

水产品中氯霉素残留的气质联用法检测

魏林阳 徐金晶 吴红军

(扬州市农产品质量监督检测中心 江苏省扬州市扬子江中路 336 号 225009)

摘 要 正交试验研究了氯霉素衍生化的最佳条件, 该最佳条件为加入 50 μ L BSTFA + TMCS (99+1) 硅烷化试剂, 在 60 $^{\circ}$ C 反应 30min。用 EI 源的 GC-MS 法, 选择离子 (SM) 定性和定量, 研究了氯霉素残留测定的气质联用法。相关系数大于 0.99, 线性范围 1—200ng/mL, 不同水产品试样中加标回收率在 70%—90% 之间, 相对标准偏差小于 5%, 检出限为 0.5 μ g/kg。

关键词 气质联用, 氯霉素, 正交试验, 衍生化, 水产品, 残留。

中图分类号: O657.63 文献标识码: B 文章编号: 1004-8138(2007)02-0201-05

1 前言

氯霉素 (CAP) 又名左旋霉素, 最初是从委内瑞拉链丝菌 (*S. venezuelae*) 的培养液中提取制得的, 人工合成氯霉素异构体称合霉素 (Sintomycin) 即阿苏糖型氯霉素。其作用机制是抑制细菌的蛋白质生物合成, 主要是阻碍 50S 核糖体与 mRNA 结合, 促肽键形成的肽基转移酶活力受阻, 从而抑制细菌的繁殖和生长。主要在肝脏被葡萄糖醛酸转移酶作用失活, 迅速由尿排出体外。氯霉素是一种广谱抗生素, 处理伤寒、斑疹伤寒最有效, 对流感杆菌引起的脑膜炎以及某些尿道感染也有效。但是它能抑制人体骨髓造血功能而引起不可逆转的再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症, 新生儿、早产儿灰色综合症、肠胃道反应、皮疹等疾病, 长期微量摄入氯霉素, 还会诱发大肠杆菌、沙门氏菌等致病菌的耐药性, 引起机体正常菌群失调, 使人们易感染各种疾病, 但由于价格低廉, 因此早期曾被广泛用于人、畜多种传染性疾病的治疗, 我国上世纪 80 年代开始在水产养殖业中得到广泛的应用。如果氯霉素在食用动物中残留, 可通过食物链传给人类, 对人类的健康造成危害。医学界至今还不能确定氯霉素的人体安全接触剂量。

鉴于以上原因, 很多国家和地区开始禁止或者严格限制使用氯霉素。FAO/WAO 规定食品中 CAP 不得检出。美国仅允许氯霉素用于非食用动物, 动物性食品中不得检出。欧盟 (EEC) 的 96/23 指令把 CAP 列入禁用药, 将 CAP 列为禁止使用的 10 种“无最大限量的药物活性物质”之一。韩国规定动物组织中不得检出。日本规定在肉、禽、水产品中的最大残留限量为 0.05mg/kg。

目前美国和欧盟对 CAP 的检出限分别是 μ g/kg 和 0.1 μ g/kg。美国 FDA 在近期改进官方实验方法后可能将标准降至 0.3 μ g/kg 甚至 0.1 μ g/kg。水产品出口在我国对外贸易中占有一定比例, 由于过去的长期使用导致 CAP 的残留和发达国家采取的技术性贸易壁垒, 氯霉素检测在水产品出口

联系人, 电话: (0614) 7086069 (办); E-mail: slilvm@yahoo.com.cn

作者简介: 魏林阳 (1981—), 男, 江苏省扬州市人, 助理工程师, 主要从事农药和兽药残留检测工作。

收稿日期: 2006-11-09; 接受日期: 2006-12-07

中至关重要。同时,为了执行农业部关于禁用兽药的公告,切实保障人民群众身体健康,应该加强对氯霉素残留检测方法的研究。

本文就氯霉素残留检测的硅烷化条件、EI源的GC-MS法检测^[4]氯霉素进行了研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

6890N/5973 inert 气质联用仪(美国Agilent公司);离心机;均质机;水浴旋转蒸发器;旋涡混合器;氮吹仪;固相萃取装置。

氯霉素标准品(SIGMA-ALDRICH);乙酸乙酯、甲醇、正己烷、氯仿均为色谱纯;无水硫酸钠,分析纯,650℃灼烧4h,冷却后置于干燥器;氯化钠,分析纯;BSTFA+TMCS(99+1)(SUPELCO);实验用水为高纯水。

