

气相色谱—质谱联用法测定猪肉组织中氟苯尼考残留

贺利民, 曾振灵, 黄显会, 刘文字, 刘戎

(华南农业大学 农业部畜禽产品质量监督检验测试中心(广州), 广东 广州 510642)

摘要: 为建立动物组织中氟苯尼考残留量测定的可靠、灵敏的气相色谱—质谱联用分析方法. 采用乙腈提取猪肉组织试样, 经 C₁₈固相小柱净化, 用体积分数为 60% 甲醇水溶液洗脱, 吹干, 用 Sylon® BFT 在 50 °C 衍生 20 min 后, 进行检测. 采用选择离子监测(*m/z* 178, 257, 259)模式进行定性定量分析测定, 衍生物 SIM 的总离子流图峰面积与试样质量浓度在 5.00~1 000.00 μg/L 范围内呈良好的线性关系, 线性回归系数大于 0.999, 方法最低检出限达 2.0 μg/kg. 猪肉组织在 1.0, 10.0 和 100.0 μg/kg 三水平加标平均回收率分别为 88.4%、84.0% 和 71.2%, 相应的变异系数分别为 8.7%、6.8% 和 11.5%. 同时, 对氟苯尼考三甲基硅醚衍生物的 EI 质谱可能裂解途径进行了解析.

关键词: 氟苯尼考残留; 气相色谱—质谱联用法; 猪肉

中图分类号: O657.63

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0100-03

Determination of florfenicol residues in pork by capillary gas chromatography-mass spectrometry

HE Li-min, ZENG Zhen-ling, HUANG Xian-hui, LIU Wen-zi, LIU Rong

(Animal and Poultry Products Quality Control Inspection and Testing Center (Guangzhou)

Ministry of Agriculture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The objective of the present study was to develop a reproducible, sensitive method to determine florfenicol residues in pork by GC-MS. The composite samples were extracted with acetonitrile, and purified with a C₁₈ cartridge successively. The drug was eluted from the cartridge with 60% (v/v) methanol water solution. After toluene and Sylon® BFT were added to the residues, the drug was derivatized at 50 °C for 20 min, and more toluene was added and then applied to GC-MS. SIM mode was performed at *m/z* 178, 257 and 259. The range of linearity was 5.00—1 000.00 μg/L, the relevant coefficient was more than 0.999, and the lowest detection limit of the method was 2.0 μg/kg. Recoveries from porks fortified at 1.0, 10.0 and 100.0 μg/kg were 88.4%, 84.0% and 71.2%, respectively, and the corresponding RSDs were 8.7%, 6.8% and 11.5%, respectively. Meanwhile, the fragmentation pathways of main fragment ions of TMS derivative of florfenicol was interpreted.

Key words: florfenicol residues; GC-MS; pork

氟苯尼考(florfenicol, FF), 又名氟甲砜霉素, 化学名称为 *d*(+)-苏-1-对甲砜基苯基-2-二氯乙酰氨基-3-氟丙醇^[1], 是由美国 Schering-Plough 公司在 20 世纪 80 年代研制开发出的新一代氯霉素类兽用合成抗生素, 其抗菌活性及抗菌谱都明显优于甲砜霉素和氯霉素^[2], 在兽医临床中显示出广泛的应用前景. 氟苯尼考作为动物专用的新型抗菌药, 该

药物残留的检测, 一般采用灵敏度相对低, 检出限较高的 HPLC 法^{2~6]}, 经硅烷化后采用气相色谱(GC)法测定^[7], 而在动物组织中采用气相色谱—质谱(GC-MS)联用法定性定量测定氟苯尼考残留量少有报道. 本研究在解析氟苯尼考三甲基硅醚电子电离(electron ionization, EI)质谱的基础上, 采用选择离子监测法, 建立了猪肉组织中残留氟苯尼考的高可靠

收稿日期: 2004-09-30

作者简介: 贺利民(1967-), 男, 副研究员, 硕士. 通讯作者: 曾振灵(1963-), 男, 教授, 博

士; E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

基金项目: 国家科技攻关计划子课题(2002BA906A75-01)

©2004 China Academic Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

度、高灵敏度的 GC-MS 定性定量分析方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

AUTOSYSTEM GC-TURBOMASS 型气相色谱-质谱联用仪(Perkin Elmer 公司); UNIVERSAL 32R 离心机(Hettich 公司); ED 53 烘箱(BINDER 公司); 固相萃取小柱: C₁₈(500 mg, 3 mL); 氟苯尼考对照品(Sigma); 衍生剂: Sylon[®] BFT (Lot: LB10799, Supelco, Inc.) 为 N, O-双三甲基硅基三氟乙酰胺+三甲基氯硅烷(99+1); 乙腈、甲苯等试剂均为分析纯。

1.2 标准溶液配制

氟苯尼考标准溶液: 准确称取氟苯尼考标准品 10 mg, 用乙腈溶解, 配成 1 mg/mL 的标准储备液, 置 4 °C 冰箱中保存。临用前, 用乙腈稀释成适当浓度的标准工作溶液。

