

研究报告

加速溶剂萃取 – 高效液相色谱 – 串联质谱法同时检测鱼肉中喹诺酮、磺胺与大环内酯类抗生素

厉文辉¹, 史亚利¹, 高立红², 刘杰民², 蔡亚岐¹

(1 中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2 北京科技大学 土木与环境工程学院, 北京 100083)

摘要: 建立了加速溶剂萃取 (ASE) – 高效液相色谱 – 串联质谱联用法同时检测鱼肉中 22 种抗生素药物残留的分析方法。样品经 ASE 提取, HLB 固相萃取柱净化后进入高效液相色谱 – 串联质谱仪分析。对 ASE 的萃取条件进行优化, 并采用 XTerra MS C₁₈ 柱对药物进行分离, 以甲醇 – 乙腈 (体积比 1 : 1) 为色谱流动相 A, 以 0.3% (体积分数) 甲酸水溶液 (含 0.1% 甲酸铵, pH = 2.9) 为流动相 B。22 种喹诺酮、磺胺和大环内酯类抗生素药物在加标水平为 20–100 μg/L 时的回收率分别为 72% ~ 120% 与 66% ~ 114%, 相对标准偏差 (RSD, n = 5) 分别为 1.9% ~ 16% 与 0.7% ~ 10%, 方法的检出限为 0.02~0.6 μg/kg。结果显示所建立的方法精密度好, 准确度高, 可满足同时对鱼肉样品中多种喹诺酮、磺胺和大环内酯类抗生素残留进行定性及定量分析的要求。

关键词: 加速溶剂萃取; 高效液相色谱 – 串联质谱; 喹诺酮; 磺胺; 大环内酯; 鱼肉

中图分类号: O657.72 TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2010)10-0987-06

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2010.10.001

Simultaneous Determination of Quinolones, Sulfonamides and Macrolides in Fish Samples Using Accelerated Solvent Extraction Followed by High Performance Liquid Chromatography – Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

LI Wen-hui¹, SHI Ya-li¹, GAO Li-hong², LIU Jie-min², CAI Ya-qi¹

(1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China; 2. Civil and Environment Engineering School,

University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract A method for the simultaneous analysis of 22 antibiotics (quinolones, sulfonamides and macrolides) in fish samples was developed. The target compounds were extracted using accelerated solvent extraction (ASE) and purified by solid phase extraction (SPE) using a hydrophilic-lipophilic balanced (HLB) polymer. The ASE conditions were optimized. The optimum ASE conditions were using methanol as the extraction solvent at temperature of 70 °C, pressure of 10.34 MPa and extraction time of 15 min. The eluate was collected and concentrated to 1 mL under a gentle stream of nitrogen gas, and then analyzed by HPLC – ESI/MS/MS under positive electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM) mode. The separation of analytes was carried out on a XTerra MS C₁₈ column with methanol – acetonitrile (1 : 1, by volume) as mobile phase A and 0.3% formic acid (containing 0.1% ammonium formate, pH = 2.9) as mobile phase B. The recoveries of all the compounds from fish muscles at two concentration levels of 20 and 100 μg/L were in the range of 72% – 120% and 66% – 114%, respectively, with the corresponding relative standard deviations (RSD, n =

收稿日期: 2010-06-02 修回日期: 2010-07-13

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (20837003); 国家自然科学基金重大资助项目 (20890111); 国家 973 项目子课题资助项目 (2009CB421605)

第一作者: 厉文辉 (1985-), 男, 山东日照人, 硕士研究生

通讯作者: 蔡亚岐, Tel: 010-62849239, E-mail: caiyaqi@rces.ac.cn

5) of 1.9% – 16% and 0.7% – 10%, respectively. The method detection limits ranged from 0.02 $\mu\text{g/kg}$ to 0.6 $\mu\text{g/kg}$. The method could be applied in the analysis of quinolones, sulfonamides and macrolides in fish muscle samples with good precision and accuracy.

