密级：公开　　中图分类号：TS254

浙江工商大学

硕士学位论文

论文题目：磁性石墨烯固相萃取-HPLC-MS/MS 在水产品药残检测中的应用研究

作者姓名：　秦烨

学科专业：　食品工程

研究方向：　水产品加工与贮藏

指导教师：　卢延斌　副研究员

提交日期：　2016 年 1 月

Dissertation Submitted to Zhejiang Gongshang University for Master's Degree of Engineering

Magnetic graphene solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for determination of residues in aquatic products

Author: Ye Qin

Major: Food Engineering

Supervisor: Prof. Yanbin Lu

Jan. 2016

College of Food Science and Biotechnology,

Zhejiang Gongshang University

Hangzhou, 310035, China

磁性石墨烯固相萃取-HPLC-MS/MS 在水产品药残检测中的应用研究

摘 要

近年来，随着国内水产养殖行业的飞速发展，我国已成为水产品养殖大国、消费大国和世界第一大水产品出口国。然而飞速发展的同时，水产养殖业也出现了一些难以忽视的问题，其中最为严重的就是水产品出现违禁药物超标的安全问题，这极大地打击了人们消费水产品的信心，同时也在一定程度上制约了我国水产品的出口，因此开展水产品中药物残留的检测方法研究刻不容缓。

水产品的基质复杂且用于水产养殖中的药物多样，对其进行残留检测的关键是选择合适的前处理技术。磁性固相萃取（MSPE）最早应用于生物化学和生物医学工程领域，其操作简便快捷，且不需额外的离心或过滤步骤，所以在分析化学领域也逐渐作为一种高效的前处理技术而推广开来。本研究以水产品中三类药残（大环内酯类、磺胺类和喹诺酮类）作为目标化合物、以自制的磁性石墨烯作为吸附剂，将 MSPE 前处理方法应用于水产品的残留检测分析中，并针对不同的目标化合物与样品基质，对 MSPE 前处理方法中影响处理效果的关键因素进行优化，建立了水产品中 3 类药残的 MSPE-HPLC-MS/MS 检测方法。主要研究内容如下。

1. 采用碱性溶液中共沉淀的方法制备了一种磁性固相萃取吸附剂——磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）纳米材料，通过透射电子显微镜对其进行结构表征，并将该磁性固相萃取用于水产品前处理，建立了水产品中大环内酯类抗生素 HPLC-MS/MS 残留检测方法。该方法在 1~150 μg/kg 范围内线性相关系数 R^2>0.995；检出限为 0.41~0.52 μg/kg，定量限为 1.25~1.65 μg/kg；在 10、25、75 μg/kg 三个添加水平下对方法进行回收率和精密度验证实验，其平均回收率为 87.4%~98.2%，日内、日间精密度均小于 8.5%。

2. 采用磁性固相萃取前处理方法和高效液相色谱串联质谱技术，建立了水产品中 5 种磺胺类药物残留 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析方法。在前处理方法中研究并优化了提取溶剂，复溶溶剂，磁性吸附剂用量，萃取时间以及解吸溶剂对鱼肉基质萃取液的萃取净化性能。实验结果显示，用二氯甲烷提取，5 mL 甲苯复溶，20 mg 磁性石墨烯萃取 10 min 并使用甲醇/氨水（98:2, v:v）解吸，效果最佳。该方法在 1~100 μg/kg 范围内线性相关系数 R^2>0.992；检出限为 0.34~0.49 μg/kg，定量限为 1.12~1.47 μg/kg；在 10、25、75 μg/kg 三个添加水平下对方法进行回收率和精密度验证实验平均回收率为 79.2%~101.3%，日内精密度小于 6.2%，日间精密度小于 9.2%。本方法可适用于鱼肉中磺胺类药物的定性、定量分析，具有操作简便高效，高准确度和高灵敏度等优点。

3. 建立了水产品中 12 种喹诺酮类药物的磁性固相萃取-HPLC-MS/MS 多残留定量分析方法。实验比较了基于磁性石墨烯的

固相萃取，石墨烯固相萃取，C18 小柱固相萃取以及多壁碳纳米管固相萃取四种不同的前处理方法，实验结果表明磁性固相萃取方法重现性好，对分析物的回收率有提升作用。该方法在 1~150 μg/kg 浓度范围内相关系数处于 0.991~0.998；检出限为 0.33~0.95 μg/kg，定量限为 1.09~3.14 μg/kg；方法的平均回收率为 68.5%~103.4%、日内精密度小于 6.2%，日间精密度小于 7.8%。该方法适用于水产品种 12 种喹诺酮药物的残留检测，具有简便、高效、快速、准确等优点。

关键词：磁性石墨烯，磁性固相萃取，高效液相色谱-质谱，大环内酯类，磺胺类，喹诺酮类，水产品

Magnetic graphene solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for determination of residues in aquatic products

ABSTRACT

In recent years, with the rapid development of the aquaculture industry, our country has played a important role in aquatic products breeding, consumption and export. There are numerous issues that can't be ignored have emerged at the same time. One of the most serious is safety problems of illegal drugs exceeded in the aquatic products, It has not only greatly hitted the confidence of the people's consumption of aquatic products but also restricted the export of aquatic products in our country. Thus, it is urgent to carry out related research of detection method for drug residues in aquatic products.

Since the complexity of matrices and diversity of aquaculture medication, the key of residue detection is the selection of the appropriate pre-treatment operation. Magnetic solid phase extraction (MSPE) was used in the field of biochemistry and biomedical engineering. It is convenient to operate and no additional centrifugation or filtration step, so in the field of analytical chemistry gradually as an efficient pre-treatment technology and popularized. In this study, three types of

drug residues in aquatic products (Macrolides, Sulfonamides and Quinolones) as the target compound, Homemade magnetic graphene as an adsorbent, the MSPE pre-treatment methods was applied to analysis of residue detection in aquatic products. Considering the different target compounds and the sample matrix, we optimized several critical factor which influence the consequence of pre-treatment and established a MSPE-HPLC-MS/MS detection method for 3 classes drugs residues in aquatic products.

1. With the utilization of alkaline solution, we prepared a magnetic graphene nano-materials (G-Fe3O4) which is used to be a magnetic solid phase extraction sorbents. The study characterized its structure by transmission electron microscopy, also, successfully apply it for the pre-treatment of aquatic products. We established a HPLC-MS/MS detection method for Macrolide antibiotics in aquatic products. There was a good linear relationship (R^2 >0.995) in the range of 1~150 μg/kg; The average recoveries of the method were 87.4%~98.2%. The LOD and LOQ were 0.41~0.52 μg/kg and 1.25~1.65 μg/kg, respectively. The mean values of relative standard deviation of intra- and inter-day were less than 8.5%.

2. Thw study established a MSPE-HPLC-MS/MS method by combing magnetic solid phase extraction and HPLC tandem mass spectrometry technology to detect five kinds of Sulfonamides residues of

aquatic products. The results showed that a high extraction efficiency was obtained in 10min with extraction solvents of dichloromethane, desorption solvents of methanol/aqueous ammonia(98:2, v:v), reconstitution solvents of 5 mL toluene and 20 mg of magnetic graphene. A good linear relationship (R^2>0.992) was obtained in the range of 1~100 μg/kg. The average recoveries of the method were 79.2%~101.3%. The LOD and LOQ for macrolides and lincosamides were in the range of 0.34~0.49 μg/kg and 1.12~1.47 μg/kg, respectively. The mean values of relative standard deviation of intra- and inter-day were less than 6.2% and 9.2%, respectively. The method we developed was efficient to perform quantitative and qualitative analysis for Sulfonamides residues in aquatic products with a simple and efficient operation .

3. The study established a MSPE-HPLC-MS/MS quantitative method for 12 kinds of Quinolones in the aquatic products. We compared 4 kind of pre-treatment about solid phase extraction include magnetic graphene, graphene, C18 cartridge and multi-walled carbon nanotubes, and the results indicated that the magnetic-based solid phase extraction method had a good reproducibility and a high recovery. A good linear relationship (R^2=0.991~0.998) was observed in the range of 1~150 μg/kg. The average recoveries of the method were 68.5%~103.4%. The LOD and LOQ for Quinolones were in the range of 0.33~0.95 μg/kg and 1.09~3.14 μg/kg, respectively. The mean values of relative standard

deviation of intra- and inter-day were less than 6.2% and 7.8%, respectively. The successful practical application of the proposed method to real samples indicated that the developed method is accurate and effective for detection 12 kinds of Quinolones in the aquatic products.

KEYWORDS: MSPE; HPLC-MS/MS; macrolides; sulfonamides; quinolones; aquatic products

目 录

第 1 章 引言.....1
1.1 水产品中几类常见药残概述.....1
1.1.1 大环内酯类抗生素.....1
1.1.2 磺胺类药物.....1
1.1.3 喹诺酮类药物.....2
1.2 食品中药残分析技术.....2
1.2.1 药残分析的样品前处理技术.....2
1.2.2 药残分析的检测技术.....4
1.3 磁性固相萃取.....6
1.3.1 磁性固相萃取的吸附剂.....6
1.3.2 磁性固相萃取方法的应用.....7
1.3.3 磁性固相萃取方法的前景和展望.....8
1.4 研究内容.....9
第 2 章 磁性石墨烯的制备及其在水产品中大环内酯类残留分析中的应用.....10
2.1 试剂与仪器.....10
2.1.1 材料.....10
2.1.2 主要试剂.....11
2.1.3 仪器设备.....11
2.2 实验方法.....12
2.2.1 溶液的配制.....12
2.2.2 磁性石墨烯的制备与表征.....13
2.2.3 样品预处理.....14
2.2.4 磁性固相萃取.....14
2.2.5 色谱条件.....14
2.2.6 质谱条件.....14
2.2.7 标准曲线和工作曲线绘制.....15
2.2.8 检出限与定量限.....15

2.2.9 回收率和精密度实验.....16
2.3 结果与讨论.....16
2.3.1 磁性石墨烯的制备与表征.....16
2.3.2 高效液相色谱条件的优化.....16
2.3.3 质谱条件的优化.....17
2.3.4 磁性石墨烯作为 MSPE 吸附剂的可行性研究.....18
2.3.5 磁性固相萃取条件的优化.....18
2.3.6 与传统固相萃取的对比研究.....22
2.3.7 基质效应.....22
2.3.8 方法学验证.....24
2.4 方法的应用.....26
2.5 小结.....27
第 3 章 鱼肉中 5 种磺胺残留的提取优化及 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析研究28
3.1 试剂与仪器.....28
3.1.1 材料.....28
3.1.2 主要试剂.....29
3.1.3 仪器设备.....29
3.2 实验方法.....30
3.2.1 溶液的配制.....30
3.2.2 样品预处理.....30
3.2.3 磁性固相萃取.....31
3.2.4 色谱条件.....31
3.2.5 质谱条件.....31
3.2.6 标准曲线和工作曲线绘制.....32
3.2.7 检出限与定量限.....32
3.2.8 回收率和精密度实验.....32
3.3 结果与讨论.....33
3.3.1 HPLC-MS/MS 条件的优化.....33
3.3.2 提取与复溶溶剂的优化.....34

3.3.3 磁性固相萃取条件的优化.....36
3.3.4 与传统固相萃取的对比研究.....38
3.3.5 基质效应.....39
3.3.6 方法学验证.....39
3.4 方法的应用.....41
3.5 小结.....42
第 4 章 MSPE-HPLC-MS/MS 同时测定水产品中 12 种喹诺酮类药物的方法研究43
4.1 试剂与仪器.....43
4.1.1 材料.....43
4.1.2 主要试剂.....44
4.1.3 仪器设备.....44
4.2 实验方法.....45
4.2.1 溶液的配制.....45
4.2.2 基质溶液的配制.....45
4.2.3 样品预处理.....46
4.2.4 磁性固相萃取.....46
4.2.5 色谱条件.....46
4.2.6 质谱条件.....46
4.2.7 标准曲线和工作曲线绘制.....47
4.2.8 检出限与定量限.....48
4.2.9 回收率和精密度实验.....48
4.3 结果与讨论.....48
4.3.1 HPLC-MS/MS 条件优化.....48
4.3.2 磁性固相萃取条件的优化.....51
4.3.3 与传统固相萃取的对比研究.....55
4.3.4 基质效应.....56
4.3.5 方法学验证.....57
4.4 方法的应用.....59
4.5 小结.....59

第 5 章 结论和展望.....60
5.1 结论.....60
5.2 创新点.....61
5.3 展望.....61
参考文献.....62
附录一 攻读硕士研究生期间发表的论文.....70
致 谢.....71
独 创 性 声 明.....72

第1章 引言

1.1 水产品中几类常见药残概述

我国已先后成为水产品养殖大国[1]、消费大国[2]和世界第一大水产品出口国[3]。短短几十年实现这种跨越式的发展，也使得水产养殖业出现了某些难以忽视的问题。其中最为严重的就是随着养殖品种和数量的增加，养殖病害的发生变得日趋普遍和严重，所以某些养殖户便片面追求低投入、高回报，滥用误用药物，不但影响了水产品的质量，同时出口后被其他国家查出违禁药物超标，极大损害了中国水产的国际形象[4]。

1.1.1 大环内酯类抗生素

大环内酯类抗生素(Macrolide antibiotics, MALs) 是由 12～16 个碳骨架的大内酯环及胺基和/或配糖体组成的抗生素[5]。对革兰氏阳性、阴性球菌有良好的抗菌作用[6]，多用于细菌感染疾病的治疗[7]。大环内酯类抗生素的抗菌机理是通过与敏感菌的核糖体 50s 亚基结合，从而对转肽酶的催化作用进行抑制，实现对菌体蛋白质合成干扰，其在低浓度下一般表现为抑菌作用，高浓度时则会呈现出杀菌效果[8]。Woodward 在 1957 年对这一类化合物首次命名为"大环内酯"[9]，目前发现的大环内酯类抗生素已达 100 多种[8]，其使用也愈加广泛。大环内酯类抗生素摄入人体后经由肠道吸收，能产生交叉抗药性，长期使用，则会对人体肠道菌群的微生态环境造成破坏，高残留则会对敏感个体造成致敏性和毒性反应。因此大环内酯类药物的最高残留限量（Maximum Residue Limits, MRL）在某些国家均作出了明确的规定。如欧盟和我国规定动物源食品中这类药物的最大残留限量为 40~1500 μg/kg[10]。

1.1.2 磺胺类药物

磺胺类药物（Sulfonamides, SAs）是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称[11]。由于磺胺类药物的抗菌谱广、性质稳定且价格低廉，所以在细菌性感染的预防和治疗上使用广泛[12]。磺胺类药物的抗菌机制是通过对氨基甲苯酸合成二氢叶酸进行竞争性地抑制，造成细菌合成叶酸时缺少二氢叶酸，最终使细菌核蛋白无法成功合成，达到抑制细菌正常生长繁殖的目的[13-14]。自 1932 年磺

胺类药物发现以来，短短八十多年，发现的种类已达上千种，反应出其巨大的使用与开发价值。然而近年来关于磺胺类药物滥用的报道屡见不鲜，使其以各种途径进入人体成为可能，这严重危及到人们的健康甚至生命安全[15]。因此磺胺类药物的最高残留限量在许多国家的食品法规中均作出了明确的规定。如欧盟规定肉类、牛奶和鸡蛋中磺胺类药物的总量的最高残留限量为 100 μg/kg[16]。

1.1.3 喹诺酮类药物

喹诺酮类(Quinolones, QNs)药物亦称为毗啶酮类抗菌药[17]。由于喹诺酮类药物抗菌谱广、低毒高效且价格低廉，故被广泛用于动物的多种感染性疾病的预防和治疗[18-19]。喹诺酮类药物为细菌合成抑制剂，通过抑制 DNA 的复制发挥抑菌和杀菌作用，临床上主要用于尿路感染、烧伤感染等一系列感染性疾病[20]。喹诺酮类药物开发源自 1962 年萘啶酸的发现，尤其是 1978 年诺氟沙星问世以来，至今已开发和正在开发了数以万计的喹诺酮类化合物[17]。然而喹诺酮在动物体内消除缓慢，若使用不当或过量使用会造成动物源性产品中的药物残留，人体摄入后会对中枢神经系统及关节部位造成不良反应等[21-22]。因此我国的法律法规对一些喹诺酮类药物的最高残留限量作出了明确的规定。如我国规定了牛、鸡和猪等动物组织中二氟沙星、达氟沙星、沙拉沙星等喹诺酮类药物的最大残留限量为 10~1900 μg/kg[23]；牛奶中喹诺酮类药物的最大残留限量在 20~100 μg/kg 之间[24]。

1.2 食品中药残分析技术

食品中药物残留监控主要依赖于各种各样的药残分析检测技术。随着世界各国对食品中药残的最高残留限量的规定日益完善和精确，对分析检测技术的要求也越来越高。食品样品检测中需要面对的是可能含有大量的色素、固醇、油脂及其他成分的复杂基质，如果样品的前处理的整个环节不够有效，这些残留下的基质会在最后的仪器分析中严重干扰实验的结果，甚至对仪器本身造成损害。因此，食品中药残分析技术的开发，关键在于合适的样品的前处理过程的研究优化，然后辅以合适的检测技术，从而达成食品中药残分析检测与定量的目的。

1.2.1 药残分析的样品前处理技术

样品前处理是分析检测中十分重要的一环，主要包括提取、分离、净化、浓缩等过程，其主要目的是减弱甚至消除基质干扰，从而减少后续仪器分析过程中

的杂质干扰，提高分析方法灵敏度等[25]。目前药残分析的样品前处理的技术主要有：固相萃取、基质固相分散萃取、加速溶剂萃取、QuEChERS 和凝胶渗透色谱等。

1.2.1.1 固相萃取（Solid Phase Extraction, SPE）

固相萃取（SPE）是液固萃取理论结合液相色谱技术发展起来的一种样品前处理方法[26]，其原理是固体填料对极性不同的物质有不同吸附保留能力，然后通过洗脱液极性的变化洗脱得到目标化合物，最后再将洗脱液浓缩，达到分离与富集目标化合物的目的。目前常用的固相萃取填料主要包括正相、反相和离子交换吸附剂三种[27]。常用于水产品中药物残留检测的 SPE 柱有 C18 硅胶柱[28]、高分子聚合物柱[29]、氧化铝柱[30]、硅藻土柱[31]等等。例如采用 C18 固相萃取柱可以萃取大环内酯类药物[32-33]、四环素类药物[34]、青霉素类药物[35]。

1.2.1.2 基质固相分散萃取（Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD）

基质固相分散萃取(MSPD) 的基本操作是将样品直接与适量反相填料研磨、混匀制成半固态装柱淋洗实现净化[36]。该技术缩减了传统样品前处理中的提取与净化等过程，避免了待测组分的损失[37]，最先采用基质固相分散萃取进行样品前处理是 Barker 教授[38]，其成功实现了动物组织样品中抗生素等药物的提取和净化。可以作为基质固相分散萃取吸附的填料种类多样，使用较为普遍的是 C8 和 C18 键合硅胶两种，均被广泛地应用于动物组织中兽药残留[39]与植物细胞[40]中活性物质的萃取。其净化耗时短，耗费试剂少，适用于自动化分析，这些优势使得该前处理技术有巨大的发展潜力。

1.2.1.3 加速溶剂萃取 （Accelerated Solvent Extraction, ASE）

加速溶剂萃取技术（ASE）是利用有机溶剂萃取固体或半固体样品的前处理方法[41-43]。该方法需要在温度（50~200 ℃）、压力（6.9~20.7 Mpa）下，利用温度升高对目标物质与基质物质的影响从而实现快速萃取的目的。相比于传统的提取方法，加速溶剂萃取法提取样品能够显著提高萃取效率、减少分析时间并降低基质样品中的污染[44-46]。加速溶剂萃取已在环境污染的检测中广泛应用，如 Richter 等[47]采用加速溶剂萃取技术萃取环境样品中的二苯并对二恶英和多氯二苯并呋喃；Wang 等[42]利用加速溶剂萃取对土壤和鱼样中的多氯联苯和多溴联苯醚进行了定量测定。

1.2.1.4 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

QuEChERS 源于 Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged 和 Safe 首字母的组合，表明该前处理方法本身优良的特点。2003 年，Lehotay 和 Anastassiadas 首先提出了 QuEChERS 农药多残留检测技术[48-50]。该方法首先使用乙腈初提，再用无水硫酸镁或其它盐类于震荡中促使其分层，最后取一定量的上清液中加入乙二胺-N-丙基硅烷（PSA）和无水硫酸镁涡旋净化，净化液过膜后使用 LC 或 GC 进行农药多残留分析[51]。QuEChERS 处理样品简洁单、高效、节约试剂并且相对安全，是一种具备较强实用性的前处理手段。

1.2.1.5 凝胶渗透色谱(gel permeation chromatography, GPC)

凝胶渗透色谱即体积排斥色谱(size exclusion chromatography)是近几十年内发展起来的一种新型液相色谱。其原理是根据多孔性物质其分子体积大小的不同，当不同体积的高聚物分子通过柱子时，被洗脱出来的次序便也有着不同，进而实现其分离[25]。该技术对富含色素、脂肪的大分子样品净化效果十分优异。阮华等[53]在葵花油等食用油中测定 34 种农药残留时采用凝胶渗透色谱在线净化，方法操作简便，灵敏度高。

1.2.2 药残分析的检测技术

食品有毒有害污染物主要包括重金属污染物、农药残留污染物、兽药残留污染物以及其它污染物[54]（如从包装材料迁移到食品中的增塑剂双酚 A）。这些残留在食品中的潜在威胁，时时刻刻危及着人们的身体健康，所以必须通过现代先进的分析检测技术来把关。目前，能够胜任当前检测要求，并且广泛使用的药残分析的检测技术主要是免疫分析法、气相色谱法、高效液相色谱法、气质联用分析技术和液质联用分析技术等。

1.2.2.1 免疫分析法

免疫分析发展于近几年，主要是通过抗原和抗体的可逆性、特异性结合反应为基础的分析手段[55]。目前免疫分析法中，以酶联免疫吸附法（ELISA）使用最为广泛。如王帅兵等[56]使用 ELISA 快速测定猪尿和猪肝中克伦特罗残留量。郑志高等[57]建立快速 ELISA 检测多种磺胺类药物的方法，并初步应用于动物样品中药物残留的检测。ELISA 主要优点是操作简便、样品容量大、分析成本和仪器化程度低，因此作为残留筛选性分析手段非常理想。其缺点也同样存在，主要是

操作过程中影响因素极多且不易控制、所以可能会导致假阳性结果的出现，这时便需要结合分析仪器进行最后确认。

1.2.2.2 气相色谱法

气相色谱法(gas chromatography, GC)发展始于二十世纪五十年代，它是使用惰性气体为流动相，以具有一定活性且大表面积的吸附剂作为固定相的柱色谱法。近年来，气相色谱被广泛应用于各个领域，成为分离挥发性物质最重要的手段之一。气相色谱采用高灵敏选择性检测器，使其具有灵敏度高、应用范围广等优点。目前，气相色谱在食品中主要应用于农药残留[58-59]、食品添加剂[60-61]等的测定分析。气相色谱在兽药残留分析领域应用并不广泛，主要是数量众多的兽药沸点偏高，从而对气相色谱的残留检测分析造成的困难[62]。

1.2.2.3 高效液相色谱法

高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)发展始于二十世纪六十年代末，其突破性的进展主要源于材料科学研究中高效填料的发展。高效液相色谱是将高压技术与传统的液相色谱结合起来，加上高效的色谱柱与适合的检测器的一种技术，其不受样品的挥发性、热敏性的限制，从而使其在分析领域的应用范围更为宽广，目前大约有 70%-80%的有机化合物能用高效液相色谱法进行分析[25]。

1.2.2.4 气质联用分析技术

气质联用(GC-MS)是近几年发展的较为成熟、实用的检测技术，它集中了气相色谱仪器的优点，又同时具备质谱仪优秀定性能力的优点。特别是分析中电离方式若采用电子轰击离子源(EI)，数据可以凭借标准谱库检索分析，使得定性能力成倍提高。气相色谱还能够同时对几十甚至上百种农药进行分析测定，拥有着极大的实用性，但是有一些缺点也值得注意，因为其采用气化的方式进行进样分析，如果待测的化合物表现出热敏性，便无法使用气质联用分析，这也极大的限制了该技术的使用范围。

1.2.2.5 液质联用技术

液相色谱-质谱联用（Liquid-Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS）是将液相色谱仪与质谱仪串联使用的一种仪器分析技术，故联用后仪器具有色谱仪和质谱仪的双重优点，即高分离性能、高灵敏度。液质联用在电离方式的技术取

得突破性进展后，其分析领域也变得愈来愈宽广。液质联用具备液相色谱仪的优点，即能够对热敏性物质进行有效的分析，从而填补了气质联用在分析领域的空白。质谱仪在联用仪器中充当检测器的角色，其主要原理是通过质荷比(mass-charge ratio) m/z 对离子进行分离，因此实际应用中能够提供相对分子质量以及大量碎片结构信息用于定性、定量分析。质谱仪的灵敏度很高，能够对 ppb 级别甚至更低浓度水平的痕量残留物质进行残留检测研究。近年来，液质联用技术已在农药、兽药残留检测领域如氨基酸甲酯类、大环内酯类、磺胺类、喹诺酮类等农兽药残留检测分析中广泛使用。

1.3 磁性固相萃取

磁性固相萃取（magnetic solid-phase extraction, MSPE）是 21 世纪分离富集领域的革命性技术[63]。其理论源于液-固色谱，MSPE 是使用磁性吸附材料作为吸附剂的一种分散固相萃取技术[64]。不同于传统的固相萃取技术，MSPE 是通过将磁性吸附材料加入到待富集净化的溶液中，经涡旋并充分静置，从而使目标化合物被磁性吸附材料完全吸附，利用外部磁铁吸附以实现磁性吸附材料和溶液的分离，最后选用合适的解吸液对吸附的目标化合物进行解吸，获得的解吸液氮吹干后复溶过膜上机分析。

