

LC-MS/MS进行牛奶中氯霉素的简单快速分析

简介:

氯霉素是一种广谱性抗生素，在所有的成年食用动物中做为兽药被长期使用（其结构式见图1）。但氯霉素存在严重的副作用，能引起人的再生性障碍性贫血，是一种可能的致癌物质，而且其致癌效果与剂量大小无关。因此，欧盟、美国、加拿大规定氯霉素禁止在食用动物中使用。近日，欧盟规定氯霉素在肉、海鲜、鸡蛋、牛奶、蜂蜜等食用动物内的最小执行限量（MRPL）为0.3 µg/kg (ppb)。然而，许多国家的动物养殖农场为了掩盖贫乏的卫生条件、促进动物生长，进行非法使用氯霉素。因此，氯霉素残留超标在食物进口中被陆续发现。随着人们食品安全意识的增强，食品中氯霉素的深入监测迫在眉睫！

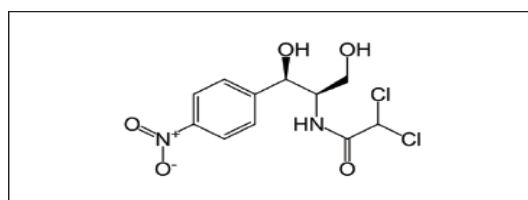


图1 氯霉素结构式

由于样品本身具有复杂的基质，再加上最低检限量(<0.3 ppb)和检测方法可行性这双重严格标准，氯霉素食物残留分析具有很大挑战性。串联质谱检测技术进一步推进了液相色谱的发展，LC-MS/MS的特异性和灵敏性使得它成为此项技术的最佳选择。LC-MS/MS运行之前需进行样品制备，样品制备过程中要求除去样品中的杂质，而传统的样品制备过程包括费钱、费力的固相萃取（SPE）或液-液萃取（LLE）。

这项研究中，我们介绍一种简单的从牛奶中提取氯霉素的样品制备方法，该方法仅仅用乙腈进行蛋白质沉淀，然后将沉淀物溶解，即可进行高速液相的分离和三重四极杆质谱仪的检测，该技术采用选择性反应监测(SRM) 模式。此样品制备方法简单、快速、低费用，同时可以满足定性分析的特异性需求和定量分析的灵敏度需求。其有效性也符合欧盟规定2002/657/EC。

目的:

为了开发一种简单、快速、灵敏的LC-MS/MS分析方法，进行牛奶中氯霉素残留分析。该方法应该满足定性和定量的双重需求。

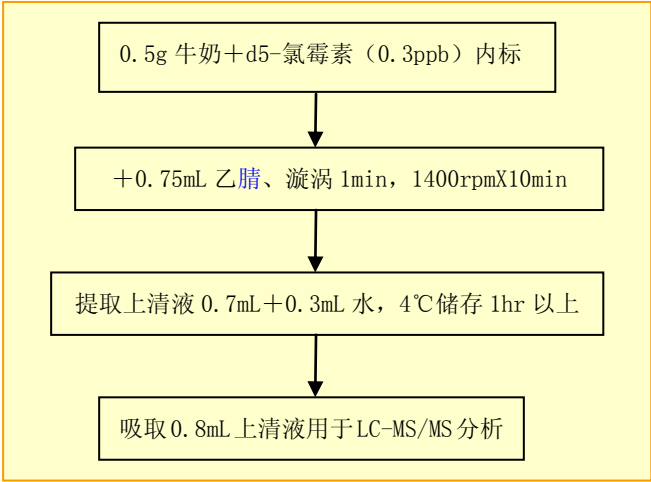
实验条件:

样品制备

标准品和试剂：氯霉素（98%）购自Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)，内标d5-氯霉素（100

μg/mL，溶于乙腈）由剑桥Isotope实验室(Andover, MA)提供，试剂纯的水、乙腈、甲醇购自Thermo Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。

实验流程如下图



色谱条件

HPLC: Accela高速液相色谱系统(Thermo Scientific, San Jose, CA)

色谱柱: Hypersil GOLD™ 50 x 2.1mm, 1.9μm

柱温: 常温

流动相: A : 甲醇 B: 水

成分(梯度)时间 (min)	A%
0.0-0.6	5%
2.3	100%
2.35-3.0	5%

流速: 500 μL/min

注射量: 20 μL (定量环)

质谱条件

质谱: TSQ Quantum Access三重四极杆质谱(Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)

源极: ESI-, 3000 V

夹套气压: 45 units

辅助气压: 10 units

毛细管温度: 300° C

源内CID:-7 V

Q1/Q3 半峰宽(FWHM): 0.7Da

扫描时间: 0.1s

碰撞气体: Ar(1.5mTorr)

SRM 检测: 氯霉素检测3SRM, d5-氯霉素检测1SRM (见表1)

表1 氯霉素和d5-氯霉素的SRM监测

	Precursor Ion	Product Ion (Collision Energy)
CAP (M⁻H⁻)	320.93	152 (17)* 257 (15) 194 (16)
d₅-CAP (M⁻H⁻)	326.93	157 (17)*

