

实验技术与方法

同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素及甲硝唑

图雅, 崔建平, 赵宏

(内蒙古呼和浩特市疾病预防控制中心, 内蒙古 呼和浩特 010070)

摘要:目的 采用同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素及甲硝唑的残留量。方法 样品经乙酸乙酯提取, MCS复合型固相萃取柱(500 mg/6 ml)净化, 采用ZORBAXSB-C₁₈色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)分离, 以甲醇和5 mmol/L乙酸铵溶液(含0.05%甲酸)为流动相进行梯度洗脱, 采用电喷雾正/负离子多反应监测模式检测, 同位素内标法定量。结果 氯霉素、甲硝唑的浓度为0.05~5.00 ng/ml时, 线性关系良好, 相关系数 $r > 0.999$ 。添加0.5、2.0、5.0 μg/kg三个不同水平时, 氯霉素、甲硝唑的回收率为79.3%~96.7%, 相对标准偏差(RSD)为5.5%~14.8%, 定量限均为0.15 μg/kg, 检出限均为0.05 μg/kg。结论 该方法灵敏度及准确度良好, 可应用于日常大批量样品的高灵敏分析。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; 同位素内标; 甲硝唑; 氯霉素; 蜂蜜; 食品污染物; 兽药残留

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)04-0450-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.04.012

Determination of chloramphenicol and metronidazole in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry with isotope-labelled internal standards

TU Ya, CUI Jian-ping, ZHAO Hong

(Hohhot Center for Disease Control and Prevention, Neimenggu Hohhot 010070, China)

Abstract: Objective To determine chloramphenicol and metronidazole in honey by isotope-labelled internal standards ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with ethyl acetate solution, and cleaned up on a MCS cartridge. The target analytes were separated on a ZORBAX SB-C₁₈ column with gradient elution using a mobile phase made up of methanol and 5 mmol/L ammonium acetate solution (containing 0.05% formic acid). Detection was carried out using positive and negative electrospray ionization and multiple reaction monitoring (MRM), and quantified with isotope internal standard method. **Results** The chloramphenicol and metronidazole showed good linearity in the range of 0.05-5.00 ng/ml. The recovery at three spiked levels of 0.5, 2.0 and 5.0 μg/kg were in the range of 79.3%-96.7%. The relative standard deviation (RSD) was 5.5%-14.8%. The limits of quantitation were 0.15 μg/kg, the limits of detection were 0.05 μg/kg. **Conclusion** The method is sensitive and accurate. It could be applied to the high-throughput analysis of chloramphenicol and metronidazole.

Key words: Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotope labelled internal standards; metronidazole; chloramphenicol; honey; food contaminants; veterinary drug residues

氯霉素(chloramphenicol, CAP)属抑菌性广谱抗生素,用于动物各种传染病的治疗。它在动物性食品中的残留会对人体造血系统产生严重不良反应,威胁人类的健康^[1-2]。美国仅允许氯霉素用于非食用动物,规定在动物性食品中不得检出氯霉素,我国早在2002年将氯霉素列为禁用药物,在动物性食品中不得检出。甲硝唑(metronidazole, MNZ)属于硝基咪唑类合成抗菌药,常添加于动物饲料中,用

于治疗和预防动物体内的某些细菌和原虫疾病。硝基咪唑类药物在动物性食品中的残留存在潜在的致癌作用^[3-4]。有些蜂农在蜜蜂临近产蜜期,仍然使用抗生素,是导致蜂蜜中含有抗生素或者超标的原因之一, NY/T 5030—2016《无公害农产品 兽药使用准则》^[5]中规定,甲硝唑片禁止在采蜜期使用。2016年随州市生产的某一品牌蜂蜜成品有3批次检出甲硝唑及氯霉素,引起了社会的广泛关注,产品不合格的主要原因是蜂蜜源头存在安全隐患,因此,必须加强监督控制抗生素的滥用,保障蜂蜜产品的质量。

目前,测定抗生素残留量的方法主要有高效液

收稿日期: 2017-05-20

作者简介: 图雅 女 中级检验技师 研究方向为物理化学

E-mail: tuyal983@126.com

相色谱法^[6-7]、气相色谱法^[8-9]、气相色谱-质谱法^[10-11]及液相色谱-串联质谱法^[12-13]。高效液相色谱-串联质谱法具有准确、高效、高灵敏度等优点,是目前测定抗生素残留量最为通用的检测手段。本试验采用超高效液相色谱-串联质谱法对蜂蜜中氯霉素及甲硝唑残留量进行测定,使用各目标分析物的同位素内标进行定量,该方法的灵敏度、回收率和重现性较好,定量准确,可满足日常检测的需要。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 6460A 超高效液相色谱-串联四级杆质谱仪(美国 Agilent)、千分之一电子天平(精度为 0.001 g)、超纯水器、离心机、涡旋混合器、氮吹仪、MCS 复合型固相萃取柱(500 mg/6 ml)。

