

解决方案

基围虾中氯霉素类化合物残留量的测定

关键字

高效液相色谱/串联质谱，全自动固相萃取，氯霉素

介绍

氯霉素类药物是一类广谱性抗生素，作为药物常用于家禽疾病治疗和预防。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。本实验采用GB/T22338-2008中的方法，均质样品后采用全自动固相萃取仪实现自动化净化浓缩样品，大大提高效率。采用HPLC-MS/MS电喷雾（ESI），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. 仪器、耗材与试剂

仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪	液相色谱-质谱联用仪 Agilent1260+Agilent 6410, ESI 负离子模式
Raykol AH-30 全自动均质器	离心机 (湘仪, H-2050R)
Raykol MPE-16 高通量真空平行浓缩仪	涡旋混合器 (IKA®MS3 basic)
Raykol Auto EVA 60 全自动平行浓缩仪	

耗材

硅胶固相萃取小柱 (RayCure Silica, 500mg/6ml, 货号: RC-204-16844)

试剂与溶剂

丙酮 (色谱纯, sigma 公司), 正己烷 (色谱纯, sigma 公司), 乙腈 (色谱纯, sigma 公司), 无水硫酸钠 (AR, 国药)。氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准物质 (sigma 公司)

2. 样品提取与前处理

2.1 样品前处理

称取 5.00g (± 0.01) 新鲜虾肉试样, 加入 5 g 左右的无水硫酸钠; 加入一定量氯霉素类混合标准物质工作液, 加入 20 mL 乙腈, 用 AH-30 全自动均质器均质 1 min, 再用 20 mL 乙腈清洗均质器刀头, 以 5500 r/min 离心 5 min, 转移上清液于分液漏斗中, 加 15 mL 乙腈饱和正己烷。残渣中再加入 20 mL 乙腈, 振荡 3 min, 以 5500 r/min 离心 5 min, 取上清液转移至同一分液漏斗, 振荡 5 min, 静置分层, 取下层乙腈层于浓缩瓶中, 加入 5 mL 异丙醇, 用 MPE-16 高通量真空平行浓缩仪浓缩至近干。加入 5 mL 丙酮+正己烷 (1:9), 振荡后转移到上样瓶中, 过柱净化。

2.2 固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科 Fotector Plus
固相萃取柱	硅胶柱 (RayCure, 500mg/6mL)
淋洗	丙酮/正己烷混合溶液 (1:9)
洗脱	丙酮/正己烷混合溶液 (6:4)

2.3 净化

硅胶固相萃取小柱用 10 mL 丙酮+正己烷 (1+9) 以 10 mL/min 的速度活化; 5 mL 丙酮+正己烷 (1+9) 溶解上步提取液残留物以 1 mL/min 上样; 2 mL 丙酮+正己烷 (1+9) 淋洗, 5 mL 丙酮+正己烷 (6+4) 溶液洗脱。洗脱液用 Auto EVA 60 全自动平行浓缩仪在 40 °C 条件下浓缩至近干, 用 1 mL 30% 甲醇水定容。操作程序见下图-1 所示。

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	丙酮正己烷(1:9)				3.2
2	活化	丙酮正己烷(1:9)	有机废液	10	10	2.3
3	上样		有机废液	1	5	5.6
4	清洗样品瓶	丙酮正己烷(1:9)	有机废液	60	3	4.2
5	淋洗	丙酮正己烷(1:9)	有机废液	2	2	1.5
6	清洗注射泵	丙酮正己烷(6:4)		30	3	0.5
7	洗脱	丙酮正己烷(6:4)	收集	1	5	5.4
8	气推		收集	1	2	2.4
9	结束					
10						

图-1. Fotector Plus 氯霉素固相萃取净化方法

3. 检测条件

3.1 液相色谱质谱联用条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μ m $\times$ 2.1 mm $\times$ 50mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A: H ₂ O B: Methanol
柱温	30 °C
进样体积	10 μ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350° C
簇电压	4000
雾化压力	35psi
洗脱梯度	0-1.5 min, 5%流动相 B; 2 min-3.5 70% 流动相 B, 5.0-6.0 5% 流动相 B

3.2 MRM 参数

名称	分子量 MW	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 DP/V	碰撞气流量 CE/V	保留时间/min
氯霉素 Chloramphenicol	323	321.1/257.1	321.1/152.0	120	5	6.03
		321.1/ 52.1		120	10	
氟甲砜霉素 Florfenicol	358	356.1/184.9	356.1/184.9	135	4	3.34
		356.1/85.1		135	12	
甲砜霉素 Thiamphenicol	356	353.9/90.0	353.9/184.9	130	4	2.52
		353.9/185.1		130	15	

