

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鱼和虾样品中 200 种药物残留

于慧娟¹, 汪洋^{1,2}, 孔聪¹, 娄晓祎¹, 韩峰¹, 王媛¹, 汤云瑜¹

(1. 东海水产研究所, 农业部水产品风险评估实验室(上海), 上海 200090;

2. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306)

摘要:建立了超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法,快速筛查鱼和虾样品中 200 种药物残留。取均质后的鱼或虾样品,加入适量 0.1 mol/L EDTA-Na₂ 溶液,分别用乙腈和乙酸乙酯超声提取,经 Oasis PRiME HLB 通过式固相萃取柱净化,以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-乙腈溶液为流动相, Thermo AccucoreQ 色谱柱(100 mm×2.1 mm×2.6 μm)分离;采用 Full MS/dd-MS² 模式采集数据,利用自建的包含化合物保留时间、母离子和子离子质荷比等信息的数据库定性,一级质谱全扫描母离子定量。结果表明,本方法的检出限为 1~50 μg/kg,在不同的加标水平下,200 种药物的加标回收率为 30%~120%,精密密度为 5%~30%,其中,精密密度在 5%~15%、15%~20% 和 20%~30% 的比例分别为 70%、10% 和 20%,且精密密度 20%~30% 主要分布于低加标水平样品。利用本方法对 48 个鱼和虾实际样品进行筛查,共定性确定 9 种药物,分别是乙氧喹啉、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、甲氧苄啶、磺胺二甲基嘧啶、敌百虫和依维菌素。该方法前处理简单、可同时测定多种药物、检测效率高、筛查定性准确度高。

关键词:鱼;虾;超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱;药物残留;筛查

中图分类号:O657.63

文献标志码:A

文章编号:1004-2997(2019)02-0097-12

doi:10.7538/zpxb.2017.0182

Rapid Screening of 200 Drug Residues in Fish and Shrimp by UPLC-Quadrupole/Exactive Orbitrap Mass Spectrometry

YU Hui-juan¹, WANG Yang^{1,2}, KONG Cong¹, LOU Xiao-yi¹,

HAN Feng¹, WANG Yuan¹, TANG Yun-yu¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Laboratory of Risk Assessment

in Aquatic products of Ministry of Agriculture(Shanghai), Shanghai 200090, China;

2. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To monitor the safety of foods in terms of the restricted or banned compounds, it is especially preferable to develop generic methods which are capable of detecting as many different classes of concerned compounds as possible, with reliable confirm

收稿日期:2017-11-29;修回日期:2018-04-18

基金项目:上海市农业委员会项目(农沪科推字(2016)第 1-4-1 号)资助

作者简介:于慧娟(1960—),女(汉族),吉林人,研究员,从事水产品质量安全管理与检测。E-mail: xdyh-7@163.com

网络出版时间:2018-07-30;网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20180727.1642.008.html

ability, satisfied sensitivity, good time-efficiency and high throughput. In this work, a method of ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)-quadrupole/exactive orbitrap mass spectrometry was developed for the rapid screening and semi-quantification of 200 drug residues in fish and shrimp. The sample was firstly added with 0.1 mol/L EDTA- Na_2 , extracted with acetonitrile and ethyl acetate, cleaned-up by solid-phase extraction using Oasis PRiME HLB column. Then, the target compounds were separated on Thermo AccucoreAQ column (100 mm \times 2.1 mm \times 2.6 μm) with a mobile phase consisting of 0.1% formic acid and 0.1% formic acid-acetonitrile. The mass spectrometry data were acquired under Full MS/dd- MS^2 mode. Self-built database screening containing retention time, precursor ion and product ions were performed for qualification. The m/z of precursor ion, retention time (t_R) and fragment ions (FI) were acquired through analysis, while the isotope pattern for precursor was automatically calculated by TraceFinder software. And then, a database containing m/z of precursor ion, t_R , m/z of FI and isotope pattern were built in TraceFinder. Screening of all the analytes were performed by TraceFinder with the self-built database. The rules of screening were established as follow: allowed m/z deviation of precursor ion was 3×10^{-6} , allowed t_R deviation was ± 15 s, at least one fragment ion match with allowed m/z deviation at 2×10^{-5} , and the fit threshold for precursor isotope pattern was 75% with allowed mass deviation at 10^{-5} , and allowed intensity deviation less than 25%. The full scan MS data was used for quantification, and the limits of detection was 1-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average spiked recoveries of 200 target compounds were 30%-120% with the relative standard derivations of 5%-30%, 70% of which were 5%-15%, and the higher relative standard deviations of 20%-30% were from samples with low spiked concentration. The developed method was successfully applied to the simultaneous determination of 200 drugs residues in fish and shrimp. The practical application showed that 9 compounds including ethoxyquin, enrofloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, trimethoprim, sulfamethazine, dipterex, ivermectin were identified in 48 actual fish and shrimp samples. As a qualitative and semi-quantitative screening method, the features of simple pretreatment, simultaneous multiresidue detection, high efficiency and accuracy are demonstrated.

