

猪可食组织中氯霉素和甲矾霉素残留检测气相色谱法建立

马素英, 袁霞, 王玉莲, 陶燕飞, 陈冬梅, 袁宗辉

(国家兽药残留基准实验室/农业部食品安全评价重点开放实验室/华中农业大学兽药研究所, 武汉 430070)

摘要: 【目的】为检测猪可食用组织中氯霉素和甲矾霉素残留, 建立了同时检测这两种残留药物的气相色谱方法。【方法】样品用乙酸乙酯提取、离心、蒸发、氯化钠溶液溶解, 然后用预先活化的 C₁₈ 固相萃取小柱净化。用水淋洗、乙腈洗脱固相萃取柱。收集洗脱液, 洗脱液吹干后和 Sylon BFT (99+1) 于 70℃ 反应 30 min。反应物用氮气吹干, 重新溶解在正己烷和环己烷的混合溶液 (6+4) 中, 终产物用气相色谱法分析。【结果】本法对猪肝脏和肌肉中氯霉素的检测限为 0.5 μg·kg⁻¹, 定量限为 1.0 μg·kg⁻¹; 对甲矾霉素的检测限为 1.0 μg·kg⁻¹, 定量限为 2.0 μg·kg⁻¹。氯霉素在 1.0~4.0 μg·kg⁻¹ 和甲矾霉素在 2.0~8.0 μg·kg⁻¹ 添加浓度范围内, 肝脏和肌肉组织中的回收率在 70%~81% 范围内, 变异系数 < 16%。氯霉素和甲矾霉素标准溶液在 10~640 μg·L⁻¹ 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.998$)。【结论】本方法简单、灵敏度高, 适用于猪可食用组织中氯霉素和甲矾霉素的定量检测。

关键词: 氯霉素; 甲矾霉素; 残留; 猪; 可食组织; 气相色谱法

Development of a Gas Chromatography Method for the Determination of Chloramphenicol and Thiamphenicol Residues in Edible Tissues of Swine

MA Su-ying, YUAN Xia, WANG Yu-lian, TAO Yan-fei, CHEN Dong-mei, YUAN Zong-hui

(National Reference Laboratory of Veterinary Drug Residues/Key Laboratory of Food Safety Evaluation, Ministry of Agriculture, Institute of Veterinary Pharmaceuticals, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: 【Objective】 A Gas Chromatography method was developed to simultaneously determine chloramphenicol and thiamphenicol residues in edible tissues of swine. 【Method】 The samples were extracted using ethyl acetate, centrifuged, evaporated, reconstituted in sodium chloride solution and then passed through preconditioned C₁₈ solid phase extraction (SPE) cartridge. The SPE column was washed with water and eluted with acetonitrile. The elutant was collected, evaporated, and reacted with Sylon BFT at 70℃ for 30min. The derivative was evaporated dry, redissolved in hexane-cyclohexane (6+4) and centrifuged. The final solution was analyzed by Gas Chromatography. 【Result】 The limits of detection of chloramphenicol in liver and muscle of swine was 0.5 μg·kg⁻¹ and the limits of quantification was 1.0 μg·kg⁻¹, The limits of detection of thiamphenicol in liver and muscle of swine was 1.0 μg·kg⁻¹ and the limits of quantification was 2.0 μg·kg⁻¹. The samples were spiked with chloramphenicol in the range of 1-4 μg·kg⁻¹ and with thiamphenicol in the range of 2-8 μg·kg⁻¹. The recovery rate was in the range of 70%-81% and the correlation coefficient was less than 16%. The calibration curves of chloramphenicol and thiamphenicol were linear ($R^2 > 0.998$) in the range of 10-640 μg·L⁻¹. 【Conclusion】 The method was simple and accurate enough to determine the residues of chloramphenicol and thiamphenicol in edible tissues of swine.

Key words: Chloramphenicol; Thiamphenicol; Residues; Swine; Edible tissues; GC-ECD

0 引言

【研究意义】氯霉素 (CAP) 类药物可以用于治

疗和预防动物的多种疾病, 在临床上的应用十分广泛, 但是也导致了在动物可食组织中的残留。由于氯霉素具有明显的毒性作用, 所以世界上许多国家都把

收稿日期: 2005-05-11; 接受日期: 2006-12-20

项目基金: “十五”国家食品安全重大科技专项 (2001BA804A18-01)

