文章编号:1009-038X(2003)06-0081-04

HPLC 测定牛奶和虾仁中氯霉素残留

戴 军, 陈尚卫, 顾小红, 汤 坚
(江南大学 分析测试中心,江苏 无锡 214036)

摘 要: 建立了一种检测虾仁和牛奶中氯霉素残留的高效液相色谱(紫外检测,即 LC/UV)方法和液相色谱-电喷雾电离质谱联用(LC/ESI-MS)检测方法. 色谱分离选用 Symmetry C_{18} 柱,以乙腈-水为流动相. 紫外检测波长为 278 nm,质谱采用选择性离子检测(M/Z 321.0,$[M-H]^-$). 样品制备省去传统的多次液-液萃取过程,采用有机溶剂直接提取,转溶后,用固相萃取方法净化样品. 虾仁和牛奶样品的平均回收率分别为 93.7%和 96.0%;检测限:LC/UV 为 2.5 μg/kg 和 8.3 μg/kg;LC/ESI-MS 为 1.3 μg/kg 和 4.5 μg/kg. 方法准确灵敏,样品预处理较简便快速.

关键词: 氯霉素;高效液相色谱;电喷雾电离质谱;虾仁;牛奶
中图分类号:R 978.13 **文献标识码**: A

HPLC Detection of Chloramphenicol Residues in Shrimp and Milk

DAI Jun, CHEN Shang-wei, GU Xiao-hong, TANG Jian
(Testing & Analysis Center of Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: A rapid and sensitive high performance liquid Chromatographic method (LC/UV) and liquid Chromatographic mass spectrometric method(LC/ESI-MS) were developed for detection of trace amounts of Chloramphenicol (CAP) residues in shrimp and milk. The analysis was performed on the Symmetry C_{18} column (4.6mm id 150mm and 2.1mm id 150mm) with acetonitrile-water as mobile phase, and UV detection at 278nm. The electrospray ionization mass spectrometry was operated in the negative ion mode using selected ion monitoring (M/Z 321.0, $[M-H]^-$). The average recoveries of CAP in shrimp and milk were 93.7% and 96.0%. The detection limit were 2.5 μg/kg and 8.3 μg/kg by LC/UV, 1.3 μg/kg and 4.5 μg/kg by LC/ESI-MS. The samples preparation in this method was simple, rapid and reliable due to utilization of using solid-phase extractaon (SPE) for cleanup of lipid and pigment.

Key words: chloramphenicol; high performance liquid chromatography; electrospray ionization mass spectrometry; shrimp; milk

---

氯霉素(chloramphenicols,即 CAP)属广谱抗生素,曾是动物临床常用的抗生素,目前仍在一定范围内使用. 但由于 CAP 具有抑制造血机能等毒副作用,近年来人们对其在虾仁、牛奶等动物性食品中的残留特别重视. 许多国家严格禁止将 CAP 用于食用动物,规定 CAP 的最高残留限量(MRL)

收稿日期:2003-03-24; 修回日期:2003-06-25.
作者简介: 戴军(1958-),男,江苏盐城人,高级工程师,工学硕士.
万方数据

为 0～0.01 mg/kg. 有关氯霉素在食品中的残留量分析方法主要有 ELISA(酶联免疫法)、GC、和 GC/MS 及 HPLC 等方法. ELISA 法主要用于快速筛选检测,但定性和定量均不够准确;GC 和 GC/MS 由于需衍生化,操作较为麻烦;HPLC 分析较准确且过程相对较简便,因而应用较多. Wal. J. M[1] 等用 Spherisorb ODS 柱以甲醇-水为流动相分析了牛奶中 CAP,其色谱分离度和峰型均不够理想,杂峰干扰较大,样品处理也较复杂. 李兰生和王勇强[2] 用 Bondapak－C_{18} 柱,也以甲醇-水为流动相测定了投喂饵药后 48 h 内虾体内不同组织中 CAP 质量分数的变化(0.59～380.1 μg/g),其样品处理是用甲醇沉淀蛋白质后直接进样,操作较简单,但可能含有一定量的弱极性成分尤其是色素等留在分析柱中,影响多次进样后的基线稳定及色谱柱寿命. Delepine 等[3] 用 LC/PB/MS 测定牛肉中 CAP 残留,其检测限为 2 μg/kg. 作者采用 Symmetry C_{18} 柱,以乙腈-水为流动相建立了速冻虾仁和牛奶中氯霉素残留的 HPLC/UV 分析方法和 LC/ESI-MS 检测方法.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

Waters600 高效液相色谱仪,配 2487 双通道紫外可见光检测器和 M32 色谱工作站:美国 Waters 公司产品;Agilent1100 LC/MSD:美国 Agilent 公司产品.