Key words accelerated solvent extraction; high performance liquid chromatography – electrospray ionization; tandem mass spectrometry; quinolone; sulfonamide; macrolide; fish

抗生素是一类具有抵抗细菌、真菌和寄生物活性的天然、半合成或人工合成的物质,作为广谱抗菌药物大量应用于人和动物的感染性疾病治疗,并添加在饲料中作为生长促进剂促进动物的生长发育^[1]。人畜服用的抗生素类药物大多不能被充分吸收利用而随排泄物进入环境,虽然许多抗生素的半衰期较短,但由于其频繁使用而易进入环境,导致形成“假持久性”现象^[2],对人类和环境造成了严重威胁。喹诺酮(Quinolones)、磺胺(Sulfonamides)和大环内酯(Macrolides)类化合物是合成抗菌剂,广泛应用于水产品养殖中。大环内酯类可用于防治呼吸道疾病或在饲料中作促进生长剂,喹诺酮应用于各种感染症的防治,磺胺类是常用的抗菌、抗原虫药物^[3]。与其他常用抗生素相比,这些药物性质更加稳定^[4],但其在动物源性食品中的残留可通过食物链对人体健康构成危害。有调查表明,磺胺药物在人体中长期存在会导致许多细菌对其产生抗药性,且有潜在的致癌性,已被多个国家规定限量或禁止使用;而喹诺酮类药物在美国属水产养殖业的禁用药^[5]。因此监测多种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意义。

加速溶剂萃取法(ASE)在固体样品中污染物的萃取方面有广泛的应用,其与索氏萃取法、超声波溶剂萃取法相比,具有溶剂用量少、提取时间短和样品提取自动化的优点^[6-7],并已被美国国家环保局收录为处理固体样品的标准方法之一^[8],也有文献推荐采用 ASE 对污泥、底泥和肉类中的抗生素进行萃取^[9-14]。但目前国内外采用 ASE 萃取鱼肉样品中多种抗生素残留的方法还少见报道,因此本文建立了基于 ASE 萃取、固相萃取柱净化的鱼肉中 22 种抗生素残留的高效液相色谱 – 串联质谱联用的分析方法。该方法具有选择性强、灵敏度高、重复性好等优点,对实际鱼肉样品的检出限可达到 0.02~0.6 $\mu\text{g/kg}$ 可满足鱼肉中抗生素类药物残留检测的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

色谱系统: P680 二元梯度泵, UltMate 3000 自动进样器和 Chromleon 6.70 色谱工作站(美国 Dionex 公司),分析柱为 XTerra MS C₁₈ 柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm , 美国 Waters 公司);质谱系统: APB200 三重四极杆串联质谱检测系统(美国 ABI 公司),配有电喷雾离子源(ESI)和 Analyst 1.4.1 工作软件; ASE350 加速溶剂萃取仪(美国 Dionex 公司); Oasis HLB 柱(6 mL/200 mg 美国 Waters 公司); RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); Vortex 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); LGJ-12B 型冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司); CR22G II 高速离心机(日本 Hitachi 公司)。

喹诺酮类标准品: 氧氟沙星(OFL, 纯度 99.9%)、诺氟沙星(NOR, 99.9%)、环丙沙星(CIP, 99.9%)、沙拉沙星(SAR, 95.0%)、氟罗沙星(FLE, 99.9%)、洛美沙星(LOM, 98.0%)、双氟沙星(DF, 98.0%)、恩诺沙星(ENR, 99.9%)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;磺胺类标准品: 磺胺嘧啶(SDZ, 99.7%)、磺胺甲基嘧啶(SMR, 99.9%)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM, 99.4%)、磺胺二甲基异唑(SIA, 99.0%)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM, 99.0%)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司,磺胺噻唑(ST, 99.0%)、磺胺吡啶(SPD, 99.0%)、磺胺甲基异唑(SMX, 99.0%)均购于日本东京化成工业株式会社,磺胺二甲基嘧啶(SDMD, 99.0%)购于美国 Acros Organics 公司。大环内酯类标准品: 红霉素(ERY, 99.1%)、罗红霉素(ROX, 不小于 90.0%)、交沙霉素(JOS, 不小于 98.0%)、酒石酸泰乐菌素(TYL, 82.4%)、螺旋霉素(SPI, 88.9%)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司。

