

使用ACQUITY UPLC I-Class系统和ACQUITY QDa检测器对牛奶中的氯霉素进行高选择性和高灵敏度筛查

Eimear McCall¹, Sara Stead¹, Dominic Roberts¹和Jennifer A. Burgess²

¹沃特世公司（英国曼彻斯特）

²沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德）

应用优势

- 提供了一种牛奶中氯霉素的快速筛查方法。
- 对检测结果低于规定限值的样品进行定量筛查。
- 对管制抗生素进行简单而灵敏的检测。
- 将质谱检测简便应用于现有LC工作流程。

沃特世解决方案

[Oasis® HLB](#)

[ACQUITY UPLC® HSS C₁₈色谱柱](#)

[ACQUITY UPLC I-Class系统](#)

[ACQUITY QDa™检测器](#)

关键词

氯霉素, 抗生素, ACQUITY QDa, 牛奶

简介

氯霉素是一种价格廉宜的广谱抗生素。氯霉素在某些易感个体中涉及毒性作用。作为致癌物质和基因毒性化合物的可疑对象，氯霉素相关的再生障碍性贫血（骨髓抑制）致命病例已有广泛记载。因此，在欧盟、加拿大、美国以及一些亚洲和南美国家均禁止将其用于食用性动物、昆虫和水产养殖。欧盟委员会指令2003/181/EC规定，任何用于检测食品中氯霉素的方法的最小性能限值（MRPL）为0.3 µg/kg。

由于产品保质期较短，需要快速的处理时间，因此乳制品检测实验室以往都采用酶联免疫吸附试验（ELISA）对大量样品进行筛查。虽然ELISA可以对氯霉素进行灵敏而快速的筛查，但它的一个缺点是假阳性结果很多，据报某些案例中的假阳性水平达到16%¹。

免疫吸附剂与干扰基质之间的交叉反应经常会导致牛奶中氯霉素的误检，从而造成不必要的产品销毁。质谱检测可以提高选择性，有助于区分氯霉素和污染基质。此外，质谱检测结合液相色谱（LC）可以避免采用气相色谱法筛查氯霉素时所需的费时衍生化处理步骤。为了让实验室能够充分利用这些优势，近期的技术进展着重于提高仪器可用性和稳定性。ACQUITY QDa检测器易于使用，不需要专业的质谱知识，因而可以方便地整合到LC工作流程中。

实验

UPLC条件

LC:	ACQUITY UPLC I-Class
运行时间:	5 min
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ 1.8 μ m, 2.1 \times 100 mm
流动相:	10 mM醋酸铵的45:55 甲醇/水溶液
进样体积:	10 μ L

检测条件

检测器:	ACQUITY QDa
电离模式:	ESI
SIR通道:	m/z 321.0
锥孔电压:	15 V
探头温度:	缺省 (600 °C)
毛细管电压:	缺省 (0.8 kV)
采样速率:	缺省 (5 Hz)

样品制备

称取半脱脂牛奶 (5 g) 样品, 装入25 mL离心管中, 强化至浓度达到0.3 μ g/kg。通过向样品中添加己烷 (5 mL) 和70%乙腈溶液 (15 mL), 完成脂肪去除和蛋白质沉淀。振摇样品, 然后在3,900 G (4 °C) 下离心10 min。去除下面的乙腈层 (5 mL), 然后用10%甲醇稀释至总体积为15 mL。

使用甲醇 (2 mL) 和水 (4 mL) 对Oasis HLB 3 cc (60 mg) 小柱进行平衡。将稀释后的样品 (15 mL) 加载到小柱上, 然后用5%甲醇溶液 (6 mL) 清洗小柱。使用100%甲醇 (6 mL) 洗脱氯霉素。随后将洗脱液在氮气中蒸发, 用10%甲醇溶液 (300 μ L) 复溶后转入LC-MS分析。

标准品制备

采用上述样品制备方法制备空白牛奶样品 (未强化)。将空白基质样品在氮气中干燥后, 使用不同浓度的标准溶液复溶, 以建立范围相当于0.075至1 μ g/kg的六点校准曲线。

结果与讨论

在分析牛奶提取物之前, 调试氯霉素的最佳源条件, 确定ACQUITY QDa检测器的预优化源参数可以提供最有效和最灵敏的检测结果。氯霉素在15 V锥孔电压的负离子模式下灵敏度最高。使用上述方法, 通过基质匹配校准曲线可以对欧盟MRPL的强化牛奶样品进行准确定量。在0.075至1 μ g/kg的选定工作范围内, 氯霉素具有出色的线性 ($R^2 > 0.995$), 如图1所示。

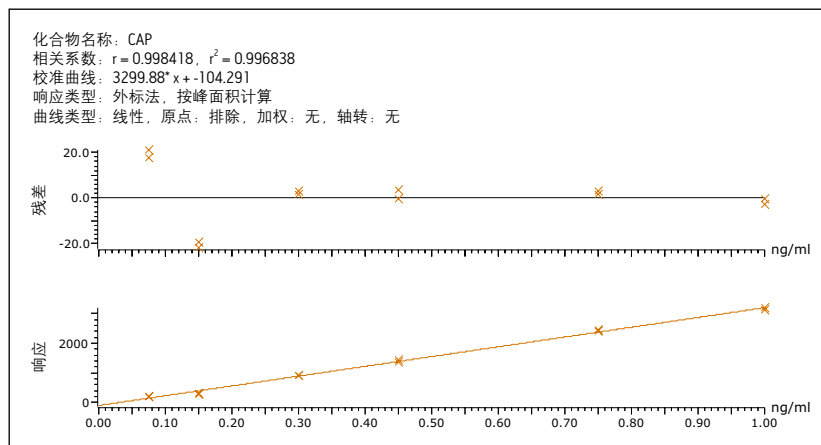


图1. 两次进样的基质匹配校准曲线, 相当于0.075至1 μ g/kg的范围。

结果与讨论

为了评估基质效应，将基质匹配校准曲线与相同范围的溶剂校准曲线进行比较。图2显示了基质匹配和溶剂校准曲线的叠加图。从该叠加图中可以明显看出基质效应（离子增强）。通过统计方法也可以证实存在基质效应，利用各校准曲线的斜率（ $\frac{\text{样品斜率}}{\text{标准品斜率}} \times 100$ ），计算出基质效应为177%。尽管存在基质效应，使用基质匹配校准曲线仍然可以对牛奶中的氯霉素实现准确的定量筛查。

