

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的残留量

赵浩军^{1*}, 杨青梅岭², 张 燕¹, 陈朋云¹, 赵 芳¹, 杨 慰¹

(1. 大理州质量技术监督综合检测中心, 大理 671000; 2. 大理大学公共卫生学院, 大理 671000)

摘 要: **目的** 建立 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的分析方法。**方法** 以乙腈为提取溶剂, 加入正己烷除脂, 氮吹浓缩乙腈定容后经 C₁₈ 填料萃取净化, 在高效液相色谱-串联质谱仪上采用电喷雾负离子扫描模式(electron spray ionization, ESI-)测定, 内标法定量。**结果** 该方法在 1.0~50.0 μg/L 范围内有良好的线性关系, 相关系数均大于 0.99, 氯霉素和氟苯尼考的方法检出限为 0.1 μg/kg, 五氯酚的方法检出限为 0.06 μg/kg。平均回收率在 81.1%~115.8%范围, 相对标准偏差在 4.2%~11.8%范围。**结论** 本方法操作简便, 准确度和精密度好, 可同时检测猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的残留量。

关键词: QuEChERS; 高效液相色谱-串联质谱法; 氯霉素; 氟苯尼考; 五氯酚

Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and pentachlorophenol in pork by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Hao-Jun^{1*}, YANY Qing-Mei-Ling², ZHANG Yan¹, CHEN Peng-Yun¹, ZHAO Fang¹, YANG Wei¹

(1. Dali Comprehensive Inspection Centre of Quality and Technical Supervision, Dali 671000, China;
2. College of Public Health, Dali University, Dali 671000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the determination of chloramphenicol, florfenicol and pentachlorophenol in pork by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The analyte was extracted with acetonitrile. N-hexane was used to remove the fat. C₁₈ purification material was applied to purify the concentrated sample. The analyte was determined by electrospray negative ion scanning mode (electron spray ionization) with HPLC-MS/MS, and quantified by the internal standard method. **Results** The method showed good linear relationship in the range of 1.0–50.0 μg/L for analyte, and the correlation coefficient square was greater than 0.99. The limits of detection (LOD) of chloramphenicol and florfenicol were 0.1 μg/kg, and pentachlorophenol was 0.06 μg/kg. The average recoveries were 81.1%–115.8%, and the relative standard deviation (RSD) was 4.2%–11.8%. **Conclusion** This method is easy to operate, accurate and precise. Chloramphenicol, florfenicol and pentachlorophenol in pork can be detected simultaneously.

KEY WORDS: QuEChERS; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; chloramphenicol; florfenicol; pentachlorophenol

基金项目: 市场监管总局技术保障专项(2019YJ040)

Fund: Supported by the Technical Support Project of the State Administration for Market Regulation(2019YJ040)

*通讯作者: 赵浩军, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: 962721345@qq.com

*Corresponding author: ZHAO Hao-Jun, Senior Engineer, Dali Comprehensive Inspection Centre of Quality and Technical Supervision, Economic Development Zone 1 box, Dali 671000, China. E-mail: 962721345@qq.com

1 引言

氯霉素 (chloramphenicol, CAP) 和氟苯尼考 (florfenicol, FF) 均属广谱型抗生素, 对革兰氏阳性、阴性菌和支原体均有抑制作用, 因其疗效好、价格低廉, 曾被广泛应用于动物疾病的防治。然而氯霉素苯环上有硝基, 会抑制骨髓造血功能, 引起再生障碍性贫血。许多国家都已禁止氯霉素在动物疾病防治上的使用, 尤其是食品动物^[1-3]。五氯酚 (pentachlorophenol, PCP) 及其钠盐属高毒有机氯农药, 曾被广泛用作杀菌剂、除草剂和杀虫剂, 五氯酚化学性质稳定, 残留期长, 能通过生物富集进入食物链, 对人体的内分泌系统、生殖系统及神经系统等均具有毒性, 被国际癌症研究机构 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 列为 2B 类致癌物, 目前已有许多国家禁止使用^[4-6]。依据《动物性食品中兽药最高残留限量》中华人民共和国农业部公告第 235 号的规定, 禁止在食品动物上使用氯霉素和五氯酚酸钠, 对氟苯尼考也有相应的限量规定^[7]。