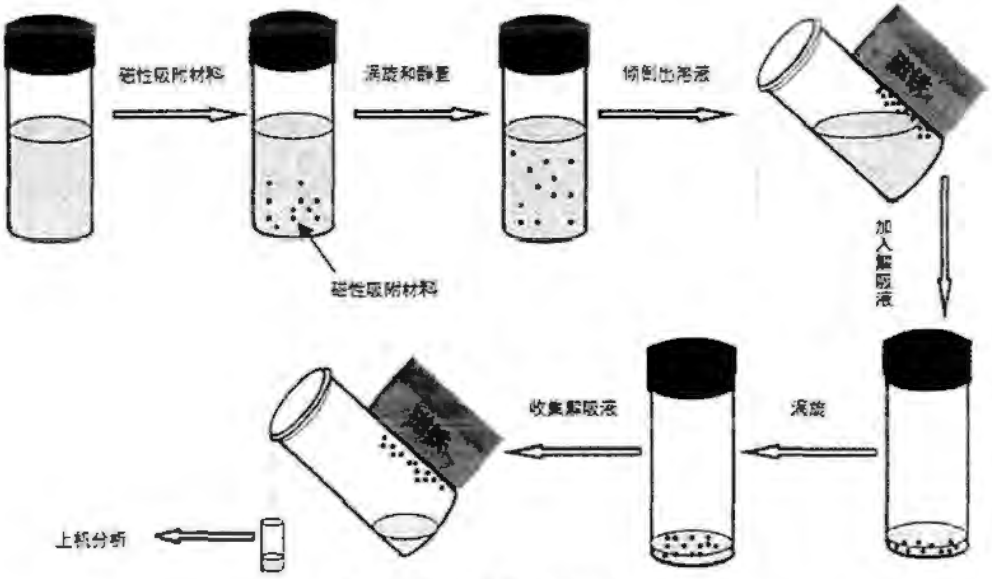


图 1-1 磁性固相萃取的步骤

Figure 1-1 The operation step of MSPE

1.3.1 磁性固相萃取的吸附剂

MSPE 的核心技术在于萃取步骤中使用的吸附剂即磁性纳米材料，因为裸露

的磁性纳米材料容易在溶液中团聚或因氧化失去磁性，所以在实际实验中，常常对制备的氧化铁纳米颗粒进行处理，处理方式包括以下两种[65]：

1、采用包埋处理，制备具有壳核结构的磁性纳米材料；

2、通过制备的氧化铁纳米颗粒与其它材料进行杂交处理制备出新的杂交磁性纳米材料。

经过上述两种方式处理氧化铁纳米颗粒后，对新的纳米材料，可以继续采用特定官能团进行修饰实现其不同的吸附性能。常见的磁性固相萃取吸附剂种类繁多，主要包括无机物包覆型磁性材料、聚合物包覆型磁性材料、有机小分子嫁接型磁性材料、碳纳米材料(碳纳米管、石墨烯)负载型磁性材料等[64]。

1.3.2 磁性固相萃取方法的应用

相比于传统的固相萃取操作中容易出现的堵塞和繁琐操作，MSPE 无论在操作的便捷性，富集过程的高效性以及在重复利用性上都显得更有优势。因此，MSPE 分离净化技术已经越来越多的应用于复杂基质样品。尤其值得注意的是，MSPE 在食品样品前处理中已取得十分广泛的应用[66]，涉及范围包含饮用水、肉类、鸡蛋、蔬菜等样品基质中微(痕)量重金属、农药、兽药等化学污染物的富集与检测。

在微(痕)量重金属检测中，Zhang 等[67]制备了具有高磁性能 $Fe_3O_4@SiO_2@TiO_2$ 纳米颗粒，用它作为 MSPE 吸附剂对环境水样中镉（Ⅱ），铬（Ⅲ），锰（Ⅱ）和铜（Ⅱ）进行富集研究。实验中，目标金属的纳米颗粒通过外部所加磁场方便分离，不需额外过滤或离心操作；同时通过引入紫外等照射光诱导氢氧根离子发射器调节样品溶液的 pH，富集后采用电感耦合等离子体质谱（ICP-MS）检测。实验中采用的 $Fe_3O_4@SiO_2@TiO_2$ 纳米颗粒被 $SiO_2@TiO_2$ 所包裹，具备良好的耐酸碱性能，可以重复使用 50 次。Faraji 等[68]使用十二烷基硫酸钠(SDS)包裹的磁铁矿纳米颗粒（SDS-Fe_3O_4）对环境样品中痕量汞(Ⅱ)吸附。富集后的饮用水样品经流动注射-电感耦合等离子体发射光谱法(FL-ICP-AES)测定，线性范围是 0.2~100 ng/mL，检出限 0.04 ng/mL。

在农药残留检测中，Deng 等[69]合成氨基化磁性多壁碳纳米管（MNPs/MWCNTs）用于茶叶样品中异丙威及 8 种杀虫剂的快速富集净化，采用 GC-MS 测定，优化影响处理效率的萃取溶剂、超声时间等，检测限 0.02~0.08

mg/kg，回收率处于 72.5%至 109.1%之间。Wu 等[70]合成磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）用于环境水样中 5 种氨基酸甲酯类农药（速灭威，克百威，抗蚜威，异丙威和乙霉威）的检测，配备二极管阵列检测器，检测限处于 0.02~0.04 ng/mL。巫远招等[71] 合成壳核结构的磁性纳米颗粒（Fe_3O_4@ZrO_4），对蔬菜样品中得有机磷农药（OPs）进行富集净化、电感耦合等离子体发射光谱法测定，处理过程中对有机磷农药的富集倍数最高为 20~100 倍，所以该方法的检出限比常规气相色谱更低。

在兽药残留检测中，Xiao 等[72]制备了磁性碳纳米管，再通过聚合反应在其表面组装了喹诺酮模版分子（以氧氟沙星为模板），合成的磁性碳纳米管/分子印记聚合物（MCNTs@MIP）应用于鸡蛋中诺氟沙星、培氟沙星、加替沙星和环丙沙星检测，其 HPLC 方法检测限达到 0.25~0.40 ng/g。Karimi 等[73]合成了磁性磺胺分子印记材料（以磺胺二甲嘧啶为模版），经由甲醇洗脱掉模版分子，将合成的材料于鸡肉中的磺胺氯达嗪、磺胺甲噁唑、磺胺甲噻二唑以及磺胺嘧啶的检测，优化了萃取时间、解吸时间、解吸液种类和体积等关键条件，经由高效液相色谱仪-紫外可见光检测器（HPLC-UV）检测，检测限位于 0.1~0.5 μg/L。

1.3.3 磁性固相萃取方法的前景和展望

自古民以食为天，食品安全与人们生活质量的高低有着尤其密切的关系，特别随着经济生活的提高，人们对食品安全的要求愈来愈多，已不再仅限于吃饱，还要吃得安全、吃得放心。同时我国已跃居为世界第一大水产品出口国，出口的食品还要符合出口国的诸多严苛的检测要求。因此快捷、方便、高效的前处理方法一定会越来越有广阔的市场。

MSPE 方法出现至今，由于其操作简单、快速、高效、适合各种各样的复杂基质和节约试剂等优点，使其在食品检测领域中利用范围也越来越宽广。MSPE 优势巨大，其技术核心的磁性纳米材料是关键，目前获取磁性纳米材料的方法主要是对磁性纳米微粒表面进行修饰以及磁性高分子聚合物和磁性分子印记材料的制备，这些方法或多或少的存在些许不足，所以合适的 MSPE 新材料的开发仍然是国内外磁分离科学的重要研究课题[74]。当然，我们也有理由相信，随着新材料领域的不断发展，类似于石墨烯这样的材料的不断发掘，MSPE 方法也会逐渐显现出美好的应用前景。

1.4 研究内容

本论文的主要目的是研究磁性石墨烯固相萃取-HPLC-MS/MS 在水产品药残检测中的应用，研究的对象是我国水产品养殖中广泛使用的合成抗菌类药物，包括大环内酯类抗生素、磺胺类及喹诺酮类药物。通过对磁性固相萃取（MSPE）步骤中关键因素的优化，建立了水产品中药物残留检测的 MSPE-HPLC-MS/MS 方法，主要包括以下几部分内容：

（1）采用碱性溶液中共沉淀的方法制备磁性石墨烯（G-Fe_3O_4），并采用透射电子显微镜对合成的材料进行结构表征，探讨磁性石墨烯作为 MSPE 吸附剂的可行性；对 MSPE 方法萃取净化步骤进行优化，研究建立草鱼体内大环内酯类抗生素 HPLC-MS/MS 定量分析方法，讨论样品的基质效应并对建立的方法进行方法学验证，包括检出限、定量限、回收率及日内/日间精密度，将建立的方法应用于市售草鱼样品检测。

（2）研究建立水产品中 5 种磺胺类药物的 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析方法。在 MSPE 步骤中以磁性石墨烯为吸附剂，对鱼肉中磺胺类药物的提取溶剂及复溶溶剂进行优化，使 MSPE 能快速萃取完成，对影响萃取效率的关键因素进行优化，建立一种简便高效的前处理方法；对建立的定量分析方法进行方法学验证并将其用于市售鳊鱼样品检测。

（3）研究建立 MSPE-LC-MS/MS 同时定量分析水产品中 12 种喹诺酮类药物残留的方法。采用 MSPE 对水产品前处理并对影响萃取效率的关键因素进行优化确定磁性吸附剂用量、萃取时间及解吸液种类与体积；将 MSPE 与传统固相萃取技术进行比较，验证方法的有效性；比较试剂空白标准曲线和基质液工作曲线对鱼肉样品的基质效应进行评估，对建立方法进行方法学验证，评估方法有效性并用于市售鲫鱼样品检测。

第 2 章 磁性石墨烯的制备及其在水产品中大环内酯类残留分析中的应用

抗生素作为有效的治疗药物被广泛用于水产养殖业，在众多抗生素类药物添加剂中，大环内酯类抗生素（MALs）占有较为重要的地位[75]。然而，由于缺乏正确的科学用药指南，导致其在某些养殖业主手中被过量甚至超量的使用，因此大环内酯残留问题便不可避免，这些残留对环境和健康的危害往往具有隐蔽性，易造成实质性和难以扭转的危害[76]。为了确保食品安全和人类健康，许多国家包括欧洲联盟(EU)[77]、美国食品和药物管理局(FDA)[78]以及中国[79]等，都已规定了部分大环内酯类抗生素在肌肉组织、脂肪、肝脏和肾脏中的最大残留限量(MRL)。因此，开发一种灵敏、可靠的分析方法用于测定食品中的大环内酯类抗生素残留是当前科研工作者的首要任务。

由于水产品样品基质复杂，含有较多的油脂、蛋白，所以对水产品中药残分析检测的关键环节之一就是样品前处理，不当的前处理方式甚至会影响整个方法的建立。磁性固相萃取（MSPE）是近几年快速发展，基于液-固色谱理论的一种样品前处理技术，相比于传统的固相萃取（SPE）操作中容易出现的堵塞和操作繁琐，MSPE无论在操作的便捷性，富集过程的高效性以及在重复利用次数上都显得更有优势，另外萃取过程中还可针对不同的目标化合物选择合适的吸附剂，实现更为针对性的前处理净化方式。

本实验采用碱性溶液中共沉淀的方法制备磁性石墨烯（G-Fe_3O_4），通过透射电子显微镜对合成的材料进行结构表征。此外以自制的磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）作为磁性固相萃取的吸附剂，通过对萃取过程中磁性石墨烯用量、萃取时间及解吸液的种类与体积进行优化，结合高效液相色谱-串联质谱技术定量检测鱼肉中大环内酯类药物残留含量。

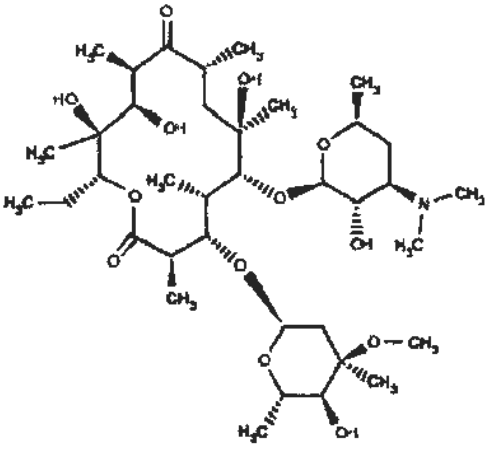
2.1 试剂与仪器

2.1.1 材料

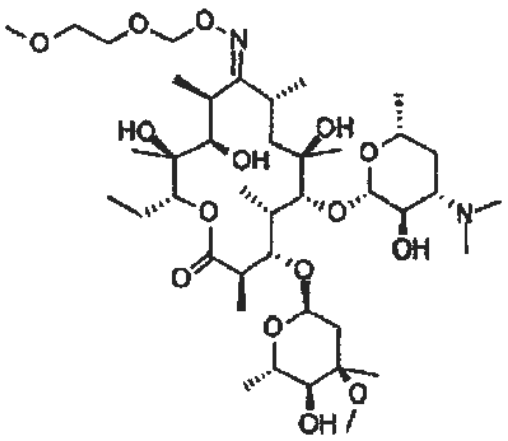
石墨粉（粒度小于 30 μm 的粒子，碳含量＞98%）购于香港 Fisher 公司；多壁碳纳米管购于深圳市纳米港有限公司；3 mL 固相萃取空柱、筛板及 C18 小

柱购于上海安谱公司；实验用草鱼购自杭州农贸市场、物美超市。

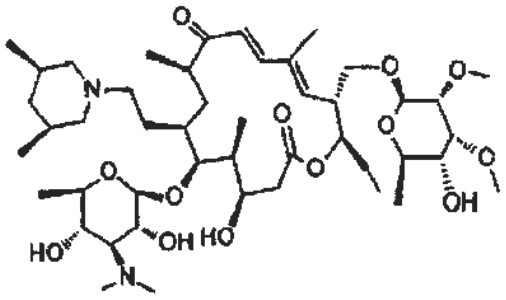
红霉素(Erythromycin, ERY)、罗红霉素(Roxithromycin, ROM) 及替米考星(Tilmicosin, TIL)均购买自 Sigma 公司，纯度大于 98%。其结构式见图 2-1。



ERY



ROM



TIL

图 2-1 红霉素、罗红霉素及替米考星的化学结构式

Figure 2-1 Chemical structures of ERY、ROM and TIL

2.1.2 主要试剂

甲醇、乙腈；HPLC 级，购自德国 Merck 公司。

甲酸、乙酸乙酯、丙酮；HPLC 级，购自美国 Tedia 公司。

高锰酸钾、硝酸钠、氯化钠、四水合氯化亚铁、六水合三氯化铁、30%双氧水、98%浓硫酸、盐酸、水合肼、氯化钡、正己烷、浓氨水；分析纯，购自杭州常盛科教器具厂。

2.1.3 仪器设备

制冰机	XB-80，宁波格兰特制冷设备制造有限公司
数显恒温水浴锅	HH-4，国华电器有限公司
定时恒温磁力搅拌器	90-2，上海精科实业有限公司

超级恒温水浴锅	2004-21(501)，国华电器有限公司
电热鼓风干燥箱	101A-1 型，上海市实验仪器总厂
循环水式真空泵	SHZ-D，巩义市英峪予华仪器厂
真空冷冻干燥机	7670530，美国 LABCONCO 公司
高效液相色谱仪	Transcend II，美国 Thermo Fisher 公司
质谱仪	TSQ Quantum Ultra™，美国 Thermo Fisher 公司
固相萃取装置	Milford Massachusetts，Waters 公司
电子天平	METTLER-AG135，美国 METTLER 公司
MilliQ 纯水系统	Direct-Q™ 5 超纯水系统，密理博公司
涡旋振荡器	XW 80A，上海医科大学仪器厂
组织匀浆机	ULTRA TURRAX T25 型均质器，IKA
氮吹仪	DSY-II 型，北京金科精华苑技术研究所
高速冷冻离心机	Sorvall RC 6 Plus 型，Thermo 公司
超声提取仪	KQ-500E，昆山超声仪器有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 溶液的配制

标准储备液：准确称取红霉素（ERY）、罗红霉素（LOM）和替米考星（TIL）标准品 10 mg，用甲醇溶解并分别定容至 10 mL，标准储备液浓度为 1 mg/mL。放入冰箱中避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 6 个月。

混合标准使用液：准确移取标准储备液 100 μL，用甲醇稀释并在室温下定容至 10 mL，混匀。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 3 个月。

混合标准工作液：准确移取混合标准使用液 5 mL，用甲醇稀释并定容至 50 mL。各组分含量为 1 μg/mL。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 3 个月。

混合标准曲线使用液：取混合标准工作液分别为 0.05、0.25、0.50、1.25、3.75、5.00、7.50 mL 于 10 mL 的容量瓶，用甲醇定容，定容后配置成浓度分别为 5、25、50、125、375、500、750 ng/mL，放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 1 个月。

2.2.2 磁性石墨烯的制备与表征

2.2.2.1 氧化石墨(GO)的制备

氧化石墨烯的制备方法按照改良的 Hummers 方法[80]。具体步骤：将 2 g 石墨粉、1 g $NaNO_3$ 固体依次加入到 500 mL 的反应瓶中（反应瓶放置于冰水），用量筒量取 98 mL 浓硫酸加入反应瓶中，加入 12 g $KMnO_4$ 同时磁力搅拌，反应约 0.5 h 后撤走冰水浴，待温度升至 35 ℃左右，磁力搅拌约 1.5 h 后，再缓缓加入去离子水，磁力搅拌 0.5 h 后，加入一定量的 30%双氧水，直至溶液变为亮黄色。趁热 8000 rpm/min 离心 20 min，并用 5%稀 HCl 溶液和去离子水反复洗涤多次，直至用氯化钡检验不出硫酸根离子。最后将得到的沉淀物均匀平摊于培养皿底部并于 80 ℃的干燥箱中充分烘干，即获得薄片状的氧化石墨（GO）。

2.2.2.2 石墨烯（G）的制备

石墨烯（G）的制备采用水合肼还原法，实验称取 100 mg GO、量取 100 mL 去离子水于烧杯中，超声 2 h 并使用玻璃棒间歇性搅拌得到棕色均匀的悬浮液。然后将溶液转移至 250 mL 配有循环冷凝水的圆底烧瓶中，80 ℃下水浴，同时滴加 2 mL 的水合肼，维持该条件反应 24 h 后抽滤，产物经 0.22 μm 微孔滤膜减压抽滤并用甲醇和水多次清洗，冷冻干燥，保存备用[81]。最后制得石墨烯粉末成品约为 68 mg。

2.2.2.3 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）制备

磁性石墨烯的制备方法采用 Wu 等的方法[82]。本文采用石墨烯、Fe^{2+}和 Fe^{3+}(摩尔比为 1 ：2)在碱性溶液中共沉淀的方法制备磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）。在三口烧瓶中依次加入 0.86 g(4.33 mmol) $FeCl_2 \cdot 4H_2O$、2.34 g(8.66 mmol) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 和 200 mL 去离子水，常温下充分溶解后，加入 0.5 g 石墨烯并超声 10 min 混匀。然后将溶液置于 50 ℃水浴，机械搅拌并通入 N_2，同时逐滴加入 10 mL 浓度为 8 mol/L 的 NH_4OH 溶液，混合溶液最终的 pH 在 11~12 之间。继续玻璃棒搅拌混合溶液待反应完全。磁铁置于三口烧瓶底部进行吸附，弃去溶液并用乙醇、去离子水清洗最终产物三遍，真空干燥后备用，反应最终可制备 1.2 g G-Fe_3O_4。

2.2.2.4 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）的测试与表征

利用透射电子显微镜（Transmission Electron Microscopy，TEM ）对 G-Fe_3O_4

的微观结构进行研究分析。

2.2.3 样品预处理

将市售的鲜活草鱼样品去头、尾、骨、鱼鳞、内脏器官等，取干净的鱼肉部位切成块状，于匀浆机中搅打成鱼糜状，冷藏于-18 ℃冰箱。

准确称量 1.00 g（精确 0.01 g）解冻后草鱼肉糜，置于加有 5 g NaCl 的 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 甲醇，涡旋 1 min、超声 10 min，6000 rpm/min 离心 3 min，取上清液于 50 mL 的离心管，对残渣重复提取一次，合并两次的上清液，加入正己烷 10 mL，涡旋 1 min，静置，除去正己烷层，最后提取液氮吹干，复溶于 5 mL 甲醇/水（v:v, 50:50）作为样品液。

2.2.4 磁性固相萃取

准确称重 15 mg 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）并用 3 mL 丙酮、去离子水、甲醇各清洗一次，随后将其加入盛有 5 mL 样品液的 15 mL 离心管中，涡旋 5 min，静置萃取 15 min。萃取结束后，以磁铁吸附 G-Fe_3O_4，弃去上层清液，将 G-Fe_3O_4 转移至另一个干净的 15 mL 离心管中。加入 3 mL 丙酮涡旋 1.5 min 进行解吸，继续以磁铁吸附 G-Fe_3O_4，收集解吸液并置于温和氮气流吹干，复溶于 1 mL 0.1% 甲酸水/乙腈（v:v, 60:40），过 0.22 μm 有机滤膜，LC-MS/MS 分析。回收的 G-Fe_3O_4 用 3 mL 丙酮、去离子水、甲醇各清洗 2 次，回收使用。

2.2.5 色谱条件

色谱柱：YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱（150 mm×4.6 mm, 3 μm）。

流动相 A：0.1%甲酸水溶液；流动相 B：乙腈；进样量：10 μL；柱温：30 ℃；梯度洗脱程序见表 2-1。

表 2-1 大环内酯类抗生素液相色谱梯度洗脱程序

Table 2-1 The gradient elution program of MALs

时间（min）	流速 mL/min	A（%）	B（%）
Initial	0.4	60	40
8	0.4	30	70
9	0.4	60	40
10	0.4	60	40

2.2.6 质谱条件

电离模式：ESI；

扫描方式：正离子；

喷雾电压：3200 V；

检测方式：SRM 模式；

气化温度：300 ℃；

壳气：高纯氮气，20 Arb；

辅助气：高纯氮气，20 Arb；

碰撞气：高纯氩气，1.5 mTorr；

毛细管温度：270 ℃；

检测3种大环内酯类抗生素离子对信息见表2-2。

表2-2 大环内酯类抗生素的质谱优化参数

Table 2-2 Optimized MS/MS parameters of MALs

化合物 Analytes	保留时间 t_R /min	离子对 m/z	碰撞电压 CE
红霉素 ERY	5.50	734.2/157.9*	29
		734.2/576.2	20
罗红霉素 ROM	6.80	837.0/157.8*	31
		837.0/679.2	20
替米考星 TIL	5.18	869.6/174.0*	43
		869.6/696.2	39

*：定量离子对

2.2.7 标准曲线和工作曲线绘制

标准曲线：分别吸取 7 个浓度（5、25、50、125、375、500、750 ng/mL）混合标准曲线使用液 0.2 mL 于进样小瓶中，同时往每个进样小瓶中加入 0.8 mL 0.1%甲酸水/乙腈（v:v, 60:40），即获得 1、5、10、25、75、100、150 ng/mL 七个浓度，HPLC-MS/MS 分析，拟合浓度与对应峰面积，得标准曲线、相关系数。

工作曲线：取 7 个浓度的混合混合标准曲线使用液 0.2 mL 于进样小瓶，并用空白基质液（按照 2.2.3 和 2.2.4 步骤处理后得到的提取液，不含大环内脂类药物的基质液）稀释成 1、5、10、25、75、100、150 μg/kg 七个浓度，HPLC-MS/MS 分析，拟合浓度与对应峰面积，得工作曲线、相关系数。

2.2.8 检出限与定量限

在空白鱼肉中添加混合标准溶液使其为 0.5、1、5、10 μg/kg 四个添加水平，按照 2.2.3 和 2.2.4 中前处理样品后，上机分析，实验重复测定 3 次，分别以 S/N

等于 3 和 10 计算检出限（LOD）和定量限（LOQ）。

2.2.9 回收率和精密度实验

空白草鱼样品 1.00 g(精确 0.01 g)中加入 0.2 mL 浓度分别 50、125、375 ng/mL 大环内酯标准液，使其添加水平为 10、25、75 μg/kg，然后依据 2.2.3 进行样品前处理，2.2.4 净化处理后上机分析检测，根据工作曲线计算出含量。

回收率（%）＝100×测得浓度/添加浓度水平。实验重复测定 3 次。

分别在 10、25、75 μg/kg 添加量下进行日内和日间精密度实验。日内精密度一天之中平行测定五次，日间精密度平行测定六天共六次，精密度值通过计算相对标准偏差获得。

2.3 结果与讨论

2.3.1 磁性石墨烯的制备与表征

实验中对合成的磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）进行透射电子显微镜（TEM）表征，研究纳米粒子的尺寸以及在石墨烯表面的分布情况，表征结果如图 2-2 所示。从图中可以看出 Fe_3O_4 纳米粒子的平均粒径约为 5~20 nm，这些纳米粒子在石墨烯薄片上分散均匀。由于负载程度已经接近饱和，一些纳米粒子产生了轻微的团聚现象。

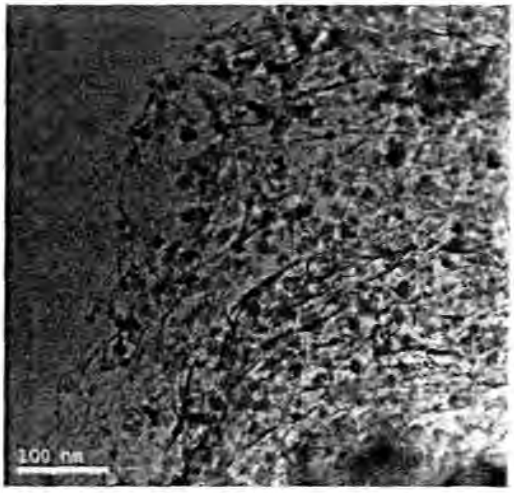


图 2-2 G-Fe_3O_4 的透射电子显微镜图

Figure 2-2 TEM image of G-Fe_3O_4

2.3.2 高效液相色谱条件的优化

为了获得尖锐美观的色谱峰形与较高的响应值，同时保证分析效率的最大化，故需优化选出合适的液相色谱条件。实验过程中首先使用常用的有机相（甲醇、乙腈）和超纯水对目标化合物进行分析，发现乙腈和超纯水获得的分离效果更好，所以初步选用这两相作为液相色谱的流动相。其次，实验过程中采用等度或者梯度洗脱皆可，在此流动相的情况下，发现梯度洗脱所需时间更短，故选用梯度洗脱，洗脱程序见表 2-1。考虑到大环类脂类化合物离子化模式为正离子，故在超纯水中加入 0.1%的甲酸提升在质谱仪中的电离效率。因此最后选定 0.1%的甲酸水和乙腈作为最后的色谱流动相，图 2-3 为 3 种大环内酯类化合物的萃取离子流色谱图。

