

水产品中几种药物残留检测技术研究

摘 要

氟甲喹(Flumequine)为喹诺酮类的第一代产品;硝基咪唑类药物是一类具有5-硝基咪唑环结构的药物,包括甲硝唑(mertimidazol, MTZ)、二甲硝唑(dimetimidazole, DMZ)和洛哒硝唑(ronimidazol, RNZ)等;四环素类是由链霉菌产生的一类广谱抗生素,在化学结构上都属于多环并四苯羧基酰胺母核的衍生物。该三类药物在水产动物疾病预防和治疗中都有应用,但其使用将不可避免的导致在水产动物体内富集,对人体具有潜在的致癌性和致畸性。目前我国现有的水产行业标准中缺少氟甲喹及硝基咪唑类药物残留的测定方法标准,四环素类药物残留的检测方法尚存在不足,因此有必要建立并完善水产品中该三类药物的测定方法。

(1)建立了高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中氟甲喹残留量的方法。用乙腈提取水产品中氟甲喹残留物,对带皮的鳗鱼进行3种浓度的回收率测定,实验结果表明,回收率在80%~110%之间,变异系数 $\leq 10\%$ 。氟甲喹的检测限为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

(2)建立了水产品中三种硝基咪唑类残留量的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定方法。以氘代二甲硝唑(DMZ-D3)作为内标,以乙酸乙酯提取水产品中的硝基咪唑类残留物,采用HPLC-MS/MS多反应监测(MRM)正离子模式测定,可一次对水产品中的MTZ、DMZ和RNZ进行定性和定量测定。方法简化了样品前处理过程,省去固相萃取步骤,具有操作简便、有机试剂消耗量少等优点。方法DMZ定量限可以达到2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,MTZ和RNZ定量限可以达到1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

(3)研究了罗非鱼中四种四环素类残留量的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定方法。首先用柠檬酸缓冲液(MTC)提取罗非鱼中的四环素类残留物,再经HLB固相萃取柱净化,采用LC-MS/MS

选择反应监测(SRM)正离子模式测定,可一次对罗非鱼中的四环素(Tetracycline, TC)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)、金霉素(Aureomycin, CTC)和强力霉素(Doxycycline, DC)进行定性和定量测定。四种物质定量下限均可达到 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法具有灵敏、准确、简便、快速等优点,适用于水产品中四环素类抗生素多残留的同时确证检测。

本论文建立了水产品中氟甲喹残留量的高效液相色谱荧光检测方法及水产品中四环素类和硝基咪唑类残留量的高效液相色谱-串联质谱测定方法,并对实际样品进行了测定,为水产品中该三类药物的残留检测提供了技术支持和基础数据。

关键词: 氟甲喹, 硝基咪唑类, 四环素类, 残留检测

Studies on the Detective Techniques for Residues of Chemical Drugs in Aquatic Products

Abstract

Flumequine is the first generation of quinolones. The nitronimidazole-drug is a group of drugs includes metronidazole, ronidazole and dimetridazole which have chemical structures of 5-Nitroimidazoles. Tetracyclines (TCs) produced by *Streptomyces* are broad-spectrum antibiotics. Tetracyclines belong to the ramification which have four benzene ring and carboxyl amide derivatives nucleus in the chemical structure. The function of these three kinds of drugs is to prevent or treat of aquatic animal diseases caused by bacteria or protozoa. The abuse of flumequine, tetracyclines and the illegal use nitronimidazole-drug may result in the drug residues in aquatic animals. When these animals are used as food resources the drug residues will have potential carcinogenic and teratogenic hazard to human. Nitroimidazoles had been banned in food producing animals in European Union, USA and China. At present there are no standards for determination of drug residues of flumequine, nitroimidazoles in aquatic in China. The method for the determination of tetracycline residues in aquatic animals also need to be modified. It is necessary to establish new standards or develop the original standards for the determination of residues for these drugs.

(1) A method of determination of flumequine residues in eel tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-FLD) is developed. Flumequine was extracted from the matrix with acetonitrile and analysed by HPLC-FLD. The recoveries of the flumequine were in the range of 80%~110%, limits of detection (LODs) 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, limits of quantitation (LOQs) 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the coefficients of variation within batches less than 10%. This method is suitable to be adopted in the

determination of Flumequine residue in eel tissues.

(2)The method for the determination of residues of three kinds of Nitroimidazoles in aquatic animals was developed by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS). Deuterated dimetridazole (DMZ-D3) which used as internal reference material was added to the sample before extraction. Samples were dissolved in sodium hydroxide solution to disassociate target analytes from matrix. Nitroimidazoles were extracted from the treated matrix by ethyl acetate with the liquid—liquid ion method. The mass spectrometer was performed in the positive ion mode using multiple reaction monitoring for both qualitative and quantitative analysis of MTZ、DMZ and RNZ during once injection. The preliminary treatment was predigested and no solid phase extraction (SPE) procedure was adopted. Comparing with other methods, this method has the advantages of simple operation, less organic chemicals consumption, and shorter operation time.The limits of detection(LOD) were 0.010 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantitation(LOQ) 0.100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

(3)A method is developed for the determination of residues of four TCs in tilapia tissue by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) detection. TCs were extracted with McIlvaine buffer solution (pH 4.0). The extract was cleaned by the Oasis HLB solid phase column.The mass spectrometer was performed in the positive ion mode using multiple reaction monitoring for both qualitative and quantitative analysis of CTC、OTC、DOC and TC during once injection. The limits of quantitation were 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method can be used to simultaneously confirm these four tetracycline antibiotics in aquatic products. The advantage of the method is sensitive, accurate, convenient and fast.

In the present study, the HPLC-FLD and the HPLC-MS/MS method were established for the determination of residues of flumequine, TCs and Nitroimidazoles in aquatic products respectively. The methods were also

applied to monitor samples which were collected from markets. The work has contributed much to the drug residue surveillance in China.

Key words: Quinolones, Nitroimidazoles, Tetracycline, drug Residue

上海海洋大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：刘艳萍

日期：2009年6月7日

上海海洋大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权上海海洋大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于
保密 ，在 年解密后适用本版权书。
不保密

学位论文作者签名：刘艳萍

日期：2009年6月7日

指导教师签名：王清印

日期：2009年6月7日

引 言

食品药物残留是指在食品的任何食用部分中药物的原形化合物或其代谢产物，并包括与药物本体有关杂质的残留。主要的残留物有消毒剂、驱虫剂、抗菌药、激素类、基因诱导剂等。虽然食品的药物残留量较低，但是通过食物链的长期富集，对人体健康有很大的危害。早在 20 世纪 70 年代，食品药物残留问题就引起了国际上的广泛关注。80 年代食品中兽药残留法典委员会(CCBVDF)^[1]成立并负责讨论药物残留的有关问题，制定动物源性食品中药物残留的允许限量标准。目前，欧美等发达国家已形成了非常完善的食品药物残留监测体系，包括法律法规体系、监督管理体系、检测机构体系、技术队伍体系和技术标准体系。

国内外对水产品药物残留控制的发展趋势

1) 政府对食品安全越来越重视

为了加强水产品安全管理，有效保证水产品安全，保护消费者安全，许多国家成立了高规格的管理机构，加强了国家对水产品安全管理的力度。欧盟设有食物链与动物健康常设委员会、食品科学委员会等机构，以欧盟委员会的名义发布有关食品安全的指令。1998 年，美国成立了“总统食品安全顾问委员会”，2002 年 5 月，日本政府决定成立由科学家和专家组成的独立委员会——“食品安全委员会”。我国已建成 4 个国家级兽药残留基准实验室，6 个部级兽药残留检测中心，30 个省级兽药监察所均已根据农业部的统一要求建立了兽药残留监测实验室^[2]。

2) 药物残留标准越来越细化

发达国家把制定药物残留限量标准作为控制水产品药物残留的重要内容和防止进口水产品药物残留超标的主要措施，制定了越来越多的药物残留标准。我国也非常重视药物残留标准的制定，从 2000 年起，

先后组织制修订了几十项标准,包括《无公害食品渔用药物使用准则》、《无公害食品水产品中渔药残留限量》、《渔用含氯消毒制剂》等。磺胺类、土霉素类、喹诺酮类药物、氯霉素、甲醛、己烯雌酚、孔雀石绿、硝基呋喃等残留量的测定方法等标准也都已制定完成^[3]。

3) 药物残留要求越来越严格

最近几年来,世界各国特别是欧盟、日本、美国等发达国家对水产品中药物残留的要求日趋严格,随着仪器设备、检测能力和检测技术水平的提高,药物最高残留限量也越来越低。由于世贸组织不仅接受和认可国际水产品法典委员会关于水产品药物残留的标准,而且规定各国有权制定比国际标准更高的标准和更严格的检验检疫措施,各国纷纷把现有仪器设备和检测方法所能检出的最低含量作为限量的标准。随着仪器设备性能的提高和检测方法的不断改进,检测标准还会向更低的方向发展。

4) 禁用限用药物越来越多

2002年,美国水产物与药品管理局(FDA)公布了禁止在进口动物源性水产品中使用的11种药物名单,其中包括氯霉素、盐酸克伦特罗、己烯雌酚、二甲硝咪唑、其他硝基咪唑类、异烟酰咪唑、呋喃西林、呋喃唑酮、磺胺类药物、氟乙酰苯酮、糖肽^[4]。

继美国之后,日本决定对中国动物源性水产品药物残留进行批批检测。禁止在家禽中使用克球酚(二氯二甲基吡啶酚)、尼卡巴嗪、螺旋霉素、灭霍灵、喹乙醇、恶喹酸、甲砒霉素、氨丙啉、磺胺喹恶啉、磺胺二甲基嘧啶、甲苯、万能胆素、前列斯汀、苯酚类消毒药以及含有磺胺喹恶啉成分的药物^[5]。

欧盟从1999年10月1日起,停止生产和使用3种促进增重的药物添加剂氯氟苯腺嘌呤、二硝甲苯酰胺、异丙硝咪唑。现在,欧盟全面禁止使用洛硝咪唑和氯羟吡啶,并已经决定从2006年1月起,将目前尚允许在饲料中使用的最后4种抗生素也予以禁止使用,这意味着欧盟将全面禁止在饲料中投放任何种类的抗生素^[6]。

近年来,我国水产养殖业发展迅速,养殖规模不断扩大,养殖品种大量增加,产量迅速提高,我国已成为世界水产养殖第一大国,与之相对的是我国水产品出口在国际市场的占有率仅为6%~8%,大大低于国际水平,而且尽管我国水产品出口数量呈上升趋势,但其品质、价格不升反降。养殖者为了防病、治病,超剂量长时间使用药物或使用禁用药而导致的水产品药物残留,已成为制约我国水产品出口增长的主要因素。我国水产品出口被禁或受限事件屡见不鲜,严重制约了我国动源性食品的出口,给我国造成了巨大的经济损失,极大的损害了我国水产品在世界贸易中的形象。由于我国在管理体制、立法、技术能力和基础数据研究方面落后于国外发达国家,因此在相关贸易争议中我国往往成为受制约一方。为了保障人民的身体健康,维护水产品正常出口、扩大水产品的贸易往来以及在贸易争议中获得主动地位,建立灵敏度高、准确可靠的残留分析方法是非常必要的。

1 文献综述

1.1 几种常用渔药的理化性质、抗菌机理及毒性

1.1.1 理化性质

1.1.1.1 氟甲喹

氟甲喹 (Flumequine) 为喹诺酮类 (QNs) 的第一代产品, 别名: 氟六喹酸、氟喹酸和 R-802 等, 分子式 $C_{14}H_{12}FNO_3$, 相对分子质量 261.25, 氟甲喹结构式见图 1-1, 为白色粉末^[7]。无臭无味, 几乎不溶于水和乙醇, 能溶于甲酸和氢氧化钠溶液, 不吸潮, 对热、湿、光比较稳定。其在抗菌活性方面比萘啶酸有较大提高^[8]。

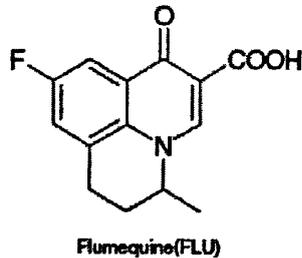


图 1-1 氟甲喹结构图

Fig.1-1 Structures of Flumequine

表 1-1 DMZ、MTZ 和 RNZ 分子结构及分子量

Table.1-1 Molecular structures and molecular masses of DMZ, MTZ and RNZ.

化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecular mass	结构 Structure
MTZ	$C_6H_9N_3O_3$	171	
DMZ	$C_5H_7N_3O_2$	141	
RNZ	$C_6H_8N_4O_4$	200	

1.1.1.2 硝基咪唑类

硝基咪唑类药物是一类具有 5-硝基咪唑环结构的药物，主要包括甲硝唑(Metronidazole, MTZ)、二甲硝唑(Dimetridazole, DMZ)和洛哒硝唑(Ronidazole, RNZ)等。甲硝唑又名灭滴灵，为白色或微黄色的结晶或结晶性粉末。在乙醇和水中微溶。二甲硝咪唑又名地美硝唑，为类白色或微黄色粉末。在乙醇中易溶，在水中微溶^[9]。MTZ、DMZ 和 RNZ 分子式、分子量和结构式见表 1-1。

1.1.1.3 四环素类药物

四环素类(Tetracyclines, TCs)是由链霉菌产生的一类广谱抗生素，在化学结构上都属于多环并四苯羧基酰胺母核的衍生物^[10]。其分子式和结构式见表 1-2。

表 1-2 TCs 分子结构和分子量

Table 1-2 Molecular structures and molecular masses of TCs.

化合物 Compound	分子式 Formula	分子量 Molecular mass	结构 Structure
OTC	$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460.44	
CTC	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	478.88	
TC	$C_{20}H_{24}N_2O_8$	444.45	
DOC	$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444.44	

1.2.1 抗菌机理及其毒性

1.2.1.1 氟甲喹

氟甲喹能抑制细菌脱氧核糖核酸(DNA)回旋酶，干扰 DNA 复制而产生杀菌作用。DNA 回旋酶由 2 个 A 亚单位及 2 个 B 亚单位组成，能将染色体正超螺旋的一条单链切开、移位、封闭，形成负超螺旋结构^[11]。氟喹诺酮类可与 DNA、DNA 回旋酶形成复合物，进而抑制 A 亚单位，只有少数药物还作用于 B 亚单位，结果不能形成负螺旋结构，阻断 DNA 复制，导致细菌死亡。

氟甲喹经口服对河鳗 96h 的 LC_{50} 在 7.94g/kg 以上。氟甲喹浸浴淡水青虾的 LC_{50}

在 1000mg/L 以上。根据农业部新兽药一般毒性方法及其毒性分级, 氟甲喹属于低毒的, 对水生动物及畜禽是安全的。

1.2.1.2 硝基咪唑类

硝基咪唑类药物具有抗原虫和抗菌活性, 同时也具有很强的抗厌氧菌作用, 药物进入易感的微生物细胞后, 在无氧或少氧环境和较低的氧化还原电位下, 其硝基易被电子传递蛋白还原成具有细胞毒作用的氨基, 抑制细胞 DNA 的合成, 并使已合成的 DNA 降价, 破坏 DNA 的双螺旋结构或阻断其转录复制, 从而使细胞死亡, 发挥其迅速杀灭厌氧菌、有效控制感染的作用^[12]。

硝基咪唑类药物及其游离代谢产物, 其硝基位于咪唑环的第 5 位置, 从化学结构上分析具有潜在的致癌和致突变性。Voogd^[13]的试验发现硝基咪唑类药物对真核细胞(包括哺乳类动物细胞)有弱或无诱变作用。Mohindra^[14]对中国田鼠卵巢细胞在低氧及有氧条件下生存力的研究结果显示, 增殖期的细胞在低氧条件下对药物的毒性极其敏感。硝基咪唑类对细胞染色体的损伤比硝基咪唑类更强, 是因为它们具有较高的电子亲和力^[15], 且电子亲和力与诱变性是紧密相关的。唐汉祥^[16]在毒性试验中发现, 替硝唑可诱发肺炎克氏柠檬酸菌、大肠杆菌 K12 突变, 对中国地鼠 V79 肺细胞无致突变性, 对鼠仔无致畸作用。史宗道^[17]对多地区的因口腔炎症应用替硝唑治疗病人进行了 II 期临床试验研究, 排除孕妇、哺乳期妇女、严重神经系统疾患、血液病及严重肝、肾功能损害或对硝基咪唑类超敏者, 约 1/3 病人出现不良反应。

1.2.1.3 四环素类药物

四环素类药物主要以原型经肾小球过滤排出, 残留药物能沉积于骨及牙组织内, 与新形成的骨、牙中所沉积的钙相结合, 导致牙齿持久成黄色, 俗称“四环素牙”^[18], 使出生的幼儿乳牙釉质发育不全并出现黄色沉积, 引起畸形或生长抑制。四环素类药物还在肝组织中富集, 造成肝损害, 还可造成过敏反应、二重感染、致畸胎。四环素类药物残留易诱导耐药菌株造成的食品残留给人类身体健康带来隐患。

1.2 在水产养殖中的应用及国内外限用状况

1.2.1 在水产养殖中的应用

1.2.1.1 氟甲喹

由于氟甲喹独具的高安全性、耐受性、在组织中的高生物活性和高渗透性, 一直受到世界卫生组织和世界粮农组织及食品法典委员会及欧洲药品评价机构的重视, 二者仅作为兽用药避免了人畜共用药的危害, 有效地减少了人类交叉耐药

菌株的产生。该药现在已被欧洲药典收载,最适宜用于无公害养殖基地、供出口畜产品、禽产品、淡水产品及海水产品养殖基地^[19]。

氟甲喹是第一个在6位引进F的药物,主要用于鲑鱼、鳟鱼、各种虾以及鳗鱼等细菌感染性疾病的预防。根据欧洲药品评价机构兽药产品委员会的报告,氟甲喹在猪体内经72h代谢,在肌肉、脂肪、肝和肾中浓度为91、118、181和237 $\mu\text{g}/\text{kg}$,药物残留限量远远低于国家对氟甲喹规定的最高残留限量,故猪只需停药3天;在鸡体内经48h代谢,在肌肉、脂肪、肝和肾中浓度为69、79、185和161 $\mu\text{g}/\text{kg}$,药物残留限量远远低于国家对氟甲喹规定的最高残留限量,故鸡只需停药2天;在鱼体内经7天的代谢,肌肉+脂肪的浓度为80 $\mu\text{g}/\text{kg}$,药物残留限量远远低于国家对氟甲喹规定的最高残留限量,故鱼只需停药2天^[20-26]。

1.2.1.2 硝基咪唑类

硝基咪唑类药物具有抗原虫和抗菌活性,同时也具有很强的抗厌氧菌作用,用于治疗鱼类指环虫病、伪指环虫病、三代虫病等单殖吸虫类寄生虫病。青鱼、草鱼、日本鳗、鲢、鳙、鳊每平方米水体用MTZ 67~100g,欧洲鳗和美洲鳗每平方米水体用MTZ 167~334g^[27]。MNZ除抗滴虫及阿米巴原虫外,还对脆弱拟杆菌、黑色素拟杆菌梭状杆菌属、产气荚膜梭状芽孢杆菌等有良好抗菌作用;DMZ不仅能抗大肠弧菌、多型性杆菌、链球菌、葡萄球菌和密螺旋体,而且可预防螺旋体引起的猪下痢,亦可用于防治水产动物的组织滴虫病及六鞭虫病,此外还有增重作用。李海燕^[28]等研究发现甲咪唑浓度为 4×10^{-6} 和 8×10^{-6} 时对日本鳗、欧洲鳗、翘嘴鳊、红剑和建鲤是安全的;浓度为 2×10^{-6} 时,前3种试验鱼全部存活,而红剑和建鲤的死亡率为6%和4%。用浓度为 2×10^{-6} 、 4×10^{-6} 和 8×10^{-6} 的甲咪唑药浴患伪指环虫病(感染率为92%)的欧洲鳗,用药1次,120h后其阳性检出率分别为54%、10%和0%。

1.2.1.3 四环素类药物

四环素类药物可防治水产动物多种疾病。包括鲈形目鱼类、鲱形目鱼类的弧菌病,香鱼以外淡水鲱形目鱼类链球菌病,虹鳟的疔疮病等等^[29]。

1.2.2 在国内外的限用情况

1.2.2.1 氟甲喹

由于氟甲喹在小鼠的18个月常规致癌试验中引起肝细胞瘤,JECFA(the Food and Agriculture (FAO)/World Health Organization(WHO)Joint Expert Committee on Food Additives)认为其致癌作用并非是由遗传毒性引起的,所以在1997年第48次JECFA会议制定了氟甲喹在鳟鱼中的MRL为500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[30]。2002年1月EMEA(the European Agency for the Evaluation of Medicinal Products)根据其肠道菌群

的作用，制定的生物学 ADI 为 $495\mu\text{g}/\text{kg}$ ，以及氟甲喹在猪、牛、羊、鱼的 MRL。但是 1999 年 Yoshida^[31]报道饲料中 $4000\text{mg}/\text{kg}$ 的氟甲喹饲喂 30 周可以引起肝脏出现坏死；2001 年 Takizawa^[32]报道氟甲喹具有引发和促进肝脏肿瘤的作用；2002 年 Kashida^[33]报道氟甲喹具有引发和促进肝脏肿瘤作用与其引起 DNA 断链有关。因此在 2003 年第 60 次会议上 JECFA 撤销 1999 年 WTO 制定的 ADI 以及在猪、牛、羊、鱼的 MRL^[34]。日本、中国和欧盟各国对氟甲喹限量标准见表 1-3。

