

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241224007

引用格式: 王凤丽, 冯秋芳, 杨帆, 等. 快速滤过型净化结合液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 16 种麻醉剂及其代谢物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(10): 134-142.

WANG FL, FENG QF, YANG F, *et al.* Simultaneous determination of 16 kinds of anesthetics and metabolites residual amount in aquatic products by multi-plug filtration cleanup method combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(10): 134-142. (in Chinese with English abstract).

快速滤过型净化结合液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 16 种麻醉剂及其代谢物残留量

王凤丽*, 冯秋芳, 杨帆, 王艳艳, 陈力, 胡奇杰, 王东旭, 谷贵章, 曾坤
(湖州市食品药品检验研究院, 湖州 313000)

摘要: **目的** 建立基于快速滤过型净化(multi-plug filtration cleanup, m-PFC)技术结合液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时测定水产品中 16 种麻醉剂及其代谢物残留量的分析方法。**方法** 样品经 1%甲酸乙腈溶液提取, 提取液盐析后, 经采用无水硫酸镁、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)、增强型脂质去除(enhanced matrix removal-lipid, EMR-Lipid)净化材料装填的 m-PFC 柱净化, 以甲醇和含 0.1%甲酸的 2 mmol/L 甲酸铵水溶液为流动相, 经 C₁₈ 色谱柱分离, 电喷雾正/负离子扫描, 多反应监测模式下检测, 基质外标法定量。**结果** 16 种麻醉剂及其代谢物在各自的浓度范围内线性关系良好(相关系数 $r^2 > 0.996$), 方法检出限(信噪比为 3)为 0.03~0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限(信噪比为 10)为 0.10~1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在空白样品基质中低、中、高 3 个浓度水平下的加标回收率为 79.3%~113.8%, 相对标准偏差为 1.3%~7.2% ($n=6$)。**结论** 该方法操作简便、灵敏度高、稳定性好, 适用于鲜活水产品中 16 种麻醉剂及其代谢物残留量的快速测定。

关键词: 水产品; 麻醉剂; 快速滤过型净化; 液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of 16 kinds of anesthetics and metabolites residual amount in aquatic products by multi-plug filtration cleanup method combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Feng-Li*, FENG Qiu-Fang, YANG Fan, WANG Yan-Yan, CHEN Li,
HU Qi-Jie, WANG Dong-Xu, GU Gui-Zhang, ZENG Kun
(Huzhou Institute for Food and Drug Control, Huzhou 313000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 16 kinds of anesthetics and metabolites residual amount in aquatic products by multi-plug filtration cleanup (m-PFC)-liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with acetonitrile

收稿日期: 2024-12-24

基金项目: 浙江省市场监督管理局青年科技项目(QN2023447); 湖州市公益性应用研究项目(2023GZ34)

第一作者/*通信作者: 王凤丽(1988—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全检测。E-mail: wfl_hsyj@163.com

containing 1% formic acid, separated by salting-out, and the upper acetonitrile was purified by m-PFC column packed with anhydrous magnesium sulfate, primary secondary amine (PSA), and enhanced matrix removal-lipid (EMR-Lipid). The targets were separated by C_{18} column using methanol-2 mmol/L ammonium formate containing 0.1% formic acid as mobile phase for gradient elution, detected by positive or negative electrospray ionization-tandem mass spectrometry under multiple reaction monitoring mode, and quantified with matrix external standard method. **Results** The 16 kinds of anesthetics and metabolites showed good linear relationships in their respective concentration ranges ($r^2 > 0.996$). The limits of detection ($S/N=3$) and limits of quantitation ($S/N=10$) were 0.03–0.30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.10–1.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries at low, medium and high concentration levels in the blank sample matrix were 79.3%–113.8%, and the relative standard deviations were 1.3%–7.2% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple to operate, sensitive and good in stability, which can be applied to the rapid detection of 16 kinds of anesthetics and metabolites in aquatic products.

KEY WORDS: aquatic products; anesthetics; multi-plug filtration cleanup; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

水产品因丰富的蛋白质, 较低的脂肪含量, 以及较高的营养价值, 受到了广大消费者的青睐, 而其鲜活程度极大地影响着水产品的品质和风味。在水产品运输过程中, 麻醉剂的使用可以保持水产品的鲜活度, 降低水产品的新陈代谢, 从而减少应激活动和溶解氧的消耗, 提高存活率^[1]。目前在鲜活水产品流通环节中广泛使用的渔用麻醉剂主要为丁香酚类化合物和卡因类化合物^[2]。近年来, 丁香酚在水产品中频繁检出, 其安全性在国际上仍存在较大争议^[3-4]。丁香酚在日本、新西兰等国允许用于渔业养殖, 但限定最大残留量为 0.05 mg/kg 和 0.1 mg/kg^[5-6], 而我国对其使用尚无明确规定。卡因类麻醉剂作为神经中枢阻滞药物, 具有麻醉效果好、复苏时间短等优点, 其中最常用的是三卡因(MS-222), 是美国和欧盟唯一允许使用的活体麻醉剂, 但也有严格的限值, 美国限定休药期为 21 d, 最高残留量不高于 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7], 而目前我国未对该类化合物作出限量规定。研究表明, 卡因类麻醉剂具有中枢神经毒性及心血管毒性, 长期或过量摄入对人体存在潜在的健康风险^[8-9]。因此, 建立一种同时测定鲜活水产品中多种麻醉剂药物的快速、准确分析方法具有重要的现实意义。

