

用安捷伦 SampliQ OPT 固相萃取和液相色谱串联质谱法测定蜂蜜中的氯霉素、氟苯考尼和甲砜霉素

应用报告

食品安全

作者

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Carol Haney Ball
Agilent Technologies, Inc.
200 Regency Forest Drive
Cary, NC 27511
USA

摘要

本文建立了一种同时测定蜂蜜中抗菌素氯霉素 (CAP)、氟苯考尼 (FF) 和甲砜霉素 (TAP) 残留的方法并进行了方法学考察。待测物用液/液萃取和固相萃取 (SPE) 纯化，用液相色谱电喷雾电离串联质谱 (LC-ESI-MS/MS) 负离子多反应检测 (MRM) 模式定量。用氯霉素-D₅ 作为内标。该方法经验证，可获得可重复的、满意的定量结果。蜂蜜中三种抗菌素的定量限 (LOQ) 为亚-ng/g 到 ng/g 水平。回收率在 74.9 到 107% 之间，RSD 值为 0.5 和 9.7%。氯霉素和氟苯考尼的线性动态范围是 0.1 到 20.0 ng/g，甲砜霉素为 1.0 到 20.0 ng/g。研究结果表明，该方法快速、简便，可有效地监测蜂蜜中残留的氯霉素、氟苯考尼和甲砜霉素。



Agilent Technologies

前言

氯霉素 (CAP) 是抑菌性抗生素，最初来源于委内瑞拉链霉菌 (*Streptomyces venezuelae*)。由于这种药物对人体有潜在的副作用，在治疗较轻病症时不建议使用，但可用于严重感染的治疗。CAP 作为兽药，是一种高效而且可耐受的抗生素，人体上观察到的潜在副作用在动物身上未见报道。然而，由于其对人体的毒性，CAP 在动物派生食品（包括蜂蜜）中的使用受到严格的控制。欧盟 (EU) 规定动物源性食品中 CAP 的最大残留限 (MRL) 为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [1]，中国的 MRL 为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [2]。甲砜霉素(TAP)和氟苯考尼 (FF)是 CAP 的类似化合物，许多国家将其用作 CAP 的替代兽用抗生素。目前食品中的 MR 已有规定，分别为 TAP (50 ng/g) 和 FF (100 ng/g) [3]。表 1 是了这三种化合物的化学结构和性质。本应用报告报道了一种同时测定蜂蜜中三种氯霉素类化合物的方法，并进行了方法学考察。

实验部分

试剂和药品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 级或分析纯。乙腈和甲醇购自 Honeywell, Burdick & Jackson (Muskegon, MI)；醋酸乙酯购自 J.T.Baker (Phillipsburg, NJ)。二甲基亚砜购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。标准品和其它化学试剂均购自 Sigma-Aldrich。

水 (pH 8.5)的制备方法是，在 pH 计监测下，向 Milli-Q 水中滴加 0.05% NH₄OH 调节 pH 至 pH 为 8.5。将 40 mL 甲醇和 160 mL 醋酸乙酯充分混合，配制成甲醇/醋酸乙酯 20:80 的溶液。取 40 mL 乙腈加入 160 mL Milli-Q 水中，配制成乙腈/水 20:80 的溶液。

表 1. 被分析物的化学结构和性质

化合物	Log P	pKa	结构
氯霉素	1.02	9.61	
氟苯考尼	-0.12	9.03	
甲砜霉素	-0.27	9.76	

用二甲基亚砜 (DMSO) 配制各化合物标准储备液 (1.0 mg/mL)，保存在 4 °C 冰箱中。工作溶液 (2,500 ng/mL) 每周用 20:80 ACN/水稀释，也在 4 °C 条件下保存。混合标准溶液每日配制，工作溶液用 Milli-Q 水或 20:80 ACN/水稀释。

内标 (IS) 储备液 (0.1 mg/mL) 用 DMSO 配制，保存在 4 °C 冰箱中。内标添加溶液 (50 ng/mL) 每周配制，储备液用 Milli-Q 适当稀释，4 °C 保存。

