

水产品中氯霉素检测条件的优化

刘丽丽*, 刘 谦, 王 宇

(保定出入境检验检疫局, 保定 071001)

摘要: **目的** 建立液相色谱串联质谱法测定加工水产品中的氯霉素, 并对提取溶剂、净化条件、流动相进行了优化。 **方法** 样品采用乙酸乙酯提取, HLB固相萃取柱净化, C₁₈色谱柱分离, ESI源负离子模式对氯霉素进行检测。 **结果** 氯霉素在 0.1~10 μg/kg 范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999, 在基质样品中添加 0.1、0.2 和 10.0 μg/kg 3 个水平药物, 其回收率在 95.0%~103.2%之间, 相对标准偏差 3.72%~6.85%, 方法检测限为 0.1 μg/kg。 **结论** 该方法可靠、稳定, 可满足加工水产品中氯霉素残留检测与确证需要。

关键词: 液相色谱串联质谱法; 氯霉素; 加工水产品

Optimization of detection conditions of chloramphenicol in aquatic products

LIU Li-Li*, LIU Qian, WANG Yu

(Baoding Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Baoding 071001, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of chloramphenicol in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and to optimize the sample pretreatment such as extraction, cleanup and mobile phase. **Methods** Samples were extracted with ethyl acetate, cleaned up by the Oasis HLB SPE cartridges and collected by the C₁₈ chromatographic column. Finally, the chloramphenicol was detected in the ESI negative ion mode. **Results** The linear ranges were 0.1~10 μg/kg and the correlation coefficients were all above 0.99. The recoveries of chloramphenicol in aquatic products at the spiked levels of 0.1, 0.2 and 10 μg/kg were in ranges of 95.0%~103.2%. The relative standard deviations were 3.72%~6.85%, and the limit of detection was 0.1 μg/kg. **Conclusion** The method is reliable and stable, which can meet the requirements for the determination of chloramphenicol in aquatic products.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; chloramphenicol; processed aquatic products

1 引言

氯霉素属苯胺醇类广谱抗生素, 因其具有抑菌性和杀菌性被广泛用于水产养殖过程中细菌性疾病的预防和治疗^[1]。氯霉素对人体有严重的副作用, 能抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病^[2]; 另外, 该药物理化性质

极其稳定, 可通过食物链在人体内蓄积, 因此动物源性食品中的氯霉素残留对人体健康构成了潜在的危害。氯霉素对人体健康的危害已引起国际组织和多个国家的高度重视, 欧盟、美国以及我国等都规定食品中氯霉素零容许量, 即不得检出。

目前用于氯霉素检测的方法有酶联免疫法^[3]、气相色谱法^[4]、气相色谱串联质谱法^[5]、液相色谱法^[6]、

*通讯作者: 刘丽丽, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 13931697750@163.com

*Corresponding author: LIU Li-Li, Assistant Engineer, Baoding Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Baoding 071001, China. E-mail: 13931697750@163.com

液相色谱串联质谱法^[7-9]等。酶联免疫法重复性差,容易出现假阳性,且成本高;气相色谱法、气相色谱质谱法需要衍生化,方法繁琐,耗费时间较长;液相色谱法灵敏度低,达不到要求^[10];液相色谱串联质谱法由于其背景干扰小,灵敏度高而作为氯霉素检测的首选方法。这些方法针对的样品多是鲜活或经简单加工的水产品,深加工水产品如鱼罐头等基质复杂的样品的检测尚未见报道。本研究针对水产品中氯霉素的前处理过程进行了改进和优化,以用于基质复杂的深加工水产品的检测,建立了一种准确、灵敏度高,且能满足国内外有关法规要求的方法。

