

高效液相色谱 / 串联质谱法 同时测定虾中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素残留量

彭 涛^{1,2} 李淑娟² 储晓刚² 蔡云霞² 李重九^{*1}

¹ (中国农业大学理学院, 北京 100094) ² (中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘 要 用高效液相色谱 / 串联质谱 (LC/MS/MS) 同时测定虾中的氯霉素 (CAP)、甲矾霉素 (TAP) 和氟甲矾霉素 (FF)。均质后的虾样品, 采用碱化乙酸乙酯提取。浓缩提取物经液 / 液分配 (LLP) 去除脂肪, C₁₈ 固相萃取 (SPE) 柱净化后, 采用 LC/MS/MS 电喷雾电离 (ESI) 负离子, 多反应监测 (MRM) 模式检测, 外标法定量。检出限为: 氯霉素和氟甲矾霉素 0.01 ng/g, 甲矾霉素为 0.05 ng/g。在添加浓度 0.1 ~ 2.0 ng/g 范围内, 氯霉素回收率为 73.9% ~ 96.0%; 甲矾霉素回收率为 78.6% ~ 99.5%; 氟甲矾霉素回收率为 74.9% ~ 103.7%; 相对标准偏差 (RSD) 均小于 6.4%。

关键词 高效液相色谱 / 串联质谱, 氯霉素, 甲矾霉素, 氟甲矾霉素, 多反应监测

1 引 言

氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素同属于氯霉素类 (CAPs) 药物, 具有广谱抗菌能力, 曾在动物和人体上大量使用。但自发现该类药物对人体造血机能的副作用, 现已限制其使用。目前, 大多数国家对食品中氯霉素类药物的最高残留限量 (MRL) 做了规定, 如欧盟规定氯霉素为 0.1 ng/g, 甲矾霉素为 50 ng/g, 氟甲矾霉素为 100 ng/g。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。

食品中氯霉素类药物的残留检测主要采用高效液相色谱 (HPLC) 和气相色谱 (GC), 其中大多数方法为单一药物的检测。氯霉素类药物多残留检测方法, 主要有 HPLC/UV^[1] 和 GC/ECD^[2,3]。近年来, 液相色谱 / 质谱 (LC/MS)^[4,5] 和气相色谱 / 质谱 (GC/MS)^[6] 开始用于氯霉素类药物多残留检测, 但由于缺乏足够的结构碎片信息, 用于确证还不具说服力。本实验采用 LC/MS/MS, 同时测定了虾中的氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素。通过丰富的母 / 子离子信息, 为阳性样品确证提供了依据。同时, 方法操作简便, 免去了 GC 的衍生化步骤, 灵敏度优于现有文献报道, 可完全满足欧盟和美国 FDA 的限量要求。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters2695 液相色谱仪 (美国 Waters 公司); Quattro Ultima Pt Tandem MS/MS (英国 Micromass 公司) 质谱系统。色谱柱: XTerra MS C₁₈, 2.1 mm × 150 mm i.d., 3.5 μm (美国 Waters 公司)。固相萃取柱: Supelclean LC-18, 3 mL, 500 mg (美国 Supelco 公司)。

氯霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素 (>99%) 均购自 Sigma 公司, 储备液用甲醇配制, 4℃ 避光保存。工作液用甲醇由储备液稀释, 现用现配。甲醇、乙酸乙酯、正己烷为色谱纯, 25% 氨水、冰醋酸、NaCl 醋酸铵为分析纯, 水为去离子水, 氮气、氩气 (>99.999%)。

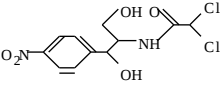
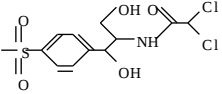
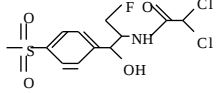
2.2 LC/MS/MS 分析条件

