

GC 法测定市售动物源性中药材地龙、水蛭中 3 种氯霉素类药物的残留量

王鹏思¹, 李嘉欣¹, 石上梅^{2*}, 薛 健^{1*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 国家药典委员会, 北京 100061)

[收稿日期] 2016-10-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 03-0065-05 [中图分类号] S853.7

[摘 要] 为了建立柱前衍生-GC-ECD 法同时测定市售动物源性中药材地龙、水蛭中氯霉素、甲矾霉素、氟甲矾霉素 3 种氯霉素类抗生素残留量的方法, 样品经乙酸乙酯超声提取, 旋转蒸干后, 提取物溶于 4% 氯化钠溶液, 经正己烷去脂, 液液分配净化。再加 BSTFA-TMCS 衍生化反应后氮气吹干, 正己烷定容进样分析, 外标法定量。结果表明, 氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素在 0.1 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数 $r^2 \geq 0.9989$; 空白样品加标实验表明, 氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素在 1、5、10 $\mu\text{g/kg}$ 这 3 个添加水平下的回收率为 62.9% ~ 100.8%, $RSD < 16\%$, 其检出限分别为 0.05、0.1、0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法简便快捷, 准确度和精密度高, 适用于地龙、水蛭中氯霉素类药物的残留测定。

[关键词] 中药材; 地龙; 水蛭; 氯霉素类药物; 残留量; 气相色谱

Determination of 3 Chloramphenicols Medicine Residues in Animal-origin Chinese Medicinal Materials Pheretima and Hirudo in the Retailer by Gas Chromatography

WANG Peng-si¹, LI Jia-xin¹, SHI Shang-mei^{2*}, XUE Jian^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical

College, Beijing 100193, China; 2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing 100061, China)

Abstract: Pre-column derivatization GC-ECD method was established to simultaneously determine the residues of chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) in animal-original Chinese medicinal materials pheretima and hirudo in the retailer. The samples were extracted with ethylacetate by ultrasound assistance and evaporated to dry. The extracts were dissolved in 4% sodium chloride solution, defatted with n-hexane, and cleaned up by liquid-liquid partition. The purified extracts were derivatized with BSTFA-TMCS and derivatization solution was dried under nitrogen. The final targets were dissolved with n-hexane and quantitated by external standard method. The results indicated that the calibration curves of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol were linear in the ranges of 0.1 ~ 20 $\mu\text{g/L}$, with correlation coefficients not less than 0.9989.

作者简介: 王鹏思, 硕士研究生, 从事中药质量方面研究。

通讯作者: 石上梅, E-mail: ssm@chp.org.cn; 薛 健, E-mail: xuejian200@sina.com

Recoveries of chloramphenicol, thiamphenicol and florfenicol spiked in blank samples at three levels of 1, 5, 10 $\mu\text{g/kg}$ were 62.9% ~ 100.8%, and the relative standard deviation (*RSD*) was less than 16%, the limits of detection (*LODs*) were 0.05, 0.1, 0.1 $\mu\text{g/kg}$ respectively. With the advantages of simplicity, rapidity, high accuracy and precision, this method could be suitable for the detection of chloramphenicols medicine residues in pheretima and hirudo.

Key words: Chinese medicinal materials; pheretima; hirudo; chloramphenicols medicine; residues; gas chromatography

氯霉素 (Chloramphenicol, CAP)、甲砒霉素 (Thiamphenicol, TAP)、氟甲砒霉素 (又称氟苯尼考, Florfenicol, FF) 同属于氯霉素类广谱抗生素, 在畜牧业、渔业中广泛应用。但研究发现氯霉素存在严重的毒副作用, 可引起人类的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症、新生儿和早产儿灰色综合症等疾病, 低浓度的药物残留还会诱发致病菌的耐药性^[1]。甲砒霉素是氯霉素的类似物, 被称为第二代氯霉素, 氟甲砒霉素是甲砒霉素的氟化衍生物, 被称为第三代氯霉素, 这两种药物有效地克服了氯霉素导致再生障碍性贫血的缺陷^[2]。但甲砒霉素有比氯霉素强 5 倍的免疫抑制作用, 且抗菌效果不及氯霉素和氟甲砒霉素, 因此限制了它的临床使用^[3]。氟甲砒霉素的毒副作用较小, 在兽医临床上应用广泛^[4]。