目前, 国家标准和行业标准中测定氯霉素和氟苯尼考的检测方法主要涉及: 高效液相色谱-串联质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)、气相色谱质谱联用法、高效液相色谱法、酶联免疫法等^[8-12], 测定五氯酚的检测方法仅有 GB 23200.92-2016《食品安全国家标准 动物源性食品中五氯酚残留量的测定 液相色谱-质谱法》^[13]。近年来, 关于检测氯霉素、氟苯尼考及五氯酚的研究论文较多, 除了常用的色谱质谱联用检测方法外, 还有胶体金免疫法、表面增强拉曼光谱法和时间分辨荧光免疫层析法等^[14-16], 但同时测定氯霉素、氟苯尼考及五氯酚这 3 种物质的方法未见报道, 然而日常监督检验的样品通常需要检测多种项目, 而且要求快速出具检测数据。考虑到国家标准上的净化方法步骤繁琐耗时, 氯霉素类药物和五氯酚需要单独处理, 并需要配制多种试剂, 增加了检验工作量, 效率低下。而

氯霉素、氟苯尼考及五氯酚这 3 种物质都是采用电喷雾负离子扫描模式测定, 化学性质类似, 因此考虑同时处理及检测这 3 种物质可以节约时间和检测成本。近年来, 在食品及环境等检测领域发展起来的 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe) 前处理净化技术^[17-20], 方便快捷、高效稳定。为了提高检测效率, 进一步优化检测方法, 本研究对现行国家标准中的前处理方法进行改进, 建立了 QuEChERS 净化与 HPLC-MS/MS 检测分析结合的方法, 同时检测猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的残留量, 可大大提高检测效率, 以期对猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚残留量的检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

猪肉样品购于当地市场。

氯霉素、氟苯尼考、五氯酚和氯霉素氘代同位素内标 (CAP-D₅) 等标准溶液 (浓度 100 mg/L, 上海安谱科学仪器有限公司); 甲醇、乙腈 (色谱纯, 德国 Merck 公司); 十八烷基硅烷 (octadecylsilane, C₁₈) 净化填料 (规格为 40~63 μm, 60 Å)、0.22 μm/13 mm 尼龙针式滤头 (上海安谱科学仪器有限公司); 实验室用水为超纯水。

API3200 串联质谱联用仪 (美国 AB SCIEX 公司); UFLC 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); Shim-Pack FC-ODS 色谱柱 (75 mm×4.6 mm, 3 μm, 日本岛津公司); AL204 电子天平 (瑞士 Mettler toledo 公司); 水浴氮吹仪 (上海沪析实业有限公司); TG16-WS 台式高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2.2 仪器分析条件

质谱离子源选用电喷雾负离子扫描模式 (electrospray ionization, ESI-); 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM); 离子源温度为 110 °C; 喷雾电压为 5500 eV; 脱溶剂温度为 450 °C; 质谱分析参考条件参见表 1。

表 1 质谱分析参数
Table 1 Parameters of mass spectra

化合物	保留时间/min	监测离子对(<i>m/z</i>)	射入电压/V	射出电压/V	碰撞能量/eV
氯霉素(CAP)	2.54	320.9/151.9*	-8	-15	-21
	2.54	320.9/176.0	-8	-15	-21
	2.54	320.9/256.9	-8	-23	-11
氯霉素氘代同位素内标 (CAP-D ₅)	2.53	326.1/157.0*	-7	-16	-22
	2.53	326.1/262.0	-7	-16	-17
氟苯尼考(FF)	2.29	355.9/336.0*	-10	-17	-31
	2.29	355.9/184.9	-10	-33	-17
五氯酚(PCP)	2.96	262.7/262.7*	-10	-15	-20
	2.96	266.7/266.7	-10	-15	-20
	2.96	268.7/268.7	-10	-15	-20

注: *为定量离子对。

液相色谱分析条件: 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 1 μ L; 流动相: A 为纯水, B 为甲醇, 梯度洗脱条件如表 2。

