

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.12.08

超高效液相色谱-串联质谱法快速测定禽蛋中氯霉素、氟苯尼考及其代谢物残留

曾 勇,董文婷,龚 波,周 青,金 灵

(湖北省兽药监察所,武汉 430070)

[收稿日期] 2017-06-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 12-0042-05 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了快速测定禽蛋中氯霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺的超高效液相色谱-串联质谱分析方法。禽蛋用乙腈提取后,正己烷液液萃取除脂,浓缩后超高效液相色谱分离,以乙腈和 10% 甲醇水为流动相进行梯度洗脱,MRM 反应监测模式检测。结果表明在 5~200 $\mu\text{g/L}$ 的系列浓度范围内均呈良好线性关系,相关系数均大于 0.999。氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺的检测限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 2.0 $\mu\text{g/kg}$,在 2~20 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内平均回收率为 60%~100%,精密度小于 20%。该方法方便快捷、定性准确,适于禽蛋中的氯霉素、氟苯尼考及氟苯尼考胺药物残留检测。

[关键词] 禽蛋;氯霉素类药物;残留;超高效液相色谱-串联质谱

Rapid Determination of Chloramphenicol, Florfenicol and Its Metabolites in Poultry Eggs by UPLC-MS/MS

ZENG Yong, DONG Wen-ting, GONG Bo, ZHOU Qin, JIN Ling

(Hubei Institute of Veterinary Drug Control, Wuhan 430070, China)

Abstract: A UPLC-MS/MS method was developed and established to rapidly determine chloramphenicol, florfenicol and florfenicol-amine in poultry eggs. The eggs were extracted with acetonitrile and then separated by n-hexane liquid. After enrichment, the samples were separated by UPLC, eluted with acetonitrile and 10% methanol as the mobile phase and the MRM reaction was monitored. The results showed that there was a good linearity in the range of 5~200 $\mu\text{g/L}$, and the correlation coefficients were more than 0.999. The detection limit of the chloramphenicol, florfenicol and florfenicol-amine was 0.5 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantification was 2 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries were 60%~100% in the range of from 2 $\mu\text{g/kg}$ to 20 $\mu\text{g/kg}$, and the precision was less than 20%. The method was convenient, rapid, accurate and it was suitable for the detection of chloramphenicol in poultry eggs.

Key words: poultry eggs; chloramphenicol; residues; UPLC-MS/MS

禽蛋是人们日常生活中重要的优质食品,特别是鸡蛋的蛋白质含量高,而且富含胆固醇,具有较高的营养价值。但蛋鸡饲养密度大,多发疾病,在疾病预防和治疗过程中,由于兽医临床不遵守休药期使用,极易造成鸡蛋中的药物残留,这些残留会直接损害消费者的健康,还会导致细菌的耐药性等等。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,氟苯尼考是动物专用抗菌药,其结构和氯霉素相似,在安全性和有效性方面比氯霉素有明显优势,其主要代谢产物为氟苯尼考胺^[1]。农业部公告第 235 号规定氯霉素为禁止使用的药物,在动物性食品中不得检出,氟苯尼考为产蛋期禁用药物,而我国目前国家检测标准中只涉及水产品、蜂蜜以及动物肌肉组织中氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺单个或两种药物残留检测方法^[2-4],还未建立蛋品中同时检测氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺残留检测方法。本方法拟建立禽蛋中氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺残留量的液相色谱-串联质谱法,以期为禽蛋中氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺药物残留的监控提供灵敏度高、简便快速的检测技术,对兽药残留监控具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源 Acquity UPLC-Quattro Premier XE 质谱联用仪, Waters 公司; AE260 电子天平, Mettler Toledo 公司; 冷冻高速离心机, Sigma 公司; 涡旋混合器; 振荡器; 氮吹仪。氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺对照品均来自德国 DR 公司; 乙腈为色谱纯; 甲醇为色谱纯; 正己烷为分析纯; 实验用水为 Milli-Q 高纯水。

1.2 标准溶液配制 精密称取氯霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺对照品约 10 mg 置于 100 mL 容量瓶中, 分别用甲醇溶解并稀释定容至刻度, 此溶液浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。分别准确量取 1.00 mL 氯霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 混匀即得 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合工作液。

