



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470763 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910782801.0

G01N 33/531(2006.01)

(22)申请日 2019.08.23

(71)申请人 北京六角体检测技术有限公司

地址 101102 北京市通州区中关村科技园
区通州园金桥科技产业基地景盛南四
街15号12C

(72)发明人 贾东芬 刘培培

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 马云华

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/28(2006.01)

G01N 30/86(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法

(57)摘要

本发明提供了同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法,属于食品安全检测技术领域。本发明提供的检测方法只需要对水产品组织样品进行一次前处理,即可实现水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素这三类药物的同步提取和检测,前处理时间短、效率高、成本低、操作简便,检出限低。如实施例结果所示,孔雀石绿、隐色孔雀石绿的检出限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$;硝基呋喃代谢物AMOZ、AOZ、AHD、SEM的检出限均为 $0.5 \mu\text{g/kg}$;氯霉素的检出限为 $0.1 \mu\text{g/kg}$;回收率范围75%~110%。



1. 一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法,其特征
在于,包括以下步骤:

将水产品组织样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液混合,在超声条件下进行
衍生化,得到衍生液;

将所述衍生液、硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液混合,进行提取,得到提取
液;

采用色谱柱对所述提取液进行净化,将所得净化液进行浓缩,得到浓缩液;

对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述醋酸水溶液的质量浓度为2~5%。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的质量浓度
为0.5~1.2%。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的方法,其特征在于,所述水产品样品、醋酸水溶液和
邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的用量比为5g: (2.5~3.5) mL: (0.5~1.2) mL。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述硫酸钠-硅藻土混合物中硫酸钠和硅
藻土的质量比为1: (0.7~1.2)。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述乙腈-甲醇混合液中乙腈和甲醇的体
积比为1: (1.5~3)。

7. 根据权利要求1或5所述的方法,其特征在于,所述硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲
醇混合液的用量比为3g: (3~10) mL。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述衍生化的温度为60~70℃,时间为10
~15min。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述提取的时间为5~8min。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢
物和氯霉素的残留量进行检测的方法包括免疫胶体金目视比色法或液相色谱-串联质谱仪
检测法。

一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及食品质量安全检测技术领域,具体涉及一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法。

背景技术

[0002] 食品中含有的农兽药残留、违禁类药物、人工色素及非法添加物严重影响着人类健康。例如,孔雀石绿是有毒的三苯甲烷类化合物,既是染料,也是消灭真菌、细菌、寄生虫的药物,长期超量使用可致癌。硝基呋喃类药物是一类广谱抗生素,对大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、真菌和原虫等病原体均有杀灭作用,但是硝基呋喃类药物及其代谢物对人体有致癌、致畸胎副作用。氯霉素能够治疗由伤寒杆菌、痢疾杆菌、大肠杆菌、流感杆菌、布氏杆菌、肺炎球菌等引起的感染,但是氯霉素会抑制骨髓造血机能,对血液系统的毒性较大。

[0003] 目前,对于水产品中的孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的检测工作主要是参照GB/T 19857-2005、GB/T 21311-2007和GB/T 22338-2008进行,然而现有检测方法都不能同步提取、检测多种类的药物残留量,且存在前处理时间长、操作步骤繁琐、检测成本高等缺陷。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素残留量的检测方法。本发明提供的检测方法前处理时间短、操作简单、检测成本低,能够实现同时对水产品中的孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素多种残留量的检测。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法,包括以下步骤:

[0007] 将水产品组织样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液混合,在超声条件下进行衍生化,得到衍生液;

[0008] 将所述衍生液、硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液混合,进行提取,得到提取液;

[0009] 采用色谱柱对所述提取液进行净化,将所得净化液进行浓缩,得到浓缩液;

[0010] 对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测。

[0011] 优选的,所述硝基呋喃代谢物包括呋喃它酮代谢物、呋喃唑酮代谢物、呋喃妥因代谢物和呋喃西林代谢物。

[0012] 优选的,所述醋酸水溶液的质量浓度为2~5%。

[0013] 优选的,所述邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的质量浓度为0.5~1.2%。

[0014] 优选的,所述水产品样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的用量比为5g:

(2.5~3.5) mL: (0.5~1.2) mL。

[0015] 优选的,所述硫酸钠-硅藻土混合物中无水硫酸钠和硅藻土的质量比为1: (0.7~1.2)。

[0016] 优选的,所述乙腈-甲醇混合液中乙腈和甲醇的体积比为1: (1.5~3)。

[0017] 优选的,所述硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液用量比为3g: (3~10) mL。

[0018] 优选的,所述衍生化的温度为60~70℃,时间为10~15min。

[0019] 优选的,所述提取的时间为5~8min。

[0020] 优选的,对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测的方法包括免疫胶体金目视比色法或液相色谱-串联质谱仪检测法。

[0021] 本发明提供了一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法,包括以下步骤:将水产品组织样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液混合,在超声条件下进行衍生化,得到衍生液;将所述衍生液、硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液混合,进行提取,得到提取液;采用色谱柱对所述提取液进行净化,将所得净化液进行浓缩,得到浓缩液;对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测。本发明提供的检测方法通过醋酸水溶液和衍生化将样品中的硝基呋喃代谢物快速衍生化,将固相微萃技术与固相分散技术相结合,使硝基呋喃代谢物衍生化产物与孔雀石绿、氯霉素共同被提取剂提取出来,净化,将所得浓缩液进行定性检测或定量检测,实现了水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素多种残留物的残留量的检测。本发明提供的检测方法只需要进行一次水产品组织样品的前处理,即可实现水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素这三类药物的同步提取和检测,耗时短、效率高、成本低、操作简便,检出限低。如实施例结果所示,孔雀石绿、隐色孔雀石绿的检出限为0.5μg/kg;硝基呋喃代谢物AMOZ、AOZ、AHD、SEM的检出限均为0.5μg/kg;氯霉素的检出限为0.1μg/kg;回收率范围75%~110%。

