

液质联用检测水产品中氯霉素、氟苯尼考和甲砒氯霉素的残留量

殷平¹, 陈舜胜¹, 邓晓军², 赵善贞¹

(1. 上海水产大学食品学院, 上海 200090) (2. 上海出入境检验检疫局, 食品与动植物检测中心, 上海 200135)

摘要: 建立了采用液相色谱-质谱同位素稀释法同时测定水产品中氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种残留药物的方法。样品采用碱化乙酸乙酯提取, 同位素内标法定量。氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种药物的定量限(LOQ)分别为0.05 ng/mL、0.5 ng/mL、0.7 ng/mL; 药物质量浓度分别在0.05~1.2 ng/g、0.5~20.0 ng/g和0.7~28.0 ng/g内, 与相应的峰面积比值呈良好的线性关系, 并且在鱼肉中氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素回收率分别为92.2%~125.5%、78.6%~102.7%和79.4%~121.0%, 在虾肉中分别为98.5%~128.4%、73.5%~109.6%和87.7%~122.8%。该法具有简单、快速、简化样品前处理步骤等优点。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 氯霉素; 氟苯尼考; 甲砒氯霉素

中图分类号: TS254.7; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2007)10-0083-05

Determination of Chloramphenicol, Florfenicol and Thiamphenicol Residues in Aquatic Product by Lipid Chromatography-mass/mass Spectrometry

YIN Ping¹, CHEN Shun-sheng¹, DENG Xiao-jun², ZHAO Shan-zhen¹

(1. College of Food Science, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China) (2. Inspection center for food, animal and plant, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: A method for identification and qualification of Chloramphenicol, Florfenicol and Thiamphenicol residues in aquatic product was developed with the internal standard method and micro pre-processing method, which could avoid the solid phase extraction steps. The limit of quantization (LOQ) of Chloramphenicol, Florfenicol and Thiamphenicol residues were 0.05 ng/mL, 0.5 ng/mL and 0.7 ng/mL, respectively, with a recovery ranged from 80 to 120%. And the corresponding concentration of the three compounds were within range of 0.05~1.2 ng/g, 0.5~20.0 ng/g and 0.7~28.0 ng/g, respectively, showing a good linear relationship between peak area ratios and correlation coefficient. The method were simple, fast and efficient, which can meet the needs of determination and quantization of related compounds in aquatic foodstuffs.

Key words: lipid chromatography-mass/mass spectrometry; chloramphenicol; florfenicol; thiamphenicol

美国和加拿大^[1]使用HPLC-MS方法测定水产品、组织和蜂蜜中的氯霉素残留, 检测低限为0.3 μg/kg, 但对于不同的基体需使用不同的前处理方法。目前尚少有各种基质均适用的低检测限的方法。国内外文献报道氯霉素类药物的检测方法^[2-4]主要采用气相色谱法、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)和液相色谱-质谱联用法(LC/MS)等, 这些方法主要是一种氯霉素药物的残留分析方法, 而三种药物同时检测的方法报道较少。

目前国内外检测氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种药物比较精密的方法首推液相色谱-串联质谱法。瞿进文等^[5]用液相色谱-串联质谱法直接用乙酸乙酯对药物进行提取。梅素容等^[6]对此法的提取条件和固相萃取净化条件进行优化。彭涛等^[7]根据Pfenning等^[8]发现的碱化乙酸乙酯对虾等水产品具有更高的回收率, 采用碱化乙酸乙酯提取, 去除脂肪后, 再用C₁₈SPE柱净化, 提高了方法灵敏度使氯霉素的最低检测限达0.01 ng/g, 但仍要通过固相萃取。

本文采用液相色谱-串联质谱法检测方法, 可对氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种药物在多种动物源

收稿日期: 2007-04-01

作者简介: 殷平, 女, 在读研究生, 研究方向为水产品加工与贮藏

基质中进行同步确证。前处理采取直接用碱化乙酸乙酯提取,省去固相萃取步骤,采用同位素内标法定量,具有操作步骤少、有机试剂消耗量少、测定周期短等优点。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和样品

