羊乳中替米考星残留的检测方法研究

王雪敏，石玉祥，李 存
(河北工程大学农学院，河北 邯郸 056021)

摘 要：建立了羊乳中替米考星残留的反相高效液相色谱检测方法。羊乳按1:1(*V/V*)用乙腈提取，上清液以5ml/min流速过C_{18} SPE柱，采用乙腈-水(20:80，*V/V*)洗涤、乙腈-水(90:10，*V/V*)洗脱，并以0.1mol/L乙酸铵-乙腈-甲酸(60:30:10，*V/V*)为流动相，采用高效液相色谱仪在280nm处使用紫外检测器检测。本法定量限(LOQ)为0.020μg/ml，平均回收率范围在90.3%～98.1%之间，线性范围为0.01～25μg/ml，变异系数范围在4.1%～8.9%之间。本法可满足残留分析的要求，为羊乳中替米考星的残留分析提供了可靠的检测方法。

关键词：羊乳；替米考星；高效液相色谱；残留检测

HPLC Determination of Tilmicosin Residue in Goat Milk

WANG Xue-min，SHI Yu-xiang，LI Cun
(College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan 056021, China)

Abstract：A reverse phase HPLC method was developed for the determination of tilmicosin residue in goat milk. Samples were extracted using methanol, and cleaned-up using SPE on a C_{18} cartridge with a mixture of acetonitrile and water (90:10, *V/V*) as the eluent [the washing with a mixture of acetonitrile and water (20:80, *V/V*) was carried out prior to elution]. The analysis was performed on a Symmetry column with a mobile phase composed of 0.1 mol/L ammonium acetate (adjusted to pH 5.0 with formic acid), acetonitrile and methanol (60:30:10, *V/V*) using a UV detector set at 280nm. The limit of quantification was 0.020 μg/ml and the linear range was 0.01－25 μg/ml, and the spike recoveries at three levels of 0.02－5 μg/ml were in the range of 90.3%－98.1% with a coefficients of variation ranging 4.1% － 8.9%. The method can meet the requirement for tilmicosin residue analysis.

Key words：goat milk；tilmicosin；HPLC；residue determination
中图分类号：TS207.5.3 文献标识码：A 文章编号：1002-6630(2009)14-0207-03

替米考星是一种畜禽专用大环内酯类抗生素，用于治疗和预防牛、羊、禽、猪等溶血性巴氏杆菌、多杀性巴氏杆菌肺炎、放线杆菌属胸膜肺炎、支原体和其敏感菌感染引起的肺炎及奶牛乳房炎。它作为一种高效畜用抗生素，有很好的应用前景[1]。替米考星内服吸收快，但不完全。表观分布容积大，肺组织中的药物浓度高。具有良好的组织穿透力，能迅速而完全的从血液进入乳房，乳中药物浓度高、维持时间长，乳中半衰期长达1～2d。奶牛及奶山羊的血清半衰期分别为4.2h和29.3h[2]。本研究拟参考国外相关方法进行优化[3-4]，以期建立替米考星在羊乳中的反相高效液相色谱检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

羊乳 河北省武安市某养羊场。

替米考星标准品(93.2%) 中国兽药监察所；双蒸水；乙酸铵(分析纯)、乙腈(色谱纯)、甲醇(色谱纯) 北京化学试剂公司。

1.2 仪器与设备

Agilent 1100高效液相色谱仪(1100紫外检测器、T19900色谱工作站) 美国Agilent公司；BondElut C_{18} SPE柱(500mg，6ml)；XW-80A漩涡混合仪 上海医科大学仪器厂；LD-2A离心机 北京医用离心机厂。

1.3 溶液配制

替米考星标准贮备液(1mg/ml)的配制：取100.0mg替米考星标准品于100ml容量瓶中，甲醇溶解并定容；HPLC流动相的配制：0.1mol/L乙酸铵(甲酸调pH值到5.0)-乙腈-甲醇(60:30:10，*V/V*)，0.45μm的滤膜过滤。使用时密封，以防止流动相中有机溶剂挥发。

