

液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中的 林可霉素、甲硝唑和氯霉素

刘 伟^{1,2}, 李丽萍^{1,2}, 张 楠^{1,2}, 范 赛^{1,2}, 吴国华^{1,2}, 赵 榕^{1,2*}

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 2. 北京市预防医学研究中心, 北京 100013)

摘 要: **目的** 建立液相色谱-串联质谱法同时检测蜂蜜中林可霉素、甲硝唑和氯霉素含量的分析方法。**方法** 蜂蜜样品加水溶解后, 过聚合物基质反相固相萃取柱净化, 经 5% 甲醇水溶液淋洗小柱, 再用 70% 甲醇水溶液洗脱目标化合物。采用 0.1% 甲酸水溶液和乙腈作为液相色谱流动相进行梯度洗脱。经多反应监测模式, 在正离子电离模式下测定甲硝唑和林可霉素, 在负离子电离模式下测定氯霉素。同位素稀释内标法定量。**结果** 本方法在 10 min 内通过质谱正负离子电离模式切换对林可霉素、甲硝唑和氯霉素进行同时测定。3 个目标化合物在 0.25、5 和 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平的回收率为 91.0%~107.1%, 相对标准偏差小于 11.9% ($n=6$), 林可霉素、甲硝唑和氯霉素的方法定量限分别为 0.20、0.14 和 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 本方法易于操作, 灵敏度和重现性良好, 适用于监督抽检和风险监测等大批量检测工作。

关键词: 蜂蜜; 林可霉素; 氯霉素; 甲硝唑; 液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of lincomycin, metronidazole and chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Wei^{1,2}, LI Li-Ping^{1,2}, ZHANG Nan^{1,2}, FAN Sai^{1,2}, WU Guo-Hua^{1,2}, ZHAO Rong^{1,2*}

(1. Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China; 2. Beijing Research Center for Preventive Medicine, Beijing 100013, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of lincomycin, metronidazole and chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Honey samples were diluted with water. And then a polymer reversed phase solid phase extraction cartridge was used to purify the sample. The cartridge was rinsed with 5% methanol aqueous solution and subsequently the target compounds were eluted by 70% methanol aqueous solution. The chromatography separation was carried out with a gradient elution program consisted of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile as mobile phases. With multiple reactions monitoring, lincomycin and metronidazole were identified under positive ionization mode, while chloramphenicol was analyzed under positive ionization mode. Quantitation was done by isotope dilution internal standard method. **Results** The simultaneous determination of lincomycin, metronidazole and chloramphenicol was

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600500)

Fund: Supported by National Key R&D Program of China (2017YFC1600500)

*通讯作者: 赵榕, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: lxyue@yeah.net

*Corresponding author: ZHAO Rong, Chief Technician, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China. E-mail: lxyue@yeah.net

achieved within 10 mins, using positive/negative switched ionization mode. The recoveries were ranged from 91.0% to 107.1% for the analytes with 3 spiked levels of 0.25, 5 and 25 $\mu\text{g/kg}$. The relative standard deviations were less than 11.9% ($n=6$), and the limits of quantitation for lincomycin, metronidazole and chloramphenicol were 0.20, 0.14 and 0.20 $\mu\text{g/kg}$, respectively. **Conclusion** The proposed method is easy, sensitive and well-reproduced, which is suitable for massive sample analysis such as risk monitoring.

KEY WORDS: honey; lincomycin; chloramphenicol; metronidazole; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

林可霉素(lincomycin)是一种林可胺类抗生素,在临床上有较为广泛的使用,尤其是针对患有青霉素过敏者的临床抗菌作用十分明显^[1,2]。但随着林可霉素临床应用的增多,呕吐、腹泻、恶心、白细胞、血小板减少以及皮疹等林可霉素引起的一系列不良反应报道也日渐增多^[3]。美洲幼虫腐臭病(American foulbrood disease, AFB)是蜂蜜幼虫感染产芽孢杆菌后引起的一种细菌性病害^[4]。目前 AFB 已经成为威胁我国养蜂业的主要病害之一。Okayama 等^[5]发现林可霉素对控制 AFB 有很好的效果,特别是 AFB 对土霉素产生耐药性后,林可霉素逐渐成为养蜂业控制 AFB 的首选。然而,我国目前尚没有批准林可霉素用于蜂蜜养殖。此外,世界上绝大多数国家和地区禁止将甲硝唑和氯霉素用于蜂蜜养殖^[6],虽然近年来对这类禁用物质的监管取得了一定的效果,但阳性样品仍偶有检出^[7,8]。