表 1-3 中国和欧盟对氟甲喹药物的最大残留量

Table 1-3 MRLs established by EU and China for Oxolinic acid and Flumequine

药物 Drugname	国家 country	范围 Range	限量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) Limit
氟甲喹		鲑形目	500
	日本	其它鱼	600
	欧盟	有鳍鱼类	600
	中国	鲑鱼（肉加皮）	150

1.2.2.2 硝基咪唑类

由于硝基咪唑所具有的危害性，许多国家都针对该种药物制定了严格的食品安全限量标准，且在一定程度上限制其使用。1988 年，美国食品及药物管理局（FDA）基于 DMZ 原型药物对人体健康存在的潜在危险，撤回其作为兽药使用；欧盟 1798/95/EEC 规定禁止将 DMZ 作为兽药使用，但用作饲料添加剂仍然保留，2002 年 11 月，又颁布禁止在饲料中投放 DMZ 作为添加剂。MNZ、RNZ、IPZ 也都被禁用。最近几年，随着世界各国特别是欧盟各国、日本、美国等发达国家对食品中药物残留的要求日趋严格，硝基咪唑类物质成为明令禁用和重点监控的兽药品种。2002 年 FDA 年公布了禁止在进口动物源性食品中使用的 11 种药物名单，其中包括二甲硝咪唑、其他硝基咪唑类。2006 年 5 月，日本肯定列表制度实施后，日方对进口蜂蜜提出了硝基咪唑类兽药的检测要求，并且硝基咪唑类药物残留的最大残留限量要求为 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 。日本政府根据其《食品卫生法》制定的“食品中农业化学品残留肯定列表制度”计划于 2006 年 5 月 29 日起正式施行，这一制度的实施将对我国食品和农产品对日出口带来严峻的考验，在所有食品中均“不得检出”的农业化学品共有 15 种，其中包括二甲硝咪唑，甲硝唑，罗硝唑。这些物质一旦被检出，即视为超标。2003 年加拿大公布了新的修改条例，基于缺乏结合残留物的毒性信息，而取消所有 5-硝基咪唑类化合物作为兽药在食源性动物中使用。2002 年 3 月我国也开始对硝基咪唑类药物严格控制，农牧发[2002]1 号文件中规定了在食源性动物中禁止使用 DMZ、MNZ^[35]。

1.2.2.3 四环素类药物

研究发现该类物质具有致突变性和潜在的致癌性，被许多国家列为限用药物。欧盟和我国规定四种四环素类总和或单项不得超过 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.3 检测方法的研究现状

1.3.1 酶联免疫法 (ELISA)

由于 ELISA 具有操作简便、灵敏度高、专一性强、适用于批量样品分析的特点，已广泛用于动物源性食品中兽药残留的检测。单克隆抗体技术的出现保证了试剂连续稳定生产和标准化供应，为 ELISA 的应用增添了新活力。ELISA 试剂盒已成为目前国内外兽药残留检测的主流技术。

目前尚没有商品化的硝基咪唑检验试剂盒，但在对其抗体的研究方面，L.H.Stanker^[36]及 Fodey.T.L^[37]都作了相关研究。Huet.A.C^[38]报道了用 ELISA 法筛选蛋和肌肉组织中的 4 种硝基咪唑的最新研究方法。样品经乙腈提取，用正己烷脱脂后，竞争酶标免疫反应测定样品中的硝基咪唑及其代谢物，对蛋中 DMZ、MNZ、RNZ、DMZOH 和 IPZ 的检测能力可分别达到 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $40\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

De Wasch 等^[39]用 ELISA 研究了猪肉和鸡肉中的四环素类药物残留，能够检测到的四环素类药物的最低水平是欧洲的 MLR 值或更低。Lee H J 等^[40]研究结果表明半定量 ELISA 方法可靠，能被用来预测活猪组织中的四环素类药物的残留。沈洪刚等^[41]应用酶联免疫法快速测定猪肉中四环素族残留量，试样中残留的四环素族经酸-丙酮提取，离心浓缩后，溶于加热过的牛奶中，用 IDEEX 试剂盒测定，利用的是酶的特异性结合原理(样品中四环素族参与竞争抑制酶标抗体与抗原的结合，样品中四环素族残留越多，抑制力就越强，酶联反应所显的颜色就越浅)，因而具有十分强的特异性，不会出现交叉反应，本方法的灵敏度为 $0.10\text{mg}/\text{kg}$ 。

酶联免疫(ELISA)法能在短时间内进行大批量样品的筛选，又不需要复杂昂贵的大型仪器，具有特异性强、灵敏度高、样品预处理简单等优点。但同类药物的交叉反应及 ELISA 法易出现假阳性结果，所以，对阳性结果需要用其他确证技术进一步检验。

1.3.2 高效液相色谱法 (HPLC)

高效液相色谱的应用越来越广泛，现已成为兽药残留检测不可缺少的重要方法。其原因主要是 HPLC 能适合分离检测不易气化或受热易分解、分子量大、离子型农药、强极性兽药及其代谢物。这些兽药用 GC 测定时，必须先进行衍生化处理。HPLC 采用高效色谱柱、高压泵和高灵敏度检测器大大提高了液相色谱的检测效率、灵敏度和速度。目前，在兽药残留分析时使用最多的检测器是紫外检测器

(UV)和荧光检测器(FD)。紫外检测器的优点是灵敏度较高,流量和温度的变化影响小,是梯度淋洗的一种比较理想的检测器,但是只能检测对紫外光有吸收性能的农药。FD是一种灵敏度高、选择性强的检测器,比UV的灵敏度要高1-2个数量级。

Harrv等^[42]用高效液相色谱-荧光检测法,并采用液-液分配提取测定鸡肉组织中氟甲喹和噁喹酸残留,但其流动相中使用了四氢呋喃,而四氢呋喃本身在氟甲喹和噁喹酸的最适波长处荧光值也很高,对实验结果影响较大。BJrklund^[43]等人则采用固相萃取净化,用高效液相色谱-荧光检测法测定猪肉组织中氟甲喹和噁喹酸残留,试验中采用了固相萃取柱,使操作过程繁琐,回收率降低。

农业部公布了动物性食品中MNZ、DMZ、RNZ残留检测的HPLC法^[44],适用于鸡的肌肉、肝脏组织中单个或多残留的检测,检测限为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$,在 $6\sim 50\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度时回收率为 $60\%\sim 120\%$ 。样品先用乙酸乙酯提取,液液萃取、固相萃取柱净化等过程,处理方法较为复杂。王建华^[45]等建立了鸡的肌肉组织中MNZ、DMZ和RNZ残留检测的HPLC法和气相色谱法。HPLC法中采用二氯甲烷提取后,提取液直接过硅胶固相萃取柱净化,样品添加浓度为 $10\sim 50\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 $78\%\sim 91\%$,但灵敏度低,检测限为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$,并且二氯甲烷的毒性比较大。艾霞^[46]等建立了MNZ在鸡蛋、牛奶及鱼的肌肉和皮肤中残留检测的HPLC法,鸡蛋和牛奶样品用乙酸乙酯提取,鱼的肌肉和皮肤用乙腈提取,提取液旋转蒸干,残余物溶于正己烷-乙酸乙酯(2:1)过固相萃取柱,洗脱液氮气吹干,流动相定容。MNZ在各组织中的检测限均可达 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$,空白鸡蛋、牛奶和草鱼添加MNZ浓度为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $4\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率为 $65\%\sim 82\%$,变异系数在 $6\%\sim 12\%$ 之间。张雨梅等^[47]应用HPLC-UV法研究了二甲硝咪唑在猪体内的残留动态;谢恺舟^[48]等建立了HPLC-UV法研究了二甲硝咪唑在肉鸡组织中的残留;沈建忠^[49]等报道了用液相色谱法检测猪肌肉组织中地美硝唑及其代谢物、甲硝唑和洛硝达唑残留量,检测限为 $1.0\sim 2.0\text{g}/\text{kg}$;沈建忠,项新华等^[50]家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱检测法研究,样品经乙酸乙酯振荡提取,浓缩,盐酸溶解残渣,己烷萃取除去脂肪。氢氧化钠调节溶液到pH 4.8-5.2,过C18小柱,甲醇洗脱,SphefisorbC18柱分离,320nm处检测。流动相为醋酸缓冲液-乙腈(85:15, v/v)。甲硝唑、洛硝达唑和二甲硝咪唑检测限分别为 $0.5\text{g}/\text{kg}$ 、 $1.0\text{g}/\text{kg}$ 和 $1.0\text{g}/\text{kg}$ 。肉鸡肌肉组织中添加 $6.0\text{ng}/\text{g}$ 水平回收率分别为:甲硝唑89.8%,洛硝达唑81.7%。二甲硝咪唑86.6%。汪纪念,高小龙等^[51]高效液相色谱法检测鸡肌肉组织中地美硝唑及其羟基代谢物。

黄志勇等^[52]研究水产品中四环素类抗生素残留量的高效液相色谱测定方法,采用4%高氯酸溶液提取样品中的残留抗生素,经浓缩处理,流速 $1.0\text{mL}/\text{min}$,以乙腈

和0.01mol/LNaH₂PO₄(18: 82,v/v)为流动相, 3种抗生素能与杂质峰完全分开, 检测波长为355nm。在50~1000μg/mL范围内, 峰面积与抗生素浓度呈良好的线性关系($R^2>0.99$), 以测量的3倍标准偏差计算方法的检出限分别为0.0451μg/g(土霉素)、0.041μg/g(四环素)和0.080μg/g(金霉素)。平均加标回收率分别为96.5%(土霉素)、87%(四环素)和73.2%(金霉素)。精密度(RSD)小于5%。Ueno R^[53]等提出了一种简化的食用鱼和小虾中药物残留的HPLC检测方法。测定四环素和土霉素时, 以甲醇-草酸(1: 9, V/V)的混合溶液为流动相, 用28%的氨水调节pH值为7.0, 紫外检测波长360nm, 检测限为0.02μg/g。Naoto Furuawa没有采用常用的C18柱或C8柱, 而是用C4柱, 这对于保留时间取决于非极性作用的四环素族抗生素来说C4柱比C18或C8柱其更不易保留, 所需的流动相极性强度和量均减小, 可采用无机相做为流动相。庞国芳^[54]等建立了一种高效液相色谱法同时测定禽肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留的分析方法。禽肉样品用0.1mol/L Na₂EDTA McIlvaine缓冲液提取, 清液用Oasis HLB固相萃取柱和Carbolic acid 阴离子交换柱净化, 用流动相洗脱定容后,用紫外检测器于350nm测定, 在5~100mg/kg的添加水平下其回收率在60%~100%之间,相对标准偏差在16%以内。土霉素、四环素的检出限为2mg/kg, 金霉素、强力霉素的检出限为5mg/kg。安清聪^[55]等研究动物组织中四环素类抗生素残留的HPLC检测,试验分别采用50ml/L高氯酸、McIlvaine 缓冲液为样品提取液; 甲醇—乙腈—0.01mol/L草酸为流动相, 流速1.0ml/min。结果显示土霉素、四环素、金霉素的最低检测限为100mg/kg, 在100~1000mg/kg浓度范围内, 标准添加回收率为74.3%~97.1%, 变异系数为0.43%~9.54%。此方法的检测限太高, 没法满足欧盟和我国对四环素类的检测要求。

1.3.3 液相色谱-质谱法

液相色谱-质谱法是近几年兴起的新技术, 用于分析对热不稳定, 分子量较大, 难以用气相色谱分析的兽药残留。与其他检测方法相比具有检测灵敏度高、选择性好、定性定量同时进行、结果可靠等优点, 是国际上公认的兽残检测确证法。随着大气压化学电离源和电喷雾离子源接口技术的成熟, 液相色谱-质谱法越来越受到人们的青睐。

M.J.Sams^[56]利用 LC-UV 筛选, LC-APCI-MS 确证鸡肉组织、蛋中的 DMZ、RNZ 及其代谢物。A.Cannavan^[57]用热喷雾离子源(TSI)的 LC-MS 测定了肌肉组织和蛋中的 DMZ, 样品用二氯甲烷(肌肉)或甲苯(肝脏和蛋)萃取, 萃取液过硅胶固相萃取小柱, DMZ 用乙腈洗脱, 洗脱液蒸干后溶于流动相进样分析, 检测限为5μg/kg, 添加浓度在5~20μg/kg时, 回收率均大于80%。D.H.Pessel^[58]用 LC-ESI-MS 同时测定了肌肉组织中四种硝基咪唑类残留物 DMZ、RNZ、DMZOH、NZL。王

海, 刘素英等^[59]研究了猪各组织中硝基咪唑类药物残留量, 猪肌肉、肝脏、肾脏和皮下组织中硝基咪唑类药物的检测限为 0.5~1ug/kg; 空白组织添加硝基咪唑类药物水平为 0.5、1、2 或 4ug/kg 时, 测得回收率: 肌肉在 61.1%~85.4%之间, 肝脏在 62.3%~80.4%之间, 肾脏在 61.6%~82%之间, 皮下组织在 63.6%~84.1%之间。杨成对, 宋莉晖等^[60]研究了家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留的液相色谱串联质谱测定, 样品用乙酸乙酯提取、浓缩、过滤后直接进入液相色谱-质谱分析。硝基咪唑类药物显示弱碱性, 可加 H^+ 形成准分子离子, 但是质子化效率影响检测限, 采用监测母离子及其相应子离子的多反应监测技术, 根据离子流峰面积进行定量。3 种药物的定量检出限分别为甲硝唑 0.8ug/kg、洛硝哒唑 0.1ug/kg 二甲硝唑 0.1ug/kg, 1 次分析的运行时间为 5min, 缩短了分析时间。吴香美, 李焕德^[62]建立一种高效液相-质谱法(HPLC-MS)检测 4 种硝基咪唑类药物(甲硝唑、替硝唑、奥硝唑、塞克硝唑)。Capitan-Vallvey^[63]等采用 LC-MS 检测水样中 5 种硝基咪唑类药物的含量, 最低检测限在 0.2 μ g/L。Hurtaud- Pessel^[64]等建立鸡肌肉组织中 MNZ、RNZ、DMZ 和 HMMN4 种硝基咪唑类药物多残留检测的 LC-MS 法, 乙酸乙酯萃取蒸干, 去脂后进样分析, 内标法定量, 检测限在 5 μ g/kg 以下, 样品处理简单。添加浓度为 5 μ g/kg 时, 4 种药物回收率在 73%~97%, 变异系数为 17%~26%。E.Daesleire^[65]LC-ESI-MS/MS 建立了蛋中的 DMZ、RNZ 和 MNZ 的同时确证方法。高新, 张小燕^[66]等采用高效液相色谱质谱联用技术测定鸡蛋中罗硝唑、甲硝哒唑、迪美唑的含量, 试样在用乙腈进行简单萃取和有机溶剂蒸发后, 过滤萃取物, 并将所得产物直接注入 C18 柱的 LC-MS/MS 系统。其中母系离子 $[M+H]^+$ 由正极气体电离源分裂氙气产生。三种化合物的检测极限是 0.5ug/kg, 回收率 DMZ 为 76%, MNZ 为 79%, RNZ 为 83%。

Marc C 等^[67]用 HPLC 和 MS/ESI 检测器测定了猪肉组织中四环素类抗生素的残留, 用 $(M+H)^+$ 峰进行定量, 检测限是 0.5~4.5ng/g。蒋宏健和袁汉成^[68]利用 Waters 的 API-LC/MS 探讨了痕量四环素的检测方法, 证明该方法具备灵敏度高、定量准确等特点, 符合国际上通用的检测要求。采用 Xterra MSC18 色谱柱 (2.1mm \times 150mm), 流动相为乙腈-水 (V/V=30: 70), 流速为 0.2ml/min; ZQ 质谱检测器: 正、负离子同时采集, 电离电压 3.7KV, 锥孔电压 23V, 离子源温度为 125 $^{\circ}$ C, 雾化温度为 350 $^{\circ}$ C。

1.3.4 气相色谱法和气相色谱-质谱法

气相色谱法分离样品具有快速、高效的特点, 但只是常规分析法, 不能确证分析。因硝基咪唑类化合物为含氮的易挥发性物质, 可用气相色谱氮磷检测器法 (NPD) 直接测定。J.H.Wang^[69]等利用 GC-NPD 测定了 DMZ、MNZ 和 RNZ。以磷酸三苯酯为内标, 硝基咪唑经乙腈提取后用醋酸酸化, 过阳离子固相萃取柱 (SCX),

乙腈-28%甲醇液洗脱分析物。洗脱液吹干后溶于甲醇进样分析。按照空白样品提取液的3倍信/噪计算, DMZ和MNZ的检测限为0.2ng/g, RNZ为0.5ng/g。DMZ、RNZ和MNZ添加浓度为5 μ g/kg时, 3种药物的回收率分别为85%、90%和80%, 变异系数分别为13.0%、14.3%和11.2%。Newkirk等^[70]报道了用气相色谱法检测地美硝唑在猪肌肉组织中的残留, 当组织样品取样量为50.0g时, 检测限为1.0 μ g/kg。

气相色谱-质谱法既具有气相色谱高的分离效能, 又具有质谱准确鉴定化合物结构的特点, 可达到同时定性、定量的检测目的。用于农药残留量检测工作, 特别是对农药代谢物、降解物的检测和多残留检测等具有突出的特点。J.Polzer^[71]建立了火鸡和猪组织中4种硝基咪唑类药物及它们的羟基代谢物的GC-NCI/MS(负离子化学电离)法, 5g样品加酶和缓冲液水解过夜, 缓冲液取出后去脂过萃取柱, 分析物测定前衍生化, 内标法定量。DMZ/HMMNI、RNZ、MNZ和羟基甲硝唑(MNZOH)的检测限为0.65~2.8 μ g/kg, IPZ和羟基异丙硝唑(IPZOH)为5.2 μ g/kg, 回收率为95%~120%。Morris^[72]建立的GC-MS-MD检测猪饲料中DMZ和IPZ检测限达不到2 μ g/kg, 但两种药物添加水平为0.1mg/kg时, 质谱图中可给出足够质谱信息来确证两种药物。但由于质谱仪比较昂贵, 目前在国内尚未广泛应用于农药残留量检测工作。

1.3.5 其它检测方法

Gaugain^[73]建立了检测猪和禽组织中RNZ、DMZ和HMMNI(羟基地美硝唑)残留检测的高效薄层色谱法(HPTLC)法。猪和禽肉用二氯甲烷萃取后蒸干, 残余物溶于乙酸铵溶液, 正己烷脱脂, 去脂后的溶液过固相萃取柱, 洗脱液吹干溶于甲醇点板。展开剂为甲醇-乙酸乙酯。板干燥后喷吡啶紫外312nm检测。RNZ、DMZ和HMMNI的检测限分别为2 μ g/kg、5 μ g/kg和5 μ g/kg。

林修光^[74]等研究了用标准纸片法快速测定鸡肉中四环素族残留量。戴栗洁^[75]改变检定所用藤黄微球菌的培养温度, 对土霉素的含量进行生物检定, 结果表明在8.72~41.61 μ g/mL浓度范围内的对数剂量与抑菌圈的直径呈良好的线性关系。钱英^[76]使用薄层色谱法定性测定家禽类肌肉组织中四环素和土霉素, 无水四环素在波长365nm下显黄色荧光, 无水土霉素显绿色荧光, 根据与标准对照可定性测定, 检测限为0.2mg/kg。张兰等^[77]用毛细管电泳-紫外检测法测定水产品中的土霉素等抗生素的含量。电泳峰面积在2.5~300.0mg/mL, 范围内呈现良好的线性, 检测限为0.5 μ g/mL。

1.4 目的意义和研究内容

1.4.1 目的意义

在世界贸易组织成员国之间，以关税、配额、许可证等为特征的贸易保护措施受到了限制。由于欧、美、日等发达国家对 WTO 中相关规则十分精通，并且在兽药的生产、管理、监控及检测等方面均具有较强的技术优势，他们便采取各种手段，以种种名义实施新的贸易保护措施。其中，食品安全质量问题已成为非常重要的贸易保护手段。美国、日本和欧盟不仅要求农药残留检测种类多，而且相当部分的农残限量标准定在检测方法的测定低限，个别项目限量标准要求已接近方法和仪器的最低检测极限，为超痕量分析，即 pg/kg 水平，甚至更低。目前国外水产品中药物残留检测有向多项目、低限量发展的趋势。相当数量的渔药品种被禁用或严格限用而不设定 MRLs，即规定在水产品中，采用当代国际上最先进的测定方法不得检出。水产品中渔药残留超标问题已成为我国水产品出口的主要障碍，形势十分严峻。我国渔药残留检测与国外发达国家技术水平尚有差距。长期以来，我国水产品中渔药残留超标致使出口受阻局面不能得到彻底改变的原因是多方面的，其中检测技术水平较低，检测方法与国外的质量标准不相适应，不具备高效的渔药多残留系统检测方法是一重要技术障碍。

由于我们缺乏多种类渔药的多残留检测方法及其快速检测技术，无法保证进出口水产品快速检验的要求，更无力对进口水产品采取技术性贸易措施，经常遭受水产品进口国设置的各种技术贸易壁垒的阻挡和退货，致使我国的水产品贸易蒙受巨大的损失。

