

# QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定海水鱼中四环素和喹诺酮类药物的残留量

蔡振世, 许琨琨, 卢文斌

(泉州市食品药品检验所, 泉州 362000)

**摘要:** 取1.00 g均质好的样品, 加入 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混合内标工作液100  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀后加入2 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  溶液, 涡旋1 min。加入8 mL乙腈, 涡旋1 min, 超声15 min, 离心3 min。取全部上清液, 加至Cleanert LipoNo净化管, 振摇1 min, 静置1 min。取全部上清液, 于45  $^\circ\text{C}$ 氮吹至干, 用体积比95:5的0.1% (体积分数, 下同) 甲酸-乙腈溶液1.0 mL复溶, 过0.22  $\mu\text{m}$ 有机滤膜, 采用超高效液相色谱-串联质谱法测定滤液中4种四环素类和5种喹诺酮类药物的含量。在色谱分析中, 以ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub> 色谱柱为固定相, 以不同体积比的0.1% 甲酸溶液和乙腈的混合溶液作流动相进行梯度洗脱; 在质谱分析中, 以电喷雾离子源正离子(ESI<sup>+</sup>) 模式电离, 多反应监测(MRM) 模式扫描, 同位素内标法定量。结果显示: 4种四环素类和5种喹诺酮类药物与内标的质量浓度比值均在5.00~125  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  内和相应的峰面积比值呈线性关系, 检出限均为2.00  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按照标准加入法进行回收试验, 回收率为91.3%~110%, 测定值的相对标准偏差( $n=6$ ) 为3.4%~11%。方法用于200批海水鱼样品的分析, 检出结果和国家标准方法的基本一致, 所用前处理时间和投入人员数更少。

**关键词:** QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 海水鱼; 四环素类药物; 喹诺酮类药物; 同位素内标法

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2024)10-1004-08

为防止海水鱼养殖及运输贮藏过程中微生物过度繁殖导致食物腐败变质, 常使用四环素和喹诺酮两类药物<sup>[1]</sup>。相关国家标准规定, 鱼类皮和肉中恩诺沙星(以恩诺沙星与环丙沙星含量合计)、四环素、土霉素、金霉素及多西环素的最大残留限量分别为100, 200, 200, 200, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ <sup>[2]</sup>, 氧氟沙星、诺氟沙星及培氟沙星均不得使用<sup>[3]</sup>。由于部分养殖者对相关药物的非法滥用, 养殖海水鱼中这两类抗生素药物的检出率居高不下, 由此带来的食品安全问题日益突出<sup>[4-6]</sup>, 不仅对人体健康产生直/间接危害, 而且导致细菌严重耐药进而对生态系统产生毒害。因此, 开发可靠、快速、高通量、高精度、易操作的监测海水鱼中这两类药物残留量的分析方法尤为重要。

检测关键点主要集中在前处理方法和测定方法的选择上。这两类药物残留的样品前处理方法主要有液液萃取法<sup>[7-8]</sup>、固相萃取法<sup>[9-13]</sup>及QuEChERS<sup>[14-16]</sup>等。相较传统的液液萃取法及固相萃取法, QuEChERS精密度和准确度更好, 分析更快, 有机溶剂用量更少, 操作更简单等, 适用于大批量样品分析。但是QuEChERS无法完全消除基质干扰, 对定量结果存在一定影响。因此, 本工作优化了QuEChERS前处理条件, 选择同位素内标法定量, 提出了一种基于Cleanert LipoNo净化管的操作简单、快速、高效、准确、可靠的QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法, 用于测定大批量海水鱼样品中4种四环素类药物及5种喹诺酮类药物的残留量。

## 1 试验部分

### 1.1 仪器与试剂

TripleQuad5500型超高效液相色谱-串联质谱仪; 3K15型冷冻离心机; PM3-900TD型超声波清洗器; TurboVap LV型全自动氮吹仪; LPD2500

收稿日期: 2023-12-03

基金项目: 福建省市场监督管理局科技项目(FJMS2021034); 泉州市科技计划项目(2021N184S)

作者简介: 蔡振世, 主管药师, 硕士, 主要从事食品药品检验工作, 234794971@qq.com



型多管涡旋混合仪; HTY HOMO761型匀浆仪; XSE205DU型电子天平; Dirent-Pure UP UV 30型纯水仪; Cleanert LipoNo净化管(净化管规格15 mL, Cleanert LipoNo用量0.1 g)。