表 2 流动相的梯度洗脱程序
Table 2 Gradient of mobile phase

时间/min	A/%	B/%
0.0	80	20
1.0	15	85
5.0	15	85
5.1	80	20
7.5	80	20

2.3 混合标准溶液的配制

分别吸取氯霉素、氟苯尼考、五氯酚的标准储备液 (100 mg/L) 各 10 μ L, 用乙腈定容至 1.0 mL, 配制成浓度为 1.0 mg/L 混合标准中间液, 此外, 单独吸取 10 μ L 氯霉素氘代同位素内标溶液 (100 mg/L), 用乙腈定容至 1.0 mL, 配制成浓度为 1.0 mg/L 的内标中间液, 再逐级稀释配制成标准工作液, 标准曲线浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μ g/L, 在每个浓度点都添加内标中间液 10 μ L, 内标浓度为 10.0 μ g/L, 以此来绘制标准曲线。

2.4 样品前处理

取新鲜猪肉样品约 200 g, 切成体积不大于 5 mm \times 5 mm \times 5 mm 的小块, 再用搅拌机搅碎, 准确称取 5.0 g 试样 (精确到 0.001 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 1.0 mg/L 的内标中间液 10 μ L, 加入 10 mL 乙腈, 再加入 5 g 氯化钠, 涡旋振荡 1 min, 以 5000 r/min 的转速离心 5 min, 将上清液转移至 20 mm \times 200 mm 玻璃试管中, 再加入 10 mL 乙腈, 按上述操作重复提取 1 次, 合并上清液, 并向上清液中加入 10 mL 用乙腈饱和过的正己烷, 涡旋振荡 1 min, 取下层

乙腈在 40 $^{\circ}$ C 下氮气吹干, 准确加入 1.0 mL 乙腈溶解残留物, 再加入 C₁₈ 净化填料 50 mg, 涡旋振荡 1 min, 0.22 μ m/13 mm 尼龙针式滤头过滤, 供仪器分析测定。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的选择

参考 GB/T 22338-2008 推荐的氯霉素的监测离子对为 m/z 320.9/151.9 和 m/z 320.9/256.9^[8], 而实际检测中发现 m/z 320.9/256.9 的响应值较低, 当检测低浓度的氯霉素时, 该监测离子对可能会低于阈值, 无法起到定性的作用, 因此, 本研究通过优化质谱条件增加了一对定性离子对, 即 m/z 320.9/176.0, 可以保障检测低浓度氯霉素时的准确性。此外, GB 23200.92-2016 中的监测离子对有 4 对^[13]: m/z 262.7/262.7、 m/z 264.7/264.7、 m/z 266.7/266.7、 m/z 268.7/268.7, 而实际检测中发现 m/z 264.7/264.7 在溶剂中干扰较大, 尽管该离子对响应值最高, 但在目标物附近有杂峰 (如图 1 所示), 最终为保证定量准确, 避免假阳性的情况出现, 本研究删除了 m/z 264.7/264.7, 选择其余的 3 对监测离子对。在选定多反应监测的离子对后, 对仪器的射入电压、射出电压以及碰撞能量等参数进行优化选择, 优化后的参数见表 1。

3.2 色谱条件的优化

实验考察了不同流动相对氯霉素、氟苯尼考及五氯酚的影响, 包括纯水-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵溶液-乙腈、纯水-甲醇、5 mmol/L 乙酸铵溶液-甲醇等体系对目标物响应值及峰型的影响, 结果显示采用纯水-甲醇时 3 种目标物的响应值最强且峰型较好, 因此, 最终选择纯水-甲醇体系作为流动相, 并对流动相的梯度洗脱程序进行了优化, 优化后的条件见表 2, 图 2 为氯霉素、氟苯尼考及五氯酚在此条件下的多反应监测图。

