

水产品中氯霉素残留检测两种前处理方法的比较

刘 畅

(哈尔滨市农产品质量安全检验检测中心, 哈尔滨 150070)

摘要:使用两种前处理方法结合超高效液相色谱串联质谱法对水产品中氯霉素残留进行检测。样品经过1%甲酸-乙腈提取、PRiME HLB固相萃取柱净化的前处理方法与常规方法相比,在5~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好,相关系数均大于0.99,在3 $\mu\text{g/kg}$ 和5 $\mu\text{g/kg}$ 两个添加浓度下的加标回收率为100.0%~109.3%和86.0%~102.8%(常规方法为83.24%~102.24%和70.8%~97.2%),相对标准偏差为3.9和6.8(常规方法为9.5和12.3)。该方法灵敏度、准确度、精密度都更高,操作简单快速,适用于大批量样品同时检测。

关键词:氯霉素;前处理;水产品;超高效液相色谱串联质谱

中图分类号:TS254.7

文献标识码:A

文章编号:1003-8701(2018)03-0052-04

Comparison of Chloramphenicol Residue in Aquatic Products by Two Pretreatment Methods

LIU Chang

(Harbin Examine and Inspection Center for Agricultural Products Safety and Quality, Harbin 150070, China)

Abstract: Two pretreatment methods were used to detect chloramphenicol residues in aquatic products combining the super high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The samples were extracted by 1% formic acid - acetonitrile solution and purified by PRiME HLB solid-phase extraction column. The correlation coefficient was greater than 0.99 in the range of 5-100 $\mu\text{g/L}$. Under the 3 $\mu\text{g/kg}$ and 5 $\mu\text{g/kg}$ two levels of average standard addition recovery were 100.0%-109.3% and 86.0%-102.8% (conventional methods were 83.24%-102.24% and 70.8%-97.2%), relative standard deviation were 3.9 and 6.8 (conventional methods were 9.5 and 12.3). The new method had higher sensitivity, accuracy, precision, simple and quick operation, suitable for bulk sample testing at the same time compared with the conventional method.

Key words: Chloramphenicol; Pretreatment; Aquatic products; Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

氯霉素是一种由链丝菌产生的广谱抗生素^[1]。它对革兰氏阳性、阴性细菌,立克次体及病毒感染均有很强的抑制作用,在鱼类养殖中常被用于治疗烂尾病、痘疮病、赤鳍病及弧菌病等。但是一旦给药过量就会损害鱼类的肝脏和造血机能,同时会污染土壤水体环境^[2],更为严重的是氯霉素能够通过食物链进入人体,杀死白细胞,造成再生障碍性贫血,损害视力,并在人体内蓄积^[3-4]。基于氯霉素对人体健康的不良影响,中国、韩国、美国、欧盟等国家和地区都做出了在水产品中不得检出的规定^[5]。

目前,水产品中氯霉素残留的检测方法有免疫胶体金快速检测法^[6]、气相色谱法^[7]、超高效液相色谱法^[8]、气相色谱串联质谱法^[9]、液相色谱串联质谱法^[10-11]等。但是,这些方法的前处理过程操作复杂,重复性工作过多,实验持续时间长。本文提供一种使用新型PRiME HLB固相萃取柱检测水产品中氯霉素的前处理方法,并将此方法与常规方法进行比较。结果表明,新方法灵敏度高、重现性好、操作简单快速,适用于批量样品检测。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

供试样品为购自当地超市的草鱼。

氯霉素(纯度>99.3%),购于Dr. Ehrenstorfer,

收稿日期:2018-02-01

作者简介:刘 畅(1988-),女,农艺师,硕士,研究方向为药残检测。

用甲醇配制成1 mg/L;氯霉素-D5内标(纯度>99.7%)购于北京曼哈格生物科技有限公司,用甲醇配制成1 mg/L。

乙酸乙酯(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)、氢氧化铵(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)、无水硫酸钠(优级纯,天津市光复精细化工研究所)、甲醇(色谱纯,Fisher Scientific)、正己烷(优级纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)、乙腈(优级纯,天津市科密欧化学试剂有限公司)、甲酸(优级纯,天津市光复精细化工研究所)、甲酸(色谱纯,Dikma Technologies)、乙腈(色谱纯,Fisher Scientific)、屈臣氏蒸馏水。