目前,蜂蜜中兽药残留和违禁物质的测定主要采用液相色谱-串联质谱法^[9],例如国家标准 GB/T 22941-2008《蜂蜜中林可霉素、红霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐霉素、交沙霉素、吉他霉素、竹桃霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[10]。而我国针对蜂蜜中氯霉素和甲硝唑,也是分别制定的国家标准检测方法^[11,12]。为了提高检测效率,包括本实验室在内的多个课题组均建立了同时测定蜂蜜中甲硝唑和氯霉素的方法^[13-15]。但林可霉素、甲硝唑和氯霉素同时测定的方法目前报道不多。

本研究采用固相萃取-液相色谱-串联质谱技术,同时测定蜂蜜中的林可霉素、甲硝唑和氯霉素,优化了前处理步骤,提高了检测的效率,为监督抽检和风险监测等大批量检测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

ACQUITY I CLASS 超高效液相色谱系统配有 Xevo TQD 三重四极质谱仪(美国 Waters 公司); N-EVAP™112 水浴氮气吹干仪(美国 Organomation 公司); Vortex-Genie 2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries 公司)。

林可霉素(lincomycin)、甲硝唑(metronidazole)和氯霉素(chloramphenicol)标准品(纯度均大于 98%, Dr.Ehrenstorfer 公司); 同位素稀释内标物林可霉素-d3(lincomycin-d3)、甲硝唑-d4(metronidazole-d4)和氯霉素-d5(chloramphenicol-d5)标准品(纯度均大于 98%, 加拿大 TRC 公司); 甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵(色谱纯, 迪马公司); WondaSep® HLB 固相萃取柱(200 mg/6 mL, 日本岛津公司); PFTE 型微孔滤膜(0.22 μm , 日本岛津公司); Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司)。

蜂蜜为市售样品。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

标准储备液: 分别称取适量的目标化合物及其对应的同位素稀释内标物标准品, 用甲醇溶解并定容, 制成浓度约为 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液, 于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

混合标准工作液: 分别准确移取适量上述标准储备液至 10 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇水溶液稀释至刻度, 制成浓度为 100 ng/mL 的混合标准工作液; 再分别准确移取适量同位素内标标准储备液至 10 mL 容量瓶中, 并用 50% 甲醇水溶液稀释至刻度, 制成浓度为 100 ng/mL 的混合内标工作液。

0.1% 甲酸水溶液: 取 1.0 mL 甲酸于 1000 mL 容量瓶中, 定容至 1000 mL。

2.2.2 样品前处理

称取 2 g 蜂蜜样品(精确至 0.001 g)于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 100 μL 浓度为 100 ng/mL 的混合内标工作液, 静置约 5 min 待内标物溶液与试样混匀。向离心管中加入 10 mL 超纯水, 涡旋混匀 1 min, 使蜂蜜样品完全溶于水。之后, 让试样溶液分批全部通过预先用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化与平衡过的 WondaSep® HLB 固相萃取柱。再用 5 mL 含 5% 甲醇水溶液淋洗小柱, 并通过减压抽干小柱中的水分, 采用 5 mL 含 70% 甲醇水溶液洗脱目标化合物。洗脱液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴中用氮气吹至近干, 加入 1 mL 含 50% 甲醇水溶液溶解残渣, 过 0.22 μm 滤膜, 待液相色谱-串联质谱测定。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

色谱柱为 Shim-pack GIST C₁₈ 柱(2.1 mm $\times$ 100 mm,

2 μm , 日本岛津公司); 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 流动相流速为 0.3 mL/min; 柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积为 5 μL 。液相色谱梯度洗脱程序: 0~0.1 min, 10 % A; 0.1~6 min, 10 %~100 % A; 6~6.5 min, 100 % A; 6.5~7 min, 100 %~10 % A; 7~10 min, 10 % A。

(2) 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(ESI)正负离子切换电离模式; 离子源温度: 150 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压: 3.0 V; 脱溶剂气温度: 550 $^{\circ}\text{C}$; 脱溶剂气流量: 900 L/hr; 碰撞气: 氩气; 扫描模式: 多反应监测(multiple reactions monitoring, MRM); 其他质谱采集参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