1.4 色谱条件

收稿日期：2008-10-08
基金项目：河北省教育厅科学研究计划资助项目(2005322)
作者简介：王雪敏(1963－)，女，教授，博士，主要从事动物性食品卫生学研究。E-mail：xmwanghd@163.com

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

检测器：紫外检测器；检测波长：280nm；色谱柱：Waters Symmetry C_{18}(3.9mm × 150mm)；流动相：0.1mol/L乙酸铵(甲酸调pH值到5.0)-乙腈-甲醇(60:30:10，*V/V*)；流速：1.0ml/min；进样量：100μl。

1.5 标准曲线绘制

用流动相将替米考星的标准贮备液稀释成0.02、0.2、0.4、4、10、40μg/ml的标准工作溶液，各取100μl进RP-HPLC分析，每个浓度进样测定3次，求平均值，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.6 羊乳样品前处理

精确量取10ml羊乳样品置于50ml离心管中，加10ml乙腈，涡动1min，3500r/min离心10min，取上清液，加25ml水，涡动混匀，过SPE柱。将SPE柱(BondElut，C_{18}，500mg，6ml)用5ml甲醇活化和5ml水平衡，使提取液按流速约5ml/min通过SPE柱，当样品通过SPE柱后用10ml水和10ml乙腈-水洗涤液(20:80，*V/V*)分别洗涤SPE柱，当洗涤液通过SPE柱后，将SPE柱吹干约5min，3ml乙腈-水洗脱液(90:10，*V/V*)洗脱，弃掉最初的0.5ml，用刻度试管收集2ml，在氮吹仪上，50℃水浴中，氮气吹至近干。流动相稀释定容至1ml，在漩涡混合仪上涡动使混匀，0.2μm滤膜过滤，取100μl进高效液相色谱仪测定。

1.7 定量限和检测限的测定

取空白的羊乳样品，10个平行，按1.6节样品前处理的方法处理，进样，高效液相色谱检测，测得基线噪音值，按信噪比3和10分别计算检测限(limits of detection，LOD)和定量限(limits of quantitation，LOQ)。

1.8 加标回收率和精密度

分别取空白羊乳10.0ml，添加一定体积的标准添加溶液，使羊乳中药物浓度为0.02、0.5和5μg/ml。添加后涡动混匀，静置30min。按1.6节样品前处理方法分别处理后进行HPLC测定，1d中每个浓度取5个平行样品，分别测定，计算回收率和日内变异系数。

2 结果与分析

2.1 标准曲线

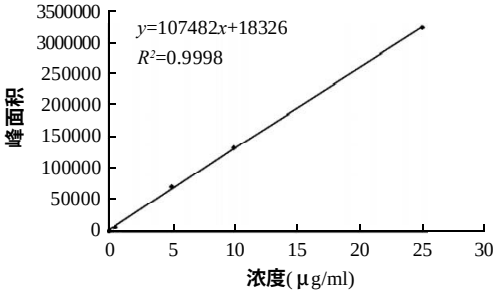


图1 替米考星标准曲线图

Fig.1 Standard curve for tilmicosin determination by the RP-HPLC method developed

在浓度为0.01～25μg/ml范围内，替米考星峰面积与浓度呈线性相关，其回归方程 Y=107482X+18326，相关系数 r=0.9998，见图1。

2.2 提取与净化

2.2.1 提取剂的选择

对提取剂的选择，本研究比较了甲醇和乙腈，甲醇提取效率高(大于90%)，但杂质较多，而乙腈提取回收率低(小于70%)，但杂质较少。综合考虑，本实验选择甲醇提取并通过后续的净化措施消除杂质干扰。

2.2.2 萃取柱的选择

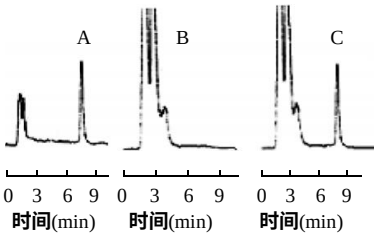
SPE的优点在于有机溶剂用量少、选择性高、速度快、可实现自动化等。为取得最佳的净化效果，通过比较不同填料的SPE柱，如MAX、MCX、HLB，回收率均低于60%。最终，本研究选择了已商品化、成本最低的 C_{18} SPE柱，降低了检测成本。