Oasis PRiME HLB固相萃取柱(200 mg/6 mL, Waters)。

1.2 仪器与设备

料理机(奥克斯);高速组织匀质仪(IKA);电子天平(感量0.01 g,梅特勒);高速冷冻离心机(SIGMA);涡旋振荡器(IKA);氮吹仪(美国Organomation);超声波清洗器(上海比朗仪器制造有限公司);固相萃取装置(Agilent Technologies);超高效液相色谱-质谱联用仪,配有电喷雾离子源(Waters Acquity UPLC-TQD)。

1.3 试验方法

1.3.1 仪器分析方法

1.3.1.1 液相色谱分析条件

色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C18柱(1.7 μ m,2.1 mm \times 100 mm);柱温:35 $^{\circ}$ C;进样体积:5 μ L;流动相:A为0.1%甲酸-水溶液,B为乙腈,以A:B(55:45)进行等度洗脱,流速为0.3 mL/min。

1.3.1.2 质谱分析条件

离子源:电喷雾电离源(ESI),负离子模式;源温度:110 $^{\circ}$ C;毛细管电压:0.5kV;脱溶剂温度:400 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流速(N_2):800 L/h;锥孔风速:50 L/h。采用MRM多反应监测模式进行检测。

1.3.2 样品制备

将草鱼去鳞,留皮,沿脊背取肉,再将鱼皮与鱼肉用料理机充分搅碎混匀,于-20 $^{\circ}$ C冷冻保藏。

1.3.3 前处理方法 I

称取均质鱼样5 g于50 mL离心管中,加入15 mL乙酸乙酯,0.45 mL氨水,涡旋1 min。再加入10 g无水硫酸钠,立即涡旋1 min,4 000 r/min离心5 min。将上清液倒入烧杯中,再次向离心管中加入15 mL乙酸乙酯,0.45 mL氨水,涡旋1 min,4 000 r/min离心5 min,收集上清液于烧杯中。3次加入提取液,重复上面操作。将收集到的上清液合并

后,在40 $^{\circ}$ C下氮吹至近干。残渣中加入2 mL正己烷,缓慢涡旋,再向离心管中先后加入100 μ L甲醇,900 μ L水溶解,涡旋,将所有液体转移至15 mL离心管中,7 000 r/min离心5 min。提取下层溶液过0.22 μ m滤膜,装瓶待测。

1.3.4 前处理方法 II

称取均质鱼样5 g于50 mL离心管中,加入1%甲酸乙腈(v/v)10 mL,涡旋1 min。再加入5 g无水硫酸钠,立即涡旋1 min,5 000 r/min离心5 min。

将上清液过PRiME HLB固相萃取柱,收集液体于小烧杯中,在40 $^{\circ}$ C下氮吹至近干。

残渣中加入200 μ L乙腈,800 μ L水,涡旋后过0.22 μ m滤膜,装瓶待测。

2 结果与分析

2.1 提取液的选择

众多文献和标准中,提取动物源食品中氯霉素的试剂主要有乙酸乙酯-氨水、乙酸乙酯等^[12-14]。本试验中,方法I采用乙酸乙酯-氨水作为提取液,方法II使用1%甲酸乙腈作为提取液。两者提取回收率都在允许范围之内,但方法II的提取率更高些(以添加浓度为5 μ g/kg为例,方法I平均回收率为81.7%,方法II平均回收率为93.1%),并且方法I使用了大量的对人体有害的有机提取试剂。水产品中含有大量水分,而乙腈溶于水,在加完提取液涡旋的过程增加了提取液和样品的接触面积,提取效果更好一些。再加上乙腈能够有效提取目标物的同时还具有沉淀蛋白质等杂质的作用,所以选择乙腈为提取溶液,能够减少后续净化步骤的难度,再加入少许甲酸,提取效果更佳。

2.2 净化方式的选择

方法I采用正己烷去脂,方法II采用PRiME HLB固相萃取柱净化,为降低基质效应的影响两种方法均使用同位素内标法。

基质效应=(目标物在空白基质溶液中的峰面积/目标物在纯溶剂溶液中的峰面积-1) \times 100%

使用PRiME HLB固相萃取柱净化的样品去基质效应更好(基质效应为-1.09%),且PRiME HLB固相萃取柱不需要活化与平衡,可直接上样,操作简单方便。方法I采用正己烷去脂表现出了严重的离子抑制效应(基质效应为-43.3%),且在操作过程中极易发生乳化现象,一旦正己烷、脂肪等杂质带入检测仪器,会极大影响仪器