氯霉素(CAS:56-75-7)、甲硝唑(CAS:443-48-1)、D₄-甲硝唑(CAS:1261392-47-5)标准品均购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH, D₅-氯霉素标准品(CAS:202480-68-0,美国 Cambridge Isotope Laboratories),乙酸乙酯、甲醇均为色谱纯,盐酸、氨水、氢氧化钠均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

氯霉素、甲硝唑标准储备液:分别称取 0.010 g(精确到 0.000 01 g)氯霉素、甲硝唑标准品,分别用甲醇溶解并定容至 10 ml,浓度均为 1.0 mg/ml, -20 ℃避光保存。

混合标准溶液:分别准确吸取氯霉素、甲硝唑标准储备液 100 μl 于 100 ml 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,浓度为 1.0 μg/ml, -20 ℃避光保存。

D₅-氯霉素、D₄-甲硝唑标准溶液:分别称取 0.005 g(精确到 0.000 01 g) D₅-氯霉素、D₄-甲硝唑标准品,分别用甲醇溶解并定容至 10 ml,浓度为 0.5 mg/ml, -20 ℃避光保存。

D₅-氯霉素、D₄-甲硝唑应用液:分别用甲醇稀释 D₅-氯霉素、D₄-甲硝唑标准溶液至浓度均为 20.0 ng/ml, 4 ℃保存。

1.2.2 样品前处理

称取蜂蜜 5 g(精确到 0.01 g)于 50 ml 离心管中,分别加入 100 μl D₅-氯霉素、D₄-甲硝唑应用液,加水 10 ml,混匀溶解,再加入 10 ml 乙酸乙酯,涡旋、超声提取 5 min, 3 000 r/min 离心 3 min,吸取上清液在 50 ℃氮气下吹干。加入 0.1 ml 甲醇溶解,再加入 1.9 ml 40 mmol/L 盐酸溶液,超声溶解 1 min, 10 000 r/min 离心 2 min,上清液待净化。依次用 5 ml 甲醇、5 ml 水、5 ml 40 mmol/L 盐酸溶液活

化平衡 MCS 复合型固相萃取柱,将上清液移至 MCS 柱内,待样品过柱后用 5 ml 水淋洗除杂真空抽干,加入 5 ml 乙酸乙酯洗脱,得到洗脱液 1;再用 5 ml 甲醇淋洗除杂真空抽干,用 5 ml 5% 氨化甲醇洗脱,得到洗脱液 2;将洗脱液 1 和 2 在 50 ℃氮气下吹干,分别先加入 0.1 ml 甲醇超声溶解残留物,再加入 0.9 ml 10% 甲醇水溶液混匀,过 0.22 μm 滤膜后进样,洗脱液 1 用于分析氯霉素,洗脱液 2 用于分析甲硝唑。

1.2.3 仪器条件

色谱:ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相为甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.05% 甲酸),流速为 0.2 ml/min,进样体积为 2 μl,洗脱方式为梯度洗脱。洗脱程序:0 ~ 0.5 min, 40% 甲醇;0.5 ~ 1.0 min, 90% 甲醇;0.5 ~ 1.5 min, 90% 甲醇;1.5 ~ 2.0 min, 40% 甲醇。

质谱:电喷雾离子源;氯霉素、D₅-氯霉素为负离子扫描,甲硝唑、D₄-甲硝唑为正离子扫描;多反应监测(MRM)模式;干燥气流量为 11 L/min;雾化器压力为 241 kPa;毛细管电压为 4 000 V(正离子)、3 500 V(负离子)。

2 结果与分析

2.1 样品提取与净化

氯霉素、甲硝唑均易溶于乙酸乙酯,试验表明乙酸乙酯对氯霉素、甲硝唑均有较高的提取效率,因此选用乙酸乙酯提取样品。本试验选择 MCS 复合型固相小柱,填料为硅胶和阳离子交换树脂,对蜂蜜中氯霉素和甲硝唑的测定起到良好的净化效果。

MCS 复合型固相萃取柱对氯霉素、甲硝唑的回收率均在 70% 以上,且除杂效果好。用乙酸乙酯从 MCS 柱洗脱获得组分氯霉素,5% 氨化甲醇从 MCS 柱洗脱获得组分甲硝唑。通过 MCS 柱对蜂蜜中氯霉素及甲硝唑进行分级净化,采用乙酸乙酯和 5% 氨化甲醇分别洗脱氯霉素和甲硝唑进行分析,可有效除去干扰物质,满足试验要求。

