

对虾中残留氯霉素的负化学源 GC/MS 分析

徐继林, 严小军, 徐年军, 冯 凯

(宁波大学 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要:建立了对虾中残留氯霉素(CAP)负化学源(NCI)的 GC/MS 分析方法。样品中 CAP 用乙酸乙酯提取, 脂肪用正己烷去除, 过聚苯乙烯型 Diaion HP-20 吸附层析小柱纯化样品, BSTFA-TMCS 衍生后用 NCI 源选择 m/z 为 466 的特征离子为目标离子, 在 SIM 模式下进行 GC/MS 分析。被检测 CAP 质量浓度在 5~500 $\mu\text{g/L}$ 内, 方法的线性关系良好, 相关系数为 0.998 8。方法的最低检测限达到 0.037 $\mu\text{g/kg}$ 。当空白样品 CAP 水平为 1~100 $\mu\text{g/kg}$ 时, 平均回收率达 71.33%~95.29%, 相对标准偏差为 1.73%~7.45%。用此方法对市场销售的人工养殖南美白对虾(*Penaeus vannamei*)肌肉样品进行测定, 结果显示氯霉素残留量为 $(0.154 \pm 0.008) \mu\text{g/kg}$, 而野生脊尾白虾(*Palaemon carinicauda*)肌肉样品中未检出 CAP 残留。

关键词: 对虾; 氯霉素; 负化学源; 气相色谱质谱联用

中图分类号: S912 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)02-0111-05

我国从 20 世纪 80 年代开始在水产养殖业中广泛应用氯霉素(Chloramphenicol, CAP)。由于它对人体具有严重的毒副作用^[1], 医学界至今还没能确定氯霉素的人体安全接触剂量。美国及欧盟都禁止在食用性动物和动物饲料中使用氯霉素^[2], 在法规中 CAP 的残留限量标准为不得检出^[3]。由于氯霉素在水产品中的残留超标, 我国水产品的出口已经受到严重的冲击, 并且开始波及到其他动物制品的出口。我国政府已明文禁止在渔牧养殖中使用含有氯霉素的兽药和渔药, 并加强了对食物性产品中氯霉素的检测监督力度。

目前美国和欧盟的对 CAP 的检测限分别是 1 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 美国在近期改进实验方法后可能将标准降至 0.3 $\mu\text{g/kg}$ 甚至 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。因此, 水产品中氯霉素残留检测方法的检测限已在国际贸易中形成新的限制性指标, 提高检测方法的灵敏度使检测限低于 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 已成为当务之急。目前, 水产品中氯霉素的残留测定方法有多种, 但检测限能达到 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 且回收率和稳定性均良好的方法还很少见^[4]。

负离子化学(negative chemical ion, NCI)源的气相色谱质谱联用(GC/MS)分析对具有强电子亲

和力的化合物有着较高的灵敏度^[5], 以前由于气质联用仪 NCI 源的单一性, 普及性较差; 现在, 同一台质谱仪内不同源可以极为方便的互换, 使得 NCI 源的气质联用分析更广泛地得到应用。本研究建立了 NCI 源气相色谱质谱联用检测虾体中氯霉素残留的方法, 以期水产品中的氯霉素残留提供方便灵敏的检测手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备 QP2010 型 GC-MS 联用分析仪, 带 AOC-20 自动进样器(日本 SHIMADZU 公司); 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm SPB-50 色谱柱(美国 SUPELCO 公司); 国产高速分散匀质机、旋转蒸发仪、旋涡混合仪、高速离心机、电子天平等。

1.1.2 试剂 氯霉素标准品(99.5%, 美国 SIGMA-ALDRICH 公司); Diaion HP-20 柱料(美国 SUPELCO 公司); 三氟双(三甲基硅烷基)乙酰胺(BSTFA) + 三甲基氯硅烷(TMCS)(99:1, 美国 SUPELCO 公司); 正己烷(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲醇(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2003-08-15; 修订日期: 2003-11-18.