ABI API4000 LC-MS/MS; BUCHI Rotavapor R-250真空旋转蒸发器(附BUCHI Heating Bath N-490水浴锅); HZQ-C振荡器; Eppendorf centrifuge 5810R离心机。氯霉素(含量99.5%); 甲砒氯霉素(含量99.5%); 氟苯尼考(含量99.5%); D₅-氯霉素(含量99.9%); 甲醇、乙腈为色谱纯试剂,乙酸乙酯、正己烷、氯化钠、无水硫酸钠为分析纯试剂;水为高纯水。

1.2 样品前处理

称取5g均质空白样品加入内标d₅-氯霉素及相应浓度的三种添加回收药物,然后加入25 mL氨化乙酸乙酯溶液(乙酸乙酯:氨水=97:3),均质2 min,于离心机中3500 r/min,离心5 min,将上清液取出,于旋转蒸发器上蒸发近干,加热温度为45 °C。然后先后加入4 mL正己烷和5 mL水分别溶解并移入10 mL试管中,震荡1 min后离心,弃去有机相,然后再加入4 mL正己烷重复去脂一次。最后将水相经0.25 μm的膜过滤,然后上机测定。

1.3 色谱条件

色谱柱: Shiesido C18, 3 μm, 50 mm×2.1 mm(i.d)或相当者; 流动相梯度洗脱程序见表1; 流速: 200 μL/min; 进样量: 30 μL。

表1 梯度洗脱液比例

Table 1 Gradient of mobile phase

时间/min	流动相 A/%*	流动相 B/%*
0	80	20
5	40	60
6	80	20
15	80	20

注: *1) A液的组成为乙酸胺和乙酸浓度分别为2 mM和0.1%的水溶液; *2) B液的组成为乙酸胺和乙酸浓度分别为2 mM和0.1%的乙腈溶液。

1.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 负离子扫描; 检测方式: 多反映监测; 电喷雾电压(IS): -5500 V; 雾化气压力(GS1): 45 Psi; 气帘气压力(CUR): 10 Psi; 辅助气流速(GS2): 30 L/min; 离子源温度(TEM): 500 °C; 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量(CE)

及碰撞室出口电压(CXP)、碰撞室入口电压(EP)、去簇电压(DP)见表2。

表2 氯霉素、甲砒氯霉素、氟苯尼考、d₅-氯霉素的质谱定性、定量离子对及其他参数条件

Table 2 Transitions of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and d₅-Chloramphenicol for confirmation, quantification and other parameters

药物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	碰撞气能量/V	碰撞室出口电压/V
氯霉素	321.0/152.0		-30	-12
	321.0/194.0	321.0/152.0	-24	-20
	321.0/256.9		-20	-15
甲砒氯霉素	354.0/290.0		-19	-10
	354.0/227.0	354.0/185.0	-28	-12
	354.0/185.0		-20	-18
氟苯尼考	356.0/335.7		-18	-12
	356.0/227.0	356.0/335.7	-22	-7
D ₅ -氯霉素	356.0/185.0		-30	-10
	325.6/156.9	325.6/156.9	-25	-9

2 结果与讨论

2.1 样品前处理

本文采用液相色谱-串联质谱法检测方法,可对氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种药物在多种动物源基质中进行同步确证。前处理采取直接用碱化乙酸乙酯提取,省去固相萃取步骤,采用同位素内标法定量,具有操作步骤少、有机试剂消耗量少、测定周期短等优点,并且定量下限分别为0.05 ng/mL、1.0 ng/mL和1.4 ng/mL,满足目前美国和欧盟对氯霉素、氟苯尼考和甲砒氯霉素残留量的要求。

2.2 质谱条件优化

氯霉素分子式为C₁₁H₁₂O₅N₂Cl₂,分子量为322.0。同位素内标氯霉素-d₅(氯霉素在5个不同位置上的氢被氘取代)的分子量较氯霉素的分子量多5,两者的理化性质相同,在样品净化过程中可以矫正由于样品净化对氯霉素造成的损失,提高测定方法的回收率。