氯霉素标准品,购自德国 RdH 公司;速冻虾仁样 1＃(250 g 装)和 2＃(200 g 装),分别为上海、福建某公司产;牛奶样 1＃(200 mL 盒装)和 2＃(200 mL 袋装),分别为上海与江苏产,2002 年 12 月购于无锡某超市; 3＃(225 mL 盒装),江苏产;4＃(486 mL 袋装),天津产;5＃(200 mL 盒装),上海产;2003 年 3 月购于无锡某超市.

乙腈,色谱纯,德国 Merck 公司产品;水,超纯级,购自无锡华晶微电子公司;其它试剂均为分析纯.

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制 精确称取 25.0 mg 氯霉素标准品于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,再稀释成质量浓度分别为 12.5, 5.0,1.25, 0.25,0.025,0.005 μg/mL 的标准溶液系列,分别用 0.45 μm 微孔滤膜.

1.2.2 样品制备 虾仁样:将虾仁打成均匀的糊状肉泥,准确称取 10 g 左右,放在 50 mL 具塞刻度管中,分别加入 15 mL 乙酸乙酯和 5 mL 水,于漩涡振荡器上振荡 3 min 后静置;使液体经滤纸过滤入分液漏斗中,将残渣再次加入 15 mL 乙酸乙酯和 5 mL 水,再次振荡、静置和过滤,反复提取 3 次,滤液均合并入分液漏斗中,去除下层保留酯相,于 60 ℃ 水浴上旋转蒸发浓缩近干;加入体积分数为 80％的乙醇溶液,超声振荡充分溶解残留物,并转移至 10 mL 容量瓶中定容至刻度,再过滤后取少量通过 Sep-pak C_{18} 固相萃取柱处理去除残余脂质和色素,供上机进样用.

牛奶样:准确称取 3 g 左右牛奶于 10 mL 容量瓶中,用无水乙醇定容后,于漩涡振荡器振荡 2 min 左右,静置,过滤后通过 Sep-PakC_{18} 固相萃取柱去除脂质,过滤液供上机分析用.

1.2.3 HPLC 分析条件 色谱柱:Waters symmetry C_{18},D 3.9 mm×150 mm;流动相:乙腈-水,体积比为 40∶60;柱温:30℃;检测波长:278 nm;体积流量:1 mL/min;进样体积 20 μL.

1.2.4 LC/MS 分析条件 ESI 负离子 SIM 检测(m/z 321.0,[M-H]$^-$);传输电压:70 V;干燥气体积流量:10 L/min;喷雾器压力:40 psi;干燥气温度:350 ℃;毛细管电压:3 500 V;色谱柱 Waters symmetry C_{18},D 2.1 mm×150 mm;流动相:乙腈-水,体积比 40∶60;柱温:40 ℃;体积流量:0.3 mL/min;进样体积:5 μL.

2 结果与讨论

2.1 HPLC-UV 检测线性及检出限

将上述不同质量浓度的标准溶液分别进样作 HPLC-UV 分析,以峰面积对进样量作线性回归,得到标准曲线及其方程见图 1. 按 3 倍信噪比测得氯霉素的检出限为 0.05 ng. 当进样体积为 20 μL 时,虾仁中氯霉素最小检出量为 0.002 5 mg/kg,牛奶中氯霉素最小检出量为 0.008 3 mg/kg. 此检测灵敏度基本可满足 MLR 为 0～0.01 mg/kg 的检测要求. 对于牛奶样,若要进一步提高检测灵敏度,还可加大取样量,在沉淀蛋白质后浓缩一定倍数再定容过柱,这样可进一步降低检出限.

2.2 HPLC-UV 分析方法回收率

准确称取同一虾仁样(1＃)4 份,其中一份测本底,另外 3 份分别加入低、中、高 3 种不同量的氯霉素标准液,均按 1.2.2 和 1.2.3 进行样品处理和 HPLC 测定,每份样品重复测定 3 次,取其峰面积平均值计得回收率,同法测得牛奶样(1＃)加标回收率,结果表 1.

