

三重四极杆质谱仪检测水产品中 兽药残留整体解决方案

目 录

1. 序言.....	3
2. 法规介绍.....	4
3. 解决方案	
3.1 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的孔雀石绿和结晶紫残留.....	6
3.2 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中氯霉素类药物残留.....	11
3.3 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中磺胺类药物残留.....	18
3.4 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中硝基呋喃类代谢物残留.....	29
3.5 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中硝基咪唑类的兽药残留.....	35
3.6 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中林可胺类抗生素残留.....	42
3.7 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的三甲氧苄氨嘧啶残留.....	47
3.8 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中喹诺酮类抗生素的残留.....	52
3.9 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的17种激素残留.....	63
3.10 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中四环素类药物残留.....	78
3.11 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中大环内酯类药物残留.....	85
4. 附录 化合物索引表.....	92

序 言

近年来，我国水产养殖业发展迅猛，养殖业集约化程度提高，养殖病害日益严峻，各类药物在生产中广泛使用，但捕捞前不执行渔药的休药、停药制度，造成水产品药物残留过高的问题日益突出。这些常用的抗菌、抗原剂具有导致过敏反应和使人产生抗药性等副作用，世界各国对此有严格的限量要求。因此监测这类抗生素药物的残留对促进水产品出口和确保人类健康具有积极的意义。

为了应对日益严格的水产品检测要求，我国于 2010 年修订了《中华人民共和国兽药典》，收载兽药品种共计 1829 种，其中新增 604 种，修订 1164 种。国际食品法典委员会（CAC）和包括我国在内的很多国家都制定了食品动物兽药残留限量标准。涉及兽药残留标准的有残留限量标准和残留检测方法标准，我国制定发布了《动物性食品中兽药最高残留限量》（农业部 235 号公告），制定最高残留限量的兽药共 96 种，其中水产品中兽药残留检测方法标准 14 项。《动物源性食品中兽药最高残留限量的指令》是欧盟管理兽药残留最核心的一部法规，确定最高残留限量共 118 种。美国兽药最高残留限量体系中，有最高残留限量值的品种包含了兽用抗生素类、抗寄生虫类、抗组胺类、激素类药物等，共 108 种。

关于残留限量标准，各国在药物品种设置上有差别。如抗生素类药物：欧盟 51 种，美国 34 种，国际食品法典委员会（CAC）15 种，中国 37 种；抗寄生虫类药物：欧盟 38 种，美国 17 种，国际食品法典委员会（CAC）21 种，中国 34 种；抗球虫类药物：欧盟 3 种，美国 19 种，国际食品法典委员会（CAC）2 种，中国 17 种。

三重四极杆质谱仪由于对微量残留物质的定性、定量检测有着独特的优势。我国兽药残留检测的相关国家标准多采用了液相色谱串联三重四极杆质谱仪作为检测仪器。岛津公司自 2010 年倡导 UFMS 理念以来，推出 LCMS-8030/8040 系列三重四极杆质谱仪，在水产品检测方面有着无可比拟的优势：可实现最大 500 通道/秒、正负极性切换时间 15 msec 的超快速 MRM 测定，以及最高 15000 u/sec 的超快速扫描测定。在高速分析中，可抑制串扰的 UFsweeperR 碰撞室与 Nexera LC-30A 完美结合，极大提高了用户的分析效率。

长期以来，岛津公司一直关注水产品中兽药残留的检测，及时为广大用户提供兽药检测解决方案。本应用文集以国家标准为主要参考依据，使用岛津公司最新推出的超高效液相色谱仪 LC-30A 串联三重四极杆质谱仪 LCMS-8030/8040，涵盖 12 类，68 种水产品中兽药残留的检测提供检测解决方案，以供广大用户参考。

岛津企业管理（中国）有限公司
分析中心
2012 年 12 月

法规介绍

水产品因为它的营养与药用价值被人们逐步深刻地认识，使得其市场和消费群体逐步扩大，需求量逐年增加，消费总量呈大幅增长势头，而且高档水产品的需求量急剧攀升，价格大幅上涨。但是在水产品高速发展的同时，水产品行业也出现了不少问题。比如：欧盟因“氯霉素虾事件”，对我国虾类产品出口提出更严格的检测要求；“鳗鱼恩诺沙星事件”“孔雀石绿事件”对我国的鳗鱼产品出口造成沉重打击；“多宝鱼事件”对国内多宝鱼养殖产业带来几近毁灭性的打击。从以上事件可以看出，当前引起我国水产品质量安全事件最直接的原因就是药物残留超标。

常见有以下滥用兽药行为：人为添加激素或者使用腐烂变质饲料；滥用抗生素、杀菌剂等进行水产动物疾病防治；捕捞前不执行渔药的休药、停药制度，造成水产品、水体中药物残留过高；水产品生产、销售和加工过程中，非法或过量添加孔雀石绿、氯霉素、硝基呋喃等药物，危及生命健康。随着美国、欧洲各国和我国相关政策法规的相继颁布实施，对水产品的检测要求日趋严格。

1. 美国法规

自1997年12月18日美国政府实施水产品HACCP法规以来，我国水产加工厂出口美国得通过美国FDA进行HACCP评审考核，申请注册，取得输美产品的HACCP的验证证书，并经美国FDA（美国食品与药物管理局）备案后才能进入美国市场。

美国水产品卫生要求，亦称水产品食品安全标准。大体上分为四大类，食品添加剂、有害污染物、微生物标准及食品标签要求。美国规定，如果在某些食品中检出氯霉素等问题，除了对该批食品货框进行销毁、退货等处理外，美方将把该批食品的生产加工企业列入不经检验即自动扣留（DWPE）的名单。美国食品与药物管理局公布的禁止在进口动物源性食品中使用的的兽药及其它化合物清单：氯霉素、己烯雌酚、地美硝唑、异丙硝唑、其它硝基咪唑类、呋喃唑酮（外用除外）、呋喃西林外用除外）、氟喹诺酮类（沙星类）等。

2. 日本法规

日本进口水产品依据《食品卫生法》实施检验。按规定，进口商在进口水产品时，须事先将进口的水产品的品名、数量报告厚生省，然后再由厚生省所授权的57个实验室(多数为大学食品实验室和各地方政府食品检疫所)对进口水产品实施包括微生物、农残、药残等近30个项目的检测，只有合格才能过关。

自2001年，日本厚生省对来自中国的动物源性食品批批检测11中药物残留物质，其种类和最高限量分别是：氯霉素(0.05mg/kg)，磺胺甲基嘧啶(0.02mg/kg)，磺胺二甲嘧啶(0.01mg/kg)，磺胺-6-甲氧嘧啶(0.03mg/kg)，磺胺二甲氧嘧啶(0.04mg/kg)，磺胺喹恶啉(0.05mg/kg)，恶喹酸 (喹菌酮0.05mg/kg)和其它抗生素。

2003年7月，日本又提出鳊鱼中恩诺沙星残留量为：白烧、活鳊为0.025mg/kg，蒲烧鳊为0.05mg/kg。使我国鳊鱼养殖业及加工出口业遭受巨大打击。

3. 欧盟法规

2009年欧盟发布EC470/2009号条例，加强了对食用动物用药的管理，并对动物源性食品中的药理活性物质残留建立残留限量。欧盟对进口水产品的检查包括新鲜度化学指标、自然毒素、寄生虫、微生物指标、环境污染的有毒化学物质和重金属、农药残留、放射线等63项，其中氯霉素、呋喃西林、孔雀石绿、结晶紫、呋喃唑酮为不得检出。

4. 韩国法规

中、韩检疫部门已签署《中韩水产品进出口卫生管理协定》，对我输韩水产品卫生标准作了详细规定。韩国对水产品的管理措施大都基于卫生标准和检验检疫规定。韩对我部分水产品实行的先检验后通关、对冷冻水产品进行的金属异物检测均与卫生标准有关。如，韩自1999年9月开始对我活鳊鱼、活石桂鱼实行先检验后通关，原因前后分别为土霉素、恶奎酸、汞超标；韩对我活蛤、血蚶、虾夷扇贝等贝类产品重金属含量实行严格检查，以确认镉含量是否超标；韩从7月中旬开始对进口虾等部分人工养殖的甲壳类水产品实施氯霉素含量检查，规定不得检出。

5. 中国法规

我国农业部共制定发布兽药残留检测方法国家标准146个。农业部发布《兽药休药期规定（农业部278号公告）》，对临床常用的202种(类)兽药和饲料药物添加剂规定了休药期。

2010年更新了《中华人民共和国兽药典》，收载兽药品种共计1829种，其中新增604种，修订1164种。为了应对日益严格的水产品检测要求，我国兽药残留检测的相关国家标准多采用了液相色谱串联三重四极杆质谱仪作为检测仪器。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的孔雀石绿和结晶紫残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定水产品中孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫和隐色结晶紫的方法。样品经提取后, 用超高效液相色谱 LC-30A 分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行内标法定量分析。样品在 2 分钟内得到快速分离和检测。孔雀石绿和隐色孔雀石绿在 0.5~200 $\mu\text{g/L}$, 结晶紫在 0.5~500 $\mu\text{g/L}$, 隐色结晶紫在 0.1~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 标准曲线的相关系数均在 0.999 以上; 对 1 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 2.925% 和 0.160% 之下, 系统精密度良好; 方法定量限为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 优于国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》中 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 的要求。

关键词: 孔雀石绿 结晶紫 水产品 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

孔雀石绿是一种带有金属光泽的绿色结晶体, 又名碱性绿、严基块绿、孔雀绿, 其既是杀真菌剂, 又是染料, 易溶于水, 溶液呈蓝绿色; 溶于甲醇、乙醇和戊醇。长期以来, 渔民都用它来预防鱼的水霉病、鳃霉病、小瓜虫病等, 而且为了使鳞受损的鱼延长生命, 在运输过程中和存放池内, 也常使用孔雀石绿。科研结果表明, 孔雀石绿在鱼内残留时间很长, 且其具有高毒素、高残留和致癌、致畸、致突变等作用, 鉴于此, 许多国家均将孔雀石绿列为水

产养殖禁用药物。我国于 2002 年 5 月也将孔雀石绿列入《动物食品禁用的兽药及其化合物清单》中。但是, 因为其价格便宜, 而且其治疗水霉病等的功效是其他药物所“不能替代”的, 所以利益的驱动使得孔雀石绿并没有退出渔业市场。本文依据国标

《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》, 使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定了水产品中孔雀石绿和结晶紫。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm

流动相: A—5 mmol/L 醋酸铵加 0.05% 甲酸水溶液; B—乙腈

流 速: 0.4 mL/min

进样体积: 10 μ L

柱 温: 40 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 50%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	95
1.80	Pumps	Pump B Conc.	95
1.81	Pumps	Pump B Conc.	50
3.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8030

离子源: ESI(+)

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250 $^{\circ}$ C

加热模块温度: 400 $^{\circ}$ C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

滞留时间: 10 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	孔雀石绿	329.20	313.15	-20.0	-40.0	-23.0
			208.10*	-30.0	-35.0	-16.0
2	隐色孔雀石绿	331.20	316.20	-10.0	-20	-24.0
			239.15*	-16.0	-30	-29.0
3	结晶紫	372.25	356.20	19.0	40.0	27.0
			251.20*	11.0	35.0	19.0
4	隐色结晶紫	374.25	359.20	11.0	25.0	28.0
			238.15*	11.0	30.0	18.0
5	D5-孔雀石绿	334.25	318.20	30.0	40.0	23.0
6	D6-隐色孔雀石绿	337.25	322.25	10.0	20.0	25.0

*表示定性离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

用乙腈配制 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准中间溶液，用乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液 (1:1, v/v) 稀释成浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液，每毫升该混合标准工作溶液中含有氘代孔雀石绿和氘代隐色孔雀石绿各 2 ng。

样品前处理方法：

同国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

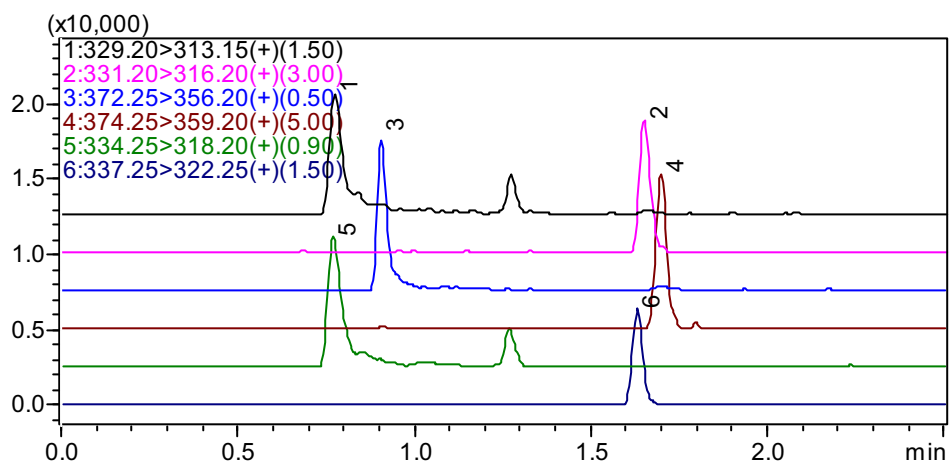


图 1 1 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱图

(1: 孔雀石绿; 2: 隐色孔雀石绿; 3: 结晶紫; 4: 隐色结晶紫; 5: D5-孔雀石绿; 6: D6-隐色孔雀石绿;)

2.2 线性关系

将浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，孔雀石绿和结晶紫以氘代孔雀石绿为内标物质计算，隐色孔雀石绿和隐色结晶紫以氘代隐色孔雀石绿为内标物质计算；以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如图 2~5 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

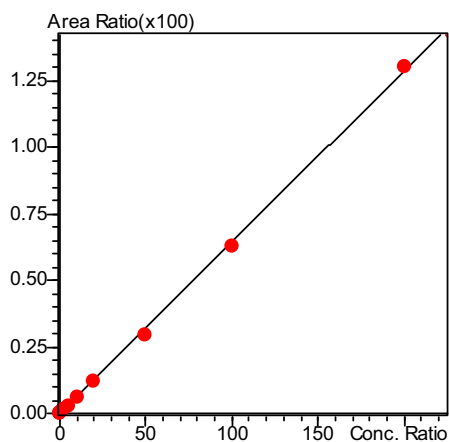


图 2 孔雀石绿的标准工作曲线

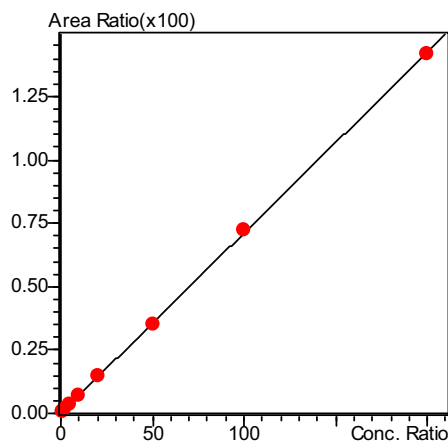


图 3 隐色孔雀石绿的标准工作曲线

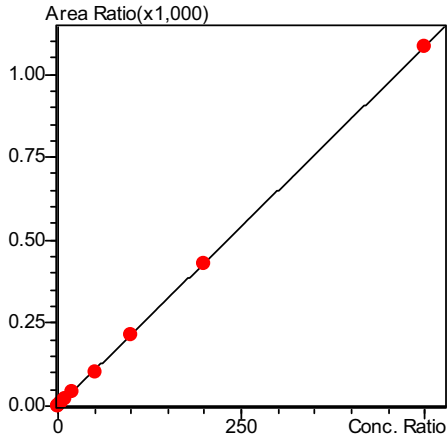


图4 结晶紫的标准工作曲线

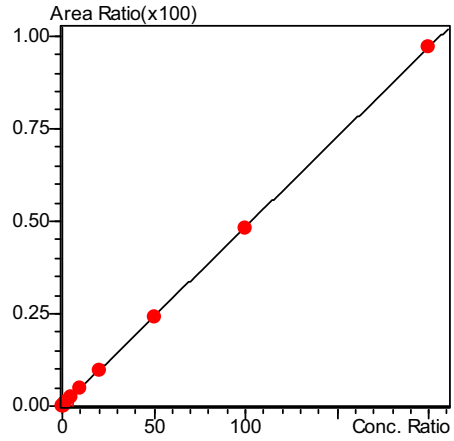


图5 隐色结晶紫的标准工作曲线

表3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 R
1	孔雀石绿	$Y = (0.659584)X$	0.5~200	0.9997
2	隐色孔雀石绿	$Y = (0.71228)X$	0.5~200	0.9996
3	结晶紫	$Y = (2.16652)X$	0.5~500	0.9999
4	隐色结晶紫	$Y = (0.484806)X$	0.1~200	0.9999

2.3 精密度实验

对 1、50、200 μg/L 混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：3 个浓度标准品的峰面积和保留时间的相对标准偏差分别在 0.680%~2.925%和 0.039%~0.160%之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 μg/L)		RSD% (50 μg/L)		RSD% (200 μg/L)	
	Area	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.
孔雀石绿	1.709	0.177	0.747	0.083	2.373	0.160
隐色孔雀石绿	2.925	0.088	1.293	0.095	1.504	0.097
结晶紫	1.385	0.055	0.680	0.039	0.825	0.084
隐色结晶紫	2.113	0.153	1.832	0.096	1.351	0.071

2.4 灵敏度实验

为了考察方法的灵敏度，在虾基质空白样品中添加 0.1 μg/kg 的混合标样，得到色谱图如图 6 和图 7 所示，样品的方法定量限为 0.1 μg/kg，优于国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》中 0.5 μg/kg 的要求。

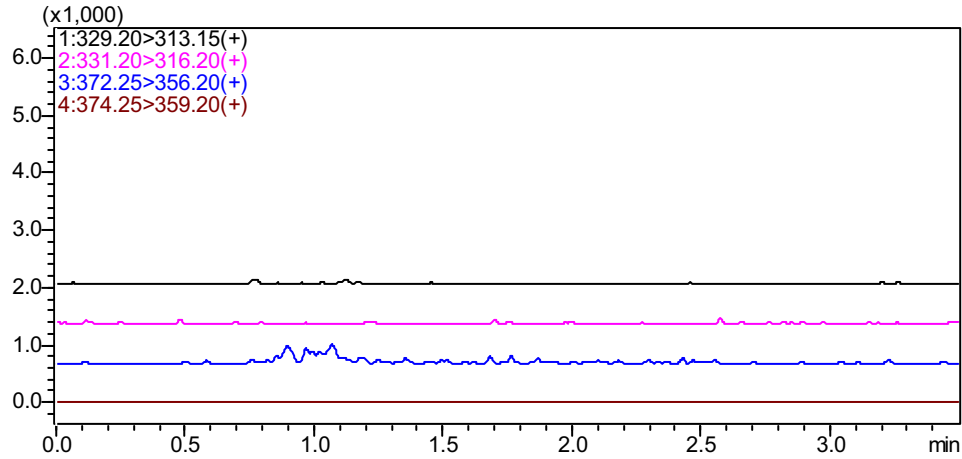


图 6 虾样品的 MRM 色谱图

(1: 孔雀石绿; 2: 隐色孔雀石绿; 3: 结晶紫; 4: 隐色结晶紫)

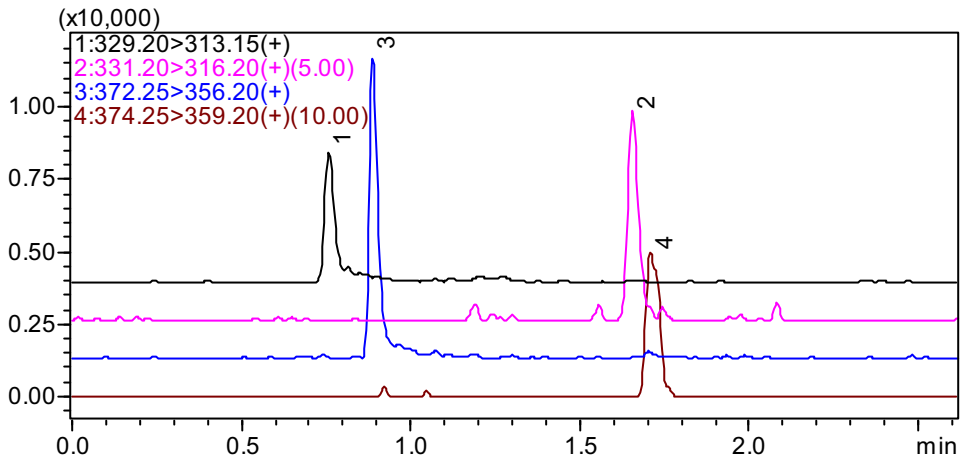


图 7 0.1 µg/kg 加标虾样品的 MRM 色谱图

(1: 孔雀石绿; 2: 隐色孔雀石绿; 3: 结晶紫; 4: 隐色结晶紫)

3. 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中孔雀石绿和结晶紫的方法。该方法分析速度快，精密度良好；校准曲线相关系数均在 0.999 以上；方法定量限为 0.1 µg/kg，优于国标《GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留的测定》中 0.5 µg/kg 的要求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中氯霉素类药物残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中测定氯霉素类药物残留的方法。借助超高效液相色谱 LC-30A 在 2.5 min 内实现快速分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析, 因此可以快速、准确地测定甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素。这 3 种物质的线性良好, 相关系数均大于 0.999; 不同浓度的精密密度实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.13 ~ 0.54% 和 1.68 ~ 4.31% 之间, 仪器精密密度良好; 甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的检出限分别为 0.10、0.04 和 0.04 $\mu\text{g/L}$, 定量限分别为 0.41、0.17 和 0.15 $\mu\text{g/L}$; 样品加标回收率为 81.5 ~ 105.5%。

关键词: 兽药残留 水产品 氯霉素类 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素(氟苯尼考)同属于氯霉素类(CAPs)药物, 甲砒霉素和氟苯尼考是新型氯霉素类广谱抗菌药物, 其结构和药理活性与氯霉素类似, 具有广谱抗菌能力并被广泛应用于动物养殖业。但氯霉素类药物用于食用性动物很容易导致在动物源性食品中残留量超标, 具有导致人体产生再生障碍性贫血和溶血性贫血等毒副作用, 对人体产生严重危害, 因此引起了国内外的广泛重视。

目前, 大多数国家已经严格限制其使用, 并对食品中氯霉素类药物的最高残留限量(MRL)做了规定: 欧盟规定氯霉素不得检出, 甲砒霉素为 50 $\mu\text{g/kg}$; 对有鳍鱼类氟苯尼考为 1000 $\mu\text{g/kg}$; 我国 GB/T 20756-2006 规定氯霉素检出限 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 甲砒霉素和氟苯尼考检出限为 1 $\mu\text{g/kg}$ 。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.42 色谱工作站。

纵观国内外文献报道氯霉素类药物的检测方法主要采用气相色谱法、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)和液相色谱-质谱联用法(LC/MS)等, 这些方法主要是测试一种氯霉素药物残留的分析方法, 而三种药物同时检测的方法报道较少。目前国内在水产品中测定这三种药物的测定方法主要参考 GB/T 20756-2006 (液相色谱-串联质谱法) 和农业部 958 号公告-14-2007 (气相色谱-质谱法), 但是多数国家检测甲砒霉素、氟甲砒霉素、氯霉素三种药物比较精密的方法还是首推液相色谱-串联质谱法。因此, 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用, 建立了水产品中氯霉素类药物残留的分析方法, 此方法快速、选择性强和灵敏度高, 供相关检测人员参考。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×50 mmL., 1.6 μm

流动相：A—水；B—乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 °C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	30
1.50	Pumps	Pump B Conc.	60
2.00	Pumps	Pump B Conc.	60
2.01	Pumps	Pump B Conc.	30
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：40 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：MRM 分组采集，见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	甲砒霉素	354.0	185.0*	27	22	19
			289.9	27	12	20
2	氟甲砒霉素	356.0	336.0*	13	10	23
			185.0	13	20	19
3	氯霉素	321.0	152.1*	25	18	15
			257.0	25	12	18

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准物质：共 3 种，分别为甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素。

标准溶液配制：用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用甲醇-水溶液(V/V, 50:50)稀释成 0.2 μ g/L、0.5 μ g/L、1 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、50 μ g/L 和 100 μ g/L 不同浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：称取5.0 g试样(精确至0.01 g)至50 mL离心管中，加入25 mL乙酸乙酯，在匀质器中以14000 r/min匀质30 s，以4000 r/min离心5 min，上层乙酸乙酯提取液收集于50 mL平底烧瓶中，残渣加入20 mL乙酸乙酯，重复上述操作，合并提取液；45 $^{\circ}$ C减压旋转浓缩至干，残留物用1 mL甲醇-水溶液(V/V, 50:50)溶解，再加入3.0 mL正己烷混合，并转移至10 mL比色管中，涡动混合30 s；以4000 r/min离心2 min，弃去上层正己烷，移取下层，经0.22 μ m微孔滤膜过滤后，用液质分析。

2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

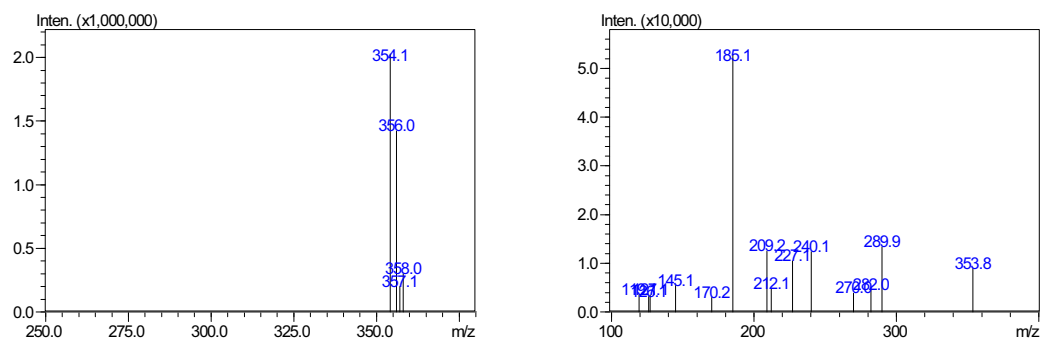


图1 甲砒霉素的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值20V，右图）

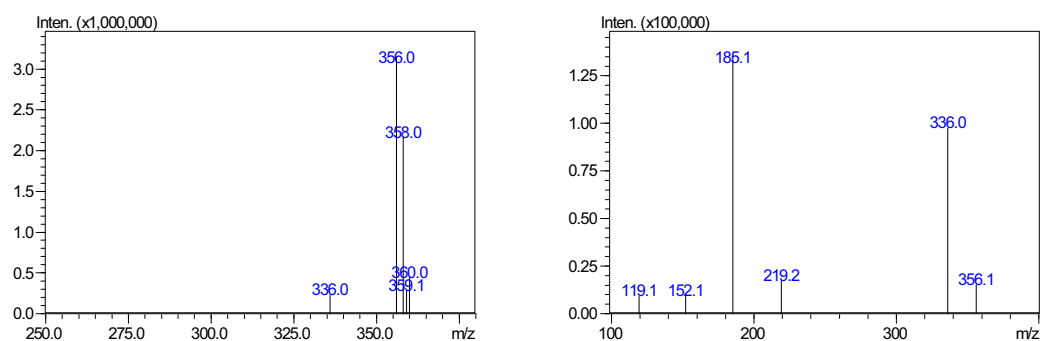


图2 氟甲砒霉素的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值16V，右图）

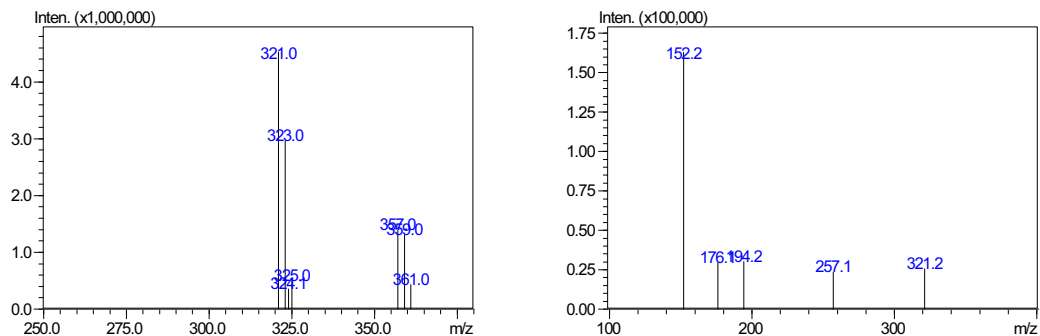


图3 氯霉素的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值 18V，右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱如图 4 所示。

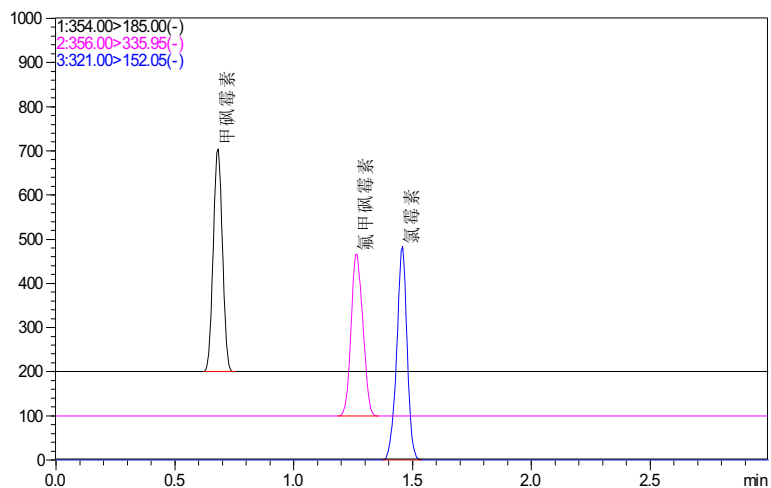


图 4 1 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的混合标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 5~7 所示。甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

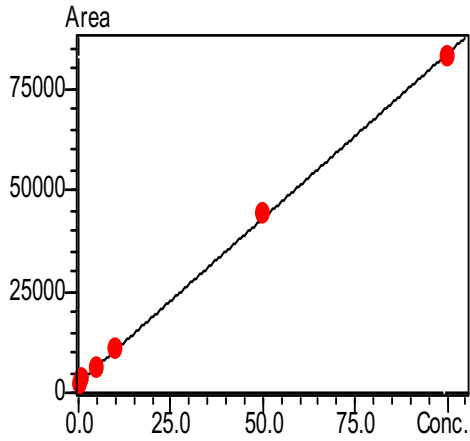


图 5 甲砒霉素的标工作曲线

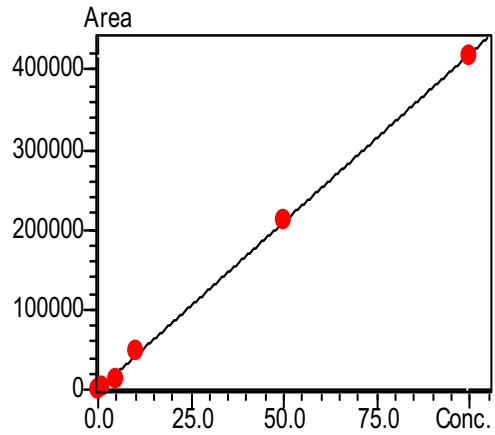


图 6 氟甲砒霉素的标工作曲线

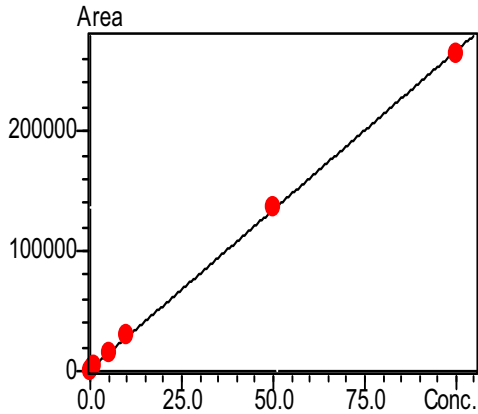


图 7 氯霉素的标工作曲线

表 3 3 种物质的校准曲线参数

编号	名称	线性范围	校准曲线	相关系数 R
1	甲砒霉素	0.5~100 μg/L	$Y = (813.877)X + (2393.00)$	0.9998
2	氟甲砒霉素	0.2~100 μg/L	$Y = (4198.77)X + (-157.491)$	0.9996
3	氯霉素	0.2~100 μg/L	$Y = (2653.64)X + (1739.35)$	0.9998