喹诺酮类药物混合标准储备溶液: 恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星及培氟沙星的质量浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 市售。

四环素类药物混合标准溶液: 取四环素、土霉素、金霉素及多西环素等四环素类药物固体标准品, 用甲醇充分溶解和稀释, 得到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的四环素类药物混合标准溶液。

混合标准工作液: 取四环素类药物混合标准储备溶液及喹诺酮类药物混合标准储备溶液各0.1 mL于同一20 mL容量瓶中, 用甲醇稀释, 配制成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合标准工作液。

单内标溶液: 恩诺沙星- $d_5$ (校正5种喹诺酮类药物)和四环素- $d_6$ (校正4种四环素类药物)的质量浓度均为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 市售。

混合内标工作液: 取恩诺沙星- $d_5$ 及四环素- $d_6$ 单内标溶液各0.1 mL于同一20 mL容量瓶中, 用甲醇稀释, 配制成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合内标工作液。

四环素、土霉素、金霉素及多西环素等四环素类药物固体标准品,  $100 \mu\text{g} \cdot \text{支}^{-1}$ ; 甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯; 二水合乙二胺四乙酸二钠( $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )为分析纯; 试验用水为超纯水, 由纯水仪制备。

200批海水鱼样品源于2022—2023年监督抽样留样, 抽检场地主要为福建省泉州市各大超市及农

贸市场。

## 1.2 仪器工作条件

### 1.2.1 色谱条件

ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C<sub>18</sub>色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 柱温40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流动相A为0.1% (体积分数, 下同) 甲酸溶液, B为乙腈; 流量 $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 进样量2  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序: 0~1.0 min, B为5%; 1.0~5.0 min, B由5%升至40%; 5.0~7.0 min, B由40%升至95%; 7.0~7.1 min, B由95%跳转至5%, 保持2.9 min。

### 1.2.2 质谱条件

电喷雾离子(ESI)源, 正离子( $\text{ESI}^+$ )模式; 离子源温度550  $^{\circ}\text{C}$ ; 多反应监测(MRM)扫描方式; 气帘气压力241 kPa; 离子化电压5 500 V; 喷雾气压力379 kPa; 辅助加热气压力379 kPa; 去簇电压80 V。进样后切换成进废液模式, 3 min后切换成质谱检测模式。其他质谱参数见表1, 其中“\*”代表定量离子。

## 1.3 试验方法

称取( $1.00 \pm 0.05$ ) g均质好的样品于50 mL离心管中, 加入混合内标工作液100  $\mu\text{L}$ , 涡旋混匀。加入2 mL  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 溶液, 涡旋1 min, 加入8 mL乙腈, 涡旋1 min, 超声15 min, 以转速5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心3 min。取全部上清液, 加至Cleanert LipoNo净化管, 振摇1 min, 静置1 min。取全部上清液, 于45  $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干, 用初始流动相1.0 mL复溶, 过0.22  $\mu\text{m}$ 有机滤膜, 滤液收集至进样瓶, 按照仪器工作条件测定。

表1 质谱参数

Tab. 1 MS parameters

序号	化合物	保留时间/min	母离子质荷比( $m/z$ )	子离子 $m/z$	碰撞能量/eV
1	土霉素	3.75	461.2	426.2 <sup>*</sup> , 443.2	25, 17
2	四环素	3.93	445.1	410.2 <sup>*</sup> , 427.1	24, 19
3	金霉素	4.73	479.1	462.0 <sup>*</sup> , 443.2	24, 28
4	多西环素	5.03	445.0	428.1 <sup>*</sup> , 154.1	24, 35
5	四环素- $d_6$	3.91	451.1	416.2	24
6	诺氟沙星	3.72	320.1	276.1 <sup>*</sup> , 233.1	26, 35
7	氧氟沙星	3.73	362.2	261.1 <sup>*</sup> , 318.1	38, 26
8	培氟沙星	3.76	334.3	290.2 <sup>*</sup> , 233.1	26, 37
9	环丙沙星	3.81	332.1	288.1 <sup>*</sup> , 245.1	25, 33
10	恩诺沙星	4.05	360.1	316.1 <sup>*</sup> , 245.1	28, 36
11	恩诺沙星- $d_5$	4.04	365.0	321.0	28

