

研究报告

牛乳粉中氯霉素残留分析标准物质的定值方法研究及应用

成长玉,向琪,刘军,夏梦婷,郭庆,余晓琴

(四川省食品检验研究院,四川 成都 611731)

摘要:目的 建立一种基于液相色谱-串联质谱法的牛乳粉中氯霉素残留分析基体标准物质定值方法,并以此法用于该标准物质的均匀性、稳定性检验及定值。方法 牛乳粉加水复原后,用乙酸乙酯提取,经正己烷除脂,再用乙酸乙酯萃取,同位素内标法定量测定。结果 氯霉素在 0.4~4.0 ng/mL 范围内线性关系良好,相关系数达 0.999,平均回收率为 100.5%,相对标准偏差 1.1%~3.2% ($n=6$),且该方法测定牛乳粉中氯霉素含量基质效应较弱。结论 该方法准确、可靠,可用于标准物质定值;经 11 家实验室联合定值,牛乳粉中氯霉素残留分析标准物质的特性量值及其扩展不确定度($k=2$)分别为 (1.92 ± 0.30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 (5.65 ± 0.53) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

关键词:牛乳粉;牛奶;氯霉素;标准物质;定值

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2021)06-0755-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2021.06.020

**Research and application of the determination method of
chloramphenicol residues reference material in milk powder**

CHENG Changyu, XIANG Qi, LIU Jun, XIA Mengting, GUO Qing, YU Xiaoqin

(Sichuan Institute of Food Inspection, Sichuan Chengdu 611731, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of the content of chloramphenicol in milk powder by liquid chromatography-mass spectrometry, and apply it to test the uniformity and stability of reference material and determine the value. **Methods** The milk powder was reconstituted by adding water, extracted with ethyl acetate, degreased with n-hexane, extracted with ethyl acetate again, and finally quantified by the isotope internal standard method. **Results** Chloramphenicol had a good linear relationship in the range of 0.4-4.0 ng/mL, the correlation coefficient was 0.999, the average recovery rate was 100.5%, the relative standard deviation was 1.1%-3.2% ($n=6$), and this method had a weak matrix effect in milk matrix. **Conclusion** The method is accurate and reliable, and can be used for the determination of reference materials. After jointly determination by 11 laboratories, the characteristic value and the expanded uncertainty ($k=2$) of the reference material for the analysis of chloramphenicol residues in milk powder are (1.92 ± 0.30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ and (5.65 ± 0.53) $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Key words: Milk powder; milk; chloramphenicol; standard substance; certification

近 20 年来,兽药在畜牧业中的应用日益广泛,与此相关的兽药残留问题也逐渐成为食品安全关注的焦点。其中,氯霉素类是目前残留问题较为严重的兽药之一^[1]。《中国居民膳食指南(2007)》凸显牛奶价值,牛奶是摄取营养元素的催化剂以及健康的关键,是健康膳食的基石^[2]。但由于奶牛饲养过程中,对泌乳期奶牛用药不当、违反国家规定把抗生素作为奶牛饲料添加剂使用、未经彻底清洗和

消毒患病奶牛使用过的挤奶工具及贮奶设备、高温季节掺杂抗生素防止牛乳酸败等原因,造成牛乳抗生素污染^[3-4]。氯霉素属广谱抗生素,能抑制革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌,由于其价格低廉、抗菌性能好,是预防和治疗牛乳房炎及各种传染病等疾病的主要药物^[5-6],进而易使乳及乳制品中存在兽药残留。氯霉素具有较强的毒副作用,可引起再生障碍性贫血和粒状白细胞缺乏症等疾病,在牛奶中的残留量超过一定值将会损害健康,引起过敏、中毒和导致耐药菌的产生等^[7-9]。

为准确监控和检测乳及乳制品中氯霉素的含量,本实验室研制了牛乳粉中氯霉素残留分析标准物质,而标准物质的标准值需要精确定量,但现阶段检测氯霉素的标准大多是针对水产品、畜禽肉、

收稿日期:2021-09-30

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC1601300)