附图说明

[0022] 图1为实施例1~2的检测流程图;

[0023] 图2为孔雀石绿 (MG) 的检测色谱图;

[0024] 图3为隐色孔雀石绿 (LMG) 的检测色谱图;

[0025] 图4为呋喃它酮代谢物 (AMOZ) 的检测色谱图;

[0026] 图5为呋喃唑酮代谢物 (AOZ) 的检测色谱图;

[0027] 图6为呋喃妥因代谢物 (AHD) 的检测色谱图;

[0028] 图7为呋喃西林代谢物 (SEM) 的检测色谱图;

[0029] 图8为氯霉素 (CAP) 检测色谱图。

具体实施方式

[0030] 本发明提供了一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法,包括以下步骤:

[0031] 将水产品组织样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液混合,在超声条件下进行衍生化,得到衍生液;

[0032] 将所述衍生液、硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液混合,进行提取,得到提取液;

[0033] 采用色谱柱对所述提取液进行净化,将所得净化液进行浓缩,得到浓缩液;

[0034] 对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测。

[0035] 在本发明中,若无特殊说明,所有的原料组分均为本领域技术人员熟知的市售商品。

[0036] 本发明将水产品组织样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液混合,在超声条件下进行衍生化,得到衍生液。

[0037] 在本发明中,所述水产品组织样品优选包括鱼、虾、蟹或贝的肉质。在本发明中,所述水产品组织样品优选将水产品的肉质经过绞碎或均质得到。本发明对于所述绞碎或均质的具体操作没有特殊限定,采用本领域熟知的绞碎或均质操作即可。

[0038] 在本发明中,所述硝基呋喃代谢物优选包括呋喃它酮代谢物(AMOZ)、呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃妥因代谢物(AHD)和呋喃西林代谢物(SEM)。

[0039] 在本发明中,所述醋酸水溶液的质量浓度优选为2~5%,更优选为3~4.5%,最优选为4%。在本发明中,所述邻硝基苯甲醛的醋酸溶液优选是将邻硝基苯甲醛和醋酸(即冰乙酸)配制得到;所述邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的质量浓度优选为0.5~1.2%,更优选为0.8~1.1%,最优选为1%。在本发明中,所述醋酸水溶液作为检测试剂,所述邻硝基苯甲醛的醋酸溶液作为衍生化试剂,醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液配合使用,能够使硝基呋喃代谢物衍生化。在本发明中,所述水产品样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的用量比为5g:(2.5~3.5)mL:(0.5~1.2)mL,更优选为5g:(2.8~3.2)mL:(0.8~1.1)mL,最优选为5g:3mL:1mL。在本发明中,所述醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液的用量过少会影响衍生化效率。

[0040] 在本发明中,所述所述水产品组织样品、醋酸水溶液和邻硝基苯甲醛的醋酸溶液混合优选在振荡条件下进行,所述混合的时间优选为2~10min,更优选为2~5min,最优选为2min。

[0041] 在本发明中,所述衍生化优选在超声波提取器中进行。在本发明中,所述超声的功率优选为90~100%,更优选为98~100%。在本发明中,所述衍生化的温度优选为60~70℃,更优选为60~65℃,最优选为65℃;所述衍生化的时间优选为10~15min,更优选为10~12min,最优选为10min。在本发明中,所述衍生化过程中,水产品组织样品中的硝基呋喃代谢物发生衍生化分别生成5-吗啉甲基-3-氨基-2-噁唑烷基酮的衍生物(2-NP-AMOZ)、1-氨基-乙内酰脲的衍生物(2-NP-AHD)、3-氨基-2-噁唑酮的衍生物(2-NP-AOZ)和氨基脲的衍生物(2-NP-SEM)。

[0042] 得到衍生液后,本发明将所述衍生液、硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液混合,进行提取,得到提取液。在本发明中,该步骤将固相微萃技术与固相分散技术相结合,从而使硝基呋喃代谢物衍生化产物与孔雀石绿、氯霉素共同被提取剂提取出来。

[0043] 在本发明中,所述硫酸钠-硅藻土混合物中硫酸钠和硅藻土的质量比优选为1:(0.7~1.2),更优选为1:(0.8~1.1),最优选为1:1。在本发明中,所述硫酸钠优选为无水硫酸钠。在本发明中,所述硫酸钠-硅藻土混合物作为提取剂,其作用是:吸附体系中的水分、强极性化合物并且对样品基质有分散作用。

[0044] 在本发明中,所述乙腈-甲醇混合液中乙腈和甲醇的体积比优选为1:(1.5~3),更优选为1:(1.8~2.5),最优选为1:2。在本发明中,所述乙腈-甲醇混合液作为提取剂,其作用是提取水产品组织样品的孔雀石绿、硝基呋喃代谢物衍生化产物和氯霉素。

[0045] 在本发明中,所述硫酸钠-硅藻土混合物和乙腈-甲醇混合液用量比优选为3g:(3~10)mL,更优选为3g:(4~8)mL,最优选为1g:2mL。

[0046] 在本发明中,所述提取优选在振荡条件下进行,所述提取的时间优选为5~8min,更优选为5~7min,最优选为5min。

[0047] 在本发明中,所述提取完成后,优选还包括将提取所得体系进行固液分离,上清液即为提取液。在本发明中,所述固液分离的方式优选为离心。在本发明中,所述离心的速度优选为8000~11000r/min;所述离心的时间优选为5~8min,更优选为5~6min,最优选为5min。在本发明中,优选取3mL提取液进行后续的净化。

