第 33卷 分析化学 (FENXI HUAXUE) 研究简报 第 12期
2005年 12月 Chinese Journal of Analytical Chemistry 1767～1770

高效液相色谱串联质谱测定蜂蜜、蜂王浆中氯霉素残留

谢 文* 丁慧瑛 章晓氡 郑自强 奚君阳 俞春燕
(浙江出入境检验检疫局检验检疫技术中心,杭州 310012)

摘 要 前处理方法包括添加同位素内标氯霉素-d5和采用 10%偏磷酸沉淀蜂王浆产品中的蛋白质,上清液经乙酸乙酯提取,自制硅胶柱和 Oasis小柱净化。净化后的提取溶液用高效液相色谱-电喷雾电离质谱检测,多反应监测 3对离子 (321.0/256.9、321.0/194.0、321.0/175.8)。该方法对不同基质样品的加标回收率为 91%～107%;相对标准偏差小于 10%;蜂蜜和蜂王浆的方法检出限分别为 0.1 μg/kg和 0.2 μg/kg。

关键词 高效液相色谱串联二级质谱,蜂蜜,蜂王浆,氯霉素残留,同位素内标氯霉素-d5

1 引 言

氯霉素 (chloramphenicol, CAP)是一种高效广谱的抗生素,对各种好氧和厌氧微生物都有活性。它曾被用于家畜和家禽疾病的预防和治疗,它在动物性食品中残留的潜在危害就是对人骨髓造血功能造成严重损害,从而引起人的粒细胞缺乏病,再生障碍性贫血和溶血性贫血,严重者可致死[1～3]。

FAO/WAO规定食品中氯霉素的残留量不得检出,欧盟 (EEC) 96/23指令中把 CAP列入禁用药,并规定氯霉素 MRPL (minimum required performance limits)值为 0.3 μg/kg。随着科学技术的进步,欧盟对进口动物源产品中的氯霉素的检出限量不断降低,甚至禁止中国的某些动物源产品的进口,同时蜂产品中氯霉素残留的检测又是动物源产品检测中的难点,因此蜂产品中氯霉素的检测变得尤为重要。文献报道用气相色谱 (GC)、气相色谱质谱 (GC-MS)测定动物源产品中 CAP,这些方法应用于蜂产品中氯霉素的检测,存在检出限难以达到要求、背景干扰或样品净化不完全以及衍生化难等问题。ELISA作为筛选方法,在蜂产品中氯霉素残留的最低检出限达到 0.1 μg/kg,但是对于阳性样品需要与之相对应的确证方法。文献[4、8]报道关于蜂蜜中氯霉素残留量的检测方法,分别采用高效液相色谱 (HPLC)和 GC-MS,尚未有蜂王浆中氯霉素残留量检测方法的报道。随着 LC-MS/MS技术发展的日趋成熟,该方法被越来越多的应用于测定和确证动物源产品中氯霉素的残留量。本实验提出了添加同位素内标氯霉素-d5和采用 10%偏磷酸沉淀蜂王浆产品中的蛋白质,上清液经乙酸乙酯提取,用 LC-MS/MS测定蜂产品中氯霉素残留量的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

API4000液相色谱-串联质谱仪,配电喷雾离子源和大气压化学源 (美国 AB公司);Oasis HLB SPE柱 (500 mg, 6 cc, Waters公司)。实验用水为二次蒸馏水;甲醇、乙腈、乙酸乙酯、甲苯、正己烷为色谱纯,氯化钠、无水硫酸钠为分析纯。硅胶:105℃灼烧 2 h,在干燥器内冷却至室温,加 1.5%的水脱活,备用。氯霉素标准物质 (纯度 ≥99%, SMA公司);氯霉素-d5同位素内标:纯度 ≥99% (德国 BGVV研究所)。储备液用甲醇配制,贮存在 4℃冰箱中。根据需要用甲醇稀释至适当浓度的标准工作液。

2.2 液相色谱与质谱条件

色谱柱:ZORBAX Eclipse XDB-C8, 5 μm, 4.6 mm ×150 mm;流动相:乙腈-5 mmol/L醋酸胺梯度洗脱 (见表 1);流速:0.4 mL/min;进样量:20 μL。扫描方式:负离子扫描;检测方式:多反映监测;电喷雾电压:-3500 V;雾化气压力:0.266 MPa;气帘气压力:0.189 MPa;辅助气流速:45 L/min;离子源温度:525℃;去簇电压 (DP) -65 V。

2005-01-21收稿;2005-04-07接受
本文系国家质量监督检验检疫总局 2002年出国人员科技活动资助项目。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 样品处理

