

蜂蜜中氯霉素的检测、确认和定量

联用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统与
Agilent Ultivo LC/TQ 系统

作者

Vikrant Goel
安捷伦科技有限公司

摘要

本应用简报介绍了使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱与 Agilent Ultivo LC/TQ 的联用系统分析蜂蜜样品中皮克级的极低含量氯霉素 (CAP)。此方法采用 Agilent Ultivo LC/TQ 开发，尽管该系统体积小，但结果毫不逊色。此应用是食品行业中蜂蜜生产、加工和商业化样品常规检测的理想选择，也十分适合用于学术研究目的。使用基于液液萃取 (LLE) 的简单样品前处理方法，能够成功实现基质中 50 ppt 的定量限 (LOQ)。

前言

CAP 是一种能够抑制蛋白质合成的广谱抗生素，长期接触会导致罕见且严重的血液疾病（再生障碍性贫血）以及骨髓损伤。由于 CAP 对人体具有明显的毒性作用，因此食品中的含量不得高于 0.3 ppb 的最低性能要求限值 (MRPL)^[1,2]。

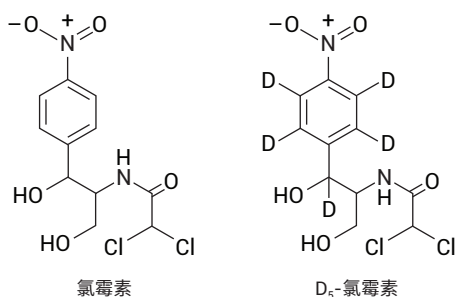


图 1. CAP 和氘代 CAP

三重四极杆 LC/MS 系统是美国、欧盟、FSSAI 和其他国家/地区用于确认蜂蜜中 CAP 的金标准。本应用采用最新款三重四极杆 LC/MS 系统 Ultivo LC/TQ。使用 Ultivo LC/TQ 获得的灵敏度优于欧盟食品法规规定的 MRPL。

此工作流程仅使用 LLE，而传统方法需要结合 LLE 和固相萃取 (SPE)。由于省去了 SPE 步骤，我们实现了一种简单、省时的高性价比解决方案（图 2）^[3,4,5]。

通过采用结构相似的 CAP-d₅ 作为内标以减少变异，这一基于 Ultivo LC/TQ 的解决方案展现出了优异的特异性、线性和稳定性，能够提供可靠的结果。

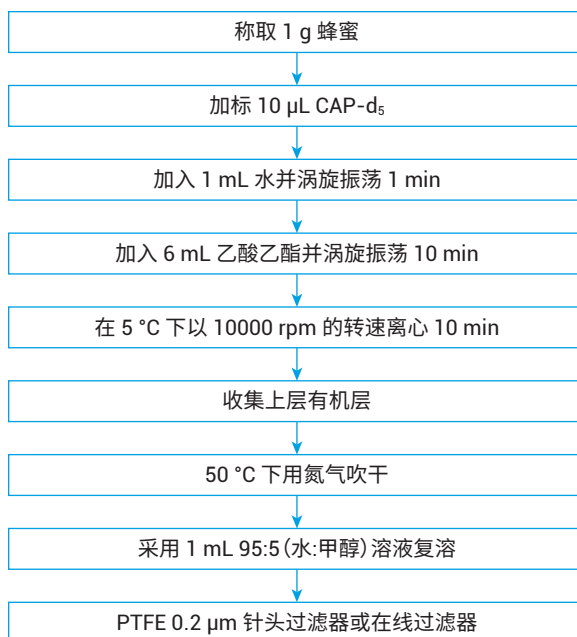


图 2. 基于 LLE 的样品前处理

实验部分

本研究采用以下溶剂：乙腈（Honeywell，LC/MS，货号 34967）；甲醇（Honeywell，LC/MS，货号 34966）；水（Millipore，Milli-Q）；乙酸乙酯（分析纯，Rankem）；氯霉素（安捷伦科技公司，货号 5091-0591）。CAP 的所有工作稀释液均采用 100% 甲醇配制。

