回收率,这与赵瑛博等<sup>[11]</sup>的研究相似,但本研究中 GCB 使用量更少。GCB 使用量增大时对目标检测物有一定的吸附,如表 3 所示,苯巴比妥回收率下降。因此选用 0.1 g PSA+0.1 g  $\text{C}_{18}$ +0.1 g GCB+0.3 g  $\text{MgSO}_4$  组合作为样品净化剂。



注: a 为提取溶剂; b 为提取方式。

图 3 提取溶剂和提取方式对苯巴比妥回收率的影响( $n=3$ )

Fig.3 Effects of extraction solvents and extraction methods on the recoveries of phenobarbital ( $n=3$ )

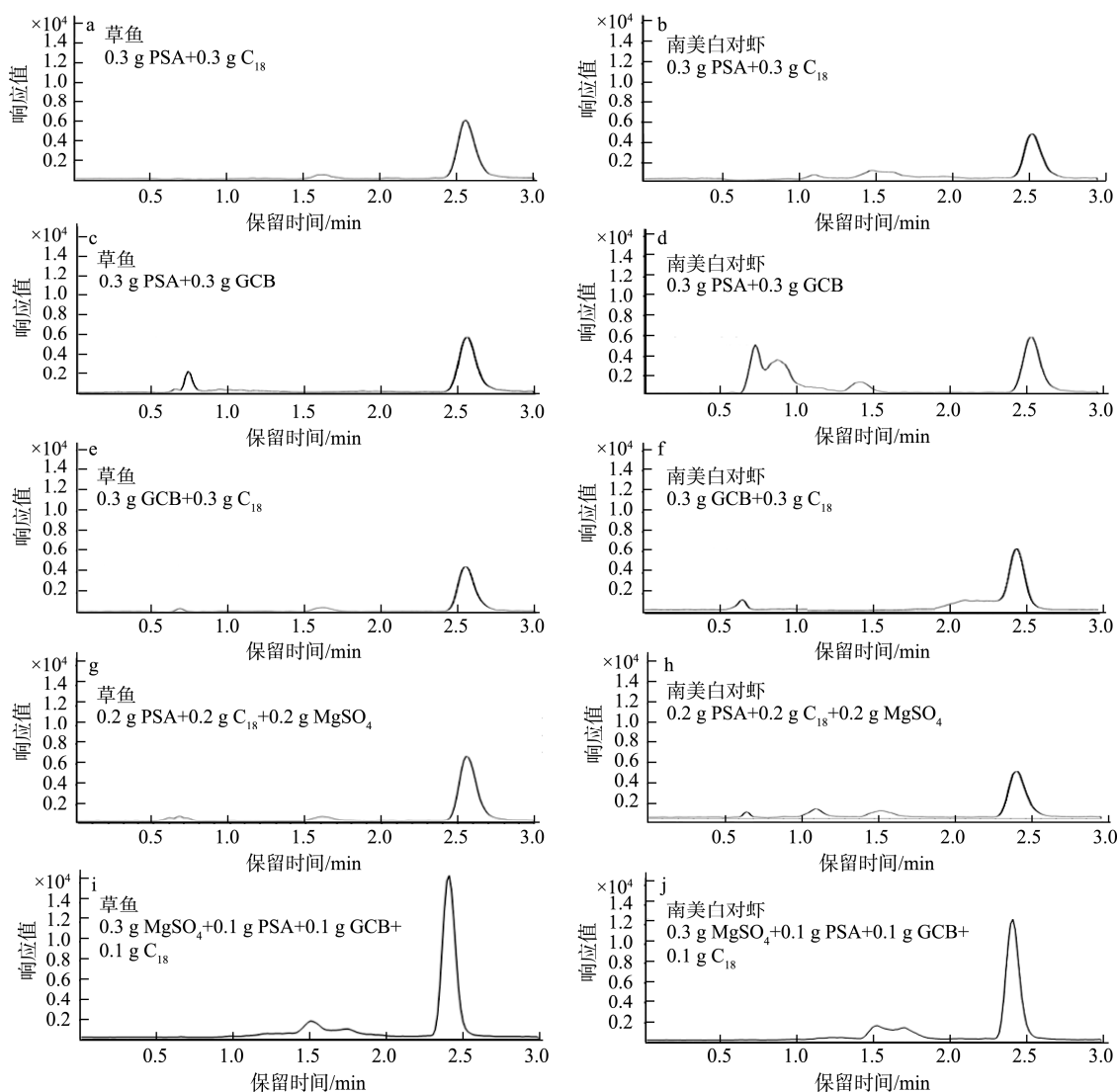


图 4 不同净化剂组合的基质清除效果

Fig.4 Matrix scavenging effects of different purifier combinations

表 3 不同净化剂组合的回收率(n=3)  
Table 3 Recoveries of different purified packing combinations (n=3)

组合配比	草鱼		南美白对虾	
	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
0.3 g PSA+0.3 g C <sub>18</sub>	80.3	8.0	60.8	4.6
0.3 g PSA+0.3 g GCB	80.6	4.5	53.7	15.1
0.3 g C <sub>18</sub> +0.3 g GCB	59.2	3.6	54.8	10.1
0.2 g PSA+0.2 g C <sub>18</sub> +0.2 g MgSO <sub>4</sub>	85.4	8.3	75.2	5.0
0.1 g PSA+0.1 g C <sub>18</sub> +0.1 g GCB+0.3 g MgSO <sub>4</sub>	92.6	6.1	75.4	5.2

