

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉和鸡蛋中氯霉素和甲硝唑

徐飞,刘峰,张亚军,关光玉

(宁夏回族自治区疾病预防控制中心,宁夏银川 750004)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉和鸡蛋中的氯霉素和甲硝唑。方法 鸡肉和鸡蛋样品经乙腈沉淀蛋白,乙酸乙酯和乙腈同时提取,Oasis MCX 柱净化,以乙腈-水为流动相,采用 ACQUITY BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离,分别以电喷雾负离子和正离子模式进行质谱测定,内标法定量。结果 分别以鸡肉和鸡蛋为加标基质,三个加标水平下氯霉素和甲硝唑的平均回收率为 96.3% ~ 110.5%,相对标准偏差小于 7.0%,氯霉素和甲硝唑的检出限($S/N=3$)为 0.1 μg/kg,定量限($S/N=10$)为 0.3 μg/kg。结论 该方法操作快速简单、重现性好,可用于鸡肉和鸡蛋中氯霉素和甲硝唑的含量测定。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱;鸡肉;鸡蛋;氯霉素;甲硝唑;食品污染物;兽药残留;食品安全

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2016)06-0759-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.06.015

Rapid determination of chloramphenicol and metronidazole in chicken and egg by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Fei, LIU Feng, ZHANG Ya-jun, GUAN Guang-yu

(The Ningxia Hui Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Ningxia Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To develop a rapid method for determination of chloramphenicol and metronidazole in chicken and egg by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) and provide analytical methodology for chicken and egg in Ningxia. **Methods** Samples of chicken and eggs were protein precipitated with acetonitrile, then extracted by ethyl acetate and acetonitrile, and cleaned up by Oasis MCX column. Chloramphenicol and metronidazole were separated on ACQUITY BEH C₁₈ chromatographic column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with mobile phase of acetonitrile-water on gradient elution, then determined and quantified by mass spectrometry. **Results** Average recoveries of chloramphenicol and metronidazole at three spiked levels were 96.3% -110.5% with relative standard deviations less than 7.0%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for both chloramphenicol and metronidazole were 0.1 μg/kg and 0.3 μg/kg. **Conclusion** The method was accurate, reliable, and could be used as a quality control method for chloramphenicol and metronidazole in chicken and egg.

Key words: Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; chicken; egg; chloramphenicol; metronidazole; food contaminant; residue of veterinary drug; food safety

食品安全是人类社会中与人体健康密切相关的安全性问题。食品化学性污染来源极其复杂,种类繁多,包括加工过程中使用的食品添加剂、包装材料以及在农牧业和水产养殖业上使用的农药、化肥、兽药、饲料添加剂等。兽药残留分析是食品安全研究的重要领域之一。长期食用兽药残留过高的动物源性食品会引起人体的多种急慢性中毒、变态反应及具有三致(致癌、致畸和致突变)可能

性^[1-2]。因此,必须加强监督控制兽药的滥用和保障动物源性食品的质量。氯霉素属于酰胺醇类广谱抗生素,由于其价格低廉,常用于畜禽及水产品的疾病预防和治疗,但对人有严重副作用,可导致再生障碍性贫血等症^[1,3-4]。甲硝唑属于硝基咪唑类药物,为近年来治疗阿米巴肠病及阿米巴肝病的首选药物。体内外毒理学试验证实,硝基咪唑类具有致癌、致畸和致突变等作用^[1,5]。我国和日本、美国和欧盟等大多数国家禁止在动物源性食品中添加氯霉素和甲硝唑等药物^[6]。目前,氯霉素和甲硝唑的测定方法主要为液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法和气相色谱-质谱(GC-MS)法等^[4,5,7-9],而采

收稿日期:2016-09-07

基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(NZ14226)

作者简介:徐飞 男 检验师 研究方向为食品安全与农药残留分析

E-mail:lengyue0524@163.com

用 LC-MS/MS 法同时测定食品中的氯霉素和甲硝唑的文献报道较少^[9]。因此,本文建立了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定氯霉素和甲硝唑,为宁夏地区食品中氯霉素和甲硝唑残留的分析和确证工作提供了参考方法,同时也为提高液质联用操作能力提供了技术保障。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