目前, 对以上 3 种药物残留量的检测方法主要有气相色谱法、气-质联用法、高效液相色谱法、液-质联用法、酶联免疫法^[5-12]等, 检测对象主要包括肉类、乳制品、水产品、禽畜饲料、土壤及禽畜粪^[5-12]等。由于地龙主食发酵的鸡粪、猪粪、牛羊粪和生活垃圾^[13], 水蛭主食螺蛳、河蚌、青虾、龟鳖、蚯蚓、草虾以及哺乳类动物的血液^[14], 故地龙、水蛭体内也可能有氯霉素类药物残留。加之目前对动物源性中药材中氯霉素类药物的残留检测鲜有报道, 本试验选取地龙、水蛭两味中医临床常用且疗效显著的中药材, 测定其中氯霉素类药物的残留量, 这既可保障人民用药安全, 亦对两味药材的进出口贸易意义重大。

1 材料

1.1 仪器与设备 Agilent 7890A 气相色谱仪 (配

μ -ECD 检测器), 色谱柱为毛细管色谱柱 (Agilent HP-5, 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm), 载气为高纯氮气 (纯度 $\geq 99.999\%$, 北京氮普北分气体工业有限公司); HGC-12A 氮吹仪 (天津市恒奥科技发展有限公司); HEI-VAP 型旋转蒸发器 (德国海道夫); HH-22 恒温水浴锅 (郑州长城科工贸有限公司); TP-150 超声波清洗机 (北京天鹏电子新技术有限公司); SHB-B 循环水式多用真空泵 (郑州长城科工贸有限公司); 80-2 型高速离心机 (江苏省金坛市医疗仪器厂); WH-1 涡旋混合仪 (上海沪西分析仪器厂); PL203/01 电子天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; Eppendorf 单通道可调移液枪 (10 ~ 100 μL 、20 ~ 200 μL 、100 ~ 1000 μL); C18 固相萃取小柱 (1000 mg/6 mL 填料, 德国 CNW 公司); Florisil 固相萃取小柱 (1000 mg/6 mL 填料, 美国 Agilent 公司) 等。

1.2 药品与试剂 氯霉素标准品 (纯度 99.3%, 中国药品生物制品检定所); 甲砒霉素标准品 (纯度 99.7%, 中国药品生物制品检定所); 氟甲砒霉素标准品 (纯度 99.3%, 中国药品生物制品检定所); N, O-双(三甲基硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA): 纯度 98%, 阿拉丁试剂; 三甲基氯硅烷 (TMCS): 纯度 98%, 国药集团; 色谱纯甲醇 (4 L/瓶, Fisher 公司); 分析纯甲醇、乙腈、正己烷、丙酮、乙醚、吡啶、甲苯、无水硫酸钠、氯化钠 (北京化工厂) 等。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制 参照农业部 958 号公告-14-2007《水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量的测定气相色谱-质谱法》配制 100 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素标准储备溶液, 10 $\mu\text{g/mL}$

氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素混合标准储备溶液, 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素混合标准使用溶液, 4% 氯化钠溶液及 BSTFA - TMCS (体积比为 99:1) 衍生化试剂。

2.2 样品前处理

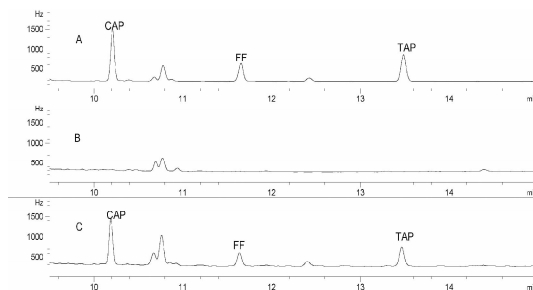
2.2.1 样品的提取 准确称取 2.0 g 样品于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入 30 mL 乙酸乙酯, 超声提取 30 min, 静置, 过滤, 滤渣重复上述操作一次, 合并两次滤液至 100 mL 茄形瓶中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴旋转浓缩至干, 加入 5 mL 4% 的氯化钠溶液超声, 将溶液转移至 10 mL 具塞玻璃试管中, 加入 5 mL 正己烷, 涡旋, 将试管置离心机中, 以 3000 r/min 离心 10 min, 取出试管, 弃掉正己烷层, 以去除脂肪, 重复操作一次。