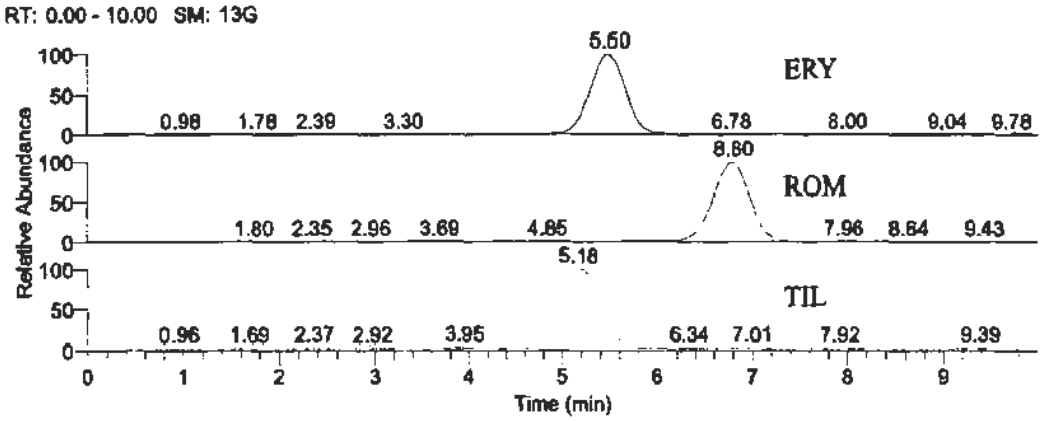


图 2-3 HPLC-MS/MS 条件优化下 3 种大环内酯标准溶液的萃取离子流色谱图

Figure 2-3 XIC for standard of three MALs under optimized HPLC–MS/MS conditions

2.3.3 质谱条件的优化

将混合标准液配置为 5 μg/mL 在电喷雾正离子模式下进行母离子全扫描，确定母离子，调节离子化温度、喷雾电压、透镜补偿电压等参数，优化后选择强度最高的两个子离子作为定量、定性离子对，同时选择子离子强度最高时的碰撞电压（CE）为最佳的碰撞电压。大环内酯类化合物子离子扫描质谱图如图 2-4 所示。经仪器分析测试表明，大环内酯类化合物的最佳母离子、子离子、保留时间和碰撞电压如表 2-2 所示。

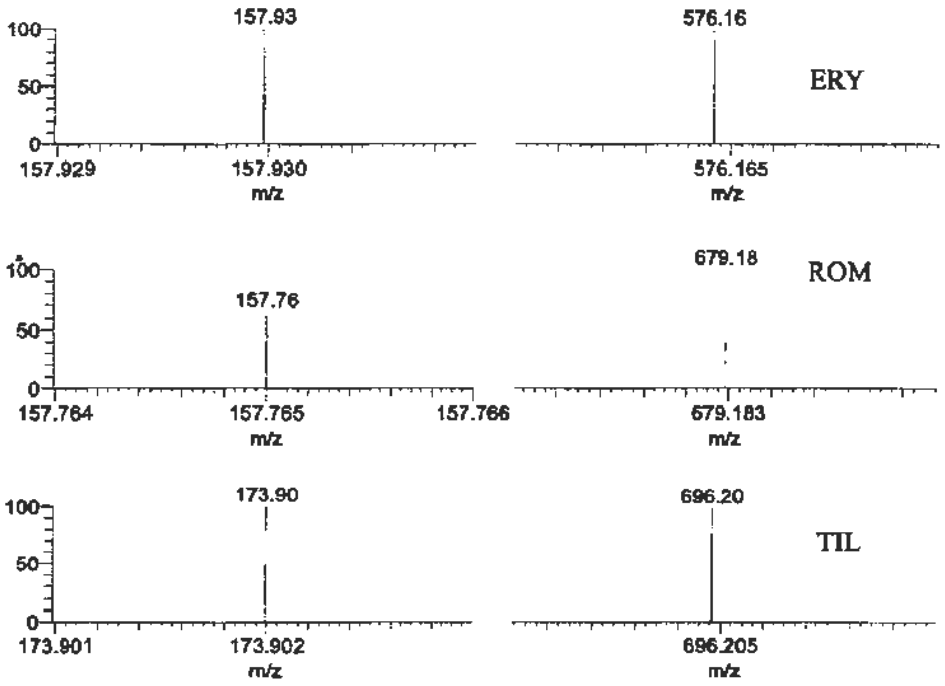


图 2-4 3 种大环内酯类抗生素的子离子扫描图

Figure 2-4 Product ions scan spectra of three MALs

2.3.4 磁性石墨烯作为 MSPE 吸附剂的可行性研究

为了评估磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）作为 MSPE 吸附剂的可行性，将一定量的 G-Fe_3O_4 放入 10 mL 的试管中，加入不同的试剂如水、甲醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯、甲苯等，将磁铁靠近试管壁吸附，发现磁性石墨烯材料迅速聚集在试管壁的位置，倾倒出加入的试剂，磁性石墨烯粉末随试剂流出，表明磁性石墨烯具备 MSPE 中快速分离吸附剂与萃取液的特性；其次，将 100 ng/mL 的大环内酯类抗生素标准液 5 mL 加入装有一定量磁性石墨烯的 10 mL 试管中，涡旋 5 min 后静置 15 min，磁铁吸附后倾倒出的溶液经 HPLC-MS/MS 检测发现无大环内酯类抗生素的存在，这表明 G-Fe_3O_4 对大环内酯具有良好的吸附性。因此判定 G-Fe_3O_4 作为磁性固相萃取吸附剂进行目标化合物的净化处理是完全可行的。

2.3.5 磁性固相萃取条件的优化

有效的前处理方法能显著提高方法的重复性和灵敏度，同时可以得到更低的检出限。为了选择最佳的磁性固相萃取（MSPE）条件，将加标浓度为 50 μg/kg 的鱼肉样品按照 2.2.3 和 2.2.4 处理后来研究不同实验条件下的萃取效率。实验对影响最终回收率的关键因素：磁性吸附剂的用量、萃取时间及解吸液的种类与体积进行了优化，进而获得最佳的前处理条件。

2.3.5.1 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）的用量优化

在磁性固相萃取的过程中，吸附剂 G-Fe_3O_4 的用量与萃取过程中目标化合物的含量有着直接的关系，同样的前处理过程中，吸附剂用量太少则会导致待检测目标化合物吸附不够完全，太多则会造成吸附剂浪费，所以实验设计 5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg G-Fe_3O_4 共 5 个用量水平，考察不同的用量水平对大环内酯回收率的影响。实验结果如图 2-5 所示，当 G-Fe_3O_4 的用量水平从 5 mg 到 15 mg，目标化合物的回收率呈明显的上升趋势且在 15 mg 时大环内酯的回收率可达 90%左右；当用量水平从 15 mg 增加到 25 mg，G-Fe_3O_4 的使用量虽然增大，但对回收率并无明显的增强作用。因此本实验采用 15mg 的磁性石墨烯作为 MSPE 的最佳使用量。

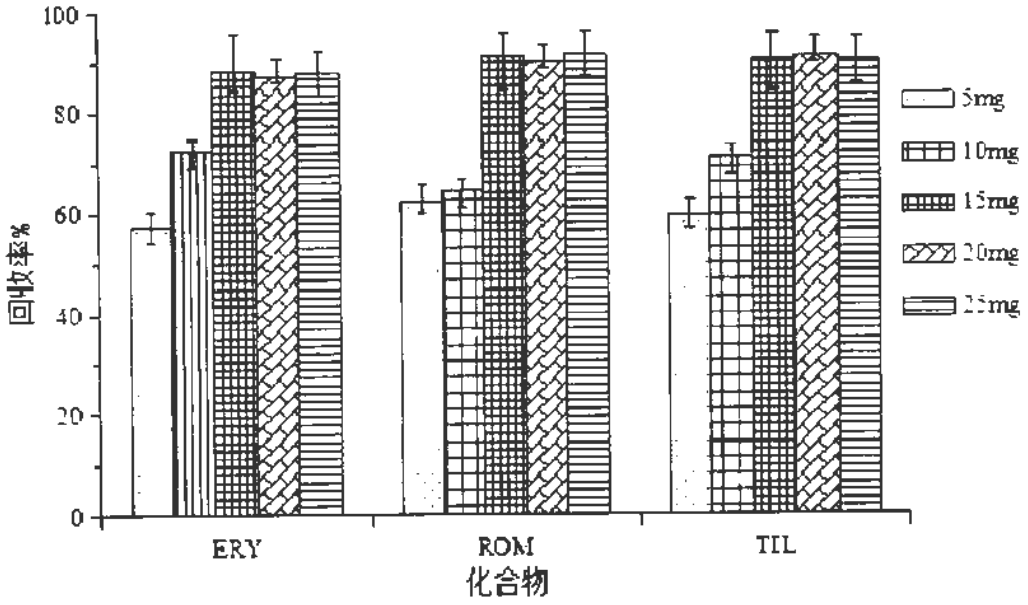


图 2-5 磁性石墨烯用量对大环内酯类抗生素回收率的影响

Figure 2-5 The effect of the amount of G-Fe_3O_4 on the recovery of MALs

2.3.5.2 萃取时间优化

在磁性固相萃取过程中，萃取时间是影响目标化合物回收率的重要因素。因此本实验考察了 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 共计 6 个时间水平下最终大环内酯回收率的情况。结果如图 2-6 所示，当萃取时间从 5 min 逐渐增加到 20 min，回收率呈现出明显的增大趋势；当萃取时间为 20min 时，回收率接近 90%，然而当萃取时间大于 20 min 后，回收率又呈现出明显的下降趋势，这可能是因为随着时间的增加，对大环内酯类化合物的吸附程度变强，从而

难以洗脱。所以，本实验的最佳萃取时间选定为 20 min。

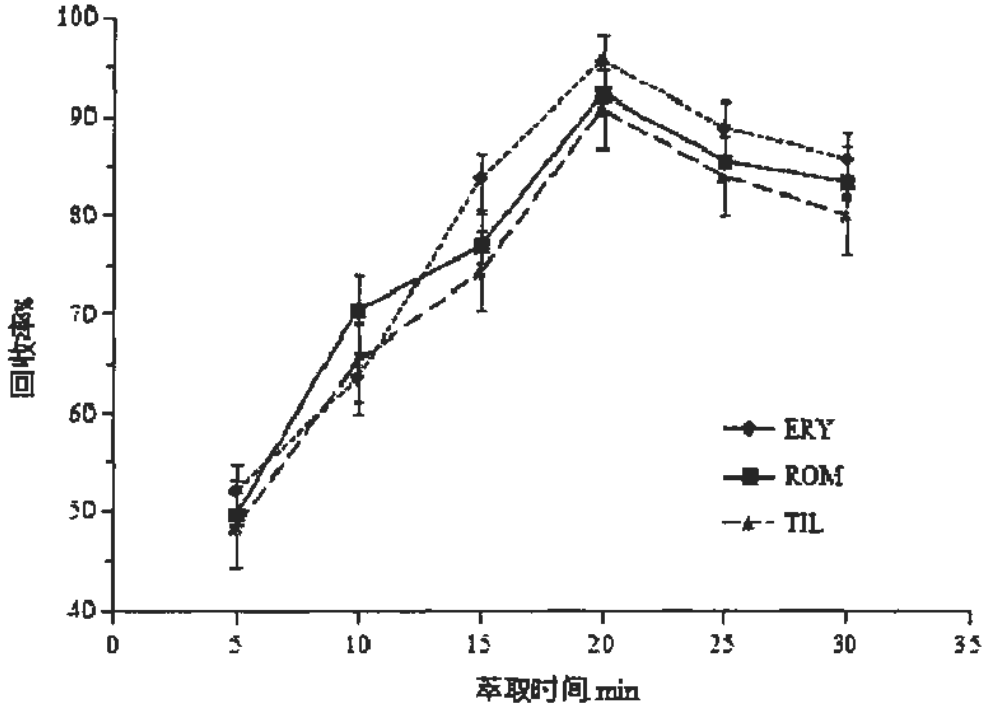


图 2-6 萃取时间对大环内酯类抗生素回收率的影响

Figure 2-6 The effect of the extraction time on the recovery of MALs

2.3.5.3 解吸液的优化

在 MSPE 过程中，解吸液扮演着十分重要的角色。解吸液的选择与目标化合物的极性有着密切的关系，因此，本实验考察了不同极性情况下，大环内酯类抗生素的回收率情况。实验在常用解吸液的基础上，又考虑所选择解析液的不同极性的均匀分布，最后选定解吸液主要包括甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、甲醇。

由图 2-7 可知，解吸液对大环内酯的回收率影响很大。甲苯、二氯甲烷和乙酸乙酯三者的解吸效果相对较差，回收率明显均低于 40%，丙酮在这 6 种解吸液中表现最好，回收率可以达到 85%以上。此外，我们还观察到作为常用的解吸液的甲醇解吸效果不明显，可能是因为其具有较强的解吸能力，在解吸过程中将某些杂质一并洗脱下来，从而干扰了目标化合物的检测，最终导致其回收率较丙酮略低。故本实验最后选择丙酮作为最终的解吸溶液。

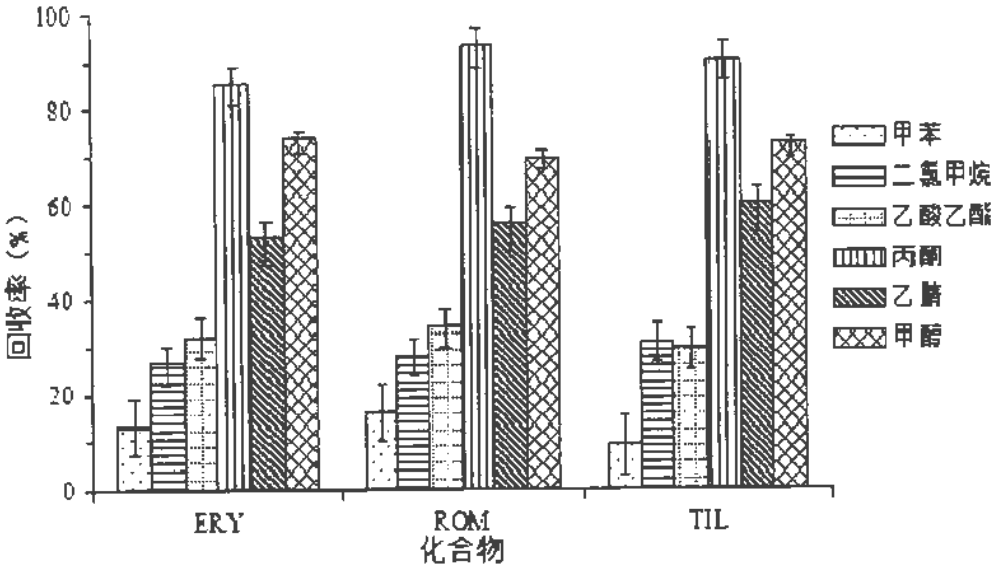


图 2-7 不同解吸液对大环内酯类抗生素回收率的影响

Figure 2-7 The effect of the eluent type on the recovery of of MALs

2.3.5.4 解吸液体积

待净化样品液与吸附剂的量固定的情况下，由于 G-Fe_3O_4 对大环内酯抗生素的吸附能力强弱有别，故解吸过程中需要解吸液体积会有差异，过多或过少的体积都会对最终的回收率产生不利的影响，因此本实验考察了解吸液体积分别为 1、2、3、4、5 mL 共 5 个解吸体积下目标化合物的回收率情况，实验结果如图 2-8 所示。对于大环内酯，在 1~3 mL 时，解吸液体积与回收率正相关。当解吸液体积大于 3 mL 时，回收率甚至还略微的降低。说明体积达到 3 mL 时，大环内酯已基本被洗脱下来，再次增加解吸体积，可能只是解吸下来一部分干扰最后定量分析的非目标化合物。因此，本实验以 3mL 作为最优的解吸体积。

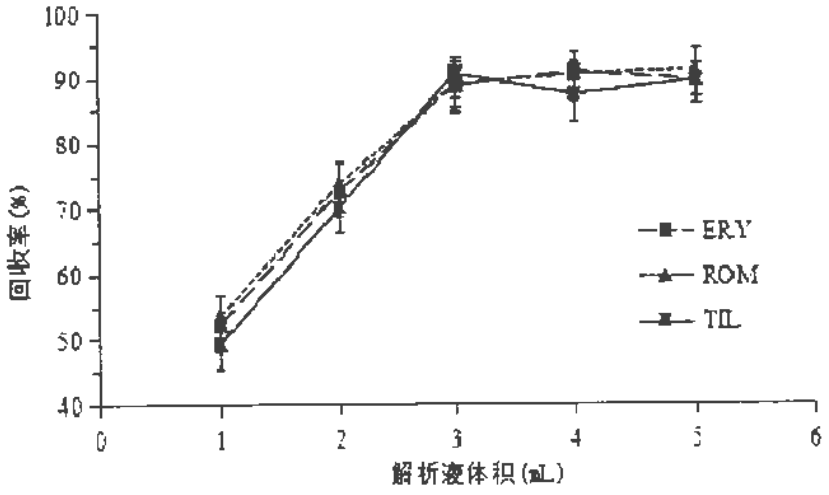


图 2-8 解吸液体积对大环内酯类抗生素回收率的影响

Figure 2-8 The effect of elution volume on the recovery of MALs

2.3.6 与传统固相萃取的对比研究

为了验证基于 G-Fe_3O_4 的 MSPE 前处理方法的优势，实验考察了几种不同前处理方式下目标化合物的回收率，这些前处理方式包括：基于 G-Fe_3O_4 的 MSPE、基于 C18 小柱的固相萃取、基于多壁碳纳米管（MWCNTs）的固相萃取以及基于石墨烯的固相萃取。

由图 2-9 可知，基于 G-Fe_3O_4 的 MSPE 对大环内酯类抗生素的回收率最高，基于石墨烯的固相萃取次之，基于多壁碳纳米管的固相萃取回收率最低。实验中观察到基于石墨烯和多壁碳纳米管的固相萃取，回收率的重现性不好，其原因可能是每次手工填料不可避免的误差所造成的；MSPE 在实验中表现出良好的重现性，可能是因为前处理过程中，磁性固相萃取的步骤是直接将磁性石墨烯加入到待处理溶液中进行萃取净化，不需要填料装柱这一环节的所致，这也进一步显示出磁性固相萃取用于样品前处理中的优势。

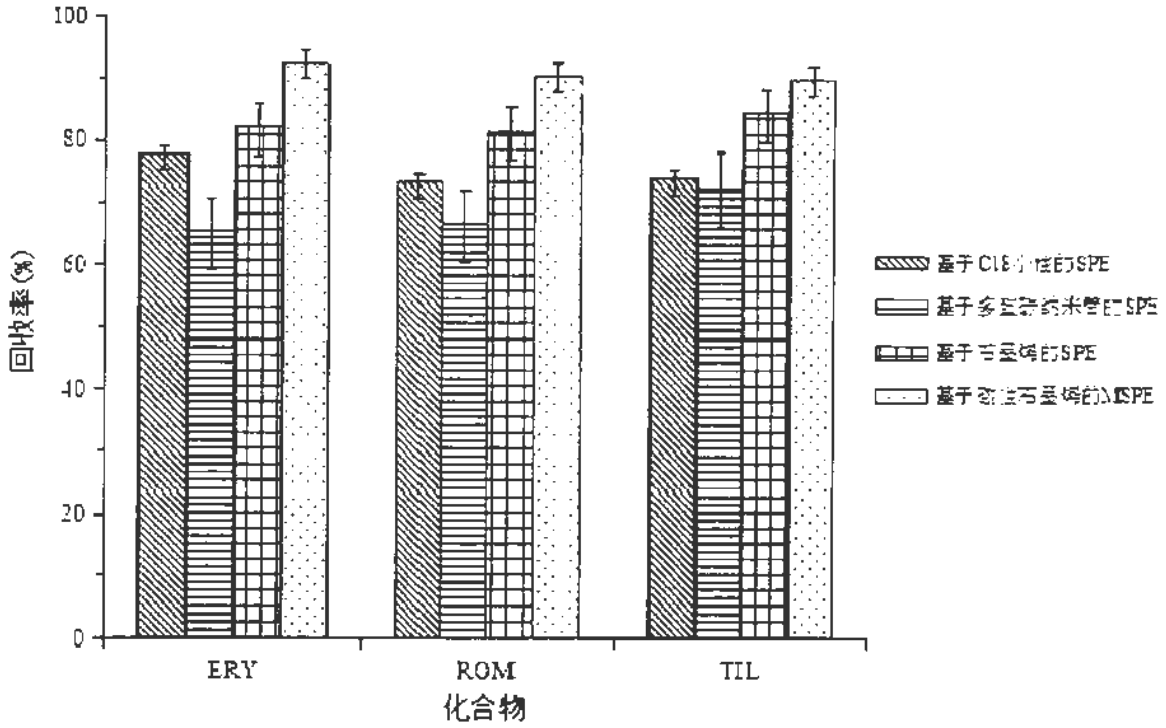


图 2-9 磁性石墨烯的 MSPE 与其他吸附剂的 SPE 萃取效果比较（均在各自优化条件下）
Figure 2-9 Comparison of G-Fe_3O_4 based on MSPE with other absorbents based on SPE (The extraction conditions were optimized for all sorbents)

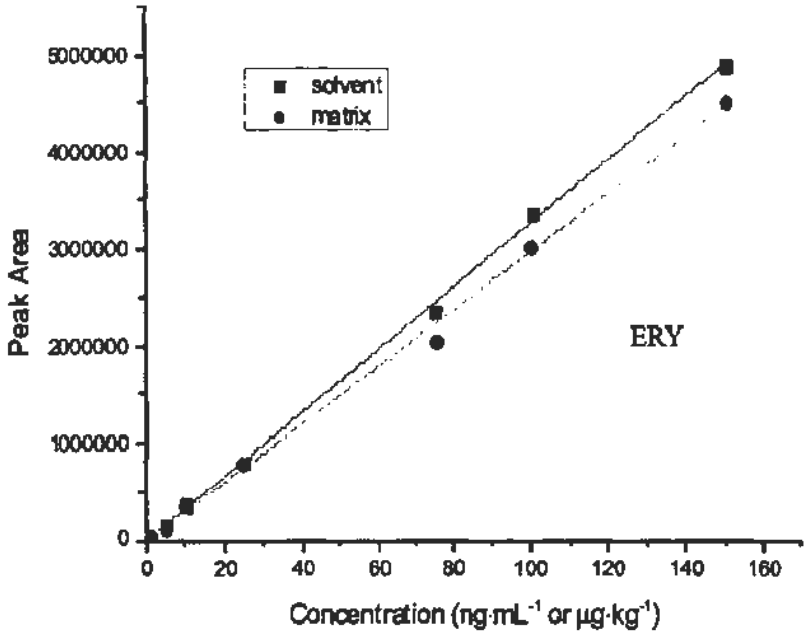
2.3.7 基质效应

水产品基质复杂，含有大量的大分子干扰物，因此在实际进样检测时，基质

的存在会一定程度上影响目标化合物的离子化，表现为增强或者减弱目标化合物的响应值[83]，从而使得结果出现偏差而影响最终结果的真实性。为了实验结果的真实可靠，实验对基质效应进行了评估，并绘制标准曲线与工作曲线见图 2-10，进而对基质效应直观的比较。

基质效应参数计算参照公式：%ME =工作溶液斜率/试剂溶液斜率×100%[83]

从图 2-10 可以看出，草鱼肉基质中红霉素（ERY）、罗红霉素（ROM）、替米考星（TIL）的基质工作曲线与溶剂标准曲线的斜率相比，均属于基质工作曲线斜率偏小，这表明鱼肉基质对红霉素、罗红霉素、替米考星这 3 种大环内酯抗生素有基质抑制作用。考虑到化合物本身所带的基团，如磷酸基团(—PO)、羟基(—OH)、氨基(—R—NH—)、羧基(—COOH)、氨基甲酸酯类基团(—O—CO—NH—)等，都易产生不同程度的基质效应[84]，以及样品处理过程中不可避免的非目标化合物的大分子干扰，因此在实际样品的定量分析检测中，该类化合物需要使用工作曲线来定量。



