

水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量 高效液相色谱-串联质谱内标测定方法的研究

王志杰¹ 冷凯良^{1*} 孙伟红¹ 刘艳萍²
翟毓秀¹ 谭志军¹ 郭萌萌¹ 王瑜²

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²上海海洋大学, 201306)

摘要 建立了水产品中3种氯霉素类抗生素残留的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定法。以氘代氯霉素(d5-CAP)为内标,样品在碱性条件下用乙酸乙酯提取,提取液氮气吹干,正己烷液分配脱脂后,采用配有ESI源的LC-MS/MS选择反应监测(SRM)负离子模式测定,可同时对水产品中的氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素进行定性和定量测定。方法简化了样品前处理过程,省去固相萃取步骤,具有操作简便、有机试剂消耗量少、测定周期短和定量更准确等优点。方法的检出限:氯霉素为0.01 μg/kg,甲砒霉素和氟甲砒霉素为0.03 μg/kg。

关键词 高效液相色谱-串联质谱 内标法 氯霉素 甲砒霉素 氟甲砒霉素 残留
中图分类号 TS254.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2009)02-0115-05

Determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in aquatic products by HPLC-MS with internal standard method

WANG Zhi-jie¹ LENG Kai-liang¹ SUN Wei-hong¹ LIU Yan-ping²
ZHAI Yu-xiu¹ TAN Zhi-jun¹ GUO Meng-meng¹ WANG Yu²

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²Shanghai Ocean University, 201306)

ABSTRACT The method for the determination of three chloramphenicols including chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) in aquatic products was developed by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Deuterium (d5-CAP) was used as internal standard instead of CAP, and was added to the sample before extraction with ethyl acetate. The sample was extracted with ethyl acetate to transfer CAP, TAP and FF into the organic phase. The extract liquid which consequently dried by blowing with nitrogen was dissolved with water and defatted with hexane. The mass spectrometer was operated in the negative ion mode using select reaction monitoring for qualitative and quan-

农业部行业专项(Nyhyzx07-046)和国家863计划项目(2008AA100805)共同资助

* 通讯作者。E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836348

收稿日期: 2008-03-27; 接受日期: 2008-06-14

作者简介: 王志杰(1981-), 女, 研究实习员, 主要从事水产品质量检验研究。E-mail: wangzj@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836348

titative analysis of these compounds at the same time. The preliminary treatment was predigested, and no solid phase extraction (SPE) procedure was adopted. The advantages of the method are simple operation, less organic chemicals consumed, and shorter operation time. The limit of detection (LOD) for CAP was 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for TAP and FF.

KEY WORDS High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Internal standard method Chloramphenicol Thiamphenicol
Florfenicol Residues

氯霉素(CAP)、甲砒霉素(TAP)和氟甲砒霉素(FF)同属于氯霉素类药物,甲砒霉素和氟甲砒霉素是新型氯霉素类广谱抗菌药物,其结构与氯霉素类似,药理活性也类似,都具有广谱抗菌能力。氯霉素曾在动物和人体上大量使用,但自发现该药物对人体造血机能的副作用后,已被禁止使用。而甲砒霉素和氟甲砒霉素作为氯霉素的替代药物,因其极佳的治疗效果正越来越广泛地被应用于治疗包括水产养殖在内的动物疾病,虽然不会引起再生障碍性贫血,但却对动物有胚胎毒性,用药后还会出现厌食、腹泻等不良反应,对消费者的危害也逐渐被人们发现。目前,大多数国家对食品中氯霉素类药物的最高残留限量做了规定,如欧盟规定氯霉素不得检出,检出限为0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$;甲砒霉素为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$;对有鳍鱼类氟甲砒霉素为1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。氯霉素类药物在食品中的残留问题不仅关系到人类健康,对国际食品贸易也有着巨大影响。因而,对水产品中氯霉素类药物残留量的检测有较大现实意义。