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

试验比较了分别以水-乙腈、 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液-乙腈、 $0.1\%$ 甲酸溶液-乙腈体系作流动相时目标物的峰形及响应情况,结果显示:在水中加入 $0.1\%$ 甲酸有助于改善各目标物的离子化效率,增大

其响应强度,改善其色谱峰形。因此,试验选择 $0.1\%$ 甲酸溶液-乙腈体系作流动相。在优化的色谱条件下,加标空白海水鱼基质溶液的提取离子色谱图见图1。

由图1可知,9种药物及2种内标的色谱峰峰形对称、尖锐,保留时间为 $3.72\sim 5.03\text{ min}$ ,满足定量分析要求。

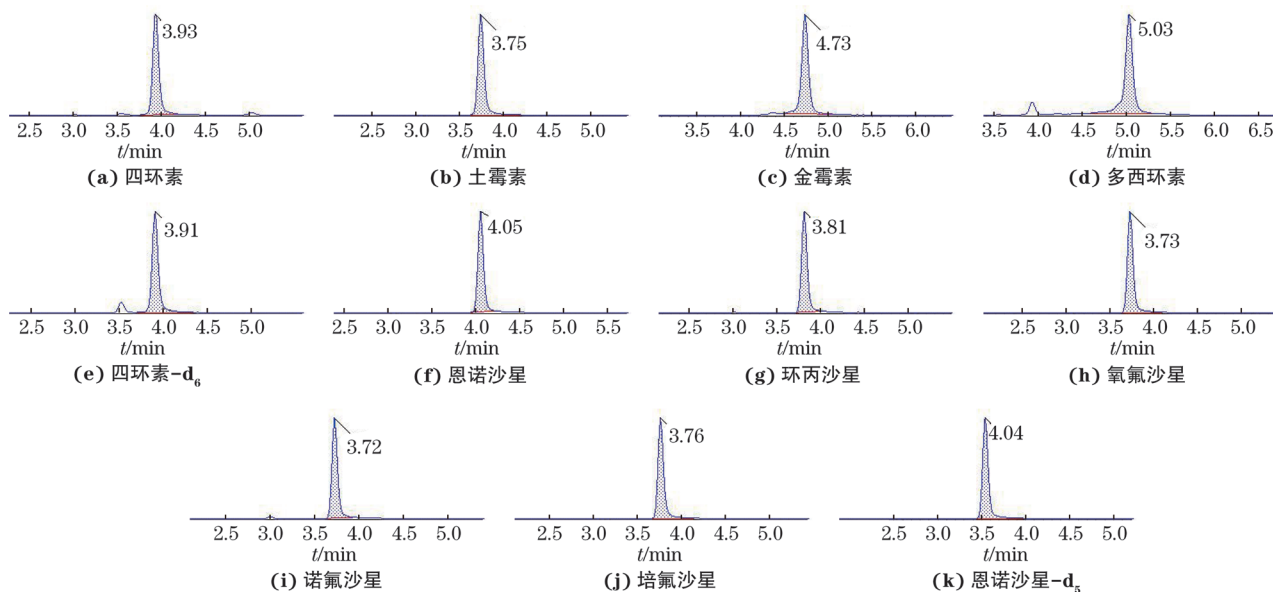


图1 空白海水鱼基质中9种药物及2种内标的提取离子色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of 9 drugs and 2 internal standards in blank marine fish matrix

### 2.2 前处理条件的选择

#### 2.2.1 提取条件

适用于QuEChERS提取的溶剂主要有甲醇及乙腈,相较甲醇,乙腈可以有效沉淀蛋白,且对糖类和脂肪的溶解程度更低<sup>[17]</sup>,因此试验选择采用乙腈提取样品中的目标物。考虑到四环素类药物容易与金属离子、蛋白质等发生螯合作用,提取难度较高,试验参考文献[18]进一步优化提取溶剂,确定采用 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{EDTA}$ 溶液+乙腈提取,该溶剂组合有利于沉淀蛋白,并能将药物从生物组织中释放出来,充分溶解在乙腈中。为确保提取充分,试验比较了分别对加标空白基质(加标量 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )提取1,2,3次时各目标物的回收率,结果见图2。