综上所述，研究建立一套适合我国国情并与国外先进技术接轨的多种类、多残留渔药快速筛选检测与确证方法已迫在眉睫，这是一项高技术水平并具有极高应用价值的开拓性工作。

1.4.2 研究内容

本课题的研究内容是：

- 1.研究建立水产品中氟甲喹残留量的液相色谱测定方法。
- 2.研究建立水产品中硝基咪唑类残留量的液相色谱串联质谱测定方法。
- 3.研究建立水产品中四环素类残留量的液相色谱串联质谱测定方法。

2 氟甲喹在水产品动物体内的残留检测方法研究

2.1 材料与方法

2.1.1 仪器和设备

岛津 LC-10AT, 配 RF-10Axl 荧光检测器; Waters2695, 配 2475 荧光检测器; Agilent1100。

BP221S 型电子分析天平: 精度 0.0001g, 西德赛多利斯公司;

组织匀浆机 IKA-T18basic: 德国 IKA 公司;

漩涡混合器: 德国 IKA 仪器公司;

KQ-600DE 型数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司;

Milli-Q 超纯水仪: 密理博公司;

高速离心机: 最高转速 4000r/min, 飞鸽牌 TDL-40B;

旋转蒸发器 laborota4000: 德国 Heidolph 公司;

N-EVAP 111 氮吹仪: 美国 Organomation 公司。

2.1.2 材料和试剂

氟甲喹标准品(含量 \geq 99.0%);

乙腈、草酸、正己烷均为色谱纯;

无水硫酸钠、氢氧化钠为分析纯;

水: Milli-Q 超纯水;

5mol/L 氢氧化钠溶液。称取 2.0g 氢氧化钠固体于 10mL 容量瓶中, 定容;

0.03mol/L 氢氧化钠溶液。量取 5.0mol/L 氢氧化钠液 0.6mL, 加水稀释至 100mL;

0.01mol/L 草酸溶液。称取草酸 0.90g, 用水稀释至 1000mL。

鲜活虾、蟹、鱼类样品 (市售)。

2.1.3 色谱条件

色谱柱:C8Luna 色谱柱, 150 mm \times 4.6 mm(id), 5 μ m, 美国 Phenomenex 公司;

柱温: 35 $^{\circ}$ C;

检测器: 荧光检测器, 激发波长 312nm, 发射波长 369nm;

流动相:0.01mol/L 草酸: 乙腈=65: 35 (v/v);

流速: 0.8mL/min;

进样量: 10 μ L。

2.2 方法建立

2.2.1 标准曲线的绘制

标准储备液 (1.0mg/mL): 准确称取氟甲喹标准品各 10mg, 分别用 0.03mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容至 10mL, 配成 1.0mg/mL 的标准储备液, 置-18℃冰箱中保存备用。

标准使用液: 准确量取适量氟甲喹标准储备液, 用乙腈稀释成浓度为 1.0 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL, 标准使用液置 4℃冰箱中保存。

标准工作溶液: 准确量取适量标准使用液, 用乙腈稀释成浓度为 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100ng/mL 的系列工作液。

绘制标准曲线: 将绘制标准曲线用工作液从低浓度到高浓度依次注入液相色谱仪, 按 2.1.3 项下的色谱条件进行分析。每一浓度进 3 针, 按其所得峰面积的平均值与对应的标准溶液浓度作标准曲线图, 并计算回归方程及相关系数。

2.2.2 样品处理

制样: 鳗鱼取带皮肌肉。样品切为不大于 0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm 的小块后混匀, 放置于-18℃冰箱备用。

提取: 将试样解冻, 称取 2.0g, 精确到 0.01g; 置于 50mL 聚乙烯离心管中, 加乙腈 10mL, 无水硫酸钠 2g, 均质提取 30s, 加入 8mL 正己烷, 涡旋混合 1min, 以 4000 r/min 离心 10min, 弃去上层有机相, 下层清液转移至 50mL 鸡心瓶中; 另取一个 50mL 离心管, 加入 10mL 乙腈, 洗涤均质刀头 10s, 洗涤液移入第一支离心管中, 用玻璃棒搅动残渣, 加入 8mL 正己烷, 涡旋提取 1min, 以 4000 r/min 离心 10min, 弃去上层有机相, 下层清液转移至上述 50mL 鸡心瓶中, 于 55℃下旋转蒸发至干。准确加入 1mL 0.01mol/L 草酸: 乙腈=65: 35 (V/V) 液体溶解残留物, 在振荡器上涡旋 30s, 过 0.45 μ m 的滤膜, 供高效液相色谱分析。

2.2.3 回收率及相对标准偏差的测定

取鳗鱼、虾、鲤鱼空白组织 2g, 准确加入合适浓度的标准工作液, 制成浓度为 1ng/mL~100ng/mL 的添加样品, 并按 2.2.2 项下的提取程序进行操作。以测得量和添加量之比计算回收率, 并计算相对标准偏差。

2.2.4 实际样品

鲜活虾、蟹、鱼类样品按 2.2.2 处理

2.3 结果

2.3.1 标准曲线及回归方程

取标准工作溶液，以待测物质量浓度为纵坐标，以时间为横坐标进行线性回归，结果表明氟甲喹的线性相关系数均 >0.99 ，绘制标准曲线见图 2-1。

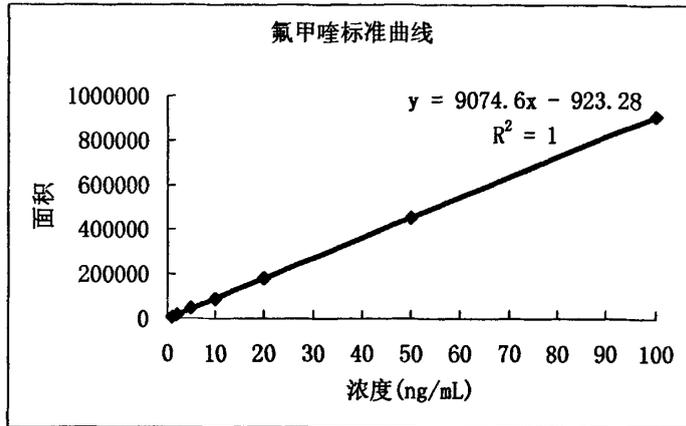


图 2-1 1-100 ng/mL 氟甲喹标准曲线 Fig 2-1 Calibration curve of Flumequine at 1-100 ng/mL

2.3.2 检测限和定量限

在空白鳗鱼、虾、鲤鱼带皮肌肉组织中分别添加氟甲喹标准溶液 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ，经测定其信噪比 (S/N) 都大于 3，表明氟甲喹检测限分别为 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在空白鳗鱼、虾、鲤鱼带皮肌肉组织中分别添加氟甲喹标准溶液 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ ，经测定其信噪比 (S/N) 都大于 10，表明氟甲喹的定量限分别为 $2\mu\text{g}/\text{kg}$ 。从测定结果来看 (图 2-2~19)，分离效果好，在目标物保留时间附近没有任何干扰峰。

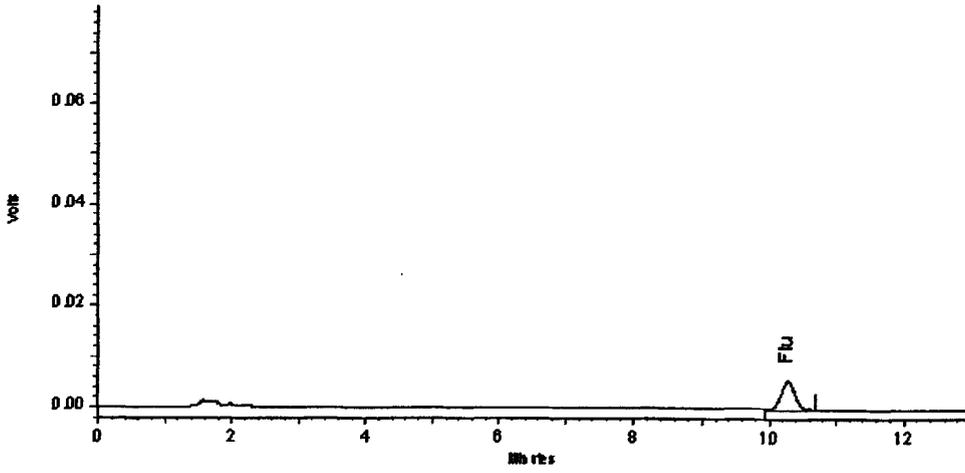


图 2-2 10.0 µg/L 氯甲喹标准溶液色谱图 Fig 2-2 Chromatograms corresponding to 10.0 µg/L standard solution

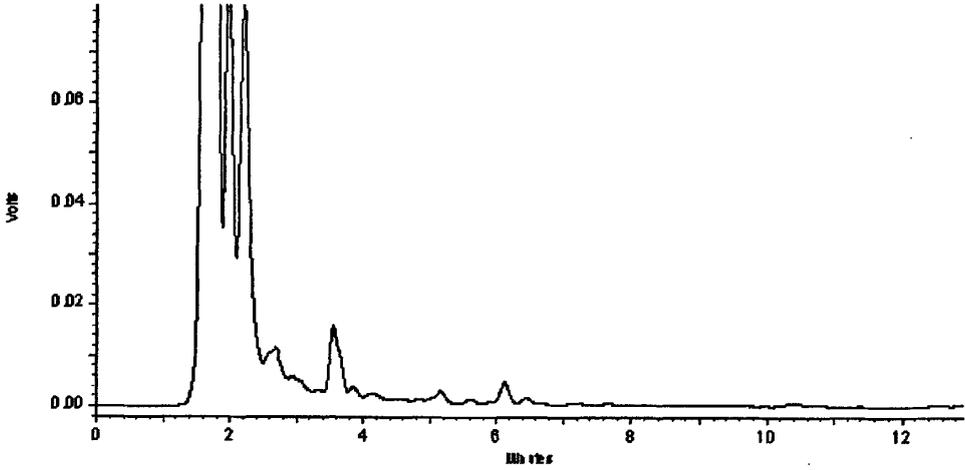


图 2-3 空白鳗鱼样品色谱图

Fig 2-3 Chromatograms corresponding to blank eel muscle

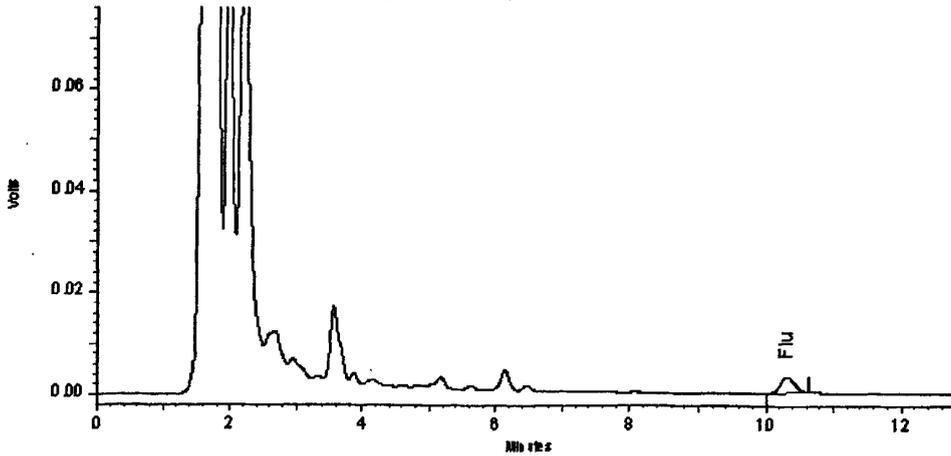


图 2-4 鳗鱼加标样品色谱图, 添加水平: 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Fig 2-4 Chromatograms corresponding to eel muscle spiked at 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

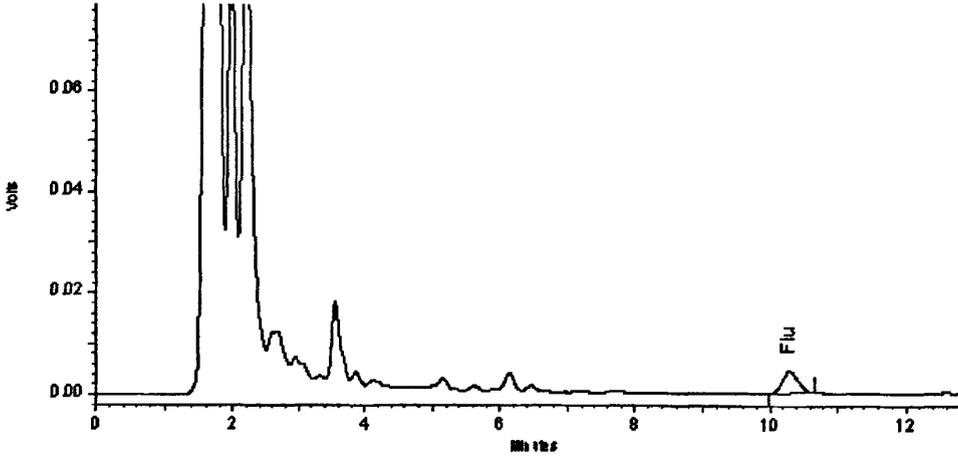


图 2-5 鳗鱼加标样品色谱图, 添加水平: 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Fig 2-5 Chromatograms corresponding to eel muscle spiked at 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

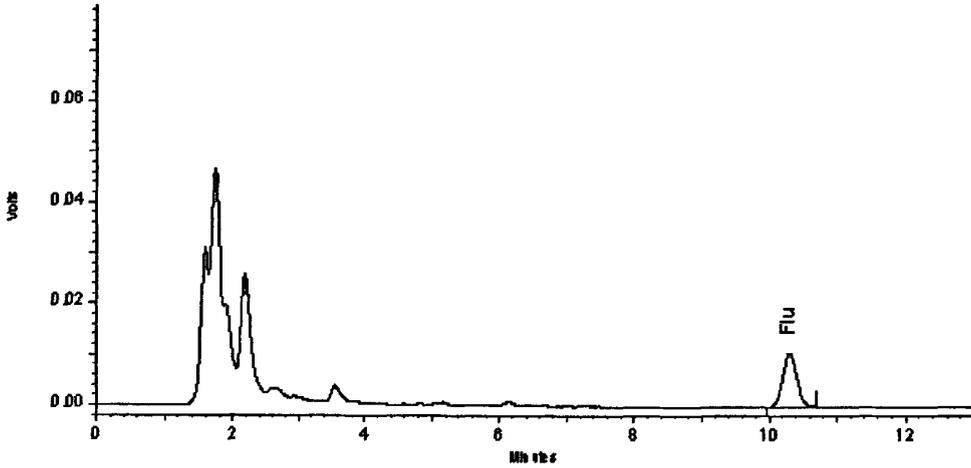


图 2-6 鳗鱼加标样品色谱图, 添加水平: 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Fig 2-6 Chromatograms corresponding to eel muscle spiked at 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

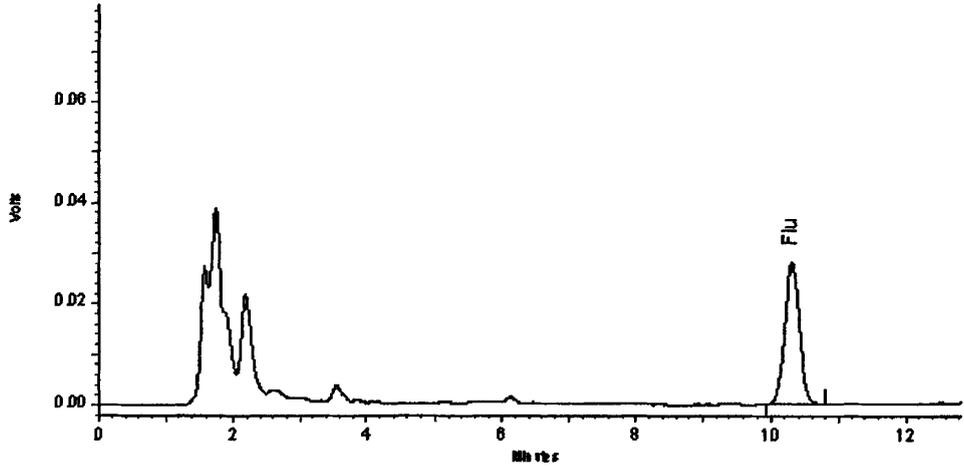


图 2-7 鳗鱼加标样品色谱图, 添加水平: 20.0 µg/kg
Fig 2-7 Chromatograms corresponding to eel muscle spiked at 20.0µg/kg

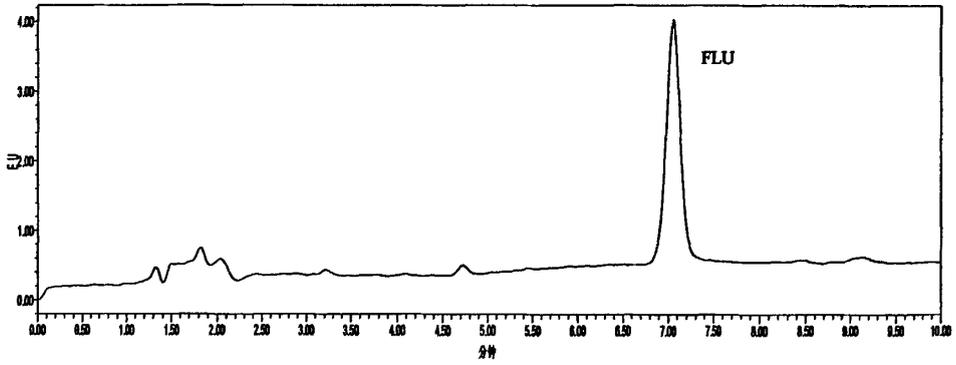


图 2-8 10.0 µg/L 氟甲唑标准溶液色谱图
Fig 2-8 Chromatograms corresponding to 10.0 ng/mL standard solution

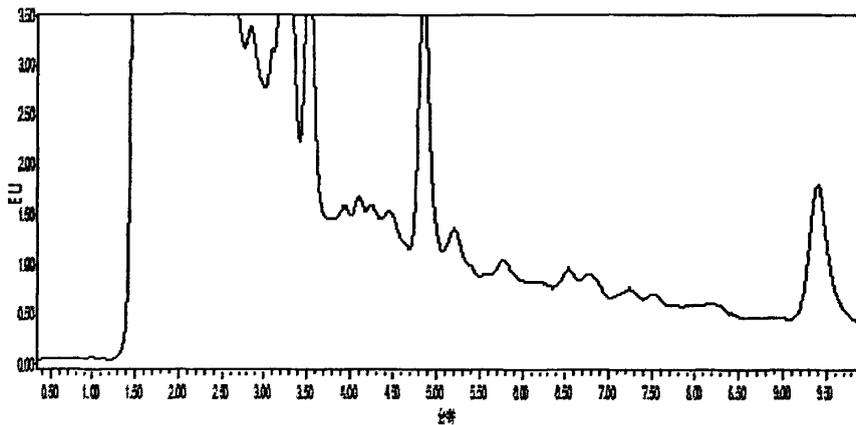


图 2-9 空白虾样品色谱图
Fig 2-9 Chromatograms corresponding to blank shrimp

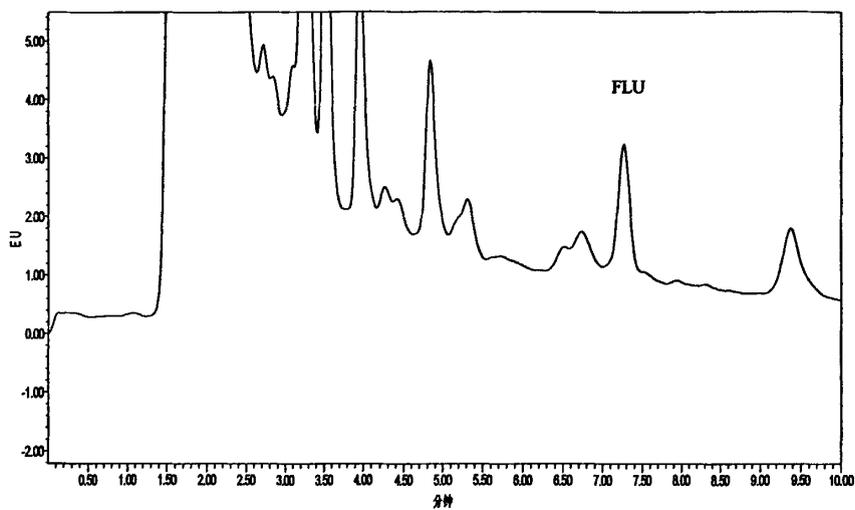


图 2-10 虾加标样品色谱图, 添加水平: 1.0 µg/kg
Fig 2-10 Chromatograms corresponding to shrimp spiked at 1.0 µg/kg

