

## 鱼肉中盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍残留的快速测定

朱小芳<sup>1</sup>, 杨会成<sup>2</sup>, 王萍亚<sup>3</sup>, 赵巧灵<sup>3</sup>, 陈康<sup>1</sup>, 薛静<sup>1</sup>, 沈清<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 海洋食品精深加工关键技术省部共建协同创新中心 浙江省水产品加工技术联合重点实验室

浙江工商大学海洋食品研究院 杭州 310012

<sup>2</sup> 舟山市食品药品检验检测研究院 浙江舟山 316000

<sup>3</sup> 浙江省海洋开发研究院 浙江舟山 316100)

**摘要** 传统的固相萃取和过膜技术存在操作繁琐、耗时长等问题。本文通过优化相关技术参数,整合通过式固相萃取(PRI-ME)和微孔滤膜技术,实现进样前操作步骤一体化。利用液相色谱串联质谱建立鱼肉中盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的定量检测方法。方法验证试验结果显示:盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍在质量浓度 0.5~100  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良好,检出限(LOD)分别是 0.51  $\mu\text{g/kg}$  和 0.53  $\mu\text{g/kg}$ ,定量限(LOQ)分别是 1.67  $\mu\text{g/kg}$  和 1.68  $\mu\text{g/kg}$ ,日内精密度相对标准偏差范围分别为 4.09%~4.48% 和 3.84%~3.90%,日间精密度相对标准偏差范围为 5.17%~5.73% 和 4.23%~5.29%。在 5, 10, 50  $\mu\text{g/kg}$  3 个水平下,盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的回收率范围分别为 91.2%~93.2% 和 91.3%~92.4%;RSD 范围分别为 4.5%~4.6% 和 1.8%~5.2%。采用液相色谱串联质谱法测定市售活鱼中目标化合物残留,未检出阳性样品,说明盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍在水产养殖方面使用情况良好,该检测方法符合痕量分析的要求。

**关键词** 固相滤膜; 酸盐小檗碱; 盐酸氯苯胍; 液相色谱; 串联质谱

文章编号 1009-7848(2022)01-0342-07 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.01.037

盐酸氯苯胍(Robenidine hydrochloride)作为一种抗球虫药,添加于饲料中,对治疗鸡、兔的急、慢性球虫病均有较好的效果<sup>[1-2]</sup>,在水产养殖中被允许用于治疗鱼类孢子虫病的国标渔药<sup>[3-5]</sup>。然而,盐酸氯苯胍长期使用会导致球虫产生严重的抗药性<sup>[6]</sup>。农业农村部、国家卫生健康委员会、国家市场监督管理总局三部门联合发布的 GB 31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》规定氯苯胍在鸡脂肪、皮以及其它可食组织中的最高残留限量分别为 200, 200, 100  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[7]</sup>。盐酸小檗碱是黄连、黄柏的主要有效成分,具有泻火解毒、清热燥湿效用以及抗微生物和显著的抑菌作用,用于治疗由爱德华氏菌、弧菌等引起的养殖鱼类的出血病、腹水病等疾病<sup>[8]</sup>。过量使用盐酸小檗碱会导致便秘、皮疹、发热,甚至可能导致横纹肌溶解症及乳酸中毒症,引起 B 族维生素吸收障碍,出现周围神经炎。为保障我国水产品质量安全以及消费者身体健康,促进水产品养殖行业的绿色、可持续发展,建立一种同时、快速测定鱼肉中盐酸

