

超高效液相色谱串联质谱法测定液态奶中 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考含量

邹 淼, 冯 静, 陈 曦, 蒋 莹*

(辽宁省疾病预防控制中心, 沈阳 110005)

摘 要: 目的 建立超高效液相色谱串联质谱法测定液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的检测方法。

方法 样品经乙酸乙酯提取, 用 Oasis MCX 柱净化。然后用 WATERS ACQUITY UPLC BEH C18(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行分离, 采用同位素内标法定量。**结果** 在优化条件下, 该方法中氯霉素的最低检出限为 0.05 μg/kg, 定量限为 0.15 μg/kg, 甲砒霉素和氟苯尼考的最低检出限为 0.1 μg/kg, 定量限为 0.3 μg/kg, 平均回收率为 80.4%~105.4%, 相对标准偏差为 2.8%~8.4%。**结论** 该方法灵敏度高、回收率好, 具有良好的净化效果, 提升检测效率, 适用于液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的同时检测。

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

Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZOU Miao, FENG Jing, CHEN Xi, JIANG Ying*

(Center for Disease Control and Prevention of Liaoning Province, Shenyang 110005, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with ethyl acetate, followed by clean-up with Oasis MCX column, and then separated by WATERS ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm). Internal standard method was used to quantify. **Results** Under optimal conditions, the minimum detection limit of chloramphenicol was 0.05 g/kg, the quantitative limit was 0.15 g/kg, the minimum detection limits of thiamphenicol and florfenicol were 0.1 g/kg, and the quantitative limits were 0.3 g/kg. The average recoveries were 80.4%–105.4%, and the relative standard deviations were 2.8%–8.4%. **Conclusion** This method has high sensitivity, good recovery rate, good purification effect and improves the detection efficiency. It is suitable for the simultaneous detection of chloramphenicol, sulfoxycin and fluorophenicol in liquid milk.

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

*通讯作者: 蒋莹, 主管技师, 主要研究方向为食品成分分析及食品污染物风险监测。E-mail: florazi@126.com

*Corresponding author: JIANG Ying, Technician, Center for Disease Control and Prevention of Liaoning Province, No.242, Shayang Road, Heping District, Shenyang 110005, China. E-mail: florazi@126.com

1 引 言

氯霉素是一种广谱抗生素,属于酰胺醇类,在预防和治疗动物性疾病中广泛应用,但随后人们发现氯霉素的长期使用会扰乱内环境平衡,导致菌群失调,甚至抑制骨髓造血功能引起再生障碍性贫血和粒状白细胞缺乏等疾病^[1-3]。美国、日本和欧盟等许多国家都禁止在动物源性食品中检出氯霉素,我国农业部也把它列为违禁药物,禁止在动物源性食品中检出^[4]。甲砒霉素和氟苯尼考是氯霉素的衍生物,亦属酰胺醇类,因其对血液系统的毒性相对于氯霉素小,且抗菌谱与氯霉素相似,常作为氯霉素的替代品,目前已成为水产和畜禽病害防治的常用药,但仍然对动物胚胎有影响。根据我国食品安全国家标准,规定在牛、猪和鱼等可食性动物组织中甲砒霉素最高残留限量为 50 μg/kg,氟苯尼考则在牛、羊泌乳期禁用。因此,建立高效、准确的方法监测液态奶产品中氯霉素类药物残留具有重要意义。

现有的氯霉素类药物检测方法有酶联免疫法、气相色谱串联质谱法、高效液相色谱法和液相色谱串联质谱法等^[5-8]。超高效液相色谱串联质谱法具有分析速度快,分离度好,灵敏度高,可有效避免酶联免疫法出现假阳性现象,降低液相色谱法的检出限,避免基质干扰,可同时测定多种氯霉素类药物的优点,因而得到普遍应用^[9,10]。当前,关于氯霉素类药物检测的研究多应用于蜂蜜、肉类及水产品中,奶制品由于基质复杂,含有的兽药种类和性质差异大,前处理过程复杂等原因研究较少,且多为单一组分检测,很难满足液态奶中多组分氯霉素类药物的检测需求。本研究在液态奶的单一氯霉素类药物检测方法的基础上,通过乙酸乙酯提取,MCX 固相萃取柱净化,同位素内标法定量,降低液态奶中基质效应影响,提高选择性和灵敏度,建立超高效液相色谱串联质谱法同时测定液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的检测方法,以期满足日常检测及奶产品中兽药残留监测的要求。