作者简介:成长玉 女 工程师 研究方向为食品安全检测

E-mail:276874514@qq.com

通信作者:余晓琴 女 高级工程师 研究方向为食品安全检测

E-mail:113343838@qq.com

蜂蜜等基质,测定乳粉基质的方法标准很少,虽然有部分文献^[5,10-12]研究和改进了牛奶中氯霉素测定的方法,但其提取过程大多依然需要过净化小柱,成本较高且操作繁琐。本试验采用加水复原,乙酸乙酯提取,正己烷除脂,再液液萃取的方式,结合液相色谱-串联质谱法(同位素内标)测定氯霉素含量,通过对加水复原、提取、净化等关键环节进行优化,建立了一种快速、准确、灵敏的乳粉中氯霉素分析方法,可以满足标准物质定值的要求,也为乳粉及相近基质中氯霉素的含量测定提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱-三重四极质谱联用仪(Agilent 1290-6495,美国安捷伦公司);ME204分析天平(瑞士METTLER TOLEDO公司);IKA MS3漩涡混合器(德国IKA公司);IDH30超声清洗仪(德国IRM公司);N1-50氮吹仪(可控温,上海屹尧仪器科技发展有限公司);X3R离心机(美国Thermo公司);Milli-Q去离子水发生器(美国Millipore公司)。

氯霉素纯度标准物质(GBW(E)060907,纯度:99.8%,相对扩展不确定度为0.2%, $k=2$,中国计量科学研究院);氯霉素-D₅(99.9 μg/mL,相对扩展不确定度为3%, $k=2$,Bepure);乙腈、乙酸乙酯、正己烷(色谱纯,美国Fisher公司);实验用水为超纯水(美国Millipore公司)。

1.2 制备流程

采用在液态奶中直接加标方法生产,即样品经目标物添加、混匀、冷冻干燥和分装等工艺制成两种不同含量水平的牛乳粉氯霉素残留分析标准物质,分别为低含量和高含量。具体制备技术路线如图1所示。

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理

样品复原:精密称取0.50 g试样置50 mL离心管中,准确加入4.5 g温水(约45 °C)充分混匀后静置20 min。

前处理:在复原后的液体乳样品中加入内标工作液,充分混匀后,加入乙酸乙酯20 mL,盖好盖子轻轻混匀,超声15 min,再涡旋提取1 min,5 000 r/min离心5 min,分取上清液至氮吹管,同种方法再提取一次,合并上清液至同一氮吹管中,50 °C下氮吹至近干。氮吹后加入甲醇0.5 mL、4%氯化钠溶液4.5 mL溶解残渣,涡旋1 min,加正己烷5 mL,涡旋1 min,静置分层,弃去最上层正己烷。下层清液加乙酸乙酯10 mL,涡旋1 min,取全部上层液于氮吹

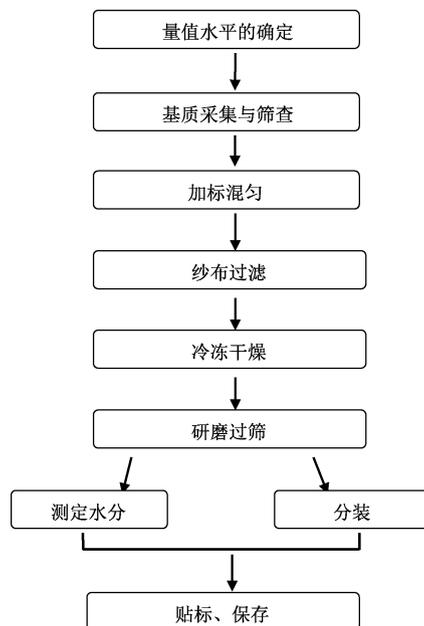


图1 牛乳粉中氯霉素基体标准物质的制备流程图
Figure 1 The preparation flow chart of chloramphenicol reference substance in milk powder