### 2.3 基质效应

基质效应(matrix effect, ME)普遍存在于样品检测过程中<sup>[34]</sup>, 对检测结果有一定影响。本研究通过基质匹配标

准工作曲线的斜率( $M_{matrix}$ )和流动相为溶剂的标准工作曲线斜率( $M_{solvent}$ )来计算基质效应[公式(1)]。ME 是正值为基质增强效应; ME 是负值为基质抑制效应。当 ME 绝对值大于 20%, 需要减弱或消除基质效应。当 ME 的绝对值为 0~20%时为弱基质效应, 可忽略<sup>[35]</sup>。

$$ME/\% = \left( \frac{M_{matrix}}{M_{solvent}} - 1 \right) \times 100\% \quad (1)$$

选取草鱼、鲈鱼、罗非鱼和南美白对虾 4 种常见鲜活水产品, 按照 1.3.4 方法制备空白基质溶液, 分别配制质量浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0  $\mu\text{g/L}$  的苯巴比妥基质匹配标准溶液。同时以流动相为溶剂配制相同质量浓度的标准溶液系列。按照 1.3.2 和 1.3.3 方法进行检测并绘制标准曲线。如表 4 所示, QuEChERS 样品前处理使样品基质得到有效净化, 4 种水产品的 ME 绝对值在 11.15%~16.19%之间, 表现为可忽略的弱基质效应。

表 4 4 种水产品基质中苯巴比妥的线性关系和基质效应  
Table 4 Linear relations and matrix effects of phenobarbital in 4 kinds of aquatic products

基质	线性方程	$r^2$	ME/%
流动相	$Y=3900.34X-600.99$	0.9999	—
草鱼	$Y=3463.63X-433.42$	0.9992	-11.20
罗非鱼	$Y=3411.29X-1408.76$	0.9991	-12.54
鲈鱼	$Y=3465.49X+555.49$	0.9998	-11.15
南美白对虾	$Y=3268.77X+1204.19$	0.9997	-16.19