1.3 样品处理 称取 5 g(精确至 0.01 g) 试样, 置于 50 mL 塑料离心管, 加入 10 mL 乙腈, 于涡旋混合器上涡旋 1 min, 水平振荡 5 min, 以 10000 r/min 离心 10 min, 取上清液转移至另一离心管中, 样品残渣再加入 10 mL 乙腈重复提取一次, 合并上清液。提取液用 10 mL 正己烷涡旋混匀, 以 10000 r/min 离心 5 min, 弃去上层正己烷, 下层再用正己烷重复操作一次, 取下层乙腈在 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮吹至近干, 准确加入 1 mL 水溶解残渣, 涡旋 1 min, 转入 1.5 mL 离心管中, 以 12000 r/min 离心 5 min, 经过 0.22 μm 滤膜, 供超高效液相色谱-串联质谱测定。

2 UPLC-MS/MS 分析

2.1 超高效液相色谱条件 色谱柱: waters Xbridge C18 柱(3.5 μm , 2.1 mm \times 150 mm); 流动相: A: 乙腈, B: 10% 的甲醇水溶液, 梯度洗脱: 0~3 min, 5% A~40% A, 3~4 min, 40% A~95% A, 4~6 min, 95% A~5% A, 流速 0.3 mL/min; 进样量 10 μL ; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 质谱条件 电喷雾离子源 ESI(+); 扫描方式: 正离子扫描(氟苯尼考胺)和负离子扫描(氟苯尼考和氯霉素); 毛细管电压: 3.0 kv; 离子源温度: 110 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂流量: 800 L/h; 多反应监测(MRM 采集模式)。各种药物的定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 1。

2.3 标准曲线 精密量取一定量的氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺混合标准工作液, 用空白样品提取液分别配成浓度为 5, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 系列基质标准工作溶液, 使用时现用现配。每个浓度重复三次, 将测得的峰面积与对应浓度拟合, 绘制标准曲线, 求回归方程和相关系数(表 2)。

2.4 方法的灵敏度、准确度和精密度 采用空白试样中添加目标化合物的方法, 经实验得到特征离子色谱峰信噪比大于或等于 3 的最低浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 即方法的检测限。信噪比大于或等 10 的最低浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 即方法的定量限。空白禽蛋中添加各药物后得到的特征离子质量色谱图如图 1 所示。

表 1 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

Tab 1 Qualitative ion pair, quantification ion pair and Collision energy

化合物名称 Compound Name	定性离子对 (<i>m/z</i>) Qualitative ion pair	定量离子对 (<i>m/z</i>) quantification ion pair	锥孔电压/V Cone	碰撞能量/eV Collision
氯霉素 chloramphenicol	320.6>151.7	320.6>151.7	30	18
	320.6>256.8		30	12
氟苯尼考 florfenicol	355.7>184.7	355.7>335.7	30	18
	355.7>335.7		30	10
氯霉素-D ₅ chloramphenicol-D ₅	325.6>156.8	325.6>156.8	30	18
氟苯尼考胺 florfenicol-amine	248>130	248>130	25	25
	248>230		25	12

表 2 标准曲线方程

Tab 2 Standard curve equation

药物 Drug	标准曲线方程 Standard curve equation	线性范围/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Linear range/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	相关系数/R Correlation coefficient/R
氯霉素 chloramphenicol	$y = 81.22x + 278.55$	5~200	0.9989
氟苯尼考 florfenicol	$y = 119.72x + 607.79$	5~200	0.9985
氟苯尼考胺 florfenicol-amine	$y = 69.25x - 343.90$	5~200	0.9992