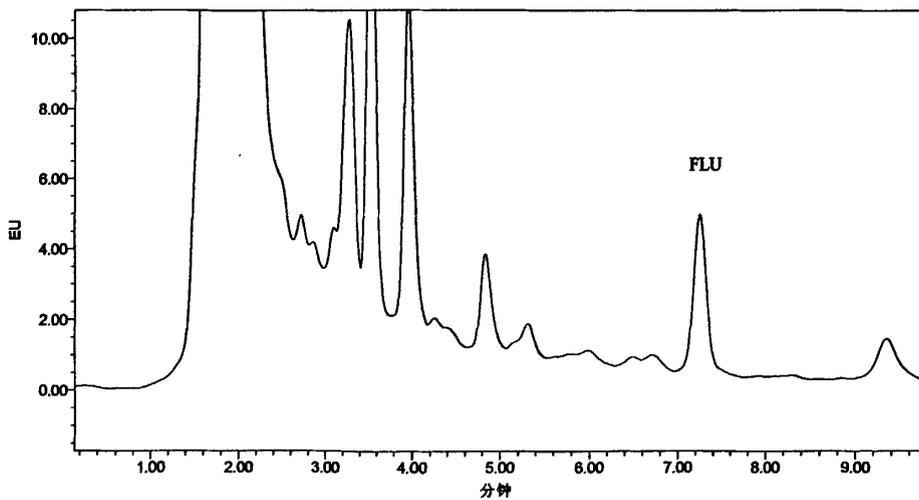


图 2-11 虾加标样品色谱图, 添加水平: 2.0 µg/kg
Fig 2-11 Chromatograms corresponding to shrimp spiked at 2.0 µg/kg

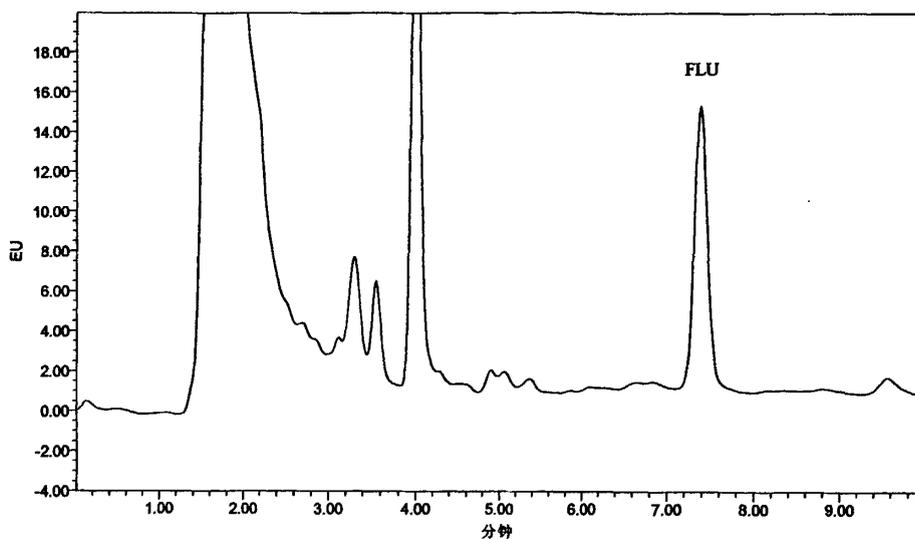


图 2-12 虾加标样品色谱图，添加水平：10.0 µg/kg
Fig 2-12 Chromatograms corresponding to shrimp spiked at 10.0 µg/kg

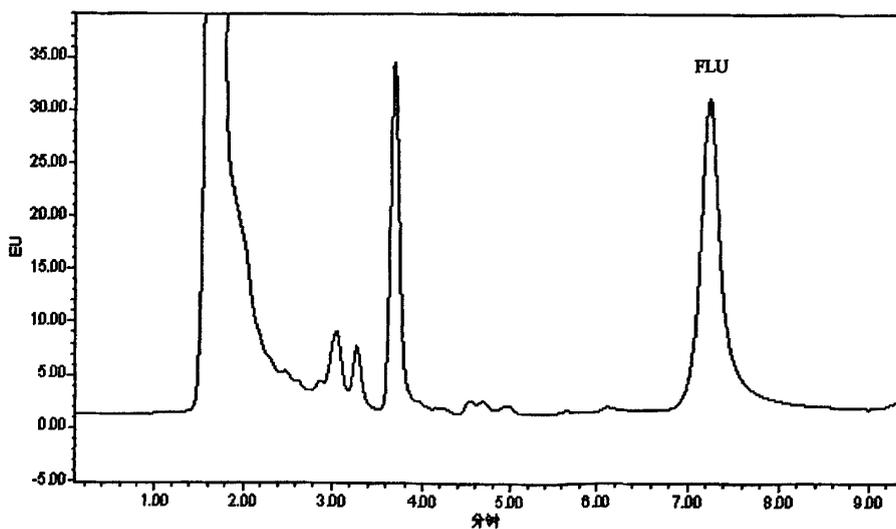


图 2-13 虾加标样品色谱图，添加水平：20.0 µg/kg
Fig 2-13 Chromatograms corresponding to shrimp spiked at 20.0 µg/kg

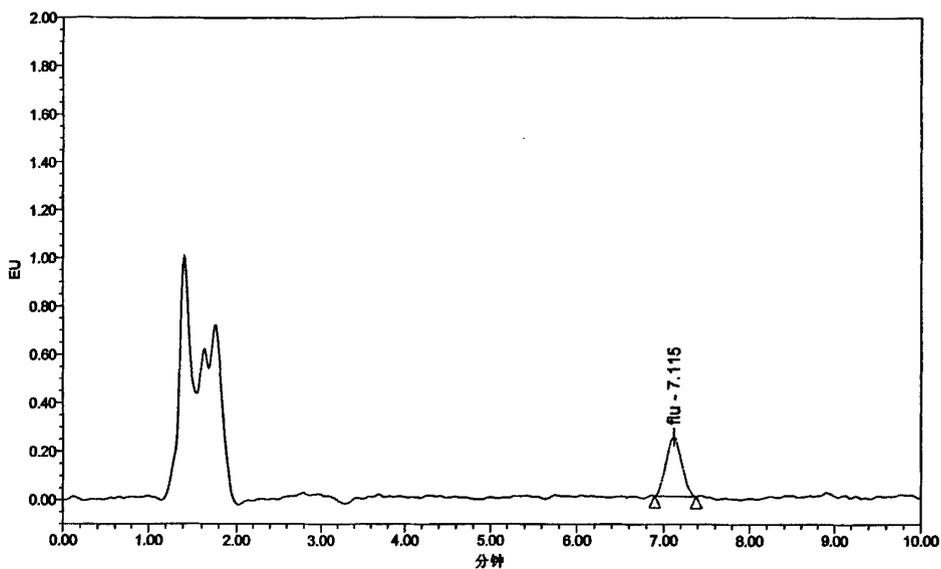


图 2-14 2.0 µg/L 氟甲嗪标准溶液色谱图

Fig 2-14 Chromatograms corresponding to 2.0 ng/mL standard solution

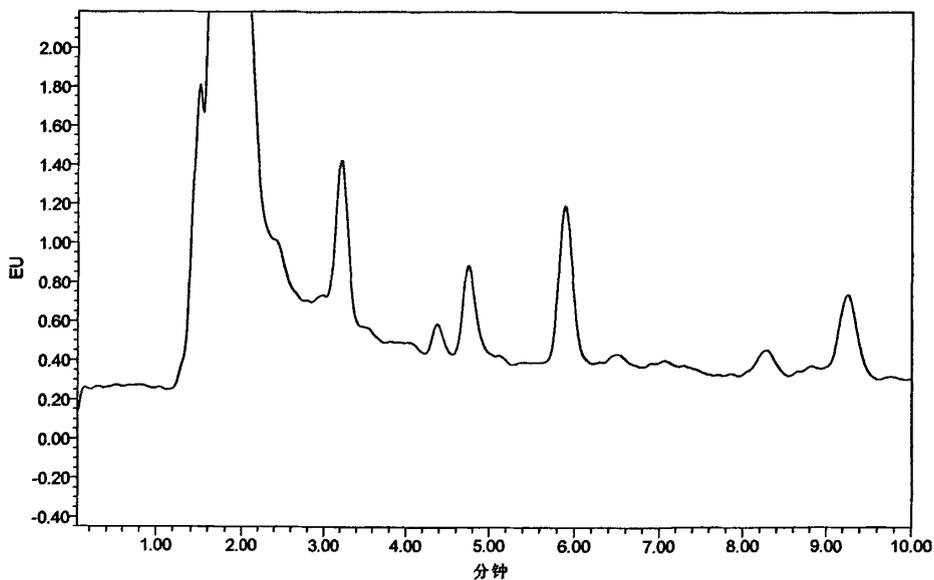


图 2-15 空白鲤鱼样品色谱图

Fig 2-15 Chromatograms corresponding to blank carp

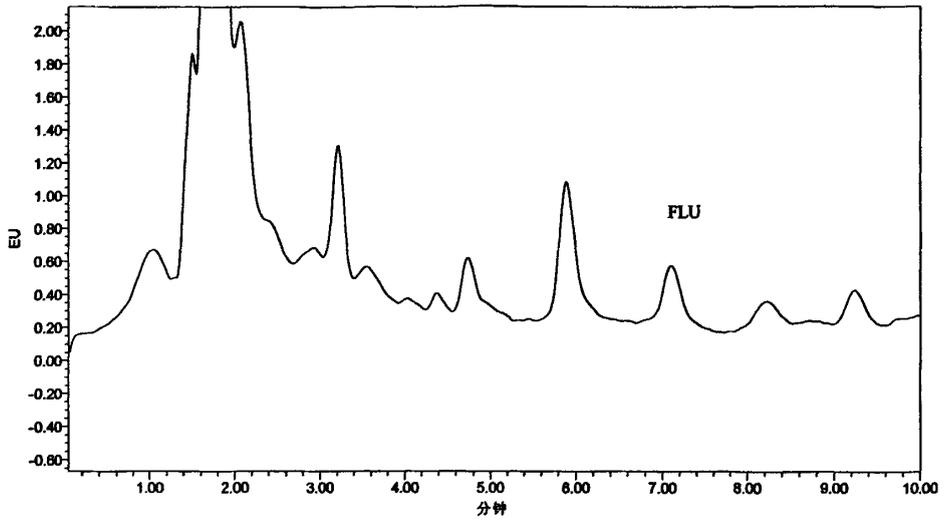


图 2-16 鲤鱼加标样品色谱图，添加水平：1.0 µg/kg
Fig 2-16 Chromatograms corresponding to carp spiked at 1.0 µg/kg

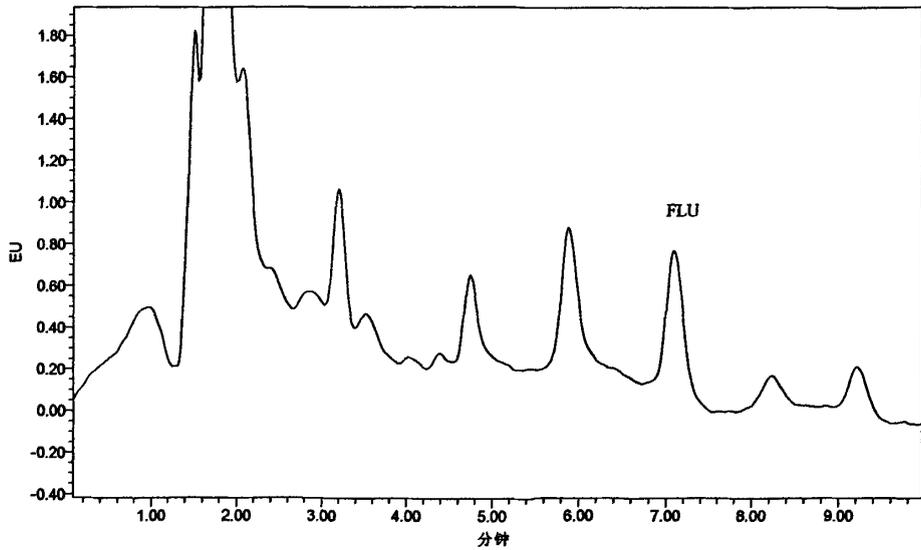


图 2-17 鳊鱼加标样品色谱图，添加水平：2.0 µg/kg
Fig 2-17 Chromatograms corresponding to carp spiked at 2.0 µg/kg

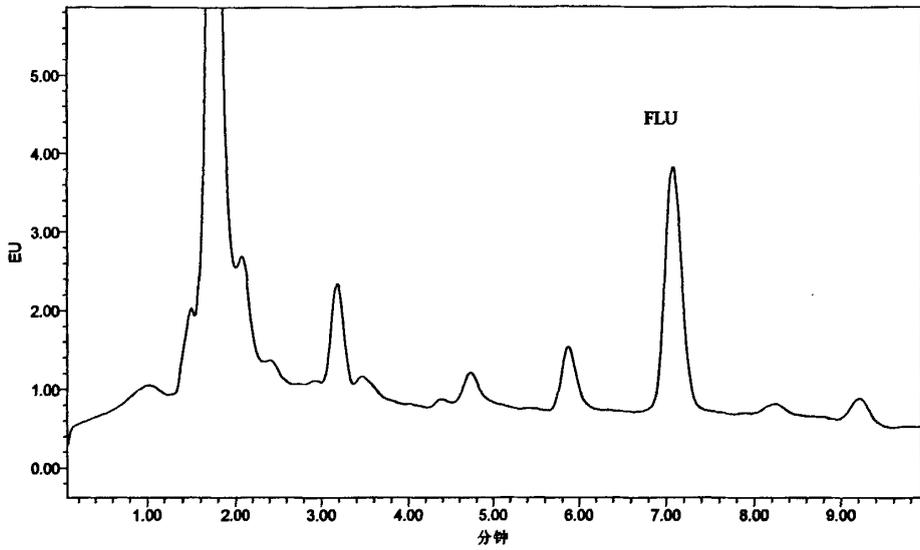


图 2-18 鲤鱼加标样品色谱图, 添加水平: 10.0 µg/kg
Fig 2-18 Chromatograms corresponding to carp spiked at 10.0 µg/kg

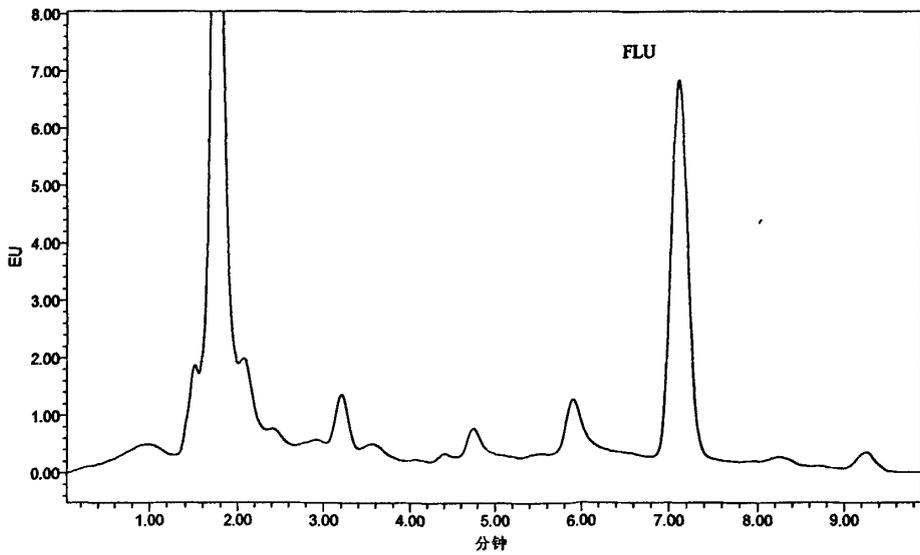


图 2-19 鲤鱼加标样品色谱图, 添加水平: 20.0 µg/kg
Fig 2-19 Chromatograms corresponding to carp spiked at 20.0 µg/kg

2.3.3 回收率及变异系数

取空白水产品带皮肌肉组织 2.0g 加适量的标准溶液, 制成含氟甲喹浓度为 5.0~20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加样品, 按 2.2.2 步骤中组织样品的提取方法处理后进行色谱分析。取峰面积值计算氟甲喹的含量, 以加入量和测得量之比计算回收率。选择 3 个不同水平, 按每个水平各测 6 个样品的回收率计算批内的变异系数; 每个浓度各测 3 批, 计算批间的变异系数, 结果见表 2-1~2-3。

实验结果表明, 方法中氟甲喹在 5ng/g、10ng/g、20ng/g 添加水平的平均回收率在 85%-105%之间。批内变异系数 $<2\%$, 批间变异系数 $<9\%$, 结果重复性好, 回收率高, 方法的准确度和精密度可以满足药残检测的要求。

2.3.4 测定样品结果

采用所建立的方法对市场采集的鲜活虾、蟹、鱼类产品进行了检测。实际样品中氟甲喹在鱼类中有检出, 但没有超标。

2.4 讨论

2.4.1 色谱条件的优化

2.4.1.1 流动相的选择

荧光检测器利用特定波长能有效的检测和定量氟甲喹。利用乙腈和草酸作为流动相比用盐溶液或离子试剂作流动相具有更好的分辨率和峰形^[78]。实验分别考察了由乙腈-水组成的混合物、乙腈-甲醇-水混合物和乙腈-四氢呋喃水混合物三种不同的流动相, 结果发现运用 ACN-THF-0.02 mol/L 的磷酸溶液作为流动相, 10ng/ml 的标准液峰形拖尾严重, 检出限稍高, 并在试验中利用荧光分光光度计测得 10ng/ml 的标准液在激发波长 312nm, 发射波长 369nm 处的荧光值与纯四氢呋喃在此处的荧光值相差很少, 影响了检出限的降低; 利用乙腈甲醇-水混合物作为流动相, 峰形稍差。本试验采用 ACN-0.01mol/L 的草酸作为流动相, 乙腈和草酸都没有荧光值, 可以降低检出限到 2ng/mL。

2.4.1.2 流动相比例的选择

为了缩短分析时间, 我们采用等梯度洗脱, 即乙腈: 0.01%的草酸=35: 65(V/V), 两种物质都能在 9 分钟内被分离。实验研究了乙腈-草酸的比例、草酸的浓度、柱温及流速对峰形及保留时间的影响, 通过对流动相中不同比例的乙腈和草酸进行的研究结果显示, 随着乙腈比例的增加, 两种物质的保留时间降低, 但是乙腈比例增加对荧光响应值没有明显影响(图 2-20)。当乙腈比例增加到 70%时, 峰形明显变差, 当乙腈比例增加到 75%时, 两个峰保留时间很接近, 没法将其分开。本试验还对不同浓度的草酸对荧光值的影响进行了研究, 发现不同浓度的草酸对荧

光值没有明显影响（图 2-21）。

本文考虑到保留时间和峰形及分离度的多重影响，最后确定了乙腈-草酸比例为 35: 65，草酸浓度为 0.01mol/mL，流速为 0.8mL/min，柱温为 35℃。

表 2-1 鳗鱼组织中氟甲喹回收率测定结果 (n=6)

Table 2-1 Recoveries of Flumequine from eel tissue

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定批次 Batch	检测结果 Results ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	批内变异 系数 CV (%) within batches	批间变异 系数 CV (%) among batches
氟甲喹	5	1	3.812	76.24 \pm 0.99	1.33	3.77
		2	4.125	82.50 \pm 1.11	2.52	
		3	3.658	73.16 \pm 1.08	2.02	
	10	1	8.93	89.30 \pm 0.56	3.12	4.71
		2	9.62	69.20 \pm 0.61	4.05	
		3	9.41	94.10 \pm 0.62	2.11	
	20	1	21.93	109.6 \pm 1.22	3.91	5.79
		2	20.89	104.4 \pm 1.19	2.88	
		3	21.01	105.0 \pm 1.25	2.92	

表 2-2 鲤鱼组织中氟甲喹回收率测定结果 (n=6)

Table 2-2 Recoveries of Flumequine from carp tissue

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定批次 Batch	检测结果 Results ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	批内变异 系数 CV (%) within batches	批间变异 系数 CV (%) among batches
氟甲喹	5.0	1	4.24	84.75 \pm 1.24	1.38	4.65
		2	3.99	79.75 \pm 1.36	2.28	
		3	3.87	77.50 \pm 2.01	3.22	
	10.0	1	9.04	90.40 \pm 3.11	2.94	6.19
		2	8.98	89.80 \pm 0.12	1.89	
		3	9.63	96.30 \pm 1.34	2.06	
	20.0	1	15.70	78.5 \pm 1.26	1.17	4.89
		2	14.40	72.00 \pm 0.62	2.11	
		3	14.10	70.50 \pm 0.41	2.77	

表 2-3 虾组织中氟甲喹回收率测定结果 (n=6)

Table 2-3 Recoveries of Flumequine from shrimp

分析物	添加水平	测定批次	检测结果	回收率	批内变异	批间变异
Analyte	Added level	Batch	Results	Recovery (%)	系数 CV	系数 CV
	($\mu\text{g}/\text{kg}$)		($\mu\text{g}/\text{kg}$)		(%) within	(%)
					batches	among
						batches
		1	3.949	78.98 \pm 1.23	1.09	
	5	2	3.162	73.24 \pm 1.31	1.21	6.44
		3	3.213	74.26 \pm 1.27	1.23	
		1	9.63	96.3 \pm 0.76	0.76	
氟甲喹	10	2	10.03	100.3 \pm 0.67	0.67	8.92
		3	11.03	110.3 \pm 1.17	0.79	
		1	19.08	95.40 \pm 0.83	0.87	
	20	2	18.92	94.60 \pm 0.79	0.84	6.41
		3	18.96	94.80 \pm 0.76	0.82	