2.3 检出限和定量限

配制 7 份混合标样，进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限 $MDL = 3.14 \times S$ ，定量限 $LOQ = 4 \times MDL$ 。测定结果如表 4 所示：

表 4 3 种物质的检出限和定量限

No.	名称	浓度(μg/L)	标准偏差(S)	检出限(μg/L)	定量限(μg/L)
1	甲砒霉素	0.50	0.033	0.102	0.41
2	氟甲砒霉素	0.20	0.014	0.043	0.17
3	氯霉素	0.20	0.011	0.038	0.15

2.4 精密度实验

配制如表 5 浓度的混合标液，平行进样 6 次。3 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.13 ~ 0.54%和 1.68 ~ 4.31%之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	名称	RSD% (0.5 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	甲砒霉素	0.54	4.31	0.15	3.34	0.25	1.51
2	氟甲砒霉素	0.40	2.66	0.09	2.39	0.16	1.87
3	氯霉素	0.38	2.26	0.16	1.68	0.13	1.98

2.5 基质加标实验

在按照 1.3 中样品制备方法，样品中添加混合标样，加标含量如表 6，各平行 4 次。测试结果显示：虾的样品加标回收率在 81.5 ~ 105.5%之间；具体结果如表 6。虾的基体空白色谱图如图 8 所示，虾的加标样品色谱图如图 9 所示。

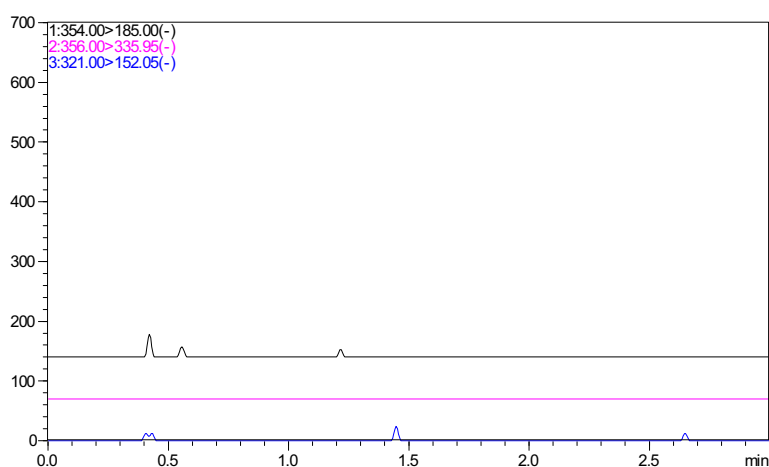


图 8 虾的基体空白色谱图

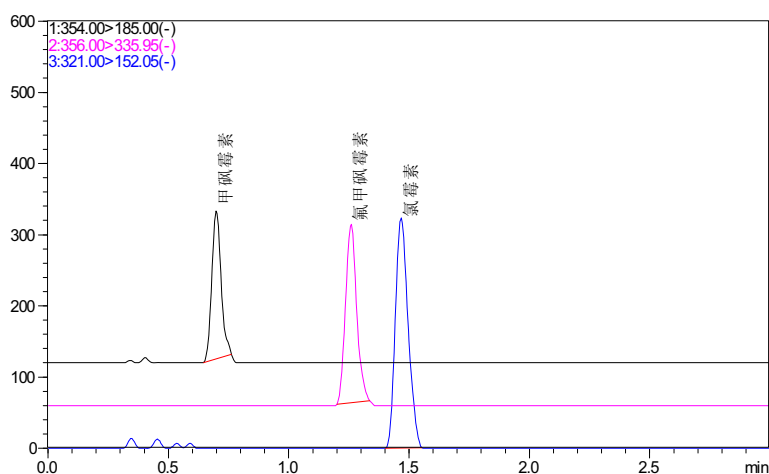


图 9 0.1 µg/kg 样品基质加标样色谱图

表 6 加标样的回收率结果 (n=4)

No.	样品名称	回收率 (%)		
		0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20 $\mu\text{g}/\text{kg}$
1	甲砒霉素	84.8	90.3	105.5
2	氟甲砒霉素	89.8	83.7	81.5
3	氯霉素	96.9	99.8	93.3

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素药物残留。3 种物质的线性良好，相关系数均大于 0.999。甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的检出限分别为 0.10、0.04 和 0.04 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，定量限分别为 0.41、0.17 和 0.15 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；基质加标回收率在 81.5 ~ 105.5% 之间。此法中对 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素类药物进行基体加标，如图 9 所示有明显响应，且回收率良好，完全满足 GB/T 20756-2006 以及欧盟对甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的最高残留量的要求，并且甲砒霉素和氟甲砒霉素方法定量限低于标准规定。此方法快速、选择性强和灵敏度高，可作为水产品中氯霉素类药物的日常检测方法。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中磺胺类药物残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超快速液相色谱仪 UFLCXR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定水产品中磺胺类药物残留量的方法。借助超快速液相色谱 UFLCXR 在 5 min 内实现快速分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析, 因此可以快速、准确的测定 12 种磺胺类药物残留量。这 12 种磺胺类药物的线性良好, 相关系数均大于 0.999; 不同浓度的精密度实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.40%和 1.00 ~ 5.57%间, 仪器精密度良好; 其仪器检出限为 0.10 ~ 0.24 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 0.41 ~ 0.97 $\mu\text{g/L}$; 样品加标回收率在 85.7 ~ 116.5%间, 方法的定量限为 0.20 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 磺胺类药物 水产品 超快速液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

近年来, 我国水产养殖业发展迅猛, 由于养殖业集约化程度提高, 养殖病害日益严峻, 各类药物在生产中广泛使用, 水产品药物残留问题日益突出。磺胺类是常用的抗菌、抗原药物, 这类合成抗菌剂具有导致过敏反应和使人产生抗药性等副作用, 世界各国对此有严格的限量要求。因此监测这类抗生素的残留对促进水产品出口和保证动物源性食品安全具有积极的意义。

目前, 我国针对磺胺类抗生素药物的残留量测定的标准有很多, 如国标(GB/T

22951-2008)、商检(SN 0208-93)以及农业部(NY 1077-1-2008)等。这些标准都是使用液相或液相质谱来测定的, 本文主要参考《农业部 1077 号公告-1-2008 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》, 使用岛津超快速液相色谱仪 UFLCXR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用, 建立了测定水产品中磺胺类药物残留量的方法, 此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超快速液相色谱仪 UFLCXR 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-20AD_{XR}×2 输液泵, DGU-20A₃ 在线脱气机, SIL-20AC_{XR} 自动进样器, CTO-20A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: UFLCXR 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×50 mmL., 1.6 μm

流动相：A—5mM 乙酸铵+0.1%甲酸水溶液；B—乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μ L

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.50	Pumps	Pump B Conc.	30
3.50	Pumps	Pump B Conc.	30
3.60	Pumps	Pump B Conc.	55
4.00	Pumps	Pump B Conc.	55
4.01	Pumps	Pump B Conc.	15
5.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}$ C

加热模块温度：400 $^{\circ}$ C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：10 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：MRM 分组采集，见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	磺胺醋酰	215.1	156.1*	-14	-9	-16
			92.2	-14	-23	-18
2	磺胺嘧啶	251.1	156.0*	-17	-14	-16
			108.1	-17	-23	-20
3	磺胺噻唑	256.1	156.0*	-17	-14	-16
			108.2	-17	-24	-21
4	磺胺吡啶	250.2	156.0*	-17	-15	-16
			92.1	-17	-26	-10
5	磺胺甲基嘧啶	265.1	156.0*	-18	-17	-16
			92.1	-18	-29	-18

6	磺胺二甲嘧啶	279.2	186.1 [*] 92.1	-19 -19	-16 -30	-20 -18
7	磺胺甲氧哒嗪	280.9	156.1 [*] 92.1	-18 -18	-17 -30	-16 -18
8	磺胺氯哒嗪	284.9	156.1 [*] 92.1	-19 -19	-14 -31	-16 -17
9	磺胺甲噁唑	254.2	156.1 [*] 92.1	-17 -17	-14 -27	-16 -10
10	磺胺二甲基异噁唑	268.0	156.0 [*] 92.2	-18 -18	-12 -26	-16 -19
11	磺胺间二甲氧嘧啶	311.0	156.1 [*] 92.1	-21 -21	-21 -31	-16 -18
12	磺胺喹噁啉	301.0	156.0 [*] 92.1	-20 -20	-15 -31	-16 -19

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准物质：共 12 种，分别为磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺甲噁唑、磺胺二甲基异噁唑、磺胺间二甲氧嘧啶和磺胺喹噁啉。

标准溶液配制：用甲醇配制 1 mg/L 的混合标准中间溶液，用甲醇+水溶液(V/V, 15:85)稀释成 1 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 和 200 μg/L 不同浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：具体参考《农业部 1077 号公告-1-2008 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》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

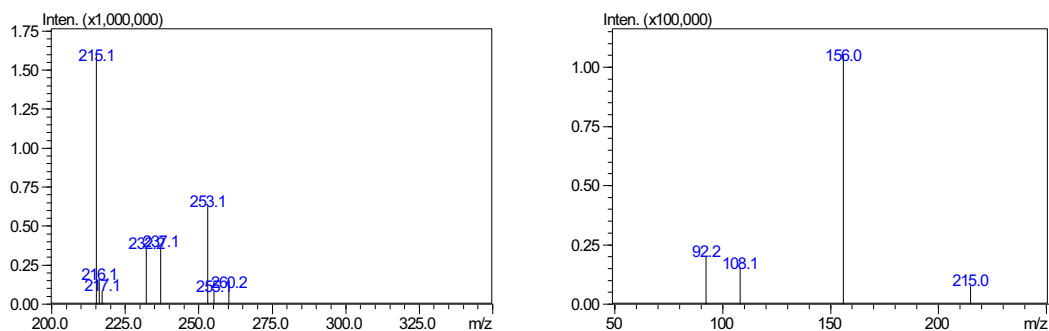


图 1 磺胺醋酰的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-12V，右图）

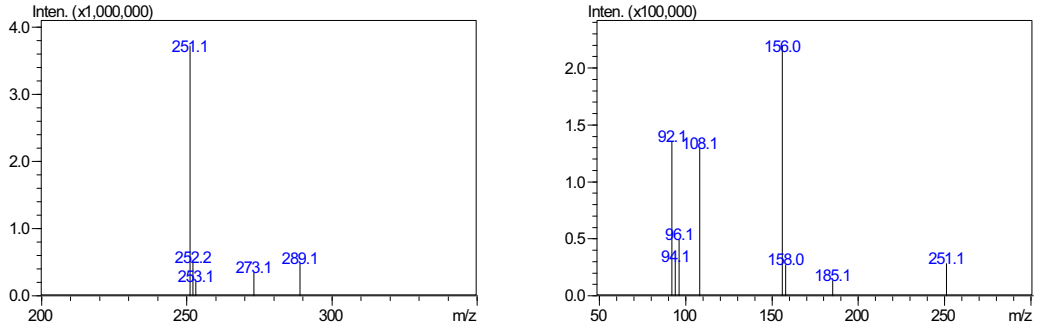


图2 磺胺嘧啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-18V，右图）

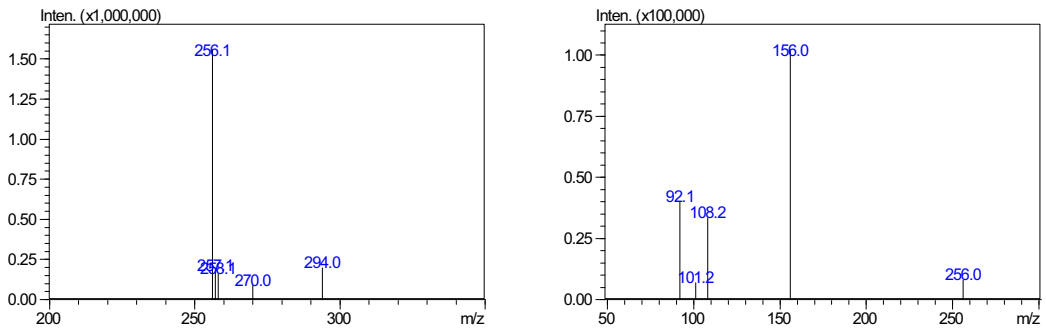


图3 磺胺噻唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-17V，右图）

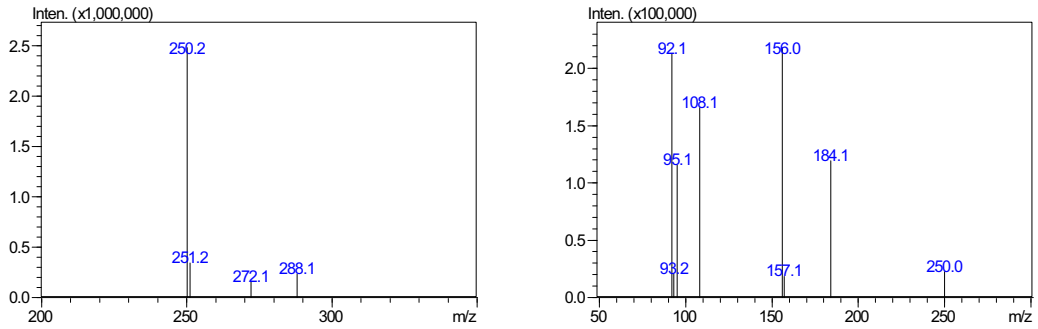


图4 磺胺吡啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-21V，右图）

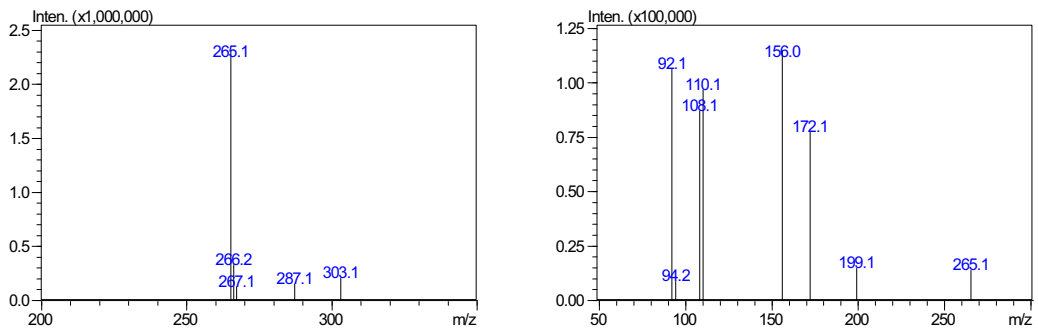


图5 磺胺甲基嘧啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE值-20V，右图）

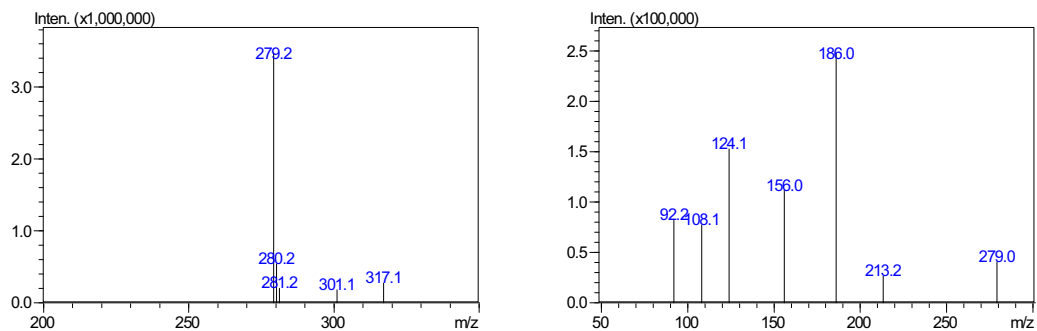


图 6 磺胺二甲嘧啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V，右图）

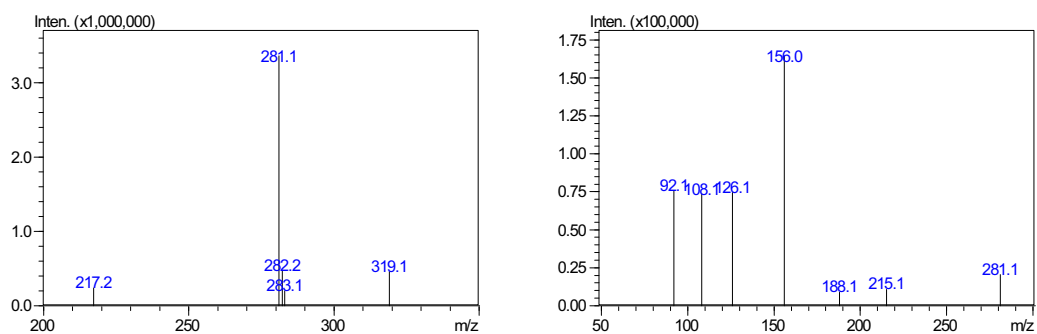


图 7 磺胺甲氧嘧啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V，右图）

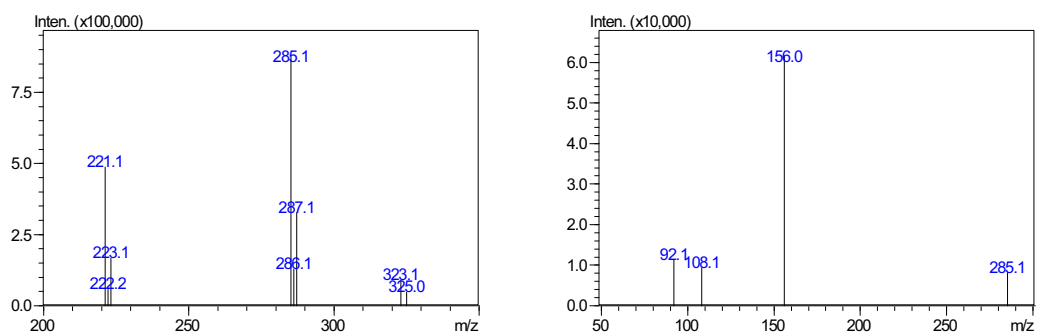


图 8 磺胺氯嘧啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-16V，右图）

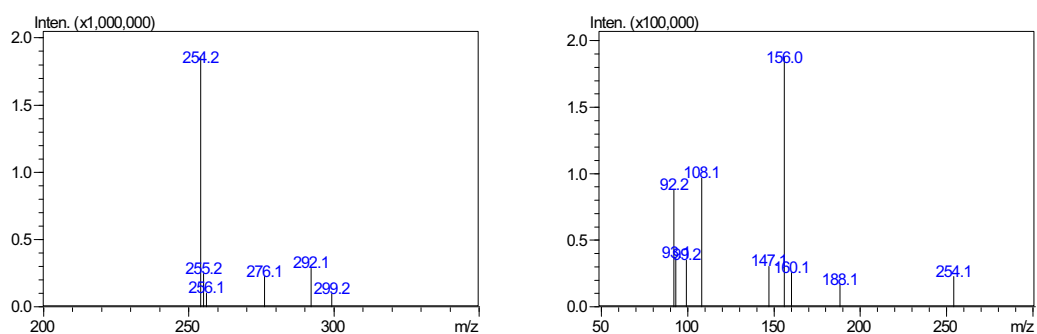


图 9 磺胺甲噻唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-18V，右图）

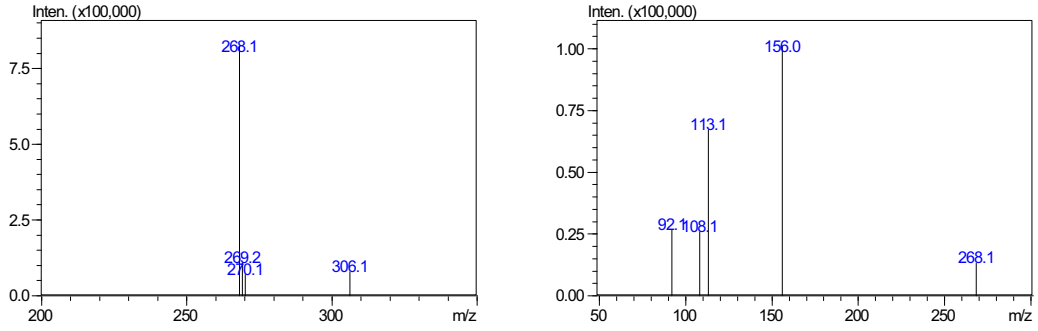


图 10 磺胺二甲基异噻唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-16V，右图）

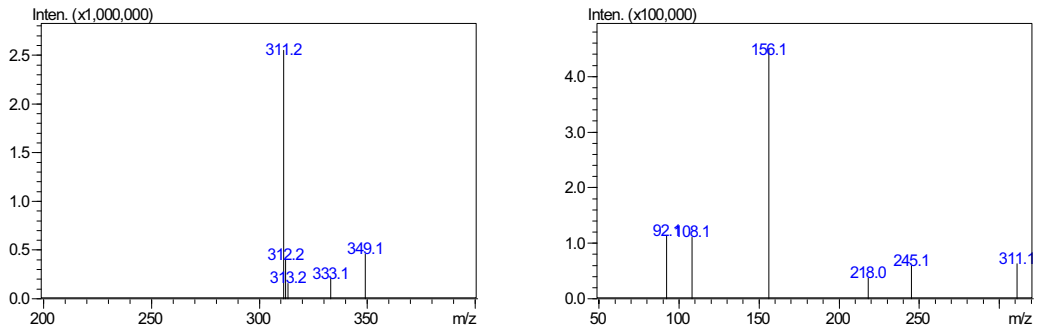


图 11 磺胺间二甲氧嘧啶的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-22V，右图）

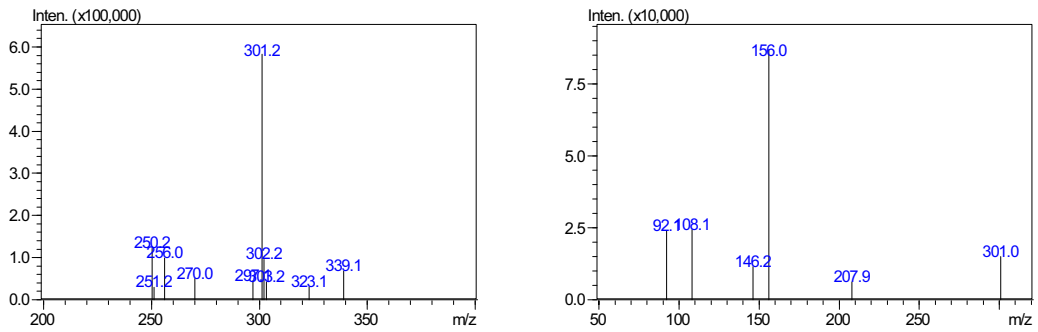


图 12 磺胺噻噻啉的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-19V，右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱如图 13 所示。

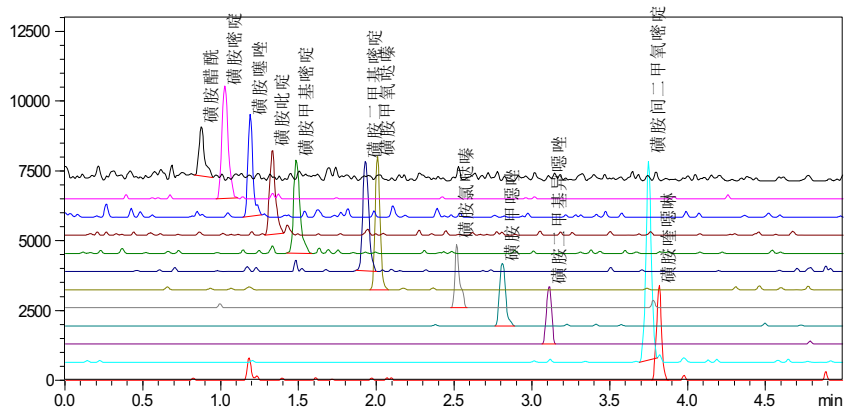


图 13 1 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 1, 5, 10, 50, 100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 14~25 所示。在 1~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

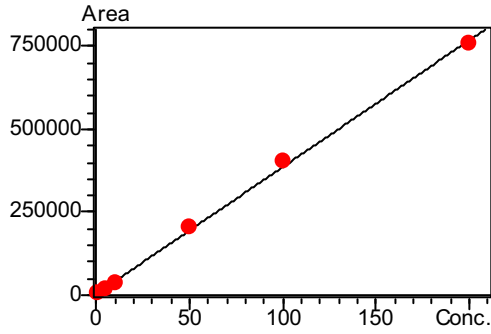


图 14 磺胺醋酰的标准工作曲线

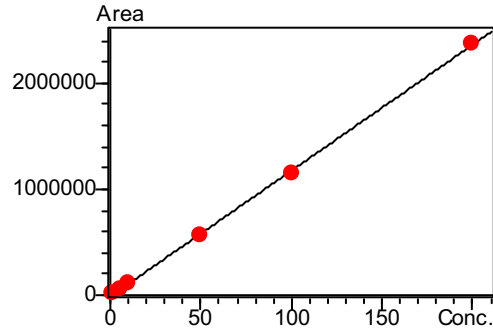


图 15 磺胺嘧啶的标准工作曲线

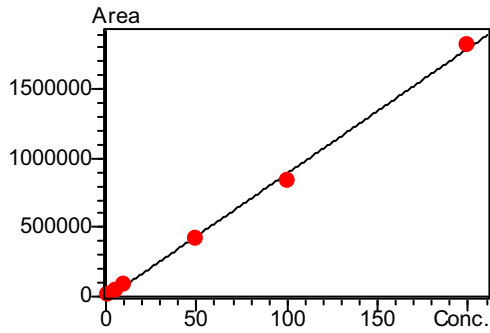


图 16 磺胺噻唑的标准工作曲线

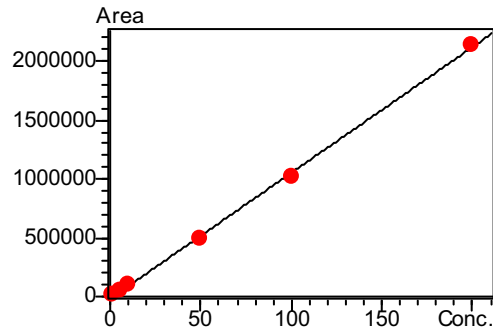


图 17 磺胺吡啶的标准工作曲线

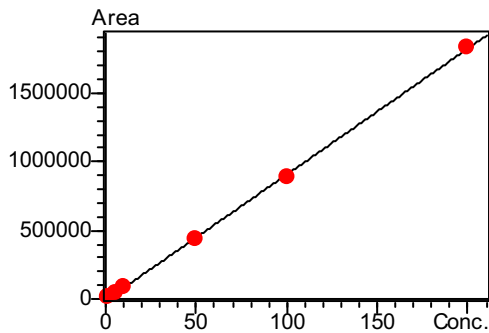


图 18 磺胺甲基吡啶的标准工作曲线

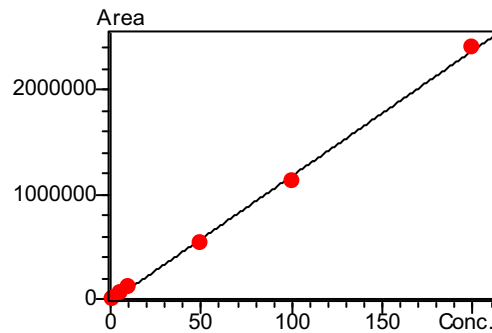


图 19 磺胺二甲基吡啶的标准工作曲线

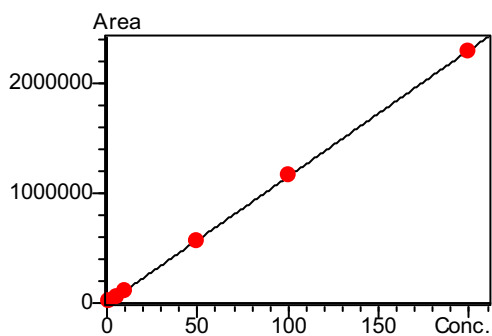


图 20 磺胺甲氧哒嗪的标准工作曲线

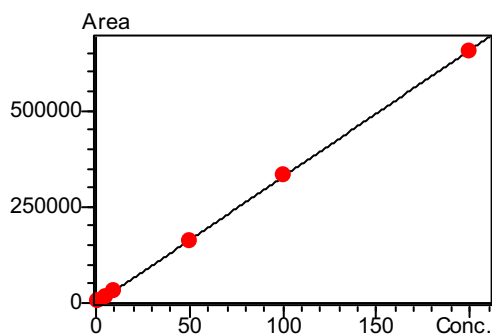


图 21 磺胺氯哒嗪的标准工作曲线

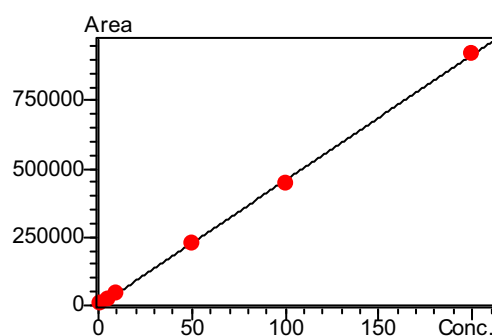


图 22 磺胺甲噁唑的标准工作曲线

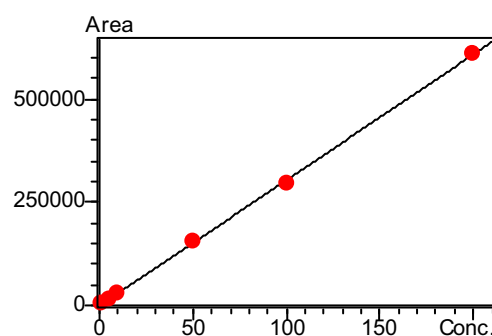


图 23 磺胺二甲基异噁唑的标准工作曲线

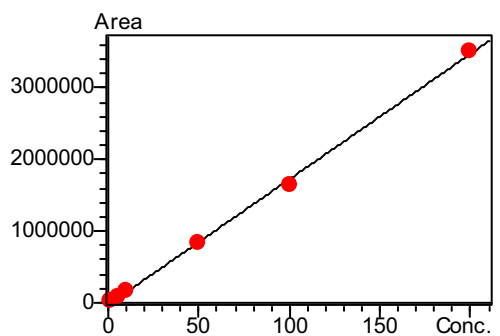


图 24 磺胺间二甲氧嘧啶的标准工作曲线

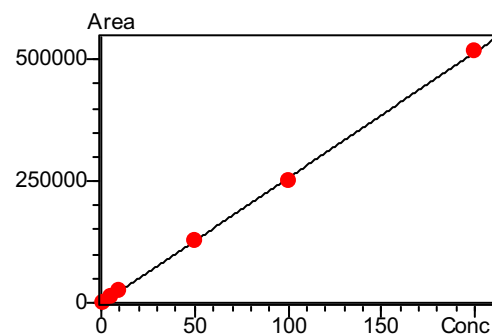


图 25 磺胺喹噁啉的标准工作曲线

表 3 12 种物质的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 R
1	磺胺醋酰	$Y = (3826.48)X + (4169.68)$	0.9995
2	磺胺嘧啶	$Y = (11871.8)X + (-11818.8)$	0.9998
3	磺胺噻唑	$Y = (9060.06)X + (-15028.4)$	0.9991
4	磺胺吡啶	$Y = (10690.2)X + (-17268.2)$	0.9996
5	磺胺甲基嘧啶	$Y = (9172.93)X + (-10178.5)$	0.9998
6	磺胺二甲嘧啶	$Y = (12027.5)X + (-27177.9)$	0.9993
7	磺胺甲氧哒嗪	$Y = (11505.3)X + (-2363.67)$	0.9999
8	磺胺氯哒嗪	$Y = (3292.91)X + (-1440.52)$	0.9999

9	磺胺甲噁唑	$Y = (4594.02)X + (-1854.49)$	0.9998
10	磺胺二甲基异噁唑	$Y = (3040.69)X + (-1135.20)$	0.9998
11	磺胺间二甲氧嘧啶	$Y = (17525.0)X + (-25256.2)$	0.9994
12	磺胺喹噁啉	$Y = (2587.97)X + (-2408.19)$	0.9999