对空白牛奶平行样品进行分析，未检出假阳性。图3A显示了一个空白提取样的色谱图示例，图中只观察到基线噪音。对于欧盟MRPL强化四个平行牛奶样品，样品提取后进行重复分析（不使用价格昂贵的氘代内标）（ $n=8$ ）。对照基质匹配校准曲线对最终样品进行定量。图3B显示了强化浓度（ $0.3 \mu\text{g/kg}$ ）下平行样的氯霉素峰，峰间信噪比（ S/N ） ≥ 50 ，达到良好水平。

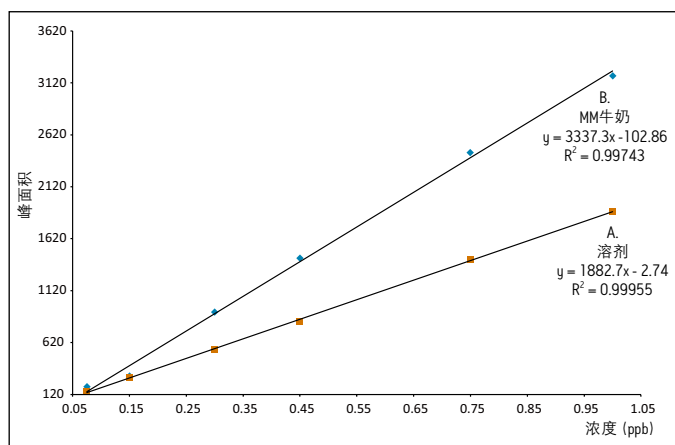


图2. 2A.溶剂（10%甲醇）和2B.相当于 0.075 至 $1 \mu\text{g/kg}$ 的基质匹配（牛奶中）校准曲线的叠加图。

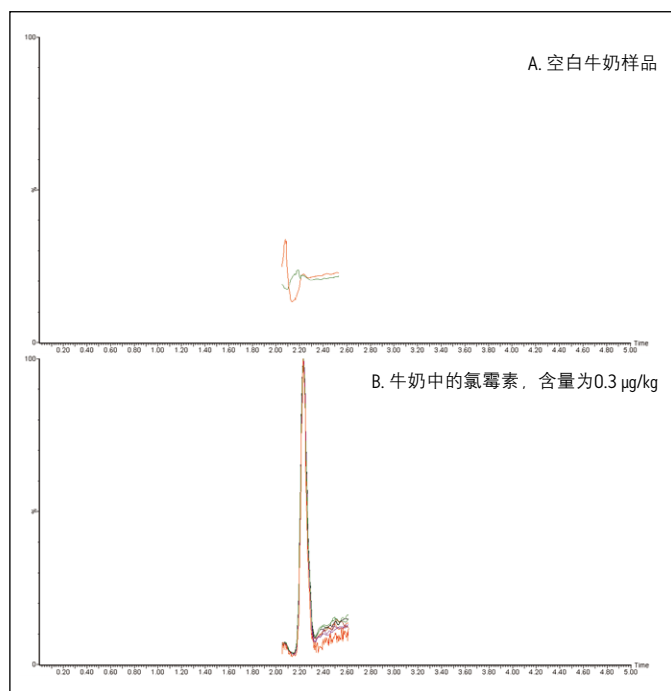


图3. 氯霉素（ m/z 321）的离子选择记录（ISR）色谱图：3A.空白牛奶提取物（ $n=2$ ）；3B.MRPL（ $0.3 \mu\text{g/kg}$ ）下的强化牛奶。重复进样（ $n=8$ ）叠加显示 $S/N \geq 50$ 。

如图3B所示，保留时间重复性良好。此外，通过统计方式对保留时间和回收率进行了解析，如表1所示。测得平均回收率为72.7%，根据欧盟委员会指令2002/657/EC，该结果是可接受的。以规定限值重复分析八次，重复性良好，相对标准差（RSD）<4.6%。上述结果表明此方法稳定且灵敏，适用于对牛奶中规定限值的氯霉素进行定量筛查。

平行样编号	回收率%	保留时间 (min)
1	77.0	2.23
2	69.7	2.23
3	76.3	2.23
4	71.7	2.23
5	72.3	2.23
6	67.3	2.23
7	75.0	2.24
8	72.3	2.23
平均	72.7	2.231
标准差	3.3	0.004
RSD%	4.5	0.158

表1. 通过SPE方法得到的回收率（n=8），结果显示样品制备和仪器均表现出良好的重复性。

结论

本文开发了一种用于定量筛查牛奶中氯霉素的准确、稳定的方法。这种方法经证实可在无内标的情况下轻松达到法规要求的检测水平，同时在欧盟MRPL（0.3 µg/kg）水平下表现出优异的重复性。质谱额外的检测区分能力提高了结果的特异性，未检出假阳性。

参考文献

1. V Gaudin, N Cadieu, O Maris O. IVth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Belgium, 2002.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。ACQUITY QDa是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自拥有者所有。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。2014年3月 720004993ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com