

# 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测动物源食品中氯霉素类药物及其代谢物残留

孙雷,张骊,王树槐,汪霞

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2009-02-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2009)03-0042-04 [中图分类号] S859.84

**[摘要]** 建立了动物源食品中氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺残留检测的超高效液相色谱 - 串联质谱 (UPLC - MS/MS) 分析方法。样品在碱性条件下用乙酸乙酯提取后,再用正己烷去除脂肪,浓缩后用 BEH C<sub>18</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离,以乙腈和水为流动相进行梯度洗脱,流速为 0.3 mL/min,多反应监测 (MRM) 模式检测。结果表明:四种药物在 2 ~ 500 μg/L 的系列浓度范围内均呈良好线性关系,相关系数  $r$  均大于 0.990。样品中氯霉素的检测限为 0.1 μg/kg,定量限为 0.2 μg/kg;甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的检测限为 0.5 μg/kg,定量限为 1 μg/kg。本方法氯霉素在 0.2 ~ 1 μg/kg 的添加浓度范围内,甲矾霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺在 1 ~ 50 μg/kg 的添加浓度范围内平均回收率均为 70% ~ 120%,相对标准偏差 (RSD) 均小于 20%。该方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等特点。

**[关键词]** 动物源食品;氯霉素类药物;残留;超高效液相色谱 - 串联质谱

## Determination of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine Residues in Animal Derived Food by UPLC - MS/MS

SUN Lei, ZHANG Li, WANG Shu - huai, WANG Xia

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; China)

**Abstract:** An ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC - MS/MS) method was established for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine residues in animal derived food. The samples were extracted by ethyl acetate in basic conditions. The fat was removed by hexane. The separation of 4 drugs was performed on waters acquity UPLC system with the column of BEH C<sub>18</sub> (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) and the gradient elution solvent of acetonitrile and water at a flow rate of 0.3 mL/min. The calibration curves were good linear between the peak areas and the concentrations of 2 ~ 500 μg/L, and the correlation coefficients ( $r$ ) were more than 0.990. The limit of detection of chloramphenicol was 0.1 μg/kg, and the limit of quantification was 0.2 μg/kg. The limits of detection of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine were 0.5 μg/kg, and the limits of quantification were 1 μg/kg. The average recoveries of 4 drugs ranged from 70% to 120%. The RSD of method was less than 20%.

**key words:** animal derived food; chloramphenicol; residue; UPLC - MS/MS

作者简介:孙雷(1978年-),硕士,助理研究员,主要从事兽药残留方面研究。E-mail: sunlei@ivdc.gov.cn

氯霉素类药物属于广谱抗生素,对革兰氏阳性菌和阴性菌均有抑制作用,常见的药物主要包括氯霉素(Chloramphenicol, CAP)、甲砒霉素(Thiamphenicol, TAP)和氟苯尼考(Florfenicol, FF)等,基本化学结构如图1所示。但研究发现,氯霉素可抑制骨髓细胞内线粒体蛋白质的合成,对人和动物骨髓细胞和肝细胞产生毒性作用,引起再生障碍性贫血,并伴有白细胞和血小板减少现象。甲砒霉素的抗菌谱、抗菌活性与氯霉素相似,但某些对氯霉素耐药的菌株仍对甲砒霉素敏感,该药不会产生再生障碍性贫血,但可抑制红细胞、白细胞和血小板的生成,程度比氯霉素轻。氟苯尼考的抗菌谱与氯霉素相似,但抗菌活性优于氯霉素和甲砒霉素,对耐氯霉素和甲砒霉素的大肠杆菌、沙门氏菌、克雷伯氏杆菌等也有效,虽不会引起骨髓抑制和再生障碍性贫血,但具有胚胎毒性。因此,为保障动物源食品安全,确保该类药物不对人类带来危害,世界各国都对其做出了严格规定,严禁氯霉素在食用动物上使用,欧盟规定动物源食品中氯霉素残留的最低要求执行限(MRPL)为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,我国农业部235号公告中把氯霉素列为禁用药物,规定甲砒霉素的最高残留限量为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ;氟苯尼考的残留标示物氟苯尼考胺(Florfenicol Amine, FFA)的最高残留限量为 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