流动相为甲醇 / 10 mmol/L 醋酸铵水溶液 (30 + 70, V/V), 含 0.1% 冰醋酸, 流速 0.2 mL/min; 柱温 25℃。ESI(-) MRM 检测 (见表 1)。毛细管电压 1.5 kV; 源温度 80℃; 去溶剂温度 350℃; 锥孔气流 30 L/h, 去溶剂气流 400 L/h, 碰撞气体为氩气, 碰撞气压 0.25 Pa。

2004-02-12 收稿; 2004-08-29 接受

本文系国家“十五”重大科技专项资助项目 (No. 2001BA804A18)

表 1 MRM所用的母/子离子
Table 1 Precursor/daughter ions used in multiple reaction monitoring (MRM)

化合物 Compound	结构式 Structure	母离子 Precursor	子离子 Daughter	驻留时间 Dwell time (s)	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)	断裂方式 Possible identity
氯霉素 Chlbramphenicol		321	257	0.20	35	11	[M - H - (HCOCl)] ⁻
			194	0.20	35	11	[M - H - (NH ₂ COCHCl ₂)] ⁻
			176	0.20	35	17	[194 - (H ₂ O)] ⁻
			152	0.20	35	18	[O ₂ N - C ₆ H ₄ - CHOH] ⁻
甲矾霉素 Thiamphenicol		354	290	0.20	35	18	[M - H - (HCOCl)] ⁻
			185	0.20	35	12	[H ₃ O - C ₆ H ₄ - CHOH] ⁻
氟甲矾霉素 Florfenicol		356	336	0.20	35	20	[M - H - HF] ⁻
			185	0.20	35	8	[CH ₃ SO ₂ - C ₆ H ₄ - CHOH] ⁻

2 3 样品前处理

取 10.00 g均质后的虾于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 20 mL 碱化乙酸乙酯(乙酸乙酯 / 25%氨水, 97 + 3, V/V),振荡 15 min后, 4000 r/min离心 5 min,吸取上层液体。残渣再用 2 ×20 mL 碱化乙酸乙酯提取 2次,合并上清液。提取液于 40 ℃水浴中减压浓缩至干。加入 25 mL 4% NaCl溶液,超声 1 min溶解, 3 ×20 mL 正己烷液分配去除脂肪后,用 3 ×15 mL 乙酸乙酯反提,合并乙酸乙酯,于 40 ℃水浴中减压浓缩至干。加入 10 mL 0.05%醋酸溶液,超声 1 min溶解,过 C₁₈ SPE柱(已用 5 mL 甲醇, 5 mL水平衡), 3 mL 水洗涤, 3 mL 甲醇/水(60 + 40, V/V)洗脱。洗脱液 40 ℃氮气吹干。1 mL 流动相溶解残留物,过 0.2 μm 微孔滤膜,取 10 μL 进样检测。

2 4 添加回收实验

取 10.00 g均质后的虾于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,按 0.1、0.5、1.0和 2.0浓度添加标准溶液,涡旋混匀,其余操作同 2.3。

3 结果和讨论

3 1 提取与净化

氯霉素类药物可以用甲醇、乙腈、丙酮、乙酸乙酯等有机溶剂提取,但乙酸乙酯对氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素的提取效率最高,适用于动物组织样品的提取,而乙腈常用于奶制品的提取; Pfenning等^[3]发现碱化乙酸乙酯对虾等水产品具有更高的回收率。本实验采用碱化乙酸乙酯提取,浓缩后用 4% NaCl和正己烷分配,再用乙酸乙酯反提,可以有效去除虾中的脂肪,进一步再用常规 C₁₈ SPE柱净化。从 MRM 色谱图(见图 1)中可以看出几乎没有干扰峰,有效保护了色谱柱和质谱仪,同时提高了方法灵敏度。

3 2 MS/MS分析

van de Riet等^[4]利用 LC/MS,采用选择离子监测(SRM)模式,同时测定了水产品中的氯霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素和氟甲矾霉素胺,但该方法缺乏碎片信息,不能用于确证。Hirsch等^[7]采用 LC/MS/MS测定了水中的氯霉素,美国 FDA也建立了氯霉素确证的 LC/MS/MS方法,但目前还没有查到有关甲矾霉素和氟甲矾霉素 LC/MS/MS的检测条件和碎片