图1为氯霉素的LC-MS/MS子离子全扫描质谱图主要的碎片m/z 152.0,还有m/z 256.9(丢失了Cl和-OH), m/z 194.0(丢失了CCl₂和-OH), m/z 175.8(从m/z 194.0的碎片上丢失H₂O), 152.0、256.9、194.0、175.8四个离子碎片峰相对其它离子碎片强。一般情况下,丰度最高的离子为母离子,即从分子上失掉一个氢,可以看到氯霉素母离子的分子离子峰为321.0。把丰度最高的离子丰度设为100%,通过丰度比例得到

其他离子的相对丰度如图所示。

在定性离子的选择时，由于不同的母离子打碎后可能会出现相同的子离子，故几种相对丰度较高的子离子需要同时存在，并且相对丰度与其标准物的相对丰度相近才能确认其为该种物质。于是，我们选择 m/z 256.9、152.0、194.2 三种子离子及其相对丰度来定性氯霉素。

在定量离子的选择时，一般选择除母离子之外的相对丰度最高的离子作为定量离子。于是， m/z 151.8 作为氯霉素的定量离子。

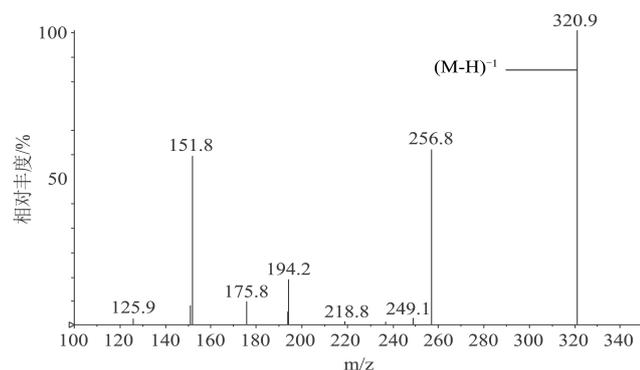


图1 氯霉素的子离子全扫描质谱图

Fig.1 Full scan product ion spectra of CAP

图2为氯霉素-D₅的子离子全扫描质谱图，出现了一个主要的碎片 m/z 157.1，因此定性、定量离子均为 326.0/157.1。

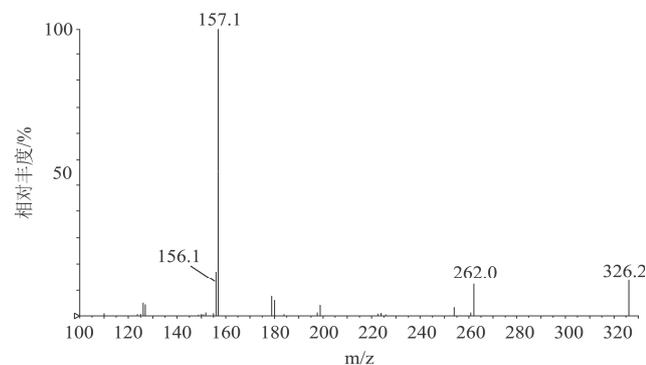


图2 氯霉素-d₅ 的子离子全扫描质谱图

Fig.2 Full scan product ion spectra of CAP-d₅

甲砒霉素分子式为 $C_{12}H_{15}O_5NCl_2S$ ，分子量为 355.0、氟苯尼考分子式为 $C_{12}H_{14}O_4NCl_2SF$ ，分子量为 357.0

图3和图4分别为甲砒霉素、氟苯尼考子离子全扫描质谱图，母离子、子离子的质量数均与文献^[8]报道一致。分别以 m/z 354.1、356.0 作为上述两种化合物的母离子，甲砒霉素产生的子离子分别为 m/z

185.0、227.0、290.0，氟苯尼考为 m/z 335.9、227.0、185.1，根据子离子的丰强度和基质对其的干扰，本文选择 m/z 185.0、335.9 作为甲砒霉素、氟苯尼考的定量离子。

