

超高效液相色谱-串联质谱法测定水产养殖用非规范药品及水中扑草净、阿维菌素和伊维菌素的残留量

陈永平¹, 包艳^{2*}, 许文龙², 成振华¹, 王辉¹, 韩现芹¹, 时文博¹, 王愿宁¹

(1. 天津市农业生态环境监测与农产品质量检测中心, 天津 300193;

2. 中国科学院 青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101)

摘要: 取水产养殖用非规范药品样品 1.00 g, 加入 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 扑草净- d_6 (内标) 溶液 10 μL 和水 20 mL, 其中固态样品经均质、超声处理后离心 5 min, 液态样品经涡旋振荡混匀后离心 5 min, 均取上清液用水定容至 100 mL; 养殖水样经 0.45 μm 滤膜过滤, 取滤液 200 mL, 加入 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 扑草净- d_6 溶液 10 μL , 振荡混匀。将上述样品溶液过 NPO HLB 固相萃取柱 (预先用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化), 用 5 mL 水淋洗, 用 6 mL 甲醇洗脱, 将洗脱液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至近干, 加入体积比 3:7 的甲醇-含 0.1% (体积分数, 下同) 甲酸的 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液混合液 1.0 mL 复溶, 经涡旋、超声振荡、离心、过滤后, 采用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定其中扑草净、阿维菌素和伊维菌素的残留量。以 Waters ACQUITY UPLC C_{18} 柱为固定相, 以不同体积比的甲醇-含 0.1% 甲酸的 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液混合液为流动相进行梯度洗脱, 质谱分析采用电喷雾离子 (ESI) 源, 正离子 (ESI⁺) 扫描及多反应监测模式, 内标法定量。结果表明: 扑草净标准曲线的线性范围为 $0.2 \sim 15.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 阿维菌素、伊维菌素标准曲线的线性范围为 $2.0 \sim 150.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 非规范药品样品中检出限 (3S/N) 分别为 0.2, 2.0, 2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 水样中检出限 (3S/N) 分别为 1.0, 10, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按照标准加入法进行回收试验, 回收率为 84.8%~105%, 测定值的相对标准偏差 ($n=6$) 小于 9.0%。方法用于分析 80 个实际样品, 结果显示, 1 个非规范药品样品中检出阿维菌素, 其残留量为 $718 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 1 个水样中检出扑草净, 其残留量为 $3.2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: 水产养殖; 非规范药品; 水; 超高效液相色谱-串联质谱法; 扑草净; 阿维菌素; 伊维菌素

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2023)09-1021-07

在养殖用地不断收缩、因地下水开采限制需养殖用水循环使用的形势下, 为了满足人们日益增长的水产品的需求, 水产品高密度养殖成为增加产品供应量的主要途径之一。其中, 闭环养殖是高密度养殖的常见模式, 但闭环养殖易导致水质恶化和水生生物疾病频发, 从而加剧药物控制的依赖。促生长剂、杀虫剂、除杂剂和环境改良剂等非规范药品因具有抗病、杀虫、除草、促生长等功能, 备受养殖者的青睐。有些养殖者专门用扑草净清除养殖水体中的丝

状藻类、大型草类及有毒藻类^[1-2], 用阿维菌素、伊维菌素杀灭单养和混养池塘水体中、增殖水体中, 以及与鱼体表寄生的锚头蚤、中华蚤、鱼鲺、线虫、指环虫、三代虫等寄生虫及松藻虫、水蜈蚣等水生昆虫等^[3-5], 致使渔业养殖水环境受到扑草净、阿维菌素、伊维菌素等残留污染。非规范药品残留会对水生生物及浮游生物产生严重影响, 也会通过食物链富集。当人类食用含有扑草净的水产品后, 会引起人体免疫系统、生殖系统、内分泌系统和神经系统异常^[6-7]; 食用少量阿维菌素、伊维菌素会产生运动失调、呼吸缓慢、DNA 损伤等, 过量会导致重度昏迷甚至死亡^[8-11]。农业农村部制定《2020 年水产养殖用兽药及其他投入品安全隐患排查计划》, 加大了对水产养殖用非规范药品中药物的监督及排查力度。由于非

