

同时测定鱼肉中氯霉素和甲矾霉素 残留量的毛细管气相色谱法

王建华, 陈世山

(青岛出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002)

摘要: 研究了鱼肉中氯霉素和甲矾霉素残留量的气相色谱测定方法。鱼肉中的待测物用乙酸乙酯提取, 浓缩至干, 溶于水, 用正己烷脱脂, 水层过 C_{18} 小柱, 用甲醇洗脱后, 用 N, O -双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺(BSTFA) + 1% (φ) 三甲基氯硅烷(TMCS) 衍生, 加入甲苯并用水灭活衍生过程。用外标法定量。当添加水平(w)为 $5 \times 10^{-9} \sim 20 \times 10^{-9}$ 时, 回收率为 80% ~ 108%。相对标准偏差为 4.5% ~ 11%; 线性相关系数 $r > 0.997$ 。

关键词: 鱼肉; 氯霉素; 甲矾霉素; 气相色谱法

中图分类号: X560.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2001)03-0089-03

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素, 因其苯环上有硝基, 故对人体有严重副作用。许多国家禁止其在供人类食用的水产品、畜产品上使用。甲矾霉素(thiamphenicol, TAP)与 CAP 同属于一类(氯霉素类), 但毒性比氯霉素小, 我国和日本等国允许其使用。而美国则禁止其在水产品中使用。氯霉素在水产品、畜产品中残留的检测方法, 国内外报道很多。多为 HPLC-UV 法^[1], GC-ECD(电子捕获检测器)法^[2, 3]。而测甲矾霉素残留方法较少, 经过对 1989~2000 年 4 月国内文献光盘检索尚未见报道。采用 HPLC 法同时测定 CAP、TAP 等在牛、羊、鸡和鱼肉残留只有一篇报道^[4], 且 TAP 在 225 nm 检测, CAP 在 270 nm 检测。国外也只有少量采用 GC 法同时测定 CAP、TAP 在牛奶^[5]、对虾^[6]中残留量的报道。

本文建立了同时测定鱼肉中 CAP、TAP 残留量的 GC-ECD 分析方法。通过优化实验条件, 能对 5×10^{-9} (w) 水平的 CAP、TAP 残留准确定量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP5890 II 气相色谱仪, 包括分流/不分流进样口, ⁶³Ni 电子捕获检测器, HP3398A 化学工作站, 自动进样器; 分流/不分流进样垫管(4 mm, 去活化, 澳大利亚 SGE 公司); SK-1 快速混合旋涡器、Alltech 24 管真空固相萃取装置。甲苯、正己烷均为国产分析纯试剂, 用前重蒸; 氯霉素(UPS, AMRESCO 分装), 甲矾霉素(Sigma), 分别用乙腈(色谱纯)配制标准储备液。标准曲线溶液的配制和衍生参照文献[5]。衍生化试剂: Sylon HTP{六甲基二硅胺[HMDS]-三甲基氯硅烷(TMCS)-吡啶[pyridine](体积比 3:9:1)}, 1 mL 安培瓶; Sylon BFT{ N, O -双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺[BSTFA]-三甲基氯硅烷(TMCS)}(体积比 99:1)}, BSTFA, 0.1 mL 安培瓶; 均为美国 Supelco 产品(购自北京康林公司)。固相萃取柱(SPE): C_{18} , 每 3 mL 含 500 mg, Varian 公司产品, Silica gel, 每 3 mL 含 500 mg, Supelco 公司产品。

1.2 气相色谱条件

色谱柱: Ultra 2(5% 交联苯基, 甲基硅酮, 25 m × 0.32 mm × 0.52 μm); 进样口和检测器温度分别为 250 °C 和 310 °C; 柱温程序: 初温 150 °C, 保持 0.5 min, 然后以 30 °C/min, 升至 270 °C, 保持 7.5 min, 再以 30 °C/min 升至 290 °C, 保持 5 min, 柱前压 50 kPa; 载气流速: 1 mL/min, 阳极吹扫: 4 mL/min, 隔垫吹扫 4 mL/min, 尾吹 40 mL/min; 采用不分流进样, 进样 0.7 min 后开始分流(purge on)。载气、尾吹气均为纯氮, 外标法峰高定量, 进样量 3 μL。