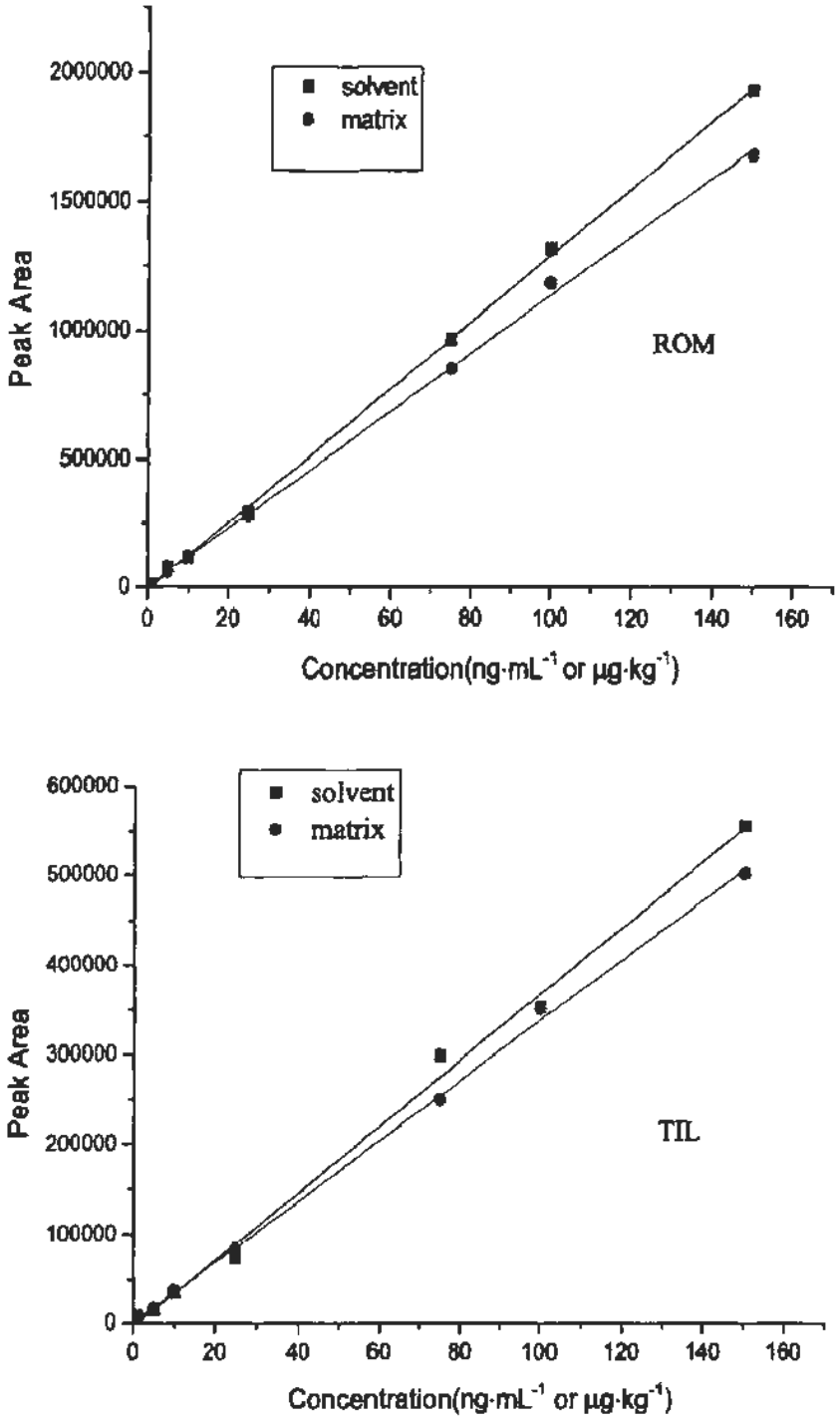


图 2-10 红霉素、罗红霉素和替米考星的标准曲线与工作曲线的比较

Figure 2-10 Comparison of solvent and matrix-matched calibration curves of ERY、ROM and TIL

2.3.8 方法学验证

2.3.8.1 工作曲线

2.3.7 部分已经对基质效应进行了评估，并且也通过图形对基质工作曲线与

溶剂标准曲线进行了比较，所以在后续的定量残留分析实验中，为了排除基质的干扰，获得更为精确的实验结果，实验中使用的定量曲线均为工作曲线。具体工作曲线绘制步骤见 2.2.7。

表 2-3 列出了红霉素、罗红霉素和替米考星的工作曲线的参数。各化合物在 1~150 μg/kg 范围内线性相关系数 R^2>0.995，线性关系良好。该工作曲线可靠，能够用于水产品中红霉素、罗红霉素和替米考星 3 种大环内酯类抗生素的定量研究。

表 2-3 大环内酯类抗生素的工作曲线、相关系数、检出限和定量限

Table 2-3 Calibration data, LOD, and LOQ of the MALs

化合物 Analyte	工作曲线 (y = ax + b) a	b	相关系数 R^2	线性范围 (μg/kg)	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
红霉素（ERY）	3.11E+04	1624.16	0.998	1-150	0.43	1.32
罗红霉素（ROM）	1.18E+04	305.40	0.999	1-150	0.52	1.65
替米考星（TIL）	3.32E+03	-1032.69	0.995	1-150	0.41	1.25

2.3.8.2 检出限和定量限

实验根据 2.2.8 的四个低浓度的质谱图（图略），依据 3 倍信噪比（S/N）计算出检出限(LOD)，依据 10 倍信噪比（S/N）计算出定量限(LOQ)。具体检出限、定量限值见表 2-3。3 种大环内酯类抗生素的检出限在 0.41~0.52 μg/kg 范围内，定量限在 1.25~1.65 μg/kg 范围内。

2.3.8.3 回收率

回收率实验中，对 3 种大环内酯类抗生素在 10，25，75 μg/kg 三个浓度水平下做标准添加检测实验，实验数据见表 2-4。

表 2-4 三个浓度水平下大环内酯类化合物的回收率

Table 2-4 Recoveries of MALs at three different spiking level

化合物	10 μg/kg		25 μg/kg		75 μg/kg	
Analytes	回收率(%)	RSD（%）	回收率(%)	RSD（%）	回收率(%)	RSD（%）
红霉素（ERY）	93.1	4.2	95.8	3.7	96.6	5.8
罗红霉素(ROM)	90.2	6.5	98.2	5.3	97.5	4.9
替米考星（TIL）	87.4	3.9	90.3	6.2	93.8	4.1

3 种药物在 10，25 和 75 μg/kg 三个水平下回收率表现优异。除了在 25 μg/kg 水平下，替米考星的回收率低于 90%，在其他 3 个添加水平下，3 种药物的回收率均大于 90%。总体来看，3 中添加的平均回收率位于 87.4%~98.2%之间，相对标准偏差位于 3.7%~6.5%，表明其重现性良好。总体而言，这些表明方法可以信

赖，能够应用于实际样品检测。

2.3.8.4 精密度

按照 2.2.9 进行精密度实验，即在加标（10，25，75 μg/kg)三个浓度水平下，研究方法的日内/日间精密度，实验数据见表 2-5。

表 2-5 大环内酯类化合物三个浓度水平下的精密度

Table 2-5 Precision of MALS at three different spiking level

化合物 Analytes	日内精密度（RSD, %, n=5）			日间精密度（RSD, %, n=6）		
	10 μg/kg	25 μg/kg	75 μg/kg	10 μg/kg	25 μg/kg	75 μg/kg
红霉素（ERY）	4.3	3.8	5.6	5.2	6.1	5.2
罗红霉（ROM）	4.0	6.3	4.5	4.2	7.8	5.6
替米考星（TIL）	6.8	5.5	5.1	8.5	5.9	6.3

对表分析可知 MALs 的日内精密度位于 3.8%~6.8%。日间精密度位于 4.2%~8.5%之间。这表明方法的稳定性良好，实验数据重现性好，符合定量分析检测要求。

2.4 方法的应用

应用本实验建立的水产品中大环内酯类抗生素的检测方法，对市售的 10 个批次草鱼样品中 3 种大环内酯类抗生素进行了定量分析与检测。10 个批次的草鱼样品（S1-S10）分别购自杭州翠苑农贸市场和物美超市。对每个批次的样品均按照建立的 MSPE 方法进行样品前处理，采用工作曲线定量计算。所得结果见表 2-6，只有 2 个批次草鱼样品中有小于定量限（LOQ）的微量残留检出，分别为红霉素和罗红霉素。其中批次 6 同时检出红霉素和罗红霉素。该检测结果再次验证了方法的有效性，也表明这 3 种大环内酯抗生素在水产养殖业的减少使用或不使用。

表 2-6 实际样品中所检测到 3 种大环内酯类抗生素的浓度(μg/kg)

Table 2-6 Concentration (μg/kg) of three MALs detected in real samples

化合物 Analyte	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
红霉素（ERY）	nd [a]	nd	nd	nd	nd	<MLOQ	nd	nd	nd	nd
罗红霉素（ROM）	<MLOQ [b]	nd	nd	nd	nd	<MLOQ	nd	nd	nd	nd
替米考星（TIL）	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

[a]：未检出(not detected)；[b]：低于定量限(lower than method limit of quantification)

2.5 小结

本实验采用碱性溶液中共沉淀的方法制备磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）并将其作为磁性固相萃取的吸附剂建立了水产品中大环内酯类残留检测的 HPLC-MS/MS 定量检测分析方法。通过透射电子显微镜对合成的磁性石墨烯纳米材料进行结构表征。定量分析实验中以草鱼肉作为基质对所建立方法进行方法学的验证，在 1~150 μg/kg 范围内线性相关系数 R^2>0.995，表明建立的方法具有良好的线性关系，可以在此范围内进行定量分析使用；同时在 10、25、75 μg/kg 三个添加水平对方法的回收率和精密度进行验证实验，结果表明开发的方法具有操作简便，回收率高的特点。这也进一步表明以 G-Fe_3O_4 作为吸附剂的磁性固相萃取适用于水产品中残留的定量分析研究。

第 3 章 鱼肉中 5 种磺胺残留的提取优化及 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析研究

近年来，磺胺类药物（SAs）作为常见的合成抗菌药物被广泛应用于水产养殖业[85]。但这种广泛使用也带来了很多新的问题，如毒性反应、二重感染、细菌耐药性的产生以及危害人体健康等不良后果[86]。因此，各国（如美国、欧盟、中国）对磺胺的使用均作出严格的限量规定。美国、欧盟规定磺胺类药物总量在食品中不得超过0.1 mg/kg；我国亦同样规定磺胺类药物残留总量不得超过0.3 mg/kg[87-89]。

目前，食品、饮用水和饲料中磺胺残留分析检测方法很多，主要包括薄层色谱法[90]、高效液相色谱法[91-92]以及液相色谱质谱联用法[93-95]。其中，液相色谱质谱联用法凭借其高灵敏度、高分辨率等优点，已成为食品分析室用于监测食品基质中（如鱼、虾、贝壳类等水产品）化学残留物的主要检测技术[96]，然而，液相色谱谱联用也对上机样品液有要求，故需要合适的前处理方法对样品进行提取，富集、净化等。

磁性固相萃取（MSPE）成功应用于水产品中大环内酯类抗生素的残留检测充分表明，在比较复杂的水产品基质中，MSPE 能够作为一种有效的前处理手段。但水产品样品的提取溶剂氮吹耗时较长需进一步改善。因此本章节以磺胺类药物作为目标化合物，并通过优化磺胺类药物在鳊鱼样品中提取与净化程序，获得更加合理高效的MSPE前处理步骤，同时经由HPLC-MS/MS实现水产品中五种磺胺类药物的定量分析。

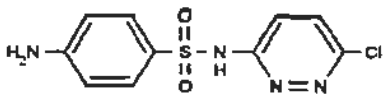
3.1 试剂与仪器

3.1.1 材料

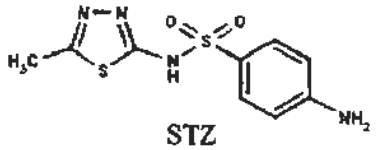
石墨烯、磁性石墨烯自制；多壁碳纳米管购于深圳市纳米港有限公司；3 mL 固相萃取空柱、筛板、C18 小柱购于上海安谱公司；实验用鳊鱼购自杭州农贸市场及物美超市。

磺胺氯达嗪（Sulfachloropyridazine, SCP），磺胺甲恶唑（Sulfamethoxazole, SMX）、磺胺甲噻二唑(Sulfamethizole, STZ)、磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SMZ)

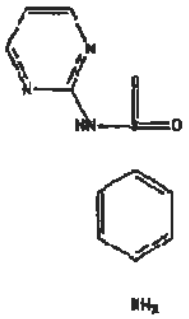
磺胺嘧啶（Sulfadiazine, SDZ）均购买自 Sigma 公司，纯度大于 98%。其结构式见图 3-1。



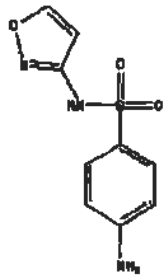
SCP



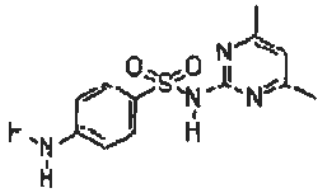
STZ



SDZ



SMX



SMZ

图 3-1 5 种磺胺类化合物的化学结构式

Figure 3-1 Chemical structures of five SAs

3.1.2 主要试剂

甲醇、乙腈：HPLC 级，购自德国 Merck 公司。

甲酸、甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮：均为 HPLC 级，购自美国 Tedia 公司。

氯化钠、浓氨水、正己烷、乙酸：分析纯，购自杭州常盛科教器具厂。

3.1.3 仪器设备

高效液相色谱仪	Transcend II，美国 Thermo Fisher 公司
质谱仪	TSQ Quantum Ultra™，美国 Thermo Fisher 公司
固相萃取装置	Milford Massachusetts，Waters 公司
电子天平	METTLER-AG135，美国 METTLER 公司

MilliQ 纯水系统	Direct-Q™ 5 超纯水系统，密理博公司
涡旋振荡器	XW 80A，上海医科大学仪器厂
组织匀浆机	ULTRA TURRAX T25 型均质器，IKA
旋转蒸发仪	SHB-III，郑州长城科工贸有限公司
氮吹仪	DSY-II 型，北京金科精华苑技术研究所
高速冷冻离心机	Sorvall RC 6 Plus 型，Thermo 公司
超声提取仪	KQ-500E，昆山超声仪器有限公司

3.2 实验方法

3.2.1 溶液的配制

标准储备液：准确称取磺胺氯达嗪（SCP）、磺胺甲恶唑（SMX）、磺胺甲噻二唑（STZ）、磺胺二甲嘧啶（SMZ）和磺胺嘧啶（SDZ）标准品 10 mg，用甲醇溶解并分别定容至 10 mL，标准储备液浓度为 1 mg/mL。放入冰箱中避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 6 个月。

混合标准使用液：准确移取标准储备液 100 μL，用甲醇稀释并在室温下定容至 10 mL，混匀。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 3 个月。

混合标准工作液：准确移取混合标准使用液 5 mL，用甲醇稀释并定容至 50 mL。各组分含量为 1 μg/mL。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 3 个月。

混合标准曲线使用液：取混合标准工作液分别为 0.05、0.25、0.50、1.25、3.75、5.00 mL 于 10 mL 的容量瓶，用甲醇定容后配置成浓度分别为 5、25、50、125、375、500 ng/mL。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 1 个月。

3.2.2 样品预处理

将市售的鲜活鳊鱼样品（购于本地市场）去头、尾、骨、鱼鳞、内脏等，取干净的鱼肉部位切成块状，置于匀浆机中搅打成鱼糜状，冷藏于-18℃冰箱。

准确称量 1.00 g（精确 0.01 g）解冻后鳊鱼肉糜，置于加有 5 g NaCl 的 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 二氯甲烷，涡旋 1 min、超声 15 min，6000 rpm/min 离心 3 min，取上清液于 50 mL 的离心管，对残渣重复提取一次，合并两次的上清液，得到样品提取液。然后对提取液减压蒸馏，蒸干后再复溶于 5 mL 的甲苯作为样品液。

3.2.3 磁性固相萃取

依次用 3 mL 丙酮、去离子水、甲醇清洗 20 mg 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4），随后将其加入盛有 5 mL 样品液的 15 mL 离心管中，涡旋 5 min，静置萃取 5 min。萃取结束后，磁铁分离 G-Fe_3O_4 和澄清溶液；将 G-Fe_3O_4 全部转移到 1.5 mL 小离心管中。加入 1.0 mL 甲醇/氨水（98:2, v:v）甲醇涡旋 1.5 min 进行解吸，磁铁分离解吸液和 G-Fe_3O_4，重复 3 次。3 次的解吸液合并后于温和氮气流吹干，复溶于 1 mL 的 0.1%甲酸水：乙腈（v:v, 70:30），过 0.22 μm 有机滤膜，HPLC-MS/MS 分析。回收的 G-Fe_3O_4 用 3 mL 丙酮、去离子水、甲醇各清洗 2 次，回收使用。

3.2.4 色谱条件

色谱柱：YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱（150 mm×4.6 mm, 3 μm）。

流动相 A：0.1%甲酸水溶液；流动相 B：乙腈；进样量：10 μL；柱温：30 ℃；梯度洗脱程序见表 3-1。

表 3-1 磺胺类化合物液相色谱梯度洗脱程序

Table 3-1 The gradient elution program of SAs

时间（min）	流速 mL/min	A（%）	B（%）
Initial	0.4	70	30
1	0.4	70	30
8	0.4	10	90
9	0.4	70	30
10	0.4	70	30

3.2.5 质谱条件

电离模式：ESI；

扫描方式：正离子；

喷雾电压：3200 V；

检测方式：SRM 模式；

气化温度：300 ℃；

壳气：高纯氮气，50 Arb；

辅助气：高纯氮气，20 Arb；

碰撞气：高纯氩气，1.5 mTorr；

毛细管温度：270 ℃；

检测5种磺胺类化合物离子对信息见表3-2。

表3-2磺胺类化合物的质谱优化参数

Table 3-2 Optimized MS/MS parameters of SAs

化合物 Analytes	保留时间 t_R /min	离子对 m/z	碰撞电压 CE
磺胺氯达嗪 SCP	8.27	285.0/156.0*	16
		285.0/92.0	29
磺胺甲恶唑 SMX	8.55	254.0/156.0*	17
		254.0/108.0	25
磺胺甲噻二唑 STZ	7.32	271.0/156.0*	15
		271.0/108.0	26
磺胺二甲嘧啶 SMZ	7.54	279.1/186.0*	18
		279.1/124.1	28
磺胺嘧啶 SDZ	6.58	251.0/156.0*	16
		251.0/108.1	23

*：定量离子对。

3.2.6 标准曲线和工作曲线绘制

标准曲线：将 6 个浓度（5、25、50、125、375、500 ng/mL）混合标准曲线使用液用 0.1%甲酸水：乙腈（v:v, 70:30）分别稀释 5 倍，获得 1、5、10、25、75、100 ng/mL 六个浓度，HPLC-MS/MS 检测，每个浓度重复测定三次，拟合对应浓度与峰面积（峰面积为横坐标），绘制成标准曲线，得出相关系数。

工作曲线：将 6 个浓度（5、25、50、125、375、500 ng/mL）混合标准曲线使用液用空白基质液（按照 3.2.2 和 3.2.3 步骤处理后得到的提取液，不含磺胺类药物的基质液）稀释 5 倍，即成 1、5、10、25、75、100 μg/kg 六个浓度，HPLC-MS/MS 分析，每个浓度重复测定三次，拟合对应浓度与峰面积（峰面积为纵坐标），绘制成标准曲线，得出相关系数。

3.2.7 检出限与定量限

在空白鱼肉中添加混合标准溶液使其为 0.5、1、5、10 μg/kg 四个添加水平，按照 3.2.2 和 3.2.3 中前处理样品后，HPLC-MS/MS 检测，每个浓度测定三次，分别以信噪比（S/N）等于 3 和 10 计算检出限（LOD）和定量限（LOQ）。

3.2.8 回收率和精密度实验

在空白鱼样品中（1 g±0.01 g）加入 0.2 mL 浓度分别 50、125、375 ng/mL 磺胺类标准液，使其添加水平为 10、25、75 μg/kg，然后按照 3.2.2 和 3.2.3 进行

样品处理后进 HPLC-MS/MS 检测，依据工作曲线定量。回收率计算方式同 2.2.9 所述。

分别在 10、25、75 μg/kg 三个浓度水平添加量下进行日内和日间精密度实验。分别一天内平行测定六次得日内精密度、连续测定三天共三次得日间精密度，计算相对标准偏差获得精密度值。

3.3 结果与讨论

3.3.1 HPLC-MS/MS 条件的优化

根据磺胺类化合物的分子结构和文献报道[97]，磺胺类化合物在电喷雾离子源（ESI）的正离子模式下发生离子化，而一定比例的甲酸可以提升化合物离子化效率，故实验采用 0.1%甲酸水作为水相。此外，本实验还比较了水相与有机相（甲醇、乙腈）不同组合对磺胺类化合物进行洗脱的出峰时间，结果表明有机相选定为乙腈时出峰快且峰形美观，因此有机相被确定为乙腈。然后针对磺胺类化合物优化其流动相比例，最后发现梯度洗脱出峰速度快，且峰形对称美观，梯度洗脱程序见表 3-1。按此梯度程序最后获得的 5 种磺胺类化合物的萃取离子流谱图见图 3-2。

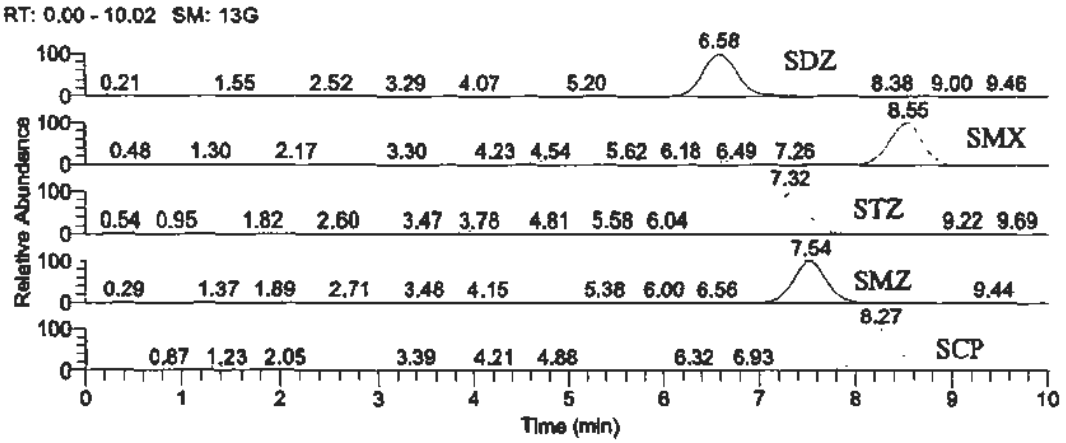


图 3-2 HPLC-MS/MS 条件优化下 5 种磺胺标准溶液的萃取离子流色谱图

Figure 3-2 XIC for standard of five SAs under optimized HPLC-MS/MS conditions

将混合标准使用液用 0.1%甲酸水稀释至约 5 μg/mL 在 ESI 正离子模式下 Q1 全扫描确定母离子，然后调节离子化温度、喷雾电压、透镜补偿电压、碰撞电压（CE）等参数，选出强度最强，离子化集中的两个子离子作为定量、定性离子对，同时选择子离子强度最高时的碰撞电压作为该子离子的最佳碰撞电压。磺胺

类化合物子离子扫描质谱图如图 3-3 所示。经仪器优化后，磺胺类化合物的最佳母离子、子离子、保留时间和碰撞电压如表 3-2 所示。

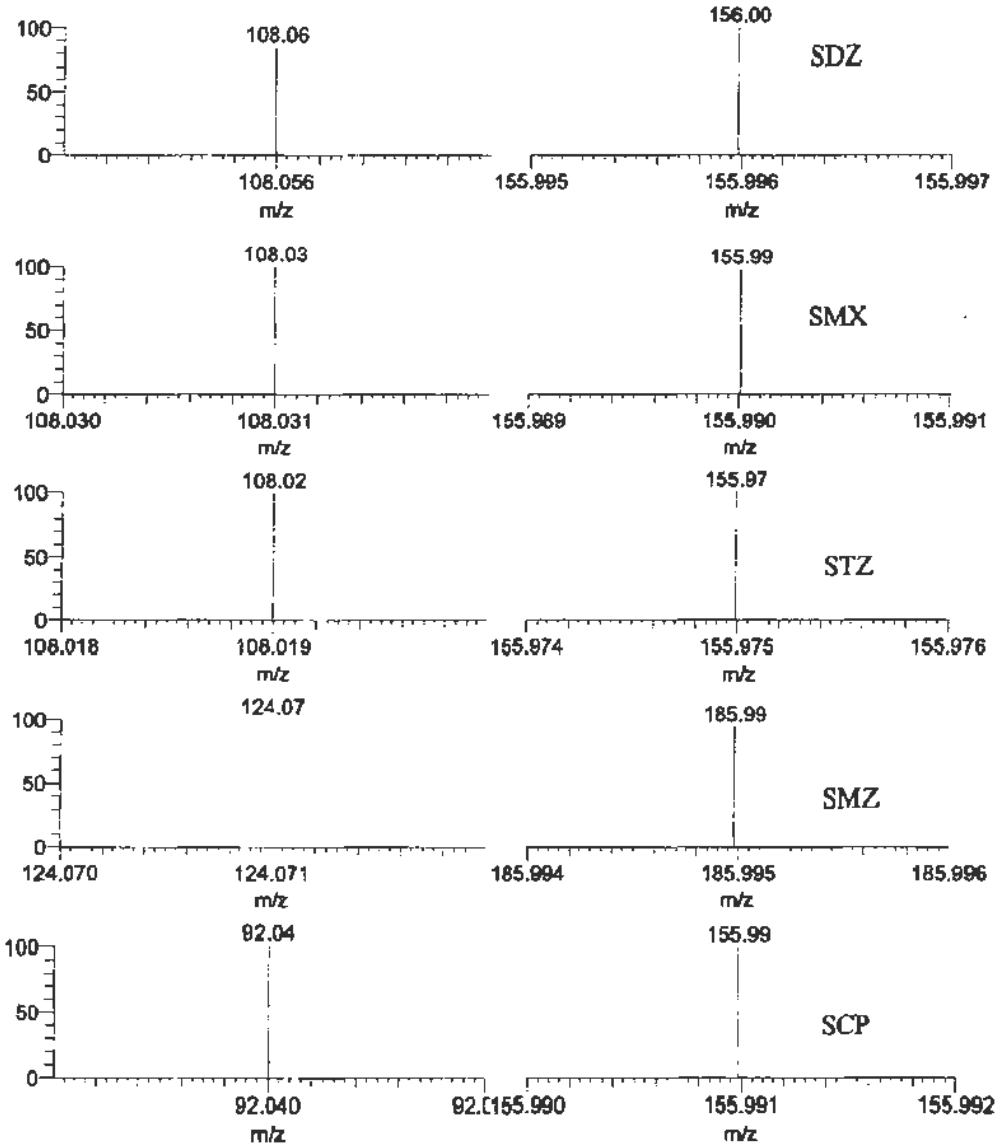


图 3-3 5 种磺胺类化合物的子离子扫描图

Figure 3-3 Product ions scan spectra of five SAs

3.3.2 提取与复溶溶剂的优化

上述研究表明，从样品中提取目标化合物是一个比较费时的步骤，尤其类似于上一章节 2.2.3 样品前处理程序，提取液甲醇（约 20 mL）需要氮吹干。虽然最后的提取效果令人满意，但由于耗时过长，导致实验进程缓慢。考虑到实验的整体简便与高效性，本小节实验设计选用出一种新的提取溶剂，这种溶剂必须满足以下两个条件：首先能够将 5 种磺胺类化合物从鳊鱼肉糜中提取出来，其次还必须满足容易氮吹干或者减压蒸干的特性，通过对磺胺类化合物的极性以及常见

