液相色谱-串联质谱法检测蜂蛹粉中链霉素及双氢链霉素的残留量

殷 耀[1*], 袁 娟[1], 彭 镇[1], 宁晓盼[1], 申金雪[1], 刘 艳[1], 丁 涛[1], 王茂华[2], 唐茂芝[2]

(1. 南京海关动植物与食品检测中心, 南京 210019;
2. 国家认证认可监督管理委员会认证认可技术研究所, 北京 100020)

摘 要: 目的 建立全自动固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定蜂蛹粉中链霉素及双氢链霉素含量的分析方法。**方法** 样品经磷酸缓冲溶液提取, 高氯酸沉淀蛋白后, 采用 waters HLB 固相萃取小柱净化, 以 Protemix WCX 色谱柱进行色谱分离, 多反应监测模式测定, 外标法定量。**结果** 结果表明 2 种化合物在 10~200 μg/kg 的浓度范围内线性关系良好, 检出限为 5 μg/kg, 定量限为 10 μg/kg。空白蜂蛹粉样品的 3 水平加标回收率为 80.6%~93.5%, 相对标准偏差为 4.7%~8.8%。**结论** 该方法适用于蜂蛹粉中链霉素和双氢链霉素残留的检测。

关键词: 蜂蛹粉; 固相萃取; 链霉素; 双氢链霉素; 液相色谱-串联质谱法

Detemination of streptomycin and dyhydrostreptomycin in bee pupa powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YIN Yao[1*], YUAN Juan[1], PENG Zhen[1], NING Xiao-Pan[1], SHEN Jin-Xue[1], LIU Yan[1], DING Tao[1], WANG Mao-Hua[2], TANG Mao-Zhi[2]

(1. *Animal*, *Plant and Food Inspection Center*, *Nanjing Customs*, *Nanjing* 210019, *China*;
2. *China Certification & Accreditation Institute*, *Beijing* 100020, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in bee pupa powder by automatic solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by phosphoric acid buffer solution, the protein was precipitated by perchloric acid, and purified by the small column of waters HLB solid phase extraction. The chromatographic separation was carried out by Protemix WCX chromatographic column, and the multi-reaction monitoring mode was used for determination. The external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The results showed that the 2 compounds had a good linear relationship in the range of 10–200 μg/kg, the limit of detection was 5 μg/kg, and the limit of quantitative was 10 μg/kg. The recoveries of blank bee pupa powder at 3 spiked levels were 80.6%–93.5%, with the relative standard deviations of 4.7%–8.8%. **Conclusion** This method is suitable for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in bee pupa powder.

KEY WORDS: bee pupa powder; solid phase extraction; streptomycin; dyhydrostreptomycin; liquid chromatography-

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFF0215605)

Fund: Supported by National Key R & D Program of China (2018TFF0215605)

***通讯作者:** 殷耀, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yinyao2300@126.com

***Corresponding author:** YIN Yao, Master, Engineer, Animal, Plant and Food Inspection Center, Nanjing Customs, No.39, Chuangzhi Road, Jianye District, Nanjing 210019, China. E-mail: yinyao2300@126.com

tandem mass spectrometry

1 引 言

蜂蛹粉富含游离氨基酸、维生素 A 和维生素 D 等营养成分, 是理想的保健食品。我国四川、安徽等地开发出了具有特色的蜂蛹产品, 此类产品的国内外需求量有逐渐增大的趋势[1,2], 对其质量的要求也在不断的提高。

链霉素是一类广谱抗生素, 会造成过敏性休克和听觉神经损伤, 还具有潜在的致畸、致癌和致突变作用[3−5]。由于其对“污仔病”(蜜蜂中常见疫病之一)有很好的疗效而常常被蜂农使用[6], 加上没有很好的控制休药期, 使得链霉素很可能在蜜蜂体内蓄积, 增加了食用有链霉素药物残留的蜂产品的风险。

国内外标准和文献中对链霉素的检测针对的基质包括蜂蜜、蜂王浆、奶粉、牛奶等[7,8], 但对于蜂蛹粉中的链霉素的检测方法相关的报道较少。目前针对链霉素及双氢链霉素的检测方法主要是酶联免疫法[9]、微生物法[10]、气相色谱-质谱法[11]、液相色谱法[12−14]和液相色谱-串联质谱法[15]。酶联免疫法出现假阳性几率比较高, 所以常用来初筛。微生物法检测时间长, 精密度和灵敏度低。链霉素极性较强, 不易挥发, 气相色谱法中需要衍生化。由于链霉素分子结构中缺少发色基团和荧光基团, 液相色谱法需要进行柱前和柱后衍生,GB18932.3-2002 还需要用两根固相萃取柱对样品净化。常用的液相色谱串联质谱法, 需要使用七氟丁酸作为离子对试剂, 可能造成仪器设备的损伤。

