

文章编号: 1000-0615(2003)03-0278-05

## 气相色谱法测定水产品中氯霉素残留

赵文亚<sup>1</sup>, 沈美芳<sup>2</sup>, 徐幸莲<sup>1</sup>, 吴光红<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省水产质量检测中心, 江苏 南京 210017)

**摘要:**介绍了水产品中氯霉素残留量测定的气相色谱法。样品中的氯霉素用乙酸乙酯提取,正己烷去脂肪,过 Sep- C<sub>18</sub>柱进行净化,用 BSTFA-TMCS 衍生后进带有微电子俘获器的气相色谱仪检测。该方法的线性范围为 0.5~500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,相关系数  $r=0.999$ ,最低检测限为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,相对标准偏差为 4.3%~11.0%,向样品中分别添加 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  3 个浓度水平的氯霉素,回收率分别为 62.0%、88.2% 和 96.4%。方法灵敏度高,准确可靠,适合水产品中氯霉素残留量的检测。

**关键词:**水产品;氯霉素;气相色谱

中国分类号: X592 文献标识码: A

## Determination of chloramphenicol residues in aquatic products by gas chromatography

ZHAO Wen-ya<sup>1</sup>, SHEN Mei-fang<sup>2</sup>, XU Xing-lian<sup>1</sup>, WU Guang-hong<sup>2</sup>

(1. Department of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Aquatic Products Analysis and Testing Center of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China)

**Abstract:** A gas chromatography method had been established for the determination of chloramphenicol in aquatic products. Chloramphenicol was extracted with ethyl acetate and partitioned with *n*-hexane to remove lipids. Cleanup was performed on a Sep cartridge. After the drug was derived with BSTFA-TMCS, the derivatives were analyzed by capillary gas chromatography-electron capture detection. The linear range was from 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  to 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  with  $r$  of 0.999. The average recoveries were 62.0%, 88.2% and 96.4% respectively when samples were spiked with 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The detection limit was 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The RSDs were 4.3% - 11.0%. The method is sensitive, accurate and suitable for the determination of trace chloramphenicol in aquatic products.

**Key words:** aquatic product; chloramphenicol; gas chromatography

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素,对多种病原菌有较强的抑制作用,由于其效高价廉,曾在水产业中得到了广泛应用。同时,也不可避免地带来氯霉素在水产品中的残留问题。氯霉素存在着严重的毒副作用,能引起人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症,新生儿、早产儿灰色综合征

收稿日期: 2002-08-02

资助项目: 江苏省“十五”科技攻关资助项目(BE2001385)

作者简介: 赵文亚(1976-),女,山东滕州人,硕士研究生,专业方向为畜产品加工与质量控制。E-mail: zwy0828@sina.com

通讯作者: 沈美芳(1968-),女,江苏昆山人,副研究员,主要从事水产动物营养及检测技术研究。E-mail: mfshe2000@sina.com

等<sup>[1]</sup>,低浓度药物残留还会诱发致病菌的耐药性,对人类的健康构成巨大的潜在威胁。因此,氯霉素残留问题引起国际组织和世界上许多国家和地区的高度重视。

关于氯霉素的检测方法,国外文献报道的主要有酶免疫法<sup>[2]</sup>、放射免疫法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4-6]</sup>、气相色谱法<sup>[7,8]</sup>和气质联用法<sup>[9,10]</sup>。酶免疫法和放射免疫法主要用于大规模的筛选工作,不用于定量。高效液相色谱法前处理相对比较简单,但检出限比较高。气质联用法主要采用电子轰击源(EI)和负离子化学源(NCI),EI源的气质联用法检测限一般高于 $5\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,NCI源的气质联用法灵敏度高,检测限可达到 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,但NCI源的气质联用仪普及性差。配备ECD检测器的气相色谱法检测限也能达到 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,而且仪器比较普及,用此法检测氯霉素残留具有很高的推广意义。本文建立了分析水产品中氯霉素残留的气相色谱法,方法准确可靠、灵敏度高。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 仪器与设备

