

# 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定水产品中氯霉素类药物残留

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中测定氯霉素类药物残留的方法。借助超高效液相色谱 LC-30A 在 2.5 min 内实现快速分离, 三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定量分析, 因此可以快速、准确地测定甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素。这 3 种物质的线性良好, 相关系数均大于 0.999; 不同浓度的精密度实验结果表明: 其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.13 ~ 0.54% 和 1.68 ~ 4.31% 之间, 仪器精密度良好; 甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的检出限分别为 0.10、0.04 和 0.04  $\mu\text{g/L}$ , 定量限分别为 0.41、0.17 和 0.15  $\mu\text{g/L}$ ; 样品加标回收率为 81.5 ~ 105.5%。

**关键词:** 兽药残留 水产品 氯霉素类 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素(氟苯尼考)同属于氯霉素类(CAPs)药物, 甲砒霉素和氟苯尼考是新型氯霉素类广谱抗菌药物, 其结构和药理活性与氯霉素类似, 具有广谱抗菌能力并被广泛应用于动物养殖业。但氯霉素类药物用于食用性动物很容易导致在动物源性食品中残留量超标, 具有导致人体产生再生障碍性贫血和溶血性贫血等毒副作用, 对人体产生严重危害, 因此引起了国内外的广泛重视。

目前, 大多数国家已经严格限制其使用, 并对食品中氯霉素类药物的最高残留限量(MRL)做了规定: 欧盟规定氯霉素不得检出, 甲砒霉素为 50  $\mu\text{g/kg}$ ; 对有鳍鱼类氟苯尼考为 1000  $\mu\text{g/kg}$ ; 我国 GB/T 20756-2006 规定氯霉素检出限 0.1  $\mu\text{g/kg}$ , 甲砒霉素和氟苯尼考检出限为 1  $\mu\text{g/kg}$ 。

纵观国内外文献报道氯霉素类药物的检测方法主要采用气相色谱法、气相色谱-质谱联用法(GC/MS)和液相色谱-质谱联用法(LC/MS)等, 这些方法主要是测试一种氯霉素药物残留的分析方法, 而三种药物同时检测的方法报道较少。目前国内在水产品中测定这三种药物的测定方法主要参考 GB/T 20756-2006 (液相色谱-串联质谱法) 和农业部 958 号公告 -14-2007 (气相色谱-质谱法), 但是多数国家检测甲砒霉素、氟甲砒霉素、氯霉素三种药物比较精密的方法还是首推液相色谱-串联质谱法。因此, 本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用, 建立了水产品中氯霉素类药物残留的分析方法, 此方法快速、选择性强和灵敏度高, 供相关检测人员参考。

## 1. 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵, DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8030 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.42 色谱工作站。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×50 mmL., 1.6 μm

流动相：A—水；B—乙腈

流速：0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40 °C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 30%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	30
1.50	Pumps	Pump B Conc.	60
2.00	Pumps	Pump B Conc.	60
2.01	Pumps	Pump B Conc.	30
4.00	Controller	Stop	

### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8030

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：40 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：MRM 分组采集，见表 2

表 2 MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	甲砒霉素	354.0	185.0*	27	22	19
			289.9	27	12	20
2	氟甲砒霉素	356.0	336.0*	13	10	23
			185.0	13	20	19
3	氯霉素	321.0	152.1*	25	18	15
			257.0	25	12	18

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

标准物质：共 3 种，分别为甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素。

标准溶液配制：用甲醇配制 10 mg/L 的混合标准中间溶液，用甲醇-水溶液(V/V, 50:50)稀释成 0.2 µg/L、0.5 µg/L、1 µg/L、5 µg/L、10 µg/L、50 µg/L 和 100 µg/L 不同浓度的混合标准工作液。

样品前处理方法：称取 5.0 g 试样(精确至 0.01 g)至 50 mL 离心管中，加入 25 mL 乙酸乙酯，在匀质器中以 14000 r/min 匀质 30 s，以 4000 r/min 离心 5 min，上层乙酸乙酯提取液收集于 50 mL 平底烧瓶中，残渣加入 20 mL 乙酸乙酯，重复上述操作，合并提取液；45℃ 减压旋转浓缩至干，残留物用 1 mL 甲醇-水溶液(V/V, 50:50)溶解，再加入 3.0 mL 正己烷混合，并转移至 10 mL 比色管中，涡动混合 30 s；以 4000 r/min 离心 2 min，弃去上层正己烷，移取下层，经 0.22 µm 微孔滤膜过滤后，用液质分析。

