

超高效液相色谱-串联质谱法检测禽畜肉中的氯霉素残留^{*1}

尹丽珠, 张学忠, 冯雷, 珠娜, 祝红昆, 牛之瑞
(云南省产品质量监督检验研究院, 云南昆明 650223)

摘要: 研究了一种针对禽畜肉中氯霉素残留量的超高效液相色谱-串联质谱联用分析方法. 本方法采用乙酸乙酯萃取禽畜肉中的氯霉素, 提取液氮吹干后用超纯水溶解样品残渣, 然后用 HLB 小柱进行固相萃取, 经过净化的样品通过超高效液相色谱进行分离, 然后用电喷雾质谱负离子多反应监测模式[ESI(-)-MRM]对氯霉素进行检测. 该方法的检出限为 0.002 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 添加水平为 0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 加标回收率为 75.8%~82.5%, 相对标准偏差小于 10%. 该方法具有灵敏度高、选择性好、分析时间短等优点.

关键词: 氯霉素; 禽畜肉; 超高效液相色谱-串联质谱联用; 分析

中图分类号: O 657.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)03-0336-04

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是由委内瑞拉链丝菌产生的抑菌性广谱抗生素,通过脂溶性可弥散进入细菌细胞内,抑制菌体蛋白合成,因此对革兰氏阳性、阴性细菌均有抑制作用. 氯霉素是第一个可以人工合成的抗生素^[1],曾广泛用于治疗各种敏感菌感染,随着应用的增加,逐渐发现其对人造血系统有严重不良反应,并且导致大肠杆菌、痢疾杆菌、变形杆菌等细菌对氯霉素产生抗药性,因此对其临床应用现已做出严格控制. 因其抗菌范围广泛,氯霉素也曾被用于防治猪牛羊及家禽的许多疾病(如大肠杆菌病、鸡白痢、慢呼病、溃疡性肠炎、坏死性肠炎、禽伤寒、副伤寒、葡萄球菌病等). 动物食品中氯霉素残留会通过肉、蛋、奶等食物形式传递给人类,对人类健康构成危害,许多国家和地区已禁止或限制氯霉素的使用,美国规定在动物食品中不得检出氯霉素;欧盟规定在动物源性食品中氯霉素残留量的最低极限值(MRPL)为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$;日本、韩国对我国出口的动物源性食品的氯霉素残留检测限要求达到 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2];我国农业部 235 号公告中也把氯霉素列为禁用药物.

目前氯霉素残留量的检测方法主要有气相色

谱法^[3]、液相色谱法^[4]、气相色谱-质谱联用法^[5]和液相色谱-质谱联用法^[6-9]、酶联免疫法^[10]等多种方法. 由于动物源性食品的成分复杂,因此有效地排除基质效应对氯霉素检测结果的干扰,建立灵敏度高、特异性强、简便易行的检测方法十分必要,本文介绍的样品前处理净化及超高效液相色谱-串联质谱多反应监测模式检测氯霉素的方法具有精确可靠、灵敏度高、重复性好以及降低假阳性检测结果的出现机率、节省分析时间和流动相的消耗量等优点,可以满足准确、快速的检测需要,运用到实际样品的检测中结果令人满意.

1 材料与方 法

1.1 试剂与材料 氯霉素标准样品(质量分数为 99.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH),甲醇、乙酸乙酯、乙腈、正己烷均为色谱纯(德国 MERK 公司),氨水、无水硫酸钠均为分析纯,18.2 M Ω 超纯水由赛多利斯超纯水机生产,鸡肉样品购买于昆明农贸市场.

1.2 仪器及工作条件

1.2.1 主要仪器及设备 GL-20G-C 高速离心

* 收稿日期:2010-05-28

基金项目:云南省科技平台项目资助(2009DA022).

作者简介:尹丽珠(1959-),女,云南人,工程师,主要从事食品安全检测方面的研究.