[0048] 得到提取液后,本发明采用色谱柱对所述提取液进行净化,将所得净化液进行浓缩,得到浓缩液。

[0049] 在本发明中,所述色谱柱在使用前优选采用5.0mL所述乙腈-甲醇混合液进行激活。本发明对于所述色谱柱没有特殊限定,次奥运本领域熟知的色谱柱即可。在本发明中,所述净化时加入的提取液的体积优选为3mL,收集流出液后进行浓缩。在本发明中,所述浓缩的方式优选为氮吹。本发明对于所述氮吹的具体操作没有特殊限定,采用本领域熟知的氮吹操作即可。本发明对于所述氮吹的时间没有特殊要求,将所得流出液氮吹至干即可。

[0050] 得到浓缩液后,本发明对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测。

[0051] 在本发明中,对所述浓缩液中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的残留量进行检测的方法包括免疫胶体金目视比色法或液相色谱-串联质谱仪检测法(LC-MS/MS)。在本发明中,所述免疫胶体金目视比色法可以进行定性检测;所述液相色谱-串联质谱仪可以进行定量检测。

[0052] 在本发明中,所述免疫胶体金目视比色法的步骤优选包括:将所述浓缩液、缓冲液和孔雀石绿衍生化试剂混合,得到待测液;吸取待测液分别滴到孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM、氯霉素的金标卡上,吸取对照液分别滴到孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM、氯霉素的另一张金标卡上,5min后判读检测结果。

[0053] 在本发明中,所述缓冲液优选为2wt%的乙酸铵溶液。在本发明中,所述孔雀石绿衍生化试剂优选为0.5wt%的单质碘的乙腈溶液。在本发明中,所述缓冲液的用量优选为2mL。在本发明中,所述孔雀石绿衍生化试剂的用量优选为50μL;所述吸取样品液的体积优选为120μL;所述吸取对照液的体积优选为120μL。在本发明中,所述对照液优选为使用经过检测的不含孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素的阴性水产品样品制备获得,所述对照液的制备优选与所述待测水产品样品的制备过程相同。

[0054] 在本发明中,金标卡的质控线C线显色正常,如果样品液的测试线T线消线,或者,样品液的测试线T线颜色比对照液或阴性样液的T线颜色浅,则样品中孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM残留量 $\geq 0.5\mu\text{g/kg}$,氯霉素残留量 $\geq 0.1\mu\text{g/kg}$;如果样品的测试线T线颜色比对照液或阴性样液的T线颜色深或颜色相同,则样品中孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM残留量 $< 0.5\mu\text{g/kg}$ 或者无残留,氯霉素残留量 $< 0.1\mu\text{g/kg}$ 或者无残留;如果金标卡的质控线C线未显

色,则金标卡无效,需要更换金标卡重新进行实验。

[0055] 在本发明中,所述液相色谱-串联质谱仪检测法的操作步骤优选包括:将所述浓缩液用1mL乙腈-乙酸铵溶液(1:9,V:V)溶解,得到待测液,将所述待测液过微孔滤膜过滤后,采用液相色谱-串联质谱仪进行检测。

[0056] 在本发明中,所述孔雀石绿及其代谢产物的液相色谱条件优选包括:色谱柱:C18柱,50mm×2.1mm,1.7 μ m或相当者;柱温为30℃;进样量为20 μ L;流动相为乙腈和5mmol/L乙酸铵溶液的混合溶液(乙腈:乙酸铵溶液体积比=3:1);流动相流速为0.2mL/min。在本发明中,所述乙酸铵溶液优选为现用现配,配制方法优选为将0.385g无水乙酸铵溶解于水中,定容至1000mL,用冰乙酸调节pH=4.5,过0.2 μ m滤膜。

[0057] 在本发明中,所述孔雀石绿及其代谢产物的质谱条件优选包括:扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应检测;离子源温度:300℃;离子传输管温度:350℃;鞘气压力:40arb;辅助气压力:10arb;喷雾电压:3500V。

[0058] 在本发明中,所述硝基呋喃类药物代谢物衍生物的液相色谱条件优选包括:色谱柱:C18柱,50mm×2.1mm,1.7 μ m或相当者;柱温为30℃;进样量为20 μ L;流动相为甲醇和2mmol/L乙酸铵溶液的混合溶液。在本发明中,所述乙酸铵溶液优选为现用现配,配制方法优选为将0.15g无水乙酸铵溶解于水中,定容至1000mL,过0.2 μ m滤膜。在本发明中,优选采用梯度洗脱方式。

[0059] 在本发明中,所述硝基呋喃类药物代谢物衍生物的质谱条件优选包括:扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应检测;离子源温度:300℃;离子传输管温度:300℃;鞘气压力:30arb;辅助气压力:15arb;喷雾电压:3800V。

[0060] 在本发明中,所述氯霉素的液相色谱条件优选包括:色谱柱:C18柱,50mm×2.1mm,1.7 μ m或相当者;柱温为40℃;进样量为20 μ L;流动相为甲醇和水的混合溶液(甲醇:水体积比=2:3);流动相流速为0.25mL/min。在本发明中,所述乙酸铵溶液优选为现用现配,配制方法优选为将0.385g无水乙酸铵溶解于水中,定容至1000mL,用冰乙酸调节pH=4.5,过0.2 μ m滤膜。

[0061] 在本发明中,所述氯霉素的质谱条件优选包括:扫描方式:负离子扫描;检测方式:多反应检测;离子源温度:300℃;离子传输管温度:300℃;鞘气压力:30arb;辅助气压力:10arb;喷雾电压:2700V。

[0062] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0063] 实施例1

[0064] (I) 将5g均质后的鱼肉样品置于50mL离心管中,加入3.0mL 4wt%醋酸水溶液和1.0mL 1wt%邻硝基苯甲醛的醋酸溶液,振荡2min充分混匀,置于65℃超声波提取器中,超声10min,在超声过程中振荡离心管1~2次,得到衍生液;