2 材料与试剂

2.1 主要仪器与试剂

Acquity Xevo TQ 型超高效液相色谱串联质谱仪、Oasis MCX 固相萃取柱(150 mg, 6 mL)(美国沃特世公司); XcelVap 型氮吹仪(美国 Horizon technology 公司); ST16R 型台式高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔公司); Vortex genie2 型多用途漩涡混合器(美国 SI 公司); Vac Elut SPS 24 型固相萃取仪(美国安捷伦公司)。

5 种标准品: 氯霉素、D₅-氯霉素同位素、甲砒霉素、氟苯尼考(纯度≥99%, 德国 Dr.E 公司); D₃-氟苯尼考同位素(纯度≥98%, 加拿大 TRC 公司); 乙酸乙酯、乙腈、甲醇

(色谱纯, 美国赛默飞世尔公司); 水为超纯水。

2.2 实验方法

2.2.1 样品处理

称取样品 5.00 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 50 μL 1000 ng/mL D₅-氯霉素、D₃-氟苯尼考混合同位素内标工作液, 加入 20 mL 乙酸乙酯, 涡旋离心后, 吸取上层乙酸乙酯相 10 mL 于 10 mL 试管, 50 °C 氮气吹干后, 加入 0.1 mL 甲醇溶解, 再加入 1.9 mL 40 mmol/L 盐酸溶液, 涡旋混匀, 上清液待净化。依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水、5 mL 40 mmol/L 盐酸溶液活化平衡 MCX 固相萃取柱, 转移上清液至 MCX 柱内, 用 5 mL 水除杂, 抽干后, 5 mL 乙酸乙酯洗脱, 50 °C 氮气吹干后, 加入初始流动相复溶, 过 0.22 μm 滤膜上机测定。

2.2.2 标准溶液的配制

标准储备液: 分别准确称取适量的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考标准品, 分别用甲醇溶解配制浓度均为 0.1 mg/mL 的单标准储备液。分别准确称取适量 D₅-氯霉素同位素、D₃-氟苯尼考同位素, 分别用甲醇溶解配制浓度均为 0.1 mg/mL 的单标同位素标准储备液。

混合标准储备液: 分别准确移取适量的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考标准储备液于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制混合标准储备液, 浓度为 1 μg/mL。

混合同位素内标工作液: 分别准确移取适量 D₅-氯霉素同位素、D₃-氟苯尼考同位素标准储备液, 用甲醇定容, 配制混合同位素内标工作液, 浓度为 1 μg/mL。

空白样品提取液: 选取阴性样品, 按 2.2.1 样品处理操作, 得到空白样品提取液。

基质混合标准工作溶液: 根据每种标准品的灵敏度和线性范围, 移取一定量的混合标准储备液和混合同位素内标工作液, 用空白样品提取液配成系列浓度的基质混合标准工作溶液。

2.2.3 仪器条件

(1) 色谱条件

色 谱 柱: WATERS ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 流量: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL; 流动相: A: 乙腈, B: 0.05% 的氨水溶液, 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	A/%	B/%
0.0	10	90
0.5	10	90
2.0	90	10
3.0	90	10
3.5	10	90
5.0	10	90

2.2.4 质谱条件

电喷雾离子源: ESI, 扫描模式: 负离子, 离子源温度: 150 ℃, 毛细管电压: 3.0 kV, 脱溶剂气温度: 350 ℃; 脱溶剂气流量: 850 L/hr。氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考及内标物质谱参数见表 2。

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

本研究以乙腈:0.05%的氨水溶液(10:90, V:V)为流动相, 流速 0.3 mL/min, 待仪器稳定后, 注入 500 ng/mL 的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、D₅-氯霉素和 D₃-氟苯尼考的混合溶液, 在负离子模式下进行全扫描, 确定氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考、D₅-氯霉素和 D₃-氟苯尼考的分子离子分别为 321.0、354.0、356.2、326.0、359.3, 与文献报道的结果一致^[11-13]。以上述 5 种目标化合物的分子离子峰为母

离子, 进行子离子扫描, 同时对其质谱条件进行优化, 选取丰度最高且互不干扰的 2 个作为子离子, 其中丰度较高的作为定量离子, 另一个作为定性离子, 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考及内标物定量、定性离子参数见表 2。

3.2 色谱条件优化

氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考均易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂, 本文比较了以甲醇、乙腈为流动相时氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的峰形, 研究发现应用乙腈为流动相时, 目标化合物的峰形更好。负离子模式下水相中加入 0.05%的氨水, 能够显著提高目标化合物的离子化效率, 提升灵敏度。因此, 本文选取乙腈作为有机相, 0.05%的氨水溶液作为水相。在实际样品测定过程中, 由于基质复杂, 对目标化合物的离子化有不同程度的抑制, 等度洗脱很难实验要求, 故采用梯度洗脱方式。氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标的 MRM 色谱图见图 1。

