

- PCDFs and PCBs in retail foods and an assessment of dietary intake for local population of Shenzhen in China[J]. *Environment International*, 2008, 34(6):799-803.
- [9] ZHOU P, WU Y, YIN S, et al. National survey of the levels of persistent organochlorine pesticides in the breast milk of mothers in China[J]. *Environmental Pollution*, 2011, 159(2):524-531.
- [10] Ramos L, Hernández L M, González M J. Study of the distribution of the polychlorinated biphenyls in the milk fat globule by supercritical fluid extraction[J]. *Chemosphere*, 2000, 41(6):881-888.
- [11] Millqvist-Fureby A. Characterisation of spray-dried emulsions with mixed fat phases [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 31(1):65-79.
- [12] Pandelova M, Piccinelli R, Kasham S, et al. Assessment of dietary exposure to PCDD/F and dioxin-like PCB in infant formulae available on the EU market[J]. *Chemosphere*, 2010, 81(8):1018-1021.
- [13] McCarthy N A, Kelly A L, O'Mahony J A, et al. The physical characteristics and emulsification properties of partially dephosphorylated bovine  $\beta$ -casein[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2/3):1304-1311.
- [14] Kim E H J, CHEN X D, Pearce D. Melting characteristics of fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powders [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2005, 42(1):1-8.

## 实验技术与方法

# 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鱼肉中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素

潘晓东, 吴平谷, 姜维

(浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051)

**摘要:**目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定鱼肉中氯霉素(CAP)、甲砒霉素(TAP)和氟甲砒霉素(FF)的测定方法。方法 以氘代氯霉素(d5-CAP)为内标,样品采用乙酸乙酯提取,正己烷脱脂处理。在ACQUITY BEH-C<sub>18</sub>色谱柱中分离,以水-甲醇做流动相梯度洗脱,以负离子多反应监测模式、同位素内标法定量。结果 CAP、TAP和FF方法的检出限分别为0.01、0.03、0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,回收率分别为83.2%~96.5%、76.8%~93.8%和79.6%~95.0%;相对标准偏差为4.1%~8.8%。结论 本法具有良好的选择性、灵敏度和准确度,满足鱼肉中痕量氯霉素类药物残留的高灵敏分析需要。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱; 氯霉素; 甲砒霉素; 氟甲砒霉素; 抗生素残留; 违禁药物

中图分类号:R155; O657.63 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)06-0572-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.06.014

## Determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol in fish muscle by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

PAN Xiao-dong, WU Ping-gu, JIANG wei

(Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

**Abstract: Objective** To develop a quantification method for chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) in fish muscle by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

**Methods** Coupled with internal standard of d5-chloramphenicol, samples were extracted with ethyl acetate, then defatted by hexane. The extraction was separated by gradient elution with methanol-water in ACQUITY BEH C<sub>18</sub> column. The analytes were simultaneously quantified by the isotope internal standard under the negative ion mode and multiple reactions monitoring mode. **Results** The limits of detection for CAP, TAP and FF were 0.01, 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and average recoveries 83.2%-96.5%, 76.8%-93.8% and 79.6%-95.0% separately. The relative standard deviation varied between 4.1%-8.8%.

**Conclusion** The method was selective, sensitive, accurate and suitable for determination of trace three chloramphenicols analysis in fish muscle.

收稿日期:2014-07-29

基金项目:浙江省医药卫生项目(2013RCA008);国家高技术研究发展计划项目(2012AA101603)

作者简介:潘晓东 男 副研究员 研究方向为食品理化检验 E-mail:panxd2009@gmail.com

**Key words:** Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; chloramphenicol; thiamphenicol; florfenicol; antibiotic residues; prohibited drugs

氯霉素类药物包括氯霉素(CAP)、甲砒霉素(TAP)和氟甲砒霉素(FF)是一类广谱抗生素,常用于畜禽及水产品的疾病治疗和预防<sup>[1]</sup>。由于氯霉素能抑制骨髓造血功能和引起再生障碍性贫血等毒副作用<sup>[2]</sup>,目前我国和大部分国家如欧盟、美国等均禁止在水产养殖中使用氯霉素<sup>[3]</sup>。

氯霉素类药物的确证检测方法主要为超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)和气相色谱-质谱法(GC-MS),其中GC-MS法需要进行衍生化,前处理方法较为繁琐<sup>[4-5]</sup>。本试验采用d5-氯霉素做内标,乙酸乙酯提取,正己烷去脂,无需过净化柱,UPLC-MS/MS法同时测定氯霉素、甲砒氯霉素和氟甲砒霉素的残留量。本方法定性定量准确,重现性好,灵敏度高,基本能满足欧盟及国家食品安全风险监测部门对残留量的限量要求。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

选取鲈鱼为试验样品,取鲈鱼背侧肌肉制成鱼肉样品。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

ACQUITY™液相色谱仪、Micromass Quattro Ultima™Pt质谱仪均购自美国Waters,高速离心机。

混合标准储备液(准确称量氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素各12.5 mg,用乙腈溶解并定容至25 ml的棕色容量瓶中,其浓度为500 μg/ml,4℃避光保存)、氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素和d5-氯霉素(纯度>99%)均购自德国Dr. Ehrenstorfer,甲醇、乙腈、乙酸乙酯、正己烷均为色谱纯,实验室用水为超纯水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 样品处理

称取5.0 g试样(精确至0.01 g)至50 ml塑料离心管中,加入20 ng/ml的d5-CAP内标溶液75 μl,5 g无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,10 ml乙酸乙酯匀浆提取30 s,5 000 r/min离心5 min,上清液收集于50 ml离心管中,残渣加入10 ml乙酸乙酯继续提取2次,合并上清液。上清液混匀后取15 ml,45℃氮气吹干,残留物用2.5 ml初始流动相溶解,加入3.0 ml正己烷涡旋混合30 s,5 000 r/min离心5 min,弃去上层正己烷层,下层再加入3.0 ml正己烷重复处理1次,弃去上层正己烷层,下层水相经0.22 μm滤膜过滤后,供液质联用分析。