2.2 流动相的选择

比较甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液两种体系,试验发现氯霉素和甲硝唑在甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液体系中响应较高。试验表明,在 5 mmol/L 乙酸铵溶液中加入少量的甲酸可以提高甲硝唑的离子化效率,增加灵敏度。为了不影响氯霉素在负电离模式下的离子化效率,本试验还对甲酸的浓度进行了优化,结果表明甲酸浓度为 0.05% 时对氯霉素的电离没有明显

影响,故本试验采用甲醇-5 mmol/L 乙酸铵溶液(含0.05%甲酸)为流动相。由于等度洗脱时待测物与干扰杂质一起流出,对氯霉素及甲硝唑的离子化产生抑制作用和色谱峰背景干扰,因此,本试验采用梯度洗脱的方法,使目标物和杂质达到完全分离。

2.3 质谱条件的优化

在电喷雾质谱正/负离子监测模式下,分别对分解电压、碰撞能量和选择离子等进行了充分的优化,选取经碰撞后所得丰度较高的两个离子作为定量和定性离子,并确定其最佳碰撞能量及分解电压。4种化合物的质谱分析参数见表1。

2.4 方法的线性关系及检出限

用空白蜂蜜基质溶液配制系列混合标准溶液,氯霉素和甲硝唑的浓度分别为0.05、0.10、0.20、

表1 质谱分析参数

化合物	母离子 /(<i>m/z</i>)	子离子 /(<i>m/z</i>)	碰撞能量 /V	分解电压 /V
氯霉素	320.9	256.9	12	90
		152.0*	16	
D ₃ -氯霉素	326.0	157.0	4	70
甲硝唑	172.1	128.1*	10	90
		82.1	26	
D ₄ -甲硝唑	176.2	128.1	10	90

注:*表示定量离子

0.50、1.00、2.00和5.00 ng/ml,其中D₃-氯霉素、D₄-甲硝唑的浓度均为2.0 ng/ml。以峰面积对应的浓度进行线性回归,其线性关系良好,相关系数 $r > 0.999$ 。根据信噪比 $S/N = 3$ 和 $S/N = 10$ 计算检出限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表2。

表2 方法的线性回归方程、相关系数和检出限

Table 2 Regression equations, correlation coefficient and limits of determination of the method

组分名	线性方程	相关系数 <i>r</i>	线性范围/(ng/ml)	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)
氯霉素	$y = 0.3594x + 0.0073$	0.999 4	0.05 ~ 5.00	0.05	0.15
甲硝唑	$y = 0.1413x + 0.0288$	0.999 7	0.05 ~ 5.00	0.05	0.15

2.5 方法的回收率与精密度

选择一份空白蜂蜜样品进行加标回收率和精密度试验,样品分别添加0.2、2.0和5.0 μg/kg的混合标准液各6份,摇匀、静置20 min后按1.2.2方法处理并进行分析,计算平均回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表3。可以看出,各添加水平的回收率范围为79.3%~96.7%,RSD为5.5%~14.8%,方法的准确度与精密度均满足抗生素分析的要求。加标样品(2.0 μg/kg)的MRM色谱图见图1。

表3 方法的精密度及加标回收率试验($n = 6$)

Table 3 Relative standard deviation and recoveries of samples of the method

化合物	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%
氯霉素	0.2	79.3	8.5
	2.0	88.7	12.3
	5.0	91.8	10.9
甲硝唑	0.2	83.2	5.5
	2.0	81.6	10.3
	5.0	96.7	14.8

