

# 高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱测定乳品中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留的研究

刘艳琴, 王浩\*, 殷晓燕, 杨红梅, 闫龙宝

(北京市海淀区产品质量监督检验所, 北京 100083)

**摘要:** 本实验建立了乳制品中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留的高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用测定方法。该方法采用多反应监测负离子模式, 可一次对氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素进行定性和定量。该方法的检出限 $0.3\sim 1.0\mu\text{g/L}$ , 测定低限牛奶 $0.3\sim 1.1\mu\text{g/L}$ , 乳粉为 $3.0\sim 11.0\mu\text{g/kg}$ , 线性范围 $1.0\sim 30.0\mu\text{g/L}$ , 加标回收率 $77.9\%\sim 96.6\%$ , 相对标准偏差为 $7.7\%\sim 14.0\%$ 。该法具有样品预处理简单, 灵敏度高, 分析时间短等优点。

**关键词:** 液质联用仪; 氯霉素; 甲砒霉素; 氟甲砒霉素; 残留

Study on LC-ESI-TRAP-MS Determination of Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol in Milk Products

LIU Yan-qin, WANG Hao\*, YIN Xiao-yan, YANG Hong-mei, YAN Long-bao

(Haidian District Institute of Products Quality Supervision and Inspection, Beijing 100083, China)

**Abstract:** This study developed a LC-ESI-TRAP-MS method for the respective determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk products. The mass-spectrometer was operated in the negative ion mode with multiple reaction monitoring. chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol could be qualitatively and quantitatively determined respectively with this method at the same time. The limit of detection is  $0.3\mu\text{g/L}$  and  $1.0\mu\text{g/L}$ , and the limit of quantitation is respectively  $0.3\sim 1.1\mu\text{g/L}$  in milk and  $3.0\sim 11.0\mu\text{g/kg}$  in powdered milk. The linear plots were obtained between  $1.0\mu\text{g/L}$  and  $30.0\mu\text{g/L}$ . Overall recoveries were between  $77.9\%$  and  $96.6\%$ , and RSD value were  $7.7\%$  and  $14.0\%$ . The advantages of this method are as follows: simplified operation, shorter operation time, and higher sensitive.

**Key words:** LC-MS; chloramphenicol; thiamphenicol; florfenicol; residue

中图分类号: TS207

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0344-03

氯霉素是一种广谱抗生素, 能抑制细菌蛋白质的形成, 但对人类也具有毒害作用, 如它对骨髓造血机能具有抑制作用, 可引起粒细胞缺乏病、再生障碍性贫血和溶血性贫血等毒副作用。乳及乳制品营养丰富, 是人类重要的膳食组成部分, 由于诸多原因, 乳制品中可能存在氯霉素残留, 给消费者的健康带来潜在的危害。

目前, 国内外采用的检测氯霉素残留的方法主要包括: 酶联免疫法、放射免疫法、液相色谱法、气相色谱法、液-质联用法和气-质联用法<sup>[1-3]</sup>。本方法用高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱, 可一次测定和确证氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素, 具有操作简单、灵敏度高、测定周期短等优点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

乙腈、甲醇均为色谱纯试剂; 乙酸乙酯、高氯酸、乙酸胺均为分析纯试剂; 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素(纯度均为99.5%) 美国Sigma公司。

### 1.2 仪器

1100型液相色谱、MSD Trap XCT型电喷雾离子阱质谱 美国Agilent公司。

### 1.3 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>柱( $5\mu\text{m}$ ,  $2.1\text{mm}\times 150\text{mm}$ ); 流速:  $0.25\text{ml/min}$ ; 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 进样量:  $50\mu\text{l}$ ; 流动相: 乙腈+ $5\text{mmol/L}$ 乙酸胺, 洗脱梯

收稿日期: 2007-04-19

作者简介: 刘艳琴(1969-), 女, 高级工程师, 研究方向为食品安全检验。E-mail: yanqin@cfqs.org

\*通讯作者: 王浩(1969-), 男, 工程师, 硕士, 研究方向为食品安全检测。E-mail: haowang2003@163.com

表1 分离3种氯霉素类抗生素的较佳洗脱梯度  
Table1 Optimal elution conditions for determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol

时间(min)	0	7	15	15.1
5mmol/L 乙酸胺(%)	87.5	65	65	87.5
乙腈(%)	12.5	35	35	12.5

度见表1。

#### 1.4 质谱条件

离子化模式: ESI<sup>-</sup>; 喷雾压力: 55psi; 干燥气流速: 11ml/min; 离子化温度: 350℃; 破碎电压: 1.0eV。

#### 1.5 样品处理

##### 1.5.1 牛奶

准确称取20ml样品, 加入2ml 5%高氯酸溶液, 混匀后过滤。用0.45μm滤膜将样液过滤, 进样50μl进行色谱分析。

##### 1.5.2 乳粉

准确称取5g样品, 用水定容至50ml, 摇匀。其余步骤同按1.5.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 质谱条件的优化