由图2可知,不同提取次数下回收率均在 $90.0\%\sim 110\%$ 内。为节省分析时间,试验选择只提取1次。

#### 2.2.2 净化方法

在日常监督抽样检测中发现,液液萃取法<sup>[19]</sup>对试验人员的操作能力要求较高,且耗费时间过长;固相萃取法<sup>[20]</sup>需要专门的固相萃取装置,净化

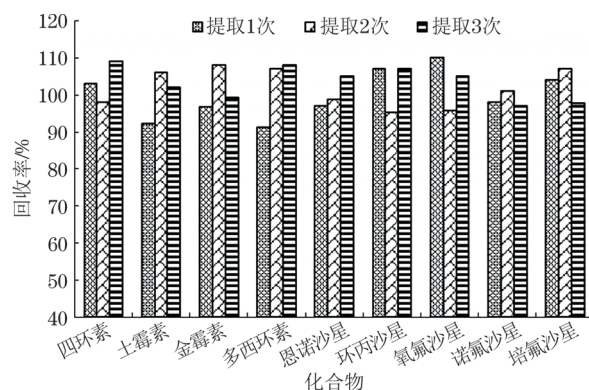


图2 不同提取次数下各目标物的回收率

Fig. 2 Recovery of each target at different extraction times

过程包括固相萃取柱活化以及样品提取液上样、淋洗、洗脱、收集等步骤,操作繁杂、耗时较长,且容易发生固相萃取柱堵塞等问题。因此,试验选择采用QuEChERS净化样品,并比较了分别采用净化材料Cleanert LipoNo、 $\text{C}_{18}+N$ -丙基乙二胺(PSA)(质量比 $1:1$ )、氧化锆吸附脂类等非极性干扰物(用量均为 $1\text{ g}$ )时加标空白基质(加标量 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )中各目标物的基质效应(ME)值(外标法所得ME值绝对

值,分别采用空白基质溶液和初始流动相配制混合标准溶液系列并制作标准曲线,以前后二者标准曲线斜率比和1的差值的绝对值计算<sup>[21]</sup>,结果见图3。

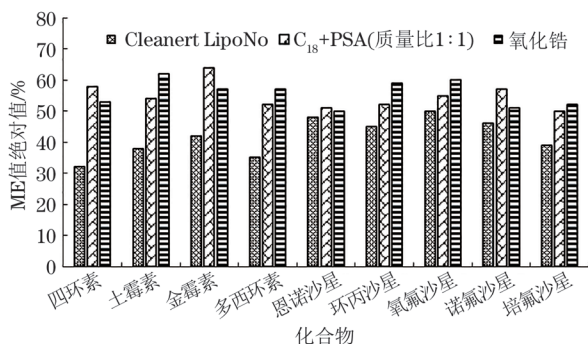


图3 不同 QuEChERS 材料净化后各目标物的 ME 值绝对值  
Fig. 3 Absolute value of ME value of each target after purification with different QuEChERS materials

由图3可知, Cleanert LipoNo 所得 ME 值绝对值更小,说明其净化效果更好,这是由于 Cleanert LipoNo 是一种表面修饰了大量大颗粒长碳链的除脂材料,可针对性地吸附脂肪等非极性干扰物,且操作简单,试验人员只需将提取液转移进填充有 Cleanert LipoNo 的净化管中,振摇后静置分层, 2 min 即完成全部净化工作,操作简单、快速,无需专门净化设备,且成本较固相萃取法更低。

### 2.3 基质效应及消除

采用超高效液相色谱-串联质谱法分析动物源性食品时,由于样品基质往往会对定量结果产生严重影响,因此需要对基质效应进行评估。参考文献<sup>[21]</sup>计算 ME 值,当 ME 值绝对值不大于 10% 时,基质效应可以忽略;当 ME 值绝对值在 [10%, 50%) 内时,存在中等基质增强或抑制效应;当 ME 值绝对值大于 50% 时,存在强基质增强或抑制效应,对定量结果影响较大。当存在中等或强基质效应时,需要优化检测方法,将 ME 值绝对值控制在 10% 以内<sup>[22]</sup>。目前消除基质效应的方法主要有空白基质匹配标准曲线法<sup>[23]</sup>和内标法<sup>[24]</sup>。在实际检测中,样品基质种类多样,不同基质对同一目标物产生的基质效应差异较大,若每种基质都用来制作空白基质匹配标准曲线,则所需空白基质数量庞大,经济及操作上均难以实现。同位素内标法不仅准确度高、操作简单,且无需制作空白基质匹配标准曲线;在同一类型药物中选取 1~2 种同位素内标直接进行内标法定量分析,既兼顾了经济性又