2.3 检出限和定量限

配制 1 µg/L 的混合标样 7 份, 进样分析, 对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S, 此时检出限 MDL=3.14×S, 定量限 LOQ=4×MDL。测定结果如表 4 所示:

表 4 12 种物质的检出限和定量限(n=7)

No.	名称	标准偏差(S)	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
1	磺胺醋酰	0.07	0.21	0.84
2	磺胺嘧啶	0.03	0.10	0.41
3	磺胺噻唑	0.07	0.21	0.85
4	磺胺吡啶	0.07	0.23	0.94
5	磺胺甲基嘧啶	0.06	0.18	0.70
6	磺胺二甲嘧啶	0.04	0.13	0.51
7	磺胺甲氧哒嗪	0.04	0.13	0.52
8	磺胺氯哒嗪	0.07	0.20	0.82
9	磺胺甲噁唑	0.06	0.20	0.81
10	磺胺二甲基异噁唑	0.08	0.24	0.95
11	磺胺间二甲氧嘧啶	0.04	0.13	0.50
12	磺胺喹噁啉	0.08	0.24	0.97

2.4 精密度实验

平行配置如表 5 浓度的混合标液各 6 份, 依次进样。12 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05 ~ 0.40% 和 1.00 ~ 5.57% 之间, 仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

No.	名称	RSD% (1 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	磺胺醋酰	0.38	4.71	0.40	4.43	0.17	2.34
2	磺胺嘧啶	0.32	3.26	0.27	3.91	0.22	2.21
3	磺胺噻唑	0.22	5.22	0.21	3.13	0.22	1.82
4	磺胺吡啶	0.38	5.57	0.32	2.85	0.26	1.16
5	磺胺甲基嘧啶	0.13	5.28	0.28	3.86	0.19	1.00

6	磺胺二甲嘧啶	0.06	4.32	0.18	2.40	0.16	2.64
7	磺胺甲氧哒嗪	0.19	5.49	0.21	4.02	0.18	1.69
8	磺胺氯哒嗪	0.24	5.39	0.11	3.47	0.13	2.49
9	磺胺甲噁唑	0.15	5.18	0.08	4.46	0.13	3.33
10	磺胺二甲基异噁唑	0.19	5.25	0.07	4.41	0.12	1.91
11	磺胺间二甲氧嘧啶	0.12	4.85	0.10	2.06	0.05	1.83
12	磺胺喹噁啉	0.29	4.93	0.09	4.00	0.05	2.53

2.5 基质加标实验

在按照 1.3 中样品制备方法，样品中添加混合标样，加标含量如表 6，各平行 4 次。测试结果显示：鱼的样品加标回收率在 85.7 ~ 116.5%之间；具体结果如表 6。鱼基体空白的色谱图如图 26 所示，鱼加标样品的色谱图如图 27 所示。

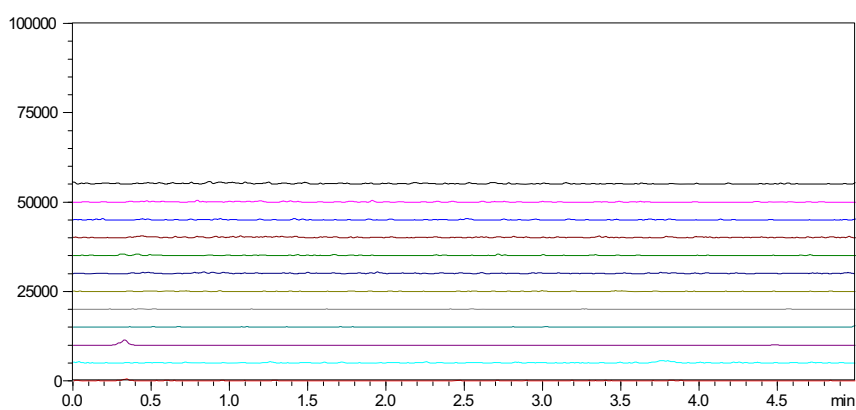


图 26 鱼基体空白色谱图

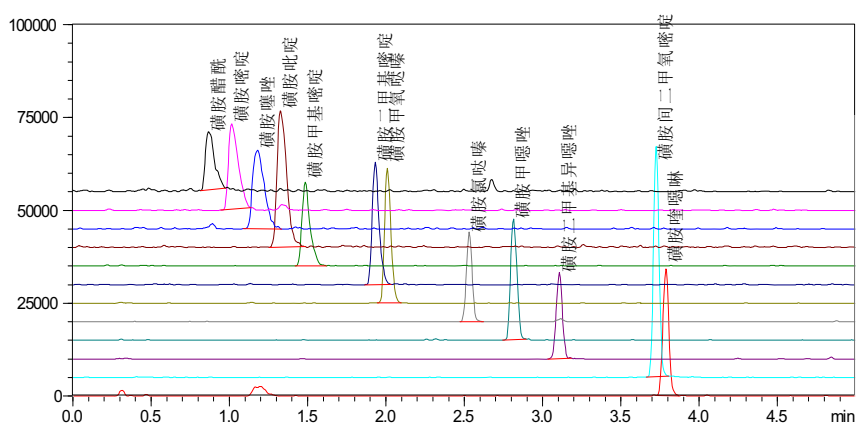


图 27 2 µg/kg 样品基质加标样色谱图

表 6 加标样的回收率结果(n=4)

No.	样品名称	回收率 (%)		
		0.2 µg/kg	2 µg/kg	20 µg/kg
1	磺胺醋酰	110.4	88.6	91.2

2	磺胺嘧啶	97.9	96.4	89.6
3	磺胺噻唑	91.2	91.1	90.0
4	磺胺吡啶	107.7	106.3	101.6
5	磺胺甲基嘧啶	85.7	94.0	88.8
6	磺胺二甲嘧啶	116.3	97.2	87.4
7	磺胺甲氧哒嗪	106.5	91.9	90.5
8	磺胺氯哒嗪	98.7	95.3	91.3
9	磺胺甲噁唑	89.7	103.1	104.8
10	磺胺二甲基异噁唑	98.3	102.2	106.8
11	磺胺间二甲氧嘧啶	93.6	94.1	93.5
12	磺胺喹噁啉	113.9	93.9	95.0

3. 结论

使用岛津超快速液相色谱仪 UFLCXR 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定水产品中磺胺类药物残留量。12 种磺胺类药物的线性良好，相关系数均大于 0.999；其仪器检出限为 0.10 ~ 0.24 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 0.41 ~ 0.97 $\mu\text{g/L}$ ；对浓度为 0.2 $\mu\text{g/kg}$ 、2 $\mu\text{g/kg}$ 以及 20 $\mu\text{g/kg}$ 三种浓度的 12 种磺胺类药物进行基质加标，其回收率在 85.7 ~ 116.5% 之间；此法的定量限为 0.2 $\mu\text{g/kg}$ ，低于《农业部 1077 号公告-1-2008 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》规定的检出限 1 $\mu\text{g/kg}$ 、定量限 2 $\mu\text{g/kg}$ 的要求。此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高，可作为测定水产品中磺胺类药物残留量的有效检测方法。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中硝基呋喃类代谢物残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用检测水产品中硝基呋喃类代谢物的残留量的测试方法。样品经处理后, 用超高效液相色谱 LC-30A 在 4.0 min 内完成分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。对四种硝基呋喃类代谢物残留的线性、精密度、检出限 (LOD)、定量限 (LOQ) 进行了验证。3-氨基-2-恶唑酮(AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮(AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(AHD)和氨基脲(SEM) 在 1~200 $\mu\text{g/L}$ 内线性良好, 相关系数均大于 0.999; 分别用浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液进行了精密度实验, 实验结果表明连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.28 ~ 0.07% 和 4.76 ~ 1.68% 间, 仪器精密度良好。

关键词: 硝基呋喃代谢物 兽药残留 水产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

硝基呋喃类药物 (Nitrofurans) 是一类合成的抗菌药物, 它们作用于微生物酶系统, 抑制乙酰辅酶 A, 干扰微生物糖类的代谢, 从而起抑菌作用。目前在医疗上应用较广者有: 呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮。呋喃西林只供局部应用, 后两者则可供系统治疗应用。目前在医疗上应用较广者有: 呋喃西林、呋喃妥因和呋喃唑酮。呋喃西林只供局部应用, 后两者则可供系统治疗应用。

硝基呋喃类药物很不稳定, 很容易生成代谢物。硝基呋喃类药物在动物体内迅速分解产生代谢物, 代谢物在体内与细胞膜蛋白结合成结合态。由于代谢物比较稳定也有致癌作用,

所以在食品安全的检测中检测硝基呋喃代谢物。常见的硝基呋喃代谢物的衍生物有如下四种, 包括: 3-氨基-2-恶唑酮 (AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮(AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(AHD)和氨基脲(SEM)。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用, 参考 GB/T 21311-2007, 建立了测定水产品中硝基呋喃代谢物, 包括: 3-氨基-2-恶唑酮 (AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮(AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(AHD)和氨基脲(SEM)残留量的检测方法, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用。具体配置: LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×150 mmL, 1.6 μm

流动相：A—（0.02%甲酸）水溶液；B—乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：20 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	40
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
1.51	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

喷雾针位置：3.0 mm

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 20 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：300℃

加热模块温度：500℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：20 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	3-氨基-2-恶唑酮 (AOZ)	236	134.10*	-18.0	-12.0	-29.0
			104.05	-18.0	-24.0	-22.0
2	5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮(AMAZ)	335	291.00*	-13.0	-11.0	-22.0
			262.00	-18.0	-17.0	-19.0
3	1-氨基-乙内酰胺 (AHD)	249	134.00*	-13.0	-13.0	-15.0
			103.95	-13.0	-22.0	-11.0
4	氨基脲(SEM)	209	166.10*	-11.0	-11.0	-18.0
			192.00	-11.0	-12.0	-14.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：硝基呋喃衍生化标准物质：3-氨基-2-恶唑酮(AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮(AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(AHD)和氨基脲(SEM)分别称取 10 mg 四种物质的标准品，用乙腈溶解并定容至 100 mL，得到浓度为 100 mg/L 的标准储备液。

用 0.02%甲酸水溶液配制 1.0 mg/L 的混合标准溶液，用 0.02%甲酸水溶液逐级稀释成浓度为 1、5、10、20、50、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。

样品前处理方法：

参考《GB/T 21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检验方法 高效液相色谱串联质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

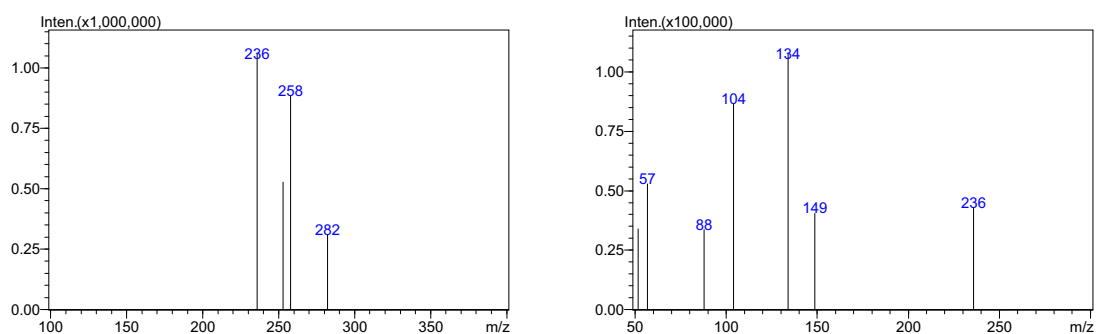


图1 3-氨基-2-恶唑酮(AOZ)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(右图)

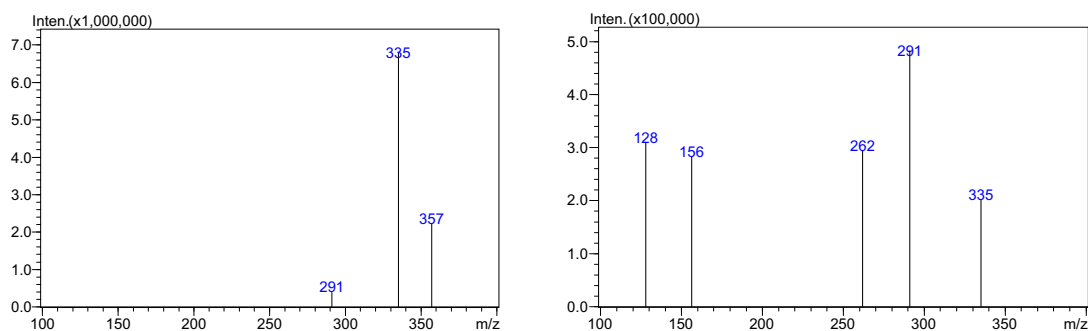


图2 5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮(AMOZ)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(右图)

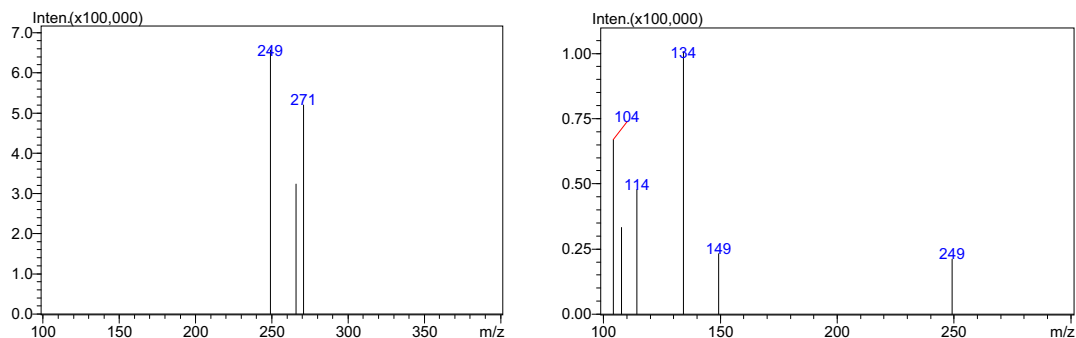


图3 1-氨基-乙内酰脲(AHD)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(右图)

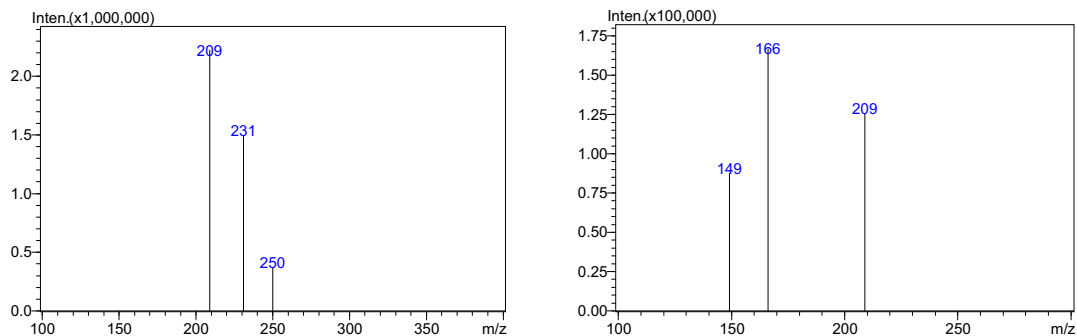


图4 氨基脲(SEM)的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(右图)

2.2 标准样品的MRM色谱图

1.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的MRM色谱如图5所示。

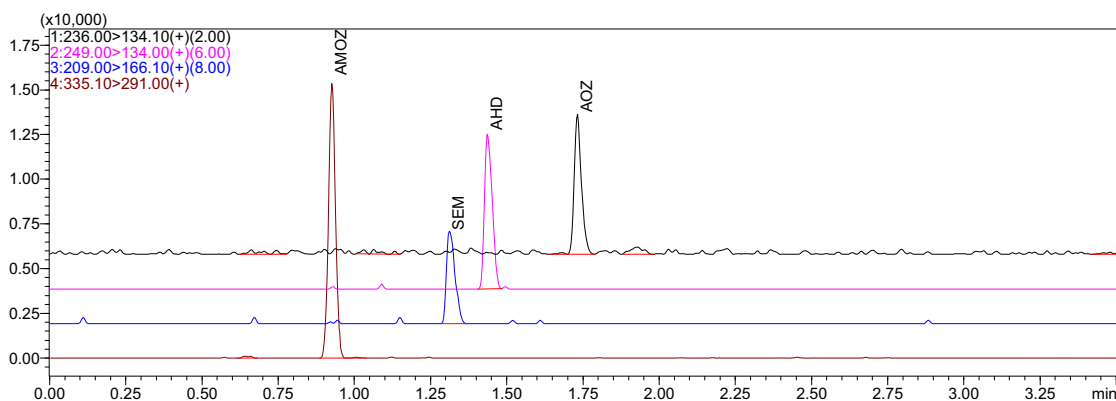


图5 1.0 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的MRM色谱图

2.3 线性关系

将浓度为1、5、10、20、50、100和200 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液，按1.2中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图6~9所示。四种硝基呋喃代谢物在1~200 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数见表3。

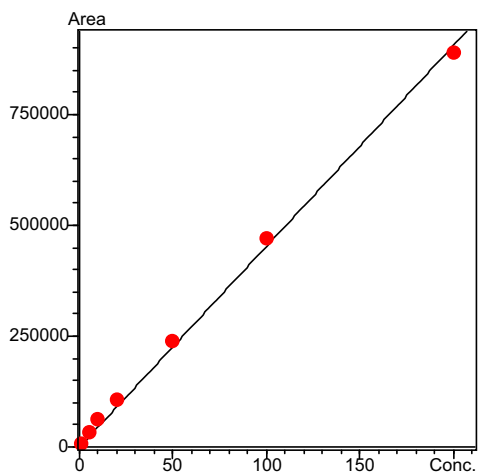


图6 AOZ的标准工作曲线

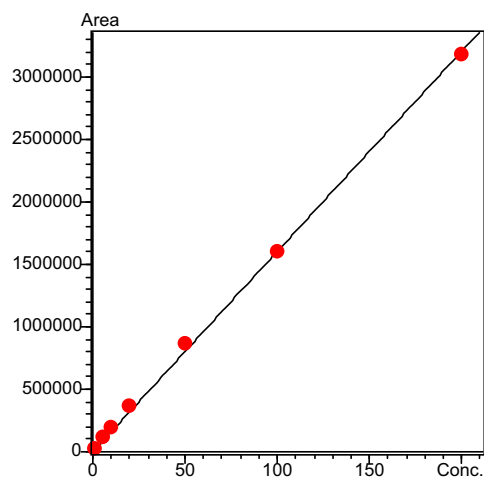


图7 AMOZ的标准工作曲线

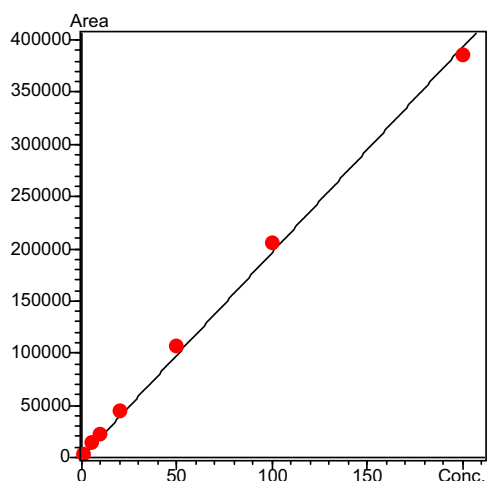


图 8 AHD 的标准工作曲线

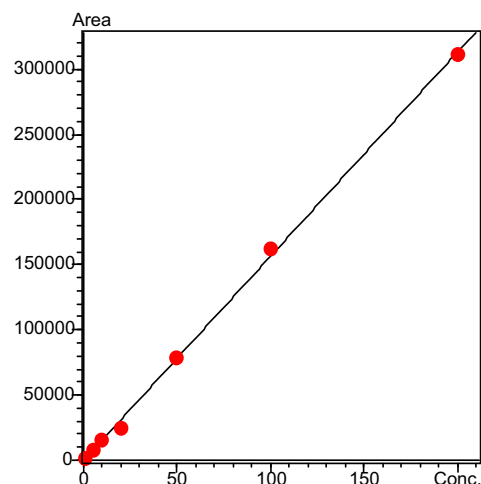


图 9 SEM 的标准工作曲线

表 3 4 种硝基呋喃代谢物的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 R
1	AOZ	$Y = 4530.67X$	0.9996
2	AMAZ	$Y = 16043.7X$	0.9998
3	AHD	$Y = 1967.93X$	0.9994
4	SEM	$Y = 1566.74X$	0.9996

2.3 检出限和定量限

配制浓度为 5.0 $\mu\text{g/L}$ 标样，直接进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算硝基呋喃四种化合物的标准偏差 S。此时检出限 $\text{MDL} = 3.14 \times S$ ，定量限 $\text{LOQ} = 4 \times \text{MDL}$ 。测定结果如表 4 所示。

表 4 4 种硝基呋喃代谢物的检出限和定量限

No.	名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)	标准限值($\mu\text{g/L}$)
1	AOZ	0.06	0.19	0.76	1.0
2	AMAZ	0.07	0.22	0.88	1.0
3	AHD	0.04	0.12	0.48	1.0
4	SEM	0.05	0.16	0.64	1.0

2.4 精密度实验

平行制备浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 标样各 6 份，依次进样。得到统计结果如表 5 所示，四种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.28 ~ 0.07% 和 4.76 ~ 1.68% 之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	样品名称	RSD% (1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	AOZ	0.13	3.84	0.15	2.36	0.09	2.16

2	AMOZ	0.11	4.24	0.09	2.13	0.07	1.69
3	AHD	0.14	3.56	0.27	3.49	0.12	2.24
4	SEM	0.27	4.76	0.28	4.66	0.12	1.68

2.5 基质加标实验

为了考察方法的灵敏度，在按照 1.3 中样品制备方法提取净化的空白鱼肉基质样品中添加混合标样，加标含量为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，水产品基质空白色谱图如图 10 所示，基质加标样品色谱图如图 11 所示。从图中可以看到，0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 基质加标样品有良好的响应。

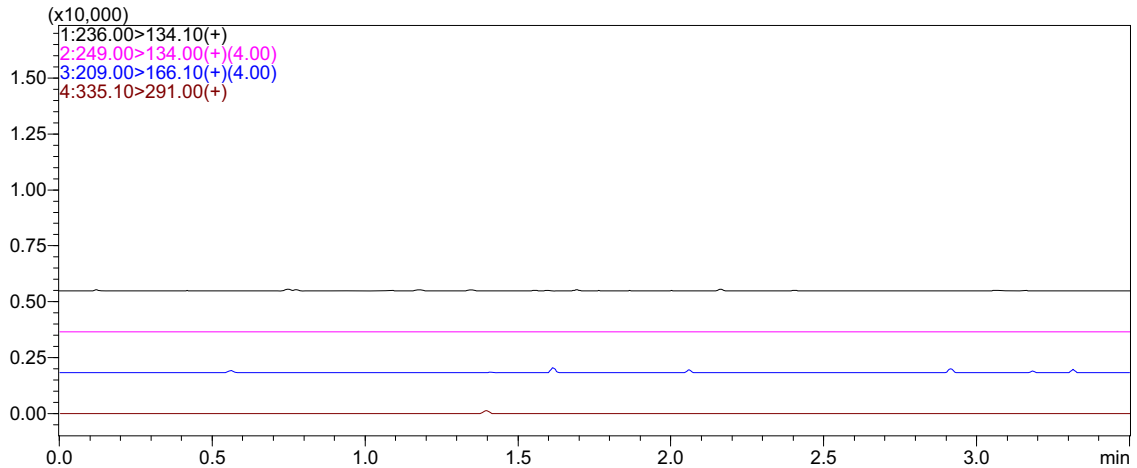


图 10 鱼肉样品空白基体色谱图

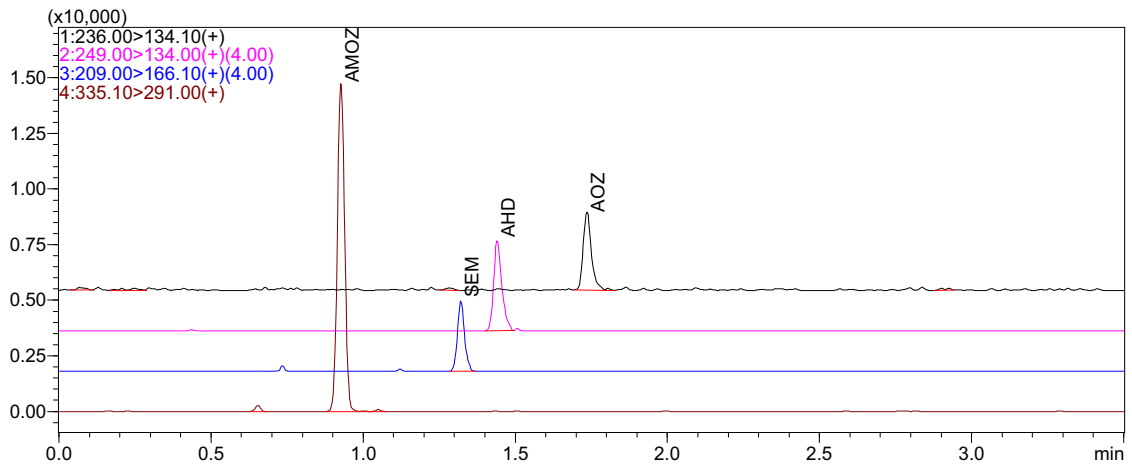


图 11 样品基质加标 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 色谱图

3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中四种硝基咪唑代谢物残留量。3-氨基-2-恶唑酮 (AOZ)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮 (AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲(AHD)和氨基脲(SEM)四种物质在 1~200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数均大于 0.999。在经样品前处理后的鱼肉基体中添加标液，基质加标样具有良好的响应，满足《GB/T 21311-2007 动物源性食品中硝基咪唑类药物代谢物残留量检验方法 高效液相色谱串联质谱法》的检测要求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中硝基咪唑类的兽药残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中硝基咪唑兽药残留的方法。样品经处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 在 6 min 内实现快速分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。对 5 种硝基咪唑兽药残留的线性、精密度、检出限 (LOD)、定量限 (LOQ) 进行了验证。洛硝哒唑、2-甲基-5 硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 内线性良好,相关系数均大于 0.999; 分别用浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液进行了精密度实验,实验结果表明连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.07~1.37%和 0.66~2.52%间,仪器精密度良好; LOD 为 0.17~0.40 $\mu\text{g/L}$ 与 LOQ 为 0.59~1.21 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词: 硝基咪唑 兽药残留 水产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

硝基咪唑类(5-nitroimidazoles)药物是一类具有 5-硝基咪唑环结构的药物,包括洛硝哒唑、2-甲基-5 硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑等。硝基咪唑类药物是畜禽饲料中常用的抗原虫感染及抗菌药,并具有促生长作用,但是该类物质及其某些代谢物对哺乳动物具有致癌、致畸、致突变作用和遗传毒性。饲料中硝基咪唑类药物的不合理使用造成可食性动物组织中药物残留问题危害到人类的食品安全。

对硝基咪唑在水产品、畜产品中残留的检测方法国内外均有报道,液相色谱法和气相色谱法不能满足欧盟 2002/657/EC 决议的要求,

气质联用法的前处理过程复杂需进行衍生化处理,液质联用法可有效减少背景干扰,提高灵敏度,将是硝基咪唑类药物残留检测的首选方法。此外,我国针对硝基咪唑类药物残留的检测颁布了相关法规,例如《GB/T 21318-2007 动物源性食品中硝基咪唑残留量检验方法》。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用,参考 GB/T 21318-2007,建立了测定水产品中硝基咪唑类(洛硝哒唑、2-甲基-5 硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑和异丙硝唑)兽药残留的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.42 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS II 2.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm

流动相：A—0.1%甲酸水溶液；B—甲醇

流速：0.25 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 °C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.50	Pumps	Pump B Conc.	100
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
5.01	Pumps	Pump B Conc.	15
9.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 °C

加热模块温度：400 °C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：35 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	洛硝哒唑	201.0	139.7*	-22.0	-10	-29.0
		201.0	54.6	-11.0	-25	-24.0
2	2-甲基-5-硝基咪唑	128.0	41.9*	-20.0	-30	-19.0
		128.0	81.9	-10.0	-20	-16.0
3	甲硝唑	172.0	81.8*	-14.0	-25	-16.0
		172.0	127.7	-14.0	-15	-26.0
4	4-硝基咪唑	114.0	67.9*	-14.0	-20	-27.0
		114.0	41.1	-21.0	-15	-16.0

5	异丙硝唑	170.1	124.1*	-14.0	-20	-27.0
		170.1	109.1	-14.0	-25	-22.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

标准物质: 洛硝哒唑、2-甲基-5 硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑。

分别称取 10 mg 5 种物质的标准品, 用甲醇溶解并定容至 1000 $\mu\text{g/L}$ 。

用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准溶液, 用甲醇+水 (15+85) 逐级稀释成浓度为 100、50、20、10、5 和 2 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。

样品前处理方法:

参考《GB/T 21318-2007 动物源性食品中硝基咪唑残留量检验方法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

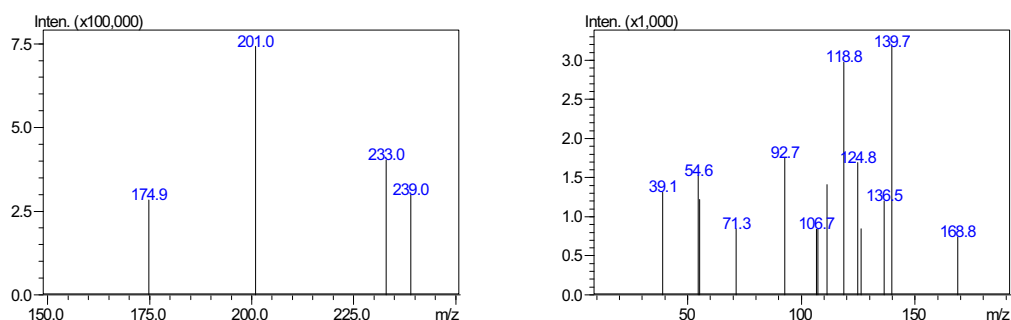


图 1 洛硝哒唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (右图)

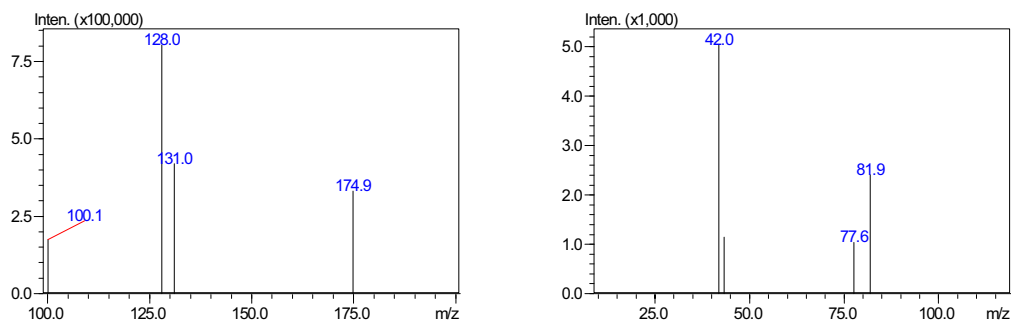


图 2 2-甲基-5-硝基咪唑的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (右图)