替代物标准品: 诺氟沙星-d₅(NOR-d₅, 99%)、氧氟沙星-d₅(OFL-d₅, 99.9%)、沙拉沙星-d₅(SAR-d₅, 99.9%)均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;磺胺甲基异唑-d₄(SMX-d₄, 99.0%)、磺胺二甲基嘧啶-d₄(SDMD-d₄, 99.0%)、螺旋霉素 I -d₃(SPII -d₃, 98.0%)、红霉素-¹³C₃(ERY-¹³C₃, d₃,

98.0%)均购于加拿大 Toronto Research Chemicals 公司。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司), 50% 氨水、甲酸铵(99%, 美国 Alfa Aesar 公司), 甲酸(98%, 美国 Fluka 公司)。所用水均为 Milli-Q Advantage A10 系统(美国 Millipore 公司)提供的电阻率为 18.2 MΩ · cm(25℃)的超纯水。

1.2 标准溶液的配制

分别称取 25.0 mg 标准品, 用甲醇溶解并定容于 25 mL 棕色容量瓶中, 配制成 1 000 mg/L 的标准储备液, 于 - 20℃下遮光保存。取各标准储备液适量, 用甲醇配制所需浓度的混合标准工作液, 密封于 4℃下保存备用。

1.3 色谱条件与质谱条件

1.3.1 色谱条件 XTerra MS C₁₈ 型色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3.5 μm); 流动相: A 相为甲醇 – 乙腈溶液(体积比 1 : 1), B 相为 0.3% 甲酸水溶液(含 0.1% 甲酸铵, pH = 2.9); 流速: 0.2 mL/min; 进样量: 15 μL; 梯度洗脱条件: 0~ 2 min, 10% A; 2~ 12 min, 10%~ 70% A; 12~ 16 min, 70%~ 100% A, 16~ 19 min, 100% A; 19~ 19.1 min, 100%~ 10% A; 19.1~ 33 min, 10% A。

1.3.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI), 分析物在正离子扫描下以多反应监测(MRM)模式分析。采用针泵进样, 分别进行 Q1 和 Q3 扫描并确定离子对, 进而优化解簇电压 DP 等参数(见表 1)。在选定色谱流动相条件下优化 Gas1、Gas2 和离子喷雾电压等参数, 使信号稳定, 灵敏度最高。优化后的质谱分析条件: 气帘气压力 0.14 MPa, 碰撞气压力 0.02 MPa, 离子喷雾电压 5 000 V, 温度 600℃, 离子源 Gas1: 0.38 MPa, Gas2: 0.45 MPa。

表 1 质谱检测条件
Table 1 Experimental conditions of electrospray tandem mass spectrometry

