

使用固相萃取结合 HPLC-MS-MS 对蜂王浆中残留的氯霉素类药物进行分析

作者

张聪聪, 吴翠玲
安捷伦科技 (中国) 有限公司

周金慧
中国农业科学院蜜蜂研究所

摘要

本文开发出一种对蜂王浆中的氯霉素类药物残留进行分析的方法。该方法使用 Agilent Bond Elut Plexa PCX 固相萃取小柱与高灵敏度 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统相结合, 分别采用负离子、正离子模式检测蜂王浆中的氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留。

前言

氯霉素类药物是一类广谱抗生素, 主要包括氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考, 用于防治畜禽和水产动物的细菌性疾病。氟苯尼考胺是氟苯尼考的主要代谢物, 通常以氟苯尼考胺作为动物体内氟苯尼考的残留标示物。氯霉素存在严重的毒副作用, 且化学性质稳定, 因此被我国、美国和欧盟许多国家禁止用于可食用动物。甲矾霉素毒性小于氯霉素, 效果好, 是氯霉素的理想替代药物。欧盟和我国均规定动物性食品中甲矾霉素的最高残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。氟苯尼考又名氟甲矾霉素, 是第三代氯霉素类广谱抗菌药, 毒性较小, 药效优于甲矾霉素和氯霉素。欧盟规定氟苯尼考及主要代谢物折算成氟苯尼考胺计算总和, 最高残留限量为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。日本肯定列表中氟苯尼考在畜禽组织中的限量也均大于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

实验部分

仪器和设备

采用 Agilent 1290 Infinity II 高效液相色谱系统与 Agilent 6470 三重四极杆液质联用系统。

样品前处理

称取 2 ± 0.1 g 蜂王浆样品，加入 0.25 g 胰蛋白酶和 2 mL 水，充分混匀后于 40 °C 下避光振荡 2 h。用 8 mL 2% 氨化乙腈涡旋提取 1 min，低温离心 10 min，移上清液于另一试管中，于 40 °C 条件下氮吹剩水，用超纯水定容至 5 mL，备用。固相萃取流程如下图所示。

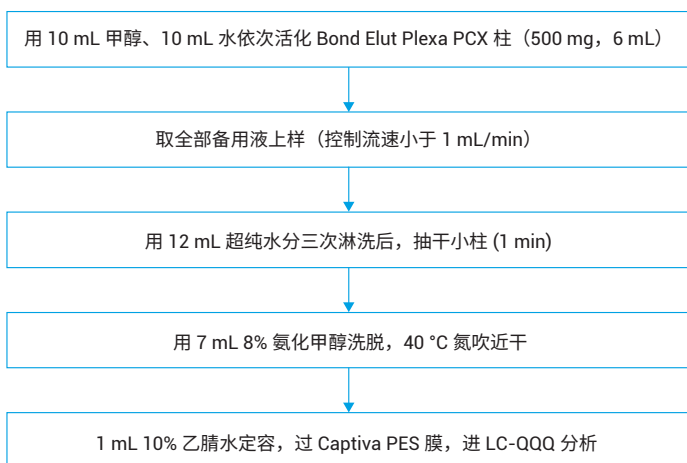


图 1. 蜂王浆中氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的固相萃取流程

色谱条件

负离子模式

色谱柱: Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm
柱温: 40 °C
进样量: 5 μL
流动相 A: 水
流动相 B: 乙腈
流速: 0.4 mL/min
梯度条件: 0–2 min, 10%–30% B;
2–4 min, 30%–75% B;
4–4.1 min, 100% B;
4.1–7 min, 100% B;
7.1 min, 10% B
后运行时间: 3 min

正离子模式

色谱柱: Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100mm, 2.7 μm
柱温: 35 °C
进样量: 5 μL
流动相 A: 0.2% 甲酸水溶液
流动相 B: 甲醇
流速: 0.4 mL/min
梯度条件: 0–1 min, 5% B;
1–3 min, 5%–60% B;
3–3.1 min, 95% B;
3.1–7 min, 95% B;
7.1 min, 5% B
后运行时间: 3 min

质谱条件

负离子模式

干燥气温度: 250 °C
干燥气流速: 7 L/min
雾化器压力: 40 psi
鞘气温度: 370 °C
鞘气流速: 12 L/min
毛细管电压: 2500 V(-)

正离子模式

干燥气温度: 250 °C
干燥气流速: 7 L/min
雾化器压力: 35 psi
鞘气温度: 325 °C
鞘气流速: 11 L/min
毛细管电压: 3500 V(+)

表 1. MRM 参数

分析物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)	离子模式
氯霉素	321.0	257.0	100.0	10.0	负
	321.0	152.0	100.0	15.0	
氟苯尼考	356.0	335.9	100.0	8.0	负
	356.0	184.9	100.0	15.0	
甲砒霉素	353.9	289.9	120.0	10.0	负
	353.9	184.9	120.0	15.0	
氟苯尼考胺	248.1	230.1	70.0	4.0	正
	248.1	130.1	70.0	20.0	