使用寿命。

2.3 质谱方法的选择

在 ESI 离子模式下,待测物及其内标离子化

效率高,多反应监测扫描模式(MRM)的质谱参数见表1,氯霉素标准品的多反应监测总离子流图见图1。

表1 待测物的监测离子及对应碰撞气能量

| 化合物 | 保留时间(min) | 母离子(m/z) | 子离子(m/z) | 锥孔电压(V) | 碰撞能量(eV) |
|--------|-----------|----------|----------|---------|----------|
| 氯霉素 | 3.59 | 321.1 | 152.1 | 40 | 18 |
| | | | 257.2 | | 11 |
| 氯霉素-D5 | 3.59 | 326.1 | 157.1 | 39 | 16 |

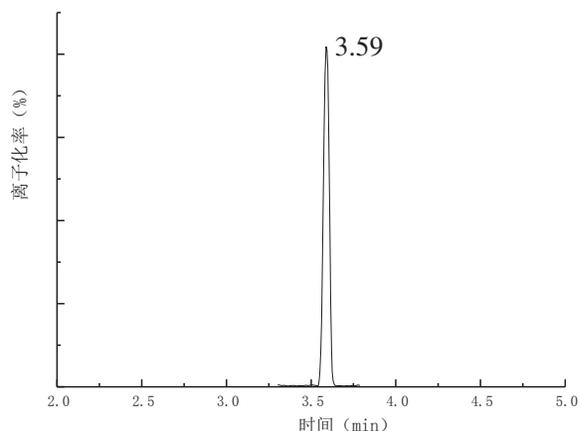


图1 氯霉素标准品的多反应监测总离子流图

2.4 液相方法的选择

比较了甲醇-水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸、甲醇-0.1%甲酸四种流动相体系中,氯霉素及其内标的响应值情况如图2所示。流动相系统中是否加水、加酸对氯霉素的分离影响不大,但是使用甲醇作为流动相,出峰时间过早,且响应值不如乙腈大,因此选择乙腈-0.1%甲酸作为流动相。

2.5 线性关系与相关系数

以前处理方法 I 和前处理方法 II 得到的空白样品为基质,分别配制浓度为 5、15、25、50、100 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液进行测定,绘制标准曲线。

结果表明,无论是前处理方法 I 还是前处理方法 II,水产品中氯霉素经超高效液相色谱-串联质谱法进行测定后,在 5~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好,相关系数均大于 0.99,均可以满足定量分析要求,但是方法 II 的相关系数明显好于方法 I,说明方法 II 更适用于水产品中氯霉素残留的定量分析。以 $S/N=3$ 时对应的含量为检出限(LOD), $S/N=10$ 时对应的含量为定量限(LOQ)(见表2)。

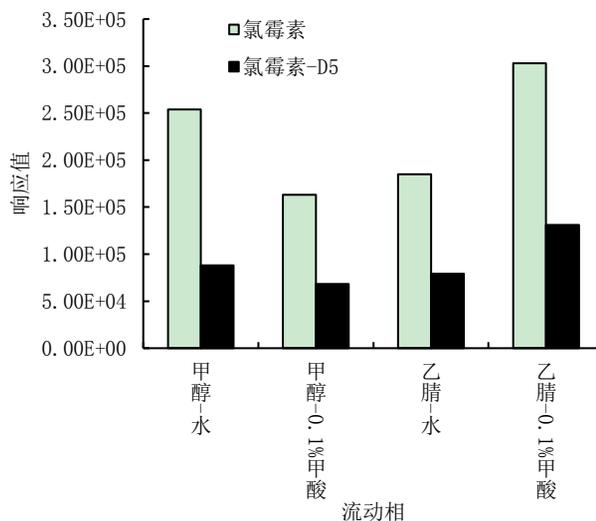


图2 氯霉素及其内标在不同流动相体系中的响应值

表2 方法 I 和方法 II 中待测参数的线性方程和相关系数

| | 线性方程 | 相关系数 | 检出限(LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | 定量限(LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) |
|-------|----------------------------|-----------|---|---|
| 方法 I | $Y=228.637X+14.2769$ | 0.991 237 | 0.1 | 0.2 |
| 方法 II | $Y=0.00714244X-0.00654132$ | 0.999 066 | 0.09 | 0.15 |

