

HPLC 法测定鸡蛋中土霉素和金霉素的残留量

陆春波, 应永飞, 吕伟军

(浙江省兽药监察所, 浙江杭州 310020)

[收稿日期] 2003-09-22 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2004)03-0019-03 [中图分类号] S859.84

[摘要] 采用 RP-HPLC 方法同时测定了鸡蛋中土霉素和金霉素的残留量。用 0.01 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液和 0.3% 磷酸溶液为提取液, 三氯乙酸 (1+1) 溶液为蛋白沉淀剂, 离心后上清液经 C₁₈ 固相萃取柱净化、浓缩。色谱柱为 Waters Symmetry Shield™ RP₁₈ 柱, 250 mm × 4.6 mm (i. d.), 粒径 5 μm; 检测波长 353 nm; 以 0.02 mol/L 草酸乙腈 0.01 mol/L 磷酸二氢钠 (451936, V/V) 为流动相。土霉素和金霉素标准曲线的线性范围分别为 0.05~1.0 μg/mL 和 0.1~2.0 μg/mL。经过 3 种不同浓度回收率的测定, 其回收率在 50.6%~85.6% 之间, RSD% 小于 8.60% (n=5)。

[关键词] 土霉素; 金霉素; 残留; RP-HPLC

动物性食品是人们赖以生存的主要食品之一, 随着人们生活水平的提高, 动物性食品的消费量日益增大。人们在饲养动物的过程中, 为了防治疾病和促进动物生长, 提高饲料中营养物质的利用率, 在复合饲料中广泛应用抗生素, 带来了可观的经济效益。但是, 它们在动物性食品中的残留问题也日益突出, 人们长期食用这种含有药物残留的动物性食品, 会对健康构成严重的潜在威胁。土霉素 (OTC) 和金霉素 (CTC) 是四环素类抗生素药物, 应用十分广泛。为了控制土霉素和金霉素在动物性食品中的残留, 我国规定了它们在动物性食品中的最高允许残留限量^[1]。本文参考有关资料^[2~6], 采用高效液相色谱法, 测定了鸡蛋中土霉素和金霉素的残留量, 获得了良好的分离效果, 达到了同时测定鸡蛋中土霉素和金霉素残留量的目的。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备 高效液相色谱仪: Waters 2695-UV2487; 超声波振荡器: KQ-500; 冷冻离心机: Sigma 2k15; 旋转蒸发仪: BUCHI B-490; 漩涡混匀器 SK-1 型; 匀浆机 AM-6 型; 电子天平 METTLER AG-285。C₁₈ 固相萃取柱 (500 mg/5 mL), 杭州富裕科技服务有限公司提供。

1.2 试剂和溶液 土霉素标准品 (912 u/mg), 中

国药品生物制品鉴定所提供; 金霉素标准品 (913 u/mg), 中国兽医药品监察所提供; 乙腈为色谱纯, 美国 TEDIA; 乙二胺四乙酸二钠、三氯乙酸、甲醇、草酸、磷酸二氢钠均为分析纯; 水为超纯水。

1.2.1 0.1 mol/L 草酸溶液 取草酸 12.6 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL。

1.2.2 0.02 mol/L 草酸溶液 取草酸 2.52 g, 加水溶解并稀释至 1 000 mL。

1.2.3 0.01 mol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液 取乙二胺四乙酸二钠 3.72 g, 加水稀释至 1 000 mL。

1.2.4 0.3% 磷酸溶液 取 85% 磷酸 2.1 mL, 加水稀释至 1 000 mL。

1.2.5 三氯乙酸 (1+1) 溶液 取三氯乙酸 100 g, 加水 100 mL。

1.3 色谱条件 色谱柱为 Waters Symmetry Shield™ RP₁₈ 柱, 250 mm × 4.6 mm (i. d.), 粒径 5 μm; 柱温为室温; 检测波长设定在 353 nm; 流动相为 0.02 mol/L 草酸 3 乙腈 3 0.01 mol/L 磷酸二氢钠 (451936, V/V); 流速为 1 mL/min; 进样 20 μL。

1.4 标准曲线的绘制

1.4.1 土霉素和金霉素标准贮备液 精密称取 25 mg 土霉素标准品置于 200 mL 棕色量瓶中, 用 0.1

陆春波 (1972 年~), 女, 兽医师, 从事兽药检测和动物性食品中药残分析等工作。

mol/L 草酸溶解后定容。精密称取 50 mg 金霉素标准品置于 200 mL 棕色量瓶中, 用 0.1 mol/L 草酸溶解后定容。标准贮备液在 0~8 贮存。