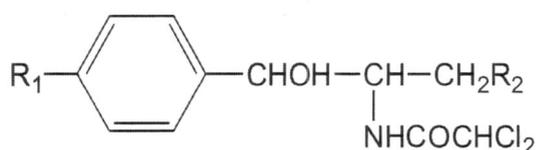


图1 氯霉素类药物的基本化学结构

氯霉素类药物的残留检测方法主要有ELISA法、HPLC法、GC法、GC-MS法和LC-MS/MS法等,其中确证方法主要是GC-MS法和LC-MS/MS法,但GC-MS法均需要进行衍生化,前处理较为繁琐。本方法采用快速简便、定性准确、灵敏度高的LC-MS/MS方法作为动物源食品中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺多残留检测的确证方法,以保障对该类药物的残留监控。

## 1 实验部分

1.1 仪器与试剂 Acquity UPLC - Quattro Premier XE<sup>TM</sup>质谱联用仪, Waters公司; Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), Waters公司; AE260电子天平, Mettler Toledo公司; SR4漩

混合器, IKA公司; 水平振荡器, IKA公司; Biofuge Strators高速离心机, Heraeus公司; Organomation Associates氮吹仪, Jnc公司。

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考来自中国兽药药品监察所; 氟苯尼考胺、氯霉素-D<sub>5</sub>购自 Dr Ehrenstorfer公司; 乙腈为色谱纯试剂, Merck公司; 甲酸为色谱纯试剂, Fisher公司; 氨水、乙酸乙酯为分析纯试剂; 实验用水为 Milli-Q高纯水。

标准和内标工作液的配制: 准确称取适量的各种药物, 用甲醇溶解并定容至10 mL, 配制成浓度为1 mg/mL的标准储备液。分别准确吸取0.1 mL的各标准储备液, 用甲醇稀释至10 mL, 混匀即得10 μg/mL的标准和内标工作液。

## 1.2 实验方法

1.2.1 提取与净化 称取(5 ± 0.05) g匀浆试料, 加氨水0.5 mL, 再加乙酸乙酯15 mL(牛奶样品需再加入4 g无水硫酸钠), 涡旋后水平振荡5 min, 8000 r/min离心5 min后, 取上清液于40 °C下氮气吹干, 加入0.5%甲酸水溶液1 mL, 充分溶解, 再加入正己烷2 mL, 涡旋混匀后于40 °C水浴中静置5 min分层后, 弃去上层有机相; 再用正己烷2 mL, 重复操作一次, 吸取下层溶液适量, 过0.22 μm滤膜后供UPLC-MS/MS测定。

1.2.2 UPLC-MS/MS分析条件 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱, 流动相A相为乙腈, B相为水, 梯度洗脱条件: 0~4 min, 10% A线性变化至60%; 4~6 min, 维持100% A; 6~7.5 min, 维持10% A。流速为0.3 mL/min, 柱温为30 °C, 进样量为10 μL。

电离电压为3.1 kV; 源温为110 °C; 雾化温度为350 °C; 锥孔气流速为50 L/h; 雾化气流速为650 L/h; 多反应监测(MRM)模式采集。各药物的定性、定量离子对、离子源、锥孔电压和碰撞能量如表1所示。

表1 药物定性、定量离子对、离子源、锥孔电压和碰撞能量

药物	定性离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	离子源	锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
FFA	248.1 > 129.9	248.1 > 230.0	ESI+	20	20
	248.1 > 230.0				12
TAP	354.1 > 185.0	354.1 > 290.1	ESI-	35	20
	354.1 > 290.1				12
FF	356.1 > 185.0	356.1 > 336.1	ESI-	30	18
	356.1 > 336.1				10
CAP	321.0 > 151.9	321.0 > 151.9	ESI-	30	18
	321.0 > 257.1				12
CAP-D <sub>5</sub>	326.0 > 156.9	326.0 > 156.9	ESI-	30	18

1.2.3 测定 定性需满足: 空白样品中不出现与阳性对照相同的离子峰; 特征离子色谱峰的信噪比(S/N)都在3:1以上; 试样色谱峰的保留时间,应与校正溶液的相对保留时间一致,容许偏差为 $\pm 2.5\%$ ; 检测到的离子的相对丰度与校正溶液的相对丰度一致,容许偏差满足2002/657/EC中的要求。定量时采用基质匹配标准溶液内标法定量。

## 2 结果与讨论

2.1 样品提取与净化 对于氯霉素类药物的提取,已报道的方法大多采用乙酸乙酯进行提取<sup>[1-6]</sup>,然后再做进一步净化。本方法采取直接用碱化乙酸乙酯提取的方法,再用正己烷去除脂肪等杂质,省去了固相萃取净化步骤,同时采用同位素内标法定量,具有操作步骤少、有机溶剂消耗少、测定周期短等优点,而且能同时对氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及其代谢产物氟苯尼考胺进行多残留检测。

