

# 高效液相色谱法测定水产品中泰乐菌素残留量

任惠丽 杨元昊 田强兵 李维平 杨娟宁 王绿洲

(农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心(西安),西安 710086)

**[摘要]** 目的:建立水产品中泰乐菌素残留量的高效液相色谱测定方法。方法:样品在碱性条件下用乙酸乙酯提取,提取液旋转蒸干后,经正己烷脱脂,SCX 柱固相萃取净化,乙腈与磷酸盐缓冲液为流动相梯度洗脱,外标法定量。结果:泰乐菌素在 0.050  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 5.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  内呈良好线性关系,相关系数  $r=0.9998$ 。检出限为 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  添加水平下回收率为 72.4% ~ 106% 相对标准偏差均小于 10%。结论:该方法的灵敏度和重复性均满足水产品中泰乐菌素药物残留量检测需要。

**[关键词]** 水产品;泰乐菌素;残留量;高效液相色谱

**[中图分类号]** O657.7<sup>+</sup>2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-8685(2011)10-2371-03

## Determination of tylosin residues in fishery products by high performance liquid chromatography

REN Hui-li, YANG Yuan-hao, TIAN Qiang-bing, LI Wei-ping, YANG Juan-ning, WANG Lv-zhou

(Supervision & Test Center for Fisheries Environment and Quality of Fishery Products(Xi'an), Ministry of Agriculture Xi'an 710086, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a HPLC method for determination of tylosin residue in fishery products. **Methods:** The samples were extracted by ethyl acetate at pH 8.0 medium, after condensed with rotary evaporation, the sample was extracted for defatting by hexane, and purified with SCX solid-phase extraction column. The target compound was separated with gradient mobile phase consisting of acetonitrile-phosphate buffer solution, and quantified by external standard method. **Results:** The method showed a good linearity within the range of 0.050  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 5.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  with a correlation coefficient of 0.9998. The detection limit was 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the quantification limits were 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The mean recoveries at spiked concentration of 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ~ 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  were in the range of 72.4% ~ 106%, and the relative standard deviations were less than 10%. **Conclusion:** The sensitivity and repeatability of the method could meet the analysis requirements for determination of tylosin residues in fishery products.

**[Key words]** Fishery products; Tylosin; Residue; HPLC

泰乐菌素(Tylosin)是一种大环内酯类抗生素,除防病外,对畜禽生长有明显的促进作用<sup>[1-4]</sup>,能提高饲料利用率,作为饲料添加剂,广泛应用于畜牧和水产养殖。动物长期食用后,抗生素及其代谢物在动物组织及器官内蓄积或贮存。药物在体内蓄积到一定的浓度,易引起肝损害及听觉障碍<sup>[5]</sup>,危害人类健康。因此,一些国家政府对其在动物性食品中的残留限量都有严格的规定。1999年,欧盟禁止在动物饲料中使用泰乐菌素,并在水产品兽药残留限量((EC)1181-2002)中规定限量指标为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;美国规定在动物组织中的最大残留限量为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;日本在 2006 年“肯定列表制度”中规定泰乐菌素在各种水产品中的“暂定标准”是 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;我国农业部第 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》规定,泰乐菌素在畜禽肌肉组织中最大残留限量为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;我国农业

行业标准 NY 5071-2002《无公害食品 渔用药物使用准则》将泰乐菌素列为禁用渔药。

目前已有蜂蜜<sup>[6]</sup>、出口禽蛋<sup>[7]</sup>、鸡可食组织<sup>[8]</sup>及畜禽肉<sup>[9]</sup>等泰乐菌素残留的检测方法标准,尚未建立水产品中泰乐菌素残留的可靠检测方法。本研究旨在建立一种方便、准确、可靠的水产品中泰乐菌素残留量的检测方法。