Analyte	Parent ion <i>m/z</i>	Daughter ion <i>m/z</i>	Decustering potential <i>U/V</i>	Entrance potential <i>U/V</i>	Collision cellent potential <i>U/V</i>	Collision energy <i>E/eV</i>	Collision cell exit potential <i>U/V</i>
Norfloxacin (NOR)	320.1	276.3 302.2*	45, 40	8.0, 8.0	11, 11	23, 28	10, 10
Ciprofloxacin (CIP)	332.1	231.1 314.3*	58, 55	4.5, 5.0	14, 11	49, 28	9.5, 6.0
Difloxacin hydrochloride (DIF)	400.0	299.1 356.2*	60, 60	4.0, 4.0	13, 13	41, 28	12, 13
Enrofloxacin (ENR)	360.0	245.2 316.2*	55, 58	5.0, 5.0	12, 11	39, 28	9.5, 11
Fleroxacin (FLE)	370.0	269.2 326.2*	45, 45	4.5, 4.5	20, 12	34, 27	10, 12
Ofloxacin (OFL)	362.2	261.2 318.2*	55, 55	5.0, 5.0	24, 12	38, 27	10, 11
Lomefloxacin hydrochloride (LOM)	352.0	265.2, 308.2	53, 55	5.0, 4.0	12, 37	34, 32	10, 12
Sarafloxacin hydrochloride (SAR)	386.0	299.2 368.2*	65, 60	4.5, 4.5	13, 14	37, 31	6.5, 7.0
Norfloxacin-d ₅ (NOR-d ₅)	325.3	281.4 307.3*	50, 40	8.5, 7.5	11, 11	23, 27	6.0, 6.5
Ofloxacin-d ₃ (OFL-d ₃)	365.2	261.2 321.2*	55, 55	6.0, 6.0	12, 12	39, 28	10, 11.5
Sarafloxacin-d ₈ (SAR-d ₈)	394.2	350.3 376.2*	60, 59	6.0, 6.0	13, 12	28, 33	12, 14
Sulfathiazole (ST)	256.0	108.0 156.0*	43, 42	4.5, 4.2	10, 10	36, 21	4.5, 4.5
Sulfamethoxazole (SMX)	254.0	156.0, 160.1	45, 47	4.0, 4.5	9, 9	23, 27	5.2, 6.0
Sulfisoxazole (SIA)	268.1	108.0 156.0*	46, 46	4.5, 4.5	12, 9	37, 21	4.5, 5.0
Sulfapyridine (SPD)	250.1	108.0 156.0*	38, 41	7.0, 4.7	11, 9	36, 24	4.5, 5.5
Sulfadimethoxin (SDM)	311.2	108.0 156.1*	55, 57	4.5, 4.0	12, 12	41, 30	4.5, 6.0
Sulfamethazine (SDMD)	279.2	156.0 186.1*	47, 49	4.5, 4.0	9, 10	27, 25	6.0, 6.5
Sulfadiazine (SDZ)	251.1	108.0 156.0*	42, 43	4.3, 3.5	11, 9	35, 23	4.2, 5.0
Sulfamerazine (SMR)	265.2	107.0, 156.0	47, 48	4.5, 5.0	11, 10	37, 24	4.5, 5.5
Sulfanonomethoxine (SMM)	281.2	156.0, 215.1	50, 48	5.0, 5.0	10, 9	26, 25	5.5, 7.0
Sulfamethazine-d ₄ (SDMD-d ₄)	283.1	160.0, 186.0	48, 48	4.5, 4.5	10, 10	28, 26	6.0, 6.5
Sulfamethoxazole-d ₄ (SMX-d ₄)	257.9	112.0 160.0*	44, 44	4.5, 4.5	11, 9	36, 25	4.8, 5.5
Spiramycin (SPI)	843.4	174.1, 318.3	87, 85	10, 9.5	30, 30	50, 42	8.0, 8.0
Josamycin (JS)	828.3	174.2, 229.1	79, 77	10, 10	30, 28	47, 43	7.5, 8.5
Tylosin tartrate (TYL)	916.3	174.0, 772.3	83, 85	10, 9.0	33, 29	55, 43	8.0, 17
Erythromycin A-dihydrate (ERY)	734.3	158.2, 576.3	60, 58	4.8, 4.8	27, 23	41, 28	6.0, 12
Roxithromycin (ROX)	837.4	158.1, 679.4	62, 62	7.0, 6.5	30, 26	48, 30	7.0, 14
Spiramycin I-d ₃ (SPII-d ₃)	846.4	174.1, 432.3	85, 30	10, 4.5	30, 27	52, 18	8.0, 15
Erythromycin- ¹³ C ₄ -d ₃ (ERY- ¹³ C ₄ -d ₄)	738.0	162.1, 580.3	55, 55	5.0, 5.0	25, 23	45, 28	7.0, 12

* quantitative ion

1.4 样品前处理方法

将草鱼等样品去皮、去骨，切碎后匀浆，冷冻干燥处理后，经研钵研磨均匀，低温下密封保存。称取 0.10 g 干鱼样品，加入 1.5 g 硅藻土混合均匀；萃取池（34 mL）底部铺上 1 cm 厚的硅藻土层，将混匀好的样品填入萃取池，并加入 20 ng 替代物；设置萃取条件为压力 10.34 MPa 温度 70 ℃，静态萃取时间 5 min，冲洗溶剂体积为池容积的 60%，氮气吹扫时间 120 s，静态循环 2 次。将萃取池置于 ASE350 上，进行加温加压萃取。收集的萃取液转移至心形瓶，37 ℃ 水浴真空旋转蒸发至不再有馏出物。