2.4.2 前处理过程的优化

2.4.2.1 萃取方法和萃取试剂的选择

固相萃取是近些年来常用的前处理提取净化方式^[79-81]。目前针对氟甲喹净化而使用的固相萃取柱主要是 SPE 柱, SPE 柱的填料可以是 C18, C8, C2 或苯乙烯一二乙烯苯共聚物, 但固相萃取需要淋洗及洗脱, 对样品提取液也有一定要求, 本试验选择了成本低、样品处理速度快的液液萃取。试验比较了利用乙酸乙酯、氯仿、二氯甲烷, 乙腈作为提取液的效果。由于氯仿具有比较大的毒性, 一般不采用; 用二氯甲烷提取的方法在离心过程中有悬浮物, 上清液不易提取; 利用乙酸乙酯和乙腈提取回收率相差不大, 但利用乙腈可以直接加正己烷去脂, 简化试验步骤。所以选择乙腈作为提取剂。对鳗鱼肌肉进行不同溶度的氟甲喹(5~20ng/g)的加标回收, 回收率均在 85%~105%之间。

2.4.2.2 定容溶液的选择

本试验比较了氮吹仪浓缩至干后利用流动相、0.01mol/L 的氢氧化钠、0.2%甲酸定容、乙腈: 0.01%草酸 (V/V=1:1) 这四种不同溶剂或比例定容, 过膜, 进样

测其回收率，结果显示利用流动相定容的方法其峰形最好。

2.4.2.3 提取方法的选择

本试验对同一样品同种浓度加标后在四种情况下的回收率进行了分析。分别进行了不均质旋转蒸发至干，均质旋转蒸发至干，不均质氮吹仪浓缩至干和均质氮吹仪浓缩至干四种方法的比较。结果发现，均质比不均质效果好；用旋转蒸发至干比用氮吹仪浓缩至干回收率要好，最终选择了均质后旋转蒸发至干为优化后的提取方法。

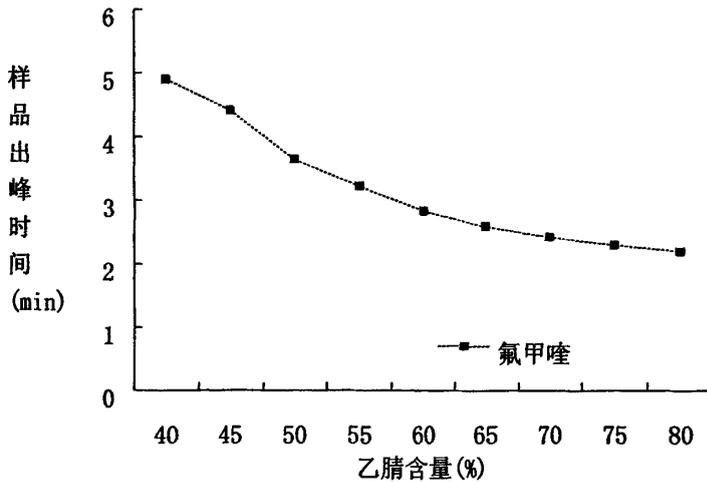


图 2-20 流动相中不同比例的乙腈对保留时间的影响

Fig 2-20 Effects of different proportion of acetonitrile and oxalic acid on retention time

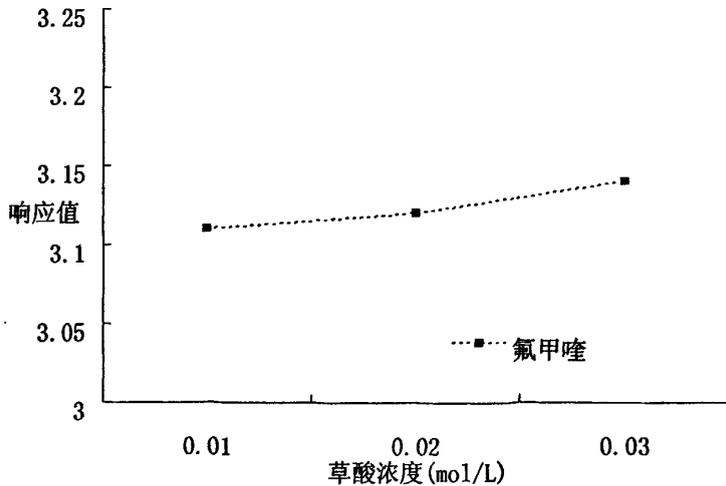


图 2-21 不同浓度草酸对荧光值的影响

Fig 2-21 Effects of different concentrations of oxalic acid on the fluorescence

2.4.3 稳定性研究

氟甲喹无论在碱性环境下还是酸性环境下都具有很好的稳定性。本试验中,样品在室温(20-25℃)或4℃间隔96小时再进样,峰形及面积没有明显影响。

2.5 小结

本实验建立测定鳗鱼中氟甲喹含量的高效液相色谱荧光检测法。氟甲喹在1ng/kg~100ng/kg范围内线性关系良好,氟甲喹的线性相关系数均 ≥ 0.999 。氟甲喹的检测限为2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;氟甲喹的定量限分别为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。方法中氟甲喹在各添加水平的平均回收率在70%~100%之间。批内变异系数 $< 4\%$,批间变异系数 $< 9\%$,结果重复性好,回收率高,该方法操作简便、灵敏度高、重现性好,适合于大批量样品的检测。

3 硝基咪唑类在水产品中的残留检测方法研究

3.1 材料与方法

3.1.1 仪器和设备

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪, 配有 ESI 源。

BP221S 型电子分析天平: 精度 0.0001g, 西德赛多利斯公司;

组织匀浆机 IKA-T18basic: 德国 IKA 公司;

漩涡混合器: 德国 IKA 仪器公司;

KQ-600DE 型数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司;

Milli-Q 超纯水仪: 密理博公司;

高速离心机: 最高转速 4000r/min, 飞鸽牌 TDL-40B;

旋转蒸发器 laborota4000: 德国 Heidolph 公司;

N-EVAP 111 氮吹仪: 美国 Organomation 公司。

3.1.2 材料和试剂

甲硝唑(MTZ)、二甲硝唑(DMZ)和洛哒硝唑(RNZ)标准品 (纯度 \geq 99.5%);

氘代二甲硝唑(DMZ-D3)标准溶液 (100 μ g/mL);

甲醇、甲酸、醋酸铵 (均为色谱纯);

乙酸乙酯、硫酸钠 (均为分析纯);

0.1%甲酸溶液 (含 0.5mmol/L 醋酸铵);

0.5mmol/L K₂HPO₄ 缓冲液 (pH 8.8)。

试验用水符合 GB/T 6682 一级水指标。

标准储备溶液: 1.0mg/mL, 分别称取适量的 MTZ、DMZ 和 RNZ 标准品, 用甲醇定容配成 1.0mg/mL 的标准储备液, 避光-18 $^{\circ}$ C 下保存, 可使用一年。

混标使用液: 准确吸取 MTZ、DMZ 和 RNZ 标准储备溶液, 用流动相逐级稀释配成 1.0 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL 混合溶液, 避光 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 保存期为 3 个月。

内标使用液: 1.0 μ g/mL, 准确吸取 100 μ L DMZ-D3 标准溶液 (100 μ g/mL) 于 10mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 避光 4 $^{\circ}$ C 下保存, 可使用 3 个月。

鲜活虾、蟹、鱼类样品 (市售)。

3.1.3 色谱条件和质谱条件

色谱柱: Hypersil Gold C18(2.1mm \times 150mm, 2.1 μ m);

流动相: A, 0.1%甲酸溶液(含0.5mmol/L醋酸铵); B, 甲醇; 梯度洗脱程序: 0~3.0min 90%A; 3.0~5.5min 90%A~10%A ; 5.5~8.0 min 10%A ; 8.0~8.1min 10%A~90%A, 8.1~10min 90%A;

流速: 0.25mL/min;

进样量: 25 μ L;

柱温: 35 $^{\circ}$ C。

离子化模式: 大气压电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式;

喷雾电压: 4100v;

鞘气压力: 35psi;

辅助气流量: 3L/min;

离子传输毛细管温度: 350 $^{\circ}$ C;

源内碰撞诱导解离电压: 10v;

锥孔电压: 35v;

扫描模式: 选择反应监测 (SRM);

Q1半峰宽: 0.4Da;

Q3半峰宽: 0.4Da;

碰撞气压力: 氩气, 1.5mTorr。

3.2 方法建立

3.2.1 标准曲线的绘制

分别准确移取0.1 μ g/mL混合标准使用溶液0.020mL、0.050mL、0.100mL、0.200mL和1 μ g/mL混合标准使用溶液0.050mL、0.100mL、0.200mL于7个进样瓶中, 再向7个进样瓶中分别加入0.050mL氘代二甲硝唑内标溶液, 用甲醇(甲醇:水=10:90)溶液定容至1mL, 测定。

3.2.2 样品处理

3.2.2.1 制样

取水产品可食部分, 切成不大于0.5cm \times 0.5cm \times 0.5cm的小块, 充分匀浆, 备用。

3.2.2.3 提取

准确称取2.0g样品置于50mL具塞离心管中, 准确加入50 μ L氘代二甲硝唑内标使用液, 于涡旋混合器上快速混合30s, 避光放置10min。加入3.0g无水硫酸钠, 混匀, 再加入8mL乙酸乙酯, 于旋涡振荡器上涡旋提取1min, 超声波提取10min, 以4000r/min离心5min, 取上清液于50mL梨形瓶中。重复上述提取步骤一次, 合并乙

酸乙酯提取液，于35℃水浴旋转蒸发至干。准确加入1.0mL甲醇（甲醇:水= 10:90）溶液涡旋振荡溶解残留物，过0.2μm滤膜到进样瓶中，供液相色谱-质谱仪测定。

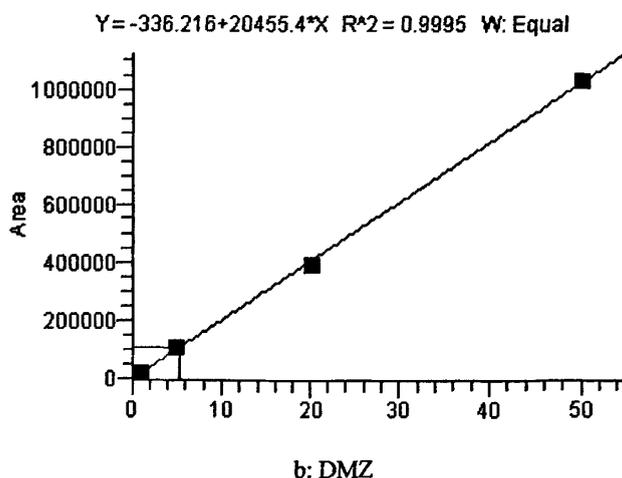
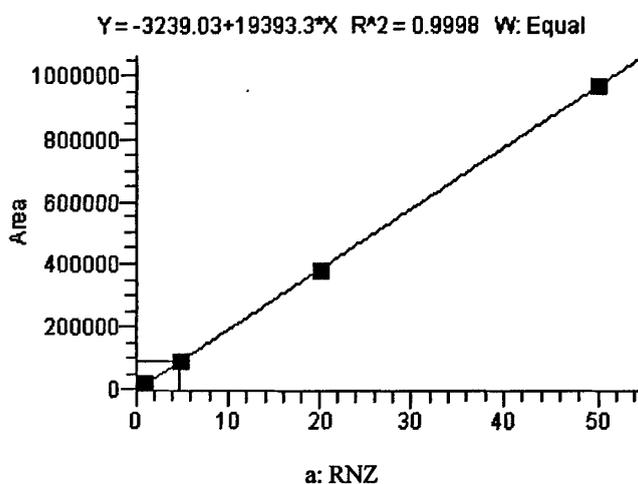
3.2.3 实际样品

鲜活虾、蟹、鱼类样品按 3.2.2 处理。

3.3 结果

3.3.1 标准曲线

配制质量浓度为 1~200ng/mL 的系列标准溶液，以待测物与内标的峰面积比为纵坐标，待测物的质量浓度为横坐标进行线性回归，结果表明，DMZ、RNZ 和 MTZ 的线性相关系数分别为 0.9995，0.9998 和 0.9987。



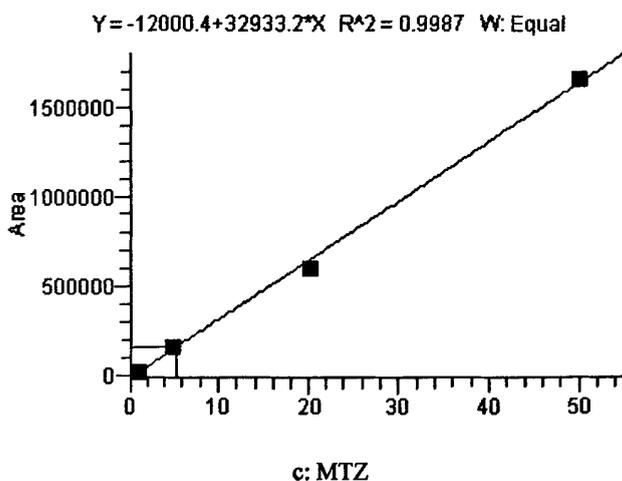


图 3-1 1-100 ng/mL 硝基咪唑类标准曲线

Fig 3-1 Calibration curve of RNZ、DMZ、MTZ at 1-100 ng/mL

3.3.2 检测限和定量限

方法的检测限一般是根据信噪比外推得到。根据实验结果外推，本方法的检测限已经达到极低的数值，而实际上这样低的检测限通常很难实现。方法的定量限是指在保证具有一定可靠性(准确度和精密度)的前提下，分析方法能够测定出的样品中药物的最低浓度。本实验在空白样品中添加硝基咪唑类标准溶液，DMZ 添加水平为 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ，MTZ 和 RNZ 添加水平为 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 时，MTZ、DMZ 和 RNZ 的信噪比(S/N)大于 10，而且方法学数据是可靠的表明 DMZ 定量限可以达到 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ，MTZ 和 RNZ 定量限可以达到 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

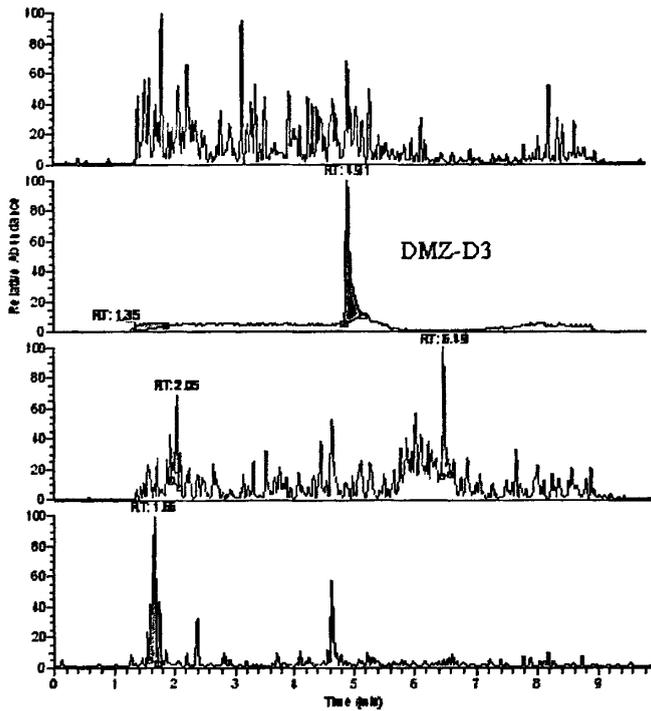


图 3-2 空白鳗鱼样品选择离子流图

Fig 3-2 Chromatograms corresponding to blank eel muscle

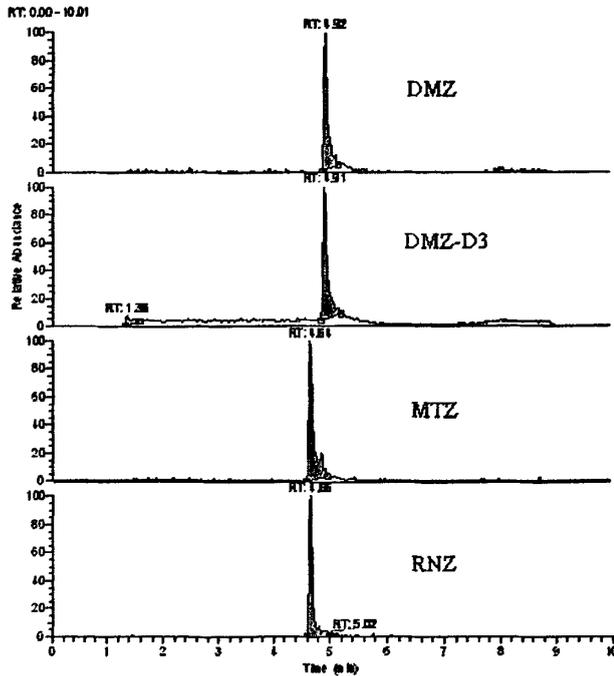
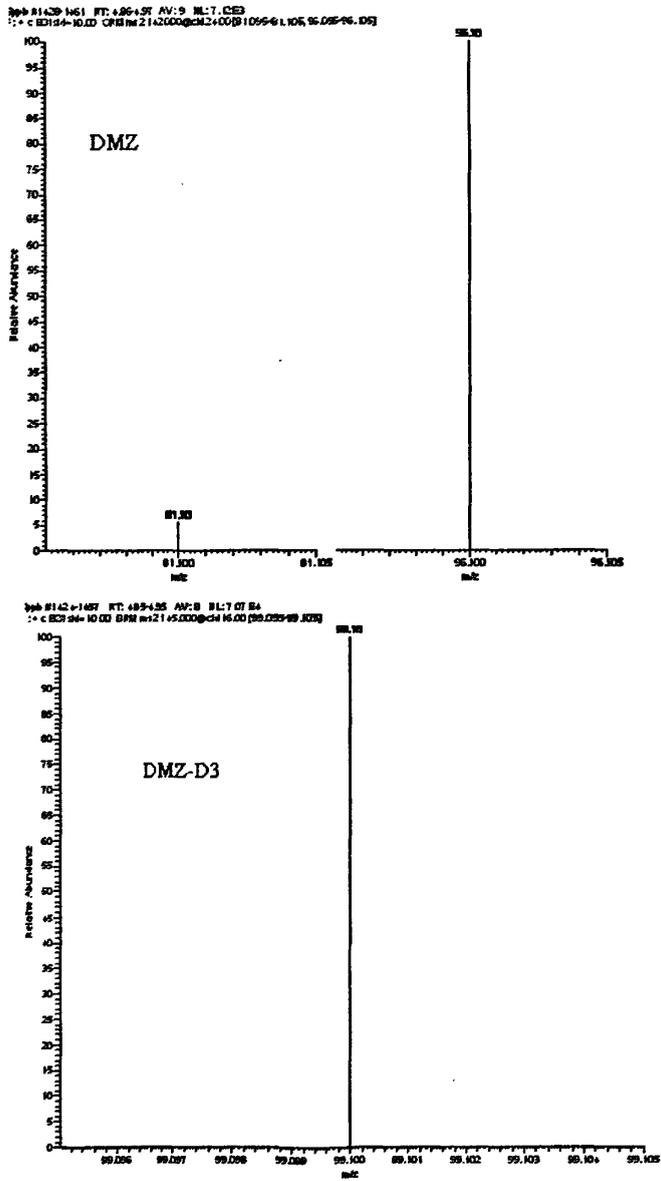


图 3-3 MTZ、DMZ 和 RNZ 混合标准 (2.0ng/mL) 及 DMZ-D3 的选择离子流图

Fig. 3-3 Chromatograms of three Nitroimidazole drugs and internal standard spiked (2.0ng/mL)



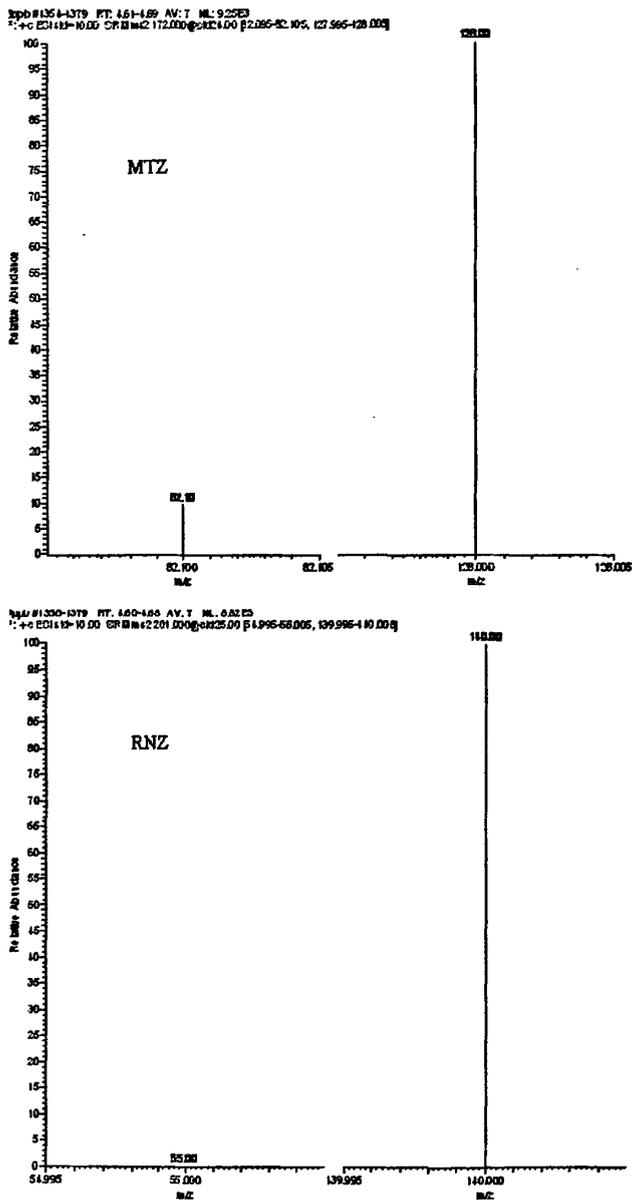


图 3-4 MTZ、DMZ 和 RNZ 混合标准 (2.0 ng/mL) 及 DMZ-D3 的质谱图
 Fig 3-4 Mass chromatograms of MTZ、DMZ 、RNZ and DMZ-D3 (2.0 ng/mL)