2.6 实际样品的测定

按本试验所建立的方法对呼和浩特市超市采购的20份蜂蜜样品进行测定,甲硝唑及氯霉素均未检出。

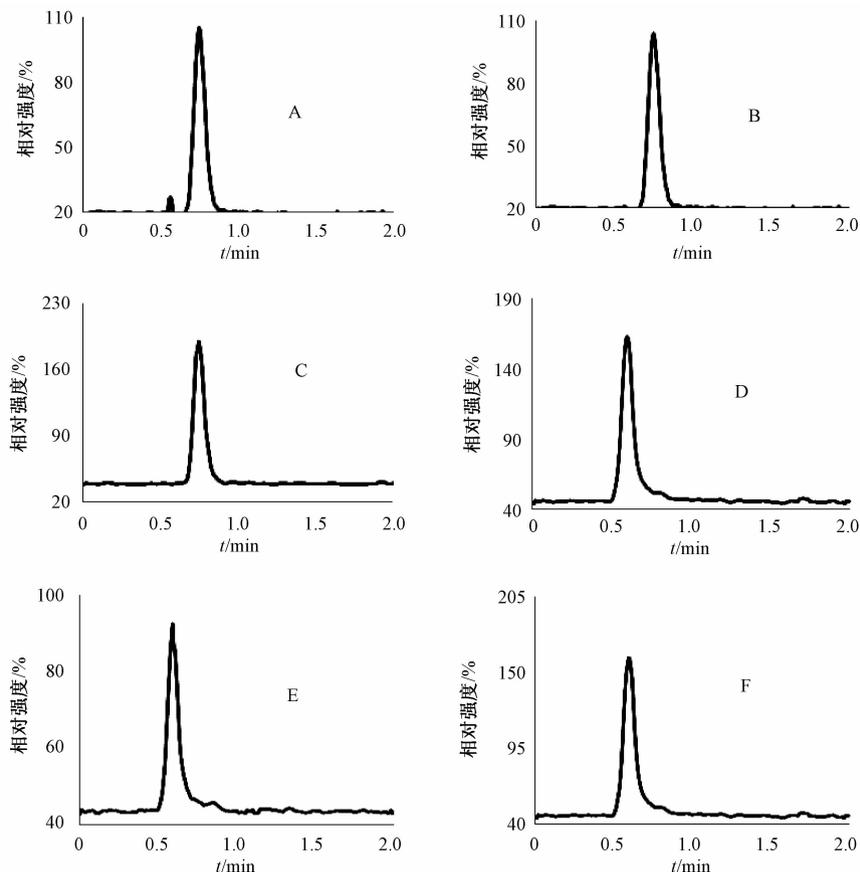
3 小结

本试验采用乙酸乙酯提取,MCS复合型固相小柱净化,内标法定量,超高效液相色谱-串联质谱法

同时测定了蜂蜜中甲硝唑及氯霉素的残留量。该方法与单独测定氯霉素或甲硝唑的方法比较,不仅节省了样品前处理时间、提高了工作效率,而且灵敏度较好,回收率和重现性符合检测要求,可应用于日常大批量样品的检测。

参考文献

- [1] 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、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量[J]. 分析化学,2005,33(4):463-466.
- [2] 姚佳,王昕,张建新,等. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素和玉米赤霉醇及其类似物[J]. 食品科学,2014,35(18):124-127.
- [3] 张璐,孔祥虹,王茜,等. 在线净化-超高效液相色谱同位素稀释串联质谱法检测蜂蜜中硝基咪唑类及其代谢物的残留[J]. 分析化学,2014,42(12):1735-1742.
- [4] 刘华良,李放,杨润,等. 超高效液相色谱-串联质谱法分析化妆品中的常见抗生素及甲硝唑[J]. 色谱,2009,27(1):50-53.
- [5] 中华人民共和国农业部. 无公害农产品 兽药使用准则:NY/T 5030—2016[S]. 北京:中国标准出版社,2016.
- [6] 罗文婷,吴青,简伟明,等. 超高效液相色谱法测定水产品中违禁兽药氯霉素、呋喃唑酮和甲硝唑残留[J]. 分析化学,2009,37(6):877-880.
- [7] 农业部畜牧兽医局. 动物性食品中氯霉素残留检测方法——高效液相色谱法[J]. 中国兽药杂志,2004,38(2):16-17.
- [8] 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):88-91.



注:A为氯霉素(320.9 > 256.9);B为氯霉素(320.9 > 152.0);C为D₅-氯霉素(326.0 > 157.0);
D为甲硝唑(172.1 > 128.1);E为甲硝唑(172.1 > 82.1);F为D₄-甲硝唑(176.2 > 128.1)

图1 加标样品(2.0 μg/kg)的MRM色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of add mark samples (2.0 μg/kg)

- [9] 林秋萍,李克勤,贾斌,等. 气相色谱法测定肌肉中氯霉素残留[J]. 食品科学,2004,25(11):245-247.
- [10] 李鹏,邱月明,蔡慧霞,等. 气相色谱-质谱联用法测定动物组织中氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素的残留量[J]. 色谱,2006,24(1):14-18.
- [11] 汪纪仓,马素英,王大菊,等. 气相色谱-离子阱串联质谱法同时测定猪肌肉中硝基咪唑类药物残留量[J]. 畜牧兽医学报,2008,39(12):1772-1778.

2008,39(12):1772-1778.

- [12] 刘柏林,谢继安,赵紫薇,等. 稳定同位素内标-超高压液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中8种抗生素残留[J]. 中国食品卫生杂志,2016,28(4):461-467.
- [13] 王春民,张秋萍,吴春霞. 超高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜜中的甲硝唑含量[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(5):1813-1817.

· 公告 ·

总局关于发布《植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定》 食品补充检验方法的公告

2017年第75号

按照《食品补充检验方法工作规定》,《植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定》食品补充检验方法已经国家食品药品监督管理总局批准,现予发布。

特此公告。

附件:植物蛋白饮料中植物源性成分鉴定(BJS 201707)

食品药品监管总局
二〇一七年六月十五日