资助项目: 国家新药基金项目(2003AA2Z3511); 浙江省青年人才基金项目(RC02059)。

作者简介: 徐继林(1965-), 男, 助理, 主要从事海洋生物化学研究。Tel: 0574-87600458, E-mail: xjlsyf@mail.nbptt.zj.cn

通讯作者: 严小军。Tel: 0574-87600458, E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

1.1.3 样品 购自宁波市场的人工养殖的鲜活南美白对虾(*Penaeus vannamei*),体长10~12 cm,去头、壳后取肌肉,用高速分散匀质机匀浆,备用。测定回收率时样品采用野生脊尾白虾(*Palaemon carincauda*),同样处理后备用。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液配制 电子天平准确称取25.0 mg 氯霉素标准品,色谱纯甲醇溶解定容到50 mL,充分摇匀,配制成500 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。制作工作曲线时再取此储备液用甲醇配制成其他浓度的标准溶液。

1.2.2 样品预处理 称取10.0 g肌肉样品,置于50 mL离心管中,加乙酸乙酯15 mL,漩涡混合1 min,4 000 r/min离心5 min,乙酸乙酯相转移到梨形瓶中。重复加入乙酸乙酯15 mL提取样品,合并提取液。50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转蒸发至干。加入2 mL甲醇超声溶解残留物30 s,转移入15 mL离心管中,先后加入4 mL 4%氯化钠水溶液和4 mL正己烷,漩涡混合2 min,4 000 r/min离心5 min,弃掉上层有机相。再向离心管中加4 mL正己烷,离心,弃去上层有机相。将水相部分直接加样于经过甲醇和蒸馏水预平衡的Diaion HP-20小柱,氯霉素将浓缩吸附于柱材料上,先用30 mL蒸馏水淋洗,待水沥干后,用20 mL甲醇洗脱,洗脱液在旋转蒸发仪上50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴蒸发至干,加入BSTFA+TMCS(99:1)100 μL ,充氮气1 min,盖塞,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热反应1 h,氮气吹干,1 mL色谱纯正己烷定容,供GC/MS分析用。

1.2.3 分析条件 GC条件:进样口温度280 $^{\circ}\text{C}$,载气为99.999%的高纯氮,总流速30 mL/min,柱流速2.00 mL/min,柱前压134.2 kPa,柱起始温度80 $^{\circ}\text{C}$,保持1 min,以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至260 $^{\circ}\text{C}$,保持10 min,再以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至300 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min。不分流进样1 μL 。

MS条件:用电子轰击(electron impact, EI)源分析时,电子能量为70 eV,离子源温度200 $^{\circ}\text{C}$,接口温度250 $^{\circ}\text{C}$,选取全程离子碎片扫描(SCAN)模式时,质量扫描范围为40~600,溶剂延迟3.5 min。用NCI源分析时,反应气为甲烷,SCAN模式时,质量扫描范围为40~600;选取特征离子碎片扫描(SIM)模式时,目标离子选取荷质比(m/z)466离子,参考离子选取 m/z 为468,322,328的离子。

2 结果

2.1 不同离子源不同模式下GC/MS对氯霉素的测定

分别使用EI源和NCI源对标准品衍生物(25 mg/L)在SCAN模式下进行测定,其保留时间一致(图1-①、②)峰高分别为321 468和1 928 542;在使用NCI源进行分析时,两种测定模式下的保留时间也完全一致(图1-②、③);使用NCI源在SIM模式下分析样品,色谱峰峰形对称,出峰尖锐,没有杂峰干扰(图1-④)。

2.2 工作曲线

配制质量浓度分别为500、250、100、50、20和5 $\mu\text{g/L}$ 的标准样品溶液,衍生后用NCI源在SIM模式下作GC/MS检测(表1)。以样品质量浓度为横坐标, m/z 比为466的特征离子峰信号响应值(峰高)为纵坐标绘制工作曲线。在5~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内CAP的含量与峰高线性关系良好,线性方程为 $Y=3.045X$,相关系数 $R=0.9988$ 。