6890N/5973N 气质联用仪,配有<sup>63</sup>Ni 微电子俘获检测器( $\mu$ -ECD)(美国 Agilent 公司);RE-52A 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);Allegra<sup>TM</sup> 21R 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);XW-80A 微型旋涡混合仪(上海沪西分析仪器厂);固相萃取装置(美国 Supelco 公司);JA-5002 电子天平(上海精天电子仪器厂);微型高速万能试样粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司);ULTRA-TURRAX T18 分散机(广州仪科实验室技术有限公司)。

#### 1.1.2 药品与试剂

氯霉素标准品(Sigma C-0378),含量 99.5%;乙酸乙酯(分析纯,南京化学试剂厂);甲醇(色谱纯,美国 Tedia 公司);氯化钠(分析纯,南京化学试剂厂);正己烷(分析纯,上海陆都化学试剂厂);正己烷(色谱纯,美国 Tedia 公司);三氯甲烷(分析纯,南京化学试剂厂);乙腈(色谱纯,美国 Tedia 公司);丙酮(色谱纯,美国 Tedia 公司);无水硫酸钠(分析纯,南京化学试剂厂);BSTFA+TCMS(99:1,美国 Supelco 公司)。

#### 1.1.3 实验材料

实验材料为冻青虾,洗净,去头、去皮后取肌肉,用高速万能试样粉碎机打成匀浆,备前处理用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱:DB-35MS(30m×0.25mm×0.25 $\mu$ m);进样口温度:260℃;检测器温度:300℃;柱温:采用程序升温,初温:150℃(1min),升温速率:20℃·min<sup>-1</sup>,终温:260℃(10min);载气:99.999%高纯氮气,流量:1.5mL·min<sup>-1</sup>,线速度:39cm·s<sup>-1</sup>;尾吹气:99.999%高纯氮气,流量:60mL·min<sup>-1</sup>;进样方式:不分流进样,不分流时间:0.75min;进样量:1 $\mu$ L。

#### 1.2.2 标准溶液的配制

准确称取 0.025g 氯霉素标准品,置于 25 mL 容量瓶中,用丙酮溶解并定容,充分摇匀,配制成 1mg·mL<sup>-1</sup>的标准储备液。根据需要再用丙酮配成适当浓度的标准工作液。

#### 1.2.3 样品前处理

称取 5 g(精确至 0.01 g)粉碎样品置于 50 mL 具塞离心管中,加入 15 mL 乙酸乙酯,用分散机混匀,5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 4 min,将乙酸乙酯相转移到另一 50 mL 具塞离心管中。再向样品中加入 15 mL 乙酸乙酯,重复上述提取步骤,合并乙酸乙酯提取液,于 45℃水浴旋转蒸发至干。向残余物中加入 1 mL 甲醇,25 mL 4%氯化钠溶液,10 mL 正己烷,用涡旋混合仪混合 1 min,5000 r·min<sup>-1</sup>离心 4 min,弃去正己烷相;再向水相中加入 10 mL 正己烷,同上操作,弃去正己烷相。水相中加入 15 mL 乙酸乙酯,涡旋混合

2min,  $5\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心4min。吸取乙酸乙酯相,通过  $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘4h的无水硫酸钠吸水并滤至于梨形瓶中,用少量乙酸乙酯淋洗无水硫酸钠,旋转蒸发至干。用3mL乙腈/水(5:95, V/V)将残余物溶解后过 Sep- pak  $\text{C}_{18}$ 柱。小柱预先依次用5mL甲醇,5mL三氯甲烷,5mL甲醇和10mL水淋洗。加样品提取液,用5mL乙腈/水(5:95)淋洗。用2mL乙腈洗脱,洗脱液用微氮吹干。向所得的残余物中加入100 $\mu\text{L}$ 硅烷化试剂,盖塞,并混合5s,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热30min,微氮气吹干,加入1mL正己烷,供分析用。