2 材料与方法

2.1 材料、试剂与仪器

2.1.1 材料

所用鱼罐头(豆豉鲑鱼罐头、茄汁鱼罐头、虾酱等)及活鱼均为市场监督管理局委托检测样品。

2.1.2 试剂

乙腈(色谱纯,西陇化工股份有限公司);乙酸乙酯(色谱纯,西陇化工股份有限公司);纯净水(娃哈哈牌);氯霉素(100 μg/mL,SB05-093-2008 农业部环境保护科研监测所制),用甲醇配制成 10 μg/mL 的储备液和 20 ng/mL 的标准中间液,在临用前用基质溶液配制成所需浓度。氘代氯霉素(d5-氯霉素)内标标准溶液 100 μg/mL(农业部环境保护科研监测所制),用甲醇配制成 10 μg/mL 的储备液和 1 μg/mL 的工作液。

2.1.3 仪器

Waters2695 高效液相色谱串联 WatersTQD 质谱仪配电喷雾离子源(ESI)(美国 Waters 公司);超声波清洗机(天鹏电子新技术有限公司);离心机(美国 Sigma 公司);旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司);固相萃取装置(美国 Agilent 公司);HLB(60mg,3ml)固相萃取柱(美国 Waters 公司)。

2.2 样品处理

2.2.1 样品制备

将各种鱼罐头取出,用粉碎机粉碎均匀。

2.2.2 提取

称取 5 g(精确至 0.01 g)粉碎均匀的试样,置于 50 mL 塑料离心管中,加入 1 μg/mL 的氘代氯霉素标准溶液 25 μL,加入 10 mL 乙酸乙酯,0.45 mL 氨水,超声提取 10 min,4000 r/min 离心 5 min,上清液转移

至 25 mL 比色管中;残渣中加入 10 mL 乙酸乙酯重复上述操作,合并上清液至 25 mL 比色管中,用乙酸乙酯定容至 25 mL,摇匀,取 5 mL 乙酸乙酯提取液于鸡心瓶中,45 °C 旋转蒸发至近干。

2.2.3 净化

鸡心瓶中的残渣用 5 mL 水溶解,涡旋混匀,倒入下接 HLB 柱的柱形漏斗中(漏斗颈部塞有脱脂棉),HLB 柱用前用 5 mL 甲醇,10 mL 活化,溶液自然过柱,待溶液完全流出后,用 10 mL 水分两次洗鸡心瓶并过柱,弃去全部流出液,减压抽干,最后用 5 mL 乙酸乙酯洗脱,收集洗脱液于 10 mL 离心管中,于 45 °C 氮气吹干,用纯水定容至 1 mL,液相色谱串联质谱测定。

2.2.4 标准曲线的绘制

分别取 25、50、100、250、500 μL 的 20 ng/mL 的氯霉素标准溶液于离心管中,各加入 5 μL 1 μg/mL 的氯霉素内标溶液,45 °C 氮气吹干,用基质溶液定容至 1 mL,液相色谱串联质谱测定。

2.3 仪器条件

2.3.1 液相条件

色谱柱: C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 5 μm);流动相: 乙腈:水=33:67(V:V)等度洗脱;柱温: 35 °C;进样量: 30 μL。

2.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI-),毛细管电压, 3.00 kV; 锥孔电压 35 V, 离子源温度: 120 °C; 去溶剂气温度: 450 °C; 去溶剂气流量: 500 L/h; 反吹气: 50 L/h。监测离子对(*m/z*)及去溶剂气能量见表 1 质谱参数。

表 1 质谱参数
Table 1 Parameters of MS

名称	监测离子对(<i>m/z</i>)	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
氯霉素	320.9/152*	33	18
	320.9/257.1	33	11
氯霉素内标	326/157.2	33	8

*代表定量离子

3 结果与讨论

3.1 提取溶剂的选取

氯霉素属于弱极性物质,易溶于甲醇、乙酸乙酯、乙腈等有机溶剂,微溶于水。甲醇、乙腈对人体

毒性大, 且甲醇极性较大, 提取液含杂质较多; 乙酸乙酯毒性小, 且容易挥发, 提取效率高。故本研究选择毒性小的乙酸乙酯作为加工水产品中氯霉素的提取液。

3.2 净化条件的优化

本研究比较了液液萃取和 HLB 固相萃取对加工水产品中氯霉素的提取效率和回收率的影响。液液萃取采用乙酸乙酯提取, 正己烷去脂的方法。由于加工水产品中添加剂较多, 油脂大, 采用液液萃取的方式, 需要多次正己烷去脂, 但一些非油性添加剂并不能去除, 实际实验该方法并不能得到理想的上清液, 最终导致回收率低于 60%, 甚至没有回收率, 并且试剂使用量大, 既不利于实验人员人体健康, 又污染环境。然而 HLB 固相萃取柱净化, 内标法定量的方式, 净化效果较好, 回收率高达 95% 以上, 试剂使用量较小, 在一定程度上减少了对环境的污染。

