

超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 氯霉素类兽药残留量

陆春胜, 马 莉, 张学博, 郁爱萍*

(上海市崇明食品药品检验所, 上海 202150)

摘 要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考 3 种氯霉素类兽药残留量的分析方法。**方法** 样品用氨化乙酸乙酯超声提取, 提取液蒸干后用水复溶, 采用电喷雾离子化, 负离子扫描和多反应监测模式(multi reaction monitor, MRM)检测, 以保留时间和特征离子对定性, 外标法定量。**结果** 氯霉素和氟苯尼考在 0.05~1.50 ng/mL, 甲砒霉素在 0.25~7.50 ng/mL 的范围内呈现良好的线性关系, 相关系数(r)均大于 0.99; 方法检出限为 0.1~0.5 $\mu\text{g/kg}$; 3 种氯霉素类药物添加水平为 0.1~5.0 $\mu\text{g/kg}$ 时, 平均回收率为 90.8%~108.2%, 相对标准偏差为 2.4%~9.8% ($n=6$)。**结论** 本方法样品前处理简单, 准确性、精密度和灵敏度均较好, 适用于猪肉中氯霉素类药物残留检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 猪肉; 氯霉素; 甲砒霉素; 氟苯尼考

Determination of chloramphenicol residues in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LU Chun-Sheng, MA Li, ZHANG Xue-Bo, YU Ai-Ping*

(Shanghai Chongming Institutes for Food and Drug Control, Shanghai 202150, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for the determination of 3 chloramphenicol compounds (chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol) in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with adding ammonia ethylacetate, and the extract was evaporated and re-dissolved with water. The target compounds were detected under ESI-and MRM mode, identified by retention time and the ration of characteristic ions, and quantified by external standard method. **Results** Chloramphenicol and florfenicol showed a good linearity in the range of 0.05 ng/mL to 1.50 ng/mL and thiamphenicol was in the range of 0.25 ng/mL to 7.50 ng/mL. The correlation coefficients of the 3 compounds were above 0.99. The limit of detection was in the range from 0.1 $\mu\text{g/kg}$ to 0.5 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries of pork samples at spiked levels from 0.1 $\mu\text{g/kg}$ to 5.0 $\mu\text{g/kg}$ were between 90.8% and 108.2%, and the relative standard deviations ($n=6$) were between 2.4% and 9.8%. **Conclusion** This method is simple, accurate, precise and sensitive, and suitable for detecting chloramphenicol residue in pork.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; pork; chloramphenicol; thiamphenicol; florfenicol

*通讯作者: 郁爱萍, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量检测。E-mail: fenglingcaomei@163.com

*Corresponding author: YU Ai-Ping, Responsible Pharmacist, Shanghai Chongming Institutes for Food and Drug Control, No.109, Binhong Road, Chongming District, Shanghai 202150, China. E-mail: fenglingcaomei@163.com

1 引 言

氯霉素类药物是一种广谱抗生素, 因其稳定不易分解, 曾被广泛应用于动物细菌性疾病的临床治疗。但氯霉素对人体伤害较大, 由于氯霉素可透过胎盘屏障, 对早产儿和足月产新生儿可能引起毒性反应, 儿童由于肝脏酶系统未发育成熟, 肾脏排泄功能差, 药物自肾排泄较成人缓慢, 故氯霉素易引起“灰婴综合征”, 老年人组织器官大多退化, 功能减退, 自身免疫功能亦降低, 氯霉素可致严重不良反应^[1-10]。甲矾霉素是将氯霉素分子中的对硝基取代为甲磺酰基, 其抗菌谱与氯霉素基本相同, 但毒性降低, 氟苯尼考是甲矾霉素的衍生物^[11-13]。我国农业部第 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》中规定, 氯霉素在猪肉中不得检出, 甲矾霉素在猪肉中的残留量为 50 μg/kg, 氟苯尼考为 300 μg/kg^[14]。目前氯霉素类药物残留量的检测主要有气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱联用法等^[15,16], 质谱法有定性准确, 检出浓度低等优点, 但 2 种方法均采用内标法定量, 且气相色谱-质谱法需进行衍生化, 操作繁琐。本研究建立液相色谱-质谱联用法测定猪肉中的氯霉素类药物残留量, 采用外标法定量, 无需加入内标, 以期节约测定时间和成本, 为猪肉中农药残留的检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 试剂、仪器与材料