向心形瓶中加入 100 mL 超纯水溶解提取物，漩涡振荡后摇匀，以 1 mL/min 流速过 Oasis HLB 小柱（6 mL/200 mg）进行净化。HLB 柱预先用 5 mL 甲醇和 5 mL 水进行活化平衡，柱富集完成后，用 12 mL 超纯水淋洗 HLB 柱，然后在负压下抽干，最后用 6 mL 氨水-甲醇溶液（体积比 5：95）洗脱，洗脱液在 35 ℃ 下氮气浓缩至 1.0 mL 以下，用初始比例流动相定容至 1.0 mL 离心管中，漩涡振荡后以 15 000 r/min 离心 5 min，取上层清液过 0.22 μm 尼龙滤膜后待测。

2 结果与讨论

2.1 样品提取条件的优化

2.1.1 萃取溶剂的选择 动物组织中药物残留的提取，一般采用二氯甲烷、丙酮、甲醇和乙腈等为提取溶剂^[15]。本文分别考察了甲醇与乙腈对鱼样进行提取时的加标回收率。结果表明，以甲醇作为提取溶剂时，各目标物回收率接近 90%，而乙腈的回收率相对偏低。因此，采用甲醇作为萃取溶剂。

2.1.2 萃取温度的影响 在其他萃取条件不变的情况下，选择 50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃ 4 个提取温度进行研究，结果如图 1 所示。图中数据表明，温度是加速溶剂萃取中最重要的参数，提取温度对样品加标回收率的影响很大。当提取温度超过 50 ℃，大部分化合物的加标回收率明显提高，但 80 ℃ 时提取杂质增多，结果重复性差。与 60 ℃、80 ℃ 相比，70 ℃ 时的提取效果较好，除磺胺嘧啶外，样品的加标回收率均在 60%~130% 之间。这可能是由于随着温度的升高，溶剂的粘度下降，从而加强了溶剂浸润基质和溶解目标分析物的能力。加入的热能同时也有助于破坏目标化合物与基质之间的作用力，增强目标分析物从基质表面扩散到溶剂中的能力，从而提高萃取回收率。但随着温度进一步提高，可能促进了部分抗生素的分解^[11]，导致回收率降低，所以选择最佳提取温度为 70 ℃。

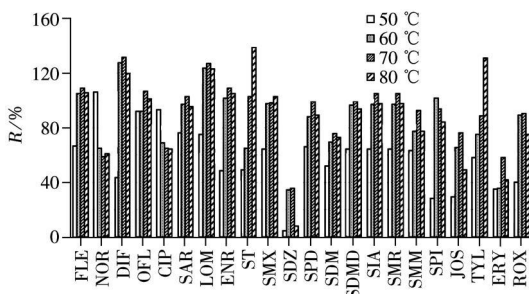


图 1 ASE 萃取温度对抗生素加标回收率的影响
Fig. 1 Effect of extraction temperature in ASE on spiked recovery of antibiotics at 20 μg/L

2.1.3 静态循环次数的优化 在其它萃取条件不变的情况下，选择 3 次循环进行研究。结果表明，磺胺和大环内酯类化合物经过第一次循环几乎萃取完全，而喹诺酮类化合物第二次循环时仍少量存在，第三次循环时接近萃取完全。鱼肉样品的基质穿透性很差，检测到的部分化合物浓度很高，而且喹诺酮类化合物具有很强的吸附作用^[16]，采用多次静态循环对提高化合物的萃取回收率非常有效。因此选用两个静态循环萃取样品。

