

最新TSQ系列三重四极杆液质联用仪同时分析检测4种氯霉素类化合物

崔舒云 高鹏 郭藤 徐牛生

赛默飞世尔科技（中国）有限公司，上海 201206

关键词

TSQ Fortis Plus, 氯霉素类, 动物源性食品, GB 31658-2021

摘要

本文用Thermo Scientific™最新三重四极杆液质联用平台TSQ Fortis Plus建立了检测4种氯霉素类化合物的方法。选用极性封端的C18色谱柱（Thermo Scientific™ Hypersil GOLD™ aQ 100x2.1mm, 1.9μm），以0.1%乙酸水溶液为水相，以甲醇为有机相，流速为0.3 mL/min，柱温为40℃。采用ESI源正负切换模式进行SRM扫描。氯霉素在0.01~100ng/mL浓度范围、氟苯尼考在0.02~200 ng/mL浓度范围、氟苯尼考胺在0.1~1000 ng/mL浓度范围和甲砒霉素在0.05~500 ng/mL浓度范围内线性关系均良好（ $R^2 > 0.99$ ），灵敏度满足最新国家标准（GB 31658-2021）的检测要求，专属性强，稳定性好，适用于动物源性食品中4种氯霉素类化合物的定量分析与检测。

1. 引言

氯霉素类药物包括氯霉素、甲砒霉素、氟苯尼考以及氟苯尼考的代谢物氟苯尼考胺。氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素，对多数革兰阴性菌和革兰阳性菌都有抑制作用，但CAP残留对人体的骨髓造血功能有抑制作用，可引起再生障碍性贫血。甲砒霉素(thiamphenicol, TAP)是CAP的衍生物，抗菌作用机制和毒性与CAP相似，可抑制机体红细胞、白细胞和血小板生成，毒性程度较CAP轻。氟苯尼考(flornfenicol, FF)是TAP的单氟衍生物，作为CAP和TAP的替代药物，抗菌谱广，抗菌活性较强，不易产生耐药性，被用于畜牧业和水产养殖业，但具有一定的胚胎毒性，人体用药后还会出现胃肠道反应。氟苯尼考胺(flornfenicol amine, FFA)是FF在动物组织中主要的代谢产物，欧盟和我国已将其列为FF的残留检测标志物之一。GB 31650-2019《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》和欧盟(EU)NO 37/2010号法规中规定CAP是禁用药物；同时，规定了TAP和FF在家禽产蛋期禁用^[1]。

目前，测定CAP、FF、FFA和TAP检测方法主要有酶联免疫法、高效液相色谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱-质谱法等。其中，酶联免疫法存在假阳性的可能；高效液相色谱法受灵敏度的限制，检出限高，不能满足检测要求。气相色谱-质谱法前处理烦琐，不适宜用于大量样品快速筛查。液相色谱-质谱法不仅有非常高的灵敏度、精密度和准确度，同时非常适用于不易挥发的氯霉素类药物的检测。

2021年9月，农业农村部发布了GB 31658-2021动物源性食品中CAP、FF和FFA的测定 液相色谱-三重四极杆质谱法^[2-3]，该标准于2022年2月实施。本文建立了基于Thermo Scientific TSQ Fortis Plus三重四极杆串联质谱仪针对4种氯霉素类物质的检测方法。本方法灵敏度高、专属性强、稳定性好，可以满足标准方法的检测要求，可为此类化合物风险监控提供有效的技术支持。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Scientific Vanquish超高效液相色谱仪

Thermo Scientific TSQ最新三重四极杆质谱仪

2.1.2 甲醇（质谱纯，美国Thermo Fisher公司）；水（质谱纯，美国Thermo Fisher公司）；乙酸（质谱纯，美国Thermo Fisher公司）

2.2 化合物信息及溶液配制

2.2.1 化合物信息（表1）

表1 化合物信息

化合物名称	英文名称	简称	CAS编号	分子式	分子量
氯霉素	chloramphenicol	CAP	56-75-7	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	322.01
甲矾霉素	thiamphenicol	TAP	15318-45-3	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	355.00
氟苯尼考	florfenicol	FF	73231-34-2	C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	357.00
氟苯尼考胺	florfenicol amine	FFA	76639-93-5	C ₁₀ H ₁₄ FNO ₃ S	247.07

