

>化学测定方法<

高效液相色谱法测定猪肉中四环素类抗生素及其代谢产物

雒婉霞¹, 赵清荣¹, 朱芸¹, 蔡增轩², 杨勤德¹

(11 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830001; 21 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310000)

[摘要] 目的: 建立猪肉中 7 种四环素类抗生素及 3 种代谢产物多残留的高效液相色谱紫外检测器同时测定方法。方法: 样品经 pH4.0 的 EDTA-Mclvaine 缓冲液提取, 提取液用 HLB 固相萃取柱净化。在 Waters Atlantis T3 (4.6 @250 mm, 5 Lm) 色谱柱上, 以甲醇: 乙腈 (2:3) - 0.2% 甲酸溶液为流动相 (梯度洗脱), 流速 1.0 ml/min, 采用 350 nm 紫外光进行检测, 在 35 min 内将 7 种四环素类抗生素及其 3 种代谢产物全部洗脱并达到基线分离。结果: 方法检出限: 4.5 Lg/kg~22 Lg/kg 定量下限: 2.5 Lg/kg~80 Lg/kg 线性范围: 2.5 Lg/kg~1250 Lg/kg 加标回收率: 82.1%~101.9%, 相对标准偏差: 0.18%~8.33%。结论: 本方法具有简便、快速、准确的优点, 适用于猪肉中 7 种四环素及其 3 种代谢产物的同时检测。

[关键词] 四环素; 高效液相; 测定; 猪肉

[中图分类号] O657.7⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-8685(2010)05-1018-03

Tetracyclines and their metabolites in pork by HPLC

LUO Wanxia¹, ZHAO Qingrong¹, ZHU Yun¹, CAI Zengxuan², YANG Qinde¹

(11 Xinjiang Uygur Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830001, China; 21 Zhejiang Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310000, China)

[Abstract] Objective: A high performance liquid chromatographic method was developed for the determination of tetracyclines and their metabolites in pork. Methods: The samples were extracted with EDTA-Mclvaine buffer group (pH4.0) and were purified by HLB solid phase extraction column. TCs were successfully separated on a Waters Atlantis T3 (4.6 @250 mm, 5 Lm) column using Methyl alcohol-Methyl cyanide-0.02% Formic acid solution as mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min and detected at 355 nm with 35 min. Results: The detection limit of the method was 4.5 Lg/kg~22 Lg/kg and the quantitative lower limit was 2.5 Lg/kg~80 Lg/kg. The linear range is from 2.5 Lg/kg to 1250 Lg/kg. Overall recoveries were between 82.1% and 101.9%. IRSD value was 0.18%~8.33%. Conclusion: The methods simple, rapid and accurate. It can be used for the determination of tetracyclines and their metabolites in pork.

[Key words] Tetracycline; HPLC; Determination; Pork

四环素类抗生素 (tetracyclines, TCs) 由于能有效地治疗和预防动物疾病, 被广泛用于畜牧养殖。而养殖户对该种药物的长期滥用, 造成畜牧产品中的高水平残留。人长期摄入这样的畜牧产品后, TCs 不断在体内蓄积, 当浓度达到一定量后, 就会对人体产生毒性作用, 对人类的健康构成潜在的危害^[1]。

国内外动物源食品残留监控计划中对 TCs 的残留量进行了严格的检测和限量控制, 我国对 TCs 的最高残留限量规定为: 所有食用性动物肌肉组织中 TCs 的单个或复合物含量不得超过 0.1 mg/kg^[2]。常用的 TCs 有四环素 (tetracycline, TC)、金霉素 (chlortetracycline, CTC)、土霉素 (oxytetracycline, OTC)、强力土霉素 (doxycycline, DC)、去甲基金霉素 (demeclocycline, DMCTC)、甲稀土霉素 (methacycline, MTC) 和二甲基四环素 (minocycline, MINO) 等。另外, 四环素、金霉素、土霉素在动物体内经代谢分别转化为差向四环素 (4-Epitetracycline, ETC)、差向金霉素 (4-Epichlortetracycline, ECTC) 和差

向土霉素 (4-Epixytetracycline, EOTC) 类药物药效极低甚至消失, 其毒副作用却增加^[3], 欧盟已将它们确定为四环素、金霉素和土霉素的残留标识物^[4]。

目前, TCs 残留的测定方法主要有微生物法、酶联免疫法、薄层色谱法、毛细管电泳法、液相色谱法^[5-9]和液质联用法^[10]等。多数方法为 TCs 药物残留的检测方法, 涉及 TCs 及其代谢产物的同时测定的方法并不多见。因此, 本文在前人工作的基础上提出了基于超纯硅胶基质的反相 C₁₈ 色谱柱和紫外检测的分离分析方法, 用于 7 种 TCs 及其 3 种代谢产物的同时测定。结果表明该方法简单、快速、灵敏, 可用于实际样品的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 Waters Alliance 2695 型高效液相色谱仪, 配紫外可见波长检测器 (Waters 2487); METTLER TOLEDO AL-204 型电子天平 (感量 0.0001 g); 组织匀浆机; WH-861 型旋涡混合器; KQ-500E 型超声清洗器; BECKMAN Allegra x-

