

高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜡中痕量氯霉素残留

雷美康^{1,2}, 侯建波¹, 祝子铜^{1,2}, 王笑笑³, 章应俊^{1,2}, 许赢升^{1,2}, 彭芳^{1,2*}

(1. 杭州海关技术中心, 杭州 310016; 2. 衢州海关综合技术服务中心, 衢州 324003;
3. 衢州市食品药品检验研究院, 衢州 324003)

摘要: 目的 建立正己烷预处理-固相萃取净化-高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜡中痕量氯霉素的分析方法。**方法** 试样采用正己烷预溶解, 经水提取后进行亲水亲脂平衡(hydrophilic-lipophilic-balance, HLB)固相萃取小柱净化, 用 Accucore XL C₁₈ 柱分离, 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式串联质谱进行测定, 内标法定量。**结果** 氯霉素在 0.3~10 ng/mL 范围内与峰面积具有较好的线性关系, 相关系数大于 0.998。该方法检出限($S/N>3$)为 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 方法定量限($S/N>10$)为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在 0.3、1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平下的回收率为 80.2%~105.2%, 相对标准偏差均小于 8%($n=6$)。**结论** 本方法快速、灵敏、准确, 适用于日常大批量蜂蜡样品中痕量氯霉素残留量的分析。

关键词: 固相萃取净化; 高效液相色谱-串联质谱法; 蜂蜡; 氯霉素

Determination of trace chloramphenicol residue in beeswax by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

LEI Mei-Kang^{1,2}, HOU Jian-Bo¹, ZHU Zi-Tong^{1,2}, WANG Xiao-Xiao³, ZHANG Ying-Jun^{1,2}, XU Ying-Shen^{1,2}, PENG Fang^{1,2*}

(1. Technical Center of Hangzhou Customs, Hangzhou 310016, China;
2. The Comprehensive Technology and Service Center of Quzhou Customs, Quzhou 324003, China;
3. Quzhou Institute for Food and Drug Control, Quzhou 324003, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of trace chloramphenicol residue in beeswax by n-hexane pretreatment-solid-phase extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were predissolved with n-hexane and then extracted with water, purified by hydrophilic-lipophilic-balance(HLB)solid phase extraction cartridge, separated with Accucore XL C₁₈ column, detected by multiple reaction monitoring (MRM) mode tandem mass spectrometry, and quantified by internal standard method. **Results** Chloramphenicol had a good linear relationship with peak area in the range of 0.3~10 ng/mL, and the correlation coefficient was greater than 0.998. The limits of detection ($S/N>3$) for chloramphenicol was 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantification ($S/N>10$) was 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries at the three addition levels of 0.3, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were 80.2%~105.2%, and the relative standard deviations were all less than

基金项目: 衢州市科技计划项目(2020K47)

Fund: Supported by Quzhou Science and Technology Plan Project (2020K47)

*通信作者: 彭芳, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量分析与检测。E-mail: 43965304@qq.com

*Corresponding author: PENG Fang, Senior Engineer, Technology and Service Center of Quzhou Customs, Quzhou 324003, China. E-mail: 43965304@qq.com

8% ($n=6$). **Conclusion** This method is rapid, sensitive and accurate. It is suitable for the determination of chloramphenicol residue in large quantities of beeswax samples.

KEY WORDS: solid phase extraction; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method; beeswax; chloramphenicol

