

# 液相色谱 - 串联三重四极杆质谱测定蜂蜜中的氯霉素残留

田文礼, 彭文君\*, 韩胜明, 高凌宇, 国占宝  
(中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100093)

**摘要:** 建立蜂蜜中氯霉素残留的高效液相色谱-串联四极杆质谱联用测定方法。该方法经乙酸乙酯提取样品,以 ZORBAX EclipseXDB-C<sub>18</sub> 柱(2.1mm × 150mm, 5 μm)分离,流动相为水溶液-甲醇(40:60, V/V),电喷雾负离子MRM模式检测。该方法的检出限0.1ng/ml,样品的定量下限为0.1 μg/kg,线性范围0.1~10.0ng/ml,加标回收率86.0%~93.2%,相对标准偏差为3.26%。

**关键词:** 液质联用仪; 氯霉素; 蜂蜜; 残留

## Liquid Chromatography/Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometric Determination of Chloramphenicol Residue in Honey

TIAN Wen-li, PENG Wen-jun\*, HAN Sheng-ming, GAO Ling-yu, GUO Zhan-bao  
(Bee Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China)

**Abstract:** A LC-MS/MS method was developed for the detection of chloramphenicol residue in honey. Samples were extracted using ethyl acetate, and the extracts were separated on a ZORBAX XDB-C<sub>18</sub> column (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) with a mobile phase composed of methanol and water (40:60, V/V). The analysis was carried out by MS/MS in an electrospray negative ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The limits of detection and quantification were 0.1 ng/ml and 0.1 g/kg, respectively. The linear range was between 0.1 ng/ml and 10.0 ng/ml. The average spike recovery was 88.2%, with an average RSD of 3.26%.

**Key words:** LC-MS/MS; chloramphenicol; honey; residue

中图分类号: TS207.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)14-0285-03

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,如对骨髓造血机能有抑制作用,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。蜂蜜营养丰富,是人类重要的滋补食品,由于诸多原因,蜂蜜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-质联用法等<sup>[1-3]</sup>。本方法采用高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法对蜂蜜中的氯霉素残留进行测定,取得满意效果。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料、试剂与仪器

蜂蜜 本地超市。

甲醇(色谱纯);甲酸(色谱纯);乙酸乙酯(分析纯);氢氧化铵(分析纯);氯霉素(纯度99%) Sigma公司。

液相色谱-串联质谱仪(Agilent 6410型串联三重四极杆质谱,配Agilent1200型液相色谱仪) Agilent公司; Milli-Q去离子水发生器 Milli-Q公司。

#### 1.2 样品处理

准确吸取样品5g至50ml比色管中,加入5ml水,0.45ml氢氧化铵,于液体混匀器上快速混合1min,使试样完全溶解。加入30ml乙酸乙酯,在振荡器上振荡20min,过无水硫酸钠脱水,再取30ml乙酸乙酯冲洗比

收稿日期: 2009-03-16

基金项目: 农业部“948”项目(2006-G19); 农业部现代蜜蜂产业技术体系项目

作者简介: 田文礼(1980-),男,助理研究员,博士研究生,研究方向为蜂产品加工与质量安全。

E-mail: leroytian@126.com

\* 通讯作者: 彭文君(1970-),男,副研究员,研究方向为昆虫授粉、蜂产品加工与质量安全。

E-mail: pengwenjun@vip.sina.com

色管及无水硫酸钠, 并入蒸发瓶内, 并将其接至旋转器上, 于 45 °C 水浴中减压蒸馏至干, 用 5 ml 水溶解, 再过 0.20 μm 滤膜后, 用液相色谱-串联质谱测定。

### 1.3 分析条件

#### 1.3.1 色谱条件

色谱柱: ZORBAX EclipseXDB-C<sub>18</sub> 柱:(2.1mm × 150mm, 5 μm); 流速: 0.25ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μl; 流动相: 水溶液-甲醇(60:40, V/V)。

#### 1.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 负离子扫描; 检测方式: 多反应检测; 干燥气: N<sub>2</sub>; 雾化气压力: 40psi; 干燥气温度: 340 °C; 干燥气流速: 8L/min。氯霉素质谱分析的条件参数如表 1 所示。

表 1 氯霉素的质谱参数

Table 1 Mass spectral parameters of chloramphenicol

被测物质名称	定量离子(m/z)	定性离子(m/z)	碎裂电压(V)	碰撞能量(V)
氯霉素	152/321	152/321	80	15
		257/321		5

## 2 结果与分析

### 2.1 样品提取

蜂蜜中成分复杂, 氯霉素在碱性条件下比较稳定, 因此本方法首先采用加入 5ml 水、0.45ml 氢氧化铵, 以使试样在碱性条件完全溶解, 然后再加入乙酸乙酯, 提高了提取效率。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取, 氮气吹干后定容等前处理方法。本方法用 5ml 水溶液定容经旋转蒸发至干的提取液后直接测定, 省去了乙酸乙酯反萃取等处理步骤, 具有操作简单、测定周期短等优点。结果表明, 该处理使蜂蜜中的氯霉素有较高的稳定性和满意的提取效率。

