

雷美康, 候建波, 彭芳, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜡中氯霉素、甲矾氯霉素、氟苯尼考和其代谢产物氟苯尼考胺残留 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 241-246. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100039

LEI Meikang, HOU Jianbo, PENG Fang, et al. Determination of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine Residues in Beeswax by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 241-246. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100039

· 分析检测 ·

固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜡中氯霉素、甲矾氯霉素、氟苯尼考和其代谢产物氟苯尼考胺残留

雷美康^{1,2}, 候建波¹, 彭芳^{1,2}, 张文华¹, 祝子铜^{1,2}, 章应俊², 陈玉娇², 谢文^{1,*}

(1. 杭州海关技术中心, 浙江杭州 310016;

2. 衢州海关综合技术服务中心, 浙江衢州 324003)

摘要: 首次建立了一种同时测定蜂蜡中氯霉素、甲矾氯霉素、氟苯尼考和其代谢物氟苯尼考胺等药物残留的固相萃取-高效液相色谱-串联质谱分析方法。根据蜂蜡脂溶性的特点, 试样采用正己烷溶剂预溶解, 用水提取 2 次后经混合型阳离子交换固相萃取柱 (MCX) 净化, 用 InertSustain Swift C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm) 分离, 多反应监测 (MRM) 模式串联质谱进行测定, 以内标法定量。结果表明, 在 0.1~10 ng/mL 范围内 4 种测定物均具有较好的线性关系, 相关系数大于 0.99, 方法定量限 (S/N>10) 为 0.1 μg/kg。对阴性蜂蜡在 0.1、0.3 和 1.0 μg/kg 等 3 个添加水平下分别进行加标回收试验, 实际样品中 4 种测定物质的平均回收率在 65.0%~113.2% 之间, 相对标准偏差 (RSD, n=6) 小于 20%。应用本方法对 15 个蜂蜡样品进行检测, 结果表明有 4 批次样品检出氯霉素类药物残留。本方法快速、灵敏、准确, 适用于日常大批量蜂蜡样品中氯霉素类药物及其代谢物残留的定性、定量分析。

关键词: 蜂蜡, 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱, 氯霉素, 甲矾氯霉素, 氟苯尼考, 氟苯尼考胺

中图分类号: S896.8

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)17-0241-06

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100039



本文网刊:

Determination of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine Residues in Beeswax by Solid Phase Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LEI Meikang^{1,2}, HOU Jianbo¹, PENG Fang^{1,2}, ZHANG Wenhua¹, ZHU Zitong^{1,2}, ZHANG Yingjun², CHEN Yujiao², XIE Wen^{1,*}

(1. Technical Center of Hangzhou Customs, Hangzhou 310016, China;

2. The Comprehensive Technology and Service Center of Quzhou Customs, Quzhou 324003, China)

Abstract: A method based on solid-phase extraction and high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (SPE-HPLC-MS/MS) had been proposed for the determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine residues in beeswax. The sample was pre dissolved with n-hexane and then extracted with water, purified the Waters Oasis MCX micro-column and separated on the InertSustain Swift C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.9 μm). The determination was carried out with electrospray ion source and multiple

收稿日期: 2020-10-12

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0401105)。

作者简介: 雷美康 (1982-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: leimeikang@163.com。

* 通信作者: 谢文 (1966-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 食品有害物质残留分析, E-mail: xw@zaiq.org.cn。

reaction monitoring (MRM) mode and the corresponding quantification was performed by employing the method of internal standards. The calibration curve of mixed standard solution showed a good linearity in the concentration rang from 0.1 to 10 ng/mL with the correlation coefficients (r) more than 0.99. The limits of quantification ($S/N>10$) for antibiotics were 0.1 $\mu\text{g/kg}$. The recovery was 65.0% to 113.20% in the spiked concentration 0.1, 0.3 and 1.0 $\mu\text{g/kg}$, with the relative standard deviations (RSD, $n=6$) lower than 20%. The method was applied to detect 15 beeswax samples, and the results showed that chloramphenicol residues were detected in 4 batches of samples. The method is rapid, sensitive and accurate, and could be applied for the qualitative and quantitative analysis of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine residues antibiotics in beeswax.