0 引言

蜂蜡是一种由工蜂腹部下面四对蜡腺分泌的物质, 是一种复杂的有机化合物, 主要成分是高级脂肪酸和一元醇所合成的酯类、脂肪酸和糖类, 近年来在食品工业、化妆品、农业和医药工业上应用广泛^[1-3]。蜂农在养殖蜜蜂过程中使用氯霉素(chloramphenicol, CAP)药物用于预防和治疗蜜蜂的幼虫腐烂病等疾病, 从而造成蜂蜡中氯霉素残留污染。但氯霉素对人类具有一定的毒性作用, 如引起人的粒细胞缺乏病, 再生障碍性贫血和过敏等症^[4-5]。因此, 联合国粮农组织/世界卫生组织规定食品中不得检出氯霉素的残留, 美国、日本和我国等国家或地区都将该药物列入禁止使用的蜂药名单中, 并制定了相关的最高残留限量^[6], 如欧盟规定氯霉素 MRPL(minimum required performance limits)值为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。蜂蜡与蜂蜜、蜂王浆相比, 具有脂溶性的特点, 加上蜂蜡循环利用及其环境的因素, 蜂蜡中氯霉素的残留风险更高。蜂蜡中氯霉素残留不仅关系到人体身体健康, 也将对我国蜂产品出口贸易产生巨大的风险。

近年来, 国内外关于蜂蜜、蜂王浆中药物残留检测方法的报道较多^[8-9], 但尚未有蜂蜡中氯霉素残留量检测方法的报道。由于蜂蜡的基质与蜂蜜和蜂王浆差异较大, 无法采用国内外已公布的蜂蜜或蜂王浆中氯霉素的提取检测方法进行检测。如, 现行的 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》使用水作为蜂蜜中氯霉素的提取溶剂, 无法满足脂溶性蜂蜡基质的提取^[10]。本研究建立了正己烷预处理-固相萃取净化-高效液相色谱-串联质谱法检测蜂蜡中痕量氯霉素的分析方法, 为蜂蜡实际样品中痕量氯霉素残留的定性和定量分析提供方法参考。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 超高效液相色谱-TSQ Vantage 三重四极杆串联质谱联用仪(美国 Thermo Scientific 公司); MS 3 digital 漩涡混合器(德国 IKA 公司); MD 200 氮吹仪(杭州奥盛仪器公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(美国密理博公司); KQ-500B 超声波清洗仪(昆山市超声仪器公司)。

氯霉素(CAS56-75-7, 纯度 $\geq 98\%$)、氯霉素-D5(纯度 $\geq 98\%$)(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 甲醇、正己烷(色谱纯, 美国赛默飞世尔公司); OASIS HLB 固相萃取小柱(500 mg, 6 mL, 美国 Waters 公司), 使用前依次用 3 mL 甲醇、5 mL 水活化。

实验样品采购于某网购平台和某蜂产品生产企业提供, 常温保存。

1.2 标准溶液的配制

称取氯霉素标准品 10 mg(精确至 0.1 mg)置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 混匀配制成 100 mg/L 的标准储备液。用甲醇配制成 1 mg/L 的单标储备液, 根据实际需要用流动相稀释成相应的标准工作溶液。氯霉素-D5 作为同位素内标的浓度为 10 ng/mL。各种标准溶液避光保存于 0~4 °C 冰箱中。

1.3 试样制备

如果蜂蜡样品不均匀, 试样可在 70 °C 左右加热条件下溶解并混匀。

1.4 提取

称取试样 2.0 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 带盖离心管中, 准确加入 0.25 mL 氯霉素-D5(10 ng/mL)内标溶液后加入 10 mL 正己烷, 涡旋(必要时可采用超声助溶解)溶解后加 10 mL 水涡旋振荡提取 5 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取下层水层, 待净化。

1.5 净化

移取试样提取液于 OASIS HLB 固相净化小柱中, 弃去流出液, 先用 5 mL 超纯水淋洗, 再用 5 mL 甲醇/水(2/8, V/V)溶液淋洗净化小柱, 弃去流出液, 最后用 5 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液于带刻度离心管中, 氮吹浓缩至近干, 最后用甲醇/水(2/8, V/V)定容至 1 mL, 混匀后经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后用于仪器测定。