氯苯胍和盐酸小檗碱残留分析的检测方法,对水产品的质量安全与相关风险监测工作具有重要意义。

目前,对动物源性食品中的兽药残留的定性分析与定量分析主要有酶联免疫吸附法(ELISA)、气相色谱-电子捕获检测法、电化学法、液相色谱质谱联用法等。ELISA 具有灵敏度高、检测量大、步骤简单的特点,目前广泛用于水产品中兽药残留的快速检测。王强等<sup>[9]</sup>制备免疫原 MT17-KLH 并获取特异性识别甲基睾酮的多克隆抗体,通过酶联免疫吸附法建立测定水产品中甲基睾酮的方法。气相色谱对于有机磷、有机氯等易挥发药物检测具有分离效能高、技术稳定成熟的优势。符靖雯等<sup>[10]</sup>通过 HLB 小柱净化、气相色谱分离、电子捕获检测,成功分离并检测出 11 种拟除虫菊酯类农药和 3 种氯霉素类兽药。液-质谱联用法是目前最为广泛使用的一种高效、可靠、稳定的兽药残留检测方法<sup>[11-13]</sup>。孙丕等<sup>[14]</sup>建立液-质谱联用法测定水产品、禽畜肉、牛奶中 7 种喹诺酮类药物的残留。殷平等<sup>[15]</sup>采用液相色谱-质谱同位素稀释法同时测定水产品中氯霉素、氟苯尼考、甲磺氯霉素 3 种残留药物的方法。然而,液-质谱联用法的样品前处

收稿日期: 2021-01-13

作者简介: 朱小芳(1986—),女,本科,助理研究员

通信作者: 沈清 E-mail: leonqshen@163.com

理复杂,需将样品进行提取、固相萃取净化、过膜去除大颗粒等步骤,存在操作步骤繁琐、耗时长这一弊端<sup>[6]</sup>。

本研究采用新型固相滤膜萃取 (Solid-phase and membrane based extraction, SPME), 通过兼容性研究和条件优化, 整合通过式固相萃取 (PRiME) 和微孔滤膜, 具有快速、省时等特点。以固相滤膜萃取液相色谱-串联质谱法快速测定鱼肉中盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱残留, 旨在为研究盐酸小檗碱、盐酸氯苯胍在鱼肉体内的残留监测提供一种快速、有效的分析方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

市售鲫鱼、鲤鱼、草鱼, 杭州城西物美超市。

盐酸氯苯胍, 纯度 $\geq 98\%$ , 百灵威科技有限公司; 盐酸小檗碱, 纯度 $\geq 98\%$ , 阿拉丁试剂有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯级), 美国 TEDIA 公司; 实验用水为电阻率  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$  的 Milli-Q 高纯水, 其余试剂均为分析纯级; 固相滤膜萃取柱 (500 mg, 6 mL), 实验室自制, 向针头滤膜腔体填入 PRiME 填料, 并用筛板(或棉花)固定。

### 1.2 仪器与设备

液相色谱仪 (Agilent 1200), 美国 Agilent 公司; 三重四极杆质谱仪 (4000 QTrap), 美国 AB Sciex 公司; 高速离心机 (Allegra X-12), 美国 Beckman 公司; 数控式恒温循环水浴槽 (HD120-T8), 英国 Prima 公司; 涡旋振荡器 (Multi Reax), 德国 Heidolph 公司; Waters XSelect HSS T3 色谱柱 (2.1 mm  $\times$  150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), 美国 Waters 公司。

### 1.3 标准溶液的配制

以甲醇为溶剂配制质量浓度为 1 mg/mL 的盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱混合标准储备液, 临用时以空白鱼肉基质提取液将上述标准溶液稀释为混合标准工作液。

### 1.4 方法

1.4.1 样品的采集与制备 对活样品 (鲫鱼、鲤鱼、草鱼) 通过放血、去鳞片去皮等步骤处理后, 分别取鱼腹部和背部肌肉组织, 用清水清洗并去除血污与泥沙后, 吸除多余水分, 分别将肌肉组织放

入搅拌机中捣成匀浆状, 置于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  冻藏保存备用。

1.4.2 样品前处理 准确称取鱼肉样品 2.0 g (精确到 0.1 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 90% (体积分数) 甲醇水溶液后将螺旋盖盖上, 高速涡旋振荡 5 min, 并放置于  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴加热 20 min。取出离心管, 于 5 000 r/min 转速下离心 5 min, 转移全部上层清液于 10 mL 容量瓶中。向离心管中继续加入 4 mL 90% 甲醇水溶液, 重复上述提取步骤。合并 2 次提取液, 用 90% 甲醇水溶液定容到 10 mL 备用。

使用一次性注射器将提取液上样至固相滤膜萃取柱, 通过手动活塞加压, 使样品以 1 滴/s 的速度通过固相滤膜萃取柱, 将流出液全部收集, 在  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  下氮气吹干, 以 1 mL 甲醇复溶, 上机检测。