2.2 固相萃取条件优化

2.2.1 固相萃取柱的选择 本文采用美国 Waters 公司的 Oasis 系列固相萃取柱。HLB 柱填充的是亲水、亲脂平衡的水可浸润型的反相吸附剂，是一种可适用于酸性、中性及碱性化合物的通用型萃取柱；WAX 萃取柱填充的是混合型弱阴离子反相吸附剂，对强酸性化合物具有高选择性。喹诺酮类药物是两性化合物，磺胺类药物在结构中含有 $-NH_2$ ^[5]，大环内酯类药物具有偏碱性，根据目标化合物的化学性质，分别考察了 HLB 柱和 WAX 柱对 22 种抗生素的萃取效果。研究结果发现，HLB 柱对目标化合物的萃取效率较高。因此，本文采用 HLB 固相萃取柱对样品进行富集和净化。

2.2.2 洗脱液的选择 分别采用甲醇和氨水-甲醇（5：95）溶液为洗脱液进行研究。结果发现，采用

氨水 – 甲醇 (5 : 95) 为洗脱液时, 3 类抗生素的回收率均在 80% ~ 130% 范围内。而采用甲醇为洗脱液时, 大环内酯类抗生素的回收率较低, 为 65% ~ 80%。因此本文采用氨水 – 甲醇 (5 : 95) 溶液进行洗脱。

2.3 方法的线性范围与检出限

在优化的色谱和质谱条件下, 22 种抗生素混合标准可以较好地分离。标准色谱图见图 2。
对一系列浓度的混合标准溶液进行分析, 以内标法定量, 各分析物的线性范围及相关系数等参数见表 2。结果表明, 该方法在较宽范围内具有良好线性, 仪器检出限 (LOD, $S/N = 3$) 为 0.002~ 0.06 $\mu\text{g/L}$, 由于样品均称取 0.1 g 所以该方法对实际样品中目标化合物的检出限为 0.02~ 0.6 $\mu\text{g/kg}$

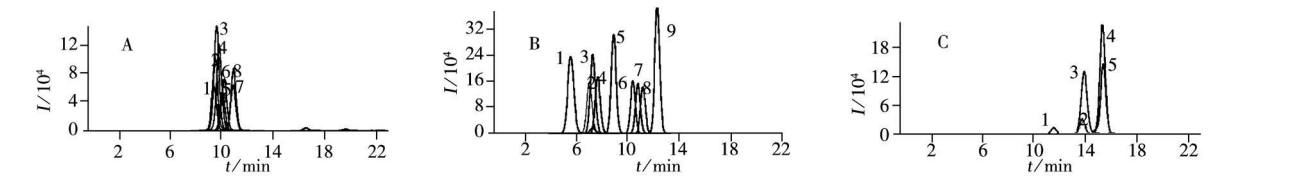


图 2 8 种喹诺酮类 (A)、9 种磺胺类 (B) 和 5 种大环内酯类 (C) 的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of 8 quinolones (A), 9 sulfonamides (B) and 5 macrolides standard (C)
A: 1 FLE, 2 OFL, 3. NOR, 4 CIP, 5 LOM, 6 ENR, 7. DIF, 8 SAR; B: 1 SDZ, 2 ST, 3. SPD, 4. SMR, 5. SDMD, 6. SMM, 7. SMX, 8. SIA, 9. SDM; C: 1 SPI, 2. ERY, 3. TYL, 4. JOS, 5. ROX