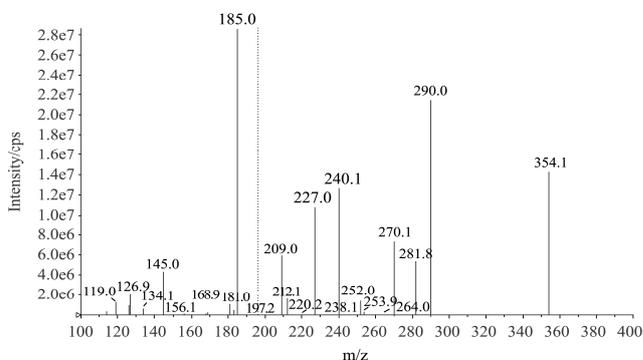


图3 甲砒霉素的子离子全扫描质谱图

Fig.3 Full scan product ion spectra of Thiamphenicol

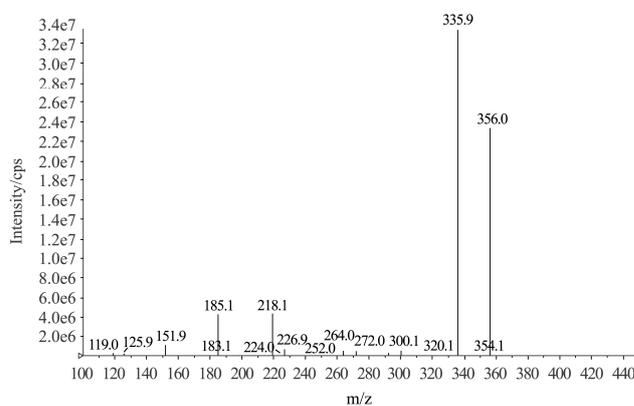


图4 氟苯尼考的子离子全扫描质谱图

Fig.4 Full scan product ion spectra of Florfenicol

2.3 色谱条件的优化

2.3.1 梯度洗脱

本研究采用乙腈和水两种溶液梯度洗脱的方法，使氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素与杂质基本达到完全分离，这样不仅提高了检测的灵敏度，而且避免了实际样品测定时干扰杂质对氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素离子化的抑制现象。

由于食品基质不同，酸碱度有较大的差异，最后导致进样液的pH值差异比较大。通过实验发现，流动相的pH值对药物峰形有很大影响，因此通过加入乙酰胺可以缓冲pH值，改善不同条件下的峰形。

另外，通过加入乙酸可以使目标碱性化合物带电，从而容易被离子化。由此得到氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素与内标物的选择性离子流图，见图5-8。