1.3 实验方法

取 25 g 搅碎的样品与 50 g 无水硫酸钠在磁坩锅中研磨均匀。取 15.0 g 混合样(相当于 5.0 g 样品)于 50

收稿日期: 2000-08-15; 修回日期: 2001-03-19

作者简介: 王建华(1968-), 男, 山东青岛人, 工程师。

mL 聚乙烯塑料离心管, 加入 15 mL 乙酸乙酯, 漩涡混合 1 min, 3 000 r/min 离心, 分层, 用一次性塑料吸管将上层有机相转入鸡心瓶; 再重复提取, 合并有机层, 在 60 °C 水浴旋转蒸发至干; 加入 5 mL 正己烷超声溶解 30 s, 漩涡混合, 转至另一干净 50 mL 离心管, 再加 30 mL 水, 重复上述操作, 合并溶液, 快速混匀, 3 000 r/min 离心 2 min, 除去上层正己烷, 重复两次; 水层转入预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化的 C_{18} 小柱, 抽真空, 保持流速每秒 1 滴, 再用 10 mL 水洗涤; 完全抽干后, 用 4 mL 甲醇洗脱至 5 mL 离心管, 在 50 °C 干浴上用氮气吹干。加入衍生化试剂 Sylon BFT 100 μ L, 在烘箱 (50 °C) 中衍生 20 min, 冷却后, 加入 400 μ L 甲苯和 200 μ L 水快速混匀, 离心, 取上清液于自动进样瓶中。

2 结果与讨论

2.1 衍生化试剂的选择

衍生化试剂主要包括: Sylon HTP^[2, 3]、Sylon BFT^[5, 6]、BSTFA。它们将氯霉素等的羟基硅烷化衍生成易挥发、热稳定的同一个物质。Sylon HTP 的最小包装为 1 mL, BSTFA、Sylon BFT 的最小包装为 0.1 mL, 因它们吸潮易分解, 故打开安培瓶后需尽快用完。BSTFA 的衍生产物的响应比 Sylon BFT 低 4% 左右, Sylon HTP 体积过大, 易浪费。故选择 0.1 mL Sylon BFT 为衍生化试剂。

2.2 衍生化反应条件的选择

实验表明, 衍生后吹干衍生化试剂, 再加甲苯测定结果不稳定, 特别是 TAP 更明显。说明衍生化试剂与分析物在进样口继续反应。加入少量水可使衍生化试剂灭活, 终止反应并可以减小前延峰, 还可将洗脱下来的水溶性污染物转至水相, 有机相无色透明。若离心后放置 10 min 以上, 取甲苯层进样, 则 TAP 峰面积减少, 而 CAP 无显著变化, 可能是 TAP 衍生产物分解造成的。

2.3 提取、净化条件的选择

提取溶剂通常为乙酸乙酯^[2-4, 6]、乙腈^[5]。实验表明, 乙酸乙酯提取杂质多, 提取液颜色较深, 但乙酸乙酯提取效率高, 毒性小。乙酸乙酯浓缩至干, 加入水溶解残渣, 用正己烷除去部分脂类物质, 再用固相萃取法进一步净化。比较硅胶柱^[4]和 C_{18} 柱^[5, 6]的回收率, C_{18} 柱回收率较高, 故选择 C_{18} 柱。过 C_{18} 柱要注意流速保持每秒 1 滴, 否则净化效果及回收率较差。实验发现, 使用去活化的进样垫管, 可以减小衍生产物在进样室内不可逆吸附, 提高灵敏度; 进样品 100 次后更换衬管。

2.4 方法的回收率和精密度

取相当于样品含量 (w) 5×10^{-9} 、 10×10^{-9} 、 20×10^{-9} 、 40×10^{-9} 、 80×10^{-9} 的 5 个标准溶液测定, CAP、TAP 的含量与峰高呈线性关系, 相关系数分别为 0.997、0.998。表 1 列出了添加 3 水平 (5×10^{-9} 、 10×10^{-9} 、 20×10^{-9}) 的鳊鱼样品的回收率和相对标准偏差。色谱图见图 1。

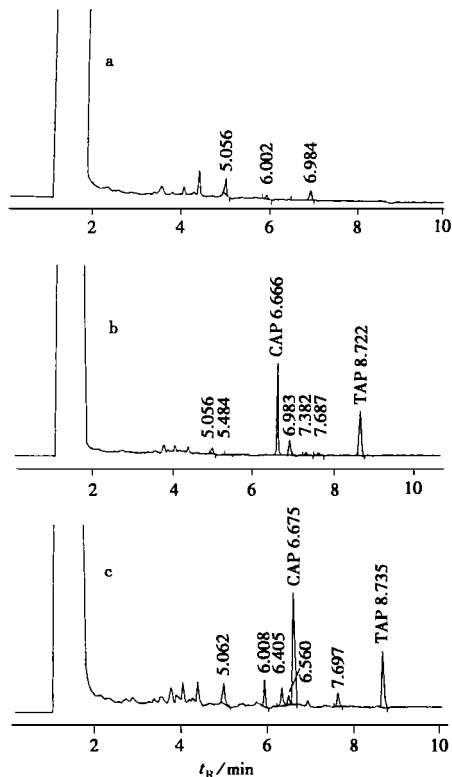


图 1 鳊鱼空白(a)、 10×10^{-9} 标准(b)和添加 10×10^{-9} 标准的鳊鱼样品(c)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of eel blank(a), standard of 10×10^{-9} (b) and spiked eel sample of 10×10^{-9} (c)