2.3.1 蜂蜜 称取 5.00 g样品,置于 50 mL离心管中,加入 0.1 mL氯霉素-d5(10 μg/L),15 mL水,8 g NaCl,20 mL乙酸乙酯,混匀,4000 r/min,离心 5 min,上层乙酸乙酯过无水硫酸钠柱至浓缩瓶中,样品溶液再加入 20 mL乙酸乙酯,重复上述操作,合并乙酸乙酯提取液,50℃以下水浴减压浓缩至干。残渣用 10 mL 乙腈-甲苯(1∶9)溶液转移入硅胶净化柱(150 mm ×5 mm i.d.玻璃柱,底部垫约 5 mm厚脱脂棉,1 cm无水硫酸钠,1 g硅胶,顶端加 1 cm无水硫酸钠),弃去流出液,用 6 mL乙腈-甲苯(6∶4,V/V)洗脱,在 50℃以下水浴中平缓氮气吹干,加入 0.5 mL乙腈-H_2O(1∶1,V/V),混匀,如有沉淀,溶液过 0.45 μm滤膜,供 LC-MS/MS测定。

表 1 流动相梯度洗脱
Table 1 Gradient elution of mobile phase

t/min	乙腈(%) Acetonitrile	5 mmol/L醋酸胺 NH_4AC(%)
0	20	80
2	70	30
6	70	30
6.1	80	20
6.5	80	20
6.6	20	80
10	20	80

2.3.2 蜂王浆 称取 2.00 g蜂王浆样品,置于 50 mL离心管中,加入 0.1 mL氯霉素-d5(10 μg/L),20 mL 10%偏磷酸溶液,混匀,以 4000 r/min离心 10 min。将上层清液转移至另一 50 mL离心管中,加 20 mL乙酸乙酯,8g NaCl,同蜂蜜的提取及用硅胶柱的净化方法。加入 5 mL水溶解残渣,倒入Oasis HLB的小柱(已依次用 8 mL甲醇和 15 mL水预处理),再用 5 mL水和 5 mL乙腈-水(1∶7,V/V)洗柱。在65 kPa的负压下,减压抽干,最后用 7 mL乙酸乙酯洗脱,洗脱液在 50℃以下水浴平缓 N_2 吹干,准确加入 0.5 mL乙腈-水(1∶1,V/V),混匀,如有沉淀,将溶液通过 0.45 μm滤膜,供 LC-MS/MS测定。

3 结果与讨论

3.1 氯霉素的液相色谱质谱图

氯霉素分子式为 $C_{11}H_{12}O_5N_2Cl_2$,分子量为 322.0123[10]。同位素内标氯霉素-d5(氯霉素在 5个不同位置上的氢被氘取代)的分子量较氯霉素的分子量多 5,两者的理化性质相同,在样品净化过程中可以矫正由于样品净化对氯霉素造成的损失,提高测定方法的回收率。图 1a为氯霉素的 LC-MS/MS,出现了主要的碎片有 m/z 256.9(丢失了 Cl和 —OH),m/z 194.0(丢失了 CCl_2和 —OH),m/z 175.8(从 m/z 194.0的碎片上丢失 H_2O),256.9、194.0和 175.8的离子碎片峰相对其它离子碎片强,同时可以看到氯霉素母离子的分子离子峰为 321.0。图 1b为氯霉素-d5的多级串联质谱图,出现了一个主要的碎片 m/z 157.1,因此监一对离子 326.0/157.1。

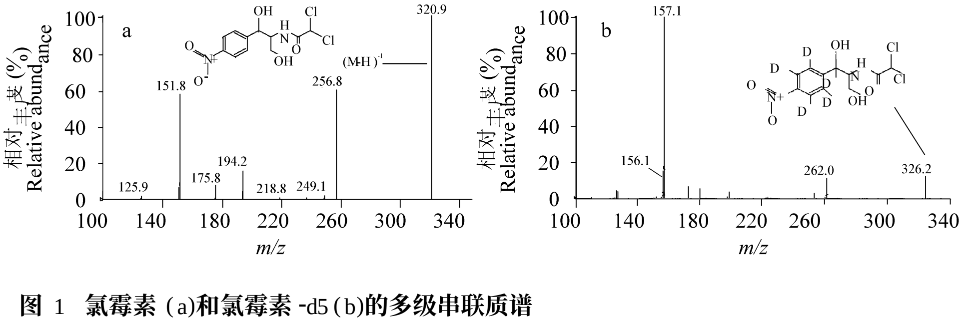

图 1 氯霉素(a)和氯霉素-d5(b)的多级串联质谱

Fig.1 Multi-stage tandem mass spectra of chloramphenicol (CAP) (a) and CAP-d5 (b)