注: —表示未检出。

## 2.4 方法学验证

### 2.4.1 线性范围和检出限

按 1.3.1 配制苯巴比妥系列标准工作溶液进行检测, 在 1.3.2 和 1.3.3 的条件下, 以苯巴比妥的质量浓度为横坐标 ( $X$ ,  $\mu\text{g/L}$ ), 以目标峰响应值为纵坐标 ( $Y$ ), 建立线性关系。结果表明, 苯巴比妥在 0.5~100.0  $\mu\text{g/L}$  的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数( $r^2$ )为 0.9999, 线性方程为  $Y=3900.34X-600.99$ 。以 3 倍信噪比( $S/N$ )确定检出限, 以 10 倍信噪比确定定量限, 苯巴比妥检出限为 0.5  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 1.5  $\mu\text{g/kg}$ , 说明该方法具有良好的灵敏度。

### 2.4.2 准确度和精密度

选取草鱼、鲈鱼、罗非鱼和南美白对虾进行样品添加回收实验, 分别添加 2.0、5.0、25.0  $\mu\text{g/kg}$  3 种不同浓度苯巴比妥标准溶液, 每个水平进行 6 次平行实验, 以回收率评价方法的准确性, 以 RSDs 评价方法精密度。如表 5 所示, 苯巴比妥的平均回收率在 72.1%~96.7%之间, RSDs 在 1.2%~12.3%之间。所建立的方法准确性和精密度良好, 可用于实际样品检测。

表 5 苯巴比妥的回收率和相对标准偏差( $n=6$ )  
Table 5 Recoveries and the RSDs of phenobarbital ( $n=6$ )

样品	加标浓度 /( $\mu\text{g/kg}$ )	检测值 /( $\mu\text{g/kg}$ )	回收率 /%	RSDs /%
草鱼	2.0	1.93±0.08	96.7	4.2
	5.0	4.35±0.53	87.0	12.3
	25.0	20.29±0.67	81.2	3.3
鲈鱼	2.0	1.65±0.09	82.7	5.5
	5.0	3.61±0.21	72.1	5.7
	25.0	19.19±0.24	76.8	1.2
罗非鱼	2.0	1.62±0.12	80.9	7.5
	5.0	3.83±0.26	76.6	6.8
	25.0	18.55±0.58	74.2	3.2
南美白对虾	2.0	1.52±0.07	76.1	4.3
	5.0	3.79±0.13	75.9	3.6
	25.0	20.33±0.77	81.3	3.8

## 2.5 实际样品检测

采用所建立的方法, 对本地购买的鲜活水产品, 分别是草鱼 4 批、罗非鱼 4 批、鲈鱼 4 批和南美白对虾 3 批进行分析, 均未检出苯巴比妥。

## 3 结论

本研究建立了 QuEChERS-UPLC-MS/MS 快速测定水产品鱼和虾中苯巴比妥残留的检测方法。首次将 QuEChERS 净化技术应用于鱼和虾中苯巴比妥残留的分析, 优化 PSA、 $C_{18}$ 、GCB 和  $MgSO_4$  使用量及比例, 较已有<sup>[36-38]</sup>研究, 节约了水产品前处理中净化剂使用量(2.0 g 样品仅使用 0.60 g 混合净化剂), 最大限度去除鱼及虾中脂肪和色素的干扰, 基质净化效果明显, 表现为可忽略的弱基质效应。与戴晓欣等<sup>[6]</sup>的净化方式相比, 基于 QuEChERS 净化过程只需涡旋振荡 5 min, 免去了正己烷脱脂及过柱步骤, 大大减少了样品前处理时间。相比较已有气相色谱-质谱法测定猪肉中苯巴比妥残留的研究<sup>[11]</sup>, 本方法净化剂使用量更少, 检出限更低(0.5  $\mu\text{g/kg}$ ), 适用于批量水产品中苯巴比妥残留的快速检测, 能满足苯巴比妥残留风险监控的需求。