表 2 22 种抗生素的线性范围、相关系数及加标回收率											
Table 2 Linear ranges, correlation coefficients (r) and spiked recoveries of 22 antibiotics											
$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$											
Analyte	Surrogate	Linear range	r^2	LOD	Background	Added	Found	Recovery	R/%	RSD s_r /%	
NOR	NOR- d_5	0.05~ 500	0.997 4	0.01	1.35	20.0, 100.0	19.5, 83.1	91, 82		16	3.8
CIP	NOR- d_5	0.05~ 500	0.998 7	0.01	0.87	20.0, 100.0	16.5, 73.3	78, 72		12	9.2
DIF	OFL- d_3	0.05~ 200	0.998 5	0.01	— [*]	20.0, 100.0	15.5, 85.2	78, 85		3.7	7.0
ENR	OFL- d_3	0.05~ 200	0.999 0	0.02	0.29	20.0, 100.0	18.1, 88.1	89, 88		10	3.6
FLE	OFL- d_3	0.05~ 500	0.998 4	0.02	0.45	20.0, 100.0	19.7, 94.0	96, 94		8.4	7.1
OFL	OFL- d_3	0.02~ 500	0.998 8	0.01	0.83	20.0, 100.0	19.0, 83.0	91, 82		9.9	3.2
LOM	OFL- d_3	0.1~ 500	0.996 7	0.03	0.42	20.0, 100.0	16.3, 83.0	80, 83		8.9	6.7
SAR	SAR- d_8	0.05~ 500	0.999 2	0.02	0.35	20.0, 100.0	18.7, 90.6	92, 90		4.1	3.3
ST	SMX- d_4	0.05~ 500	0.997 4	0.005	0.017	20.0, 100.0	20.1, 87.3	100, 87		14	10
SMX	SMX- d_4	0.02~ 500	0.999 1	0.005	0.038	20.0, 100.0	19.4, 97.2	97, 97		3.5	1.2
SDZ	SMX- d_4	0.05~ 200	0.998 7	0.005	—	20.0, 100.0	18.6, 96.8	93, 97		3.0	4.2
SPD	SDMD- d_4	0.02~ 500	0.998 5	0.002	—	20.0, 100.0	19.9, 96.7	99, 97		11	9.1
SDM	SDMD- d_4	0.01~ 500	0.999 6	0.002	—	20.0, 100.0	21.7, 114.4	109, 114		3.8	4.6
SDMD	SDMD- d_4	0.05~ 500	0.999 3	0.002	—	20.0, 100.0	20.9, 103.6	105, 104		1.9	3.9
SIA	SDMD- d_4	0.01~ 500	0.998 6	0.002	0.006	20.0, 100.0	24.0, 111.4	120, 111		8.8	3.2
SMR	SDMD- d_4	0.02~ 500	0.997 7	0.004	—	20.0, 100.0	20.7, 109.2	104, 109		7.0	8.2
SMM	SDMD- d_4	0.02~ 500	0.998 5	0.004	—	20.0, 100.0	20.3, 103.0	102, 103		3.7	0.7
SPI	SP11- d_3	0.2~ 500	0.998 0	0.06	0.07	20.0, 100.0	21.3, 106.0	106, 106		3.5	2.1
JOS	SP11- d_3	0.1~ 200	0.993 4	0.01	—	20.0, 100.0	17.1, 74.8	86, 75		6.6	7.0
TYL	SP11- d_3	0.1~ 200	0.993 4	0.03	—	20.0, 100.0	17.1, 65.8	86, 66		8.8	8.1
ERY	ERY- $^{13}\text{C}_4$	0.05~ 500	0.999 2	0.004	0.075	20.0, 100.0	19.0, 96.7	95, 97		4.4	4.4
ROX	SP11- d_3	0.1~ 200	0.990 5	0.01	—	20.0, 100.0	14.4, 91.8	72, 92		8.6	8.0

* no detected

2.4 方法的精密度与准确度

对鱼肉样品进行加标回收实验, 加标水平分别为 20、100 $\mu\text{g/L}$, 平行测定 5 份, 分析结果列于表 2。结果表明, 本文采用的前处理方法对 22 种抗生素的测定具有良好的精密度与准确度。加标水平为 20、100 $\mu\text{g/L}$ 时, 22 种抗生素的加标回收率分别为 72% ~ 120%、66% ~ 114%, 相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.9% ~ 16%、0.7% ~ 10%。

2.5 实际样品的分析

在优化实验条件下, 对农贸市场随机采集的鱼类样品进行检测 (结果见表 3)。结果表明, 喹诺酮

类抗生素在鱼肉中的残留水平较高，尤其是恩诺沙星，可达 36.4 μg/kg 而磺胺类和大环内酯类抗生素的含量较低，仅有 4 种可以检出，其它均低于检出限。

3 结 论

本文采用 ASE 与 HPLC-MS/MS 联用技术，建立了鱼肉中 22 种抗生素类药物残留的分析方法。方法具有较高的灵敏度和选择性。采用本研究中的样品前处理和分析方法，能够实现 对 鱼 肉 样 品 中 喹 诺 酮 类 、 磺 胺 类 和 大 环 内 酯 类 抗 生 素 的 准 确 快 速 测 定 。