2.2.2 储备液：FFA用1mL超纯水溶解后再用甲醇制备100.00 mg/L的标准储备液，其余标准品直接用甲醇制备100.00mg/L的标准储备液。

2.2.3 系列标准曲线：以10%甲醇水作为溶剂，稀释成系列标准曲线0.01~1000 ng/mL（不同化合物标曲浓度点有所不同）。

2.3 色谱条件：

色谱柱：Thermo Scientific Hypersil GOLD aQ (100x2.1mm, 1.9 μ m)；

柱温：40℃；

进样量：5 μ L；

流动相：A为0.1% 乙酸水，B为甲醇，梯度洗脱程序（表2）

表2 梯度洗脱程序

时间	A%	B%	流速mL/min
0.00	90	10	0.3
0.50	90	10	0.3
2.00	5	95	0.3
3.50	5	95	0.3
3.60	90	10	0.3
5.00	90	10	0.3

2.4 质谱条件：

可加热电喷雾电离源（HESI），正、负切换模式；扫描方式：SRM；喷雾电压：3500（+）、3000V（-）；离子传输管温度：320℃；鞘气压力45arb；辅助气压力10 arb；离子源温度：400℃；碰撞气压力：2.0 mTorr；选择反应监测离子对信息见表3。

表3 质谱采集参数

Compound	Polarity	Precursor (m/z)	Product (m/z)	CE (V)	S-Lens (V)	SF(V)
CAP	Negative	320.983	152.133*	15.96	71	13.061
			257.05	10.08		
FF	Negative	355.957	118.967	30.64	53	31.02
			184.967*	17.39		
FFA	Positive	247.963	129.967*	24.55	76	21.224
			229.967	12.16		
TAP	Negative	353.967	184.967*	18.75	54	34.3
			269.967	10.01		

注：*为定量离子

3. 实验结果与讨论

3.1 灵敏度

采用上述仪器方法，4种氯霉素类药物均可获得了良好的色谱峰，图1为CAP、FF、FFA和TAP分别在LOQ浓度水平下的提取离子流图，各化合物灵敏度测试均满足国标检测要求。