通讯作者:冯雷(1979-),男,云南人,工程师,硕士,主要从事食品中农兽药残留、非法添加剂的检测方面的研究, E-mail: fenglei16

机上海安亭科学仪器厂; B-400 均质机, 瑞士 Buch 公司; N-EVAP 氮吹仪, 美国 Organomation 公司; AL204-IC 电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; 超高效液相色谱, 美国 Waters 公司; API-3200 三重四级杆串联质谱仪, 美国 AB 公司; 质谱工作站为 Analyst 质谱工作站, 美国 AB 公司。

1.2.2 色谱条件 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μm , ϕ 2.1 mm \times 100 mm, 流动相为乙腈-水, 流动相梯度见表 1, 流动相流速为 0.4 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 5 μL 。

表 1 氯霉素的梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient of mobile phase

t/min	$\varphi(\text{乙腈})/\%$	t/min	$\varphi(\text{乙腈})/\%$
0.0	20	3.8	50
0.5	20	3.9	20
2.5	50	5.6	20

1.2.3 串联质谱条件 超高效液相色谱与串联质谱接口为电喷雾接口 (ESI) 负离子模式, 离子监测模式为多反应监测模式 (MRM), 质谱仪器所用气体均为高纯氮气, 喷雾电压 (IS) 为 -4 000 V, 喷雾气 (GS1) 气压为 415 kPa, 辅助气 (GS2) 气压为 450 kPa, 气帘气 (CUR) 气压为 140 kPa, 碰撞气 (CAD) 气压为 35 kPa, 辅助喷雾气温度 (TEM) 为 600 $^{\circ}\text{C}$, 去簇电压 (DP) 为 -32.0 V, 碰撞室入口电压 (EP) 为 -8.0 V, 其他参考条件参见表 2。

表 2 氯霉素定性离子对、定量离子对、采集时间、碰撞能量和碰撞室出口电压

Tab. 2 Transitions for confirmation and quantification, time, CE, CXP

离子对	碰撞能量 (CE) /V	碰撞室出口电压 (CXP)/V
320.8/151.9*	-21	-4
320.8/175.9	-26	-5
320.8/257.0	-20	-5

*: 定量离子对; 采集时间均为 300 ms

1.3 样品前处理 取 100 g 动物肌肉组织于均质机中粉碎均质后用分析天平准确称取 5 g (精确至 0.01 g) 样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 氨

水和 15 mL 乙酸乙酯, 拧紧离心管盖子后漩涡混匀并超声波提取 10 min. 以 6 000 r/min 的转速离心 5 min, 反复提取 3 次, 合并萃取液. 萃取液经 10 g 无水硫酸钠干燥后转移至比色管中, 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 条件下将萃取液氮吹浓缩至近干. 在该比色管中加入 5 mL 水溶解残渣, 并用适量正己烷提取样品中的油脂, 保留水相部分进行固相萃取净化. 将上述水相部分全部转入经 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化过后的 HLB 固相萃取柱, 以 3 mL/min 的流速通过固相萃取柱后, 然后再用 5 mL 乙腈+水 (体积比 1:7) 淋洗 HLB 小柱, 弃去全部淋洗液, 在负压下对 HLB 小柱减压抽干 1 min, 最后用 5 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液于 10 mL 比色管中, 于 50 $^{\circ}\text{C}$ 用氮吹仪吹干, 用流动相定容至 1 mL, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤后即可进样。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的选择 氯霉素分子含有 2 个氯原子, 具有较强的电负性, 其在电喷雾离子源中易失去氢原子而带负电荷. 氯霉素的这一性质决定了采用液质联用对其进行检测时, 只能采用负离子模式. 采用扫描模式对氯霉素标准样品进行扫描得到的一级质谱图见图 1, $m/z = 320.8$ 和 $m/z = 322.8$ 分别为氯霉素的准分子离子峰和同位素峰. 对氯霉素的准分子离子峰 ($m/z = 320.8$) 进行二级质谱扫描, 二级质谱信息见图 2, 氯霉素的主要碎片有 121.0, 151.9, 175.9, 194.0 和 257.0. 本方法以离子强度最大的 151.9 作为定量离子, 175.9 和 257.0 两个离子对作为定性离子. 经优化的质谱条件参数见 1.2.3 节。

2.2 色谱条件 氯霉素属于弱极性化合物, 在水中溶解性较差, 易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂. 本方法采水-乙腈为流动相, 利用梯度洗脱的方法缩短分离时间, 提高分离效果. 在对流动相流速及梯度进行优化后发现对于串联质谱检测器, 1.2.2 节所列色谱条件下氯霉素的检测灵敏度最高。