本研究中的目标化合物在质谱测定时需要正、负离子扫描模式切换进行。因此, 色谱条件优化的目的除了使各目标化合物的色谱峰形与响应值达到较好的状态, 还需要考虑各目标化合物的保留时间, 以确保所有目标化合物均在质谱切换扫描模式前后的稳定状态下出峰, 保证方法的稳定性和灵敏度。

选择实验室常用的流动相组合进行条件优化。有机相包括甲醇、乙腈, 水相包括水、0.1%甲酸水溶液、添加 5 mmol/L 乙酸铵的 0.1%甲酸水溶液。在考察了 6 种流动相组合后发现: 在 C_{18} 色谱柱上, 乙腈比甲醇有更强的洗脱能力, 各目标化合物的出峰时间提前; 水相无添加酸或盐的条件下, 林可霉素峰形较差, 无法准确定量, 而氯霉素的响应值最高; 水相中添加了甲酸或乙酸铵后, 目标化合物峰形较好,

但无机盐(乙酸铵)对目标化合物离子化有抑制作用, 因此目标物的响应值降低比较明显, 流动相体系中的酸也使氯霉素的响应值有明显降低。

综合以上情况, 本方法选择乙腈-0.1%甲酸水溶液流动相体系。浓度为 10 ng/mL 的标准溶液总离子流图见图 1。

3.2 前处理条件优化

参考本实验室之前建立的蜂蜜中氯霉素和甲硝唑的测定方法, 及文献中有关林可霉素的测定方法, 选择反相聚合物基质的 WondaSep[®] HLB 固相萃取柱对目标化合物进行富集和净化。

首先对上柱溶液进行考察。本实验室之前建立的方法中, 蜂蜜加水稀释后, 采用乙酸乙酯萃取氯霉素和甲硝唑, 再经固相萃取处理的效果好于直接将蜂蜜水上柱处理^[13]。然而, 由于实验过程中各目标化合物均有相对应的同位素内标物, 这在一定程度上克服了个别目标物绝对回收率偏低的影响。同时, 减少乙酸乙酯提取步骤, 即可减少有机试剂的使用, 降低对环境的影响, 又节省了时间, 提高了实验效率。因此, 在本方法中采用了蜂蜜加水稀释后直接上样的方式。

然后, 对固相萃取的淋洗液和洗脱液进行考察。配制含不同体积分数甲醇水溶液作为淋洗液, 根据各目标化合物的绝对回收率制作曲线。如图 2 所示, 当淋洗液中甲醇含量大于 10%时, 甲硝唑和林可霉素明显被洗脱。因此本方法中固相萃取淋洗液为 5%甲醇水溶液。同样由图 2 可知, 当甲醇含量大于 60%时, 3 个目标化合物可完全被洗脱下来, 因此, 本方法中固相萃取洗脱液为 70%甲醇水溶液。

表 1 目标化合物的质谱采集参数与保留时间
Table 1 Collection parameters and retention time of target compounds by mass spectrometry

化合物	离子化模式	母离子/(m/z)	锥孔电压/V	子离子/(m/z)	碰撞能量/V	保留时间/min
林可霉素	ESI+	407.2	44	125.9*	30	1.88
				359.1	20	
林可霉素-d3	ESI+	410.2	42	128.9	28	1.88
甲硝唑	ESI+	171.8	30	127.8*	14	1.86
				81.8	26	
甲硝唑-d4	ESI+	176.0	32	127.8	14	1.86
氯霉素	ESI-	320.8	36	151.7*	18	3.24
				256.9	12	
氯霉素-d5	ESI-	325.0	34	155.8	14	3.24

注: *为定量离子。

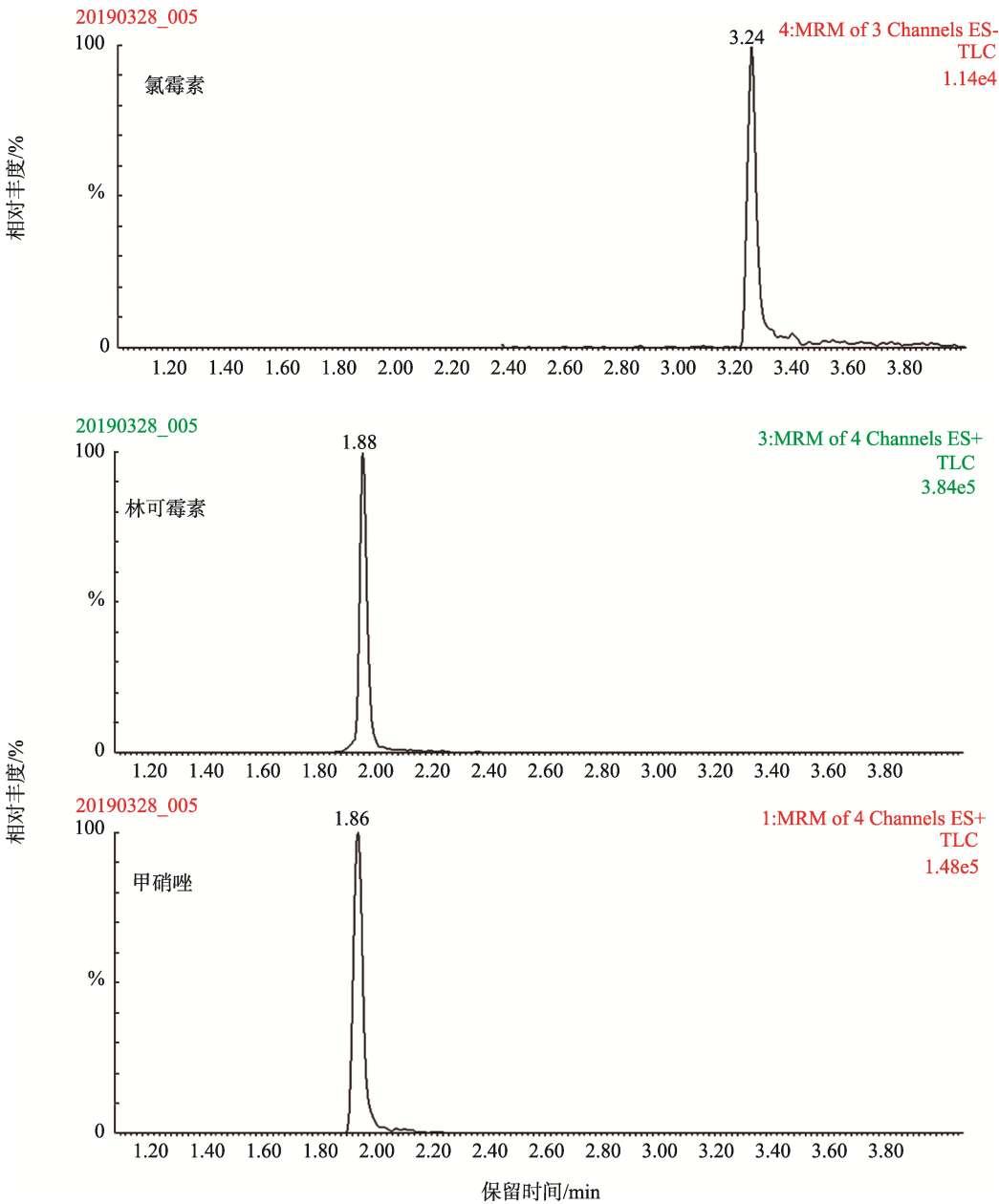


图 1 标准溶液总离子流图(10 ng/mL)

Fig. 1 Total ion chromatogram of standards mixture (10 ng/mL)

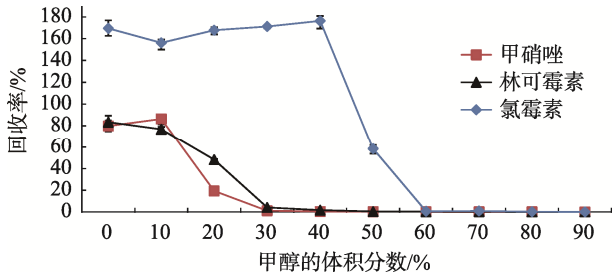


图 2 固相萃取洗脱曲线(n=3)

Fig. 2 Elute solution of solid phase extraction (n=3)

3.3 方法的线性范围、检出限、定量限、回收率及精密度

以目标物的质量浓度为横坐标,以目标物和内标物的峰面积之比为纵坐标制作基质匹配标准曲线得到线性方程。结果表明,3种目标物在0.50~50 ng/mL范围内,在选定的仪器条件下进行测定时,线性关系良好,相关系数(r^2)均大于0.9992。取阴性蜂蜜样品,根据以往文献中目标物的检出情况,进行高、中、低3个浓度水平(25、5.0和0.25 $\mu\text{g/kg}$)的加标回收实验,每个水平重复6次,目标物的回收率范

围为 91.0%~107.1%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 范围为 2.0%~11.9%。以 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 确定方法检出限, 10 倍信噪比 ($S/N=10$) 确定方法定量限, 当称样量为 2.000 g 时, 林可霉素、甲硝唑和氯霉素的检出限分别是 0.06、0.04 和 0.06 $\mu\text{g/kg}$, 定量限分别为 0.20、0.14 和 0.20 $\mu\text{g/kg}$ 。详细统计见表 2。

3.4 实际样品测定

采用本研究建立的检测方法对市售 30 种蜂蜜样品中林可霉素、甲硝唑和氯霉素的残留量进行了测定。其中, 4 件样品检出林可霉素, 检出浓度在 1.1~9.2 $\mu\text{g/kg}$ 范围内。30 件样品均未检出甲硝唑和氯霉素残留。林可霉素阳性和阴性样品色谱图见图 3。

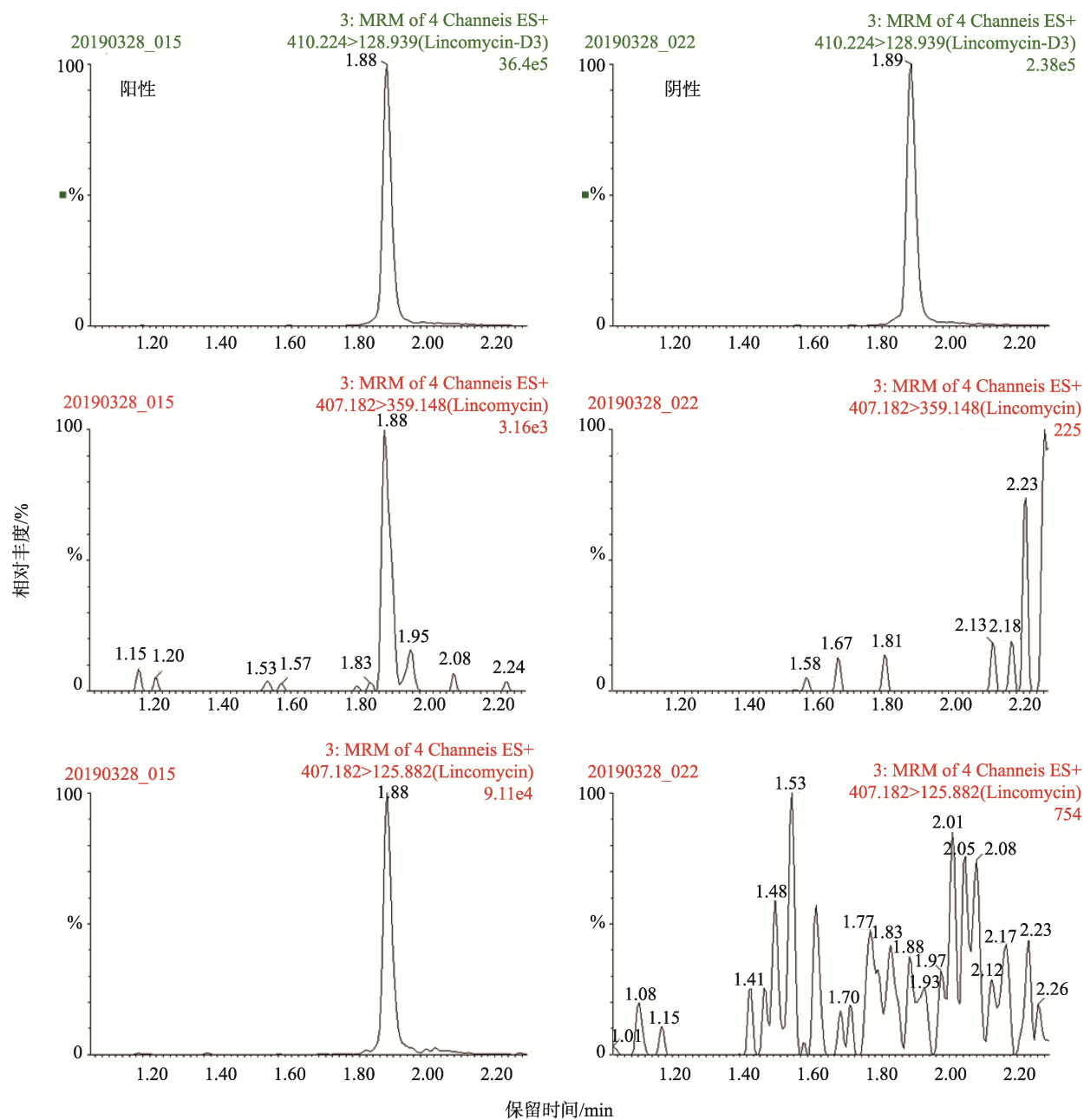


图 3 林可霉素阳性(左)和阴性(右)样品色谱图

Fig. 3 Chromatograms of lincomycin positive (left) and negative (right) honey samples

表 2 线性范围、回收率及精密度
Table 2 Linear range, recoveries and precisions of the method

化合物	添加水平/(μg/kg)	平均回收率/%	RSD/%	线性方程	线性范围/(ng/mL)	r ²
林可霉素	0.25	98.7	2.7	Y=0.390815X-0.0262371	0.50 ~ 50	0.9999
	5.0	101.8	2.0			
	25	105.1	2.6			
甲硝唑	0.25	91.0	11.4	Y=1.71063X-0.0519998	0.50 ~ 50	0.9992
	5.0	102.9	2.5			
	25	104.0	3.9			
氯霉素	0.25	99.7	11.9	Y=1.17216X-0.172959	0.50 ~ 50	0.9999
	5.0	107.1	3.8			
	25	100.3	8.5			

4 结 论

本文建立了液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中林可霉素、甲硝唑和氯霉素的方法。通过采用同位素稀释内标法和改进固相萃取上样步骤,实验的效率得到提升,有机溶剂的消耗减少。本方法的各项技术参数满足食品安全监管的需要。根据实际样品的检测结果,建议相关部门针对蜂蜜中的林可霉素残留情况开展风险评估。

参考文献

[1] 刘瑞华. 林可霉素生物合成的研究进展[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1138–1145.
Liu RH. Proceedings of lincomycin biosynthesis [J]. Microbiol China, 2018, 45(5): 1138–1145.

[2] 王强, 李香荷, 高燕霞, 等. 国产盐酸林可霉素滴眼液的质量评价[J]. 中国抗生素杂志, 2019, (3): 355–361.
Wang Q, Li XH, Gao YX, *et al.* Quality assessment of domestic lincomycin hydrochloride eye drops [J]. Chin J Antibio, 2019, (3): 355–361.

[3] 王奇志, 杜文民, 徐建龙. 林可霉素临床应用和不良反应的研究进展[J]. 中国医学生物技术应用, 2003, (1): 21–25.
Wang QZ, Du WM, Xu JL. The research development of clinical application and adverse reaction of lincomycin [J]. Chin Acad Med Magaz Organ, 2003, (1): 21–25.

[4] Feldlaufer MF, Pettis JS, Kochansky JP, *et al.* Lincomycin hydrochloride for the control of American foulbrood disease of honey bees [J]. Apidologie, 2001, 32(6): 547–554.

[5] Okayama A, Sakogawa T, Nakajima C, *et al.* Biological properties and antibiotic susceptibility of *Bacillus* larvae originated from American foulbrood of honeybee in Japan [J]. J Vet Med Sci, 1996, 58(5): 439–441.

[6] Reybroeck W, Daeseleire E, Brabander HFD, *et al.* Antimicrobials in beekeeping [J]. Vet Microbiol, 2012, 158(1–2): 1–11.

[7] Bładek T, Gajda A, Gbylik M, *et al.* Analytical procedure for the

determination of lincomycin in honey by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2010, 54(2): 205–209.