表 1. HPLC 梯度方法

参数	值																		
色谱柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685775-922)																		
流动相	A) 水 B) 甲醇; 500 μL/min																		
进样量	25 μL																		
柱温	50 °C																		
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>水 (100%)</th><th>甲醇 (100%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>2.5</td><td>2</td><td>98</td></tr><tr><td>3.0</td><td>2</td><td>98</td></tr><tr><td>3.5</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>5.0</td><td>95</td><td>5</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	水 (100%)	甲醇 (100%)	0.0	95	5	2.5	2	98	3.0	2	98	3.5	95	5	5.0	95	5
时间 (min)	水 (100%)	甲醇 (100%)																	
0.0	95	5																	
2.5	2	98																	
3.0	2	98																	
3.5	95	5																	
5.0	95	5																	

仪器

- Agilent 1260 Infinity II 全能泵 (G7104C)
- Agilent 1260 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129C)
- Agilent 1260 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116A)
- 配备 AJS 离子源的 Agilent Ultivo LC/TQ (G6465A)

结果与讨论

由于规定的 MRPL 为 300 ppt，大多数分析实验室普遍将 100 ppt 设置为常规 LOQ。所提出的方法的检测限 (LOD) 为 25 ppt。但是，考虑到蜂蜜产品的多样性，建议的 LOQ 为 50 ppt。图 3 的 MRM 色谱图展示了稀释剂空白、LOD 和 LOQ。此外，通过进样各种浓度的 CAP 稀释液，获得了可重现的洗脱曲线，如图 4 所示。表 2 显示了六次重复测定获得的 CAP 浓度计算值的变异系数 (CV%) 数据。

表 2. Agilent Ultivo LC/TQ 条件

参数	设置	
电离模式	AJS (负离子模式)	
雾化器气体	35 psi	
干燥气	10 L/min, 350 °C	
鞘气	12 L/min, 400 °C	
毛细管电压	2000 V	
喷嘴电压	1500 V	
碎裂电压	90 V	
CAV	9 V	
驻留时间	50 ms	
分辨率	Unit/Unit	
分析物	MRM 离子对	CE (V)
CAP	321/151.9	9
CAP	321/257.1	2
CAP	321/194.0	3
CAP-d ₅	326/157.0	9