#### 1.2.2 仪器条件

色谱条件:Waters Acquity BEH-C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm × 100 mm,1.7 μm),流速0.4 ml/min,柱温40℃;进样量10 μl,流动相:A为甲醇,B为水。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间/min	流速/(ml/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.4	10	90
3.0	0.4	90	10
4.0	0.4	90	10
4.1	0.4	10	90
5.0	0.4	10	90

质谱条件:负离子电喷雾(ESI-)模式,毛细管电压3.0 kV,离子源温度120℃,脱溶剂温度350℃;去溶剂气流量650 L/h,锥孔气流量40 L/h,碰撞气压0.32 kPa(Ar),反应监测(MRM)模式检测。CAP、TAP和FF质谱分析参数见表2。

表2 CAP、TAP和FF的质谱分析参数

分析物	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
CAP	2.47	321	152	35	26
			257	35	16
d5-CAP	2.46	326	157	35	26
TAP	1.71	354	185	35	18
			290	35	27
FF	2.04	356	185	35	14
			336	35	18

## 2 结果与amp;讨论

### 2.1 样品前处理

氯霉素属于弱极性物质,在水中溶解度较差,而易溶于甲醇、乙腈等有机溶剂。从样品中提取氯霉素主要有乙酸乙酯、乙腈等。采用乙酸乙酯提取时,很多脂类和其他种类的杂质也易溶解,为了减少干扰,常用正己烷或者固相萃取柱去除脂类杂质<sup>[6]</sup>。本试验采取Oasis HLB固相萃取柱进行净化比较,Oasis HLB柱可有效去除杂质,方法检出限较低,但成本较高,而液液萃取对于正己烷脱脂的净化方法有较好的回收率和检出限,成本也相对较低,因此本试验采用液液萃取的方法。

### 2.2 质谱条件优化

将0.5 mg/L的CAP、TAP、FF混标溶液及d5-CAP内标液利用流速为10 μl/min的流动注射泵以

连续进样方式在负离子模式下进行母离子全扫描,确定CAP、TAP、FF及d5-CAP的分子离子 $m/z$ 分别为321,354,356和326。然后分别以各自的母离子(parent ion),以子离子扫描方式(daughter scan)进行二级质谱分析,各自找出选择丰度相对较强的两个特征碎片离子,以母离子和子离子组成监测离子对,使用多反应监测(MRM)模式对目标物进行定性定量分析。选择丰度最强、无干扰的监测离子对 $m/z$  321/152、 $m/z$  354/290、 $m/z$  356/336和 $m/z$  326/157分别用于CAP、TAP、FF及d5-CAP的定量,其它离子对则分别用于辅助定性。优化调节锥孔电压及碰撞能量,结果见表2。

### 2.3 线性范围与检出限

分别配制一系列标准工作溶液(0.05~100 ng/ml),内标d5-CAP浓度为10 ng/ml。在本试验的色谱和质谱条件下进行测定,CAP、TAP、FF的线性相关系数( $r$ )均在0.998以上,方法检出限(LOD)以仪器三倍信噪比来估算,CAP检出限为0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TAP和FF检出限均为0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2.4 回收率和精密度试验

选取空白本底的鱼肉样品,添加3种氯霉素类标准品和内标,氯霉素类标准品的添加水平为0.5、10和50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,测定方法的回收率。每个样品重复测定6次,测定方法的精密度,结果见表3。CAP、TAP和FF的回收率分别为83.2%~96.5%,76.8%~93.8%和79.6%~95.0%,相对标准偏差为4.1%~8.8%。

## 3 小结

本文建立了鱼肉中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定方法。该方法采用液液萃取和正己烷脱脂,省去固相萃取步骤,具有操作简便、有机试剂消

表3 回收率和精密度试验( $n=6$ )

Table 3 Recovery and precision				
分析物	添加水平 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均测定值 /( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率 /%	RSD/%
CAP	0.5	0.416	83.2	6.6
	10	9.060	90.6	4.9
	50	48.250	96.5	6.1
TAP	0.5	0.384	76.8	7.4
	10	9.010	90.1	4.3
	50	46.901	93.8	4.6
FF	0.5	0.398	79.6	7.5
	10	9.124	91.2	8.8
	50	47.503	95.0	6.2

耗少、测定周期短等优点,减少了样品间交叉污染的机会。该方法样品前处理时加入同位素内标物,部分补偿了分析物在样品前处理时的损失,以及基体的干扰,回收率和精密度令人满意。本方法适用于水产品中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留的确证检验。

## 参考文献

- [1] 蒋定国,杨大进. 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况(综述)[J]. 中国食品卫生杂志,2002,14(2):44-47.
- [2] ZHANG S,LIU Z,GUO X,et al. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life,2008,875(2):399-404.
- [3] 中华人民共和国农业部. 农业部公告193号 食品动物禁用的兽药及其化合物清单[S]. 北京: 中华人民共和国农业部,2002.
- [4] 董宇,马殿君,那海秋,等. 辽宁省熟肉制品中氯霉素残留检测结果分析[J]. 中国食品卫生杂志,2012,24(5):471-473.
- [5] 陈剑刚,张艳,白艳玲,等. 同位素内标稀释液相色谱-串联质谱法测定虾中氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素残留量[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(7):1670-1673.
- [6] 虞晓珍,黄百芬,冯靓,等. 同位素稀释-超高效液相色谱串联质谱法测定卫生用品中的氯霉素[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(12):2822-2824.