1290 UHPLC 6470 QQQ 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Agilent Technology 公司); ST 8R 冷冻离心机、LP Vortex Mixer 涡旋振荡仪(美国 Thermo Fisher 公司); MS205DU 十万分之一电子天平、PL2002 百分之一电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); Ultrasonic Cleaner 超声仪(上海科导超声仪器有限公司); 旋转蒸发器(瑞士 BUCHI 公司); ULTRA TURRAX 高速匀浆机(德国 IKA 公司)。

乙酸乙酯、甲醇(HPLC, 德国 CNW 公司); 氨水(28%~30%)(GR, 德国 CNW 公司); 无水硫酸钠(GR, 国药集团化学试剂有限公司); 实验用水为 Thermo Fisher GEN PURE PRO 制备的超纯水。

氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考标准品(纯度均大于 98.8%, 德国 Dr.E 公司)。

实验用猪肉为市售。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

精密称取氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考 5.0 mg, 置于 50 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 得最终浓度为 100 μg/mL 的标准储备液。临用前用水稀释至所需浓度的标准溶液。

2.2.2 仪器条件

(1) 色谱条件

流动相: 甲醇: 水=40:60(体积比); 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μL; 色谱柱: Agilent ZROBAX-XDB C₁₈ (3 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 35 °C。

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 负离子扫描(ESI⁻); 监测方式: 多反应监测; 离子源电压: 3.5 kV; 雾化气压力: 45 psi; 干燥气流量: 5 L/min; 干燥气温度: 300 °C; 鞘气流量: 11 L/min; 鞘气温度: 250 °C; 离子对、Fragmentor 电压及碰撞能详见表 1。

表 1 目标化合物主要质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of the target compounds

化合物名称	离子对	电压/V	碰撞能/V
氯霉素	321.0/152.0*	110	17
	321.0/257.0		9
甲矾霉素	354.0/185.0*	120	21
	354.0/290.0		9
氟苯尼考	356.0/336.0*	100	5
	356.0/185.0		17

备注: *表示定量离子。

2.2.3 样品处理

取猪肉 1 kg, 去皮, 绞碎, 5000 r/min 匀浆 1 min, 称取已匀浆试样(5.00±0.05) g, 置 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 3 g 无水硫酸钠, 乙酸乙酯 10.0 mL, 氨水(28%~30%)0.3 mL, 涡旋 2 min, 超声处理(40 kHz)5 min, 以 4500 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 mL 至 25 mL 鸡心瓶中, 45 °C 旋转蒸发至干。残渣加入正己烷 3 mL, 涡旋 20 s, 再加入水 2 mL, 涡旋 1 min, 静置分层, 取下层溶液过 0.22 μm 滤膜后, 供液相色谱-串联质谱测定。

2.2.4 线性关系分析

取一定量的氯霉素、甲矾霉素和氟苯尼考标准储备液, 用水配制成含氯霉素和氟苯尼考各 0.05、0.15、0.25、0.50、1.00、1.50 ng/mL, 含甲矾霉素 0.25、0.75、1.25、2.50、5.00、7.50 ng/mL 的混合标准工作溶液。分别进样测定峰面积, 以标准溶液中氯霉素类药物的浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算标准曲线方程和相关系数。

2.2.5 氨水影响试验

取分别添加氯霉素和氟苯尼考浓度为 1.0 μg/kg, 甲矾霉素浓度为 5.0 μg/kg 的已匀浆试样, 改变加入氨水(28%~30%)的量, 分别加入氨水(28%~30%) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mL, 其余按照样品处理制备加标样品溶液, 每个添加量同法处理 3 份, 测定定量离子平均峰面积。

2.2.6 回收率和精密度试验

样品中添加 3 个不同浓度的标准溶液, 添加氯霉素和氟苯尼考浓度分别为 0.1、0.3、1.0 μg/kg; 添加甲磺霉素浓度分别为 0.5、1.5、5.0 μg/kg。每个浓度设 6 个平行, 按照样品处理制备加标样品溶液, 计算加标回收率及相对标准偏差。