[0065] (II) 将衍生液、3g质量比为1:1的无水硫酸钠-硅藻土混合物和6.0mL体积比为1:2的乙腈-甲醇混合液,振荡5min混匀,在8000r/min条件下离心5min,上清液即为提取液;

[0066] (III) 将固相萃取柱用5.0mL体积比为1:2的乙腈和甲醇的混合溶液进行激活,将

3mL所述提取液过柱,收集流出液,氮吹至近干,得到浓缩液;

[0067] (IV) 在所述浓缩液中加入2mL的2wt%的乙酸铵溶液,加入50 μ L的0.5wt%的单质碘的乙腈溶液混合,得到待测液;吸取120 μ L待测液分别滴到孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM、氯霉素的金标卡上,吸取120 μ L对照液分别滴到孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM、氯霉素的另一张金标卡上,5min后判读检测结果。金标卡的质控线C线显色正常,如果样品液的测试线T线消线,或者,样品液的测试线T线颜色比对照液或阴性样液的T线颜色浅,则样品中孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM残留量 $\geq 0.5\mu\text{g/kg}$,氯霉素残留量 $\geq 0.1\mu\text{g/kg}$;如果样品的测试线T线颜色比对照液或阴性样液的T线颜色深或颜色相同,则样品中孔雀石绿、AMOZ、AOZ、AHD、SEM残留量 $< 0.5\mu\text{g/kg}$ 或者无残留,氯霉素残留量 $< 0.1\mu\text{g/kg}$ 或者无残留;如果金标卡的质控线C线未显色,则金标卡无效,需要更换金标卡重新进行实验。

[0068] 检出限:孔雀石绿、隐色孔雀石绿的检出限为 $0.5\mu\text{g/kg}$;硝基呋喃代谢物AMOZ、AOZ、AHD、SEM的检出限均为 $0.5\mu\text{g/kg}$;氯霉素的检出限为 $0.1\mu\text{g/kg}$ 。

[0069] 实施例2

[0070] 按照实施例1的方法制备浓缩液,用1mL乙腈-乙酸铵溶液(1:9,V:V)溶解浓缩液,得到孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素的待测液,将所述待测液过微孔滤膜后,采用液相色谱-串联质谱仪进行检测。添加 $0.5\mu\text{g/kg}$ 孔雀石绿、 $0.5\mu\text{g/kg}$ 隐色孔雀石绿、 $0.5\mu\text{g/kg}$ AMOZ、 $0.5\mu\text{g/kg}$ AOZ、 $0.5\mu\text{g/kg}$ AHD、 $0.5\mu\text{g/kg}$ SEM和 $0.1\mu\text{g/kg}$ 氯霉素的鱼肉样品经本发明合检方法处理后,采用LC-MS/MS检测,所得色谱图如图2~8所示,图2为孔雀石绿(MG)的检测色谱图,图3为隐色孔雀石绿(LMG)的检测色谱图,图4为呋喃它酮代谢物(AMOZ)的检测色谱图,图5为呋喃唑酮代谢物(AOZ)的检测色谱图,图6为呋喃妥因代谢物(AHD)的检测色谱图,图7为呋喃西林代谢物(SEM)的检测色谱图,图8为氯霉素(CAP)检测色谱图。

[0071] (1) 孔雀石绿及其代谢产物检测的液相色谱-串联质谱条件

[0072] 液相色谱条件:色谱柱:C18柱,50mm $\times$ 2.1mm,1.7 μm 或相当者;柱温为30 $^{\circ}\text{C}$;进样量为20 μL ;流动相为乙腈和5mmol/L乙酸铵溶液的混合溶液(乙腈:乙酸铵溶液体积比=3:1);流动相流速为0.2mL/min。其中,乙酸铵溶液配制方法为将0.385g无水乙酸铵溶解于水中,定容至1000mL,用冰乙酸调节pH=4.5,过0.2 μm 滤膜;

[0073] 质谱条件:扫描方式:正离子扫描;检测方式:多反应检测;离子源温度:300 $^{\circ}\text{C}$;离子传输管温度:350 $^{\circ}\text{C}$;鞘气压力:40arb;辅助气压力:10arb;喷雾电压:3500V;

[0074] 所述孔雀石绿及其代谢产物的定性、定量离子对如表1所示:

[0075] 表1孔雀石绿及其代谢产物的定性、定量离子对

[0076]

被测物及内标名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)
孔雀石绿 (MG)	329.1/208.1	329.1/313.1
	329.1/313.1	
隐色孔雀石绿 (LMG)	331.2/316.1	331.2/239.1
	331.2/239.1	

[0077]

氘代孔雀石绿 (D5-MG)	334.2/318.2	334.2/318.2
氘代隐色孔雀石绿	337.2/322.2	337.2/322.2

[0078] (2) 硝基呋喃类药物代谢物衍生物检测的液相色谱-串联质谱条件

[0079] 液相色谱条件: 色谱柱: C18柱, 50mm×2.1mm, 1.7μm或相当者; 柱温为30℃; 进样量为20μL; 流动相为甲醇和2mmol/L乙酸铵溶液的混合溶液; 其中, 乙酸铵溶液的配制方法为将0.15g无水乙酸铵溶解于水中, 定容至1000mL, 过0.2μm滤膜; 采用梯度洗脱方式, 梯度洗脱条件优选如表2所示:

[0080] 表2梯度洗脱条件

[0081]

时间/min	流速/(mL/min)	甲醇	2mmol/L乙酸铵
0	0.25	20	80
2	0.25	60	40
3	0.25	60	40
3.5	0.25	80	20
4.5	0.25	80	20
4.6	0.25	20	80
6	0.25	20	80

