论著

液液萃取 - 液相色谱 - 串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素

权伍英[1]　张秀丽[1]　栾　燕[1]　陈笑艳[2]　李　晶[3]
(1. 沈阳市疾病预防控制中心,沈阳　110031; 2. 沈阳药科大学,沈阳　110016;
3. 辽宁中医学院职工技术学院,沈阳　110101)

摘　要:**目的**　建立液相色谱 - 串联质谱法检测蜂蜜中氯霉素残留量的方法。**方法**　试样前处理采用液液萃取,以甲醇 + 水(71 + 29 体积分数)为流动相,用 Zorbax Eclipse XDB C_{18}柱进行分离,以氘代氯霉素作为内标,采用负离子方式,液相色谱 - 电喷雾串联质谱法进行测定。**结果**　平均回收率为 93.0 %～98.2 %,相对标准偏差小于 8 %。采用空白蜂蜜基质制作校正曲线,蜂蜜中氯霉素检测的线性范围为 0.01～1.00 μg/kg,定量检测下限为 0.01 μg/kg。**结论**　方法灵敏、准确、快速,能满足蜂蜜中氯霉素的监督检测。

关键词:色谱法;光谱分析,质量;氯霉素;蜂蜜

Determination of Chloramphenicol Residue in Honey by Liquid-Liquid Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

QUAN Wu-ying, ZHANG Xiu-li, LUAN Yan, CHEN Xiao-yan, LI Jing
(Shenyang Municipal Center for Disease Prevention and Control, Liaoning Shenyang 110031, China)

Abstract: **Objective**　A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed for the determination of chloramphenicol (CAP) in honey. **Method**　The analyte was extracted from honey samples by liquid-liquid extraction, separated on a Zorbax Eclipse XDB C_{18} column with methanol + water (71 + 29 V/V) as mobile phase and detected by tandem mass spectrometry with electrospray ionization source operating in negative ion mode. An isotopically labelled internal standard (d5-CAP) was used. **Results**　The mean recoveries ranged from 93.0 % to 98.2 % and the relative standard derivations were lower than 8 %. The matrix-matched calibration curve showed good linearity in the range of 0.01～1.00 μg/kg in honey samples. The limit of quantification for CAP in honey samples was 0.01 μg/kg. **Conclusion**　The method was rapid, sensitive and specific. It is suitable for determination of CAP in honey.

Key word: Chromatography; Spectrum Analysis, Mass; Chloramphenicol; Honey

氯霉素(Chloramphenicol,CAP)能抑制人体骨髓造血机能,引起粒细胞缺乏病,再生障碍性贫血和溶血性贫血,产生致死性效应,欧盟于 1994 年就禁止其在食用动物中使用[1]。我国虽也禁止在动物源性食品中使用 CAP,但是,违禁使用的现象屡有发生。我国出口的蜂产品中曾多次因氯霉素残留引起国际贸易问题。因此,加强蜂产品中氯霉素残留量的监测十分必要。欧盟规定蜂蜜中氯霉素的残留限量为 0.3 μg/kg。液相色谱 - 串联质谱法(LC/MS/MS)检测 CAP 操作简便,灵敏度高,已成为食品中痕量氯霉素残留检测的主流方法。采用 LC/MS/MS 法测定蜂蜜中氯霉素,试样的前处理一般采用固相萃取法[2-4],过程繁琐,成本较高。为简化试样的前处理过程,本文以氘代氯霉素作为内标,乙酸乙酯为溶剂,液液萃取提取试样,并以空白蜂蜜基质进行校正曲线的制作,采用液相色谱 - 串联质谱法测定蜂蜜中的氯霉素残留量,定量检测限可达 0.01 μg/kg,实现了蜂蜜中氯霉素残留量快速、准确测定。

作者简介:权伍英　女　副主任技师

1　材料与方法

1.1　仪器与试剂

液相色谱 - 串联四极杆质谱仪　TSQ Quantum Discovery,美国 Thermo Finnigan 公司,配有电喷雾离子化源(ESI 源)以及 Xcalibur 1.2 系统软件,LC quan 2.0 定量处理软件,Surveyor 液相色谱系统;Turbo Vap 蒸发仪 美国 Zymark 公司;HY-2 调速多用振荡器 国华电器有限公司;YKH-型液体快速混合器 江西医疗器械厂;LG10-2.4A 高速离心机 北京医用离心机厂。甲醇(色谱纯)、乙酸乙酯(分析纯)、氯霉素(CAP)及 d5-氯霉素(d5-CAP)标准物质 Sigma 公司。