万方数据

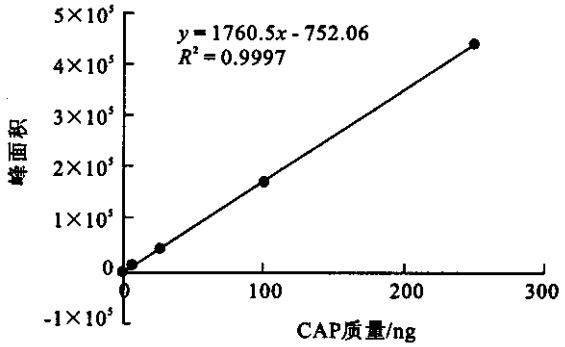


图 1　氯霉素的标准曲线

Fig. 1　Calibration curve of CAP

表 1　氯霉素回收率测定结果

Tab. 1　Results ofrecoveryexperiments of CAP determination

样 品	原质量/μg	加标质量/μg	检出质量/μg	回收率/%	平均值/%
虾仁 1#	0.116	0.10	0.208	92.0	
	0.102	0.20	0.289	93.5	93.7
	0.109	0.30	0.396	95.7	
牛奶 1#	0.0368	0.05	0.0845	95.4	
	0.0361	0.10	0.132	95.9	96.0
	0.0373	0.20	0.231	96.8	

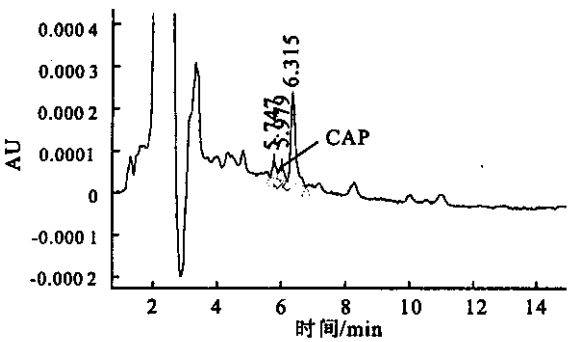


图 2　虾仁 1# 的 LC-UV 图谱

Fig. 2　LC/UV Chromatogram of Shrimp Sample 1#

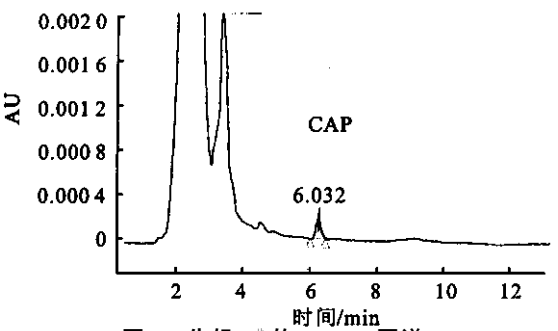


图 3　牛奶 2# 的 LC-UV 图谱

Fig. 3　LC/UV Chromatogram of Milk Sample 2#

2.3　LC-UV 方法的部分定量结果及其精密度

按 1.2.2 处理 2 个虾仁样和 5 个牛奶样,每个样平行制备 4 个,均在 1.2.3 的 HPLC-UV 分析条件下,以外标法测得各样品中氯霉素的质量分数,结果见表 2. 其相对标准偏差(RSD)为 2.23%～5.20%.

表 2　部分样品中氯霉素检测结果

Tab. 2　The detection results of CAP in Samples

(mg/kg)

样品	LC-UV 平均质量分数(n=4)	LC-UV RSD/%	LC-MS
牛奶 1#	0.012	3.12	0.014
牛奶 2#	0.22	2.23	0.017
牛奶 3#	未检出	—	未检出
牛奶 4#	未检出	—	未检出
牛奶 5#	未检出	—	未检出
虾仁 1#	0.0094	5.20	0.0088
虾仁 2#	未检出	—	未检出