Key words: beeswax; solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; chloramphenicol; thiamphenicol; florfenicol; florfenicol amine

蜂蜡是一种由工蜂腹部下面四对蜡腺分泌的物质,其主要成分是烷醇和烷酸形成的酯类,在食品工业、化妆品、农业和医药工业上应用广泛^[1-4]。蜂农在养殖蜜蜂过程中使用氯霉素类药物用于预防和治疗蜜蜂的幼虫腐烂病等疾病,有可能造成蜂蜡中氯霉素类药物或其代谢物的残留。由于蜂蜡的循环使用导致巢脾中药物残留种类、残留量不断增加,直接影响了蜂蜡的质量安全^[5-7]。同时通过蜂蜜与巢脾的接触,氯霉素类药物及其代谢物能够转移至其他蜂产品中,进而造成蜂蜜、蜂王浆和蜂胶的污染^[8-10]。氯霉素类药物及其代谢物在蜂蜡中的残留不仅关系到人们身体健康,也将对我国蜂产品出口贸易产生巨大的风险。

氯霉素类药物属广谱抗生素,对革兰氏阴、阳性细菌均有抑制作用,常见的药物主要包括氯霉素(chloramphenicol, CAP)、甲砒氯霉素(thiamphenicol, TAP)和氟苯尼考(flорfenicol, FF)等^[11],其中氯霉素被世界多个国家列入禁止使用的兽药名单中^[12-14]。由于甲砒氯霉素和氟苯尼考,其抗菌谱与氯霉素相似,较氯霉素其毒性有所降低,被广泛用于养殖业。为保障食品安全,欧盟、日本和我国等均制定了其在动物源性食品中的最大残留限量,如 GB 31650-2019^[15]规定了动物源性食品中甲砒氯霉素和氟苯尼考最高残留限量分别为 50 $\mu\text{g/kg}$ 和 100~3000 $\mu\text{g/kg}$ 。

近年来,国内外关于氯霉素类药物及代谢物残留检测方法的研究越来越得到人们的重视^[16-20],主要基质为畜禽产品、水产品和蜂蜜等,但尚未见蜂蜡中氯霉素类药物残留量同时检测方法的报道。为保障蜂蜡产品的质量安全,同时为更好地监控蜂产品的污染状况,溯源蜂蜜、蜂王浆等其他蜂产品的药物污染来源提供检测技术支持。本文首次建立了正己烷预处理-固相萃取净化-超高效液相色谱电喷雾电离-串联质谱检测蜂蜡中痕量氯霉素类药物的分析方法,该法具有简便、灵敏度高、基质干扰小等优点,可用于大批量蜂蜡实际样品中痕量氯霉素、甲砒氯霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺残留的定性和定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

标准物质:氯霉素(CAS 56-75-7,纯度 $\geq 98\%$)、氯霉素-D5(纯度 $\geq 98\%$)、甲砒氯霉素(CAS 15318-

45-3,纯度 $\geq 98\%$)、氟苯尼考(CAS 76639-94-6,纯度 $\geq 98\%$)和氟苯尼考-D3(纯度 $\geq 98\%$)、氟苯尼考胺(CAS 76639-94-5,纯度 $\geq 98\%$)、氟苯尼考胺-D3(纯度 $\geq 98\%$) 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司;甲醇、正己烷 色谱纯,美国 fisher 公司;氨水 分析纯,国药集团化学试剂有限公司;甲酸 分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;超纯水 Millipore 纯水仪制备;OASIS HLB 固相萃取小柱:500 mg, 6 mL 美国 Waters 公司;蜂蜡样品 采购于某网购平台和某蜂产品生产企业提供,常温保存。

1260-6460 液相色谱-串联质谱仪 美国安捷伦科技有限公司;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;KQ-500B 超声波清洗仪 昆山市超声仪器公司;Milli-Q Advantage A10 超纯水系统 美国密理博公司。

1.2 实验方法

1.2.1 蜂蜡预处理 试样可放置于烧杯中,在 70 $^{\circ}\text{C}$ 左右^[8]加热条件下溶解并混匀。

1.2.2 样品提取 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 混合内标溶液(10 ng/mL),加入 10 mL 正己烷,涡旋超声溶解后加入 5 mL 水涡旋振荡提取,8000 r/min 离心 5 min,取下层水层,用 5 mL 水再提取一次,合并提取液,待净化。