[8] 马晓年, 张秀清, 陈俊秀, 等. 云南省市售蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留检测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3665–3669.
Ma XN, Zhang XQ, Chen JX, *et al.* Analysis of chloramphenicol and metronidazole residues in honey of Yunnan province [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3665–3669.

[9] Bargańska Ż, Namieśnik J, Ślebioda M. Determination of antibiotic residues in honey [J]. Trac Trend Anal Chem, 2011, 30(7): 1035–1041.

[10] GB/T 22941-2008 蜂蜜中林可霉素、红霉素、螺旋霉素、替米考星、泰乐霉素、交沙霉素、吉他霉素、竹桃霉素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 22941-2008 Determination of lincomycin, erythromycin, iramycin, tilmicosin, tylosin, josamycin, kitasamycin, oleandomycin residues in honey-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].

[11] GB/T 18932.19-2003 蜂蜜中氯霉素残留量的测定方法 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 18932.19-2003 Method for the determination of chloramphenicol residues in honey-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].

[12] GB/T 20744-2006 蜂蜜中甲硝唑、洛硝哒唑、二甲硝咪唑残留量的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
GB/T 20744-2006 Method for the determination of metronidazole, ronidazole and dimetridazole residues in honey-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].

[13] 刘伟, 张楠, 李兵, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-同位素稀释串联质谱法测定蜂蜜中的甲硝唑和氯霉素[J]. 分析科学学报, 2017, 33(1): 145–148.
Liu W, Zhang N, Li B, *et al.* Simultaneous determination of metronidazole and chloramphenicol in honey by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. J Anal Sci, 2017, 33(1): 145–148.

[14] 图雅, 崔建平, 赵宏. 同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素及甲硝唑[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(4): 450–453.
Tu Y, Cui JP, Zhao H. Determination of chloramphenicol and

metronidazole in honey by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry with isotope-labelled internal standards [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(4): 450-453.

- [15] 章剑, 李昌安, 李建伟, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜样品中氯霉素和甲硝唑[J]. 安徽预防医学杂志, 2018, 24(1): 16-20.

Zhang J, Li CA, Li JW, *et al.* Validation of a solid phase extraction-based UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of chloramphenicol and metronidazole in honey [J]. Anhui J Prev Med, 2018, 24(1): 16-20.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



刘 伟, 主管技师, 主要研究方向为食品理化检验。

E-mail: liu.w@aliyun.com



赵 榕, 主任技师, 主要研究方向为食品理化检验。

E-mail: lxyue@yeah.net

“食品化学与营养”专题征稿函

食品中成分相当复杂, 有些成分是动、植物体内原有的; 有些是在加工过程、储藏期间新产生的; 有些是人为添加的; 有些是原料生产、加工或储藏期间所污染的; 还有的是包装材料带来的。食品营养是指人体从食品中所能获得的满足自身生理需要的必要的生物学过程, 而食品营养学是研究食物、营养与人体生长发育和健康的以及提高食品营养价值的措施。食品化学就是从化学的角度和分子水平上研究食品中化学成分的结构、理化性质、营养作用、安全性及可享受性, 以及各种成分在食品生产、食品加工和储藏期间的变化及其对食品营养性、享受性和安全性影响的科学, 为改善食品品质、开发食品新资源、革新食品加工工艺和储运技术、科学调整膳食结构、改进食品包装、加强食品质量与安全控制及提高食品原料加工和综合利用水平奠定理论基础。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品化学与营养”专题, 由天津科技大学食品工程与生物技术学院院长 **张民 教授** 担任专题主编, 围绕 **食品中的营养成分、微量及添加成分、生理活性成分及以上各成分在食品加工、储藏过程中的次生物质的分离与分析, 食品加工、储藏和运销过程对食品化学成分的影响, 营养与膳食平衡、能量平衡、疾病防治的关系, 食品的营养素强化与功能性食品等方面**或您认为本领域有意义的问题进行论述, 计划在 2019 年 **8 月份出版**。

鉴于您在该领域的成就, 本刊主编 **吴永宁 研究员** 及专题主编 **张民 教授** 特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在 **2019 年 7 月 20 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与与支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(请选择**食品化学与营养专题**)

E-mail: jfoods@126.com(请注明**食品化学与营养专题**文章)

《食品安全质量检测学报》编辑部