的提取溶剂物理化学性质的考量，最后选定二氯甲烷作为最后的提取溶剂，并且将浓缩步骤由氮吹改为减压旋蒸，相比于 2.2.3 中的鱼肉糜样品提取步骤中前处理时间缩短了约 20 min，在获得优良提取效果的同时，也满足了简便高效的提取要求。

复溶作为磁性固相萃取（MSPE）前的一个步骤，也是前处理中至关重要的步骤。一方面复溶溶剂需要使目标化合物均匀分散于溶液中，另外还需要保证 MSPE 萃取过程中目标化合物能够被完全萃取，同时不引入其他杂质的干扰。实验中为了取得最佳的复溶溶剂，通过在空白鳊鱼样品中加标使其添加水平为 50 μg/kg，平行三组（由于待检测的 5 种磺胺类化合物无较大差异，本实验以磺胺氯达嗪（SCP）、磺胺甲恶唑（SMX）和磺胺嘧啶（SDZ）为例，下同），然后按照 3.2.2 处理后，分别复溶于甲苯、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、甲醇，然后再按照 3.2.3 处理净化（磁性萃取过程均选取为 10 min），经由 HPLC-MS/MS 分析，得出回收率与复溶溶剂的柱状图，如图 3-4 所示。由图可知，萃取相同时间的前提下，不同的复溶溶剂回收率各有不同，其中以甲苯的回收率最高，达到 90%以上，其他的四种溶剂复溶后，目标化合物的回收率均未达到 90%。可能是由于甲苯作为复溶溶剂时，更少的溶解非目标化合物，同时其作为溶剂能够使磁性石墨烯在相同的时间（10min）进行最大程度的吸附，从而保证了高效的前处理过程，因此最后选用甲苯作为复溶溶剂。

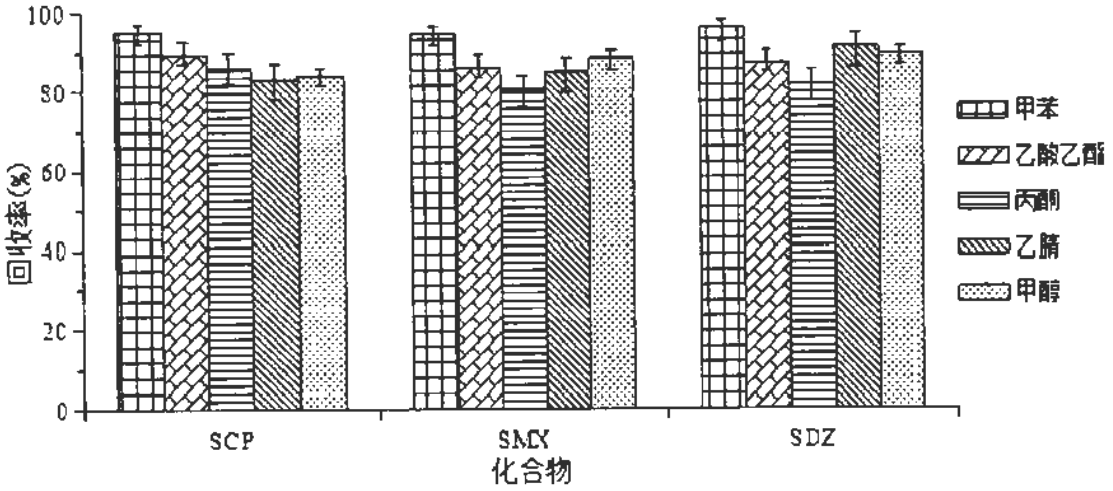


图 3-4 不同复溶溶剂对磺胺类化合物回收率的影响（以磺胺氯达嗪、磺胺甲恶唑和磺胺嘧啶为例）

Figure 3-4 The effect of the dissolution solvent type on the recovery of of SAs (SCP, SMX and SDZ were taken as model analytes)

3.3.3 磁性固相萃取条件的优化

上述研究表明在不同的溶剂中，磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）均能够对磺胺类（SAs）化合物实现有效的吸附，这也证实了以 G-Fe_3O_4 为吸附剂磁性固相萃取（MSPE）提取净化磺胺类化合物的可能性。故本小节通过优化磁性固相萃取过程中的几个关键因素，进而获得最佳的鱼肉中磺胺残留检测的 MSPE 前处理条件。

实验设计空白鳊鱼样品中加标为 50 μg/kg，按照 3.2.2 和 3.2.3 处理加标后样品。对 MSPE 过程中关键因素如磁性吸附剂的用量、萃取时间及解吸液的种类进行优化。

3.3.3.1 磁性石墨烯用量优化

实验共设计 5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg 共 5 个用量水平，考察其对磺胺类化合物萃取的的最佳使用量。实验结果如图 3-5 所示，磁性石墨烯的使用量从 5 mg 增加到 20 mg，目标化合物的回收率急剧增大；从 20 mg 到 25 mg，目标化合物的回收率略有降低，5 个用量水平中，20 mg 磁性石墨烯对应的回收率最高，位于 95%附近。故本实验中 MSPE 的吸附剂磁性石墨烯最佳用量确定为 20mg。

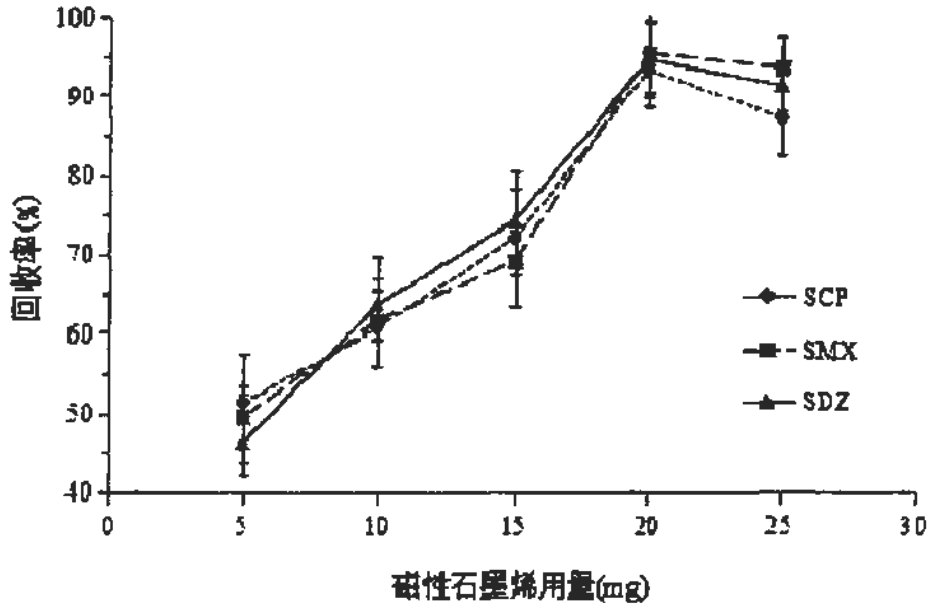


图 3-5 磁性石墨烯用量对磺胺类化合物回收率的影响

Figure 3-5 The effect of the amount of G-Fe_3O_4 on the recovery of SAs

3.3.3.2 萃取时间优化

实验整体考察了 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 共计 6 个水平下磺胺类化合物回收率的情况。结果如图 3-6 所示，萃取时间从 5 min 增加至 10 min 时，回收率急剧增大到 95%左右；其后随着萃取时间的增加，回收率又呈现缓慢下降趋势，甚至最后萃取时间为 30 min 时，目标化合物的回收率要低于 5 min 萃取时间目标化合物的回收率。这一方面验证了磁性石墨烯的快速吸附性能，证明了吸附材料的优越性；一方面也表明，过长时间的吸附，使其目标化合物的吸附程度增强，增加了洗脱难度。所以，本实验最佳的萃取时间确定为 10 min。

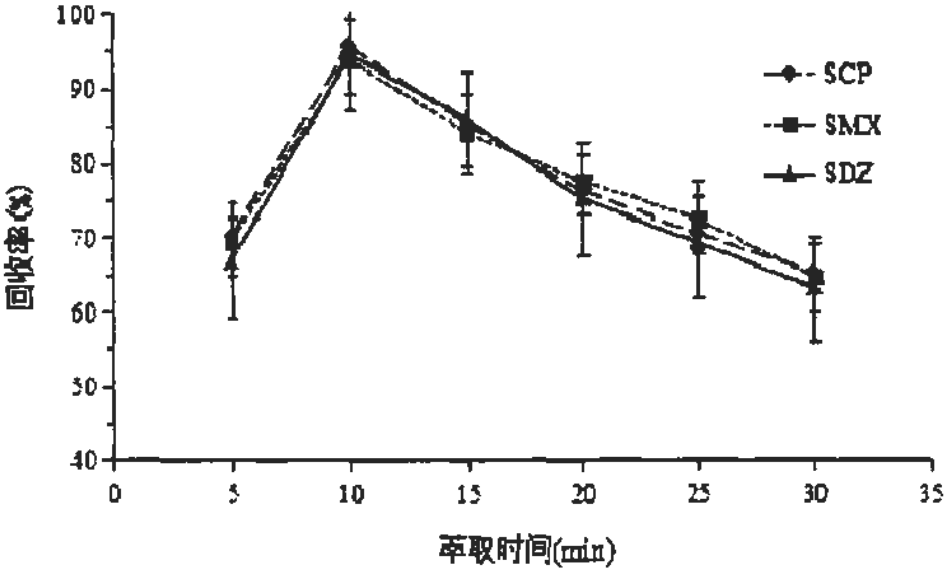


图 3-6 萃取时间对磺胺类化合物回收率的影响

Figure 3-6 The effect of the extraction time on the recovery of SAs

3.3.3.3 解吸液的优化

实验综合考虑磺胺类化合物的酸碱性、极性等化学性质，进而分以下几个步骤考虑解吸液的选用。先从常见解吸溶剂甲醇、乙腈中选取较为合适的解吸液；其次通过对选取的有机溶剂加乙酸和氨水，赋予其酸碱特性，考察酸碱性对回收率的影响；最后再通过添加不同浓度的酸或碱来选取最合适的解吸液。按照这种方法，最后实验设计的解吸液为乙腈、甲醇、甲醇/乙酸（99:1, v:v）、甲醇/氨水（99:1, v:v）、甲醇/氨水（98:2, v:v）、甲醇/氨水（97:3, v:v）。

解吸液的种类与回收率的对应结果见图 3-7，不同解吸液对磺胺类化合物的回收率有很大影响。与甲醇相比，乙腈作为解吸液回收率明显较低，三种磺胺类

化合物的回收率均低于60%(甲醇作为解吸液三种磺胺类化合物的回收率为70%左右),所以有机溶剂首先选定为甲醇;通过向甲醇中分别添加1%的乙酸和氨水,发现添加氨水的甲醇解吸的回收率明显要更高,所以选用添加氨水作为解吸液;最后对添加氨水的比例做了优化,设计了甲醇/氨水(99:1, v:v)、甲醇/氨水(98:2, v:v)、甲醇/氨水(97:3, v:v)三个比例的氨水添加量,最后表明甲醇/氨水(98:2, v:v)作为解吸液,三种化合物的回收率均处于最大值,所以本实验选用甲醇/氨水(98:2, v:v)作为解吸液。

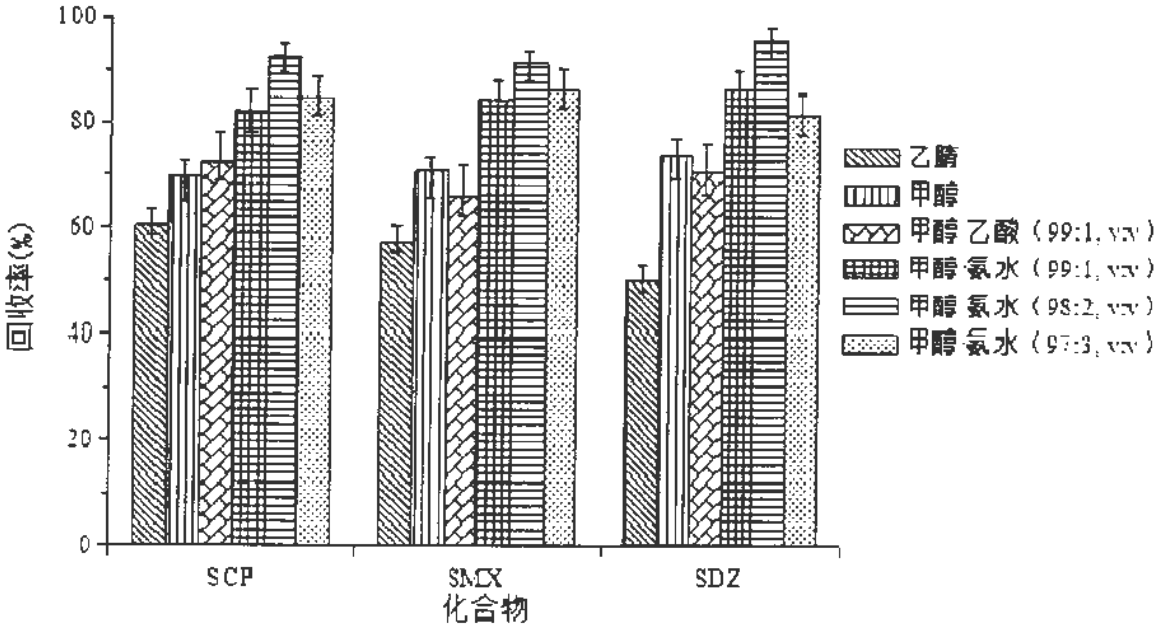


图 3-7 不同解吸液对磺胺类化合物回收率的影响

Figure 3-7 The effect of the eluent type on the recovery of of SAs

3.3.4 与传统固相萃取的对比研究

目前研究磺胺类残留的高效液相分析一般是采用 C18 等反相柱做前处理[98-99],即传统的固相萃取(SPE)技术。因此实验设计基于磁性石墨烯(G-Fe_3O_4)的磁性固相萃取(MSPE)、基于C18小柱SPE、基于多壁碳纳米管(MWCNTs)SPE与基于石墨烯(G)SPE共四种前处理手段。通过与传统固相萃取做对比研究(各种前处理方法均在最优条件下)验证磁性石墨烯作为 MSPE 吸附剂的优越性。结果如图3-8所示,基于磁性石墨烯的MSPE对磺胺类化合物的回收率最高,基于石墨烯的SPE回收率略低于MSPE前处理方法,基于多壁碳纳米管的SPE回收率最低。实验中发现,基于石墨烯和磁性石墨烯材料的前处理方式回收率均有不俗的表现,反映出了石墨烯材料的良好吸附性能。

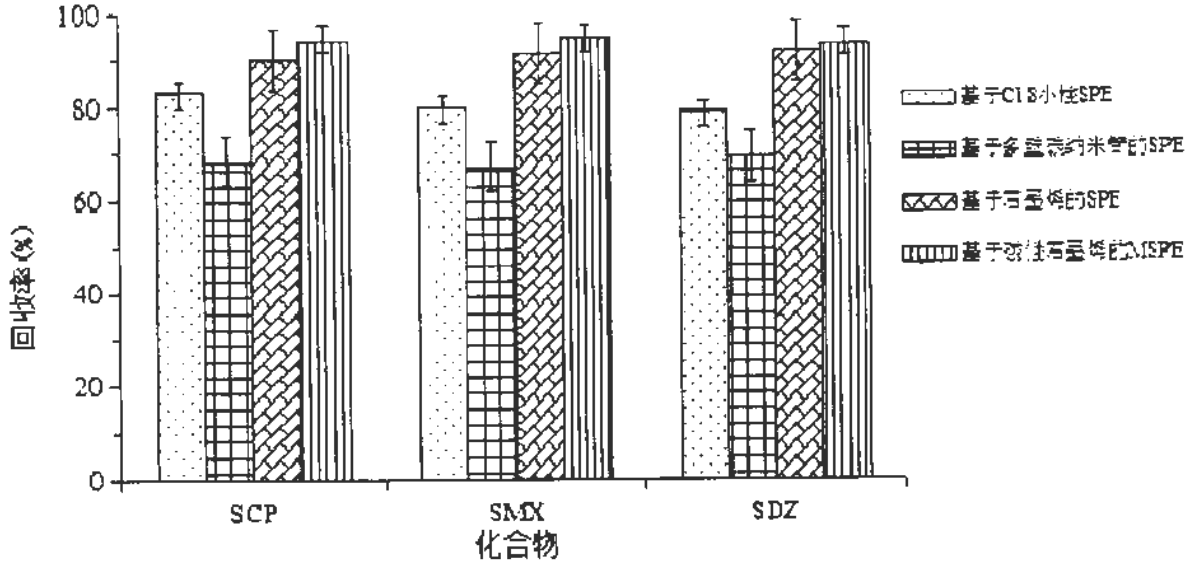


图 3-8 磁性石墨烯的 MSPE 与其他吸附剂的 SPE 萃取效果比较（均在各自优化条件下）

Figure 3-8 Comparison of G-Fe_3O_4 based on MSPE with other absorbents based on SPE (The extraction conditions were optimized for all sorbents)

3.3.5 基质效应

基质效应在最后的 HPLC-MS/MS 分析中会对离子对丰度比、检测方法灵敏度、分析仪器的稳定性等造成不良影响，进而使定量分析的数据失真（如呈现假阴、假阳性等），故实验中基质效应的考察是定量分析中不可缺少的一个重要环节。实验中基质效应通过标准曲线和工作曲线对比来阐明[100]。曲线的配制方法按照 3.2.6 进行。

基质效应（%ME）结果见表 3-3，%ME 值参考 2.3.7 中公式计算获得。从表中可以直观看出，除了磺胺氯达嗪的基质效应值等于 100，其余化合物的基质效应值均小于 100，这说明该方法处理样品后，磺胺类化合物大多表现为基质抑制效应，其中观察到磺胺嘧啶的基质效应值最小为 87，表明磺胺嘧啶的试剂标准曲线与工作标曲的斜率偏差仍控制在可接受的 15%范围内，这反映样品中可能带来基质干扰的物质在前处理过程中已经被较好地除去，进一步验证了磁性固相萃取（MSPE）前处理方法的优异。

3.3.6 方法学验证

3.3.6.1 工作曲线

基质效应的评估表明，实验中采取工作曲线定量分析，所得的结果更加真实可信。以目标物峰面积作为纵坐标，所对应的浓度（μg/kg）为横坐标绘制工作曲线，工作曲线和相关系数见表 3-3。五种磺胺类化合物残留在 1~100 μg/kg 范

围内线性相关系数均大于 0.992，线性关系良好，表明工作曲线可靠。

表 3-3 磺胺类化合物的标准曲线、工作曲线、相关系数以及基质效应(%ME)等评估参数
Table 3-3 Evaluation of matrix effects: comparison of the calibration curves slopes and matrix effects (%ME) for the studied SAs

化合物 Analytes	斜率/截距		相关系数(R^2)		基质效应（%ME）
	标准溶液 [a]	工作溶液	标准溶液	工作溶液	
磺胺氯达嗪 SCP	9914/-330	9952/-125	0.999	0.997	100
磺胺甲恶唑 SMX	8459/-37	7701/160	0.991	0.999	91
磺胺甲噻二唑 STZ	11244/430	10695/43	0.993	0.997	95
磺胺二甲嘧啶 SMZ	29100/12459	26176/62451	0.995	0.999	90
磺胺嘧啶 SDZ	11769/-786	10213/1716	0.993	0.992	87

注：[a]：0.1%甲酸水/乙腈（v:v, 70:30）

3.3.6.2 检出限和定量限

方法的检出限（LOD）和定量限（LOQ）是仪器检测过程中验证方法学时必须设计的一个步骤。操作一般是通过基质液稀释标曲所得的出峰谱图计算得出的，实验中，定量分析的浓度应处在定量限之上，才能得出所检测的残留的精确量。各种加标的鳊鱼样品按照 MSPE 处理后，检出限和定量限值见表 3-4。由表可知，该方法得到的检出限和定量限分别在 0.34~0.49 μg/kg 和 1.12~1.47 μg/kg 范围内，说明该方法具有较高的灵敏度，适用于水产品中磺胺类的残留分析。

表 3-4 磺胺类残留的加标回收率、检出限以及定量限
Table 3-4 Recovery, LOD, and LOQ values for SAs

化合物 Analytes	回收率(%)±RSDs			检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
	10(μg/kg)	25(μg/kg)	75(μg/kg)		
磺胺氯达嗪 SCP	87.3	82.5	92.3	0.36	1.19
磺胺甲恶唑 SMX	92.5	101.3	95.4	0.38	1.25
磺胺甲噻二唑 STZ	88.9	79.2	85.4	0.43	1.42
磺胺二甲嘧啶 SMZ	88.4	85.2	92.1	0.49	1.47
磺胺嘧啶 SDZ	90.1	79.8	87.5	0.34	1.12

3.3.6.3 回收率和精密度

在回收率实验中，通过对空白鱼肉中加入磺胺标准液，添加水平分别为 10、25、75 μg/kg。实验得回收率和精密度数据见表 3-4，5 种磺胺类化合物回收率总体位于 79.2%~101.3%，位于 70%~120%的范围内，说明方法的可信度较高，可以应用于实际样品的检测。

按照 3.2.8 进行精密度实验，即加标 (10，25，75 μg/kg)三个浓度水平，一天之中测定 6 次，平行测定 3 天，分别求其相对标准偏差值计算出方法的日内/日间精密度，实验数据见表 3-5。对表分析可知磺胺类化合物的日内精密度位于 2.6%~6.2%，且明显低浓度的精密度值要更大一些，也符合实验的常见规律。从日间精密度来看，数值均小于 10%，其中最大为 9.2%，最小值为 3.7%。这反映出新开发的方法具有良好的重现性，在实际样品的分析检测中也能够被有效使用。

表 3-5 磺胺类化合物在三个加标浓度下的方法精密度

Table 3-5 Method precision at three different concentration levels

化合物 Analytes	日内精密度 (RSD%, n=6)			日间精密度 (RSD%, n=3)		
	10(μg/kg)	25(μg/kg)	75(μg/kg)	10(μg/kg)	25(μg/kg)	75(μg/kg)
磺胺氯达嗪 SCP	2.6	4.3	5.2	3.7	5.4	6.2
磺胺甲恶唑 SMX	6.2	3.6	4.6	9.2	5.5	5.4
磺胺甲噻二唑 STZ	4.0	3.9	2.7	4.8	5.9	5.1
磺胺二甲嘧啶 SMZ	3.5	4.1	3.7	6.8	7.4	5.7
磺胺嘧啶 SDZ	4.2	5.1	3.3	5.6	4.2	6.1

3.4 方法的应用

应用实验中建立的方法，对市售的 10 个批次草鱼样品中 5 种磺胺类化合物进行了定量分析。10 个批次的草鱼样品分别购自杭州翠苑农贸市场和物美超市。每个批次的样品均通过优化后的最佳磁性固相萃取进行前处理，采用工作曲线定量计算样品中 5 种磺胺类化合物的含量。具体含量检测结果见表 3-6，根据表可知，只有两个批次有磺胺类药物检出，且第 7 批次检出 3 种药物中只有磺胺二甲

嘧啶含量高于定量限，对其复测确定其含量为 6.3 μg/kg。表明磺胺类药物的使用情况仍然存在。

表 3-6 实际样品中所检测到目标分析物的浓度(μg/kg)

Table 3-6 Concentration (μg/kg) of target analytes detected in real samples

化合物 Analytes	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
磺胺氯达嗪 SCP	nd[a]	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
磺胺甲恶唑 SMX	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
磺胺甲噻二唑 STZ	nd	nd	<MLOQ[b]	nd	nd	nd	<MLOQ	nd	nd	Nd
磺胺二甲嘧啶 SMZ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	> MLOQ[c]	nd	nd	Nd
磺胺嘧啶 SDZ	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<MLOQ	nd	nd	Nd

[a]：未检出(not detected)；[b]：低于定量限(lower than method limit of quantification)

[c]：高于定量限（higher than method limit of quantification）

3.5 小结

本实验对鱼肉样品中磺胺残留的提取方法进行优化并建立 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析方法。实验选用能够提取目标化合物且易挥发的有机溶剂二氯甲烷作为提取液，通过比较不同极性复溶溶剂对回收率的影响得到最佳的复溶溶剂甲苯，对磁性固相萃取的关键步骤进行优化，得出最佳的磁性石墨烯用量 15 mg、萃取时间 10 min 及解吸液甲醇/氨水（98:2, v:v），建立的方法具有操作简便、重复性好及精确度高的特点。本实验通过在鳊鱼肉中添加 10、25 和 75 μg/kg 作为方法学验证的实验样品，实验过程中采用工作曲线进行定量计算，3 种添加水平下回收率处于 79.2%~101.3%之间，且日内/日间精密度均小于 10%，采用 HPLC-MS/MS 定量分析，5 种鱼肉中化合物经处理后基质效应大大减弱，也验证了所建立的定量分析方法的有效与准确性。

第4章 MSPE-HPLC-MS/MS同时测定水产品中12种喹诺酮类药物的方法研究

喹诺酮类药物（QNs）抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透力强，是一类有巨大潜力的新型抗菌药，且其化学合成药物价格低廉且疗效显著，被广泛用于动物的多种感染性疾病的预防和治疗[12-13]。但随着该药物的大范围使用，其在水产品中的残留便不可避免，这些残留的药物会导致耐药致病菌的大量产生，人类通过食物链感染后，便可能患上难以治愈的疾病。近年来，水产品中喹诺酮的残留已经引起了广泛的关注[101-102]。因此，开展水产品中喹诺酮类药物的残留监控，保障食品安全已是当务之急。

目前国内外有关喹诺酮类药物检测报道较多[103-104]，但关于水产品中该药物的相关报道[105-106]还不多见。究其原因，很可能与水产品基质的复杂性有关。在上两个章节中，我们引入并优化了磁性固相萃取（MSPE）前处理方法，最后在样品前处理过程中展现出良好的净化效果，尤其与传统固相萃取对比发现，其操作的简便、处理的高效性上，都表现得十分优异。本实验中我们选取12种喹诺酮类药物作为目标化合物，优化影响MSPE萃取效率的关键因素，最后采用MSPE-LC-MS/MS同时进行水产品中12种喹诺酮类药物的定量分析与检测。