1.2.3 净化 将提取液转移至 MCX 固相萃取小柱(500 mg/6 mL,使用前依次用 3 mL 甲醇,5 mL 1% 甲酸水溶液活化)中,弃去淋洗液,用 5.0 mL 甲醇-水(1:1, V/V)淋洗,抽干,用 8 mL 5% 氨水甲醇洗脱,收集全部洗脱液,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 以下水浴中氮吹干,用 1.0 mL 甲醇-0.15% 甲酸(2:8, V/V)溶液溶解,混匀后经 0.22 μm 有机相滤膜过滤后用于上机分析^[21]。

1.2.4 色谱条件 色谱柱:InertSustain Swift C_{18} (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.9 μm),流动相:A 为 0.1% 甲酸水,B 为甲醇,流速 0.1 mL/min;进样量 20 μL 。梯度洗脱程序:0~1.0 min, 80%A; 0.5~7 min, 70%A~10%A; 7~8 min, 10%A; 8~8.1 min, 10%A~70%A; 8.1~12 min, 70%A。

1.2.5 质谱条件 电喷雾离子化源(ESI), 正负离子切换扫描模式; 干燥气温度: 350 ℃; 干燥气流速: 5 L/min; 喷雾气压力: 50 psi; 鞘气温度: 350 ℃; 鞘气流速: 12 L/min; 毛细管电压: 3000 V; 多反应监测(MRM), 采集参数见表 1。

1.2.6 标准曲线绘制 分别称取适量 4 种氯霉素类药物标准品用甲醇配制成 500 μg/mL 的标准储备溶液, 储存于-20 ℃ 冰箱中。取适量各标准储备液, 用甲醇稀释成 50 μg/L 的混合标准中间溶液。取适量混合标准中间溶液用流动相逐级稀释配制浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μg/L 的混合标准工作溶液, 其中同位素内标溶液浓度均为 2.5 μg/L。

1.3 数据处理

实验结果采用 OriginLab 9.0 软件进行绘图和处理。

2 结果与分析

2.1 提取条件的选择与优化

蜂蜡属于脂溶性物质, 常温下, 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^[3,8]。所以本文采用加入正己烷溶解蜂蜡样品后, 再加入提取溶剂提取。同时为考察水溶液的种类和水相-有机相比对蜂蜡中氯霉素类药物提取的影响, 本文比较了水、10% 甲醇-水溶液、0.1% 甲酸-水溶液和 0.1% 氨水-水溶液四种提取溶剂的提取效果。采用基质曲线和外标法定量, 前处理提取 2 次, 结果见图 1。

结果表明, 对于氯霉素、甲砒霉素和氟苯尼考, 采用 0.1% 氨水-水溶液的提取回收率均小于 20%; 采用 10% 甲醇-水溶液和 0.1% 甲酸-水溶液的提取回收率 60% 左右, 采用纯水的提取回收率大于 88%。4 种提取溶剂对氟苯尼考胺的提取效率均低于 50%, 其中纯水的提取回收率最高为 45.9%。综合以上试验数据, 同时考虑环保因素, 所以本实验采用水作为提取溶液。

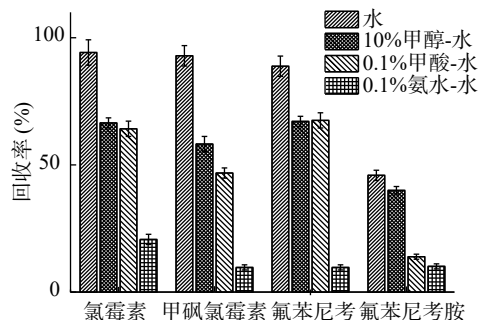


图 1 溶剂对氯霉素类药物提取效果的影响

Fig.1 Recovery rates of chloramphenicol drugs in different extraction solvents

2.2 净化条件的选择和优化

研究比较了亲水亲脂平衡(HLB)和混合型阳离子交换固相萃取柱(MCX)固相萃取小柱对蜂蜡中 4 种氯霉素类药物净化效果和回收率^[22-23]。结果表明: 对于蜂蜡中甲砒氯霉素和氟苯尼考 HLB 净化小柱的回收率略优于 MCX 净化小柱, 但是氟苯尼考胺的回收率只有 14.4%, 见图 2。综合考虑, 所以本实验的净化方法采用 MCX 净化小柱。