表1 不同浓度的氯霉素衍生物中荷/质比为466特征离子响应值

Table 1 Ion responses of CAP derivative at different concentrations ($m/z=466$)

浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration	5.00	20.00	50.00	100.00	250.00	500.00
峰高($\times 10^4$) Peak height	1.69	6.73	16.45	30.33	70.56	154.92

2.3 回收率和精密度

取10.0 g脊尾白虾样品(空白分析未检出CAP)。加入相当于样品含量1、10、100 $\mu\text{g/kg}$ 的CAP,每个水平设3个平行,按照1.2.2步骤和1.2.3分析条件测定回收率,同时计算出方法的精密度(表2)。可见,当添加水平在10 $\mu\text{g/kg}$ 以上时,方法回收率大于90%,相对标准偏差小于5%,结果良好。当添加水平在1 $\mu\text{g/kg}$ 时,回收率也能大于70%,相对标准偏差小于10%,说明方法在此浓度下也是可信的。

2.4 检测限

将2.0 $\mu\text{g/L}$ 标准样衍生后根据1.2.3分析条件用NCI源在SIM模式下作GC/MS检测,QP2010气相色谱-质谱分析仪随机所载SNRATIO软件测得信噪比54.38,将信噪比为2的浓度作为仪器检

测限^[6],可求得仪器检测限为 $0.074 \mu\text{g/L}$ 。如果将信噪比为 10 的含量作为 CAP 在样品中的最低可定

量检测的含量,那么可求得该方法的检测限为 $0.037 \mu\text{g/kg}$ 。可见该方法相当灵敏。

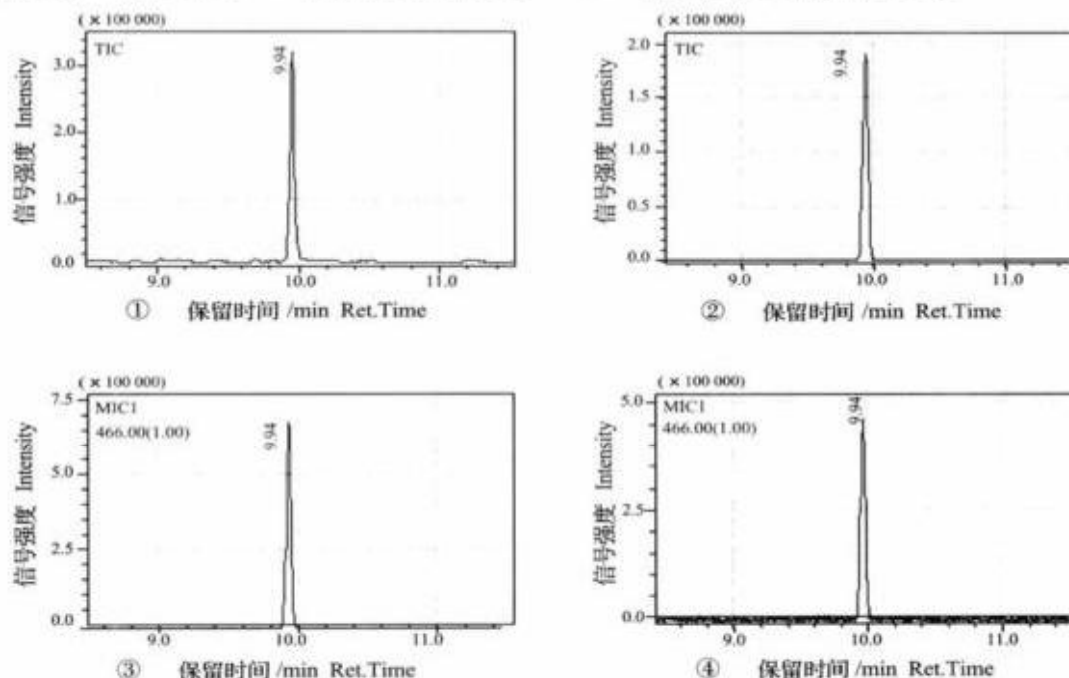


图1 氯霉素标准品与样品衍生物在不同测定模式下的色谱图

Fig.1 Chromatograms of standard and sample derivatives in different determine patterns