1.6 色谱条件

色谱柱: Accucore XL C_{18} 柱(150 mm \times 4.6 mm, 4 μm); 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL ; 流速: 0.5 mL/min。流动相: A 为水溶液, B 为甲醇溶液。梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 70%A; 0.5~7.0 min, 70%A~10%A; 7.0~8.0 min, 10% A; 8.0~8.1 min, 10%A~70%A; 8.1~12.0 min, 70%A。

1.7 质谱条件

扫描方式: 负模式扫描; 检测方式: 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: -3000 V ; 鞘气: 207 kPa ; 辅助气: $10\text{ arbitrary units}$; 毛细管温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; 蒸发温度: $300\text{ }^{\circ}\text{C}$; 碰撞气: 氩气(1.5 mTorr)。氯霉素和内标的质谱条件参数具体见表 1。

表 1 氯霉素和内标的质谱条件参数
Table 1 Mass spectrometry condition parameters of chloramphenicol and internal standard

测定物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	S-Lens 电压/V	碰撞电压 /eV	保留时间 /min
CAP	321	152*257	77	20 15	6.4
CAP-D5	326	157*	77	20	6.4

注: *表示定量离子。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂选择

蜂蜡的主要成分为烷醇和烷酸形成的酯类, 易溶于正己烷、氯仿和四氯化碳等弱极性有机溶剂, 不易溶于水、甲醇、乙腈等强极性溶剂, 属于脂溶性物质^[3]。采用乙腈、乙酸乙酯等常用提取溶剂提取蜂蜡中氯霉素, 需要采用加热辅助提取, 并采用冷冻法去除提取液中脂类物质, 以上加热和冷冻等工序较复杂, 所以本研究未采用该提取方法。根据蜂蜡和氯霉素的化学性质, 本研究采用正己烷溶解蜂蜡后再使用水进行提取目标物。

本研究探讨了水、含 0.1% 甲酸的水溶液和含 0.1% 氨水的水溶液 3 种溶剂对蜂蜡中氯霉素的提取效率。在 $20\text{ }\mu\text{g/kg}$ 水平下, 各种不同 pH 值的溶剂分别做阴性样品加标实验, 以平均回收率判定提取溶剂的优劣。实验表明, 采用水作为提取溶液回收率达 90% 以上, 结果见图 1, 所以采用纯水作为提取溶剂。

2.2 净化条件选择

根据文献报道^[7,11-13], 常用的氯霉素前处理净化方法有液液萃取、固相萃取净化方法。考虑到 2.1 节提取溶液为水溶液, 无需溶剂转化可直接使用 HLB 柱净化, 同时本研究考察了 HLB 小柱的净化效果, 实验表明 HLB 固相萃取净化小柱对蜂蜡中氯霉素的绝对回收率达 90% 以上。所以本研究选用 HLB 固相萃取净化法。

2.3 方法的线性范围和检出限

在本研究实验条件下, 以氯霉素与其同位素内标

物浓度比值为横坐标 X , 以氯霉素与同位素内标物峰面积比值为纵坐标 Y , 绘制标准溶液工作曲线, 在 $0.3\sim 10\text{ ng/mL}$ 范围内氯霉素峰面积呈良好的线性关系, 线性关系方程为 $Y=0.286385X-0.00152397$, 相关系数大于 0.998 。

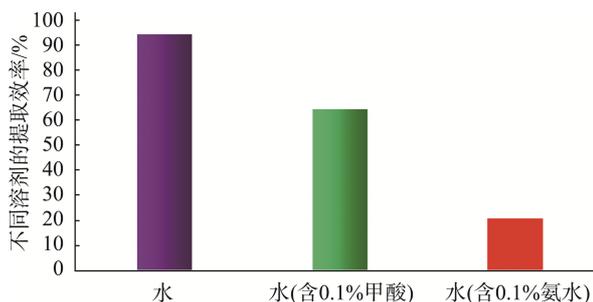


图 1 不同溶剂的提取效率

Fig.1 Extraction efficiency of different solvents

在阴性样品中添加氯霉素, 按照本研究的实验方法 (做 6 平行) 测定, 以 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)对应的添加水平分别作为方法检出限(limits of detection, LOD)和方法定量限(limits of quantification, LOQ)。结果表明, 本方法 LOD 值为 $0.05\text{ }\mu\text{g/kg}$, LOQ 值为 $0.3\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

2.4 方法的回收率和精密度

在 $0.3\text{ }\mu\text{g/kg}$ 、 $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 和 $2.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平下进行空白加标回收率实验, 每个水平重复 6 次。如表 2, $0.3\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加水平时氯霉素的回收率为 $82.7\%\sim 95.2\%$, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 5.2% ; $1.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加水平时氯霉素的回收率为 $80.2\%\sim 98.1\%$, RSD 为 7.8% ; $2.0\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加水平时氯霉素的回收率为 $98.7\%\sim 105.2\%$, RSD 为 2.5% 。参照 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的检测方法验证的相关要求^[14], 本方法符合蜂蜡实际样品种氯霉素残留检测的要求。

2.5 实际样品测定

应用本方法对某网购平台采购的 15 份和某蜂产品生产企业提供的 25 份实际蜂蜡样品中氯霉素残留量进行测定, 结果表明, 实际样品中氯霉素的检出率为 17.5% , 在所有检测样品中氯霉素总含量在 $0.3\sim 1.0\text{ ng/kg}$ 之间有 5 个, 占 12.5% ; 含量在大于 1.0 ng/kg 有 2 个, 分别为 40.3 、 41.5 ng/kg 。以上数据说明, 蜂蜡中氯霉素的检出率高于蜂蜜等其它蜂产品^[15]。

表2 方法回收率和精密度数据($n=6$)
Table 2 Spiked recoveries and RSDs of the CAP ($n=6$)

添加水平/(ng/kg)	回收率/%						平均回收率/%	精密度/%
0.3	89.7	87.2	93.2	95.2	93.7	82.7	90.3	5.2
1.0	98.1	94.7	91.7	86.4	83.1	80.2	89.0	7.8
2.0	101.3	99.6	101.0	98.7	105.2	103.8	101.6	2.5

3 结论

本研究采用正己烷预溶解, 经水提取后进行 HLB 固相萃取小柱净化, 有效提高了提取率, 减少了杂质的干扰, 并对质谱分析条件进行了优化。方法具有易操作、灵敏度高、环境友好等优点, 可以满足国内外对大批量蜂蜡中痕量氯霉素残留监控和风险分析的要求, 同时为分析蜂蜜、蜂王浆等其他蜂产品中氯霉素污染来源提供了技术参考。

参考文献

- [1] 王静琳, 汪燕, 马振刚. 综述蜂蜡的应用[J]. 蜂蜜杂志, 2019, 39(12): 9-12.
WANG JL, WANG Y, MA ZG. Review of the application of beeswax [J]. J Bee, 2019, 39(12): 9-12.
- [2] 雷美康, 彭芳, 祝子铜, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜡中硝基咪唑类代谢物[J]. 分析实验室, 2015, 34(10): 1174-1177.
LEI MK, PENG F, ZHU ZT, *et al.* Determination of metabolites of nitrofurantoin antibiotics in beeswax using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2015, 34(10): 1174-1177.
- [3] NIELL S, CESIO V, HEPPELLE J, *et al.* QuEChERS-based method for the multiresidue analysis of pesticides in beeswax by LC-MS/MS and GC×GC-TOF [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(17): 3675-3683.
- [4] WANG H, ZHOU XJ, LIU YQ, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in Milk by triple quadrupole liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(8): 3532-3538.
- [5] RODZIEWICZ L, ZAWADZKA I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2008, 75(3): 846-850.
- [6] 祝子铜, 雷美康, 彭芳, 等. 快速溶剂萃取-凝胶渗透色谱净化-LC/MS/MS 结合测定蜂花粉中硝基咪唑类药物[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 522-529.
ZHU ZT, LEI MK, PENG F, *et al.* Determination of nitroimidazole residues in bee pollen using LC-MS/MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatographic purification [J]. Chin J Pharm Anal, 2016, 36(3): 522-529.
- [7] 谢文, 丁慧瑛, 章晓氢, 等. 高效液相色谱串联质谱测定蜂蜜、蜂王浆中氯霉素残留[J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1767-1770.
XIE W, DING HY, ZHANG XD, *et al.* Determination of chloramphenicol residue in honey and royal jelly by high performance liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(12): 1767-1770.
- [8] 周萍, 李英华, 钮灵铃, 等. 高效液相色谱-串联质谱对蜂王浆中 27 种药物残留的同时测定[J]. 分析测试学报, 2010, 29(6): 539-543.
ZHOU P, LI YH, NIU LL, *et al.* Simultaneous determination of 27 medicine residues in royal jelly using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2010, 29(6): 539-543.
- [9] 张璐, 孔祥虹, 何强, 等. 蜂蜜中兽药残留检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 11(1): 4368-4372.
ZHANG L, KONG XH, HE Q, *et al.* Research advances on the detection method of veterinary drug residues in honey [J]. J Food Saf Qual, 2015, 11(1): 4368-4372.
- [10] 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 Determination of chloramphenicol residues in honey liquid chromatography tandem mass spectrometry [S].
- [11] 张国翠. 食品中氯霉素标准检测方法的研究综述[J]. 食品工程, 2017, 3: 13-14, 44.
ZHANG GC. A review of the standard methods for the determination of chloramphenicol in food [J]. Food Eng, 2017, 3: 13-14, 44.
- [12] 马晓年, 梁志坚, 李怡. 超高效液相色谱-串联质谱法测定乳饼中的氯霉素[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(2): 539-543.
MA XN, LIANG ZJ, LI Y. Determination of chloramphenicol in rubbing by ultra performance liquid chromatography/triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(2): 539-543.
- [13] 赵浩军, 杨青梅岭, 张燕, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中氯霉素、氟苯尼考和五氯酚的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 4121-4126
ZHAO HJ, YANY QML, ZHANG Y, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and pentachlorophenol in pork by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(12): 4121-4126.
- [14] GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].

GB/T 27404—2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testinf of food [S].

[15] 吕冰峰, 刘敏, 裴新荣. 2015—2018 年蜂蜜国家食品安全监督抽检结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 23(12): 8164—8170.

LV BF, LIU M, PEI XR. Results analysis of the national food safety supervision and sampling inspection of honey from 2015 to 2018 [J]. J Food Saf Qual, 2019, 23(12): 8164—8170.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



雷美康, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量分析与检测。
E-mail: leimeikang@163.com

彭 芳, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量分析与检测。
E-mail: 43965304@qq.com



“生物毒素研究”专题征稿函

随着社会经济的发展, 人民越来越关注食品的安全问题。在日常生活中, 食物中毒事件时有发生。在食品安全事件中, 生物毒素中毒事件占一定比例。生物毒素是生物体内所产生的有毒代谢产物, 包括微生物毒素、植物毒素、动物毒素和海洋毒素。生物毒素不仅对消费者的健康造成危害, 还会对养殖业、种植业、畜牧水产业等行业造成巨大的经济损失。因此, 关注食品中生物毒素的安全, 是一项具有重大经济意义和科学意义的事情。

鉴于此, 本刊特别策划“生物毒素研究”专题。专题将围绕生物毒素的产生与调控机制、生物毒素的快速检测与筛查技术、生物毒素的脱毒方法与机制、生物毒素的毒理研究与风险评估、生物毒素的标准物质研发、生物毒素型药物的开发研究等问题展开讨论, 计划在 2021 年 3~4 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2021 年 1 月 31 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**生物毒素研究**):

网站: www.chinafoodj.com(备注投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **生物毒素研究**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **生物毒素研究**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部