3.3 标准样品质谱图

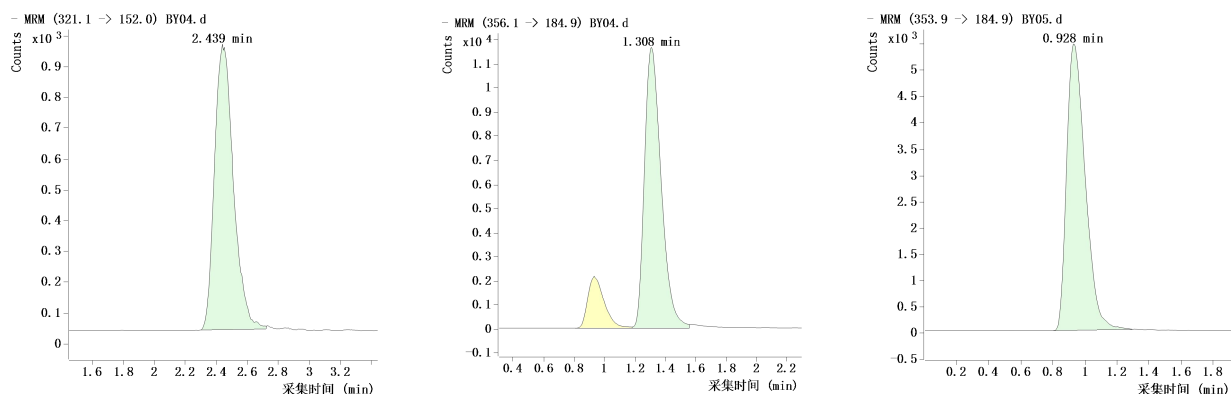


图-2. 三种氯霉素类的质谱图 (5 $\mu\text{g/L}$, 左-氯霉素, 中-氟甲砒霉素, 右-甲砒霉素)

4. 方法可行性验证

4.1 基质效应验证

为了消除基质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。组分系列浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/kg}$ 以各组分的质量浓度 (X , $\mu\text{g/L}$) 对峰面积 (Y) 绘制标准工作曲线。如果基质标准曲线响应与标准曲线响应相似, 则可以直接用标准

曲线对样品进行定量; 如果不准确, 请使用基质加标工作曲线进行定量。

选择定量离子的峰面积作为纵坐标, 浓度作为横坐标, 做相关曲线, 曲线为线性回归, 各点权重相等, 拟合出工作曲线, 要求 $R^2 > 0.995$; 此曲线两周需要重新配置一次。

4.2 样品基质加标测试

在 5 g 空白虾肉样品中分别添加 0.1、1.0、5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯霉素、氟甲砒霉素和甲砒霉素混标。回收率及精密度见表-1。从表中数据看出, 3 个加标浓度的回收率均在 79–95% 之间, 相对标准偏差小于

10 %, 符合痕量残留检测的要求; 而甲砒霉素在添加浓度 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。

表-1 虾肉基质加标回收率及 RSD 值

名称	添加浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	鱼肉基质	
		回收率/%	RSD (n=4) /%
氯霉素	0.1	88.30	5.6
	1.0	87.18	8.3
	5.0	88.34	6.2
氟甲砒霉素	0.1	91.70	7.8
	1.0	82.57	5.9
	5.0	85.54	6.5
甲砒霉素	0.1	\	\
	1.0	79.93	4.4
	5.0	80.03	7.5

5. 结果与讨论

氯霉素、氟甲砒霉素和甲砒霉素易溶于甲醇、

乙酸乙酯、丙酮和乙腈等, 文献报道多采用碱化乙

酸乙酯提取，可以得到很好的回收率。本实验参考 GB/T 22338-2008 方法，用乙腈提取食品中的氯霉素类药物。

根据提取的方法不同，可选择多种净化小柱，大量文献报道多采用 HLB、C18 与硅胶柱均取得比

较理想的效果。由于 HLB 和 C18 固相萃取小柱价格比较贵，洗脱溶剂比较多的特点，本实验采用硅胶小柱净化提取液，方法简便快捷，成本低，且洗脱溶剂用量少。

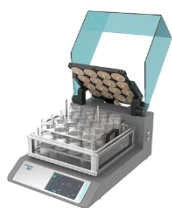
6. 总结

本解决方案操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。其中 AH-30 全自动均质器可以自动完成 16 个样品均质，均质后能够自动清洗刀头，清洗刀头时可以采用水洗、超声洗和溶剂洗等多级清洗组合，有效防止交叉污染，且全程无需人工干预；MPE-16 高通量真空平行浓缩仪特别适用于大体积提取液的浓缩，浓缩效率是单台旋蒸的 16 倍。独特的尾管设计方便用户观察剩余体积和定容；Fotector

Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。Auto EVA 60 全自动平行浓缩仪通过独特的针自动追随液面技术可以极大地减少氮气使用量，同时避免手动氮吹需要经常去调节氮吹针高度带来的麻烦。



全自动均质器
均质



高通量真空平行浓缩仪
浓缩



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

智能化、自动化实验室整体解决方案

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 10 月版