能确保方法的准确度。综合考虑,试验选择采用四环素-d<sub>6</sub> 作为四环素类药物的同位素内标,恩诺沙星-d<sub>5</sub> 作为喹诺酮类药物的同位素内标,并以市场销售量较高的 6 种空白海水鱼基质(黄花鱼、黄翅鱼、带鱼、海鲈鱼、金线鱼和鲷鱼,其中黄花鱼及黄翅鱼中目标物检出率较高)为待测对象,考察了分别采用内标法与外标法定量时各目标物的 ME 值,所得结果见图 4。

由图 4 可知:采用外标法定量时,两类药物 ME 值绝对值在 [10%, 50%) 内,均显示为基质抑制效应;采用内标法定量时,两类药物 ME 值绝对值均小于 10%,说明内标法能有效消除基质效应。

### 2.4 方法学考察

#### 2.4.1 标准曲线、检出限和测定下限

分别取混合标准工作液及混合内标工作液适量,用初始流动相稀释,配制成含内标  $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,各目标物 5.00, 10.0, 25.0, 50.0, 75.0,  $125 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的混合标准溶液系列,按照仪器工作条件测定。以各目标物质量浓度与内标质量浓度的比值为横坐标,对应的目标物的定量离子色谱峰面积与对应内标离子色谱峰面积的比值为纵坐标绘制标准曲线,所得各标准曲线的线性范围均为  $5.00 \sim 125 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,其他线性参数见表 2。

在空白海水鱼基质中加入标准溶液,制备一系列低浓度加标水平的海水鱼样品(加标量 1.00, 2.00, 5.00,  $10.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),按照试验方法测定。以信噪比接近 3, 10 的加标量作检出限和测定下限,检出限和测定下限分别为  $2.00, 5.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

#### 2.4.2 精密度和回收试验

选取不合格率较高的空白黄花鱼基质,在 1, 2, 10 倍测定下限水平下各进行 6 次平行加标回收试验,计算回收率和测定值的相对标准偏差(RSD),结果见表 3。

由表 3 可知,9 种药物的回收率为 91.3%~110%,测定值的 RSD 为 3.4%~11%,满足实际检测准确度和精密度要求。

### 2.5 样品分析

按照试验方法分析 2022—2023 年实验室监督抽样中留存的 200 批海水鱼样品,检出结果与当年实验室监督抽样所用国家标准方法<sup>[25-26]</sup>的进行比对。结果显示:四环素类药物均未检出;在 41 批样品中检出了喹诺酮类药物,其中 41 批样品检出了恩诺沙星,36 批样品同时检出了环丙沙星,6 批样品