2.2 样品提取与净化

准确称取5g样品,加入20mL乙酸乙酯均质提取,再加入10mL乙酸乙酯重复提取一次。提取液于40℃水浴中旋转蒸发至干。加入1mL甲醇旋涡混合溶解残留物,再加入15mL正己烷和25mL 4%氯化钠溶液提取脂肪,除去正己烷相,再加入10mL正己烷重复提取一次,弃去正己烷相。加入15mL乙酸乙酯提取,用无水硫酸钠脱水,再用5mL乙酸乙酯重复一次。提取液在40℃水浴中旋转蒸发至干,用5mL 5%乙腈水溶液溶解。

依次用5mL甲醇、氯仿、甲醇和水活化C₁₈柱,提取液过C₁₈柱,用7mL水淋洗和3mL乙腈洗脱。在50℃砂浴中氮气吹干。

2.3 衍生化

加入衍生化试剂,旋涡混合,在一定温度和时间下反应,在50℃砂浴中氮气吹干。加入0.5mL正己烷,旋涡混合,待测。

考虑加入的衍生化试剂量、温度和时间三个因素,衍生化条件和水平(见表1)。

采用正交试验设计,以在色谱上的峰面积响应为数据,以三因素四水平的L₉(3⁴)正交表(见表2),对衍生化条件进行试验,进行极差分析,找出最佳的条件。

2.4 仪器条件

色谱柱:HP-5MS,30m×0.25mm×0.25μm毛细管色谱柱;

载气:高纯氦气(99.999%),柱流量1.0mL/min;

进样口:温度260℃,不分流进样,吹扫延迟1.00min;进样体积1.0μL;

MSD:EI源,传输线温度280℃,离子源温度230℃,四极杆温度150℃;SM模式,选择73、208、225三个特征离子,以225定量,73和208定性。

2.5 样品测定

分别测定水产品批发市场、超市和农贸市场上的青虾、鲫鱼和螃蟹等样品中氯霉素的含量及不同水产品基体中氯霉素的加标回收率。

表1 正交试验衍生化条件和水平

因素	水平		
	1	2	3
试剂量(A)(μL)	50	100	150
温度(B)(℃)	60	70	80
时间(C)(min)	15	30	45

3 结果与讨论

3.1 衍生化条件

正交试验结果及极差分析结果见表 2。

由此可见, 对衍生化效果影响最显著的为时间, 其次为加入衍生化试剂量, 温度影响最小。从节省时间和成本的角度考虑, 选择加入 50 μ L 衍生化试剂, 在 60 反应 30min 为最佳条件。

3.2 氯霉素的定性和定量

氯霉素的结构式见图 1, 其硅烷化衍生物结构式及质谱图见图 2。

表 2 $L_9(3^4)$ 正交表及极差分析

试验号	A	B	C	数据
	1	2	3	
1	1	1	1	151
2	1	2	2	568
3	1	3	3	403
4	2	1	2	265
5	2	2	3	141
6	2	3	1	62
7	3	1	3	606
8	3	2	1	126
9	3	3	2	333
I_j	1122	1022	339	
II_j	468	835	1166	
III_j	654	798	1150	
极差	654	224	827	