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素在水产品、畜产品中残留的检测方法,国内外报道很多,检测方法主要有酶联免疫法(刘智宏等 1995)、高效液相色谱法(杨方等 2005; Christian *et al.* 1995)、气相色谱法(电子捕获检测器)(洪振涛等 2006; Munns *et al.* 1994)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)(Tomoko *et al.* 1996; Kijak *et al.* 1994)和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)(秦燕等 2005; Li *et al.* 2002)。酶联免疫法主要用于大规模的筛选工作,不用于定量,并且容易出现假阳性;配备电子捕获检测器的气相色谱法,检测限也可达到0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但不是确证方法;高效液相色谱法前处理相对比较简单,但检出限较高,达不到当今的低限量检测要求。根据欧盟委员会2002/657/EC决议的规定,禁用兽药的确证检测方法必须能提供结构方面的信息,且要达到法规规定的4个确证点,液相色谱法和气相色谱法不能满足这一要求,因此,氯霉素的确证检测方法主要为气质联用法和液质联用法。GC-MS测定动物源性食品中的氯霉素残留方法也已经比较成熟,但在样品的前处理过程复杂,需对氯霉素进行衍生化处理。而HPLC-MS-MS通过选择反应监测,可有效减少背景干扰,提高灵敏度,将是氯霉素类药物残留检测的首选方法。本试验建立了以d5-CAP为内标,采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS-MS)测定水产品中氯霉素类药物残留的方法,能有效消除样品提取、净化等过程中的损失和克服质谱检测过程中离子抑制所引起的定量误差,并使定量和确证性分析一次性完成。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与样品

Thermo Finnigan TSQ Quantum Access 液相色谱-高分辨串联四极杆质谱联用仪,配有ESI离子源。超声波清洗仪、离心机、氮吹仪和旋涡振荡器。

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准品(纯度 $\geq 99.5\%$);氘代氯霉素(d_5 -CAP)标准溶液(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$);乙酸乙酯、甲醇和正己烷(均为色谱纯);无水硫酸钠(分析纯,经650 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧4 h);氨水(25%~28%);滤膜(0.2 μm)。

标准储备溶液:10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,分别称取适量的氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准品,用甲醇定容配成10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的标准储备液,-18 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,可使用1年。

混标使用液:50 ng/ml ,分别取0.5 ml氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准储备溶液于100 ml容量瓶中,

用甲醇稀释至刻度,4℃下保存,可使用 3 个月。

内标使用液:1 μg/ml,准确吸取 100 μl 氘代氯霉素标准溶液(100 μg/ml)于 10 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,4℃下保存,可使用 3 个月。

样品:国家水产品药残监控样品。

1.2 分析条件

1.2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil Gold C18 (2.1 mm×150 mm,2.1 μm);流动相:A,水;B,甲醇;梯度洗脱程序:0~3.0 min 90% A,3.0~5.0 min 10% A,5.0~6.0 min 10% A~90% A,6.0~8.0 min 90% A。流速:0.25 ml/min;进样量:25 μl;柱温:室温。

1.2.2 质谱条件

离子化模式:电喷雾离子源(ESI),负离子模式;喷雾电压:4 200 V;雾化气压力:40 psi;辅助气流量:5 L/min;离子传输管温度:350℃;源内碰撞诱导解离电压:10 V;扫描模式:选择反应监测(SRM),选择反应监测母离子、子离子和碰撞能量见表 1;Q1 半峰宽:0.7 Da;Q3 半峰宽:0.7 Da;碰撞气压力:氩气,1.5 mTorr;选择反应监测母离子、子离子及碰撞能量见表 1。

1.3 样品前处理

称取 1.0 g 均质样品,置于 50 ml 聚丙烯离心管中,加入内标使用液 50 μl 涡旋混合 30 s,再加入 8 ml 乙酸乙酯,0.4 ml 氨水,2.0~3.0 g 无水硫酸钠,于旋涡振荡器上涡旋提取 1 min,超声波提取 10 min,以 4 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 10 ml 玻璃离心管中,在 50℃下吹氮浓缩至干。

残渣用 1.0 ml 水溶解,加入 3.0 ml 正己烷,涡旋混合 30 s,以 3 000 r/min 离心 5 min,弃去上层;下层溶液经正己烷脱脂,用 0.2 μm 水相滤膜过滤后,供液质联用测定。

2 结果与讨论

2.1 样品处理

2.1.1 提取溶剂

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素微溶于水,易溶于乙酸乙酯、甲醇和乙腈等有机溶剂。甲醇和乙腈这两种溶剂对人体毒性较大,且乙腈的挥干时间较长,而乙酸乙酯提取效率高、毒性小,且容易挥干。因此,选用乙酸乙酯作为提取剂。

2.1.2 提取次数

由于采用内标法定量,将样品用 5 ml 乙酸乙酯提取两次,与用乙酸乙酯 8 ml 一次提取,回收率并无显著性差异。采用一次提取,可节约试剂和减少提取时间。

2.1.3 样品质量

大多数文献(秦燕等 2005; Li et al. 2002)报道的氯霉素类药物残留的测定方法均采用较大的样品量(5 g 或 10 g)和提取溶剂量(20 ml 以上),需要旋转蒸发和固相萃取等步骤,不仅操作繁琐、样品处理时间长,而且增加了交叉污染的机会。本研究仅用 1 g 样品量,大大减少了有机溶剂的用量,减少了对环境的污染;

表 1 3 种氯霉素类药物的质谱条件

Table 1 ESI MS/MS conditions of chloramphenicol drugs

分析物 Analyte	母离子(m/z) Parent ion	子离子(m/z) Daughter ion	碰撞能量(ev) Collision energy
CAP	321	257*	13
		152	17
TAP	354	185*	23
		290	16
FF	356	336*	12
		185	23
CAP-d5	326	157*	21

注:* 为定量碎片离子

用吹氮浓缩代替旋转蒸发浓缩,降低了交叉污染的机会;由于样品量少,提取出的杂质相应减少,可省去固相萃取步骤,不仅降低了检测成本,而且提高了检测效率,灵敏度完全达到欧盟要求。

2.2 定量方法的选择

在空白样品中添加 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素,加入 50 μl 内标使用液,按照 1.3 步骤处理后,分别利用外标法和内标法定量(表 2)。结果表明,外标法测定会产生较大误差,而内标法测定结果接近真值(添加值)。利用液相色谱-质谱联用技术对生物样品中氯霉素残留含量测定时,氯霉素在电离过程中电离效率不如氯霉素标准溶液高,选用内标法定量,可减少误差,而且使用内标法定量,进样量的变化、色谱条件的微小变化对定量结果的影响不大,特别是本实验在样品前处理(如浓缩和萃取)前加入内标物,然后再进行前处理时,可部分补偿氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素在样品前处理时的损失,因此本研究采用内标法定量。

表 2 内标法和外标法测定结果比较
Table 2 Results obtained by internal standard and external standard methods

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	内标法 Internal standard method($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	外标法 External standard method($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)
CAP	1.0	0.92	92	0.48	48
	5.0	4.80	96	3.02	60
TAP	1.0	0.86	86	0.34	34
	5.0	5.12	102	2.06	41
FF	1.0	0.81	81	0.39	39
	5.0	5.25	105	2.21	44

2.3 质谱条件的优化

用针泵以 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 的流速注入 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素和氘代氯霉素混合标准溶液,在 m/z 150~400 扫描范围内以负离子模式进行一级质谱图扫描,确定氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素和氘代氯霉素的分子离子分别为 m/z 321、354、356 和 326。分别以 321、354、356 和 326 作为母离子,进行子离子扫描发现,氯霉素碎片离子主要有 257、194、176 和 152;甲砒霉素碎片离子主要有 290、270、240、227 和 185;氟甲砒霉素碎片离子主要有 270、336 和 185。选取丰度最强的 m/z 152 和 257 作为氯霉素的监测离子, m/z 185 和 290 作为甲砒霉素的监测离子, m/z 185 和 336 作为氟甲砒霉素的监测离子, m/z 157 作为氘代氯霉素的监测离子。最后以选择反应监测(SRM)负离子模式优化锥孔电压(Skimmer offset)和碰撞能量(Collision energy)等。

2.4 线性范围、检测限和定量限

配制质量浓度为 0.5~200 ng/ml 的系列标准溶液,以待测物与内标的峰面积比为纵坐标,待测物的质量浓度为横坐标进行线性回归。结果表明,氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素的线性相关系数(r)分别为 0.998、0.993 和 0.995。

以 $S/N = 3$ 求得方法的检出限(LOD):氯霉素为 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$,甲砒霉素和氟甲砒霉素为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 回收率和精密度试验

选取阴性鳕鱼样品,添加 3 种氯霉素类标准品和内标,氯霉素类标准品的添加水平为 0.50、5.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,考察方法的回收率。每个样品重复测定 6 次,考察方法的精密度,结果见表 3,相应的色谱图见图 1。

表 3 鳙鱼样品中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素的添加回收率 (n=6)
Table 3 Recoveries of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol from spiked ling (n=6)

分析物 Analyte	添加水平 Added level ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)						平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
		89.0	87.8	76.8	83.6	80.5	75.1		
CAP	0.50	89.0	87.8	76.8	83.6	80.5	75.1	82.1	6.9
	5.0	98.0	95.6	92.7	96.2	94.8	89.1	94.4	3.3
	10.0	97.3	89.5	92.1	87.6	90.6	91.5	91.4	3.6
TAP	0.50	76.6	78.0	87.7	75.2	70.5	80.7	78.1	7.4
	5.0	105.3	96.8	107.3	100.2	97.8	105.1	102.1	4.3
	10.0	92.7	99.6	88.9	91.5	95.3	90.6	93.1	4.1
FF	0.50	91.7	87.8	82.1	90.2	79.4	84.2	85.9	5.6
	5.0	106.8	112.0	99.8	108.4	104.1	98.9	105.0	4.8
	10.0	99.3	95.9	90.6	101.3	93.5	92.0	95.4	4.4

3 结论

本文建立了水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素残留的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 测定法。该方法仅用 1 g 样品,省去固相萃取步骤,具有操作简便、有机试剂消耗量少和测定周期短等优点,并减少了不同样品间交叉污染的机会。该方法样品前处理时加入内标物,部分补偿了氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素在样品前处理时的损失,回收率令人满意。该方法可适用于水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素残留的确证检验。

参 考 文 献

刘智宏. 1995. 酶标免疫测定法(EIA)在检测动物性食品中氯霉素的应用. 中国兽药杂志, 29(2): 47~48

杨 方, 陈国南. 2005. 高效液相色谱法同时检测水产品中氯霉素、甲矾霉素与氟甲矾霉素残留. 福建分析测试, 14(1): 2 112~2 113

洪振涛, 张卫锋, 聂建荣, 朱孟丽, 庄志辉. 2006. 气相色谱法测定动物组织中氯霉素的残留量. 中国兽药杂志, 40(2): 14~16

秦 燕, 朱柳明, 张美金, 林 峰, 林海丹. 2005. 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物肌肉组织中的氯霉素残留. 分析测试学报, 24(4): 17~20

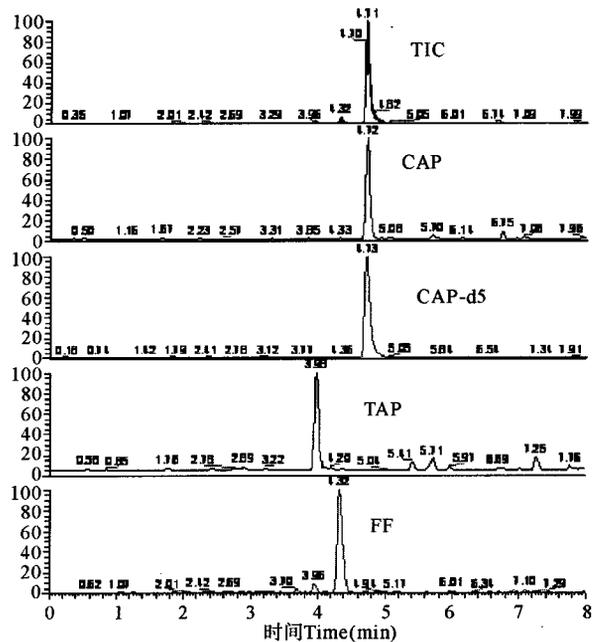
Christian, H., Bernd, L., and Hans, S. 1995. Determination of chloramphenicol in animal tissue using High-performance liquid chromatography with a column-switching system and ultraviolet detection. J. Chromatogr B. 668(1): 53~58

Kijak, P. J. 1994. Confirmation of chloramphenicol residues in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry. J. AOAC Int. 77 (1) : 34~40

Li, T. L., Chung-Wang, Y. J., and Shih, Y. C. 2002. Determination and confirmation of chloramphenicol residues in swine muscle and liver. Food Science, 67(1): 21~28

Munns, R. K., Holland, D. C., and Roybal, J. E. 1994. Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp; Interlaboratory study. J. AOAC Int. 77 (3): 596~601

Tomoko, N., and Hisao, Oka. 1996. detection of residual chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 44(5):1 280~1 284



添加水平: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Spiked level: 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$

图 1 鳙鱼中添加 3 种氯霉素类药物及内标物的选择离子流
Fig. 1 Chromatograms of 3 chloramphenicol drugs and internal standard spiked in a ling sample