

沙门氏菌热裂解气相色谱-质谱法研究

董海燕

(福建省纤维检验局,福建 福州 350026)

摘要:文中应用热裂解气相色谱-质谱技术,对沙门氏菌属中的4种菌株(甲型副伤寒、乙型副伤寒、鼠伤寒和G1M1.345肠炎沙门氏菌肠炎亚种)进行了研究,探讨了热裂解气相色谱-质谱的条件,得到了清晰的总离子流色谱图,确定了部分裂解产物的分子结构。结果表明:这4种沙门氏菌全细胞在裂解温度650℃,裂解时间12s,离子源温度230℃的条件下均可得到清晰的总离子流色谱图,且这4种沙门氏菌的色谱图相似度极高;另通过质谱分析和比对,确定了这4种沙门氏菌裂解产物包括苯酚、吡啶和1-十三烯的分子结构式。总体来说,该方法可作为沙门氏菌属的快速检测,但不能用于属内菌株类别的鉴定。

关键词:沙门氏菌;快速检测;热裂解气相色谱-质谱;裂解产物;总离子流色谱图;分子结构式

中图分类号:TS 103.7

文献标志码:B

文章编号:1000-4033(2012)06-0064-03

热裂解气相色谱-质谱法是一种灵敏度高、简单、快速的新技术,目前已广泛应用于微生物的检验和鉴定当中^[1-2]。国外,有学者曾研究了生物学材料的裂解色谱图,得出了各图谱存在可作为鉴别依据的“特征峰”。国内,周方^[3]在1980年发表了关于肠道杆菌的裂解气相色谱法研究;纪标^[4]在1992年发表了伤寒沙门氏菌的裂解气相色谱分析。

本文采用热裂解气相色谱-质谱法对4种沙门氏菌(甲型副伤寒、乙型副伤寒、鼠伤寒和G1M1.345肠炎沙门氏菌肠炎亚种)进行了热裂解色谱质谱分析,得到了清晰的总离子流色谱图,且对部分裂解产物的结构进行了鉴定,为沙门氏菌的快速检测技术提供了参考。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

甲型副伤寒沙门氏菌(*Salmonel-*

la paratyphi A), 菌株编号:CMCC (B)50093。

乙型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi B*), 菌株编号:CMCC (B)50094。

鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*), 菌株编号:CMCC(B)50115。

G1M1.345 肠炎沙门氏菌肠炎亚种, 菌株编号:ATCC14028。

以上菌种均购自广东环凯微生物科技有限公司。

1.2 试验试剂

营养肉汤培养基(广东环凯微生物科技有限公司)、37%甲醛溶液(福尔马林,分析纯)、无菌水(本试验室自制)。

1.3 仪器设备

LDZX-50KBS 立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂)、PY-2020is 热裂解仪(安捷伦科技

有限公司)、G1888-7890A/5975C 气相色谱-质谱联用仪(安捷伦科技有限公司)、FD-1-50 真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)、KA-1000 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、BHC-1300 II A/B3 型生物洁净安全柜(苏州净化设备有限公司)、ZHWHY-100B 型恒温振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司)、VDRTEX-5 混匀器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.4 菌体制备

1.4.1 接种菌液和培养

用1mL 营养肉汤将1.1中所述的4株冻干粉菌种分别制成菌液。然后取0.1mL 菌液接种至10mL 营养肉汤培养基内,在37℃培养箱中,100r/min、振荡培养24h。再取1mL 菌液接种至100mL 营养肉汤培养基内,继续置37℃培养箱中,100r/min、振荡培养24h,

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2010QK052)。

作者简介:董海燕(1982—),女,工程师,硕士,主要从事纺织品生态项目的检测工作。

制成培养液。

1.4.2 灭活和收集

将 1 mL 37% 甲醛的溶液加入到 100 mL 的培养液中将其灭活。灭活后的培养液经离心机 4 000 r/min 离心数次后,收集菌体,用无菌蒸馏水洗涤两次后,再加入 0.1 mL 的无菌水,旋涡振荡后分装至进样瓶。

1.4.3 预冷和冻干

将分装好的菌体,在 -20 °C 冰箱、冷冻 24 h 后,置于冷冻干燥机中,冷冻干燥成粉状后保存备用。

1.5 热裂解气相色谱-质谱条件

1.5.1 裂解条件

裂解温度	650 °C
时间	12 s
表面温度	280 °C
进样量	0.2 mg

1.5.2 气相色谱条件

色谱柱型号:DB-17MS, 30 m × 0.25 mm。

升温程序:起始温度 44 °C (运行 2 min),采用 5 °C/min 的速率上升至 200 °C (运行 8 min),然后升温至 300 °C 后运行 2 min。