1.4.2 土霉素和金霉素混合标准工作溶液 精密量取适量的土霉素和金霉素标准贮备液, 用水稀释至适宜浓度的土霉素和金霉素混合标准工作溶液。

1.4.3 绘制标准曲线用土霉素和金霉素工作液 精密量取土霉素和金霉素混合标准工作溶液, 用水稀释至含土霉素分别为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 $\mu\text{g/mL}$, 含金霉素分别为 0.1、0.2、0.4、1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列工作液。

1.4.4 标准曲线的绘制 将绘制标准曲线用土霉素和金霉素混合工作液按浓度从低到高, 依次进行高效液相色谱分析。按其所得峰面积与对应的工作液浓度作标准曲线图, 并计算回归方程和相关系数。

1.5 试样的提取 取 5.0 g 匀浆后的鸡蛋样品, 放入 50 mL 的聚丙烯离心管中, 加 0.01 mol/L 的乙二胺四乙酸二钠溶液 7.5 mL、0.3% 磷酸溶液 7.5 mL, 超声 10 min 后, 加入三氯乙酸(1+1)溶液 1 mL, 混匀后, 再超声 10 min, 于 5 000 g 离心 15 min, 取上清液过滤, 收集滤液。重复 1 次, 合并滤液, 备用。

1.6 试样的净化 取 C_{18} 小柱(500 mg/5 mL), 用甲醇 10 mL、蒸馏水 20 mL 淋洗, 取滤液过柱, 再用蒸馏水 10 mL 淋洗, 吹干后加甲醇 10 mL 洗脱, 洗脱液在 60 旋转蒸干后, 用 0.01 mol/L 草酸 1 mL 溶解残渣, 过滤膜后, 注入色谱仪分析。

1.7 回收率的测定 分取空白鸡蛋的匀浆 5.0 g, 加适量土霉素和金霉素混合标准工作溶液, 使土霉素的浓度为 0.1、0.2 和 1.0 $\mu\text{g/g}$, 金霉素的浓度为 0.2、0.4 和 2.0 $\mu\text{g/g}$, 按 1.5、1.6 项下的方法处理后进行色谱分析。每个浓度点配制 5 份样品, 求其平均回收率, 并计算批内相对标准偏差。取峰面积值, 以外标法计算组织中土霉素和金霉素的含量, 以测得量与添加量之比来计算回收率。

2 结果

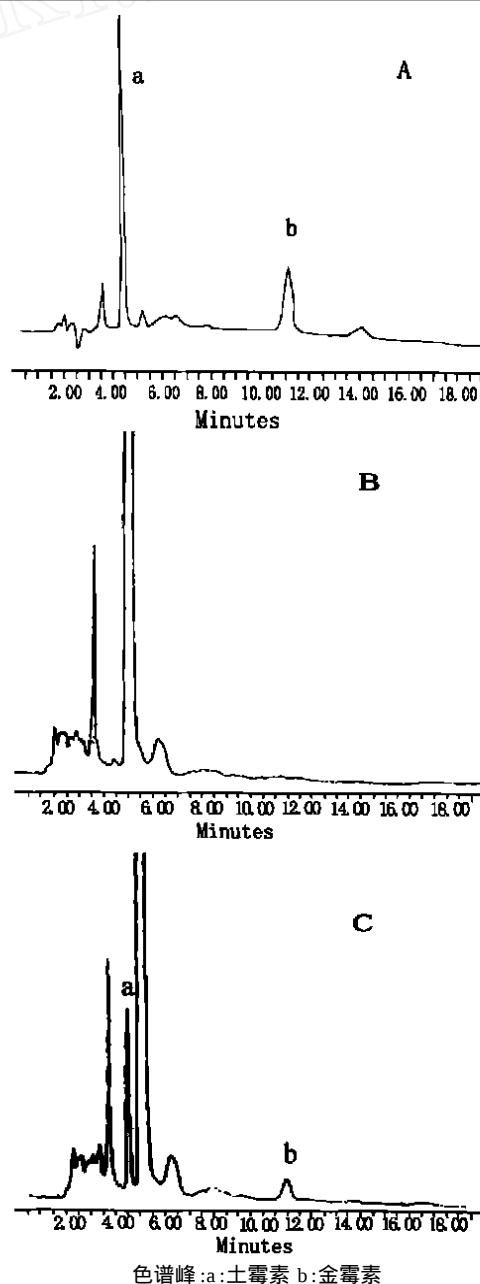
2.1 标准曲线 土霉素的线性回归方程为: $y = 3.40 \times 10^4 x - 8.97 \times 10^2$ ($r = 0.9999$), 线性范围为 0.05~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。金霉素的线性回归方程为: $y = 1.04 \times 10^4 x - 1.7 \times 10^3$ ($r = 0.9997$), 线性