2.2.7 稳定性试验

取添加量为氯霉素和氟苯尼考 1.0 μg/kg, 甲磺霉素 5.0 μg/kg 的加标样品溶液, 10 °C 下保存, 分别在 0、4、8、24 h 进样分析, 记录定量离子峰面积, 计算不同时间进样结果峰面积相对标准偏差。

2.2.8 灵敏度试验

取一定量的标准储备液添加到空白样品中, 制成空白添加样品, 经处理后用液相色谱-串联质谱测定, 以 3 倍信噪比(S/N)对应的浓度为检出限。

3 结果与分析

3.1 标准曲线

氯霉素和氟苯尼考在 0.05~1.50 ng/mL, 甲磺霉素在 0.25~7.50 ng/mL 的范围内呈现良好的线性关系, 结果见表 2。

表 2 标准曲线和相关系数
Table 2 Standard curve and related coefficient

化合物名称	标准曲线方程	相关系数(r)
氯霉素	$Y=5295.004X+3.42965$	0.99946
甲磺霉素	$Y=1027.931X+44.0091$	0.99893
氟苯尼考	$Y=8417.653X+44.6236$	0.99987

3.2 氨水影响实验结果

结果表明, 改变氨水(28%~30%)添加量时, 对氯霉素类药物提取有较大影响。根据实验结果, 采用添加 0.3 mL 氨水(28%~30%)作为样品提取液时, 甲磺霉素提取效率最高, 采用添加 0.3 mL 或 0.4 mL 氨水(28%~30%)作为样品提取液时, 氯霉素和氟苯尼考提取效率高, 但无明显差异, 故本研究采用添加 0.3 mL 氨水(28%~30%)作为样品提取液。氨水添加量与提取氯霉素类药物的峰面积关系见图 1。

3.3 回收率和精密度结果

实验结果表明, 在空白猪肉样品中 3 种氯霉素类药物添加水平为 0.1~5.0 μg/kg 时, 平均回收率为 90.8%~108.2%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.4%~9.8%(n=6), 回收率和精密度结果均较好。回收率和精密度结果见表 3。样品中 3 种氯霉素类药物的定量离子流图见图 2。

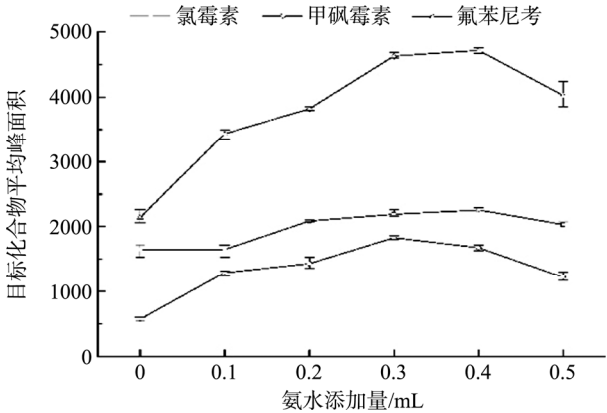


图 1 氨水添加量与提取氯霉素类药物的峰面积关系图(n=3)
Fig.1 Peak areas of the chloramphenicol drugs with different adding ammonia (n=3)

表 3 氯霉素、甲磺霉素、氟苯尼考回收率和精密度(n=6)
Table 3 Recoveries and precision of chloramphenicol, methylsulfamphenicol, flubenicol (n=6)

化合物名称	添加量/(μg/kg)	回收率/%	相对标准偏差/%
氯霉素	0.1	101.1	3.3
	0.3	95.1	2.8
	1.0	94.8	5.2
	0.5	95.2	3.3
甲磺霉素	1.5	108.2	9.8
	5.0	101.6	2.4
	0.1	90.8	7.3
氟苯尼考	0.3	104.2	4.7
	1.0	103.2	5.3

3.4 稳定性实验结果

加标样品在 10 °C 下保存, 不同时间进样分析, 氯霉素定量离子峰面积 RSD 为 1.3%, 甲磺霉素定量离子峰面积 RSD 为 2.0%, 氟苯尼考定量离子峰面积 RSD 为 1.6%, 3 种氯霉素类化合物定量离子峰面积在 24 小时内 RSD 均小于 2%, 满足食品检测方法确认技术要求中在该添加水平下的精密度要求^[17]。结果表明, 供试品溶液置于 10 °C 下, 在 24 h 内基本稳定。不同进样时间化合物平均峰面积相对标准偏差见表 4。