本文采用磷酸缓冲溶液提取蜂蛹粉中的链霉素及双氢链霉素, 经固相萃取小柱净化, 最后由液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测, 方法简单快捷, 回收率稳定, 对仪器设备无损伤, 能满足日常检测需要, 为蜂蛹粉中链霉素类药物残留检测提供了技术保障。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Thermo TSQ Quantiva 液相色谱-串联三重四极杆质谱联用仪, 配电喷雾离子源(ESI)(美国 Thermo 公司); 2-16K 离心机(美国 Sigma 公司); AutoVap S60 氮吹仪(美国 Organomation 公司); Option Q15 超纯水仪(美国 LEGA 公司); Preval SPE 304+全自动固相萃取装置(北京普立泰科公司); OASIS HLB 固相萃取小柱(60 mg/3 mL, 美国 Waters 公司)。

链霉素、双氢链霉素(纯度≥99.0%, 美国 ISO Science 公司); 甲醇、磷酸钠、磷酸(分析纯, 南京化学试剂公司); 甲醇(色谱纯, 美国 Merck 公司); 甲酸、醋酸铵(色谱纯, 德国 CNW 公司); 庚烷磺酸钠(分析纯, 美国 REGIS 公司)。

5% (*V*/*V*)高氯酸溶液: 准确量取 50 mL 高氯酸, 加入至 1000 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。

2.2 标准溶液的配制

分别准确称取链霉素、双氢链霉素标准品各 10 mg, 用水溶解后转移至 10 mL 容量瓶中, 定容配制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的储备液。于冷冻条件下保存。

2.3 溶液的配制

磷酸盐缓冲溶液: 准确称取 5.05 g 庚烷磺酸钠、2.05 g 磷酸钠、加入 2.5 mL 磷酸, 用水定容至 500 mL。

0.5%(*V*/*V*)甲酸溶液: 准确量取 2.5 mL 甲酸, 转移至 500 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。

10 mmol/L 醋酸铵溶液: 准确称取 0.435 g 醋酸铵, 用水溶解后转移至 500 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度。

2.4 样品前处理

称取蜂蛹粉样品 1.00 g 于 50 mL 离心管中, 加入磷酸缓冲液 20 mL, 5 mL 5%高氯酸溶液, 充分涡旋, 超声 10 min, 于 8000 r/min 高速离心 5 min, 取上清液过滤, 收集至 50 mL 离心管中, 采用 HLB 小柱, 全自动固相萃取仪净化(见表 1), 收集洗脱液置 10 mL 试管中, 于 40 ℃下氮气吹干, 加入 1.0 mL 醋酸铵(10 mmol/L)溶液溶解残渣, 过 0.45 μm 残渣水相滤膜, 供 LC-MS/MS 检测。

表 1 全自动固相萃取程序

Table 1 Automatic solid phase extraction procedure

步骤	试剂	体积/mL	流速/(mL/min)	干燥体积/mL
活化	甲醇	5	3	0
	水	5	3	5
上样	样液	30	2	10
淋洗	磷酸	5	3	10
洗脱	甲醇	5	2	10

2.5 色谱及质谱条件

色谱条件: Protemix WCX 柱((100 mm×2.1 mm, 5 μm); 柱温: 25 ℃; 流速: 0.35 mL/min; 进样量: 25 mL; 流动相及梯度洗脱程序见表 2。

质谱条件: ESI 正离子扫描方式; 毛细管温度: 330 ℃; 喷雾电压: 3000 kV; 鞘气压力: 0.3 MPa, 辅助气流速: 5 L/min。链霉素、双氢链霉素质谱分析参数见表 3。

表 2　梯度洗脱程序
Table 2　Gradient elution program

时间/min	水	0.5%甲酸/%	10 mmol/L 醋酸铵/%	甲醇/%	流速/(mL/min)
0	0	0	80	20	0.35
1	0	0	80	20	0.35
2	0	0	0	100	0.35
2.5	0	0	0	100	0.35
2.6	0	80	0	20	0.35
3.5	0	80	0	20	0.35
3.6	90	0	0	10	0.35
4	90	0	0	10	0.35
4.1	0	0	80	20	0.35
7	0	0	80	20	0.35

