

全自动固相萃取测定罗非鱼中的氯霉素

公丕学

(山东省食品药品检验研究院, 山东 济南 250101)

摘要: 氯霉素可作用于细菌核糖核蛋白体的 50S 亚基, 而阻挠蛋白质的合成, 属于抑菌性广谱抗生素, 能够用于人体某些疾病的治疗, 以及作为兽药用于防范及治疗动物疾病。在日常生活中氯霉素等激素类药物会广泛应用于养殖业, 例如鱼、虾等水产类食品, 养殖户为了所养殖的鱼、虾能够快速生长, 并且不生病, 会放很多抗生素类药物到养殖的水中, 从而造成药物在动物体内及动物体表富集, 而人类食用这些肉类会使兽药残留进入人体, 从而影响身体健康。

关键词: SPE1000; MiniLab3000; M64; GB31658.2-2021; 氯霉素; 动物性食品

1. 仪器设备及试剂耗材

1.1 仪器设备

- 1.1.1 SPE1000 全自动固相萃取系统，莱伯泰科公司；
- 1.1.2 SCIEX-4500 液相色谱-质谱仪，AB 公司；
- 1.1.3 MinLab3000 全自动液体处理平台，莱伯泰科公司；
- 1.1.4 M64 高通量平行浓缩仪，莱伯泰科公司；
- 1.1.5 离心机；
- 1.1.6 震荡仪。

1.2 试剂耗材

- 1.2.1 甲醇（色谱纯，Fisher Chemical）；
- 1.2.2 乙腈（色谱纯，Fisher Chemical）；
- 1.2.3 正己烷（色谱纯，Fisher Chemical）；
- 1.2.4 乙酸乙酯（色谱纯，Fisher Chemical）；
- 1.2.5 氯化钠（分析纯）；
- 1.2.6 4%氯化钠溶液：取 4g 氯化钠（2.5）用水溶解并稀释至 100mL，临用现配；
- 1.2.7 水饱和乙酸乙酯：取 400mL 乙酸乙酯（2.4）于 500mL 棕色试剂瓶中，加水 50mL，加盖、振摇、静置，使用时取上层溶液；
- 1.2.8 C18 固相萃取柱：1000mg/6mL（莱伯泰科）。

1.3 标准溶液

- 1.3.1 内标储备液： $\rho=100\mu\text{g/mL}$ ，氘代氯霉素，国家标准物质；
- 1.3.2 氯霉素储备液： $\rho=100\mu\text{g/mL}$ ，国家标准物质；
- 1.3.3 内标工作液：精密量取内标储备液适量，用流动相稀释成浓度为 100ng/mL 的内标工作液。 4°C 保存，有效期 6 个月。
- 1.3.4 氯霉素标准工作液：精密量取氯霉素标准储备液适量，用流动相稀释成浓度为 100ng/mL 的标准工作液。 4°C 保存，有效期 6 个月。

2. 实验过程

2.1 提取

取鱼肉 5g，加内标溶液 $50\mu\text{L}$ 、氯霉素标准溶液 $50\mu\text{L}$ 、乙腈 5mL、4%氯化钠溶液 5mL，涡旋振荡 2min，4000r/min 离心 10min，取上清液，残渣重复提取 1 次，合并上清液。加正己烷 5mL，涡旋振荡 1min，2000r/min 离心 10min，弃去上层液，正己烷重复处理 1 次。加水饱和的乙酸乙酯溶液 5mL，涡旋振荡 1min，2000r/min 离心 10min，上层液转移到 20mL 上样瓶中，重复提取 1 次，合并提取液，氮气吹干，加水-乙腈（95+5）3mL 使溶解，备用。

2.2 固相萃取净化

将前述制备液按照图 1 的方法进行萃取净化，收集洗脱液，加水饱和乙酸乙酯 4mL，涡旋振荡 1min，2000r/min 离心 5min，取上层液，重复处理 1 次，合并上层溶液，氮气吹至近干。加甲醇+水（50+50）1mL 溶解，微孔滤膜过滤，供 LC-MS/MS 测定。

方法管理： 关闭

方法名称 上样模式
萃取模式 是否追随液面
实际样品体积 mL

活化 上样 清洗样品瓶 淋洗 洗脱 洗脱样品瓶 洗针

步骤	溶剂	体积 (mL)	流速 (mL/min)	Collection	干燥 (sec)
▶ 活化	甲醇	10	3	废液1	0
活化	水	10	3	废液1	0
上样		4	3	废液1	0
洗针					
淋洗	水	3	3	废液1	0
淋洗	水	3	3	废液1	0
洗脱	甲醇：水...	5	1	组分1	30

保存 插入行 删除行

图 1 固相萃取方法

2.3 校准曲线配制

按照图 2 和图 3 的方法，用全自动液体处理平台配制氯霉素标准曲线，供液质分析。



图 2 校准曲线配置



图 3 校准曲线配置

2.4 LC-MS/MS 检测条件

离子源: ESI 源; 离子源温度: 120°C; 电离电压: 2.8KV;