3.5 灵敏度实验结果

按 3 倍信噪比(S/N)对应的空白基质中加标浓度水平为检出限, 氯霉素和氟苯尼考的检出限为 0.1 μg/kg, 甲磺霉素的检出限为 0.5 μg/kg。

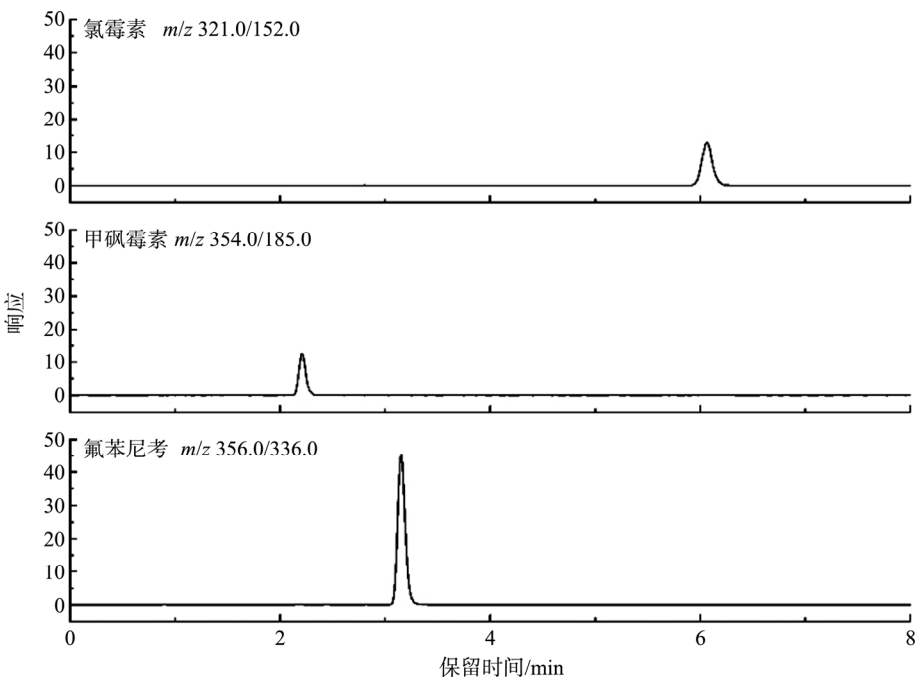


图 2 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考定量离子流图
Fig.2 Quantitative extract ion chromatography of the chloramphenicol drugs

化合物名称	不同进样时间化合物平均峰面积 (n=2)				峰面积相对标准偏差 RSD/%
	0 h	4 h	8 h	24 h	
氯霉素	1833	1840	1811	1791	1.3
甲砒霉素	1497	1508	1455	1452	2.0
氟苯尼考	4421	4410	4387	4276	1.6

4 结 论

研究结果表明, 3 种氯霉素类化合物线性关系良好, 3 个添加水平下的回收率、精密度较好, 符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》^[17]检测方法确认的技术要求。本方法操作简便, 方法检出限低, 采用外标法定量, 无需加入内标, 节约时间和成本, 样品提取液稳定, 适用于猪肉中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的检测, 满足一般实验室检测要求。

参考文献

[1] 罗昭军, 陈幸, 单乃荣. 高效液相色谱法检测鸡蛋中氯霉素类药物残留[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(3): 72-74.
Luo ZJ, Chen X, Shan NR. Determination of chloramphenicol drugs in eggs by UPLC [J]. Chin Abst Anim Husb Veter Med, 2018, 34(3): 72-74.
[2] 赵飞. 固相萃取-超高效液相色谱-串联四级杆质谱检测水产品中氯霉