## 2. 结果讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

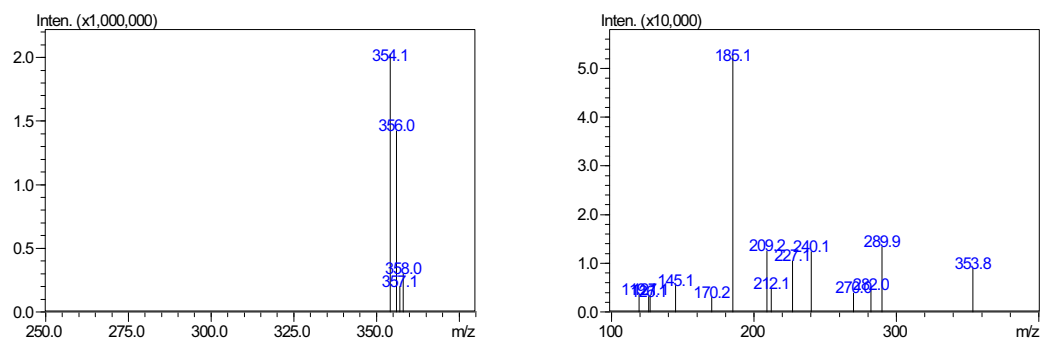


图 1 甲砒霉素的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值 20V，右图）

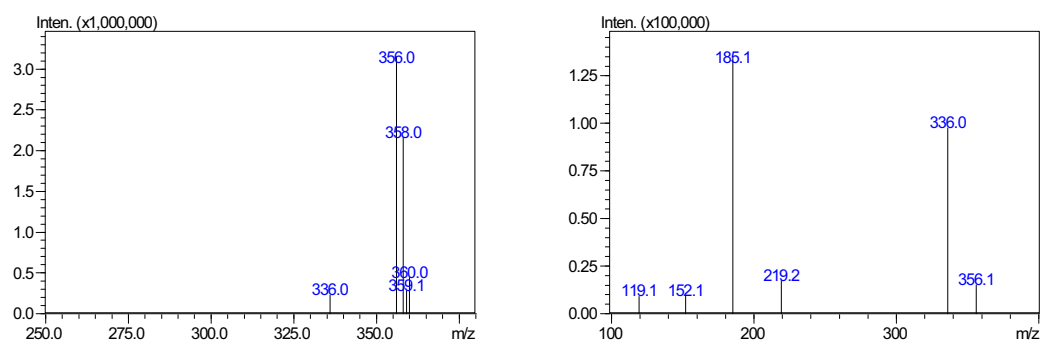


图 2 氟甲砒霉素的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值 16V，右图）

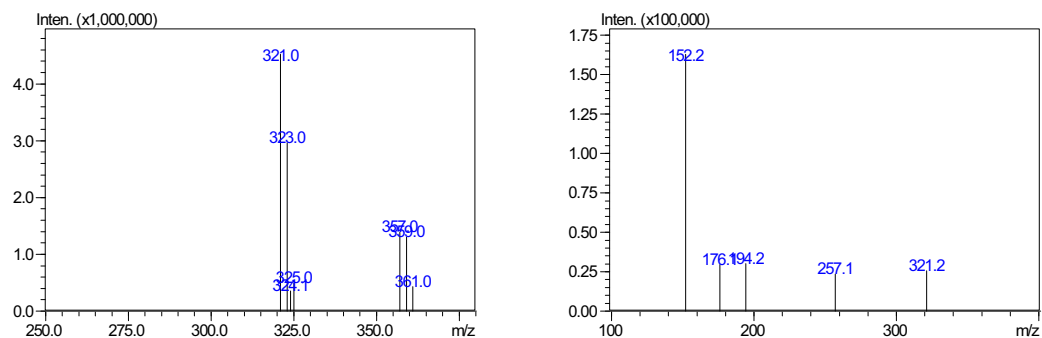


图3 氯霉素的一级质谱图（左图）和产物离子扫描质谱图（CE 值 18V，右图）

## 2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱如图 4 所示。

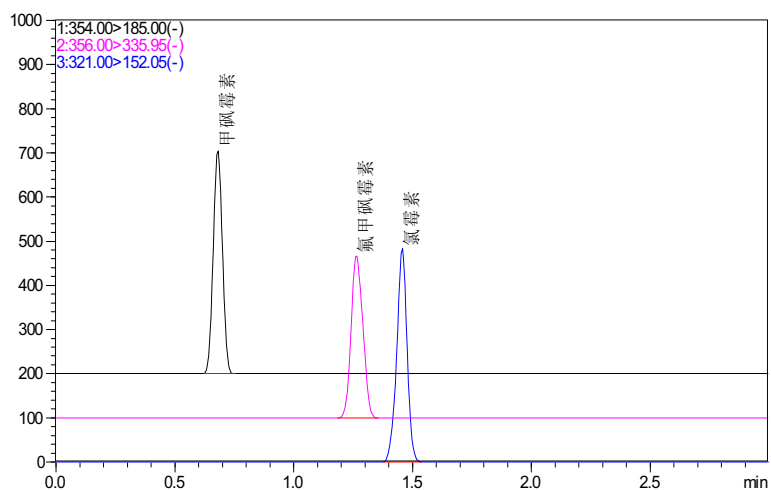


图4 1  $\mu\text{g/L}$  混合标准样品的 MRM 色谱图

## 2.3 线性关系

将浓度为 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 50 和 100  $\mu\text{g/L}$  甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的混合标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，如图 5~7 所示。甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素线性良好。线性方程、线性范围和相关系数见表 3。