2.2 UPLC-MS/MS条件优化 实验首先采用 $1\mu\text{g/mL}$ 的氟苯尼考胺标准溶液在电喷雾正离子模式下进行母离子全扫描,确定其质子化分子离子 $[M+H]^+$ ;再用 $1\mu\text{g/mL}$ 的甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素标准溶液在电喷雾负离子模式下进行母离子全扫描,确定其质子化分子离子 $[M-H]^-$ ,然后以这些分子离子作为母离子对其子离子进行全扫描,最后选取丰度较强的两对离子,优化其锥孔电压、碰撞能量等质谱参数。

采用正离子模式进行质谱采集时,通常需在溶液中加入甲酸使分析物容易质子化而带上正电荷,但是使用甲酸后甲砒霉素、氟苯尼考和氯霉素的负离子模式采集会受到抑制。本试验发现,以乙腈和水作为流动相,各组分均能得到较好的分离,在质谱上均有较强的响应,并且峰形好看,和已有报道现象相同<sup>[3,6]</sup>。

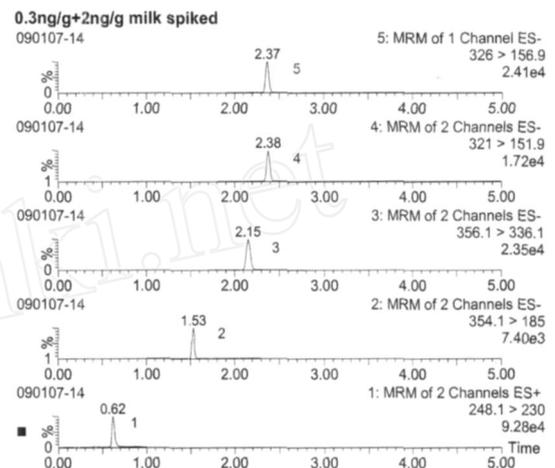
2.3 标准曲线 在本方法所确定的条件下,以测试药物和内标的特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标,基质匹配标准溶液浓度为横坐标做图,发现各药物均呈良好线性关系,相关系数 $r$ 均大于0.990(表2)。

2.4 方法添加回收率、精密度和灵敏度 采用在空白组织中添加目标化合物的方法,依据特征离子色谱峰信噪比 $S/N > 3$ 为方法检测限, $S/N > 10$ 为方法定量限,测得氯霉素的检测限为 $0.1\mu\text{g/kg}$ ,定量限为 $0.2\mu\text{g/kg}$ ;甲砒霉素、氟苯尼考及氟苯尼考

胺的检测限为 $0.5\mu\text{g/kg}$ ,定量限为 $1\mu\text{g/kg}$ ,空白牛奶中添加各药物后得到的特征离子质量色谱图如图2所示。

表2 药物标准曲线和相关系数

药物	回归方程	相关系数( $r$ )
FFA	$y = 1.2738x - 5.3537$	0.9997
TCP	$y = 0.0181x + 0.1233$	0.9996
FF	$y = 0.0887x + 0.4175$	0.9990
CAP	$y = 0.1028x + 0.8375$	0.9992



1. FFA; 2. TAP; 3. FF; 4. CAP; 5. CAP-D<sub>5</sub>

图2 空白牛奶中添加 $0.3\text{ ng/g}$ 氯霉素和 $2\text{ ng/g}$ 甲砒霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺得到的特征离子质量色谱图(含 $0.6\text{ ng/g}$ 氯霉素-D<sub>5</sub>)

在空白牛奶中添加低、中、高三个不同浓度的药物进行回收率试验,每一浓度做3批,每批做5个平行样品,结果汇总如表3所示。可以看出,各药物的平均回收率均为 $70\% \sim 120\%$ ,批内、批间RSD均小于 $20\%$ 。另外,通过进一步方法学考察发现该方法也同时适用于猪肝、猪肉等样品,其准确度和精密度均能满足有关法规的要求。

## 3 结论

本研究建立了牛奶、猪肝和猪肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺残留检测的UPLC-MS/MS分析方法,通过对仪器色谱条件和质谱条件各项参数的调谐以及对样品前处理条件的充分优化改进,使得方法的灵敏度、精确度均能满足兽药残留分析方面的要求。本方法具有快速简便、灵敏度高、可以进行氯霉素类药物多残留检测等优点。

表 3 空白牛奶中药物添加回收率实验结果 (n = 5)

