



## 应用通讯#704422

# 利用EVOQ Qube对牛奶中的氯霉素定量分析

### 摘要

建立了高效液相色谱串联质谱法测定牛奶中氯霉素浓度的方法。方法采用3通道MRM模式对氯霉素进行检测，一个通道用于定性，两个用于定量。分析方法的定量下限为0.02 ppb，定量线性范围为0.02 ppb-1.0 ppb， $R^2=0.9980$ ，权重为1/X。

### 前言

氯霉素(CAP)是一种广谱抗生素，最早使用于1949年。氯霉素虽然价格便宜,但因其副作用大,故已不作为治疗人类疾病的一线药物<sup>[2,3]</sup>。据报道,氯霉素能抑制骨髓细胞的生长,导致非再生性贫血和可能致命的再生障碍性贫血。此外,氯霉素是一种有效的非竞争性的微粒体酶抑制剂,能影响其它药物的吸收代谢。

氯霉素也可当兽药应用,但由于它对人类有许多潜在的副作用,所以在许多国家被限制或禁止使用。欧盟2003/181/EC决议规定在牛奶中被检出任何水平的氯霉素都是不允许的,同时规定检测氯霉素的方法必须符合或优于0.3 ppb的最低要求<sup>[4]</sup>。

## 实验

### 样品制备

氯霉素 (CAP), 纯度98%, 购自Sigma-Aldrich; 氯霉素-d5 (d5-CAP), (溶于乙腈, 浓度为100 µg/mL), 由剑桥大学同位素实验室提供。

空白牛奶基质根据Cronly等人报道的方法制得<sup>[5]</sup>: 在2 mL的离心管中加0.5 g全奶(购买于当地超市)和1 mL乙腈, 混合, 涡旋30 s; 再加入0.25 g NaCl, 振荡30 s, 然后在12000 转速下离心10 min, 上层有机相转移至另外一个离心管并置于Eppendorf真空干燥器内45 °C干燥。最后用0.5 mL的初始流动相(甲醇/水=10/90)复溶, 并用0.2 µm PVDF 过滤针过滤, 最终得空白牛奶基质。不同浓度的氯霉素和0.3 ppb (在基质中)的内标d5-CAP逐个加入到一定量空白牛奶基质中。

### 色谱条件:

- 色谱柱: ACE® C18, 50x2.1 mm, 3 µm
- 进样体积: 10 µL
- 流速: 0.5 mL/min
- 流动相A: 水
- 流动相B: 甲醇
- 梯度:
  - 0.00 min 10% B
  - 0.05 min 10% B
  - 2.50 min 95% B
  - 3.00 min 95% B
  - 3.10 min 10% B
  - 4.50 min 10% B

### 质谱条件:

- 真空隔层加热电喷雾源 (VIP-HESI) 加热温度: 400 °C
- 加热气体流量: 70 unit
- 雾化气流量: 90 unit
- 锥孔气温度: 250 °C
- 锥孔气流量: 10 unit
- 喷雾电压: -4500 v
- 主动排空: 开
- 标准分辨率
- 转换时间: 100 ms
- CAP 和d5-CAP 检测离子:
  - m/z 320.9>152 (CE:12 v) 定量
  - m/z 320.9>257 (CE: 8 v) 定性
  - m/z 320.9>194 (CE:10 v) 定性
  - m/z 326>152 (CE:12 v) 内标

## 实验结果

图2显示的是空白牛奶基质中加入最低浓度0.02 ppb CAP (上样量为200 fg) 的离子流色谱图。在这色谱图中可以观察到有一个微弱的背景信号干扰。然而, 这基质干扰峰响应值远小于最低浓度信号强度, 0.02 ppb的CAP可以清晰的检测到。图3显示的是0.02 ppb CAP (上样量为200 fg) 在空白牛奶基质中三个选择离子监测离子通道MRM的色谱图, 它们的S/N都大于10。

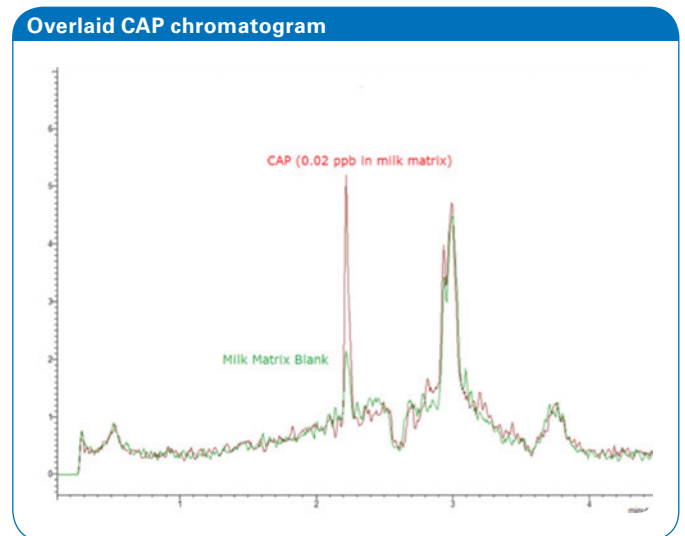


图1: 空白牛奶基质和空白牛奶基质中加入0.02ppb CAP后, 3个MRMs通道的总离子流图。

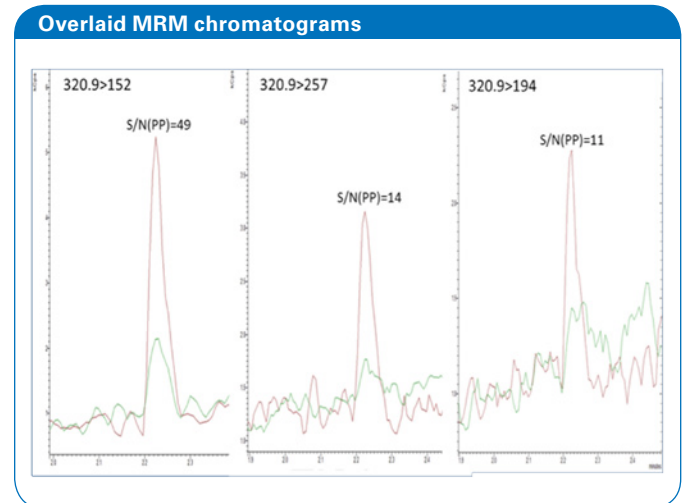


图2: 空白牛奶基质MRM的色谱图 (蓝色); 空白牛奶基质中加入0.02 ppb 氯霉素后, MRM色谱图 (红色)

## 定性:

2002/657/EC号决议详细说明了氯霉素确证的几个参数<sup>[6]</sup>。氯霉素是被禁止的A类成分, 至少需要4个鉴定分才能对它进行确认。因此方法至少需要2个MRM通道, 其中母离子为1.0个鉴定分, 每个子离子各为1.5鉴定分。每个MRM的离子丰度比必须在一定的允许范围内符合一些已通过认证的文献数据。在定性MRMs中, 离子丰度比应该在最强子离子强度的20%-50%之间, 允许误差范围为±25%。在我们这个实验中, 化合物在0.05 ppb-1 ppb浓度范围内, 离子丰度比的误差始终小于10%。图3所示的是为0.05 ppb时的离子丰度比。需要注意的是, 0.02 ppb时, 离子丰度比超过了范围, 这是由于基质效应引起的。图4所示为0.02 ppb浓度时, 定量离子通道MRM (320.9>152)的离子流图。

## 定量

6个不同浓度的氯霉素标准品加入到一定量的空白牛奶基质中, 得到浓度范围为0.02 ppb-1.0 ppb的标准曲线 (图5)。结果表明线性良好,  $R=0.9980$  (权重系数为 $1/X$ )。

## 结论

建立了一种简单, 快速测定牛奶中氯霉素浓度的高效液相串联质谱法。利用EVOQ Qube可以对牛奶基质中浓度低至0.02 ppb的氯霉素进行准确定性和定量分析。

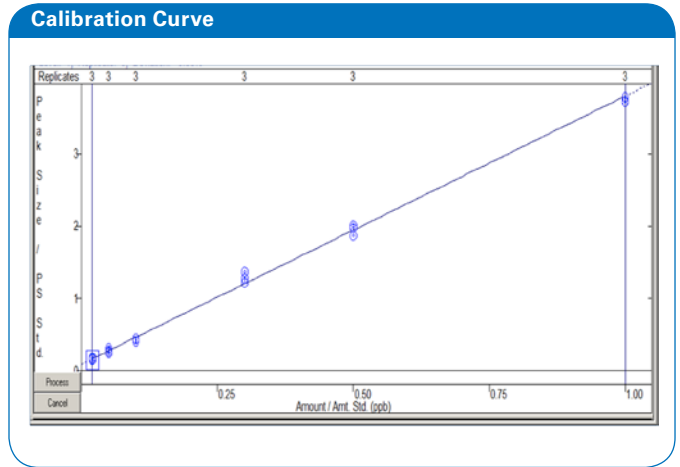


图4: 牛奶基质中氯霉素(320.9>152)的标准曲线, 线性范围为0.2 ppb-1.0 ppb (6个浓度分别为: 0.02, 0.05, 0.10, 0.3, 0.5, 1.0 ppb)。