### 1 材料与amp;方法

#### 1.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪(配紫外检测器);匀质器;离心机;旋转蒸发仪;微量电子天平;固相萃取装置。

标准品:酒石酸泰乐菌素标准品(纯度 $\geq 95\%$ ),购自 Dr. Ehrenstorfer 公司。

乙腈、甲醇、正己烷及乙酸乙酯均为色谱纯;磷酸氢二钾、磷酸二氢钾及磷酸均为分析纯。

磷酸盐缓冲溶液 I (pH 8.0):称取 0.52 g 磷酸二氢钾、16.73 g 磷酸氢二钾,以水溶解并稀释至 500 ml。

**[基金项目]** 农业部兽药残留研究项目(2006-52)

**[作者简介]** 任惠丽(1965-),女,本科,高级工程师,主要从事渔业环境及水产品质量安全研究工作。

磷酸盐缓冲溶液 II (pH 4.0): 在磷酸盐缓冲溶液 I 中滴加磷酸调 pH 为 4.0。

磷酸氢二钾溶液 (0.1 mol/L, pH 9.0): 称取 1.74 g 磷酸氢二钾以水溶解稀释至 100 ml。

磷酸二氢钾溶液 (0.01 mol/L, pH 2.5): 称取 1.36 g 磷酸二氢钾溶解于 1 000 ml 水中, 用磷酸调节 pH 为 2.5。

### 1.2 样品提取

准确称取 5 g 匀浆样品于 50 ml 具塞离心管中, 加入 5 ml 磷酸盐缓冲溶液 I 涡旋混匀 1 min。加入 25 ml 乙酸乙酯振荡提取 10 min, 4500 r/min 离心 5 min, 上清液转移至 100 ml 鸡心瓶中, 用乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并提取液, 旋转蒸发至干。

用 1 ml 甲醇溶解蒸干残渣, 转移至另一 50 ml 离心管, 用 10 ml 磷酸盐缓冲溶液 II 和 10 ml 正己烷洗涤鸡心瓶, 涡旋混合 2 min, 洗涤液合并于离心管, 涡旋混匀, 4 500 r/min 离心 5 min, 弃去上层正己烷, 下层水溶液备用。

### 1.3 样品净化

用 5 ml 甲醇、5 ml 磷酸盐缓冲溶液 II 活化 SCX 固相萃取柱, 上样, 依次用 3 ml 水、5 ml 甲醇、3 ml 水、3 ml 磷酸氢二钾溶液、0.4 ml 甲醇淋洗, 再以 3 ml 甲醇常压洗脱, 收集洗脱液, 涡旋混匀, 过 0.45 μm 滤膜, 待测。

### 1.4 色谱条件

Waters Atlantis C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 梯度洗脱的流动相为: A—乙腈, B—0.01 mol/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 水溶液 (用磷酸调 pH 为 2.5), 流速: 1.00 ml/min, 柱温: 35℃, 进样量: 20 μl, 检测波长: 285 nm。梯度洗脱程序见表 1:

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	0	3	9	16	19	25
A (%)	25	25	50	50	25	25
B (%)	75	75	50	50	75	75

### 1.5 标准曲线的绘制

准确称取 10 mg 标准品, 用乙腈溶解并定容至 100 ml 棕色容量瓶, 2℃~8℃ 冷藏保存。使用时取一定体积上述储备液用甲醇稀释成浓度为 0.050 μg/ml、0.10 μg/ml、0.50 μg/ml、1.00 μg/ml、2.00 μg/ml、和 5.00 μg/ml 的系列标准工作液。标准品色谱图见图 1。

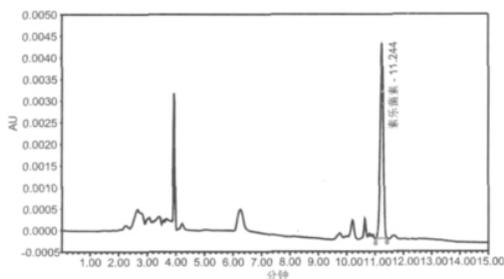


图 1 标准品 (1.00 μg/ml) 色谱图

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取剂的选择

目前较常见的提取动物组织中泰乐菌素药物残留的溶剂

有乙腈<sup>[8,9]</sup>、甲醇<sup>[10]</sup>、乙酸乙酯<sup>[11]</sup>等。实验发现乙腈和乙酸乙酯相对提取效果好, 但由于乙腈提取液在减压浓缩蒸干时容易产生泡沫喷出, 且乙腈与缓冲液互溶, 浓缩蒸干时间较长, 因此, 将乙酸乙酯确定为提取剂。

### 2.2 净化条件的选择

考虑到泰乐菌素的弱碱性和脂溶性等理化特性, 选择了 SCX 强阳离子交换固相萃取小柱进行净化获得较好提取效果, 尤其在洗脱样品前先用 0.4 ml 甲醇淋洗, 提高了样品的回收率。