表 3 鱼肉样品中的抗生素含量

Table 3 Contents of antibiotics in fish samples w/(μg•kg ⁻¹)					
Analyte	Sample 1	Sample 2	Analyte	Sample 1	Sample 2
FLE	3. 51	1. 20	SPD	1. 47	0. 099
NOR	- *	0. 89	SDM	1. 71	0. 091
DIF	-	0. 77	SDMD	-	-
OFL	-	1. 99	SIA	-	-
CIP	3. 93	1. 02	SMR	-	-
SAR	4. 73	0. 72	SMM	-	-
LOM	3. 41	0. 81	SPI	-	-
ENR	36. 4	2. 85	JOS	-	-
ST	6. 01	3. 22	TYL	-	-
SMX	-	0. 061	ERY	-	-
SDZ	1. 28	0. 042	ROX	-	-

* no detected

参考文献:

[1] KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment——A review - Part I [J]. Chemosphere, 2009, 75(4): 417- 434

[2] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染 [J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243- 250

[3] 陈莹, 陈辉, 林谷园, 林荆, 江滨炜, 吴文凡. 超高效液相色谱串联质谱法对鳗鱼中大环内酯类、喹诺酮类和磺胺类兽药残留量的同时测定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(5): 243, 538- 541.

[4] CHA JM, YANG S, CARLSON KH. Trace determination of β-lactam antibiotics in surface water and urban wastewater using liquid chromatography combined with electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1115(1/2): 46- 57.

[5] 刘正才, 杨方, 李耀平, 余孔捷, 王武军, 叶松生. UPLC- MS/MS 对 鳗 鱼 中 26 种 喹 诺 酮 类 及 磺 胺 类 抗 生 素 药 物 残 留 的 快 速 测 定 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(11): 1171- 1175.

[6] CARABIAS- MARTÍNEZ R, RODRÍGUEZ- GONZALO E, REVILLA- RUÍZ P, HERNÁNDEZ- MÉNDEZ J. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples [J]. J Chromatogr A, 2005, 1089(1/2): 1- 17.

[7] MENDIOLA JA, HERRERO M, CIFUENTES A, IBÁÑEZ E. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications [J]. J Chromatogr A, 2007, 1152(1/2): 234- 246

[8] SANCHEZ- BRUNETE C, MIGUEL E, TADEO JL. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography- mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid [J]. J Chromatogr A, 2007, 1148(2): 219- 227.

[9] JELIĆ A, PETROVIĆ M, BARCELÓ D. Multi residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry [J]. Talanta, 2009, 80(1): 363- 371.

[10] NIETO A, BORRULL F, MARCER M, POCURULL E. Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction [J]. J Chromatogr A, 2007, 1174(1/2): 125- 131.

[11] CARRETERO V, BLASCO C, PICÓ Y. Multi class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography- tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1209(1/2): 162- 173

[12] SILVIA DÍAZ- CRUZ M, JOSÉ LÓPEZ DE ALDA M, BARCELÓ D. Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction- liquid chromatography- tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1130(1): 72- 82

[13] JACOBSEN AM, HALLING- SPØRENSEN B, NGERSLEY F, HANSEN SH. Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography- tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1038(1/2): 157- 170

[14] CAÑADA- CAÑADA F, MUÑOZ DE LA PEÑA A, ESPINOSA- MANSILLA A. Analysis of antibiotics in fish samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395(4): 987- 1008

[15] 吴鹏, 赵新淮. 加速溶剂提取-液相色谱法分析动物组织中的磺胺残留 [J]. 食品科学, 2008, 28(12): 382- 386

[16] MORENO- BONDIM C, MARAZUELA MD, HERRANZ S, RODRÍGUEZ E. An overview of sample preparation procedures for LC- MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2009, 395(4): 921- 946