Key words: fish; shrimp; ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/exactive Orbitrap mass spectrometry; drugresidues; screening

水产品中的药物残留主要来源于养殖过程中渔药和饲料的使用。目前,存在向渔药和饲料中非法添加药物的现象,质量良莠不齐^[1-3]。将质量不合格的渔药、饲料用于水产动物养殖过程,会导致水产品中的药物残留呈现杂乱未知状态,难以预测其中的安全隐患。因此,建立高效可靠的水产品中多种药物同时快速筛查的方法,对水产品中药物残留风险监测和隐患排查具有十分重要的意义。

目前,食品中药物残留的检测方法主要为

液相色谱-三重四极杆串联质谱法^[4-6],并通过多反应监测模式或选择反应监测模式实现多种化合物的同时定性与定量^[7-8]。由于三重四极杆质谱仪的分辨率和质量精度较低,该方法局限于检测结构类似的同族化合物或少数其他几类化合物^[9-10]。

随着兽药的商业化,越来越多的化合物种类需要监测^[11]。高分辨质谱凭借高分辨率 and 高质量精度为多残留检测提供了新的手段,例如飞行时间质谱^[12-14]和静电场轨道阱质

谱^[15-21],这些技术不仅能同时分析上百种化合物,还可以进行非目标物的筛查。采用液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查水产品中药物残留是近几年新兴的一种检测手段,相关研究报道较少。杨璐齐等^[20]和 Sherri 等^[21]运用此技术分别同时检测了水产品中33种、260种药物,虽然 Sherri 等测定了260种药物,但经实际样品验证的药物仅为70多种。

本研究拟建立超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱法,通过优化分析条件,开发快速、高通量的样品前处理方法,实现水产品中200种药物残留的同时快速检测,并通过建立化合物数据库对目标物进行定性。希望为快速了解水产品中药物残留状况、隐患因子排查提供有效的技术支持。

1 实验部分

1.1 主要仪器与装置

Ultimate 3000 超高效液相色谱-Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱联用系统:配有 TraceFinder 分析软件,美国 Thermo Fisher 公司产品;0.22 μm 尼龙水相针式滤膜:美国 Supelco 公司产品;涡旋搅拌器:德国 IKA 公司产品;16RXII 高速冷冻离心机:日本 HITACHI CF 公司产品;Milli-Q 超纯水机:美国 Millipore 公司产品;PL602-L 电子天平:瑞士 Mettler-Toledo 公司产品;BT 125D 精密天平:德国 Sartorius 公司产品;KQ-300E 超声波提取仪:昆山市超声仪器有限公司产品。

1.2 主要材料与试剂

200种风险排查标准品:均为德国 Dr. Ehrenstofer GmbH 公司产品;乙腈、甲醇、乙酸乙酯和甲酸:均为色谱纯,美国 J. T. Baker 公司产品;实验用水:由 Milli-Q 超纯水机制备;Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(200 mg/3 mL):美国 Waters 公司产品。

1.3 实验条件

1.3.1 样品制备 从农贸市场购买草鱼、鲫鱼、鳊鱼和南美白对虾等鲜活水产品。取鱼可食用部分,均质混匀;将虾去头、去壳,均质混匀;分别装入聚乙烯瓶中,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,测定前解冻,称样。

1.3.2 样品前处理 准确称取2.00 g样品于30 mL聚丙烯离心管中,加入200 μL 0.1 mol/L EDTA- Na_2 和10 mL乙腈,在高通量研磨仪中,以2000 r/min振荡30 s,超声10 min,涡旋2 min,于 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以10000 r/min离心10 min,取出上清液。向残渣中加入10 mL乙酸乙酯,按上述方法重复操作1次,合并2次上清液,于 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 减压蒸发至近干,用3 mL乙腈溶解,以6000 r/min离心10 min,得到待净化液。

将待净化液加入SPE固相萃取柱中,用1 mL乙腈淋洗,接收全部上样流出液至10 mL离心管中, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至近干,用1 mL含0.1%甲酸的乙腈-水溶液(40:60,V/V)复溶,于 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以10000 r/min离心10 min,取上清液,过0.22 μm 尼龙针式滤膜,待测。

1.3.3 色谱条件 色谱柱:Thermo Accuore aQ 柱(100 mm \times 2.1 mm \times 2.6 μm);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)和0.1%甲酸-乙腈溶液(B);梯度洗脱程序:0~1.0 min(100%A),1.0~18.0 min(100%~0%A),18.0~22.0 min(100%A);流速:0.3 mL/min;柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量:10 μL 。

1.3.4 质谱条件 静电场轨道阱质谱;可加热的电喷雾离子源(HESI-II);喷雾电压:3.2 kV(+),2.8 kV(-);鞘气:氮气,流速8 L/min;辅助气:氮气,流速10 L/min,温度 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$;吹扫气:氮气,流速1.5 L/min;离子传输管温度: $325\text{ }^{\circ}\text{C}$;质谱数据获取模式:一级母离子全扫描加数据依赖的二级子离子扫描模式(Full MS/dd-MS²);Full MS分辨率:70000;最大注入时间:100 ms;质量扫描范围: m/z 150~1000;二级质谱分辨率:17500;触发阈值: 2×10^5 ;最大注入时间80 ms。200种药物的质谱参数列于表1。

1.3.5 标准溶液的配制 准确称取适量的标准品,用甲醇配制成约500 mg/L的单标储备液,不溶药品加入1 mL甲酸或二甲亚砜溶解后,用甲醇定容,于 $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。将200种药物按性质分为18类,即苯并咪唑类、 β -受体激动剂类、 β -内酰胺类、氯霉素类、染料类、激素类、大环内酯类、硝基咪唑类、喹诺酮类、喹噁啉类、镇静剂类、磺胺类、三嗪类、四环素类、硝唑类、咪唑类农药、有机氯类农药和有机磷类农