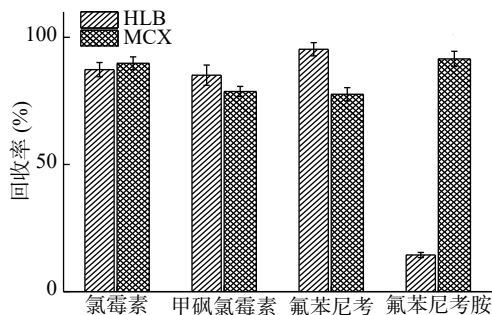


图 2 不同净化方法对氯霉素类药物净化回收率的影响

Fig.2 Recovery rates of chloramphenicol drugs in different purification method

2.3 质谱条件的优化

分别取 1.0 mg/L 氯霉素、氯霉素-D5、甲砒氯霉素、氟苯尼考、氟苯尼考-D3、氟苯尼考胺和氟苯尼

表 1 质谱参数

Table 1 MS parameters

分析物	离子对(m/z)	断裂方式	传输电压(V)	碰撞能量(Ev)	驻留时间(s)
CAP	321.0>256.7*	[M-H-HOCH ₂ -Cl] ⁻	90	2	120
	321.0>151.9	[M-H-HOCH ₂ -CNHCOCCl ₂] ⁻	90	2	120
CAP-d5	326.0>156.9	[M-H-HOCH ₂ -CNHCOCCl ₂] ⁻	100	2	120
FF	355.9>335.7*	[M-H-HF] ⁻	110	2	50
	355.9>184.9	[M-H-HF-CHCH ₂ NHOCCl ₂] ⁻	110	10	50
FF-d3	358.9>187.9	[M-H-HOCH ₂ -Cl] ⁻	80	7	40
TAP	353.9>184.7*	[M-H-HOCH ₂ -Cl] ⁻	130	11	40
	353.9>289.8	[M-H-HOCH ₂ -CNHCOCCl ₂] ⁻	130	2	40
FFA	248.1>230.0*	[M+H-HF] ⁺	80	6	40
	248.1>130.0	[M+H-HF-H ₂ O-CH ₃ SO ₂] ⁺	80	6	40
FFA-d3	251.1>233.1	[M+H-HF-H ₂ O-CH ₃ O ₂] ⁺	110	6	40

注: *表示定量离子。

考胺-D3 的标准溶液,采用流动注射进样的方式,以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 分别对其母离子扫描得到分子离子峰,再对其进行子离子扫描得到碎片离子信息。优化各项质谱参数,使母离子与选取的子离子强度达到最大。优化结果表明,氯霉素、甲砒氯霉素和氟苯尼考在负模式下灵敏度高,氟苯尼考胺在正模式下灵敏度高。氯霉素、甲砒氯霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺的二级质谱图,母离子、子离子的质量数均与文献^[16-20]报道一致。多种氯霉素类药物及其代谢物多反应监测质谱参数见表 1,混合标准溶液的总离子流图见图 3。

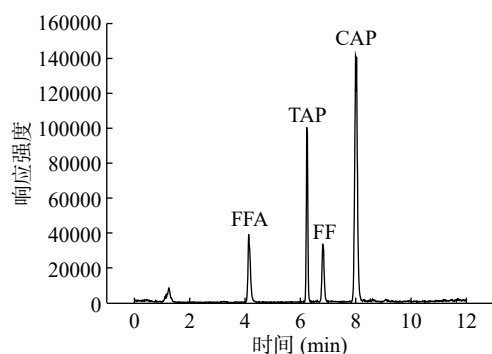


图 3 氯霉素药物标准溶液总离子流图
Fig.3 Total ion current chromatograms of standard of chloramphenicol drugs

2.4 线性关系、检出限和定量限

分别吸取不同浓度的氯霉素类药物标准溶液,用空白基质配制标准曲线,按建立好的方法进行分析,以各目标分析物与内标的浓度比 X 为横坐标,以目标分析物与内标的峰面积比 Y 为纵坐标,进行回归分析,绘制基质加标工作曲线,得到本方法的线性范围,回归曲线方程及相关系数,结果显示,在 0.1~10 ng/mL 范围内,4 种氯霉素类药物均呈现出良好的线性关系(相关系数 $r \geq 0.99$),如表 2 所示。在阴性蜂蜡中加标测定,3 倍信噪比对应的加标水平为方法的检出限,10 倍为定量限。该方法的检出限和定量限符合欧盟、我国等国家动物源性产品中氯霉素类药物残留限量的要求^[15,23]。