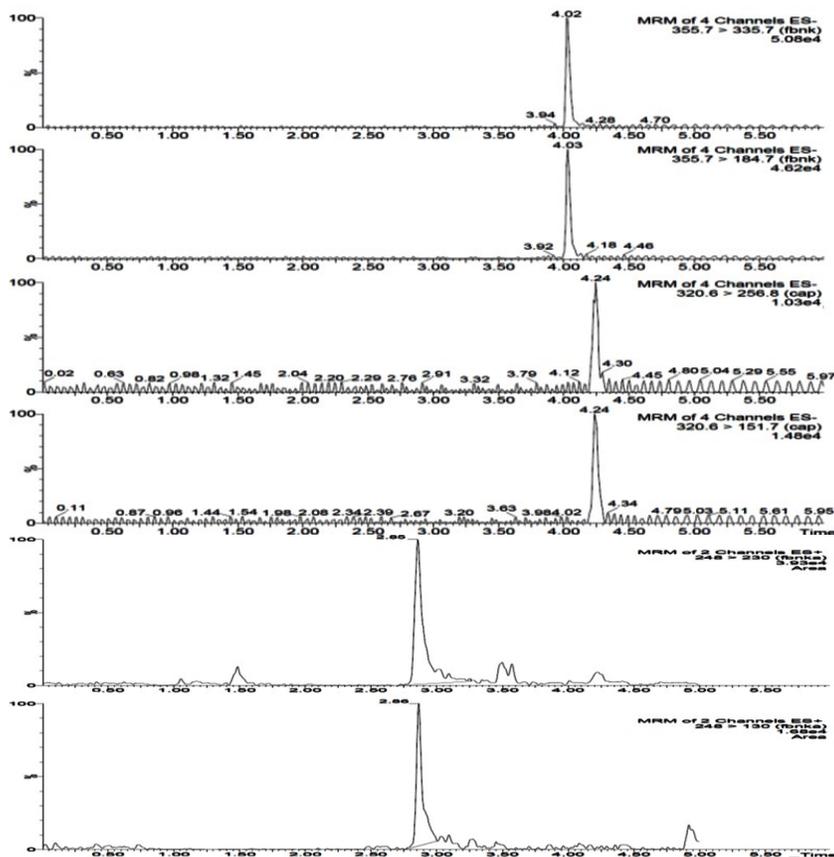


图 1 空白鸡蛋中添加 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺的特征离子质量色谱图

Fig 1 Characteristic ion mass chromatogram of chloramphenicol, florfenicol and florfenicol amine 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ added in blank eggs

在空白禽蛋中添加 2.0、4.0、20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个不同浓度的药物进行回收率试验,每个浓度进行 5 个平行试验,重复进行 3 次,鸡蛋结果见表 3,鸭蛋结

果见表 4。本方法在 2~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内,添加浓度的回收率为 60%~100%。批内相对标准偏差 $\leq 20\%$,批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

表 3 鸡蛋中添加药物回收率及精密度测定结果

Tab 3 Recovery rate and precision of the drugs added in eggs

药物名称 Drug	添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ Additive concentration	回收率平均值/% Average recovery rate	批内 RSD($n=5$)/% Intra assay	批间 RSD($n=3$)/% Inter assay
氯霉素 chloramphenicol	2.0	75.9	7.8	8.6
	4.0	75.6	5.5	8.0
	20.0	75.2	6.8	9.6
氟苯尼考 florfenicol	2.0	78.2	6.1	7.1
	4.0	79.2	4.0	4.0
	20.0	78.8	5.2	5.1
氟苯尼考胺 florfenicol-amine	2.0	69.0	5.3	6.7
	4.0	69.7	3.6	3.5
	20.0	66.1	5.0	5.3

表 4 鸭蛋中添加药物回收率及精密度测定结果

Tab 4 Recovery rate and precision of the drugs added in duck eggs

药物名称 Drug	添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ Additive concentration	回收率平均值/% Average recovery rate	批内 RSD($n=5$)/% Intra assay RSD	批间 RSD($n=3$)/% Inter assay RSD
氯霉素 chloramphenicol	2.0	77.4	6.1	5.9
	4.0	80.4	6.7	6.6
	20.0	81.0	6.7	6.2
氟苯尼考 florfenicol	2.0	73.5	7.1	6.8
	4.0	80.4	4.9	4.3
	20.0	81.7	5.8	5.4
氟苯尼考胺 florfenicol-amine	2.0	63.4	4.8	6.7
	4.0	66.6	3.6	3.3
	20.0	68.7	5.5	5.2

3 讨论与小结

3.1 提取与净化 氯霉素、氟苯尼考都是弱极性化合物,而氟苯尼考胺属于极性化合物,且它们都属于弱碱性化合物,极易溶于甲醇、乙腈和乙酸乙酯等有机溶剂。国内外关于在动物组织样品中同时提取氯霉素、氟苯尼考以及氟苯尼考胺大多采用碱性乙酸乙酯。本实验比较了乙腈、碱性乙酸乙酯、甲醇三种试剂的回收率情况,甲醇回收率较低,

