

## 使用LC-MS/MS对蜂蜜和牛奶中的氯霉素进行痕量分析

---

Simon Hird, Taposh Gorella, Sushil Gawande, Padmakar Wagh博士

Waters Corporation

---

### 摘要

欧盟对违禁物质的残留实行零容忍政策，未规定最大残留量。考虑到有必要确保对进口或投放市场的动物源食品进行管控，相关机构针对违禁物质设定了行动参考值(RPA)。因此，我们需要通过可靠的分析方法来检测、定量和鉴定各种组织、生物体液和动物源性食品中的氯霉素(CAP)残留。本应用纪要介绍了一种基于液相色谱-串联四极杆质谱的方法开发，用于分析牛奶和蜂蜜。通过溶剂萃取（包括牛奶的分散固相萃取步骤）制备提取物，然后使用LC-MS/MS(Xevo™ TQ-S cronos)进行测定。方法性能已经根据欧盟委员会法规(EU) 2021/808号实施条例中的可接受标准得到了验证。加标分析结果表明，正确度和重复性都在相应的偏差范围内。该方法具有良好的灵敏度、准确度，并且经过进一步验证，适用于测定牛奶和蜂蜜中的CAP，用于检查是否符合0.15 µg/kg的RPA。

### 优势

- 使用高灵敏度、高选择性方法测定牛奶和蜂蜜中的CAP
- 可在0.025 µg/kg的最低校准浓度(LCL)下检出CAP，显著低于CAP的RPA值0.15 µg/kg
- 该方法的性能满足(EU) 2021/808中规定的正确度和重复性可接受标准

---

## 简介

兽药产品用于预防和控制疾病，在动物组织中以及相关的动物源性食品中的残留量通常非常低。为避免此类残留伤害消费者，许多国家/地区对兽药的使用实施了注册和批准制度，该制度基于法规限值的设定。在欧盟(EU)中，兽药在获准用于食品动物之前，相关机构需要评估其药物活性物质及其形成的残留物的安全性并建议最大残留量(MRL)。违禁物质是一种由于对消费者构成风险而无法确定MRL的物质，不允许用于食品动物。氯霉素(CAP)就是其中一个例子，某些地区向EU出口的商品中仍然存在非法使用该物质的情况。欧盟对违禁物质残留实行零容忍政策。考虑到有必要确保对进口或投放市场的动物源食品进行管控，相关机构针对违禁物质设定了行动参考值(RPA)。RPA设定为官方控制实验室中可以达到的最低分析水平。欧盟委员会法规(EU) 2019/1871中更新了CAP的RPA，规定动物源性食品中CAP的RPA为0.15 µg/kg<sup>1</sup>。面对如此严格的法规要求，我们需要采用高灵敏度、高选择性和高准确度的方法来监测合规性。我们之前报道了一种测定鸡肉中CAP的方法<sup>2</sup>。本研究展示了基于液相色谱-串联四极杆质谱(LC-MS/MS)的方法的性能，通过将ACQUITY™ H-Class UPLC系统与Xevo™ TQ-S cronos联用，测定牛奶和蜂蜜中的CAP。

---

## 实验

### 样品描述

使用两种基于溶剂萃取的方案对购自当地零售商的牛奶和蜂蜜均质化样品进行萃取。对于牛奶，使用乙腈萃取可以使牛奶蛋白发生沉淀。使用硫酸钠进行盐析以分离有机层，然后离心，并使用分散固相萃取(dSPE)进行净化。对于蜂蜜，使用甲基叔丁基醚(MTBE)和二乙醚的混合物进行萃取，然后执行离心和浓缩步骤。完整详情请参阅下方图1。

向牛奶和蜂蜜的测试部分中加入已知量的CAP，得到浓度范围为0.025~0.50 µg/kg的标准品，制备基质加标标准品，也称为程序校准标准品。通过每种商品重复分析六次来确定正确度和实验室内重复性，这些样品以三种浓度制备：0.025 µg/kg、0.050 µg/kg和0.100 µg/kg。本研究未使用内标。

### 液相色谱条件

液相色谱系统：

配备FTN SM的ACQUITY H-Class UPLC

样品瓶：	全回收样品瓶，带瓶盖和预切割PTFE/硅胶隔垫，容积1 mL(P/N: 186000385C)
色谱柱：	XBridge™ Premier BEH C <sub>18</sub> (2.5 μm, 2.1 x 100 mm) (P/N: 186009828)
柱温：	40 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	10 μL
流动相A：	水
流动相B：	甲醇

