

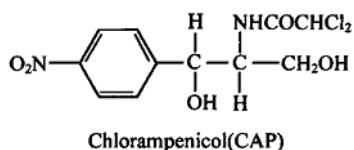
在线前处理液相系统 – 质谱联用法检测蜂蜜中的氯霉素

LCMSMS-083

摘要： 本文建立了一种使用在线前处理液相系统 – 质谱联用法检测蜂蜜中的氯霉素的方法。该方法通过搭建阀切换系统，从而实现样品的在线处理和浓缩，大大节省了用户前处理的时间，方法简单方便、灵敏度高、重现性好，方法定量限可达 0.5 μg/kg。

关键词： 在线前处理液相系统 三重四极杆质谱 蜂蜜 氯霉素

氯霉素 (Chloramphenicol, CAP, CAS:56-75-7) 又称氯胺苯醇，是一种广谱抗生素，在水产、禽类等养殖生产上常被用于细菌性传染病。化学结构式如下。



由于氯霉素存在抑制造血功能的毒副作用，许多国家禁止其在动物源性食品中使用，规定在所有食品动物可食性组织中最高残留限量为零。我国农业部（2002 年

农业部第 227 号公告）也有同样规定，并列入《食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂品种名单（第五批）》中。我国是蜂蜜出口大国，蜂蜜中氯霉素的检测成为进出口的必检项目。因此，建立一种简单、便捷、灵敏的检测方法非常必要。

本文采用了一种在线前处理 – 质谱联用系统，可以大大简化蜂蜜样品的前处理步骤，同时配合岛津 LCMS-8040 三重四极杆质谱检测器，真正实现痕量氯霉素的快速、高灵敏度检测。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用基于 LC-30A 的在线前处理系统与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。仪器配置流路图如下所示：

1) 样品导入流路 使用导入样品泵将样品导入前处理色谱柱，目标组分在该柱上保留，而基质随着导入流动相流入废液，从而起到前处理的目的。

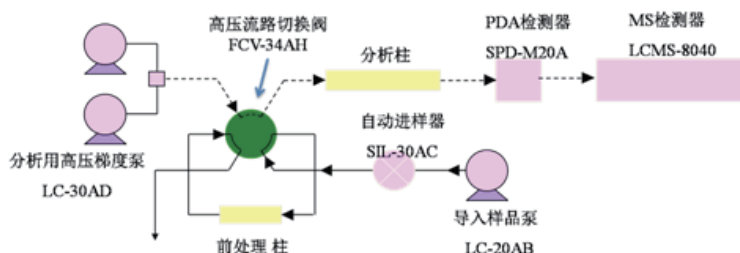


图 1 样品导入流路图

2) 样品分析流路 切换流路，使用分析用高压梯度泵输送分析流动相，将富集在前处理色谱柱上的目标物洗脱出来，进入分析柱进行分离，PDA 和 MS 检测器进行检测。

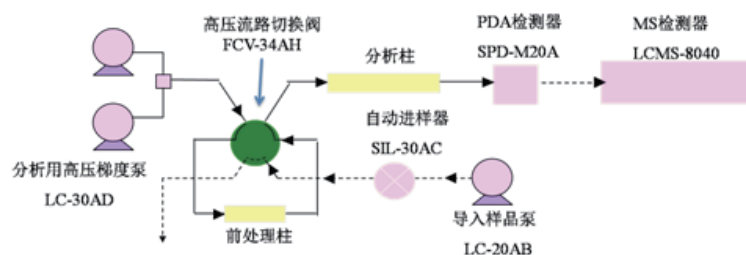


图2 样品分析流程图

1.2 分析条件

液相条件

1) 上样条件

色谱柱: MAYI-ODS

(2.0 mm I.D. × 10 mm L., 5 μm)

导入流动相: A 相 - 水溶液; B 相 - 乙腈

流速: 2 mL/min

进样量: 5 μL

2) 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS

(2.0 I.D. × 75 mm L., 2.2 μm)

流动相: A 相 - 水溶液; B 相 - 乙腈

流速: 0.35 mL/min

柱温: 40°C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 5%, 洗脱

程序见表 1。

质谱条件

离子化模式: ESI(-)

离子喷雾电压: -3.5 kV

雾化气: 氮气 2.5 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 300°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 100 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Column Oven	CTO.RVL	1
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
1.00	Pumps	Pump C B.Conc	5
1.01	Pumps	Pump C B.Conc	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	95
3.00	Column Oven	CTO.RVL	0
3.00	Pumps	Pump B Conc.	95
3.00	Pumps	Pump C B.Conc	90
3.01	Pumps	Pump B Conc.	5
3.01	Pumps	Pump C B.Conc	5
5.00	Controller	Stop	

注: Pump C 为上样泵; Pump A/B 为分析泵

表 2 MRM 优化参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q1 Pre Bias (V)
氯霉素	321.05	152.05*	12.0	18.0	29.0
		257.05	12.0	10.0	16.0
D5-氯霉素 (内标)	326.00	262.15	23.0	11.0	16.0

注: *表示定量离子

1.3 标准品溶液的配制

标准工作溶液配制：用乙腈配制 1.0 mg/mL 的标准储备液，再用水稀释成不同浓度的混合标准工作液，工作液浓度分别为：0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL。

1.4 样品前处理方法

由于本方法使用的是在线前处理，因此只需要对蜂蜜样品进行简单的稀释和过滤即可进行检测。具体方法如下：准备称取 5 g 蜂蜜（精确到 0.01 g）加入 50 mL 水，震荡均匀后，使用 0.22 μm 的滤膜过滤后进样测试。

■ 结果与讨论

2.1 上样时间的优化

使用样品前处理系统时，上样时间的确定对结果有较大的影响。上样时间短，基质没有洗脱完全；上样时间长，目标组分会出现峰展宽和回收率低的问题。因此在方法开发初期，需要考察上样时间。本文检测的是蜂蜜中的氯霉素，蜂蜜中存在大量的糖类，所以在考察时不接质谱，设置紫外检测器检测波长为 200 nm 用于检测基质洗脱情况。此时管路连接使用样品导入流路，流路出口接紫外检测器。结果显示，样品中的糖类在 1 min 内几乎全部流出，所以设置该方法的上样时间为 1 min。

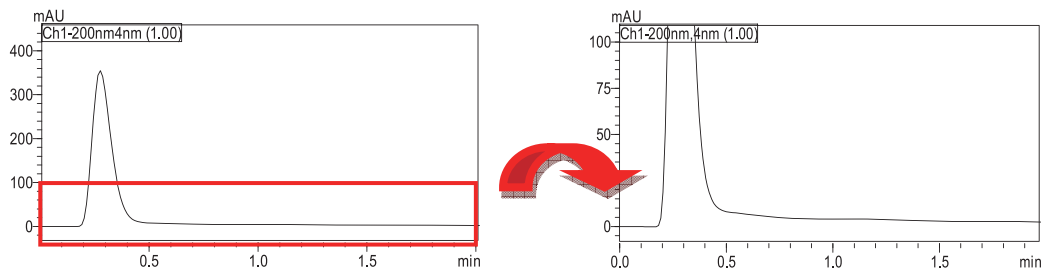


图 3 样品在前处理柱上保留的紫外色谱图

2.2 标准样品一级质谱图及 MRM 色谱图

使用 100 ng/mL 的标准品 Q3 Scan 模式得到氯霉素的一级质谱图，氯霉素在负离子模式下有很好的响应， $[M-H]^- = 321.05$ 。10 ng/mL 标准品的 MRM 色谱图见图 5。

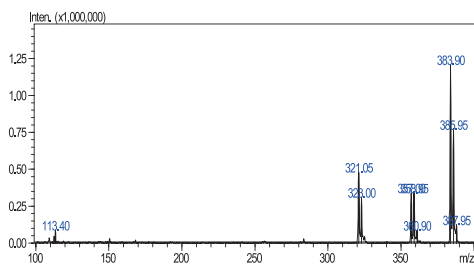


图 4 100 ng/mL 的标准品 Q3 Scan 色谱图

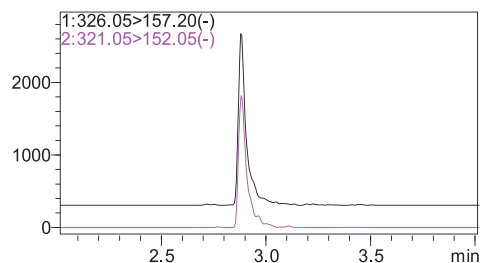


图 5 10 ng/mL 标准品的 MRM 色谱图

2.3 线性范围

0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/mL 的标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法定量。以浓度比值为横坐标，峰面积比值为纵坐标，绘制校准曲线如图 6 所示；所得校准曲线线性方程 $Y = (0.183317)X + (-0.00508229)$ ，相关系数 $r = 0.9997$ ，曲线线性良好。

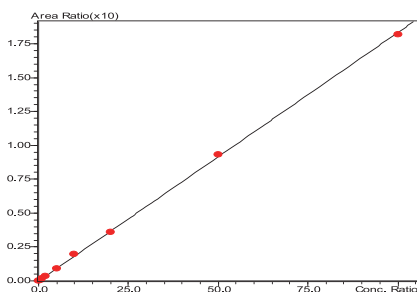


图 6 氯霉素的校准曲线

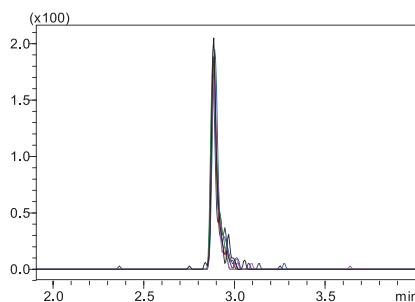


图 7 0.5 ng/mL 标准溶液 6 次进样的重叠色谱图

2.4 精密度实验

对 0.5 ng/mL 标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，色谱图见图 7，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.13% 和 3.12%，仪器精密度良好。

2.4 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，使用 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 蜂蜜基质加标进行测试，样品有较好的响应，色谱图见图 8。由于该系统的前处理色谱柱同时具有浓缩的功能，可以大体积上样。当上样体积为 50 μL 时，0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 蜂蜜基质加标样品的 S/N 可达 35.65，色谱图见图 9。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

No.	R.T	Area
1	2.885	457
2	2.886	432
3	2.892	462
4	2.886	433
5	2.882	434
6	2.881	435
平均	2.885	442
RSD%	0.13	3.12

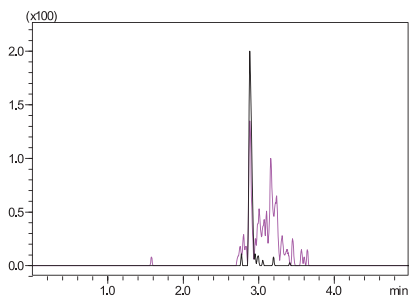


图 8 5 uL 上样 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 蜂蜜基质加标样品色谱图

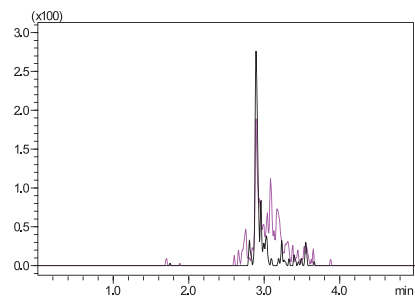


图 9 50 uL 上样 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 蜂蜜基质加标样品色谱图

2.6 回收率实验

考察了 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样品的回收率，结果显示在该浓度样品的回收率为 83.0%。

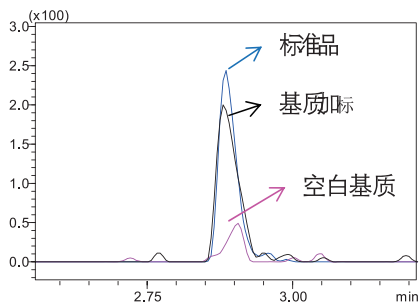


图 10 空白基质、基质加标和标准品的重叠色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用在线前处理液相系统 – 质谱联用法检测蜂蜜中的氯霉素的方法。该方法可实现蜂蜜样品在线前处理和浓缩；氯霉素在 0.1 ~100 ng/mL 范围内线性良好，相关系数可达 0.9997。由于该方法具有在线浓缩的功能，所以可以通过大体积上样实现 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的氯霉素的检测；0.5 ng/mL 标准工作液连续测定 6 次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.13% 和 3.12%，仪器精密度良好；5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 样品的回收率可达 83.0%。实验表明，方法简单方便、灵敏度高、重复性好。