

采用睿科 Fotector Plus 全自动固相萃取仪测定

动物源性食品中氯霉素类的残留量

摘要:用高效液相色谱/串联质谱 (HPLC/MS) 同时测定猪肉、鱼肉中的氯霉素 (CAP)、氟甲砜霉素 (FF) 和甲砜霉素 (TAP)。均质样品后, 采用乙腈提取, 去脂后经浓缩提取物, 采用 Reeko 全自动固相萃取仪硅胶柱净化; 采用 HPLC/MS 电喷雾 (ESI), 负离子, 多反应监测 (MRM) 模式检测。氯霉素和氟甲砜霉素在添加浓度为 0.1~5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ 范围内, 回收率分别为 84.95~97.95%, 72.57~91.7% 之间; 甲砜霉素在添加浓度为 1.0~5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ 范围内, 回收率在 69.93~91.75% 之间; 相对标准偏差 RSD% ($n=4$) 在 4.2~12.3 之间。方法的准确度和精密度均符合残留分析要求。

1 前言

氯霉素类药物是一类光谱性抗生素, 作为药物常用于家禽疾病治疗和预防^[1]。由于氯霉素对人体有严重的毒副作用, 目前美国、日本、韩国和欧盟等国家和地区均已禁止在食用性动物中使用氯霉素, 并规定在动物源性食品中不得检出^[2]。食品中氯霉素类药物的残留检测主要有 HPLC/US^[3]、HPLC/MS^[4-6]、GC/MS^[7, 8] 检测。本实验采用 GB/T22338-2008 中的方法, 用 Reeko 全自动固相萃取仪净化样品, 实现自动化净化浓缩样品, 大大提高效率; HPLC/MS 检测仪器检测猪肉和鱼肉中的氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素, 方法操作简便, 免去 GC 的衍生化步骤, 可满足检测要求。

2 实验部分

2.1 实验试剂与仪器

丙酮 (色谱纯, 西格玛公司), 正己烷 (色谱纯, 西格玛公司), 乙腈 (色谱纯, 西格玛公司), 硅胶固相萃取小柱 (Agilent Bond Elut SI, 500mg/3ml)。无水硫酸钠 (AR, 国药) 氯霉素、甲砜霉素和氟甲砜霉素标准品 (美国 sigma)。将上述标准物质以甲醇为溶剂配制成 1mg/mL 的混合标准物质储备液, 置于 -20°C 冰箱保存。

全自动固相萃取仪 (Reeko Fotector 06C), 液相色谱-质谱联用仪 (Agilent 1260+Agilent 6410, ESI 源, Agilent EC-C18 2.7 μm ×3.0×50mm)。均质机 (FLUKO, FA25), 离心机 (湘仪, H-2050R), 旋转蒸发器 (IKA®RV10 basic, IKA®HB10 basic), 涡旋混合器 (IKA®MS3 basic)。

2.2 仪器条件

2.2.1 色谱条件

流动相: 40% 甲醇水; 流速: 0.2ml/min; 柱温: 30°C; 进样量: 10 μL 。

2.2.2 质谱条件

电喷雾离子源, 负离子模式, 多反应监测, 电喷雾电压: 4000V; 离子源温度: 350°C; 雾化气压力: 15psi; 辅助气流速: 10L/min。

2.3 样品前处理

2.3.1 样品中氯霉素类提取

称取 5.00g (精确至 ± 0.01) 试样, 加入 5g 左右的无水硫酸钠; 加入一定量氯霉素类工作液, 加入 20mL 乙腈, 均质 1min, 再用 20mL 乙腈清洗均质刀头, 以 5500r/min 离心 5min, 转移上清液于分液

漏斗中，加 15mL 乙腈饱和正己烷。残渣中再加入 20mL 乙腈，振摇 3min，以 5500r/min 离心 5min，取上清液转移至同一分液漏斗，振荡 5min，静置分层，取下层乙腈层于鸡心瓶中，加入 5ml 异丙醇，旋转蒸发至近干。加入 5ml 丙酮+正己烷（1+9），振荡后转移到上样瓶中，过柱净化。

2.3.2 固相萃取柱净化样品

硅胶固相萃取小柱用 10mL 丙酮+正己烷(1+9) 以 20mL/min 的速度活化；5ml 丙酮+正己烷（1+9）溶解上步提取液残留物以 1mL/min 上样；2mL 丙酮+正己烷（1+9）淋洗，5mL 丙酮+正己烷（6+4）溶液洗脱。洗脱液在 40℃、10psi 条件下浓缩至近干，用 1mL30% 甲醇水定容。操作程序见下图 1。

No	Command	Solvent	Output	Push speed	Volume	Time
1	Sample path wa...	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	60	5	0.1
2	Syringe washing	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	60	2	0
3	Condition	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	20	10	0.5
4	Sample loading	Wastel	Wastel	1	5	5
5	Vials washing	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	60	2	0
6	Rinse	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	2	2	1
7	Syringe washing	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	20	3	0.2
8	Elute	C3H6O-C6H14(1:9)	Wastel	1	5	5
9	End					

图 1 全自动固相萃取仪运行程序

2.4 回收率及精密度

为消除基因而带来的离子抑制对定量测定的影响，需用空白样品提取液来配制一系列混标标准工作曲线。在 5g 空白猪肉和鱼肉样品中分别添加 0.1、1.0、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素混标。回收率及精密度见表 5。从表中数据看出，3 个浓度加标，不同基质中的加标回收率均在 69-98%之间，相对标准偏差小于 15%，符合痕量残留检测的要求；而甲砜霉素在添加浓度 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的条件下，由于杂质干扰比较大，仪器灵敏度不够高，造成未检出。空白加标 MRM 图谱见图 2。

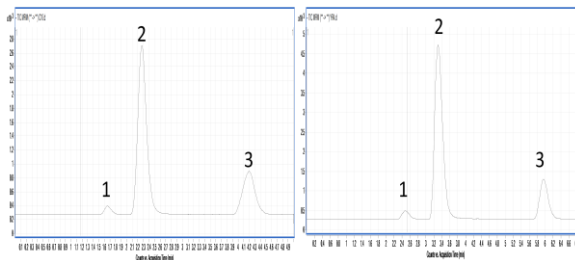


图 1 猪肉（左）、鱼肉（右）空白样品加标中甲砜霉素（1，2.52min）、氟甲砜霉素（2，3.342min）和氯霉素(3，6.03min)的 MRM 色谱图

表 1 氯霉素类药物在不同基质中的平均回收率和精密度

名称	添加浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	猪肉基质		鱼肉基质	
		回收率 /%	RSD (n=4) /%	回收率 /%	RSD (n=4) /%
氯霉素	0.1	84.95	10.1	88.30	11.3
	1.0	97.95	4.2	87.18	8.3
	5.0	92.37	5.1	88.34	6.2
氟甲砜霉素	0.1	74.80	12.3	91.70	7.8
	1.0	83.42	4.6	72.57	5.9
	5.0	85.01	5.9	75.54	8.5
甲砜霉素	0.1	-	-	-	-
	1.0	91.75	10.9	69.93	8.4
	5.0	84.57	6.8	80.03	7.5

4 小结

动物组织样品基质复杂，干扰物大，给药物残留分析带来一定的难度。本方法采用乙腈提取，Reeko 全自动固相萃取仪硅胶小柱净化，HPLC/MS 检测，免去内标物的添加，降低成本，效果比较客观，实用性强，可作为动物组织中氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素残留的检测。