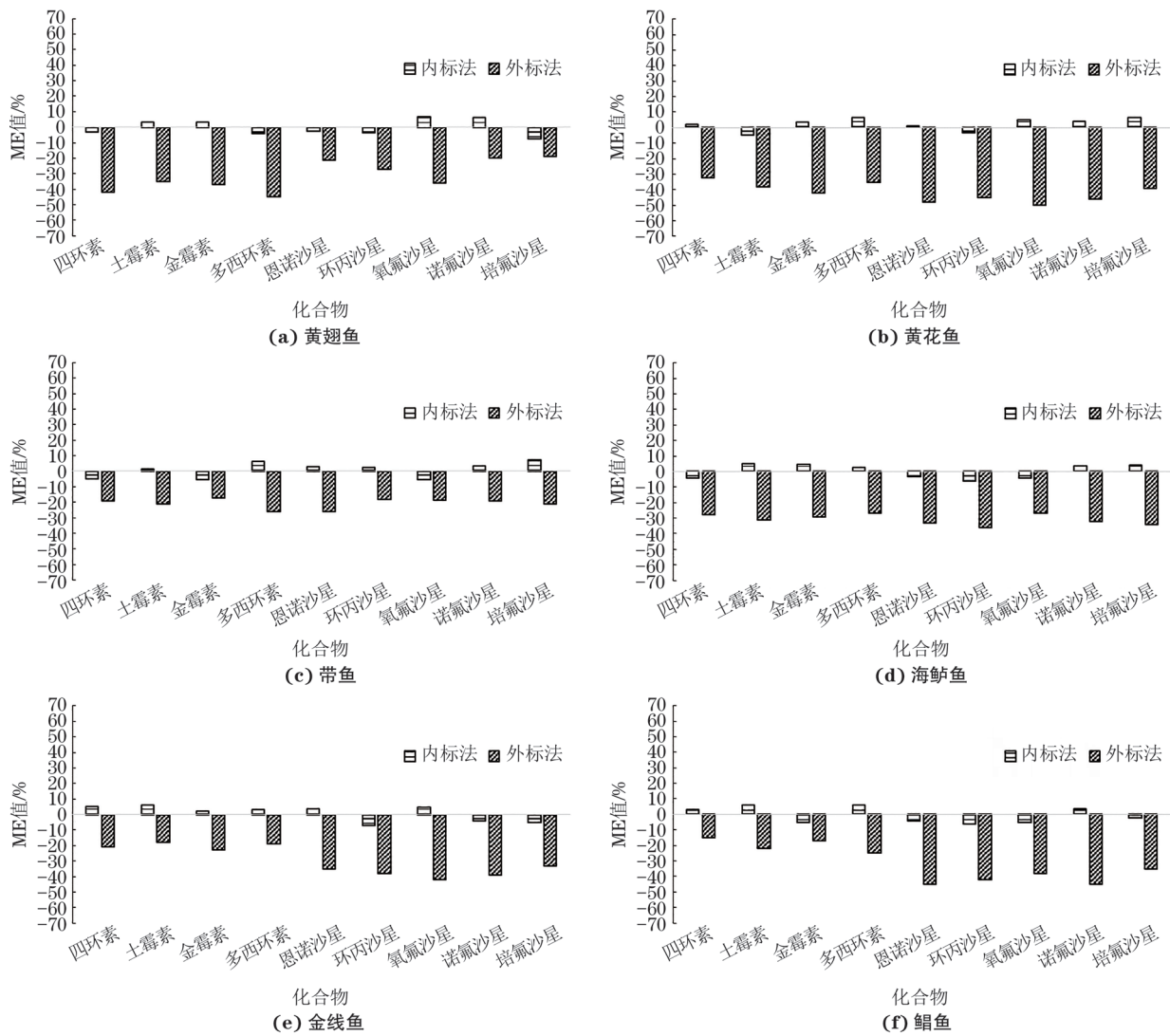


图 4 9 种药物在不同海水鱼基质中的 ME 值

Fig. 4 ME values of 9 drugs in different marine fish matrices

表 2 线性参数

Tab. 2 Linearity parameters

化合物	线性回归方程	相关系数
四环素	$y=0.6486x-0.002200$	0.9996
土霉素	$y=0.5469x+0.04247$	0.9995
金霉素	$y=0.5199x-0.02551$	0.9994
多西环素	$y=1.152x-0.05188$	0.9997
恩诺沙星	$y=0.6742x+0.05713$	0.9995
环丙沙星	$y=0.3425x+0.03205$	0.9996
氧氟沙星	$y=0.9063x+0.26363$	0.9996
诺氟沙星	$y=0.3283x+0.03801$	0.9994
培氟沙星	$y=0.6435x+0.05495$	0.9995

中恩诺沙星和环丙沙星总检出量超过国家标准规定 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )<sup>[2]</sup>, 比对结果如表 4 所示。

由表 4 可知, 200 批海水鱼样品的检出结果与当年监督抽样检验结果基本一致, 但是本方法所需前处理时间及投入人员数大大减少, 说明本方法操作更为简便、快速, 且结果稳定可靠。

本工作采用基于 Cleanert LipoNo 净化管的 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定海水鱼样品中四环素和喹诺酮类药物的含量, 大大缩短了样品前处理和仪器运行时间, 同时保证了较高的准确度及精密度, 适用于大批量海水鱼样品中抗生素残留的快速、高效、准确测定。后续研究可增加药物种类及样品种类, 一次性实现对多基质中多种类药物的快速定量分析, 进而为政府大规模开展食用农产品监督抽样及风险监测提供有利技术支持。