表 3　链霉素和双氢链霉素的质谱分析参数
Table 3　Mass spectrometry parameters of streptomycin and dyhydrostreptomycin

化合物	离子信息	母离子(*m*/z)	子离子(*m*/z)	
			1	2
链霉素	[M+H]+	582.3	263.2*	246.1
双氢链霉素	[M+H]+	584.3	263.3*	246.1

注: *为定量离子。

3　结果与分析

3.1　提取试剂的选择

蜂蛹粉中蛋白质含量较高, 需沉淀蛋白质, 将目标物释放出来。本研究选择了具有蛋白沉淀效果的高氯酸、三氯乙酸和三氯甲烷作为沉淀剂, 比较了 3 种沉淀剂的蛋白沉淀效果, 结果发现三氯乙酸沉淀过的样液仍然较浑浊, 会造成固相萃取小柱的堵塞; 三氯甲烷沉淀出来的样液虽然较清澈, 但是由于其毒性较大, 也没有采用; 高氯酸溶液可以很好地沉淀蜂蛹粉样品中的蛋白质, 样液较清澈, 不会堵塞净化小柱, 故本研究采用高氯酸溶液作为沉淀剂。

比较了体积分数 1%、5%、10%(*V*/*V*)的高氯酸溶液提取效果, 1%高氯酸溶液蛋白沉淀效果差, 提取液离心后仍然较浑浊, 5%、10%的高氯酸溶液可以获得比较清澈的溶液, 但考虑到后续过固相萃取小柱需要控制 pH, 故本文选择 5%的高氯酸作为蛋白沉淀剂。

3.2　净化小柱的选择

本研究比较了了 HLB 和 C_{18} 固相萃取小柱对链霉素及双氢链霉素的富集净化效果, 见表 4。结果表明: HLB 小柱富集净化效果更好, 因此选择 HLB 小柱作为净化用小柱。

表 4　2 种固相萃取小柱净化蜂蛹粉的回收率
Table 4　Recoveries rate of 2 kinds of solid phase extraction cartridges for purification of bee powder

固相萃取小柱	回收率/%	
	链霉素	双氢链霉素
C_{18}	78	77
HLB	90	89

3.3　色谱柱的选择

链霉素、双氢链霉素均有较大的极性, 在反相 C_{18} 色谱柱上几乎不保留。使用亲水型色谱柱如 HILIC, 或采用庚烷磺酸钠作为离子对试剂增加链霉素在反相 C_{18} 色谱柱上的保留。庚烷磺酸钠在质谱上会抑制质谱的信号, 故本研究未选择。本文重点研究了亲水性 BEH HILIC (2.1 mm×

100 mm, 1.7 μm)色谱柱和弱阴离子 Protemix WCX(100 mm×2.1 mm, 5 μm)色谱柱在各自优化的色谱条件下对链霉素及双氢链霉素的保留情况。结果表明在 BEH HILIC 柱上的保留时间是 4.1 min, 有很好的保留性能, 但是实际检测中发现 HILIC 柱在承受 500 针左右的样品分析之后性能有极大程度的下降, 必须更换新的色谱柱才能重新进行检测。Protemix WCX 柱上的保留时间是 3.4 min, 也可以满足分析的要求, 并且可以承受近 2500 针样品分析的强度, 大大节省了实验成本, 因此本研究选择了 Protemix WCX 作为分析柱使用。

3.4 空白基质加标色谱图

以空白蜂蛹粉样品作为空白基质加标 100 ng/g, 按照 2.4 节处理方法进行处理分析, 得到的空白基质加标色谱图见图 1。

3.5 线性范围、检出限和定量限

以空白蜂蛹粉样品作为空白基质, 按照 2.4 节处理方法制作浓度为(10、20、50、100、200 μg/L)的链霉素和双氢链霉素的标准工作曲线, 以定量离子的峰面积(*Y*)作为纵坐标, 以相应质量浓度(*X*, μg/L)作为横坐标, 计算结果表明链霉素、双氢链霉素在 10~200 μg/L 浓度范围内呈良好的线性关系, 回归方程分别为 Y=188.32X+7421.91(r^2=0.9956); Y=8596.36X+4951.49(r^2=0.9923)。按 3 倍信噪比对应的加标水平确定检出限为 5 μg/kg, 10 倍信噪比对应的加标水平确定定量限为 10 μg/kg。