表1 200种化合物的色谱、质谱信息和检出限

Table 1 Chromatographic and mass spectrometric parameters of 200 compounds

序号 No.	化合物 Compounds	保留时间 t_R /min	母离子/扫描模式 Precursor ions (m/z)/scan mode	子离子 Fragment ions (m/z)	检出限 LODs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	磺胺醋酰	4.35	215.04849(+)	173.03792;156.01138	50
2	甲硝唑	4.41	172.07167(+)	128.04545	5
3	特布他林	4.53	226.14377(+)	152.07061;125.05971	10
4	沙丁胺醇	4.55	240.15942(+)	148.07569;222.14886	10
5	齐帕特罗	4.55	262.15500(+)	244.14444;185.07143	10
6	西马特罗	4.57	220.14444(+)	160.08692;143.06037	10
7	罗硝唑	4.76	201.06183(+)	140.04545	10
8	地美硝唑	4.81	142.06110(+)	112.06311;95.06037	50
9	磺胺嘧啶	4.85	251.05972(+)	156.01138;108.04439	5
10	磺胺二甲异噻唑	4.92	279.09102(+)	156.01138;124.08692	5
11	呋喃它酮	4.94	325.11426(+)	100.07569;252.09788	5
12	西布特罗	5.08	234.16009(+)	160.08692;143.06037	1
13	多菌灵	5.10	192.07675(+)	160.05054;132.05562	1
14	非诺特罗	5.25	304.15433(+)	107.04914;135.08044	1
15	磺胺噻唑	5.25	256.02089(+)	156.01138;108.04439	1
16	磺胺吡啶	5.25	250.06447(+)	184.08692;156.01138	1
17	林可霉素	5.32	407.22103(+)	126.12773;359.21766	1
18	米诺环素	5.39	458.19218(+)	441.16563;352.11795	1
19	利托君	5.44	288.15942(+)	121.06479;270.14886	1
20	噻苯哒唑	5.44	202.04334(+)	175.03245;131.06037	1
21	吡哌酸	5.46	304.14042(+)	217.10839;189.0779	5
22	磺胺甲基噻唑	5.46	265.07537(+)	190.02809;156.01138	1
23	呋喃西林	5.60	199.04618(+)	182.01963;156.04037	5
24	氨苄西林	5.68	350.11690(+)	106.06513;160.04268	50
25	金刚烷胺	5.71	152.14338(+)	135.11683	1
26	甲氧西林	5.74	381.11148(+)	165.05462;222.07682	50
27	头孢氨苄	5.74	348.10125(+)	158.02702;68.04948	50
28	甲氧苄啶	5.77	291.14517(+)	275.11387;261.09822	1
29	卡巴氧	5.82	263.07748(+)	231.05127;147.05529	1
30	甲砒霉素	5.84	353.99752(-)	78.984830;119.04914	5
31	麻保沙星	5.85	363.14631(+)	320.10411;72.08078	1
32	磺胺二甲基噻唑	5.85	268.07504(+)	156.01138;108.04439	1
33	头孢噻肟	5.85	456.06422(+)	125.00422;167.02736	10
34	伊诺沙星	5.87	321.13575(+)	277.14592;257.13969	1
35	磺胺二甲基噻唑	5.90	279.09102(+)	156.01138;124.08692	1
36	土霉素	5.90	461.15546(+)	426.11834;337.07066	10
37	2-喹噁啉羧酸	5.93	175.05020(+)	131.06037;147.05529	10
38	氟罗沙星	6.04	370.13730(+)	326.14747;269.08962	1
39	诺氟沙星	6.04	320.14050(+)	276.15067;233.10847	1

续表 1

序号 No.	化合物 Compounds	保留时间 t_R /min	母离子/扫描模式 Precursor ions (m/z)/scan mode	子离子 Fragment ions (m/z)	检出限 LODs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
40	氧氟沙星	6.04	362.15106(+)	318.16123;261.10338	1
41	奥美普林	6.04	275.15025(+)	259.11895;123.06652	1
42	乙酰甲喹	6.04	219.07642(+)	143.06037;185.07094	1
43	克伦派罗	6.10	263.07125(+)	132.06820;245.06068	5
44	培氟沙星	6.10	334.15615(+)	290.16632;233.10847	1
45	氯丙那林	6.10	214.09932(+)	154.04180;196.08875	5
46	磺胺甲噁二唑	6.13	271.03179(+)	156.01138;108.04439	1
47	阿苯哒唑亚矾	6.15	282.09069(+)	208.01752;240.04374	1
48	环丙沙星	6.15	332.14050(+)	288.15067;245.10847	1
49	3-甲基喹噁啉-2-羧酸	6.15	189.06585(+)	145.07062;118.06513	10
50	磺胺对甲氧嘧啶	6.15	281.07029(+)	215.09274;156.01138	1
51	磺胺甲氧吡嗪	6.15	281.07029(+)	215.09274;156.01138	1
52	氮哌酮	6.18	328.18197(+)	165.07102;123.02407	1
52	莱克多巴胺	6.21	302.17507(+)	107.04914;164.10699	1
54	四环素	6.24	445.16054(+)	410.12343;154.04987	5
55	敌百虫	6.24	256.92985(+)	127.01547;220.95318	10
56	先锋霉素 V	6.29	455.03729(+)	323.05570;295.06032	10
57	洛美沙星	6.29	352.14672(+)	308.15690;265.1147	1
58	杀虫脒	6.29	197.08400(+)	117.05730;152.02615	1
59	丹诺沙星	6.29	358.15615(+)	314.16632;283.12412	1
60	呋喃唑酮	6.38	226.04585(+)	209.04311;122.0118	5
61	芞星青霉素	6.43	333.09035(+)	259.07133;118.06513	50
62	恩诺沙星	6.46	360.17180(+)	316.18197;245.10847	1
63	头孢呋辛	6.48	423.06161(-)	207.04003;284.06792	50
64	原黄素	6.49	210.10257(+)	193.07602;166.06513	1
65	奥比沙星	6.55	396.15295(+)	352.16312;295.10527	1
66	磺胺间甲氧嘧啶	6.64	281.07029(+)	215.09274;156.01138	1
67	妥洛特罗	6.67	228.11497(+)	154.04180;228.11497	1
68	天青 C	6.69	242.07464(+)	227.05117;200.04027	10
69	克伦特罗	6.69	277.08690(+)	203.01373;259.07633	1
70	去甲金霉素	6.72	465.10592(+)	448.07937;430.0688	10
71	氨苯砜	6.75	249.06922(+)	108.04439;156.01138	5
72	福莫特罗	6.81	345.18088(+)	121.06479;149.09609	1
73	羧基甲苯咪唑	6.93	298.11862(+)	266.09240;298.11862	1
74	沙拉沙星	6.95	386.13107(+)	342.14125;299.0995	1
75	双氟沙星	7.01	400.14672(+)	356.15689;299.09905	1
76	司帕沙星	7.01	393.17327(+)	349.18344;292.12559	1
77	米帕林二盐酸	7.07	400.21502(+)	142.15903;86.09643	1
78	地托咪定	7.10	187.12298(+)	81.04472	1
79	氨基甲苯咪唑	7.12	238.09749(+)	238.09749;105.03349	1