1.3 样品处理

1.3.1 提取 准确称取搅碎的猪肉 5 g 置于离心管中, 加 25 mL 乙腈均质 1 min, 振荡 30 min。在 5 °C, 10 000 r/min 下离心 15 min, 倾出上清液, 沉淀用 20 mL 乙腈再提取 1 次。合并上清液, 加入 5 mL 异丙醇, 旋转蒸干。残渣用 5 mL 水溶解, 在 5 °C, 4 000 r/min 下离心 10 min, 吸取下层水溶液净化。同时做样品对照和加标试验。

1.3.2 净化 用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化 C₁₈ 小柱, 取适量样品液过柱, 3 mL 水洗柱。在溶剂流过柱后, 于 1 000 r/min 离心 5 min, 使柱中液体逐渐枯竭。用体积分数为 60% 的甲醇水溶液洗脱, 收集洗脱液。

1.3.3 衍生 用氮气小心吹干洗脱液, 干燥后, 加入 100 μL 甲苯溶解残渣, 加入 100 μL 衍生剂, 于 50 °C 衍生 20 min。取适量标准工作溶液吹干后做同步衍生。冷却后用甲苯定容到适当体积, 加 100 μL 水, 涡漩 30 s, 静置 10 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 吸取上层有机相进行分析。

1.4 样品测定

色谱条件: HP-5MS 30 m × 0.25 mm (i. d.) × 0.25 μm 弹性石英毛细管柱, 载气为高纯氦气, 流量 1.3 mL/min, 不分流进样, 进样量 1 μL, 溶剂延迟 6 min。进样口温度 265 °C, 接口温度 280 °C, 起始柱温 150 °C(0.5 min), 以 30 °C/min 升至 270 °C(9 min)。

质谱条件: 离子源为 EI 源, 电子能量 70 eV, 发射电流 200 μA, 电子倍增器电压 600 V, 离子源温度 250 °C, 扫描范围 70~450 u。选择监测离子 *m/z*: 178、257、259。

2 结果与分析

2.1 氟苯尼考衍生物质谱解析

在 1.4 试验条件下, 标准氟苯尼考衍生物 GC-MS 分析全扫描总离子流图中保留时间 8.96 min 处色谱峰为氟苯尼考三甲基硅醚, 其对应的质谱见图 1。

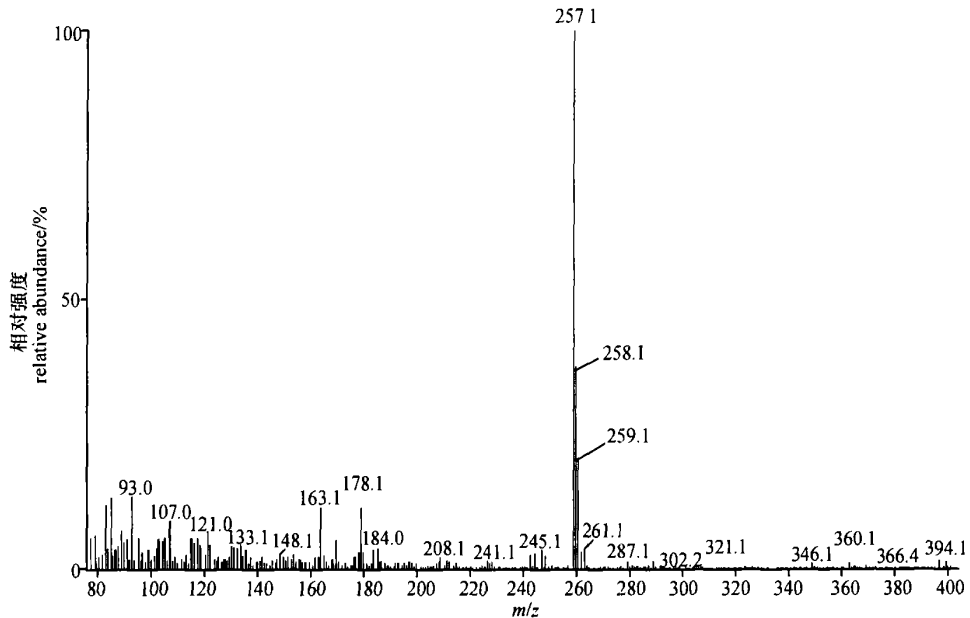


图 1 氟苯尼考三甲基硅醚衍生物质谱图

Fig. 1 Mass spectrum of TMS derivative of florfenicol

在 NIST 质谱库中, 没有检索到氟苯尼考三甲基硅醚的标准谱图。为此, 作者根据图 1 对氟苯尼考三甲基硅醚的主要裂解途径进行了推测, 对谱图中的

主要碎片离子进行了归属, 见图 2。与 NIST 质谱库中氯霉素相应质谱及作者实测的氯霉素和甲砒霉素的质谱比较^[8], 氟苯尼考三甲基硅醚质谱图非常简单,

在于氟(F)原子的强电负性,发生 $\alpha\text{-C}-\text{C}$ 键断裂时,电子保留在带 F 原子的碎片上,形成 m/z 257 稳定的基峰,而不生成 m/z 242、244、246 含 2 个 Cl 原子的同位素特征碎片(氯霉素和甲砒霉素都有); m/z 258 及 259 除图 2 的可能裂解途径外,主要为 Si 和 S 共同贡献的同位素峰系列。