2.3 定量回归方程及相关系数 将用流动相逐级稀释配制的氯霉素标准工作溶液分别进样 5 μL , 以质量浓度为横坐标, 定量离子的峰面积为纵坐标进行线性回归, 线性范围为 0.1 ~ 50.0 ng/mL, 线性回归方程为 $Y = 1\ 030X + 293$, 相关系数 $r = 0.9999$. 说明采用外标标准曲线法对样品中的氯霉素进行定量具有较好的线性响应范围。

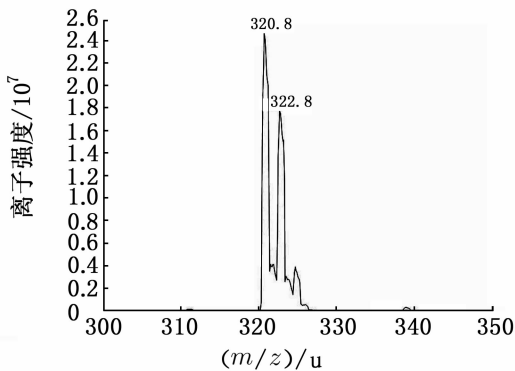


图 1 氯霉素一级质谱图

Fig. 1 The mass spectrum of chloramphenicol

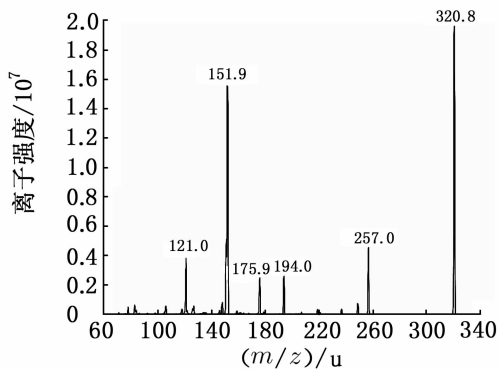


图 2 氯霉素二级质谱图

Fig. 2 The MS2 spectrum of chloramphenicol

2.4 方法的回收率和精密度 以市售鸡肉作为空白样品,分别按 0.1, 1.0, 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个质量比水平加入标准样品进行回收率实验,每个水平做 5 次平行试验,回收率及相对标准偏差见表 3。以本方法对质量浓度为 0.1 ng/mL 的标准样品进行检测,定量离子对的信噪比为 30.7 (图 3),以此推算出本方法的仪器检出限为 0.01 ng/mL ,根据取样量以及定容体积可计算出本方法运用于实际禽畜肉样品时的检出限为 2.5 ng/kg 。

2.5 样品检测 应用本方法对实际样品进行分析,鸡肉样品中氯霉素的定量离子色谱图见图 4,

样品中氯霉素峰型良好,在多反应监测模式下无干扰峰。说明本方法可以适用于禽畜肉中氯霉素的快速检测。

表 3 方法精密度和回收率 ($n=5$)Tab. 2 The recovery and precision of method ($n=5$)

加标量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均回收率/%	RSD/%
0.1	77.5	6.78
1.0	81.4	6.90
10.0	83.6	5.02

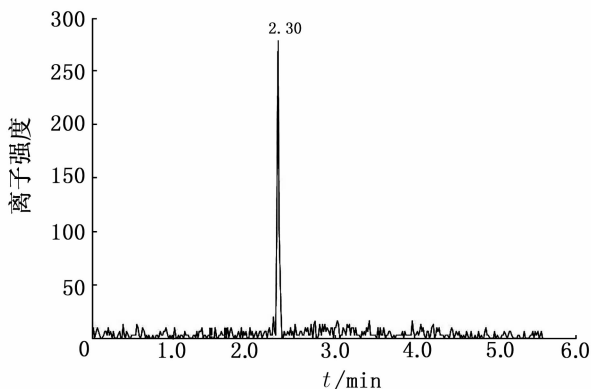
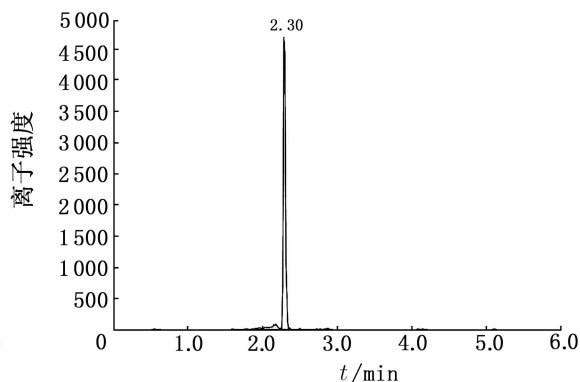
图 3 氯霉素标样 (0.1 ng/mL) 定量离子色谱图 ($S/N=30.7$)Fig. 3 The mass chromatography of chloramphenicol standard (0.1 ng/mL)