管中,50 °C下氮吹至近干,精密加乙腈+水(1:1)1 mL,涡旋30 s,过0.22 μm滤膜,供液相色谱串联质谱分析。同时,同法制备全试剂空白溶液。

1.3.2 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB-C₁₈(5 μm 4.6 × 150 mm);流速:0.8 mL/min;进样体积:5 μL;柱温:35 °C;流动相:A为水溶液,B为甲醇;梯度洗脱程序:0~2 min,30% B~70% B;2~2.5 min,70% B~30% B;2.5~6 min,30% B。

1.3.3 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI源,负模式);电喷雾电压:3 500 V;雾化器压力:50 psi;离子源温度:350 °C。MRM离子参数见表1。

表1 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量

Table 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, collision gas energy

化合物名称	母离子 /(<i>m/z</i>)	子离子 /(<i>m/z</i>)	驻留时间 /ms	碰撞气能量 /eV
氯霉素	320.9	256.9 152*	50	10
氯霉素-D ₅	325.9	157.1	50	10

注:*为定量子离子

2 结果与分析

2.1 定值方法优化

2.1.1 加水复原体积

标准物质的性状为冻干粉,在提取过程中,需考虑加水复原的体积对测定结果的影响,分别考察不同的复原体积(0、2、4、8、10 mL)条件下测定氯霉

素含量。结果表明,当复原体积为 0 mL 和 2 mL 时,均未检出氯霉素,即在不加水复原和加水体积过少时,无法提取出冻干粉中的氯霉素;而当复原体积为 4、8、10 mL 时,不同体积对氯霉素含量的测定无显著差异,即只要乳粉可以全部充分溶解,水加入的多少对氯霉素的提取无影响。

2.1.2 复原时间

冻干粉需加入温水使其复原,为避免浸泡时间对氯霉素含量测定产生影响,分别考察不同浸泡时间(0、10、20、30、60、90 min)下氯霉素的含量。测定结果见图 2,表明只要保证冻干粉全部溶解,复原时间对氯霉素含量测定无显著影响。

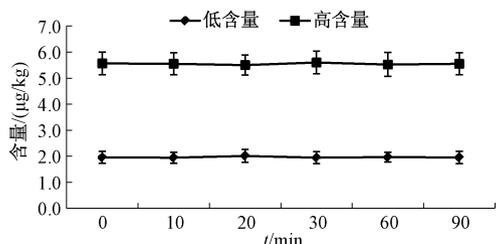


图 2 复原时间对氯霉素含量测定的影响 ($n=3$)

Figure 2 The effect of recovery time on the determination of chloramphenicol content ($n=3$)

2.1.3 提取体积、提取次数

分别称取牛乳粉 0.5 g 于 50 mL 离心管中,加水复原,加入内标溶液,充分混匀后,分别加入乙酸乙酯 10 mL (1 次)、10 mL (2 次共 20 mL)、20 mL (1 次)、20 mL (2 次共 40 mL)、20 mL (3 次共 60 mL),经提取、离心、净化、氮吹和复溶后上机测定。结果如图 3 所示,但因提取过程有乳化现象,提取试剂量不宜过少,综合考虑提取效率和试剂用量,最终选择 20 mL 分别提取 2 次作为提取体积。

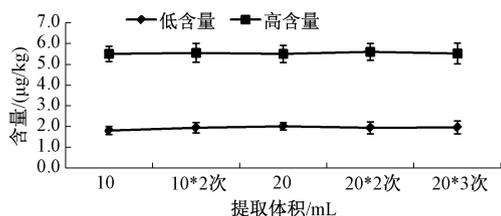


图 3 提取体积和提取次数对氯霉素含量提取效率的影响 ($n=3$)

Figure 3 The effect of extraction volume and extraction times on extraction efficiency of chloramphenicol content ($n=3$)

2.1.4 提取时间

分别称取牛乳粉 0.5 g 于 50 mL 离心管中,加水复原,加入内标溶液,充分混匀后,加入乙酸乙酯 20 mL,分别采用超声提取 1、5、15 和 30 min,再涡旋 1 min 的方式进行提取,再离心、净化、氮吹和复溶后上机测定。结果如图 4 所示,试验表明,含量较低