[作者简介] 雒婉霞 (1981-), 女, 本科, 技师, 主要从事理化检验工作。

22R型冷冻离心机; QGC- 12T型吹氮浓缩仪; FULI PHS- 3E型 pH计(测量精度 0.001); 可调式移液器(量程 20 L l~200 L l/200 L l~ 1000 L l); Waters固相萃取真空装置, 20孔; Waters Oasis HLB固相萃取柱(5 mg 6 cc); Milli- Q超纯水制备机; 滤膜(0.45 Lm 有机系)。

11.1.2 试剂 二甲胺四环素(Mpbio公司, 97.0%)、差相四环素(ACROS公司, 97.0%)、差向土霉素(ACROS公司, 97.0%)、土霉素(ACROS公司, 98.5%)、四环素(Drl Ehrenstorfer公司, 97.0%)、去甲基金霉素(Fuka公司, 99.0%)、差向金霉素(ACROS公司, 97.0%)、金霉素(Drl Ehrenstorfer公司, 99.0%)、甲稀土霉(Riedel dHaen公司, 97.5%)、素强力霉素(Drl Ehrenstorfer公司, 96.5%); 甲醇、乙腈、甲酸为色谱纯; 0.1 mol/L EDTA- Milvaïne缓冲溶液[¥磷酸氢二钠溶液 0.2 mol/L: 称取 711.63 g磷酸氢二钠, 用水溶解, 定容至 1000 ml] | 柠檬酸溶液 0.1 mol/L: 称取 211.01 g柠檬酸, 用水溶解, 定容至 1000 ml] § Milvaïne缓冲溶液: 将 625 ml 0.2 mol/L磷酸氢二钠溶液与 1000 ml 0.1 mol/L柠檬酸溶液混合, 必要时用盐酸或氢氧化钠调节 pH至 4.0? 0.05 ` EDTA- Milvaïne缓冲溶液 0.1 mol/L: 称取 601.5 g乙二胺四乙酸二钠放入 1625 ml Milvaïne缓冲溶液中, 使其溶解, 摇匀。]; 其他试剂为分析纯; 水为超纯水; 猪肉为市购。

11.2 标准溶液的配制

11.2.1 标准储备液 1100 mg/ml 分别准确称取 0.10100 g的 MNO、ETC、EOTC、OTC、TC、DMCTC、ECTC、CTC、MTC、DOXY标准品分别置于 10个 10.0 ml棕色容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度。

11.2.2 混合标准中间液 1010 Lg/ml(其中 MNO、DMCTC、ECTC、CTC、DOXY的浓度增加一倍), 将以上各标准储备液用甲醇稀释, 配成混合标准溶液。

11.2.3 标准使用液 临用前将混合标准中间液用甲醇: 乙腈(2:3) - 0.1%甲酸溶液(体积比例为 14:86)稀释至相应浓度供仪器分析。

11.3 色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis T3(4.6 @250 mm, 5 Lm); 流动相: 甲醇: 乙腈(2:3) - 0.1%甲酸溶液为流动相(梯度洗脱); 流速: 110 ml/min; 进样量: 10 L; 柱温: 40e; 检测波长: 350 nm; 洗脱梯度见表 1。

表 1 分离 7种 TCs及其 3种代谢产物的洗脱梯度

时间 (min)	甲醇: 乙腈 (2:3) (%)	0.1%甲酸溶液 (%)	Curve
0	14	86	6
171.5	18	82	6
28	33	67	6
35	37	63	1
37	37	63	6
371.5	100	0	6
381.5	100	0	1
39	14	86	6

11.4 样品前处理

11.4.1 提取 称取均质猪肉试样 510 g(精确到 0.101 g), 置于 50 ml聚丙烯离心管中, 加入约 20 ml 0.1 mol/L EDTA-

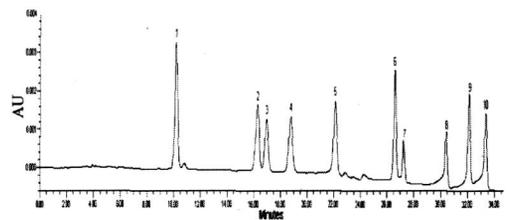
Milvaïne缓冲溶液, 用组织匀浆机匀浆 3 min, 再用约 5 ml 0.1 mol/L EDTA- Milvaïne缓冲溶液淋洗组织匀浆机刀头, 合并淋洗液与上述试样匀浆, 旋涡混合 30 s 低温超声提取 10 min, 15000 r/min 离心 10 min(温度 0e), 上清液过滤, 滤液待净化。