表3 精密度和回收试验结果 (n=6)

Tab. 3 Results of tests for precision and recovery (n=6)

化合物	加标量 5.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		加标量 10.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		加标量 50.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
四环素	103	6.5	100	7.1	98.1	4.6
土霉素	92.2	5.8	95.3	3.8	93.8	6.7
金霉素	96.8	7.5	92.9	6.7	103	4.8
多西环素	91.3	4.9	105	9.4	94.3	6.4
恩诺沙星	97.1	5.6	101	4.5	101	3.4
环丙沙星	107	6.0	94.1	5.2	104	5.3
氧氟沙星	110	8.7	107	4.6	95.1	7.5
诺氟沙星	98.1	9.8	106	7.1	102	5.3
培氟沙星	104	11	100	5.4	96.3	7.6

表4 方法对比结果

Tab. 4 Results of method comparison

方法来源	总检出			不合格检出			前处理 总用时/d	投入 人员数/人
	数量/批	化合物	测定值 $w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	数量/批	化合物	测定值 $w/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$		
国家标准方法	41	恩诺沙星	11.5~955	6	恩诺沙星+环丙沙星	367, 518, 241, 234, 1 005, 248	10	2
	36	环丙沙星	6.14~50.1					
本方法	41	恩诺沙星	12.3~1 017	6	恩诺沙星+环丙沙星	389, 553, 222, 256, 1 074, 265	2	1
	36	环丙沙星	5.30~57.3					

## 参考文献:

- [1] 周柯举. 集约化海水养殖区抗生素的污染特征[D]. 厦门: 厦门大学, 2020.
- [2] 中华人民共和国农业农村部, 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量: GB 31650—2019 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- [3] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业部公告第2292号(2015年第9期)[EB/OL]. (2015-09-01). [http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/jiuqi/201712/t20171219\\_6103873.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2015/jiuqi/201712/t20171219_6103873.htm).
- [4] 陈玲, 杨潇, 张琳钰, 等. 食品中环境新污染物危害管控研究[J]. 中国工程科学, 2022, 24(6): 99-106.
- [5] 孟丽华, 史艳伟, 时兵, 等. 四环素类抗生素残留的检测方法及其对渔业环境的影响研究进展[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(1): 50-55.
- [6] 王云鹏, 马越. 养殖业抗生素的使用及其潜在危害[J]. 中国抗生素杂志, 2008(9): 519-523.
- [7] LAI G X, CHEN G Y, CHEN T W, et al. Rapid screening of oxytetracycline residue in fish muscle by dispersive liquid-liquid microextraction and europium-sensitized luminescence[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(8): 2052-2058.
- [8] BARBAYANOV K, TIMOFEEVA I, BULATOV A. An effervescence-assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on three-component deep eutectic solvent for the determination of fluoroquinolones in foods[J]. Talanta, 2022, 250: 123709.
- [9] 刘柏林, 谢继安, 赵紫薇, 等. 同位素内标-超高效液相色谱串联质谱法测定禽类食品中喹诺酮与四环素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7329-7339.
- [10] 刘善菁, 陆桂萍, 刘雨昕, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肝中4种四环素类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(11): 4379-4387.
- [11] 魏丹, 国明, 张菊. 加速溶剂萃取-磁固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中10种氟喹诺酮类药物残留[J]. 色谱, 2020, 38(12): 1413-1422.
- [12] FUKUMITSU T, WAKI M, HAGIO M, et al. Development of an analytical method for simultaneous determination of quinolones and tetracyclines in livestock and fishery products[J]. Journal of the Food Hygienic