## 参考文献

- 温从丛, 马建设, 张美玲, 等. UPLC-MS/MS 同时检测胃内容物中 4 种巴比妥类药物[J]. 海峡药学, 2021, 33(7): 73-77.  
WENG CC, MA JS, ZHNAG ML, *et al.* Simultaneous determination of four barbiturates in gastric contents by UPLC-MS/MS [J]. Strait Pharm, 2021, 33(7): 73-77.
- 陈鹏, 范兴刚, 张庭芳. 中枢抑制药物苯巴比妥对鱼苗运输成活率的影响试验[J]. 贵州畜牧兽医, 2012, 36(6): 66-68.  
CNEN P, FAN XG, ZHANG TF. Detection of the effect of phenobarbital on the survival rate of fish seedlings in transportation [J]. Guizhou J Anim Vet Med, 2012, 36(6): 66-68.
- 张海棠, 王自良, 王艳荣. 苯巴比妥在动物生产中的非法使用及毒性作用[J]. 山西农业科学, 2008, 36(4): 29-31.  
ZHANG HT, WANG ZL, WANG YR. Illegal use and safety evaluation of phenobarbital in animal production [J]. J Shanxi Agric Sci, 2008, 36(4): 29-31.
- 李会荣, 李桂华, 刘华阳, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中 4 种巴比妥类药物的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2010, 46(13): 75-80.  
LI HR, LI GH, LIU HY, *et al.* Determination of four barbiturates in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anim Sci, 2010, 46(13): 75-80.
- 原中华人民共和国农业部第 176 号公告. 禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录[EB/OL]. [2002-02-09]. [http://www.moa.gov.cn/ztzl/nepzxxz/flfg/200709/t20070919\\_893060.htm](http://www.moa.gov.cn/ztzl/nepzxxz/flfg/200709/t20070919_893060.htm) [2022-06-01].  
Announcement NO. 176 of the former Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Catalogue of drugs prohibited to be used in feed and animal drinking water [EB/OL]. [2002-02-09]. [http://www.moa.gov.cn/ztzl/nepzxxz/flfg/200709/t20070919\\_893060.htm](http://www.moa.gov.cn/ztzl/nepzxxz/flfg/200709/t20070919_893060.htm) [2022-06-01].
- 戴晓欣, 朱新平, 吴仕辉, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定水产品