1.4.3 液相色谱-质谱条件 液相条件: 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和 0.1% 甲酸乙腈溶液 (B); 梯度洗脱条件: 初始 5%B; 0~3 min, 5%~20%B; 3~6 min, 20%~80%B; 6~8 min, 80%~100%B; 8~9 min, 100%B; 9~10 min, 100%~5%B; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 5  $\mu\text{L}$ ; 柱温保持  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

质谱条件: 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描, 多反应离子检测模式 (MRM), 喷雾电压 5.5 kV, 干燥温度  $500 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , 源内碰撞诱导解离气为氮气, 气帘气 25 psi, GS1 为 40 psi, GS2 为 50 psi。

## 2 结果与分析

### 2.1 固相滤膜萃取优化

传统的固相萃取和过膜整个试验步骤分为上样、淋洗、洗脱、过膜 4 个步骤, 耗时长, 溶剂使用量大<sup>[7]</sup>。本研究将通过型 PRiME 固相萃取和针头滤膜有效结合, 实现萃取、净化、除杂一步到位, 大大缩短了常规操作耗时由 10 min 至 2 min, 减少实验人员工作量, 同时减少了常规 SPE 淋洗和洗脱溶剂 6~10 mL, 免去了用于收集洗脱液的离心管的使用。经试验检测分析, 传统方法的化合物回收率为 92.8%~96.4%, 新型固相萃取膜化合物回收率为 91.3%~93.2% (表 1), 两种方法对盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱的回收率差异不显著, 均可满足实验室分析测试需求。

表1 传统固相萃取和过膜与新型固相萃取膜试验数据对比

Table 1 Performance comparison of traditional solid-phase extraction and membrane filtration with SPM

	传统固相萃取过膜	新型固相萃取
试验步骤	上样、淋洗、洗脱、过膜	一步通过
综合耗时/min	10	2
溶剂使用量/mL	6~10	无
耗材使用	移液器上样,离心管收集,样品瓶保存	移液器上样,样品瓶保存
化合物回收率/%	92.8~96.4	91.3~93.2

## 2.2 质谱条件的优化

以流动注射将质量浓度为  $1 \mu\text{g/mL}$  的盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍标准溶液进行正离子模式下 MS 全扫描,分别得到两种药物的准分子离子。其中离子峰  $m/z$  336.40 与脱水和 Cl 的盐酸小檗碱离子质量 ( $m/z$  336.37) 相符,而离子峰  $m/z$  334.23 与脱 Cl 后的盐酸氯苯胍离子质量 ( $m/z$  334.21) 相符,故确定  $m/z$  336 和  $m/z$  334 为盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的母离子。通过 MS/MS 碰撞解离获取其碎片信息,其中盐酸小檗碱的主要子离子为  $m/z$  319.8 和  $m/z$  291.7,盐酸氯苯胍的子离子为  $m/z$  177.8 和  $m/z$  137.9。使用爬坡(Ramp)调试功能优化去簇电压(DP)和碰撞能量(CE),使母离子和子离子组成的离子对信号强度达到最大,并分别以最强和次强离子对作为定量和定性离子对,具体参数见表 1。本试验离子对信息与汤菊芬等<sup>[18]</sup>所建立的 HPLC-MS/MS 法相符,而锥孔电压和碰撞能有所出入,原因可能是不同的质谱设备在离子化和解离设计方面有所不同。

## 2.3 色谱条件的优化

本研究以水、甲醇和乙腈为流动相,其中水相中加入了甲酸来改善化合物的色谱峰型和保留行为。试验结果显示,甲醇和乙腈二者的分离效果相当,而当以水和乙腈为流动相时,盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的峰对称度好,拖尾现象少,因此采用水和乙腈为流动相。向水相中加入甲酸提高了目标化合物的保留能力和响应值。通过提高甲酸浓度观察信号响应时发现,以纯水为水相时盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的响应值较低,0.1%甲酸水-乙腈作为流动相体系时,化合物响应值最高。进一步逐级升高甲酸体积分数至 0.5% 时,盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的信号强度呈逐渐降低的趋势。甲酸的

体积分数对目标化合物在色谱柱上的保留行为影响不大。因此,本研究以 0.1% 甲酸水-乙腈为流动相,使得目标化合物得到有效分离。优化后的色谱条件,峰形良好、灵敏度极高,5 min 之内,盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍得到良好的分离(图 1)。