续表 1

序号 No.	化合物 Compounds	保留时间 t_R /min	母离子/扫描模式 Precursor ions (m/z)/scan mode	子离子 Fragment ions (m/z)	检出限 LODs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
80	阿苯哒唑酮	7.18	298.08560(+)	266.05939;298.08561	1
81	磺胺甲恶唑	7.18	254.05939(+)	156.01138;108.04439	1
82	氟苯尼考	7.22	355.99319(-)	119.04914;185.02669	10
83	磺胺乙氧吡嗪	7.23	295.08594(+)	156.01138;108.04439	1
84	奥芬哒唑	7.26	316.07504(+)	191.03254;284.04882	1
85	天青 A	7.32	256.09029(+)	241.06682;214.05592	1
86	脱氧卡巴氧	7.46	231.08765(+)	143.06037;199.06144	1
87	磺胺二甲基异恶唑	7.49	268.07504(+)	156.01138;113.07094	5
88	氯霉素	7.65	321.00505(-)	152.03422;121.02841	5
89	多西环素	7.69	445.16054(+)	428.13399;321.07575	10
90	恶唑酸	7.81	262.07100(+)	244.06043;234.03971	5
91	溴西洋	7.81	316.00800(+)	182.08385;209.09475	1
92	美西林	7.81	326.15329(+)	160.04268;167.11789	10
93	卡拉洛尔	7.84	299.17540(+)	116.10699;184.07569	1
94	头孢噻呋	7.89	524.03629(+)	125.00422;95.01276	5
95	磺胺苯酰	7.92	277.06414(+)	156.01138;108.04439	10
96	磺胺氯吡嗪	7.98	285.02075(+)	130.01616;108.04439	10
97	头孢噻吩	8.09	414.07880(+)	152.01646;158.02703	50
98	磺胺邻二甲氧嘧啶	8.12	311.08085(+)	156.01138;140.04545	1
99	亚甲基蓝	8.18	284.12159(+)	284.12159;268.09029	1
100	磺胺喹噁啉	8.18	301.07537(+)	156.01138;108.04439	1
101	磺胺苯吡唑	8.28	315.09102(+)	222.03317;158.07127	1
102	马喷特罗	8.31	325.12890(+)	237.04009;217.03386	1
103	哌拉西林	8.39	518.17040(+)	143.08150;160.04268	50
104	溴布特罗	8.42	364.98586(+)	290.91270;211.99436	1
105	替米考星	8.42	869.57332(+)	174.11247;88.07569	10
106	磺胺氯吡嗪	8.45	285.02075(+)	156.01138;108.04439	1
107	螺旋霉素	8.45	843.52128(+)	540.31671;174.11247	1
108	青霉素 G	8.47	335.10600(+)	176.07061;160.04268	50
109	阿奇霉素	8.50	749.51580(+)	83.04914;591.42151	1
110	咪达唑仑	8.50	326.08548(+)	291.11663;265.05271	1
111	甲苯哒唑	8.54	296.10297(+)	264.07675;296.10297	1
112	唑吡坦	8.63	308.17574(+)	235.12298;263.11789	1
113	碱性橙 2	8.63	213.11347(+)	196.08692;121.06345	50
114	头孢西丁	8.66	445.08462(+)	215.04849;114.09134	50
115	班布特罗	8.66	368.21800(+)	72.04439;294.14618	1
116	金霉素	8.66	479.12157(+)	462.09502;444.08446	10
117	克伦潘特罗	8.68	291.10255(+)	168.04488;132.0682	1
118	天青 B	8.70	270.10594(+)	254.07464;255.08247	1
119	异丙硝唑	8.70	170.09240(+)	84.08078;109.07602	1