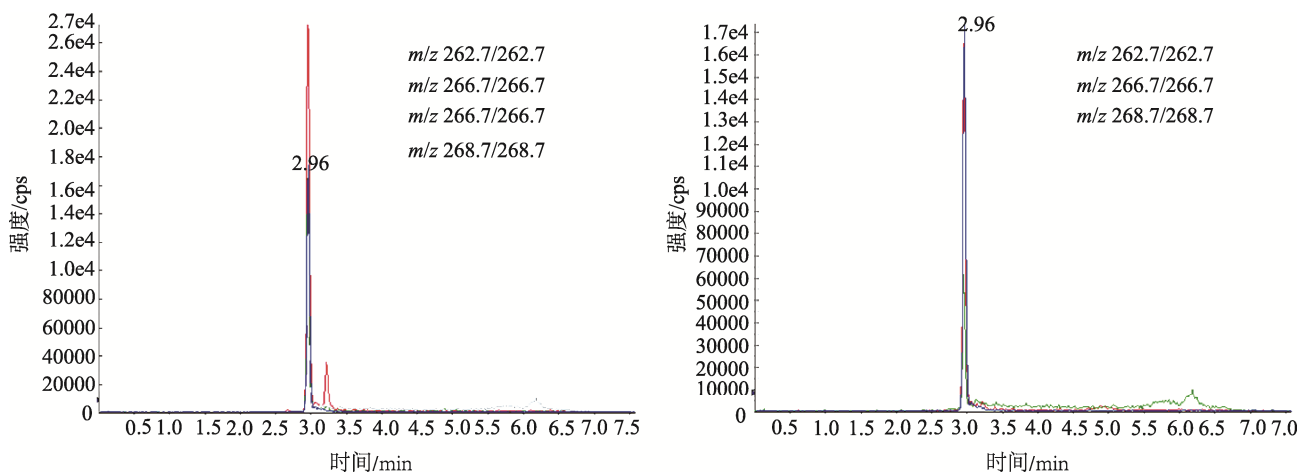


图 1 不同条件下五氯酚的多反应监测图

Fig.1 Multiple reaction monitoring chromatogram of pentachlorophenol on different condition

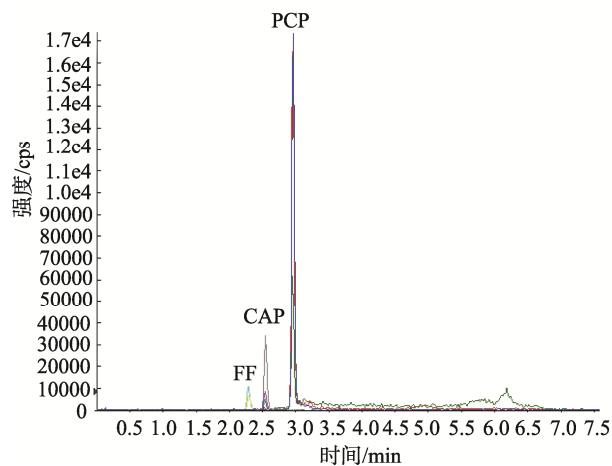
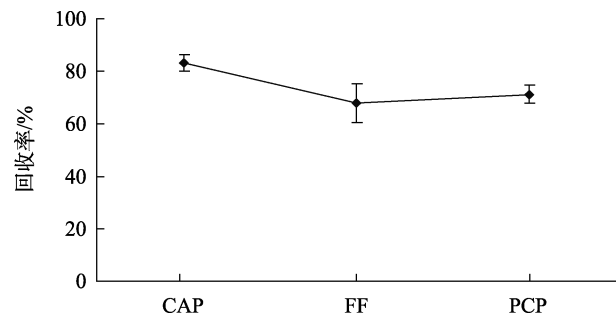


图 2 多反应监测色谱图

Fig.2 Multiple reaction monitoring chromatogram

3.3 样品前处理条件的选择

国家标准中检测氯霉素、氟苯尼考的方法 GB/T 22338-2008^[8], 以及检测五氯酚的方法 GB 23200.92-2016^[13], 这些标准中都采用了固相萃取柱的净化方法, 操作过程耗时长, 且固相萃取柱的使用成本较高, 且国标中没有这 3 种目标物同时检测的方法。本研究采用 QuEChERS 的前处理方法, 比较了 C_{18} 对不同目标物氯霉素、氟苯尼考及五氯酚的吸附效果。 C_{18} 是通过非极性相互作用, 吸附烯烃类、脂肪酸、色素等大分子基质干扰物。由图 3 可以看出, 回收率在 65%~85% 范围, 说明 C_{18} 吸附剂对 3 种目标物均有少量吸附, 由于吸附剂对 3 种目标物的吸附量较少, 本着尽可能地除去样品中的杂质, 以达到保护仪器的目的, 最终本研究以 C_{18} 作为净化吸附剂。