## 梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.45	90	10	初始
0.2	0.45	90	10	6
3.0	0.45	2	98	6
3.2	0.45	90	10	6
6.0	0.45	90	10	6

## MS条件

质谱系统：	Xevo TQ-S cronos
-------	------------------

电离模式：	电喷雾（负离子模式）
毛细管电压：	-1.0 kV
离子源温度：	150 °C
脱溶剂气温度：	500 °C
脱溶剂气流速：	900 L/h
锥孔气流速：	0 L/h
锥孔电压：	40 V

## MRM方法（定量通道以粗体显示）

化合物	保留时间 (min)	MRM	CE (eV)	驻留时间(s)
CAP	2.8	<b>321&gt;152</b>	14	0.207
		321>257	8	0.207

利用Autodwell功能自动设置驻留时间，使每个峰至少包含10个数据点。

## 数据管理

质谱软件：	MassLynx v4.2
信息学软件：	TargetLynx XS

## 方法性能

根据(EU)2021/808中的要求，完全验证要求由同一分析人员在三天内制备和分析重复加标样品<sup>3</sup>。本研究通过制

备一组重复的加标牛奶和蜂蜜样品并进行分析来评估方法性能。评估的因素包括：灵敏度、校准图特征、正确度和重复性。正确度是指从大量检测结果中获得的平均值与可接受的参比值（在本例中为加标样品的浓度）之间的一致程度。由于使用了基质加标校准，因此无需评估绝对回收率。

---

## 结果与讨论

XBridge Premier BEH C<sub>18</sub>色谱柱为CAP提供了足够的保留性，其在2.8 min处洗脱，且峰形呈高斯峰，总运行时间为6 min。

通过分析由加标牛奶和蜂蜜样品制备的基质加标标准品，已证实该方法具有优异的灵敏度。图2显示了分析牛奶和蜂蜜中最低校准浓度(LCL)(0.025 µg/kg)的基质加标标准品得到的典型氯霉素色谱图，表明该方法在经过适当的验证后能够用于检查RPA合规性要求。氯霉素的响应在评估的范围内呈线性，图表使用1/x加权创建。决定系数(R<sup>2</sup>) > 0.99，残差 < 10%。

使用分析加标样品得到数据评估正确度，通过实测回收率进行确定。每组加标样品在三种浓度下采用两种方法测得的平均回收率在81%~110%的范围内（正确度为-19%~+10%）。这些方法的重复性值也令人满意(2.7%~9.7% RSD)。正确度和重复性值均处于欧盟委员会法规(EU)2021/808中规定的标准范围内，即分别为-50%~+20%和< 20%（不使用内标）。实测回收率和重复性（误差条柱）如图3所示。

此外，评估分析重复样加标所得数据是否符合所需的鉴定标准。每种分析物采用两个通道足以满足所需的四个违禁物鉴定点，所得峰的离子丰度比和保留时间与标准品之间的偏差均在建议范围内。

---

## 结论

本应用纪要介绍了两种使用LC-MS/MS(Xevo TQ-S cronos)的方法，可用于灵敏且准确地测定牛奶和蜂蜜中的CAP。该方法能够可靠地定量浓度低至修订版RPA(0.15 µg/kg)以下的浓度，并且其性能已经得到了验证。该方法在分析牛奶和蜂蜜时均表现出高灵敏度(LCL 0.025 µg/kg)。加标分析结果表明，正确度和重复性都在相应的偏差范围内。经适当验证后，这些程序可用于分析牛奶和蜂蜜，以检查CAP是否符合RPA(0.15 µg/kg)。

---

## 参考资料

1. COMMISSION REGULATION (EU) 2019/1871 of 7 November 2019 on reference points for action for non-allowed pharmacologically active substances present in food of animal origin and repealing Decision 2005/34/EC.
2. Renata Jandova, Sara Stead.用于分析禁用兽药残留的Xevo TQ-S cronos：测定鸡肉中法规限量水平的硝基呋喃代谢物和氯霉素，沃特世应用纪要，[720007233ZH](#)，2021.
3. COMMISSION IMPLEMENTING REGULATION (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC.

---

## 特色产品

[ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/10138533>](https://www.waters.com/10138533)

[Xevo TQ-S cronos三重四极杆质谱仪 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135027354>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135027354)

[MassLynx MS软件 <https://www.waters.com/513662>](https://www.waters.com/513662)

[TargetLynx <https://www.waters.com/513791>](https://www.waters.com/513791)

720007922ZH，2023年7月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号