1.2　标准溶液的配制

1.2.1　氯霉素标准溶液　准确称取 10 mg CAP 标准物质于 100 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配成 0.1 g/L 的标准储备液,将标准储备液用甲

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

醇稀释成 500 μg/L 的标准中间液,再将其用水稀释成 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/L 的标准使用液。

1.2.2 内标溶液 准确称取 12.5 mg 的 d5 - CAP 标准物质于 25 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,配成 0.5 g/L 的储备液,再将其用水稀释成 10 μg/L 的使用液。

1.3 色谱条件

色谱柱 Zorbax Eclipse XDB C_{18},5 μm,150 mm ×4.6 mm(i.d);流动相:甲醇 + 水(71 + 29 体积分数);流速:0.5 ml/min;进样量:20 μl。

1.4 质谱条件

离子源为电喷雾离子化源(ESI 源);电喷雾电压3 800 V;加热毛细管温度 320 ℃;鞘气(N_2)压力 35 Arb;辅助气(N_2)压力 5 Arb;碰撞气(Ar)压力 1.2 mTorr;碰撞及诱导解离(CID)电压均为 18 V;负离子方式检测;扫描方式为选择反应监测(SRM);扫描时间为 0.3 s;以 m/z 321 →152,257 为 CAP 定性离子,以保留时间和各对离子的响应强度比作为定性依据,样品中定性离子的丰度比不超过标准工作溶液的 ±20 %。分别以 m/z 321 →152 和 m/z 326 → 157 作为 CAP、d5 - CAP 的定量离子。

1.5 标准工作溶液制备

分别取 CAP 浓度为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/L 标准系列 50 μl(CAP 的含量分别为 0.005、0.025、0.050、0.250、0.500 ng)于 10 ml 离心管中,分别加入 0.50 g 空白蜂蜜,50 μl d5 - CAP 内标溶液(10 μg/L)及 0.5 ml 水,涡流混合 1 min,加入 3 ml 乙酸乙酯,混匀后在振荡器上振荡 10 min,以3 500 r/min 离心 5 min,将上层的乙酸乙酯转入另一离心管中,再用 3 ml 乙酸乙酯重复提取一次,合并上清液,在蒸发仪上于 50 ℃空气流下吹干,残留物加入 200 μl 流动相溶解,涡流混合,取 20 μl 进行液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.6 试样溶液制备

取 0.5 g 蜂蜜,加 50 μl d5 - CAP 内标溶液(10 μg/L)及 0.5 ml 水,以下按"1.5 标准工作溶液制备"项下的相同方法操作。

1.7 结果计算

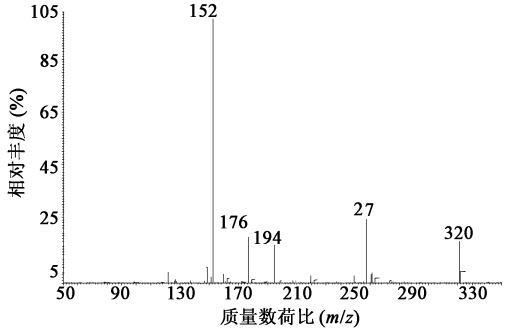
$$X = \frac{c}{m} \cdot \frac{1\,000}{1\,000}$$

式中:X - 试样中氯霉素的残留量,μg/kg;c - 从校正曲线上得到的氯霉素量,ng;m - 试样的取样量,g。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的建立