4.1 试剂与仪器

4.1.1 材料

石墨烯、磁性石墨烯自制；多壁碳纳米管购于深圳市纳米港有限公司；3 mL固相萃取空柱、筛板、C18小柱购于上海安谱公司；实验用鲫鱼购于杭州农贸市场、物美超市。

诺氟沙星(Norfloxacin, NOR)、依诺沙星(Enoxacin, ENO)、环丙沙星(Ciprofloxacin, CIP)、培氟沙星(Pefloxacin, PEF)、洛美沙星(Lomefloxacin, LOM)、丹诺沙星(Danofloxacim, DAN)、恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)、氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)、氟罗沙星(Fleroxacin, FLE)、司帕沙星(Sparfloxacin, SPA)、奥比沙星(Orbifloxacin, ORB)、双氟沙星(Difloxacin, DIF)、均购买自Sigma公司，纯度大于98%，其结构式见图4-1。

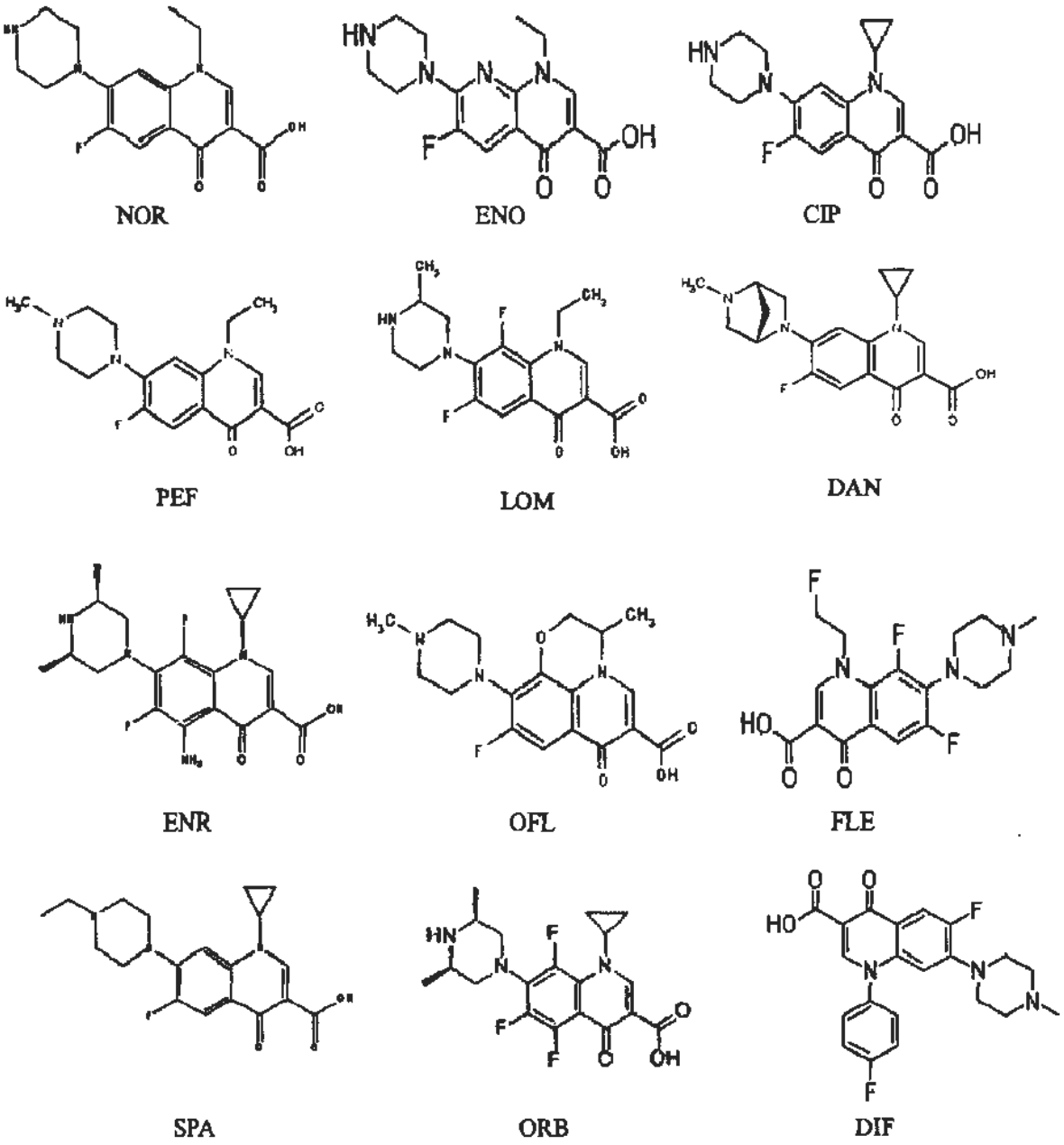


图 4-1 12 种喹诺酮类药物化学结构式

Figure 4-1 Chemical structures of twelve QNs

4.1.2 主要试剂

甲醇、乙腈；HPLC 级，购自德国 Merck 公司。

甲酸、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮：均为 HPLC 级，购自美国 Tedia 公司。

硫酸钠、浓氨水、正己烷、乙酸；分析纯，购自杭州常盛科教器具厂。

4.1.3 仪器设备

高效液相色谱仪	Transcend II，美国 Thermo Fisher 公司

质谱仪	TSQ Quantum Ultra™，美国 Thermo Fisher 公司
固相萃取装置	Milford Massachusetts，Waters 公司
电子天平	METTLER-AG135，美国 METTLER 公司
MilliQ 纯水系统	Direct-Q™ 5 超纯水系统，密理博公司
涡旋振荡器	XW 80A，上海医科大学仪器厂
组织匀浆机	ULTRA TURRAX T25 型均质器，IKA
旋转蒸发仪	SHB-Ⅲ，郑州长城科工贸有限公司
氮吹仪	DSY-Ⅱ型，北京金科精华苑技术研究所
高速冷冻离心机	Sorvall RC 6 Plus 型，Thermo 公司
超声提取仪	KQ-500E，昆山超声仪器有限公司

4.2 实验方法

4.2.1 溶液的配制

标准储备液：准确称取 12 种喹诺酮类（QNs）化合物标准品 10 mg，除洛美沙星（LOM）外 11 种化合物均用甲醇溶解并定容至 10 mL，配置成标准储备液浓度为 1 mg/mL，洛美沙星用乙腈溶解并定容至 50 mL，定容后浓度为 200 μg/mL。放入冰箱中避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 6 个月。

混合标准使用液：准确移取标准储备液为 1 mg/mL 的溶液 100 μL、洛美沙星标准储备液 500 μL 于 10 mL 的容量瓶，用甲醇稀释并在室温下定容至 10 mL，混匀。放入冰箱中避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 6 个月。

混合标准工作液：移取混合标准使用液 5 mL，用甲醇稀释并定容至 50 mL。各组分含量为 1 μg/mL。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 3 个月。

混合标准曲线使用液：取混合标准工作液分别为 0.05、0.25、0.50、1.25、3.75、5.00、7.50 mL 于 10 mL 的容量瓶，用甲醇室温下定容，定容后浓度分别为 5、25、50、125、375、500、750 ng/mL。放入冰箱避光冷藏保存(T<5 ℃)，有效期 1 个月。

4.2.2 基质溶液的配制

按照 4.2.3 处理不含喹诺酮药物残留的空白水产品样品，然后按照 4.2.4 的处理得到复溶后的溶液，即为空白基质液。重复该步骤多次，得到实验用空白基质

溶液。避光冷藏保存备用(T<5 ℃)。

4.2.3 样品预处理

类似于 2.2.3 中鱼肉样品的处理方式，将鲫鱼样品同样处理后，获得鲫鱼鱼糜，冷藏于-18℃冰箱。

准确称量 1.00 g（精确 0.01 g）解冻后草鱼肉糜，置于加有 5 g Na_2SO_4 的 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 甲醇，涡旋 1 min、超声 10 min，6000 rpm/min 离心 3 min，取上清液于 50 mL 的离心管，对残渣重复提取一次，合并两次的上清液，正己烷脱脂后，旋蒸干后复溶于 5 mL 甲醇/水（v:v, 50:50）作为样品液。

4.2.4 磁性固相萃取

3 mL 丙酮、去离子水、甲醇清洗 15 mg 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4），并同 5 mL 样品液一起加入的 15 mL 离心管中，涡旋 5 min 后，静置萃取 10min。萃取结束后，用磁铁转移 G-Fe_3O_4 到 1.5 mL 的小塑料离心管，加入 1.0 mL 甲醇/乙酸(95:5, v:v）涡旋 1.5 min 进行解吸，然后用磁铁分离 G-Fe_3O_4 得到解吸液，重复 4 次。合并 4 次解吸液并于温和氮气下吹干，复溶于 0.5%乙酸水/乙腈（v:v, 80:20），过 0.22 μm 有机滤膜，进样分析。回收的 G-Fe_3O_4 同 2.2.4 中清洗，可循环使用。

4.2.5 色谱条件

色谱柱：YMC-Pack ODS-AQ 色谱柱（150 mm×4.6 mm, 3 μm）。

流动相 A：0.5%乙酸水溶液；流动相 B：乙腈；进样量：10 μL；柱温：30 ℃；梯度洗脱程序见表 4-1。

表 4-1 喹诺酮类化合物液相色谱梯度洗脱程序

Table 4-1 The gradient elution program of QNs

时间（min）	流速 mL/min	A（%）	B（%）
Initial	0.4	80	20
12	0.4	70	30
12.5	0.4	80	20
13	0.4	60	20

4.2.6 质谱条件

电离模式：ESI；

扫描方式：正离子；

喷雾电压：3200 V；

检测方式：SRM 模式；

气化温度：300 ℃；

壳气：高纯氮气，30 Arb；

辅助气：高纯氮气，20 Arb；

碰撞气：高纯氩气，1.5 mTorr；

毛细管温度：270 ℃；

检测12种喹诺酮类化合物离子对信息见表4-2。

表 4-2 喹诺酮类化合物的质谱定量参数

Table 4-2 Optimized MS/MS parameters of QNs

化合物 Analytes	离子对 m/z	碰撞电压 CE
环丙沙星	332.1/245.1*	21
CIP	332.1/288.1	16
丹诺沙星	358.1/340.1*	22
DAN	358.1/314.1	16
双氟沙星	400.0/356.1*	18
DIF	400.0/299.0	26
奥比沙星	396.1/295.0*	21
ORB	396.1/352.1	14
恩诺沙星	360.1/316.1*	18
ENR	360.1/245.0	26
诺氟沙星	320.1/276.1*	14
NOR	320.1/302.1	19
氧氟沙星	362.1/318.1*	18
OFL	362.1/261.0	25
氟罗沙星	370.1/269.0*	25
FLE	370.1/326.1	17
依诺沙星	321.0/303.1*	19
ENO	321.0/234.1	22
司帕沙星	393.1/292.0*	22
SPA	393.1/349.1	16
洛美沙星	352.0/265.0*	21
LOM	352.0/308.1	15
培氟沙星	334.0/290.1*	16
PEF	334.0/233.0	22

*：定量离子对

4.2.7 标准曲线和工作曲线绘制

标准曲线：按照 2.2.7 中标准曲线的绘制方法，使用 0.5%乙酸水/乙腈（v:v,

80:20）将混合标准曲线使用液稀释五倍，最后获得喹诺酮标准曲线的的七个浓度，即 1、5、10、25、75、100、150 ng/mL，HPLC-MS/MS 检测，每个浓度测定三次，拟合对应浓度与峰面积（峰面积为横坐标），绘制标准曲线，得出相关系数。

工作曲线绘制绘制：使用 4.2.2 中制备的空白基质溶液将混合标准曲线使用液稀释五倍，最后获得喹诺酮标准曲线的的七个浓度，即 1、5、10、25、75、100、150 ng/mL，上机分析检测，每个浓度重复测定三次，拟合对应浓度与峰面积（峰面积为横坐标），绘制成标准曲线，得出相关系数。

4.2.8 检出限与定量限

在空白鲫鱼肉中添加混合标准溶液使其为 0.5、1、5、10 μg/kg 四个添加水平，按照 4.2.3 和 4.2.4 中前处理方法处理样品，HPLC-MS/MS 检测，分别以 S/N 等于 3 和 10 计算检出限（LOD）和定量限（LOQ）。

4.2.9 回收率和精密度实验

在空白鱼样品中（1 g±0.01 g）加入 0.2 mL 浓度分别 50、125、375 ng/mL 喹诺酮类标准液，使其添加水平为 10、25、75 μg/kg，然后按照 4.2.3 进行样品前处理，按照 4.2.4 净化处理后进 HPLC-MS/MS 检测，依据工作曲线得出测定含量。回收率计算方式同 2.2.9 所述。

分别在 10、25、75 μg/kg 三个浓度水平添加量下进行精密度实验。日内精密度一天内平行测定六次，日间精密度平行测定六天共六次，精密度值通过分别计算 RSD 值获得。

4.3 结果与讨论

4.3.1 HPLC-MS/MS 条件优化

美观的色谱峰型和最佳的分辨率的取得与 HPLC 条件具有密切的关系。HPLC 条件的优化主要包括柱温，流动相，洗脱程序的优化。

在实验中，柱温对喹诺酮类化合物的峰形的影响不明显，但观察到柱温在 30 ℃时，柱压较小，故选择柱温为 30 ℃；选择合适的流动相能提高化合物的分离度，实验分别对有机相(甲醇或乙腈)和水相(不同比例的乙酸)进行了优化和选择，结果表明乙腈具有更强的洗脱能力且缩短了保留时间，并且在超纯水中加入

0.5%乙酸，显著提高了色谱分离度。此外，优化洗脱程序时发现，喹诺酮类化合物集中在有机相配比 20%至 30%之间出峰，考虑要分离 12 种不同的化合物以及最后出峰后的峰形，故选用梯度洗脱程序，梯度洗脱程序见表 4-1，在此洗脱条件下一方面出峰时间短，另一方面又使峰形更为对称美观。图 4-2 为 12 种喹诺酮类化合物的萃取离子流色谱图。

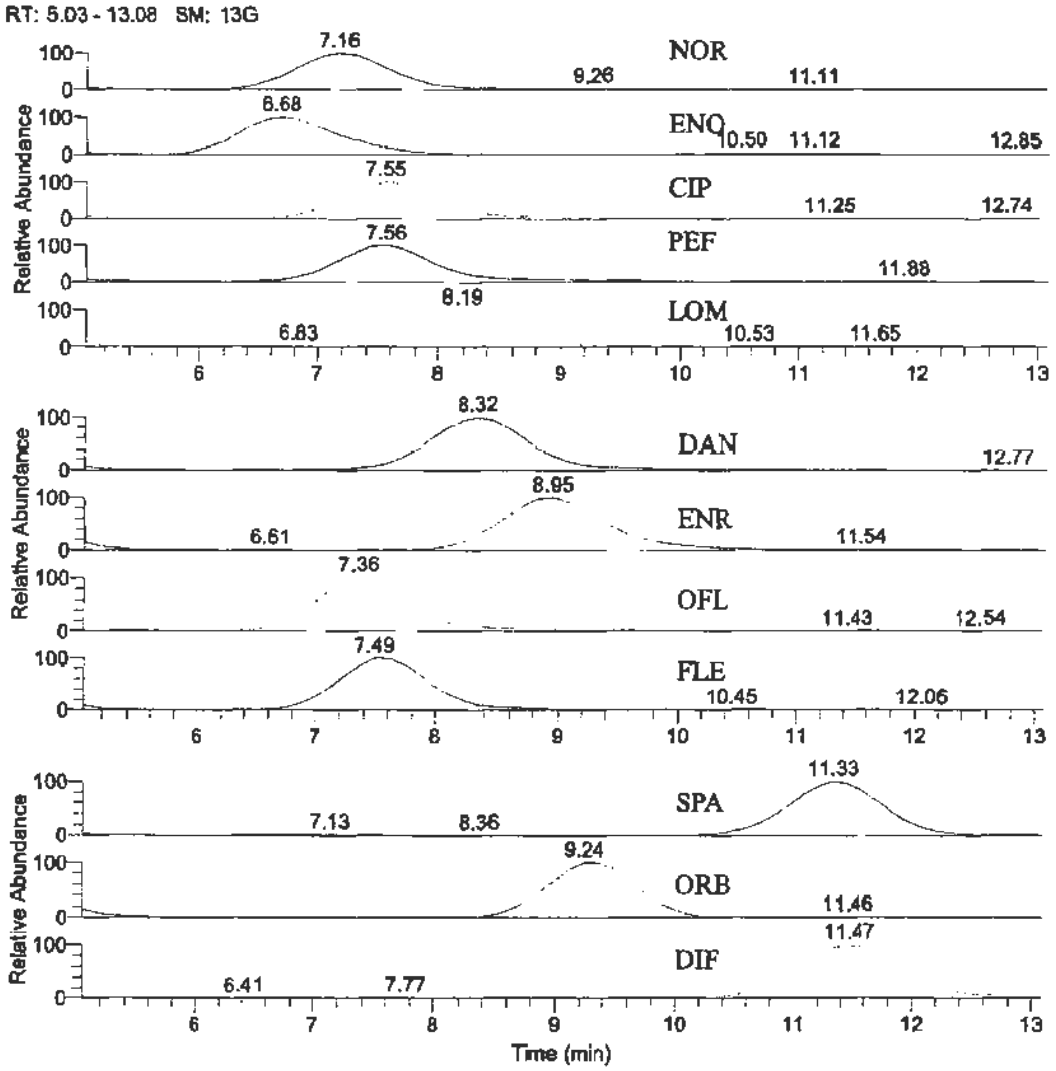
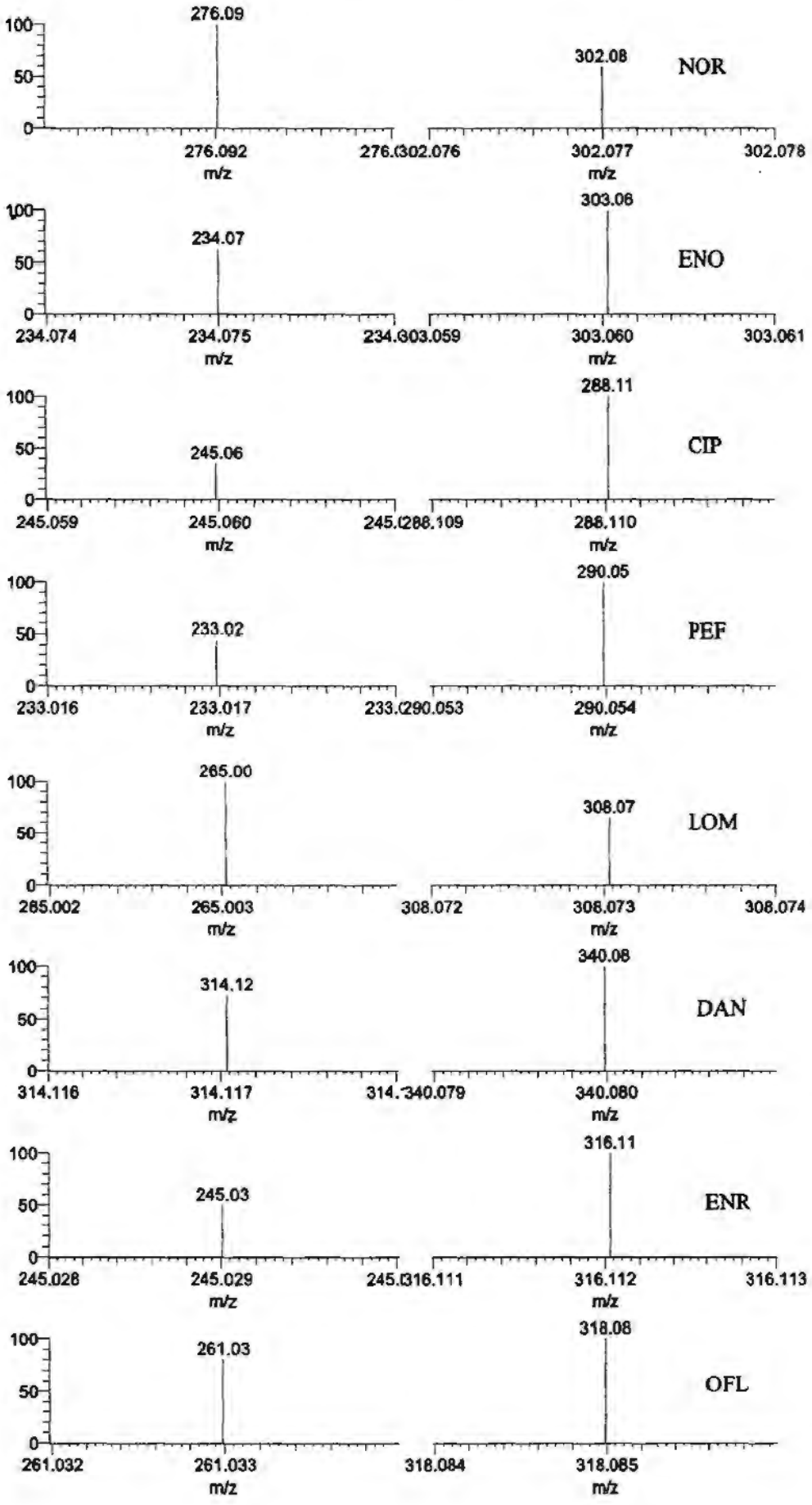


图 4-2 HPLC-MS/MS 条件优化下 12 种喹诺酮标准溶液的萃取离子流色谱图

Figure 4-2 XIC for standard of twelve QNs under optimized HPLC–MS/MS conditions

将喹诺酮混合标准使用液用甲醇稀释至约 2.5 μg/mL，正离子模式下优化质谱参数，优化流程同 2.3.3。最终获得喹诺酮类化合物子离子扫描质谱图如图 4-3 所示。经过一系列优化后，喹诺酮类化合物的最佳母离子、子离子和碰撞电压如表 4-2 所示。


276.09
302.08
NOR
276.092
276.302.076
302.077
302.078
m/z
303.06
234.07
ENO
234.074
234.075
234.303.059
303.060
303.061
m/z
288.11
245.06
CIP
245.059
245.060
245.288.109
288.110
m/z
290.05
233.02
PEF
233.016
233.017
233.290.053
290.054
m/z
265.00
308.07
LOM
265.002
265.003
308.072
308.073
308.074
m/z
340.08
314.12
DAN
314.116
314.117
314.340.079
340.080
m/z
316.11
245.03
ENR
245.028
245.029
245.316.111
316.112
316.113
m/z
318.08
261.03
OFL
261.032
261.033
318.084
318.085
m/z

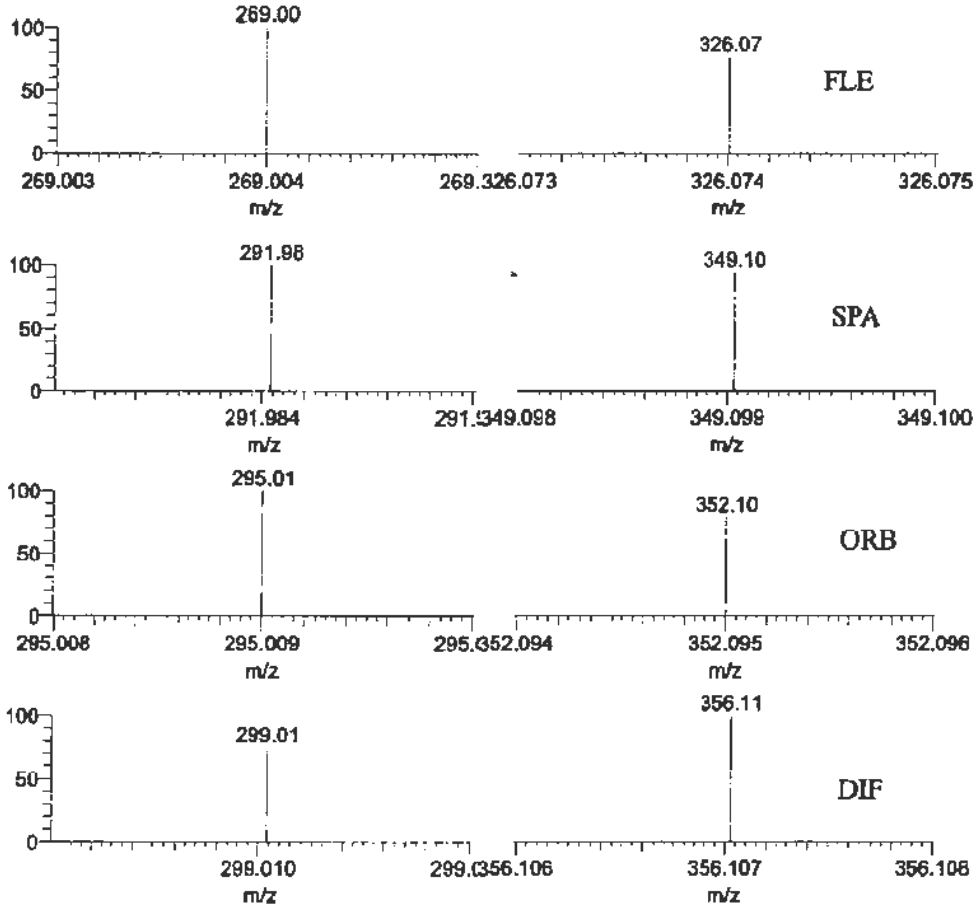


图 4-3 12 种喹诺酮类化合物的子离子扫描图

Figure 4-3 Product ions scan spectra of twelve QNs

4.3.2 磁性固相萃取条件的优化

将 15 mg 磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）加入装有 5 mL 100 ng/mL 喹诺酮类标准液的试管中，涡旋 5 min 后静置 15 min，磁铁置于试管外壁吸附分离磁性石墨烯与溶液，过膜 HPLC-MS/MS 检测，结果无喹诺酮检出，这表明 G-Fe_3O_4 对喹诺酮类药物具有良好的吸附性。因此 G-Fe_3O_4 可以作为磁性固相萃取（MSPE）吸附剂净化处理喹诺酮类药物。

实验以 12 种喹诺酮类药物为目标化合物，同时检测的化合物数量相比前两个章节有明显增加。因此，磁性固相萃取这一前处理步骤愈显重要。为了取得最佳的MSPE条件，通过在空白鲫鱼样品中加标使其添加水平为50 μg/kg，按照4.2.3和4.2.4处理样品后 HPLC-MS/MS 分析。实验对磁性吸附剂的用量、萃取时间以及解吸液种类与用量进行了优化，得出最佳的磁性固相萃取步骤。