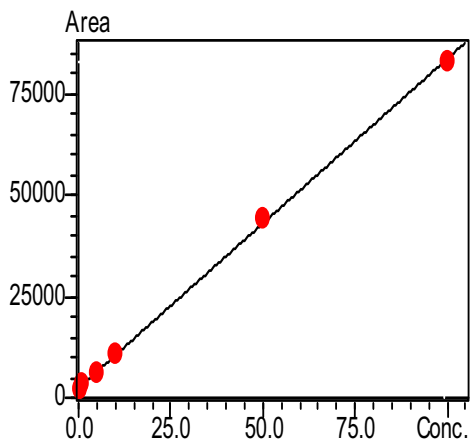


图 5 甲砒霉素的标准工作曲线

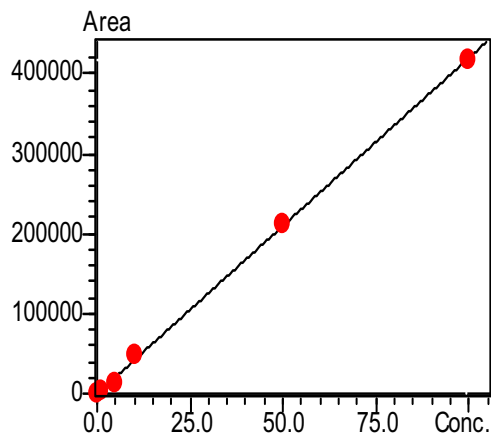


图 6 氟甲砒霉素的标准工作曲线

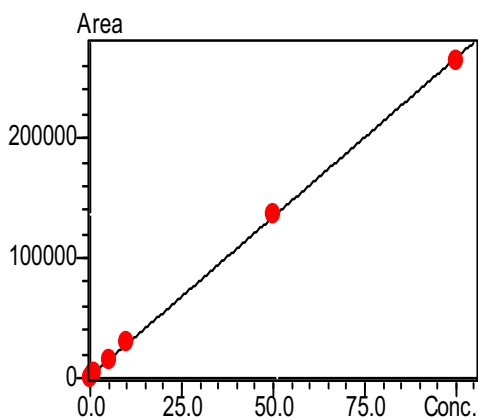


图 7 氯霉素的标准工作曲线

表 3 3 种物质的校准曲线参数

编号	名称	线性范围	校准曲线	相关系数 R
1	甲砒霉素	0.5~100 µg/L	$Y = (813.877)X + (2393.00)$	0.9998
2	氟甲砒霉素	0.2~100 µg/L	$Y = (4198.77)X + (-157.491)$	0.9996
3	氯霉素	0.2~100 µg/L	$Y = (2653.64)X + (1739.35)$	0.9998

### 2.3 检出限和定量限

配制 7 份混合标样，进样分析，对上述测定结果剔除离群值后将各自的 7 次测定结果计算其标准偏差 S，此时检出限  $MDL = 3.14 \times S$ ，定量限  $LOQ = 4 \times MDL$ 。测定结果如表 4 所示：

表 4 3 种物质的检出限和定量限

No.	名称	浓度(µg/L)	标准偏差(S)	检出限(µg/L)	定量限(µg/L)
1	甲砒霉素	0.50	0.033	0.102	0.41
2	氟甲砒霉素	0.20	0.014	0.043	0.17
3	氯霉素	0.20	0.011	0.038	0.15