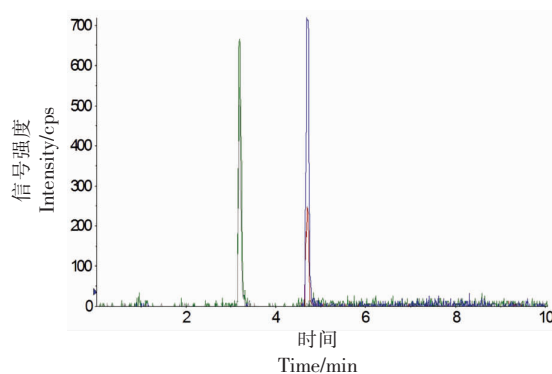


图1 固相滤膜萃取液相色谱-串联质谱法快速测定盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱残留色谱图

Fig.1 The chromatogram of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride acquired by SPM HPLC-MS/MS

## 2.4 固相萃取填料的选择与洗脱液体积的确定

本研究选用了 C18、HLB、Silica、Florisil 4 种萃取填料进行试验。如图 2a 所示,盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱的吸附洗脱行为相似,使用不同填料萃取下两者回收率十分相近。然而不同填料性质对目标化合物的回收率影响较大,常规 C18 对盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱的回收率分别为 65.7% 和 66.9%。当使用 HLB 填料时,目标化合物的回收率均在 90% 以上。Silica 和 Florisil 对盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱的吸附洗脱影响较小,分别仅为 38.9%, 42.5% 和 33.6%, 33.4%。甲醇是一种良好的萃取溶剂,不同体积的甲醇溶液对于目标物的回收率有一定程度的影响。本研究选用甲醇作为萃取

液,分别选用 1~5 mL 的甲醇进行试验。结果如图 2b 所示,盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱的回收率随着甲醇体积的增加而上升,当甲醇体积在 3~5 mL

时,目标物的回收率在 90%以上,能取得较为满意的提取效果,故确定 3 mL 为洗脱液最佳体积量。

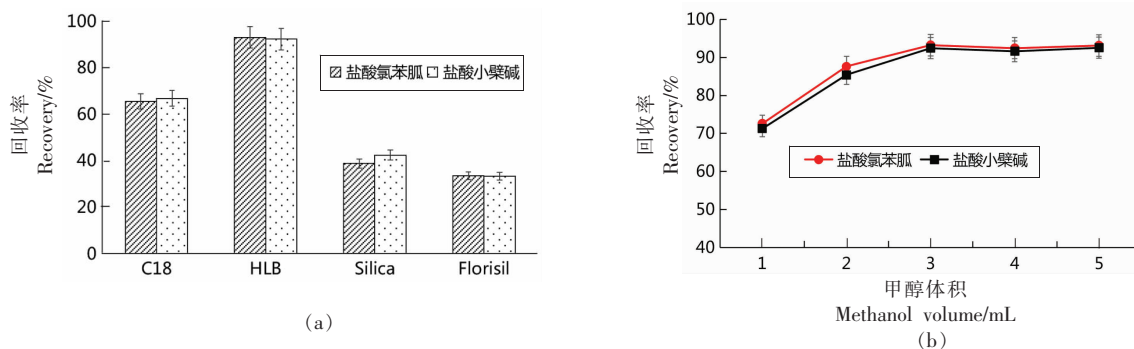


图 2 固相滤膜萃取填料(a)和洗脱液体积(b)对盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱回收率的影响

Fig.2 The effect of sorbent of SPM (a) and volume of eluting solution (b) on the recovery of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride

## 2.5 标准曲线、线性范围和检出限、定量限

选用预检无残留的空白鲫鱼样品为空白基质。分别选取质量浓度为 0.5, 1, 5, 10, 100  $\mu\text{g/L}$  的盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱混合标准工作溶液进行加标检测试验。以峰面积( $y$ )为纵坐标,对应的标准溶液质量浓度为横坐标绘制标准曲线,得出线性回归方程、线性范围和相关系数( $r$ )。分别以 3 倍和 10 倍信噪比( $S/N$ )确定被测物的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。由表 2 可知,试验结果表明,盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍在 0.5~100  $\mu\text{g/L}$  的