续表 1

序号 No.	化合物 Compounds	保留时间 t_R /min	母离子/扫描模式 Precursor ions (m/z)/scan mode	子离子 Fragment ions (m/z)	检出限 LODs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
120	甲苯胺蓝	8.70	270.10594(+)	254.07464	1
121	氟西洋	8.75	388.15864(+)	315.06835;317.08515	1
122	阿苯哒唑	8.75	266.09577(+)	234.06956;266.09577	1
123	敌敌畏	8.75	220.95318(+)	127.01565;78.99452	10
124	马布特罗	8.78	311.11325(+)	237.04009;217.03386	1
125	美他环素	8.83	443.14489(+)	426.11834;201.05462	10
126	红霉素	8.83	734.46852(+)	158.11756;116.07061	1
127	氯氮卓	8.85	300.08982(+)	227.04963;283.08708	5
128	磺胺间二甲氧嘧啶	8.88	311.08085(+)	156.01138;108.04439	1
129	萘啶酸	8.89	233.09207(+)	205.06077;187.05023	1
130	乙氧喹啉	8.89	218.15394(+)	148.07569;190.12264	1
131	头孢哌酮	8.91	646.14968(+)	290.11353;148.0393	50
132	奥苯哒唑	8.91	250.11862(+)	218.09240;176.04545	1
133	甲基硫菌灵	8.92	343.05292(+)	151.03245;311.02671	5
134	克林霉素	8.93	425.18715(+)	126.12772	5
135	氟苯哒唑	8.95	314.09355(+)	282.06733;314.09355	1
136	倍他米松	8.95	393.20718(+)	355.19039;279.17434	5
137	帕苯哒唑	9.03	248.13935(+)	216.11314;160.05054	1
138	硝西洋	9.03	282.08732(+)	268.08424;180.08078	1
139	青霉素 V	9.09	351.10092(+)	229.06414;257.05905	50
140	苯乙醇胺 A	9.14	345.18088(+)	327.17032;150.09134	1
141	泰乐菌素	9.17	916.52643(+)	772.44778;174.11247	5
142	隐色孔雀石绿	9.17	331.21688(+)	316.19340;239.15428	5
143	奥沙西洋	9.17	287.05818(+)	241.05273;269.04762	1
144	丫啶黄	9.19	352.07614(-)	79.95627;352.07614	10
145	氟甲喹	9.20	262.08740(+)	244.07683;220.04045	1
146	乙酰丙嗪	9.23	327.15256(+)	86.09643;58.06513	1
147	去甲地西洋	9.28	271.06327(+)	140.02615;165.02143	1
148	氟羟甲睾酮	9.30	337.21735(+)	299.20056;281.18999	5
149	艾司唑仑	9.30	295.07450(+)	267.05578;205.07602	1
150	盐酸异丙嗪	9.36	285.14200(+)	86.09643;198.03728	1
151	硝呋烯腙	9.36	361.08911(+)	222.06351;58.04132	5
152	安眠酮	9.58	251.11789(+)	132.08078;91.05423	1
153	新青霉素 II	9.82	402.11182(+)	144.04439;160.04268	50
154	三唑仑	9.87	343.05118(+)	308.08233;315.03245	1
155	群勃龙	9.89	271.16926(+)	253.15869;199.11174	1
156	雌酮	9.89	271.16926(+)	133.06479;157.06479	1
157	芬苯哒唑	9.97	300.08012(+)	268.05391;300.08102	1
158	替马西洋	9.97	301.07383(+)	255.06835;283.06327	1
159	去氢睾酮	10.0	287.20056(+)	269.18999;173.09609	5

续表 1

序号 No.	化合物 Compounds	保留时间 t_R /min	母离子/扫描模式 Precursor ions (m/z)/scan mode	子离子 Fragment ions (m/z)	检出限 LODs/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
160	克拉霉素	10.1	748.48417(+)	158.11756;590.39658	1
161	丙酰丙噻	10.2	341.16821(+)	86.09643;58.06513	1
162	玉米赤霉醇	10.3	321.17075(-)	303.16018;277.18092	50
163	罗红霉素	10.4	837.53185(+)	158.11756;83.04914	1
164	诺龙	10.4	275.20056(+)	257.18999;239.17943	50
165	萘夫西林	10.4	415.13222(+)	256.09682;199.07536	50
166	沙美特罗	10.4	416.27954(+)	398.26897;380.25841	1
167	去氢甲睾酮	10.5	301.21621(+)	121.06479;149.13248	1
168	地西洋	10.5	285.07892(+)	154.04180;193.0886	1
169	硫菌灵	10.5	371.08422(+)	151.03245;282.03654	1
170	氯丙噻	10.6	319.10302(+)	86.09643;58.06513	1
171	吉他霉素	10.7	786.46343(+)	558.32727;174.11247	10
172	炔诺酮	10.7	299.20056(+)	231.17434;109.06479	1
173	睾酮	10.8	289.21621(+)	109.06479;97.06479	1
174	21-羟基孕酮	10.9	331.22677(+)	313.21621;109.06479	5
175	雄烯二酮	11.1	287.20056(+)	109.06479;97.06479	50
176	17 α -羟基孕酮	11.2	331.22677(+)	97.06479;109.06479	1
177	玉米赤霉酮	11.3	321.16965(+)	303.15909;123.04406	1
178	双烯雌酚	11.5	267.13796(+)	107.04914;121.06479	50
179	康力龙	11.6	329.25874(+)	121.10118;81.04472	1
180	克拉珠利	11.6	371.01080(-)	300.01008;265.01680	50
181	左炔诺孕酮	11.6	313.21621(+)	295.20564;245.18999	1
182	炔诺孕酮	11.7	313.21621(+)	295.20564;245.18999	50
183	地克珠利	12.2	404.97183(-)	333.97110	50
184	孔雀石绿	12.3	329.20123(+)	313.16993;208.11277	5
185	三唑磷	12.4	314.07228(+)	162.06619;114.96133	1
186	利福平	12.7	823.41240(+)	95.08553;151.07536	5
187	三氯苯哒唑	12.8	358.95730(+)	343.93392;273.99621	10
188	醋酸甲地孕酮	13.0	385.23734(+)	325.21621;282.19782	1
189	醋酸氯地孕酮	13.0	405.18271(+)	345.16158;309.18491	10
190	醋酸甲羟孕酮	13.1	387.25299(+)	123.08044;327.23186	1
191	醋酸美仑孕酮	13.2	397.23734(+)	337.21621;279.17434	10
192	孕酮	13.2	315.2318(+)	109.06479;97.06479	5
193	茚虫威	14.2	528.0779(+)	203.01866;168.02107	1
194	爱普瑞菌素	14.6	936.50798(+)	490.27725;352.17278	10
195	结晶紫	14.8	372.24342(+)	356.21212;251.15428	1
196	丙酸睾酮	15.1	345.24242(+)	271.20564;253.19508	1
197	阿维菌素	15.3	895.48143(+)	751.40278;449.25097	10
198	多拉菌素	16.0	921.49708(+)	777.41843;449.25097	10
199	苯丙酸诺龙	16.3	407.25807(+)	257.18999;239.17943	10
200	伊维菌素 B1a	16.9	897.49708(+)	753.41843;329.20872	10