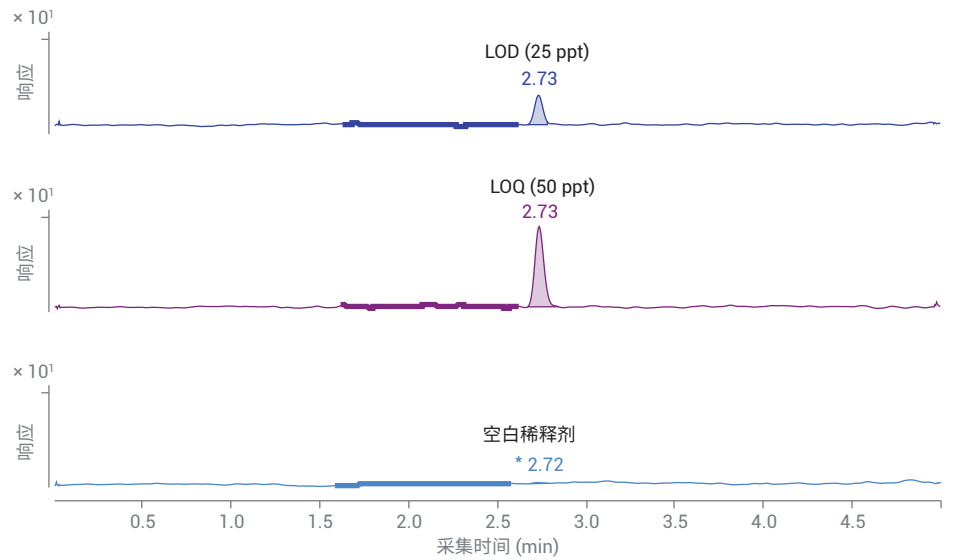


图 3. Agilent Ultivo LC/TQ 分析 CAP 的灵敏度

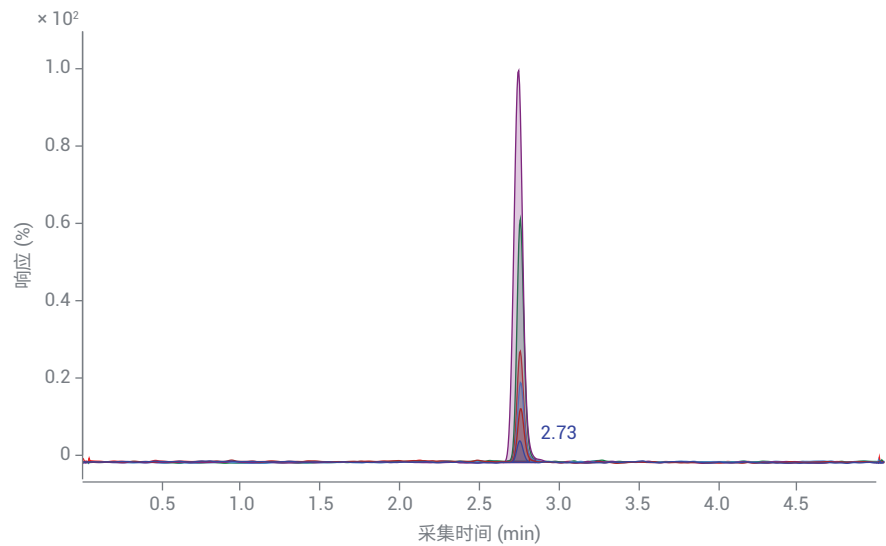


图 4. 各种浓度 CAP 的叠加色谱图

校准和线性

在 50–600 ppt 浓度范围内生成了相对响应 (CAP 与 CAP-d₅ 的峰面积比) 的校准线性图 (图 5)。为实现数据的严谨性, 在每个浓度水平下进行三次重复测定, 在 LOQ 水平下进行六次重复测定。图 6 所示为校准表截图, 其中包含一个定量离子、两个定性离子以及 MRM 比, 符合法规要求。

蜂蜜样品的定量分析

将该方法扩展到市售蜂蜜样品。蜂蜜购自印度德里的当地商店 (品牌 1、品牌 2 和品牌 G) 和路边摊贩 (当地样品和当地样品 2)。所有样品进行三次重复测定。图 7 表明, 结果报告的 CAP 浓度低于 EU-MRPL 浓度 300 ppt。

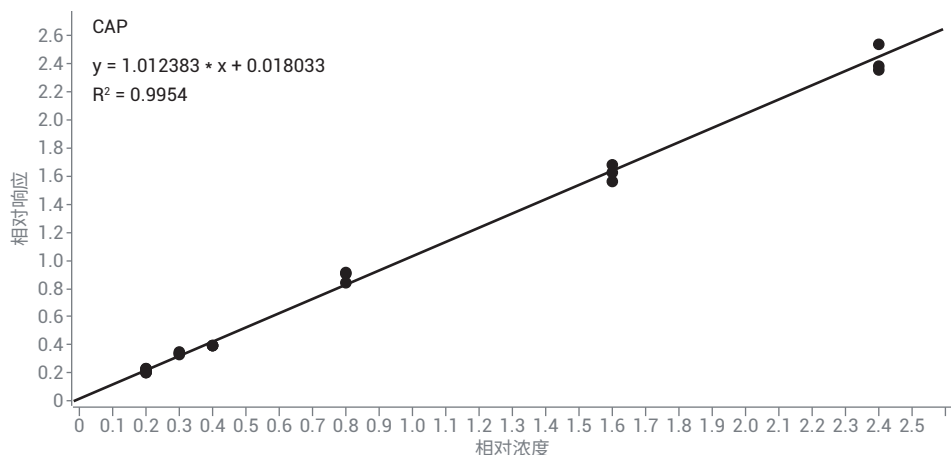


图 5. 50–600 ppt 范围内的线性曲线 (R² = 0.9953)