作者简介: 马素英 (1972-), 女, 河南郑州人, 硕士, 研究方向兽医药理学。E-mail: msy@webmail.hzau.edu.cn。通讯作者袁宗辉 (1958-), 男, 湖北天门人, 博士, 教授。研究方向兽医药理学与毒理学。Tel: 027-87287186; Fax: 027-87672232; E-mail: yuan5802@mail.hzau.edu.cn。

该药列为禁用药。甲砒霉素 (TAP) 是在氯霉素结构的基础上进行改造后人工合成的替代品, 由于有潜在的毒性作用, 许多国家也相继制定了甲砒霉素的残留限量来限制它的应用^[1]。因此为了保护人民群众的身体健康和保障国际之间贸易的需要, 有必要建立检测动物可食组织中该类药物残留的检测方法。【前人研究进展】目前的检测方法主要有仪器方法、免疫学方法和微生物学方法。微生物学方法简便、成本低廉, 但特异性较差, 灵敏度也较低。放射免疫学方法具有应用的同位素的半衰期短、存在放射污染和需要特殊仪器等缺点, 所以, 研究最多的是仪器方法。国外对该药物残留的研究进行的较早, 已经建立了氯霉素类药 HPLC-UV^[2,3], GC-MS^[4], GC-ECD^[5], HPLC-MS^[6] 等的单残留和多残留方法。【本研究切入点】但国内对该药的研究还处于单残留研究阶段, 官方所发布的检测方法中大多数是液相色谱检测方法^[7], 方法的检测能力有限, 检测限只能达到 $1.0\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 不适应对氯霉素零残留的要求。另外林海丹等采用液相色谱串联质谱方法检测水产品中氯霉素残留, 检测限可以达到 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[8], 但是该类仪器成本太高, 不容易普及, 【拟解决的关键问题】有必要建立处理方法简单、灵敏度高、能同时检测氯霉素和甲砒霉素的多残留方法来保障人们的食品安全和国家的经济利益。

1 材料与amp;方法

1.1 药物与试剂

氯霉素 (013K0152)、甲砒霉素 (063K0945) 购自 Sigma 公司。甲醇、乙酸乙酯、乙腈、正己烷、环己烷 (分析纯重蒸)、氯化钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾 (分析纯)、Sylon BFT N,O-双 (三甲基硅) 三氟乙酰胺 (BSTFA) -三甲基氯硅烷 (TMCS) (99+1) ($25\text{g}/\text{瓶}$)、 β -葡萄糖醛酸酶。

1.2 仪器

气相色谱仪 (Agilent6890N)、分析天平、天平、离心机、漩涡混合器、匀浆机、 C_{18} 固相萃取柱及萃取系统、旋转蒸发仪、冰箱、氮气蒸发设备等。

1.3 猪空白组织

取未使用过氯霉素和甲砒霉素的猪的肌肉和肝脏, 匀浆, -20°C 避光保存。

1.4 贮备液和工作液的配制

精确称取氯霉素、甲砒霉素各 10mg 于 10ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 制成 $1.0\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的溶液作为贮备液, 4°C 避光保存。准确量取 0.1ml 贮备液

到 10ml 容量瓶中, 用甲醇稀释, 制成 $10.0\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的溶液作为工作液。

1.5 制样方法

1.5.1 提取 称取 5g 匀浆后的组织于 50ml 玻璃离心管中, 加 β -葡萄糖醛酸酶 $100\mu\text{l}$ 和 $\text{pH} 6.8$ 磷酸盐缓冲液 2ml , 置 37°C 孵育 2h (肌肉不加酶和缓冲溶液水解)。再加乙酸乙酯 15ml , 超声 3min , $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 10min 。收集有机层, 沉淀再用乙酸乙酯 15ml 、 10ml 重复提取两次。合并有机层, 有机层中加水 1ml , 在 40°C 水浴下蒸干有机层。残余物依次加 4% 氯化钠溶液 10ml 、 5ml 溶解, 所得的氯化钠溶液中再加正己烷 2ml , 漩涡混匀, $5000\text{r}/\text{min}$ 离心 5min , 弃有机层, 水层过 C_{18} 固相萃取柱。

1.5.2 净化 C_{18} 固相萃取柱依次用乙腈 5ml 、水 10ml 活化。样品的提取液加入 C_{18} 柱, 加水 5ml 洗涤样品管并把洗涤液加入固相萃取柱。用水 3ml 淋洗固相萃取柱, 乙腈 3ml 洗脱, 收集洗脱液, 用氮气蒸发仪 40°C 缓缓吹干。