收稿日期: 2022-08-19

作者简介: 陈永平, 高级工程师, 主要从事农业生态环境监测与农产品质量安全检测工作

* 通信联系人。baoyan@qibebt.ac.cn

规范药品为新型投入品,相关学者对其中药物检测技术研究较少,尚无检测标准或方法依据可参考,这给非规范药品中药物的监督、监测造成较大困难,因此开发非规范药品中药物检测技术十分必要。

目前阿维菌素的主要检测方法有酶联免疫吸附测定法^[12-14]、液相色谱法^[15-22]和液相色谱-串联质谱法^[23-30],液相色谱法灵敏度低,干扰影响因素多,而采用荧光检测器时涉及衍生化处理,操作复杂,而高效液相色谱-串联质谱法具有高选择性和高灵敏度,应用较为广泛。扑草净的测定方法主要有高效液相色谱法^[31-32]、液相色谱-串联质谱法^[33]、气相色谱法^[34]、气相色谱-质谱法^[35-36]和酶联免疫吸附测定法^[1]等,但水产养殖用非规范药品及水中上述药物的同时测定方法还未见报道。鉴于此,本工作采用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产养殖用非规范药品及水中扑草净、阿维菌素和伊维菌素的残留量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

AB 5500 Qtrap 型三重四极杆质谱仪;SHIMADU LC-30AD 型超高效液相色谱仪;SIMGA 3-18KS 型高速冷冻离心机;IKA-T25 型高速组织匀浆机;MS1 Mini-shaker 型涡轮振荡器;Milli-Q 型纯水器;NPO HLB 固相萃取柱(6 mL/500 mg)。

单标准储备溶液:100 mg·L⁻¹,准确称取扑草净、阿维菌素、伊维菌素标准品各 10 mg,分别用甲醇溶解并定容至 100 mL,配制成质量浓度为 100 mg·L⁻¹的单标准储备溶液,于-18℃避光保存。同法配制内标(扑草净-d₆)储备溶液。

混合标准溶液:取扑草净标准储备溶液0.1 mL,阿维菌素、伊维菌素标准储备溶液各 1.0 mL,用含 0.1%(体积分数,下同)甲酸的 2 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液溶解并定容至 100 mL,配制成扑草净质量浓度为 0.1 mg·L⁻¹,阿维菌素、伊维菌素的质量浓度均为 1.0 mg·L⁻¹的混合标准溶液。

内标溶液:1.0 mg·L⁻¹,移取内标储备溶液 1.0 mL,用含 0.1%甲酸的 2 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液稀释并定容至 100 mL,配制成质量浓度为 1.0 mg·L⁻¹的内标溶液。

混合标准溶液系列:移取适量的混合标准溶液以及内标溶液,用含 0.1%甲酸的 2 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液稀释,配制成扑草净的质量浓度为 0.2,

0.5,1.0,2.0,5.0,10.0,15.0 μg·L⁻¹,阿维菌素、伊维菌素的质量浓度为 2.0,5.0,10.0,20.0,50.0,100.0,150.0 μg·L⁻¹,内标质量浓度均为 10 μg·L⁻¹的混合标准溶液系列。

扑草净、阿维菌素、伊维菌素、扑草净-d₆ 标准品的纯度不小于 98%;甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵均为色谱纯;试验用水为超纯水。

1.2 仪器工作条件

1.2.1 色谱条件

Waters ACQUITY UPLC C₁₈ 色谱柱(100.0 mm×2.1 mm,1.7 μm);流量 0.2 mL·min⁻¹;柱温 40℃;进样体积 5.0 μL;流动相 A 为含 0.1%甲酸的 2 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液,B 为甲醇。梯度洗脱程序:0~6.0 min 时,B 由 30%降至 0,保持 4.0 min;10.0~10.1 min 时,B 由 0 跳转至 30%,保持 2.9 min。