目前, 水产中麻醉剂药物的检测方法主要有液相色谱法^[10]、液相色谱-串联质谱法^[11-12]、气相色谱法^[13]、气相色谱-质谱法^[14]等, 其中液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)具有选择性强、灵敏度高、抗干扰能力强等优点^[15], 是药物多残留检测的首选方法。水产品基质复杂, 含有蛋白质、脂肪、磷脂等多种干扰物质, 相关前处理方法主要有固相萃取法^[16]、分散固相萃取法^[17]等。快速滤过型净化(multi-plug filtration cleanup, m-PFC)技术是根据 QuEChERS 方法原理, 将一定种类和数量的净化材料填入固相萃取(solid phase extraction, SPE)空柱中制备成净

化柱后, 样液以一定速度通过净化柱而完成净化^[18-19]。与传统固相萃取方法相比, 该方法无需活化、淋洗和洗脱程序, 可实现一步净化, 大大提高了样品前处理效率, 且可根据基质特点灵活选择净化材料种类及用量, 具有操作简便、净化效率高等优点^[20]。目前 m-PFC 已成功应用于蔬菜^[21]、水果^[22]、茶叶^[23-24]、肉类^[25]和水产品^[26-27]中农药、兽药残留的测定, 但尚未见于水产品中麻醉剂药物残留的检测。

本研究采用自制的 m-PFC 结合 LC-MS/MS 技术, 对 m-PFC 柱净化材料进行了优化, 建立了水产品中 16 种卡因类和丁香酚类麻醉剂药物同时测定的方法, 以期为鲜活水产品中多种麻醉剂残留检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

1260 超高效液相色谱-6470 三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司); Allegra X-12R 低温高速离心机(美国贝克曼公司); IKA-T25 高速均质器、IKA-MS3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); KQ-500DB 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); ME2002E 电子天平(感量 0.01 g)、ME204E 电子天平(感量 0.01 mg)(瑞士梅特勒-托利多有限公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 材料与试剂

鲜活水产品样本来源于潮州市各大型超市。

甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 十八烷基键合硅胶吸附剂(ostade-cylsilane, C_{18})、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)(天津博纳艾杰尔有限公司); 增强型脂质去除(enhanced matrix removal-lipid, EMR-Lipid)吸附剂、Agilent ZORBAX SB- C_{18} 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm)(美国 Agilent 公司); 中性氧化铝(neutral alumina, Al-N)、硅胶(Silica)(美国 Agela 公司); 氯化钠、无水硫酸镁、甲酸铵

(分析纯, 上海麦克林生化试剂有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水; 带筛板 SPE 空柱(6 mL, 宁波鸿谱实验科技有限公司); 10 种卡因类麻醉剂及其代谢物标准品 (MS-222、苯佐卡因、间氨基苯甲酸、对氨基苯甲酸、利多卡因、丙胺卡因、辛可卡因、氯普鲁卡因、普鲁卡因胺、布比卡因)(纯度>98.0%)、6 种丁香酚类标准混合溶液(质量浓度 1000 $\mu\text{g/mL}$)(北京曼哈格公司), 各标准物质 CAS 号见表 1。

1.3 方法

1.3.1 仪器条件

色谱条件: 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱

(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm); 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$; 流速为 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL ; 流动相 A 为含 2 mmol/L 甲酸铵的 0.1% 甲酸水(正离子模式)/水(负离子模式), 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 10% B; 1.0~3.0 min, 10%~40% B; 3.0~10.0 min, 40%~90% B; 10.0~12.0 min, 90% B; 12.0~12.5 min, 90%~10% B; 12.5~17.0 min, 10% B。

质谱条件: 电喷雾电离正/负离子, 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式, 毛细管电压 3.5 kV, 离子源温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 脱溶剂温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气压力 40 psi, 脱溶剂气流量 11 L/min, 16 种麻醉剂及其代谢物的质谱参数见表 1。

表 1 16 种麻醉剂及其代谢物的质谱参数
Table 1 Mass spectrometry parameters of 16 kinds of anesthetics and metabolites

序号	化合物	CAS 号	电喷雾离子源模式	离子对(m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV
1	MS-222	886-86-2	正离子	166.0>138.1*	65	13
				166.0>94.0	65	21
2	间氨基苯甲酸	99-05-8	正离子	138.1>77.0*	125	25
				138.1>65.1	125	33
3	苯佐卡因	94-09-7	正离子	166.0>138.1*	85	13
				166.0>94.3	85	21
4	对氨基苯甲酸	150-13-0	正离子	138.1>77.1*	135	13
				138.1>94.0	135	25
5	普鲁卡因胺	51-06-9	正离子	236.1>163.1*	85	17
				236.1>120.2	85	33
6	氯普鲁卡因	133-16-4	正离子	271.1>154.2	95	33
				271.1>100.1*	95	17
7	辛可卡因	85-79-0	正离子	344.2>271.3*	125	25
				344.2>215.1	125	33
8	布比卡因	2180-92-9	正离子	289.1>140.1*	95	21
				289.1>98.0	95	45
9	丙胺卡因	721-50-6	正离子	221.2>86.1*	65	21
				221.2>136.1	65	13
10	利多卡因	137-58-6	正离子	235.2>86.1*	65	45
				235.2>58.2	65	21
11	丁香酚	97-53-0	负离子	162.9>148.0*	-75	-13
				162.9>121.0	-75	-25
12	异丁香酚	97-54-1	负离子	162.9>148.0*	-75	-13
				162.9>121.0	-75	-25
13	甲基丁香酚	93-15-2	正离子	179.0>123.0*	65	4
				179.0>138.1	65	25
14	甲基异丁香酚	93-16-3	正离子	179.0>151.1*	85	15
				179.0>164.1	85	13
15	乙酸丁香酚酯	93-28-7	正离子	207.1>165.1*	65	13
				207.1>189.1	65	4
16	乙酰基异丁香酚	93-29-8	正离子	207.1>165.1*	65	4
				207.1>137.1	65	17