11.4.2 净化 Waters Oasis HLB固相萃取柱, 临用时依次用 6 ml 甲醇、6 ml 水、6 ml 0.1 mol/L EDTA- Milvaïne缓冲溶液活化, 然后将滤液以 2~3 ml/min 的流速过柱, 待样液完全流出后, 用 2 ml 5% 甲醇水溶液淋洗, 弃去全部流出液, 减压抽干 3 min, 再用 4 ml 甲醇洗脱。洗脱液用氮气 40e 吹干。用 110 ml 初始流动相溶解残渣, 漩涡 1 min 过 0.45 Lm 滤膜, 供高效液相色谱仪测定。

2 结果与讨论

2.1 样品提取与净化

TCs及其代谢产物属高极性的弱酸弱碱类化合物, 在生物样品中易与蛋白质强烈结合, 需用强酸或脱蛋白剂从生物样品中提取。但是, 酸性条件下 (pH < 2.0) TCs降解为脱水产物^[4], 因此本方法采用 pH=4.0的 EDTA- Milvaïne缓冲溶液作为提取液, 使猪肉中的 TCs及其代谢产物具有高的稳定性和满意的提取率。又由于 ETC、EOTC、ECTC与 TC、OTC、CTC的分子结构和化学性质类似, 因此 TCs的代谢产物的提取与净化条件可与 TCs相同。综上所述, 本方法采用 21.3.2的固相萃取技术对提取液进行净化, 取得满意的结果(图 1)。



1- MNO; 2- ETC; 3- EOTC; 4- OTC; 5- TC; 6- DMCTC; 7- ECTC; 8- CTC; 9- MTC; 10- DOXY

图 1 7种 TCs及其 3种代谢产物的液相色谱图

2.2 检测波长的选择

根据文献报道^[4], TCs及其代谢产物含有苯环、酮基和醇组成的共轭体系, 具有两个发色团, 在近可见区具有强的紫外吸收。通过将一定量的混合标准溶液, 用甲醇: 乙腈(2:3) - 0.1%甲酸溶液(体积比例为 14:86)稀释至 10 ml以 PDA检测器进行全扫描, 发现 TCs及其代谢产物在 267 nm 和 350 nm 处均有较强吸收峰, 但由于本实验梯度洗脱条件下选择 267 nm 时出现基线漂移且有较多的干扰, 故采用 350 nm 作为检测波长。

2.3 色谱分离条件的优化

选择了 Waters Atlantis T3(4.6 @250 mm, 5 Lm)柱作为分离柱对 10种 TCs及其代谢产物进行分离条件的优化。采用 110 ml/min 的流速。根据文献^[5,6]选择甲醇 - 乙腈 - 0.1 mol/L 的三氟乙酸溶液, 结果发现甲醇 - 乙腈 - 0.1 mol/L 的三氟乙酸溶液为流动相的条件下 ETC和 EOTC存在重叠, 无法实现定性和准确定量。采用甲醇 - 乙腈 - 0.1%甲酸溶液为流动相对流动相的比例和洗脱梯度进行优化。在对有机相比例选择上发现, 仅采用甲醇, 各成分分离效

果较理想,但由于分离时间过长造成 CTC、MTC、DOXY峰前展比较严重,在甲醇中不断提高乙腈的含量,发现各组分的分离度和峰形都较为理想。经过反复优化当有机相中甲醇和乙腈的比例为2:3时,7种TCs及其3种代谢产物均能达到较好的分离效果,而且具有较高的检测灵敏度和较佳的峰形。

214 方法的线性范围与检出限、测定低限

逐级稀释标准混合工作液进行超高效液相色谱仪分析,测定结果用 Waters Empower⁰ 软件回归,线性范围为 25 Lg/kg ~ 1250 Lg/kg 检出限为 41.5 Lg/kg ~ 22 Lg/kg 测定低限为 25 Lg/kg ~ 80 Lg/kg。回归方程、相关系数、检出限见表 2(x 为峰面积, y 为待测组分的浓度, Lg/kg)。

表 2 7种 TCs及其 3种代谢产物的回归方程、相关系数、检出限及测定低限

组分名称	回归方程	相关系数 (r)	LOD (Lg/kg)	LOQ (Lg/kg)
MNO	$Y = 0.123X - 0.0377$	0.9979	91.0	50
ETC	$Y = 0.192X + 0.0175$	0.9976	41.5	25
EOTC	$Y = 0.102X + 0.1526$	0.9969	71.5	25
OTC	$Y = 0.132X + 1.160$	0.9954	41.5	25
TC	$Y = 0.195X - 0.0306$	0.9978	61.0	25
DMCTC	$Y = 0.113X + 0.0702$	0.9950	91.0	50
ECTC	$Y = 3.02X - 0.0236$	0.9989	22	80
CTC	$Y = 5.28X - 0.0220$	0.9958	22	80
MTC	$Y = 1.67X - 0.00183$	0.9946	71.5	25
DOXY	$Y = 0.107X - 0.00407$	0.9816	18	50

