

LC-MS/MS快速检测蜂蜜及蜂蜜产品类兽药残留

Rapid detection of veterinary drug residues in honey and honey products by LC-MS / MS

刘青¹, 陈情², 黄文杰², 李荷香², 杨总¹, 刘冰洁¹, 郭立海¹

Liu Qing¹, Chen Qing², Huang Wenjie², Li Henxiang², Yang Zong¹, Liu Bingjie¹, Guo Lihai¹

SCIEX Application Support Center, China¹

Jiangxi Huaxing Testing Co., Ltd²

Keywords: 蜂蜜; 蜂产品

引言

蜂蜜是由蜜蜂采集花蜜而来, 富含人体必需的各类营养物质如葡萄糖、果糖、氨基酸、酶类、矿物质和抗氧化物质等, 是重要的天然食品。蜂王浆是由工蜂的舌腺和上颚腺分泌的混合物, 具有非常好的保健和药用价值。然而, 实际生产中蜜蜂容易受到细菌、真菌、病毒和外来寄生螨类的侵染而引起病害。控制和治理这些疾病通常的方法是直接饲喂兽药或者在蜂巢中喷洒, 因此可能导致蜂蜜和蜂王浆等蜂产品中的兽药残留问题, 对消费者造成潜在威胁。在这样的背景下, 农业农村部、国家卫生健康委员会和国家市场监督管理总局公告 2019 年第 114 号, 《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》(GB 31650-2019, 代替农业部公告第 235 号中的相应部分) 及 9 项兽药残留检测方法食品安全国家标准颁布实施。本文采用高效液相色谱串联质谱建立了对于新颁布实施的蜂蜜类产品的检测标准进行了前处理和方法学验证工作, 该方法的优势和特点:

1. 方法灵敏度高: 所有化合物灵敏度足以满足 GB 31657.2-2021、GB 31657.1-2021 标准的限量要求;
2. 紧扣标准: 前处理方法与以上标准要求保持一致, 方法实用性强;

1 实验方法

1.1 样品前处理

方法 1: 本方法适用于 (GB 31657.2-2021) 蜂蜜和蜂王浆中喹诺酮类药物残留量检测。取蜂蜜试样 2 g (准确至 ± 0.02 g), 于

50 mL 聚丙烯离心管中, 加磷酸盐缓冲液 (4.2.1) 20 mL, 涡旋 1 min, 振荡 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 备用。取蜂王浆试样 2 g (准确至 ± 0.02 g), 于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加磷酸盐缓冲液 (4.2.1) 10 mL, 涡旋 1 min, 振荡 10 min, 4°C 下 10 000 r/min 离心 10 min, 移取上清液至另一离心管。残渣加磷酸盐缓冲液 (4.2.1) 10 mL 重复提取, 合并两次上清液, 玻璃纤维滤纸 (4.5.3) 过滤, 备用。HLB 固相萃取柱 (4.5.1) 分别用甲醇 10 mL、水 10 mL 活化, 备用液过柱, 用水 5 mL 淋洗, 抽干, 分别用 5% 甲酸甲醇 (4.2.2) 和乙酸乙酯各 4 mL 洗脱, 抽干, 收集洗脱液, 40°C 氮气吹干。用 20% 乙腈甲酸水溶液 (4.2.4) 1.00 mL 溶解残余物, 超声 1 min, 涡旋混匀 (蜂王浆样品溶液需在 4°C 下 20 000 r/min 离心 10 min), 上清液过微孔尼龙滤膜, 供液相色谱串联质谱测定。