图 3 吸附剂对目标物回收率的影响($n=3$)Fig.3 Effect of sorbent on target recovery($n=3$)

3.4 方法的线性范围与检出限

标准溶液浓度范围为 1.0 ~ 50.0 $\mu\text{g/L}$ 时, 目标物的校准曲线回归方程和相关系数如表 3 所示, 其中 Y 为目标物与内标的峰面积之比, X 为目标物的浓度($\mu\text{g/L}$)。根据 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)分别计算该方法的检出限和定量限, 在猪肉的实际样品中添加检出限浓度的目标物, 可以检出, 结果见表 3。

3.5 方法回收率与精密度

分别向猪肉样品中添加浓度为 0.4、2.0 和 8.0 $\mu\text{g/kg}$ 3 水平的回收率实验, 每个浓度重复测定 6 次, 结果见表 4, 其平均回收率在 81.1% ~ 115.8% 范围, 相对标准偏差在 4.2% ~ 11.8% 范围, 方法的准确度和精密度都符合分析要求。同时, 实验室也采用外标法定量进行对比, 结果表明外标法的回收率在 61.2% ~ 138.8% 范围, 相对标准偏差在 3.1% ~ 32.1% 范围, 与内标法相比较准确度和精密度都偏低, 因此采用同位素内标法使得检测结果更准确。分析原

表 3 回归方程和相关系数

Table 3 Regression equation and correlation coefficients

目标物	回归方程	相关系数/ r	检出限/ $(\mu\text{g/kg})$	定量限/ $(\mu\text{g/kg})$
氯霉素(CAP)	$Y=0.0131X-0.125$	0.9986	0.1	0.3
氟苯尼考(FF)	$Y=0.0469X-0.0284$	0.9997	0.1	0.3
五氯酚(PCP)	$Y=0.704X+0.668$	0.9994	0.06	0.2

表 4 在猪肉中的回收率和精密度试验($n=6$)Table 4 Recoveries and precision tests in pork ($n=6$)

目标物	加标浓度/ $(\mu\text{g/kg})$	平均回收率/%	精密度/%
氯霉素(CAP)	0.4	115.8	8.4
	2.0	108.4	7.9
	8.0	107.2	6.5
氟苯尼考(FF)	0.4	110.3	11.8
	2.0	95.9	9.3
	8.0	102.3	7.4
五氯酚(PCP)	0.4	108.7	8.3
	2.0	88.8	4.2
	8.0	81.1	7.9

因可能是由于净化步骤较多, 目标物的回收率很难达到 100%, 而采用相同的提取净化过程, 目标物与内标物两者的绝对回收率较接近, 当采用两者的比值作为相对回收率时, 准确度就得到显著提高。

3.6 实际样品测定

采用此法检测了当地市场上的 58 个猪肉样品, 所有样品均未检出氯霉素、氟苯尼考和五氯酚。

4 结 论

本文建立了针对猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的检测方法, 采用乙腈提取, 正己烷除脂, 氮吹浓缩后乙腈定容, C_{18} 吸附剂净化试样, 以氯霉素氘代同位素标记物作为内标, 定量检测结果准确。此方法操作简便, 实用性强, 精密度和准确度符合分析要求, 可满足猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的检测需要。