表 2 线性范围、回归方程、相关系数、检出限和定量限
Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients, recoveries, limit of detection and limit of quantitation

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{L}$)	检出限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
氯霉素	$Y=1.14812X+0.13923$	0.996	0.1~10	0.1	0.3
甲砒氯霉素	$Y=0.27169X+0.00546$	0.997	0.1~10	0.1	0.3
氟苯尼考	$Y=0.16087X+0.00740$	0.993	0.1~10	0.1	0.3
氟苯尼考胺	$Y=1.14812X+0.13923$	0.998	0.1~10	0.1	0.3

2.5 回收率和精密度

选取阴性蜂蜡样品,分别在 0.1、0.3 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平下进行加标试验,测得的回收率和精密度如表 3 所示。结果显示,蜂蜡中 4 种药物残留的平均

回收率在 65.0%~113.2% 之间,相对标准偏差在 3.9%~18.2% 之间。

表 3 空白样品的加标回收率和相对标准偏差($n=6$)
Table 3 Spiked recoveries rate and relative standard deviations (RSDs) of in blank samples ($n=6$)

化合物	添加量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率(%)	相对标准偏差(%)
氯霉素	0.1	65.0	8.4
	0.3	81.1	14.6
	1.0	100.7	3.9
甲砒氯霉素	0.1	98.3	13.5
	0.3	76.0	12.6
	1.0	77.1	9.9
氟苯尼考	0.1	90.0	14.1
	0.3	88.3	8.2
	1.0	106.7	9.3
氟苯尼考胺	0.1	85.7	16.3
	0.3	96.6	18.2
	1.0	113.2	14.8

2.6 基质效应

本文采用基质空白配制标样响应值(A)与同质量浓度溶剂标样响应值(B)的比值(Matrix effect)进行评价基质效应,其计算公式为 Matrix effect (ME)= $A/B \times 100$ ^[24-26]。当标准工作液浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,氯霉素、甲砒氯霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺基质效应分别为 $ME(\text{氯霉素})=33.9\%$, $ME(\text{甲砒氯霉素})=24.0\%$, $ME(\text{氟苯尼考})=30.8\%$, $ME(\text{氟苯尼考胺})=12.3\%$ 。从实验结果可以看出,蜂蜡基质对氯霉素、甲砒氯霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺四种化合物均表现出较强的基质抑制效应,为消除基质效应带来的影响,本文采用同位素内标以及空白基质提取液配制标准曲线的溶液等方法来降低基质效应的影响。因未采购到甲砒氯霉素的氘代标准物质,所以本文甲砒氯霉素的测定内标采用氯霉素-D5。

2.7 实际样品检测

用上述建立的方法对 15 个蜂蜡样品进行检测,有 4 批次样品检出氯霉素类药物残留,其中 1 批次同时检出了氯霉素和氟苯尼考胺两种物质。检测结果为氯霉素检出 3 批,残留量浓度分别为 0.62、0.77 和 14.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,甲砒氯霉素和氟苯尼考胺各检出 1 批,残留量浓度分别为 1.56 和 0.87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。氟苯尼考药物未检出,原因可能为该药物分解为氟苯尼考胺^[21]。具体情况见表 4。

表 4 15 批次蜂蜡中 4 种氯霉素类药物检测结果
Table 4 Results of 4 kinds of chloramphenicol drugs in 15 batches of beeswax

化合物	检出浓度范围($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出批次	检出率(%)
氯霉素	0.62~14.3	3	20
甲砒氯霉素	1.56	1	6.7
氟苯尼考	未检出	0	0.0
氟苯尼考胺	0.87	1	6.7

对蜂蜡中氯霉素类药物检测结果表明,蜂蜡中氯霉素药物阳性检出率高于蜂蜜、蜂王浆等蜂产品^[27]。

分析原因可能为蜜蜂养殖过程中,为预防或者之类蜂蜜疾病,需要向蜂巢中喷洒药物,造成蜂蜡直接暴露在一定浓度的氯霉素药物中;蜂蜡脂溶性的特点,蜂蜡更容易受到氯霉素类药物的污染^[28-30];蜂蜡可重复用于制造蜂巢,造成了药物在蜂蜡中的累积^[6-7]。