鸡肉和鸡蛋样品各 30 份均为 2016 年宁夏回族自治区食品风险监测项目抽检样品,采样过程符合国家标准要求。样品取回后,经均质仪均质后, -20 ℃ 下避光保存备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

Xevo TQ-S 三重四级杆质谱系统、Oasis MCX 强阳离子交换固相萃取柱(3 ml/60 mg)均购自美国 Waters, B-400 均质仪(瑞士 Buchi), N-EVAP 氮吹仪(美国 Organomation), 3-30K 台式冷冻离心机, 漩涡混合器, 试验用超纯水均为 Milli-Q 超纯水仪制备, GD/X Nylon 多层针头式滤器(0.2 μm)。

甲醇和乙腈均为色谱纯、氯化钠等其他试剂均为国产优级纯, 氯霉素固体标准品(56-75-7, 纯度 98.5%) 和甲硝唑-d₄ 固体氘代内标(1261392-47-5, 纯度 98.5%) 均购自德国 Dr. Ehrensorfer, 甲硝唑固体标准品(443-48-1, 纯度 ≥98.0%) 和氯霉素-d₅ 固体氘代内标和(41724-1MG, 纯度 ≥98.0%) 均购自美国 Sigma。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液的配制

单一标准储备液: 分别称取 10.0 mg 氯霉素和甲硝唑标准物质于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度线, 即得, 标准储备液的浓度为 1.0 mg/ml。避光保存于 -20 ℃ 冰箱中, 可使用 6 个月。

混合标准中间液: 分别吸取单一标准储备液 100 μl 于同一 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度线, 即得, 各组分浓度为 10.0 μg/ml。避光保存于 -20 ℃ 冰箱中, 可使用 3 个月。

混合标准工作液: 吸取混合标准中间液 100 μl 于 10 ml 容量瓶中, 用初始流动相稀释至刻度线, 即得, 各组分浓度为 100.0 ng/ml。现用现配。

单一内标储备液: 分别称取 1.0 mg 氯霉素-d₅ 和 10.0 mg 甲硝唑-d₄ 于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度线, 即得, 浓度分别为 100.0 μg/ml 和 1.0 mg/ml。避光保存于 -20 ℃ 冰箱中, 可使用 6 个月。

混合内标中间液: 分别吸取氯霉素-d₅ 和甲硝

唑-d₄ 内标储备液 100 μl 和 10 μl 于同一 10 ml 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度线, 即得, 各组分浓度为 1.0 μg/ml。避光保存于 -20 ℃ 冰箱中, 可使用 3 个月。

混合内标工作液: 吸取混合内标中间液 300 μl 于 10 ml 容量瓶中, 用初始流动相稀释至刻度线, 即得, 各组分浓度为 30.0 ng/ml。现用现配。

1.2.2 提取净化

称取 5.0 g 鸡肉(精确至 0.01 g) 于 50 ml 聚四氟乙烯具塞离心管中, 依次加入 100 μl 混合内标工作液(30.0 ng/ml) 和 5 ml 4% 氯化钠溶液, 充分匀浆后, 再加入 5 ml 乙腈, 涡旋混匀, 超声提取 10 min。取出后, 加入 10 ml 乙酸乙酯, 振荡提取 5 min, -4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 取上层有机相待净化。

MCX 小柱, 使用前依次用 3 ml 甲醇和 3 ml 乙酸乙酯活化, 取 5.0 ml 上层有机相于柱中(重力过柱), 用 10 ml 试管收集, 待过柱完成后, 用 2 ml 乙酸乙酯淋洗, 压干, 得洗脱液 1; 再用 2 ml 甲醇淋洗小柱, 压干后, 用 3 ml 5% 氨化甲醇洗脱, 收集于另一 10 ml 试管中, 压干, 得洗脱液 2。分别将洗脱液 1 和洗脱液 2 置于氮吹仪上, 50 ℃ 下吹干, 最后用 10% 甲醇-水溶液定容至 1 ml, 涡旋 30 s, 采用 0.2 μm GD/X Nylon 多层针头式滤器过滤到进样小瓶中, 供 UPLC-MS/MS 检测。