3.2 色谱条件的优化

氯霉素属于弱极性物质,易溶于甲醇、乙腈、乙酸乙酯等有机溶剂。本实验以乙腈-5 mmol/L醋酸胺为流动相进行了色谱条件的优化。实验表明,乙腈在流动相中所占比例,决定氯霉素的保留时间、峰形和测定的灵敏度。在测定蜂产品时,由于氯霉素与干扰杂质一起流出,对氯霉素的离子化产生严重抑制作用和色谱峰背景干扰,因此本实验采用梯度洗脱的方法,使氯霉素与杂质基本达到完全分离。

3.3 样品提取溶剂的选择

氯霉素易溶于乙酸乙酯,而不溶于正己烷。大量文献报道[4~9]选用乙酸乙酯作为提取溶剂。实验表明,乙酸乙酯提取杂质多,提取颜色较深,但乙酸乙酯提取效率高,因此本实验选用乙酸乙酯提取样品

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中的氯霉素,用无水硫酸钠脱去乙酸乙酯中的水分,可减少水溶性杂质。

3.4 蜂王浆中蛋白质沉淀方法的选择

蜂王浆样品含有大量蛋白质的均匀胶体。要从蜂王浆中提取氯霉素,必须破坏其胶体状态。文献[11]选 2%三氯乙酸和 2%柠檬酸沉淀蛋白,经实验,沉淀蛋白质时间短,效果理想,但是沉淀后的上清液经乙酸乙酯提取后,由于有酸性溶液存在,乙酸乙酯溶液难浓缩干。本实验采用文献[12]的方法,选用 10%偏磷酸溶液沉淀蛋白质。

3.5 硅胶柱净化

用自制的 1 g硅胶柱净化样品提取液,方法简便快捷,成本低,实验结果表明,用硅胶柱净化蜂蜜,效果好,色谱图中的背景杂质干扰少。但是控制好硅胶 1.5%脱水后的活性是关键之一。先进行标样的淋洗后,再净化样品溶液,另外,样品溶液过柱的流速不要过快。以 1滴/s净化、洗脱效果较好。

3.6 方法的线性关系

将氯霉素和氯霉素-d5混合标准溶液直接进样,在 LC-MS/MS的响应不理想,同时考虑到有些实验室缺少同位素内标,在样品前处理过程中回收率偏低,因此本实验 5点不同浓度工作曲线全部采用空白样品添加氯霉素和氯霉素-d5,取 5 g蜂蜜空白样分别添加 0.05、0.1、0.2、0.3和 0.4 mL氯霉素(10 μg/L)和 0.1 mL氯霉素-d5(10 μg/L)或取 2 g蜂王浆空白样分别添加 0.04、0.08、0.12、0.16 mL氯霉素(10 μg/L)和 0.1 mL氯霉素-d5(10 μg/L),按照 2.3操作方法制备样品溶液,在本法所确定的实验条件下进样,测定其峰面积,以质量浓度 X (μg/kg)为横坐标,峰面积的比值 Y (氯霉素峰面积/氯霉素-d5面积)为纵坐标,绘制标准曲线。结果见表 2。

表 2 线性方程、相关系数

Table 2 The linear equation

样品 Sample	离子对名称 Transitions	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	线性范围 Linear range (μg/kg)
蜂蜜 Honey	321.0/256.9	$Y = 2.21X + 0.0445$	0.9992	0.1～0.8
蜂王浆 Royal jelly	321.0/256.9	$Y = 1.52X + 0.0618$	0.9985	0.2～0.8

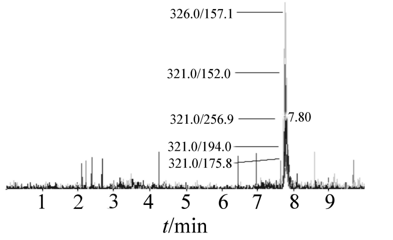

图 2 蜂蜜氯霉素阳性样品氯霉素-d5(0.2 μg/kg)的选择

Fig 2 Select ion chromatograms of positive sample spike CAP-d5 (0.2 μg/kg) in honey sample

3.7 回收率及精密度实验

在 5 g蜂蜜空白样品中分别添加 0.05、0.2、0.4 mL氯霉素(10 μg/L)和 0.1 mL氯霉素-d5 (10 μg/L)。2 g蜂王浆空白样品中分别添加 0.04、0.08、0.16 mL氯霉素(10 μg/L)和 0.1 mL氯霉素-d5 (10 μg/L),按照 2.3制备样品溶液。回收率及精密度见表 3,阳性样品氯霉素-d5)见图 2和图 3。

表 3 方法的回收率及精密度实验

Table 3 The recovery and precision of the method

样品 Sample	离子对 Transitions	加入量 Added (μg/kg)	测定量 Found (μg/kg)	平均回收率 Recovery (%)	RSD (%)
蜂蜜 Honey	321.0/256.9	0.1	0.091	91	4.4
		0.4	0.43	107	2.7
		0.8	0.82	102	2.1
蜂王浆 Royal jelly	321.0/256.9	0.2	0.201	100	2.8
		0.4	0.39	97	7.1
		0.8	0.79	99	2.3