### 2.4 精密度实验

配制如表 5 浓度的混合标液，平行进样 6 次。3 种目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.13 ~ 0.54%和 1.68 ~ 4.31%之间，仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

No.	名称	RSD% (0.5 µg/L)		RSD% (10 µg/L)		RSD%(100 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	甲砒霉素	0.54	4.31	0.15	3.34	0.25	1.51
2	氟甲砒霉素	0.40	2.66	0.09	2.39	0.16	1.87
3	氯霉素	0.38	2.26	0.16	1.68	0.13	1.98

2.5 基质加标实验

在按照 1.3 中样品制备方法，样品中添加混合标样，加标含量如表 6，各平行 4 次。测试结果显示：虾的样品加标回收率在 81.5 ~ 105.5%之间；具体结果如表 6。虾的基体空白色谱图如图 8 所示，虾的加标样品色谱图如图 9 所示。

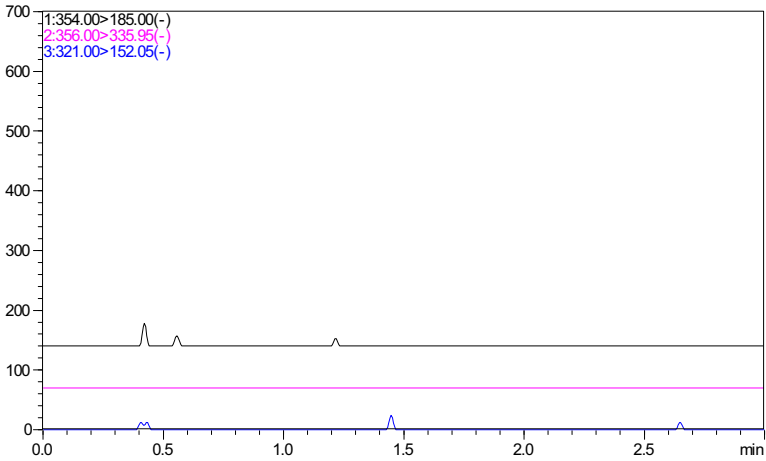


图 8 虾的基体空白色谱图

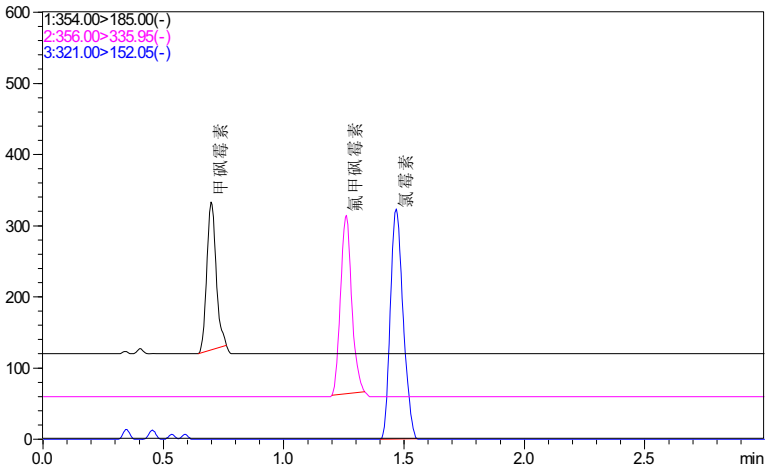


图 9 0.1 µg/kg 样品基质加标样色谱图

表 6 加标样的回收率结果 (n=4)

No.	样品名称	回收率 (%)		
		0.1 µg/kg	1 µg/kg	20 µg/kg
1	甲砒霉素	84.8	90.3	105.5
2	氟甲砒霉素	89.8	83.7	81.5
3	氯霉素	96.9	99.8	93.3

### 3. 结论

使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用测定水产品中甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素药物残留。3 种物质的线性良好，相关系数均大于 0.999。甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的检出限分别为 0.10、0.04 和 0.04 µg/L，定量限分别为 0.41、0.17 和 0.15 µg/L；基质加标回收率在 81.5 ~ 105.5% 之间。此法中对 0.1 µg/kg 氯霉素类药物进行基体加标，如图 9 所示有明显响应，且回收率良好，完全满足 GB/T 20756-2006 以及欧盟对甲砒霉素、氟甲砒霉素和氯霉素的最高残留量的要求，并且甲砒霉素和氟甲砒霉素方法定量限低于标准规定。此方法快速、选择性强和灵敏度高，可作为水产品中氯霉素类药物的日常检测方法。