3 结论

本文采用正己烷预溶解,水提取2次,MCX固相萃取小柱净化等前处理方法提取净化,高效液相色谱-串联质谱同位素内标法测定蜂蜡中痕量氯霉素、甲砒氯霉素和氟苯尼考等氯霉素类药物残留量。结果表明,本方法具有简便、灵敏、准确的优点,可以用于蜂蜡中痕量氯霉素类药物残留的定性和定量分析,为蜂产品质量安全控制、污染物溯源、风险分析提供检测技术支持。对蜂蜡中氯霉素类药物检测结果表明,蜂蜡中存在一定的药物残留的安全隐患,希望相关部门给予重视,开展相关风险分析,并制定相应的措施。

参考文献

- [1] 徐国钧,宋鑫.世界主要蜂蜡出口国的国际竞争力分析[J].蜜蜂杂志,2020,40(4):7-10. [Xu Guo-jun, Song Xin. Analysis on international competitiveness of the world's leading exporter of beewax[J]. Journal of Bee, 2020, 40(4): 7-10.]
- [2] 王静琳,汪燕,马振刚.综述蜂蜡的应用[J].蜜蜂杂志,2019,12:9-12. [Wang Jing-lin, Wang Yan, Ma Zhen-gang. Review of the application of beeswax[J]. Journal of Bee, 2019, 12: 9-12.]
- [3] 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呋喃类代谢物[J].分析试验室,2015,34(10):1174-1177. [Lei Mei-kang, Peng Fang, Zhu Zi-tong, et al. Determination of metabolites of nitrofurant antibiotics in beeswax using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, 34(10): 1174-1177.]
- [4] MD Navarro-Hortal, Orantes-Bermejo F J, C Sánchez-González, et al. Industrial-scale decontamination procedure effects on the content of acaricides, heavy metals and antioxidant capacity of beeswax[J]. Molecules 2019, 24(8): 1518.
- [5] Silvia V, Ares ana maría, Bernal josé luis, et al. Fast determination of neonicotinoid insecticides in beeswax by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an enhanced matrix removal-lipid sorbent for clean-up[J]. Microchemical Journal, 2018, 142: 70-77.
- [6] Muhammad jamal, Muhmmad asif aziz, Muhammad naeem, et al. Detection of flumethrin acaricide residues from honey and beeswax using high performance liquid chromatography (HPLC) technique[J]. Journal of King Saud University - Science, 2020, 32(3): 2229-2235.
- [7] Wallner, K. Varroacides and their residues in bee products[J]. Apidologie, 1999, 30: 235-248.
- [8] Issa M M, Taha S M, El-marsafy A M, et al. Acetonitrile-ethyl acetate based method for the residue analysis of 373 pesticides in

beeswax using LC-MS/MS and GC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2020, 1145: 122106.