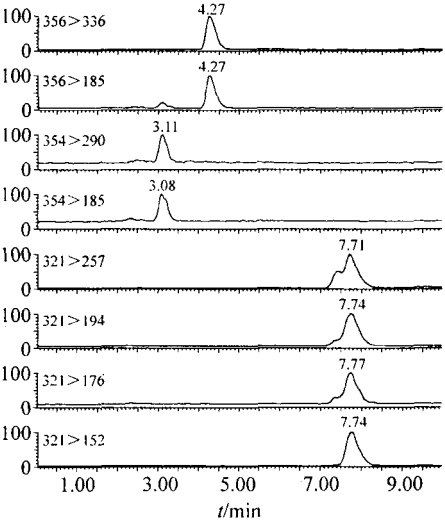


图 1 添加虾样中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素的 MRM 色谱图

Fig 1 Mutiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of chlbramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in spiked shrimp

信息。

本实验在 Hirsch 的研究基础上,采用 ESI(-)方式同时测定了虾中的氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素。在已有的氯霉素 LC/MS检测方法中,多采用 ESI(-)方式。负离子方式可以提供较正离子方式更多的碎片信息,同时灵敏度大幅度提高。这点在 GC/MS上也有体现。实验发现,甲矾霉素和氟甲矾霉素同样用 ESI(-)比用 ESI(+)具有更高的响应值。同时流动相中加入醋酸铵,醋酸根离子促进分析物的电离,也进一步提高了灵敏度。通过子离子扫描(见图 2)发现:氯霉素碎片离子较少,但丰度集中,主要离子有 321、257、194、176和 152;甲矾霉素非常容易断裂,碎片多且丰度分散,这也是其检测灵敏度低于其余二者的原因,主要离子有 354、290和 185;氟甲矾霉素碎片也较多,但丰度很集中,主要离子为 356、336和 185。根据已报道的氯霉素碎片信息,推测甲矾霉素和氟甲矾霉素碎片离子断裂方式如表 1 所示。

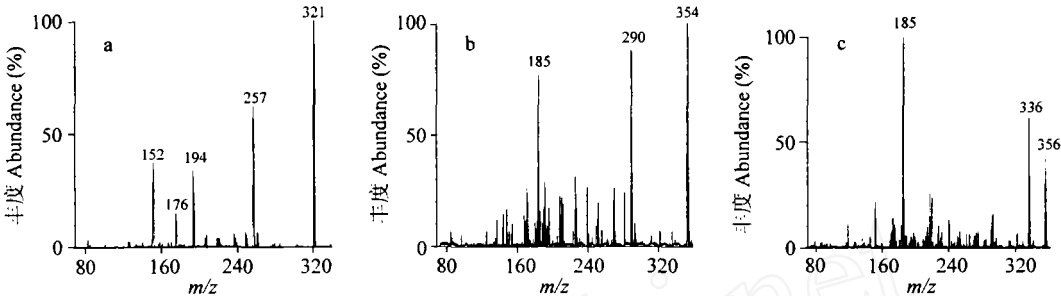


图 2 氯霉素 (a)、甲矾霉素 (b)和氟甲矾霉素 (c)子离子扫描图
Fig 2 Daughter scans of chloramphenicol (a), thiamphenicol (b) and florfenicol (c)

3.3 外标曲线

氯霉素和氟甲矾霉素标准品浓度在 0.5~20 μg/L 范围内 (相当于添加浓度 0.05~2.0 ng/g),甲矾霉素标准品浓度在 1.0~20 μg/L 范围内 (相当于添加浓度 0.1~2.0 ng/g),分别以离子 152、336和 290 峰面积对浓度作图,所得曲线方程分别为: $y = 2140.31x + 741.426$ 、 $y = 3218.29x + 573.982$ 和 $y = 552.354x + 599.799$;相关系数 r 分别为: 0.9995、0.9997和 0.9995。