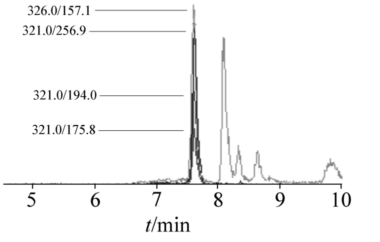

图 3 蜂王浆氯霉素阳性样品添加氯霉素-d5(0.5 μg/kg)总离子流图

Fig 3 Select ion chromatograms of positive sample spike CAP-d5 (0.5 μg/kg) in royal jelly sample

应用本方法检测出口蜂王浆 166批,结果氯霉素含量大于 0.3 μg/kg为 42%;20批蜂蜜,结果均小于 0.1 μg/kg。该方法具有很高的灵敏度和选择性。通过 1对离子碎片对氯霉素定量,其余 2对离子碎片对检测结果进行确证。由于添加了同位素内标氯霉素-d5,方法的回收率和精密度在 0.1 μg/kg的痕量残留仍然符合实验要求。采用 10%偏磷酸测定蜂王浆中的蛋白质,方法简便、容易操作,

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

适用于日常检验。

References

1 Semin Y A. *Hematol*, **1973**: 10: 225～234

2 Ding Quanfu (丁全福). *Pharmacology* (药理学). Beijing (北京): People Press (人民出版社), **2001**: 249～250

3 Li Lansheng (李兰生), Wang Yongqiang (王勇强). *Joural of China Ocean University* (青岛海洋大学学报), **1995**, 25 (3): 400～406

4 Hu Daxi (胡大晰), Li Qingcai (李庆才). *Yantai Teachers University Journal (Natural Science)* (烟台师范学院学报自然科学版), **1994**, 10 (2): 121～124

5 Takino M, Daishima S, Nakahara T. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1011: 67～75

6 Gantverg A, Shishani I, Hoffman M. *Analytica Chimica Acta*, **2003**, 483: 125～135

7 Mottier P, Parisod V, Gremaud E, Guy P A, Stadler R H. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 994: 75～84

8 Liu Yizi (刘宜孜), Xie Mengxia (谢孟峡), Han Jie (韩 杰), Liu Yuan (刘 媛), Qiu Yueming (邱月明), Ding Yayun (丁雅韵), Zhang Lei (张 雷). *Journal of Beijing Normal University* (北京师范大学学报自然科学版), **2004**, 40 (2): 232～236

9 Gikas E, Kormali P, Tsipi D, Tsarbopoulos A. *J. Agric. Food Chem.*, **2004**, 52: 1025～1030

10 Li Junsuo (李俊锁), Qiu Yueming (邱月明), Wang Chao (王 超). *Analysis Veterinary Drug Residue* (兽药残留分析). Shanghai (上海): Shanghai Science Technology Press (上海科学技术出版社), **2002**: 393～395

11 *SN/0205-93 Professional Standard of the People's Republic of China for Import and Export Commodity Inspection* (中华人民共和国进出口商品检验行业标准). Beijing (北京): Standard Press (中国标准出版社)

12 *SN/T0549-1996 Professional Standard of the People's Republic of China for Import and Export Commodity Inspection* (中华人民共和国进出口商品检验行业标准). Beijing (北京): Standard Press (中国标准出版社)

Determination of Chloramphenicol Residue in Honey and Royal Jelly by High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

Xie Wen*, Ding Huiying, Zhang Xiaodong, Zheng Ziqiang, Xi Junyang, Yu Chunyan

(*Zhejiang Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Hangzhou* 310012)

Abstract A method for the determination of chloramphenicol residue in honey and royal jelly samples has been introduced. In order to enhance the accuracy of the method and precipitate the protein in samples, the isotope internal standard (CAP-d5) and 10% metaphosphoric acid solution were added into the sample solutions, the upper layer solution was extracted with ethyl acetate, then it was cleaned up with sillica and Oasis columns. The above solution was analysed by using high performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. The precursor/product ion transitions (321.0/256.9, 321.0/194.0, 321.0/175.8) were monitored. The recoveries were between 91% and 107% in different matrix. The Relative standard deviations were below 10%. The limit of detections of the method for the analysis of honey and royal jelly samples were 0.1 μg/kg and 0.2 μg/kg respectively.

Keywords High performance liquid chromatograpy tandem mass spectrometry, honey, royal jelly, chloramphenicol residue, isotopic internal standard chloramphenicol-d5

(Received 21 January 2005; accepted 7 April 2005)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net