

陈晓兰,陈 未,王帅兵,等. HPLC-MS/MS法测定鸭肉中氯霉素类药物残留[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):316-319.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.098

HPLC-MS/MS法测定鸭肉中氯霉素类药物残留

陈晓兰^{1,2}, 陈 未¹, 王帅兵¹, 蒋春茂^{1,2}

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省动物药品工程技术研究中心, 江苏泰州 225300)

摘要:现有动物性食品中氯霉素类药物残留检测前处理方法较为复杂,为简化样品分析方法,建立简单的样品前处理方法和HPLC-MS/MS方法,以同时检测鸭肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考残留。以50%乙腈制备组织匀浆液,向匀浆液中添加对照药物后采用乙腈去蛋白,高速离心,选择0.1%乙酸和乙腈-甲醇(1:1)为流动相,以0.5 mL/min流速梯度洗脱,LC-MS/MS电喷雾电源(ESI),负离子,选择多反应监测(MRM)模式检测,并对所建立的方法进行方法学验证。在所建立的样品前处理和色谱条件下,3种目标化合物在3 min内实现同时分离,标准工作曲线在0.025~5.000 $\mu\text{g/g}$ 范围内线性良好, r^2 为0.995 8~0.997 6。最低检测限均为2.5 ng/g,最低定量限为25 ng/g。在添加量为20、50、100 ng/g的水平下,平均回收率为93.26%~97.25%,RSD为0.47%~1.83%。本试验采用较为简单的乙腈蛋白沉淀法,操作简易,过程提取回收率高,可大幅提高样品前处理的效率,在所建立的色谱条件下检测灵敏度大幅提高。该方法简易可行,能满足国际氯霉素类药物残留检测的要求。

关键词:HPLC-MS/MS;氯霉素;甲砒霉素;氟苯尼考;鸭肉;残留

中图分类号:TS207.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0316-04

动物源食品(肉、蛋、奶、水产及其制品)的安全是全世界关注的焦点,其中兽药残留问题是影响动物源食品安全的重要因素之一^[1]。氯霉素类药物属于广谱抗生素,对革兰氏阴性及阳性细菌均有抑制作用,主要包括氯霉素(chloramphenicol, CAP)、甲砒霉素(thiamphenicol, TAP)、氟苯尼考(florfenicol, FF)等。氯霉素可抑制人类骨髓的造血功能,引起再生障碍性贫血,在美国、欧盟及我国均被禁用于食品动物,同时规定了禽肉中甲砒霉素、氟苯尼考的最高残留限量分别为50、100 ng/g。目前,氯霉素类药物残留的检测方法主要有微生物法^[2]、酶联免疫法^[3]、共振生物传感器法^[4]、气相色谱法^[5]、液相色谱法^[6]、超高效液相色谱法^[7]、气相色谱-质谱

法^[8]、液相色谱-质谱法^[9]、超高效液相色谱-串联质谱法^[10-12]等。

目前,动物性食品中氯霉素类及其代谢物的残留检测前处理方法较为传统,药物与杂质间分离度差,且复杂的前处理程序影响了样品回收率。如何简化前处理方法是目前该类药物检测中亟待解决的关键问题。仅采用HPLC技术或GC技术已无法满足多残留检测的要求,且其在鸭肉残留检测方法中的应用尚未见国内外报道。鉴于此,本研究拟将快速溶剂萃取(ASE)技术应用于样品前处理,采用HPLC-MS/MS法建立快速、简易、高灵敏、高通量的禽肉中氯霉素类及其代谢物的多残留快速检测技术,为兽药残留监控体系的建立和完善提供先进的技术资料,对于我国动物性食品出口贸易更好地与国际接轨、保障人类健康具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

氯霉素对照品购自中国食品药品检定研究所,批号为

Gracilaria cornea[J]. Carbohydrate Polymers, 2002, 49(4): 491-498.