氯霉素在 ESI(-)的电离模式下,一级质谱检测得到的准分子离子峰为 m/z 321 $[M - H]^-$。以 m/z 321 $[M - H]^-$ 为母离子,进行二级质谱扫描,得到氯霉素的特征碎片离子为 m/z 152、176、194 和 257(见图 1)。各离子的丰度为 m/z 152 (100 %)、m/z 257 (28 %)、m/z 176 (20 %)、m/z 194 (12 %)、m/z 321(16 %)。根据各碎片离子的结构特征和欧盟对禁用兽药残留鉴定分值(identification point,IP)4 分的要求[5],选取 m/z 321 →152,257 为定性离子,并要求试样中各离子的丰度不得超过标准工作溶液的 ±20 %。在定性离子中,选取 m/z 321 →152 为 CAP 定量离子。内标(d5 - CAP)的质谱裂解行为与 CAP 相同,选取 m/z 326 →157 为 d5 - CAP 定量离子,其定性离子的丰度比为:m/z 157 (100 %)、m/z 262 (30 %)、m/z 326 (15 %)。



注:m/z 152、176、194 和 257 为氯霉素的特征碎片离子

图 1 氯霉素 MS/MS 全扫描质谱图

2.2 色谱条件的选择

由于试样仅采用液液萃取处理,为了避免一些杂质对测定的干扰,对色谱柱和流动相进行了选择。分别采用 Luna、Diamonsil 和 Zorbax 的 C_{18},5 μm,150 mm ×4.6 mm(i.d)色谱柱进行试验,结果表明 Zorbax 色谱柱分离效果比较理想。并对色谱条件进行了优化,分别使用甲醇 + 水和乙腈 + 水作为流动相,二者的分离效果无明显差异,最终确定采用甲醇 + 水(71 + 29 体积分数)作为流动相。

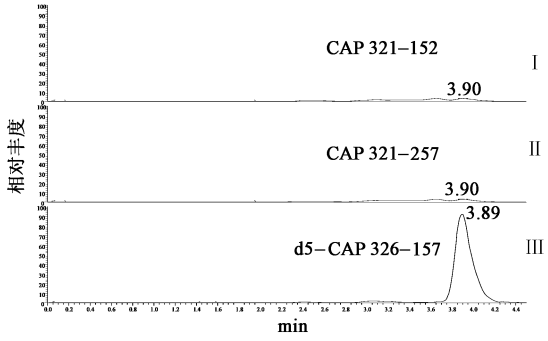
2.3 试样前处理条件的选择

本试验采用乙酸乙酯作为萃取溶剂进行液液萃取,并与固相萃取柱净化效果进行比较。在空白蜂蜜中(色谱图见图 2)添加 0.05 μg/kg 氯霉素标准品,分别用本法及固相萃取法[4]测定 6 次,其均值分别为 0.048 和 0.046 μg/kg,相对标准偏差分别为 5.4 % 和 6.8 %。对两组数据进行 t 检验,$P > 0.05$,结果无统计学差异。液液萃取法简化了试样处理过程,蜂蜜中的杂质不影响氯霉素的测定。

2.4 方法的线性范围及定量下限

分别吸取系列标准溶液进样,以 CAP 浓度为横坐标,CAP 与 d5 - CAP 的峰面积比值为纵坐标,用加权($1/x^2$)最小二乘法进行回归运算,求得线性回

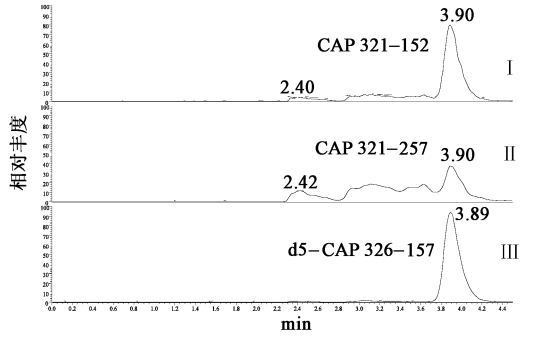
© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



注：Ⅰ- 氯霉素定量离子 m/z 321→152 的色谱峰；Ⅱ- 氯霉素定性离子 m/z 321→257 的色谱峰；Ⅲ- 内标 d5 - CAP 的色谱峰。

图 2　空白蜂密样品中氯霉素 SRM 色谱图

归方程为 $y = 0.153\,732 + 2.428\,75x$，相关系数 $R^2 = 0.995\,0$，检测 CAP 的浓度范围为 0.025 ～ 2.500 μg/L，且蜂蜜氯霉素含量为 0.01 μg/kg 时（色谱图见图 3），其信噪比（S/N）为 51，以此作为本法 CAP 定量检测限（0.01 μg/kg），可满足 2003 年欧盟规定的牛奶、肉、蛋、水产品、蜂蜜等食品中氯霉素残留检测的最低性能极限值（MRPL）0.3 μg/kg[6] 的要求。