[0082] 质谱条件: 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应检测; 离子源温度: 300℃; 离子传输管温度: 300℃; 鞘气压力: 30arb; 辅助气压力: 15arb; 喷雾电压: 3800V;

[0083] 所述硝基呋喃类药物代谢物衍生物及对应内标的衍生物的定性离子对、定量离子对如表3所示:

[0084] 表3硝基呋喃代谢物及对应内标的衍生物的定性离子对、定量离子对

[0085]

衍生后的硝基呋喃代谢物 及内标物名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)
5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮的衍生物 (2-NP-AMTZ)	335.1/291.1	335.1/291.1
	335.1/262.1	

[0086]

1-氨基-乙内酰脲的衍生物 (2-NP-AHD)	249.0/134.0	249.0/134.0
	249.0/104.0	
3-氨基-2-噁唑酮的衍生物 (2-NP-AOZ)	236.0/134.0	236.0/134.0
	236.0/104.0	
氨基脲的衍生物 (2-NP-SEM)	209.0/166.0	209.0/166.0
	209.0/192.0	
5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮内标物的衍生物 (2-NP-D5-AMTZ)	340.1/296.1	340.1/296.1
1-氨基-乙内酰脲内标物的衍生物 (2-NP-13C3-AHD)	252.0/134.1	252.0/134.1
3-氨基-2-噁唑酮内标物的衍生物 (2-NP-D4-AOZ)	240.0/104.2	240.0/104.2
氨基脲内标物的衍生物 (2-NP-13C15N-SEM)	212.0/168.0	212.0/168.0

[0087] (3) 氯霉素检测的液相色谱-串联质谱条件

[0088] 液相色谱条件: 色谱柱: C18柱, 50mm×2.1mm, 1.7μm或相当者; 柱温为40℃; 进样量为20μL; 流动相为甲醇和水的混合溶液 (甲醇: 水体积比=2:3); 流动相流速为0.25mL/min; 其中, 乙酸铵溶液的配制方法为将0.385g无水乙酸铵溶解于水中, 定容至1000mL, 用冰乙酸调节pH=4.5, 过0.2μm滤膜;

[0089] 质谱条件: 扫描方式: 负离子扫描; 检测方式: 多反应检测; 离子源温度: 300℃; 离子传输管温度: 300℃; 鞘气压力: 30arb; 辅助气压力: 10arb; 喷雾电压: 2700V;

[0090] 所述氯霉素和氘代氯霉素的定性、定量离子对如表4所示:

[0091] 表4氯霉素和氘代氯霉素的定性、定量离子对

[0092]

被测物及内标名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)
----------	-------------	-------------

[0093]

氯霉素	321.0/152.0	321.0/257.0
	321.0/257.0	
氘代氯霉素 (d5-氯霉素)	326.0/157.1	326.0/157.1

[0094] 由上述实施例测试结果可知,本发明提供检测方法实现了水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素多种残留物的残留量的检测。本发明提供的检测方法只需要进行一次水产品组织样品的前处理,即可实现水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素这三类药物的同步提取和检测,耗时短、效率高、成本低、操作简便,检出限低。如实施例结果所示,孔雀石绿、隐色孔雀石绿的检出限为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$;硝基呋喃代谢物AMOZ、AOZ、AHD、SEM的检出限均为 $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$;氯霉素的检出限为 $\mu\text{g}/\text{kg}$;回收率范围75%~110%。