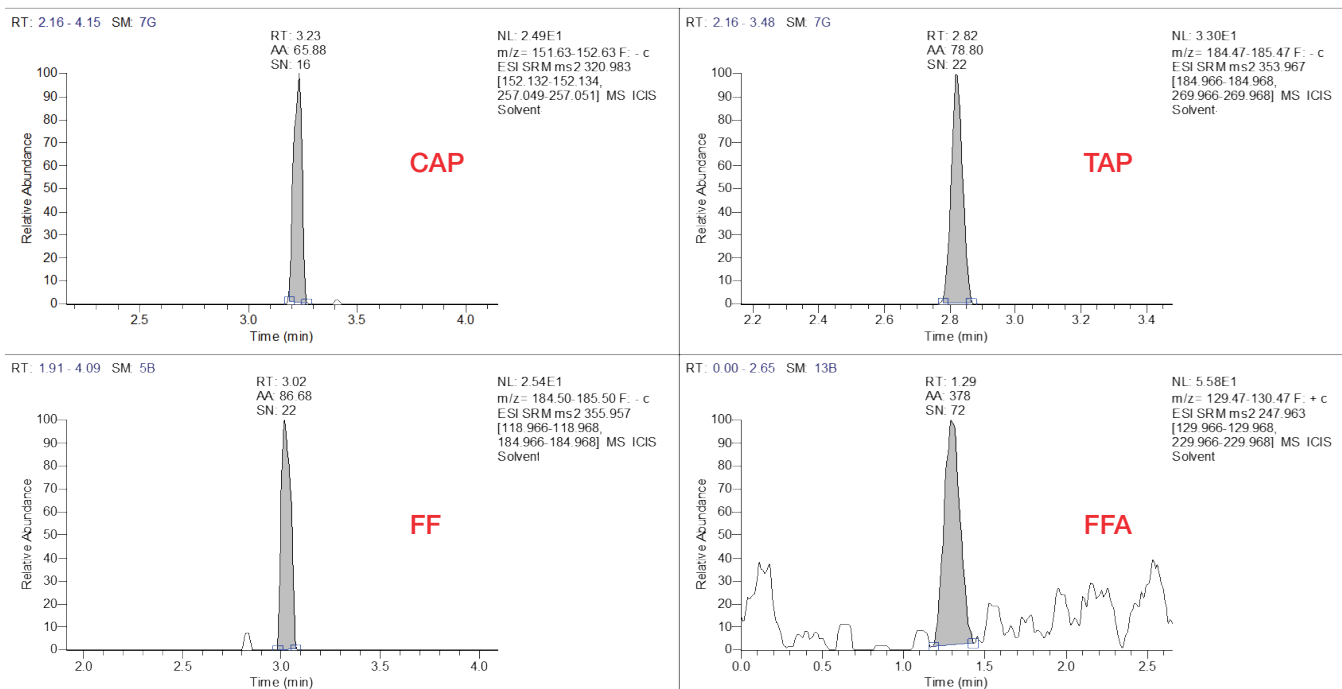


图1 4种氯霉素类药物提取离子流图

3.2 线性范围

将高浓度标准品逐级稀释，配制成系列标准曲线考察仪器线性范围。其线性范围、线性相关系数结果见表4，由表4可知：各化合物在一定浓度范围内均呈良好的线性关系。

表4 4种氯霉素类物质线性测试结果

化合物名称	简称	RT	线性范围	线性方程	R ²
氯霉素	CAP	3.21	0.01-100	Y=6.187e3X+7.001e0	0.9959
氟苯尼考	FF	3.01	0.02-200	Y=3.372e3X+1.344e1	0.9955
氟苯尼考胺	FFA	1.27	0.1-1000	Y=6.561e3X+8.443e1	0.9991
甲矾霉素	TAP	2.82	0.05-500	Y=1.155e3X-7.829e-1	0.9948

3.3 稳定性

采用上述仪器分析方法，将1ppb的混合标准工作溶液连续进样6针，考察仪器稳定性，实验结果见表5，4种氯霉素重复进样6针的峰面积相对标准偏差RSD均<2.4%，证明仪器稳定性良好。

表5 重现性

化合物简称	浓度 (ng/mL)	1	2	3	4	5	6	RSD%
CAP	1.0	7313	7398	7537	7533	7277	7401	1.46
FF	1.0	4485	4400	4350	4247	4424	4361	1.84
FFA	1.0	6418	6583	6635	6408	6572	6593	1.48
TAP	1.0	2194	2127	2159	2050	2101	2124	2.32

3.4 基质测试

制备猪肉空白基质，采用上述的仪器分析方法，考察4种氯霉素在基质中的灵敏度，图2为CAP、FF、FFA和TAP分别在基质加标LOQ浓度水平下的提取离子流图；各化合物灵敏度测试结果见表6，由表6可知：各化合物在基质中的灵敏度均满足国标检测要求；4种氯霉素在基质中加标1ppb连续进样6针，实验结果见表7，4种氯霉素基质加标重复进样6针的峰面积相对标准偏差RSD均<3.3%，证明仪器稳定性良好。