4.3.2.1 磁性石墨烯的用量优化

作为磁性固相萃取中使用的关键材料，吸附剂 G-Fe_3O_4 的用量与萃取结果有着密切的关系。为了确定实验中磁性石墨烯最优使用量，共设计 5 mg、10 mg、15 mg、20 mg、25 mg 5 个用量水平，考察对喹诺酮类化合物萃取的的最佳使用量。

结果如图 4-4 所示，5 个用量水平中，当磁性石墨烯用量为 5 mg、10 mg 时，目标化合物（由于待检测的 12 种喹诺酮类化合物无较大差异，本实验以环丙沙星（CIP）、恩诺沙星（ENR）和双氟沙星（DIF）为例，下同）的回收率大部分低于 70%。当用量达到 15 mg、20 mg、25 mg 3 个水平时，目标化合物的回收率均位于 90%附近，故本实验以 15 mg 作为磁性固相萃取中吸附剂的最佳用量。

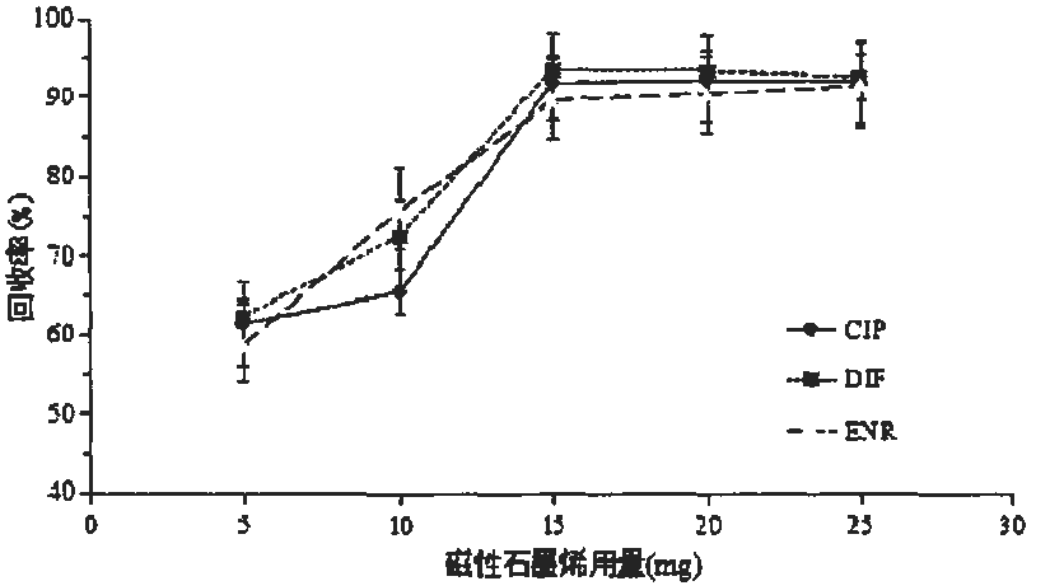


图 4-4 磁性石墨烯用量对喹诺酮类化合物回收率的影响（以环丙沙星、恩诺沙星和双氟沙星为例）

Figure 4-4 The effect of the amount of G-Fe_3O_4 on the recovery of QNs (CIP、ENR、DIF were taken as model analytes)

4.3.2.2 萃取时间优化

在 MSPE 过程中，萃取时间是影响萃取效果的重要因素。萃取时间太短，会导致对目标化合物吸附不够完全；萃取的时间太长则会导致解吸困难甚至无法解吸的情况，所以要采取合适的萃取时间才能够获得良好的回收率。因此，实验设计了 5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 共计 6 个时间水平来考察最终喹诺酮类化合物的回收率。结果如图 4-5 所示，萃取时间从 5 min 增加到 15 min 时，回收率明显增大，且当萃取时间为 15 min 时，回收率超过 90%，其

后随着萃取时间的增加，回收率处于略微下降的状态。考虑到在其它两种化合物上进行萃取时间优化时也出现过类似情况，基本可以判定，过长时间的吸附会导致解吸变得困难，从而使目标化合物的回收率降低。故实验最后选择 15 min 作为最佳的萃取时间。

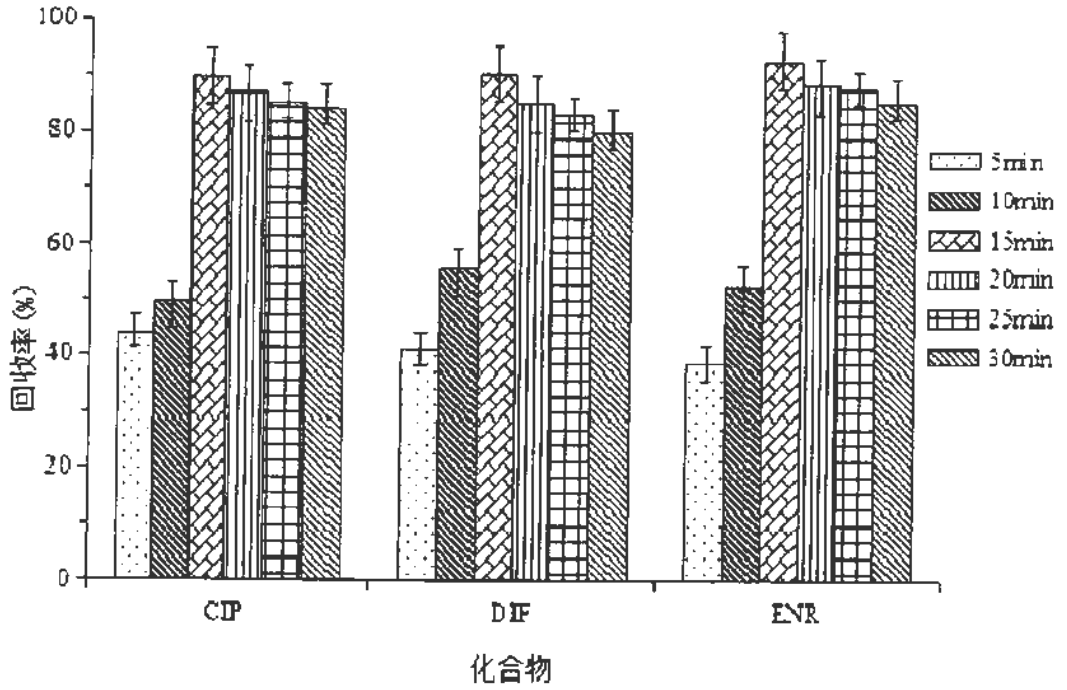


图 4-5 萃取时间对喹诺酮类化合物回收率的影响

Figure 4-5 The effect of the extraction time on the recovery of QNs

4.3.2.3 解吸液优化

实验选取甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮、乙腈和甲醇共 6 种极性不同的解吸液对萃取目标化合物后的磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）进行解吸操作。

结果如图4-6所示，不同极性的洗脱剂对喹诺酮类药物的回收率有很大影响。甲苯、二氯甲烷和乙酸乙酯三者的解吸效果较差，目标化合物的回收率大多数不到 30%，这可能是因为这三种有机试剂的极性与目标化合物差异较大，导致解吸时不能够很好地解吸下目标物，致使回收率不够理想。丙酮的解吸效果要高于甲苯、二氯甲烷和乙酸乙酯三者，但是仍然不够理想（丙酮的回收率在 55%左右），乙腈与甲醇的解吸效果均不错，但是甲醇在双氟沙星和恩诺沙星的解吸效果明显优于乙腈。

考虑到喹诺酮类为两性化合物，实验设计甲醇/乙酸（99:1, v:v）和甲醇/氨水（99:1, v:v）两种 PH 分别为酸性、碱性的解吸液来考察酸碱性对回收率的影响。经比较发现，添加乙酸后对回收率提升更大，优化甲醇/乙酸的体积比，最

后得出甲醇/乙酸(95:5, v:v)回收率达到85%以上，故本实验选择甲醇/乙酸(95:5, v:v）作为MSPE中的解吸液。

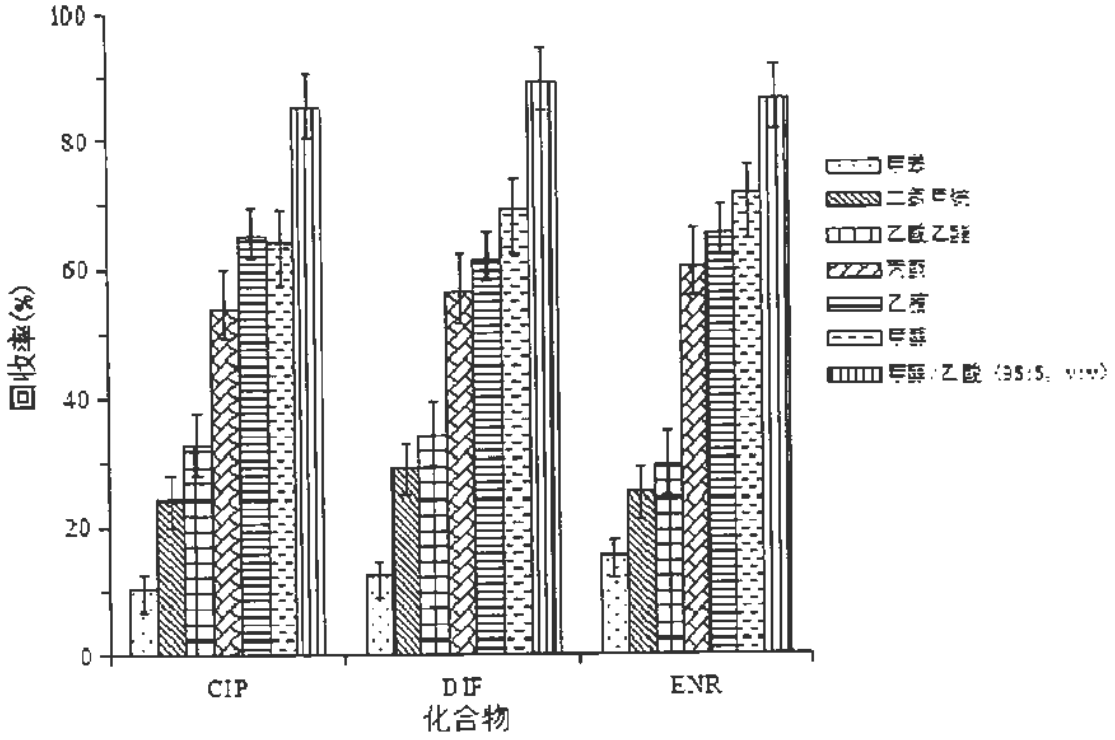


图4-6 不同解吸液对喹诺酮类化合物回收率的影响

Figure 4-6 The effect of the eluent type on the recovery of of QNs

4.3.2.4 解吸液体积

采用每次1 mL的解吸液对目标化合物进行解吸，本小节讨论的解吸液的体积，便代表着需要解吸的次数。实验设计了1 mL、2 mL、3 mL、4 mL和5 mL共5个体积水平进行解吸实验。从图4-7中可以明显看出，对于喹诺酮类化合物，在1~4 mL时，解吸液体积与回收率正相关。当解吸液体积大于4 mL时，回收率基本保持不变。因此本实验选定4 mL作为最优的解吸体积，也即表示每次1 mL解吸液对目标化合物进行解吸的操作需要重复4次。

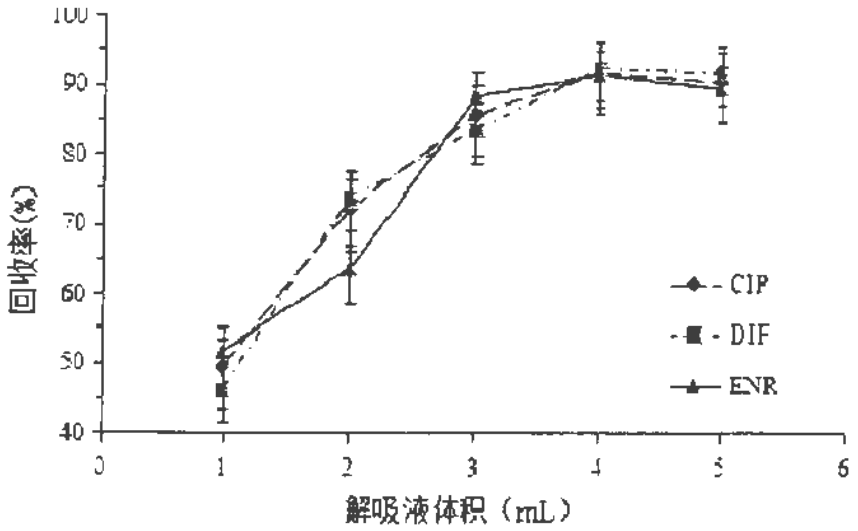


图 4-7 解吸液体积对喹诺酮类化合物回收率的影响

Figure 4-7 The effect of clution volume on the recovery of QNs

4.3.3 与传统固相萃取的对比研究

采用 2.3.6 中的四种前处理方式进行研究。结果见图 4-8。从图中可以明显看出，基于 G-Fe_3O_4 的 MSPE 前处理方式，目标化合物的回收率最高。实验过程中观察到，MSPE 的操作的步骤最为简单（只需要萃取与解吸即可），对操作的要求比较低，而固相萃取必须借助固相萃取装置，并且处理的鱼肉样品容易在过滤过程中容易堵塞，对操作熟练度要求较高，且自己装填的固相萃取小柱也表现出较差的重现性，这在一定程度上也反映出 MSPE 在水产品前处理过程中相比传统的 SPE 前处理技术更具有优势。

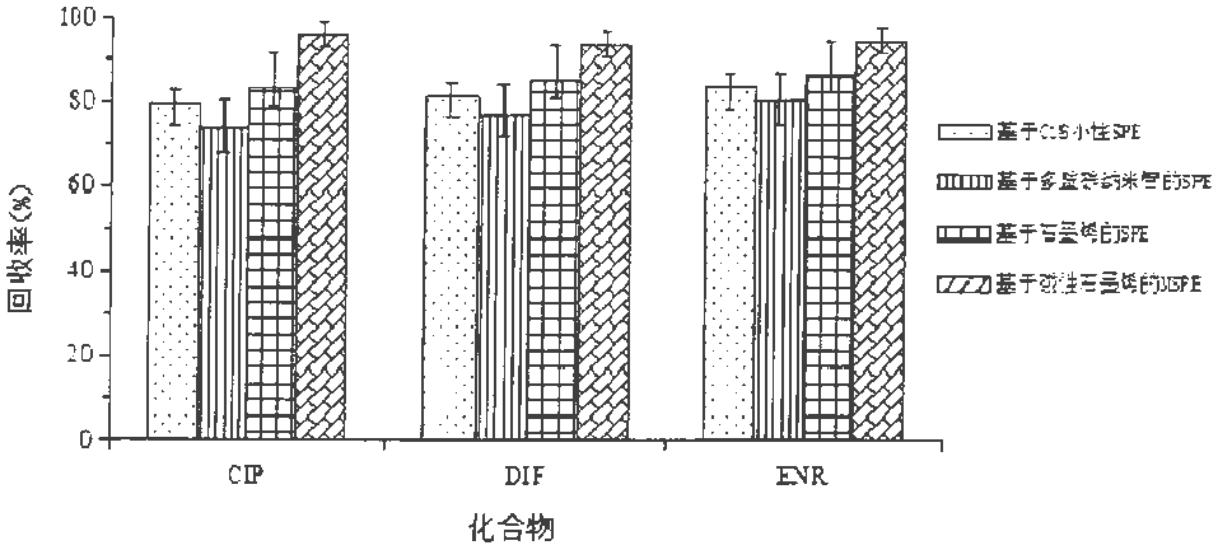


图 4-8 磁性石墨烯的 MSPE 与其他吸附剂的 SPE 萃取效果比较（均在各自优化条件下）

Figure 4-8 Comparison of G-Fe_3O_4 based on MSPE with other absorbents based on SPE (The extraction conditions were optimized for all sorbents).

4.3.4 基质效应

实验中，处理样品的差异会导致目标化合物最终的分析检测出现基质抑制或基质增强，从而干扰正常的实验结果，甚至会使分析仪器被污染而影响后续的整个实验，因此基质效应的评估既是为了验证所使用的处理方法的有效性，又是对自己处理后样品是否处理好的一个衡量指标。实验中采用绘制工作曲线和试剂标曲进行比较，工作标曲使用空白基质液稀释配置，试剂标曲采用 0.5%乙酸水/乙腈（v:v, 80:20）稀释而成，配置的具体步骤见 4.2.7，过膜 HPLC-MS/MS 分析，平行测定每个浓度 3 次，再以各化合物的浓度为横坐标，以对应的峰面积为纵坐标，拟合得出两条曲线。基质效应则是将工作曲线的斜率比上溶剂标准曲线的斜率，即为斜率比[52]。12 种喹诺酮类化合物的斜率比见图 4-9，实验中斜率比 0.9~1.1 可视为无基质效应，小于 0.9 为基质抑制，大于 1.1 为基质增强。依据柱状图可直观得出，PEF、DAN、OFL、FLE、SPA 共 5 种化合物无基质干扰、NOR、ENO、CIP、LOM、ENR、ORB 共 6 种化合物基质抑制、仅化合物 DIF 表现出基质增强。因此，后续的方法学验证及实际样品测定中，依据工作曲线进行定量分析研究。

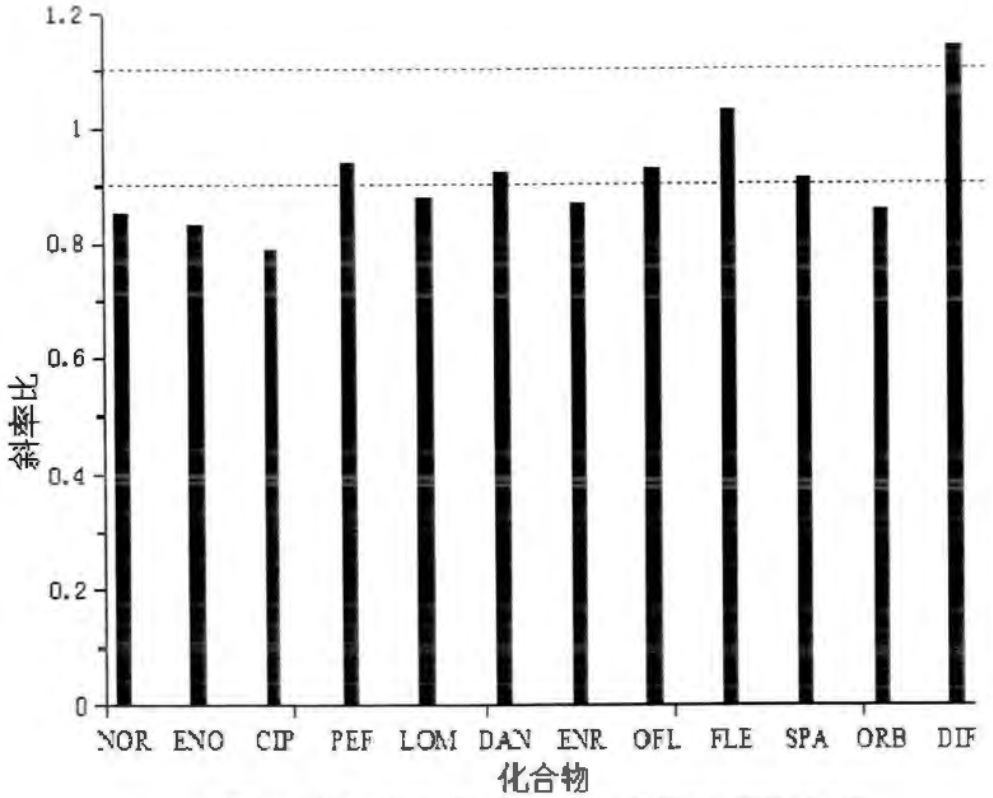


图 4-9 喹诺酮化合物工作曲线与溶剂标准曲线的斜率比

Figure 4-9 Slope ratios of QNs between matrix-matched and solvent calibration

4.3.5 方法学验证

4.3.5.1 工作曲线

实验采用工作曲线进行方法学验证的定量分析操作，分别以喹诺酮类化合物的质谱图峰面积、质量浓度（μg/kg）作为纵坐标（Y）、横坐标（X），拟合得出工作曲线。工作曲线及相关系数见表 4-3。12 种喹诺酮化合物在 1~150 μg/kg 线性范围良好，相关系数处于 0.991~0.998。

表 4-3 喹诺酮类化合物工作曲线相关系数、检出限以及定量限等参数

Table 4-3 Calibration data, LOD and LOQ of QNs

分析物 Analytes	工作曲线	相关系数 R^2	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)	线性范围 (μg/kg)
环丙沙星（CIP）	y=1739x-231	0.993	0.47	1.55	1-150
丹诺沙星（DAN）	y=2580x+36583	0.997	0.36	1.19	1-150
双氟沙星（DIF）	y=12433x+1958	0.998	0.95	3.14	1-150
奥比沙星（ORB）	y=6390x+2542	0.997	0.49	1.62	1-150
恩诺沙星（ENR）	y=7148x+31578	0.994	0.39	1.29	1-150
诺氟沙星（NOR）	y=1357x+168	0.992	0.42	1.39	1-150
氧氟沙星（OFL）	y=6576x+49420	0.993	0.40	1.32	1-150
氟罗沙星（FLE）	y=2277x+3005	0.991	0.33	1.09	1-150
依诺沙星（ENO）	y=1128x+763	0.993	0.48	1.58	1-150
司帕沙星（SPA）	y=6660x+7863	0.992	0.57	1.88	1-150
洛美沙星（LOM）	y=5103x-79	0.995	0.50	1.65	1-150
培氟沙星（PEF）	y=4852x+19258	0.991	0.41	1.35	1-150

4.3.5.2 检出限与定量限

实验以 0.5、1、5 和 10 μg/kg 四个添加水平经仪器分析，取信噪比等于 3 和 10 时的浓度作为检出限（LOD）和定量限（LOQ）。各种喹诺酮类化合物在鲫鱼基质中方法检出限和定量限见表 4-3。除了双氟沙星的检出限、定量限值偏大分别为 0.95 μg/kg、3.14 μg/kg，其余化合物检出限均处于 0.33~0.57 μg/kg 范围内、定量限在 1.09~1.88 μg/kg 之间。其中具体每个化合物的检出限与值见表 4-3。

4.3.5.3 回收率和精密度

准确称量空白鲫鱼样品（1 g ± 0.01 g），加入 0.2 mL 浓度分别 50、125、375 ng/mL 喹诺酮类标准液，使其添加水平为 10、25、75 μg/kg。然后按照 4.2.3 将目标化合物提取出来，经过 4.2.4 MSPE 的净化处理，进样分析，经由工作曲线定量，得出表 4-4。大部分的喹诺酮类化合物的回收率都位于 70%~100%之间，

除了依诺沙星回收率为68.5%，略低于70%，其它化合物均展现出良好的回收率，反映出MSPE方法处理样品的有效与可行性。

表4-4 喹诺酮类化合物的加标回收率

Table 4-4 Recovery values for QNs

化合物 Analytes	回收率(%)		
	10(μg/kg)	25(μg/kg)	75(μg/kg)
环丙沙星（CIP）	87.3	88.4	92.5
丹诺沙星（DAN）	89.7	88.7	84.2
双氟沙星（DIF）	93.6	91.7	85.1
奥比沙星（ORB）	89.5	81.1	87.2
恩诺沙星（ENR）	103.4	91.2	88.8
诺氟沙星（NOR）	91.5	89.7	91.3
氧氟沙星（OFL）	79.3	78.9	84.2
氟罗沙星（FLE）	94.4	89.2	81.3
依诺沙星（ENO）	68.5	82.0	77.7
司帕沙星（SPA）	81.6	79.3	88.6
洛美沙星（LOM）	84.3	84.9	89.2
培氟沙星（PEF）	89.2	85.4	92.4

分别在10、25、75 μg/kg三个浓度水平添加量下进行日内和日间精密度实验，数据见表4-5。其中日内、日间精密度处在2.4~6.2%、2.9~7.8%范围内，这些数据说明建立的方法具有较高的可信度，可以用于实际鱼样的分析。

表4-5 喹诺酮类化合物在三个加标浓度下的方法精密度

Table 4-5 Method precision at three different concentration levels of QNs

分析物 Analytes	日内精密度（RSD%, n=6）			日间精密度（RSD%, n=6）		
	10(μg/kg)	25(μg/kg)	75(μg/kg)	10(μg/kg)	25(μg/kg)	75(μg/kg)
环丙沙星（CIP）	4.3	3.7	3.8	4.4	4.6	5.5
丹诺沙星（DAN）	5.6	4.7	3.1	6.3	5.4	4.6
双氟沙星（DIF）	5.3	2.9	3.2	6.8	3.0	5.7
奥比沙星（ORB）	4.2	3.6	2.2	3.3	6.1	4.9
恩诺沙星（ENR）	3.1	5.6	4.5	2.9	4.5	6.6
诺氟沙星（NOR）	2.4	5.3	4.7	4.6	5.9	6.3
氧氟沙星（OFL）	5.4	3.9	2.9	3.8	6.5	6.7
氟罗沙星（FLE）	2.7	3.0	2.6	3.5	4.8	4.9
依诺沙星（ENO）	5.2	4.2	5.5	7.8	3.6	6.0
司帕沙星（SPA）	2.6	3.2	2.8	3.4	5.0	6.2
洛美沙星（LOM）	3.5	2.7	2.9	4.6	5.2	5.8
培氟沙星（PEF）	6.2	3.6	4.0	7.6	4.4	5.6

4.4 方法的应用

应用本实验建立的 MSPE-HPLC-MS/MS 方法，对本地市售的 10 个批次鲫鱼样品中 12 种喹诺酮药物残留同时进行检测，工作曲线定量计算。结果见表 4-6。10 个批次中，有 5 个批次有 QNs 残留检出，且奥比沙星、氧氟沙星、依诺沙星的分别在 4 个、3 个、3 个批次中检出，表明其可能在水产养殖业中继续使用。

表 4-6 实际样品中所检测到目标分析物的浓度(μg/kg)