碰撞气: 氩气 3×10^{-3} mbar; 脱溶剂气流速: 500L/h; 锥孔气流速: 20 L/h;

色谱柱: C₁₈ (150mm*3.2mm, 5μm); 进样量: 10μL; 柱箱温度: 40°C。

液相梯度:

表 1 流动相梯度表

步骤	总时间	流速 (mL/min)	A (水) %	B (甲醇) %
1	0	0.2	100	0
2	1	0.2	30	70
3	2	0.2	20	80
4	4	0.2	20	80
5	5	0.2	100	0

3.实验结果

3.1 标准样品色谱图

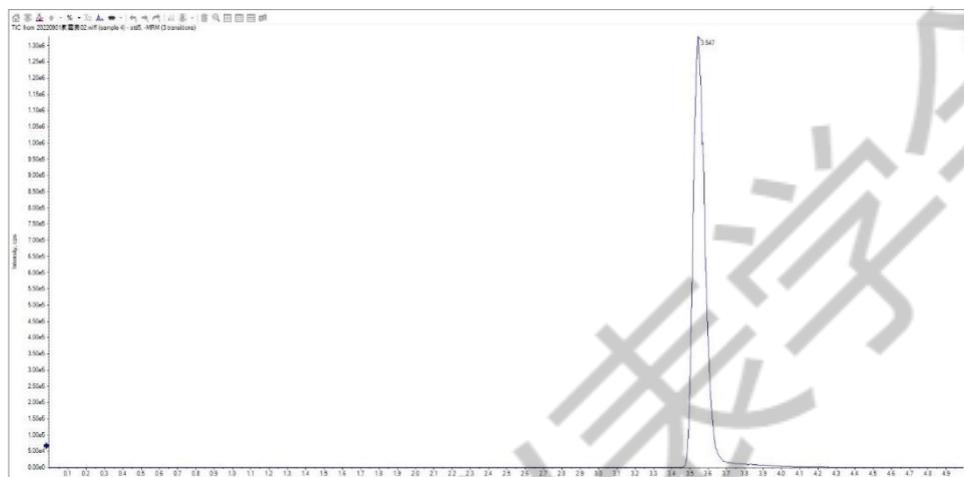


图 4 氟霉索标样色谱图

3.2 标准曲线图

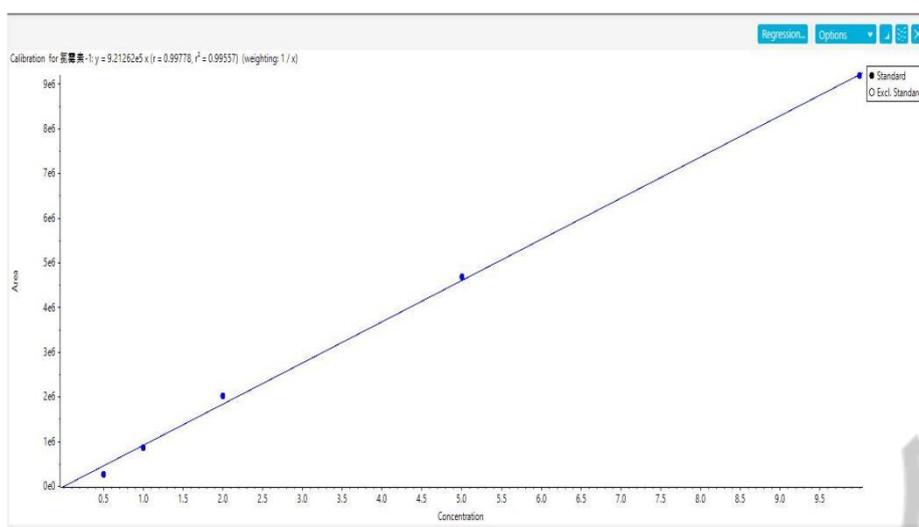


图 5 氯霉素标准曲线图

3.3 精密度及准确度结果

经过鱼肉样品提取、净化、浓缩等前处理步骤，得到氯霉素样品加标回收率为 86.3%~105.2%，RSD 为 8.1%，满足 GB31658.2-2021 中的相应要求。

表 2 样品加标回收率

化合物	加标浓度 μg/kg	加标回收率%						均值 %	RSD %
		1	2	3	4	5	6		
氯霉素	1	86.3	84.7	101.3	100.9	93.5	105.2	95.3	8.1

4. 结果与讨论

实验使用全自动液体处理平台配制氯霉素标准溶液，搭配全自动固相萃取净化，能够节约时间，减少人力，真正做到节约成本，提高效率。全自动固相萃取液相色谱串联质谱法能够用于测定罗非鱼中的氯霉素。

参考标准

GB31658.2-2021 食品安全国家标准 动物性食品中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法