[0095] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

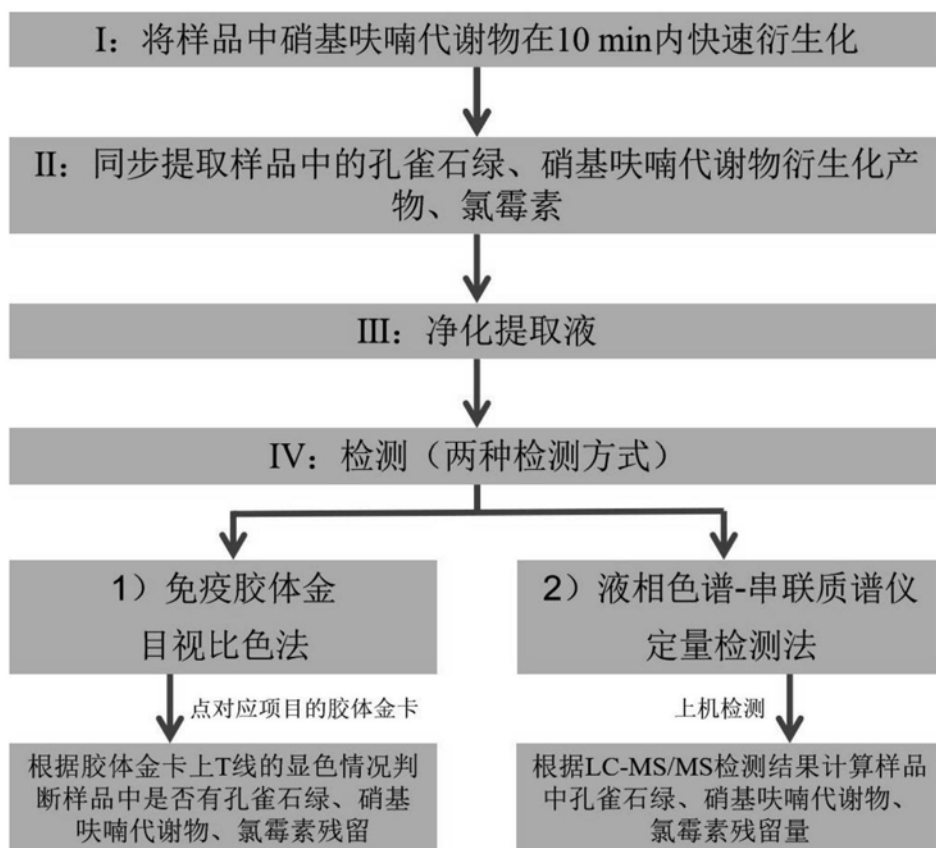


图1

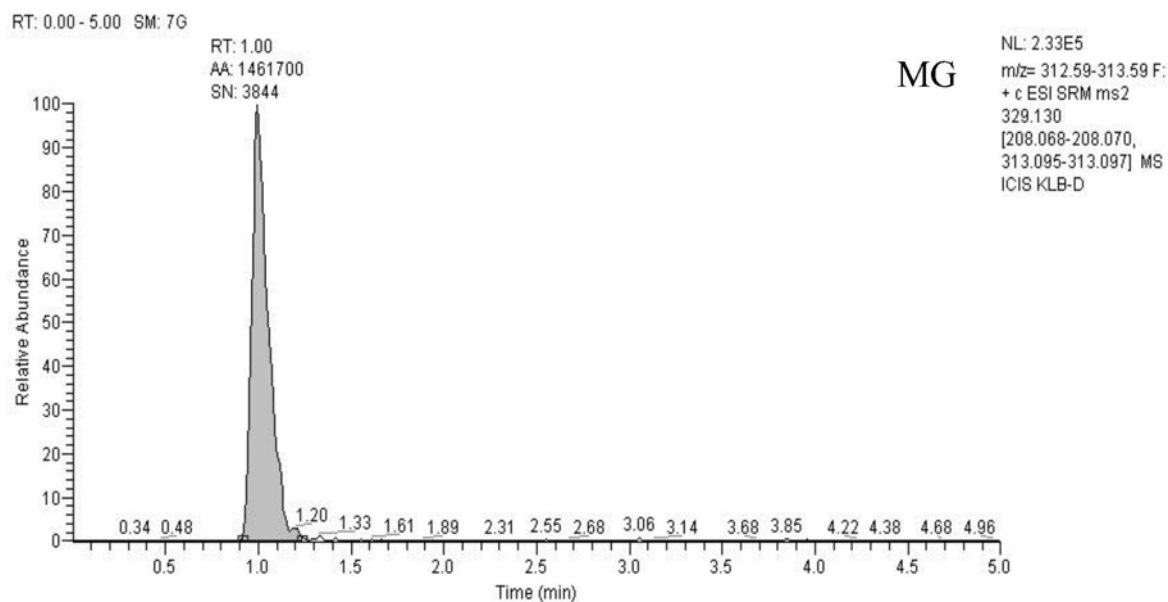


图2

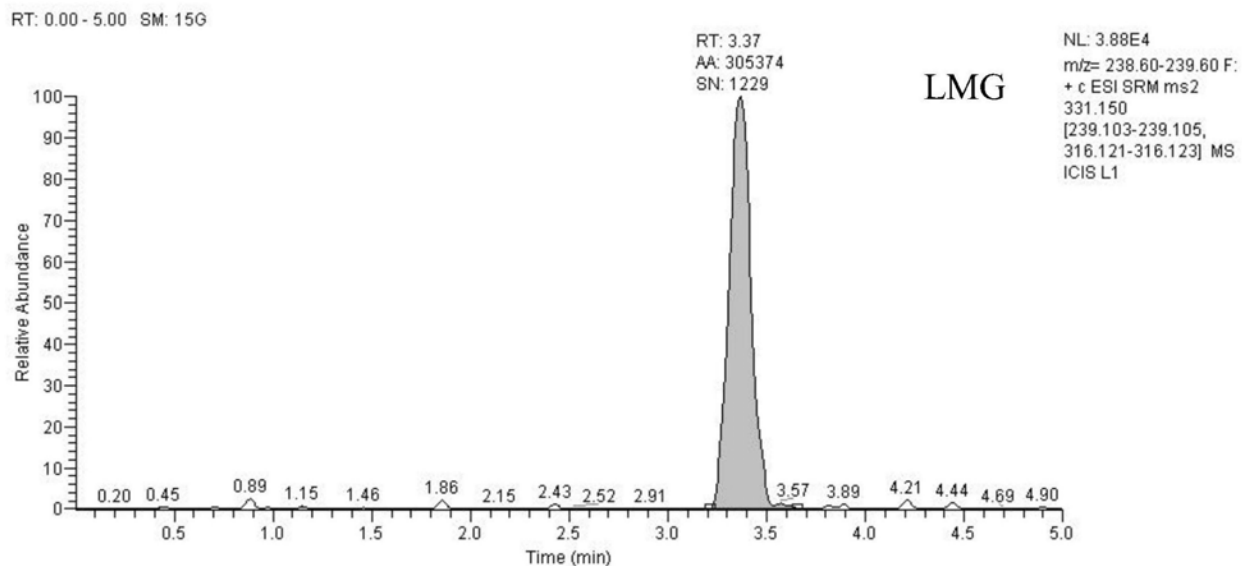


图3

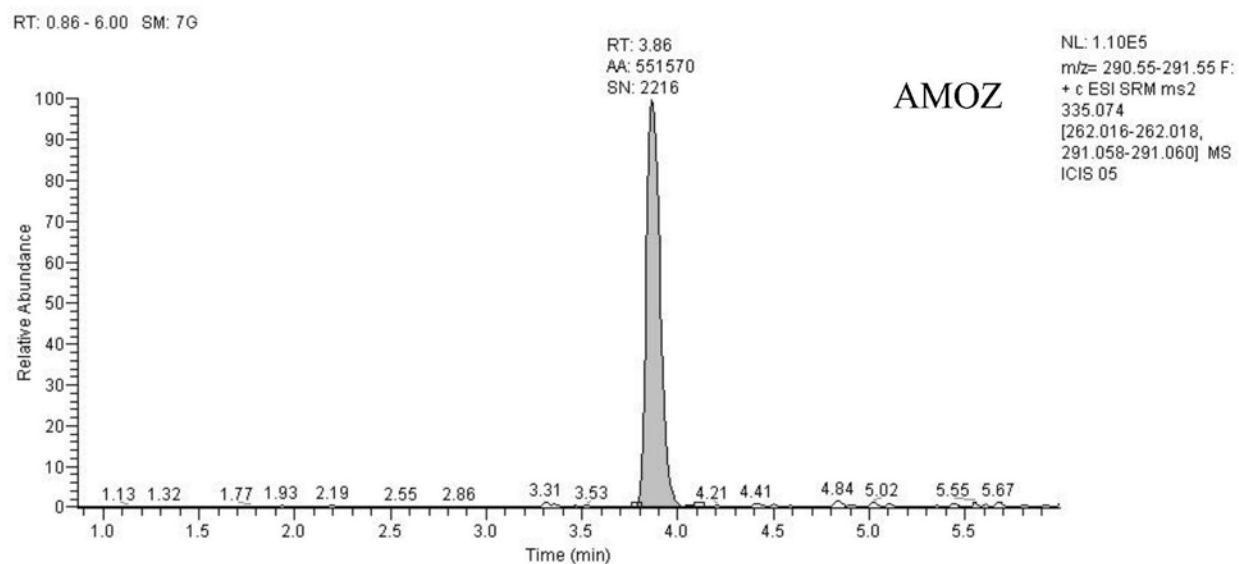


图4

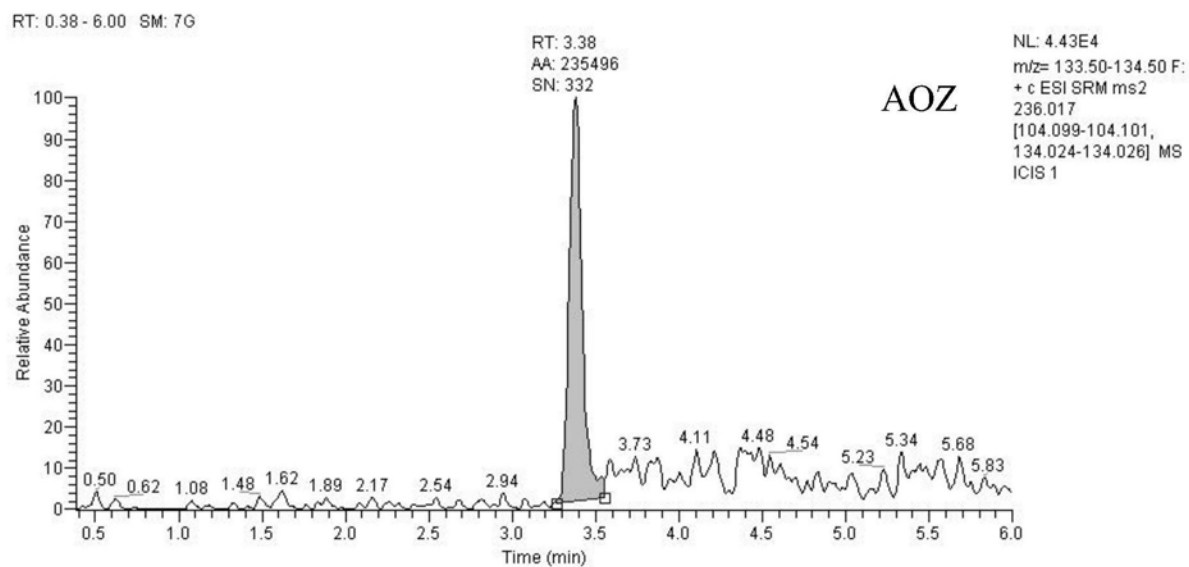


图5

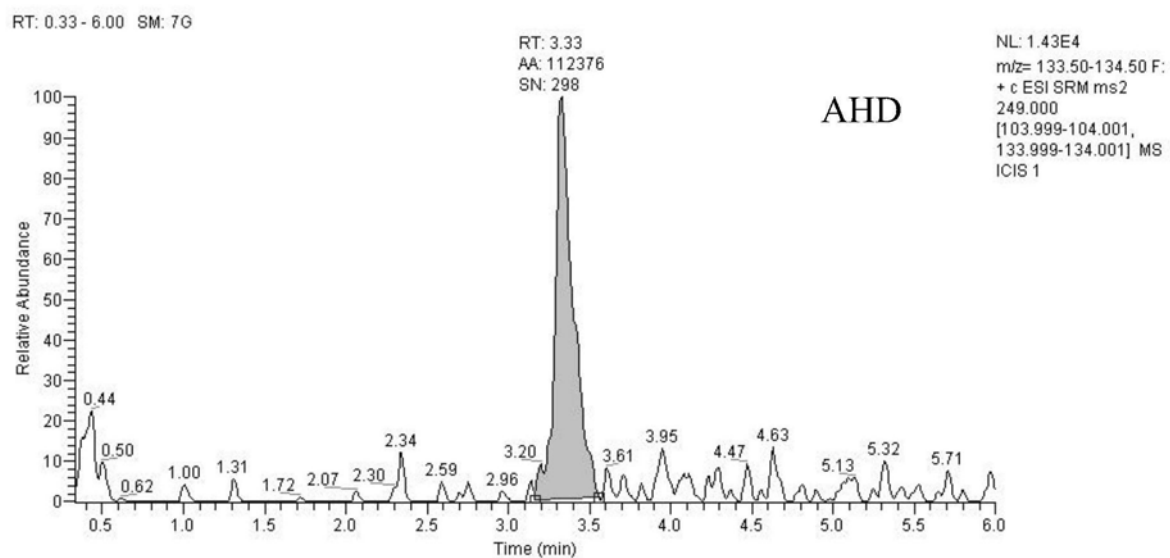


图6

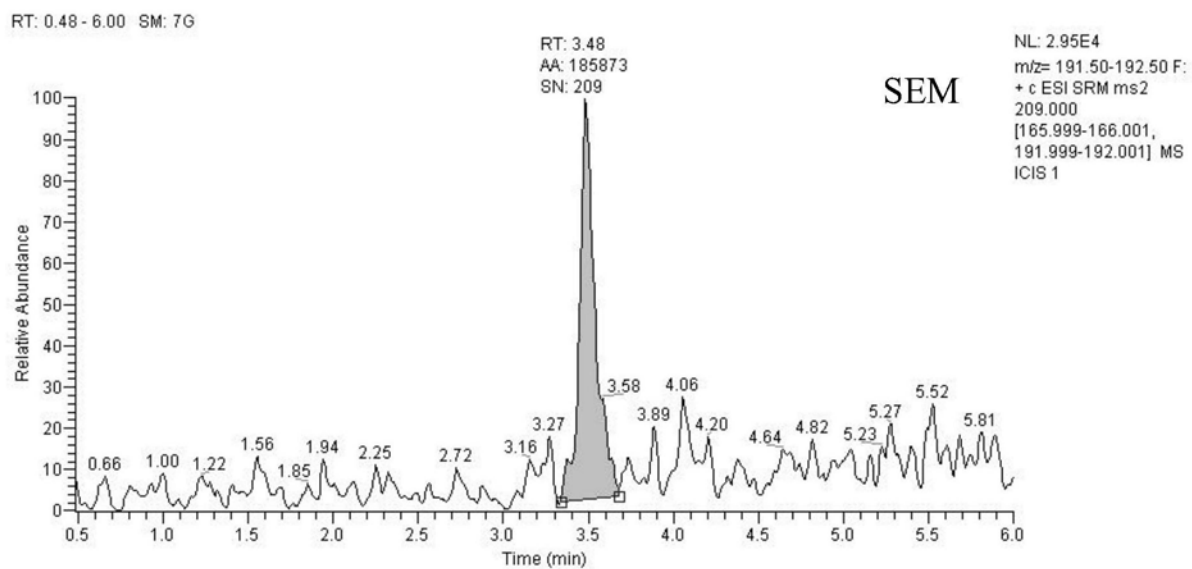