3.6 准确度和精密度

以空白蜂蛹粉样品加标的回收率表示方法的准确度, 以回收率的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示方法的精密度。向空白蜂蛹粉样品中加入链霉素和双氢链霉素标准溶液, 加标水平分别为 10、20、50 μg/kg, 每个加标水平按照 2.4 节方法处理, 其回收率和相对偏差结果见表 5。链霉素和双氢链霉素的平均回收率为 80.6%~93.5%, 相对标准偏差为 4.7%~8.8%, 精密度良好。

3.7 实际样品检测

用本文建立的检测方法对送检的 26 批次蜂蛹粉样品进行检测, 有 1 批次蜂蛹粉样品检出链霉素阳性, 其他均未检出链霉素和双氢链霉素。

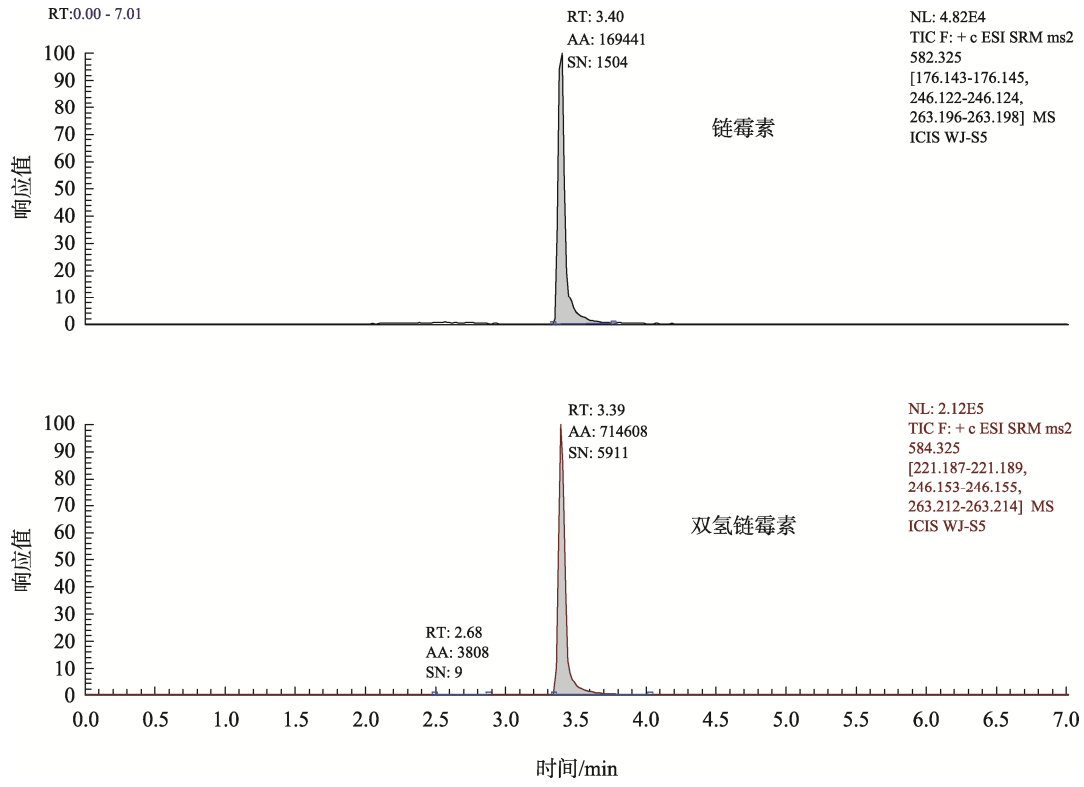

图 1 空白基质添加 100 ng/g 标准品色谱图

Fig.1 Chromatography of the blank sample with standard at 100 ng/g

表 5　空白蜂蛹粉中链霉素和双氢链霉素的加标回收试验结果(n=6)

Table 5　Results of spiked recovery test of streptomycin and dihydrostreptomycin in blank bee powder (n=6)

化合物	10 μg/kg		20 μg/kg		50 μg/kg	
	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%	回收率/%	相对标准偏差/%
链霉素 STR	82.8	4.73	83.9	7.08	92.2	5.96
双氢链霉素	80.6	8.83	86.2	7.41	93.5	5.51

4　结　论

本研究采用全自动固相萃取-液相色谱-串联质谱法建立了蜂蛹粉中链霉素和双氢链霉素残留量的检测方法。本方法用蛋白沉淀剂和固相萃取技术对样品进行充分净化，利用离子交换柱增加了链霉素类化合物的色谱保留，通过三重四极杆质谱进行准确的定性和定量检测。经实际样品检测的考察，该方法稳定，准确，适合蜂蛹粉中链霉素及双氢链霉素的检测。

参考文献

[1] 兰凤明, 姚真良. 长白山区雄蜂蛹的生产要点[J]. 中国蜂业, 2018, (3): 28.
Lan FM, Yao ZL. Key points of producing drone pupae in Changbai mountain area [J]. Apicul China, 2018, (3): 28.