方法 2: 本方法适用于 (GB 31657.1-2021) 蜂蜜和蜂王浆中氟胺菊酯残留量检测。取蜂蜜 5 g (准确至 ± 0.02 g) [蜂王浆 2 g (准确至 ± 0.02 g)], 于 50 mL 具塞聚丙烯离心管, 加水 10 mL, 涡旋混合 1 min, 使溶解。加正己烷-丙酮溶液 (1:1) 20 mL, 涡旋 3 min, 3000 r/min 离心 5 min, 取上层于 150 mL 鸡心瓶。用正己烷-丙酮溶液 (1:1) 20 mL 重复提取一次, 合并上层液, 40°C 水浴减压浓缩至近干, 加正己烷 3 mL 使溶解, 备用。弗罗里硅土固相萃取柱依次用正己烷-丙酮溶液 (95:5)、正己烷各 5 mL 活化, 取备用液过柱, 再用正己烷 3 mL 洗涤鸡心瓶, 洗液过柱, 弃去此部分流出液。用正己烷-丙酮溶液 (95:5) 10 mL 洗脱, 收集洗脱液, 40°C 水浴氮气吹至干, 用 10% 甲醇水 1.0 mL 复溶, 供测定。

1.2 液相色谱条件

液相系统: SCIEX ExionLC™ 系统

色谱柱: Phenomenex C18 (100×2.1 mm, 1.7 μm)

流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈

流速: 0.3 mL/min

柱温: 40°C

洗脱程序: 梯度洗脱

1.3 质谱条件

质谱系统: SCIEX 三重四级杆质谱系统

扫描模式: 多反应监测 MRM;

离子源: ESI 源;

喷雾电压 (IS): 5500V; 离子源温度 (TEM): 550°C;

气帘气 (CUR): 35 psi; 碰撞气 (CAD): Medium;

雾化气 (GS1): 55 psi; 辅助雾化气 (GS2): 55psi; MRM

离子对见 (表 1)

母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	化合物名称	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)	标准编号
362.2	318.1	Ofloxacin 1	80	26	GB 31657.2
362.2	261.1	Ofloxacin 2	80	38	GB 31657.2
321	303	Enoxacin 1	80	24	GB 31657.2
321	234	Enoxacin 2	80	30	GB 31657.2
321.1	277	Enoxacin 3	36	21	GB 31657.2
321.1	234	Enoxacin 4	36	31	GB 31657.2
332.1	288.1	Ciprofloxacin 1	80	25	GB 31657.2
332.1	245.1	Ciprofloxacin 2	80	33	GB 31657.2
332.1	314	Ciprofloxacin 3	46	25	GB 31657.2
352	265	Lomefloxacin 1	80	33	GB 31657.2
352	308.1	Lomefloxacin 2	80	28	GB 31657.2
352.2	237	Lomefloxacin 3	36	43	GB 31657.2
358.1	340.1	Danofloxacin 1	77	30	GB 31657.2
358.1	314.1	Danofloxacin 2	77	24	GB 31657.2
358.2	314	Danofloxacin 3	56	23	GB 31657.2
400.1	356.1	Difloxacin 1	80	28	GB 31657.2
400.1	299.1	Difloxacin 2	80	41	GB 31657.2
400.2	382	Difloxacin 3	46	29	GB 31657.2
262	244.1	Oxolinic acid 1	70	26	GB 31657.2
262	216.1	Oxolinic acid 2	70	40	GB 31657.2
262.1	160	Oxolinic acid 3	26	47	GB 31657.2
263.1	217.1	Cinoxacin 1	60	30	GB 31657.2
263.1	245	Cinoxacin 2	60	22	GB 31657.2
263.1	189	Cinoxacin 3	26	37	GB 31657.2
233	215	Nalidixic acid 1	68	18	GB 31657.2
233	187	Nalidixic acid 2	68	34	GB 31657.2
233.1	159	Nalidixic acid 3	21	41	GB 31657.2
370	326.1	Fleroxacin 1	80	27	GB 31657.2
370	269.2	Fleroxacin 2	80	35	GB 31657.2
370.1	352	Fleroxacin 3	31	27	GB 31657.2
376.2	261	Gatifloxacin 1	41	41	GB 31657.2
376.2	289	Gatifloxacin 2	41	29	GB 31657.2
376.2	332	Gatifloxacin 3	36	23	GB 31657.2
396	352	Orbifloxacin 1	80	24	GB 31657.2
396	295.2	Orbifloxacin 2	80	32	GB 31657.2
396.2	267	Orbifloxacin 3	36	47	GB 31657.2
393	349.2	Sparfloxacin 1	80	30	GB 31657.2
393	292	Sparfloxacin 2	80	38	GB 31657.2
393.2	251	Sparfloxacin 3	41	43	GB 31657.2
304.2	286.2	Pipemidic Acid 1	80	25	GB 31657.2
304.2	217.1	Pipemidic Acid 2	80	31	GB 31657.2