时超声时间对提取效率无显著影响,当样品中氯霉素含量较高时,随着超声时间的延长,提取效率也随之增高,当超声提取为 15 min 时可达到最佳提取效率。

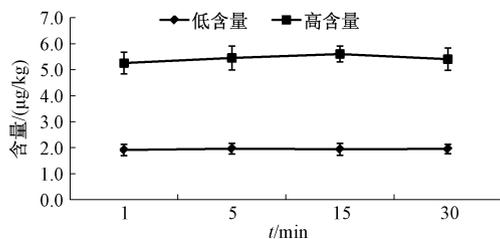


图 4 超声时间对氯霉素含量提取效率的影响 ($n=3$)

Figure 4 The effect of ultrasonic time on extraction efficiency of chloramphenicol content ($n=3$)

2.1.5 净化方式

乳及乳制品基质中含有部分脂肪,需要在提取完成后进行净化处理,一般选用 C_{18} 小柱或正己烷除脂。按照以上优化后的提取方式制得样品提取液,氮吹后加入甲醇 0.5 mL、4% 氯化钠溶液 4.5 mL 溶解残渣,涡旋 1 min,分别考察 C_{18} 柱和正己烷的净化效果。结果表明:用正己烷除脂操作方便,重现性更好,且对氯霉素含量测定没有影响。

2.1.6 萃取体积

样品提取液经正己烷除脂后,用乙酸乙酯萃取,分别考察提取体积为 5、10、15、20 mL 时的萃取效率。结果见图 5,表明用 10 mL 的乙酸乙酯进行萃取时即可达到最佳提取效率。

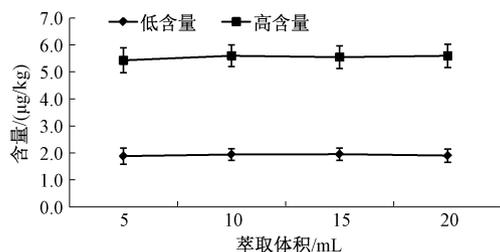


图 5 萃取体积对氯霉素含量提取效率的影响 ($n=3$)

Figure 5 The effect of extraction volume on extraction efficiency of chloramphenicol content ($n=3$)

2.2 方法验证

2.2.1 空白试验

称取与样品相同质量的阴性牛乳粉于 50 mL 塑料离心管中,除不添加内标以外,其余步骤同样品处理,制得空白基质溶液。经测试,试剂和样品基质对氯霉素的测定无干扰。

2.2.2 回收率测定

称取与样品相同质量的牛乳粉于 50 mL 离心管中,根据样品的含量水平,分别精密加入适量标准溶液,使得加标回收测定水平与实际样品含量水平

相当,混匀,按上述方法同法复原及处理加标样品,制得样品加标回收测定液,供 LC-MS/MS 测定,测定结果见表 2。

3.1%,精密度良好。

2.2.4 基质效应评价

通过采用同样的取样量和稀释倍数制备的空白基质溶液来配制校准曲线和同浓度的溶剂校准曲线进行比较,进而评价该方法测定牛乳粉中氯霉素的基质效应(ME)。经对比,溶剂配制的校准曲线得到的回归方程为: $y = 1.1667x - 0.01073$,空白基质溶液配制的校准曲线得到的回归方程为: $y = 1.1613x + 0.01027$,两条校准曲线均能保证线性回归方程的相关系数达 0.999,通过计算 $ME = (\text{基质匹配标准曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率}) \times 100\%$,可知基质效应较弱。

2.3 定值方法应用的结果分析

将优化好的定值方法用于牛乳粉中氯霉素残留分析标准物质的均匀性、稳定性和定值中,并计算各分量引入的不确定度。

2.3.1 均匀性检验结果分析

采用优化后的测定方法检验样品的瓶间均匀性,根据单因素方差分析方法处理数据,检验结果见表 3,其 F 值均小于 F_{crit} ,则说明牛乳粉中氯霉素样品的均匀性良好,本氯霉素标准物质的最小取样量为 0.5 g。

表 2 不同加标水平条件下氯霉素回收率测定结果

Table 2 Determination results of chloramphenicol recovery rate under different spiked levels