1.5.3 衍生 残余物中加乙腈 $200\mu\text{l}$ 和 Sylon BFT N, O-双 (三甲基硅) 三氟乙酰胺 (BSTFA) -三甲基氯硅烷 (TMCS) (99:1) $25\mu\text{l}$, 迅速盖紧, 漩涡混匀, 在 70°C 烘箱中反应 30min 。反应产物在 40°C 用氮气蒸发仪缓缓吹干, 残余物中加正己烷: 环己烷溶液 (6:4) $200\mu\text{l}$, 漩涡混匀, $2000\text{r}/\text{min}$ 离心 5.0min , 上层转移到进样小瓶中, GC-ECD 测定。

1.6 测定条件

色谱柱: HP-5 (5%Phenyl Methyl Siloxane Capillary) $30.0\text{m}\times 320\mu\text{m}\times 0.25\mu\text{m}$; 载气: 氮气 (99.999%); 进样方式: 不分流进样; 进样体积: $1.0\mu\text{l}$; 进样口温度: 250°C ; 检测器温度: 300°C ; 升温程序: 初始温度 150°C , 保持 0.5min , $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 270°C , 保持 7.5min , $20^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 290°C , 保持 5.0min 。

1.7 标准曲线绘制

分别精确量取适量贮备液, 制成混合标准溶液, 再稀释成浓度为 640.0 、 320.0 、 160.0 、 80.0 、 40.0 、 20.0 、 $10.0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的工作液, 工作液用氮气蒸发仪 40°C 缓缓吹干, 残余物中加乙腈 $200\mu\text{l}$ 、衍生试剂 $25\mu\text{l}$, 漩涡混匀, 70°C 反应 30min , 反应产物用氮气蒸发仪 40°C 缓缓吹干, 残余物加正己烷: 环己烷溶液 (6:4) $200\mu\text{l}$, 漩涡混匀, $2000\text{r}/\text{min}$ 离心 5.0min , 用 GC-ECD 测定, 用峰面积 (纵坐标) 与浓度 (横坐标) 进行线性回归绘制标准曲线。

1.8 回收率测定

准确称取匀浆后的空白组织 5 g, 加入适宜浓度的混合标准溶液 100 μl , 分别制成含有药物 CAP 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、TAP 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; CAP 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、TAP 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; CAP 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、TAP 8.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的加药组织, 按照 1.5 处理后检测。每个浓度检测 5 个批次, 每个批次 5 个重复。

1.9 最低检测限和最低定量限

猪肌肉和肝脏中添加不同浓度的氯霉素和甲砒霉素, 按 1.5 处理, $S/N > 3$ 定为检测限, $S/N > 10$ 定为定量限。

按外标法计算含量, 并进行单点校正。

按下式计算组织中药物的残留量 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$):

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times M}$$

X —组织中药物的残留量 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

C_s —标准工作液中药物的浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

A —供试品中药物的峰面积

A_s —标准品工作液中药物的峰面积

V —样品提取液处理浓缩至干后, 溶解残余物所用的溶剂的总体积 (L)

M —组织样品的质量 (kg)

2 结果与分析

2.1 特异性

本方法能够完全分离和定量检测猪肝脏和肌肉中氯霉素和甲砒霉素残留, 由图 1、图 2 可知, 组织样品在药物色谱峰的位置没有干扰。

2.2 线性范围

氯霉素和甲砒霉素在 10~640 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好 ($R^2 > 0.998$); 曲线和回归方程见图 3。

2.3 准确度与精密度测定结果

氯霉素和甲砒霉素在肝脏和肌肉中回收率在 70%~81% 范围内, 变异系数 $< 16\%$ (表)。

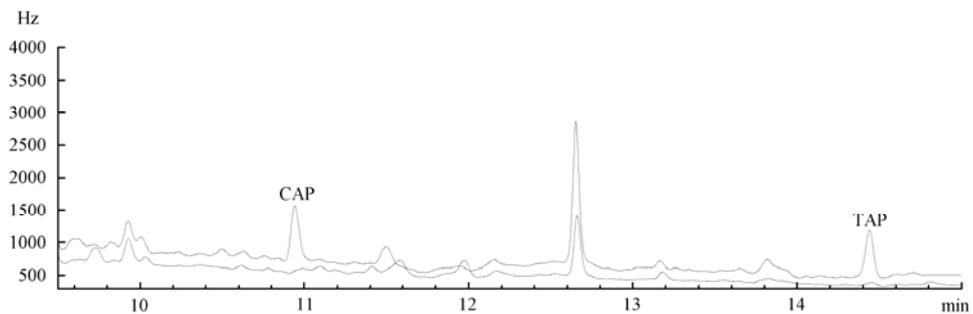


图 1 空白肝脏和肝脏中加入药物的图谱 (氯霉素: 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 甲砒霉素 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Fig. 1 Chromatogram of blank liver sample and chromatogram of liver sample fortified with chloramphenicol and thiamphenicol (Chloramphenicol: 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; Thiamphenicol 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