表 1. 离子对信息

母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	化合物名称	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)	标准编号
503	181	Fluvalinate 1	92	40	GB 31657.1
503	208	Fluvalinate 2	92	17	GB 31657.1
320.1	276.1	Norfloxacin 1	80	26	GB 31657.2
320.1	233.1	Norfloxacin 2	80	35	GB 31657.2
320.1	302	Norfloxacin 3	41	27	GB 31657.2
360.1	316.1	Enrofloxacin 1	80	28	GB 31657.2
360.1	245.1	Enrofloxacin 2	80	36	GB 31657.2
360.2	342	Enrofloxacin 3	41	27	GB 31657.2
386.1	342.1	Sarafloxacin 1	90	28	GB 31657.2
386.1	299.1	Sarafloxacin 2	90	37	GB 31657.2
386.1	368	Sarafloxacin 3	36	29	GB 31657.2
262.1	244.1	Flumequin 1	77	23	GB 31657.2
262.1	202.1	Flumequin 2	77	42	GB 31657.2
262.1	174	Flumequin 3	26	49	GB 31657.2
363.1	320.1	Marbofloxacin 1	80	23	GB 31657.2
363.1	72	Marbofloxacin 2	80	46	GB 31657.2
363.2	345	Marbofloxacin 3	36	25	GB 31657.2
334.1	316.1	Pefloxacin 1	80	27	GB 31657.2
334.1	290.2	Pefloxacin 2	80	25	GB 31657.2

2 实验结果与讨论

2.1 色谱条件优化

实验详细优化了色谱条件，比较了不同品牌、不同型号的色谱柱以及流动相，不仅所有的化合物得到很好的分离，同时保证所有的化合物有着尖锐的峰形，竟而有效地避开基质干扰，优化后的色谱梯度能够很好的将各个化合物分开，让定量结果更加准确。

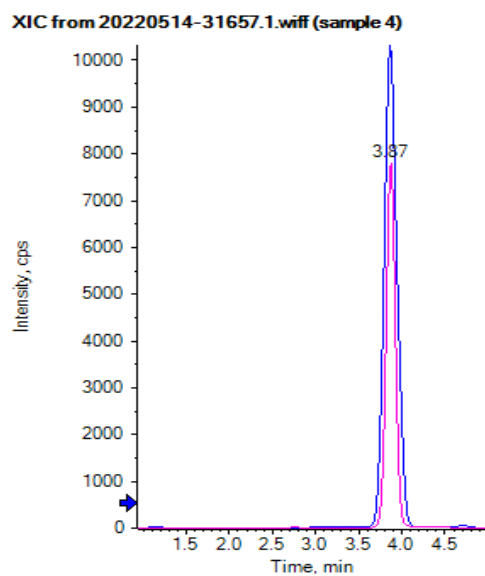


图 1. 蜂蜜和蜂王浆中氟胺氰菊酯提取提取离子流图 (GB 31657.2-2021)

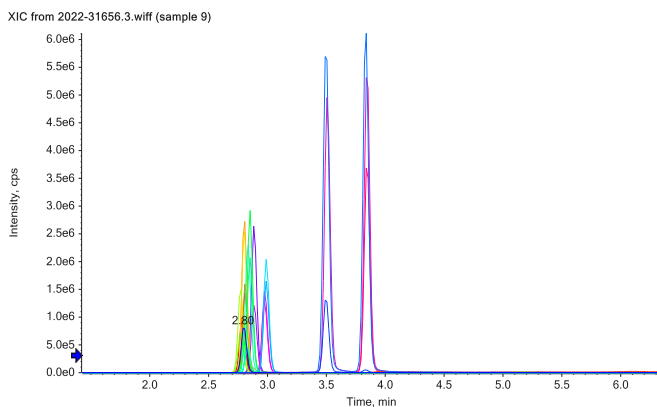


图 2. 蜂蜜和蜂王浆中喹诺酮类药物提取提取离子流图 (GB 31657.2-2021)