- 中的苯巴比妥[J]. 食品科学, 2012, 33(18): 232–235.
- DAI XX, ZHU XP, WU SH, *et al.* Determination of phenobarbital residues in fishery products by SPE-HPLC [J]. Food Sci, 2012, 33(18): 232–235.
- [7] SERRALHEIRO A, ALVES G, FORTUNA A, *et al.* First HPLC-UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10, 11-epoxide, 10, 11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma [J]. J Chromatogr B, 2013, 925: 1–9.
- [8] 林芳, 李涛, 李继, 等. UPLC-DAD 法快速测定改善睡眠类保健食品中违法添加的 14 种精神药物[J]. 食品科学, 2013, 34(22): 218–223.
- LIN F, LI T, LI J, *et al.* Rapid determination of 14 psychoactive drugs in sleep-improving health-care foods by ultra performance liquid chromatography photodiode array detection [J]. Food Sci, 2013, 34(22): 218–223.
- [9] 鲁静, 陈天朝. 超高效液相色谱法测定血清中苯妥英钠、苯巴比妥和马西平的浓度[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(2): 119–121.
- LU J, CHEN TC. Determination of phenytoin sodium, phenobarbital and carbamazepine in human serum by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2015, 31(2): 119–121.
- [10] TIAN HX, ZHOU XX, CHEN C, *et al.* Simultaneous determination of phenobarbital, pentobarbital, amobarbital and secobarbital in raw milk via liquid chromatography with electron spray ionization tandem mass spectrometry [J]. Korean J Food Sci Anim Resour, 2017, 37(6): 847–854.
- [11] 赵瑛博, 关丽, 周艳明. QuEChERS 结合气质联用法测定猪肉中苯巴比妥残留量[J]. 现代食品科技, 2015, 31(8): 329–333.
- ZHAO YB, GUAN L, ZHOU YM. Detecting phenobarbital residue in pork via the combination of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with quick-easy-cheap-effective-rugged-and-safe (QuEChERS) [J]. Mod Food Sci Technol, 2015, 31(8): 329–333.
- [12] 谢华, 贾正平, 王荣, 等. 高效毛细管电泳法测定苯巴比妥片中苯巴比妥的含量[J]. 医药导报, 2008, 27(12): 1500–1501.
- XIE H, JIA ZP, WANG R, *et al.* Determination the concentration of phenobarbital in phenobarbital tables by HPCE [J]. Her Med, 2008, 27(12): 1500–1501.
- [13] 程定玺, 杨璐, 梁宇. 荧光探针法快速检测苯巴比妥含量[J]. 分析试验室, 2012, 31(12): 32–35.
- CHENG DX, YANG L, LIANG Y. Rapid determination of phenobarbital content by fluorescent probe [J]. Chin J Anal Lab, 2012, 31(12): 32–35.
- [14] 王江录. 食品中苯巴比妥快速检测方法的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
- WANG JL. The development of rapid detection of the method for phenobarbital in food [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.
- [15] 黄佳佳, 李燕杰, 梁志理, 等. 胶体金免疫层析法定量检测鱼和虾中苯巴比妥残留[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 313–320.
- HUANG JJ, LI YJ, LIANG ZL, *et al.* Development of a colloidal gold immunochromatographic assay for the quantitative determination of phenobarbital residues in fish and shrimp [J]. Mod Food Sci Technol, 2020, 36(7): 313–320.
- [16] SHIN D, KANG HS, JEONG J, *et al.* Multi-residue determination of veterinary drugs in fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Anal Methods, 2018, 11(6): 1815–1831.
- [17] BARBIERI MV, POSTIGO C, GUILLEM-ARGILES N, *et al.* Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination [J]. Sci Total Environ, 2019, 653: 958–967.
- [18] GAO L, WANG P, CHEN Z, *et al.* Multi-pharmaceuticals analysis in fish by continuous series solid-phase extraction coupled with UPLC-MS/MS [J]. Acta Chromatogr, 2021, 34(1): 61–70.
- [19] 王兴益, 陈彦龙, 肖小华, 等. 水产品中有害物质分析样品前处理技术研究进展[J]. 色谱, 2021, 39(1): 34–45.
- WANG XY, CHEN YL, XIAO XH, *et al.* Recent advances in sample preparation technologies for analysis of harmful substances in aquatic products [J]. Chin J Chromatogr, 2021, 39(1): 34–45.
- [20] 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.
- [21] BAESU A, BALLASH G, MOLLENKOPF D, *et al.* Suspect screening of pharmaceuticals in fish livers based on QuEChERS extraction coupled with high resolution mass spectrometry [J]. Sci Total Environ, 2021, 783(2/3): 146902.
- [22] RACOVITA RC, SECUIANU C, ISRAEL-ROMING F. Quantification and risk assessment of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in retail smoked fish and smoked cheeses [J]. Food Control, 2021, 121: 107586.
- [23] GRANDE-MARTINEZ A, MORENO-GONZALEZ D, ARREBOLA-LIEBANAS FJ, *et al.* Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS [J]. J Pharmaceut Biomed, 2018, 155: 27–32.
- [24] 曲建国, 徐秋阳. HPLC 法测定镇静催眠类中成药中非法添加化学药物成分[J]. 中国药师, 2010, 13(12): 1694–1696.
- QU JG, XU QY. Determination of chemical components illegally mixed in hypnagogic traditional Chinese medicine by HPLC [J]. Chin Pharm, 2010, 13(12): 1694–1696.
- [25] 焦建东, 李俊卿, 王金凤, 等. 离子迁移谱快速检测改善睡眠类保健品中非法添加的巴比妥类药物[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 321–329.
- JIAO JD, LI JQ, WANG JF, *et al.* Rapid detection of illegally added barbiturates in sleep-improving healthy foods by ion mobility spectrometry [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(2): 321–329.
- [26] 温海滨, 林洁纯, 叶靖怡, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(18): 7214–7221.
- WEN HB, LIN JC, YE JY, *et al.* Simultaneous determination of 20 kinds of benzimidazoles and their metabolites residues in aquatic products by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(18): 7214–7221.
- [27] 马丽莎, 谢文平, 尹怡, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定稻田水产品中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 308–314.
- MA LS, XIE WP, YIN Y, *et al.* Determination of fipronil and its metabolites in aquatic products from paddy field by QuEChERS combined with high-performance liquid chromatography-tandem mass [J]. Food Sci, 2021, 42(14): 308–314.
- [28] 陈秋华, 张天闻, 傅红, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法快速筛查水产品中 16 种激素残留[J]. 食品科学, 2018, 39(20): 337–343.
- CHEN QH, ZHANG TW, FU H, *et al.* Rapid screening of 16 hormone residues in aquatic products by ultra-performance liquid chromatography



- coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2018, 39(20): 337–343.
- [29] GU C, CHENG Y, ZHEN X, *et al.* Determination of progesterin residues in fish by UPLC-Q-TOF/MS coupled with QuEChERS [J]. *J Anal Methods Chem*, 2019, 2019(1): 1–6.
- [30] SHIN D, KIM J, KANG HS, *et al.* Multi-residue determination of pesticides in farmed aquatic animal products using gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Korean J Pestic Sci*, 2020, 24(4): 321–333.
- [31] ZHENG W, PARK JA, ZHANG D, *et al.* Determination of fenobucarb residues in animal and aquatic food products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a QuEChERS extraction method [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1058: 1–7.
- [32] 吴丽姣, 王琼妹. QuEChERS-气相色谱-串联质谱法测定海南淡水鱼中有机氯农药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(22): 8312–8317.
- WU LJ, WANG QM. Determination of organochlorine pesticide residues in Hainan freshwater fishes by QuEChERS combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(22): 8312–8317.
- [33] 李丽春, 刘书贵, 尹怡, 等. QuEChERS结合UPLC-MS/MS测定水产品中9种除草剂残留及基质效应[J]. *食品科学*, 2020, 41(18): 258–266.
- LI LC, LIU SG, YIN Y, *et al.* Determination of nine herbicide residues in aquatic products using QuEChERS combined with UPLC-MS/MS and evaluation of matrix effects [J]. *Food Sci*, 2020, 41(18): 258–266.
- [34] 吴少明, 蔡小明, 周鹏, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中6种丁香酚类物质的残留量[J]. *食品科学*, 2020, 41(16): 320–326.
- WU SM, CAI XM, ZHOU P, *et al.* Determination of 6 eugenol residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2020, 41(16): 320–326.
- [35] 何旭峰, 黄小兰, 肖琦, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中5种双酰胺类杀虫剂的残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20): 7977–7985.
- HE XF, HUANG XL, XIAO Q, *et al.* Simultaneous determination of 5 kinds of bisamide insecticides residues in animal-derived foods by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(20): 7977–7985.
- [36] ZHANG C, WANG Z, LIU S, *et al.* Analytical method for sequential determination of persistent herbicides and their metabolites in fish tissues by UPLC-MS/MS [J]. *Chemosphere*, 2022, 288: 132591.
- [37] CHIANG CF, LIAO PL, HSU KC, *et al.* Establishment of optimal QuEChERS conditions of various food matrices for rapid measurement of heterocyclic amines in various foods [J]. *Food Chem*, 2022: 132184.
- [38] SAMBOLINO A, ORTEGA-ZAMORA C, GONAZALEZ-SALAMO J, *et al.* Determination of phthalic acid esters and di (2-ethylhexyl) adipate in fish and squid using the ammonium formate version of the QuEChERS method combined with gas chromatography mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2022, 380: 132174.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

### 作者简介



黄佳佳, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 313370106@qq.com



徐振林, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: jallent@163.com