

超高效液相色谱-串联质谱法测定乳饼中的氯霉素

马晓年, 梁志坚, 李 怡*

(昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228)

摘 要: 目的 建立一种超高效液相色谱-串联质谱法(ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测乳饼中氯霉素的分析方法。**方法** 样品经乙酸乙酯提取, 分析了分别经 C_{18} (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)及 MCS 固相萃取柱净化、富集的结果; 以乙腈-0.05%氨水为流动相, 经 C_{18} 色谱柱分离, 采用多反应检测负离子模式进行定性及定量分析。**结果** MSC 固相萃取柱具有较好的回收率, 氯霉素的方法检出限为 0.004 μ g/kg, 方法定量限为 0.01 μ g/kg, 在 0.10、0.50、1.00、10.00 ng 4 个加标水平下回收率分别为 76.4%、101%、62.4%、61.1%。**结论** 本方法灵敏度高、重复性好, 可满足乳饼样品中痕量氯霉素残留的测定。

关键词: 氯霉素; 固相萃取小柱; 超高效液相色谱-串联质谱法; 乳饼

Determination of chloramphenicol in rubing by ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry

MA Xiao-Nian, LIANG Zhi-Jian, LI Yi*

(Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China)

ABSTRACT: Objective To establish a analysis method for chloramphenicol in rubing with ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry. **Methods** The sample was extracted by ethyl acetate, then the results were analysed after C_{18} column and MCS cartridge purification. The objective compounds were separated using synchronis C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) with acetonitrile-water (0.05% ammonia) as mobile phase and analyzed by mass spectrometry in the negative electrospray ionization under multiple reaction monitoring mode (MRM). **Results** The results showed that MCS cartridge had good recovery rate. The detection limit of chloramphenicol was 0.004 μ g/kg, the limit of quantitation was 0.01 μ g/kg, the average recoveries for spiked levels of 0.10, 0.50, 1.00, 10.00 μ g/kg were 76.4%, 101%, 62.4%, 61.1%, respectively. **Conclusion** This method is sensitive and repeatable, which is suitable for the detection of chloramphenicol residual in rubing.

KEY WORDS: chloramphenicol; solid phase extraction column; ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; rubing

基金项目: 昆明市卫生人才科技人才培养项目(2017-sw(后备)-66)

Fund: Supported by the Health Talents and Technology Talents Training Project of Kunming (2017-sw(Reserve)-66)

*通讯作者: 李怡, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为理化分析。E-mail: 1609064931@qq.com

*Corresponding author: LI Yi, Master, Associate Chief Technician, Kunming Center for Disease Control and Prevention, No.4, Ziyun Road, Kunming 650228, China. E-mail: 1609064931@qq.com

1 引言

乳饼是云南省 3 大民族特色乳制品(乳饼、乳扇、酥油)之一,在云南已有 500 多年的历史^[1],主要产于昆明路南彝族地区、大理白族地区剑川县、洱源县、鹤庆县。乳饼由牛奶或山羊奶制成,呈白色块状,酷似豆腐,故又叫奶豆腐,已逐渐成为云南省的特色优势食品产业,广受大家喜爱^[2]。但由于奶牛饲养过程中,对泌乳期奶牛用药不当、违反国家规定把抗生素作为奶牛饲料添加剂使用、未经彻底清洗和消毒患病奶牛使用过的挤奶工具及贮奶设备、高温季节掺杂抗生素防止奶酸败等原因,造成乳饼原材料—奶抗生素污染^[3,4]。奶中的抗生素残留主要以氯霉素为主,氯霉素(chloramphenicol, CAP)属广谱抗生素,能抑制细菌蛋白质的形成,广泛用于动物各种传染性疾病的治疗,特别是用于奶牛乳腺炎的治疗,从而易使奶及奶制品中存在氯霉素残留。由于氯霉素可引起再生障碍性贫血和粒状白细胞缺乏症等疾病^[5],1999 年 9 月 13 日中华人民共和国农业部发布了《动物性食品中兽药最高残留限量》^[6]的通知,规定了氯霉素在所有食品动物的可食用组织不得检出。