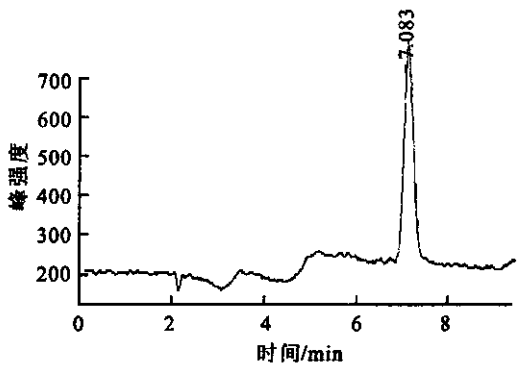


图 4　牛奶 2# 的 LC/ESI-MS 选择离子色谱图

Fig. 4　Chromatogram of selected ion monitoring of milk sample 2#

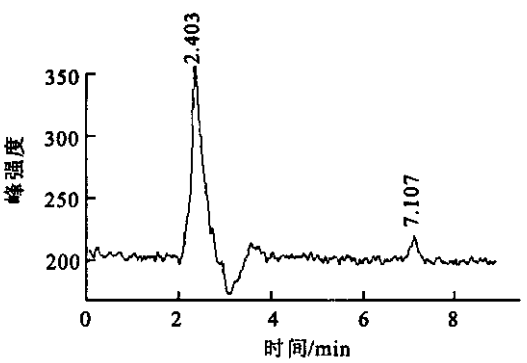


图 5　虾仁 1# 的 LC/ESI-MS 选择离子色谱图

Fig. 5　Chromatogram of selected ion monitoring of shrimp sample 1#

2.4　LC/ESI-MS 检测

在 1.2.4 的条件下,用 LC/ESI-MS 作选择性离子检测(m/z 321.0,$[M-H]^-$),以外标法测定 2 个虾仁样和 5 个牛奶样中氯霉素,其结果(表 2 和图 4～6)与 LC-UV 的分析结果基本相近. 但 LC/ESI-

万方数据

MS 离子选择性检测方法的灵敏度较高，杂峰干扰显著减少. 按 3 倍信噪比计，在进样体积为 5 μL 时，虾仁和牛奶中氯霉素的最小检出量分别为 1.3 μg/kg 和 4.5 μg/kg. 若有条件采用 LC/MS/MS 分析[4]，虾仁中氯霉素的最小检测量可达 0.08 μg/kg.

2.5 样品处理

对于动物性食品中氯霉素的检测，以往文献[3,5]中的样品预处理方法一般是先用甲醇、乙腈或乙酸乙酯等有机溶剂提取，提取液浓缩后溶于 4%的氯化钠溶液中，用正己烷等非极性溶剂进行液－液分配以除去脂类，再用乙酸乙酯反萃回有机相，然后浓缩近干，用流动相溶解定容，其手续麻烦耗时，且因多次萃取使得回收率较低. 作者现采用的方法，样品预处理简便，可省去多次液－液萃取. 对虾仁样用乙酸乙酯提取后，转溶至体积分数为 80%乙醇中，此步骤可减少大量脂质，然后再用反相固相萃取柱进一步去除脂质和色素. 如此处理后的样品溶液无色透明. 若不用固相萃取净化，样品液则呈淡黄色，CAP 后的杂质峰明显较多. 对于牛奶样，直接用体积分数为 70%的乙醇提取，既可去除蛋白，也可破乳. 其提取液中脂质再用反相固相萃取柱去除. 因样品手续简化，检测牛奶和虾仁样品中 CAP 的回收率均较高，重复性较好，分析时间大大缩短.

参考文献：

[1] Wal J M, Peleran J C, Bories G F. High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk[J]. **J AOAC**, 1980, 63: 1044－1048.

[2]李兰生，王勇强. 氯霉素在对虾体内的动力学研究[J]. 色谱，1997，15(5)：431－434.

[3]Delepine B, Sanders P. Determination of chloramphenicol in muscle using a particle beam interface for combining liquid chromatography with negative-ion chemical ionization mass spectrometry. **J Chromatogr**, 1992, 582: 113－121.

[4]Neuhaus B K, Hurlbut J A, Hammack W. LC/MS/MS analysis of chloramphenicol in shrimp[J]. **Laboratory Inforatory bulletin**, 2002, 18(9): 1－10.

[5]Bories G F, Peleran J C, Wal J M, Liquid chromatography Determination and Mass Spectrometric Confirmation of chloramphenicol residues in animal Tissnes[J]. **J AOAC**, 1983, 66: 1521－1526.

（责任编辑：朱 明）

征 稿 征 订 启 事

江南大学是教育部直属的“211 工程”重点建设大学。《江南大学学报(自然科学版)》为自然科学与工程技术融合的学术刊物(双月刊)，旨在反映自然科学与工程技术领域中最新研究成果及其应用，刊载机械工程、通信与控制工程、信息工程、化学与材料工程、纺织工程、工业设计、土木工程、数理科学以及医疗卫生等学科的科技论文。

刊物为全国公开发行，邮发代号：28—189。热忱欢迎本校及全国各地高等院校相关专业的师生及有关科研院所和企业的研究人员、工程技术人员不吝赐稿，积极订阅(订购处：全国各地邮局)。

《江南大学学报(自然科学版)》编辑部

万方数据