1.2.3 空白基质提取液的制备

分别称取与待测样品基质相同且不含待测成分的样品, 不加入氘代内标, 按 1.2.2 的方法制备空白基质提取液。

1.2.4 仪器条件

色谱条件: 色谱柱为 ACQUITY BEH C₁₈ 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 柱温 40 ℃, 样品室温度 20 ℃, 流速 0.3 ml/min, 进样体积 5.0 μl, 流动相 A 为乙腈、流动相 B 为超纯水。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 以乙腈-水为流动相的梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.0	10	90
0.5	10	90
2.0	90	10
3.0	90	10
3.5	10	90
5.0	10	90

质谱条件: 离子源为电喷雾离子源(ESI), 扫描方式为负离子扫描(ESI-) 或正离子扫描(ESI+), 检测方式为多反应监测(MRM), 毛细管电压 3.0 kV, 离子源温度 150 ℃, 脱溶剂气温度 500 ℃,

脱溶剂气流量 1 000 L/h, 碰撞气为高纯氩气 150 L/h, 其余使用气体均为氮气发生器产生。氯霉素和甲硝唑及其氘代内标的 MRM 检测的相关质谱参数见表 2。

表 2 氯霉素和甲硝唑及其氘代内标的质谱采集参数
Table 2 Mass parameters for chloramphenicol, metronidazole and internal standards analysis

物质名称	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /V	保留时间 /min
氯霉素	321.0	152.0*, 257.0	30, 30	18, 12	2.22
甲硝唑	172.1	128.1*, 82.1	32, 32	14, 22	1.78
氯霉素-d ₅	326.1	157.0	30	22	2.22
甲硝唑-d ₄	176.2	128.1	36	14	1.77

注: * 为定量离子

2 结果与分析

2.1 样品前处理

从样品中提取氯霉素和甲硝唑等主要使用乙腈和乙酸乙酯等溶剂。5.0 g 样品先加入 4% 氯化钠溶液匀浆, 再加入 5 ml 乙腈来沉淀蛋白和提取, 最后用 10 ml 乙酸乙酯充分提取目标物。经试验证明, 乙腈不仅具有沉淀蛋白的作用, 而且与乙酸乙酯的同时使用解决了单一有机溶剂提取不充分等问题。本试验采用 Oasis MCX 柱净化和富集目标物。MCX 是一款以聚合物为基质, 键合同时具有反相和强阳离子交换两种性质基团的混合型固相萃取小柱。样品经提取和离心后的上层有机相直接通过 MCX 小柱后, 氯霉素不被固定相吸附, 并留在样液中; 部分杂质和甲硝唑被吸附在固定相上, 通过甲醇淋洗除去杂质, 5% 氯化甲醇洗脱得到甲硝唑。洗脱液吹干定容后仍然存在很多油脂和蛋白质等固体杂质, 需要过滤除杂才能上机检测。普通滤头在过滤过程中会出现堵塞滤膜, 增大操作压力和易爆裂等问题。有试验指出采用正己烷萃取后过滤, 效果不明显, 且费时费力^[5]。另外, 残留的正己烷也会污染色谱柱和质谱进样系统。本试验采用 Whatman GD/X Nylon 多层针头式滤器进行过滤。该滤头专门为处理高颗粒含量、粘稠及浑浊的样品设计, 有效去除杂质的同时实现很小的操作压力并有很好的流速, 实现更低溶出本底、样品吸附量和最高的样品得率, 大大提高了试验的效率。

2.2 色谱和质谱条件的优化

选择 Waters ACQUITY BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 作为分析柱, 比较了甲醇-水和乙腈-水两个分离体系的效果, 发现乙腈-水的分离效果、峰形和灵敏度较好。由于氯霉素和甲硝唑使用不同的 ESI 模式, 加入酸或碱均会影响彼此的电离效果。综合考虑, 本试验不加入酸、碱和缓冲盐。