1.2.2 质谱条件

电喷雾离子(ESI)源,正离子(ESI⁺)扫描模式;离子源温度 550℃;气帘气压力 138 kPa;碰撞诱导解离(CAD)设置 Medium;喷雾电压 4 500 V;辅助气 1 压力 344 kPa;辅助气 2 压力 344 kPa;多反应监测(MRM)模式。其他质谱参数见表 1,其中“*”代表定量离子。

表 1 质谱参数
Tab. 1 MS parameters

化合物	保留时间/ min	质荷比(m/z)		去簇电压/碰撞能量/ V eV	
		母离子	子离子		
扑草净	2.27	242.0	200.1,158.0*	85,85	24,31
阿维菌素	5.40	890.5	305.1*,145.0	95,95	33,58
伊维菌素	7.67	982.5	569.4,307.3*	85,85	35,35
扑草净-d ₆	2.24	248.0	206.0*	85	24

1.3 试验方法

1.3.1 样品的前处理

水产养殖用非规范药品固态样品处理:准确称取水产养殖用非规范药品固态样品 1.00 g,加入 1.0 mg·L⁻¹扑草净-d₆ 溶液 10 μL 和水 20 mL,经均质、超声处理后离心 5 min,取上清液用水定容至 100 mL。

水产养殖用非规范药品液态样品处理:准确称取水产养殖用非规范药品液态样品 1.00 g,加入 1.0 mg·L⁻¹扑草净-d₆ 溶液 10 μL 和水 20 mL,经涡旋振荡混匀后离心 5 min,取上清液用水定容至 100 mL。

养殖水样品处理:养殖水样品经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,取滤液 $200\ \text{mL}$,然后加入 $1.0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 扑草净- d_6 溶液 $10\ \mu\text{L}$,振荡混匀。

1.3.2 样品的净化

用 $5\ \text{mL}$ 甲醇、 $5\ \text{mL}$ 水活化 NPO HLB 固相萃取柱,充分浸润填料,以清洗固相萃取柱上的干扰杂质以及溶剂残留。将 $100\ \text{mL}$ 待净化的样品溶液以 $1\ \text{滴/s}$ 的流量过已活化的 NPO HLB 固相萃取柱,用 $5\ \text{mL}$ 水淋洗。用洗耳球将固相萃取柱内的淋洗液吹干,然后用 $6\ \text{mL}$ 甲醇洗脱于 $15\ \text{mL}$ 离心管中,再用洗耳球吹干。将洗脱液于 $40\ ^\circ\text{C}$ 氮吹至近干,加入体积比 $3:7$ 的甲醇-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液(定容溶剂) $1.0\ \text{mL}$,涡旋 $1\ \text{min}$,超声振荡 $1\ \text{min}$,转入 $1.5\ \text{mL}$ 离心管中,以转速 $20\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $5\ \text{min}$,所得溶液过 $0.2\ \mu\text{m}$ 滤膜,按照仪器工作条件测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

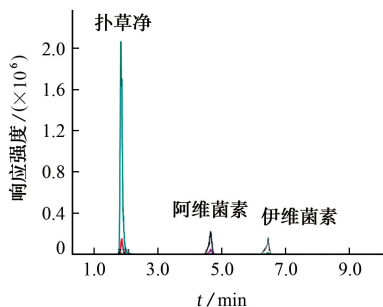
2.1.1 流动相

为同时使扑草净、阿维菌素、伊维菌素获得理想的灵敏度与分离效果,试验选取了乙腈-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液、甲醇-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液、甲醇-水、乙腈-水等 4 种不同的流动相体系进行对比。结果表明,与甲醇-水、乙腈-水流动相体系相比,乙腈-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液、甲醇-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液流动相体系可明显提高离子化程度,在同等条件下,甲醇-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液作为流动相体系时目标物的信号更强,因此试验选择甲醇-含 0.1% 甲酸的 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵溶液作为流动相体系。