[13]李璐磊,赵 珺,李 丹,等. 冬虫夏草深层发酵胞外和蛹虫草子实体抗氧化活性的对比研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 75-79.

[14]Shen J W, Yu H Y, Huo Y F, et al. Purification of polysaccharide of *Phaeoportun obliquus* and the bioactivity of purified fractions[J]. Mycosystema, 2009, 28(3): 564-570.

[15]Xie L Y, Zhang Y, Peng W H. Immune function and antioxidant activity of intracellular polysaccharides from *Phellinus baumii*[J]. Food Science, 2011, 32(9): 276-281.

[16]Li Z P, Wu P, Wu S Q. Study on antioxidant activity of *Ganoderma applanatum* intracellular polysaccharides[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(6): 108-110.

收稿日期:2015-11-16

基金项目:江苏省泰州市社会发展项目(编号:TS032)。

作者简介:陈晓兰(1979—),女,江苏海安人,博士,讲师,主要从事新药研究。E-mail:cxl7972563@163.com。

通信作者:蒋春茂,博士,教授,主要从事新兽药研究。E-mail:cmj109@126.com。

[8]Smirnoff N, Cumbes Q J. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes[J]. Phytochemistry, 1989, 28(4): 1057-1060.

[9]Oyaizu M. Antioxidative activity of browning products of glucosamine fractionated by organic solvent and thin layer chromatography[J]. J Soc Food Sci, 1986, 35(11): 771-775.

[10]Zou X. Quick isolation and purification of extracellular polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill and elementary property analysis[J]. Food Science, 2005, 17(4): 14.

[11]Liu X, Zhao M. Antioxidant activities and functional composition content of selected *Phyllanthus emblica* fruits juice[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(5): 151-154.

[12]Melo M S, Feitosa J A, Freitas A P, et al. Isolation and characterization of soluble sulfated polysaccharide from the red seaweed

130555-201203。甲砒霉素对照品购自中国兽医药品监察所,批号为 k0240706。氟苯尼考对照品购自中国兽医药品监察所,批号为 k0301305。7-羟基双香豆素标准品购自 Sigma-Aldrich 公司,批号为 STBD2336V。氯霉素原料药购自郑州津北化工有限公司。甲砒霉素粉(5%)、氟苯尼考粉(10%)均购自江苏中牧倍康药业有限公司。乙腈为色谱纯,购自 Fisher scientific 公司。二甲基亚砜(DMSO)为色谱纯,购自国药集团化学试剂有限公司。乙酸为色谱纯,购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 仪器与设备

API4000 Q-trap 型三重四级杆/离子阱质谱仪,包含电喷雾电离源(ESI 源)(美国应用生物系统公司);1200 系列高效液相色谱系统(美国安捷伦科技有限公司);CTC PAL 型自动进样器(CTC Analytics, AG, 瑞士);FA25 型高速匀浆机(Fluko 公司)。

1.3 试验动物及处理

雏鸭购自江苏省海安县某孵化场,选择无抗饲料饲养至 30 日龄。将鸭分为 2 组,其中一组给以氯霉素原料药、甲砒霉素粉、氟苯尼考粉,均按说明书剂量拌料给药,连用 3 d;另一组为对照组,不给以任何药物。分别在给药后 3 d 将其剖杀,取各组肌肉,于 -20 ℃ 保存备用。

1.4 试验方法

1.4.1 系列标准工作溶液的配制 精确称取适量氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考标准品,分别置于 20 mL 容量瓶中,采用 DMSO 溶解并定容,超声促溶,充分摇匀,配制成 1 mg/mL 的标准储备液。采用移液枪各取 100 μL 标准储备液于 700 μL 乙腈中,配制成 100 μg/mL 的混合作液。采用乙腈梯度稀释至 5.000、2.000、1.000、0.500、0.200、0.100、0.050、0.025 μg/mL 的混合系列标准工作溶液。

1.4.2 内标工作溶液的配制 精确称取适量 7-羟基双香豆素标准品,置于 10 mL 容量瓶中,采用 DMSO 溶解并定容,超声促溶,充分摇匀,配制成 2 mg/mL 的标准储备液。采用乙腈稀释至 200 ng/mL,储存备用。

1.4.3 空白肌肉匀浆液 称取一定量的鸭空白肌肉样品,剪碎,加入 10 倍体积的 50% 乙腈,将样品置于冰浴,采用高速

匀浆机进行匀浆处理,得到均一的匀浆液。

1.4.4 标准工作曲线的前处理 取 5 μL 系列标准工作液(5.000、2.000、1.000、0.500、0.200、0.100、0.050、0.025 μg/mL)加入至 50 μL 空白肌肉匀浆液中,涡旋振荡 30 s,加入 150 μL 内标工作溶液,涡旋振荡 3 min,使蛋白充分沉淀;于 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 10 min,取 150 μL 上清液加入至 150 μL 超纯水中,混合均匀后待进样。标准曲线的系列浓度为 2.50、5.00、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 ng/mL;肌肉匀浆为 10 倍体积匀浆液,因此在肌肉中的定量范围为 25.0、50.0、100.0、200.0、500.0、1 000.0、2 000.0、5 000.0 ng/g。

1.4.5 给药鸭肌肉样品前处理 取给药鸭肌肉匀浆液 50 μL,加入 5 μL 乙腈,使其与空白添加样品(标准曲线)的基质保持一致;加入 150 μL 含内标的乙腈,涡旋振荡 3 min,于 4 ℃、14 000 r/min 条件下离心 10 min,取 150 μL 上清液加入至 150 μL 超纯水中,混合均匀后待进样。

1.4.6 HPLC 色谱条件 采用 CAPCELLPAK 型色谱柱(MG, 50 mm×2.0 mm, I.D. 5 μm)(日本资生堂),流动相 A 为 0.1% 乙酸,流动相 B 为乙腈-甲醇(体积比 1:1),进样体积为 10 μL,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

序号	时间 (min)	流速 (μL/min)	A 相 (%)	B 相 (%)
1	0.00	500	95.0	5.0
2	0.20	500	95.0	5.0
3	2.00	500	5.0	95.0
4	3.00	500	5.0	95.0
5	3.10	500	95.0	5.0
6	4.50	500	95.0	5.0

质谱条件:采用电喷雾离子源(ESI),应用负离子模式,检测方式为多反应监测(MRM)。质谱离子源参数分别为 CUR 40.00、CAD-2.00、IS-4 500.00、TEM 400.00、GS1 40.00、GS2 50.00、ihe ON。化合物质谱参数见表 2。采用 Analyst 1.4.2 质谱采集与分析软件。

表 2 化合物质谱参数

化合物	母离子/子离子	电压(V)			
		去簇	碰撞	射入	射出
甲砒霉素	<i>m/z</i> 353.9/289.8	-80	-18	-10	-13
氯霉素	<i>m/z</i> 320.9/256.9	-80	-16	-10	-11
氟苯尼考	<i>m/z</i> 509.4/450.4	-85	-14	-10	-13
7-羟基双香豆素(内标)	<i>m/z</i> 161/133	-70	-28	-10	-9

1.4.7 加标回收率 在空白鸭肉中,分别添加 25、50、100 g/kg 质量浓度水平的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考对照品,每个质量浓度水平设 3 个平行试验,计算 3 种物质的加标回收率和相对标准偏差(RSD)。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的平均分子量分别为 323.13、356.22、358.20,这 3 个化合物均含有 2 个 Cl⁻ 离子。

Cl 在自然界中有 2 种同位素,即³⁵Cl、³⁷Cl,其分子量分别为 34.969、36.966,丰度分别为 75.77%、24.23%。为获得更高的灵敏度,以含³⁵Cl 的化合物作为目标化合物进行检测,经计算,含³⁵Cl 的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的准确分子量分别为 322、355、357。

预先配制 50、100、150 ng/mL 质量浓度的氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考标准溶液,以流动注射的方式在负离子模式下进行一级质谱母离子全扫描,分子离子 *m/z* 分别为 320.9、353.9、355.9,其中 50 ng/mL 分子离子的响应在 10⁶ cps 附

近,即为最佳优化质量浓度。以 50 ng/mL 质量浓度在负离子模式下进行自动优化,以确定最高响应二级离子 m/z 以及相应的 DP、CE、CXP 参数(表 2)。最终优化 ESI 源的碰撞电压、离子化温度、气帘气等参数。

2.2 色谱条件的优化

氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考均为弱极性化合物,极易溶解于甲醇、乙腈。本研究以含 0.1% 乙酸作为水相,0.1% 乙酸能促进分子的电离,大幅增强检测信号的强度;以等比例甲醇-乙腈作为有机相,随着有机相比比例的提高,目标物保留时间缩短,但分离效果较差,如果有有机相比比例过低,其色谱峰较宽,灵敏度将随之降低。等度洗脱要将 3 个目标化合物同时分离,单个样品的检测时间较长,因此最终选择梯度洗脱,可在较短时间内将 3 个化合物很好地分离,同时提高了分析效率及检测灵敏度。

2.3 样品的提取

在动物组织样品中,氯霉素类药物的常用提取溶剂为乙腈、甲醇、丙酮、二氯甲烷、乙酸乙酯等。本试验采用较为简单的乙腈蛋白沉淀法,过程提取回收率约为 95%,符合要求且步骤简单,可大幅提高样品前处理的效率。

2.4 方法的线性范围、定量限和检测限

标准工作曲线的处理见“1.4.4”节,进样 10 μL 。在本方法所确定的试验条件下,采用 Analyst 1.4.2 软件进行数据的采集与分析。将各待测化合物和内标峰面积的比值与理论浓度采用一元二次回归方程(quadratic)拟合,得到权重因子为 $1/x^2$ 。氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的线性方程、相关系数、线性范围见表 3,回归曲线见图 1、图 2、图 3。氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的定量下限均为 25 ng/g,定量下限的信噪比分别为 77.2、53.5、320.4(图 4、图 5、图 6),符合信噪比(R_{SN}) > 10 作为定量下限的要求。当信噪比为 3 时,最低检测限分别为 2.50、2.50、1.25 ng/g。

表 3 回归方程、相关系数和线性范围

药物	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g/L}$)
氯霉素	$y = -4.82 \times 10^{-7}x^2 + 0.000\ 736x + 0.000\ 15$	0.997 9	2.50 ~ 500.00
甲砒霉素	$y = -4.94 \times 10^{-7}x^2 + 0.000\ 746x + 0.000\ 22$	0.998 4	2.50 ~ 500.00
氟苯尼考	$y = -1.42 \times 10^{-6}x^2 + 0.002\ 400x - 0.000\ 151$	0.998 8	2.50 ~ 500.00

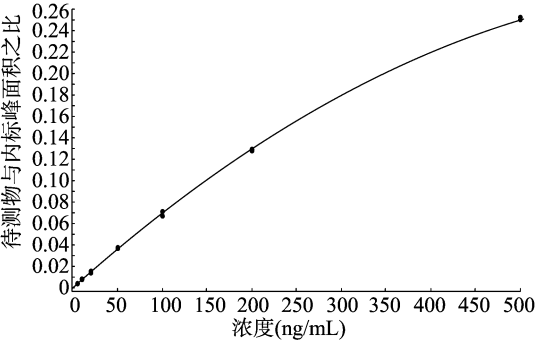


图1 氯霉素标准曲线

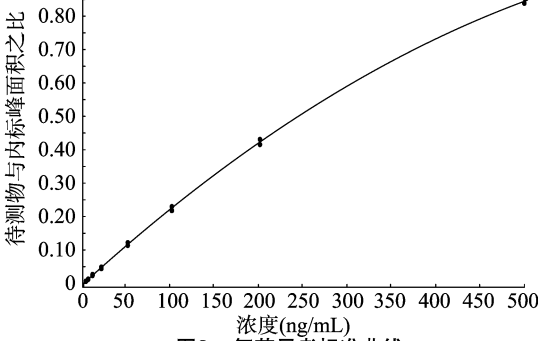


图3 氟苯尼考标准曲线

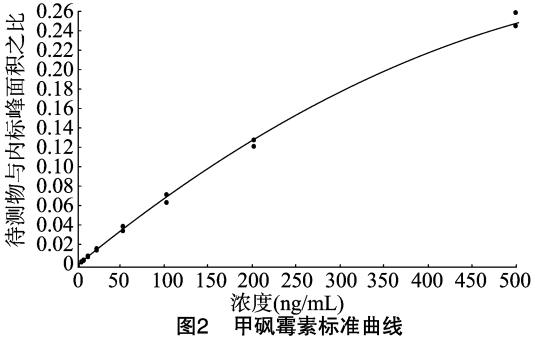


图2 甲砒霉素标准曲线

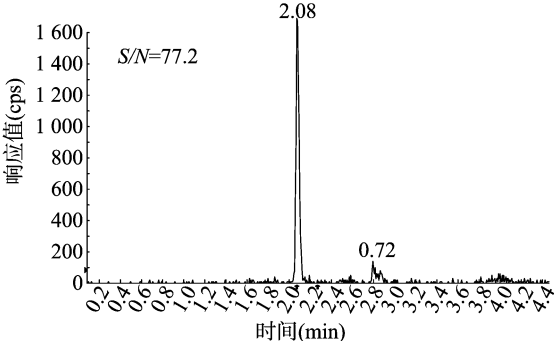


图4 氯霉素定量下限的信噪比

2.5 加标回收率

3 种药物在 20、50、100 $\mu\text{g/kg}$ 添加水平下的平均回收率为 93.26% ~ 97.25%, RSD 为 0.47% ~ 1.83%(表 4)。可见,本方法可满足鸭肉中同时检测氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的要求。

2.6 给药动物肌肉中药物浓度的测定

给药样品经处理后进样,通过 Analyst 1.4.2 软件计算,

肌肉样品中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的平均浓度分别为 735、1 470、1 540 ng/g(图 7)。

3 结论与讨论

本研究建立了应用 HPLC-MS/MS 检测禽肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考残留的检测方法,采用负离子选择反应监测模式同时检测 3 种化合物。本方法仅取 0.5 ~ 1.0 g 样品,

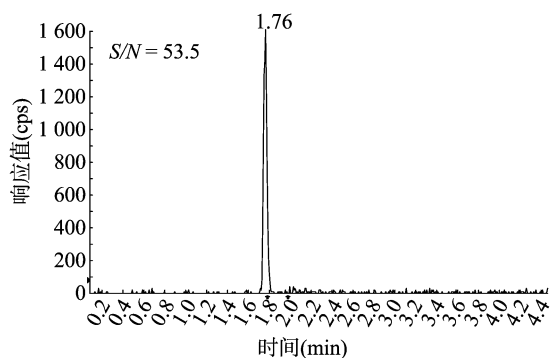


图5 甲砒霉素定量下限的信噪比

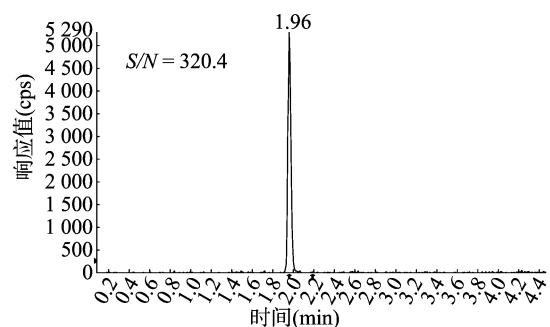


图6 氟苯尼考定量下限的信噪比

表4 氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考的加标回收率

添加药物	加标质量浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率 (%)	RSD (%)
氯霉素	25	94.33	1.52
	50	96.72	
	100	97.15	
	平均	96.07	
甲砒霉素	25	93.26	1.83
	50	94.52	
	100	96.87	
	平均	94.88	
氟苯尼考	25	96.34	0.47
	50	97.25	
	100	96.99	
	平均	96.86	

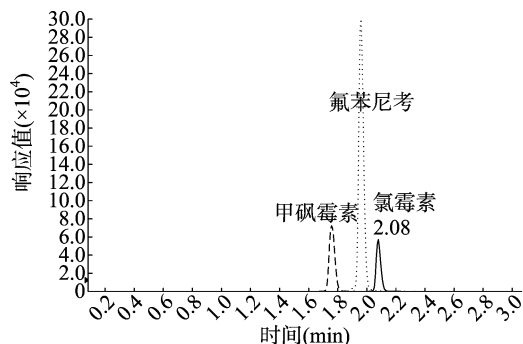


图7 给药后鸭肌肉中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考残留

经50%乙腈高速匀浆后,取50 μL 匀浆样品,加入5 μL 乙腈,以7-羟基双香豆素为内标。无需脱脂和固相萃取等操作,且无需氮吹浓缩。该方法简单易行,出峰时间为1~3 min,分析快速,且方法的最低检测限低于国家氯霉素类残留最低检测限(100 ng/g)。该方法的回收率和准确率高,完全可满足禽肉中氯霉素类药物的残留确证。

有关鸭肉中氯霉素类药物残留检测的报道很少,但在其他有关动物组织中,氯霉素类药物残留检测方法的报道很多。陶昕晨等采用 HPLC-MS/MS 建立虾肉和猪肉中氯霉素类药物的多残留检测方法,以2%碱性乙酸乙酯提取,其平均回收率为78.17%~99.86%,但保留时间为2.63~3.72 min^[13];本试验的分析时间更短,仅为1~2 min,且样品处理方法更为简单。

参考文献:

- [1] 聂芳红,徐晓彬,陈进军. 食品动物兽药残留的研究进展[J]. 中国农学通报,2006,22(9):71-75.
- [2] 王亚群,王静雪,林洪,等. 发光细菌法检测水产品中氯霉素体系的建立[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2009,39(1):66-70.
- [3] 何佳琪,段振娟,张燕,等. 氯霉素残留 ELISA 检测方法[J]. 中国兽医杂志,2008,44(2):88-89.
- [4] Dumont V, Huet A C, Traynor I, et al. A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florefenicol, florefenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps[J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 567(2):179-183.
- [5] 王建华,陈世山. 同时测定鱼肉中氯霉素和甲砒霉素残留量的毛细管气相色谱法[J]. 分析测试学报,2001,20(3):89-91.
- [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、氟甲砒霉素残留[J]. 福建分析测试,2005,14(1):2112-2113.
- [7] 占春瑞,郭平,陈振桂,等. 超高效液相色谱法测定水产品中甲砒霉素和氟甲砒霉素残留[J]. 分析化学,2008,36(4):525-528.
- [8] 魏林阳,徐金品,吴红军. 水产品中氯霉素残留的气质联用法检测[J]. 光谱实验室,2007,24(2):201-205.
- [9] 周萍,胡福良,巩珊,等. 液液萃取法结合高效液相色谱-串联质谱测定蜂王浆中的氯霉素残留量[J]. 食品科学,2008,29(5):341-343.
- [10] 孙雷,张骊,王树槐,等. 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[J]. 中国兽药杂志,2009,43(3):42-45.
- [11] 栗阳,和顺琴,薛景娇,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的氯霉素残留[J]. 畜牧与饲料科学,2010,31(8):91-92.
- [12] 任佳,郑小平,黄菲菲,等. UPLC-MS/MS 法测定乳制品中的氯霉素类药物[J]. 食品与机械,2011,27(4):75-77.
- [13] 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):232-237.