表 2 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考及内标物的质谱参数
Table 2 Parameters of mass spectra of chloramphenicol, thiamphenicol , florfenicol and Internal standard

化合物	母离子	定量离子(锥孔电压/V、碰撞能量/eV)	定性离子(锥孔电压/V、碰撞能量/eV)
氯霉素	321.0	151.7(26、16)	256.9(26、12)
D ₅ -氯霉素	326.0	156.8(26、18)	-
氟苯尼考	356.2	336.2(24、8)	185.2(24、18)
D ₃ -氟苯尼考	359.3	339.3(26、8)	-
甲砒霉素	354.0	184.9(32、22)	290.0(32、12)

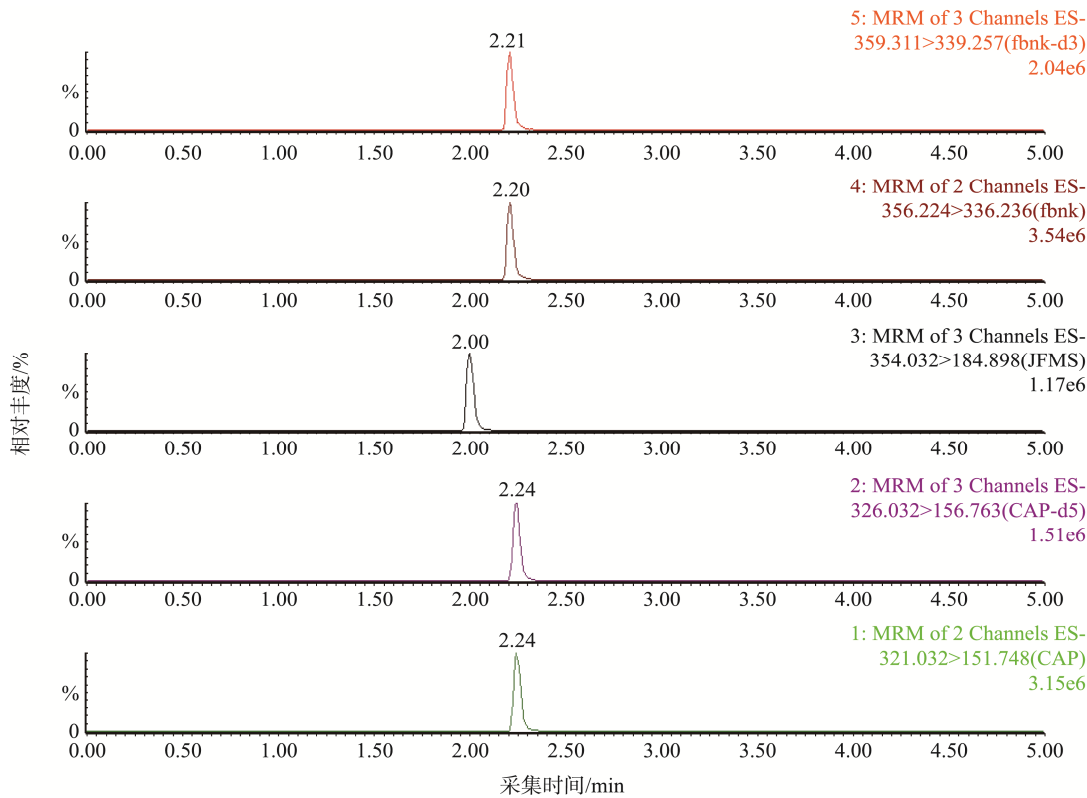


图 1 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及内标物的 MRM 提取离子流图

Fig.1 MRM Chromatogram of chloramphenicol, thiamphenicol, aflorfenicol and internal standard

3.3 前处理条件优化

液态奶中由于含有较多的蛋白质、磷脂等亲脂性成分, 给分析测定带来诸多干扰, 因此, 本实验在提取溶剂及固相萃取小柱的选择上进行了优化。氯霉素类药物的提取试剂有乙腈、丙酮、乙酸乙酯等^[14,15], 乙腈、丙酮虽然对氯霉素有良好的提取效果, 但是对甲砒霉素和氟苯尼考提取效率较低, 故而, 本文采用乙酸乙酯作为氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考同时提取的提取剂。对于固相萃取小柱, 本文对比了使用 MCX 固相萃取柱和 HLB 固相萃取小柱的绝对回收率, 见图 2, 实验结果表明, 对于液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的测定, MCX 固相萃取柱绝对回收率相对较好, 是样品前处理中净化的最佳选择。