目前,氯霉素主要通过固相萃取小柱进行前处理的提取、净化^[7,8],测定方法有气相色谱法^[9,10]、液相色谱法^[11,12]、液相色谱-串联质谱法^[13-17]。而乳饼中氯霉素的测定鲜见报道,本研究对比了 C₁₈、MCS 2 种固相萃取小柱的提取效果,通过研究小柱对氯霉素标准的保留能力选出其中的优势小柱 MCS。MCS 固相萃取小柱的填料为 SILICA+阳离子交换树脂,当样品提取液通过小柱时,由于填料与氯霉素之间较强的作用力,氯霉素被保留在 SPE 小柱上,其他组分则流出小柱。再用甲醇为洗脱剂将氯霉素洗脱下来从而实现乳饼中氯霉素的分离、纯化及富集。本文研究了 MCS 固相萃取小柱对样品的净化效果,以期为乳饼中氯霉素的测定提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

QTRAP 4500 质谱分析仪(美国 AB SCIEX 公司); Agilent 1290 高效液相色谱仪(美国安捷伦科技公司); 3H16R1 型智能台式高速冷冻离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); SHZ-82S 振荡器(常州金坛恒丰仪器制造有限公司); RV10 旋转蒸发仪(德国 IKA 公司); Auto EVA-30 氮吹仪(美国 Reeko 公司); BS 223 S 电子天平(0~220 g, d=0.001 g, 德国 Sartorius 集团); VM-30 涡旋振荡器(韩国大韩公司); Cleanert MCS-SPE 固相萃取小柱、Cleanert S C₁₈-SPE 固相萃取小柱(上海 Agela Technologies, 500 mg/6 mL)。

乳饼: 购于昆明农贸市场; 氯霉素、氯霉素-D5 (100 μg/mL, 不确定度 3%(k=2), 坛墨质检-国家标准物质中心);

甲醇、乙酸乙酯(色谱纯, 美国 JT Baker 公司); 氯化钠(分析纯, 重庆东方试剂厂); 正己烷、氨水(分析纯, 天津市风船化学试剂科技有限公司); 实验用水为 Milli-Q 超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 标准溶液配制

准确量取氯霉素标准溶液 25 μL, 用甲醇稀释并定容至 100 mL, 得到 25.00 ng/mL 的氯霉素应用液。准确量取氯霉素-D5 标准溶液 20 μL, 用甲醇稀释并定容至 100 mL, 得到 20.00 ng/mL 的氯霉素-D5 应用液。标准应用液均于 4 °C 条件下保存。

2.2.2 样品的提取

取 10 g(精确至 0.01g)均质好的乳饼样品于 50 mL 离心管中, 加氯霉素-D5 标准应用液 100 μL, 再加乙酸乙酯 20 mL, 振荡 15 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取乙酸乙酯层于鸡心瓶中。再加 20 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并 2 次提取液, 于 40 °C 水浴旋转蒸发至干。用 5 mL 4%氯化钠溶液溶解残留物, 加 5 mL 正己烷振荡混合 1 min, 静置分层, 弃去正己烷。再加正己烷 5 mL, 重复提取 1 次, 取下层液备用。

2.2.3 样品的净化

C₁₈ 及 MCS 小柱依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化, 取备用液分别过 C₁₈ 及 MCS 固相萃取小柱, 用 5 mL 水淋洗抽干, 再用 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液于 40 °C 下氮气吹干。用 1.0 mL 甲醇溶解残留物, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 滤膜, 供超高效液相-串联质谱(ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定。

2.2.4 仪器条件

(1) 色谱条件

Synchronis C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A: 0.05%氨水, 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序见表 1; 流速: 0.40 mL/min, 分析时间: 5 min, 进样体积: 5 μL, 柱温: 30 °C。

表 1 流动相梯度洗脱
Table 1 Mobile phase gradient elution

时间/min	乙腈/%	0.05%氨水/%
0	10	90
0.5	10	90
2.0	90	10
3.0	90	10
3.5	10	90
5.0	10	90

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ion source, ESI-); 扫描方式: 负离子模式; 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 电离电压: 4.0 kV; 离子源温度: 500 ℃; 喷雾器压力: 50 psi; 辅助加热气: 50 psi; 气帘气压力: 35 psi; 其他参数见表 2。