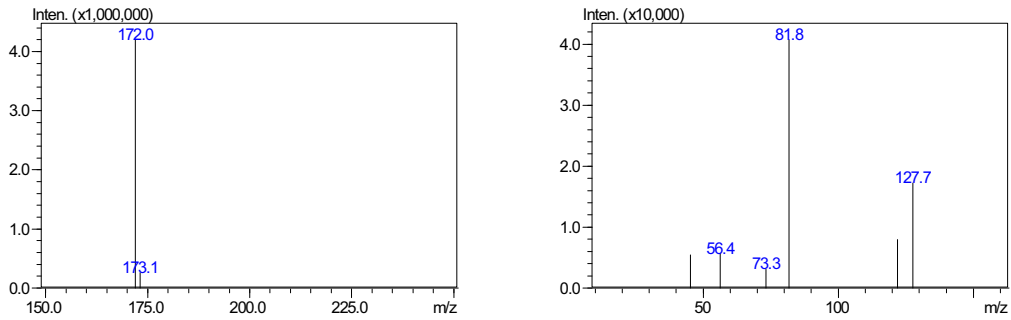


图 3 甲硝唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（右图）

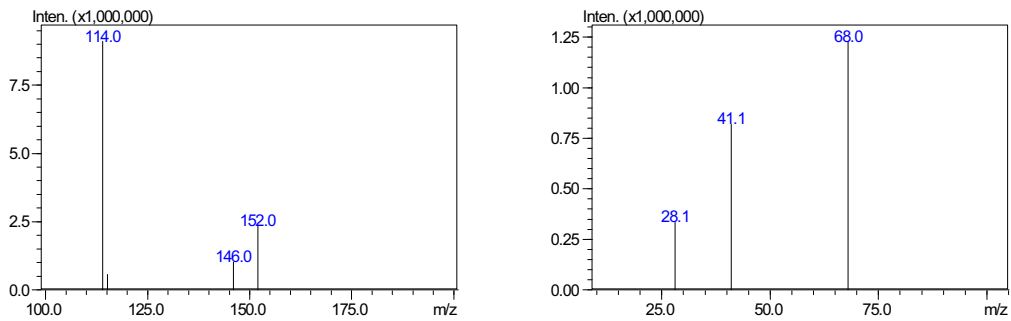


图 4 4-硝基咪唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（右图）

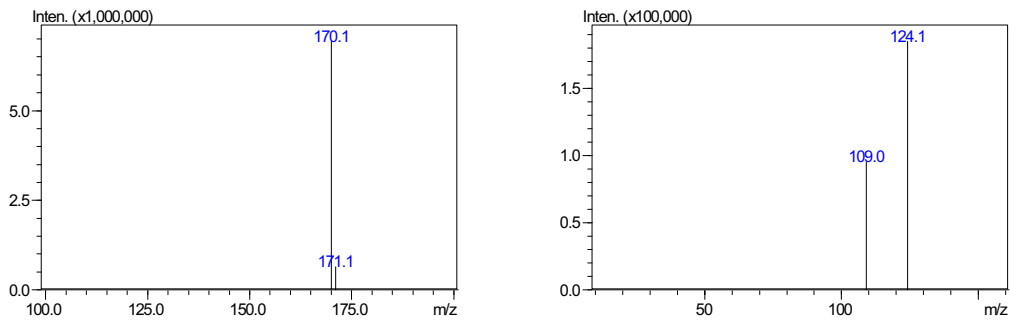


图 5 异丙硝唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（右图）

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱如图 6 所示。

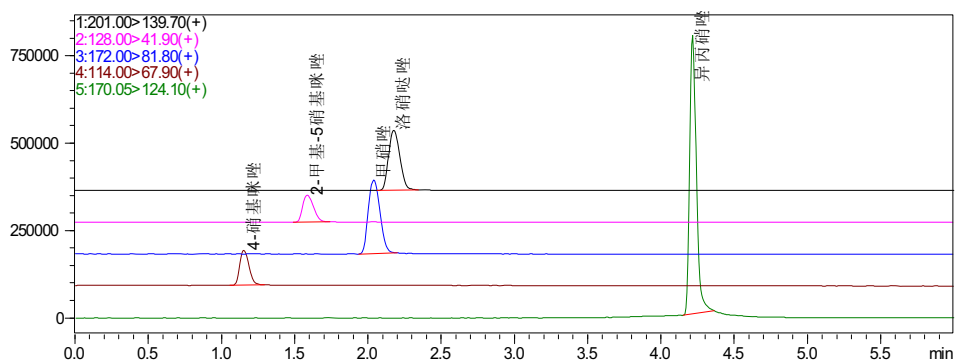


图 6 50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 2, 5, 10, 20, 50 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 外标法制作校准曲线, 如图 7~11 所示。5 种硝基咪唑物质在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数见表 3。

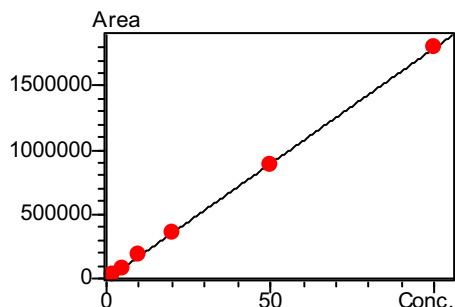


图 7 洛硝哒唑的标准工作曲线

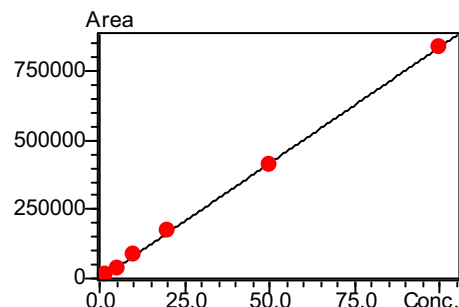


图 8 2-甲基-5-硝基咪唑的标准工作曲线

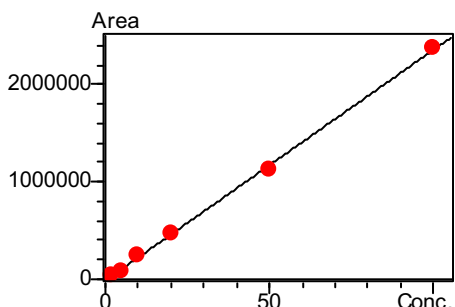


图 9 甲硝唑的标准工作曲线

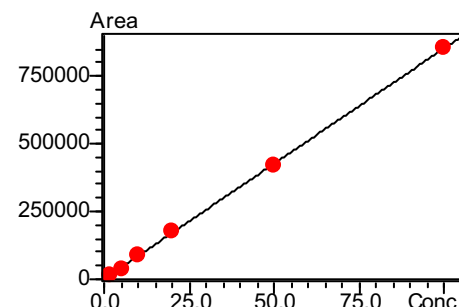


图 10 4-硝基咪唑的标准工作曲线

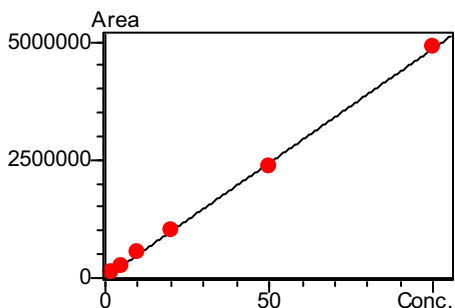


图 11 异丙硝唑的标准工作曲线

表 3 5 种硝基咪唑的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 R
1	洛硝哒唑	$Y = (18033.6)X + (-7926.56)$	0.9999
2	2-甲基-5-硝基咪唑	$Y = (8405.32)X + (-3629.04)$	0.9999
3	甲硝唑	$Y = (23695.8)X + (-13207.9)$	0.9996
4	4-硝基咪唑	$Y = (8511.96)X + (1085.90)$	0.9999
5	异丙硝唑	$Y = (48457.1)X + (16721.6)$	0.9998

2.3 检出限和定量限

配制浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 标样 7 份, 直接进样分析, 对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S, 此时检出限 $\text{LOD}=3.3\text{S}$, 定量限 $\text{LOQ}=10\text{S}$ 。测定结果如表 4 所示:

表 4 5 种硝基咪唑的检出限和定量限

No.	名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
1	洛硝哒唑	0.06	0.19	0.59
2	2-甲基-5-硝基咪唑	0.09	0.29	0.87
3	甲硝唑	0.08	0.25	0.77
4	4-硝基咪唑	0.12	0.40	1.21
5	异丙硝唑	0.05	0.17	0.52

2.4 精密度实验

平行制备浓度为 5 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 标样各 6 份, 依次进样。5 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.07-1.37%和 0.66 ~ 2.52%之间, 仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	样品名称	RSD% (5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (20 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (100 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	洛硝哒唑	1.23	1.53	0.82	1.25	1.16	0.64
2	2-甲基-5-硝基咪唑	1.03	2.52	0.69	1.34	0.93	1.22
3	甲硝唑	1.14	1.72	0.76	1.37	1.08	0.76
4	4-硝基咪唑	0.75	2.16	0.51	1.10	0.97	0.86
5	异丙硝唑	0.15	1.85	0.07	0.91	0.10	0.66

2.5 基质加标实验

为了考察方法的灵敏度, 在按照 1.3 中样品制备方法提取净化的空白鱼肉基质样品中添加混合标样, 加标含量为 2 $\mu\text{g/L}$ (0.1 $\mu\text{g/kg}$), 水产品基质空白色谱图如图 12 所示, 基质加标样品色谱图如图 13 所示。从图中可以看到, 2 $\mu\text{g/L}$ 基质加标样品有很好的响应。

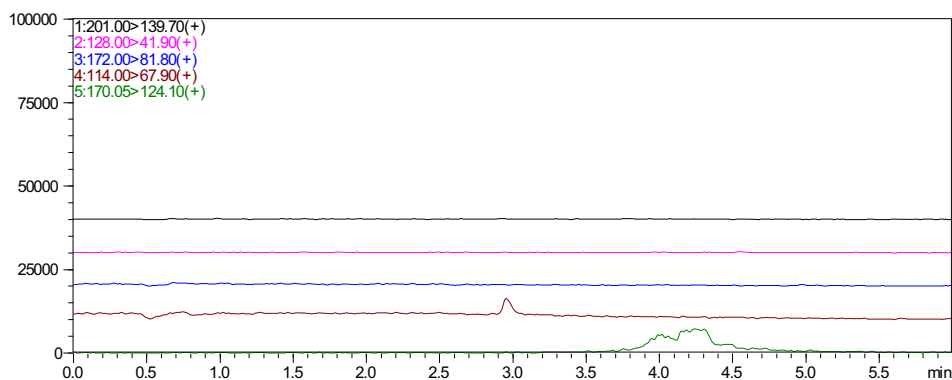


图 12 鱼肉样品空白基体色谱图

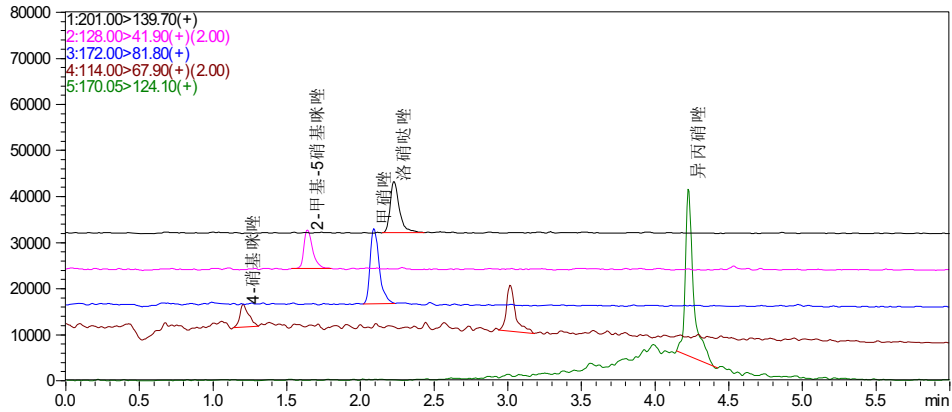


图 13 样品基质加标样色谱图

3. 结论

参考 GB/T 21318-2007，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中 5 种硝基咪唑兽药残留量。洛硝哒唑、2-甲基-5 硝基咪唑、甲硝唑、4-硝基咪唑、异丙硝唑这 5 种硝基咪唑类兽药在 2~100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数均大于 0.999。检出限为 0.17-0.40 $\mu\text{g/L}$ ；定量限为 0.59~1.21 $\mu\text{g/L}$ 。在经样品前处理后的鱼肉基体中添加标液，0.1 $\mu\text{g/kg}$ 基质加标样有很好的响应，能满足《GB/T 21318-2007 动物源性食品中硝基咪唑残留量检验方法》标准中的测定低限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 的要求，并且比标准要求的更低。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中林可胺类抗生素残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定水产品中林可胺类抗生素的方法。水产品经处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行分析。盐酸林可霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$; 盐酸克林霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好,标准曲线的相关系数均在 0.9996 以上;对 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 林可霉素、克林霉素混合标准溶液进行精密度实验,连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.31%和 3.95%以下,系统精密度良好。

关键词: 林可胺类抗生素 林可霉素 克林霉素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

林可胺类抗生素(Lincomycin)又叫洁霉素,是由放线杆菌或小单孢菌产生的一类抗生素。主要对革兰阳性菌、某些厌氧菌和霉形体有较强抗菌作用,抗菌谱较红霉素窄。金黄色葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎球菌及猪肺炎霉形体、鸡败血霉形体对本品敏感,但肠球菌一般对本品耐药;厌氧菌如拟杆菌、破伤风杆菌、梭状芽孢杆菌、魏氏梭菌、消化球菌等对本品敏感。主要用于治疗革兰阳性菌特别是耐青霉素的革兰阳性菌所引起的各种感染,霉形体引起的家禽慢性呼吸道病、猪喘气病,厌氧菌感染如鸡的坏死性肠炎等,也用于治疗猪密螺

旋体痢疾、弓形体病和狗、猫的放线菌病。

《GB/T2020762-2006.20 畜禽肉中林可霉素竹桃霉素红霉素替米考星泰乐菌素克林霉素螺旋霉素吉它霉素交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》规定,林可霉素的 MRL 为 1.0 $\mu\text{g/kg}$;克林霉素的 MRL 为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用,建立了一种测定水产品中林可霉素和克林霉素的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD \times 2(输液泵), DGU-20A₅(在线脱气机), SIL-30AC(自动进样器), CTO-30AC(柱温箱), CBM-20A(系统控制器), LCMS-8030(三重四极杆质谱仪), LabSolutions Ver. 5.41(色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS II (2.0 mm I.D. \times 75 mm L., 2.2 μm)

流动相：A—0.1 %甲酸水溶液；B—甲醇

流速：0.2 mL/min

进样体积：10 μ L

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱方式：等度洗脱，B相:80%。

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：ESI(+), 4.5kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}$ C

加热模块温度：400 $^{\circ}$ C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 1

表 1. MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	林可霉素	407.3	126.1*	-20	-40	-17
			359.3	-20	-20	-27
2	克林霉素	425.3	126.1*	-21	-50	-10
			377.3	-21	-20	-28

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：准确称取适量林可霉素、克林霉素标准物质，用甲醇配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液，用流动相稀释成浓度为 1、5、10、20、50、100 μ g/L 的标准工作液。

样品前处理方法：水产品的制备、净化、提取参照《GB/T2020762-2006.20 畜禽肉中林可霉素竹桃霉素红霉素替米考星泰乐菌素克林霉素螺旋霉素吉它霉素交沙霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

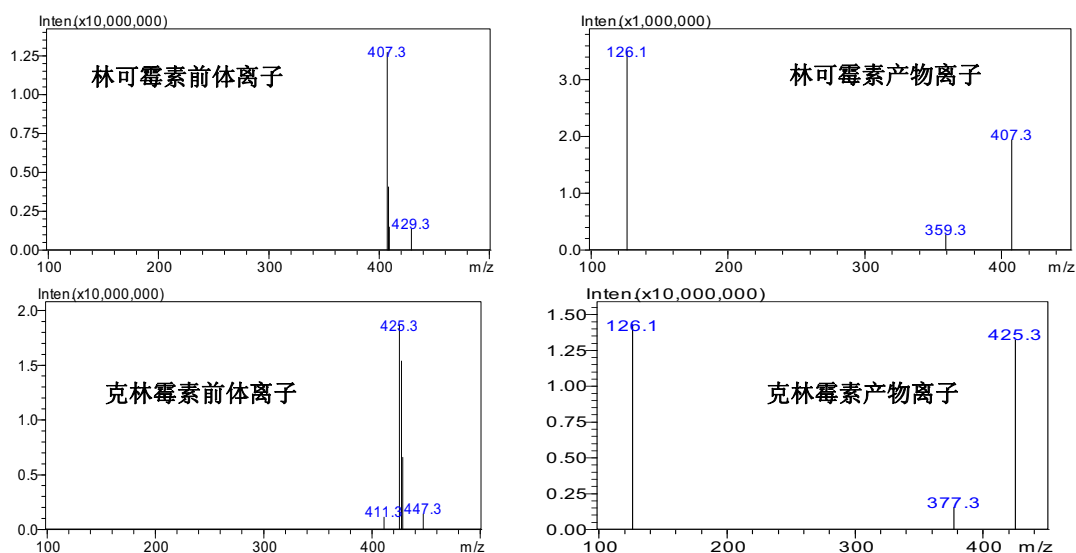


图 1. 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 2 为 50 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱，林可霉素、克林霉素在 6 分钟内得到了快速检测。

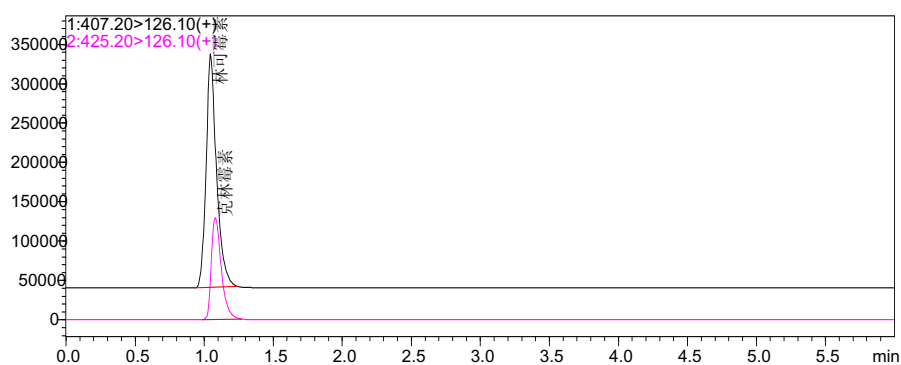


图 2. 林可胺类抗生素 50 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示。林可霉素在 1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好；克林霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数见表 2。

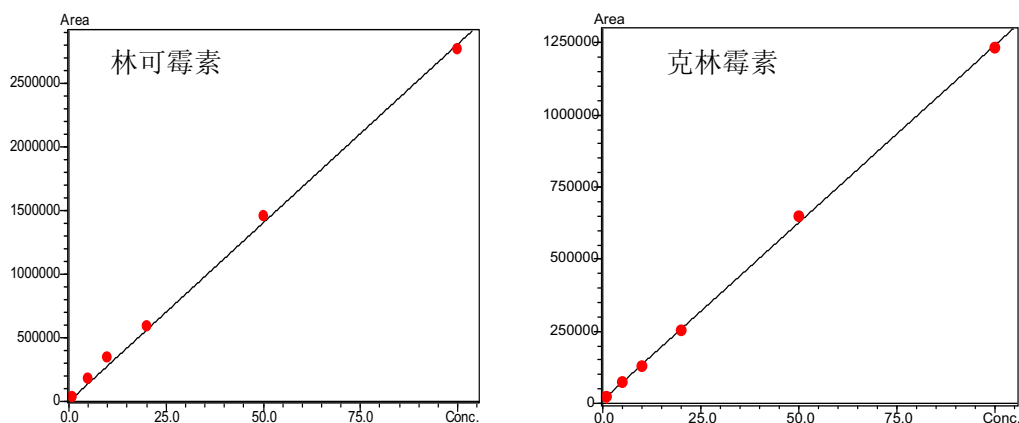


图 3. 林可霉素和克林霉素的标准工作曲线

表 2. 林可霉素和克林霉素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数	线性范围
R				
1	林可霉素	$Y = 28070.0X$	0.9996	1-100
2	克林霉素	$Y = 12478.9X$	0.9997	1-100

2.4 检出限和定量限

配制浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 标样 7 份, 直接进样分析, 对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S, 此时检出限 $\text{LOD}=3.3\text{S}$, 定量限 $\text{LOQ}=10\text{S}$ 。测定结果如表 3 所示:

表 3 林可霉素和克林霉素的检出限和定量限

No.	名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
1	林可霉素	0.07	0.22	0.68
2	克林霉素	0.04	0.13	0.39

2.5 精密度实验

对 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 林可霉素、克林霉素混合标准溶液连续 6 次进样, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02%~1.87%和 0.97%~5.04%之间, 仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (5 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
林可霉素	0.31	3.01	0.11	2.37	0.17	2.82
克林霉素	0.26	3.95	0.19	3.26	0.16	3.21

2.6 基质加标实验

为了考察方法的灵敏度, 在按照 1.3 中样品制备方法提取净化的空白猪肉基质样品中添加浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的林可霉素、克林霉素混合标样, 水产品基质空白色谱图如图 4 所示, 水产品基质加标样品色谱图如图 5 所示。从图中可以看到, 基质加标样品在定量限上均有很好的响应。

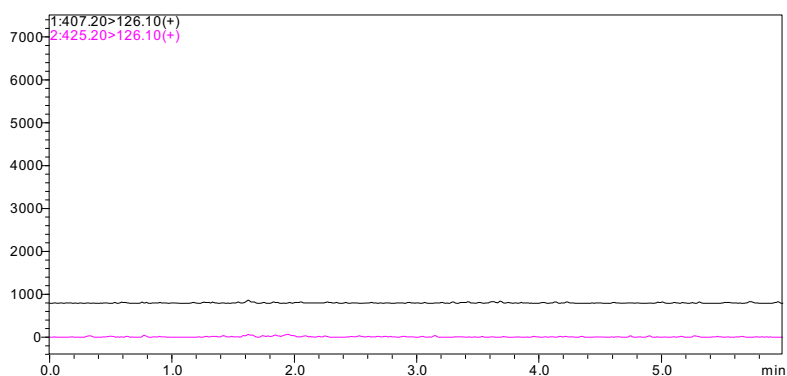


图 4. 水产品空白基质色谱图

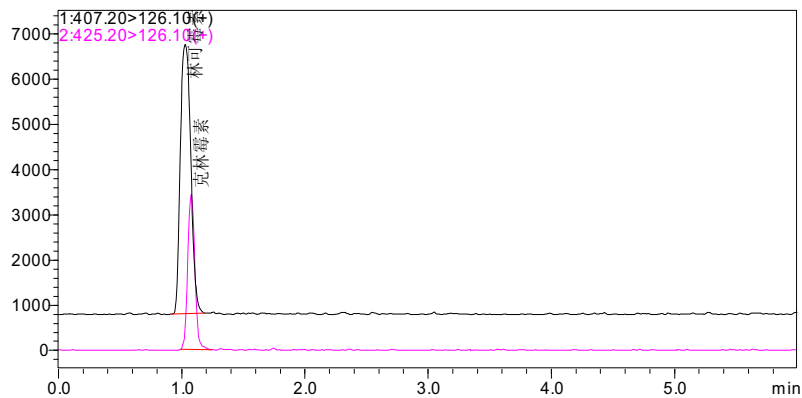


图 5. 水产品空白基质加标样品的色谱图

3. 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中林可霉素、克林霉素的方法。该方法灵敏度高，精密度良好；林可霉素、克林霉素在 1-100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9996 以上。在经样品前处理后的水产品空白基质中添加混合标样，基质加标样品有很好的响应，满足标准检测要求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的三甲氧苄氨嘧啶残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用快速测定水产品中三甲氧苄氨嘧啶的方法。水产品经处理后, 用超高效液相色谱 LC-30A 分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行分析。三甲氧苄氨嘧啶在 0.1-100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 标准曲线的相关系数为 0.9993; 对 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 三甲氧苄氨嘧啶标准溶液进行精密度实验, 连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.31%和 3.95%以下, 系统精密度良好。

关键词: 三甲氧苄氨嘧啶 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

三甲氧苄氨嘧啶 (TMP), 是一种磺胺增效剂。常与多种抗生素合用, 也可产生协同作用, 增强疗效, 可以成倍增加部分抗菌药的疗效。抗菌谱与磺胺药基本类似, 但抗菌作用弱, 且易产生耐药性。和磺胺类、四环素、青霉素、红霉素、庆大霉素、粘菌素等合用可以增强抗菌作用。

目前我国对磺胺类及其增效剂的使用有比较明确的规定。农业部 NY 5034 - 2005 中规定禽肉类产品中磺胺类总量不得超过 100 $\mu\text{g/kg}$; NY5070 - 2002 中规定磺胺类在水产品中总量不得超过 100 $\mu\text{g/kg}$, 增效剂磺胺三

甲氧苄氨嘧啶限量不得超过 50 $\mu\text{g/kg}$ 。日本肯定列表中将动物源性食品的最低限量定为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。

《SN/T 2538-2010 进出口动物源性食品中二甲氧苄氨嘧啶,三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶残留量的检测方法液相色谱质谱/质谱法》规定, 三甲氧苄氨嘧啶的检测下限为 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用, 建立了一种测定水产品中三甲氧苄氨嘧啶的方法, 供检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器配置

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为: LC-30AD \times 2 (输液泵), DGU-20A₅ (在线脱气机), SIL-30AC (自动进样器), CTO-30A (柱温箱), CBM-20A (系统控制器), LCMS-8040 (三重四极杆质谱仪), LabSolutions Ver. 5.53 (色谱工作站)。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色 谱 柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm)

流动相：A—0.1 %甲酸水溶液；B—甲醇

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μ L

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱方式：梯度洗脱

梯度条件：见表 1

表 1. 梯度条件

Time(min)	Module	Command	Value
0.01	Pumps	Pump B Conc.	20
0.50	Pumps	Pump B Conc.	50
0.60	Pumps	Pump B Conc.	50
0.61	Pumps	Pump B Conc.	20
1.50	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI, 正离子扫描

离子源接口电压：ESI(+), 4.5kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}$ C

加热模块温度：400 $^{\circ}$ C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：100 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2. MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	三甲氧苄氨	291	230.15*	-20.0	-22.0	-25.0
	嘧啶		123.15	-20.0	-23.0	-13.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：准确称取适量三甲氧苄氨嘧啶标准物质，用乙腈配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液，用流动相稀释成浓度为 0.1、1、2、5、10、20、50、100 μ g/L 的标准工作液。

样品前处理方法：水产品的制备、净化、提取参照《SN/T 2538-2010 进出口动物源性食品中二甲氧苄氨嘧啶,三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶残留量的检测方法液相色谱质谱/质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

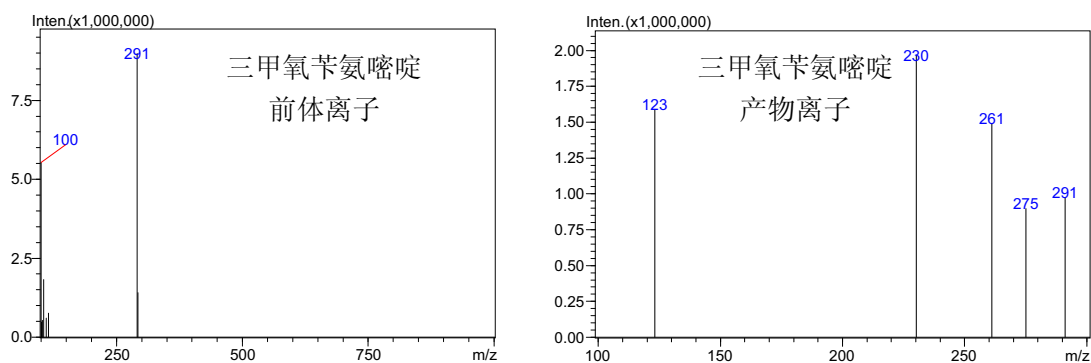


图 1. 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 2 为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱，三甲氧苄氨嘧啶在 1.5 min 内得到了快速检测。

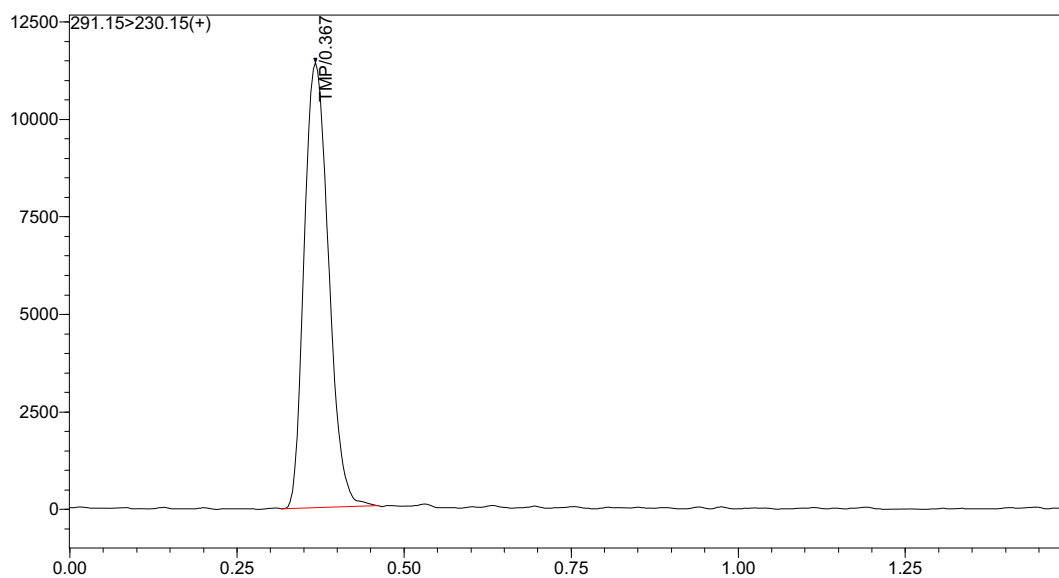


图 2. 三甲氧苄氨嘧啶 1.0 $\mu\text{g/L}$ 标准样品的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将浓度为 0.1、1、2、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 3 所示。三甲氧苄氨嘧啶在 0.1 ~ 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数见表 3。

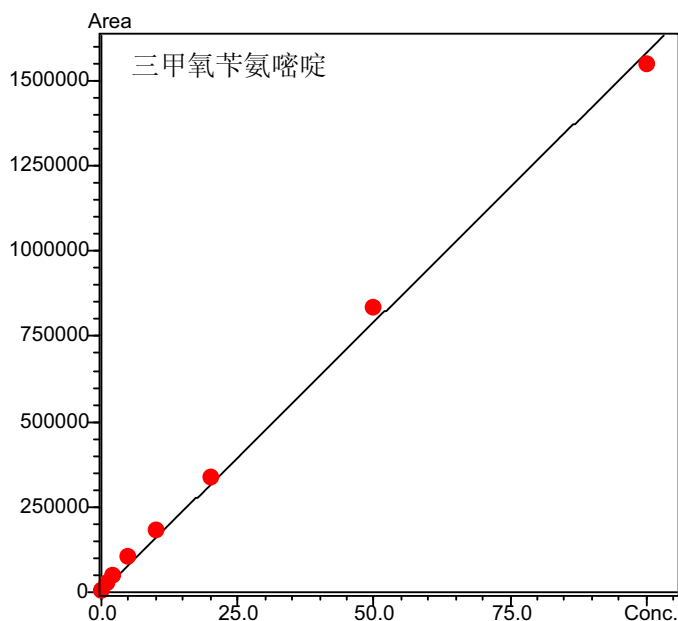


图 3. 三甲氧苄氨嘧啶的标准工作曲线

表 3. 三甲氧苄氨嘧啶的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	线性范围
1	三甲氧苄氨嘧啶	$Y = 15820.5X$	0.9993	0.1-100

2.4 检出限和定量限

配制浓度为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 标样，直接进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S ，此时检出限 $\text{MDL}=3.14\times S$ ，定量限 $\text{LOQ}=4\times\text{MDL}$ 。测定结果如表 4 所示：

表 4 三甲氧苄氨嘧啶的检出限和定量限

No.	名称	标准偏差(S)	检出限($\mu\text{g/L}$)	定量限($\mu\text{g/L}$)
1	三甲氧苄氨嘧啶	0.009	0.028	0.1

2.5 精密度实验

对 1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 三甲氧苄氨嘧啶标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.29%~0.90%和 1.23%~2.14%之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (2 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (10 $\mu\text{g/L}$)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
三甲氧苄氨嘧啶	0.90	2.14	0.34	1.23	0.29	1.72

2.6 基质加标实验

为了考察方法的灵敏度，在空白鱼肉基质样品中添加浓度为 1.0 $\mu\text{g/kg}$ 的三甲氧苄氨嘧啶标样，空白基质样与空白基质加标样经过 1.3 步骤前处理制备过程后，上机测试得到，鱼肉基质

空白色谱图如图 4 所示，鱼肉基质加标样品色谱图如图 5 所示。基质加标样品在 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 上均有很好的响应。基质样品加标回收率如表 6 所示，三甲氧苄氨嘧啶基质加标回收率为 82.2%。