不同加标水平	样品编号	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
2 μg/kg	1-1	100.9	100.5	2.1
	1-2	101.5		
	1-3	101.5		
	1-4	101.3		
	1-5	101.7		
	1-6	96.2		
6 μg/kg	2-1	99.7	100.4	1.4
	2-2	99.1		
	2-3	102.8		
	2-4	100.3		
	2-5	101.5		
	2-6	99.8		

2.2.3 精密度测定

采用液相色谱-质谱法(同位素为内标)测定精密度。随机抽取 2 份样品,每份样品独立重复测定 3 次,计算平均值及相对标准偏差。经计算,低浓度含量水平的相对标准偏差范围为 1.1%~3.2%,高浓度含量水平的相对标准偏差范围为 1.2%~

表 3 均匀性检验单因素方差分析结果

Table 3 Uniformity test results of analysis of variance

不同含量	差异源	SS	df	MS	F	F_{crit}	均匀性引入相对不确定度
低含量	组间	0.0377	14	0.00269	1.88	2.04	0.01102
	组内	0.0431	30	0.00144			
	总计	0.0808	44				
高含量	组间	0.2186	14	0.0156	1.64	2.04	0.00830
	组内	0.2864	30	0.0095			
	总计	0.5051	44				

2.3.2 稳定性检验结果分析

样品为棕色瓶包装,可忽略光照对稳定性的影响,只考虑极端温度情况下温度对氯霉素含量的影响,选择-30℃和 50℃进行短期稳定性研究,采用同步稳定性评估的方法,分别考察第 0、1、2、4、7 d

样品的稳定性;长期稳定性按先密后疏原则进行,考察在 2~8℃条件下低温冷藏保存 12 个月的稳定性。通过回归趋势分析法处理数据,稳定性数据和数据分析结果分别见表 4 和表 5。

可知,短期稳定性和长期稳定性均能满足

表 4 12 个月的长期稳定性数据

Table 4 Long-term stability data for 12 months

不同含量	0 月	1 月	2 月	4 月	6 月	8 月	12 月
低含量	1.862	1.850	1.839	1.883	1.842	1.874	1.859
高含量	5.535	5.412	5.425	5.463	5.541	5.459	5.533

$|\beta_1| < t_{(0.05, n-2)} \cdot S(\beta_1)$,斜率不显著,没有观察到不稳定性。即在 2℃~8℃条件下低温冷藏保存 12 个月,两个浓度水平的氯霉素基体标准物质质量值稳定。

2.3.3 定值结果分析

采用一个定值方法,联合 11 家行业领域经验丰富且经国家认证的检测实验室协作定值,11 家实验

室分别编号为实验室 A~K。对返回的定值数据进行统计分析,组内可疑值检验采用格拉布斯法,组间等精度检验采用科克伦法,平均值显著性差异检验采用格拉布斯法,经剔除可疑值后,采用偏态系数和峰态系数法进行正态分布检验。各实验室定值平均结果见表 6。

表5 短期稳定性和长期稳定性数据分析结果

稳定性	温度	β_1	β_0	s^2	$t_{*} s(\beta_1)$	稳定性引入不确定度
短期稳定性(低含量)	50 °C	0.003 50	1.849 3	0.000 568 9	0.013 67	0.020 96
	-30 °C	0.001 81	1.858 5	0.000 387 2	0.011 27	
短期稳定性(高含量)	50 °C	0.020 02	5.411 8	0.005 241	0.041 48	0.026 53
	-30 °C	-0.007 44	5.563 8	0.008 202	0.051 89	
长期稳定性(低含量)	\	0.000 807	1.854 5	3.04E-04	0.004 284	0.010 77
长期稳定性(高含量)	\	0.005 047	5.457 3	3.02E-03	0.013 505	0.011 50

表6 11家实验室合作定值结果

实验室编号	低含量平均值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	高含量平均值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
实验室 A	1.756	5.233
实验室 B	1.781	5.336
实验室 C	1.870	5.075
实验室 D	2.069	5.995
实验室 E	1.906	5.770
实验室 F	1.917	5.598
实验室 G	2.055	6.124
实验室 H	1.964	5.798
实验室 I	1.847	5.524
实验室 J	2.075	6.031
实验室 K	1.833	5.655
总平均值, $\mu\text{g}/\text{kg}$	1.92	5.65
定值引入的相对不确定度	0.071 66	0.035 50