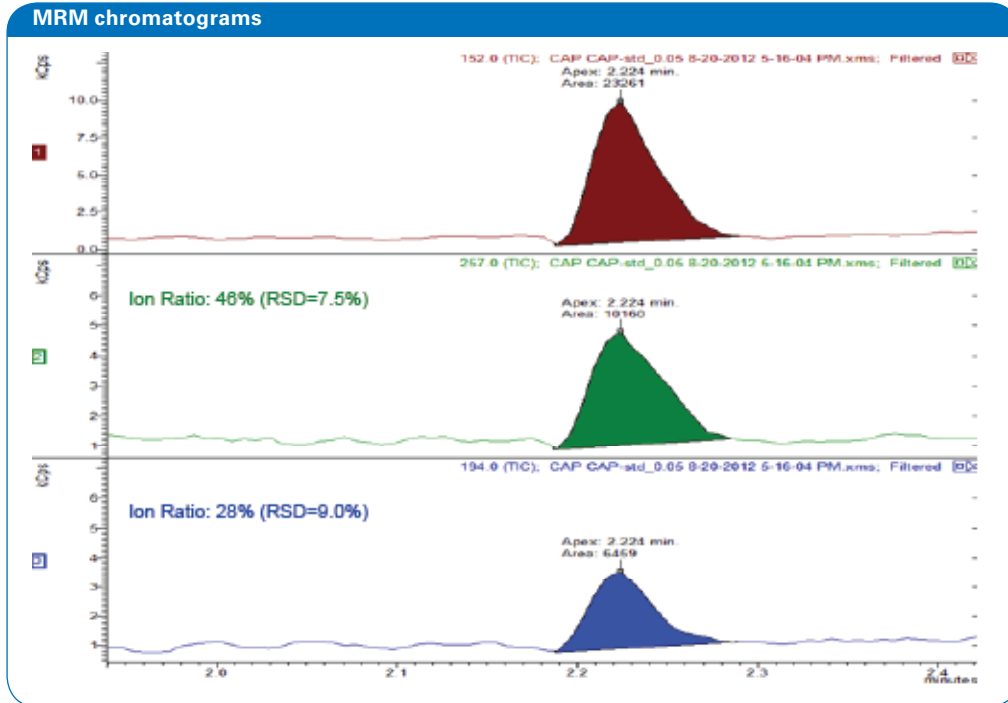


图3: 牛奶基质中0.05 ppb 氯霉素 (柱上500 fg) 的离子丰度比及其RSD (n=3)

## 作者

Kefei Wang, Helen (Qingyu) Sun

## 参考文献

- (1) T.E. Woodward. Chloromycetin and Aureomycin: Therapeutic Results. *Ann Intern Med.* 1949, 31, 53-82
- (2) H.J. Balbi. Chloramphenicol: A Review. *Pediatrics in Review* 2004, 25, 284-289
- (3) Chloramphenicol and Congeners. *The Merck Veterinary Manual for Veterinary Professionals* [Online]. last full review/revision March 2012.  
[http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/antibacterial\\_agents/chloramphenicol\\_and%2%A0congeners.html](http://www.merckmanuals.com/vet/pharmacology/antibacterial_agents/chloramphenicol_and%2%A0congeners.html)
- (4) M. Cronly, et al. *Food Additives and Contaminants.* Vol 27, 9, 2010, pp 1233-46.

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.  
本产品仅用于研究，不能用于诊断过程

### **Bruker Daltonik GmbH**

Bremen · Germany  
Phone +49 (0)421-2205-0  
Fax +49 (0)421-2205-103  
sales@bdal.de

[www.bruker.com/ms](http://www.bruker.com/ms)

### **Bruker Daltonics Inc.**

Billerica, MA · USA  
Phone +1 (978) 663-3660  
Fax +1 (978) 667-5993  
ms-sales@bdal.com

### **Bruker Daltonics Inc.**

Fremont, CA · USA  
Phone +1 (510) 683-4300  
Fax +1 (510) 490-6586  
ms-sales@bdal.com