3.4 内标物的选择

本实验根据氯霉素类药物的性质选取内标物, 氯霉素、甲砒霉素以 D₃-氯霉素为内标, 氟苯尼考以为 D₃-氟苯尼考内标, 实验表明, 上述 2 种同位素为内标时, 可获得准确可靠的实验结果。

3.5 线性范围和检出限

将系列浓度的基质混合标准工作溶液在本实验仪器条件下进行测定, 以目标化合物与相应同位素内标的峰面积比(Y)为纵坐标, 以各目标化合物的浓度(X)为横坐标, 进行线性回归, 以 3 倍信噪比对应的化合物含量作为方法检出限 LOD, 得到氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的回归方程、线性范围、相关系数、检出限及定量限见表 3。

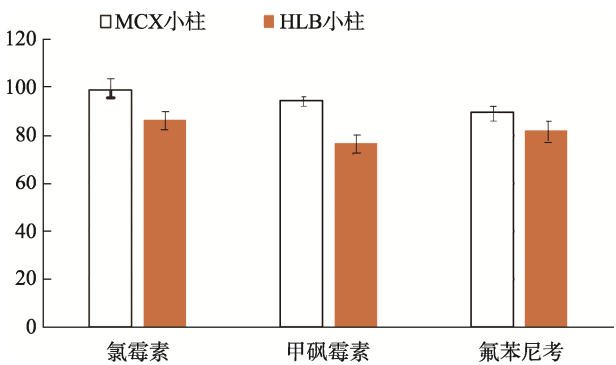


图2 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考在 MCX 和 HLB 固相萃取小柱上绝对回收率对比图(n=6)

Fig.2 Absolute recoveries of chloramphenicol, thiamphenicol and aflorfenicol on MCX and HLB columns(n=6)

3.6 回收率和相对标准偏差

称取 3 组液态奶阴性样品, 每组 6 份, 加入一定量的氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考混合标准溶液, 混匀, 静置, 使液态奶阴性样品与标准溶液充分混合, 然后按照本实验进行样品处理, 上机测定, 结果见表 4。氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的平均回收率为 80.4%~105.4%, 相对标准偏差为

2.8%~8.4%, 准确度和精密度均满足实际样品检测的要求。

表 3 氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的回归方程、线性范围、相关系数、检出限及定量限

Table 3 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients, detection limits and quantification limits of chloramphenicol, thiamphenicol and aflorfenicol					
化合物	回归方程	线性范围 (μg/L)	相关系数	检出限 (μg/kg)	定量限 (μg/kg)
氯霉素	$Y=0.0220776X-0.00157345$	0.5~50	0.9959	0.05	0.15
氟苯尼考	$Y=0.0161902X+0.204603$	1.0~100	0.9984	0.1	0.3
甲砒霉素	$Y=0.00509909X+0.0158448$	1.0~100	0.9961	0.1	0.3

表 4 加标样品回收率与相对标准偏差(n=6)

Table 4 Recoveries and relative standard deviations of spiked samples(n=6)

化合物	添加浓度/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%
氯霉素	0.5	100.3	4.8
	5.0	105.4	2.8
	10.0	97.1	5.4
氟苯尼考	1.0	82.3	8.4
	5.0	86.9	4.3
	10.0	92.7	3.1
甲砒霉素	1.0	80.4	6.5
	10.0	86.4	4.9
	50.0	90.1	6.2

3.7 样品实际测定

应用本研究方法对市售 20 份液态奶样品进行测定, 均未检出氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考残留, 符合我国 GB31650-2019《食品中兽药最大残留限量》^[16]中的限量要求。

4 结 论

本研究采用乙酸乙酯提取, MCX 固相萃取柱净化, 结合同位素内标法进行定量, 建立超高效液相色谱串联质谱法同时测定液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考。其中, 氯霉素的最低检出限为 0.05 μg/kg, 甲砒霉素和氟苯尼考的最低检出限为 0.1 μg/kg, 平均回收率为 80.4%~105.4%, 相对标准偏差为 2.8%~8.4%, 能够满足氯霉素类药物的检测要求。与其他实验方法相比, 本研究针对液态奶成分复杂, 较多的蛋白质、磷脂等亲脂性成分干扰测定的问题, 通过对比分析, 选用乙酸乙酯提取, MCX 固相萃取柱净化方式, 使得液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考均具有良好的提取效果, 尤其是对于较难获得高提取率的甲砒霉

素和氟苯尼考, 本研究在保证其测定结果的准确度的同时获得理想的提取效果。本方法基质干扰低, 特异性好, 灵敏度高, 具有良好的回收率和精密度, 适用于液态奶中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考的同时检测。