2.2.2 样品的净化 向除去脂肪、蛋白质的氯化钠水溶液中加入 5 mL 乙酸乙酯涡旋, 静置分层, 吸取有机相至 10 mL 具塞玻璃试管中, 再分别用 3、2 mL 乙酸乙酯提取两次, 合并有机相, 过装有 5 g 无水硫酸钠的小柱, 以除去水分, 再用 5 mL 乙酸乙酯洗涤无水硫酸钠的小柱, 合并洗脱液至 50 mL 茄形瓶中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴浓缩至近干, 加入 1 mL 乙酸乙酯溶解茄形瓶中的残渣并转移至 5 mL 刻度试管中, 再用 2 mL 乙酸乙酯清洗茄形瓶, 清洗液亦转移至 5 mL 刻度试管中, 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干待衍生化。

2.2.3 样品的衍生化 取上述吹干后待衍生化的残渣加入 100 μL 衍生化试剂 BSTFA - TMCS 与 100 μL 反应介质吡啶, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 60 min 进行衍生化反应, 反应完成后氮气吹干, 放至室温用正己烷定容至 1 mL, 转移至 2 mL 进样小瓶中, 待 GC 检测。

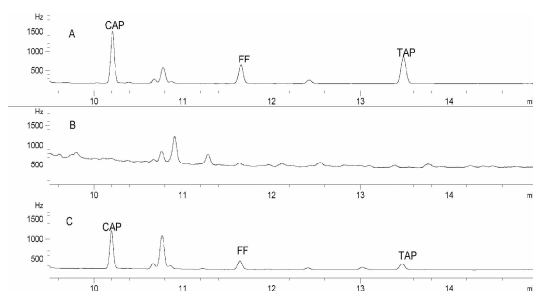
2.3 色谱测定条件 Agilent HP - 5 毛细管色谱柱 (30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.25 μm); 升温程序: 80 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 200 $^{\circ}\text{C}$, 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 260 $^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 280 $^{\circ}\text{C}$; 进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$; 载气为高纯氮气, 流速 1 mL/min; 检测器温度为 300 $^{\circ}\text{C}$; 进样量为 1 μL , 不分流进样。混合标准品和样品色谱图见图 1、图 2。

2.4 线性关系考察 用 2.1.3 混合标准使用溶液



B. 地龙空白样品色谱图; C. 地龙加标样品色谱图

图 1 氯霉素类药物混合标准品溶液 (A) 和地龙样品 (B、C) 气相色谱图



B. 水蛭空白样品色谱图; C. 水蛭加标样品色谱图

图 2 氯霉素类药物混合标准品溶液 (A) 和水蛭样品 (B、C) 气相色谱图

分别配制出 0.1、1、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 的混合标准溶液, 将不同浓度的混合标准溶液按 2.2.3 项下衍生化后, 按 2.3 项下条件进行 GC - ECD 测定。以峰面积 Y 为纵坐标, 以试样浓度 X ($\mu\text{g/L}$) 为横坐标, 绘制标准曲线并进行回归计算, 得氯霉素的回归方程为: $Y = 103.92X - 57.791$, $r^2 = 0.9993$, 氟甲砒霉素的回归方程为: $Y = 32.945X + 31.982$, $r^2 = 0.9989$, 甲砒霉素的回归方程为: $Y = 81.725X - 249.37$, $r^2 = 0.9990$ 。表明本方法氯霉素、氟甲砒霉素、甲砒霉素在 0.1 ~ 20 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性关系良好。