注: *为定量离子。

1.3.2 标准溶液的配制

准确称取 10.0 mg 卡因类麻醉剂及其代谢物标准品于 100 mL 容量瓶中, 乙腈溶解稀释定容至刻度, 配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的卡因类及其代谢物标准储备液。准确移取 6 种丁香酚混合标准溶液 1.00 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈稀释定容至刻度, 配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的丁香酚类标准储备液。分别移取一定量的卡因类及其代谢物标准储备液和丁香酚类标准储备液, 用乙腈稀释配制成质量浓度为 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 16 种麻醉剂混合标准中间液。

1.3.3 样品前处理

取鲜活水产品的可食用部分, 捣碎后经高速均质器匀浆处理。准确称取 2.5 g (精确至 0.01 g) 均质试样, 置 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 1.0% 甲酸乙腈溶液, 剧烈振荡提取 1 min, 超声提取 10 min, 加入 1 g 氯化钠, 涡旋混合 1 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 8000 r/min 离心 5 min, 待净化。

将 150 mg PSA、150 mg EMR-Lipid、300 mg 无水硫酸镁混匀, 加入下端垫有聚四氟乙烯筛板的 6 mL SPE 空柱中, 上层用筛板压实, 得到自制的 m-PFC 净化柱。移取 3 mL 上述提取液加入到净化柱中, 柱底端接 0.22 μm 微孔滤膜, 缓慢推动注射杆, 控制流速 2~3 s/滴, 弃去初滤液 1~2 滴, 收集续滤液于进样小瓶中, 进 LC-MS/MS 仪测定。

1.4 数据处理

数据采用安捷伦液质 Masshunter 12 软件处理分析,

数据计算采用 Microsoft Excel 2018, 绘制图形采用 Origin pro 2024 软件, 样品同一实验条件平行测定 3 次。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

实验对比了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-含 2 mmol/L 甲酸铵的 0.1% 甲酸水 4 种流动相体系, 结果表明: 乙腈由于洗脱能力较强, 难以实现目标物中同分异构体的分离, 甲醇对目标物的分离效果优于乙腈; 负离子模式下, 水相中加入甲酸或甲酸铵, 丁香酚和异丁香酚均被抑制, 而甲醇-水条件下, 峰形和响应最优; 正离子模式下, 以甲醇-0.1% 甲酸水为流动相时, 10 种卡因类麻醉剂及其代谢物能较好分离, 但 4 种丁香酚类药物的响应较低, 且不能完全分离, 当选取甲醇-含 2 mmol/L 甲酸铵的 0.1% 甲酸水为流动相时, 卡因类、丁香酚类药物的同分异构体均能完全分离, 且质谱响应信号均较好。在优化的色谱条件下, 16 种麻醉剂药物的定量离子 MRM 图谱见图 1。

2.2 净化方式的优化

本研究考察了 C_{18} 、PSA、EMR-Lipid、Al-N 和 Silica 5 种吸附剂作为 m-PFC 净化材料对 16 种麻醉剂的净化效果。在空白基质(草鱼)中添加 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 16 种麻醉剂药物,

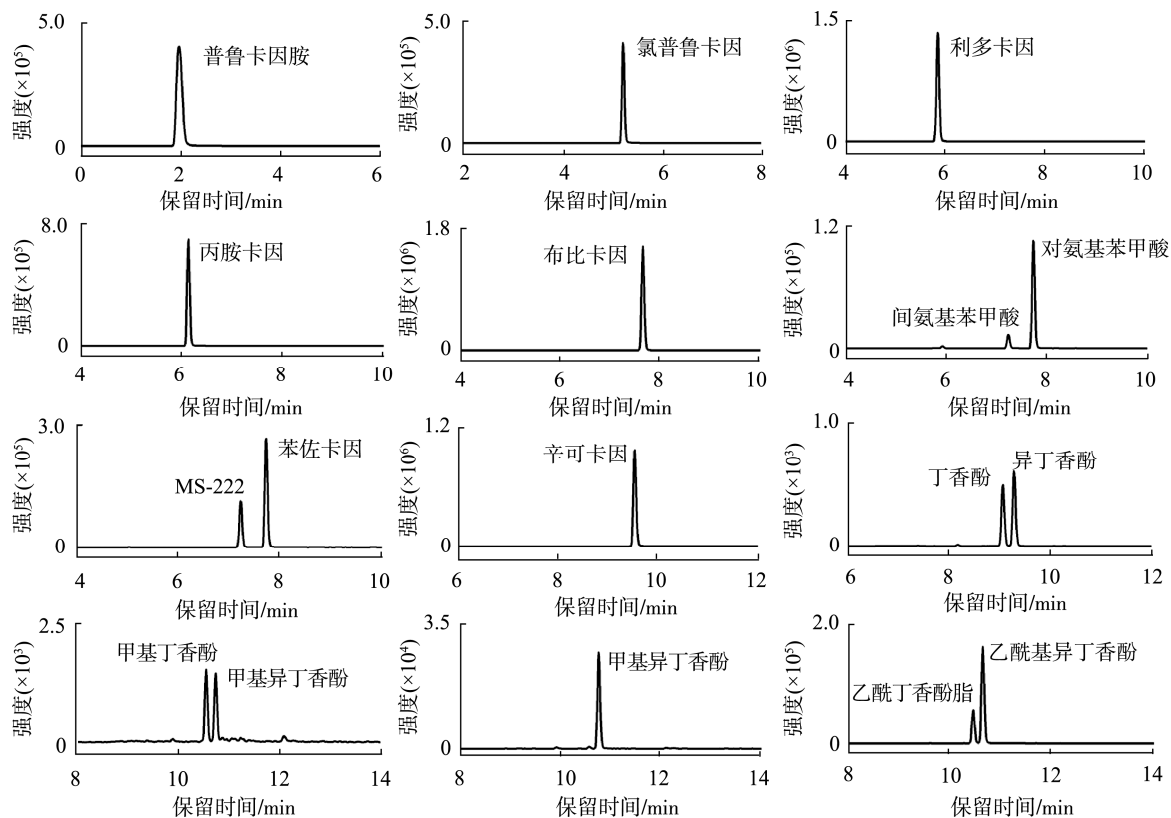


图 1 16 种麻醉剂及代谢物的定量离子 MRM 图谱

Fig.1 Quantitative ion MRM spectrums of 16 kinds of anesthetics and metabolites

分别用 200 mg 上述 5 种吸附剂及 300 mg 无水硫酸镁进行净化, 比较其回收率。结果如图 2 所示, Silica 对目标物有一定的吸附性, 其中对普鲁卡因胺、氯普鲁卡因、利多卡因、丙胺卡因和辛可卡因的吸附性较强, 其回收率均在 60% 以下。Al-N 对普鲁卡因胺、乙酸丁香酚酯和乙酰基异丁香酚有一定吸附, 回收率低于 70%。C₁₈ 对普鲁卡因胺、辛可卡因和乙酰基异丁香酚有一定吸附, 回收率分别为 67.5%、72.6% 和 70.4%。而 PSA 和 EMR-Lipid 对各目标物的回收率均较好, 介于 80.7%~111.3%。PSA 是一种弱离子交换剂, 可用于去除基质中有机酸、脂肪酸等物质^[28], EMR-Lipid 基于体积排阻和疏水相互作用机制, 能够高选择性、高效去除脂质^[29], 在本研究中表现出更好的净化效果。因此, 本研究选用 PSA 和 EMR-Lipid 吸附剂作为 m-PFC 净化填料, 并优化两者的用量, 如图 3 所示, 当 PSA 和 EMR-Lipid 用量各为 150 mg 时, 大部分化合物的回收率和净化效果达到最优, 故选用此用量。

2.3 提取溶剂的选择

卡因类和丁香酚类麻醉剂极性差异较大, 相关文献报道, 常用的甲醇和乙腈均有较好的提取效果, 而乙腈具有更好的沉淀蛋白质作用^[30]。在此基础上, 本研究分别考察了乙腈、1.0%甲酸乙腈、1.0%甲酸乙腈-水(8:2, V:V)的提取效果, 对空白鱼肉样品进行 10 μg/kg 的加标回收实验, 结果见图 4。采用乙腈提取时, 16 种麻醉剂的回收率为 74.6%~113.6%, 采用 1.0%甲酸乙腈-水(8:2, V:V)提取时, 卡因类麻醉剂的回收率虽较好, 而甲基丁香酚和甲基异丁香酚的回收率明显降低, 分别为 72.6% 和 68.7%。采用 1.0%甲酸乙腈提取时, 各目标化合物的回收率均较好, 为 81.3%~112.5%。由于卡因类麻醉剂大多为伯胺类, 加入甲酸

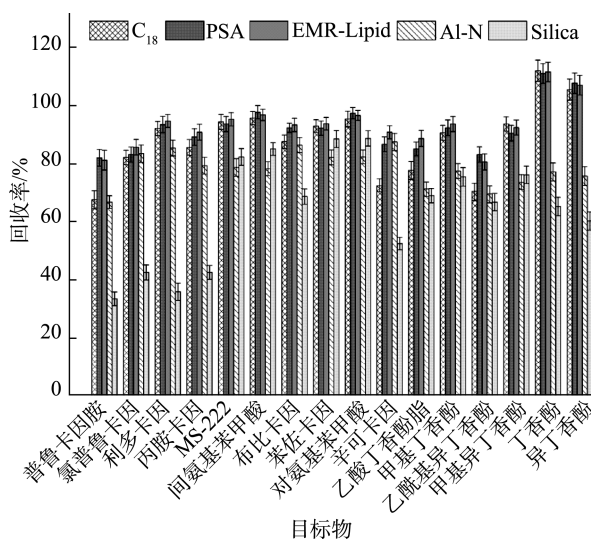


图2 不同净化材料对目标物回收率的影响($n=3$)
Fig.2 Effects of different absorption materials on recoveries of the targets ($n=3$)

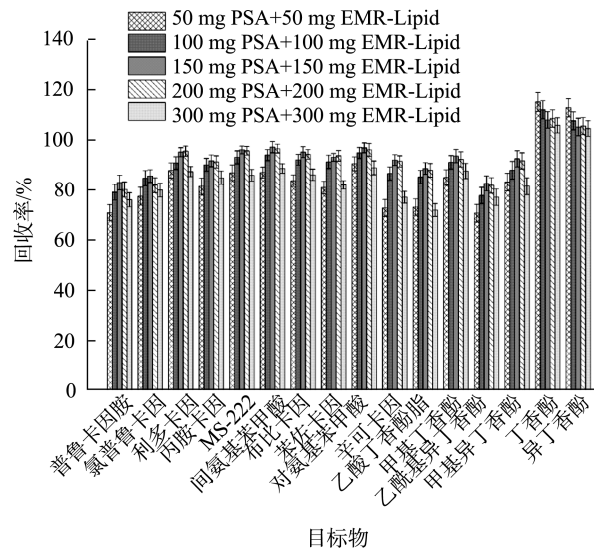


图3 不同净化剂用量对目标物回收率的影响($n=3$)
Fig.3 Effects of different absorption materials dosage on recoveries of the targets ($n=3$)

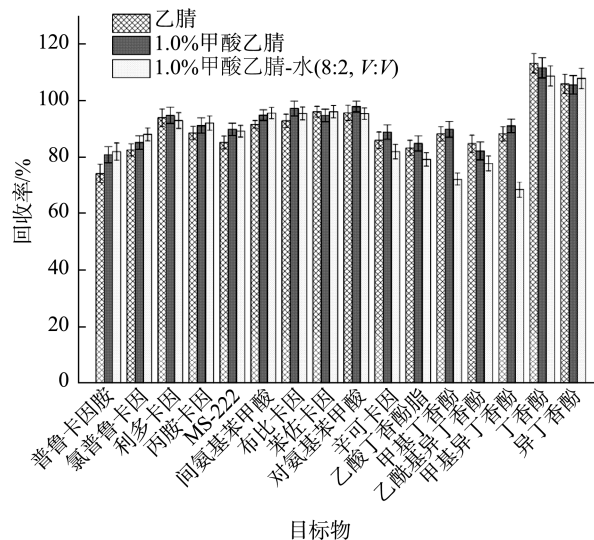


图4 不同提取溶剂条件对目标物回收率的影响($n=3$)
Fig.4 Effects of different extraction solvent conditions on recoveries of the targets ($n=3$)

有助于氨基的质子化, 提高提取效率^[10]。因此, 选择 1.0% 甲酸乙腈作为提取溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 基质效应、线性范围、检出限和定量限

分别以阴性淡水草鱼和南美对虾为基质, 经提取净化处理后得到空白基质溶液, 加入适量的麻醉剂混合标准中间液, 配制成 0.5~100.0 ng/mL 相应的基质匹配标准溶液, 并与同质量浓度的标准溶液(20%甲醇水溶液配制)一起进行仪器测定, 对 16 种目标化合物的基质效应(matrix effect, ME)进行了考察。基质匹配标准曲线的斜率为 k_1 , 溶剂标准曲线的斜率为 k_2 , $ME=k_1/k_2 \times 100\%$, ME 越接近 100%, 说明 ME 越小。16 种麻醉剂药物在两种基质中的 ME 值见表 2, ME

介于 85.3%~138.0%之间, 其中丁香酚和异丁香酚有较强的基质增强作用。因此, 为保证实验结果的准确性, 本研究采用基质匹配标准曲线进行定量。由表 2 可知, 16 种麻醉剂药物在 0.5~100.0 ng/mL 质量浓度范围内线性关系良好(其中丁香酚、异丁香酚、甲基丁香酚、甲基异丁香酚和间氨基苯甲酸为 1.0~100.0 $\mu\text{g/mL}$), 相关系数(r^2)不低于 0.996。以空白样品的 3 倍信噪比确定 LOD ($S/N=3$), 10 倍信噪比确定 LOQ ($S/N=10$), 结果见表 2, 16 种麻醉剂的方法 LODs 为 0.03~0.30 $\mu\text{g/kg}$, LOQs 为 0.10~1.00 $\mu\text{g/kg}$, 方

法灵敏度与现有文献报道相当^[11,17]。

2.4.2 方法的回收率和精密度

选取空白淡水草鱼和南美对虾两种基质进行加标实验, 分别添加低中高 3 种浓度(2.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/kg}$), 按 1.3.3 处理方法进行操作, 每个浓度平行测定 6 次, 对方法的加标回收率和精密度进行考察, 结果见表 3。16 种化合物的加标回收率范围分别在 79.3%~113.8%之间, RSDs 为 1.3%~7.2%。结果符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》对于回收率的要求。

表 2 16 种麻醉剂及其代谢物的线性方程、LODs、LOQs 和 MEs
Table 2 Linear equations, LODs, LOQs and MEs of 16 kinds of anesthetics and metabolites

化合物	基质	线性方程	相关系数(r^2)	LODs/ $(\mu\text{g/kg})$	LOQs/ $(\mu\text{g/kg})$	MEs/%
普鲁卡因胺	草鱼	$Y=1.01 \times 10^4 X - 3.32 \times 10^3$	0.9974	0.15	0.50	92.7
	南美对虾	$Y=1.03 \times 10^4 X - 3.16 \times 10^3$	0.9978			94.5
氯普鲁卡	草鱼	$Y=1.02 \times 10^4 X - 1.17 \times 10^3$	0.9962	0.15	0.50	94.6
	南美对虾	$Y=1.01 \times 10^4 X + 2.68 \times 10^3$	0.9971			93.7
利多卡因	草鱼	$Y=4.65 \times 10^4 X + 7.70 \times 10^4$	0.9988	0.03	0.10	97.0
	南美对虾	$Y=4.78 \times 10^4 X + 4.39 \times 10^4$	0.9990			99.7
丙胺卡因	草鱼	$Y=2.52 \times 10^4 X + 1.75 \times 10^4$	0.9995	0.10	0.30	96.6
	南美对虾	$Y=2.57 \times 10^4 X + 8.32 \times 10^3$	0.9994			98.5
MS-222	草鱼	$Y=6.15 \times 10^3 X - 223$	0.9997	0.15	0.50	97.8
	南美对虾	$Y=6.38 \times 10^3 X - 956$	0.9996			101.0
间氨基苯甲酸	草鱼	$Y=1.38 \times 10^3 X - 323$	0.9998	0.30	1.00	98.5
	南美对虾	$Y=1.41 \times 10^3 X - 915$	0.9997			101.0
布比卡因	草鱼	$Y=7.04 \times 10^4 X + 1.83 \times 10^3$	0.9996	0.03	0.10	99.7
	南美对虾	$Y=6.80 \times 10^4 X + 5.16 \times 10^4$	0.9996			96.3
苯佐卡因	草鱼	$Y=1.35 \times 10^4 X + 6.49 \times 10^3$	0.9994	0.10	0.30	99.3
	南美对虾	$Y=1.41 \times 10^4 X - 6.05 \times 10^3$	0.9998			104.0
对氨基苯甲酸	草鱼	$Y=1.07 \times 10^4 X + 3.14 \times 10^3$	0.9996	0.10	0.30	97.0
	南美对虾	$Y=1.11 \times 10^4 X - 5.03 \times 10^3$	0.9997			101.0
辛可卡因	草鱼	$Y=4.44 \times 10^4 X + 5.01 \times 10^3$	0.9968	0.03	0.10	97.4
	南美对虾	$Y=4.22 \times 10^4 X + 1.08 \times 10^4$	0.9998			92.6
丁香酚	草鱼	$Y=1.32 \times 10^2 X + 173$	0.9984	0.30	1.00	129.0
	南美对虾	$Y=1.41 \times 10^2 X + 209$	0.9988			138.0
异丁香酚	草鱼	$Y=3.28 \times 10^2 X + 10.2$	0.9993	0.30	1.00	126.0
	南美对虾	$Y=3.37 \times 10^2 X - 17.8$	0.9998			129.0
甲基丁香酚	草鱼	$Y=3.63 \times 10^2 X + 89.8$	0.9991	0.30	1.00	88.7
	南美对虾	$Y=3.80 \times 10^2 X - 38.2$	0.9996			92.8
甲基异丁香酚	草鱼	$Y=2.43 \times 10^3 X + 132$	0.9996	0.30	1.00	85.3
	南美对虾	$Y=2.50 \times 10^3 X - 53.7$	0.9992			87.8
乙酸丁香酚酯	草鱼	$Y=2.85 \times 10^3 X + 2.58 \times 10^3$	0.9962	0.15	0.50	93.4
	南美对虾	$Y=2.65 \times 10^3 X + 6.05 \times 10^3$	0.9980			86.8
乙酰基异丁香酚	草鱼	$Y=4.51 \times 10^3 X - 1.28 \times 10^3$	0.9978	0.15	0.50	90.8
	南美对虾	$Y=4.35 \times 10^3 X + 5.32 \times 10^3$	0.9998			87.6

注: 检出限(limit of detection, LOD), 定量限(limit of quantitation, LOQ)。

表 3 16 种麻醉剂及其代谢物在 2 种水产品基质中的添加回收率和精密度($n=6$)Table 3 Recoveries and precision of 16 kinds of anesthetics and metabolites into 2 kinds of aquatic products ($n=6$)

化合物	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	淡水草鱼		南美对虾		化合物	加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	淡水草鱼		南美对虾	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%			回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
普鲁卡因胺	2.0	82.6	3.1	82.1	2.6	对氨基苯甲酸	2.0	96.4	2.0	96.8	2.2
	10.0	83.5	3.7	83.3	3.1		10.0	98.1	1.3	97.3	2.5
	50.0	82.9	2.8	85.2	3.5		50.0	97.5	1.7	99.5	1.7
氯普鲁卡因	2.0	84.8	3.4	80.9	4.7	辛可卡因	2.0	88.7	3.5	92.7	2.2
	10.0	86.1	3.2	87.6	3.7		10.0	92.7	2.3	95.0	2.7
	50.0	85.0	3.0	85.8	3.5		50.0	91.6	3.8	96.3	2.5
利多卡因	2.0	94.1	2.8	92.2	3.3	丁香酚	2.0	113.8	6.1	112.2	7.2
	10.0	93.4	3.1	93.5	3.1		10.0	109.0	4.4	107.3	5.6
	50.0	93.7	2.6	96.0	2.4		50.0	110.6	4.8	105.7	5.6
丙胺卡因	2.0	90.4	3.4	87.8	3.8	异丁香酚	2.0	107.2	3.8	105.9	4.8
	10.0	91.2	2.0	90.2	3.5		10.0	106.3	3.6	101.4	4.3
	50.0	92.1	2.7	91.2	4.7		50.0	105.5	7.1	99.6	5.3
MS-222	2.0	95.3	2.8	94.9	3.6	甲基丁香酚	2.0	91.5	3.5	89.4	3.8
	10.0	96.4	2.4	97.3	3.4		10.0	91.6	3.3	93.7	4.2
	50.0	96.3	2.7	96.8	2.6		50.0	93.2	3.3	92.1	4.0
间氨基苯甲酸	2.0	95.6	2.6	97.2	1.6	甲基异丁香酚	2.0	89.0	3.9	85.7	3.1
	10.0	98.1	1.9	98.2	1.5		10.0	90.4	3.1	92.8	2.8
	50.0	96.4	2.3	97.6	1.8		50.0	92.3	6.6	90.5	4.0
布比卡因	2.0	95.3	2.3	94.7	2.1	乙酸丁香酚酯	2.0	83.1	6.9	82.8	4.4
	10.0	97.0	2.4	97.1	1.3		10.0	86.8	3.6	85.3	4.8
	50.0	95.7	2.0	95.5	2.8		50.0	85.0	3.8	83.6	5.6
苯佐卡因	2.0	92.8	2.3	96.2	3.8	乙酰基异丁香酚	2.0	81.5	3.5	79.3	4.6
	10.0	95.3	1.9	97.4	2.1		10.0	83.5	3.7	83.6	3.6
	50.0	93.2	2.1	98.3	2.3		50.0	80.5	6.2	83.0	3.2

注: 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

2.4.3 与已报道方法的比较

与已报道方法的比较, 结果见表 4。本方法灵敏度与文献[11,17]相当, 高于文献[12], 更具优势在于有机试剂用量少(5 mL), 前处理耗时 22 min, 省去了氮吹浓缩及复溶的步骤。因此, 本方法具有简单、环保、灵敏等优点。

2.5 实际样品检测

采集市售的草鱼、黑鱼、鲈鱼、鳊鱼、鲫鱼、花鲢、桂鱼、南美对虾、沼虾、小龙虾等常见水产品 100 份, 应用本方法进行麻醉剂药物残留检测。结果检出丁香酚 9 份(包括草鱼 5 份、花鲢 2 份、鲫鱼 1 份、鲈鱼 1 份), 含量范围

表 4 本方法与已报道的水产品中麻醉剂检测方法的比较

Table 4 Comparison of the proposed method with the other reported methods for the determination of anesthetics in aquatic products

样品基质	检测化合物	检测方法	前处理方法	前处理时间 /min	有机试剂用量 /mL	LODs ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	文献
鱼、虾和螃蟹	18 种卡因类	LC-MS/MS	固相萃取	60	11	0.2~0.4	[11]
鱼和虾	6 种丁香酚类	LC-MS/MS	QuEChERS	30	5	0.5~1.5	[12]
鱼	6 种丁香酚和 MS-222	LC-MS/MS	分散固相萃取	20	10	0.02~0.40	[17]
鱼和虾	10 种卡因类和 6 种丁香酚类	LC-MS/MS	m-PFC	22	5	0.03~0.30	本方法

为 7.6~353.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在 1 份鲈鱼中检出苯佐卡因, 含量为 29.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其余均未检出。

3 结 论

本研究建立了 m-PFC 净化-LC-MS/MS 同时测定水产品中 16 种卡因类和丁香酚类麻醉剂药物。样品前处理操作简便、耗时短、有机试剂消耗少, 方法学验证表明该方法具有较好的线性关系和重现性, 较高的灵敏度和准确度, 可用于鲜活水产品中卡因类和丁香酚类麻醉剂药物残留的快速筛查和定量分析。

参考文献

- [1] 谢晶, 曹杰. 渔用麻醉剂在鱼类麻醉保活运输中应用的研究进展[J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(1): 189-196.
XIE J, CAO J. Research progress on application of fishing anesthetic in fish anesthesia keep-alive transportation [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2021, 30(1): 189-196.
- [2] 苏明明, 孙兴权, 杨春光, 等. 渔用麻醉剂 MS-222、丁香酚在鲜活水产品运输中的应用及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(1): 25-29.
SU MM, SUN XQ, YANG CG, *et al.* Progress of the research and application of fish anesthetics MS-222 and eugenolon in fresh seafoods transportation [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(1): 25-29.
- [3] 金元, 何雅静, 程波, 等. 丁香酚类麻醉剂的安全性探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 33-40.
JIN Y, HE YJ, CHENG B, *et al.* Research on safety of eugenol derivatives anesthetics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(1): 33-40.
- [4] 方晓磊, 柯常亮, 刘奇, 等. 水产品中丁香酚残留的人体健康风险分析[J]. 水产科学, 2018, 37(1): 140-144.
FANG XL, KE CL, LIU Q, *et al.* 2018. Human health risk evaluation of eugenol residues in fish [J]. Fisheries Science, 2018, 37(1): 140-144.
- [5] 李晋成, 刘欢, 王群, 等. 水产品中丁香酚的残留风险评估研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(11): 3598-3602.
LI JC, LIU H, WANG Q, *et al.* Progress in risk assessment of eugenol residues in aquatic products [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(11): 3598-3602.
- [6] 王彩霞, 熊光权, 白婵, 等. 渔用麻醉剂检测方法及残留安全性评价研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(1): 51-56.
WANG CX, XIONG GQ, BAI C, *et al.* Research progress of detection methods and residual safety evaluation of fish sedatives [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(1): 51-56.
- [7] WAGNER E, ARNDT R, HILTON B. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide [J]. Aquaculture, 2002, 211(1/2/3/4): 353-366.
- [8] 周纯洁, 程辉跃. 卡因类非法添加物检测技术研究进展[J]. 中国药业, 2023, 32(19): 1-6.
ZHOU CJ, CHENG HY. Research progress on the detection technology of caine-type illegal additives [J]. China Pharmaceuticals, 2023, 32(19): 1-6.
- [9] 潘洪民, 蒋乐霞, 张长峰, 等. 渔用麻醉剂研究进展与安全性评价[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(10): 136-143.
PAN HM, JIANG LX, ZHANG CF, *et al.* Research progress and safety evaluation of fishery anesthetics [J]. Storage and Process, 2021, 21(10): 136-143.
- [10] 石芳, 寿旦, 金米聪, 等. 分散固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中 7 种麻醉剂[J]. 色谱, 2022, 40(2): 139-147.
SHI F, SHOU D, JIN MC, *et al.* Dispersive solid-phase extraction combined with high-performance liquid chromatography for determination of seven anesthetics in aquatic products [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(2): 139-147.
- [11] 吴少明, 陈言凯, 刘文菁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中 18 种卡因类麻醉剂的残留量[J]. 食品科技, 2023, 48(1): 285-291.
WU SM, CHEN YH, LIU WJ, *et al.* Determination of 18 caine anesthetic residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science and Technology, 2023, 48(1): 285-291.
- [12] 林晨, 吴敏, 王凯, 等. QuEChERS-超高压液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中的 6 种丁香酚类麻醉剂[J]. 食品科学, 2023, 44(8): 324-329.
LIN C, WU M, WANG K, *et al.* Simultaneous determination of eugenol and its five derivatives in aquatic products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction [J]. Food Science, 2023, 44(8): 324-329.
- [13] 陈焕, 黄和, 高平, 等. 分散固相萃取-气相色谱法同时测定水产品中六种丁香酚类麻醉剂的残留量[J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 88-92.
CHEN H, HUANG H, GAO P, *et al.* Determination of six clove phenol drug residues in aquatic products by gas chromatography with dispersive solid-phase extraction [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 88-92.
- [14] 赵莹, 尹丹阳, 王玮, 等. 通过式固相萃取-气相色谱-三重四极杆串联质谱法同时测定淡水鱼中 14 种麻醉剂的残留量[J]. 理化检验-化学分册, 2022, 58(10): 1130-1136.
ZHAO Y, YIN DY, WANG W *et al.* Simultaneous determination of residues of 14 kinds of anesthetics in freshwater fish by gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry with pass-through solid phase extraction [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2022, 58(10): 1130-1136.
- [15] 杨建英, 朱虹, 徐宁, 等. QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱法测定护肤品中的 21 种麻醉剂[J]. 分析测试学报, 2023, 42(2): 189-196.
YANG JY, ZHU H, XU N, *et al.* Determination of 21 kinds of anesthetics in skin care products by QuEChERS/high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(2): 189-196.
- [16] 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 kinds of eugenol residues in aquatic products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Science, 2020, 41(16): 320-326.
- [17] 周华, 黄琴, 吴香伦, 等. 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法快速同时测定淡水鱼中 7 种渔用麻醉剂和 2 种镇静剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(4): 522-528.
ZHOU H, HUANG Q, WU XL, *et al.* Rapid and simultaneous