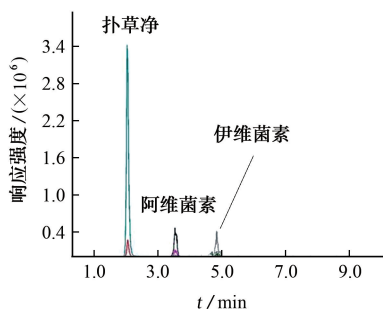
2.1.2 色谱柱

保持其他条件不变,试验考察了 Shim-pack XR-ODS C_8 柱($75.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 2.2\ \mu\text{m}$)、Thermo C_{18} 柱($100.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 5.0\ \mu\text{m}$)和 Waters ACQUITY UPLC C_{18} 柱($100.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 1.7\ \mu\text{m}$)等不同色谱柱对目标物分离效果的影响,结果见图 1。

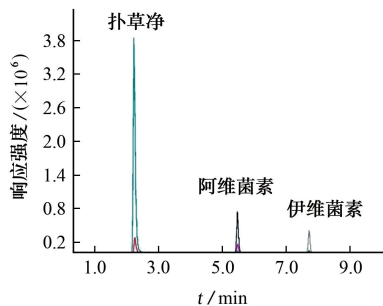
由图 1 可知:以 Shim-pack XR-ODS C_8 柱作为分离柱,阿维菌素、伊维菌素峰形较差,响应强度较低;以 Thermo C_{18} 柱作为分离柱,阿维菌素、伊维菌素半峰宽较宽,响应强度较低;以 Waters ACQUITY



(a) Shim-pack XR-ODS C_8 柱
($75.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 2.2\ \mu\text{m}$)



(b) Thermo C_{18} 柱($100.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 5.0\ \mu\text{m}$)



(c) Waters ACQUITY UPLC C_{18} 柱
($100.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 1.7\ \mu\text{m}$)

图 1 不同色谱柱下目标物的分离效果

Fig. 1 Separation effect of targets on different chromatographic columns

UPLC C_{18} 柱作为分离柱,目标物峰形好,响应强度高。因此,试验选择 Waters ACQUITY UPLC C_{18} 柱($100.0\ \text{mm}\times 2.1\ \text{mm}, 1.7\ \mu\text{m}$)作为色谱分离柱。

2.2 扫描模式的选择

为获得扑草净、阿维菌素、伊维菌素较理想的信号强度,比较了 ESI^+ 与电喷雾离子源负离子(ESI^-)扫描模式下目标物的响应强度。结果表明:在 ESI^- 扫描模式下,阿维菌素、伊维菌素响应强度较低,按不小于 3 倍信噪比(S/N)计算,扑草净的检出限为 $5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,阿维菌素、伊维菌素的检出限为 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;在 ESI^+ 扫描模式下,以体积比

3 : 7 的甲醇-含 0.1% 甲酸的 2 mmol · L⁻¹ 乙酸铵溶液作为定容溶剂,各目标物母离子[M+NH₄]⁺ 响应强度增大,按不小于 3 倍信噪比计算,扑草净的检出限可达到 0.2 μg · kg⁻¹,阿维菌素、伊维菌素的检出限可达到 2.0 μg · kg⁻¹。因此,试验选择 ESI⁺ 模式扫描。

2.3 固相萃取柱的选择

试验分别以 NPO HLB 柱、Waters OASIS HLB 柱和 CNW HLB 柱等 3 个品牌 HLB 固相萃取柱(500 mg/6 mL)作为目标物净化提取柱,考察了不同 HLB 固相萃取柱对非规范药品中 3 种目标物的提取效果,结果见图 2。

结果表明:在相同条件下,Waters OASIS HLB 柱净化效果较好,但过柱时间长;NPO HLB 柱过柱速率最快,回收效果好,但柱净化效果稍差;CNW HLB 柱过柱速率较快,净化效果较好,但回收效果不理想。综合考虑,大批量样品处理采用 NPO HLB 柱作为固相萃取柱,同时满足高效、准确度高的要求。

2.4 标准曲线、检出限和测定下限

按仪器工作条件测定混合标准溶液系列,扑草

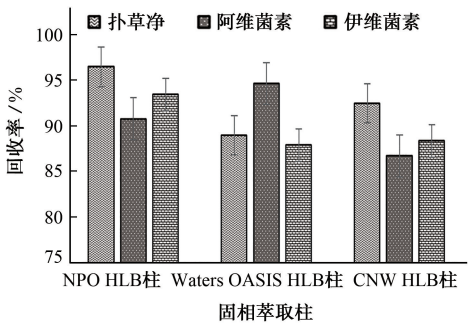


图 2 不同固相萃取柱下非规范药品中 3 种目标物的回收率
Fig. 2 Recovery of 3 targets in non-standard drugs by different solid phase extraction columns

净、阿维菌素、伊维菌素均以扑草净-d₆ 为内标,用仪器自带工作站按内标法进行自动计算,以目标物质量浓度与内标质量浓度的比值为横坐标,以目标物峰面积与内标峰面积的比值为纵坐标绘制标准曲线。所得目标物的线性范围、线性回归方程和相关系数见表 2。按不小于 3 倍信噪比分别计算非规范药品和水样中各目标物的检出限,按不小于 10 倍信噪比分别计算非规范药品和水样中各目标物的测定下限,结果见表 2。

表 2 线性参数、检出限和测定下限

Tab. 2 Linearity parameters, detection limits and lower limits of determination

化合物	线性范围 ρ/ (μg · L ⁻¹)	线性回归方程	相关系数	检出限		测定下限	
				非规范药品 w/ (μg · kg ⁻¹)	水样 ρ/ (ng · L ⁻¹)	非规范药品 w/ (μg · kg ⁻¹)	水样 ρ/ (ng · L ⁻¹)
扑草净	0.2~15.0	y=1.470×10 ⁻³ ·x+5.440×10 ⁻³	0.998 9	0.2	1.0	0.5	2.5
阿维菌素	2.0~150.0	y=3.760×10 ⁻³ ·x+1.290×10 ⁻³	0.998 9	2.0	10	5.0	25
伊维菌素	2.0~150.0	y=2.370×10 ⁻³ ·x+5.680×10 ⁻³	0.996 9	2.0	10	5.0	25

2.5 精密度和回收试验

选取空白非规范药品固态样品和液态样品、水样为基质,分别进行 3 个浓度水平的加标回收试验,

每个浓度水平制备 6 个平行样品,计算回收率及测定值的相对标准偏差(RSD),结果见表 3 和表 4。

结果表明:目标物的回收率为 84.8%~105%,

表 3 在非规范药品样品基质中的精密度和回收试验结果(n=6)

Tab. 3 Results of tests for precision and recovery in non-standard drug sample matrices(n=6)

基质	化合物	加标量 w/ (μg · kg ⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %	基质	化合物	加标量 w/ (μg · kg ⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %
非规范药品固态样品	扑草净	0.5	94.0	5.7	非规范药品液态样品	扑草净	0.5	96.0	7.4
		5.0	96.4	4.2			5.0	97.6	5.8
		15.0	96.7	3.1			15.0	105	2.9
	阿维菌素	5.0	92.8	6.5		阿维菌素	5.0	89.2	7.6
		50.0	95.0	4.7			50.0	98.6	3.8
		150.0	97.7	3.9			150.0	96.9	3.2

表 3(续)

基质	化合物	加标量 $w/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %	基质	化合物	加标量 $w/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %
	伊维菌素	5.0	94.2	3.4		伊维菌素	5.0	98.2	6.3
		50.0	97.4	5.3			50.0	97.4	4.6
		150.0	98.9	4.6			150.0	101	3.7

表 4 在水样基质中的精密度和回收试验结果($n=6$)

Tab. 4 Results of tests for precision and recovery
in water sample matrix($n=6$)

基质	化合物	加标量 $\rho/$ ($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率/ %	RSD/ %
水样	扑草净	2.5	93.6	5.8
		10	94.2	5.1
		50	103	2.9
	阿维菌素	25	84.8	8.4
		100	93.6	4.9
		500	97.2	4.1
	伊维菌素	25	93.2	7.5
		100	95.1	4.4
		500	94.6	3.6

测定值的 RSD 为 2.9%~8.4%。说明方法适合水产养殖非规范药品及水中扑草净、阿维菌素、伊维菌素的残留测定。

2.6 样品分析

按照试验方法分析天津市场的 80 个非规范药品与水样(包括杀虫剂、促生长剂、水质改良剂、底质改良剂、微生物制剂、水产养殖用饲料等)。结果显示,1 个非规范药品样品中检出阿维菌素,其残留量为 718 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,1 个水样中检出扑草净,其残留量为 3.2 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$,其他样品均未检出。

本工作提出了超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产养殖用非规范药品及水中扑草净、阿维菌素、伊维菌素残留量的方法。本方法具有快速、灵敏、准确且简单的优点,可满足实验室质量控制规范的技术要求。

参考文献:

[1] LIU C M, WANG Y D, ZHANG L, et al. An integrated strategy for rapid on-site screening and determination of prometryn residues in herbs[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2020,412(3):621-633.
[2] LIANG D, DING M Y, XIAO C Y, et al. Isolation and identification of *Pseudomonas* sp. strain DY-1 from agricultural soil and its degradation effect on

prometryne[J]. Current Microbiology, 2021,78(5): 1871-1881.
[3] EL-SABER BATIHA G, ALQAHTANI A, ILESANMI O B, et al. Avermectin derivatives, pharmacokinetics, therapeutic and toxic dosages, mechanism of action, and their biological effects[J]. Pharmaceuticals, 2020,13(8):1-37.
[4] DU Y Y, SHAO Z L, XU Q, et al. Azobenzene-avermectin Bla derivatives for optical modulation of insect behaviors[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021,69(51):15530-15537.
[5] ZENG J Y, VUONG T M D, SHI J H, et al. Avermectin stress varied structure and function of gut microbial community in *Lymantria dispar asiatica* (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020,164:196-202.
[6] HAND L H, GOUGOULIAS C, BRAMKE I, et al. Evaluation of the rhizosphere contribution to the environmental fate of the herbicide prometryn[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2020,39(2): 450-457.
[7] TIAN Y Y, LIU M X, SANG Y X, et al. Degradation of prometryn in *Ruditapes philippinarum* using ozonation: Influencing factors, degradation mechanism, pathway and toxicity assessment[J]. Chemosphere, 2020,248:126018.
[8] SAMY A L P A, BAKTHAVACHALAM V, VUDUTHA M, et al. Eprinomectin, a novel semi-synthetic macrocyclic lactone is cytotoxic to PC3 metastatic prostate cancer cells via inducing apoptosis[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2020,401: 115071.
[9] SERAFINI S, DE FREITAS SOUZA C, BALDISERA M D, et al. Fish exposed to eprinomectin show hepatic oxidative stress and impairment in enzymes of the phosphotransfer network[J]. Aquaculture, 2019, 508:199-205.
[10] ALAK G, YELTEKIN A Ç, TAS I H, et al. Investigation of 8-OHdG, CYP1A, HSP70 and transcriptional analyses of antioxidant defence system in liver tissues of rainbow trout exposed to eprinomectin[J].