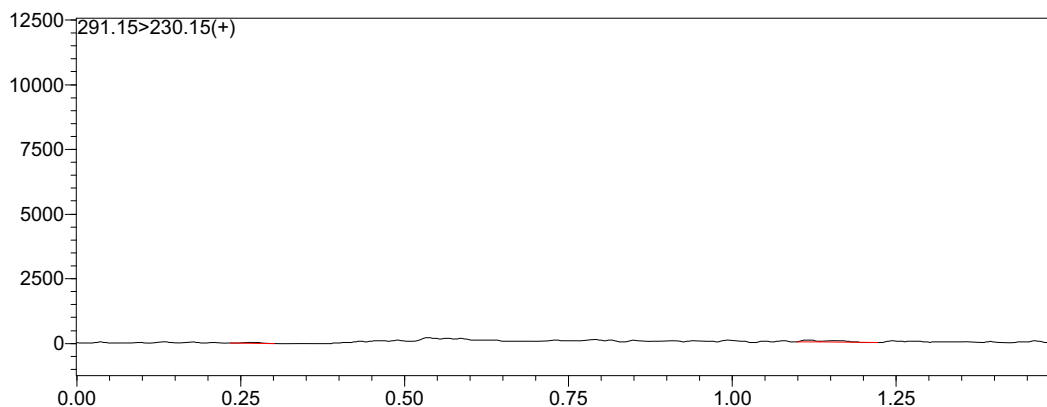


图 4. 鱼肉空白基质色谱图

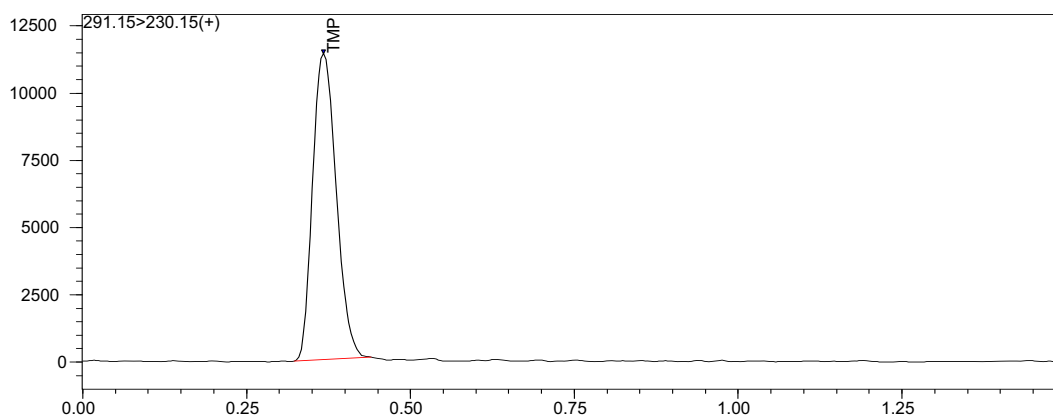


图 5. 鱼肉空白基质加标样品的色谱图

表 6 鱼肉基质样品加标 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 回收率

样品名称	基质样品含量 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	基质加标 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
三甲氧苄氨嘧啶	—	0.822	82.2

3. 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定水产品中三甲氧苄氨嘧啶的方法。该方法灵敏度高，精密度良好。三甲氧苄氨嘧啶在 0.1-100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，标准曲线的相关系数为 0.9993。在经样品前处理后的水产品空白基质中添加 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 标样，基质加标样品有很好的响应。本方法线性范围宽，定量限远低于标准规定的 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，可以用于水产品中三甲氧苄氨嘧啶残留量的检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中喹诺酮类抗生素的残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定水产品中10种喹诺酮类抗生素的分析方法。样品经处理后,用超高效液相色谱LC-30A在6 min内实现快速分离,三重四极杆质谱仪LCMS-8040进行定量分析。使用外标法绘制10种喹诺酮类抗生素的校准曲线线性良好,相关系数在0.9989~0.9999之间;对不同浓度的标准溶液进行精密度实验,连续6次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在0.50 %和5.30%以下,表明仪器精密度良好。不同浓度下基质加标回收率范围为68.0%~95.5%。

关键词: 水产品 喹诺酮类抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

喹诺酮类抗菌药(Quinolones, QNs)是指人工合成的一类抗菌药物,因其抗菌广谱、抗菌活性强、组织穿透力强、价格低廉、与其他抗菌药物无交叉耐药性等特点而广泛应用于动物和人类的多种感染性疾病的预防和治疗。此类药物主要用于预防和治疗鱼类疾病,少量使用还具有一定的促生长作用;过量使用或不当使用会造成动物源性食品中药物残留,若长期食用被此类药残污染的食品,人会产生耐药性和抗药性,严重时会引起食用者产生远期毒性作用及潜在“三致”(致癌、致畸、致突变)作用。因此,此类药物的残留问题越来越引起人们的关注。联合国粮农组织、世界卫生组织食品添加剂专家联席会议、欧盟都已制定了恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、

噁喹酸、氟甲喹在动物组织中的最高残留量限量;美国FDA于2005年宣布禁止用于治疗家禽和鱼类细菌感染的抗菌药物恩诺沙星的销售和使用;日本也在肯定列表中对恩诺沙星、环丙沙星、噁喹酸、氟甲喹的最大残留限量进行了规定。

由于水产品的蛋白质及脂肪含量高、基质复杂等原因,采用液相色谱法测定灵敏度低,超高效液相色谱与串联质谱联用法具有选择性强、灵敏度高和一次可检测多种喹诺酮类药物残留的优点,在喹诺酮类药物的确证分析中应用较多。本文建立了一种使用超高效液相色谱仪LC-30A和三重四极杆质谱仪LCMS-8040联用(UHPLC-MS/MS)测定水产品中10种喹诺酮类抗生素的方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-20AD_{XR}×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II 2.0 mm I.D.× 75 mm L., 2.2 μm

流动相: A—5 mM 乙酸铵 (含 0.1%甲酸); B—乙腈

流速: 0.4 mL/min

柱温: 40℃

进样量: 20 μL

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 梯度洗脱程序见表 1

表 1. 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.0	Pumps	Pump B Conc.	10%
4.0	Pumps	Pump B Conc.	60%
4.5	Pumps	Pump B Conc.	60%
4.6	Pumps	Pump B Conc.	10%
6.0	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI (+)

离子喷雾电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250℃

加热模块温度: 400℃

扫描模式: 多反应监测(MRM)

驻留时间: 10 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2. MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias(V)	CE(V)	Q ₃ Pre Bias(V)
吡呱酸	304.2	286.1*	-30.0	-19.0	-20.0
		217.1	-30.0	-21.0	-23.0
依诺沙星	321.2	303.2*	-15.0	-18.0	-22.0
		204.1	-15.0	-41.0	-21.0
氧氟沙星	362.2	318.2*	-30.0	-18.0	-22.0
		261.1	-30.0	-26.0	-27.0

培氟沙星	334.2	316.1*	-22.0	-21.0	-16.0
		290.2	-22.0	-16.0	-30.0
环丙沙星	332.2	314.1*	-15.0	-20.0	-22.0
		231.1	-15.0	-39.0	-25.0
洛美沙星	352.2	265.1*	-12.0	-23.0	-29.0
		308.2	-12.0	-16.0	-24.0
达氟沙星	358.2	340.2*	-17.0	-19.0	-17.0
		82.2	-17.0	-44.0	-30.0
恩诺沙星	360.3	342.2*	-17.0	-21.0	-25.0
		316.2	-17.0	-18.0	-22.0
沙拉沙星	386.2	368.3*	-26.0	-20.0	-25.0
		270.2	-26.0	-44.0	-26.0
西诺沙星	263.1	245.1*	-12.0	-14.0	-12.0
		189.0	-12.0	-27.0	-19.0

注：*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

标准物质：共 10 种，分别为依诺沙星、氧氟沙星、培氟沙星、环丙沙星、洛美沙星、达氟沙星、恩诺沙星、沙拉沙星、吡呱酸和西诺沙星。

标准工作溶液配制：用乙腈配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用乙腈和 0.1%甲酸水 (1/9, v/v) 溶液稀释成不同浓度的混合标准工作液。各标准物质的具体浓度见表 3。

表 3. 混合标准工作液中各标准物质的浓度 (μg/L)

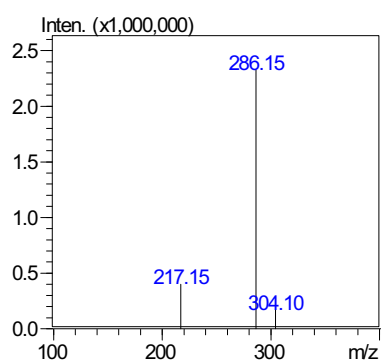
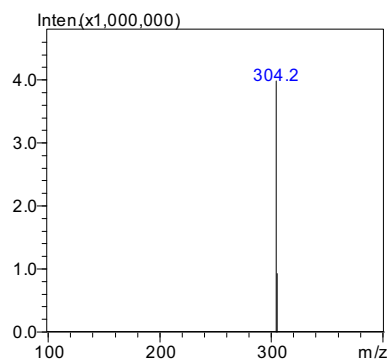
名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
吡呱酸	2	4	10	40	200	500
依诺沙星	2	4	10	40	200	500
氧氟沙星	2	4	10	40	200	500
培氟沙星	1	2	5	20	100	250
环丙沙星	0.5	1	2.5	10	50	125
洛美沙星	2	4	10	40	200	500
达氟沙星	1	2	5	20	100	250
恩诺沙星	0.5	1	2.5	10	50	125
沙拉沙星	0.4	0.8	2	8	40	100
西诺沙星	2	4	10	40	200	500

1.3.2 样品前处理方法

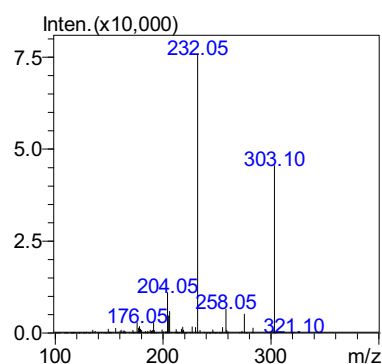
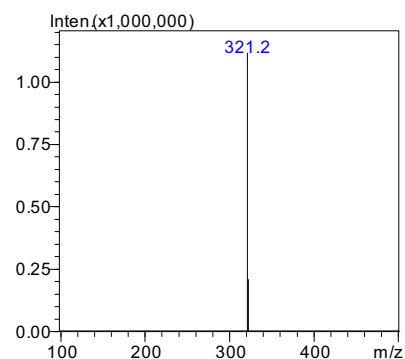
水产品基质的前处理操作方法参照国标《GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》。

2. 结果讨论

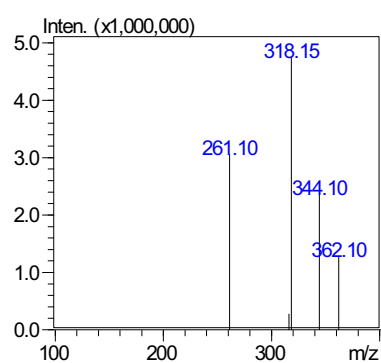
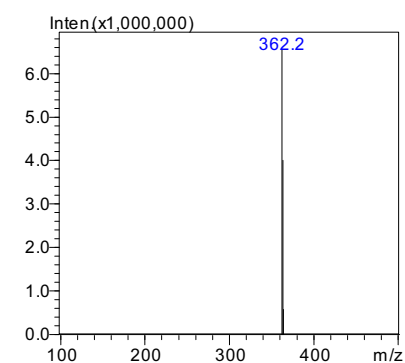
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



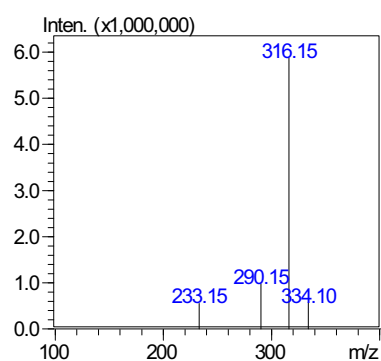
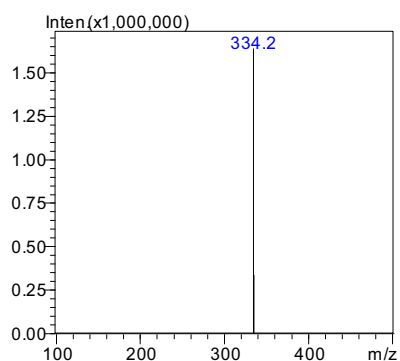
1. 吡呱酸的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V）（右图）



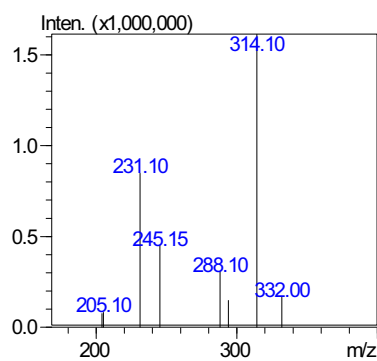
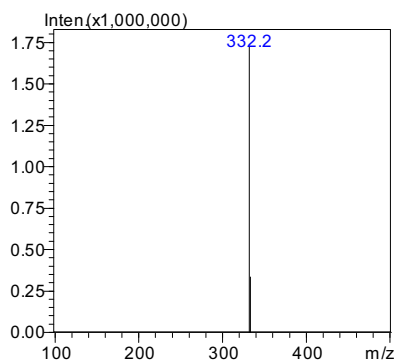
2. 依诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V）（右图）



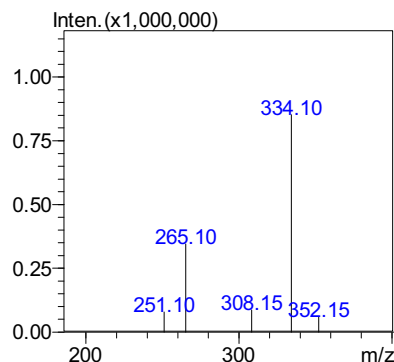
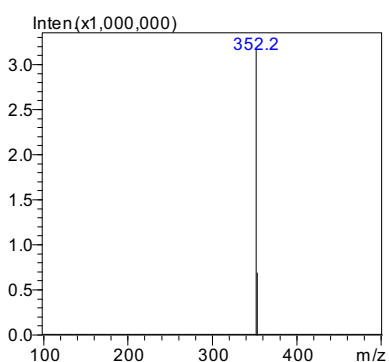
3. 氧氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-22V）（右图）



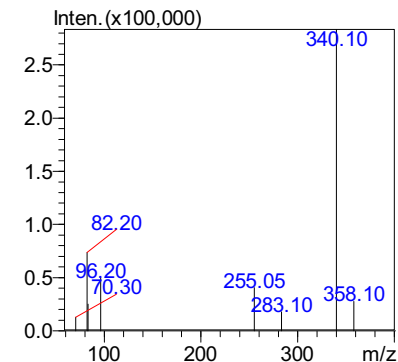
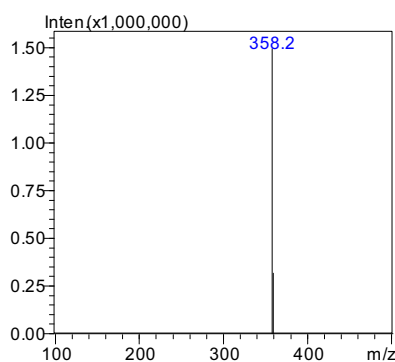
4. 培氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-21V）（右图）



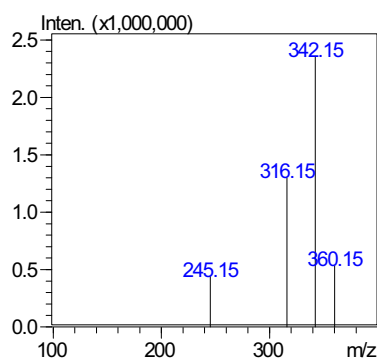
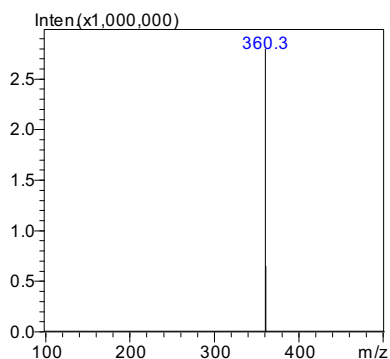
5. 环丙沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-24V）（右图）



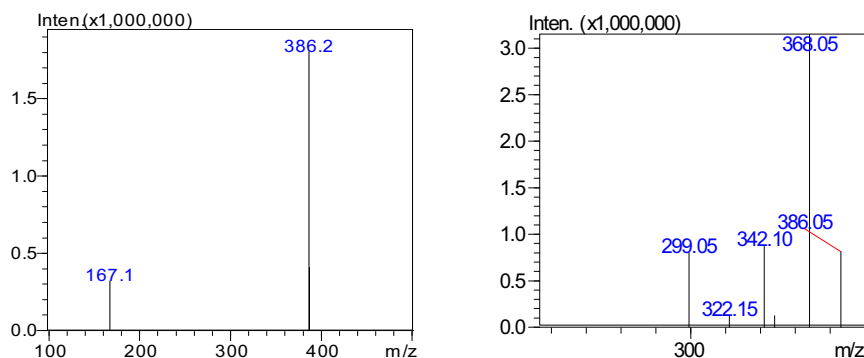
6. 洛美沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-23V）（右图）



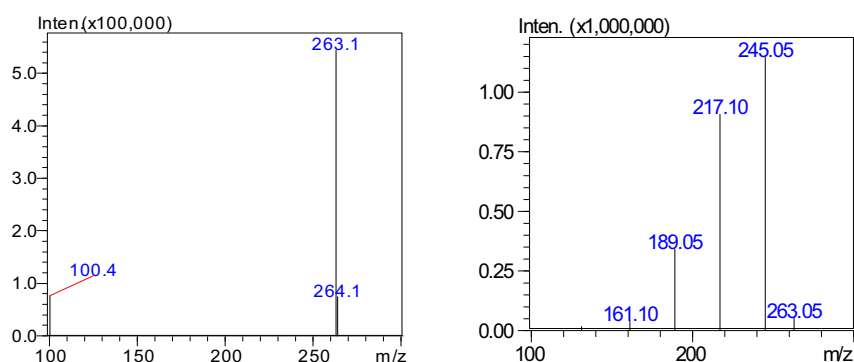
7. 达氟沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-30V）（右图）



8. 恩诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-21V）（右图）



9. 沙拉沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-22V）（右图）



10. 西诺沙星的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值-20V）（右图）

图 1. 10 种喹诺酮类抗生素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

10 种喹诺酮类抗生素标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

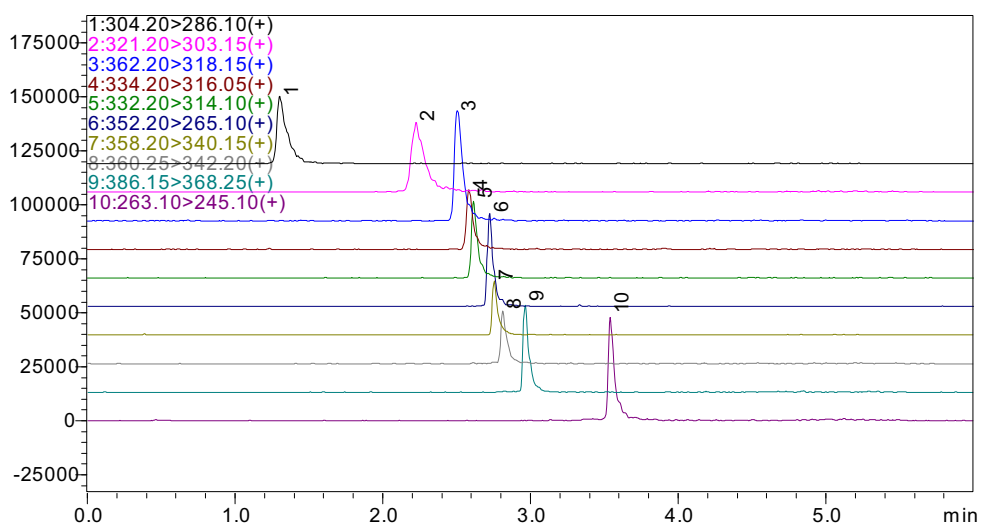


图 2. 10 种喹诺酮类抗生素标准样品的 MRM 色谱图

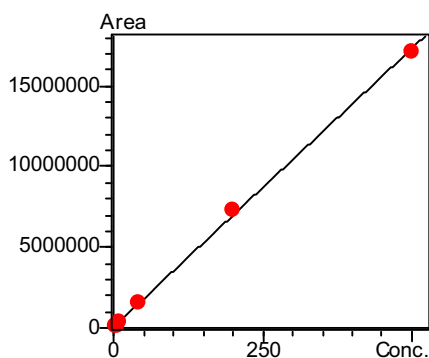
峰型归属：1、吡哌酸（4 μg/L）；2、依诺沙星（4 μg/L）；3、氧氟沙星（4 μg/L）；

4、培氟沙星 (2 μg/L) ; 5、环丙沙星 (1 μg/L) ; 6、洛美沙星 (4 μg/L) ; 7、达氟沙星 (2 μg/L) ; 8、恩诺沙星 (1 μg/L) ; 9、沙拉沙星 (0.8 μg/L) ; 10、西诺沙星 (4 μg/L)

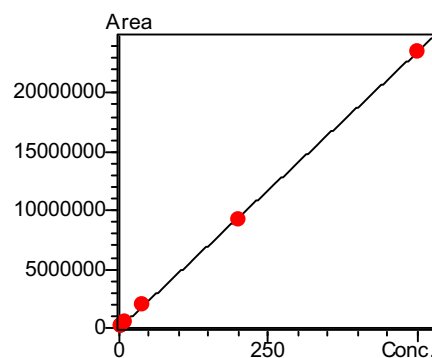
2.3 线性关系

将不同浓度的混合标准工作液（见表 3）按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法绘制校准曲线如图 3 所示，所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 4。

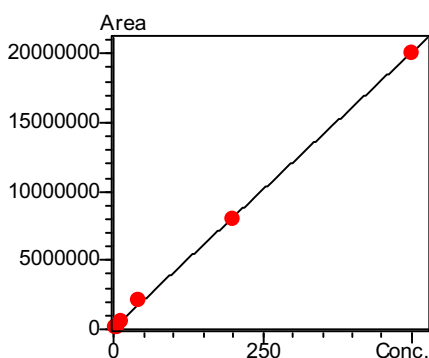
1、吡哌酸



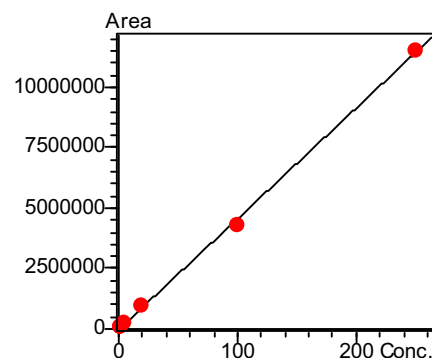
2、依诺沙星



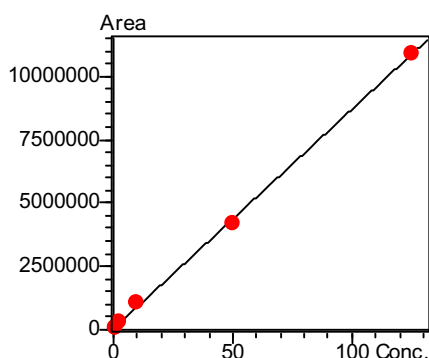
3、氧氟沙星



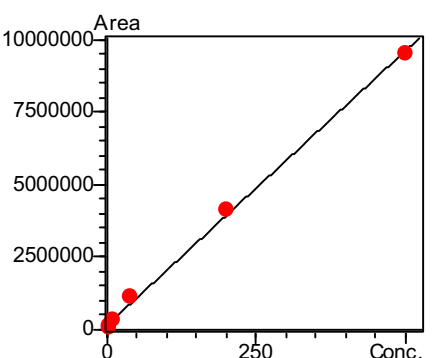
4、培氟沙星



5、环丙沙星



6、洛美沙星



7、达氟沙星



8、恩诺沙星



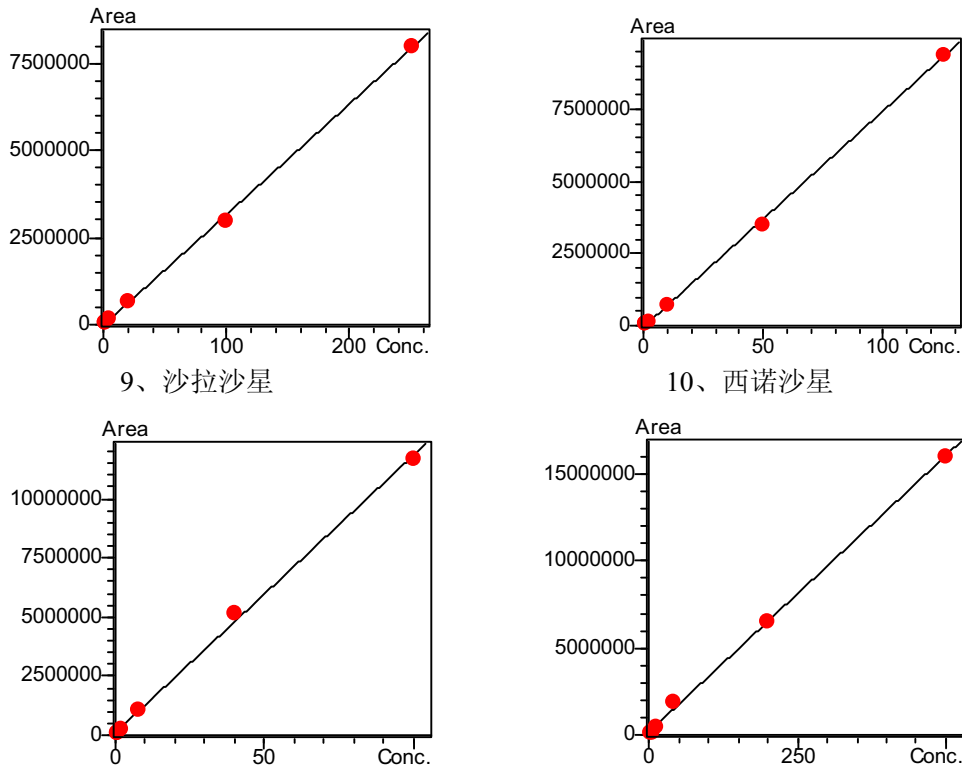


图 3. 10 种喹诺酮类抗生素标准样品的标准曲线

表 4. 10 种喹诺酮类抗生素的校准曲线参数

No.	化合物名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 R
1	吡呱酸	$Y = (36578.1)X + (-5519.45)$	2~500	0.9999
2	依诺沙星	$Y = (46525.9)X + (19258.1)$	2~500	0.9999
3	氧氟沙星	$Y = (44869.6)X + (66854.4)$	2~500	0.9994
4	培氟沙星	$Y = (45846.3)X + (-22086.0)$	1~250	0.9996
5	环丙沙星	$Y = (95160.9)X + (-3949.78)$	0.5~125	0.9991
6	洛美沙星	$Y = (19564.3)X + (168771)$	2~500	0.9989
7	达氟沙星	$Y = (31820.2)X + (-19813.1)$	1~250	0.9997
8	恩诺沙星	$Y = (74899.2)X + (-49109.1)$	0.5~125	0.9997
9	沙拉沙星	$Y = (117672)X + (120403)$	0.4~100	0.9993
10	西诺沙星	$Y = (31726.8)X + (200913)$	2~500	0.9994

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02 % ~ 0.50 % 和 0.87 % ~ 5.30 % 之间，仪器精密度良好。

表 5. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (2 μg/L)		RSD% (40 μg/L)		RSD% (500 μg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
吡呱酸	0.39	3.64	0.23	2.82	0.34	1.42

依诺沙星	0.26	1.67	0.50	1.68	0.37	2.01
氧氟沙星	0.14	3.60	0.14	2.88	0.09	0.96
洛美沙星	0.12	3.53	0.04	2.14	0.07	1.28
西诺沙星	0.07	3.78	0.04	1.94	0.04	1.05
	RSD% (1 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (250 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
培氟沙星	0.12	5.30	0.09	2.61	0.07	1.73
达氟沙星	0.11	2.63	0.02	2.42	0.05	1.34
	RSD% (0.5 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD% (125 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
环丙沙星	0.13	3.61	0.08	2.18	0.13	1.68
恩诺沙星	0.08	5.24	0.04	2.04	0.08	1.77
	RSD% (0.4 µg/L)		RSD% (8 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
沙拉沙星	0.08	4.39	0.03	2.27	0.07	0.87

2.5 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度，配制如下浓度的标准测试样品1份（见表6），平行进样7次。由7次进样测定的标准偏差(S)计算出检出限和定量限，此时检出限MDL=3.14×S，定量限LOQ=4×MDL。测定结果如表6所示。

表 6. 10 种抗生素的检出限和定量限

No.	名称	浓度 (µg/L)	相对标准偏差 (RSD%)	检出限 (µg/L)	定量限 (µg/L)
1	吡呱酸	2	4.63	0.29	1.16
2	依诺沙星	2	2.85	0.18	0.72
3	氧氟沙星	2	1.63	0.10	0.40
4	培氟沙星	1	4.48	0.14	0.56
5	环丙沙星	0.5	4.40	0.07	0.28
6	洛美沙星	2	3.23	0.20	0.80
7	达氟沙星	1	2.80	0.09	0.36
8	恩诺沙星	0.5	2.80	0.05	0.20
9	沙拉沙星	0.4	1.82	0.03	0.12
10	西诺沙星	2	2.91	0.18	0.72

2.6 基质加标实验

以不含 10 种喹诺酮类抗生素的鱼肉作为空白样品，进行基质加标实验，加标浓度如表 7 所示。鱼肉样品的检测色谱图与加标样品色谱图分别如图 4 和图 5 所示。由表 7 结果可知

该方法灵敏度高，对于鱼肉样品中的 10 种喹诺酮类抗生素检测的测定限低于国标《GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》水平。

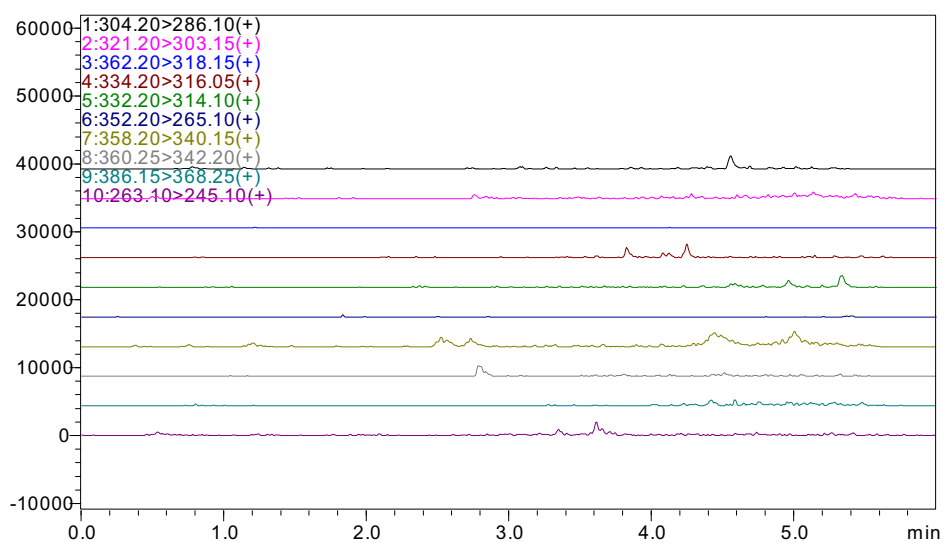


图 4. 鱼肉样品的 MRM 色谱

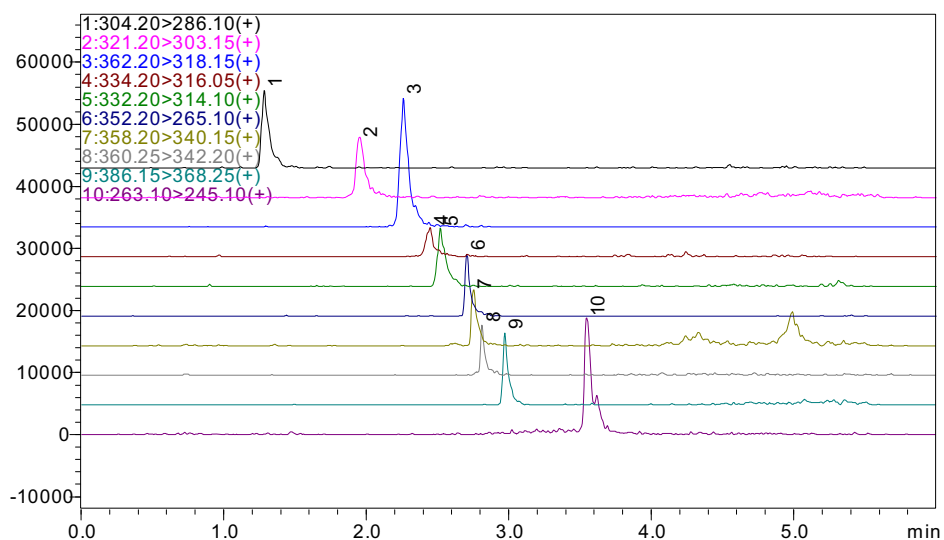


图 5. 鱼肉加标样品的 MRM 色谱图（加标浓度见表 7）

峰型归属：1、吡呱酸；2、依诺沙星；3、氧氟沙星；4、培氟沙星；5、环丙沙星；
6、洛美沙星；7、达氟沙星；8、恩诺沙星；9、沙拉沙星；10、西诺沙星

表 7. 加标样品回收率和信噪比

编号	名称	加标含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	信噪比 (S/N)	实测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	吡呱酸	2	76	1.62	81.0
2	依诺沙星	2	46	1.36	68.0
3	氧氟沙星	2	154	1.76	88.0
4	洛美沙星	2	224	1.44	77.0
5	西诺沙星	2	51	1.91	95.5

6	培氟沙星	1	33	0.92	92.0
7	达氟沙星	1	42	0.83	83.0
8	环丙沙星	0.5	55	0.37	74.0
9	恩诺沙星	0.5	41	0.38	76.0
10	沙拉沙星	0.4	104	0.33	82.5

3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定水产品中 10 种喹诺酮类抗生素的分析方法。该方法在 6.0 min 之内完成 10 种目标物的分离分析，标准曲线的相关系数在 0.9989~0.9999 之间。对不同浓度的标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.50 % 和 5.30 % 以下，系统精密度良好。该方法具有快速、高灵敏的特点，检出限低于国标《GB/T 20366-2006 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，适合动物水产品中喹诺酮类抗生素残留量的快速检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中的 17 种激素残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中多种激素残留的分析方法。鱼肉经样品前处理后,用超高效液相色谱 LC-30A 分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析。采用外标法建立标准曲线,17 种激素具有良好的线性相关性,相关系数在 0.9987~0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验,17 种激素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.322%和 5.82%以下,系统精密度良好,检出限范围为 0.07~1.06 $\mu\text{g/L}$ 。采取鱼肉基质加标的方法计算回收率进行方法验证,17 种激素的回收率范围为 78.0%~115%,可以满足鱼肉中激素类药物的检测需求。

关键词: 激素 水产品 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

激素,诸如雄激素、雌激素和孕激素等,在生命体中扮演了非常重要的角色。雄激素是主要的男性类固醇激素,是决定在胚胎发育过程和青春期性成熟过程当中男性特征显现的首要决定因素,通常用于恢复肌肉形状和力量的治疗中。众所周知,雌激素直接影响大脑中控制情绪和认知的区域。雌激素与孕激素的结合也通常被用于治疗更年期综合征。激素化合物能提高饲料转化率并促进动物生长而被广泛用于水产养殖行业。例如,生长激素能促进鱼类的生长发育;雌二醇、睾酮、孕酮三种性腺激素,其主要作用是调节鱼类的生殖行为,在水产养殖生产中,这些激素类药物常用于鱼类的性转变。通常地,激素比较稳定而且不易降解,然而残留在动物组织中的天然和合成激素当通过食物链进入人体后,仍具有很强的生物活性和潜在的致癌性,容易引发中性肥胖、

免疫缺陷和骨质疏松等疾病,已被许多国家限制或禁止其在食用性动物养殖中使用。但由于利益驱动,这些化合物仍然被滥用,因此,很有必要建立可靠的分析方法对水产品中激素残留量进行监控。通常 HPLC 只能采用常规方法,而不能进行特殊的检测;GC-MS 需要在色谱分离之前进行衍生化,因为多数组分本身具有热不稳定性、非挥发性或者极性等特点。UHPLC-MS/MS 具有高的分离效率和鉴定准确率,目前已经成为分析测定激素的首选方法。

本文在结合国家标准 GB/T 21981-2008 《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》基础上,建立超高效液相色谱和三重四极杆质谱法联用法准确测定了水产品中多种激素的残留。

1 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。

具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.1 mmI.D.×50mmL., 1.6 μm

流动相：A—0.1%甲酸水溶液，B—甲醇，A/B=35%/65% (V/V)

流速：0.3 mL/min

洗脱方式：等度洗脱

进样体积：10 μL

柱温：40℃

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：30 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 1

表 1. MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q ₁ Pre Bias (V)	CE (V)	Q ₃ Pre Bias (V)
雄烯二酮	287.05	97.00*	-15.0	-25.0	-20.0
	287.05	109.15	-15.0	-25.0	-23.0
勃地酮	287.10	121.05*	-26.0	-25.0	-26.0
	287.10	135.05	-26.0	-15.0	-15.0
达那唑	338.25	148.15*	-26.0	-30.0	-16.0
	338.25	120.00	-26.0	-35.0	-24.0
氟甲睾酮	337.15	241.15*	-13.0	-25.0	-18.0
	337.15	131.00	-13.0	-35.0	-28.0
睾酮	289.25	97.00*	-25.0	-25.0	-20.0
	289.25	109.05	-25.0	-25.0	-22.0
甲睾酮	303.25	109.15*	-25.0	-30.0	-21.0

	303.25	97.15	-25.0	-25.0	-19.0
美雄酮	301.25	121.15*	-26.0	-25.0	-13.0
	301.25	149.15	-26.0	-15.0	-16.0
诺龙	275.10	109.10*	-13.0	-30.0	-22.0
	275.10	257.20	-13.0	-15.0	-20.0
去甲雄烯二酮	273.10	109.15*	-10.0	-25.0	-23.0
	273.10	197.10	-10.0	-20.0	-15.0
群勃龙	271.20	253.15*	-27.0	-20.0	-19.0
	271.20	199.05	-27.0	-25.0	-15.0
乙酸甲地孕酮	385.10	267.15*	-23.0	-20.0	-20.0
	385.10	325.20	-23.0	-15.0	-25.0
甲羟孕酮	345.30	123.00*	-13.0	-25.0	-13.0
	345.30	97.20	-13.0	-25.0	-19.0
甲羟孕酮乙酸酯	387.30	123.00*	-15.0	-30.0	-13.0
	387.30	327.25	-15.0	-10.0	-25.0
甲基炔诺酮	313.25	109.15*	-12.0	-35.0	-24.0
	313.25	245.20	-12.0	-25.0	-18.0
氯地孕酮乙酸酯	405.05	345.20*	-24.0	-15.0	-18.0
	405.05	309.15	-24.0	-20.0	-23.0
炔诺酮	299.05	109.05*	-19.0	-35.0	-22.0
	299.05	91.15	-19.0	-25.0	-11.0
孕酮	315.15	97.15*	-12.0	-25.0	-20.0
	315.15	109.00	-12.0	-30.0	-21.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

将浓度为 100 mg/L 的 17 种激素，用超纯水依次稀释至 1000 µg/L 的混合标样。将 1000 µg/L 的 17 种激素混合标样，用水逐级稀释成不同浓度点的标准工作液用于建立标准曲线(见表 2)。

表 2. 混合标准工作液中各标准物质的浓度 (µg/L)

编号	名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6
1	去甲雄烯二酮	1	2	10	20	50	100
2	群勃龙	2	5	10	20	50	100
3	勃地酮	2	5	10	20	50	100
4	诺龙	1	2	5	20	50	100
5	雄烯二酮	1	5	10	20	50	100
6	美雄酮	2	5	10	20	50	100
7	睾酮	1	2	10	20	50	100
8	甲睾酮	1	2	10	20	50	100
9	甲羟孕酮	1	2	10	20	50	100
10	乙酸甲地孕酮	1	2	10	20	50	100
11	甲羟孕酮乙酸酯	0.5	2	10	20	50	100
12	孕酮	1	2	10	20	50	100

13	炔诺酮	2	5	10	20	50	100
14	甲基炔诺酮	1	5	10	20	50	100
15	氯地孕酮乙酸酯	0.5	2	10	20	50	100
16	氟甲睾酮	2	5	10	20	50	100
17	达那唑	1	5	10	20	50	100

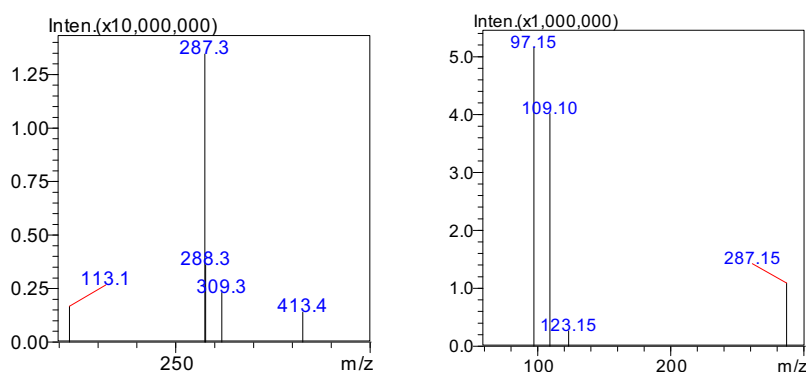
1.3.2 样品前处理方法

称取 5.0 g 试样，置于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中，加入 20 mL 乙腈-甲酸（含 0.1%）溶液，用均质器均质 1 min，然后于离心机上以 4000 r/min 的速率离心 5 min，将上清液移入另一个 60 mL 聚四氟乙烯离心管中，将离心残渣用 20 mL 乙腈-甲酸（含 0.1%）溶液再提取一次，合并上清液。

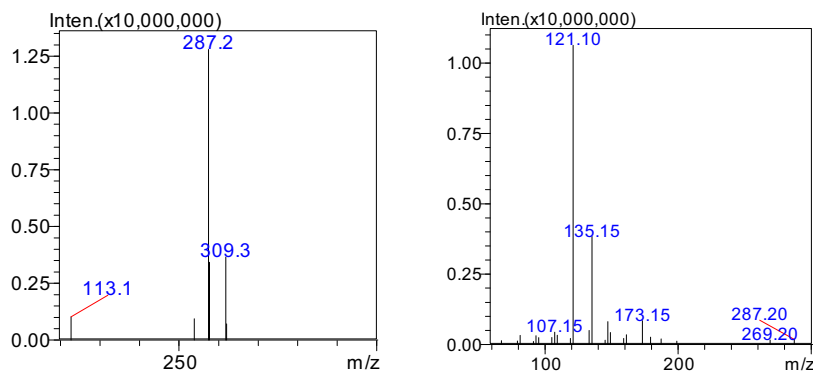
将上清液转移到 125 mL 分液漏斗中，于上清液中加入 25 mL 乙腈饱和的正己烷，振荡 2 min，弃去上层溶液，将下层溶液移至 100 mL 棕色鸡心瓶中，于 40℃ 水浴中旋转蒸发至近干，用氮气流吹干，准确加入 1.0 mL 乙腈-甲酸（含 0.1%）溶液溶解残渣，涡流混匀后，用一次性注射式过滤器过滤至样品瓶中，供液相色谱-串联质谱仪测定。

2 结果讨论

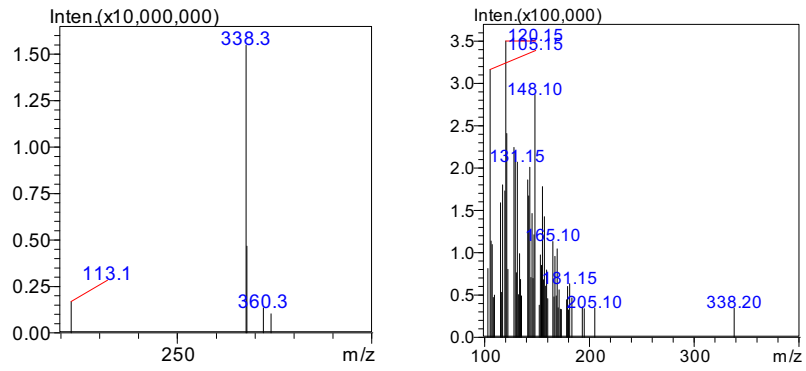
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图



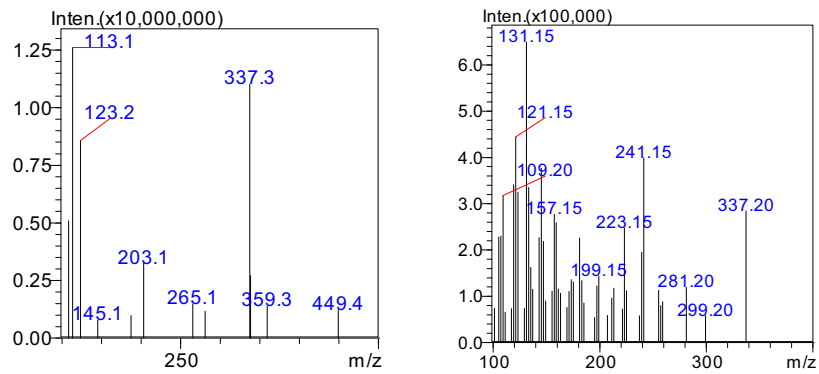
1. 雄烯二酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-22V）（右图）



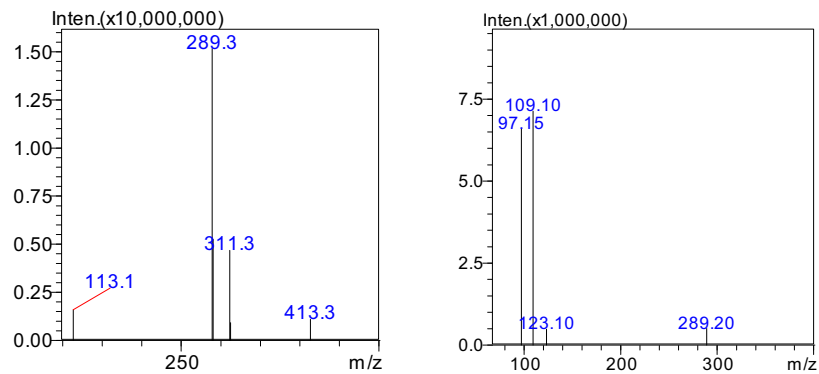
2. 勃地酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-21V）（右图）



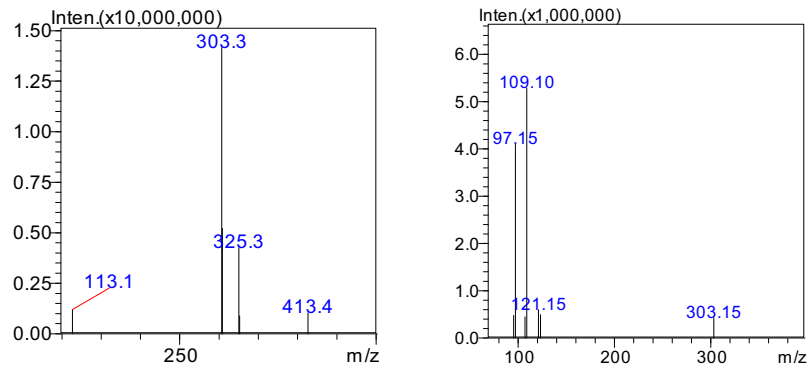
3. 达那唑的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-40V）（右图）



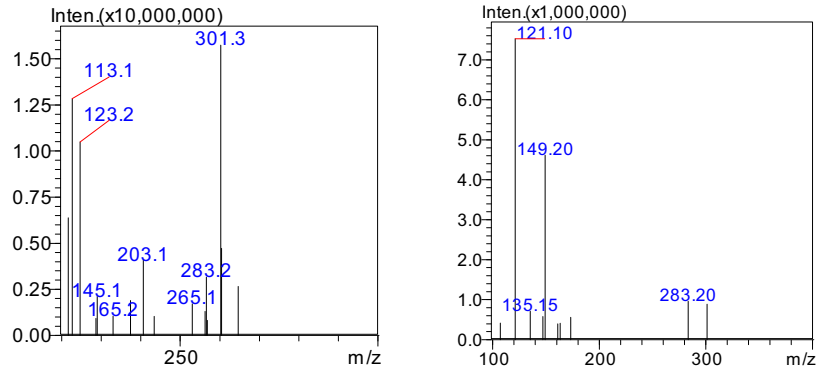
4. 氟甲睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-32V）（右图）



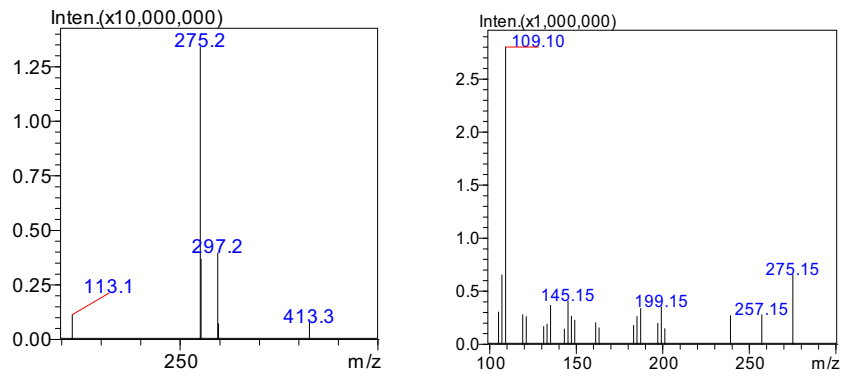
5. 睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



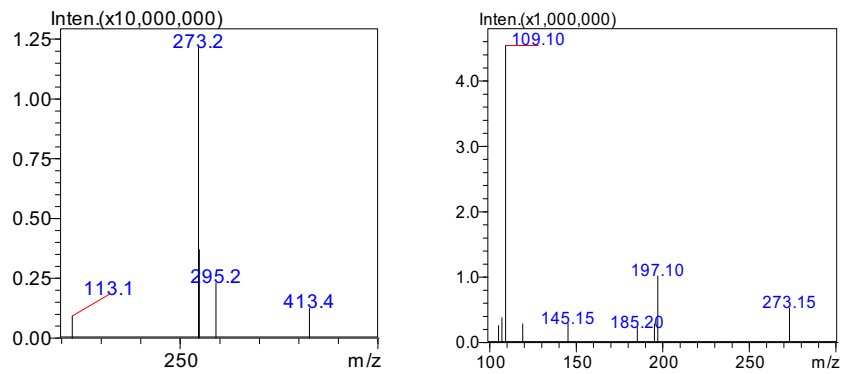
6. 甲睾酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-26V）（右图）



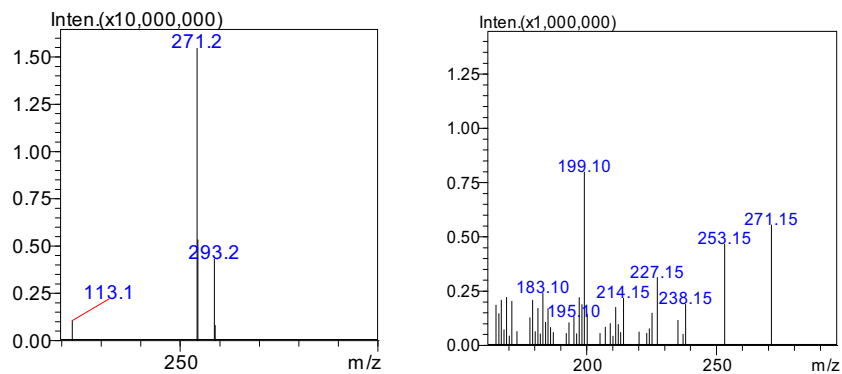
7. 美雄酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-18V）（右图）



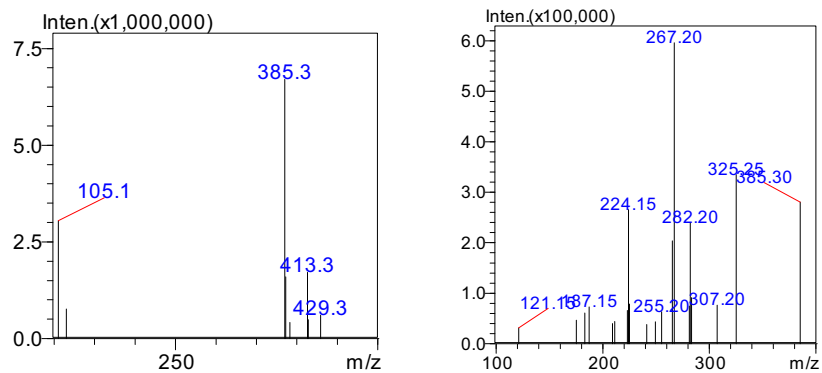
8. 诺龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-24V）（右图）



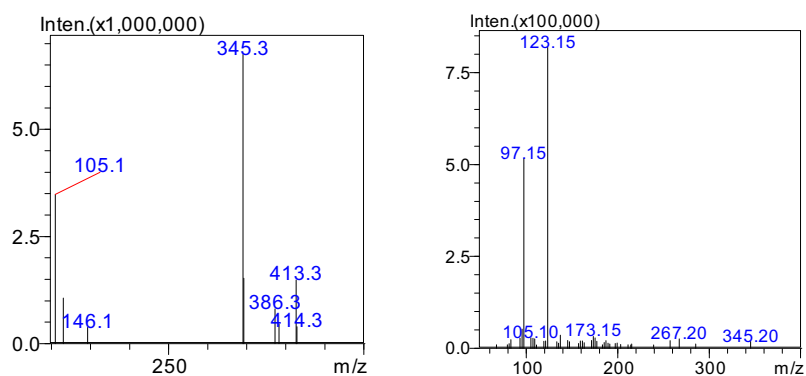
9. 去甲雄烯二酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）



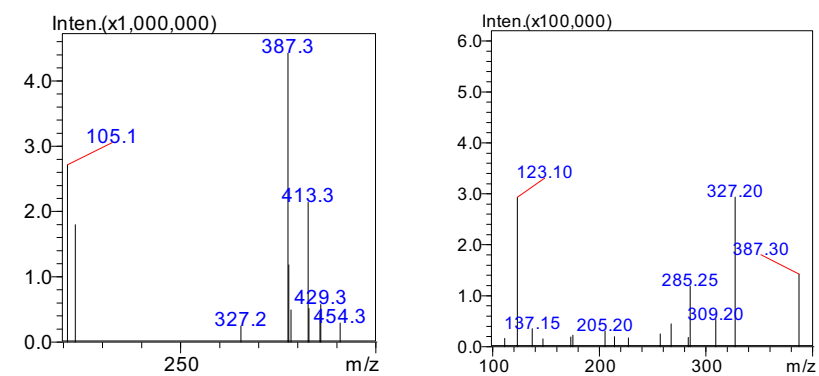
10. 群勃龙的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-30V）（右图）



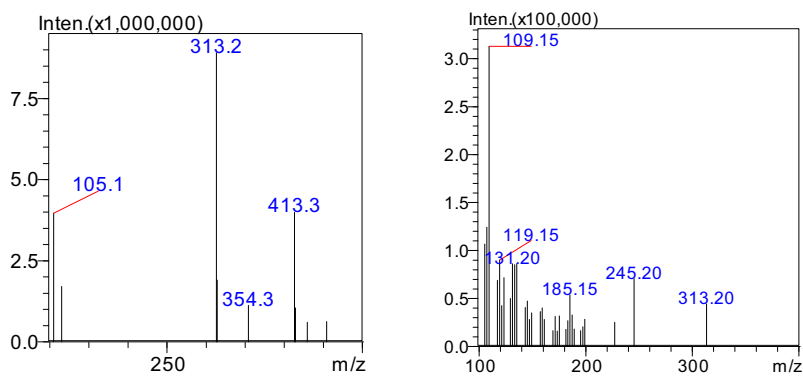
11. 乙酸甲地孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-19V）（右图）



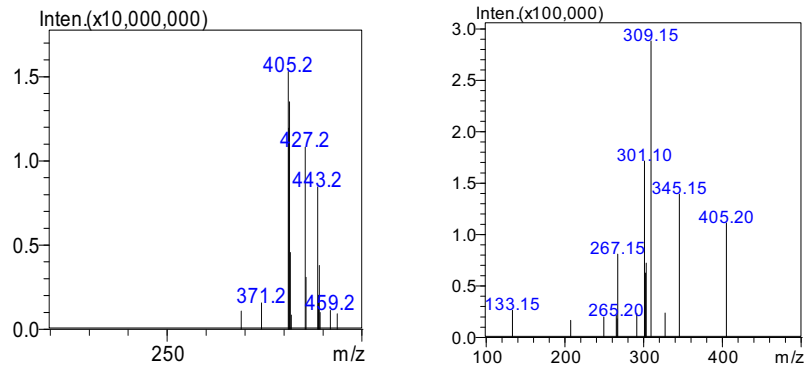
12. 甲羟孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-29V）（右图）



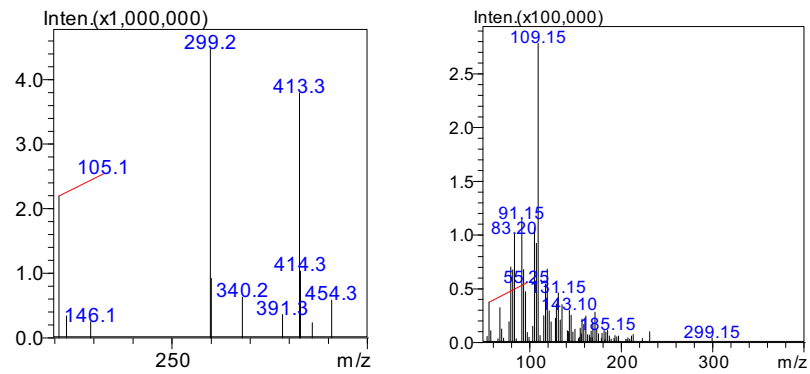
13. 甲羟孕酮乙酸酯的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-20V）（右图）



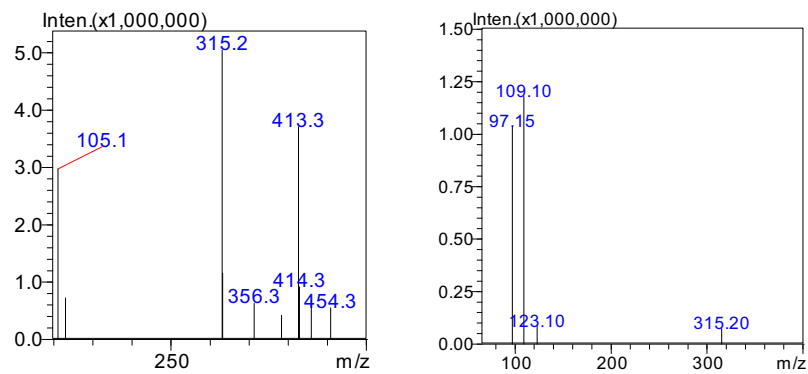
14. 甲基炔诺酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-26V）（右图）



15. 氯地孕酮乙酸酯的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-18V）（右图）



16. 炔诺酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-32V）（右图）



17. 孕酮的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值为-25V）（右图）

图 1. 17 种激素的一级质谱图和产物离子扫描质谱图

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标样的 MRM 色谱图如图 2 所示。

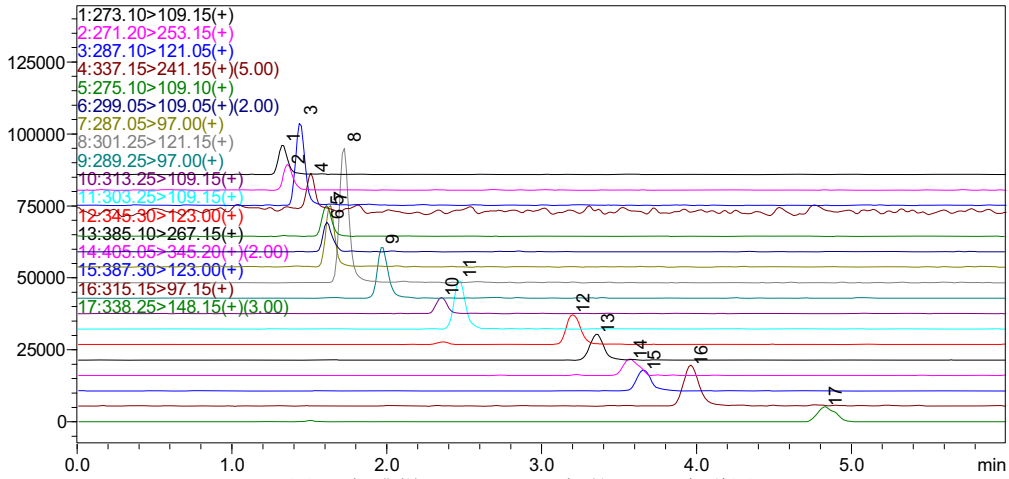


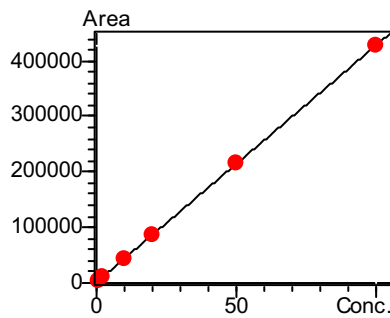
图 2. 标准样品 10 µg/L 混标的 MRM 色谱图

峰归属: 1、去甲雄烯二酮; 2、群勃龙; 3、勃地酮; 4、氟甲睾酮; 5、诺龙; 6、炔诺酮; 7、雄烯二酮; 8、美雄酮; 9、睾酮; 10、甲基炔诺酮; 11、甲睾酮; 12、甲羟孕酮; 13、乙酸甲地孕酮; 14、氯地孕酮乙酸酯; 15、甲羟孕酮乙酸酯; 16、孕酮; 17、达那唑

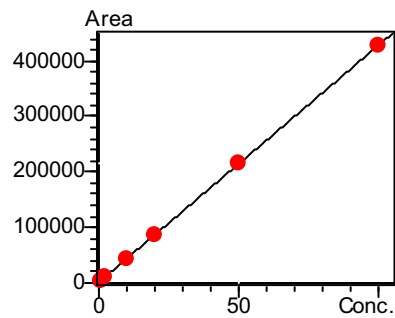
2.3 线性关系

按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 按照表 2 线性浓度点, 采用六点外标法建立校准曲线, 如图 3 所示。17 种激素在各自的线性浓度范围内, 线性相关性良好, 相关系数均在 0.9987~0.9999 之间 (见表 3)。

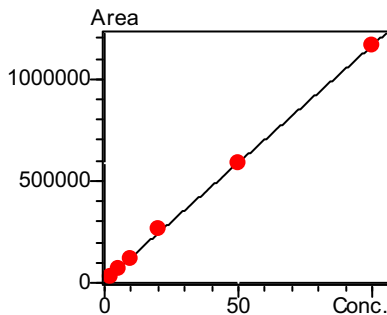
1、去甲雄烯二酮



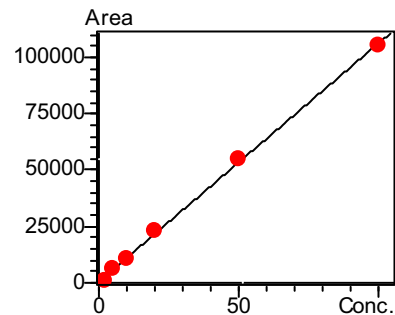
2、群勃龙



3、勃地酮



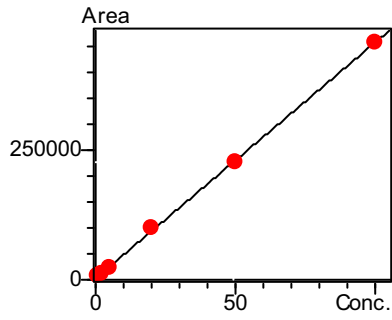
4、氟甲睾酮



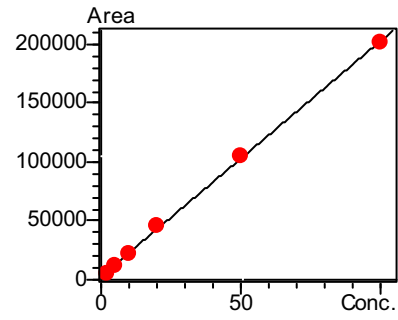
5、诺龙

5、诺龙

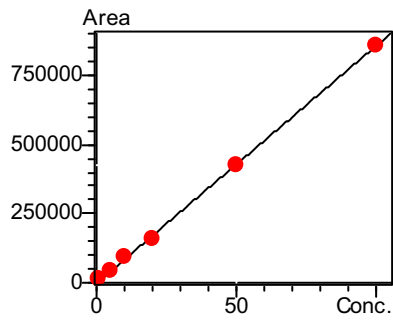
6、炔诺酮



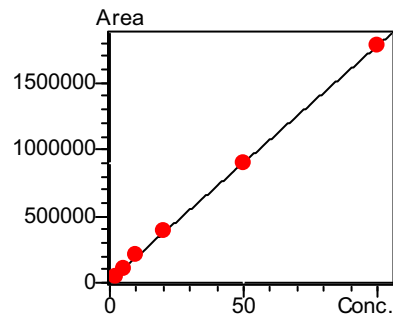
7、雄烯二酮



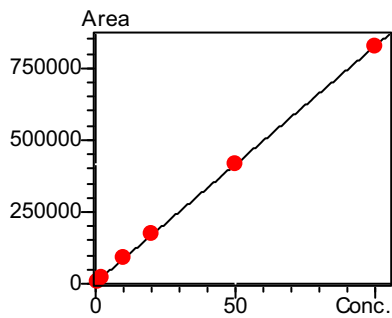
8、美雄酮



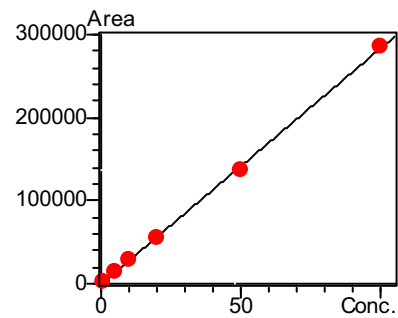
9、睾酮



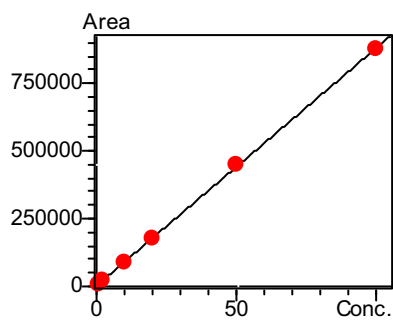
10、甲基炔诺酮



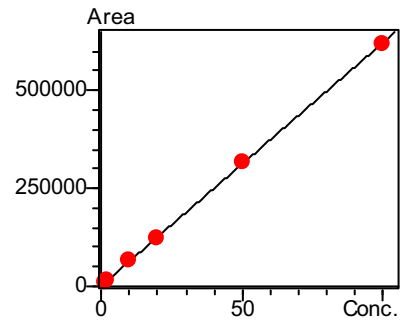
11、甲睾酮



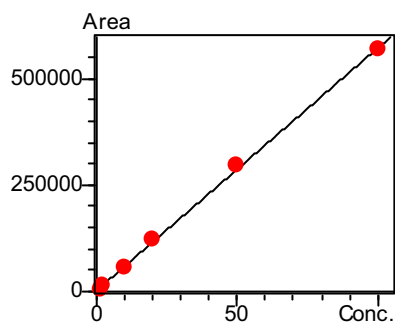
12、甲羟孕酮



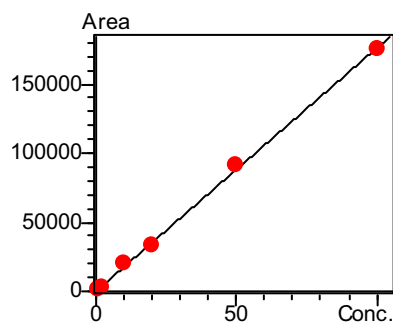
13、乙酸甲地孕酮



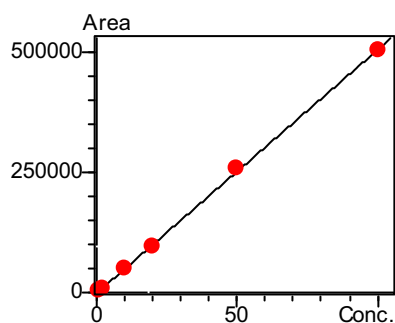
14、氯地孕酮乙酸酯



15、甲羟孕酮乙酸酯



16、孕酮



17、达那唑

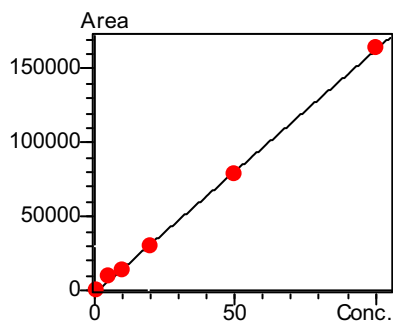
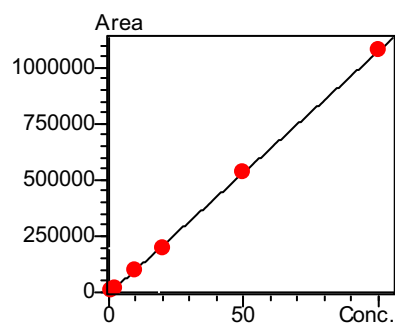


图 3. 17 种激素的标准工作曲线

表 3. 17 种激素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 (R)
1	去甲雄烯二酮	$Y = (4254.64)X + (1493.63)$	1~100	0.9999
2	群勃龙	$Y = (3379.96)X + (6893.91)$	2~100	0.9987
3	勃地酮	$Y = (11511.7)X + (12943.8)$	2~100	0.9998
4	氟甲睾酮	$Y = (1053.25)X + (632.811)$	2~100	0.9996
5	诺龙	$Y = (4550.24)X + (2929.70)$	1~100	0.9998
6	炔诺酮	$Y = (1992.13)X + (3128.01)$	2~100	0.9997
7	雄烯二酮	$Y = (8551.73)X + (-384.882)$	1~100	0.9998
8	美雄酮	$Y = (17580.0)X + (21981.1)$	2~100	0.9999
9	睾酮	$Y = (8203.99)X + (4305.48)$	1~100	0.9999
10	甲基炔诺酮	$Y = (2832.40)X + (-276.314)$	1~100	0.9997
11	甲睾酮	$Y = (8743.59)X + (3603.80)$	1~100	0.9999

12	甲羟孕酮	$Y = (6163.55)X + (3450.24)$	1~100	0.9999
13	乙酸甲地孕酮	$Y = (5674.36)X + (3494.83)$	1~100	0.9997
14	氯地孕酮乙酸酯	$Y = (1761.35)X + (153.117)$	0.5~100	0.9994
15	甲羟孕酮乙酸酯	$Y = (5053.94)X + (-1205.06)$	0.5~100	0.9998
16	孕酮	$Y = (10770.8)X + (-5643.77)$	1~100	0.9998
17	达那唑	$Y = (1640.93)X + (-1559.86)$	1~100	0.9997

2.4 精密度实验

配制低中高不同浓度的混合标样依次进样（浓度见表4），平行测定6次，17种物质的保留时间相对标准偏差和峰面积的相对标准偏差分别在0.063%~0.322%和0.555%~5.82%之间，结果表明系统具有良好的精密度。

表4. 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	样品名称	RSD% (2 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (100 µg/L)	
		R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	去甲雄烯二酮	0.135	5.23	0.178	3.83	0.115	2.70
2	群勃龙	0.096	5.35	0.227	2.94	0.085	1.23
3	勃地酮	0.230	4.53	0.187	2.57	0.118	1.37
4	氟甲睾酮	0.242	4.98	0.205	4.78	0.105	3.69
5	诺龙	0.192	3.27	0.186	2.89	0.120	2.52
6	炔诺酮	0.310	5.12	0.269	3.46	0.117	2.13
7	雄烯二酮	0.199	2.83	0.186	3.71	0.117	1.71
8	美雄酮	0.176	4.97	0.201	1.44	0.133	0.555
9	睾酮	0.212	4.98	0.222	3.05	0.115	1.00
10	甲基炔诺酮	0.322	5.82	0.205	4.13	0.105	1.93
11	甲睾酮	0.220	5.42	0.120	3.67	0.122	1.52
12	甲羟孕酮	0.273	5.32	0.250	3.17	0.095	2.36
13	乙酸甲地孕酮	0.167	4.85	0.104	3.02	0.068	1.99
14	氯地孕酮乙酸酯	0.282	5.66	0.136	4.09	0.063	1.44
15	甲羟孕酮乙酸酯	0.268	3.69	0.137	3.33	0.073	2.14
16	孕酮	0.243	5.13	0.169	3.28	0.081	1.61
17	达那唑	0.285	5.63	0.227	3.51	0.098	2.13

2.5 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度，配制浓度为2 µg/L的混合标准测试样品1份（见表5），平行进样7次，色谱图如图4所示。由7次进样测定的信噪比平均值，按照信噪比的3倍和10倍分别计算检出限和定量限。测定结果如表5所示。

表5. 17种激素的检出限和定量限

No.	名称	信噪比	检出限 (µg/L)	定量限 (µg/L)
1	去甲雄烯二酮	30.7	0.20	0.67

2	群勃龙	48.7	0.12	0.40
3	勃地酮	65.1	0.09	0.31
4	氟甲睾酮	18.9	0.32	1.06
5	诺龙	27.6	0.22	0.72
6	炔诺酮	30.3	0.20	0.67
7	雄烯二酮	22.2	0.27	0.90
8	美雄酮	86.7	0.07	0.23
9	睾酮	56.3	0.11	0.37
10	甲基炔诺酮	19.8	0.30	1.00
11	甲睾酮	45.5	0.13	0.44
12	甲羟孕酮	58.1	0.10	0.35
13	乙酸甲地孕酮	261.3	0.023	0.08
14	氯地孕酮乙酸酯	200	0.03	0.10
15	甲羟孕酮乙酸酯	277	0.022	0.07
16	孕酮	19.3	0.31	1.03
17	达那唑	110.4	0.05	0.18

2.6 基质加标实验

图 5 为鱼肉基质按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图。往鱼肉基质中添加 17 种激素标样，加标 MRM 色谱图如图 6 所示。鱼肉中 17 种激素检测与加标回收率结果见表 6。

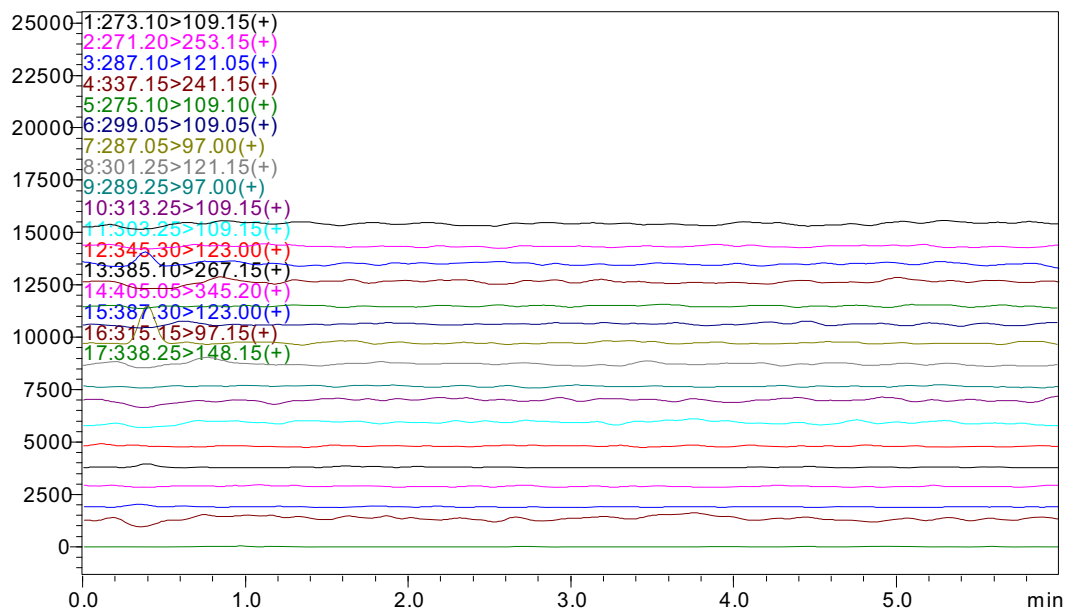


图 5. 鱼肉基质的 MRM 色谱图

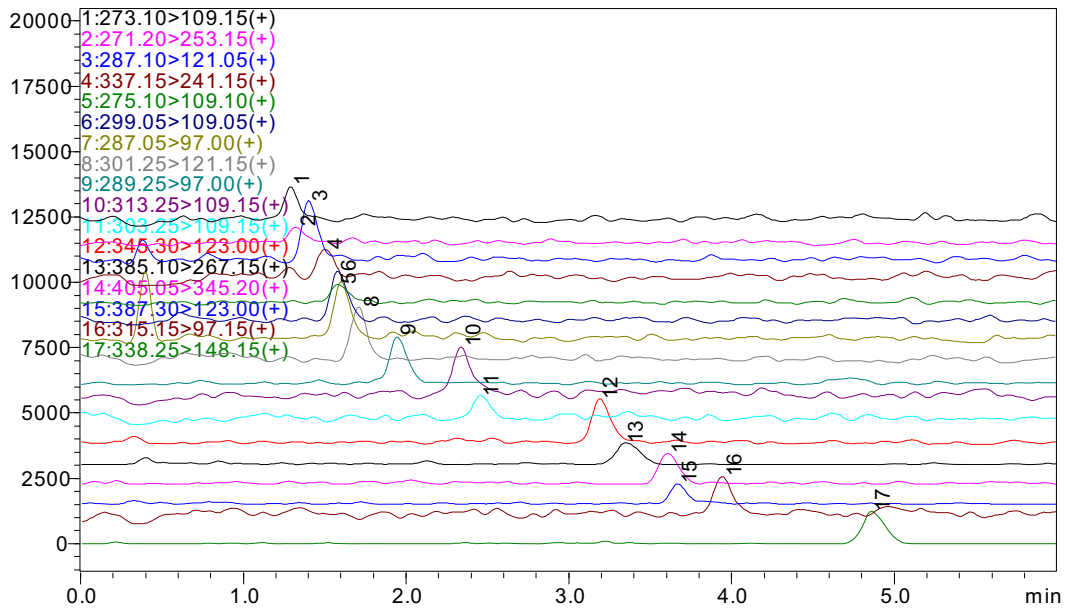


图 6. 鱼肉基质加标的 MRM 色谱图（加标浓度见表 6）

峰归属: 1、去甲雄烯二酮; 2、群勃龙; 3、勃地酮; 4、氟甲睾酮; 5、诺龙; 6、雄烯二酮; 7、炔诺酮; 8、美雄酮; 9、睾酮; 10、甲基炔诺酮; 11、甲睾酮; 12、甲羟孕酮; 13、乙酸甲地孕酮; 14、氯地孕酮乙酸酯; 15、甲羟孕酮乙酸酯; 16、孕酮; 17、达那唑

表 6. 鱼肉中激素类药物检测与加标回收率结果

No.	名称	鱼肉检测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	鱼肉加标浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)
1	去甲雄烯二酮	N.D.	0.4	0.424	106.0
2	群勃龙	N.D.	0.4	0.396	99.0
3	勃地酮	N.D.	0.4	0.372	93.0
4	氟甲睾酮	N.D.	2	2.27	113.5
5	诺龙	N.D.	0.4	0.424	106
6	雄烯二酮	N.D.	1	0.947	94.7
7	炔诺酮	N.D.	0.4	0.362	90.5
8	美雄酮	N.D.	0.4	0.380	95.0
9	睾酮	N.D.	0.4	0.320	80.0
10	甲基炔诺酮	N.D.	1	0.961	96.1
11	甲睾酮	N.D.	0.4	0.380	95.0
12	甲羟孕酮	N.D.	0.4	0.376	94.1
13	乙酸甲地孕酮	N.D.	0.4	0.458	114.5
14	氯地孕酮乙酸酯	N.D.	1	1.15	115
15	甲羟孕酮乙酸酯	N.D.	0.4	0.442	110.5
16	孕酮	N.D.	0.4	0.446	111.6
17	达那唑	N.D.	2	1.46	78.0

注: N.D.表示未检出

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030

联用快速测定水产品中多种激素残留的分析方法。17 种激素线性范围宽，相关系数在 0.9987~0.9999 之间。对低中高不同浓度的混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.063%~0.322%和 0.555%~5.82%之间，仪器精密度良好。水产品基质加标回收率范围为 78.0%~115%。实验结果表明该方法灵敏度高，检出限低于国标 GB/T 21981-2008《动物源食品中激素多残留检测方法液相色谱-质谱/质谱法》，可以满足水产品中激素类药物的检测需求。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中四环素类药物残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定鱼肉中 5 种四环素类抗生素残留的方法。鱼肉样品中的四环素类抗生素经固相萃取富集后,使用超高效液相色谱 LC-30A 在 4 min 内实现快速分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。以外标法绘制 5 种四环素类抗生素的校准曲线,四环素、去甲基金霉素和强力霉素的校准曲线线性范围在 0.1~100 $\mu\text{g/L}$ 间,土霉素和金霉素的线性范围在 0.1~50 $\mu\text{g/L}$ 间;相关系数均在 0.9977 以上。对 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验,连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.64%~0.81%和 0.70%~2.90%之间,系统精密度良好。其检出限为 0.035~0.057 $\mu\text{g/L}$,定量限为 0.138~0.226 $\mu\text{g/L}$,样品加标回收率在 105~120%之间,满足四环素类抗生素的检测需求。

关键词: 四环素 抗生素 三重四极杆质谱 水产品

近年来,我国水产养殖业发展迅猛。但随着养殖业集约化程度提高,养殖病害日益严峻,各类药物在生产中广泛使用,药物残留问题日益突出。四环素类抗生素(Tetracyclines, TCs)是临床上广泛应用的广谱抗生素,但其并不能被动物完全吸收,有相当部分以原形或代谢物形式进入食物链和环境中,间接对人体健康造成影响。高效液相色谱-串联质谱联用技术是近年来发展很快的分析技术,具有高的选择性

和灵敏度,对复杂基体中的药物残留具有准确的定性能力。本文主要参考《GB/T 21317-2007 动物源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》,使用岛津超快速液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了测定水产品中四环素类兽药残留量的方法,此方法快速、简单、选择性强和灵敏度高,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为:LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm I.D. \times 75 mm L., 1.6 μm 粒径。

流动相: A—0.1%甲酸的水溶液; B—甲醇

流速：0.5 mL/min

柱温：30℃

进样量：20 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 15%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	95
3.00	Pumps	Pump B Conc.	95
3.01	Pumps	Pump B Conc.	15
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI(+)

离子喷雾电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

DL 温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测(MRM)

驻留时间：30 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
四环素	445.10	410.15*	-16	-20	-28
		427.25	-16	-14	-21
土霉素	461.10	426.15*	-22	-19	-30
		443.15	-22	-12	-22
去甲基金霉素	465.10	448.10*	-17	-17	-30
		430.05	-17	-21	-30
金霉素	479.05	444.10*	-23	-22	-30
		462.15	-16	-14	-21
强力霉素	445.05	428.25*	-16	-19	-30
		410.05	-16	-38	-29

注：*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：称取适量五种标准物质，分别为四环素、土霉素、去甲基金霉素、金霉素和强力霉素，用甲醇配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液，用流动相初始比例稀释成浓度为 0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作液。

样品前处理方法：鱼肉样品的制备、净化、提取参照《GB/T 21317-2007 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》。

2. 结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

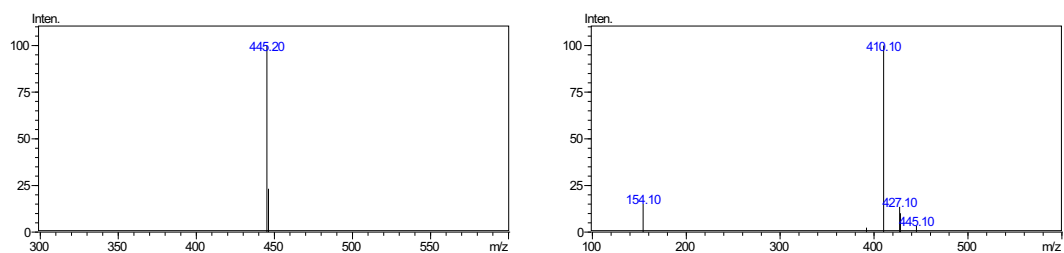


图 1. 四环素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-18V)

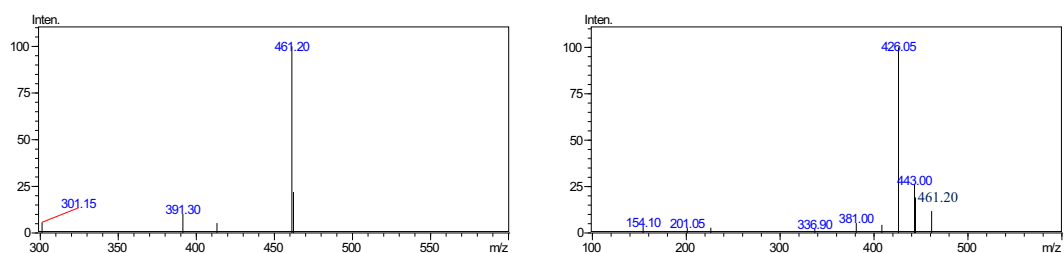


图 2. 土霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-19V)

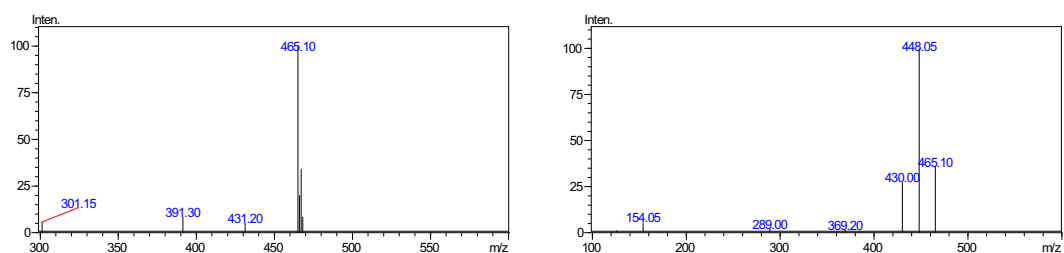


图 3. 去甲基金霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-19V)

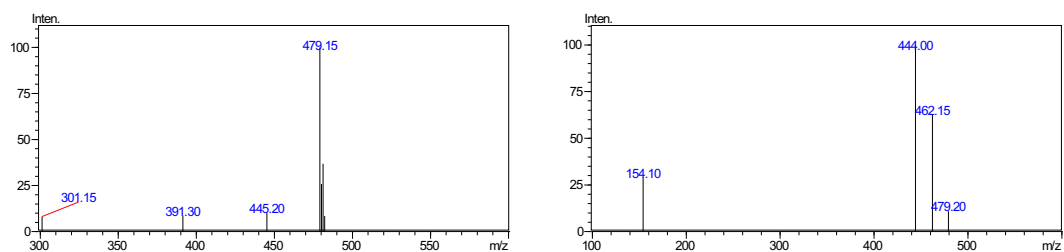


图 4. 金霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-23V)

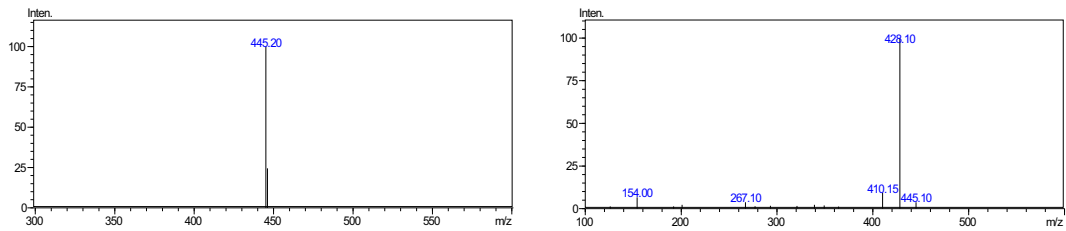


图 5. 强力霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-25V)

2.2 标准样品的MRM色谱图

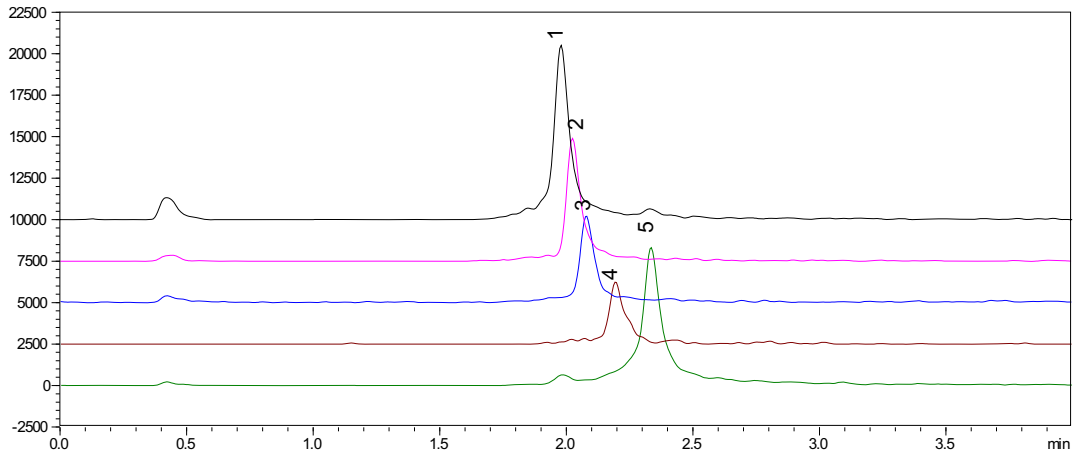


图 6 标准样品的 MRM 色谱图 (1 µg/L)

(1、四环素；2、土霉素；3、去甲基金霉素；4、金霉素；5、强力霉素)

2.3 线性范围

将 0.1、0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 µg/L 不同浓度的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 7~11 所示；所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

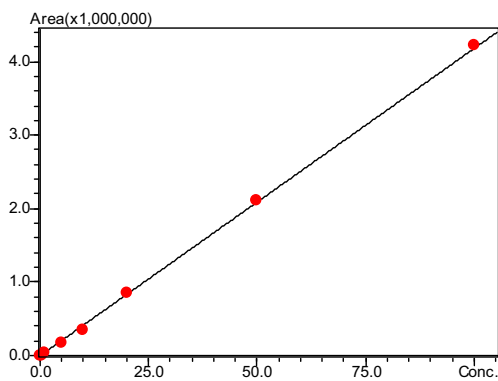


图 7 四环素校准曲线

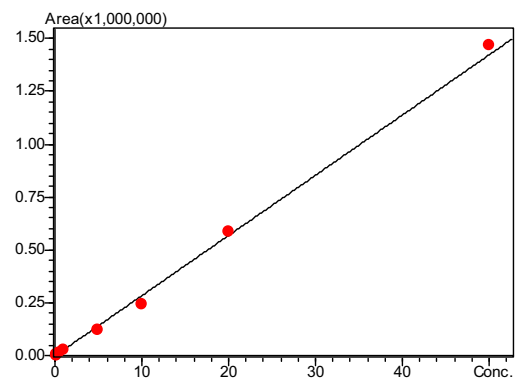


图 8 土霉素标准曲线

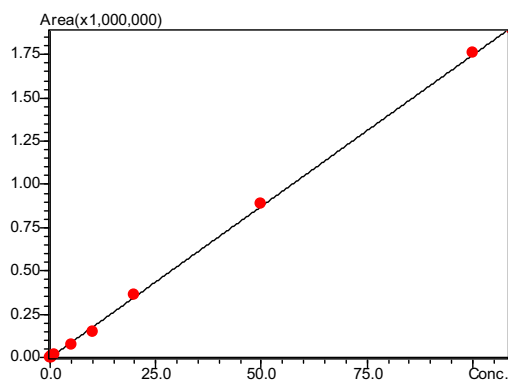


图 9 去甲金霉素标准曲线

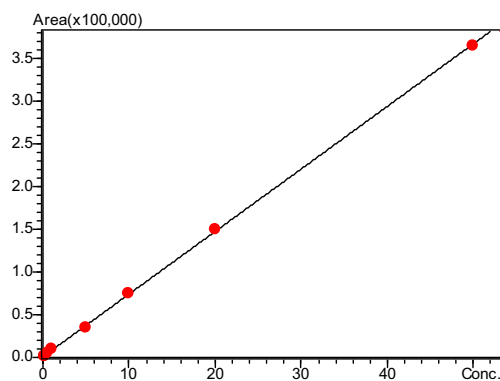


图 10 金霉素标准曲线

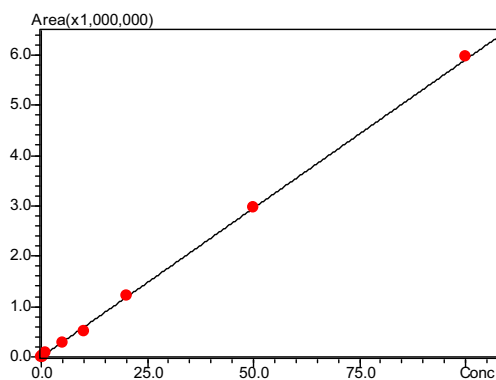


图 11 强力霉素标准曲线

表 3 校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 R
1	四环素	$Y = (41813.3)X + (-1335.28)$	0.1~100	0.9990
2	土霉素	$Y = (28472.3)X + (-1268.34)$	0.1~50	0.9977
3	去甲基金霉素	$Y = (17475.7)X + (-7.52695)$	0.1~100	0.9989
4	金霉素	$Y = (7312.66)X + (984.523)$	0.1~50	0.9989
5	强力霉素	$Y = (59025.7)X + (1741.35)$	0.1~100	0.9993

2.4 精密度实验

对不同浓度混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：不同浓度标准品保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.64%~0.81%和 0.70%~2.90%之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

样品名称	RSD% (1 μg/L)		RSD% (10 μg/L)		RSD% (100 μg/L)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
四环素	0.81	2.1	0.65	1.6	0.74	0.70
土霉素	0.79	1.5	0.65	1.6	0.73	0.89
去甲基金霉素	0.81	2.0	0.64	1.8	0.73	0.84
金霉素	0.79	2.4	0.65	1.6	0.73	1.16

强力霉素 0.81 2.9 0.65 2.0 0.73 1.40

2.5 检出限

配制浓度为0.1 μg/L标样，直接进样7针分析，对上述结果剔除利群值后将各自的7次测定结果计算标准偏差S，此时检出限MDL=3.14×S，定量限LOQ=4×MDL。测定结果如表5所示。

表 5 四环素类抗生素的检出限和定量下限

No.	名称	标准偏差(SD)	检出限(μg/L)	定量限(μg/L)
1	四环素	0.011	0.035	0.14
2	土霉素	0.013	0.041	0.16
3	去甲基金霉素	0.012	0.038	0.15
4	金霉素	0.018	0.057	0.23
5	强力霉素	0.014	0.044	0.18

2.6 回收率实验

在按照1.3中样品制备方法，样品中添加0.1 μg/kg混合标样，空白鱼肉基质色谱图和基质加标色谱图如图12、图13所示。从图中可以看到，基质加标样品在定量限上均有很好的响应。