表 猪肝脏和肌肉组织中添加氯霉素和甲砒霉素的回收率和变异系数

Table The recoveries and correlation coefficient of chloramphenicol spiked 1, 2, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and thiamphenicol spiked 2, 4, 8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ in liver and muscle of swine ($n = 5 \times 5$)

	组织样品 Sample	添加浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 Recoveries (%)	变异系数 Correlation coefficient (%)
氯霉素 Chloramphenicol	肝脏 Liver	1	75.5 \pm 9.6	14.1
		2	78.2 \pm 11.6	15.8
		4	80.9 \pm 7.3	10.3
甲砒霉素 Thiamphenicol	肌肉 Muscle	1	73.0 \pm 6.4	8.8
		2	80.5 \pm 11.9	14.8
		4	72.7 \pm 7.3	10.0
甲砒霉素 Thiamphenicol	肝脏 Liver	2	77.4 \pm 8.9	11.5
		4	72.5 \pm 7.7	10.6
		8	77.9 \pm 7.8	10.0
甲砒霉素 Thiamphenicol	肌肉 Muscle	2	71.7 \pm 5.1	7.0
		4	78.5 \pm 10.2	13.0
		8	74.5 \pm 6.2	8.3

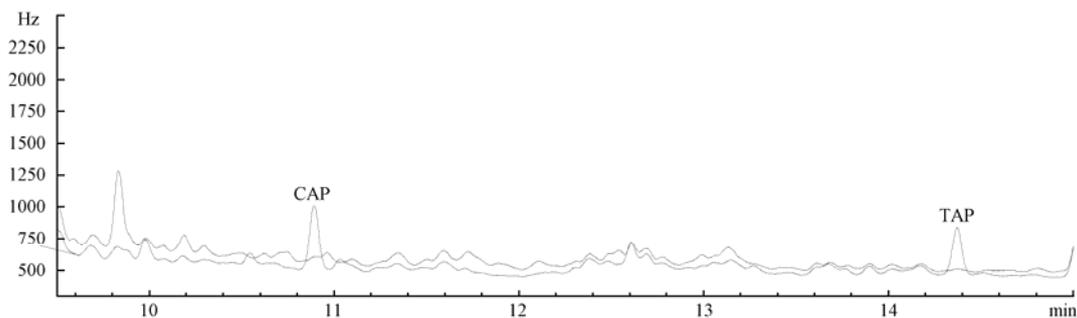


图 2 空白肌肉和肌肉中加入药物的图谱 (氯霉素: $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 甲砒霉素 $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Fig. 2 Chromatogram of blank muscle sample and chromatogram of muscle sample fortified with chloramphenicol and thiamphenicol. (Chloramphenicol: $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; Thiamphenicol $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

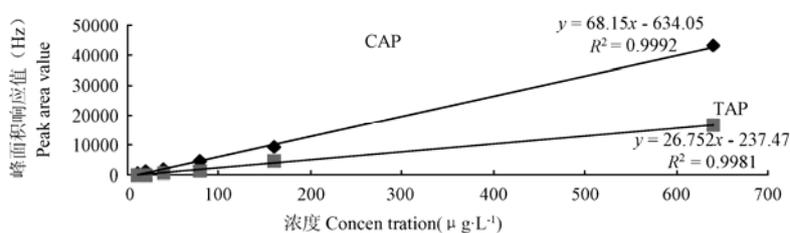


图 3 氯霉素和甲砒霉素标准曲线图

Fig. 3 Calibration curve chromatogram of chloramphenicol and thiamphenicol

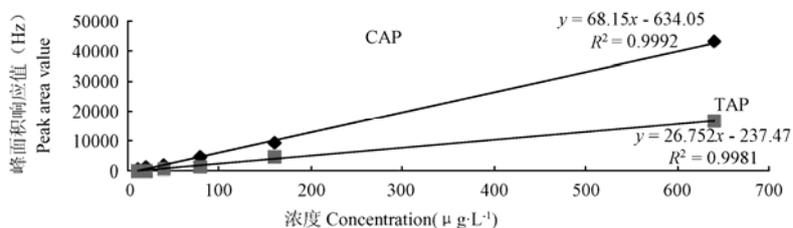


图 4 氯霉素和甲砒霉素标准溶液图谱 (氯霉素: $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 甲砒霉素 $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Fig. 4 Chromatogram of chloramphenicol and thiamphenicol standard solution (Chloramphenicol: $25.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Thiamphenicol: $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