禽蛋中加入碱性乙酸乙酯后样品基质变成果冻状,无法充分提取。用乙腈能有效提取三种药物,再用正己烷去除脂肪等杂质,省去了固相萃取步骤,旋转蒸发,浓缩时用氮气吹干取代,减少了交叉污染的机会。

3.2 流动相条件 试验中发现,乙腈和 10% 甲醇水作为流动相,各组分均能较好分离,并且峰形较好,在质谱上也有较强的响应。而乙腈和 0.1% 甲

酸水作为流动相时,对于正离子模式采集的氟苯尼考胺的信号有明显增强,因为甲酸对分析物容易质子化而带上正电荷,然而对于氯霉素和氟苯尼考的负离子采集模式会受到抑制^[5]。

3.3 基质效应 对氯霉素类物质残留检测文献中采用的是内标法,本文采用了配制基质曲线法外标定量,用基质空白溶液配制标准溶液,从而降低基质效应。在实验过程中也考察了基质效应的影响,采用空白鸡蛋样品按照 1.3 项的提取方法制得阴

性空白基质样液(B),然后用空白试剂水(A)和空白基质样液(B),分别配制 2.3 项的标准曲线系列溶液,得到标准溶液 A 和标准溶液 B,进行测定,标准曲线见表 5。基质效应 ME 可以用基质曲线斜率/标准曲线斜率×100%来进行计算,一般认为基质效应 ME 在 85%~115%之间不存在明显基质效应,从表 5 可以看出,氯霉素和氟苯尼考两种药物在乙腈提取制得的空白基质样液无明显的基质效应。

表 5 氯霉素类化合物标准溶液和基质标准溶液的线性方程和基质效应 (ME)

Tab 5 Linear equations and matrix effect of chloramphenicol standard solution and matrix standard solution (ME)

样品 Sample	药物 Drug	标准曲线方程 Standard curve equation	线性范围/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Linear range	相关系数(R) Correlation coefficient	ME/%
标准溶液 A	氯霉素	$y = 92.94x + 292.55$	5~200	0.9989	
	氟苯尼考	$y = 124.62x + 617.79$	5~200	0.9987	
标准溶液 B	氯霉素	$y = 87.92x + 284.56$	5~200	0.9986	94.6
	氟苯尼考	$y = 120.12x + 610.39$	5~200	0.9989	96.4

3.4 方法的定量限 在方法研究中,氯霉素浓度在 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,其 S/N 为 23.6,说明降低氯霉素的定量限空间很大,后续可进一步研究,降低氯霉素的定量限。

本研究建立了禽蛋中氯霉素、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优化,使得方法的灵敏度、精确度均能满足兽药残留分析。本方法具有操作步骤少、有机溶剂消耗少、测定周期短等优点,而且能同时对氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考胺三种药物进行多残留检测。

参考文献:

[1] Horsberg T E, Martinsen B, Vamma K J. The disposition of 14C-Florfenicol in a atlantic salmon (*Salmo Salar*) [J]. *Aquaculture*, 1994, 122:97-106.

[2] 刘智宏,黄耀凌,汪霞,等水产品中甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺酶联免疫多残留测定[J]. *中国兽药杂志*, 2010, 44(12):1-5.

nation of Thiamphenicol, Florfenicol, Florfenicol Amine in aquatic products by ELISA[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2010, 44(12):1-5.

[3] 谢恺舟,姚宜林,李洋静,等.高效液相色谱荧光检测法同时检测鸡肉中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留[J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(4):489-492.

Xie K Zh, Yao Y L, Li Y J, et al. Simultaneous detection of Florfenicol and Florfenicol Amine in poultry meat by HPLC-FD [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(4):489-492.

[4] 刘永涛,艾晓辉,李荣,等.水产品中氟苯尼考和氟苯尼考胺的高效液相色谱荧光法同时测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(3):316-318.

Liu Y T, Ai X H, Li R, et al. Simultaneous detection of Florfenicol and Florfenicol Amine in aquatic products by HPLC-FD [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2008, 27(3):316-318.

[5] 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.

Sun L, Zhang L, Wang Sh H, et al. A detection of Chloramphenicol and Chloramphenicol metabolites in food by UPLC-MS/MS [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2009, 43(3):42-45.