质量浓度范围内线性关系良好,相关系数  $r > 0.999$ 。该方法对化合物检出的灵敏度高,其中盐酸小檗碱的 LOD 和 LOQ 分别为 0.51  $\mu\text{g/kg}$  和 1.67  $\mu\text{g/kg}$ ,盐酸氯苯胍的 LOD 和 LOQ 为 0.53  $\mu\text{g/kg}$  和 1.68  $\mu\text{g/kg}$ 。本研究建立的固相滤膜萃取液相色谱串联质谱法相较于常规方法在灵敏度方面有显著提高,如刘永涛等<sup>[19]</sup>用超高效液相色谱所建立的同时测定水产品中盐酸氯苯胍及其代谢物方法的 LOD 为 25  $\mu\text{g/kg}$ 。

表 2 盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍线性范围、标准曲线、检出限和定量限

Table 2 The linearity range, calibration curve, LOD and LOQ of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride

化合物	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	标准曲线	相关系数( $r$ )	检出限(LOD)/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	定量限(LOQ)/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
盐酸小檗碱	0.5~100	$y = 2538x + 132$	0.999 5	0.51	1.67
盐酸氯苯胍	0.5~100	$y = 1749x - 52$	0.999 2	0.53	1.68

## 2.6 回收率与精密度

在空白鲫鱼样品基质中加入盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱混合标准溶液,制备质量浓度分别为 5, 10, 50  $\mu\text{g/kg}$  的加标样品。根据前述的处理方法和测定条件进行精密度和回收率试验。每个添加水平平行测定 6 次,结果如表 3 所示,在质量浓度分别为 5, 10, 50  $\mu\text{g/kg}$  的情况下,盐酸小檗碱的日内

和日间精密度 RSD 为 4.09%~5.73%,盐酸氯苯胍的日内和日间精密度 RSD 为 3.84%~5.29%。3 种质量浓度水平下,盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的回收率  $\geq 91.2\%$ ~ $93.2\%$ ,  $RSD \leq 5.2\%$ 。结果表明,该检测方法结果稳定、可靠、精密度和回收率高,可以满足在鱼肉中同时检测盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍残留量的要求。

表3 空白鲫鱼肉中盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍不同质量浓度下的日内精密度和日间精密度的  
Table 3 The intra-day and inter-day precisions of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride at different mass concentrations in fish meat

化合物	质量加标浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	日内精密度		日间精密度
		均值 $\pm$ 标准偏差	RSD/%	
盐酸小檗碱	5.0	4.91 $\pm$ 0.22	4.48	5.73
	10.0	9.85 $\pm$ 0.41	4.16	5.25
	50.0	48.4 $\pm$ 1.98	4.09	5.17
盐酸氯苯胍	5.0	4.87 $\pm$ 0.19	3.90	5.29
	10.0	9.72 $\pm$ 0.38	3.91	4.66
	50.0	48.5 $\pm$ 1.86	3.84	4.23

表4 空白鲫鱼肉中盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍加标回收率及相对标准偏差  
Table 4 The standard spiked recovery and RSD of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride in blank fish meat sample

化合物	加标质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$					
	5		10		50	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
盐酸小檗碱	92.6	4.6	93.2	4.5	91.2	4.6
盐酸氯苯胍	91.3	1.8	92.4	5.2	92.1	5.1

## 2.7 实际样品检测

采用本研究方法对市售商品鲫鱼、草鱼、鲤鱼各12批次进行检测,结果未出现阳性样品,分析原因可能:(1)盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍作为抗菌抗虫药在水产养殖业中使用并不十分普及;(2)目前职能部门对兽药在养殖业中的使用规范监管惩治力度较严,兽药滥用情况较以前有明显改善。后期将进一步对不同品种和来源的水产品进行检测,扩大抽检样本量。

## 3 结论

将通过型PEiME固相萃取和针式滤膜结合,实现鱼肉样品前处理过程中,萃取、净化、除杂的步骤一体化,在保证盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍萃取效率的前提下,极大地节约了操作时间,节省了试剂和耗材使用。结合液相色谱串联质谱法实现了鱼肉中盐酸小檗碱和盐酸氯苯胍的高效、稳定和可靠检测。此方法操作步骤简单、耗时较少,可作为鱼肉中盐酸氯苯胍和盐酸小檗碱残留的检测方法,为水产品质量安全风险管理提供技术支持。