## 2 结果

### 2.1 色谱图

在1.2.1色谱条件下,氯霉素标准品( $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )和样品的典型色谱图见图1,两者的相对保留时间均为9.78min,峰形尖锐,对称,与临近峰完全分离。

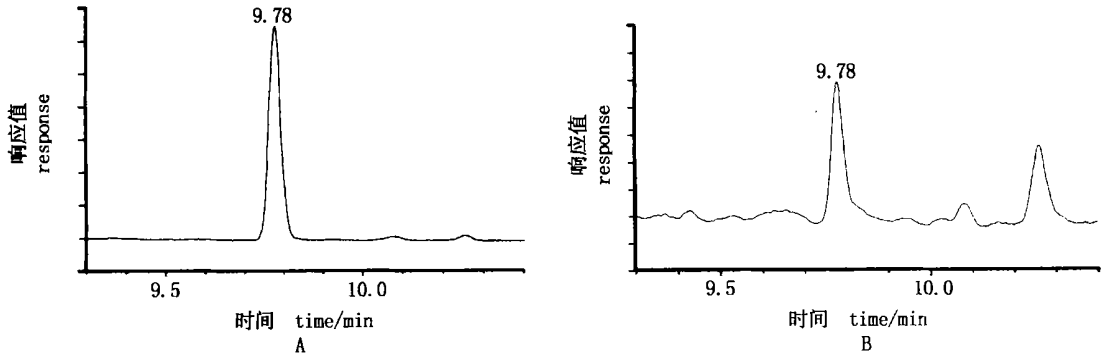


图1 氯霉素标准品(A)与样品(B)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard (A) and sample (B)

### 2.2 线性关系

配制浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )依次为0.5、20、50、100、200和500的氯霉素标准液,衍生后进样,测定其峰高响应值(表1),以峰高值对质量浓度做工作曲线(图2)。氯霉素在浓度为0.5~ $500\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的范围内呈良好的线性关系,线性方程为 $Y=322214X$ ,线性系数 $r=0.999$ 。

### 2.3 最低检测限(MDL)的测定

根据气相色谱法最低检测限测定方法测定<sup>[11]</sup>,按公式 $\text{MDL}=2\text{NC}/\text{R}$ 计算。式中MDL为最低检测限,C为标样浓度(标准曲线中的低限浓度),N为实测噪声,R为检测器( $\mu\text{-ECD}$ )响应值,本文为峰高。将 $0.5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标样衍生后进样,测得 $N=13\,500$ , $R=137\,091$ ,按上式计算得本方法氯霉素的最低检测限为 $0.1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,此与参考文献[7]报道一致。

### 2.4 精密度的测定

分别配制 $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3种

表1 不同浓度氯霉素衍生物响应值

Tab. 1 The response of various CAP derivative concentrations

浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) concentration	0.5	20	50	100	200	500
峰高( $\times 10^6$ ) peak height	0.14	6.48	15.25	30.28	66.24	160.86

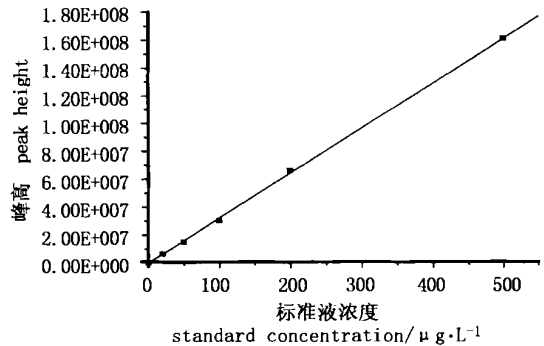


图2 氯霉素标准曲线

Fig. 2 The standard curve of CAP

质量浓度的标准液, 衍生后在同一天内分别进样 5 次, 在 1 周内选择 3d 进样, 计算日内及日间精密度, 结果见表 2。

## 2.5 回收率的测定

向样品中分别添加 3 个浓度水平的氯霉素:  $1\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $20\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每个浓度做 3 个平行, 每个平行设一个空白对照, 按方法 1.2.3 处理后测定回收率(表 3)。