范围为 0.1~2.0 $\mu\text{g/g}$ 。

2.2 回收率测定 结果见表 1, 其高效液相色谱图(其中土霉素的添加量为 0.2 $\mu\text{g/g}$, 金霉素的添加量为 0.4 $\mu\text{g/g}$) 见图 1。

表 1 回收率测定结果 ($n = 3$)

项 目	OTC			CTC		
添加浓度/ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.1	0.2	1.0	0.2	0.4	2.0
平均回收率/ %	64.1	65.5	85.6	50.6	58.6	72.5
RSD/ %	7.29	8.60	2.51	5.53	6.83	8.06



色谱峰: a: 土霉素 b: 金霉素

A: 标准溶液; B: 空白样品; C: 阳性添加样品

图 1 高效液相色谱图

3 讨论与结论

关于土霉素和金霉素在动物组织中的残留检测方法,文献已有报道^[3~7],但研究发现,由于没有添加蛋白沉淀剂,影响了液相色谱柱的分离效果,所得到的色谱图色谱峰很杂,影响药物特征峰的识别。笔者在样品处理过程中,通过加入三氯乙酸沉淀蛋白质,提取液再经过 C₁₈ 柱净化而有效地除去了其中的水溶性杂质,有利于药物的分离,使得到的色谱图中杂质峰明显降低。

本方法简便、快捷、可准确地测定鸡蛋中土霉素和金霉素的残留量。在本实验的色谱条件下,可以使被测样品中的各组分得到很好地分离。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 2002. 12.
- [2] 卜一工, 赵彤, 侯掩文, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定对虾体内土霉素残留量[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1995, 31(4):415-421.
- [3] 陈玲, 周岚, 杨林, 等. 金霉素在鸡肝中残留量的检测方法探讨[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(2):18-20.
- [4] 黄志良. 高效液相色谱法测定肉中金霉素含量[J]. 食品工业科技, 2000, 21(5):68-71.
- [5] 李薇, 阎震. 动物肉中土霉素、四环素、金霉素残留量测定方法的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(6):730-731.
- [6] 蔡秀成, 潘维平, 邢立新, 等. 动物组织中土霉素、四环素、金霉素残留量分析[J]. 农业与技术, 2000, 8(4):41-42.

Determination of oxytetracycline and chlortetracycline residues in eggs by HPLC

LU Chun-bo, YING Yong-fei, L ÜWei-jun

(The Institute of Zhejiang Provincial Veterinary Drugs Control, Hangzhou, Zhejiang 310020; China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic(HPLC) method was used for simultaneous determination of oxytetracycline(OTC) and chlortetracycline(CTC) residues in eggs. The OTC and CTC were extracted with 0.01 mol/L ethylenediaminetetraacetic acid disodium and 0.3% phosphoric acid. After the protein precipitation with trichloroacetic acid, the extract were purified and concentrated by passing through Bond Elut C₁₈ solid-phase extraction cartridges. The HPLC determination was carried out on a Waters Symmetry ShieldTM RP₁₈ column (250 mm ×4.6 mm i. d., 5 μm) and oxalic acid (0.02 mol/L)-acetonitrile-sodium dihydrogenphosphate (0.01 mol/L) (451936) as mobile phase with UV detection at 353 nm. The linear range of calibration curve were 0.05 ~ 1.0 μg/mL for OTC and 0.1 ~ 2.0 μg/mL for CTC. Recoveries for OTC and CTC were between 50.6% and 85.6%, RSDs were not more than 8.60% (n=5).

Key words: oxytetracycline; chlortetracycline; residues; HPLC; eggs

农业部发布《高致病性禽流感疫情判定及扑灭技术规范》等 9 项标准

农业部于 2004 年 2 月 17 日发布第 347 号公告。经专家审定通过,农业部审查批准,将《高致病性禽流感疫情判定及扑灭技术规范》等 9 项标准发布为中华人民共和国农业行业标准,自发布之日起实施。

这 9 项标准分别为:高致病性禽流感疫情判定及扑灭技术规范(NY 764-2004);高致病性禽流感样品采集、保存及运输技术规范(NY/T 765-2004);高致病性禽流感无害化处理技术规范(NY/T 766-2004);高致病性禽流感消毒技术规范(NY/T 767-2004);高致病性禽流感人员防护技术规范(NY/T 768-2004);高致病性禽流感免疫技术规范(NY/T 769-2004);高致病性禽流感监测技术规范(NY/T 770-2004);高致病性禽流感流行病学调查技术规范(NY/T 771-2004);禽流感病毒 RT-PCR 试验方法(NY/T 772-2004)。