表 2 各化合物质谱参数				
Table 2 Mass spectrum parameters of various compounds				
化合物名称	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	去簇电压/V	碰撞电压/V
氯霉素	320.9	152.0*	70	23
		256.9	70	16
氯霉素-D5	325.9	157.0*	70	25
		262.0	70	16

注: *表示定量离子。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

根据待测物的性质, 使用氯霉素及氯霉素-D5 标准应用液在 ESI-模式下分别进行质谱条件优化。选择每种药物响应强度最高的 *m/z* 值作为母离子, 进行子离子扫描, 并优化去簇电压和碰撞电压。并在 MRM 模式下优化了气帘气、离子源温度、喷雾气、辅助加热气。

3.2 色谱条件优化

本研究选择了 Hypersll GOLD 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm), Synchronis C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 发现采用 Hypersll GOLD 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.9 μm)分离时, 色谱峰展宽, 响应值偏低。采用 Synchronis C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离时, 色谱峰得到较大改善, 峰形收窄, 响应增高, 基线噪音降低, 实现更低检出限。

本研究选择流动相时考虑到是 ESI-模式, 所以使用了 0.05%氨水及具有改善峰形作用的乙腈。低流速时, 峰形展宽、拖尾, 综合分离效果及柱压等因素, 最终选择 0.4 mL/min 流速。图 1 为 1.00 ng/mL 的氯霉素标准溶液 MRM 谱图。

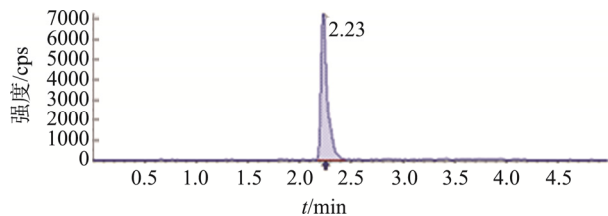


图 1 氯霉素标准 MRM 谱图
Fig.1 Multiple reaction monitoring chromatogram of chloramphenicol

3.3 提取溶剂的选择

氯霉素微溶于水, 易溶于乙酸乙酯、甲醇、乙腈等有机溶剂。测定牛奶中的氯霉素常用方法为用乙腈或乙酸乙酯提取^[11]。其中, 乙腈毒性大, 且在挥干时耗时长; 甲醇的极性比较大, 且提取液含杂质较多; 而乙酸乙酯偏中性, 提取液含杂质较少, 提取效率高, 毒性小, 容易挥干。本研究采用乙酸乙酯作为提取溶剂可以最大限度的从乳饼中提取出有效成分并使共萃取的干扰物较少^[18]。

3.4 固相萃取小柱的选择

本研究进行了 0.10、0.50、2.50、10.00 ng 4 个水平的加标回收实验, 比较了 C₁₈ 及 MCS 2 种固相萃取小柱对氯霉素的保留能力。结果表明 MCS 固相萃取小柱 4 个水平的回收均实现 75%以上, 而 C₁₈ 固相萃取小柱在低水平回收实验中效果不佳, 回收率低于 50%。实验结果见表 3, 故实验最终选择 MCS 固相萃取小柱进行样品净化。

表 3 2 种固相萃取柱的回收率				
Table 3 Recovery rate of two kinds of SPE				
加标量/ng	C ₁₈		MCS	
	实测值/ng	回收率/%	实测值/ng	回收率/%
0.10	0.0454	45.4	0.0887	88.7
0.50	0.427	85.4	0.386	77.2
2.50	1.52	60.8	2.04	81.6
10.00	8.92	89.2	7.61	76.1

3.5 标准曲线、检出限与定量限

用甲醇将氯霉素-D5 及氯霉素标准应用液制备成含氯霉素-D5 2.00 ng/mL, 含氯霉素分别为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.50、5.00、10.00 ng/mL 的标准工作溶液, 在确定的分析条件下进行测定, 以标准溶液质量浓度为横坐标, 氯霉素与氯霉素-D5 响应值之比为纵坐标绘制标准曲线, 得到的线性方程、相关系数及检出限见表 4, 方法定量限为 0.01 μg/kg。

表 4 氯霉素的线性方程、相关系数、检出限			
Table 4 Linear equation, correlation coefficient, limit of chloramphenicol			
化合物	工作曲线	相关系数 <i>r</i>	方法检出限/(μg/kg)
氯霉素	$Y=38259.6X+436.0$	0.9992	0.004