表 2 精密度测定

Tab. 2 Precisions of CAP determination

浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) concentration	日内精密度(n=5) intra-day precisions		日间精密度(n=3) inter-day precisions	
	$\bar{X}\pm\text{SD}$ ( $\times 10^6$ )	RSD (%)	$\bar{X}\pm\text{SD}$ ( $\times 10^6$ )	RSD (%)
5	$1.34\pm 0.079$	5.9	$1.13\pm 0.050$	4.4
50	$14.27\pm 0.61$	4.3	$13.82\pm 0.61$	4.4
100	$29.76\pm 3.27$	11.0	$28.95\pm 1.45$	5.0

表 3 回收率测定结果

Tab. 3 Results of recovery of experiment n=3

添加浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) concentration	测定值 ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) result	回收率 (%) recovery	RSD (%)
1	$0.62\pm 0.02$	62.0	3.2
10	$8.82\pm 0.94$	88.2	10.7
20	$19.28\pm 1.20$	96.4	6.2

## 2.6 衍生化产物的确定

将  $50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的标样衍生后进 GC/MS 分析, 总离子色谱图如图 3 所示, 在 9.65 min 时有一明显产物峰, 其对应的质谱图为图 4, 特征离子峰为  $m/z$  242, 225, 208 和 73, 经谱库检索该物质为  $\text{di}(-\text{OH})_2\text{-TMS}$  (二硅烷化产物), 其化学结构如图 4 中所示。

## 3 讨论

### 3.1 样品中氯霉素的提取

在提取样品中的氯霉素的时候, 采用分散机混匀, 而不是用涡漩混合仪混匀, 可使样品进一步匀浆, 使氯霉素提取的比较完全。

### 3.2 氯霉素的定性

试验采用 3 种方法对氯霉素进行定性: (1) 在相同的色谱条件下, 将样品色谱图与氯霉素标准液色谱图进行对照, 根据保留时间确定样品中的氯霉素; (2) 在样品中加入氯霉素的标准液, 根据峰高的突增来确定样品中的氯霉素; (3) 用质谱对氯霉素进行定性。