Table 4-6 Concentration (μg/kg) of target analytes detected in real samples

化合物 Analytes	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10
环丙沙星（CIP）	-[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丹诺沙星（DAN）	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
双氟沙星（DIF）	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
奥比沙星（ORB）	-	2.32[b]	-	-	2.58	2.35	-	-	2.42	-
恩诺沙星（ENR）	-	-	-	-	-	-	1.38	-	-	-
诺氟沙星（NOR）	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
氧氟沙星（OFL）	-	3.13	-	-		2.50	-	-	2.22	-
氟罗沙星（FLE）	-	-	-	-	-	-	1.38	-	-	-
依诺沙星（ENO）	-	2.39	-	-	4.03	-	-	-	1.95	-
司帕沙星（SPA）	-	3.35	-	-	-	-	-	-	-	-
洛美沙星（LOM）	-	-	-	-	-	-	-	-	3.45	-
培氟沙星（PEF）	-	2.12	-	-	-	-	-	-	-	-

注：[a] 小于检出限(<LOD)，[b] μg/kg

4.5 小结

本实验建立了 MSPE-LC-MS/MS 同时测定水产品中 12 种喹诺酮类药物的定量分析方法。比较了磁性石墨烯固相萃取、石墨烯固相萃取、C18 小柱固相萃取以及多壁碳纳米管固相萃取四种不同的前处理方法，结果表明磁性固相萃取前处理方式下目标化合物的回收率高，操作简便高效及重现性好。本方法采用 HPLC-MS/MS 同时对 12 种喹诺酮残留进行定量分析研究，实验中为了定量的准确性，对试剂标准曲线和基质液稀释的工作曲线进行对比研究，评价了 12 种喹诺酮药物的基质效应，经方法学验证表明，12 种喹诺酮类药物在线性范围下线性关系良好；在 10~75 μg/kg 浓度范围下，平均回收率 68.5%~103.4%；日内、日间精密度处在 2.4~6.2%、2.9~7.8%之间；检出限在 0.33~0.95 μg/kg 之间，定量限位于 1.09~3.14 μg/kg 范围内。该方法良好的重现性及高灵敏度证明其适用于水产品中喹诺酮药物的残留检测。

第 5 章 结论和展望

5.1 结论

本论文主要针对水产品中兽药残留的磁性固相萃取（MSPE）前处理方法进行了分析研究。实验以合成的磁性石墨烯（G-Fe_3O_4）作为 MSPE 的吸附剂，以水产养殖中广泛使用的合成抗菌药，包括大环内酯类抗生素、磺胺类和喹诺酮类药物为目标化合物，通过对 MSPE 步骤中关键因素进行优化，分别建立了 3 类药物残留的 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析手段。

1、实验合成 MSPE 吸附剂——G-Fe_3O_4 材料并通过透射电子显微镜对其结构表征，通过 MSPE 前处理手段，建立了水产品中大环内酯类抗生素的的残留检测方法，具有具有快速、高效、操作简便等优点。实验通过在空白草鱼肉中加标实验，优化了得出 MSPE 的最佳前处理程序。建立的方法检出限在 0.41~0.52 μg/kg 之间，定量限在 1.25~1.65 μg/kg 之间；平均回收率为 87.4%~98.2%；日内、日间精密度均小于 8.5%。对该方法用于实际样品检测，仅有 2 个批次有检出，检出值小于定量限。

2、建立了鱼肉中 5 种磺胺类药物残留 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析方法。对鱼肉中磺胺类药物的提取做了优化，选用了能快速提取目标化合物且易挥发的有机溶剂；对复溶目标化合物的溶剂进行优化，使 MSPE 能快速萃取完成。实验同样针对 MSPE 的关键步骤进行优化，改善了解吸液的解吸方法。建立磺胺类定量分析方法检出限为 0.34~0.49 μg/kg、定量限为 1.12~1.47 μg/kg，小于规定的最高残留限量（MRL）值 100 μg/kg；5 种磺胺残留加标回收率处于 79.2%~101.3%之间；日内、日间精密度最大为 9.2%，且大多小于 6%，展现出良好的稳定性。

3、建立了 MSPE-LC-MS/MS 同时测定水产品中 12 种喹诺酮类药物残留的定量分析方法。通过对色谱条件、质谱条件的优化，使其表现出良好的色谱峰形。优化获得最佳的 MSPE 处理步骤，同时将其与石墨烯、C18、多壁碳纳米管的固相萃取（在其最优的条件下）相比较；绘制工作曲线与标准曲线的斜率比图研究基质效应，且最后使用工作曲线进行方法学验证。经方法学验证表明，检出限和

定量限分别为 0.33~0.95 μg/kg 和 1.09~3.14 μg/kg，在 10~75 μg/kg 浓度范围下，平均回收率 68.5%~103.4%、日内/日间精密度处在 2.4~6.2%、2.9~7.8%之间。该方法的良好重现性、高灵敏度，表明其用于实际水产品中残留检测的可行性。

5.2 创新点

1、采用 MSPE 前处理方法，用于水产品中大环内酯类抗生素、磺胺类和喹诺酮类药物的残留检测研究，与常规方法相比，降低了操作的难度、降低了基质效应、提高了分析结果的准确性。

2、合成磁性纳米材料——G-Fe_3O_4 作为 MSPE 的吸附剂，通过石墨烯的强吸附性，实现 MSPE 过程中快速吸附，显著提升了提取净化效率。

5.3 展望

本论文将 MSPE 与水产品中的兽药残留检测技术进行合理的结合，建立了水产品中 3 类药物残留的 MSPE-HPLC-MS/MS 定量分析手段。但必须明确的是，仅仅 3 类药残的 MSPE 实验是远远不够的，基质的不同、待检测的目标化合物不同，都需要广大科研工作者对 MSPE 的各项条件进行摸索。

1、磁性固相萃取的核心是磁性纳米材料，因此不断开发出新的适合于 MSPE 的磁性吸附材料，是以后科研工作者任务的攻坚方向。

2、磁性固相萃取在水产品残留检测中的报道不多见，且大部分涉及到的是磁性分子印记材料的 MSPE，所以需要广大科研工作者将 MSPE 方法在水产品残留检测的研究上推广开来。

3、仪器分析的高分辨率与高精密度一直是仪器发展上不断的追求，高精密度的仪器与残留检测的联用技术也应该被不断的被发掘与创新。

参考文献

[1] 穆迎春, 马兵, 宋怿, 等. 国内外养殖水产品质量安全管理体系建设现状及比较分析[J]. 渔业现代化, 2010, 37(4): 57-61.

[2] 赵秀秀, 杨德利. 加快中国水产品消费发展的几点思考[J]. 山西农业科学, 2010, 38(3): 65-67.

[3] 刘庆博, 刘俊昌. 中国水产品出口波动的实证分析: 1992~2011[J]. 国际经贸探索, 2013, 29(1): 15-23.

[4] 杨学伶. 浅谈水产品药物残留的现状[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2014, 30(2): 178-179.

[5] 史艳梅, 刘转莉, 田伟, 等. 毛细管电泳电化学发光检测大环内酯类抗生素及应用研究[J]. 分析化学, 2009, 37(Z1): 189-206.

[6] 史艳梅, 刘转莉, 田伟, 等. 毛细管电泳电化学发光离子液体检测替米考星、琥已红霉素和克林霉素[J]. 分析化学, 2009, 37(Z1): 95-106.

[7] 谢丽琪, 岳振峰, 唐少冰, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中林可酰胺类和大环内酯类抗生素残留量的研究[J]. 分析试验室, 2008, 27(3): 5-8.

[8] 刘晔. 动物性食品中大环内酯类抗生素残留的 HPLC 分析[D]. 无锡: 江南大学, 2008.

[9] Woodward R B. Agnew Chem, 1957, 69: 50.

[10] 孙雷, 张骊, 王树槐, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法对动物源食品中 13 种林可胺类及大环内酯类药物残留的检测[J]. 分析测试学报, 2008, 28(9): 1058-1061.

[11] 李俊锁, 邱月明. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 228-232.

[12] Biswas A K, Rao G S, Kondaiah N, et al. Simple multiresidue method for monitoring of trimethoprim and sulfonamide residues in buffalo meat by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55: 8845-8850.

[13] Anadon A, Martinez-Larrangaga M R, Martinez M A. Scientific basis and regulatory aspect for the toxicology of plant protection products in the European Union [J]. Toxico, 2001, 43(3): 297-301.

[14] Cavaliere C, Curini R, Corcia A D, et al. A simple and sensitive liquid chromatography-mass spectrometry confi rmatory method for analyzing sulfonamide antibacterials in milk and egg [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(10): 538-566.

[15] Nue H C. The crisis in antibiotic resistance [J]. Science, 1992, 113(257): 1064-1073.

[16] EU reference laboratory for residues of veterinary drugs. Committee for Veterinary Medicinal Products. No. EMEA/MRL/026/95.

[17] 李娟. 动物组织中 11 种喹诺酮类药物多残留的 HPLC 法研究[D]. 成都: 四川大学, 2007.

[18] 李桂芝, 高福凯, 张兴梅, 等. 柠檬酸水溶液生物亲和萃取-高效液相色谱法检测鱼肉样品中喹诺酮类药物残留[J]. 分析化学, 2013, 41(10): 1592-1596.

[19] 陈倩, 于泓, 孟令敏, 等. 吡啶离子液体阳离子的离子色谱法分析[J]. 分析测试学报, 2011, 30(1): 38-42.

[20] 李文平, 李忠万. 喹诺酮药物发展现状[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(9): 37-39.

[21] 曹慧, 陈小珍, 朱岩, 等. 多壁碳纳米管固相萃取技术同时测定蜂蜜中多类兽药残留[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(12): 2710-2715.

[22] 曲斌, 陆桂萍, 蒋天梅, 等. 超高效液相色谱-串联质谱同时快速检测生鲜牛乳中的磺胺类和氟喹诺酮类药物[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 276-282.

[23] 姜宁. 动物源性食品中磺胺和氟喹诺酮类兽药残留分析方法研究[D]. 保定: 河北大学, 2007.

[24] 张剑, 易翔, 曾延波, 等. 环境水样中己烯雌酚与双烯雌酚的离子液体分散液-液微萃取/高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 629-632.

[25] 唐英章. 现代食品安全检测技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 6.

[26] 张帆, 李忠海, 王利兵, 等. 食品中氨基甲酸酯类农药残留的检测方法研究进展[J]. 中国食物与营养. 2010, 16(2): 64-67.

[27] Fontanals N, Marce R M, Borull F. New hydrophilic materials for solid-phase extraction[J]. Trac-trends in Analytical Chemistry, 2005, 35(24): 394-406.

[28] 钱卓真, 苏秀华, 魏博娟, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 6 种喹诺酮药物的残留[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 185-189.

[29] Zhu W, Yang J, Wei W. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps[J]. Journal of Chromatography A, 2008, 19(1-2): 29-37.

[30] 祝颖, 张虹. UPLC-MS/MS 法同时检测水产品中喹诺酮类药物残留[J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 206-213.

[31] Galarini R, Fioroni L, Moretti S. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 68(2): 167-176.

[32] Hilton M J, Thomas K V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 14(15): 129-141.

[33] Yang S, Carlson K H. Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and wastewater matrices [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 15(38): 141-155.

[34] Ruyck H D, Ridder H D, Ruyck H D. Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. Mass Spectrometers, 2007, 24(21): 1511-1520.

[35] Fagerquist C K, Lightfield A R, Lehotay S J. Confirmatory and quantitative analysis of beta-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatograpby-tandem mass spectrometry [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 77(5): 1473-1482.

[36] 仲维科, 郝酰, 樊耀波, 等. 食品农药残留分析进展[J]. 分析化学评述和进展, 2000, 28(7): 904-910.

[37] 王舒婷, 慕慧, 张艳伟, 等. 兽药多残留分析中前处理与检测技术研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(8): 43-46.

[38] Barker S A, Long A R, Short C R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion [J]. Journal of Chromatography A, 1989, 1(47): 353-361.

[39] Lott H M, Barker S A. Comparison of a matrix solid phase dispersion and a classical extraction method for the determination of chlorinated pesticides in fish [J]. Environ Monit Assess, 1993, 13(28): 109-116.

[40] Blasco C, Font G, Pico Y. Comparison of microextraction procedures to determine pesticide multi-residues in food [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 13(970): 201-212.

[41] 马微, 彭涛, 朱明达, 等. 加速溶剂萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定减肥保健食品中 11 种食欲抑制剂[J]. 分析化学, 2009, 37(11): 1583-1589.

[42] Wang P, Zhang Q, Wang Y, et al. Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent

extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 64(1): 43-48.

[43] Li Y, Pang T, Guo Z, et al. Accelerated solvent extraction for GC-based tobacco fingerprinting and its comparison with simultaneous distillation and extraction[J]. Talanta, 2010, 53(81): 650-656.

[44] 王耀, 刘少彬, 谢翠美, 等. 加速溶剂萃取凝胶渗透色谱-固相萃取净化气相色谱质谱法测定咸鱼中有机磷农药残留[J]. 分析化学研究报告, 2011, 39(1): 67-71.

[45] 赵保成, 王艳玲, 孙明山, 等. 加速溶剂萃取技术在检测分析中的应用[J]. 农业与技术, 2009, 29(6): 85-87.

[46] 邱市华, 杨再雍, 李明玉. 快速溶剂萃取技术在有机污染物检测中的应用[J]. 化工时刊, 2008, 22(9): 39-41.

[47] Richter B E, Ezzell J L, Knowles D E, et al. Extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans from environmental samples using accelerated solvent extraction (ASE) [J]. Chemosphere, 1997, 26(34): 975-987.

[48] Hotay S J, Mastovskak, Yun S J. Evaluation of two fast and easy methodsfor pesticide residue analysis in fatty food matrixes [J]. Journal of Aoac International , 2005, 14(88): 630-633.

[49] Anastassiadas M, Lehotay S J, Stajnbaher D. Fastand easy muhiresidue method employing aeetonitrile exo traction/partitioning and dispersive solid-extraction for the determination of pesticide residuesin produce [J]. Journal of Aoac International , 2003, 12(86): 412-413.

[50] Hotay S J. Quick, easy, cheap, effective, ragged, and safe (QuEchERS) approach for determiningpesticide residues [M]. USA: Humana Press, 2004: 157-178.

[51] 胡西洲, 程运斌, 胡定金. QuEchERS 法测定蔬菜中有机磷类农药多残留分析[J]. 2006, 32(3): 132-133.

[52] 陈琳垚. 新型 QuEChERS 样品前处理方法在水产品兽药多残留分析中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2013.

[53] 阮华, 荣维广, 宋宁慧, 等. QuEChERS-在线凝胶色谱-气相色谱-质谱法测定植物油中 34 种农药残留[J]. 2014, 42(8): 1110-1116.

[54] 张帆, 李忠海, 席慧, 等. 纳米材料在食品有害污染物检测中的应用进展[J]. 2013, 32(12): 1523-1528.

[55] Lee H J, Lee M H, Ryu P D, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for screening the plasma residues of tetracycline antibiotics in pigs[J]. The Journal of Veterinary Medical Science/the Japanese Society of Veterinary Science, 2011, 63(5): 553-556.

[56] 王帅兵, 左伟勇, 洪伟鸣, 等. 猪尿和猪肝中克伦特罗 EUSA 方法的建立及初步应用[J]. 2012, 40(1): 279-282.

[57] 郑志高, 江红星, 吕芳, 等. 磺胺类药物的多残留酶联免疫法检测[J]. 2006, 16(1): 19-22.

[58] 刘咏梅, 王志华, 储晓刚. 凝胶渗透色谱净化气相色谱分离同时测定糙米中 50 种有机磷农药残留[J]. 分析化学, 2005, 33(6): 808-810.

[59] 莫小荣, 郑春慧, 陈建伟, 等. 浊点萃取-异辛烷反萃取-气相色谱测定茶叶中拟除虫菊酯农药残留[J]. 分析化学, 2009, 37(8): 1178-1181.

[60] 高扬. 毛细管气相色谱法检测面粉中添加剂方法的研究[D]. 天津: 南开大学, 2009.

[61] 陈烨, 王红松, 刘君峰, 等. 气相色谱外标法测定食品添加剂 1,2-丙二醇中 6 种杂质[J]. 中国食品添加剂, 2014, 25(10): 89-94.

[62] 李俊锁. 兽药残留分析研究进展[J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 81-87.

[63] 高强, 冯钰锜. 磁性微纳米材料的功能化及其在食物样品前处理中的应用进展[J]. 色谱, 2014, 32(10): 1043-1051.

[64] 潘胜东, 叶美君, 金米聪. 磁性固相萃取在食品安全检测中的应用进展[J]. 理化检验-化学分册, 2015, 51(3): 416-424.

[65] Liu Q, Zhou Q F, Jiang G B. Nanomaterials for analysis and monitoring of emerging chemical pollutants[J]. Trac-trends in Analytical Chemistry, 2014, 34(58): 10-22.

[66] Li X S, Zhu G T, Luo, et al. Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation[J]. Trac- trends Analytical Chemistry, 2013, 33(45): 233-247.

[67] Zhang N, Peng H Y, Hu B. Light-induced pH change and its application to solid phase extraction of trace heavy metals by high-magnetization Fe_3O_4@SiO_2@TiO_2 nanoparticles followed by inductively coupled plasma mass spectrometry detection[J]. Talanta, 2012, 55(94): 278-283.

[68] Faraji M, Yamini Y, Rezaee M. Extraction of trace amounts of mercury with sodium dodecyle sulphate-coated magnetite nanoparticles and its determination by flow injection inductively coupled plasma-optical emission spectrometry[J]. Talanta, 2010, 81(3): 831-836.

[69] Deng X J, Guo Q J, Chen X P. Rapid and effective sample clean-up based on magnetic

multiwalled carbon nanotubes for the determination of pesticide residues in tea by gas chromatography-mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2014, 39(145): 853-858.

[70] Wu Q H, Zhao G Y, Feng C. Preparation of a graphene-based magnetic nanocomposite for the extraction of carbamate pesticides from environmental water samples[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 19(44): 7936-7942.

[71] 巫远招, 徐维莲, 侯建国, 等. 基于 Fe_3O_4@ZrO_2 磁性纳米颗粒选择性富集-电感耦合等离子体发射光谱法检测蔬菜中痕量有机磷研究[J]. 农药学学报, 2010, 12(2): 178-184.

[72] Xiao D L, Dramou P, Xiong N Q. Preparation of molecularly imprinted polymers on the surface of magnetic carbon nanotubes with a pseudo template for rapid simultaneous extraction of four fluoroquinolones in egg samples[J]. Analyst, 2013, 138(11): 3287-3296.

[73] Karimi M, Aboufazeli F, Zhad H R L Z, et al. Determination of Sulfonamides in Chicken Meat by Magnetic Molecularly Imprinted Polymer Coupled to HPLC-UV[J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(1): 73-80.

[74] 王志, 王春. 磁性固相萃取技术研究的新进展[J]. 色谱, 2012, 30(10): 977-979.

[75] 葛涵, 沈舜义. 大环内酯类抗生素研究进展[J]. 世界临床药物, 2007, 28(6): 376-380.

[76] 于慧娟, 沈晓盛, 李庆, 等. 高效液相色谱-荧光法测定对虾组织中红霉素的残留量[J]. 2006, 25(4): 82-85.

[77] European Commission, Commission Regulation (EEC) No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin[S]. European Biophyscis Journal, 2010, 27(L15): 1-72.

[78] USDA (United States Department of Agriculture). Foreign Agricultural Service[J/OL]. Veterinary drug MRL database. http://www.mrldatabase.com/default.cfm. 2010.

[79] 中华人民共和国农业部. 动物源食品中兽药最高残留量[S]. 2002, 第 235 号文件.

[80] Hummers W S, Offeman R E. Preparation of Graphitic Oxide [J]. Journal of the American Chemical Society , 1958, 22(80): 1339.

[81] 马文石, 周俊文, 程顺喜. 石墨烯的制备与表征[J]. 高校化学工程学报, 2010, 24(4): 719-722.

[82] Wu Q H, Zhao G Y, Feng C, et al. Preparation of a graphene-based magnetic nanocomposite for the extraction of carbamate pesticides from environmental water samples[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 19(44): 7936-7942.

[83] Sagratini G, Fernández-Franzón M, De Berardinis F, et al. Simultaneous determination of eight underivatised biogenic amines in fish by solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2012, 37(132): 537-543.

[84] Wang Y, Jin H, Ma S, et al. Determination of 195 pesticide residues in Chinese herbs by gas chromatography-mass spectrometry using analyte protectants[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 19(2): 334-342.

[85] 黄德凤, 戚隽渊, 孙建华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 19 种磺胺类药物残留量[J]. 水产科技情报, 2012, 40(3): 148-151.

[86] 陈振桂, 占春瑞, 郭平, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中 13 种磺胺类药物残留的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 448-451.

[87] 庞国芳. 液相色谱串联质谱同时测定家禽组织中 16 种磺胺残留[J]. 分析化学, 2005, 33(9): 1252-1256.

[88] 李俊锁, 邱月明, 王超著. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.

[89] Antonio C, Manuela N. Liquid chromatography-mass spectrometry methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products [J]. Journal of Chromatography A, 2002, 10(47): 53-89.

[90] 刘雪红. 鸡肉中磺胺类药物残留的薄层色谱检测方法[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(5): 31-34.

[91] 陈振桂. 水产品中磺胺类和氯霉素类兽药残留分析方法研究[D]. 江西: 南昌大学, 2007.

[92] 吴翠琴, 陈迪云, 周爱菊. 离子液体单滴微萃取-高效液相色谱法测定水体中磺胺类药物[J]. 分析化学, 2011, 39(1): 17-21.

[93] 罗辉泰, 黄晓兰, 吴惠勤, 等. 快速高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 5 类 33 种药物残留[J]. 分析化学, 2012, 40(2): 273-279.

[94] Won S Y, Lee C H, Chang H S, et al. Monitoring of 14 sulfanomide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS [J]. Food Control, 2011, 22(35): 1101-1107.

[95] Ben W W, Qiang Z M, Adams C, et al. Simultaneous determination of sulfanomide, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2008, 16(12): 173-180.

[96] Commission Decision 2004/25/EC of 22 December 2003 on the amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin[S]. European Biophyscis Journal, 2004, 21(L6): 38-39.

[97] Lopes R P, Reyes R C, Romero-González R, et al. Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2012, 55(89): 201-208.

[98] 白丽丽, 戴华, 林正峰. 高效液相色谱-串联质谱法检测虾中 9 种磺胺类药物的残留[J]. 中国当代医药, 2011, 23(23), 35-42.

[99] 徐琳, 罗义, 徐冰洁. 海河底泥中 12 种抗生素残留的液相色谱串联质谱同时检测[J]. 分析测试学报, 2010, 29(1), 59-65.

[100] Fillâtre Y, Rondeau D, Bonnet B, et al. Multiresidue analysis of multiclass pesticides in lavandin essential oil by LC/MS/MS using the scheduled selected reaction monitoring mode [J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(25): 109-117.

[101] Zeng Z L, Dong A, Yang G X, et al. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2005, 13(2): 202-209.

[102] 丁国华, 丁磊如, 刘馥. 氟喹诺酮类药的神经毒性作用[J]. 中国医院药学杂志, 1995, 8(15): 380- 384.

[103] Tang C, Yu Y Y, Huang Q X, et al. Simultaneous determination of fluoroquinolone and tetracycline antibacterials in sewage sludge using ultrasonic-assisted extraction and HPLC-MS/MS[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2012, 92(12): 1389-1402.

[104] Hu W, Ma L L, Guo C S, et al. Simultaneous extraction and determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides antibiotics in soils using optimised solid phase extraction chromatography-tandem mass spectrometry[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2012, 92(6): 698-713.

[105] 张国文, 占春瑞, 倪永年. HPLC 法测定鳗鱼中多种氟喹诺酮[J]. 食品科技, 2004, 20(11): 69-71.

[106] 陈辉华, 戴军, 王洪新. HPLC 法对鱼肉中 3 种四环素类和 5 种氟喹诺酮类兽药残留的同时测定[J]. 分析测试学报, 2008, 27(9): 951- 955.

附录一　攻读硕士研究生期间发表的论文

1. 秦烨, 陈琳垚, 卢延斌. QuEChERS-UPLC-MS/MS快速测定鱼肉中磺胺类药物, 理化检验-化学分册, 2015, 51: 423-426.

2. Yanbin Lu*; Ye Qin; Xiaoji Cao; Zhuo Cheng. Rapid Determination of of Malachite Green and Its Metabolite in Fish Tissues by High-Performance Liquid Chromatography: A Practical Comparison of Core-shell Particles and sub-2 μm Porous Particles. Journal of separation Science.

致 谢

本论文是在卢延斌副研究员的共同指导下完成的，从论文的选题、研究思路的确立和论文的撰写，整个过程中导师都给予了悉心的指导。他对学科发展敏锐的洞察力、严谨的学术态度和兢兢业业的作风时刻感染和鞭策着我，并将使我终生受益；学习之余，导师在生活中给予了我无微不至的关怀和照顾。在此，谨向导师卢延斌副研究员致以我最诚挚的敬意。

感谢戴志远研究员、金仁耀老师、黄超群老师、张燕平副教授在实验过程中提供了宝贵意见，感谢他们的耐心指导和宝贵的建议，没有他们的热忱相助，本论文将难以顺利完成。感谢同我一起学习工作的王韦、禄彦科、李慧思、吴娟以及师妹程卓、刘春平、宋悦感谢他们在实验过程中给予的宝贵建议和帮助，以及在学习生活中给予的支持和理解。同时感谢我的女朋友黄程，一直无怨无悔的陪着我烦恼、开心，陪我一起走过毕业最难熬的这段时间，同时对论文的最终完成给予巨大的帮助。

最后，我要特别感谢我的父母和我朋友，他们对我不离不弃的支持和鼓励使我得以顺利完成学业，他们永远是我学习和生活的动力源泉。

独 创 性 声 明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师指导下，独立进行研究工作所取得的成果。尽我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或研究成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律和学术责任由本人承担。

学位论文作者签名：秦晔

日期：2015 年 12 月 28 日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解浙江工商大学有关保留、使用学位论文的规定：浙江工商大学有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以将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、汇编学位论文，并且本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。

保密的学位论文在解密后也遵守此规定。

签名：秦晔　　导师签名：

日期：2015 年 12 月 29 日