3.3 流动相的优化

实验用 C_{18} 色谱柱进行分离, 流动相分别比较了乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸水、乙腈-10 mmol/L 乙酸铵、甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸水、甲醇-10 mmol/L 乙酸铵对分离度、峰形、灵敏度的影响。结果表明, 水相是否添加甲酸或乙酸铵对氯霉素的分离影响

不大, 有机相用乙腈比用甲醇的峰形更好, 且有利于 ESI 源中溶剂的去除。因此, 本研究采用乙腈-水作为流动相。

3.4 质谱条件的优化

氯霉素的分子式为 $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$, 在电喷雾离子源 (ESI) 中失去一个 H^+ 而带负电荷, 故选择 ESI 负离子模式对其进行检测, 扫描范围 m/z 200~400 之间, 得到 320.9 的准分子离子峰, 然后以 320.9 为母离子, 进行子离子扫描, 选取丰度最强的碎片离子 152 为定量离子 (色谱图见图 1), 丰度次强的 257.1 为定性离子 (色谱图见图 2), 以此为基础对锥孔电压、碰撞能量进行优化, 使选定的目标离子的丰度达到最佳。

3.5 线性关系、灵敏度和精密度

在优化条件下, 选择了鲜活水产品活鲤鱼和加工水产品中基质最为复杂的豆豉鲮鱼罐头做氯霉素添加回收实验 (结果见表 2), 在 0.10~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间线性关系良好, 线性方程为 $Y=1.24058X-0.00868135$, 相关系数为 0.999, 检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 从图 3 和图 4 可以看出该方法对目标物的净化效果较好, 没有杂质峰, 基线相对平稳, 该方法既能满足鲜活水产品又适用于加工水产品中氯霉素的检测需求。

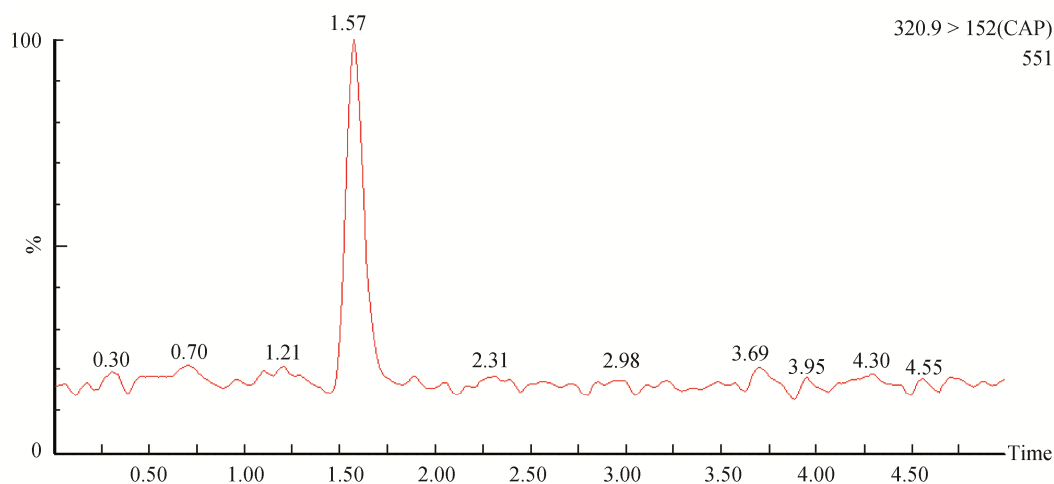


图 1 氯霉素(0.1 ng/mL)提取离子流图 (定量离子对)