3.4 添加回收率和检出限

添加浓度为 0.1~2.0 ng/g,氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素回收率分别为 73.9%~96.0%、78.6%~99.5%和 74.9%~103.7%;相对标准偏差均小于 6.4% (见表 2)。以 3 倍信噪比为检出限 (LOD),计算得氯霉素和氟甲矾霉素检出限为 0.01 ng/g;甲矾霉素检出限为 0.05 ng/g,均优于文献报道。

表 2 虾中氯霉素类药物添加回收率

Table 2 Spiked recoveries of chloramphenicols (CAPs) in shrimp								
化合物 Compound	添加浓度 Fortified Level (ng/g)	平行 Run [#]					平均值 Average (%)	相对标准偏差 RSD (%)
		1	2	3	4	5		
氯霉素 Chloramphenicol	0.1	73.9	78.1	75.2	88.7	80.4	79.3	5.9
	0.5	80.3	94.7	90.5	80.6	87.8	86.8	6.3
	1.0	78.2	85.2	89.8	90.1	81.2	84.9	5.2
	2.0	96.0	90.1	84.7	88.9	93.4	90.6	4.3
甲矾霉素 Thiamphenicol	0.1	99.5	93.2	87.7	95.2	88.3	92.8	4.9
	0.5	78.6	80.9	90.5	86.2	84.1	84.1	4.6
	1.0	98.7	87.4	90.8	95.4	95.5	93.5	4.4
	2.0	96.6	85.3	87.9	91.2	95.8	91.4	4.9
氟甲矾霉素 Florfenicol	0.1	80.5	79.6	88.7	90.3	87.1	85.2	4.9
	0.5	74.9	78.4	88.2	85.6	89.5	83.3	6.4
	1.0	98.3	100.8	92.4	88.7	103.7	96.8	6.1
	2.0	96.1	99.7	86.2	89.5	94.4	93.2	5.4

References

- 1 Nagata T, Saeki M. *J. Liq Chromatogr*, **1992**, 15 (12): 2045 ~ 2056
- 2 Pfenning A P, Madson M R, Roybal J E, Tumipseed S B, Gonzales S A, Hurlbut J A, Salmon G D. *J. AOAC Int*, **1998**, 81 (4): 714 ~ 720
- 3 Pfenning A P, Roybal J E, Tumipseed S B, Gonzales S A. *J. AOAC Int*, **2000**, 83 (1): 26 ~ 30
- 4 van de Riet J M, Potter R A, Christie-Fougere M, Burns B G. *J. AOAC Int*, **2003**, 86 (3): 510 ~ 514
- 5 Yang Chengdui (杨成对), Song Lihui (宋莉晖), Mao Lihua (毛丽哈), Liu Mixin (刘密新). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2004**, 32 (7): 905 ~ 907
- 6 Nagata T, Oka H. *J. Agric Food Chem.*, **1996**, 44 (5): 1280 ~ 1284
- 7 Hirsch R, Temes T A, Haberer K, Mehlich A, Balkwanz F, Kratz K L. *J. Chromatogr A*, **1998**, 5 (2): 213 ~ 223

Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol in Shrimp by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Peng Tao^{1,2}, Li Shujuan², Chu Xiaogang², Cai Yunxia², Li Chongjiu^{*1}

¹ (College of Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

² (Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025)

Abstract A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method was established for simultaneous determination of residues of chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) in shrimp. Homogenized shrimp samples were extracted with basic ethyl acetate. Concentrated extracts were first defatted by liquid-liquid partition, then, cleaned by C₁₈ solid phase extraction (SPE) cartridge. Identification was achieved by electrospray ionization (ESI) in negative mode using multiple reaction monitoring. Limits of detection for CAP and FF were 0.01 ng/g, for TAP was 0.05 ng/g. The recoveries of CAP, TAP and FF were 73.9% ~ 96.0%, 78.6% ~ 99.5% and 74.9% ~ 103.7% respectively, at spiked levels of 0.1 ~ 2.0 ng/g. The RSD of the method was less than 6.4%.

Keywords High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, multiple reaction monitoring

(Received 12 February 2004; accepted 29 August 2004)