215 方法的回收率与精密度

选用不含 10 种待测组分的猪肉样品,分别加入 100 Lg/kg、250 Lg/kg 和 500 Lg/kg 3 个浓度水平的 10 种待测组分混合标准溶液,按 2.1.3 处理样品,进行 3 个浓度水平添加回收试验,空白猪肉样品及标准添加样品的色谱图见图 2~图 3。测得平均回收率 (n=10) 在 82.1% ~ 101.1% 之间, RSD 在 0.8% ~ 8.3% 之间。

表 3 各水平回收率、精密度

组分名称	添加水平 (Lg/kg)					
	100		250		500	
	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
MNO	87.7	4.1	82.5	2.7	90.6	1.6
ETC	85.5	3.5	87.0	3.6	91.8	2.5
EOTC	101.9	3.4	89.4	4.1	89.4	2.7
OTC	89.3	2.6	95.6	2.9	100.5	0.8
TC	85.7	3.9	90.0	4.5	90.4	3.1
DMCTC	90.5	4.4	87.9	6.2	87.2	3.6
ECTC	97.1	5.6	92.6	7.5	98.6	5.2
CTC	92.5	7.7	95.8	4.3	86.5	4.8
MTC	97.5	2.3	94.2	5.5	90.4	3.6
DOXY	88.8	8.3	88.0	3.8	90.8	2.9

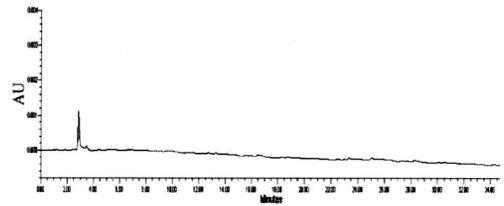
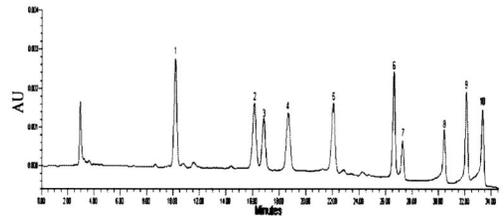


图 2 空白猪肉样品的色谱图



1 - MINO; 2 - ETC; 3 - EOTC; 4 - OTC; 5 - TC; 6 - DMCTC; 7 - ECTC; 8 - CTC; 9 - MTC; 10 - DOXY

图 3 加标猪肉样品 (加标 100 µg/kg) 的色谱图

3 结论

本方法前处理简单,灵敏度高,精密度及回收率均可满足国内外对残留分析的要求,可用于猪肉中四环素及其代谢产物多残留的同时检测。

[参考文献]

- [1] 罗晓燕,林玉娜,刘莉治. 1 SPE-HPLC法同时测定水产品中四种抗生素残留的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(3): 198-2201
- [2] 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 1 动物性食品中兽药残留限量 120021
- [3] 张劲强,梁岩,董元华,等. 1 差相异构体对四环素药物的发光霉菌毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(5): 279-2811
- [4] 李俊锁,邱月明,王超. 1 兽药残留分析[M]. 1 上海:上海科学技术出版社, 2002: 393-4121
- [5] 吉彩,岳振峰,丽琪,等. 1 液相色谱法同时检测水产品中 7 种四环素类抗生素残留的研究[J]. 1 中国兽医科技, 2005, 35(10): 820-8261
- [6] 王蕾,徐智秀,张孝松,等. 1 反相高效液相色谱法快速测定 7 种四环素类抗生素[J]. 1 分析化学, 2003, 31(1): 52-541
- [7] 王蕾,张孝松,徐志秀,等. 1 反相高效液相色谱法测定四环素类抗生素[J]. 1 色谱, 2002, 20(1): 49-511
- [8] Korsrud GO, MacNeil JD. 1 A comparison of three bioassay techniques and high performance liquid chromatography for the detection of chlor2 tetracycline residues in swine tissues[J]. 1 Food Additives and Contam2 nants 1987, 5(2): 14921531
- [9] Sokol J, Matisova E. 1 Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food 2 producing animals by high performance liquid chromatography using solid phase extraction[J]. 1 J Chromatogr A, 1994, 669: 752801
- [10] 杨红梅,王浩,刘艳琴,等. 1 高效液相色谱-质谱联用测定乳制品中 6 种四环素类抗生素[J]. 1 中国乳品工业, 2007, 35(11): 50-521

(收稿日期: 2010-01-28)