- Fish & Shellfish Immunology, 2017,65:136-144.
- [11] DIAO L, TANG N, ZHANG C, et al. Avermectin induced DNA damage to the apoptosis and autophagy in human lung epithelial A549 cells[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021,215:112129.
- [12] 陈吉香,谢体波,冯才伟.阿维菌素、埃比菌素的残留检测[J].食品研究与开发, 2018,39(8):119-124.
- [13] XIE Z J, KONG D Z, LIU L Q, et al. Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic assay strip for the simultaneous detection of avermectin and ivermectin[J]. Food and Agricultural Immunology, 2017,28(3):439-451.
- [14] SHI W M, HE J H, JIANG H Y, et al. Determination of multiresidue of avermectins in bovine liver by an indirect competitive ELISA[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006,54(17):6143-6146.
- [15] 张元,谷岩,贾宏新.固相萃取-高效液相色谱-紫外检测法测定蔬菜中阿维菌素的残留量[J].食品安全质量检测学报, 2020,11(6):1958-1961.
- [16] 刘桂伶,李婷婷.高效液相色谱法检测 8 种果蔬中阿维菌素残留量的分析方法[J].新疆农业科技, 2020(1):38-39.
- [17] 韩冯阳,高有华,时英爽,等.QuEChERS-高效液相色谱测定棉花植株中阿维菌素、高效氯氟菊酯残留的方法研究[J].新疆农业大学学报, 2018,41(4):281-286.
- [18] RÚBIES A, ANTKOWIAK S, GRANADOS M, et al. Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples[J]. Food Chemistry, 2015,181:57-63.
- [19] LEMOS M A T, MATOS C A, DE RESENDE M F, et al. Development, validation, and application of a method for selected avermectin determination in rural waters using high performance liquid chromatography and fluorescence detection[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016,133:424-432.
- [20] PIMENTEL-TRAPERO D, SONSECA-YEPES A, MOREIRA-ROMERO S, et al. Determination of macrocyclic lactones in bovine liver using QuEChERS and HPLC with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2016,1015/1016:166-172.
- [21] FLOREZ D H Â, TEIXEIRA R A, SANTOS DA SILVA R C, et al. Pipette-tip solid-phase extraction using polypyrrole as efficient adsorbent for extraction of avermectins and milbemycins in milk[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2018,410(14):3361-3374.
- [22] HOU Z N, LIANG X R, DU L P, et al. Quantitative determination and validation of avermectin B1a in commercial products using quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2014,52(9):480-485.
- [23] MOSCHOU I C, DASENAKI M E, THOMAIDIS N S. Ionization study and simultaneous determination of avermectins and milbemycins in fish tissue by LC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2019,1104:134-140.
- [24] 黄梅英,王华珍,卢军,等.应用 QuEChERS-HPLC/MS/MS 法测定鸡蛋中的氯羟吡啶和阿维菌素[J].浙江农业科学, 2020,61(9):1872-1875.
- [25] 方玲,卞红正,赵宏梅.QuEChERS-UPLC-MS/MS 法测定水果蔬菜中的阿维菌素[J].安徽农学通报, 2019,25(9):106-108.
- [26] ZHANG W, HUANG T, LI H M, et al. Determination of avermectins by the internal standard recovery correction-high performance liquid chromatography-quantitative Nuclear Magnetic Resonance method[J]. Talanta, 2017,172:78-85.
- [27] ZHANG H X, LU W, XIA H, et al. Rapid and sensitive detection of avermectin residues in edible oils by magnetic solid-phase extraction combined with ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Analytical Methods, 2017,10(9):3201-3208.
- [28] YOU X X, GAO L, QIN D L, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers by atom transfer radical polymerization for the rapid extraction of avermectin from fish samples[J]. Journal of Separation Science, 2017,40(2):424-430.
- [29] BEPPU K, SAITO D, MUGURUMA Y, et al. Stable isotope labeling by carbon-13 in bacteria culture for the analysis of residual avermectin using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analytical Sciences, 2021,37(10):1385-1390.
- [30] DA SILVA G R, LIMA J A, DE SOUZA L F, et al. Multiresidue method for identification and quantification of avermectins, benzimidazoles and nitroimidazoles residues in bovine muscle tissue by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) using a QuEChERS approach[J]. Talanta, 2017,171:307-320.
- [31] 李雪,王凡,郑永欣,等.固相萃取-高效液相色谱法测定环境水样中痕量三嗪类除草剂[J].福建分析测试, 2018,27(3):38-42.
- [32] SEE H H, MARSIN SANAGI M, IBRAHIM W A W, et al. Determination of triazine herbicides using