2.5 准确度和精密度考察 分别准确称取空白本底的地龙、水蛭样品 2.0 g 于 100 mL 具塞锥形瓶中, 加入浓度分别为 1、5 和 10 $\mu\text{g/L}$ 的 3 种氯霉素类药物混合标准品溶液 2 mL (精密量取), 充分混匀, 放置过夜。使空白样品中氯霉素类药物的添加水平为 1、5、10 $\mu\text{g/kg}$ 3 个水平 (每个水平 3 个平行)。按照

2.2 样品前处理及 2.3 色谱测定条件进行测定,计算加标回收率和相对标准偏差,结果见表 1。

由表 1 可知,氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素在 1、5、10 $\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平下的回收率为 62.9% ~ 100.8%, $RSD < 16\%$,符合氯霉素类药物残留测定的要求。

表 1 地龙、水蛭中三种不同浓度氯霉素类药物混合标准溶液添加回收率 (n = 3)

样品	药物名称	氯霉素类药物添加回收率/%					
		1 $\mu\text{g/kg}$	$RSD/\%$	5 $\mu\text{g/kg}$	$RSD/\%$	10 $\mu\text{g/kg}$	$RSD/\%$
地龙	氯霉素	93.8	11.4	100	12.1	98.8	10.2
	氟甲砒霉素	77.4	4.4	62.9	9.4	75.4	11.7
	甲砒霉素	88.0	15.0	93.6	13.0	82.8	6.8
水蛭	氯霉素	92.5	9.4	98.5	10.1	100.8	14.2
	氟甲砒霉素	78.2	8.4	70.9	11.4	74.4	12.1
	甲砒霉素	90.0	13.0	98.6	15.0	85.8	8.6

2.6 检出限和定量限的确定 分别取地龙、水蛭空白样品,按照样品前处理程序处理后上机测定,另取多份空白样品,分别加入不同的较低浓度的氯霉素类药物混合标准工作液,按照样品前处理程序处理后上机测定,对比两者, $S/N = 3$ 时的药物浓度即为检出限, $S/N = 10$ 时的药物浓度即为定量限。本试验所建立的检测方法测得氯霉素的检出限和定量限分别为 0.05、0.17 $\mu\text{g/kg}$,甲砒霉素、氟甲砒霉素的检出限和定量限分别为 0.1、0.33 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.7 样本测定结果 从北京 10 家药店随机购买样本 10 份,均未检出氯霉素类药物。

3 讨论与分析

3.1 提取溶剂的选择 氯霉素类药物为弱极性物质,微溶于水,易溶于乙腈、甲醇、丙酮和乙酸乙酯等有机溶剂,甲醇、乙腈这两种溶剂对人体毒性较大,而且乙腈在挥干时容易冒泡,挥干时间较长^[5,15-16],参考《GB/T 22338-2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定》中气相色谱-质谱法,本试验选择乙酸乙酯作为提取剂。

3.2 净化方式的选择 李鹏等^[7]测定动物组织中氯霉素类药物残留量时采用 Florisil 柱净化,农业部 958 号公告-14-2007《水产品中氯霉素、甲砒霉素、氟甲砒霉素残留量的测定气相色谱-质谱法》采用 C18 固相萃取柱净化,吴明媛^[6]、冷凯良等^[17]采用乙酸乙酯反萃取净化。本试验对 3 种净化方法均进行了试验,结果显示采用 Florisil SPE 柱净化时氯霉素类药物的回收率比较低,采用 C18 SPE 柱和乙酸乙酯液液萃取净化时氯霉素类药物的回收率均在 75% 以上。综合样品净化的回收率结果、操

作的简便性和耗材费用等方面的因素,确定地龙药、水蛭药材中 3 种氯霉素类药物残留测定方法中样品的净化方法为:用 10 mL 乙酸乙酯分 3 次 (5 mL + 3 mL + 2 mL) 萃取净化。