Sample			CAP Met..	CAP Results				Qualifier..	Qualifier..	CAP-IS (ISTD) R..
Type	Level	Acq. Date-Time (Inst.)	Exp. Conc.	RT	Calc. Conc.	Accuracy	ISTD Resp. Ratio	Ratio	Ratio	RT
Blank		8/24/2018 4:18 AM		2.59	0.00		0.0061		208.3	2.72
Cal	1	8/24/2018 1:54 AM	50.00	2.73	43.47	86.9	0.2061	87.3	47.7	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:06 AM	50.00	2.73	42.73	85.5	0.2031	110.6	44.4	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:12 AM	50.00	2.73	48.06	96.1	0.2244	92.0	38.5	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:18 AM	50.00	2.73	48.88	97.8	0.2277	84.6	40.7	2.72
Cal	1	8/24/2018 2:24 AM	50.00	2.73	49.16	98.3	0.2288	104.3	47.7	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:30 AM	50.00	2.73	42.17	84.3	0.2008	80.7	39.1	2.73
Cal	2	8/24/2018 2:42 AM	75.00	2.73	86.21	114.9	0.3768	88.0	41.5	2.72
Cal	2	8/24/2018 2:48 AM	75.00	2.73	82.51	110.0	0.3621	105.0	43.3	2.73
Cal	2	8/24/2018 2:54 AM	75.00	2.73	81.06	108.1	0.3563	87.4	47.4	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:06 AM	100.00	2.73	89.71	89.7	0.3908	96.7	48.9	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:12 AM	100.00	2.73	89.93	89.9	0.3917	100.9	39.7	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:18 AM	100.00	2.73	91.81	91.8	0.3992	90.0	38.6	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:24 AM	200.00	2.73	219.27	109.6	0.9086	103.6	47.5	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:36 AM	200.00	2.73	217.76	108.9	0.9025	104.5	46.3	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:42 AM	200.00	2.73	205.06	102.5	0.8518	109.8	46.2	2.72
Cal	5	8/24/2018 3:48 AM	400.00	2.72	399.33	99.8	1.6281	90.5	43.9	2.71
Cal	5	8/24/2018 3:54 AM	400.00	2.72	380.87	95.2	1.5543	95.3	46.6	2.71
Cal	5	8/24/2018 4:00 AM	400.00	2.71	412.19	103.0	1.6795	94.3	43.7	2.71
Cal	6	8/24/2018 11:48 AM	600.00	2.73	583.31	97.2	2.3633	94.6	42.2	2.72
Cal	6	8/24/2018 11:54 AM	600.00	2.72	584.87	97.5	2.3696	98.3	43.3	2.71
Cal	6	8/24/2018 12:00 PM	600.00	2.71	626.66	104.4	2.5366	95.1	41.4	2.71

图 6. 50–600 ppt 范围内 CAP 的校准表

蜂蜜样品中的回收率

不包含 2.73 ± 0.1 分钟处的色谱峰且离子比符合 EU 指南规定的样品被视为阴性样品^[6]。品牌 G 样品的 CAP 浓度高于 LOD 值，当地样品 2 的 CAP 浓度高于 LOQ 值。此外，通过向蜂蜜样品中添加 50 ppt CAP 进行加标实验，如图 7 所示。在表 3 所示的加标研究中，所有五个样品均表现出了良好的回收率 (80%–120%)，证实了所提出的方法适用于对蜂蜜进行常规 CAP 分析。

结论

本方法的 LOQ 是 EU-MRPL 的 1/6。本研究中的 LC 方法使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120, 2.7 μm 色谱柱在低压下实现了 UHPLC 分离。基于 LLE 的样品前处理方法采用简单且省时的步骤。根据欧盟标准，成功分析了真实蜂蜜样品中的 CAP。