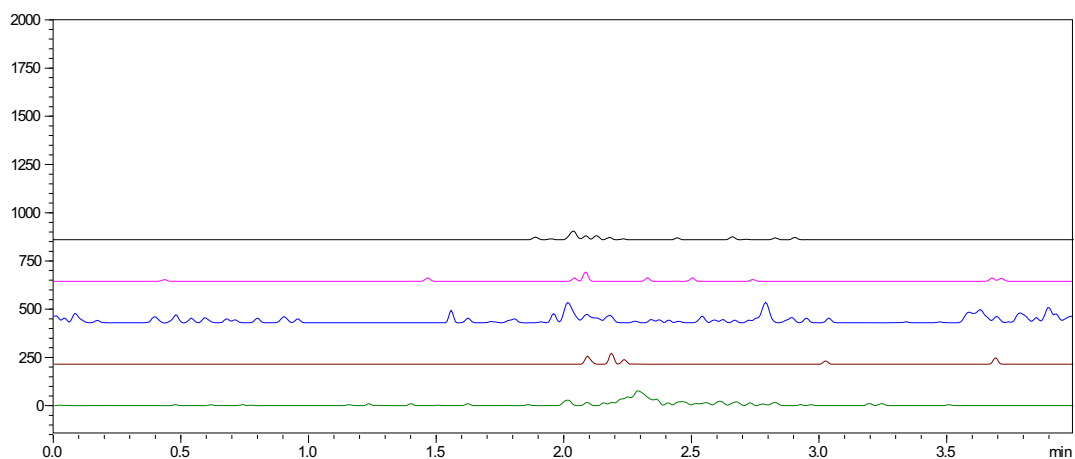


图 12 鱼肉样品的 MRM 色谱图

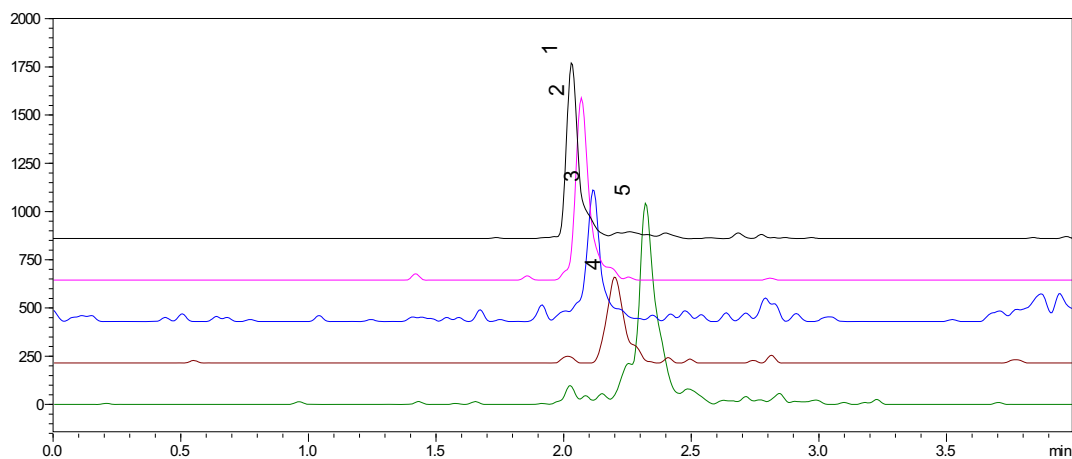


图 13 鱼肉加标(0.1 μg/kg)样品的 MRM 色谱图

(1、四环素；2、土霉素；3、去甲基金霉素；4、金霉素；5、强力霉素)

表 6 四环素类抗生素加标回收率结果

No.	名称	样品 1 实测浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	样品 2 实测浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率(%)
1	四环素	0.10	0.11	105
2	土霉素	0.13	0.11	120
3	去甲基金霉素	0.11	0.11	110
4	金霉素	0.11	0.09	100
5	强力霉素	0.12	0.11	115

3 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定鱼肉样品中的四环素类抗生素残留量的检测方法。该方法在 4 min 之内完成 5 种四环素的分离分析，四环素、去甲基金霉素和强力霉素的校准曲线线性范围在 0.1~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 间，土霉素和金霉素的线性范围在 0.1~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 间；五种四环素相关系数均在 0.9977 以上。对 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 混合标准溶液进行精密度实验，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差分别介于 0.64%~0.81% 和 0.70%~2.90% 之间，系统精密度良好。其检出限为 0.035~0.057 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，定量限为 0.138~0.226 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，样品加标回收率在 105~120% 之间。该方法具有分析速度快、重复性好、灵敏高的特点，适合鱼肉中四环素、土霉素、去甲基金霉素、金霉素和强力霉素的检测。

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中大环内酯类药物残留

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪和三重四极杆质谱仪联用测定水产品中 5 种大环内酯类抗生素的方法。样品经提取后,用超高效液相色谱 LC-30A 分离,三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 进行定量分析。5 种大环内酯类抗生素在 3 分钟内得到快速分离和检测。螺旋霉素在 0.5~100 $\mu\text{g/L}$, 北里霉素和秦乐菌素在 0.2~50 $\mu\text{g/L}$, 红霉素和替米考星在 0.2~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好,标准曲线的相关系数均在 0.9951 以上;对 2 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 和 50 $\mu\text{g/L}$ 混合标准溶液进行精密度实验,连续 6 次进样保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.05~1.13%和 0.85~2.43%之间,系统精密度良好;检出限为 0.016~0.11 $\mu\text{g/L}$,定量限为 0.063~0.38 $\mu\text{g/L}$,加标回收率介于 84.0~104.0%之间,适合水产品中大环内酯类抗生素的检测。

关键词: 水产品 大环内酯类抗生素 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

近年来,我国水产养殖业发展迅猛,由于养殖业集约化程度提高,养殖病害日益严峻,各类药物在生产中广泛使用,水产品药物残留问题日益突出。大环内酯类抗生素 (Macrolide Antibiotics) 是一类用量大、使用范围广且容易进入环境水体的抗生素,在水体中多以痕量存在,因此检测难度较大。本文主要参考《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内脂

类抗生素残留检测方法 第 2 部分:高效液相色谱串联质谱法》,使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了一种快速测定水产品中 5 种常见大环内酯类抗生素 (螺旋霉素、替米考星、秦乐菌素、北里霉素、红霉素) 的方法,并采用所建立的方法对市售鱼肉的该类抗生素污染状况进行了检测,供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为: LC-30AD \times 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm)

流动相: A—0.1%甲酸水溶液; B—乙腈

流 速: 0.4 mL/min

进样体积: 20 μ L

柱 温: 40 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱; B 相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: ESI(+), 4.5kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250 $^{\circ}$ C

加热模块温度: 400 $^{\circ}$ C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 1. 梯度洗脱时间程序

Time (min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	60
1.01	Pumps	Pump B Conc.	85
1.30	Pumps	Pump B Conc.	90
1.40	Pumps	Pump B Conc.	15
3.00	Controller	Stop	

表 2. MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	螺旋霉素	843.6	174.15*	30	-41	-18
			101.10	-30	-48	-11
2	北里霉素	772.45	109.15*	-22	-45	-22
			174.15	-22	-34	-18
3	红霉素	734.50	158.10*	-40	-31	-17
			576.35	-40	-20	-28
4	替米考星	869.65	174.10*	-24	-49	-18

			696.50	-24	-51	-25
5	秦乐菌素	916.60	174.10*	-20	-43	-18
			101.50	-20	-51	-11

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：准确称取适量螺旋霉素、替米考星、秦乐菌素、北里霉素、红霉素 5 种标准物质，用甲醇配制 1000 mg/L 的混合标准储备溶液，用流动相稀释成浓度为 0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 μg/L 的标准工作液。

样品前处理方法：具体参考出入境检验检疫行业标准《SN/T 1777.2-2007 动物源食品中大环内脂类抗生素残留检测方法 第 2 部分：高效液相色谱串联质谱法》。

2. 结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描

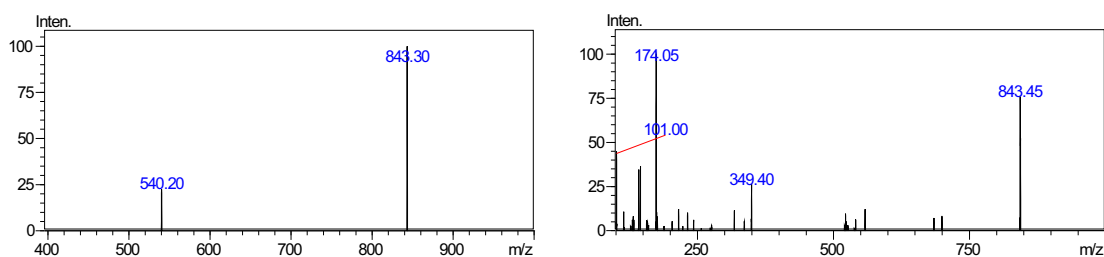


图 1. 螺旋霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-20V)

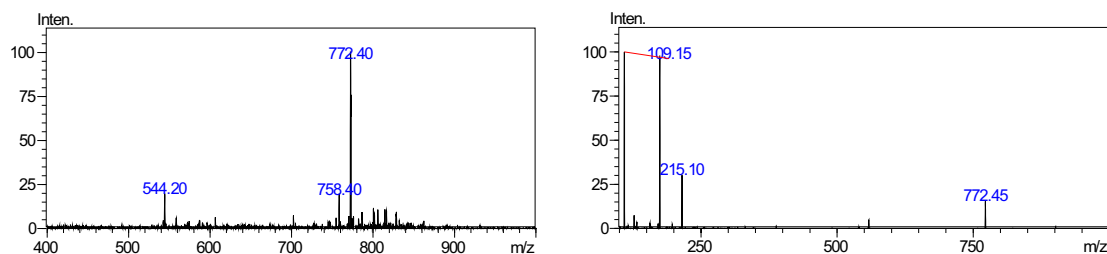


图 2. 北里霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-32V)

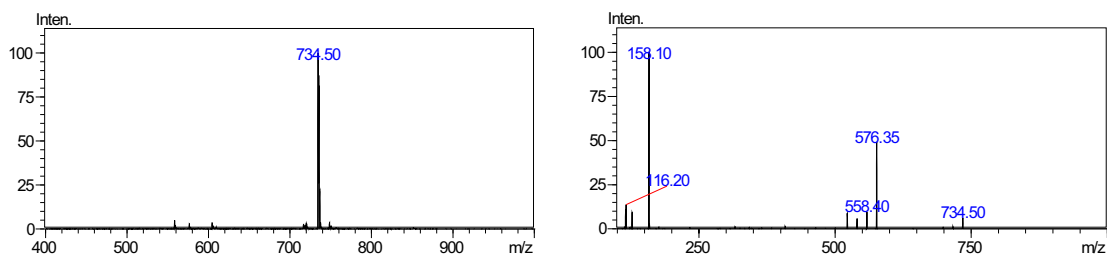


图 3. 红霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-25V)

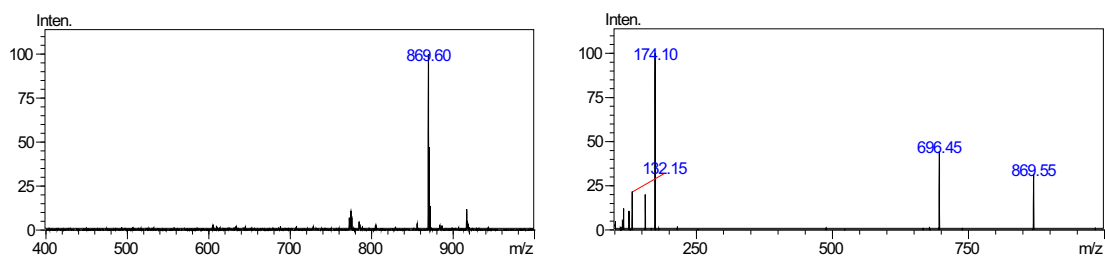


图 4. 替米考星一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-45V)

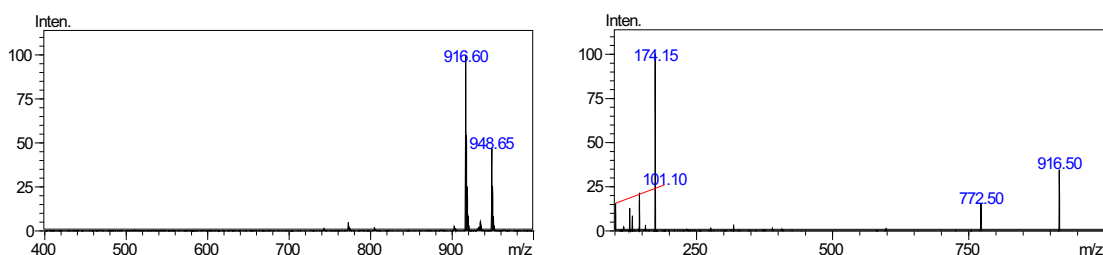


图 5. 秦乐霉素一级质谱图（左）和产物离子扫描图(CE 值-35V)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

图 6 为混合标准样品的 MRM 色谱图，5 种大环内酯类抗生素在 3 分钟内得到了快速检测。

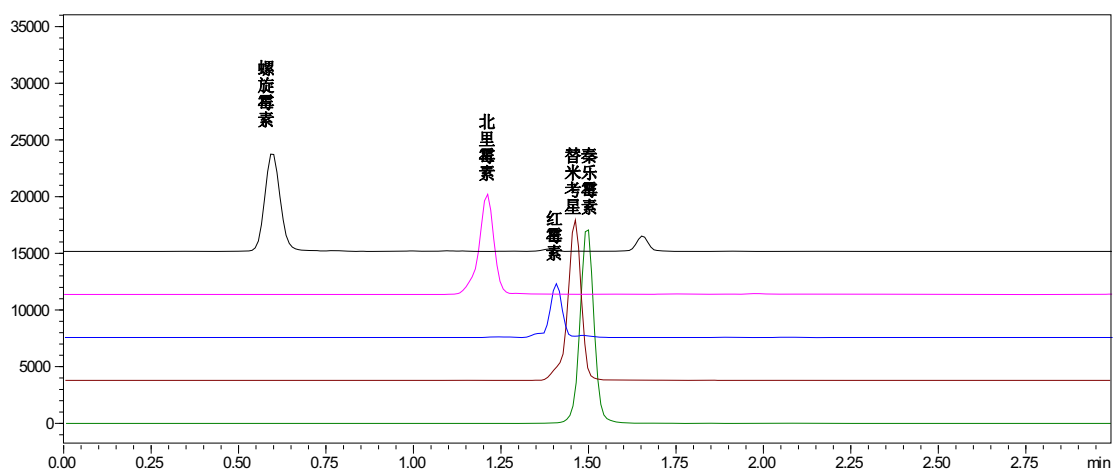


图 6. 大环内酯类抗生素标准样品的 MRM 色谱图 (1 $\mu\text{g/L}$)

2.3 线性关系

将浓度为 0.2、0.5、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 7 至图 11 所示。螺旋霉素在 0.5~100 $\mu\text{g/L}$ ，北里霉素和秦乐菌素在 0.2~50 $\mu\text{g/L}$ ，红霉素和替米考星在 0.2~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

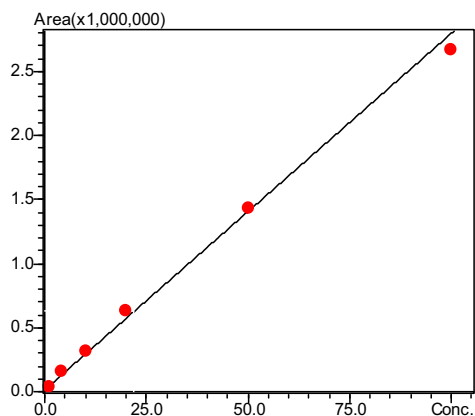


图 7. 螺旋霉素校准曲线

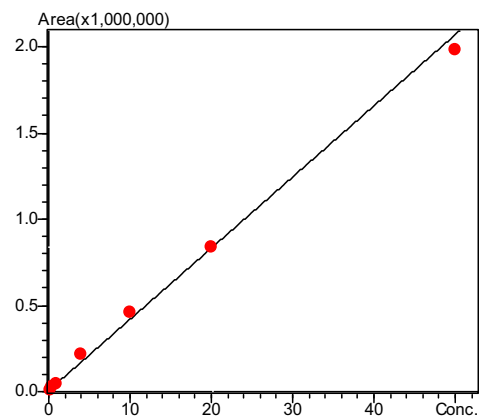


图 8. 北里霉素校准曲线

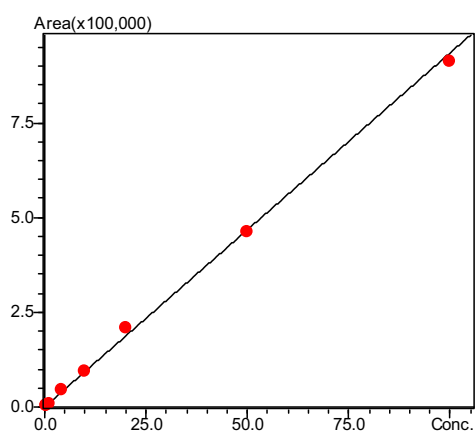


图 9. 红霉素校准曲线

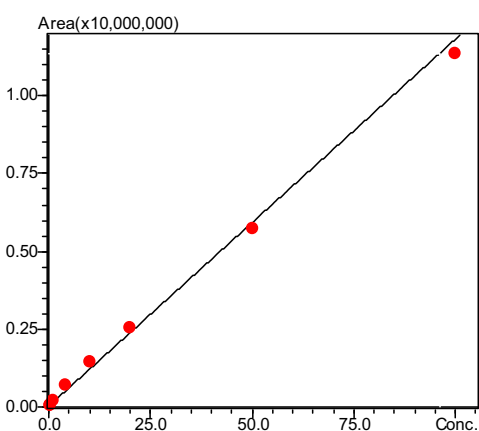


图 10. 替米考星校准曲线

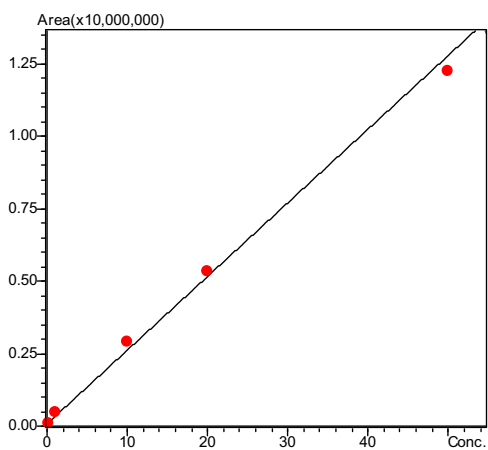


图 11. 泰乐菌素校准曲线

表 3.5 种大环内酯类抗生素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围
1	螺旋霉素	$Y = (28081.2)X + (6171.18)$	0.9970	0.5-100
2	北里霉素	$Y = (41302.3)X + (6801.93)$	0.9969	0.2-50
3	红霉素	$Y = (9338.55)X + (522.514)$	0.9988	0.2-100

4	替米考星	$Y = (117967)X + (27799.9)$	0.9951	0.2-100
5	泰乐菌素	$Y = (254080)X + (75500.2)$	0.9959	0.2-50

2.4 精密度实验

对 2 µg/L、20 µg/L 和 50 µg/L 混合标准溶液连续 6 次进样，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05~1.13%和 0.85~2.43 %之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD% (2 µg/L)		RSD% (20 µg/L)		RSD% (50 µg/L)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
螺旋霉素	1.13	2.01	0.67	1.37	0.42	1.10
北里霉素	0.13	1.35	0.11	0.85	0.19	0.88
红霉素	0.10	2.12	0.08	1.88	0.08	1.78
替米考星	0.08	2.43	0.05	2.01	0.08	2.22
泰乐菌素	0.05	2.11	0.07	1.28	0.07	1.20

2.5 检出限

配制浓度为 0.5 µg/L 标样 7 份，直接进样分析，对上述结果剔除利群值后将各自的 7 次测定结果计算标准偏差 SD，此时检出限 MDL = 3.14 × S，定量限 LOQ = 4 × MDL。测定结果如表 5 所示。

表 5 大环内酯类抗生素的检出限和定量限

No.	名称	标准偏差(SD)	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
1	螺旋霉素	0.030	0.095	0.38
2	北里霉素	0.025	0.078	0.31
3	红霉素	0.035	0.11	0.44
4	替米考星	0.0050	0.016	0.063
5	泰乐菌素	0.010	0.033	0.13

2.6 基质加标实验

在按照 1.3 中样品制备方法，样品中添加 0.5 µg/kg 混合标样，空白鱼肉基质色谱图和基质加标色谱图如图 12、图 13 所示。从图中可以看到，基质加标样品在定量限上均有好的响应。

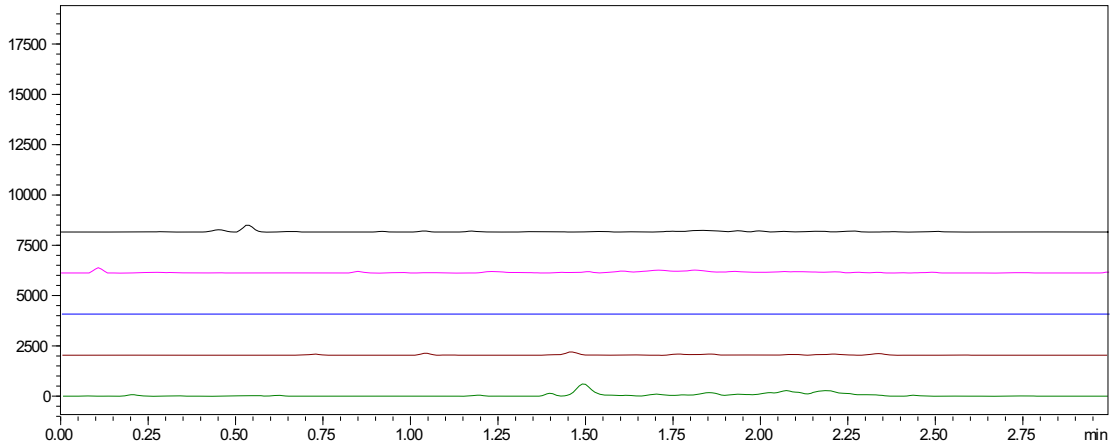


图 12. 鱼肉空白基质样品的色谱图

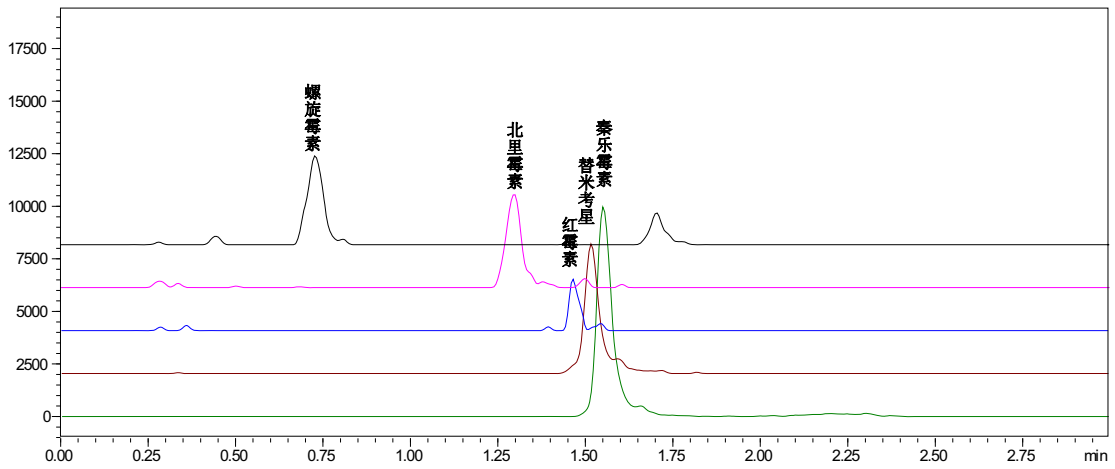


图 13. 鱼肉空白基质加标样品的色谱图

表 6. 大环内酯类抗生素加标回收率结果

No.	名称	样品 1 实测浓度	样品 2 实测浓度	平均回收率
		($\mu\text{g}/\text{kg}$)	度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
1	螺旋霉素	0.42	0.47	89.0
2	北里霉素	0.41	0.50	91.0
3	红霉素	0.38	0.46	84.0
4	替米考星	0.53	0.51	104.0
5	泰乐菌素	0.44	0.48	93.0

3. 结论

建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定鱼肉 5 种大环内酯类抗生素的方法。该方法分析速度快，灵敏度高，精密度良好；螺旋霉素在 0.5~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，北里霉素和泰乐菌素在 0.2~50 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，红霉素和替米考星在 0.2~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内线性良好，标准曲线的相关系数均在 0.9951 以上；检出限为 0.016~0.11 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，定量限为 0.063~0.38 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，加标回收率介于 84.0~104.0%之间，适合水产品中螺旋霉素、替米考星、泰乐菌素、北里霉素和红霉素的检测。

附录

化合物索引表

编号	种类	化合物名称	英文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	页码	
1	孔雀石绿	孔雀石绿	MalachiteGreen oxalate	2437-29-8	329.2	313.15*	6	
						208.1		
2	孔雀石绿	隐色孔雀石绿	Leucomalachite green	129-73-7	331.2	316.20*	6	
						239.15		
3	结晶紫	结晶紫	Basic violet 3	548-62-9	372.25	356.20*	6	
						251.2		
4	结晶紫	隐色结晶紫	Leucocrystal violet	603-48-5	374.25	359.20*	6	
						238.15		
5	氯霉素	甲矾霉素	Thiamphenicol	15318-45-3	354	185.00*	11	
						289.9		
6	氯霉素	氟甲矾霉素	Florfenicol	73231-34-2	356	336.00*	11	
						185		
7	氯霉素	氯霉素	Chloramphenicol	56-75-7	321	152.10*	11	
						257		
8	磺胺类	磺胺醋酰	Sulfacetamide	144-80-9	215.1	156.10*	18	
						92.2		
9		磺胺嘧啶	Sulfadiazine	68-35-9	251.1	251.1	156.00*	18
							108.1	
10		磺胺噻唑	Sulfathiazole	72-14-0	256.1	256.1	156.00*	18
							108.2	
11		磺胺吡啶	Sulfapyridine	144-83-2	250.2	250.2	156.00*	18
							92.1	
12		磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	127-79-7	265.1	265.1	156.00*	18
							92.1	
13		磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	57-68-1	279.2	279.2	186.10*	18
							92.1	
14		磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxypyridazine	80-35-3	280.9	280.9	156.10*	18
							92.1	
15		磺胺氯吡嗪	Sulfchloropyridazine	80-32-0	284.9	284.9	156.10*	18
							92.1	
16		磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	723-46-6	254.2	254.2	156.10*	18
							92.1	
17		磺胺二甲基异噁唑	Sulfisoxazole	127-69-5	268	268	156.00*	18
							92.2	
18	磺胺间二甲氧嘧啶	Sulfadimethoxine	122-11-2	311	311	156.10*	18	
						92.1		
19	磺胺喹噁啉	Sulfachinoxalin	59-40-5	301	301	156.00*	18	
						92.1		

20	硝基咪唑类	3-氨基-2-恶唑酮	Furazolidone	80-65-9	236	134.10*	29
						104.05	
21		5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮	Furaltadone	43056-63-9	335	291.00*	29
						262	
22	1-氨基-乙内酰脲	Nitrofurantion	2827-56-7	249	134.00*	29	
					103.95		
23	氨基脲	Furacilinum	16004-43-6	209	166.10*	29	
					192		
24	硝基咪唑类	洛硝哒唑	Ronidazole	7681-76-7	201	139.70*	35
						54.6	
25		2-甲基-5-硝基咪唑	2-methyl-5-nitroimidazole	88054-22-2	128	41.90*	35
						81.9	
26		甲硝唑	Metronidazole	443-48-1	172	81.80*	35
						127.7	
27	4-硝基咪唑	4-Nitroimidazole	3034-38-6	114	67.90*	35	
					41.1		
28	异丙硝唑	Ipronidazole	14885-29-1	170.1	124.10*	35	
					109.1		
29	林可胺类	林可霉素	Lincocin Hydrochloride	859-18-7	407.3	126.10*	42
						359.3	
30	克林霉素	Clindamycin	21462-39-5	425.3	126.10*	42	
					377.3		
31	磺胺增效剂类	三甲氧苄氨嘧啶	Trimethoprin	738-70-5	291	230.15*	42
						123.15	
32	喹诺酮类	吡哌酸	Pipemidic acid	51940-44-4	304.2	286.10*	52
						217.1	
33		依诺沙星	Enoxacin sesquihydrate	84294-96-2	321.2	303.20*	52
						204.1	
34		氧氟沙星	Ofloxacin	82419-36-1	362.2	318.20*	52
						261.1	
35		培氟沙星	Norfloxacin	70458-96-7	334.2	316.10*	52
						290.2	
36		环丙沙星	Ciprofloxacin hydrochloride	93107-08-5	332.2	314.10*	52
						231.1	
37		洛美沙星	Lomefloxacin	98079-52-8	352.2	265.10*	52
						308.2	
38	达氟沙星	Danofloxain	119478-55-6	358.2	340.20*	52	
					82.2		
39	恩诺沙星	Enrofloxacin	93106-60-6	360.3	342.20*	52	
					316.2		
40	沙拉沙星	Sarafloxacin hydrochloride	91296-87-6	386.2	368.30*	52	
					270.2		

41		西诺沙星	Cinoxacin	28657-80-9	263.1	245.10*	52
						189	
42	激素类	雄烯二酮	19-nor-4-androstene-3,17-dione	734-32-7	287.05	97.00*	63
						109.15	
43		勃地酮	1-Dehydrotestosterone Sulfate	87331-43-9	287.1	121.05*	63
						135.05	
44		达那唑	Danazol	17230-88-5	338.25	148.15*	63
						120	
45		氟甲睾酮	Fluoxymesterone	76-43-7	337.15	241.15*	63
						131	
46		睾酮	Testosterone	58-22-0	289.25	97.00*	63
						109.05	
47		甲睾酮	17-alpha-methyltestosterone /methyltestosterone	521-18-6	303.25	109.15*	63
						97.15	
48		美雄酮	Methadrostenolone	72-63-9	301.25	121.15*	63
						149.15	
49		诺龙	Nandrolone	434-22-0	275.1	109.10*	63
						257.2	
50		去甲雄烯二酮	19-nor-4-androstene-3,17-dione	734-32-7	273.1	109.15*	63
						197.1	
51		群勃龙	Trenbolone	10161-33-8	271.2	253.15*	63
						199.05	
52	乙酸甲地孕酮	Megestrol-17-acetate	595-33-5	385.1	267.15*	63	
					325.2		
53	甲羟孕酮	Medroxyprogesterone	520-85-4	345.3	123.00*	63	
					97.2		
54	甲羟孕酮乙酸酯	Medroxyprogesterone-17-acetate	71-58-9	387.3	123.00*	63	
					327.25		
55	甲基炔诺酮	Norgestrel	6533-00-2	313.25	109.15*	63	
					245.2		
56	氯地孕酮乙酸酯	Chloromadinone 17-acetate	302-22-7	405.05	345.20*	63	
					309.15		
57	炔诺酮	Norethindrone	68-22-4	299.05	109.05*	63	
					91.15		
58	孕酮	Progesterone	57-83-0	315.15	97.15*	63	
					109		
59	四环素类	四环素	Tetracycline hydrochloride	64-75-5	445.1	410.15*	78
						427.25	
60		土霉素	Oxytetracycline	79-57-2	461.1	426.15*	78

						443.15		
61	大环内酯类	去甲基金霉素	Demeclocycline hydrochloride	64-73-3	465.1	448.10*	78	
						430.05		
62		金霉素	Chlortetrachclie hydrochloride	64-72-2	479.05	444.10*	78	
						462.15		
63		强力霉素	Doxycycline	10592-13-9	445.05	428.25*	78	
						410.05		
64	大环内酯类	螺旋霉素	Spiramycin	8025-81-8	843.6	174.15*	85	
						101.1		
65		北里霉素	leucomycin hydrate	1392-21-8	772.45	109.15*	85	
						174.15		
66		大环内酯类	红霉素	Erythromycin (mixture of A,B,C)	114-07-8	734.5	158.10*	85
							576.35	
67	替米考星		Tilmicosin	108050-54-0	869.65	174.10*	85	
						696.5		
68	大环内酯类		秦乐菌素	Acetylisovaleryltylosin Tartrate	63428-13-7	916.6	174.10*	85
							101.5	

*表示定量离