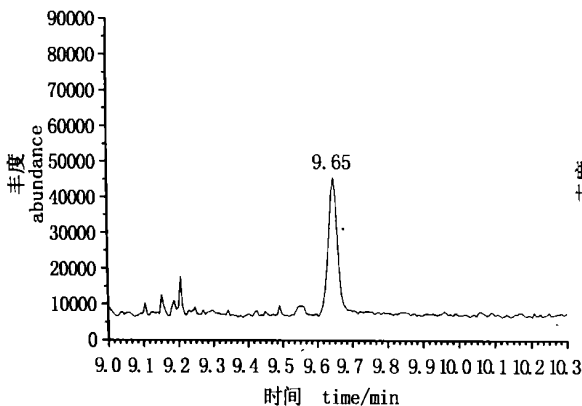


图 3 总离子流色谱图

Fig. 3 Total ion chromatography

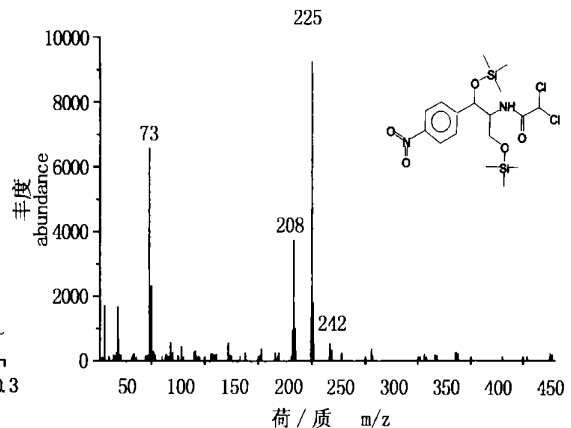


图 4 对应于 9.65 分的质谱图和衍生物结构图

Fig. 4 Mass spectrum and structure of

derivate corresponding to 9.65m peak

### 3.3 衍生化产物的确定

Keukens<sup>[5]</sup>等报道用 BSTFA-TMCS 对氯霉素进行衍生时只有两羟基(-OH) 被取代的 di(-OH)<sub>2</sub>-TMS 产物, 而 Weber<sup>[7]</sup>则报道除了 di(-OH)<sub>2</sub>-TMS 产物外, 还有氨基(-NH) 同时被取代的 tri(-OH)<sub>2</sub>(-NH)-TMS(三硅烷化产物), 在色谱图上会有两个峰出现, 这就给定量带来困难。本实验用质谱对衍生化产物进行了确定。将 10mg·L<sup>-1</sup>和 50mg·L<sup>-1</sup>的标样衍生后进质谱, 分别对两种浓度的质谱图进行分析, 结果都表明产物只有 di(-OH)<sub>2</sub>-TMS, 而没有 tri(-OH)<sub>2</sub>(-NH)-TMS。这证明用 BSTFA-TMCS 衍生只有 di(-OH)<sub>2</sub>-TMS, 与 Keukens 等报道是一致的。所以用二取代产物进行定量是可靠的。

## 4 结论

本试验所建立的色谱条件, 能使氯霉素衍生物在色谱图上有合适的保留时间, 且峰形尖锐、对称, 与临近峰完全分离。该方法的最低检测限为 0.1 μg·kg<sup>-1</sup>, 相对标准偏差为 4.3% ~ 11.0%, 当样品中分别添加 1 μg·kg<sup>-1</sup>、10 μg·kg<sup>-1</sup>、20 μg·kg<sup>-1</sup> 3 种浓度水平的氯霉素时, 平均回收率分别为 62.0%、88.2% 和 96.4%。以上结果表明, 该方法灵敏度高, 重复性和准确性好, 适合水产品中氯霉素残留分析。

### 参考文献:

- [ 1 ] Allen E H. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, egg and tissues from food-producing animal[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68: 990- 999.
- [ 2 ] Water D, Haagsma N. Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue[J]. Assoc Off Anal Chem, 1990, 73: 534- 540.
- [ 3 ] Arnold D, Somogyi A. Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay[J]. Assoc Off Anal Chem, 1985, 68: 984- 990.
- [ 4 ] Nagata T, Saeki M. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography[J]. Liquid Chromatography, 1992, 15: 2045- 2056.
- [ 5 ] Sanders P, Guillot P, Dagorn M, et al. Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in calf tissues: studies of stability in muscle, kidney and liver[J]. Assoc Off Anal Chem, 1991, 74(3): 483- 486.
- [ 6 ] Keukens H J, Aerts M M L, Trag W A. Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in meat : preliminary studies in milk[J]. Assoc Off Anal Chem, 1992, 75 (2): 245- 256.
- [ 7 ] Weber L. Trace analysis of chloramphenicol residues in egg powders by capillary gas chromatography-electron capture detection [J]. Chromatographic Science, 1990, 28: 501- 504.
- [ 8 ] Munns R K, Hollard D C, Roybal J E, et al. Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp: interlaboratory study [J]. J Aoac Int, 1994, 77(3): 596- 601.
- [ 9 ] Tomoko N, Hisao O. Detection of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in yellowtail fish muscles by capillary gas chromatography-mass spectrometry[J]. Agric Food Chem, 1996, 44: 1280- 1284.
- [ 10 ] Kijak P J. Confirmation of chloramphenicol residues in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Aoac Int, 1994, 77(1): 34- 40.
- [ 11 ] Yang H F, Dai Y, Wang S C, et al. Handbook of standard analysis and testing on food hygiene[S]. Beijing: China Standard Press, 1997. 21. [ 杨惠芬, 戴 寅, 王叔淳, 等. 食品卫生理化检验标准手册[S]. 北京: 中国标准出版社, 1997. 21.]