注: ① 25mg/L 标准品衍生物用 EI 源在 SCAN 模式下的色谱图; ② 25mg/L 标准品衍生物用 NCI 源在 SCAN 模式下的色谱图; ③ 200 $\mu\text{g/L}$ 标准品衍生物用 NCI 源在 SIM 模式下的色谱图; ④ 样品衍生物用 NCI 源在 SIM 模式下的色谱图。

Note: ① Chromatogram of 25mg/L standard derivative with EI in SCAN mode; ② Chromatogram of 25mg/L standard derivative with NCI in SCAN mode; ③ Chromatogram of 200 $\mu\text{g/L}$ standard derivative with NCI in SIM mode; ④ Chromatogram of the sample derivative with NCI in SIM mode.

表2 固相萃取后氯霉素的回收率

Table 2 Recovery of CAP after solid phase cleanup

添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})^*$ Initial content	测定值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$ Observed value				回收率/% Recovery	RSD/%
	1	2	3	$\bar{x} \pm \text{SD}$		
1.00	0.71	0.65	0.78	0.71 ± 0.05	71.33	7.45
10.00	9.03	8.83	9.42	9.09 ± 0.30	90.93	3.30
100.00	95.44	97.23	93.21	95.29 ± 1.64	95.29	1.73

* 注: 相当于虾体重的氯霉素含量

Note: Corresponding to the weight of CAP in shrimp tissue.

2.5 样品 CAP 残留

取 10.0 g 人工养殖的南美白对虾肌肉按上述条件平行测定 3 次,测得 CAP 残留量为 $(0.154 \pm 0.008) \mu\text{g/kg}$,相对标准偏差为 5.19%。从野生脊尾白虾样品中未检出 CAP 残留。

3 讨论

3.1 氯霉素的定性及测定模式的选取

EI 源是利用直热式阴极发射的电子去轰击气体状态的分子或原子,使其电离,产生的碎片离子多,有利于结构分析。NCI 源是通过分子-离子反

应使样品电离,得到的离子多数是准分子离子,有利于确定化合物的分子量,而且对带有电负性较大原子的分子比 EI 有更强的信号^[5]。从本实验对 25 mg/L 氯霉素标准溶液测定的结果也可以看出(图 1-①、②),对同一浓度氯霉素响应,同样采用 SCAN 模式,NCI 源的响应信号是 EI 源响应信号的 6 倍左右,而且背景噪音也小得多,所以选择 NCI 源对样品进行分析。又由于在 SIM 模式下质谱仪只对选择性离子进行响应,比 SCAN 模式有更高的灵敏度,

所以,本研究最终选择用 NCI 源在 SIM 模式下对 CAP 进行分析。

根据标准物质在 SCAN 模式下分别用 EI 和 NCI 源的 GC-MS-TIC 图可见,同在 9.94 min 有信号响应(图 1-①、②),依该信号的 NCI-MS 图谱(图 2-①),可以确定此响应物质的相对分子质量为 466;再根据该信号的 EI-MS 图谱(图 2-②),最终可以确定此物质是双羟基被取代的氯霉素硅烷化产物。这跟 Keukens 等的报道一致^[7]。