- Society of Japan, 2021, 62(5): 168-174.
- [13] TURNIPSEED S B, STOREY J M, LOHNE J J, et al. Wide-scope screening method for multiclass 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.
- [14] CHEN J, WEI Z, CAO X Y. QuEChERS pretreatment combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of four veterinary drug residues in marine products[J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(5): 1055-1066.
- [15] 谢敏,徐浚,费丹,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定牧草中氟喹诺酮类药物残留[J]. *分析试验室*, 2023. DOI: 10.1359511.cnki.issn1000-0720.2013.010901.
- [16] DINH Q T, MUNOZ G, VO DU Y S, et al. Analysis of sulfonamides, fluoroquinolones, tetracyclines, triphenylmethane dyes and other veterinary drug residues in cultured and wild seafood sold in Montreal, Canada[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 94: 103630.
- [17] 王展华,梁晶晶,施贝,等. 通过式固相萃取结合 UPLC-MS/MS 同时检测水产品中麻醉剂及其代谢物残留[J]. *中国现代应用药学*, 2023, 40(16): 2282-2287.
- [18] GRANDE-MARTÍNEZ Á, MORENO-GONZÁLEZ D, ARREBOLA-LIÉBANAS F J, et al. Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2018, 155: 27-32.
- [19] LEHOTAY S J, LIGHTFIELD A R. Extract-and-inject analysis of veterinary drug residues in catfish and ready-to-eat meats by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*, 2020, 103(2): 584-606.
- [20] HERRERA-HERRERA A V, HERNÁNDEZ-BORGES J, RODRÍGUEZ-DELGADO M A, et al. Determination of quinolone residues in infant and young children powdered milk combining solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(42): 7608-7614.
- [21] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(13): 3019-3030.
- [22] 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.
- [23] TSHEPHO R, DUBE S, NINDI M M. Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of anthelmintic drug residues in small-stock meat followed by LC-ESI-MS/MS detection[J]. *Food Science & Nutrition*, 2023, 11(10): 6288-6302.
- [24] HAJRULAI-MUSLIU Z, UZUNOV R, JOVANOVIĆ S, et al. Multi-class/residue method for determination of veterinary drug residues, mycotoxins and pesticide in urine using LC-MS/MS technique[J]. *BMC Veterinary Research*, 2023, 19(1): 156.
- [25] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法: GB/T 21317—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [26] 中华人民共和国农业部. 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: 农业部1077号公告-1—2008[S]. (2008-09-20). [http://www.moa.gov.cn/nybg/2008/djiuq/201806/t20180611\\_6151661.htm](http://www.moa.gov.cn/nybg/2008/djiuq/201806/t20180611_6151661.htm).



## Rapid Determination of Residues of Tetracyclines and Quinolones in Marine Fish by Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with QuEChERS

CAI Zhenshi, XU Kunkun, LU Wenbin

(Quanzhou Institute for Food and Drug Control, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** An aliquot (1.00 g) of the homogenized sample was taken, and 100  $\mu\text{L}$  of  $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  mixed internal standard working solution was added. After mixing well by vortex, 2 mL of  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{EDTA}$  solution was added, and the mixture was vortexed for 1 min. Then 8 mL of acetonitrile was added, and the mixture was vortexed for 1 min, sonicated for 15 min, and centrifuged for 3 min. All the supernatant was taken and placed into a Cleanert LipoNo purification tube for shaking for 1 min and settling for 1 min. All the supernatant was taken and blown to dryness by nitrogen at  $45^\circ\text{C}$ . The residue was re-dissolved in 1.0 mL of 0.1% (volume fraction, the same below) formic acid-acetonitrile solution at volume ratio of 95:5. The solution obtained was passed through a  $0.22 \mu\text{m}$  organic filter membrane, and 4 tetracyclines and 5 quinolones in the filtrate were determined by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. In chromatographic analysis, ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH  $\text{C}_{18}$  chromatographic column was used as the stationary phase, and mixed solutions of 0.1% formic acid solution and acetonitrile at different volume ratios were used as the mobile phase for gradient elution. In mass spectrometry analysis, the positive ion ( $\text{ESI}^+$ ) mode of the electrospray ion source was used for ionization, multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for scanning, and the isotope internal standard method was used for quantification. It was shown that linear relationships between values of the mass concentration ratio and peak area ratio of 4 tetracyclines and 5 quinolones to the internal standard were kept in the range of  $5.00\text{--}125 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , with detection limits of  $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Test for recovery was made according to the standard addition method, giving recoveries in the range of 91.3%–110%, and RSDs ( $n=6$ ) of the determined values ranged from 3.4% to 11%. The proposed method was used for the analysis of 200 batches of marine fish samples, and the detection results were basically consistent with those given by the national standards, with lower pre-treatment time and number of personnel involved.

**Keywords:** QuEChERS; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; marine fish; tetracycline drug; quinolone drug; isotope internal standard method