分流比:1:50。

载气:氦气。

1.5.3 质谱条件

离子源温度	230 °C
传输线温度	280 °C
电离方式	EI
电离电压	69 eV

质谱数据库参考安捷伦科技有限公司的数据库。

2 结果与分析

2.1 4 种沙门氏菌热裂解总离子流色谱图

沙门氏菌在 650 °C 热裂解可以形成小分子物质。这 4 种沙门氏菌在同样取样量和同样气相色谱条件下进行分离,得到裂解产物的总离子流色谱图,结果如图 1 所

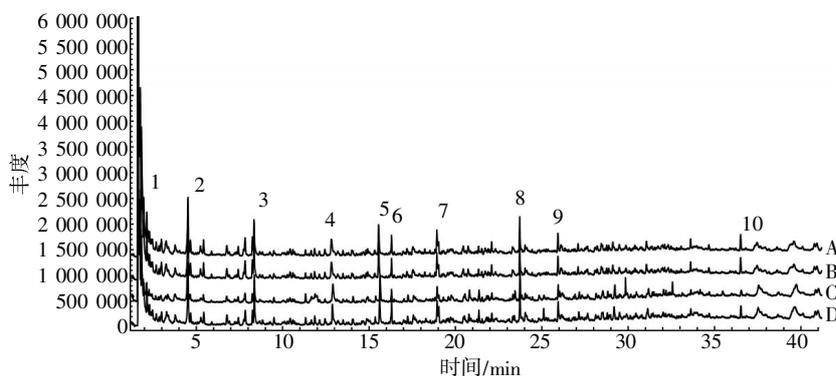
示。

由图 1 可看出,4 种沙门氏菌热裂解产物的色谱图极其相似,裂解产物的出峰时间和峰的强度一致,由此可见这 4 种沙门氏菌的热裂解产物大致相同。

2.2 4 种沙门氏菌的热裂解产物

将 4 种沙门氏菌全细胞在 650 °C 热裂解产物的总离子流色谱图经质谱分析后,可以确定部分裂解产物的分子结构,结果如表 1 所示。

由表 1 可看出,热裂解产物主要分为三大类。第一类:脂肪族裂解产物,由高温碳化而得,以二氧化碳为代表,其产率较高;第二类:芳香族裂解产物,以甲苯、苯酚、苯乙腈等为代表,该类物质的主要特征是含有苯环;第三类:杂环和烯类裂解产物,以 1-十三烯、吡啶、腺嘌呤等为代表。



注:A.鼠伤寒沙门氏菌;B.G1M1.345 肠炎沙门氏菌肠炎亚种;C.乙型副伤寒;D.甲型副伤寒;序号 1~10 分别为沙门氏菌 10 种裂解产物对应的峰号。

图 1 4 种沙门氏菌热裂解总离子流色谱图

表 1 4 种沙门氏菌全细胞的主要裂解产物

类别	峰号	化合物	分子量	化学物质登录号 CAS#	保留时间/min
脂肪族	1	二氧化碳/CO ₂	44	124-38-9	1.654
芳香族	2	甲苯/C ₇ H ₈	92	108-88-3	4.529
	4	苯酚/C ₆ H ₅ OH	94	108-95-2	12.851
	5	对甲苯酚/C ₇ H ₇ O	108	106-44-5	15.580
	7	苯乙腈/C ₈ H ₇ N	117	140-29-4	19.035
杂环和烯类	3	2-呋喃甲醇/C ₅ H ₆ O ₂	98	98-00-0	8.353
	6	1-十三烯/C ₁₃ H ₂₆	182	2437-56-1	16.305
	8	吡啶/C ₅ H ₅ N	117	120-72-9	23.723
	9	3-甲基吡啶/C ₉ H ₉ N	131	83-34-1	25.944
	10	腺嘌呤/C ₅ H ₅ N ₅	135	73-24-5	39.399