氯霉素分子式为 C₁₁H₁₂Cl₂N₂O₅, 分子量为 322.0。氯霉素由于含有氯等电负性基团, 故选择在电喷雾负离子模式下测定, 先在 MS₁ Scan 模式中获得的准分子离子 [M-H]⁻, m/z 322.0, 随后采用 Intellistart 模式, 自动获得 m/z 257.0 ([M-H-HCOCl]⁻) 和 m/z 152.0 两个强度较大的子离子。甲硝唑分子式为 C₆H₉N₃O₃, 分子量 171.1。选择在电喷雾正离子模式下测定, 先在 MS₁ Scan 模式中获得的准分子离子 [M+H]⁺, m/z 172.1, 随后采用 Intellistart 模式, 自动获得 m/z 128.1 ([M+H-CH₂=CHOH]⁺) 和 m/z 82.1 两个强度较大的子离子。以上化合物的两个子离子的最佳锥孔电压和碰撞能量均由 Intellistart 模式自动优化得到。驻留时间在 MRM 模式下选择自动调整。

2.3 标准曲线和相关系数

用空白基质提取液配制系列浓度的标准溶液, 氯霉素和甲硝唑浓度为 0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 和 10.0 ng/ml, 其中氯霉素-d₅ 和甲硝唑-d₄ 氘代内标的浓度均为 1.0 ng/ml, 按浓度从低到高依次测定, 以目标组分峰面积与相应内标峰面积的比值为纵坐标, 以标准工作液的浓度 (ng/ml) 为横坐标, 进行线性回归, 绘制工作曲线, 采用内标法定量。方法检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别以最低加标浓度样品中被分析物质的定性离子 S/N = 3 和 S/N = 10 计算所得。当取样量为 5.0 g 时, 氯霉素和甲硝唑的 LOD 为 0.1 μg/kg, LOQ 为 0.3 μg/kg。结果见表 3。

表 3 氯霉素和甲硝唑测定的线性回归方程、检测限和定量限

Table 3 Regression equations, limits of determination and limits of quantification of chloramphenicol and metronidazole

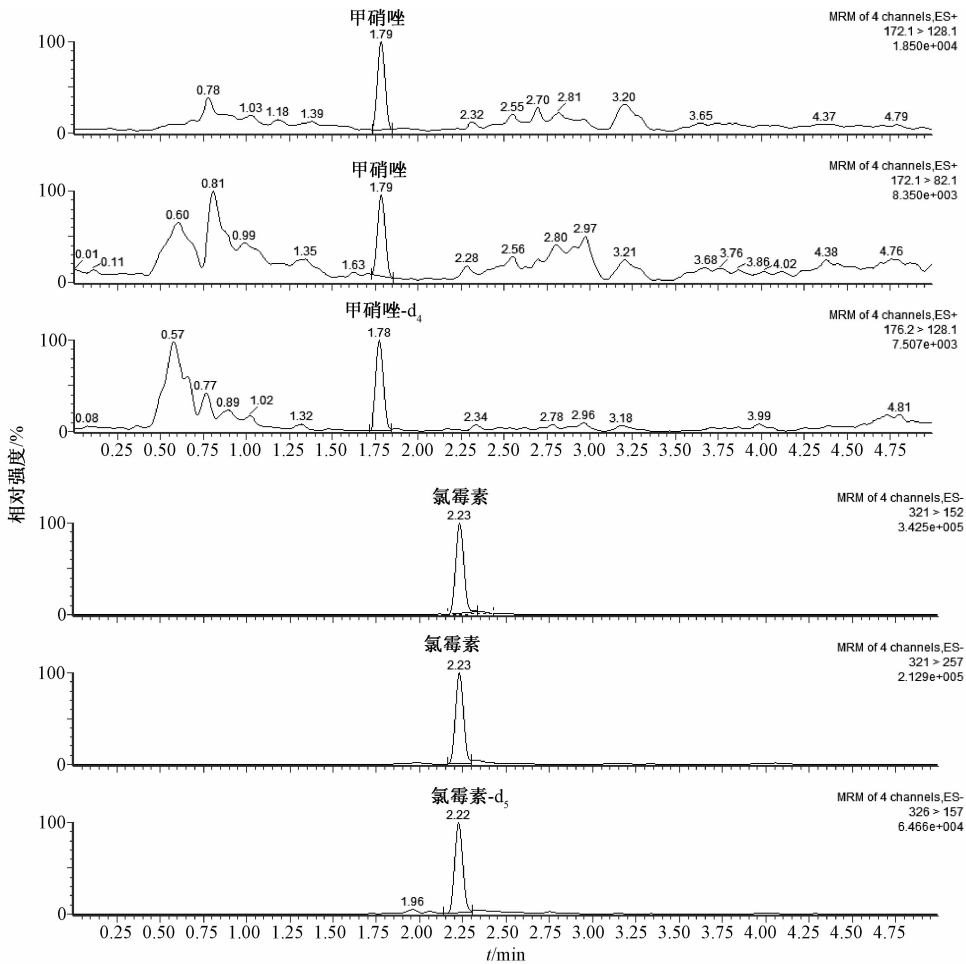
分析物	回归方程	相关系数 r^2	LOD /(μg/kg)	LOQ /(μg/kg)
氯霉素	$y = 1.9324x - 0.0749$	0.998 1	0.1	0.3
甲硝唑	$y = 0.7705x - 0.0257$	0.999 1		