经检验,除了低含量实验室 A 的最小值需剔除以外,其余无可疑数据;各实验室组间数据等精度,且服从正态分布检验。剔除离群值后,将每组数据的平均值再次计算平均值可计算出总平均值,即为标准物质最终的特性量值。

2.3.4 不确定度评定

定值结果的不确定度由3部分组成,分别为:均匀性引起的不确定度,稳定性引起的不确定度以及定值过程带来的不确定度。经计算,基体标准物质不确定度分量结果如表7所示。

所以,牛乳粉中氯霉素残留分析标准物质的特性量值及其扩展不确定度($k=2$)分别为(1.92 ± 0.30) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和(5.65 ± 0.53) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表7 不确定度评估表

不同含量	标准值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对不确定度分量			合成不确定度	扩展不确定度 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		均匀性	稳定性	定值过程引入		
低含量	1.92	0.011 02	0.023 56	0.071 66	0.146 4	0.292 8
高含量	5.65	0.008 30	0.028 91	0.035 50	0.262 9	0.525 8

3 结论

本研究通过优化提取方法和净化方式,建立了牛乳粉中氯霉素残留分析标准物质的液相色谱-质谱定值方法,该方法利用液液萃取、正己烷除脂方式,在保证结果的准确前提下,不仅省去了过净化小柱的繁琐,而且节约了成本、提高了效率,也适用于大批量样品的同时测定。用此法检验标准物质的均匀性和稳定性,均满足要求;且多家实验室联合定值方式,也再次验证该方法具备重现性、可靠性和准确性。本研究建立的定值方法为乳及乳制品等相近基质中氯霉素的快速准确定量分析提供了技术支持。

参考文献

[1] 郭德华,邓晓军,李波,等. 鱼粉中氯霉素和克仑特罗、沙丁胺醇标准物质研制和定值[J]. 分析化学,2008(9):1221-1227.
 [2] 崔崑. 牛奶是健康膳食的基石——解读《中国居民膳食指南(2007)》奶制品篇[J]. 中国乳业,2008(2):7-8.
 [3] 韩荣伟,王加启,郑楠,等. 牛奶质量安全主要风险因子分析Ⅲ. 兽药残留[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(4):1-10.

[4] 冯云霞,王亦欣. 牛奶中兽药残留的原因分析及控制措施[J]. 中国动物保健,2016,18(11):35-36.
 [5] 马晓年,梁志坚,李怡. 固相萃取小柱-超高效液相串联质谱测定牛奶中氯霉素[J]. 中国乳品工业,2020,48(3):52-55.
 [6] 张将乐. 高效液相色谱法测定牛奶中残留的氯霉素[J]. 广州化工,2017,45(11):152-153,165.
 [7] 王浩,杨红梅,郭启雷. 液质联用法测定牛奶中氯霉素类药物残留[J]. 食品研究与开发,2015,36(6):74-76.
 [8] 吴宇伉,梅勇,张鑫,等. 高效液相色谱-质谱/质谱联用法快速检测牛奶中的氯霉素[J]. 中国卫生检验杂志,2015,25(1):29-31.
 [9] BERLINA A N, TARANOVA N A, ZHERDEV A V, et al. Quantum dot-based lateral flow immunoassay for detection of chloramphenicol in milk [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry,2013, 405(14):4997-5000.
 [10] 权伍英,高嵘,郭微玲. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中氯霉素的方法改进[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(1):147-148.
 [11] 高志莹,刘琦,洪霞,等. LC-MS/MS测定牛奶中氯霉素和四环素类抗生素[J]. 食品工业,2016,37(10):287-290.
 [12] 仲伶俐,郭灵安,毛建霏,等. UPLC-MS/MS法同时测定牛奶中替米考星、地塞米松、氟苯尼考和氯霉素残留[J]. 中国畜牧兽医,2018,45(9):2645-2652.