药物	添加浓度	回收率	批内 RSD	批间 RSD
FFA	1	90.2	8.0	9.3
	2	92.7	5.4	6.0
	50	95.6	9.4	6.7
TCP	1	80.9	10.3	11.1
	2	86.6	8.4	7.7
	50	92.1	7.5	8.0
FF	1	89.5	9.2	6.4
	2	94.5	8.7	6.3
	50	98.7	10.1	7.0
CAP	0.2	95.6	11.6	10.3
	0.3	98.9	6.8	6.5
	1	102.3	9.2	6.9

## 参考文献:

- [1] 王树槐, 门立强, 孙 雷, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法检测猪肝组织中氯霉素残留的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2007, 41 (10): 18 - 21.
- [2] 孙丰云, 张素霞, 沈建忠, 等. 虾肉中氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺残留气相色谱 - 微电子捕获检测法 [J]. 中国兽医杂志, 2006, 42 (10): 66 - 68.
- [3] 陈小霞, 岳振峰, 吉彩霞, 等. 高效液相色谱 - 电喷雾电离三级四级杆质谱测定鸡肉中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素的残留量 [J]. 色谱, 2005, 23 (1): 92 - 95.
- [4] Pfenning Allen P, Roybal Jose E, Rupp Heidi S, et al. Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Florfenicol, Florfenicol Amine, and Thiamphenicol in Shrimp Tissue by Gas Chromatography with Electron Capture Detection [J]. Journal of AOAC International, 2000, 83 (1): 26 - 30.
- [5] Ramos M, Munoz P, Aranda A, et al. Determination of Chloramphenicol Residues in Shrimps by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry [J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 791 (12): 31 - 38.
- [6] Jeffery M van de Riet, Ross A Potter, Melissa Christie Fougere, et al. Simultaneous Determination of Residues of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine in Farmed Aquatic Species by Liquid Chromatography - Mass Spectrometry [J]. Journal of AOAC International, 2003, 86 (3): 510 - 514.

## 合理使用兽药 保障畜产品安全

## 1. 不使用过期和淘汰的兽药

凡规定有效期的兽药,期满后,效价即降低或失效。不同的兽药有不同的有效期,例如硫酸抗敌素注射液、汞撒利茶碱注射液、复合维生素 B 注射液、麦角流浸膏、淀粉酶等有效期为 1 年。在使用中,要注意兽药的生产日期和有效期,凡过期者不得使用。为了保证畜禽用药安全,早在 1982 年原农牧渔业部曾以 (82)农(牧)字第 83 号文件,列指了被淘汰禁用的兽药品种共 100 余种,继续使用这些已淘汰的兽药,不但影响畜禽疫病防治的效果,而且会造成严重的经济损失,因此,兽药使用者要掌握哪些药是已被淘汰品种,不要使用这些品种。

## 2 熟悉兽药的特性,合理调配使用

因青霉素、链霉素在酸性、碱性环境中均极易被破坏,所以在给畜禽用青霉素、链霉素时,应避免饲喂呈酸性、碱性的饲料,饲料添加剂和药物,如青贮饲料和酒糟;胆碱、维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>6</sub> 等饲料添加剂;四环素类、磺胺类、巴比妥类、肾上腺类等药物。

四环素类药物:四环素类药物因可与钙、镁等元素结合成不能被吸收利用的络合物,使药物的药效降低或丧失,故使用四环素类药物时,应忌喂富含钙、镁等元素的饲料、饲料添加剂和药物。如黑豆、大豆、饼粕等饲料;石粉、骨粉、蛋壳粉、石膏等饲料添加剂;碳酸钙、磷酸氢钙、葡萄糖酸钙、氯化钙等补钙药物。

磺胺类药物:因硫会加重磺胺类药物对血液的毒性,引发硫络血红蛋白血症,所以在用磺胺类药物时应忌喂含硫的饲料添加剂和药物,如人工盐、硫酸镁、硫酸钠、石膏、硫酸亚铁等。

维生素类药物:因维生素类药物多为酸性,故不能与碱性较强的饲料添加剂和药物同时使用,如胆碱、碳酸钙、磺胺类药物。另外,硫酸亚铁、氯化亚铁、硫化亚铁也不能与维生素类同时使用,否则,此类饲料添加剂会加速维生素类药物的氧化破坏过程。还应注意:防治畜禽维生素 A 缺乏症时,应忌喂棉籽饼,它会影响维生素 A 的吸收。

葡萄糖酸钙、氯化钙、磷酸氢钙等补钙药:应忌与强心苷合用,忌喂麸皮、菠菜等饲料和胆碱饲料添加剂。因强心苷、胆碱等碱性较强,而钙在酸性环境中易吸收,在碱性环境中吸收很少。(下转第 49 页)