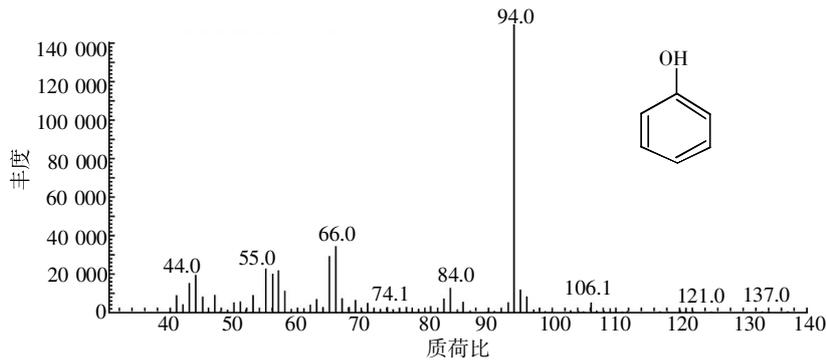


图2 苯酚的质谱图和结构式

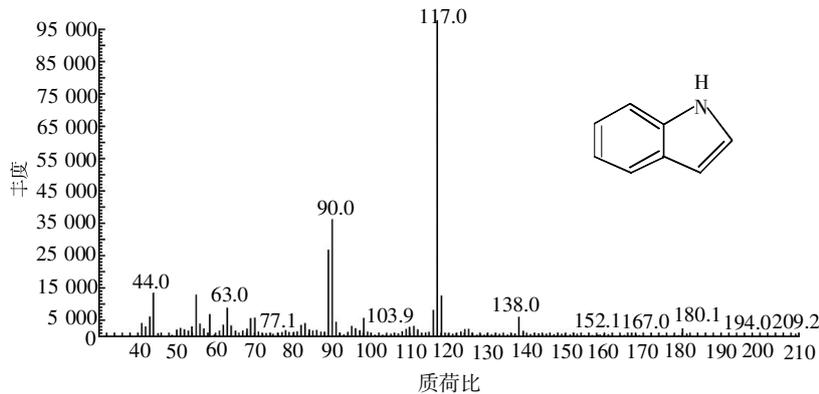


图3 吲哚的质谱图和结构式

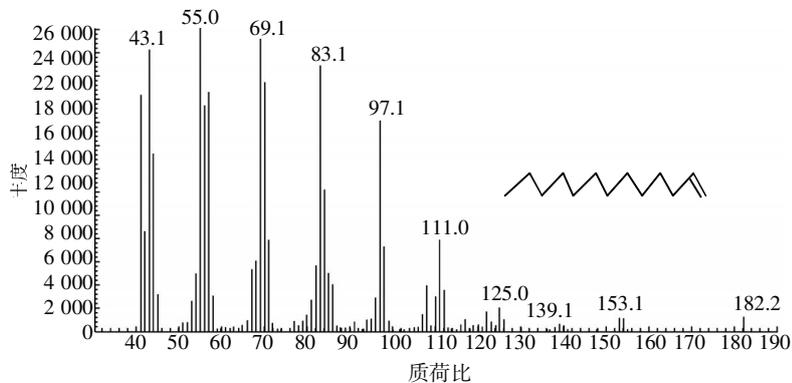


图4 1-十三烯的质谱图和结构式

法可用于沙门氏菌属的检测,但不能用于属内菌株类别的鉴定。

3.3 通过分析以及与质谱数据库比对,可以确定4种沙门氏菌部分裂解产物包括苯酚、吲哚和1-十三烯的分子结构图。

参考文献

[1]郭爱玲,郭华英,马爱民,等.沙门氏菌全细胞的热裂解气相色谱-质谱分析[J].分析化学,2007,35(5):700-702.

[2]丁锡申,阎安庄,杨培珍.裂解气相色谱法对不同株的肠膜状明串珠菌的鉴别[J].微生物学通报,1983,10(1):11-12.

[3]周方.微生物学通报[J].分析化学,1980,7(3):136-137.

[4]纪标,任培上,唐银,等.伤寒沙门氏菌的裂解气相色谱分析[J].微生物学通报,1992,19(6):344-348.

收稿日期 2011年10月30日

链接

沙门氏菌

沙门氏菌属是一大群寄生于人类和动物肠道内、生化反应和抗原构造相似的革兰氏阴性杆菌。有的专对人类致病,有的只对动物致病,也有对人和动物都致病,这些统称为沙门氏菌。

1 形态特性

沙门氏菌是两端钝圆的短杆菌(比大肠杆菌细),散在,无荚膜和芽孢,除鸡白痢沙门氏菌、鸡伤寒沙门氏菌外都具有周身鞭毛,能运动,大多数具有菌毛,能吸附于宿主细胞表面或凝集豚鼠红细胞。

2 抵抗力

沙门氏菌属不耐热,55℃、1h或60℃、15~30min即被杀死。

沙门氏菌属在外界的生活力较强,在10~42℃的范围内均能生长,最适生长温度为37℃。沙门氏菌属在普通水中虽不易繁殖,但可生存2~3周;在牛乳和肉类食品中存活数月;在食盐含量为10%~15%的腌肉中亦可存活2~3个月。

在烹调大块鱼、肉类食品时,如果食品内部达不到沙门氏菌的致死温度,其中的沙门氏菌仍能存活,食用后可导致食物中毒。

冷冻对于沙门氏菌无杀灭作用,即使在-25℃低温环境中其仍可存活10个月左右。

3 感染性

摄入污染了的沙门氏菌的食物或饮料是唯一的感染方式。

由于沙门氏菌属不分解蛋白质,不产生鞣基质,污染食物后无感官性状的变化,所以其感染易被忽视而引起食物中毒;另外还可引起胃肠炎、伤寒、败血症及肠外灶性感染等多种症候群,统称为沙门氏菌感染(即沙门氏菌病),各种症候群有时可重叠。