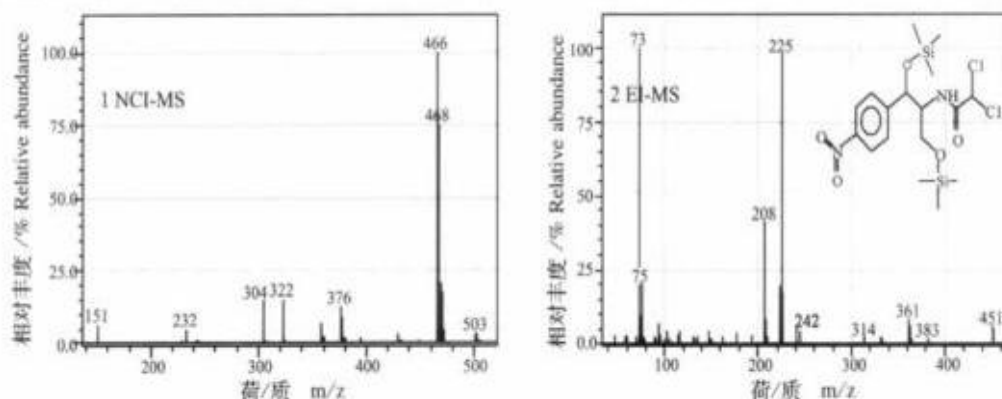


图2 氯霉素 TMS 衍生物的质量谱图和结构图
Fig.2 Mass spectrum and structure of CAP TMS derivative

根据 NCI-MS 图谱(图 2-①),选择离子碎片强度最大的 m/z 466 的离子为 SIM 模式的目标离子。由于在实际测定中不可能每次都通过 EI-MS 确认目标化合物是否是氯霉素的衍生物,为了确定测定的化合物是氯霉素,故在 NCI 源的 SIM 模式下,再选择 m/z 分别是 468、322、304 的特征离子作为参考离子,只有当这 4 种离子的相对丰度与标准物一致时,才认为测定的化合物正是所要检测的。

3.2 提取、纯化条件的选择

针对氯霉素,常用的提取溶剂有乙酸乙酯和乙腈^[8-9],虽然乙酸乙酯提取后杂质较多,颜色深,但其提取效率高,毒性比乙腈小,而且脂质杂质可用正己烷分配去除,再通过固相萃取,可使样品得到进一步纯化;氯霉素的固相萃取使用反相填料, C_{18} 柱较常用^[9-10],有现成的进口商品(美国 Waters 公司),但该商品柱成本较高,不适宜于大量样品的反复预处理,因此本实验中采用自行填装的聚苯乙烯型 Diaion HP-20 吸附层析小柱,用甲醇洗脱,2.3 结果表明回收率和重现性均良好。

3.3 仪器分析条件对方法检测限的影响

由于质谱仪是检测目标离子的质量信号,所以仪器真空度不高将直接导致背景信号的增强从而使信噪比降低。在对 $2.0 \mu\text{g/L}$ 标准样衍生物进行分析时,同样条件下开机 2 h 后的信噪比为 42.86(此时仪器高真空度为 8.8×10^{-4} Pa),而 24 h 后信噪比基本稳定在 54 左右(此时仪器高真空度为 2.2×10^{-4} Pa),可见要使仪器达到最佳检测灵敏度,在其他条件正常的情况下,最好在仪器抽真空 24 h 后再进行分析。

同样对 $2.0 \mu\text{g/L}$ 标准样衍生物进行分析,载气控制模式采用线速度控制模式,保持其他条件不变,只改变载气柱流速,信噪比也有明显的变化(表 3)。

表3 柱流速对信噪比的影响					
Table 3 Effects of column flow on S/N ratio					
柱流速/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) Column flow	0.40	0.80	1.20	2.00	5.00
信噪比 S/N ratio	16.84	31.36	39.74	54.38	104.84