仪器和材料

Agilent 1200 系列 HPLC (安捷伦科技, Santa Clara, CA, USA)

Agilent 6410 三重串联四极杆 LC/MS/MS 系统，配电喷雾离子源 (安捷伦科技, Santa Clara, CA, USA)

安捷伦 SampliQ OPT 固相萃取小柱，50 × 3 mL, 60 mg (部件号 5982-3036) (安捷伦科技, Wilmington, DE, USA)

CentraCL3R 离心机 (Thermo IEC, Needham Heights, MA, USA)

氮吹仪 (Glas-Col, Terre Haute, IN, USA)

样品制备

液/液萃取

称取 5g 蜂蜜 (± 0.05 g)，置于 50 mL 具塞聚丙烯试管中。加入 0.5 mL 内标溶液 (50 ng/mL)，涡旋混合。再加入 5 mL Milli-Q 水，与样品涡旋混合 3 分钟。然后加入 5 mL 醋酸乙酯，盖紧，振摇试管 5 分钟。3,200 rpm 下离心 5 分钟，并将上面的有机相移至另一试管中。重复加入醋酸乙酯、振摇、离心、转移有机层 2 次以上，合并所有上清。样品于 50 °C 氮气吹干，用 5 mL Milli-Q 水复溶，涡旋混合并超声，使残渣完全溶解。样品准备进行固相萃取纯化。图 1 显示了萃取流程。

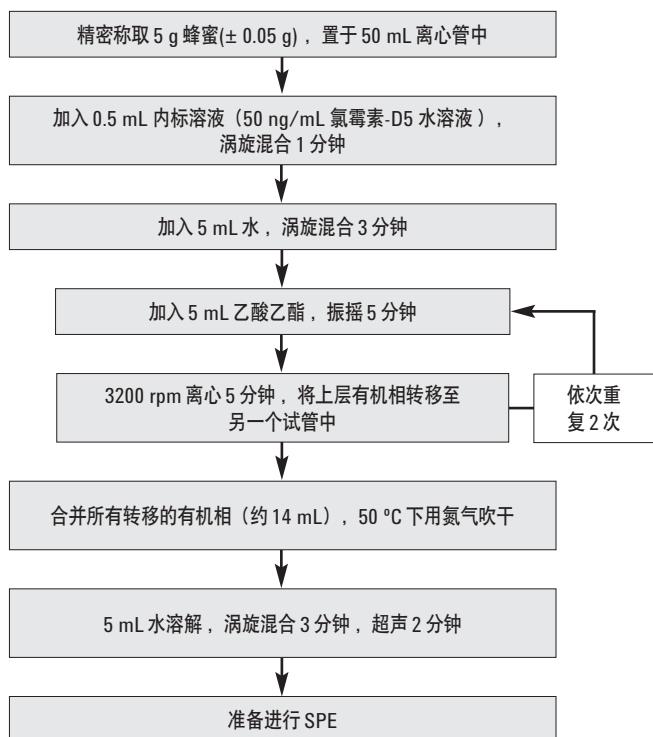


图 1. 样品制备 – 蜂蜜中氯霉素类化合物的液/液萃取

固相萃取

SPE 萃取过程如图 2 所示。安捷伦 SampliQ OPT 小柱先用 3 mL 甲醇活化，再用 5 mL 水平衡。将 5 mL 样品提取液上样于小柱上，靠重力使其慢慢流过小柱 (0.5 mL/min)。试管用 5 mL Milli-Q 水淋洗 2 次。再重复 1 次上述冲洗步骤。弃去全部淋洗液。小柱抽真空 3 分钟，使其完全干燥。最后用 5 mL 20:80 甲醇/醋酸乙酯 (2.5 mL × 2) 以 1 mL/min 的速度洗脱待测物。将洗脱液收集在干净的试管中，50 °C 下用氮气吹干。残渣用 0.5 mL 20:80 乙腈/水复溶。涡旋混合并超声，使试管中的残渣完全溶解。将样品转移到离心管中，3,200 rpm 离心 2 分钟。将样品转移到 2 mL 自动进样器样品瓶中待测。