药,分别吸取适量的单标储备液,用甲醇配制成18种10 mg/L混合标准溶液;再分别吸取适量的18种混合标准溶液,用甲醇稀释,配制成浓度均为0.5 mg/L的200种药物混合标准工作液,于 $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.3.6 数据库、定性和定量分析 收集200种药物的分子式和相对分子质量信息,在优化的液相色谱和质谱条件下,获取0.1 mg/L各类药物的色谱保留时间、母离子及加合模式,并在梯度碰撞能量(20、50、80 eV)下获得碎片离子信息。利用TraceFinder软件建立含有化合物名称、CAS号、分子式、精确分子质量、保留时间、母离子质荷比(精确至 10^{-5})以及碎片离子质荷比的数据库。

利用Full MS/dd-MS²模式采集数据,结合建立的数据库进行定性筛查,确认检出的标准为:母离子质荷比偏差 $<3\times 10^{-6}$;保留时间偏差 $<15\text{ s}$;同位素质荷比偏差 $<10\times 10^{-6}$ 、相对丰度偏差 $<25\%$ 、综合比对 $>75\%$;碎片离子质荷比偏差 $<20\times 10^{-6}$,且至少有1个碎片离子满足此要求。采用基质匹配标准曲线外标法,利用母离子进行定量分析。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理的优化

本实验的200种目标物极性差异较大,采用乙腈、乙酸乙酯为提取剂,对草鱼加标样品进行提取实验。结果表明,乙腈作为提取剂时,多数药物能被提取出来,但激素类、镇静剂类和咪唑类药物的提取效率较低;乙酸乙酯作为提取剂时,虽然能够提高激素类和镇静剂类药物的提取效率,但沙星类、 β -激动剂类和染料类药物的提取效率较低。为实现不同极性化合物均可达到高效率提取,本实验采用两步提取的方法,即先用乙腈超声提取,再用乙酸乙酯对残渣超声提取,经两次提取,检测回收率为 $30\%\sim 120\%$,其中,有 75% 药物的回收率大于 50% 。

2.2 色谱条件的优化

本实验涉及的目标物种类繁多、性质各异,为达到所有目标物同时分析、准确性的目的,选择Thermo AccucoreAQ柱作为色谱柱,对200种目标物进行分离实验。结果显示,非极性、弱极性和极性化合物在该色谱柱上的保留

性能良好,极性化合物的保留性能优于Thermo Accucore C18色谱柱。以 0.1% 甲酸水溶液和 0.1% 甲酸-乙腈溶液为流动相,优化的梯度洗脱条件见1.3.3节,在最佳色谱分离条件下,各药物均得到有效保留,峰形和灵敏度良好。在22 min内,通过1次进样可实现200种药物的快速筛查分析。200种药物的保留时间已列于表1,部分同分异构体和极性化合物的提取离子流图示于图1。

2.3 质谱条件的优化

根据200种药物的电离性质,选用ESI⁺和ESI⁻离子化模式,其中,甲矾霉素、氟苯尼考、氯霉素、玉米赤霉醇、卡拉珠利、地克珠利、头孢呋辛和丫啶黄在负离子模式下响应;其余药物均在正离子模式下响应。采用流动注射方式对200种药物分类进行一级质谱全扫描,质量扫描范围 $m/z\approx 150\sim 1\,000$,选择信号最强的目标离子作为一级母离子。200种药物母离子、子离子及扫描模式列于表1。

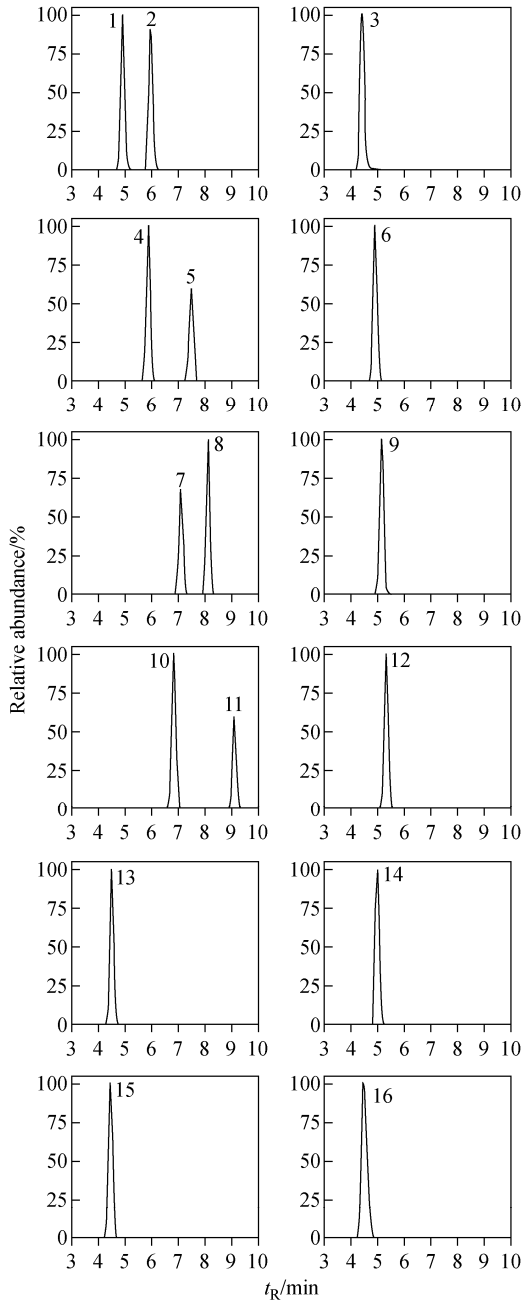
2.4 线性范围和检出限

以鱼、虾空白基质溶液配制基质匹配工作曲线进行定量分析,以消除基质效应对测定结果的影响。基质标准曲线的绘制方法为:以空白基质液配制 $1\sim 1\,000\text{ mg/L}$ 系列混合标准溶液,检测得到母离子响应值。以药物的浓度为横坐标,响应值为纵坐标,绘制基质标准曲线。结果表明,每种药物在 $1\,000\text{ mg/L}$ 检出限范围内,线性关系良好,相关系数 $R^2\geq 0.990\,0$ 。以能够触发二级质谱扫描的各化合物最小峰面积为评价标准,通过不同加标水平确定方法检出限。本方法的检出限为 $1\sim 50\text{ }\mu\text{g/kg}$,其中,有100种药物的检出限为 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$,有42种药物的检出限为 $5\text{ }\mu\text{g/kg}$,33种药物的检出限为 $10\text{ }\mu\text{g/kg}$,24种药物的检出限为 $50\text{ }\mu\text{g/kg}$,各药物的检出限列于表1。