### 2.2 质谱条件的优化

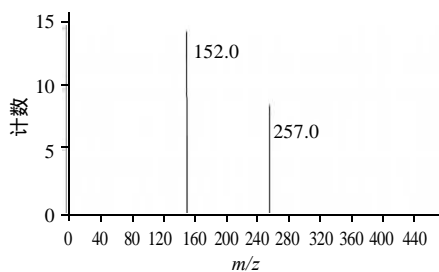


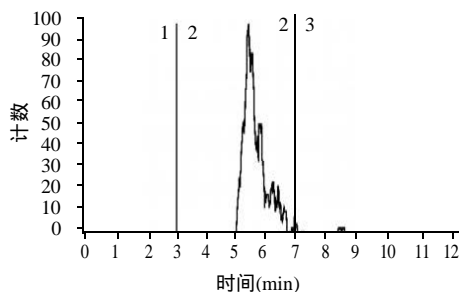
图 1 碰撞能量为 15eV 警方氯霉素的质谱图

Fig.1 Mass spectrum of chloramphenicol at 15 eV collision energy

首先采用 50ng/ml 的氯霉素标准溶液在负离子模式下进行母离子全扫描, 确定氯霉素的分子离子为  $m/z$ 321.0。比较了不同参数如碎裂电压、碰撞电压对检测的影响。结果表明, 碎裂电压通常在 60 ~ 80V 内对氯霉素母离子检测响应的影响较大。质谱峰面积随碎裂电压的增加而增大, 在超过 80V 时峰面积逐步减小, 因为氯霉素母离子在此电压就已经开始分解, 因此本研究选取碎裂电压 80V。碰撞电压主要控制氯霉素前体离子的断裂, 给出碎片离子。在碰撞电压分别为 15eV 和 5eV 时,  $m/z$ 152.0 和  $m/z$ 257.0 碎片离子的强度比较大, 因此选择这两个离子作为定量检测离子(图 1)。

### 2.3 色谱条件的优化

氯霉素属于弱极性化合物, 为了有利于色谱峰的分离及峰形的改善, 本方法分别采用 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱、ZORBAX Eclipse SB-C<sub>18</sub> 和 ZORBAX SB-Aq 柱进行分离实验。研究表明最佳色谱条件为: 色谱柱: Eclipse XDB-C<sub>18</sub>; 流动相: 水溶液-甲醇(40:60, V/V), 流速 0.25ml/min。在此条件下, 6min 内可以较好的分离样品中氯霉素。图 2 为加标样品总离子流图, 从图 2 中可以看出氯霉素得到较好的分离。



1、2、3 表示分段, 2 段为色谱分析。

图 2 加标样品的总离子流图

Fig.2 Total ion current chromatogram of chloramphenicol-spiked honey sample

### 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 20 μl, 测定结果经线性回归, 线性范围为 0.1 ~ 10ng/ml。回归方程  $y=146.79x+153.21$  ( $y$  为峰面积,  $x$  为浓度); 线性相关系数为 0.99842。进空白样, 以基线 3 倍噪声值在标准曲线查得结果计算, 测得方法检出限为 0.1ng/ml, 按测定方法计算, 样品的定量下限为 0.1 μg/kg。

### 2.5 方法的加标回收率和精密度

准确称取已知含量的同一样品 4 份, 每份 5g, 分别加入定量为 2.5、25ng 的氯霉素标准品, 按供试样品制备方法制备后, 进行测定, 结果见表 2。从表 2 中

可看出, 平均加标回收率为 88.2%, 经计算平均相对标准偏差为 3.26% ( $n = 8$ )。

表 2 回收率测定结果

Table 2 Recoveries for chloramphenicol in spiked honey samples

实验号	加标量(ng/ml)	回收率(%)	回收率(%)	平均回收率(%)
1	0.5	0.43	86.0	
2	0.5	0.44	88.0	
3	0.5	0.46	92.0	
4	0.5	0.43	86.0	
5	5.0	4.66	93.2	88.2
6	5.0	4.30	86.0	
7	5.0	4.40	88.0	
8	5.0	4.31	86.2	

### 3 结 论

本实验建立了蜂蜜中氯霉素的高效液相色谱 - 串联四极杆质谱联用测定方法: 经乙酸、乙酯提取样品, 以 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 柱分离, 流动相为水溶液 - 甲醇(40:60,  $V/V$ )电喷雾负离子 MRM 模式检测。该法具有样品处理简单、测定周期短等优点, 适用于大量样品的快速定性定量测定。

#### 参考文献:

- [1] 陈美莲, 张辉. 乳与乳制品中氯霉素残留量的检测方法[J]. 乳业科学与技术, 2006, 28(1): 18-19.
- [2] 彭涛, 李淑娟, 储晓刚, 等. 高效液相色谱 / 串联质谱法同时测定虾中氯霉素、甲砷霉素和氟甲砷霉素残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(4): 463-466.
- [3] 瞿进文, 吴洁珊, 蔡勤仁, 等. 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.