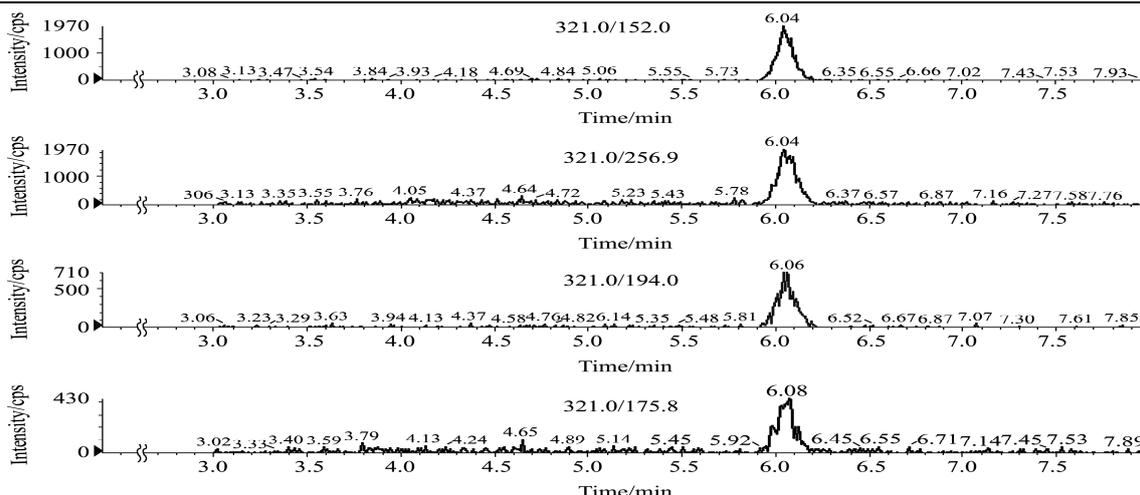


图5 氯霉素的标准品的选择性离子流图

Fig.5 Selected ion chromatograms of sample with CAP

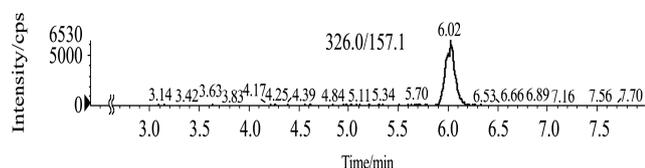


图6 D5-氯霉素的标准品的选择性离子流图

Fig.6 Selected ion chromatograms of sample with d5-CAP

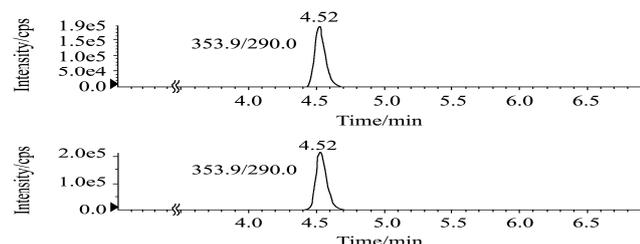


图7 甲砒霉素的的标准品的选择性离子流图

Fig.7 Selected ion chromatograms of sample with

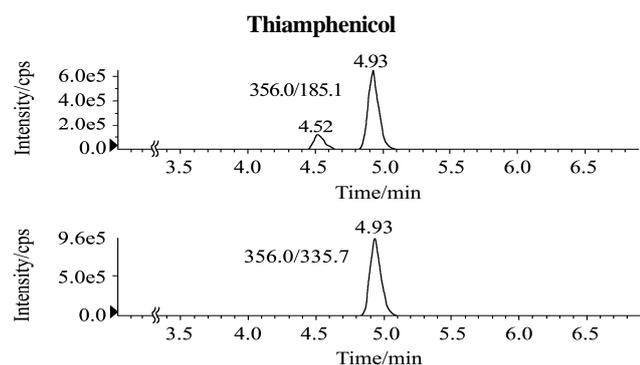


图8 氟苯尼考的标准品的选择性离子流图

Fig.8 Selected ion chromatograms of sample with Florfenicol

2.4 标准曲线和检测限

由于氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种药物可以同时检测,故只需检测5个不同水平的样品,三条标准曲线即可同步制得。三种药物及内标的添加量如表3所示:

表3 氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素和d5-氯霉素的5个添加水平 (ng/g) 及用液相色谱-串联质谱法检测所得相关系数

Table 3 Five adding levels of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and d5-Chloramphenicol(ng/g) and the correlation coefficient gained by LC-MS/MS

名称	水平					相关系数
	1	2	3	4	5	
d5-氯霉素	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	—
氯霉素	0.05	0.10	0.50	1.00	2.00	0.9993
氟苯尼考	0.5	1.0	2.0	10.0	20.0	0.9993
甲砒氯霉素	0.7	1.4	2.8	14.0	28.0	0.9991

经检测发现,氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素三种药物各自的质量浓度与相应的峰面积比值(药物峰的面积/d5-氯霉素峰面积)呈良好的线性关系。以质量浓度X (ng/g) 为横坐标,峰面积比Y为纵坐标,绘制标准曲线,发现线性关系良好,相关系数均达到0.9990以上,详见表3。

氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素的定性限(LOD)、定量限(LOQ)详见表4:

表4 氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素的定性限(LOD)和最低定量限(LOQ) 单位: ng/mL

Table 4 Limit of determination(LOD)and limit of quantitation(LOQ) of Chloramphenicol, Thiamphenicol and