* Product ion used for quantitation

结果与讨论

样品制备：此实验方法开发的一个主要目的就是为了避免使用许多文献中提到的费时、费力的固相萃取（SPE）或是液-液萃取（LLE）制备方法。在这项样品制备方法中，向牛奶样品中按1.5:1（体积比）的比例加入乙腈沉淀蛋白后，用水稀释，这步操作对梯度色谱分离来说是非常必要的。在如此的乙腈-水比例中，蛋白质的清除是不彻底的，尤其是当制备样品在4℃放置一段时间以后会发现底部有蛋白质沉淀的痕迹。因此，溶解的样品在4℃放置一小时以上后取上清液进行LC-MS/MS分析检测，以防止未沉淀彻底的蛋白质进入LC-MS/MS。

定量和定性离子选择：三种产物离子被选择用来检测，5.5IPs满足欧盟对如氯霉素之类的禁用物质定性检验的相关规定，规定中 ≥ 4.0 IPs（2002/657/EC）即可。 m/z 152离子被选定为定量离子， m/z 257离子和194离子为定性离子，它与相关文献的报道是一致的。表2是各种浓度氯霉素选择不同离子所监测到的离子丰度，从表中结果可知：257/152 和194/152相应的离子丰度符合欧盟相关规定（2002/657/EC）。注意，我们发现在许多其他不同基质样品中，我们发现，321>257离子对更容易被样品基质所干扰，因此如果此方法为达到4.0 IPs，需要两个SRM检测，那么321>152 和 321>194为首选。

表2 牛奶中不同浓度氯霉素的相对离子丰度及欧盟2002/657/EC的公差要求

CAP Spiked Level (µg/kg)	Relative Ion Abundance of 257/152			Relative Ion Abundance of 194/152		
	Mean <i>n</i> =6	%RSD <i>n</i> =6	Tolerance by Decision 2002/657/EC	Mean <i>n</i> =6	%RSD <i>n</i> =6	Tolerance by Decision 2002/657/EC
0.05	96%	16%	20%	26%	21%	25%
0.15	92%	7.6%		28%	25%	
0.30	93%	15%		31%	15%	
0.50	90%	3.4%		31%	17%	

Note: Relative ion abundance values were calculated by relative peak area ratios

方法结果：图2给出了牛奶空白样品和浓度0.05 µg/kg牛奶添加样品的典型谱图。如图所示，使用高速液相，每个样品运行时间仅为3min，允许高通量筛选分析。并且，浓度为0.05

μg/kg的牛奶添加样品，三个SRM监测均很好被定量。假定100%的回收率，0.05 μg/kg的牛奶添加样品进样后，氯霉素的绝对上样量为0.46 pg。值得注意的，使用高速液相分离，每个样品色谱运行时间仅为3 min，且氯霉素的色谱峰宽（10%以上基线）仅为6s。在目前质谱条件下，每一个色谱峰可以有13~14点，足以保证得到好的峰形用于定量精确计算。图3是氯霉素添加到牛奶中的标准曲线。0.05 ~1.0 μg/kg范围有好的线性关系，其 $R^2 = 0.9954$ （权重因数 $W=1/X$ ）。从表3可以看出此分析方法具有较高回收率和很好的重现性（表中为4天结果）。