结果与讨论

如图 2-3 和表 2-3 所示, 本文所述的方法适用于分析王浆中残留的氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺。该方法负离子模式的 3 种化合物和正离子模式的氟苯尼考胺的定量限分别为 1 μg/kg 和 2 μg/kg。氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考在 1-100 ng/mL 范围内表现出良好的线性 (基质校准曲线), 氟苯尼考胺在 2-200 ng/mL 范围内表现出良好的线性 (基质校准曲线)。在 1、2、5 μg/kg 和 2、4、10 μg/kg 3 个加标水平下, 蜂王浆中各种化合物的加标回收率分别为 72.0%–116.9% 和 80.2%–87.7%, RSD ≤ 6.9%。

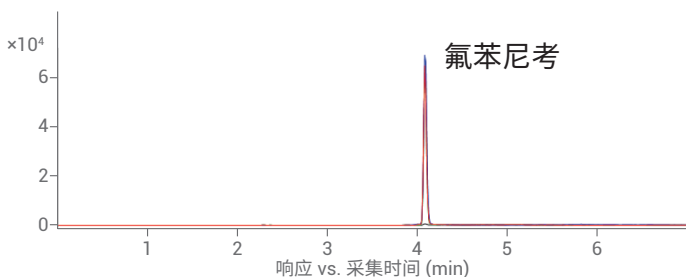
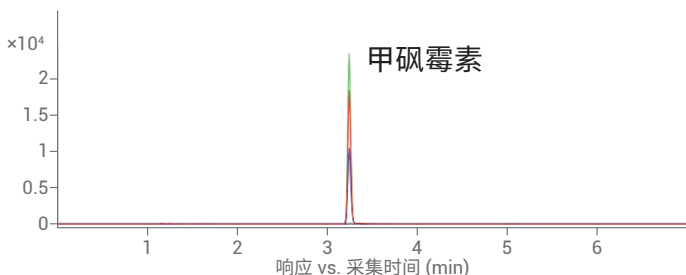
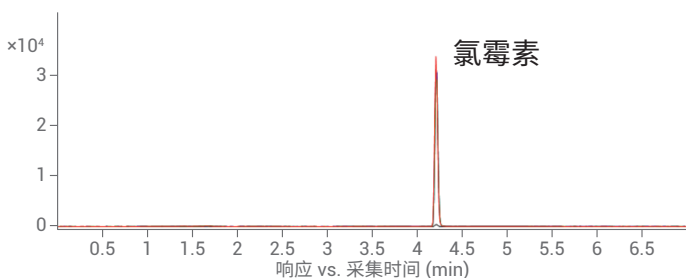


图 2. 氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考 10 ng/mL 标品 (蓝色)、蜂王浆空白样品 (黑色)、10 ng/mL 基质加标样品及 5 μg/kg 加标样品的色谱图

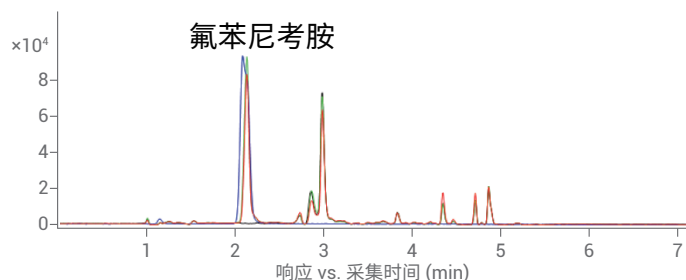


图 3. 氟苯尼考胺 20 ng/mL 标品 (蓝色)、蜂王浆空白样品 (黑色)、20 ng/mL 基质加标样品及 5 μg/kg 加标样品的色谱图

表 2. 氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的线性方程

分析物	线性方程	相关系数 R ²
氯霉素	$Y = 21410.1 * X + 218067.9$	0.9997
甲矾霉素	$Y = 2322.4 * X - 2608.1$	0.9991
氟苯尼考	$Y = 18627.1 * X - 14290.1$	0.9997
氟苯尼考胺	$Y = 41481.1 * X - 56700.2$	0.9995

表 3. 氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺在不同加标水平下的回收率

目标分析物	加标 1 μg/kg (氟苯尼考胺 2 μg/kg)		加标 2 μg/kg (氟苯尼考胺 4 μg/kg)		加标 5 μg/kg (氟苯尼考胺 10 μg/kg)	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
氯霉素	100.5	1.0	115.0	4.3	116.9	0.6
甲矾霉素	85.0	3.0	72.0	5.7	78.7	3.7
氟苯尼考	93.7	4.9	96.7	6.4	105.9	6.9
氟苯尼考胺	87.7	1.8	83.0	4.8	80.2	4.1

结论

本文采用 Agilent Bond Elut Plexa PCX (500 mg, 6 mL) 固相萃取柱, 利用其反相和离子交换两种保留机理, 同时净化蜂王浆中的氯霉素、甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺, 使用 Agilent Poroshell 120 快速分析柱并结合 Agilent 6470 分别采用正负两种模式获得较高的灵敏度。该方法适用于分析蜂王浆中的氯霉素类药物残留。

消耗品订购信息

消耗品	部件号
Agilent Bond Elut Plexa PCX, 500 mg, 6 mL	12258506
Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm	695975-302
Agilent VacElut 20 固相萃取装置	12234104
Agilent Captiva 过滤膜, PES, 0.2 μm, 13 mm	170113023

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn



微信搜一搜

安捷伦视界

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更,恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2019
2019年8月1日, 中国出版
5994-1075ZHCN