- [9] Medina-dzul K, Medina-peralta S, Carrera-figueiras C, et al. Matrix solid-phase dispersion extraction of organophosphorous pesticides from beeswax[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2017: 1-10.
- [10] 陈芳,李丹,张金振,等.气相色谱微池电子捕获检测器测定蜂蜡中6种杀螨剂药物残留[J].食品科学,2010,31(18):244-247. [Chen Fang, Li Dan, Zhang Jin-zhen, et al. Determination of six acaricide residues in beeswax by gas chromatography coupled with a micro-electron capture detector[J]. Food Science, 2010, 31(18): 244-247.]
- [11] 张伟伟,曾明华,许世富,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡肉中氯霉素药物及其代谢物残留方法的建立[J].安徽农业大学学报,2012,39(4):641-645. [Zhang Wei-wei, Zeng Hua-ming, Xu Shi-fu, et al. Development of method for simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine residues in chicken tissues by LC-MS/MS[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2012, 39(4): 641-645.]
- [12] Wang Hao, Zhou Xiang-Juan, Liu Yan-Qin, et al. Simultaneous determination of chloramphenicol and aflatoxin M1 residues in milk by triple quadrupole liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59: 3532-3538.
- [13] Rodziewicz L, Zawadzka I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography -electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. Talanta, 2008, 75: 846-850.
- [14] 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(3):522-529. [Zhu Zi-tong, Lei Mei-kang, Peng Fang, et al. Determination of nitroimidazoles residues in bee pollen using LC-MS/MS coupled with accelerated solvent extraction and gel permeation chromatographic purification[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2016(3): 522-529.]
- [15] GB 31650-2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S].北京:中国标准出版社,2019. [GB 31650-2019 National food safety standard—Maximum residue limits for veterinary drugs in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2019.]
- [16] 李莹莹,宋永青,赵榕,等.液质联用检测鱼肉中氟苯尼考和氟苯尼考胺的残留量[J].食品科学,2010,31(12):219-222. [Li Ying-ying, Song Yong-qing, Zhao Rong, et al. HPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine residues in fish[J]. Food Science, 2010, 31(12): 219-222.]
- [17] 张凤清,王岩松,范世华,等.高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉组织中氯霉素、甲砒氯霉素和氟苯尼考残留量[J].食品科学,2010,31(8):248-251. [Zhang Feng-qing, Wang Yan-song, Fan Shi-hua, et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol residues in animal muscles[J]. Food Science, 2010, 31(8): 248-251.]

- [18] Muhammad imran, Fazal-e- habib, Saima majeed, et al. LC-MS/MS-based determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry meat from the Punjab-Pakistan[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018, 35(8): 1530–1542.
- [19] Xie Xing, Wang Bo, MaodaPang, et al. Quantitative analysis of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs via liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2018, 269: 542–548.
- [20] Fabianobarreto, Cristinaribeiro, Rodrigobarcellos hoff, et al. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in poultry, swine, bovine and fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1449: 48–53.
- [21] 1025 号公告-23-2008 动物源食品中磺胺类药物残留检测液相色谱—串联质谱法 [S]. 北京:中国标准出版社, 2008. [Announcement no. 1025-23-2008. Determination of sulfonamides residues in edible tissues of animal Liquid chromatography-tandem mass spectrometry[S]. Beijing: China Standards Press, 2008.]
- [22] Shizuka, Saito-Shida, Kouji, et al. Determination of total florfenicol residues as florfenicol amine in bovine tissues and eel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using external calibration.[J]. *Journal of Chromatography B*, 2019, 1109: 37–44.
- [23] Orlando, Adilson E, Roque C, et al. UPLC-MS/MS determination of florfenicol and florfenicol amine antimicrobial residues in tilapia muscle[J]. *Journal of Chromatography B*, 2016, .1035: 8–15.
- [24] 方海仙, 耿慧春, 梅文泉, 等. 气相色谱法测定农产品中农药残留的基质效应研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(14): 3770–3779. [Fang Hai-xian, Geng Hui-chun, Mei Wen-quan, et al. Study on matrix effect of determination of pesticide residues in agricultural products by gas chromatography[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(14): 3770–3779.]
- [25] Li Jian-bo, Hu Yu-jie, Wu Ya-jin, et al. Pharmacokinetics of palmitate in rat after oral and intravenous administration by UPLC-MS/MS[J]. *Acta Chromatographica*, 2021, 33(1): 25–29.
- [26] Hana bavlovi piskáková, Iestad E L, Nela váňová, et al. Electromembrane extraction of anthracyclines from plasma: Comparison with conventional extraction techniques[J]. *Talanta*, 2021, 223: 121748.
- [27] 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 Bing-Feng, Liu Min, Pei Xin-rong. Results analysis of the national food safety supervision and sampling inspection of honey from 2015 to 2018[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 23(12): 8164–8170.]
- [28] Shimshoni J A, Sperling R, Massarwa M, et al. Pesticide distribution and depletion kinetic determination in honey and beeswax: Model for pesticide occurrence and distribution in beehive products[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0212631.
- [29] Agrebi N E, Traynor K, Wilmart O, et al. Pesticide and veterinary drug residues in Belgian beeswax: Occurrence, toxicity, and risk to honey bees[J]. *Science of The Total Environment*, 2020, 745: 141036.
- [30] Vijayakumar bommuraj, Chen Y, Klein H, et al. Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration[J]. *Food Chemistry*, 2019, 299: 125123.