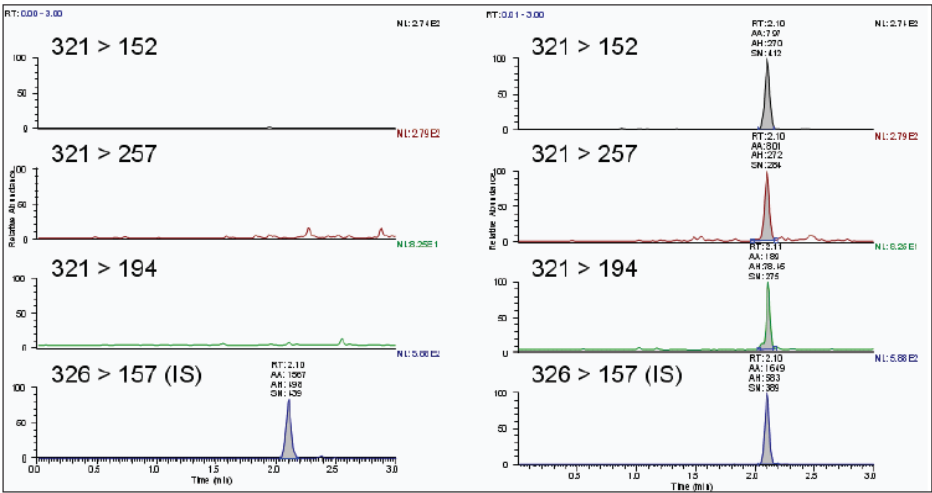


图2 空白样品和浓度为 0.05 μg/kg 牛奶添加样品的色谱图

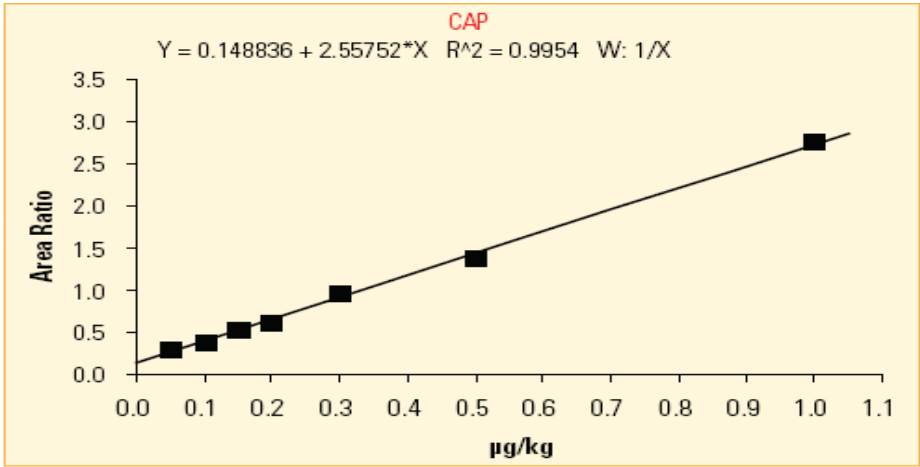


图3 牛奶中氯霉素的标准曲线

检出限 CC_{α} 和检测限 CC_{β} ：根据欧盟2002/657/EC规定，检出限(CC_{α})是指氯霉素被检出的最低浓度，且此时报告的假阳性率 $\leq 1\%$ ，即 $\alpha = 0.01$ 。检测限(CC_{β})是指氯霉素被检出并能进行定量的最低浓度，且此时报告的假阳性率 $\leq 5\%$ ，即 $\beta = 0.05$ 。根据欧盟规定，有两种方法可以被用来计算 CC_{α} 和 CC_{β} 。一种方法是根据检测器恰能辨别响应信号为噪声信

号的三倍时所需注入色谱柱的物质的最小浓度为检出限。另一种方法认为可用校正曲线的截距和实验室的重现标准差来计算检出限。前一种方法对LC-MS/MS而言，并不能很好的工作，因为SRM监测的极低背景噪音（响应接近0）常常产生不符合实际的低数值的CC α 。因此，我们使用后一种方法，用三个点(0.05、0.15、0.30 $\mu\text{g/kg}$)来获得标准曲线截距（Y-intercept）和重现性标准偏差（SDY-intercept），即CC α =Y-intercept + 2.33*SDY-intercept。同样，CC β 可以通过CC α 和在CC α 浓度的牛奶添加样品20次测量的重现性标准偏差来计算。后一项使用近似0.15 $\mu\text{g/kg}$ 浓度的添加样品重现性标准偏差。因此，CC β =CC α + 1.64*SD。表3中的SD 0.15 $\mu\text{g/kg}$ 表示0.15 $\mu\text{g/kg}$ 浓度的氯霉素20次测量的重现性标准偏差数据，CC α 和CC β 的计算结果分别为 0.087 $\mu\text{g/kg}$ 和0.12 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 3 样品回收率和重现性

CAP Spiking Level ($\mu\text{g/kg}$)	Within-laboratory Reproducibility ($n = 20$)		
	Mean (%)	SD ($\mu\text{g/kg}$)	%RSD
0.05	97%	0.0065	14%
0.15	101%	0.020	13%
0.30	104%	0.037	11%
0.50	94%	0.042	8.0%

结论

一种简单、快速、灵敏的，分析牛奶中氯霉素的LC-MS/MS方法得到开发并被确证。蛋白质沉淀、溶解进行样品制备，操作简单，且避免使用费时、费力、费钱的SPE和LLE方法。Accela高速液相色谱和TSQ Quantum Access三重四极杆质谱的联用，可以进行高通量筛选和快速定量。筛选分析中，该方法能检出牛奶中< 0.050 $\mu\text{g/kg}$ 的氯霉素。确认分析中，该方法通过确证，CC α 、CC β 分别为0.087 $\mu\text{g/kg}$ 、0.12 $\mu\text{g/kg}$ ，符合2002/657/EC规定，并低于其规定的最低检出限（MRPL）0.3 $\mu\text{g/kg}$ 。

参考文献

1. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/ECD concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official Journal of the European Communities, L 221, 2002, 8-36.

2. Bogusz, M. J. et al. “Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography - electrospray negative ionization tandem mass spectrometry” ; *J. Chrom. B* 2004, 807(2), 343-356.

3. Tao, D. et al. “Effects of sample preparation and high resolution SRM on LC-MS-MS

determination of chloramphenicol in various food products” , Poster Presentation, 53rd ASMS Conference, San Antonio, TX, USA, June 5-9, 2005.

4. Gallo, P. et al. “Development of a liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramphenicol residues in milk after alfa-1-acid glycoprotein affinity chromatography” , *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19(4), 574-579.

5. Vinci, F. et al. “In-house validation of liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramphenicol residues in muscles according to Decision 2002/567/EC” ; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19(22), 3349-3355.