- membrane-protected carbon nanotubes solid phase membrane tip extraction prior to micro-liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010,1217(11):1767-1772.
- [33] 刘峰,金海涛,马文琼,等.UPLC-MS/MS法检测稻米及土壤中扑草净除草剂的残留量[J].*农药科学与管理*, 2014,35(4):49-52.
- [34] 鲁刚,宗万里.基于毛细管气相色谱法的花色蛤中扑草净残留量测定[J].*成都大学学报(自然科学版)*, 2015,34(4):336-338.
- [35] 朱晓华,王凯,张毅,等.固相萃取-气相色谱串联质谱法测定水产品中扑草净的残留[J].*上海海洋大学学报*, 2015,24(6):960-967.
- [36] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.进出口食品中扑草净残留量检测方法 气相色谱-质谱法:SN/T 1968—2007[S].北京:中国标准出版社, 2008.

Determination of Residues of Prometryne, Avermectin and Ivermectin in Non-Standard Drugs for Aquaculture and Water by Ultra-High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

CHEN Yongping¹, BAO Yan^{2*}, XU Wenlong², CHENG Zhenhua¹, WANG Hui¹,
HAN Xianqin¹, SHI Wenbo¹, WANG Yuanning¹

(1. *Testing Center of Tianjin Agricultural Ecological Environment and Agricultural Product Quality, Tianjin 300193, China*;

2. *Qingdao Institute of Bioenergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China*)

Abstract: The non-standard drug sample for aquaculture (1.00 g) was taken, and 10 μL of 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ prometryne- d_6 (internal standard) solution and 20 mL of water were added. The solid sample was centrifuged for 5 min after homogenization and ultrasonication, while the liquid sample was centrifuged for 5 min after stirring well by vortex oscillation, both in which the supernatant was taken and made its volume up to 100 mL with water. The aquaculture water sample was filtered through a 0.45 μm filter membrane, 200 mL of the filtrate was taken, and 10 μL of 1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of prometryne- d_6 solution was added, shaking and mixing well. The above sample solution was passed through NPO HLB solid phase extraction column (activated with 5 mL of methanol and 5 mL of water), washed with 5 mL of water, and eluted with 6 mL of methanol. The eluent was blown to near dryness at 40 $^{\circ}\text{C}$ by nitrogen. The residue was redissolved in 1.0 mL of a mixture of methanol and 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium acetate solution containing 0.1% (volume fraction, the same below) formic acid at a volume ratio of 3 : 7. After vortex, ultrasonic oscillation, centrifugation and filtration, the residues of prometryne, avermectin and ivermectin were determined by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), using Waters ACQUITY UPLC C_{18} column as stationary phase and mixtures of methanol and 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium acetate solution containing 0.1% formic acid at different volume ratios as mobile phase for gradient elution. Electrospray ion (ESI) source was used for mass spectrometry, with multiple reaction monitoring mode in positive scanning mode. Internal standard method was used for quantitative analysis. As shown by the results, the linear ranges of the standard curve were 0.2—15.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for prometryne, and 2.0—150.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for avermectin and ivermectin, with detection limits (3S/N) of 0.2, 2.0, 2.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively in the non-standard drug samples, and 1.0, 10, 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively in water samples. Test for recovery was made by standard addition method, giving results in the range of 84.8%—105%, with RSDs ($n=6$) of the determined values less than 9.0%. This method was applied to the analysis of 80 actual samples, and it was shown that avermectin was detected with a residue of 718 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ in a non-standard drug sample, and prometryne was detected with a residue of 3.2 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ in a water sample.

Keywords: aquaculture; non-standard drug; water; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; prometryne; avermectin; ivermectin