Sample			CAP Results			Qualifi...	Qualifi...	CAP-IS (...)
Name	Type	Acq. Date-Time	RT	MI	Final Conc.	Ratio	Ratio	RT
Brand1	Sample	8/24/2018 12:12 P...	2.973		4.55			2.721
Brand1	Sample	8/24/2018 12:18 P...	2.978		15.36	102.6		2.721
Brand1	Sample	8/24/2018 12:24 P...	2.431		23.49	63.9		2.726
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:30 P...	2.732		40.89	101.6	47.1	2.726
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:36 P...	2.727		41.76	95.4	54.6	2.726
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:42 P...	2.732		41.39	77.4	51.9	2.726
Brand2	Sample	8/24/2018 12:48 P...	2.978		89.47	15.6	3.3	2.726
Brand2	Sample	8/24/2018 12:54 P...	2.431		67.75	55.8	146.5	2.726
Brand2	Sample	8/24/2018 1:00 PM	2.983		128.01	15.8	9.6	2.726
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:06 PM	2.732		44.81	93.7	36.4	2.721
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:12 PM	2.732		42.73	87.3	57.8	2.726
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:18 PM	2.727		38.41	93.1	49.7	2.726
BrandG	Sample	8/24/2018 1:24 PM	2.727		25.90	100.0	47.1	2.726
BrandG	Sample	8/24/2018 1:30 PM	2.732		30.59	96.2	49.4	2.726
BrandG	Sample	8/24/2018 1:36 PM	2.732		28.61	112.0	57.6	2.726
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:42 PM	2.732		74.66	90.6	49.7	2.720
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:48 PM	2.727		77.49	103.1	51.1	2.721
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:54 PM	2.732		83.27	107.3	42.1	2.726
Local	Sample	8/24/2018 2:00 PM	2.743		0.00	318.5		2.726
Local	Sample	8/24/2018 2:06 PM	2.732		2.10		156.5	2.726
Local	Sample	8/24/2018 2:12 PM	2.620		0.00	390.9	72.5	2.726
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:18 PM	2.732		48.68	77.2	39.2	2.726
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:24 PM	2.732		41.78	113.2	53.8	2.726
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:30 PM	2.732		51.07	75.9	55.6	2.726
Local2	Sample	8/24/2018 2:36 PM	2.732		130.33	95.7	40.3	2.726
Local2	Sample	8/24/2018 2:42 PM	2.732		142.36	99.0	41.4	2.726
Local2	Sample	8/24/2018 2:48 PM	2.727		164.55	88.2	47.4	2.721
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 2:54 PM	2.732		193.57	100.3	44.1	2.726
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 3:00 PM	2.732		207.12	83.0	45.5	2.726
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 3:06 PM	2.732		197.05	96.4	44.8	2.726

图 7. 市售样品和以 LOQ 浓度加标的市售样品

表 3. 各种蜂蜜中的氯霉素

市售样品	加标前浓度 (a)	加标后浓度 (b)	% 回收率 = $100(b-a)/50$
品牌 1	ND	41.35 ppt	82.69%
品牌 2	ND	41.98 ppt	83.96%
品牌 G	28.37 ppt	78.47 ppt	100.20%
当地样品	ND	47.18 ppt	94.35%
当地样品 2	145.75 ppt	199.25 ppt	107.0%

参考文献

1. Scientific Opinion on Chloramphenicol in Food and Feed. *EFSA Journal* **2014**, 12(11), 3907
2. Commission Decision 2003/181/EC
3. Fang, Y. et al. Detection, Confirmation, and Quantification of Chloramphenicol in Honey and Shrimp at Regulatory Levels Using Quadrupole and Ion Trap LC/MS Application (使用四极杆和离子阱 LC/MS 在监管浓度下对蜂蜜和虾中的氯霉素进行检测、确认和定量), *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5988-9920EN, **2007**
4. Zhao, L. 等, 使用 Agilent SampliQ OPT 固相萃取柱和液相色谱-串联质谱测定蜂蜜中的氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5990-3615CHCN, **2009**
5. Jin-Lan, S. 等, 采用 LC-MS/MS 结合改进的 QuEChERS 方法对动物源食品中的 36 种兽药进行筛查, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-0013CHCN, **2012**
6. SANTE/11813/2017

www.agilent.com/chem

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技 (中国) 有限公司, 2019
2019 年 9 月 6 日, 中国出版
5994-1317ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