3.3 药材样本的测定 在对 10 批地龙、水蛭样本的测定中,未检出氯霉素类药物的残留,参照中华人民共和国农业部 2002 年 235 号公告《动物源性食品中兽药最高残留限量》中的规定:氯霉素为禁止使用的药物,在动物性食品中不得检出;甲砒霉素最大残留限量为 50 $\mu\text{g/kg}$;氟甲砒霉素在其他动物的肌肉中的最大残留限量为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。本批样本氯霉素类药物的残留符合规定。但值得注意的是,研究着重于建立一种测定动物源性中药材地龙、水蛭中 3 种氯霉素类药物残留量的方法,所测的地龙、水蛭样本数量不足,因此要想全面了解地龙、水蛭中氯霉素类药物的残留情况,还需增加对不同品种、不同地区和不同炮制方式等更多样本的测定。

4 小 结

建立了 GC-ECD 法同时测定动物源性中药材地龙、水蛭中 3 种氯霉素类药物残留量的方法,本法灵敏度高,氯霉素的检出限可达到 0.05 $\mu\text{g/kg}$,甲砒霉素和氟甲砒霉素的检出限可达到 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法前处理步骤相对简单,处理后杂质干扰少,具有较强的适用性。

参考文献:

[1] 高 林.氯霉素的不良反应及其残留检测方法研究进展[J].动物医学进展,2010,31(4):90-95.

- [2] 李红权, 孙良娟, 伍志强, 等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定饲料中氯霉素、甲矾霉素与氟甲矾霉素残留[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 31(11): 1396 - 1400.
- [3] 琚大伟, 阮祥春, 吴虹, 等. 甲矾霉素残留检测研究进展[J]. 中国蜂业, 2011, 62(Z3): 56 - 60.
- [4] 孙兴南. 氟苯尼考在基层动物诊疗应用中存在的问题及对策[J]. 云南畜牧兽医, 2015, 44(5): 33 - 34.
- [5] 刘永涛, 李荣, 袁科平, 等. 气相色谱法同时测定水产品中氯霉素、氟甲矾霉素和甲矾霉素残留量[J]. 淡水渔业, 2007, 37(2): 44 - 47.
- [6] 吴明媛, 杨妹丽, 黎小正, 等. 毛细管电子捕获气相色谱法同时测定水产品中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素残留[J]. 广西农业科学, 2009, 40(5): 567 - 570.
- [7] 李鹏, 邱月明, 蔡慧霞, 等. 气相色谱 - 质谱联用法测定动物组织中氯霉素、氟甲矾霉素和甲矾霉素的残留量[J]. 色谱, 2006, 24(1): 14 - 18.
- [8] 曾芳, 黄玉芬, 刘忠珍, 等. 高效液相色谱法测定土壤和畜禽粪中的氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素[J]. 广东农业科学, 2010, 37(10): 38 - 40.
- [9] 潘晓东, 吴平谷, 姜维. 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定鱼肉中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(6): 572 - 574.
- [10] 胡雪, 李翠枝, 刘丽君, 等. UPLC - MS - MS 法测定饲料、原料乳及乳制品中 3 种氯霉素类药物残留[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 110 - 113.
- [11] 周晓芳, 张淑萍, 王僧虎, 等. ELISA 方法检测氯霉素的质量评价[J]. 北京农学院学报, 2010, 25(4): 1 - 3.
- [12] 刘智宏, 黄耀凌, 汪霞, 等. 水产品中甲矾霉素、氟苯尼考和氟苯尼考胺酶联免疫多残留测定[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(12): 1 - 5.
- [13] 刘红军, 尹文生. 蚯蚓养殖技术与加工利用[J]. 现代农业科技, 2016, 23(1): 9296 - 9297.
- [14] 常东洲, 李同国. 水蛭的生物学习性及人工养殖技术[J]. 科学养鱼, 2000, 15(12): 18.
- [15] 刘耀川, 赵刚, 刘军骅, 等. 氟苯尼考的研究进展及应用[J]. 现代畜牧兽医, 2011, 40(2): 44 - 46.
- [16] 李佩佩, 张小军, 梅光明, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测渔用饲料中氯霉素类药物[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(3): 44 - 50.
- [17] 冷凯良, 孙伟红, 王志杰, 等. GC/MS 法同时测定水产品中氯霉素、氟甲矾霉素及甲矾霉素残留量[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 95 - 99.

(编辑: 陈希)