2.4 最低检测限和最低定量限

按 1.9 操作, 肌肉和肝脏组织中氯霉素的最低检测限和最低定量限分别为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; 甲砒霉素的最低检测限和最低定量限分别为 $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 衍生试剂的选择

氯霉素类药物的结构中有羟基和胺基, 极性较大,

挥发性差, 需要衍生成对热稳定的并且容易挥发的物质, 所以采用硅烷化试剂作为衍生试剂。据报道该类试剂中, Sylon BFT N_2O -双(三甲基硅)三氟乙酰胺 (BSTFA)-三甲基氯硅烷 (TMCS) (99+1) 的衍生效果较好^[1], 所以选用该物质。最好采用小包装, 以免衍生试剂影响测定结果。

3.2 样品处理方法的选择

文献所报导的检测氯霉素类药物残留的方法中, 样品的处理方法主要有液-液提取和净化^[9]、液-液提

取和固相净化^[10]、液-液提取和滤膜净化^[11]等相结合的几种方法。本研究采用的是配备有电子捕获检测器的气相色谱方法,该检测器的灵敏度较高,所以在获得高的响应信号的同时,杂质的响应也比较大。因此为了获得杂质质量较少的样品,并根据残留分析的特点决定选用液-液提取和固相净化相结合的手段。固相净化中分析该类药物常用的萃取小柱有氧化铝小柱和C₁₈小柱,二者相比前者对样品的吸附较大,回收率较低,所以本实验采用C₁₈小柱。另外,根据文献报道,氯霉素在肝脏内与葡萄糖醛酸结合生成结合物,所以为了更有效地检测肝脏内的氯霉素,首先用β-葡萄糖醛酸酶水解结合产物,再采用所选定的方法测定。

References

- [1] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 3.
Li J S, Qiu Y M. *Residues Analyses on Animal Medicine*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 3. (in Chinese)
- [2] Pascal S, Philippe G, Michele D. Liquid Chromatographic determination of Chloramphenicol in calf tissues: studies of stability in muscle, kidney and liver. *Journal ASSOC of Animal Chemistry*, 1991, 74: 483-486.
- [3] Nagata T, Saeki M. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 1992, 15: 2045-2056.
- [4] Nagata T, Oka H. Detection of residual Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in yellowtailfish muscles by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1996, 44: 1280-1284.
- [5] Allen P, Pfenning R, Madson, Jose E. Simultaneous determination chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of AOAC International*, 1998, 81: 714-721.
- [6] Impens S, Reybroeck W, Vercammen J, Courtheyn D, Ooghe S, Wasch K D, Smedts W, Brabander H D. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS2 and LC-MS2. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483: 153-163.
- [7] 中华人民共和国农业部. 氯霉素残留的气相色谱测定法. 北京: 中华人民共和国农业行业标准 NY 5029—2001, 2001: 附录 D 41-43. Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination Chloramphenicol Residue by Gas Chromatography. Beijing: Agriculture Vocation Criterion of the People's Republic of China NY 5029—2001, 2001: Appendix D 41-43. (in Chinese)
- [8] 林海丹, 秦燕, 林峰, 朱柳明, 吴映璇. LC-MS-MS 测定水产品中氯霉素药物残留. 检验检疫科学, 2005, 15(增刊): 44-45. Lin H D, Qin Y, Lin F, Zhu L M, Wu Y X. Determination chloramphenicol residue in aquatic product by LC-MS-MS. *Inspection and Quarantine Science*, 2005, 15 (Suppl.): 44-45. (in Chinese)
- [9] 孙亮, 陈海云. GC-MS/MS 测定虾仁中氯霉素的研究. 中国卫生检验杂志, 2003, 13: 293-294. Sun L, Chen H Y. Determination Chloramphenicol residue in shrimp by GC-MS/MS. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*. 2003, 13: 293-294. (in Chinese)
- [10] 彭莉, 岳秀英. 高效液相色谱法测定牛奶中的氯霉素残留量. 中国兽药杂志, 2002, 36(8): 23-24. Peng L, Yue X Y, Determination chloramphenicol residue in milk by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2002, 36(8): 23-24. (in Chinese)
- [11] Mottier P, Parisod V, Gremaud E, Guy P A, Stadler R H. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography electro-spray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 994(1-2): 75-84

(责任编辑 林鉴非)