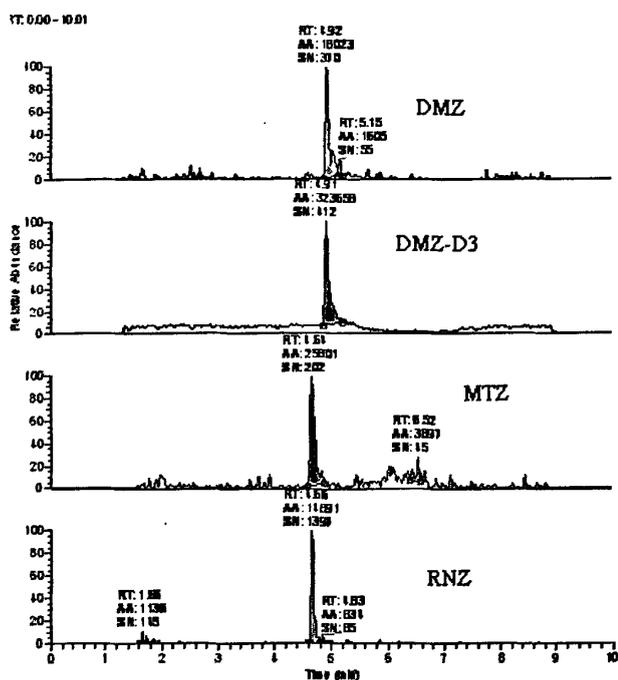


图 3-5 鳗鱼空白样品中添加 MTZ、DMZ、RNZ 和 DMZ-D3 的选择离子流图,添加水平: 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

Fig. 3-5 Chromatograms of three Nitroimidazole drugs and internal standard spiked in eel sample
Spiked level: 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

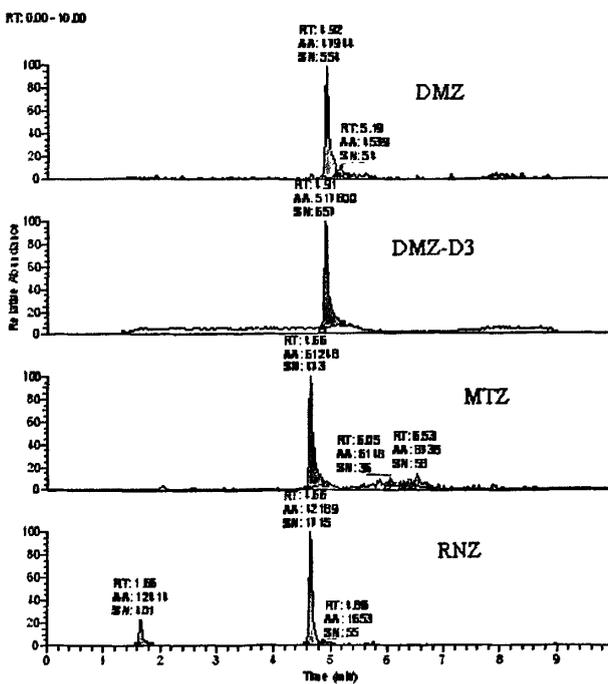


图 3-6 鳗鱼空白样品中添加 MTZ、DMZ、RNZ 和 DMZ-D3 的选择离子流图，添加水平：2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

Fig. 3-6 Chromatograms of three Nitroimidazole drugs and internal standard spiked in eel sample
Spiked level: 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

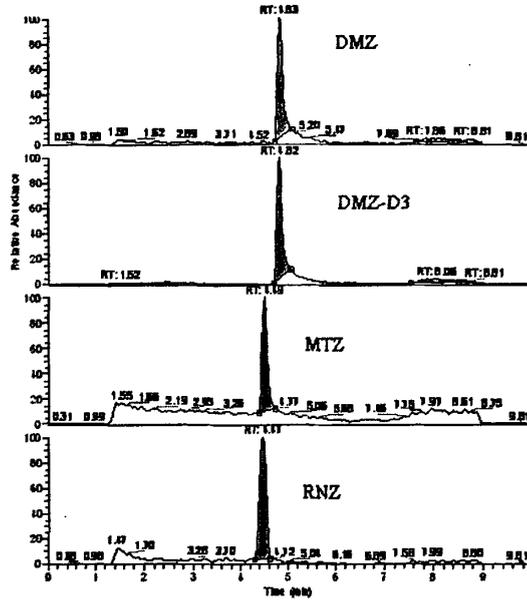


图 3-7 鳢鱼中添加3种硝基咪唑类药物及内标物的离子流图，添加水平：2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

Fig. 3-7 Chromatograms of three Nitroimidazole drugs and internal standard spiked in a ling sample
Spiked level: 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

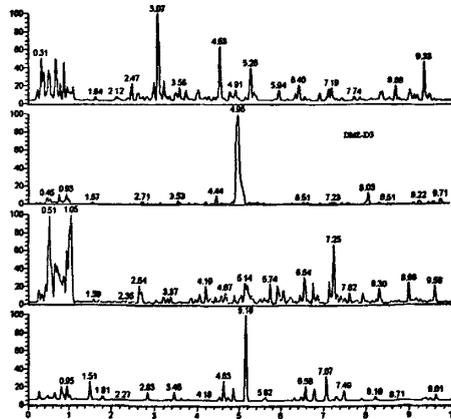


图3-8 空白虾样品选择离子流图

Fig 3-8 Chromatograms corresponding to blank shrimp

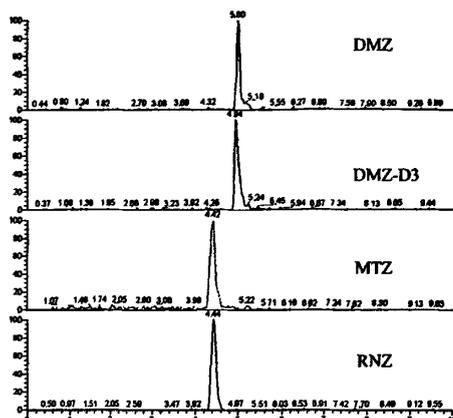


图 3-9 虾中 10.0 µg/kg 添加回收率的选择离子流图

Fig 3-9 Chromatograms corresponding to shrimp spiked at 10.0 ng/mL

3.3.3 回收率及变异系数

选取阴性鳎鱼、鳗鱼和虾样品，添加 3 种硝基咪唑类标准品和内标，考察方法的回收率。每个样品重复测定 6 次，考察方法的精密度，结果见表 3-1~3-3，相应的色谱图见图 3-2~3-9。实验结果表明，方法中 3 种硝基咪唑类在 2.0µg/kg、5.0µg/kg 和 10.0µg/kg 添加水平的平均回收率在 86%-102% 之间，相对标准偏差 < 6%。结果重复性好，回收率高，方法的准确度和精密度可以满足药残检测的要求。

表3-1 鳗鱼加标回收率及变异系数 (n=6)

Table 3-1 Recoveries of DMZ, RNZ and MTZ from spiked eel (n=6)

分析物 Analyte	添加水平 Added level (µg/kg)	检测结果 Detection result (µg/kg)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 相对标准偏差 RSD(%)
DMZ	1.0	0.81	81.00	9.4
	2.0	1.70	85.00	7.06
	10.0	9.59	95.90	5.52
RNZ	1.0	0.79	79.00	10.06
	2.0	1.78	89.00	7.19
	10.0	9.49	94.90	5.53
MTZ	1.0	0.99	99.00	10.19
	2.0	2.02	101.00	8.96
	10.0	9.67	96.70	5.91

表3-2 虾加标回收率及变异系数 (n=6)

Table 3-2 Recoveries of DMZ, RNZ and MTZ from spiked shrimp(n=6)

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测结果 Detection result ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD(%)
DMZ	1.0	0.82	82.0	9.13
	2.0	1.64	82.08	6.8
	10.0	9.59	95.9	4.48
RNZ	1.0	0.81	81.00	10.18
	2.0	1.78	89.25	7.54
	10.0	9.52	95.20	5.96
MTZ	1.0	0.96	96.00	11.62
	2.0	1.94	97.00	7.52
	10.0	9.70	97.00	5.55

表3-3 鳕鱼样品中DMZ、RNZ和MTZ的添加回收率 (n=6)

Table 3-3 Recoveries of DMZ, RNZ and MTZ from spiked ling (n=6)

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测结果 Detection result ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD(%)
DMZ	1.0	0.94	94.0	5.6
	2.0	1.72	86.0	4.9
	10.0	9.87	98.7	2.8
RNZ	1.0	0.97	97.0	3.4
	2.0	1.98	99.0	4.3
	10.0	9.87	98.7	2.1
MTZ	1.0	0.95	95.0	4.6
	2.0	2.04	102.0	4.8
	10.0	9.89	98.9	2.4

3.3.4 定性

DMZ、RNZ和MTZ的定性分别采用m/z96.1和81.1, 140和55, 128 和82.1及其相对丰度比来定性, 基峰与次强碎片离子丰度比应符合表3要求。

表3-4基峰与次强碎片离子丰度比要求

Table 3-4 The require of ion abundance

次强碎片离子相对丰度 The relative abundance of metastable peak %	允许相对偏差 Allowed relative deviation %
> 50	± 20
> 20 ~ 50	± 25
>10 ~ 20	± 30

≤ 10

± 50

3.3.5 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 3-5

表 3-5 种 TCs 类药物的质谱条件

Table 3-5 The mass spectrometry conditions of DMZ, RNZ and MTZ

目标化合物 Analyte	母离子 (m/z) Parent ion	子离子 (m/z) Daughter ion	碰撞能量 (ev) Collision energy
RNZ	201	140*	12
		55	25
DMZ	142	96*	18
		81	24
MTZ	172	128*	17
		82	24
DMZ-D ₃	145	99*	16

3.3.6 实际样品测定

采用所建立的方法对市场采集的鲜活虾、蟹、鱼类产品进行了检测。硝基咪唑类残留均未检出。

3.4 讨论

3.4.1 提取净化条件的研究

3.4.1.1 萃取方式的选择

硝基咪唑类药物的提取一般有两种方式：液-液萃取法和固相萃取法 (SPE)。固相萃取法对样品的净化效果要更好一些，但是步骤繁琐，回收率受操作水平影响较大，且成本高。串联质谱的强抗干扰能力使其对样品的前处理净化依赖性很低。本方法采用液-液萃取法，将前处理过程简单化，且消耗成本降低。

3.4.1.2 提取试剂的选择

文献报道的用于硝基咪唑类药物提取溶剂包括乙酸乙酯、甲醇、乙腈、甲苯、二氯甲烷等有机溶剂^[82-85]。实验发现二氯甲烷和乙酸乙酯对硝基咪唑类药物的提取效果比较高，但二氯甲烷对人体毒性较大，尽量不采用。同时由于硝基咪唑类残留对热有一定的敏感性，在旋转蒸发步骤中过高的水浴温度将导致回收率偏低，因此应尽可能在实验中利用低沸点的有机溶剂，故本方法选择乙酸乙酯作为提取溶剂。

3.4.1.3 提取方式的选择

实验分别考察了涡旋、超声波振荡和涡旋后再超声波振荡三种提取方式。结果表明，涡旋后再超声波振荡提取效果比较好，而且回收率比较稳定，因此本方

法采用涡旋后再超声波振荡的提取方式。

3.4.1.4 挥干温度的选择

实验分别考察了35℃、45℃和55℃三种挥干温度对回收率的影响,结果表明,随着温度的升高DMZ、DMZ-D3的响应降低,RNZ、MTZ的响应值相对稳定。采用45℃和55℃的挥干温度时,RNZ、MTZ均会因内标的响应值较低而导致回收率偏高;采用35℃的挥干温度时,MTZ、DMZ和RNZ的回收率均较好,因此,本方法选择35℃的挥干温度。同时应注意旋转蒸干时不应过度蒸干,而且蒸干后应立即加入定容溶剂,防止硝基咪唑类药物分解。

3.4.2 定容溶液的选择

实验尝试了分别采用A.甲醇、B.甲醇:水(50:50)、C.流动相—甲醇:水(10:90)三种溶液定容,结果发现:A色谱峰完全消失;B色谱峰比较宽;C色谱峰比较好。ESI源是低流速源(流速一般在0.2mL/min左右),主要靠高压、氮气雾化,加热毛细管加热使溶剂汽化,如果流速太大,去溶剂效果不好,离子化效率也不高,会使响应降低。如此低的流速下,进入25 μ L样品会严重改变流动相比例,导致色谱峰变宽,甚至消失。因此本方法选择C.流动相—甲醇:水(10:90)作为定容溶剂。

3.4.3 色谱条件的优化

色谱分离柱采用C18或者C8反相柱皆可,对Thermo Hypersil Gold C18柱和Agilent Extend C18柱的效果进行了评估,发现二者均可实现基质和分析物的较好分离。本实验采用Thermo Hypersil Gold C18柱作为分析柱。

对于流动相中的有机相,分别比较了甲醇和乙腈的影响,结果发现甲醇作为流动相可以更好地提高检测的灵敏度和分离效果。在流动相的水相中加入挥发性电介质醋酸铵、甲酸,可以使离子预先形成,提高离子化效率,在保持较好分离度的前提下获得理想的色谱峰。

3.4.4 质谱条件的优化

DMZ、RNZ和MTZ的分子结构如表1-1所示,用针泵以20 μ L/min的流速注入2 μ g/mL的DMZ、RNZ、MTZ和DMZ-D3混合标准溶液,在m/z 100~300扫描范围内以正离子模式进行一级质谱图扫描,发现这些化合物的[M+1]⁺峰均比较强,一些碎片和加合离子的峰均较弱。确定DMZ、RNZ、MTZ和DMZ-D3的分子离子分别为m/z 142、201、172和145。分别以142、201、172和145作为母离子,进行子离子扫描,选取丰度最强的[M—NO₂+H]⁺m/z 96.1作为DMZ的定量离子,次强的m/z 81.1作为DMZ的定性离子;选取丰度最强的[M—NO₂—CH₃+H]⁺m/z 140作为RNZ的定量离子,次强的m/z 55作为RNZ的定性离子;选取丰度最强的[M—CH=CHOH+H]⁺m/z 128作为MTZ的定量离子,次强的m/z 82.1作为MTZ的定性离子;

m/z145作为DMZ-D3的监测离子。最后以选择反应监测(SRM)正离子模式优化锥孔电压 (Skimmer offset)、碰撞能量 (Collision energy) 等质谱参数。

3.5 小结

本实验建立了同时测定水产品中硝基咪唑类含量的高效液相色谱串联质谱法。3 中硝基咪唑类在 1ng/mL~200ng/mL 范围内线性关系良好, DMZ、RNZ 和 MTZ 的线性相关系数分别为 0.9991, 0.9995 和 0.9993。DMZ、RNZ 和 MTZ 的定量下限分别为 2.0 μ g/kg、1.0 μ g/kg 和 1.0 μ g/kg。方法中 DMZ、RNZ 和 MTZ 在 2 μ g/kg、5 μ g/kg、10 μ g/kg 添加水平的平均回收率在 86%~102% 之间, 相对标准偏差<6%。结果重复性好, 回收率高, 该方法操作简便、灵敏度高、重现性好, 适合于大批量样品的检测。

4 四环素类药物在罗非鱼体内的残留检测方法研究

4.1 材料与方法

4.1.1 仪器和设备

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪, 配有 ESI 源。

BP221S 型电子分析天平: 精度 0.0001g, 西德赛多利斯公司;

组织匀浆机 IKA-T18basic: 德国 IKA 公司;

漩涡混合器: 德国 IKA 仪器公司;

KQ-600DE 型数控超声波清洗器: 昆山市超声仪器有限公司;

Milli-Q 超纯水仪: 密理博公司;

高速离心机: 最高转速 4000r/min, 飞鸽牌 TDL-40B;

旋转蒸发器 laborota4000: 德国 Heidoplh 公司;

N-EVAP 111 氮吹仪: 美国 Organomation 公司。

固相萃取装置

4.1.2 材料和试剂

Oasis HLB 小柱, 60mg/3 mL;

四环素、土霉素、金霉素和强力霉素标准品 (纯度 \geq 99.5%);

甲醇、甲酸、醋酸铵、乙酸乙酯 (均为色谱纯)。

标准储备溶液: 1.0mg/mL, 分别称取适量的土霉素、四环素、金霉素和强力霉素标准品, 用甲醇定容配成 1.0mg/mL 的标准储备液, 避光-18 °C 下保存, 可使用一个月。

混标使用液: 准确吸取土霉素、四环素、金霉素和强力霉素标准储备溶液, 用甲醇逐级稀释配成 1.0 μ g/mL 和 0.1 μ g/mL 混合溶液, 避光 4 °C 冷藏保存。

基质混合标准工作溶液: 根据需要吸取适量土霉素、四环素、金霉素、强力霉素标准混标使用液, 用空白样品提取液稀释成适当浓度的基质混合标准工作溶液, 基质混合标准工作溶液在 4°C 保存, 可使用三天。

MCI 缓冲溶液: 柠檬酸(含 1 个结晶水)12.9g, 磷酸氢二钠 10.9g, 乙二胺四乙酸二钠 37.2g, 加水至 1000mL, 用饱和氢氧化钠调 pH 至 4.0。

鲜活虾、蟹、鱼类。

4.1.3 分析条件

4.1.3.1 色谱条件

色谱柱: MG II C18(2.1mm×150mm, 2.1 μ m);

流动相: A.0.2%甲酸溶液(含 0.5mmol/L 醋酸铵); B.乙腈; 流动相比例:

A:B=7:3; 流速 0.25mL/min;

进样量: 10 μ L;

柱温: 室温。

4.1.3.2 质谱条件

离子化模式: 大气压电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式;

喷雾电压: 4100 v;

鞘气压力: 35psi;

辅助气流量: 3 L/min;

离子传输管温度: 350 $^{\circ}$ C;

源内碰撞诱导解离电压: 10v;

锥孔电压: 35v;

扫描模式: 选择反应监测 (SRM);

Q1 半峰宽: 0.7Da; Q3 半峰宽: 0.7Da;

碰撞气压力: 氩气, 1.5mTorr。

4.2 方法建立

4.2.1 标准曲线的绘制

分别准确移取 0.1 μ g/mL 混合标准使用溶液 0.02mL、0.05mL、0.10mL、0.20mL 和 1.0 μ g/mL 混合标准使用溶液 0.05mL、0.10mL 于 6 个进样瓶中, 用空白样品提取溶液配制 2 μ g/L、5 μ g/L、10 μ g/L、20 μ g/L、50 μ g/L 和 100 μ g/L 的标准溶液, 测定。

4.2.2 样品处理

4.2.2.1 制样

取水产品可食部分, 切成不大于 0.5cm×0.5cm×0.5cm 的小块, 充分匀浆, 备用。

4.2.2.2 提取

准确称取 2.0g 样品置于 50mL 具塞离心管中, 加入 MCI 缓冲溶液 8mL, 于旋涡振荡器上涡旋提取 1min, 超声波提取 10min, 以 10000 r/min 离心 10min, 取上清液于 50mL 梨形瓶中。重复上述提取步骤一次, 合并提取液。

4.2.2.3 过柱

Oasis HLB柱依次用5mL甲醇、5mL水活化，取上述上清液过柱，以3mL/min的速度过固相萃取柱，待上清液完全流出后，用5mL 5%甲醇溶液淋洗，弃去全部流出液。减压抽干5min，最后5mL甲醇：乙酸乙酯=10：90 (V/V)洗脱，洗脱液用氮气吹干(温度不超过50℃)。准确加入1.0mL流动相，涡旋振荡溶解残留物，过0.2μm滤膜到进样瓶中，供液相色谱-质谱仪测定。