注：Ⅰ- 氯霉素定量离子 m/z 321→152 的色谱峰；Ⅱ- 氯霉素定性离子 m/z 321→257 的色谱峰；Ⅲ- 内标 d5 - CAP 的色谱峰。

图 3　蜂蜜中 0.01 μg/kg 氯霉素 SRM 色谱图

2.5　方法的精密度与准确度

将同一蜂蜜试样按前述方法重复分析 6 次，计算出相对标准偏差（*RSD*），确定该方法的精密度。测定结果为 0.48、0.45、0.44、0.46、0.46、0.43（μg/kg），均值为 0.45，*RSD* 为 3.9 %。

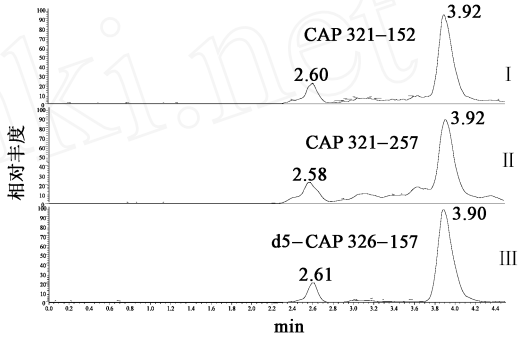
以空白蜂蜜为本底，添加不同浓度的氯霉素标准，结果见表 1，其平均回收率为 93.0 %～98.2 %，*RSD* 低于 8 %。

表 1　方法的回收试验结果（$n = 6$）

加标量 (μg/kg)	测得量 (μg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
0.010	0.009	93.0	7.6
0.050	0.048	96.0	5.4
0.500	0.491	98.2	2.8

2.6　方法的比对考核

采用本方法测定 2005 年英国中央科学实验室（CSL）组织的食品分析质量水平测试（FAPAS）考核的蜂蜜中氯霉素含量分析（色谱图见图 4），并参加中国疾病预防控制中心营养与食品安全所发放的蜂蜜质控样品的测定，结果见表 2。在 FAPAS 考核中，本实验室的 z 评分为 - 0.8，符合 $|z| \leq 2$ 要求。在质控蜂蜜的测定中，结果满足实验室间协同性验证的要求。



注：Ⅰ- 氯霉素定量离子 m/z 321→152 的色谱峰；Ⅱ- 氯霉素定性离子 m/z 321→257 的色谱峰；Ⅲ- 内标 d5 - CAP 的色谱峰。

图 4　蜂蜜样品中氯霉素 SRM 色谱图

表 2　FAPAS 和质控蜂蜜 CAP 测定结果

样品名称	测定值 (μg/kg)	相对标准偏差 (%)
FAPAS 考核样品	0.45	3.9
质控样品 - 1	0.42	2.7
质控样品 - 2	0.41	3.7

参考文献

[1] UTE SCHRÖDER. Interlaboratory study of chloramphenicol (CAP) residues in shrimps. 34th WEFTA meeting, September 12 - 15 2004 [C]. Lübeck-Germany 91.

[2] VERZRGNASSI L, ROYER D, MOTTIER P. Analysis of chloramphenicol in honey of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Food Addit Contam, 2003, 20(4): 335-342.

[3] GIKAS E, KORMALI P, TSIPI D, et al. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-ESI MS/MS method for the determination of chloramphenicol in seafood[J]. Agric Food Chem, 2004, 52(5): 1025-1030.

[4] GB/T 18932.19—2003. 蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 液相色谱 - 串联质谱法[S].

[5] Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results[J]. Official Journal of the European Union, 2002, 45(L221): 8-36.

[6] Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin official[J]. Official Journal of the European Union, 2003, 46(L71): 17-18.

[收稿日期：2006 - 11 - 05]

中图分类号：R15；O657.7；S896.1　　文献标识码：A　　文章编号：1004 - 8456(2007)02 - 0117 - 03

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net