2.2 方法考察了重复性、线性等

实验分别按照前述前处理方法，选取适用的蜂蜜空白基质添加 1 倍和 5 倍地定量限两个浓度，每个浓度重复 6 次，准确度在 83.58%-105.59% 之间 (n=6)，相对标准偏差小于 2.31% (表 3)，实验结果表明该方法具有较好的准确度以及良好的稳定性。基质加标曲线相关系数均大于 $r > 0.995$ (图 2)，表明线性良好。该方法完全满足标准定量检测的要求。

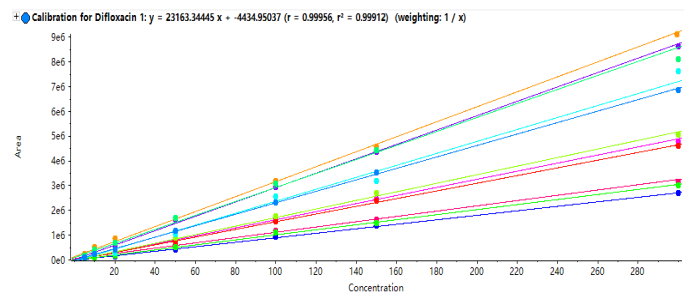


图 3. 蜂蜜中喹诺酮类药物线性回归曲线 (GB 31657.1-2021)

表 2. 回收率及重复性实验 (n=6)

化合物名称	添加浓度 (µg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
氟胺氰菊酯	5/10	92.61	2.24
	25/50	96.42	1.38
诺氟沙星	1	89.25	2.21
	5	92.46	0.96
恩诺沙星	1	85.36	1.18
	5	92.89	2.29
沙拉沙星	1	89.34	1.94
	5	102.56	2.42
氟甲喹	1	103.56	0.95
	5	99.37	1.26
马波沙星	1	101.85	1.97
	5	97.45	1.63
培氟沙星	1	88.93	2.10
	5	93.19	1.19
氧氟沙星	1	89.37	1.73
	5	92.16	0.87
依诺沙星	1	85.93	2.04
	5	95.85	2.06

表 2. 回收率及重复性实验 (n=6) (续)

化合物名称	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
环丙沙星	1	105.19	1.65
	5	104.63	1.59
洛美沙星	1	102.40	2.04
	5	99.48	1.77
达氟沙星	1	105.29	1.93
	5	97.89	2.11
双氟沙星	1	103.83	1.68
	5	99.18	1.92
噁喹酸	1	103.94	2.16
	5	104.28	2.03
西诺沙星	1	92.01	1.63
	5	83.58	0.84
萘啶酸	1	89.20	1.38
	5	90.38	1.96
氟罗沙星	1	95.73	0.92
	5	103.46	1.45
加替沙星	1	89.34	2.29
	5	87.30	2.31
奥比沙星	1	89.29	1.95
	5	92.08	2.03
司帕沙星	1	104.38	0.75
	5	96.82	1.19
吡哌酸	1	104.86	1.84
	5	93.29	2.03

注：氟胺氟菊酯蜂蜜和蜂王浆加标为 1 倍定量限 5.0 和 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 5 倍定量限 25 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

3 小结

本文建立了高效液相色谱 - 串联三重四极杆质谱快速定量分析检测喹诺酮类和氟胺氟菊酯的检测方法。实验严格按照 GB31650-2019 配套相关标准进行，确保了实验结果的有效性，定量结果更准确。该方法足以满足 GB 31657.2-2021、GB 31657.1-2021 蜂产品中喹诺酮类药物、氟胺氟菊酯残留量的测定要求，在蜂蜜的分析检测具有重要的参考意义。

SCIEX 临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅 <https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于 AB Sciex Pte. Ltd. 或在 美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14908-ZH-A



SCIEX 中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808-1388
传真: 010-5808-1390
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419-7200
传真: 021-2419-7333
官网: sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510-0200
传真: 020-3876-0835
官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)