图 4 鸡肉样品定量离子色谱图

Fig. 4 The mass chromatography of chicken sample

3 结论

本方法采用乙酸乙酯对样品中的氯霉素进行萃取,固相萃取进行样品进化,有效地去除了样品中的干扰成分;超高效液相色谱-串联质谱联用方法对氯霉素残留进行检测具有高效、灵敏的特点。

本方法 6 min 可完成一个样品分析,分析速度快。多反应监测 (MRM) 技术的应用,使方法具有了很高的选择性和灵敏度。因此,本方法具有准确、快速、高灵敏度和高选择性的特点。

参考文献:

- [1] 张龙. 兽医药物化学[M]. 北京:中国农业出版社, 1999.
- [2] 蒋定国,杨大进. 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况(综述)[J]. 中国食品卫生杂志,2002, 14(2):44-47.
- [3] 钟惠英,杨佳锋,徐开达. 气相色谱法定量分析水产品中的氯霉素(CAP)残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(2):183-185.
- [4] 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.
- [5] 魏林阳,徐金晶,吴红军. 水产品中氯霉素残留的气质联用法检测[J]. 光谱实验室,2007,24(2):201-205.
- [6] 刘艳琴,王皓,殷晓燕,等. 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱测定乳品中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留的[J]. 食品科学,2008,29(4):344-346.
- [7] 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.
- [8] 李丹妮,严凤,张文刚,等. 超高效液相色谱-串联质谱法对奶粉中氯霉素残留的检测[J]. 分析测试学报,2008,27(11):161-163.
- [9] 冯雷,尹丽珠,孙文通,等. 禽畜肉中氯霉素残留量的液质联用分析方法[J]. 食品科学,2010,31(4):243-245.
- [10] 何佳琪,段振娟,张燕,等. 氯霉素残留 ELISA 检测方法[J]. 中国兽医杂志,2008,44(2):88-89.

Determination of chloramphenicol residues in meat by UPLC – MS/MS

YIN Li-zhu, ZHANG Xue-zhong, FENG Lei, ZHU Hong-kun, ZHU Na, NIU Zhi-ru
(Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming 650223, China)

Abstract: A new determination of chloramphenicol in meat was introduced. Solid – phase extraction (SPE) was applied in pretreatment of samples which were separated by ultra performance liquid chromatography (UPLC) with acetonitrile – water as mobile phase afterwards. The detection of chloramphenicol residues was performed by MS/MS in ESI(–) – MRM mode. The results shows that the pretreatment, as well as the analytical approach, was highly efficient, sensitive and also specific to chloramphenicol.

Key words: chloramphenicol; UPLC – MS/MS; meat

(上接第 335 页)

Abstract: A method has been developed for the simultaneous determination of 9 β – lactam antibiotics residues in milk by high – performance liquid chromatography – ultrasonic assisted extraction (HPLC – UAE). The milk samples were extracted with acetonitrile – phosphate buffer solution under 20 kHz ultrasound for 5 min, then centrifuged. With Agilent TC C18 (150 mm \times 4.6 mm id, 5 μ m) column, phosphate buffer – methanol as mobile phase, flow rate 1.0 mL/min, 220 nm detection, 9 β – lactam antibiotics were separated within 22 min. The method could be used for simultaneous determination of β – lactam antibiotics in milk.

Key words: ultrasound – assisted extraction; HPLC; milk; β – lactam antibiotics