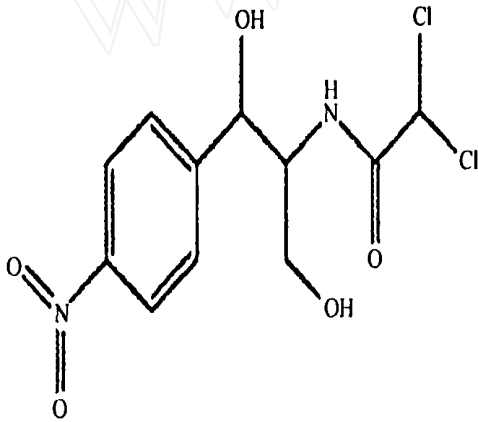


图 1 氯霉素的结构式

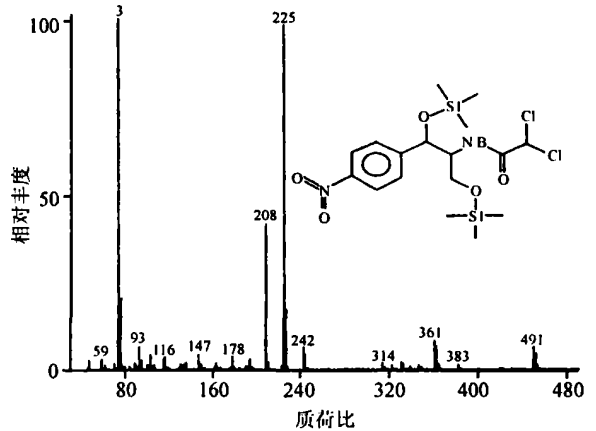


图 2 氯霉素硅烷化衍生物结构式及质谱图

氯霉素标准溶液的总离子流色谱图 and 选择离子色谱图见图 3。

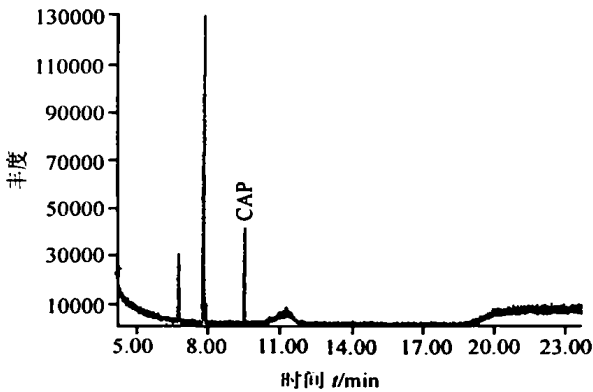


图 3 氯霉素标准溶液总离子流色谱图

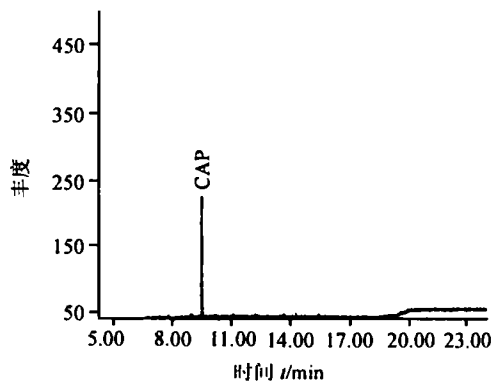


图 4 氯霉素标准溶液选择离子色谱图

以 225 定量, 72 和 208 定性, 73, 208 和 225 三个特征离子丰度分别为 100, 41 和 98。

3.3 精密度、准确度和线性

以标准溶液和氯霉素峰面积做校准曲线, 相关系数 $r = 0.999$, 线性范围 1—200 ng/mL。加标浓度为 4.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 对不同水产品进行加标回收率测定, 其回收率和相对标准偏差见表 3。从表中数据可看出, 不同试样中加标回收率在 70%—90% 之间, 重复性小于 5%, 以 3 倍 S/N 计算得检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.4 样品测定结果

在所测的 31 个样品中, 有青虾、鲫鱼等共 3 个检出。样品和加标的 SM 谱图见图 5-6。

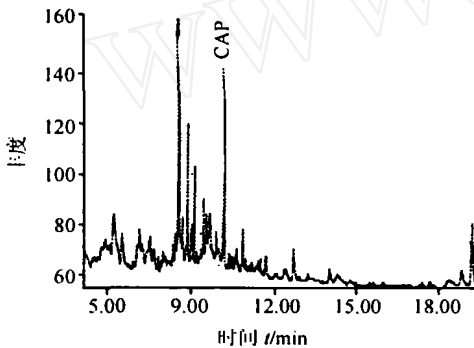


图 5 样品 SM 图

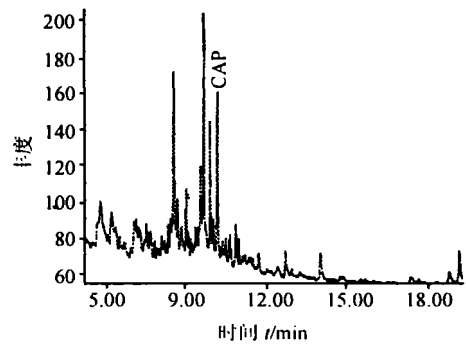


图 6 加标样品 SM 图

通过检测数据统计和氯霉素在不同水产品中的残留规律, 可以有针对地进行氯霉素的监督检测。

4 结论

(1) 动物性食品中氯霉素的提取净化方法比较成熟^[1-2], 典型的方法是乙酸乙酯提取后正己烷脱脂, 乙酸乙酯反萃取, C_{18} SPE 净化。如果用气相色谱检测, 则还需硅烷衍生化。关于硅烷化的条件, 有很多报道, 大多不尽一致^[1-3]。

本文采用三因素三水平的正交试验设计法, 对氯霉素硅烷化衍生化加入的衍生化试剂量、温度和时间三个因素进行了试验, 最后找出硅烷化的最佳条件为: 加入 50 μL 衍生化试剂, 在 60 反应 30 min。