表 1 鳊鱼样品的 CAP 和 TAP 回收率和相对标准偏差
Table 1 Recoveries of CAP and TAP in spiked eel sample

Spiked level $w/10^{-9}$	Compound	Mean recovery $R/\%$ ($n=5$)	RSD $s_r/\%$ ($n=5$)
5	CAP	80	11
5	TAP	90	10
10	CAP	94	4.5
10	TAP	99	9.0
20	CAP	90	4.9
20	TAP	108	9.0

参考文献:

- [1] KEUKENS H J, AERTS M M L, TRAAG W A, *et al.* Analytical strategy for the regulatory control of residues of chloramphenicol in meat: Preliminary studies in milk[J]. *J AOAC Int*, 1992, 75(2): 245- 256.
- [2] EPSTEIN R L, HENRY C, HOLLAND K P, *et al.* International validation study for chloramphenicol in bovine muscle[J]. *J AOAC Int*, 1994, 77(3): 570- 576.
- [3] MUNNS R K, HOLLAND 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.
- [4] NAGATA T, SAEKI M. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, and chloramphenicol residues in muscles of animals and cultured fish by liquid chromatography[J]. *J Liq Chromatogr*, 1992, 15(12): 2045- 2056.
- [5] PFENNING A P, MADSON M R, ROYBAL J E, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection[J]. *J AOAC Int*, 1998, 81(4): 714- 720.
- [6] PFENNING A P, ROYBAL J E, RUPP H S, *et al.* Simultaneous determination residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine, and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection[J]. *J AOAC Int*, 2000, 83(1): 26- 30.

Simultaneous Determination of Chloramphenicol and Thiamphenicol in Fish Tissues by Capillary GC- ECD

WANG Jian_hua, CHEN Shi_shan

(Qingdao Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: A gas chromatographic (GC) method is described for the determination of chloramphenicol (CAP) and thiamphenicol (TAP) residues in fish tissues. Samples were extracted with ethyl acetate, and evaporated to dryness. The residues were dissolved in water, defatted with hexane, and passed through a C₁₈ SPE column. The C₁₈ SPE column was eluted with MeOH. The eluate was derivatized with *N, O*-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TMCS). After derivatization, toluene was added to sample, followed by water, to quench the derivatization process. The quantitative determination was performed with an external standard method. The relative standard deviations were 4.5% ~ 11%, and the recoveries were 80% ~ 108%. The correlation coefficient $r > 0.997$.

Key words: Fish tissues; Chloramphenicol; Thiamphenicol; Gas chromatography

分析测试学报

(双月刊 1982年创刊)

第 20 卷 第 3 期

编辑出版:《分析测试学报》编辑部

(地址:广州市先烈中路 100 号

中国广州分析测试中心内
510070; 电话: 87759776)

E-mail: fxc_sxb@ceshi.gis.sti.gd.cn

本期责任编辑: 谭永基 潘伟健

主办: 中国分析测试协会

协办: 中国广州分析测试中心

主编: 程青

副主编: 张展霞 谢培山

编辑部主任: 吴惠勤

总发行处: 广东省报刊发行局

订购处: 全国各地邮局

国外总发行: 中国国际图书贸

易总公司(北京 399 信箱)

国内统一刊号: CN 44-1318/TH

广告经营许可证: 粤 010029

FENXI CESHI XUEBAO

Journal of Instrumental Analysis

(Bimonthly, Established in 1982)

Vol. 20 No. 3 May 25 2001

Sponsored by China Association for Instrumental Analysis.

Assisted by Chinese National Analysis Centre, Guangzhou.

Editor_in_chief Cheng Zhiqing.

Edited & Published by Editorial office of FENXI CESHI

XUEBAO (100 Xianlie Zhong Road, Guangzhou,

510070, PRC)

Distributed Abroad by China International Book Trading

Corporation (P. O. Box 399 Beijing, PRC)

出版日期: 2001 年 5 月 25 日 邮发代号: 国内 46-104 国外 BM 6013 印刷: 广东精装印务有限公司 定价: 8.00 元
国际标准刊号: ISSN 1004-4957