Fig.1 Qualitative ion current of chloramphenicol (0.1 ng/mL)

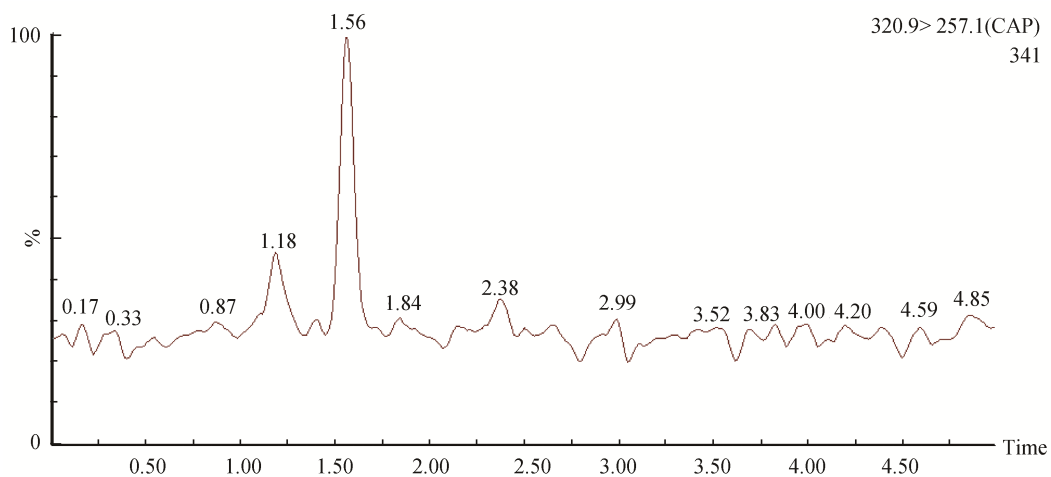


图2 氯霉素(0.1ng/mL)提取离子流图(定性离子对)

Fig. 2 Quantitative ion current of chloramphenicol (0.1 ng/mL)

表2 样品中氯霉素回收率及相对标准偏差(n=6)

Table 2 Recoveries and RSD of chloramphenicol in samples (n=6)

	加标值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
豆豉鲮鱼罐头	0.1	95.0	4.63
	0.2	103.2	6.85
	10.0	97.0	3.72
鲤鱼	0.1	95.8	4.34
	0.2	99.5	5.28
	10.0	101.9	7.01

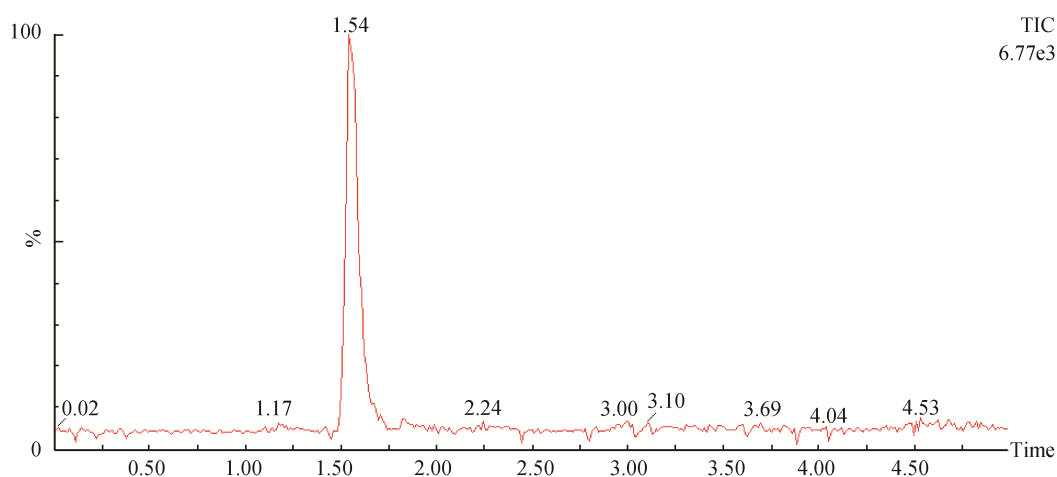


图3 氯霉素(0.1 ng/mL)总离子流图

Fig. 3 The total ion chromatogram of chloramphenicol (0.1 ng/mL)