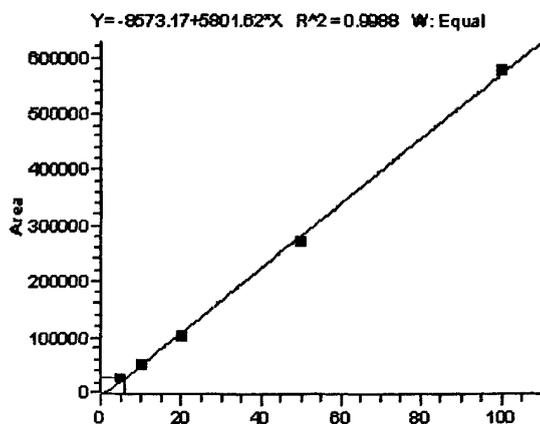
4.2.3 实际样品测定

样品按 4.2.2 处理。

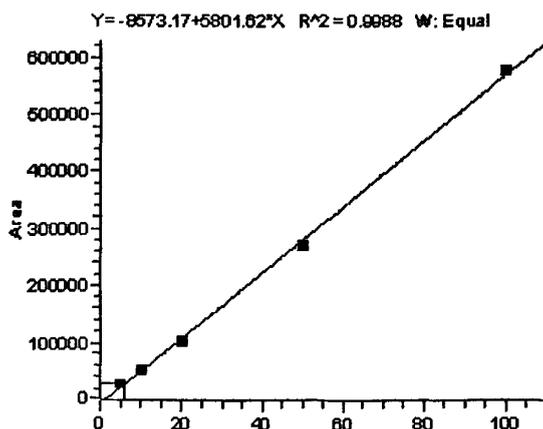
4.3 结果

4.3.1 线性范围

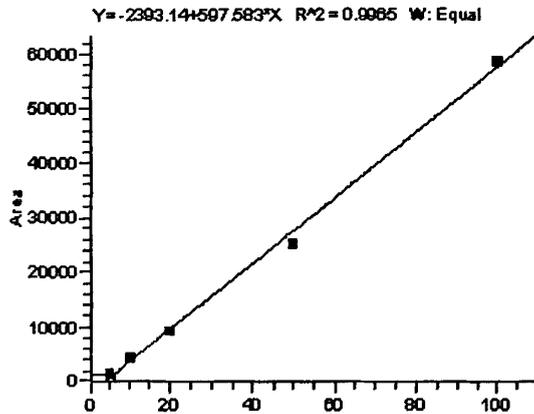
配制质量浓度为 1~100ng/mL 的系列标准溶液，以待测物峰面积比为纵坐标，待测物的质量浓度为横坐标进行线性回归，其线性相关系数见图 4-1。



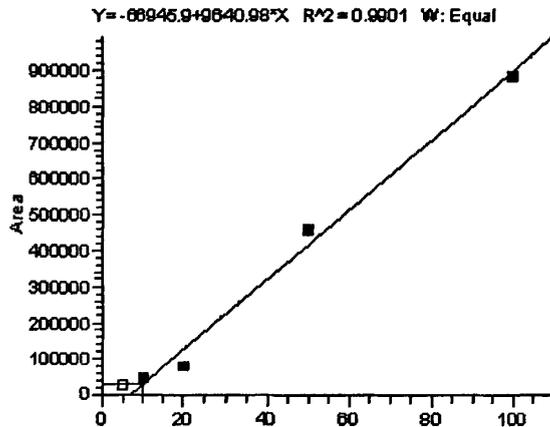
a: TC



b: OTC



c: CTC



d: DC

图 4-1 1-100 ng/mL 四环素类标准曲线

Fig 4-1 Calibration curve of TCs at 1-100 ng/mL

4.3.2 检测限和定量限

本实验在空白样品中添加 TCs 类标准溶液, 添加水平为 1.0 μ g/kg, TCs 的信噪比(S/N)大于 3, 而且方法学数据是可靠的, 表明 TCs 检测限可以达到 1.0 μ g/kg。在空白样品中添加 TCs 类标准溶液, 添加水平为 2.0 μ g/kg, TCs 的信噪比(S/N)大于 10, 表明 TCs 定量限可以达到 2.0 μ g/kg。

4.3.3 回收率和精密度试验

选取罗非鱼样品, 添加 4 种 TCs 类标准品, 添加水平为 5.0 μ g/kg、10.0 μ g/kg 和 20.0 μ g/kg, 考察方法的回收率。每个样品重复测定 6 次, 考察方法的精密度, 结果见表 4-1, 相应的色谱图见图 4-2~4-3。

表 4-1 罗非鱼样品中 TCs 的添加回收率 (n=6)

Table 4-1 Recoveries of TCs from spiked Tilapia (n=6)

分析物 Analyte	添加水平 Added level (µg/kg)	检测结果 Detection result (µg/kg)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD(%)
OTC	5.0	3.73	74.60	5.6
	10.0	8.72	87.20	4.9
	20.0	17.81	89.02	2.8
CTC	5.0	3.86	77.20	3.4
	10.0	8.41	84.10	4.3
	20.0	18.01	90.05	2.1
TC	5.0	5.10	102.0	4.6
	10.0	9.69	96.09	4.8
	20.0	19.89	99.45	2.4
DOC	5.0	3.51	72.20	4.6
	10.0	8.38	83.8	4.8
	20.0	16.32	81.6	2.4

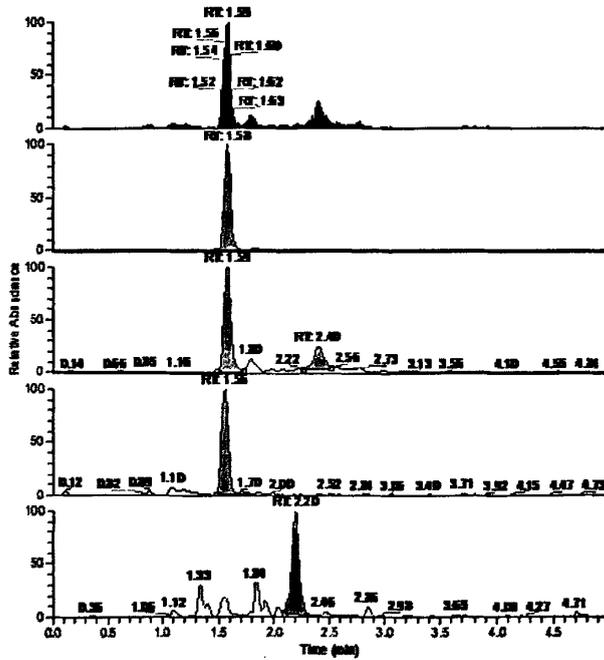


图 4-2 50 ng/mL 标准溶液色谱图

Fig. 4-2 Chromatograms corresponding to 50 ng/mL standard solution

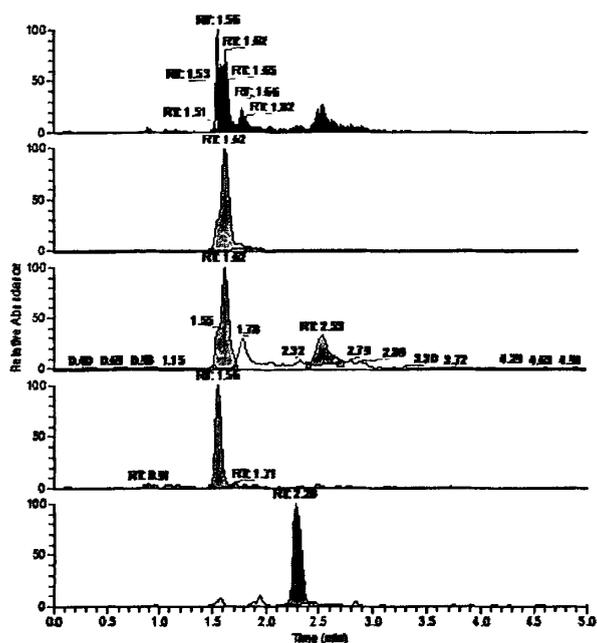


图 4-3 罗非鱼中添加 4 种 TCs 类药物的离子流图, 添加水平: 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Fig. 4-3 Chromatograms of Four TCs drugs spiked in a tilapia sample Spiked level: 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

4.3.4 选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量

选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 4-2

表 4-2 4 种 TCs 类药物的质谱条件

Table 4-2 The mass spectrometry conditions of four TCs drugs

目标化合物 Analyte	母离子 (m/z) Parent ion	子离子 (m/z) Daughter ion	碰撞能量 (ev) Collision energy
OTC	461	426*	18
		443	9
CTC	479	444*	17
		154	24
TC	445	410*	16
		428	15
DOC	445	154*	24
		410	16

4.3.5 测定结果

采用所建立的方法对实际样品进行了检测。鲜活虾、蟹、鱼类产品, 土霉素、四环素残留超标率较高, 土霉素残留超标率虾蟹类为 12.2%, 鲜活鱼为 8.9%; 四环素残留超标率虾蟹类为 9.3%, 鲜活鱼为 8.2%。

4.4 讨论

4.4.1 提取净化条件的研究

4.4.1.1 萃取方式的选择

TCs 类药物提取液的净化多采用固相萃取柱净化, 例如 C18 柱、阴离子交换柱、阳离子交换柱和 HLB 柱等^[86-87]。洗脱液则多用水或甲酸甲醇溶液。本研究比较了 C18 柱、PEP 柱和 HLB 柱的净化效果, 结果发现采用 C18 柱净化, 强力霉素没有保留, 金霉素保留较少; 采用 PEP 柱峰形分叉严重; 采用 HLB 固相萃取柱峰形好, 回收率也比较高, 且较稳定(图 4-4~4-6)。比较了利用不同比例甲酸甲醇溶液以及不同比例甲醇乙酸乙酯溶液为洗脱液效果, 结果显示, 以甲醇: 乙酸乙酯= 10: 90(V/V)为洗脱液, 可以获得较高而相对稳定的回收率, 且便于净化后的浓缩。

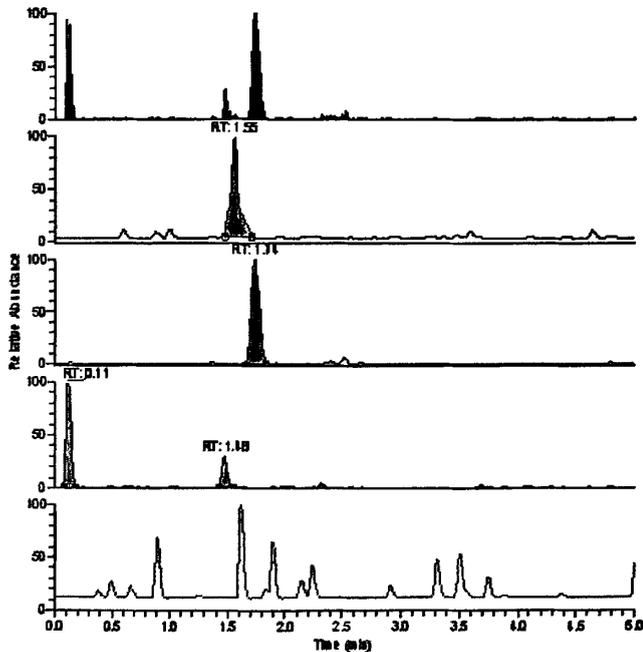


图 4-4 采用 C18 柱净化色谱图

Fig 4-4 Chromatograms of extracted by C18

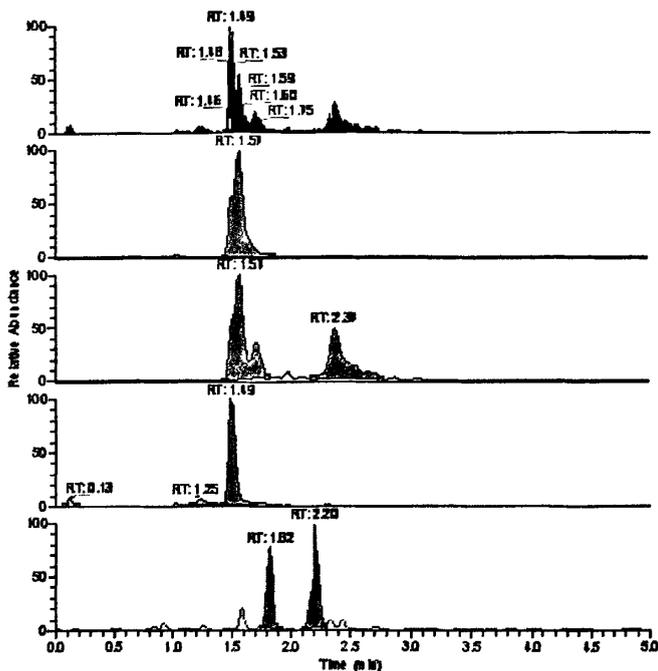


图 4-5 采用 PEP 柱净化色谱图

Fig 4-5 Chromatograms of extracted by PEP

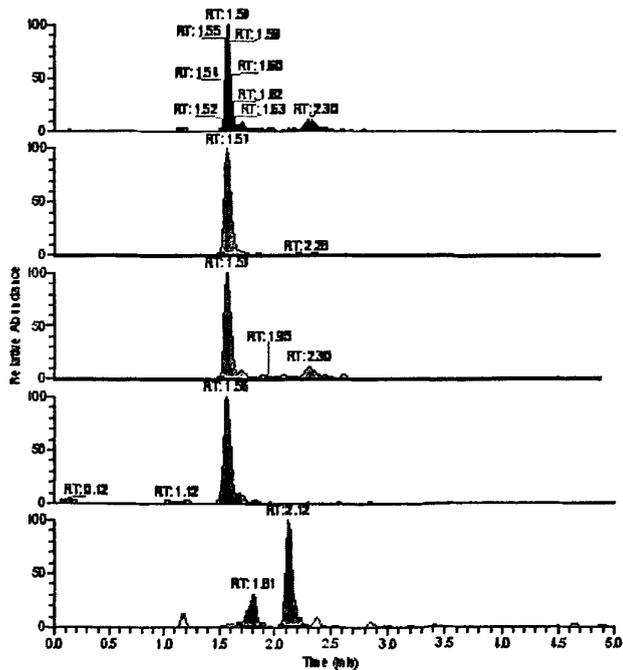


图 4-6 采用 HLB 柱净化色谱图

Fig 4-6 Chromatograms of extracted by HLB

4.4.1.2 提取液的选择

由于 TCs 同金属离子可形成配合物, 又可以与生物样本中的蛋白键合^[88], 所以提取生物样本时往往需加入金属络合剂和强酸或酸性去蛋白试剂, 然而, 在酸性条件下(pH < 2), 四环素类药物易降解为脱水产物, 加热时又可转变为差向异构体。因此, 本研究选用含有 EDTA 的弱酸性溶剂 0.1mol/L 的 Mcllvaine-EDTA 缓冲液作为提取溶剂。分别调节缓冲液 pH 值为 3.0、4.0 和 5.0, 进行添加回收率试验, 从表 4-3 中可以看出, pH 为 3.0 和 5.0 的回收率偏低, pH 为 3.0 的回收率低可能是因为 Mcllvaine-EDTA 缓冲液在 pH 为 3.0 时有结晶现象。pH 为 4.0 的缓冲液的提取效果最佳。

表 4-3 不同 pH 的缓冲溶液提取下罗非鱼加标回收率 (添加水平 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 4-3 Recoveries of TCs from spiked Tilapia with different pH solution(Added level 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

pH	TC	OTC	DOC	CTC
3.0	71.2 %	82.1 %	64.2 %	65.2 %
4.0	83.4 %	83.2 %	78.5 %	88.1 %
5.0	69.8 %	88.8 %	61.8 %	78.5 %

4.4.1.3 定容溶液的选择

实验尝试了分别采用 A.甲醇、B.水、C.流动相三种溶液定容, 结果表明: 用甲醇溶解的样品, 其峰形和灵敏度较差, 但溶液的稳定性较好; 用水溶解的样品其稳定性较差; 用流动相溶解的样品稳定性和检测的灵敏度都比较好。

4.4.1.4 标准溶液的配制

实验初期, 利用流动相直接配制标准溶液, 发现各浓度样品加标回收的回收率均很高, 一般都在 150%~200%之间, 并且很稳定。考虑到可能是样品基质的影响比较大, 利用空白样品提取液配制标准溶液, 结果回收率都在 70%~100%之间。所以试验最终选用了基质加标配置标准工作溶液。

4.4.2 色谱条件的优化

色谱分离柱一般采用 C18 反相柱, 对 Thermo Hypersil Gold C18 柱、Agilent Extend C18 柱和 MG II C18 的效果进行了评估, 结果发现: Thermo Hypersil Gold C18 柱和 Agilent Extend C18 柱作为 TCs 的色谱分离柱时, 分离度效果不好、保留时间不稳, 而采用 MG II C18 时各 TCs 均获得良好的分离效果 and 对称的峰形(图 4-7~4-9)。因此本实验选择的高纯硅胶基制备并经端基封闭处理的 MG II C18 柱, 可满足检测的要求。

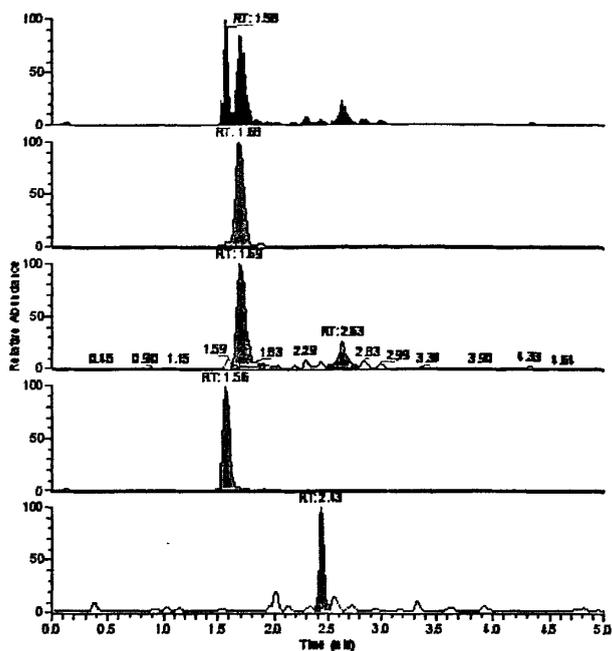


图 4-7 MG II C18 为色谱柱的色谱图

Fig 4-7 Chromatograms corresponding to MG II C18 as column

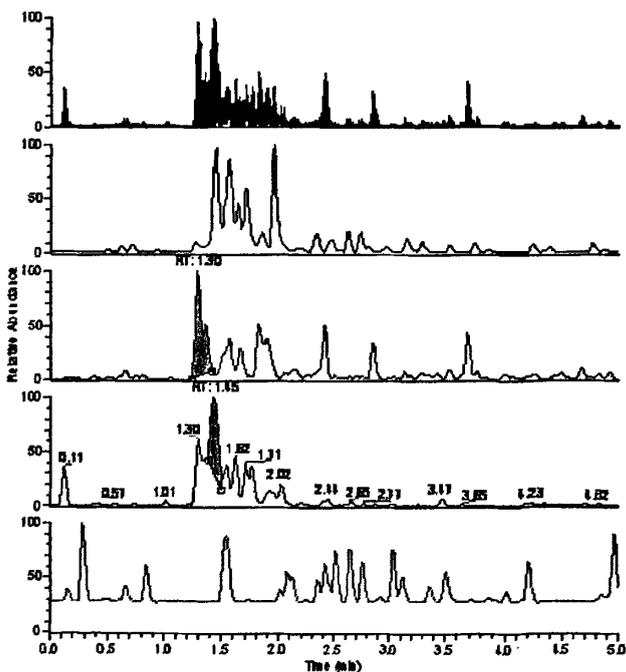


图 4-8 Agilent Extend C18 为色谱柱的色谱图

Fig 4-8 Chromatograms corresponding to Agilent Extend C18 as column

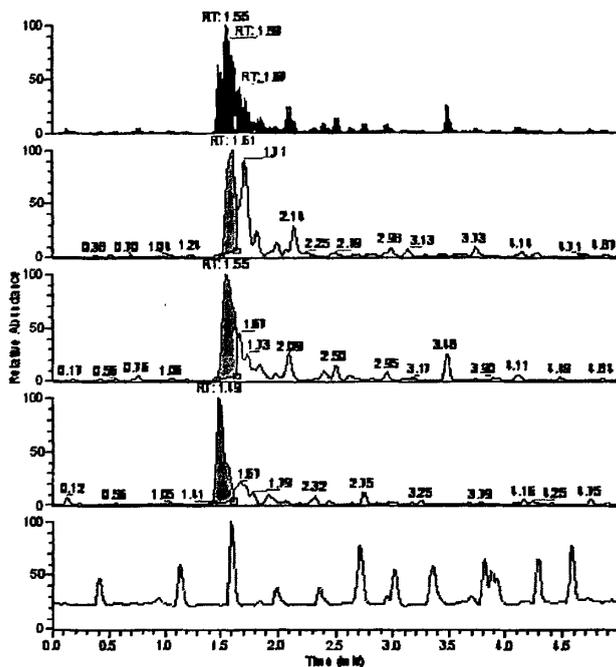


图 4-9 Thermo Hypersil Gold C18 为色谱柱的色谱图

Fig 4-9 Chromatograms corresponding to Thermo Hypersil Gold C18 as column

对于流动相中的有机相，一般采用甲醇和乙腈，由于采用电喷雾模式，而电离机理中一个重要的过程为去溶剂化，乙腈比甲醇更易气化，故选择乙腈为流动相中的有机相。在流动相的水相中加入挥发性电介质醋酸铵、甲酸，可以使离子预先形成，提高离子化效率，在保持较好分离度的前提下获得理想的色谱峰。对于甲酸的最适浓度，分别比较了 0.1%、0.2% 和 0.3% 的甲酸溶液的影响，结果发现甲酸浓度为 0.1% 时，在相同浓度下 TC 没有响应值；0.2% 的甲酸溶液可以更好地提高检测的灵敏度和分离效果；甲酸浓度为 0.3% 时，CTC 没有响应值（见图 4-10~4-12）。