2.2.3 待测样品提取液流速选择

当样品通过SPE柱时流速很关键，流速高于5ml/min影响回收率，达到6ml/min回收率低于80%，流速太慢重复性较差，净化时间长，而且SPE柱容易堵塞。本实验采用5ml/min流速。

2.2.4 洗涤和洗脱条件

纯乙腈可以完全洗脱替米考星，但净化效果差，通过比较不同比例的乙腈-水，发现乙腈-水(20:80，*V/V*)洗涤SPE柱，不影响回收率，而且可以消除部分杂质干扰；乙腈-水(90:10，*V/V*)可以完全洗脱替米考星，而且净化效果更好，回收率满意(大于90%)。在以上条件的基础上，最终选择了乙腈-水(20:80，*V/V*)洗涤、乙腈-水(90:10，*V/V*)洗脱，避免了杂质的干扰，基质与替米考星分离良好(图2)。



A.标准溶液色谱图；B.空白羊乳样品色谱图；C.加标羊乳样品色谱图。

图2 羊乳中替米考星的高效液相色谱图

Fig.2 HPLC chromatograms of tilmicosin standard, blank goat milk and tilmicosin-spiked goat milk

2.3 色谱分离条件

本研究选择了常规的紫外监测器，分别对多种型号和规格的色谱柱进行考察和比较，选择了成本低、耐酸、耐水的Symmetry C_{18}色谱柱，据文献报道[5]，在流动相中加入乙酸铵，保证了对称的峰形，将pH值调

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

至5，既保证了药物与杂质的分离，又避免了低pH值对色谱柱的影响。本实验采用0.1mol/L乙酸铵-乙腈-甲醇(60:30:10，*V*/*V*)做为流动相。

2.4 定量限和检测限

根据十个空白羊乳样品的基线噪音值求其平均值，按信噪比(S/N)为3和10计算LOD和LOQ，求得羊乳中替米考星的LOD为0.006μg/ml、LOQ为0.020μg/ml。

2.5 加标回收率及重复性

替米考星的色谱峰峰形尖锐且对称，样品中替米考星与杂质分离良好、基线平稳、无明显的杂质干扰峰，见图2。由表1可知，羊乳在0.02、0.5、5μg/ml三个添加水平的平均回收率范围在90.3%～98.1%之间，相对标准偏差范围在4.1%～8.9%之间。回收率高，重复性好。

表1 羊乳中替米考星的加标回收率和相对标准偏差

Table 1 Recoveries for tilmicosin in goat milk spiked at three levels

添加浓度(μg/ml)	实测值(μg/ml)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
0.02	0.0196 ± 0.002	98.1	8.9
0.5	0.467 ± 0.021	93.4	4.6
5	4.515 ± 0.186	90.3	4.1

注：本底值未检出。

3 讨论与结论

前处理中净化的工作量最大，但一个具有强大分离效能或高选择性检测能力的测定体系可大大降低对净化的要求，动物组织提取液的净化多采用固相萃取(solid-phase extraction，SPE)。SPE柱的活化和平衡中流速、精确的甲醇和水的体积对结果影响不大，但不可使SPE柱流干，否则会影响实验结果。

本实验首次建立了羊乳中替米考星残留的反相等度洗脱HPLC检测方法，方法的线性、准确度、精密度、定量限和检测限满足相关研究的要求。

参考文献：

[1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.

[2] 孙永学, 陈杖榴. 替米考星在兽医临床上应用的研究概况[J]. 兽药与饲料添加剂, 2002, 22(2): 18-20.

[3] RAMADAN A. Pharmacokinetics of tilmicosin in serum and milk of goats[J]. Research in Veterinary Science, 1997, 62(1): 48-50.

[4] 李存, 沈建忠, 张素霞, 等. 猪排泄物中替米考星的高效液相色谱检测方法研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38: 2531-2535.

[5] CHAN W, GEOFF C G, CRAIG D C S. Determination of tylosin and tilmicosin residues in animal tissues by reversed-phase liquid chromatography[J]. Journal of AOAC International, 1994, 77(2): 331-333.

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net