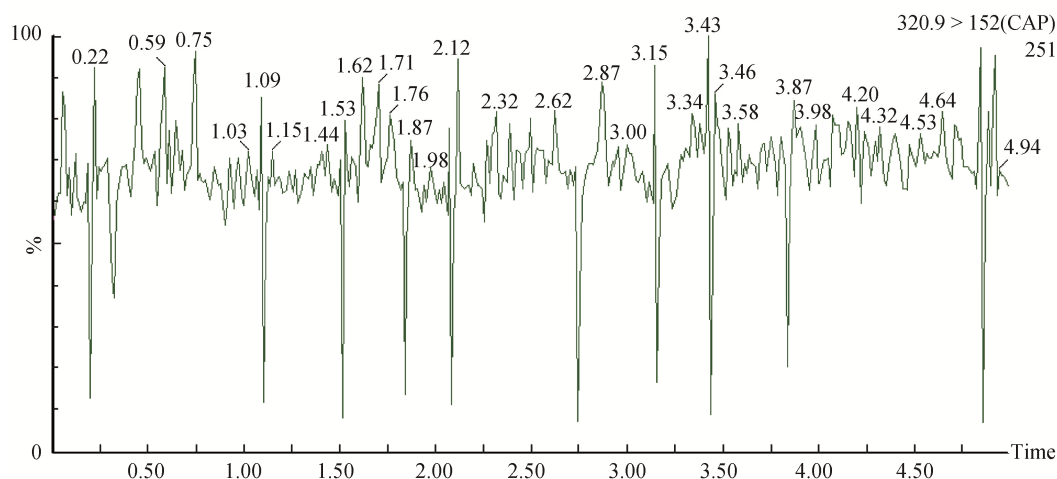


图 4 空白样品氯霉素定量离子图

Fig. 4 The quantitative ion current of chloramphenicol in blank sample

4 结 论

本研究建立了液相色谱串联质谱法检测加工水产品中氯霉素的分析方法, 通过对提取溶剂、净化条件、色谱条件和质谱条件的优化, 最终确定乙酸乙酯为提取液, HLB 柱为净化柱, 乙腈-水为流动相, 本方法灵敏度及回收率高、重复性及线性关系良好, 基质干扰小, 检出限达到 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法解决了深加工水产品中氯霉素的检测问题, 同时又能满足鲜活水产品中氯霉素的残留检测。HLB 固相萃取柱净化样品, 提高了净化效果和回收率, 减少了对色谱柱及环境的污染, 既满足国内外对水产品中氯霉素残留的限量要求, 又能用于加工水产品中氯霉素的检测和确证。

参考文献

- [1] 胡红美, 郭源明, 雷科, 等. 分散固相萃取净化-气相色谱法测定水产品中氯霉素和氟苯尼考[J]. 食品科学, 2014, 08(35): 231-235.
Hu HM, Guo YM, Lei K, *et al.* Determination of chloramphenicol and florfenicol in fishery products by dispersive solid phase extraction and gas chromatograph [J]. Food Sci, 2014, 08(35): 231-235.
- [2] 徐理奇, 卢春香. 动物食品中氯霉素类药物的残留状况及检测方法比较[J]. 饲料工业, 2008, 29(15): 41-42
Xu LQ, Lu CX. Comparison of residues and detection methods of chloramphenicol residues in animal food [J]. Feed Ind, 2008, 29(15): 41-42
- [3] 郝凯, 过世东, 胥传来, 等. 水产品中甲砒霉素残留的 CELISA 检测方法研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(2): 186-189.
Hao K, Guo SD, Xu CL, *et al.* Study on the CELISA detection method for the residue of methyl in aquatic products [J]. Food Ind Sci Technol, 2006, 27(2): 186-189.
- [4] 吴明媛, 杨姝丽, 黎小正, 等. 毛细管电子捕获气相色谱法同时测定水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留[J]. 广西农业科学, 2009, 40(5): 567-570.
Wu MY, Yang SL, Li XZ, *et al.* Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in aquatic products by gas chromatographic method with electron capture detection [J]. Guangxi Agric Sci, 2009, 40(5): 567-570.
- [5] 谢孟峡, 刘媛, 邱月明, 等. 固相萃取-气相色谱/质谱测定动物组织中氯霉素残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 1-4.
Xie MX, Liu Y, Qiu YM, *et al.* Determination of chloramphenicol residues in animal tissues by solid phase extraction and gas chromatography / mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005, 33(1): 1-4.
- [6] 占春瑞, 郭平, 陈振桂, 等. 超高效液相色谱法测定水产品中甲砒霉素和氟甲砒霉素残留[J]. 分析化学, 2008, 36(4): 525-528.
Zhan CR, Guo P, Chen ZG, *et al.* Determination of thiamphenicol and florfenicol residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography [J]. Anal Chim Acta, 2008, 36(4): 525-528.
- [7] 彭涛, 李淑娟, 储晓刚, 等. 高效液相色谱/串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量[J]. 分析化学, 2008, 36(4): 525-528.