3.6 精密度及准确度

取不含氯霉素的乳饼样品过 MCS 固相萃取小柱进行

加标回收率实验, 结果见表 5。由表中可见, MCS 固相萃取小柱在 4 个水平的加标回收率均能达到 61.1%以上。结合上述固相萃取小柱回收试验, 说明 MCS 固相萃取小柱有更良好的准确性, 适宜于乳饼中氯霉素残留的痕量测定。图 2 为乳饼样品添加氯霉素的 MRM 谱图。

表 5 氯霉素在不同加标水平下的加标回收率及相对标准偏差 (n=3)

Table 5 Recovery rates and relative standard deviations of chloramphenicol at different spiked levels (n=3)

目标物	加标水平/ng	实测值/ng	回收率/%	RSD/%
氯霉素	0.10	0.0764	76.4	9.6
	0.50	0.505	101.0	5.9
	1.00	0.624	62.4	5.5
	10.0	6.110	61.1	6.9

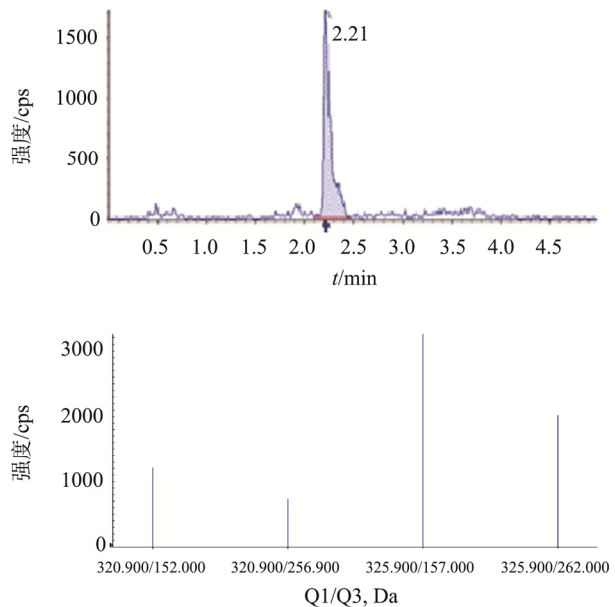


图 2 加标样品谱图

Fig.2 chromatogram of spiked sample

4 结论与讨论

建立了乳饼中氯霉素残留测定的 UPLC-MS/MS 法。通过对 C₁₈ 及 MCS 固相萃取柱的试验效果比对, 发现 MCS 固相萃取小柱损失小, 回收率在 61.1%~101%之间, 检出限为 0.004 μg/kg, 定量限为 0.01 μg/kg, 能够满足食品安全风险监测的要求, 且较于国标方法(GB 29688-2013 牛奶中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法)有更高灵敏度及准确度, 在乳饼中氯霉素残留痕量检测上具有更大优势, 适合用于大批次样品筛查检验。

参考文献

[1] 王磊. 中国奶酪——乳饼[J]. 食品与健康, 2011, (2): 34-35.

Wang L. Chinese cheese-Rubing [J]. Food Health, 2011, (2): 34-35.

[2] 张亚丽, 杨璐莹, 吴文君, 等. 云南省特色乳制品——乳饼质量指标探讨[J]. 中国乳品工业, 2014, 42(7): 42-44, 48.

Zhang YL, Yang LY, Wu WJ, *et al.* Discussion on quality standard of Yunnan milk products-Rubing [J]. Chin Dairy Ind, 2014, 42(7): 42-44, 48.

[3] 韩荣伟, 王加启, 郑楠, 等. 牛奶质量安全主要风险因子分析III. 兽药残留[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(4): 1-10.

Han RW, Wang JQ, Zheng N, *et al.* Main risk factor analysis for milk quality and safety III. veterinary drug residues [J]. Chin Anim Hus Veter Med, 2012, 39(4): 1-10.

[4] 冯云霞, 王亦欣. 牛奶中兽药残留的原因分析及控制措施[J]. 中国动物保健, 2016, 18(11): 35-36.