## 参 考 文 献

- [1] 陈冬, 杨光友, 程建国, 等. 盐酸氯苯胍等4种抗球虫药物对林麝球虫的抑杀效果观察[J]. 经济动物学报, 2017, 21(1): 41-43, 57.  
CHEN D, YANG G Y, CHENG J G, et al. Efficacy of four coccidiostats for killing coccidium in captive *Moschus berezovskii* [J]. Journal of Economic Animal, 2017, 21(1): 41-43, 57.
- [2] 何高明, 姜悦平, 潘文鹤, 等. 盐酸氯苯胍与轰血球制剂抗巨型艾美球虫的效果观察[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(3): 72-73.  
HE G M, JIANG Y P, PAN W H, et al. An observation on effect of robenidine hydrochloride and Hongxueqiu preparation against *Eimeia maxima* [J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2003, 33(3): 72-73.
- [3] 周宏正, 赵燕楠, 张祎桐, 等. 盐酸氯苯胍在异育银鲫体内的药代动力学研究[J]. 上海海洋大学学报, 2018, 27(6): 115-122.  
ZHOU H Z, ZHAO Y N, ZHANG Y T, et al. The pharmacokinetics of robenidine hydrochloride in crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. Journal of

- Shanghai Ocean University, 2018, 27(6): 115–122.
- [4] 赵留杰, 王元, 常晓晴. 盐酸氯苯胍药饵给药条件下在异育银鲫体内药动学和组织分布与消除规律[J]. 海洋渔业, 2018, 40(2): 227–234.
- ZHAO L J, WANG Y, CHANG X Q. Pharmacokinetics, tissue distribution and elimination of robenidine hydrochloride in *Carassius auratus gibelio* after oral administration via medicated feed [J]. Marine Fisheries, 2018, 40(2): 227–234.
- [5] 杨先乐, 陆承平, 战文斌, 等. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 204–456.
- YANG X L, LU C P, ZHAN W B, et al. New handbook of fishery medicine[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 204–456.
- [6] 曲斌, 陈蓉, 耿士伟, 等. 液质联用技术在兽药多类别、多组分残留分析中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 5: 1654–1660.
- QU B, CHEN R, GENG S W, et al. Liquid chromatography–mass spectrometry in applications of veterinary drugs multi–class and multi–residues analysis [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 5: 1654–1660.
- [7] 农业农村部, 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量: GB 31650–2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019: 30.
- Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Health Commission, State Administration for Market Regulation. National food safety standard–maximum residue limits for veterinary drugs in foods: GB 31650–2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019: 30.
- [8] 何金凤, 张征西. HPLC法测定牙膏中盐酸小檗碱的含量[J]. 口腔护理用品工业, 2013, 23(1): 26–27.
- HE J F, ZHANG Z X. Determination of the content of berberine hydrochloride in toothpaste by HPLC[J]. Toothpaste Industry, 2013, 23(1): 26–27.
- [9] 王强, 王旭峰, 黄珂, 等. 酶联免疫吸附法测定水产品中甲基睾酮残留[J]. 现代食品科技, 2015(5): 310–315.
- WANG Q, WANG X, HUANG K, et al. Determination of methyltestosterone residue in aquatic products by enzyme–linked immunosorbent assay[J]. Modern Food Science & Technology, 2015(5): 310–315.
- [10] 符靖雯, 黄子敬, 陈孟君, 等. 气相色谱–电子捕获检测器快速测定水产品中多种农药及兽药残留[J]. 理化检验–化学分册, 2018, 54(9): 1015–1019.
- FU J W, HUANG Z J, CHEN M J, et al. Rapid determination of pesticide and veterinary drug residues in aquatic products by gas chromatography–electro capture detector [J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2018, 54(9): 1015–1019.
- [11] SHEN Q, FENG J, WANG J, et al. Laser irradiation desorption of microcystins from protein complex in fish tissue and liquid chromatography mass spectrometry analysis[J]. Electrophoresis, 2019, 40(14): 1805–1811.
- [12] ZHANG Y, YU X, LI L, et al. Development of a PRiME cleanup procedure for the purification of avermectins in grass carp and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis[J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(9): 1905–1913.
- [13] SHEN Q, WANG J, CHEN K, et al. Development of a PRiME cartridge purification method for rapid determination of malachite green and leucomalachite green in Chinese softshell turtle[J]. Electrophoresis, 2019, 40(11): 1615–1621.
- [14] 孙丕, 王柯, 刘畅. 液质联用法测定禽畜肉、水产品、牛奶中7种喹诺酮类药物的残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(16): 2341–2345.
- SUN P, WANG K, LIU C. Simultaneous determination of 7 quinolones in poultry meat, aquatic products and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014(16): 2341–2345.
- [15] 殷平, 陈舜胜, 邓晓军, 等. 液质联用检测水产品中氯霉素、氟苯尼考和甲砒氯霉素的残留量[J]. 现代食品科技, 2007(10): 83–87.
- YIN P, CHEN S S, DENG X J, et al. Determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol residues in aquatic product by lipid chromatography–mass/mass spectrometry[J]. Modern Food Science & Technology, 2007(10): 83–87.
- [16] WANG J, LIAO J, WANG H, et al. Quantitative and comparative study of plasmalogen molecular species in six edible shellfishes by hydrophilic interaction chromatography mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2021, 334: 127558.
- [17] SONG G, WANG H, ZHANG M, et al. Titania–coated fibrous silica (TiO<sub>2</sub>/KCC–1) core–shell microspheres based solid–phase extraction in clam (*Cor-*