图7

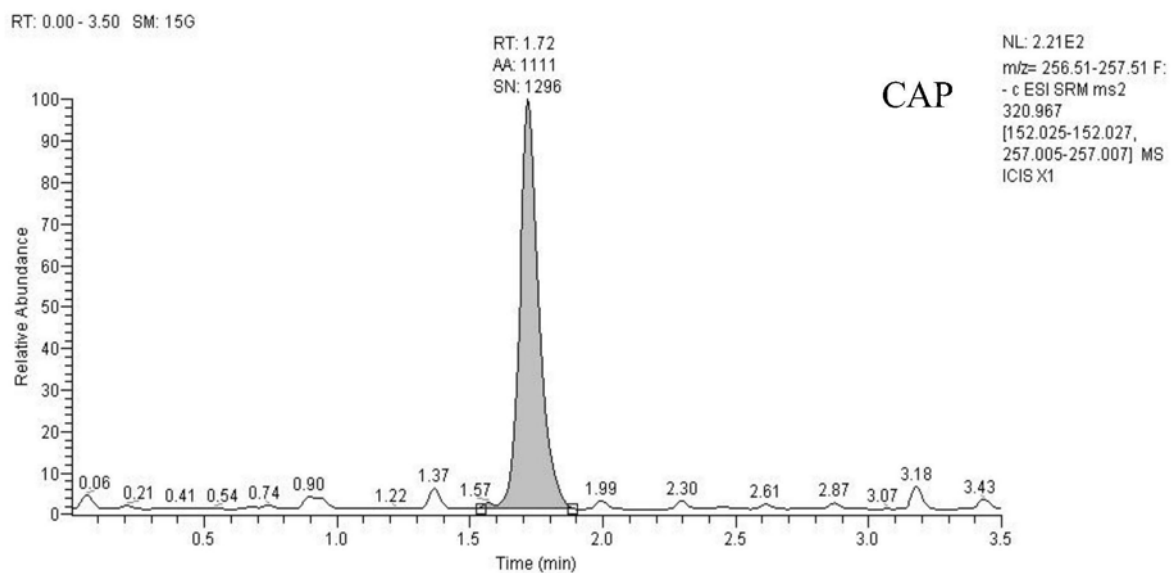


图8

专利名称(译)	一种同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法		
公开(公告)号	CN110470763A	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201910782801.0	申请日	2019-08-23
[标]发明人	贾东芬 刘培培		
发明人	贾东芬 刘培培		
IPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N30/28 G01N30/86 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N30/28 G01N30/8675 G01N33/53 G01N33/531		
代理人(译)	马云华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了同时检测水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物和氯霉素残留量的方法，属于食品质量安全检测技术领域。本发明提供的检测方法只需要对水产品组织样品进行一次前处理，即可实现水产品中孔雀石绿、硝基呋喃代谢物、氯霉素这三类药物的同步提取和检测，前处理时间短、效率高、成本低、操作简便，检出限低。如实施例结果所示，孔雀石绿、隐色孔雀石绿的检出限为0.5μg/kg；硝基呋喃代谢物AMOZ、AOZ、AHD、SEM的检出限均为0.5μg/kg；氯霉素的检出限为0.1μg/kg；回收率范围75%~110%。