2.5 回收率和精密度

为考察本方法的准确性,对空白鱼、虾样品进行标准添加实验,添加水平分别为1、5、10和 $50\text{ }\mu\text{g/kg}$,每个添加水平做5个平行样,按1.3节方法处理和检测,计算不同添加水平下药物的回收率和精密度。结果表明,在不同的加标水平下,200种药物的平均回收率为 $30\%\sim 120\%$;相对标准偏差在 $5\%\sim 30\%$ 之间,其中,

RSD 为 5%~15%、15%~20% 和 20%~30% 的比例分别为 70%、10% 和 20%，且相对标准偏差 20%~30% 主要分布于低加标水平上。



注:1. 磺胺二甲异嘧啶;2. 磺胺二甲基嘧啶;3. 甲硝唑;
4. 磺胺二甲噻唑;5. 磺胺二甲异噻唑;6. 磺胺嘧啶;
7. 磺胺间二甲氧嘧啶;8. 磺胺邻二甲氧嘧啶;9. 多菌灵;
10. 福莫特罗;11. 苯乙醇胺 A;12. 林可霉素;
13. 齐帕特罗;14. 头孢匹林;15. 特布他林;16. 唑乙醇

图 1 混合标准溶液中部分药物的提取离子流图

Fig. 1 Extracted precursor ion chromatograms of some drugs in mix standard solution

3 实际样品筛查

应用本方法对 48 个鲜活水产品,包括南美白对虾、鳊鱼、草鱼、鲤鱼、鲫鱼和大黄鱼等进行筛查,结果表明,对虾样品中未检出药物残留,鳊鱼、草鱼、鲤鱼、鲫鱼和大黄鱼中均检出药物残留,检出率占样品总量的 21%。检出药物的种类包括乙氧喹啉、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、甲氧苄啶、磺胺二甲基嘧啶、敌百虫和依维菌素,其中有 1 个草鱼样品的药物残留较严重,同时检出乙氧喹啉、恩诺沙星、环丙沙星、甲氧苄啶和敌百虫 5 种药物,含量分别为 8.11、363.4、11.7、1 273 和 26.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,该样品的提取离子流图示于图 2。

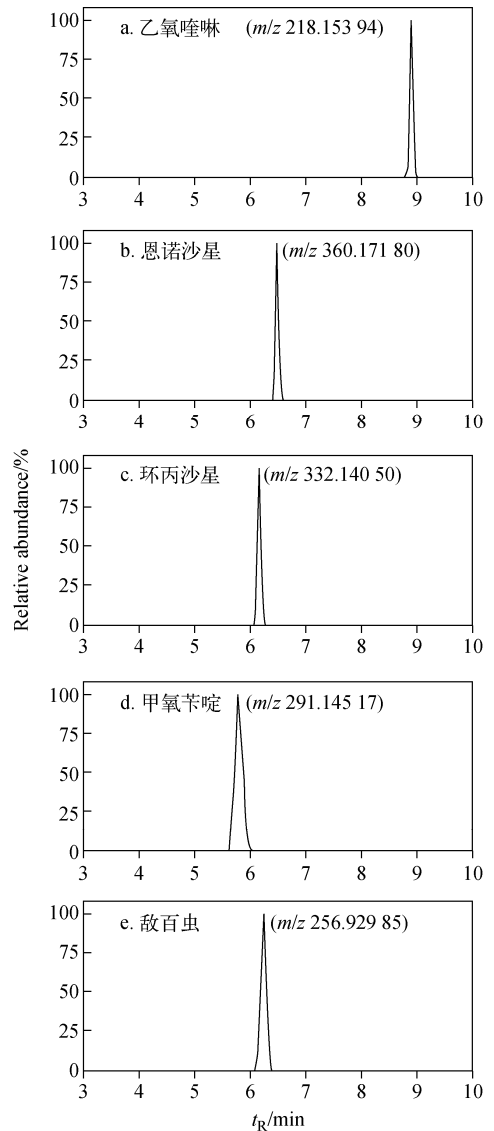


图 2 草鱼样品中检出药物的提取离子流图

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of compounds detected in grass carp

4 结论

建立了超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速同时筛查鱼、虾样品中200种药物。该方法的样品前处理简单、耗时短、检测效率高、定性准确,可为养殖和流通环节中水产品质量安全监管及隐患排查提供技术支持。

参考文献:

- [1] 孔聪,周哲,汪洋,等. 超高压液相色谱串联高分辨质谱筛查渔用投入品中禁用药物[J]. 分析化学,2017,45(2):245-252.
KONG Cong, ZHOU Zhe, WANG Yang, et al. Screening of chemical drugs in fishery inputs by ultrahigh performance liquid chromatography-orbitrap high resolution mass spectroscopy[J]. Chinese J Anal Chem, 2017, 45(2): 245-252 (in Chinese).
- [2] 孙晓杰,王苏玥,卢立娜,等. 水产养殖投入品中药物残留检测方法研究及现状分析[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(5):1 984-1 990.
SUN Xiaojie, WANG Suyue, LU Li'na, et al. Detection methods for drug residues in aquaculture inputs and its status analysis[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(5): 1 984-1 990(in Chinese).
- [3] VALESE A C, MOLOGNONI L, DE SOUZA N C, et al. Development, validation and different approaches for the measurement uncertainty of a multi-class veterinary drugs residues LC-MS method for feeds[J]. J Chromatogr B, 2017, 1 053: 48-59.
- [4] 周贻兵,吴坤,刘利亚,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物[J]. 质谱学报,2013,34(5):294-299.
ZHOU Yibing, WU Kun, LIU Liya, et al. Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites contents in fishes by UPLC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2013, 34(5): 294-299(in Chinese).
- [5] CHEN D, YU J, TAO Y, et al. Qualitative screening of veterinary anti-microbial agents in tissues, milk, and eggs of food-producing animals using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B, 2016, 1 017-1 018: 82-88.
- [6] 于慧娟,张姗姗,张晓玲,等. 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中雌激素、孕激素和雄激素[J]. 质谱学报,2014,25(2):129-137.
YU Huijuan, ZHANG Shanshan, ZHANG Xiaoling, et al. Simultaneous determination of the estrogen, progesterone and androgen in aquatic products by isotope dilution-LC-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2014, 25(2): 129-137(in Chinese).
- [7] 陈丽娜,宋风瑞,郑重,等. 人参中农药多残留的超高效液相色谱-串联质谱分析方法研究[J]. 化学学报,2012,70(7):843-851.
CHEN Lina, SONG Fengrui, ZHENG Zhong, et al. Studies on the determination method of pesticide multi-residues in ginseng by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Acta Chimica Sinica, 2012, 70(7): 843-851(in Chinese).
- [8] 熊春兰,郭平,占春瑞,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中8类38种兽药残留[J]. 分析测试学报,2013,32(2):193-198.
XIONG Chunlan, GUO Ping, ZHAN Chunrui, et al. Simultaneous determination of 8 kinds of 38 veterinary drug residues in aquatic products by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2013, 32(2): 193-198(in Chinese).
- [9] 于慧娟,蔡友琼,黄宣运,等. 10种麻痹性贝类毒素的固相萃取及液相色谱-串联质谱测定法[J]. 海洋渔业,2015,37(4):364-370.
YU Huijuan, CAI Youqiong, HUANG Xuan-yun, et al. Determination of 10 poisoning toxins by SPE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Marine Fisheries, 2015, 37(4): 364-370(in Chinese).
- [10] LOPES R P, REYES R C, ROMERO-GONZÁLEZ R, et al. Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2012, 895: 39-47.
- [11] 卜明楠,石志红,康健,等. QuEChERS结合LC-MS/MS同时测定虾肉中72种兽药残留[J]. 分析测试学报,2012,31(5):552-558.

- BU Mingnan, SHI Zhihong, KANG Jian, et al. Simultaneous determination of 72 veterinary drugs in shrimp by modified QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(5): 552-558(in Chinese).
- [12] MUNARETTO J S, MAY M M, SAIBT N, et al. Liquid chromatography with high resolution mass spectrometry for identification of organic contaminants in fish fillet; screening and quantification assessment using two scan modes for data acquisition[J]. *J Chromatogr A*, 2016, 1456: 205-216.
- [13] ZHANG Y, LI X, LIU X, et al. Multi-class, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *J Dairy Sci*, 2015, 98: 8433-8444.
- [14] 陈建波, 马琳, 黄兰淇. 超高效液相色谱-飞行时间质谱快速筛查农业投入品中违规添加的氨基甲酸酯类农药[J]. *现代农药*, 2016, 15(3): 25-28.
- CHEN Jianbo, MA Lin, HUANG Lanqi. UPLC-TOF MS method for rapid screening of carbamate insecticides in agricultural inputs[J]. *Modern Agrochemicals*, 2016, 15(3): 25-28(in Chinese).
- [15] RAJSKI Ł, GÓMEZ-RAMOS M D M, FERNÁNDEZ-ALBA A R. Large pesticide multi-residue screening method by liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables[J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1360: 119-127.
- [16] LEÓN N, PASTOR A, YUSÀ V. Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2016, 149: 43-52.
- [17] 郭萌萌, 国佼, 吴海燕, 等. 通过式固相萃取-液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速筛查鱼肉中全氟化合物及其前提物质[J]. *分析化学*, 2016, 44(10): 1504-1513.
- GUO Mengmeng, GUO Jiao, WU Haiyan, et al. Rapid screening and confirmation of perfluorinated compounds and their precursors in fish muscle by solid phase extraction purification and liquid chromatography coupled with quadrupole/exactive orbitrap mass spectrometry[J]. *Chinese J Anal Chem*, 2016, 44(10): 1504-1513(in Chinese).
- [18] JIA W, CHU X, CHANG J, et al. High-throughput untargeted screening of veterinary drug residues and metabolites in tilapia using high resolution orbitrap mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2017, 957: 29-39.
- [19] 牛增元, 罗忻, 王凤美, 等. UPLC-LTO/Orbitrap MS 快速筛查确证化妆品中 89 种禁用物质[J]. *质谱学报*, 2016, 37(3): 201-212.
- NIU Zengyuan, LUO Xin, WANG Fengmei, et al. Fast screening and confirmation of 89 prohibited compounds in cosmetics using UPLC-LTQ/Orbitrap MS[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2016, 37(3): 201-212(in Chinese).
- [20] 杨璐齐, 李蓉, 高永清, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 同时检测水产品中磺胺和喹诺酮类药物残留[J]. *食品与机械*, 2016, 33(8): 38-43.
- YANG Luqi, LI Rong, GAO Yongqing, et al. Simultaneous determination of sulfonamides and quinolones in fish by UPLC-Q/Orbitrap HRMS[J]. *Food & Machinery*, 2016, 33(8): 38-43(in Chinese).
- [21] TURNIPSEED S B, STOREY J M, LOHNE J J, et al. Wide-scope screening method for multi-class veterinary drug residues in fish, shrimp, and eel using liquid chromatography-quadrupole high-resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(34): 7252-7267.