[2] 颜志立. 雄蜂蛹生产调查[J]. 蜂蜜杂志, 2018, (7): 23–24.
Yan ZL. Investigation of drone pupa production [J]. J Bee, 2018, (7): 23–24.

[3] 杨岸军, 耿玉兴. 雄蜂蛹的生产意义和方法[J]. 中国蜂业, 2017, (11): 28.
Yang AJ, Geng YX. The meaning and method of producing drone pupa [J]. Apicult China, 2017, (11): 28.

[4] 胡昌勤. 链霉素的免疫学[J]. 国外医药抗生素分册, 1989, 10(1): 39-42.
Hu CQ. Immunology of streptomycin [J]. World Notes Antibiot, 1989, 10(1): 39–42.

[5] 薛晓锋, 吴黎明, 陈兰珍, 等. 蜂王浆中链霉素残留的提取、净化及液相色谱的测定方法研究[J]. 食品科学, 2008, (11): 487–489.
Xue XF, Wu LM, Chen LZ, *et al*. Study on extraction, purification and chromatographic analysis of streptomycin residuce in royal jelly [J]. Food Sci, 2008, (11): 487–489.

[6] 杨慧元, 杜玥, 徐伟东. HPLC-MS/MS 测定蜂蜜中氨基糖苷类药物残留[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(8): 751.
Yang HY, Du Y, Xu WD. Residue determination of aminoglycosides in honey by HPLC-MS/MS [J]. Chin J Modern Appl Pharm, 2011, 28 (8): 751.

[7] GB/T 22995-2008 蜂蜜中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 22995-2008 Detemination of streptomycin, dihydrostreptomycin and kanamycin residues in honey-LC-MS-MS method [S].

[8] GB/T 22969-2008 奶粉和牛奶中链霉素、双氢链霉素和卡那霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 22969-2008 Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin and kanamycin residues in milk and milk powder—LC-MS-MS method [S].

[9] Ulrike K. Lebensmitte lchemie [M]. Germny: WILEY-VCH, 1996.

[10] 杨智洪, 杜根成, 乔宏兴, 等. 链霉素残留检测方法研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2005, (5): 2–3.
Yang HZ, Du GC, Qiao HX, *et al*. Progress in the detection of streptomycin residues [J]. Shanghai J Anim Husb Veter Med, 2005, (5): 2–3.

[11] 刘小兰, 万宇平, 刘文芳, 等. 链霉素和双氢链霉素检测技术研究进展[J]. 新疆畜牧业, 2011, (2): 21–23.
Liu XL, Wan YP, Liu WF, *et al*. Advances in the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin [J]. Xinjiang Anim Husb, 2011, (2): 21–23.

[12] 张晓燕, 徐锦忠, 沈崇钰, 等. 高效液相色谱柱后衍生法测定蜂王浆中的链霉素[J]. 色谱, 2008, 26(3): 395–397.
Zhang XY, Xu JZ, Shen CY, *et al*. Determination of streptomycin in royal jelly by HPLC after column derivatization [J]. Chin J Chromatogr, 2008, 26(3): 395–397.

[13] 姜莉, 赵守成. 柱后衍生-荧光检测高效液相色谱法快速测定鲜牛奶中链霉素残留量[J]. 分子科学学报, 2005, 21(1): 20–24.
Jiang L, Zhao SC. Rapid determination of streptomycin residues in fresh milk by post-column derivatization and fluorescence detection [J]. J Molecul Sci, 2005, 21(1): 20–24.

[14] GB/T 18932.3-2002 蜂蜜中链霉素残留量的测定 液相色谱法[S].
GB/T 18932.3-2002 Determination of streptomycin residue in honey-Liquid chromatography method [S].

[15] 万译文, 黄向荣, 伍远安, 等. 固相萃取净化-高效液相色谱串联质谱法测定鱼肉制品中链霉素、双氢链霉素、卡那霉素的含量[J]. 现代食品科技, 2018, 34(8): 261−265, 272.
Wan YW, Huang XR, Wu YA, *et al*. Determination of streptomycin, dihydrostreptomycin and kanamycin in fish products by solid phase extraction and high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Mod Food Sci Technol, 2018, 34(8): 261−265, 272.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

殷　耀, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: yinyao2300@126.com