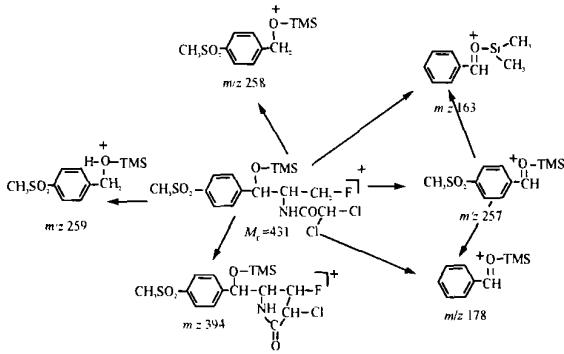


图 2 氟苯尼考三甲基硅醚主要裂解途径

Fig. 2 Main fragmentation pathways of TMS derivative of florfenicol

2.2 定性依据

GC-MS 分析检测兽药残留,采用选择离子监测模式可大大提高检测灵敏度。同时,根据选择监测的特征离子的相对丰度比,可以对待测物峰进行有效确证。分析氟苯尼考三甲基硅醚衍生物的质谱,选择监测离子 m/z 178、257(基峰)及 259 进行定性测定,所选择监测的 3 个碎片离子的质谱强度相对丰度比约为 15:100:35。

2.3 线性范围

配制 0、2.00、10.00、50.00、250.00 和 1000.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准溶液,各准确分取 1 mL,按 1.3.3 衍生、测定。试验表明氟苯尼考三甲基硅醚衍生物的峰面积与其浓度在 5.00~1000.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内均呈良好线性关系,相关系数大于 0.999。

2.4 回收率试验

对空白猪肉进行 1.0、10.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三水平添加氟苯尼考试验,回收率试验结果(表 1)表明,建立的方法满足残留分析检测的要求。

表 1 猪肉添加氟苯尼考回收率试验

Tab. 1 Recoveries of TMS derivative of florfenicol from spiked porks $n=5$

添加量 added level/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	回收率 recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
1.0	88.4	8.7
10.0	84.0	6.8
100.0	71.2	11.5

2.5 检出限

测定样品加标溶液,使响应值峰高达到噪音的 3

倍左右,据此折算为 3 倍信噪比时,猪肉中氟苯尼考最低检出限可达 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。文献报道 HPLC 法^[4,5]与 GC 法^[7]的最低检出限分别为 50.0 与 1.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6 样品提取方法

通过采用乙酸乙酯与乙腈为溶剂的提取比较,以乙腈为溶剂提取待测物回收率相对较高,提取杂质少。采用低温离心脱脂技术获得良好试验结果,较采用非极性溶剂脱脂简单,溶剂消耗少,回收率高。

3 结论

采用乙腈提取猪肉中残留的氟苯尼考,通过水溶解、分散和低温离心脱脂技术,建立了猪肉组织中残留氟苯尼考的高可靠度、高灵敏度的 GC-MS 定性、定量分析方法,为日益严格的兽药残留检测提供了技术支撑。

参考文献:

- [1] SYRIOPOULOU V P, HARDING A L, GOLDMANN D A, et al. *In vitro* antibacterial activity of florfenicol analogs of chloramphenicol and thiamphenicol[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1981, 19(2): 294-297.
- [2] VARMA K J, ADAMS P E, POWERS T E, et al. Pharmacokinetics of florfenicol in veal calves[J]. *J Vet Pharmacol Therap*, 1986, 9: 412-425.
- [3] AFIFIN A, SOOUD K A. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broilerchickens[J]. *Bi Poultry Sci*, 1997, 38(4): 425-428.
- [4] 蒋红霞,冯淇辉,曾振灵,等.氟甲砒霉素(Flofenicol)在猪体内的药代动力学[J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(1): 86-89.
- [5] CHUE V, LARRY J, SCHMID T, et al. Liquid chromatographic determination of florfenicol in the plasma of multiple species of fish[J]. *Journal of Chromatography B*, 2002, 780: 111-117.
- [6] LI J Z, FUNG K F, CHEN Z L, et al. Pharmacokinetics of Florfenicol in healthy pigs and in pigs experimentally infected with actinobacillus pleuropneumoniae[J]. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2003, 47(2): 820-823.
- [7] ALLEN P P, JOSE E R, HEIDIS R, et al. Simultaneous determination of residues chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine, and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection[J]. *J Association Official Analytical Chemists Int*, 2000, 83(1): 26-30.
- [8] 贺利民,曾振灵,刘雅红,等.氯霉素类三甲基硅醚衍生物的质谱特征及其残留监测[J]. *质谱学报*, 2004, 25(增刊): 95-96.

【责任编辑 柴 焰】