可见保持其他条件稳定不变,较高的载气流速会提高信号的出峰高度,从而可以提高方法的灵敏度。但在载气总流速不变时,要达到较高的载气柱流速势必提高柱前压,这就给仪器进样系统的气密性提出了更高的要求。例如保持总流速 30.0 mL/min 不变,柱流速 2.0 mL/min 时柱前压为 134.2 kPa,而柱流速 5.0 mL/min 时柱前压已经达到 273.0 kPa。由 2.4 可知在柱流速 2.0 mL/min 时此方法检测限已经达到 0.037 $\mu\text{g}/\text{kg}$,目前国内同行还未见更低检测限的报道,故本实验还是选择 2.0 mL/min 作为仪器分析时的柱流速。

4 结论

以本实验方法对氯霉素进行检测,色谱峰峰形对称,出峰尖锐,没有杂峰干扰。在 CAP 质量浓度 5 ~ 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ 内线性关系良好,相关系数 $R = 0.9988$ 。方法的最低检测限达到 0.037 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。当空白样品 CAP 水平为 1 ~ 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率达 71.33% ~ 95.29%,标准相对偏差为 1.73% ~ 7.45%。用此方法对市场上销售的人工养殖南美白对虾肌肉样品进行测定,结果显示 CAP 残留量达 $(0.154 \pm 0.008) \mu\text{g}/\text{kg}$,而脊尾白虾样品中未检出 CAP 残留。

参考文献:

- [1] 蒋定国,杨大进. 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况 [J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14 (2): 44-47.
- [2] Neuhaus B K, Hurlbut J A, Hammack W. LC/MS/MS analysis of chloramphenicol in shrimp [J]. Lab Inf Bull, 2002, 18 (9): 1-18.
- [3] George W C. Food safety first [J]. Advocate, 2002, 5 (1): 2.
- [4] 李晓川,孔铁群,冷凯良,等. 水产品中氯霉素残留测定方法的分析研究 [J]. 海洋水产研究, 2002, 23 (4): 76-81.
- [5] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学 [M]. 北京:科学出版社, 2001. 244.
- [6] 杨惠芬,戴寅,王叔淳,等. 食品卫生理化检验标准手册 [M]. 北京:中国标准出版社, 1997. 21.
- [7] Keukens H J, Aerts M M L, Trug 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.
- [8] 胡国飞,沈建忠. 氯霉素类抗生素的残留分析 [J]. 中国兽药杂志, 2001, 35 (5): 55-57.
- [9] 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.
- [10] 王建华,陈世山. 同时测定鱼肉中氯霉素和甲砒霉素残留量的毛细管气相色谱法 [J]. 分析测试学报, 2001, 20 (3): 89-91.

Determination of chloramphenicol residues in prawns by GC - NCI - MS

XU Ji-lin, YAN Xiao-jun, XU Nian-jun, FENG Kai

(Key Laboratory of Marine Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: The determination of chloramphenicol in prawns was established by gas chromatography - mass spectrometry with negative chemical ionization (GC - NCI - MS). Chloramphenicol was extracted with ethyl acetate and partitioned with n - hexane to remove lipids. Cleanup was performed on a Diaion HP - 20 column, and the recovered chloramphenicol was derived with BSTFA - TMCS and analyzed in selective ion monitoring (SIM) mode using m/z 466 as the characteristic ion. The linear range was very good from 5 to 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ and relative coefficient was 0.9988. The detection limit was down to 0.037 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recovery rates were 71.33% - 95.29% when 1 - 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ chloramphenicol standards were spiked into the zero shrimp sample, and the RSDs were 1.73% - 7.45%. The chloramphenicol residues in the cultured *Penaeus vannamei* muscle obtained from market was $(0.154 \pm 0.008) \mu\text{g}/\text{kg}$ and no chloramphenicol residue was detected in the *Palaemon carinicauda* muscle.

Key words: prawn; chloramphenicol; NCI; GC/MS

Corresponding author: YAN Xiao-jun. E-mail: xiaojunyan@hotmail.com

* This study is supported by National New Drug Fund (No. 2003AA2Z3511) and Project of Young Talent Fund of Zhejiang Province (No. RC02059).