### 2.3 流动相的选择

一般分离单一组分物质多用流动相等度洗脱, 试验发现在一定 pH、乙腈和缓冲盐比例下, 等度洗脱虽有较为对称的泰乐菌素色谱峰, 但峰型较宽, 灵敏度较低; 降低 pH, 调节流动相比例, 采用梯度洗脱, 得到较好的泰乐菌素色谱峰及较高的灵敏度, 因此确定为乙腈和缓冲盐按一定比率梯度洗脱。

### 2.4 线性关系

测定泰乐菌素浓度为 0.050 μg/ml、0.10 μg/ml、0.50 μg/ml、1.00 μg/ml、2.00 μg/ml、5.00 μg/ml 的系列标准工作液, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 泰乐菌素在 0.050 μg/ml~5.00 μg/ml 范围内成线性关系, 线性方程式为:  $Y = 1.52 \times 104X + 338$ , 相关系数为 0.9998。

### 2.5 检出限和定量限

在 30 μg/kg 添加水平时, 信噪比大于 3, 故将其定为检出限; 在 100 μg/kg 添加水平时, 信噪比大于 10, 且回收率、相对标准偏差满足条件, 故将其定为定量检出限。

### 2.6 回收率与精密度

在 5 g 空白试样中分别添加相当于 50 μg/kg、100 μg/kg、150 μg/kg 和 500 μg/kg 水平的泰乐菌素标准液, 每个浓度做六个平行样, 泰乐菌素加标回收率和相对标准偏差见表 2 和图 2、图 3。

表 2 方法的加标回收率及精密度 (n=6)

添加水平 (μg/kg)	回收率 (%)	精密度 (%)
50	91.2 88.9 76.4 90.7 76.9 81.6	8.1
100	84.3 82.2 78.6 79.7 77.5 78.1	3.3
150	88.9 81.9 92.4 78.5 80.8 91.1	6.9
500	92.3 85.6 96.7 90.1 93.4 88.9	4.2

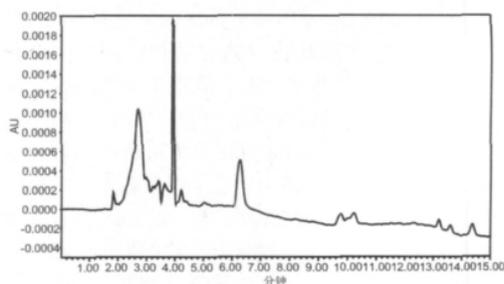


图 2 空白样品色谱图

(下转第 2376 页)

在肿瘤中的作用打下坚实的基础。

### [参考文献]

- [1] Ozaki T, Nagase T, Ichimiya S *et al.* NFBBD1/KIAA0170 is a novel nuclear transcriptional transactivator with BRCT domain [J]. DNA Cell Biol 2000, 19(8): 475-485.
- [2] Bosch FX, Ribes J, Díaz M, *et al.* Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. Gastroenterology 2004, 127: S5-S16.
- [3] Mochan TA, Venere M, DiTullio RA Jr, *et al.* 53BP1 and NFBBD1/MDC1 - Nbs1 function in parallel interacting pathways activating ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in response to DNA damage [J]. Cancer Res 2003, 63(24): 8586-8591.
- [4] Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D *et al.* MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks [J]. Cell 2005, 123(7): 1213-1226.
- [5] Stucki M, Jackson SP. MDC1/NFBBD1: a key regulator of the DNA damage response in higher eukaryotes [J]. DNA Repair (Amst), 2004, 3(8-9): 953-957.
- [6] Xu X, Stern DF. NFBBD1/MDC1 regulates ionizing radiation-induced focus formation by DNA checkpoint signaling and repair factors [J]. FASEB J 2003, 17(13): 1842-1848.
- [7] Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, *et al.* NFBBD1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage [J]. Biol Chem, 2007, 282(31): 22993-23004.
- [8] Dimitrova N, de Lange T. MDC1 accelerates nonhomologous end-joining of dysfunctional telomeres [J]. Genes Dev 2006, 20(23): 3238-3243.
- [9] Peng A, Chen PL. NFBBD1, like 53BP1, is an early and redundant transducer mediating Chk2 phosphorylation in response to DNA damage [J]. Biol Chem 2003, 278(11): 8873-8876.
- [10] Bartek J, Lukas J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer [J]. Cancer Cell 2003, 3(5): 421-429.
- [11] Hofmann K, Bucher P. The FHA domain: a putative nuclear signaling domain found in protein kinases and transcription factors [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20(9): 347-349.
- [12] Xu X, Stern DF. NFBBD1/KIAA0170 is a chromatin-associated protein involved in DNA damage signaling pathways [J]. Biol Chem, 2003, 278(10): 8795-803.
- [13] Alpha-Bazin B, Lorphelin A, Nozerand N, *et al.* Boundaries and physical characterization of a new domain shared between mammalian 53BP1 and yeast Rad9 checkpoint proteins [J]. Protein Sci, 2005, 14(7): 1827-1839.
- [14] 友泉, 杨正梅, 兰欢, 等. siRNA 介导的 NFBBD1 表达沉默对 HeLa 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(10): 943-949.
- [15] Nakanishi M, Ozaki T, Yamamoto H, *et al.* NFBBD1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage [J]. Biol Chem, 2007, 282(31): 22993-23004.
- [16] Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life or death switch [J]. FEBS Lett 2000, 466(1): 6-10.
- [17] Zamzami N, Susin SA, Marchetti P *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis [J]. Exp Med, 1996, 183(4): 1533-1544.
- [18] Luo X, Budihardjo I, Zou H *et al.* Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors [J]. Cell, 1998, 94: 481-490.
- [19] Terrones O, Antonsson B, Yamaguchi H, *et al.* Lipidic pore formation by the concerted action of proapoptotic BAX and tBID [J]. Biol Chem, 2004, 279(29): 30081-30091.
- [20] Van Mau N, Kajava AV, Bonfils C, *et al.* Interactions of Bax and tBid with lipid monolayers [J]. Membr Biol, 2005, 207(1): 1-9.