- bicula fluminea*) using hydrophilic interaction liquid chromatography and mass spectrometry[J]. *Food Research International*, 2020, 137: 109408.
- [18] 汤菊芬, 蔡佳, 廖建萌, 等. HPLC-MS/MS法同时测定水产品中的诺氟沙星, 盐酸小檗碱, 盐酸氯苯胍残留[J]. *中国兽药杂志*, 2014(8): 55-60.
- TANG J F, CAI J, LIAO J M, et al. Determination of norfloxacin, berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS)[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2014(8): 55-60.
- [19] 刘永涛, 董靖, 李乐, 等. 超高效液相色谱法同时测定水产品中的盐酸氯苯胍及其代谢产物[J]. *分析试验室*, 2017, 36(9): 1058-1061.
- LIU Y T, DONG J, LI L, et al. Simultaneous determination of robenidine hydrochloride and its metabolites in aquatic products by UPLC[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2017, 36(9): 1058-1061.

### Fast Determination of Berberine Hydrochloride and Robenidine Hydrochloride in Fish Meat

Zhu Xiaofang<sup>1</sup>, Yang Huicheng<sup>2</sup>, Wang Pingya<sup>3</sup>, Zhao Qiaoling<sup>3</sup>, Chen Kang<sup>1</sup>, Xue Jing<sup>1</sup>, Shen Qing<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Collaborative Innovation Center of Seafood Deep Processing, Zhejiang Province Joint Key Laboratory of Aquatic Products Processing, Institute of Seafood, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310012*

<sup>2</sup>*Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316000, Zhejiang*

<sup>3</sup>*Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316100, Zhejiang*

**Abstract** Traditional solid-phase extraction (SPE) and membrane filtration technology are complicated, and time and labor consuming. In this study, the PRiME and membrane filtration technology were integrated to realize the integration of operational steps before sample injection, and the relevant technical parameters were optimized. A quantitative method for the determination of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride in fish was established by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The results showed that berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride had good linearity in the range of 0.5-100 g/L, the detection limits (LOD) were 0.51 g/kg and 0.53 g/kg, the quantitative limits (LOQ) were 1.67 g/kg and 1.68 g/kg, the intraday relative standard deviation of precision was 4.09%-4.48% and 3.84%-3.90%, respectively, and the intraday relative standard deviation of precision was 5.17%-5.73% and 4.23%-5.29%, respectively. The recoveries of berberine hydrochloride and robenidine hydrochloride were 91.2%-93.2% and 91.3%-92.4%, respectively, at 5, 10, 50 g/kg concentrations. The RSD was 4.5%-4.6% and 1.8%-5.2%, respectively. The liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS) was used to determine the residues of target compounds in fresh fish on the market, and no positive samples were detected, indicating that berberine hydrochloride and chlorophenguandine hydrochloride were used well in aquaculture.

**Keywords** solid-phase membrane; berberine hydrochloride; robenidine hydrochloride; chromatography; tandem mass spectrometry