(2) 氯霉素的残留有很多检测方法^[4]。检出限和确证能力是氯霉素残留检测中最受关注的问题。微生物法、免疫分析法和 FDA 的 CHARM II 等筛选方法, 适合大量样品的初步筛选, 应用最普遍的酶联免疫法具有灵敏度高、成本低等优点, 但存在稳定性差和假阳性等问题。高效液相色谱法重复性较好, 但是其检出限不能满足要求; 气相色谱法虽具有很高灵敏度, 低检出限, 但是仍存在假阳性问题。在氯霉素的确证分析中, 以气质联用法和液质联用法应用较广。液质联用法具有很高的灵敏度和稳定性, 是 FDA 推荐的确证方法, 随着 LC-MS 的逐渐普及, 液质联用法将成为国内首选的确证方法, 但是现阶段国内 LC-MS 的普及性仍较差; 气质联用法一般使用 NCI 源^[4], 灵敏度高, 可达到 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但是 CI 源的气质联用仪普及性不高。EI 源的 GC-MS 法在一些方面虽不及前者, 但是 SM 模式仍然具有很高灵敏度, 一般可高于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 而且其使用较为普及。

表 3 不同试样氯霉素的加标回收率和重复性

试样	测定值	回收率	相对标准偏差
青虾	3.24	81.0	5.0
	3.35	83.8	
	3.57	89.2	
鲫鱼	2.91	72.8	4.0
	2.97	72.8	
	3.14	78.5	
螃蟹	2.81	70.2	2.1
	2.92	73.0	
	2.92	73.0	

(3) 气质联用法在氯霉素残留检测上的优点之一是其确证能力。本文以氯霉素的质谱图 of 参考, 选择了几个特征离子, 结合实际试样基体情况, 最后确定了 225、72 和 208 定性三个特征离子, 丰度分别为 100、41 和 98。测定时, 只要样品的 SM 图定性离子丰度在标样丰度的 20% 范围内就判定为阳性。采用这种方式确证, 大大降低了氯霉素残留检测中“假阳性”情况的发生。

参考文献

- [1] 中华人民共和国水产行业标准 水产品中氯霉素残留量的测定气相色谱法[S]. SC/T 3018-2004. 北京: 中国标准出版社, 2005. 296—299.
- [2] 沈美芳, 吴光红, 费志良, 高钰一. 气相色谱法测定水产品中氯霉素残留前处理方法的比较[J]. 水产学报, 2005, 29(1): 103—108.
- [3] 谢孟峡, 刘媛, 邱月明, 韩杰, 刘宜孜. 固相萃取-气相色谱质谱测定动物组织中氯霉素的残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 1—4.
- [4] 庄宛, 叶玫. 动物性食品中氯霉素(CAP)残留检验方法概述[J]. 福建畜牧兽医, 2004, 26(1): 8—10.

Determination of Chloramphenicol Residues in Aquatic Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry

WEI Lin-Yang XU Jin-Jing WU Hong-Jun

(Yangzhou Center of Farm Product Quality Supervision and Inspection, Yangzhou, Jiangsu 225009, P. R. China)

Abstract The optimal conditions in which chloramphenicol(CAP) was derivatized were studied with orthogonal test. Chloramphenicol can be derivatized optimally at 60 °C for 30 minutes with 50 μL BSTFA + TMCS (99 + 1). The chloramphenicol residue characterization and quantification determination of GC-MS with EI source and SM mode were studied. The correlation coefficients were above 0.99 for the calibration curves. The linear plots were obtained between 1 ng/mL and 200 ng/mL. Overall recoveries of different aquatic products were between 70% and 90%. The relative standard deviations were less than 5%. The limits of detection (LOD) were 0.5 μg/kg.

Key words GC-MS, Chloramphenicol, Orthogonal Test, Derivation, Aquatic Products, Residue

过期《光谱实验室》期刊免费赠送启事

本部尚有一些过期(2004, 2005 及以前)的期刊, 凡需要者均可免费赠送, 但邮费自付(可用邮票支付), 每 6 本(不同期)为 1 个单元, 约重 2- 2.2kg, 普通印刷品收邮费 11 元, 挂号另加 3 元。

有意者来信告知收件人姓名及详细地址, 同时将邮票放在信封中挂号寄来。

联系地址: 北京市 81 信箱 66 分箱《光谱实验室》编辑部联络处 刘建林, 邮编: 100095

《光谱实验室》编辑部