Feng YX, Wang YX. Cause analysis and control measures of veterinary drug residues in milk [J]. China Anim Health Care, 2016, 18(11): 35-36.

[5] Berlina AN, Taranova NA, Zherdev AV, *et al.* Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk [J]. Anal Bioanal Chem, 2013, 405(14): 4997-5000.

[6] 中华人民共和国公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[Z]. Bulletin NO.235, Ministry of Agriculture of People's Republic China. Maximum residue limits of veterinary drugs in animal food [Z].

[7] 仲伶俐, 郭灵安, 毛建霏, 等. UPLC-MS/MS 法同时测定牛奶中替米考星、地塞米松、氟苯尼考和氯霉素残留[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(9): 2645-2652.

Zhong LL, Guo LA, Mao JF, *et al.* Simultaneous determination of tilmicosin, dexamethasone, florfenicol and chloramphenicol residue in milk by UPLC-MS/MS method [J]. Chin Anim Husband Vet Med, 2018, 45(9): 2645-2652.

[8] 谢孟峡, 刘媛, 邱月明, 等. 固相萃取-气相色谱质谱测定动物组织中氯霉素的残留量[J]. 分析化学研究报告, 2005, 33(1): 1-4.

Xie MX, Liu Y, Qiu YM, *et al.* Determination of chloramphenicol residue in animal tissues by solid phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(1): 1-4.

[9] 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 JW, Huang ZJ, Chen MJ, *et al.* Rapid determination of pesticide and veterinary drug residues in aquatic products by gas chromatography-electro capture detector [J]. Phys Test Chem Anal Part B, 2018, 54(9): 1015-1019.

[10] 郭军, 王文兰, 赵全东, 等. 气相色谱法测定水产品中氯霉素残留的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(23): 6216-6220.

Guo J, Wang WL, Zhao QD, *et al.* Uncertainty evaluation for the determination of chloramphenicol residue in aquatic products by gas chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(23): 6216-6220.

[11] 姚佳, 王昕, 张建新, 等. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素和玉米赤霉醇及其类似物[J]. 食品科学, 2014, 35(18): 124-127.

Yao J, Wang X, Zhang JX, *et al.* Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, zearalanol and its analogs in milk by high performance liquid chromatography with immunoaffinity column [J]. Food Sci, 2014, 35(18): 124-127.

[12] 罗文婷, 吴青, 简伟明, 等. 超高效液相色谱法测定水产品中违禁兽药氯霉素、呋喃唑酮和甲硝唑残留[J]. 分析化学研究简报, 2009, 37(6): 877-880.

- Luo WT, Wu Q, Jian WM, *et al.* Simultaneous determination of illegal veterinary drugs of chloramphenicol, furazolidone and metronidazole in aquatic product using ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2009, 37(6): 877–880.
- [13] 王浩, 赵丽, 杨红梅, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 35 种四环素类、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, 33(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, 33(9): 995–1001.
- [14] 马晓年, 张秀清, 陈俊秀, 等. 云南省市售蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留检测结果分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(14): 3665–3669.
- Ma XN, Zhang XQ, Chen JX, *et al.* Analysis of chloramphenicol and metronidazole residues in honey of Yunnan province [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(14): 3665–3669.
- [15] 马晓年, 段海波, 李文廷, 等. 超高效液相色谱串联三重四级杆质谱测定蜂蜜中氯霉素残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3898–3902.
- Ma XN, Duan HB, Li WT, *et al.* Determination of chloramphenicol residue in honey by ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(10): 3898–3902.
- [16] 2019 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[Z].
- 2019 National handbook on risk monitoring of food pollution and harmful factors [Z].
- [17] GB 29688-2013 牛奶中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法 [S].
- GB 29688-2013 Determination of chloramphenicol residue in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method [S].
- [18] 许小友, 高平, 李洪波. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中氯霉素的两种前处理方法比较[J]. *畜牧与兽医*, 2019, 51(7): 51–54.
- Xu XY, Gao P, Li HB. Comparison of two preprocessing methods for determination of chloramphenicol in eggs using ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry [J]. *Anim Husband Vet Med*, 2019, 51(7): 51–54.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



马晓年, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为食品风险监测。

E-mail: 179267837@qq.com

李 怡, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为理化分析。

E-mail: 1609064931@qq.com