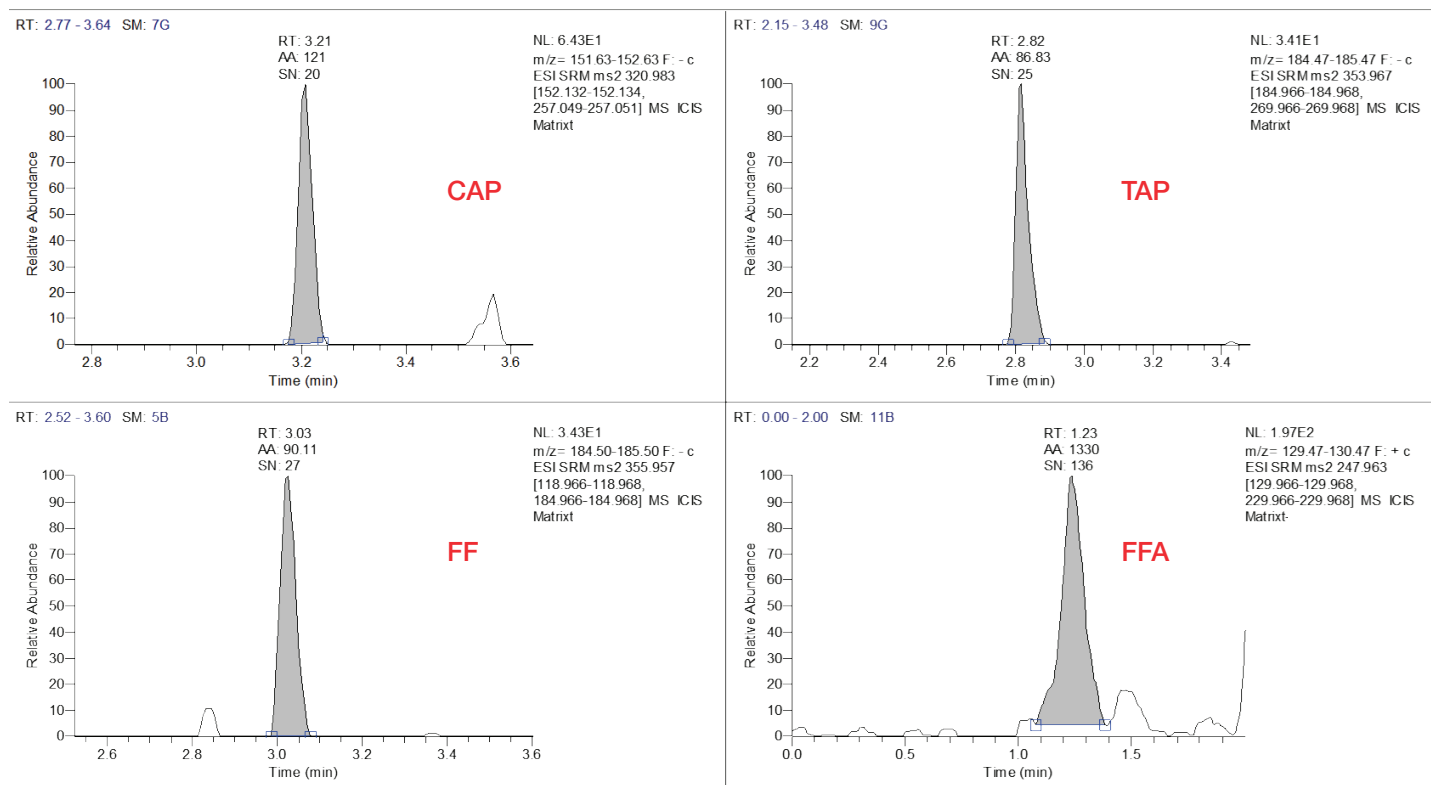


图2 猪肉空白基质中添加不同浓度的4种氯霉素提取离子流色谱图

表6 4种氯霉素类化合物国标限量要求及灵敏度

化合物名称	简称	MRL* (µg/kg)	国标LOQ* (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
氯霉素	CAP	禁用	0.2	<0.2
氟苯尼考	FF	100	10	<0.2
氟苯尼考胺	FFA	100	10	<0.2
甲矾霉素	TAP	50	/	<0.2

注：MRL来自GB 31650-2019所要求最严格食品基质的限量要求，LOQ来自GB 31658-2021所规定的检测要求。

表7 基质加标重现性

化合物简称	浓度 (ng/mL)	1	2	3	4	5	6	RSD%
CAP	1.0	7068	7174	7309	7209	7408	7428	1.94
FF	1.0	4639	4563	4773	4770	4815	4658	2.06
FFA	1.0	6139	6317	6429	6483	6425	6395	1.94
TAP	1.0	1830	1906	1865	1916	2013	1915	3.24

3.5 软件TraceFinder进行数据处理

本文所有数据处理工作均由TraceFinder完成。TraceFinder应用程序为高通量定量分析提供面向工作流程的方法，用于特定的数据分析、仪器控制和方法开发等。可自动快速创建方法、加载样品、自动生成数据、手动查看和编辑结果，并完成数据查看和报告处理。TraceFinder提供改善的离子比率计算结果、并可以指定离子比率计算方式。TraceFinder应用程序能够导出.xml和.csv格式的SRM参数，这些文件随后可导入到其它应用程序或仪器方法中。

4. 总结

本文建立了赛默飞最新三重四极杆液质联用仪TSQ Fortis Plus分析4种氯霉素类化合物的检测方法。由实验结果可以看出，该方法不仅具有优异的灵敏度和线性范围，同时具备良好的重现性，完全符合国标检测要求。本方法可用于动物源性食品安全监控中有关4种氯霉素类化合物的分析检测。

5. 参考文献

- [1]. GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留量
- [2]. GB 31658.2-2021 食品安全国家标准 动物源性食品中氯霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
- [3]. GB 31658.2-2021 食品安全国家标准 动物源性食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量的测定 液相色谱-串联质谱法



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC