

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中氯霉素残留

崔涛, 常建军, 张雪峰, 朱炜, 李梅

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司分析中心, 呼和浩特 011500)

中图分类号: O657.63

文献标志码: B

文章编号: 1001-4020(2011)08-0970-02

氯霉素(CAP)属氯霉素类抗生素,是兽医临床常用的抗生素。氯霉素一般对革兰氏阴性菌的作用较革兰氏阳性菌强,曾是兽医临床常用的抗生素。氯霉素类的主要毒副作用是抑制造血机能,发生不可逆转的再生障碍性贫血。人和幼龄动物对氯霉素均非常敏感。欧盟、中国以及许多国家将氯霉素列为食品、动物禁用兽药,在动物性食品中规定氯霉素是不得检出的。目前检测氯霉素的方法主要有酶联免疫吸附检测法(ELISA)^[1-2]、气相色谱-电子捕获检测、气相色谱-质谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱法^[3-6]等。本工作采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)及超高效液相色谱-紫外检测器(UPLC-UV)检测牛奶及相关产品中氯霉素残留量。

1 试验部分

1.1 仪器与试剂

Waters UPLC 分离单元,配有自动进样器, Waters TUV 紫外检测器, Waters TQD 质谱检测器; Heal Force 高速冷冻离心机; Organomation N-EVAP 氮吹仪; Millipore 超纯水系统; Cleantert PEP 固相萃取小柱(60 mg/3 mL)。

氯霉素标准溶液:称取氯霉素标准品(纯度为99.5%) 10 mg,用甲醇定容于100 mL棕色容量瓶中,混匀,配成100 mg·L⁻¹的氯霉素标准储备溶液,放置于-18℃冷柜避光保存;至少可以保存4个星期。

试验用水为超纯水。

1.2 仪器工作条件

色谱条件:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm);柱温30℃;流动相:甲醇与甲酸-水(0.1+99.9)溶液按体积比45比55混合的溶液;流量0.35 mL·min⁻¹,进样体积10 μL;紫外检测波长278 nm。

质谱条件:电喷雾电离源(ESI⁻),电离电压3.00 kV,锥孔电压30 V;源温度120℃,去溶剂气温度450℃,去溶剂气流量600 L·h⁻¹,采集方式为多反应监测模式(MRM)。其他质谱条件见表1,其中碎片离子 *m/z* 151.8 为定量离子。

表1 氯霉素的质谱参数

Tab. 1 Mass parameters for chloramphenicol

准分子离子 <i>m/z</i>	特征碎片离子 <i>m/z</i>	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV	停留时间 /s
321.1	151.8	28	17	0.05
	256.8		11	

1.3 试验方法

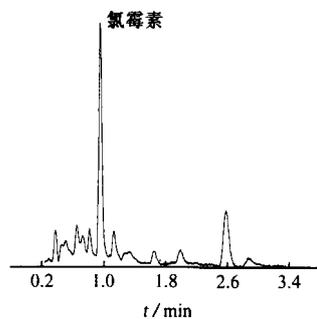
称取牛奶试样5.00 g(乳粉2.00 g),加入乙酸乙酯15 mL,涡旋1 min,放入超声机中超声20 min,以14 000 r·min⁻¹转速离心10 min,取上清液10 mL,置于氮吹管中,在50℃下,用氮气吹干。用甲醇0.5 mL溶解,水5 mL稀释,过PEP固相萃取小柱(预先用甲醇,水各5 mL活化),待快干时用水5 mL除杂,用真空泵抽干,加入甲醇6 mL洗脱,然后用氮气45℃吹干,用甲醇(1+1)溶液1 mL溶解,涡旋2 min,经0.22 μm微孔滤膜过滤后,按仪器工作条件进行测定。

收稿日期: 2010-06-20

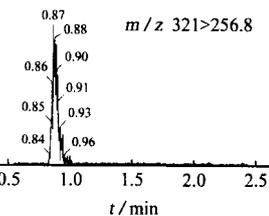
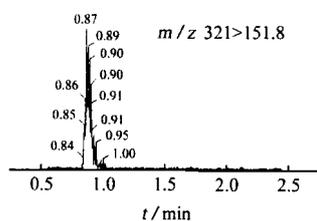
2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

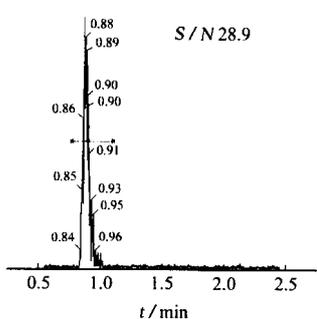
采用甲醇和甲酸-水(0.1+99.9)溶液为流动相,考察了两者以不同体积比混合时氯霉素与牛奶中其他组分的分离效果。结果表明:两者按体积比 45 比 55 混合时,色谱峰的响应值及保留时间最佳,不受杂质峰干扰,达到分离要求,氯霉素色谱、质谱图见图 1。



(a) 氯霉素标准溶液色谱图



(b) 氯霉素标准溶液质谱图



(c) $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯霉素标准溶液信噪比图

图 1 氯霉素色谱、质谱图

Fig. 1 Chromatograms and mass spectra of chloramphenicol

2.2 样品前处理条件的选择

2.2.1 提取剂

考察了乙腈与乙酸乙酯的提取能力,结果表明:

相同条件下,乙腈提取体系的回收率在 40%~60% 之间,乙酸乙酯提取体系的回收率在 90%~105% 之间。试验选择乙酸乙酯作为提取剂。

2.2.2 溶剂种类及用量

氮吹后分别选用了甲醇 0.5 mL, 甲醇 1.0 mL, 水 1.0 mL 对吹干后加标样品进行溶解,再加入水 5 mL 稀释,过净化柱,制得样液后在仪器工作条件下进行测定。结果表明:用甲醇 0.5 mL 溶解的回收率最好,可达 90% 以上,加入甲醇 1.0 mL 和水 1.0 mL 溶解的效果不佳,回收率都在 70% 以下。因为在甲醇 1.0 mL 溶解后,样液中甲醇含量过大,影响了净化柱的吸附,致使部分目标物损失;以水 1.0 mL 溶解后,氮吹管内物质未被完全溶解,致使回收率偏低。试验选择甲醇作溶剂,用量为 0.5 mL。

2.2.3 固相萃取柱

试验对 Cleanert PEP 固相萃取小柱与 Oasis HLB 固相萃取柱的净化效果进行了比较,同条件下,经两种萃取小柱净化后的加标样品的回收率无显著差异。试验选择 Cleanert PEP 固相萃取小柱进行净化。

2.3 标准曲线与检出限

按试验方法处理空白样品制得基质溶液,以基质溶液配制 $0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯霉素标准溶液,按仪器工作条件对标准溶液系列进行测定,氯霉素质量浓度在 $0.1 \sim 5.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性,线性回归方程为 $y = 23.73 \rho + 0.22$,相关系数为 0.999 5。

测定氯霉素的检出限 ($3S/N$) 为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,测定下限 ($10S/N$) 为 $0.20 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。方法符合现欧盟所规定的氯霉素在食品中的最高残留 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标准。

2.4 方法的精密度

取含有氯霉素药物的样品作为待测样品,重复取样 10 次,按试验方法进行处理,并进样测定。平均测定值 ($n=10$) 为 $0.286 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,相对标准偏差为 5.6%。

2.5 样品分析

取不含有氯霉素药物的样品为空白样品,分别加入不同量的氯霉素标准溶液,按试验方法进行处理,在 $0.3, 3.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 2 个浓度水平下进行回收试验,结果见表 2。

(下转第 973 页)

38.2%;采用正己烷和甲苯作为萃取剂,四乙基铅的回收率分别为80.9%和73.8%。因甲苯的毒性较大,试验选择正己烷作为萃取溶剂。

2.3 工作曲线与检出限

按试验方法对四乙基铅标准溶液系列进行测定,以质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制工作曲线,测得线性范围在 $0.05 \sim 10.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,线性回归方程为 $y=1210.6\rho+2.51$,相关系数为0.9985。以3倍信噪比计算方法的检出限为 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4 方法的回收率与精密度

在100.00 mL水中进行加标回收试验,标准加入量分别为0.1,0.5,1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,分别平行测定7次,测得平均值分别为0.078,0.401,0.840 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,回收率分别为78.0%,80.2%,84.0%,相对标准偏差分别为5.7%,3.2%,3.4%。

2.5 样品分析

选取长三角地区10份地表水样品,按试验方法进行分析,均未检出四乙基铅。

采用本法测定水中四乙基铅操作过程简单,其检出限符合GB 3838-2002规定,分析时间短,检测效率高,适用于地表水中四乙基铅的分析。

参考文献:

- [1] 常晓峰,舒平,白伟. 四乙基铅中毒临床研究进展[J]. 工业卫生与职业病, 2008,34(5):312-314.
- [2] TUNCEL U, CLERICI W J, JONES C R. Differential ototoxicities induced by lead acetate and tetraethyl lead [J]. Hearing Research, 2002,166(1/2):113-123.
- [3] YU Xiao-mei, PAWLISZYN J. Speciation of alkyllead and inorganic lead by derivatization with deuterium-labeled sodium tetraethylborate and SPME-GC/MS[J]. Analytical Chemistry, 2000,72(8):1788-1792.
- [4] MESTER Z A, LORD H, PAWLISZYN J. Speciation of trimethyllead and triethyllead by in-tube solid phase microextraction high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2000,15:595-660.
- [5] 李明,李爱荣,帅琴,等. 双气路校正-固相微萃取电感耦合等离子体质谱法测定四乙基铅[J]. 分析实验室, 2007,26(6):107-110.
- [6] 程滢,杨文武,张宗祥. 石墨炉原子吸收光谱法测定水中四乙基铅[J]. 环境监测管理与技术, 2009,21(2):40-41.

(上接第971页)

表2 回收试验结果(n=3)

Tab. 2 Results of test for recovery

标准加入量 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收量 $\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率 /%
0.3	0.275	91.8
3.0	2.964	98.8

按试验方法对市售的纯牛奶、乳粉、乳饮料、冰淇淋4种牛奶类产品进行了分析,结果表明:4种牛奶类产品中均未检出氯霉素。

参考文献:

- [1] SCORTICHINI G, ANNUNZIATA L, HAOUET M N, et al. ELISA qualitative screening of chloramphenicol in muscle, eggs, honey and milk; method validation according to the Commission Decision 2002/657/EC criteria. [J]. Anal Chim Acta, 2005,535(11):43-48.

- [2] 刘堃,高世同,吴丽明,等. 定量ELISA法检测蜂蜜中氯霉素残留量研究[J]. 中国公共卫生管理, 2004(3):265-266.
- [3] 蒋定国,杨大进,方从容,等. 高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素残留量的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2003(1):36-38.
- [4] FORTI A F, CAMPANA G, SCORTICHINI G, et al. Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005,529(2):257-263.
- [5] RAMOS M, MUÑOZ P, ARANDA A, et al. Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2003,791(7):31-38.
- [6] 王浩,刘艳琴,殷晓燕,等. 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱法测定乳品中的氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留[J]. 中国食品学报, 2008,5:138-141.