- 2005, 33(4): 463-466
- Peng T, Li SJ, Chu XG, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, methyl and chloramphenicol in shrimp by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2005, 33(4): 463-466.
- [8] 杨洪生, 孟勇, 张美琴, 等. 快速溶剂萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中氯霉素和氟苯尼考[J]. *理化检验: 化学手册*, 2012, 48(11): 1353-1356
- Yang HS, Meng Y, Zhang MQ, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol and florfenicol in aquatic products with accelerated solvent extraction by UHPLC-MS/MS [J]. *Phys Test Chem Anal: Handbook Chem*, 2012, 48(11): 1353-1356
- [9] 冯民, 魏云计, 朱臻怡, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定饲料中氯霉素、甲矾霉素与氟甲矾霉素残留量[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(1): 117-121.
- Feng M, Wei YJ, Zhu ZY, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in feed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 32(1): 117-121.
- [10] 戴军, 陈尚卫, 顾小红. HPLC 测定牛奶和虾仁中氯霉素残留[J]. *无锡轻工大学学报*, 2003, 22(6): 81-84.
- Dai J, Chen SW, Gu XH. Detection of chloramphenicol residues in shrimp and milk by HPLC [J]. *J Wuxi Univ Light Ind*, 2003, 22(6): 81-84.
- [11] GB/T 20756-2006 可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考残留量的测定[S]
- GB/T 20756-2006 Determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in fishery products [S].
- [12] 周萍, 胡福良, 巩珊, 等. 液液萃取法结合高效液相色谱-串联质谱测定蜂王浆中的氯霉素残留量[J]. *食品科学*, 2008, 29(5): 341-343.
- Zhou P, Hu FL, Gong S, *et al.* Determination of chloramphenicol residues in royal jelly by Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2008, 29(5): 341-343.
- [13] 严忠雍, 张小军, 梅光明, 等. N-丙基乙二胺快速净化结合 UPLC-MS/MS 测定水产品中氯霉素残留量[J]. *中国渔业质量与标准*, 2013, 3(1): 65-69.
- Yan ZY, Zhang XJ, Mei GM, *et al.* Determination of chloramphenicol residues in aquatic products by N - propyl ethylenediamine rapid purification UPLC/MS/MS [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2013, 3(1): 65-69.
- [14] 何方奕, 李铁纯, 李学程. 固相萃取-高效液相色谱法测定肌肉中氯霉素的残留[J]. *食品科学*, 2006, 27(12): 629-630.
- He FY, Li XC, Li XC. Determination of chloramphenicol in muscle residue by Solid phase extraction, high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2006, 27(12): 629-630.
- [15] 万译文, 邓克国, 刘丽. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考残留量[J]. *食品科学*, 2013, 32(5): 84-87.
- Wan YW, Deng KG, Liu L. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2013, 32(5): 84-87.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘丽丽, 助理工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 13931697750@163.com