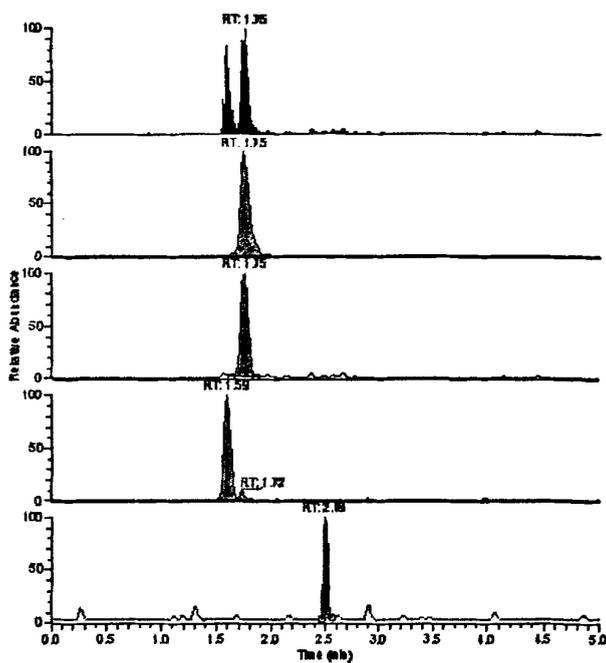


图 4-10 0.1%的甲酸溶液
Fig 4-10 0.1% of Formic acid solution

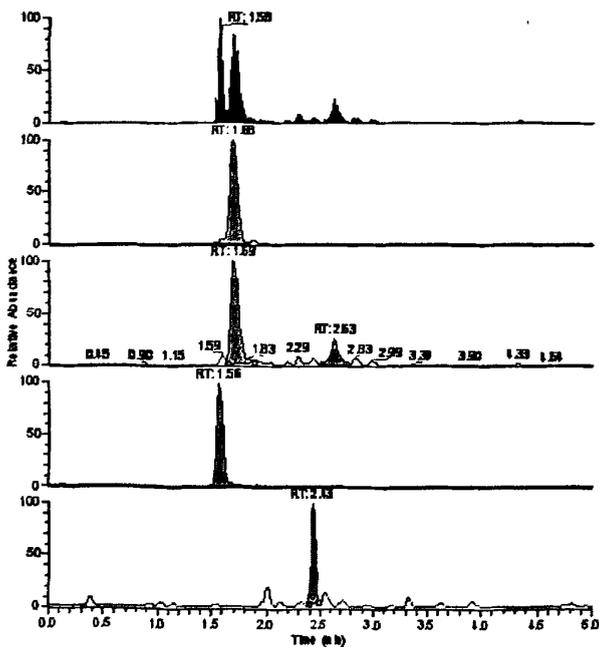


图 4-11 0.2%的甲酸溶液
Fig 4-11 0.2% of Formic acid solution

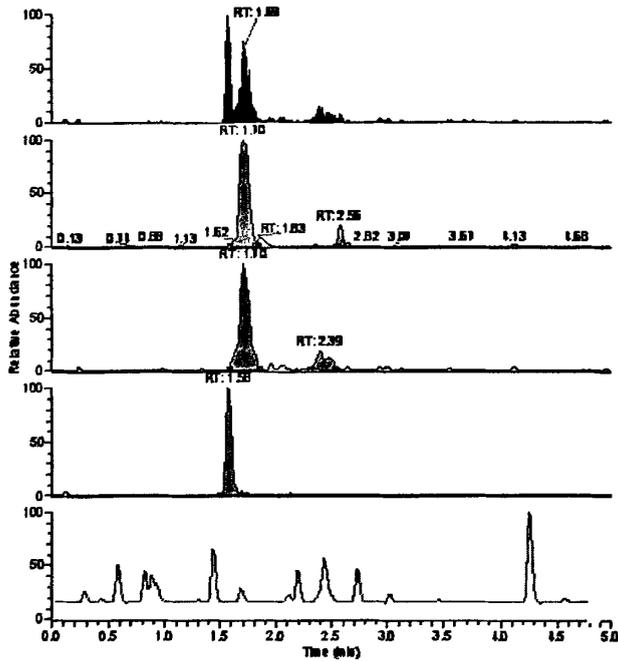


图 4-12 0.3%的甲酸溶液
Fig 4-12 0.3% of Formic acid solution

4.4.3 质谱条件的优化

TCs 是两性物质，分子结构中同时含有酸性基团和碱性基团^[89]，其分子结构如表 0-2 所示，用针泵以 20 μ L/min 的流速注入 2 μ g/mL 的 OTC、CTC、TC 和 DOC 混合标准溶液，电离时会同时产生正负离子，但是实验表明，正离子[M+H]⁺采集到的信号较强，因此以正离子方式(ESI⁺)进行采集。在 m/z100~500 扫描范围内以正离子模式进行一级质谱图扫描，在电喷雾电离方式下，四环素类药物产生的碎片离子主要是[M+H-NH₃]⁺、[M+H-H₂O]⁺和[M+H-NH₃-H₂O]⁺，确定 OTC、CTC、TC 和 DOC 的分子离子分别为 m/z 461、479、445 和 445。分别其作为母离子，进行子离子扫描，选取丰度最强的作为各自的定量离子。最后以选择反应监测(SRM)正离子模式优化锥孔电压 (Skimmer offset)、碰撞能量 (Collision energy) 等质谱参数。

4.5 小结

建立了罗非鱼中四种四环素类残留量的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定方法。首先用 MTC 缓冲液提取罗非鱼中的四环素类残留物，再经 HLB 固相萃取柱净化，采用 LC-MS/MS 选择反应监测(SRM)正离子模式测定，

可一次对罗非鱼中的四环素、土霉素、金霉素和强力霉素进行定性和定量。四种物质定量下限均可达到 $2.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法具有灵敏、准确、简便、快速等优点，适用于水产品中四环素类抗生素多残留的同时确证检测。

结论

本文对水产品中几种药物残留的检测方法进行了研究，获得以下结论：

(1) 改进了氟甲喹在水产品中残留的高效液相色谱荧光检测法，在此基础上，起草了水产品中氟甲喹残留量的高效液相色谱荧光检测法国家标准。

(2) 建立了水产品中硝基咪唑类含量的测定方法。协助起草了水产品中硝基咪唑类残留量的高效液相色谱串联质谱法的国家标准。

(3) 研究了 TCs 在水产品中残留的高效液相色谱串联质谱测定方法，该方法操作简便、灵敏度高、重现性好。

(4) 利用建立的方法对市场采集的实际样品进行了检测，为了解水产品中药物残留现状提供了基础数据。

总之，本论文建立了水产品中氟甲喹残留量的高效液相色谱检测方法及水产品中四环素类和硝基咪唑类残留量的液-质联用检测方法，测定了实际水产样品，为水产品中三类药物的残留检测提供了技术支持和基础数据。

参考文献

- [1] Spoo JW, Riviere JE (1995) In: Adams HR (ed) *Veterinary pharmacology and therapeutics*, 7th edn. Iowa State university Press, Ames, pp 832-833
- [2] Shen JZ, Xie LJ (2000) *Veterinary pharmacology*. China Agricultural university Press, Beijing, pp 162-167
- [3] Ministry of Agriculture of the PR China (2002) 235th bulletin
- [4] FDA (2005) FDA announces final decision about veterinary medicine source. FDA, uSA, 29 July 2005
- [5] 曲志娜, 郭福生, 郑增忍等. 欧盟等国家和地区对动物源性食品中药残的若干规定[J]. 山东畜牧兽医, 2007, 11(25):35-36
- [6] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析. 上海科学技术出版社. 2002, 1
- [7] Shen JY, Kimb MR, Lee CJ, him JH (2004) *Anal Chim Acta* 513:451-455
- [8] Anadon, A. Pharmacokinetics and residues of enrofloxacin in fish[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1995, 56:501-506
- [9] A.Cannavan, G.Kennedy, *Analyst*. 1997, 122:963.
- [10] Xu Shi xin. *Procedural Rule of the Codex Alimentarius*. Bei jing: China Agricultural Science and Technology Press. 2004:169
- [11] Brodfuehrer JI, Priebe S, Guttendorf R (1998) *J Chromatogr B* 709:265-272
- [12] M.J.Sams, P.R.Strutt, K.A.Barnes, A.P.Damant, M.D.Rose, *Analyst*. 1998, 123: 2545.
- [13] Voogd CE. On the mutagtnicity of nitroimidazoles[J]. *Mutat Res*, 1981, 86:243
- [14] Mohindra JK. Increased cells killing by metronidazole and nitrofuranzone of hypoxic compared to aerobic mammalian cells[J]. *Cancer Research*, 1976, 36(3):930
- [15] Toanne H. Toeher reductive activation of nitroheterocyclic compounds[J]. *Gen Pharmac*, 1997, 28(4): 485.
- [16] 唐汉祥. 替硝唑的临床药理研究[J]. *中国新药杂志*, 1997, 6(3):180
- [17] 史宗道. 国产替硝唑片剂的不良反应[J]. *中国新药杂志*, 1999, 8(2): 114
- [18] Turiel E, Bordin G, Rodrguez AR (2003) *J Chromatogr A* 1008:145-155
- [19] 王祖兵. 国内研制开发的又一新型兽用抗菌药-氟甲喹. *兽药市场指南*. 5005.
- [20] Cooper, A.D. In vitro activity of danofloxacin, tylosin and oxytetracycline against my copl asmas of veterinary importance [J]. *Research in Veterinary Science*, 1993, 54: 329-334.
- [21] Shen JZ, Xie LJ. *Veterinary pharmacology*[M], China Agricultural university Press, Beijing, 2000, 162-167.
- [22] Ministry of Agriculture of the PR China 235th bulletin[S], 2002.
- [23] European Commission Regulation 99/508/EEC, 9 March. Off J European Commission L60, 1999, 305.
- [24] Larocque L, Schnurr M, Sved S, etal.. *J Assoc Off Anal Chem*, 74: 608, 1991.
- [25] Lyse Larocque, Mary Schnurr, Stephen Sved, etal. Dtetermination of oxolinic acid residues in salmon muscle tissue by liquid chromatography with fluorecence detection[J]. *J Asso off Anal Chem*, 74(4): 608-611, 1991.
- [26] Brodfuehrer JI, Priebe S, Guttendorf R[J] *Chromatogr B*, 1998, 709:265-272.
- [27] Turiel E, Bordin G, Rodrguez AR[J] *Chromatogr A*, 2003, 1008:145-155.
- [28] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 131-132
- [29] 农业部畜牧兽医局. *中国兽药杂志*, 2003, 37(4): 15
- [30] 冯忠武. 兽药与动物性食品安全[J]. *中国兽药杂志*. 2004, 38(9):1-5.
- [31] Yoshida, Froc P (2000) *J Chromatogr A* 882:63-77
- [32] Takizawa, HernandezF (2006) *J Chromatogr A* 1103:83-93
- [33] Kashida, Yang GX, Chen ZL, Huang XH (2005) *J Chromatogr B* 821:202-209
- [34] Lindberg R, Jarnheimer PA, Olsen B, Johansson M, Tysklind M (2004) *Chemosphere* 57:1479-1488

- [35] L.H.Stanker, Leen Mortier, Els Daeseleire, et al. Development of an ELISA Screening Test for Nitroimidazoles in Egg and Chicken Muscle[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 534(1): 157-162.
- [36] J.polzer, Karp BE. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med Mal Infect*, 2004, 34(11):514-521
- [37] Fodey.T.L, Abjean J.P. High-performance Thin-layer Chromatographic Method for the Fluorescence Detection of Three Nitroimidazole Residues in Swine and Poultry Tissue[J]. *J Chro A*, 1996, 737(2): 343 -46.
- [38] Huet.A.C. Della W M Sin, Wong K M, et al. Determination of Dimetridazole and Metronidazole in Poultry and Porcine Tissues by Gas Chromatography—electron Capture Negative Ionization Mass Spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530(6): 23-31
- [39] De Wasch K, Okerman L, Croubels S, et al. Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chickmeat: correlation between results of screening and confirmatory tests[J]. *The Analyst*, 1998, 123(12): 2737-2741
- [40] Lee H J, Le M H, Ryu P D, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening the plasma residues of tetracycline antibiotics in pigs [R]. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 2001.63(5): 553-556
- [41] 沈洪刚, 程玲玲, 方智, 等. 酶联免疫法快速测定猪肉中四环素族残留量[J]. *检验检疫科学*, 2000, 10(2):42-43
- [42] Harrv Bjrkuna. Analysis of oxolinic acid in fish by high-performance Liquid chromatography[J]. *Journal of chromatography*, 530: 75-82, 1990.
- [43] Brodfuehrer JI, Priebe S, Guttendorf R(1998) *J Chromatogr B* 709:265-272
- [44] Announcement of Ministry of Agriculture of the People's Republic of China: No.560
- [45] 王建华, 林黎明, 崔鹤. 液相色谱紫外法测定鸡肉中三种硝基咪唑残留量[J]. *化学分析计量*, 2000, 9(4): 9-10.
- [46] 艾霞, 王大菊, 张丛兰, 等. 高效液相色谱法检测草鱼可食用组织中甲硝唑的残留[J]. *天津农学院学报*, 2005, 12(2): 10-14.
- [47] 张雨梅, 谢恺舟, 曹永忠, 等. 二甲硝咪唑及其代谢物在猪体内的消除规律[J]. *中国兽医学报*, 2001, 03:35
- [48] 谢恺舟; 张雨梅; 曹永忠, 等. 二甲硝咪唑在肉鸡组织中残留的研究[J]. *江苏农业研究*, 2000, 04:2
- [49] 沈建忠. 动物性食品中硝基咪唑类药物残留的检测方法. *毒理学杂志*. 2005, 9(19)
- [50] 沈建忠, 项新华, 张跃等. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留高效液相色谱检测法研究[J]. *中国农业科学*, 2003, 36(6): 700-703.
- [51] 汪纪仓, 高小龙. 高效液相色谱法检测鸡肌肉组织中地美硝唑及其羟基代谢物. *黑龙江畜牧兽*. 2006, 12, 76:7
- [52] 黄志勇, 蔡洪基, 黄高凌, 等. 水产品中四环素类抗生素残留量的高效液相色谱测定方法[J]. *福建分析测试*, 2005, 14(1):2093-2095
- [53] ueno R, Sangrungruang K, Miyakawa M. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography [J]. *Food Research International*. 1999, 32 (9): 629-633
- [54] Naoto Furuawa, Froc P (2000) *J Chromatogr A* 882:63-77
- [55] 庞国芳, 曹彦忠, 张进杰等. 高效液相色谱法同时测定禽肉中土霉素、四环素、金霉素、强力霉素残留的研究[J]. *分析测试学报*, 2005, 24(4):61-63
- [56] 安清聪, 张曦, 李琦华. 动物组织中四环素类抗生素残留的HPLC检测研究[J]. *动物医学进展*, 2005, 26(6):92-94
- [57] M.J.Sams, Delepine B, Laurentie M. Determination of Four Nitroimidazole Residues in Poultry Meat by Liquid Chromatography-mass Spectrometry[J]. *J Chro A*, 2000, 882(1/2): 8-98.
- [58] A.Cannavan, Leadbetter M G, Barnes C J, et al. Identification of Dimetridazole, Iprnidazole, and Their Alcohol Metabolites in Turkey by Thermospry Tandem Mass Spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, (40): 439-443.

- [59] D.H.Pessel, Robert J McCracken, Audrey S Haggan, et al. Confirmatory assay for the determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 1997, 692(2): 351-360.
- [60] 王海, 刘素英. 高效液相色谱-质谱法测定猪组织中硝基咪唑类药物残留量. *中国兽药杂志*. 2005, 39(12):8-11
- [61] 杨成对, 宋莉晖. 家禽肌肉组织中硝基咪唑类药物残留的液相色谱串联质谱测定. *分析测试学报*. 2006, 25(4):101-103
- [62] 吴美香, 李焕德. 高效液相-质谱法检测中成药中掺加化学药物的研究. *中国医院药学杂志*. 2007, 27(4):444-447
- [63] Capitan-Vallvey, Ciranni E, Alimenti R, et al. Development of a simple liquid chromatographic method with uV and mass spectrometric detection for the separation of substances related to amoxicillin sodium[J]. *J Chromatogr A*, 1998, 797(2):311-316.
- [64] Hurtaud-Pessel, Clarke P, Shearer G. Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 1999, 729(1): 127-138
- [65] Daeseleire E, Edward K Chess, Sean Brynjelsen, et al. Collisionally activated of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and their application in the identification of a new compound in tobramycin samples[J]. *J Am Soc. Mass Spectrom*, 2000, 11(3): 200-209.
- [66] 高新, 王旭. 动物性食品中硝基咪唑类药物残留的检测方法. *毒理学杂志*. 2005, 9(19)
- [67] Marc C, Mario S, Siska C, et al. Quantitative multiresidue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electro spray ionization mass spectrometry [J]. *Analytica Chimica Acta*. 2003, 492(1-2):199-213
- [68] 蒋宏健, 袁汉成. 痕量四环素类药物残余物液质联用分析及鉴定[J]. *现代仪器*, 2002, (1):35-36
- [69] J.H.Wang, Sherwood L. Antimicrobial use in feed—time to stop. *New England Journal of Medicine*. 2001, 16(345):1202 Newkirk
- [70] Newkirk, Harvey R B, Farrington L A, Nisbet D J. Evaluation of subtherapeutic use of the antibiotics apramycin and carbadox on the prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella* infection in swine. *Journal of Food Protection*. 2001, 64 (12) :2067-2070
- [71] Polzer J. Regulation of antibiotic resistance in the uS. *AgBioForum*. 2000, 3 (2/3):141-147
- [72] Morris D.K, Rossiter S, Stamey K, Joyce K, Barrett TJ, Tollefson LK, Angulo FJ. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) for enteric bacteria, 1996-1999: surveillance for action. *J Am Vet Med Assoc*. 2000, 15:1829-1830
- [73] Gaugain A R, Hsieh L C, Malbrough M S, et al. Matrix solid-phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk[J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1990, 73(3): 379-384
- [74] 林修光, 寇运同, 贾臻等. 用标准纸片法快速测定鸡肉中四环素族残留量[J]. *口岸卫生控制*, 2001, 6(3):19-20
- [75] 戴栗洁. 土霉素生物检定条件的改进[J]. *锦州医学院学报*, 2001, 22(5):34
- [76] 钱英. 薄层色谱法测家禽肌肉组织中的四环素和土霉素[J]. *职业与健康*, 2000, 16(12):37
- [77] 张兰, 林子倦, 谢增鸿. 毛细管电泳用于水产品中五种抗生素的同时测定[J]. *分析测试技术与仪器*, 2004, 10(1):18-23
- [78] Renew JE, Huang CH (2004) *J Chromatogr A* 1042:113-121
- [79] Johnston L, Mackay L, Croft M (2002) *J Chromatogr A* 982:97-109
- [80] Toussaint B, Chedin M, Vincent u, Bordin G, Rodriguez AR (2005) *J Chromatogr A* 1088:32-39
- [81] 仲峰, 董琳琳, 汪霞. 噻唑酸、氟甲喹在鱼组织中残留量的检测方法研究[J]. *中国兽药杂志*. 2002. 36(11): 20-22.
- [82] Germain Carignan, Lyse Larocque and Stephen Sved. Assay oxolinic acid residues in salmon muscle by chromatography with fluorescence detection; interlaboratory study[J]. *J Assoc off Anal Chem*. 1991. 74(6): 906-909..

- [83]Renwick A G. Data-derived safety factors for the evaluation of food additives and environmental contaminants. *Food Addit Contam.*1993, 10 (3):275-305
- [84]Lynas L, Currie D, McCaughey WJ, McEvoy JD, Kennedy DG. Contamination of animal feedingstuffs with undeclared antimicrobial additives. *Food Addit Contam.* 1998, 15 (2):162-170
- [85]郭明星.克伦特罗与食品安全. *食品安全.*2002.10:19-23
- [86]陈杖榴主编. *兽医药理学* 第二版.中国农业出版社.2002
- [87]贾薇, 孙璐, 史向国等.液相色谱- 质谱联用法测定牛奶中4种四环素类药物残留[J]. *沈阳药科大学学报*, 2002, 19(2):96-100
- [88]卢运战, 祁克宗, 朱良强等.四环素类药物残留检测方法研究进展[J]. *家禽科学*, 2006, 10: 37-39
- [89]张纯萍, 刘艳华, 门立强等.牛奶中四环素类药物残留的确证方法—液质联用法[J]. *中国兽医学报*, 2005, 11(25) : 649-651

硕士学习期间发表和投稿的论文及科研成果

1. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中的四种四环素类药物残留量,《海洋科学》收录。
2. 高效液相色谱法同时测定鳗鱼中氟甲喹和噁喹酸的残留量,《上海水产大学学报》收录。
3. 起草了水产品中氟甲喹残留量的高效液相色谱荧光检测法国家标准。
4. 协助起草了水产品中硝基咪唑类残留量的高效液相色谱串联质谱法的国家标准。

致 谢

本论文是在王清印研究员、冷凯良副研究员的悉心指导下完成的，在三年的研究生学习期间，两位老师广博的知识、严谨的治学态度、独特的见解和思维方式使我深受教育和启发，感谢两位老师三年来在学业、工作等方面以及生活上无微不至的关心！

在我三年的学习工作期间，我还要特别感谢黄海水产研究所王志杰老师和邢丽红师姐在实验过程中以及论文写作中给予的许多建设性指导意见，为本论文的顺利完成给予了极大的帮助！

感谢质检中心的全体老师和同学所给予的热情帮助和支持，感谢药残实验室的全体老师给予的帮助和支持！

最后衷心的感谢在我研究生阶段给予关心、支持和帮助的人！