图 2. 样品净化 – 安捷伦 SampliQ 固相萃取

仪器条件

HPLC 条件

色谱柱:	Agilent ZORBAX Eclipse Plus 150 mm × 2.1 mm, 5 μ m (部件号: 959701-906)		
流速:	0.3 mL/min		
柱温:	30 °C		
进样量:	20 μ L		
流动相:	pH 8.5 水 (A), 乙腈 (B)		
梯度:	时间	%乙腈	流速 (mL/min)
	0	20	0.3
	0.5	20	0.3
	6.0	80	0.3
	6.01	100	0.5
	6.50	100	0.5
	6.51	20	0.3
	7.00	STOP	

MS 条件

三个化合物用负离子模式检测。多反应监测通道如表 2 所示。

表 2. 各个化合物多反应监测 (MRM) 分析参数

分析物	MRM ($m/z \rightarrow m/z$)	驻留时间 (ms)
甲砜霉素	354.0 → 184.9 (定量离子) 354.0 → 290.0 (定性离子)	50 25
氟苯考尼	355.8 → 185.0 (定量离子) 355.8 → 336.0 (定性离子)	50 25
氯霉素	320.9 → 152.0 (定量离子) 320.9 → 176.0 (定性离子)	50 25
氯霉素-D ₅ (IS)	325.9 → 156.8	25

结果与讨论

线性、检测限

0.2 ng/g 强化蜂蜜的提取离子色谱图见图 3。空白蜂蜜的提取离子色谱图很干净，不含分析物，说明净化后的蜂蜜提取物对目标化合物的分析没有任何干扰。

本文的浓度范围远远低于 TAP (50 ng/g) MRL 指定的定量限 (LOQ) [3]。在本研究中 TAP 的定量限 (LOQ) 为 1.0 ng/g，其线性范围为 1.0 到 20.0 ng/g。CAP (LOQ 0.1 ng/g, MRL 0.3 ng/g) 和 FF (LOQ 0.1 ng/g, MRL 100 ng/g) 的线性范围为 0.1 到 20.0 ng/g。

将 CAP 和 FF 添加到基质空白中绘制校正曲线，浓度水平为 0.1、0.2、1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 ng/g，TAP 的添加浓度为 1.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 ng/g。5 ng/g 的氯霉素-D₅ 作为内标。以被分析物的相对响应 (被分析物峰面积/内标峰面积) 对相对浓度 (被分析物浓度/内标浓度) 作图，得到校正曲线。信噪比在 4 到 5 时为检测限 (LOD)。表 3 列出了线性方程、相关系数 (R^2) 和 LOD。氯霉素的校正曲线见图 4。

表 3. 氯霉素类化合物的线性和 LOD

被分析物	线性回归方程	R^2	LOD (ng/g)
氯霉素	$Y = 0.5643X - 0.0001$	0.9957	0.02
氟苯考尼	$Y = 0.8790X + 0.0006$	0.9932	0.02
甲砜霉素	$Y = 0.1510X - 0.0018$	0.9953	0.20

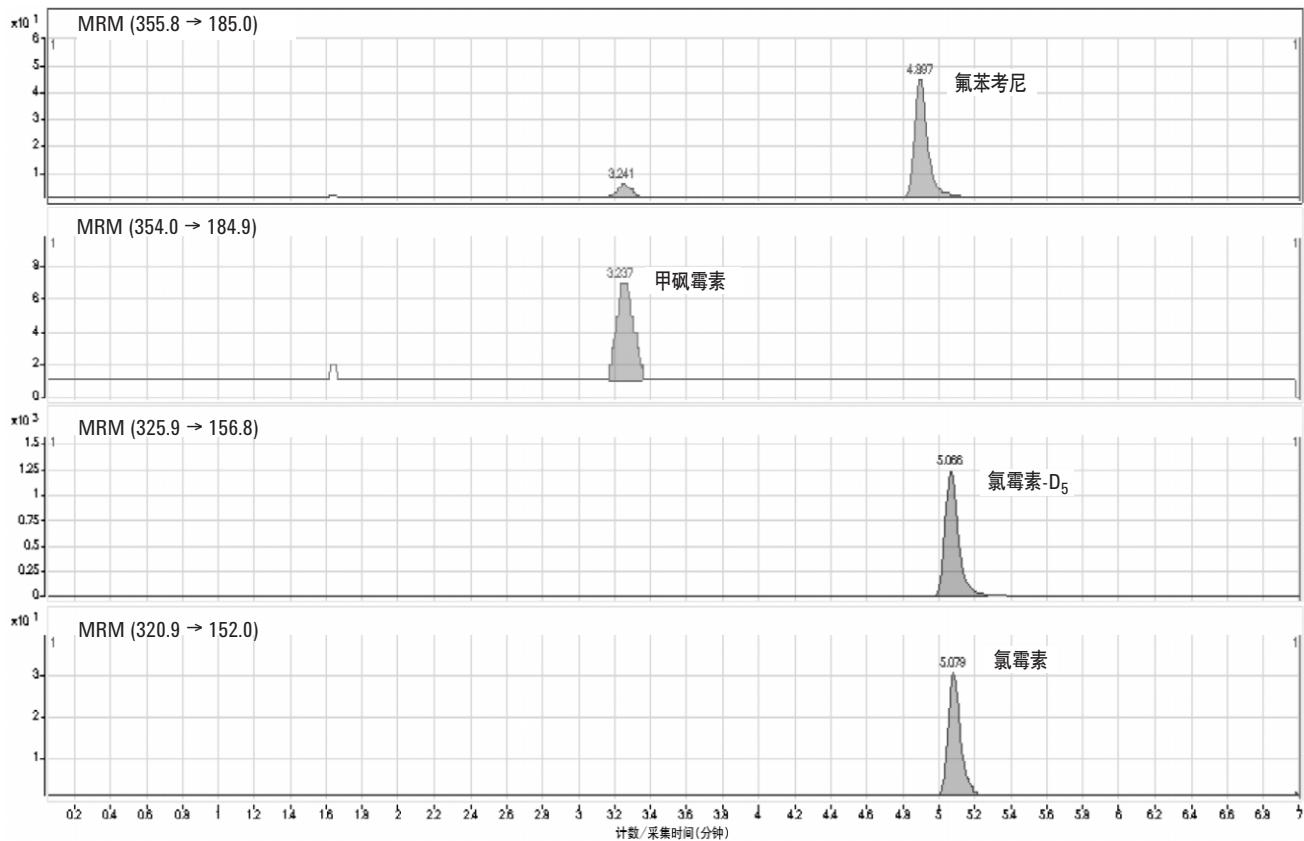


图 3. 0.2 ng/g 强化蜂蜜提取物的色谱图

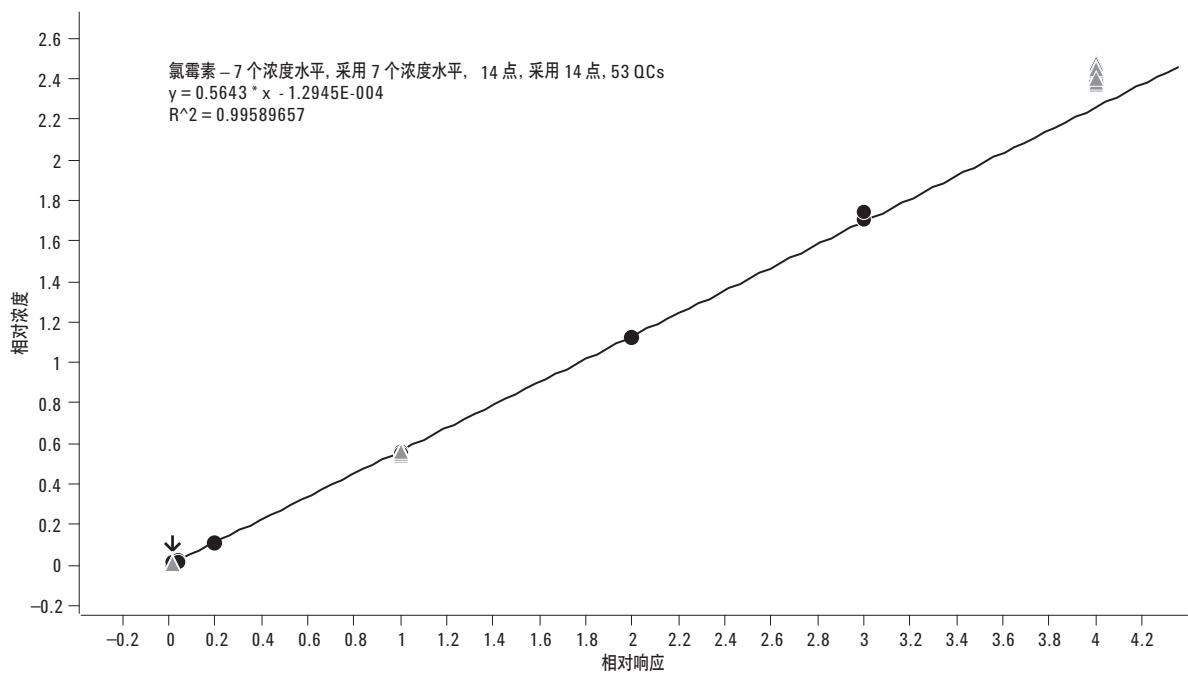


图 4. 氯霉素 (0.1 到 20.0 ng/g) 的校正曲线。• 表示校正曲线点的样品结果，△ 表示质控的样品结果

回收率和重现性

回收率和重现性的测定，向蜂蜜中添加氯霉素类化合物标准品作为质控样品 (QC)，浓度水平为 0.1 ng/g (TAP 为 1.0 ng/g)、5.0 ng/g 和 20.0 ng/g，用基质添加得到的校正曲线对这些 QC 样品进行定量测定。每个浓度水平重复分析 6 次 (TAP 低浓度重复 4 次)。回收率和重现性 (以%RSD 表示) 数据见表 4。CAP 和 FF 在所有 QC 水平上都显示了良好的回收率和重现性。TAP 在所有浓度上的回收率能满足分析需要，重现性很好。

表 4. 强化蜂蜜中氯霉素类化合物的回收率和重现性

被分析物	添加浓度 (ng/g 蜂蜜)	回收率 (%)	RSD (%) n = 6
氯霉素	0.10	96.94	3.51
	5.00	98.88	0.87
	20.00	107.32	0.46
氟苯考尼	0.10	100.67	9.77
	5.00	100.28	2.84
	20.00	107.49	2.55
甲砜霉素	1.00	76.00	4.39*
	5.00	74.89	2.34
	20.00	89.81	3.83

* 实验重复了 4 次。

结论

安捷伦 SampliQ OPT SPE 小柱为蜂蜜中氯霉素，氟苯考尼和甲砜霉素的纯化与富集，提供了简便而有效的方法。基质添加标准品计算得到的回收率和重现性说明，蜂蜜中氯霉素残留的测定方法符合欧盟和中国法规的要求。蜂蜜中的杂质和基质效应很小，对目标化合物的定量没有干扰。三种氯霉素类化合物的 LOQ 都远远低于其 MRL。

参考文献

1. GB/T 18932.19-2003, "Determination of Chloramphenicol Residues in Honey -LC/MS/MS Method."
2. "Commission Decision" 2003/181/ED of 13 March 2003, Off. J. Eur. Commun. L71/17 (2003).
3. "Handbook of Food Analysis: Residue and Other Food Component Analysis," CRC Press, 2004, pgs 937, 940.

更多信息

如需了解我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、描述和规格，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司, 2009
中国印刷
2009 年 9 月 16 日
5990-3615CHCN