药物名称	Florfenicol	
	定性限	定量限
氯霉素	0.15	0.05
氟苯尼考	1.5	0.5
甲砒氯霉素	2.1	0.7

2.5 回收率及精密度

氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素在鱼肉和虾肉中

不同浓度水平的回收率和精密度详见表 5 和表 6。平均回收率均在 80%~120%之间, RSD 均小于 16.9%。

表 5 氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素在鱼肉中三种浓度水平的回收率及精密度

Table 5 The recovery of three adding level of Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol in fish and precision

添加水平	氯霉素/(ng/g)			甲砒氯霉素/(ng/g)			氟苯尼考/(ng/g)		
	0.10	0.20	0.50	7.0	14.0	28.0	5.0	10.0	20.0
回收率/%	120.6	92.2	108.4	102.7	86.4	85.0	105.3	81.1	80.7
	124.5	96.6	104.3	98.1	85.7	91.2	108.9	95.6	82.9
	109.8	98.5	95.5	97.7	84.3	78.6	121.0	81.9	79.4
	125.5	114.2	95.5	78.8	86.4	74.5	107.7	88.6	88.2
平均值/%	120.1	100.4	104.0	94.3	85.7	82.3	110.7	86.8	82.8
RSD/%	6.0	9.6	5.7	11.2	1.1	8.9	6.4	7.8	4.7

表 6 氯霉素、氟苯尼考、甲砒氯霉素在虾肉中三种浓度水平的回收率及精密度

Table 6 The recovery of three adding level of Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol in fish and precision

添加水平	氯霉素/(ng/g)			甲砒氯霉素/(ng/g)			氟苯尼考/(ng/g)		
	0.10	0.20	0.50	7.0	14.0	28.0	5.0	10.0	20.0
回收率/%	121.6	106.4	108.0	101.0	101.4	91.8	104.7	103.5	87.7
	108.8	98.5	106.7	109.6	76.9	86.7	106.0	92.1	89.0
	113.7	119.6	101.6	83.0	99.3	73.5	95.1	128.1	93.8
	128.4	104.4	116.1	75.9	91.8	95.2	95.6	122.8	106.6
平均值/%	118.1	107.2	108.1	92.4	92.3	86.8	100.4	111.6	94.3
RSD/%	7.3	8.3	5.7	16.9	12.0	11	5.8	15	5.6

3 讨论

本文建立了用LC/MS/MS检测水产品中氯霉素、氟苯尼考和甲砒氯霉素的方法。目前水产品中三种药物同时检测的报道较少,采用本方法具简单、快速和高效等特点。实验结果数据表明,本方法的精密度和回收率能满足产品出口检测的相关法规^[9]要求。

参考文献

[1] Roybal J E. In: Turnipseed S B, Long A R. Analytical Procedures for Drug Residue in Food of Animal Origin. Sacramento, CA USA: Science Technology System, 1998, 227

[2] Pfenning A P, Roybal J E, Rupp H S, et al. A. J AOAC Int,2000,83 (1):26

[3] Pfenning A P, M adson M R, Roybal J E, Turnipseed S B, Gonzales S A, Hurlbut J A, Salmon G D. J AOAC Int, 1998, 81 (4):714

[4] 谢孟峡,刘媛,邱月明,等.固相萃取-气相色谱质谱测定动物组织中氯霉素的残留量[J]分析化学,2005,33(1):1

[5] 瞿进文,吴洁珊,蔡勤仁,等.液相色谱-电喷雾串联质谱法测定鱼肉中氯霉素含量[J]理化分析(化学分册),2005,41(11):799-801

[6] 梅素容,王鹏,朱宽正,等.用液相色谱-串联质谱法测定蜂王浆中氯霉素残留量[J]华中科技大学学报(自然科学版),2006,34 (2):115-117

[7] 彭涛,李淑娟,储晓刚,等.高效液相色谱/串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砒氯霉素和氟甲砒氯霉素残留量[J]分析化学,2006,33(4):463-466

[8] Pfenning A P, Roybal J E, Turnipseed S B, et al. J AOAC Int., 2000,83(1):26-30

[9] Commission of the European Communities. Off J Eur Commun,2002,L221:8