素类药物残留[J]. 山东化工, 2016, 45(20): 86-89.
Zhao F. Determination of chloramphenicol drugs in sea food by SPE-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Shandong Chem Ind, 2016, 45(20): 86-89.
[3] Vasiliy A, Anton K. A simple sample preparation for simultaneous determination of chloramphenicol and its succinate esters in food products using high-performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry [J]. Food Addit Contam A, 2017, 34(2): 211-217.
[4] 管祖东, 吕小玲, 李文迹, 等. 液相色谱串联质谱法在检测鸡肉和鸡蛋中氯霉素残留的应用[J]. 福建畜牧兽医, 2015, 37(2): 28-30.
Guan ZD, Lv XL, Li WJ, et al. Determination of the residues of chloramphenicols in chicken and eggs by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Fujian J Anim Husb Veter Med, 2015, 37(2): 28-30.
[5] 陆苑, 伍萍, 杨淑婷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中氯霉素和五种磺胺类药物的残留量[J]. 食品工业科技, 2017, 38(24): 259-263.
Lu Y, Wu P, Yang ST, et al. Determination of residues of chloramphenicol and five sulfonamides in pork by ultra-high liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2017, 38(24): 259-263.
[6] 宗万里, 鲁刚. 基于液相色谱-串联质谱法的鱼肉中氯霉素残留量测定[J]. 成都大学学报(自然科学版), 2016, 35(1): 27-29.
Zong WL, Lu G. Determination of chloramphenicol residue in fish meat by LC-MS/MS [J]. J Chengdu Univ (Nat Sci Ed), 2016, 35(1): 27-29.
[7] 宗万里. 同位素内标-液相色谱-串联质谱法测定鱿鱼丝中氯霉素[J]. 生命科学仪器, 2015, 13(6): 42-45.
Zong WL. Determination of chloramphenicol residue in shredded squid by isotope internal standard-LC-MS/MS [J]. Life Sci Inst, 2015, 13(6): 42-45.

- [8] 王浩, 赵丽, 杨红梅, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 35 种四环素、磺胺类、青霉素类、大环内酯类、氯霉素类抗生素残留[J]. 色谱, 2015, 35(9): 995-1001.
- Wang H, Zhao L, Yang HM, *et al.* Determination of 35 antibiotic residues of tetracyclines, sulfonamides, penicillins, macrolides and amphenicols in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2015, 35(9): 995-1001.
- [9] 孙雷, 张骊, 王树槐, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测动物源食品中氯霉素类药物及其代谢物残留[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(3): 42-45.
- Sun L, Zhang L, Wang SH, *et al.* A detection of chloramphenicol and chloramphenicol metabolites in food by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Veter Drug*, 2009, 43(3): 42-45.
- [10] 舒顺顺, 米倩, 杨彩霞, 等. 液相质谱法同时检测猪肉中氯霉素和地塞米松[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 186-190.
- Shu SS, Mi Q, Yang CX, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol and dexamethasone residues in pork by liquid phase mass spectrometry [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(5): 186-190.
- [11] 刘文卫, 钮伟民, 许伟芳. 氯霉素残留检测技术的研究进展[J]. 现代预防医学, 2007, (1): 67-68, 75.
- Liu WW, Niu WM, Xu WF, Advances in detection of chloramphenicol residue [J]. *Mod Pre Med*, 2007, (1): 67-68, 75.
- [12] 权伍英, 栾燕, 陈笑艳. 液液萃取-液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中的氯霉素[J]. 分析测试学报, 2015, 24(5): 166-167.
- Quan WY, Luan Y, Chen XY. Determination of chloramphenicol residues in honey by liquid-liquid extraction/liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Inst Anal*, 2015, 24(5): 166-167.
- [13] 曾勇, 董文婷, 龚波, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定禽蛋中氯霉素、氟苯尼考及其代谢物残留[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(12): 42-46.
- Zeng Y, Dong WT, Gong B, *et al.* Rapid determination of chloramphenicol, florfenicol and its metabolites in poultry eggs by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Veter Drug*, 2017, 51(12): 42-46.
- [14] 农业部第 235 号公告-2002 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
- The agriculture department announcement no. 235-2002 maximum residue limit for veterinary drug in animal-original food [S].
- [15] 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 florfenicol residues in edible animal muscles, liver and aquatic products LC-MS-MS method [S].
- [16] GB/T 22338-2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量的测定[S].
- GB/T 22338-2008 Determination of multi-residues of chloramphenicols in animal-original food [S].
- [17] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检验[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

陆春胜, 检验技师, 主要研究方向为食品农产品质量检测。

E-mail: lu_chunsh@163.com

郁爱萍, 主管药师, 主要研究方向为食品药品质量检测。

E-mail: fenglingcaomei@163.com