2.6 回收率与精密度

在 3 $\mu\text{g/kg}$ 和 5 $\mu\text{g/kg}$ 两个浓度水平下进行空白样品加标回收实验,每个水平重复 6 次,分别采用前处理方法 I 和前处理方法 II 对样品进行处理,比较两者回收率及精密度。结果表明,虽然方法 I 和方法 II 的回收率都能满足检测要求(在

70%~120% 范围内),但是方法 I 的平均回收率还是低于方法 II,且重现性差,在 5 $\mu\text{g/kg}$ 的添加浓度水平下,方法 I 的 RSD 达到 12.3%,远远大于方法 II 的 6.8%。这说明使用 PRiME HLB 固相萃取柱净化能够获得更高的回收率、更好的重现性。添加回收的具体数据见表 3。

表3 方法 I 和方法 II 的回收率、精密度 (n=6)

| 样品 | 添加浓度 0.003 mg·kg ⁻¹ | | 添加浓度 0.005 mg·kg ⁻¹ | |
|-------|--------------------------------|---------|--------------------------------|---------|
| | 回收率 (%) | 精密度 (%) | 回收率 (%) | 精密度 (%) |
| 方法 I | 102.24 | 9.5 | 74.8 | 12.3 |
| | 83.24 | | 70.8 | |
| | 77.88 | | 97.2 | |
| | 86.98 | | 74.8 | |
| | 86.56 | | 87.6 | |
| | 84.11 | | 85.2 | |
| 方法 II | 109.3 | 3.9 | 88.0 | 6.8 |
| | 109.3 | | 86.0 | |
| | 100.0 | | 98.0 | |
| | 103.3 | | 93.2 | |
| | 102.7 | | 90.4 | |
| | 101.3 | | 102.8 | |

3 结 论

采用两种不同的前处理方法对水产品中的氯霉素进行提取、浓缩、净化,通过考察回收率、精密度等参数得出结论:水产品中氯霉素可经过1%甲酸-乙腈提取、PRiME HLB固相萃取柱净化的方法进行前处理,该方法灵敏度高、回收率稳定、重现性好、操作简单快速,适用于大批量样品同时检测。

参考文献:

- [1] 袁玉花. 鸡蛋中氯霉素残留的检测方法及消除规律研究[D]. 重庆:西南农业大学, 2002.
- [2] 王 媛, 马继力, 吕 川, 等. 吉林省辽河流域农业面源污染特征及趋势研究[J]. 吉林农业科学, 2012, 37(3): 61-64.
- [3] 郭 睿, 曹院章, 齐海霞, 等. 水产品中氯霉素检测方法的比较与分析[J]. 北京农业, 2014(5): 148-149.
- [4] 刘丽丽, 刘 谦, 王 宇. 水产品中氯霉素检测条件的优化[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 623-628.
- [5] 汤轶伟, 励建荣, 孟良玉, 等. 水产品中氯霉素药物残留检测方法研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(11): 333-337.
- [6] 胡金春, 张晓辉. 水产品中氯霉素及四种硝基咪唑代谢物残留快速检测方法研究[J]. 福建分析测试, 2016, 5(6): 1-4.
- [7] 杨秋红, 艾晓辉, 李 荣, 等. 固相萃取-气相色谱法同时检测水产品中的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺[J]. 分析实验室, 2015, 34(5): 533-537.
- [8] 张小军. 水产品中三类药物多残留的 HPLC 和 UPLC-MS/MS 分析方法研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2012.
- [9] 宋宏娟. 气相色谱-串联质谱法检测水产品中氯霉素残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(6): 2373-2378.
- [10] 罗 靳. 超声波一步提取淡水鱼氯霉素药残检测的方法初探[J]. 河北渔业, 2016(9): 40-42.
- [11] A Kaufmann, P Butcher, K Maden, et al. Determination of nitrofurans and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 862(3): 41-52.
- [12] 中华人民共和国国家标准. GB/T 20756-2006, 可食动物肌肉、肝脏和水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [13] 中华人民共和国国家标准. 农业部公告 781-2-2006, 动物源食品中氯霉素残留量的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [14] 单 艺, 亢美娟, 王象欣, 等. UPLC-MS/MS 法测定乳及乳制品中氯霉素前处理方法的比较[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(3): 54-58.

(责任编辑:王 昱)