首先采用20ng/ml的氯霉素类混合标准溶液以流动注射的方式在负离子模式下进行母离子全扫描, 确定氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的分子离子分别为m/z 321、356、354。然后分别以上述离子为母离子, 对其子离子进行全扫描, 在质谱条件下, 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的主要分子离子分别为m/z 256.8; 193.9; 289.9; 226.8; 335.9; 218.7。为了增加检测的灵敏度, 分别选取上述子离子作为相应母离子的监控离子, 以多反应监控(MRM)正离子模式Smart调谐毛细管电压、喷雾器压力、干燥气流量、分离器电压、透镜电压、毛细管出口偏置电压、八级杆电压、八级杆射频、离子阱驱动等质谱参数。上述3种抗生素的定性采取标准分析品指纹图匹配, 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的定量离子分别采用m/z 256.8; 193.9/321.0、289.8; 226.8/354.0、335.9; 218.7/356.0。

### 2.2 色谱条件的优化

氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素均属于弱极性化合物, 在水中溶解性较差, 易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂。本方法采用乙酸胺溶液-乙腈为流动相, 利用梯度洗脱的方法缩短分离时间, 提高分离效果, 测试开始时, 流动相中乙腈、5mmol/L乙酸胺的比例为1:7, 然后分别0~7min内将三者的比例调整为7:13, 7~15min内保持此比例, 最后在15.1min回到测试开始时的比例。通过上述两步梯度, 在15min内, 可以较好的分离牛奶

中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素。其中, 第一阶段主要是将牛奶中极性大的杂质与目标化合物分离, 防止杂质进阱影响电离效果; 第二阶段主要是将牛奶中标化合物进行分离。图1为浓度为20μg/L甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素标准物质的抽取子离子图。从图中可以看出三种物质得到较好的分离。

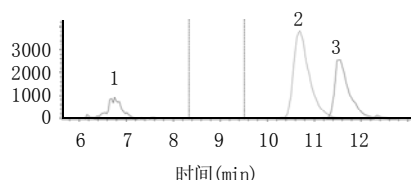


图1 甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素标准物质的抽取子离子图

Fig.1 Extracted product ion spectrum of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol

### 2.3 样品前处理的优化

牛奶中成分复杂, 蛋白质含量较高, 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素均属于弱极性化合物, 易于蛋白质结合, 因此本方法分别采用5%高氯酸处理样品, 以除去样品中的蛋白质。目前, 国内外相关氯霉素检测研究都采用乙酸乙酯萃取, 正己烷脱脂, 然后用乙酸乙酯反萃, 氮气吹干后定容等前处理方法, 本研究省去了液-液萃取等有机处理步骤, 具有操作简单、测定周期短等优点。实验结果表明, 该处理使牛奶中的氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素有较高的稳定性和满意的提取效率。

### 2.4 线性范围与检出限

将逐级稀释的标准工作液分别进样50μl, 测定结果经线性回归, 线性范围为1.0~30μg/L。回归方程(y为峰面积, Counts; x为浓度, μg/L)相关系数和检出限见表2。

表2 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素的回归方程、相关系数及检出限  
Table 2 Regression, correlation coefficients and detection limits of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol respectively

化合物	定量离子 (m/z)	线性回归方程 (y=ax)	线性相 关系数(r) (μg/L, S/N≥3)	检出限
氯霉素	256.8; 193.8/321.0	y=1572.1x-801.23	0.9956	0.3
甲砒霉素	298.9; 226.8/354.0	y=338.14x+101.71	0.9904	1
氟甲砒 霉素	335.8; 218.8/356.0	y=2502.2x-1574.1	0.9951	0.2

### 2.5 方法的回收率和精密度

称取已知含量的同一样品6份, 每份10ml, 分别添加含量为0.02、0.10、0.20、0.50mg的3种氯霉素类抗生素的混合标准溶液, 按供试溶液制备方法制备后, 进行测定, 结果见表3。

表3 牛奶样品中氯霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素的回收率(%)与相对标准偏差(%)

Table 3 Recovery and relative standard deviations(RSD) of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in milk sample respectively

化合物	样品浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	添加浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	检测浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	加标回收 率(%)	相对标准 偏差(%)
氯霉素	0	1.00	0.78	77.9	14.0
	0	5.00	4.61	92.2	11.1
	0	10.00	9.31	93.1	12.1
	0	25.00	22.78	91.1	9.3
甲矾霉素	0	1.00	0.89	88.9	13.4
	0	5.00	4.22	84.4	12.9
	0	10.00	8.47	84.7	13.0
	0	25.00	23.58	94.3	11.9
氟甲矾霉素	0	1.00	0.89	88.9	12.0
	0	5.00	4.46	89.1	7.7
	0	10.00	8.99	89.9	10.5
	0	25.00	24.15	96.6	11.6

### 3 结 论

本实验建立了乳制品中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素残留的高效液相色谱-电喷雾离子阱质谱联用测定方法。该法样品操作简单、有机试剂消耗少、测定周期短等优点,明显提高了检测效率,适用于乳制品中大量样品的快速筛选,测定。

### 参考文献:

- [1] 邹月利, 赵李霞, 张永忠. 奶中氯霉素残留量的高效液相色谱方法研究[J]. 食品工业, 2006, (5): 50-52.
- [2] 潘莹宇, 张建新, 许茜. 荧光衍生化法测定牛奶中氯霉素残留的研究[J]. 分析实验室, 2005, 24(5): 67-70.
- [3] 瞿进文, 吴洁珊, 蔡勤仁, 等. 古学群, 陈伟生. 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定鱼肉中氯霉素含量[J]. 理化检验-化学分册, 2005, 41(11): 799-801.