(收稿日期: 2011-07-20)

(上接第 2372 页)

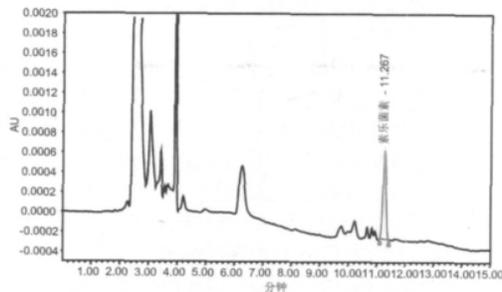


图 3 空白样品加标(150 µg/kg)色谱图

### 3 结论

按本方法的条件,用鲈鱼、甲鱼、蟹、鳊鱼等水产品进行了准确性和精密性试验,测定结果的平均回收率均大于 70%,相对标准偏差均小于 10%。相对标准偏差均小于 10%,方法的定量限能满足欧盟、日本“肯定列表”及我国对水产品泰乐菌素残留量的要求。该法操作性强,重复性好,适用于水产品中泰乐菌素残留的测定。

### [参考文献]

- [1] 陈礼人, 陈惠勤. 泰乐菌素研究进展 [J]. 微生物学通报, 1992, 19(5): 289-294.
- [2] 葛蔚, 张莉, 董越春. 泰乐菌素的药用性能及促生长作用 [J]. 兽药与饲料添加剂, 2000, 4(5): 14-15.
- [3] 刘恒, 腾茉莉. 泰乐菌素的性能、药物疗效和促生长作用简介及抗生素饲料添加剂应用现状和前景浅议 [J]. 饲料广角, 2000, 14(5): 16-19.
- [4] 孙志良, 许建平, 谭超. 泰乐菌素在养殖业中的应用 [J]. 湖南畜牧兽医, 2000, 2(5): 5-6.
- [5] Masakazu H, Harumi T, Kazuo T. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2003, 492(1-2): 187-197.
- [6] GB/T 18932.27-2005. 蜂蜜中泰乐菌素残留量测定方法 酶联免疫法 [S].
- [7] SN0670-1997. 出口禽蛋中泰乐菌素残留量检验方法 - 杯碟法 [S].
- [8] 农业部 958 号公告 - 5 - 2007. 鸡可食性组织中泰乐菌素残留检测方法 - 高效液相色谱法 [S].
- [9] GB/T 20762-2006. 畜禽肉中林可霉素、竹桃霉素、红霉素、星泰菌素、克林霉素、螺旋霉素、吉它霉素、交沙霉素残留量的测定 - 液相色谱串联质谱法 [S].
- [10] Marco De Liguoro, Paola Anfossi, Roberto Angeletti *et al.* Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography [J]. Analyst, 1998, 123(6): 1279-1282.
- [11] C Prats, R Francesch, M Arboix *et al.* Determination of tylosin residues in different animal tissues by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2001, 766(1): 57-65.

(收稿日期: 2011-06-10)