2.4 方法的回收率及精密度

分别取鸡肉和鸡蛋空白样品, 进行加标试验, 设定 0.3、0.6 和 3.0 μg/kg 三个加标水平, 每个条件平行处理 6 次, 上机测定。结果表明, 以鸡肉为基质的回收率分别为 108.6%、96.3% 和 99.1%, RSD 分别为 5.3%、6.5% 和 6.1%; 以鸡蛋为基质的回收率分别为 110.5%、98.5% 和 99.1%, RSD 分别为 5.6%、5.2% 和 6.8%。图 1 为鸡肉样品加标的 UPLC-MS/MS 谱图。

2.5 实际样品的检测

用本方法对 2016 年宁夏回族自治区食品风险监测项目抽检的 30 份鸡肉样品和 30 份鸡蛋样品进

图1 鸡肉样品加标(3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的UPLC-MS/MS谱图Figure 1 UPLC-MS/MS chromatograms of metronidazole and chloramphenicol spiked in chicken sample (3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

行了检测。结果表明,30份鸡肉样品中氯霉素和甲硝唑的含量均低于本法LOD(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$);30份鸡蛋样品中,2份样品检出甲硝唑,含量分别为0.3和0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余28份样品中甲硝唑含量低于本法LOD(0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

3 小结

本试验采用乙腈沉淀蛋白,乙酸乙酯提取,采用MCX柱净化,UPLC-MS/MS法直接测定了宁夏市售鸡肉和鸡蛋中氯霉素和甲硝唑的含量。本方法快速简便、灵敏度高、重现性好,且回收率和精密度符合检测要求,对于加强宁夏地区该项目的监测工作具有重要意义。

参考文献

- [1] 方小明,丁卓平. 动物源食品兽药残留分析[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [2] 贺家亮,李开雄,于见亮,等. 动物性食品中兽药残留现状及

对策[J]. 食品研究与开发,2006,27(6):176-178.

- [3] 曹巧玲,杨凯,武泽新. 氯霉素的毒性作用和检测方法研究进展[J]. 职业与健康,2013,29(16):2095-2097.
- [4] 潘晓东,吴平谷,姜维. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素[J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(6):572-574.
- [5] 陈瑞春,艾连峰,郭春梅,等. 液相色谱同位素稀释串联质谱法测定牛奶和奶粉中3种硝基咪唑类禁用兽药及其代谢物的残留量[J]. 中国食品卫生杂志,2011,23(6):543-549.
- [6] 中华人民共和国农业部. 食品动物禁用的兽药及其化合物清单(农业部公告第193号)[A]. 2002-04-09.
- [7] 刘跃坤,刘崇奇. 对GB/T 22338—2008气相色谱质谱联用仪负化学源法检测食品中氯霉素类残留量方法的改进与补充[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(1):74-78.
- [8] 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.
- [9] 王浩,杨红梅,郭启雷,等. 液相色谱-串联质谱法快速同时测定婴幼儿配方乳粉中氯霉素、三聚氰胺、甲硝唑和洛硝达唑[J]. 分析化学,2013,41(2):283-287.