参考文献

- [1] 姚佳, 王昕, 张建新, 等. 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.
- [2] 彭涛, 李淑娟, 储晓刚, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(4): 463-466.
- Peng T, Li SJ, Chu XG, *et al.* Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in shrimp by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(4): 463-466.
- [3] 仲伶俐, 郭灵安, 毛建章, 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 chlornphenicol residues in milk by UPLC-MS/MS method [J]. China Anim Husb Vet Med, 2018, 45(9): 2645-2652.
- [4] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 193 号. 食品动物禁用的兽药及其他化合物清单[Z].
- Ministry of Agriculture. Announcement No. 193 of the Ministry of agriculture of the people's Republic of China. List of prohibited veterinary drugs and other compounds in food animals [Z].
- [5] 何田田, 薛强, 段潜, 等. 氯霉素 ELISA 检测试剂盒评价技术[J]. 食品科技, 2012, 41(62): 406-408.
- He TT, Xue Q, Duan Q, *et al.* Evaluation of chloramphenicol ELISA kit [J]. Food Sci Technol, 2012, 41(62): 406-408.
- [6] 杨方, 陈国南. 高效液相色谱法同时检测水产品中氯霉素、甲砒霉素与氟甲砒霉素残留[J]. 福建分析测试, 2005, 14(1): 2112-2113.
- Yang F, Chen GN. Simultaneous determination of chloramphenicols residues in fisheries products by HPLC [J]. Fujian Anal Test, 2005, 14(1): 2112-2113.
- [7] 李鹏, 邱月明, 蔡慧霞, 等. 气相色谱-质谱联用法测定动物组织中氯霉素、氟甲砒霉素和甲砒霉素的残留量[J]. 饲料工业, 2006, 24(1): 14-18.
- Li P, Qiu YM, Cai HX, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, thiam-phenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2006, 24(1): 14-18.
- [8] 李红权, 孙良娟, 伍志强, 等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定饲料中氯霉素、甲砒霉素与氟甲砒霉素残留[J]. 分析测试学报, 2012, 31(11): 1396-1400.
- Li HQ, Sun LJ, Wu ZQ, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in feedstuff by isotope dillution high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(11): 1396-1400.
- [9] 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, sulfonamides, penicillins, macrolides and amphenicols in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2015, 33(9): 995-1001.
- [10] 赵飞, 高广慧. 超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱测定蜂蜜中氯霉素的含量[J]. 山东化工, 2016, 45(13): 82-84.
- Zhao F, Gao GH. Determination of chloramphenicol in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Shandong Chem Ind, 2016, 45(13): 82-84.
- [11] 张科明, 梁飞燕, 邓鸣, 等. QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中多类兽药残留[J]. 色谱, 2016, 34(9): 860-867.
- Zhang KM, Liang FY, Deng M, *et al.* Multi-residue determination of veterinary drugs in porcine muscle by QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(9): 860-867.
- [12] 张静, 高玉时, 周倩, 等. 高效液相色谱-电喷雾电离串联质谱法测定鸡肉、鸡蛋中氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考药物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2211-2219.
- Zhang J, Gao YS, Zhou Q, *et al.* Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in chicken and egg by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(6): 2211-2219.
- [13] 谢文, 丁慧瑛, 黄雷芳. 高效液相色谱-电喷雾电离三级四级杆质谱检测动物源食品中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考残留量[J]. 分析实验室, 2006, 25(12): 1-7.
- Xie W, Ding HY, Huang LF. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residue in original animal food by HPLC-ESI-MS/MS [J]. Chin J Anal Lab, 2006, 25(12): 1-7.
- [14] 王浩, 杨红梅, 郭启雷. 液质联用法测定牛奶中氯霉素类药物残留[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(6): 74-76.
- Wang H, Yang HM, Guo QL. Determination of chloramphenicols residues in milk by LC-MS/MS [J]. Food Res Dev, 2015, 36(6): 74-76.
- [15] 陶昕晨, 黄和, 廖建萌, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时检测虾肉和猪肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和其代谢产物氟苯尼考胺残留[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 232-238.
- Tao XC, Huang H, Liao JM, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine residues in shrimp and pork by LC-MS/MS [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2014, 14(1): 232-238.
- [16] GB 31650-2019 食品中兽药最大残留限量[S].
- GB 31650-2019 Maximum veterinary drug residue limit in food [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介

邹 淼, 主管技师, 主要研究方向为卫生理化检验及食品污染物风险监测。
E-mail: 741690012@qq.com

蒋 莹, 主管技师, 主要研究方向为食品成分分析及食品污染物风险监测。
E-mail: florazi@126.com