- determination of 7 kinds of fishery anesthetics and 2 kinds of sedatives in freshwater fish by dispersive solid phase extraction liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2023, 35(4): 522–528.
- [18] 张鹏, 彭菲, 刘玮琦, 等. 快速滤过型净化法应用于气相色谱-串联质谱检测大豆中农药残留[J]. *大豆科学*, 2023, 42(4): 466–472.
ZHANG P, PENG F, LIU WQ, *et al.* Detection of pesticide residues in soybean by multi-plug filtration cleanup combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Soybean Science*, 2023, 42(4): 466–472.
- [19] 王献礼, 饶钦雄, 张其才, 等. 快速滤过型净化结合超高效液相色谱-串联质谱法测定中华绒螯蟹中 14 种全氟烷基化合物[J]. *色谱*, 2023, 41(12): 1095–1105.
WANG XL, RAO QX, ZHANG QC, *et al.* Determination of 14 perfluoroalkyl substances in Chinese mitten crab by multi-plug filtration cleanup coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(12): 1095–1105.
- [20] 陈兴连, 林涛, 方海仙, 等. 快速滤过型净化结合超高效液相色谱-串联质谱法测定姬松茸中农药残留[J]. *农药*, 2023, 62(9): 657–663.
CHEN XL, LIN T, FANG HX, *et al.* Determination of pesticide residues in agaricus blazei by rapid filtration cleanup combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Agrochemicals*, 2023, 62(9): 657–663.
- [21] 孟志娟, 黄云霞, 邸鹏月, 等. 快速滤过型净化法结合气相色谱-四极杆-飞行时间质谱同时筛查果蔬中 234 种农药残留[J]. *食品科学*, 2020, 41(16): 272–285.
MENG ZJ, HUANG YX, DI PY, *et al.* Rapid screening of 234 pesticide residues in vegetables and fruits by multi-plug filtration cleanup method combined with gas chromatography-quadrupole time of flight mass spectrometry [J]. *Food Science*, 2020, 41(16): 272–285.
- [22] WANG Y, HUAGN T, ZHANG T, *et al.* Residue levels and dietary intake risk assessments of 139 pesticides in agricultural produce using the m-PFC method based on SBA-15-C₁₈ with GC-MS/MS [J]. *Molecules*, 2023, 28(6): 2480.
- [23] SONG L, ZENG WB, LI A, *et al.* Automated multi-plug filtration cleanup method for analysis of 48 pesticide residues in green tea using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Control*, 2022, 131: 108436.
- [24] DONG XQ, LAN T, TIAN X, *et al.* Simultaneous determination of 14 pesticide residues in tea by multi-plug filtration cleanup combined with LC-MS/MS [J]. *Journal of Environmental Science and Health: Part B*, 2021, 56(8): 771–781.
- [25] WANG X, ZHAO Q, ZHAO Z, *et al.* A multi-plug filtration (m-PFC) cleanup method based on carboxylic multi-walled carbon nanotubes for the detection of 14 perfluorinated compounds and dietary risk assessment of chicken, beef, and mutton collected from Shanghai markets [J]. *Food Control*, 2021, 130: 108330.
- [26] 潘永波, 万娜, 王承业, 等. 快速滤过型净化结合液相色谱-质谱联用法测定海产品中 19 种磺胺类药物残留[J]. *食品工业科技*, 2023, 44(7): 320–328.
PAN YB, WAN N, WANG CY, *et al.* Determination of 19 sulfonamides residues in seafood by multi-plug filtration cleanup method combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(7): 320–328.
- [27] 高晓敏, 王磊钢, 马智玲, 等. 快速滤过型净化法结合超高效液相色谱-串联质谱同时检测水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(24): 249–255.
GAO XM, WANG JG, MA ZL, *et al.* Simultaneous determination of malachite green and crystal violet residues in aquatic products by multi-plug filtration cleanup method combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food and Fermentation Industry*, 2021, 47(24): 249–255.
- [28] 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]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(18): 7214–7221.
- [29] 申雷, 柳溪, 羊银, 等. Captiva EMR-Lipid 技术结合液相色谱-串联质谱法测定畜禽肉及内脏中 4 种抗生素残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(11): 220–229.
SHEN L, LIU X, YANG Y, *et al.* Determination of 4 kinds of antibiotics residues in meat and viscera of livestock and poultry by Captiva EMR-Lipid technology combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(11): 220–229.
- [30] 吴少明, 欧阳立群, 孟鹏, 等. 固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定畜肉中 18 种卡因类麻醉剂[J]. *色谱*, 2023, 41(5): 434–442.
WU SM, OUYANG LQ, MENG P, *et al.* Determination of 18 kinds of caine anesthetics in animal meat using solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2023, 41(5): 434–442.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)