参考文献

- [1] Turton JA, Havard AC, Robinson S, *et al.* An assessment of chloramphenicol and thiamphenicol in the induction of aplastic anaemia in the BALB/c mouse [J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38(10): 925-938.
- [2] 王花茹, 王加才. 骨髓造血机能的潜在杀手氯霉素残留危害及检测[J]. *中国动物保健*, 2008, (10): 43-44.
Wang HR, Wang JC. Study on the hazard and detection of chloramphenicol residue, which is the potential killer of bone marrow hematopoietic function [J]. *China Anim Health*, 2008, (10): 43-44.
- [3] Vu DH, Nguyen TH, Nguyen HT, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, dexamethasone and naphazoline in ternary and quaternary mixtures by RPHPLC, derivative and wavelet transforms of UV ratio spectra [J]. *Spectrochim Acta Part A*, 2015, 139(3): 20-27.
- [4] Zheng WW, Yu H, Wang X, *et al.* Systematic review of pentachlorophenol occurrence in the environment and in humans in China: Not a negligible health risk due to the re-emergence of schistosomiasis [J]. *Environ Int*, 2012, (42): 105-116.
- [5] World Health Organization. IPCS international programme on chemical safety: Health and safety guide N0.19, pentachlorophenol [EB/OL]. (2014-05-25) [2019-04-18]. <http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg019.htm>.
- [6] Environmental Protection Agency. Toxicological review of pentachlorophenol (CAS no. 87-86-5) in support of summary information on the integrated risk information system (IRIS) [EB/OL]. (2009-04) [2019-12-10]. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/P100SL76.PDF?Dockey=P100SL76.PDF>.
- [7] 中华人民共和国农业部. 农业部公告第 235 号 动物性食品中兽药最高残留限量[Z].
The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement of the ministry of agriculture No. 235. The maximum residue limit of veterinary drugs in animal food [Z].
- [8] GB/T 22338-2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定[S].
GB/T 22338-2008 Determination of multi-residues of chloramphenicols in animal original food [S].
- [9] 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 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20756-2006 Method for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol and flufenicol residues in edible animal muscles, liver and aquatic products-LC-MS/MS method [S].
- [10] GB/T 9695.32-2009 肉与肉制品 氯霉素含量的测定[S].
GB/T 9695.32-2009 Meat and meat products-Determination of chloramphenicol content [S].
- [11] NY/T 3409-2018 畜禽肉中氯霉素的测定[S].
NY/T 3409-2018 Determination of chloramphenicol in meat of livestock and poultry [S].
- [12] SN/T 2058-2008 进出口蜂王浆中氯霉素残留量测定方法 酶联免疫法[S].
SN/T 2058-2008 Determination of chloramphenicol residues in royal jelly for import and export-Enzyme-linked immunosorbent assay [S].
- [13] GB 23200.92-2016 食品安全国家标准 动物源性食品中五氯酚残留量的测定 液相色谱-质谱法[S].
GB 23200.92-2016 National food safety standard-Determination of pentachlorophenol residue in animal-derived foods-Liquid chromatography - mass spectrometry [S].
- [14] 周萍, 李樱红, 尹志红, 等. 胶体金免疫层析法快速测定蜂胶及蜂胶乙醇提取物中氯霉素残留[J]. *中国蜂业*, 2019, 70(5): 68-72.
Zhou P, Li YH, Yin ZH, *et al.* Rapid determination of chloramphenicol residues in propolis and ethanol extracts of propolis by colloidal gold immunochromatography assay [J]. *Apicula China*, 2019, 70(5): 68-72.
- [15] 张沪文, 余婉松, 夏苏捷, 等. 基于表面增强拉曼光谱的养殖水中五氯酚残留检测 [J/OL]. *食品与机械*, [2019-12-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20191106.1539.005.html>.
Zhang LW, Yu WS, Xia SJ, *et al.* Detection of pentachlorophenol in fishery water using surface-enhanced Raman spectroscopy [J/OL]. *Food Mach*, [2019-12-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1183.TS.20191106.1539.005.html>.
- [16] 崔乃元, 赵义良, 马立才, 等. 水产品中氯霉素时间分辨荧光免疫层析定量检测方法的研究 [J/OL]. *食品与发酵工业*, [2019-12-17]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022043>.
Cui NY, Zhao YL, Ma LC, *et al.* Quantitative determination of chloramphenicol in aquatic products by timeresolved fluorescence immunochromatography [J/OL]. *Food Ferm Ind*, [2019-12-17]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.022043>.
- [17] Daniel BA, Tatiana SMF, Hélio ON, *et al.* Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade [J]. *Food Chem*, 2019, 298: 124958.
- [18] Álvaro SM, Bárbara SR, Antonio VHH, *et al.* Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis [J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2019, 116: 214-235.
- [19] Herbert M, Luke C, Vusumzi EP, *et al.* Recent developments and

applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis [J]. *J Food Compos Anal*, 2019, 84: 103314.

- [20] Rosa P, Pedro S, Priscilla PF, *et al.* QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1070: 1–28.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



赵浩军, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。

E-mail: 962721345@qq.com