

猪肉中二甲胺四环素的反相-高效液相色谱测定

王晓芳¹, 李 涛^{*1}, 杨春亮¹, 肖 前², 林 玲¹

(1. 中国热带农业科学院农产品加工研究所, 广东湛江 524001;

2. 湛江市农业科学研究所, 广东湛江 524001)

摘 要:建立了一种测定猪肉中二甲胺四环素的反相-高效液相色谱(RP-HPLC)分析方法。目标物经 EDTA-McIlvaine 提取,用 Oasis HLB 固相萃取小柱净化,流动相为甲醇-咪唑缓冲溶液,体积比 20:80,荧光检测器检测,外标法定量。平均添加回收率在 89.6%~94.0%之间,相对标准偏差(RSD)在 3.1%~6.5%之间,检出限为 0.01 mg/kg。该方法简单,灵敏度高,重现性好。

关键词:二甲胺四环素;高效液相色谱;猪肉

中图分类号:O657.7⁺2 文献标识码:A

四环素类抗生素是由链霉菌产生的类碱性抗生素。盐酸二甲胺四环素(Minocyclin Hydrochloride),又名美满霉素或盐酸米诺环素,具有高效、广谱的特点,对革兰阳性及阴性菌均有杀菌能力。四环素类抗生素中二甲胺四环素疗效最好,已在临床使用了多年,它是由去甲基金霉素(DMCTC)和去甲基四环素(DMTC)经半合成制得的。很多国家对在食用动物养殖中使用的四环素类及其在食品中的残留进行了严格的规定,美国、日本、欧盟及我国均规定水产品中四环素类抗生素的最大残留限量为 0.1 mg/kg^[1]。国内有关四环素类抗生素的测定方法很多,但关于二甲胺四环素测定方法的报道甚少,目前的测定二甲胺四环素方法多为高效液相色谱法^[2-3]和高效液相色谱质谱联用法^[4],并且这些方法基本都是用于人血清中二甲胺四环素的测定。

本文建立了反相-高效液相色谱法(RP-HPLC)测定猪肉中二甲胺四环素,该方法的建立可为常规的实验室检测提供可靠的依据。

1 实验部分

1.1 主要仪器、试剂与材料

Waters 2695 高效液相色谱仪,配备荧光检测器(美国, Waters 公司);Oasis HLB 小柱(3 mL, 60 mg, 美国 Waters 公司);氮吹仪(美国, Organomation);离心机(日本, 日立公司);漩涡混合器(德国, IKA);固相萃取装置 HP6019;FA1104 电子天平(上海天平仪器厂)。

盐酸二甲胺四环素标准溶液:精密称取 50.0 mg 盐酸二甲胺四环素标准品(95%, 购于上海安谱)于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈溶解并定容,配制成 500 mg/L 的标准储备液。咪唑缓冲溶液:准确称取 68.06 g 咪唑、0.37 g 乙二胺四乙酸二钠及 10.27 g 乙酸镁溶于 800 mL 水中,用冰乙酸调 pH 至 7.0~7.5,再用水定容至 1 000 mL。柠檬酸溶液(0.1 mol/L):称取 21.01 g 柠檬酸,用水溶解并定容至 1 000 mL。磷酸氢二钠溶液(0.2 mol/L):称取 28.41 g 磷酸氢二钠,用水溶解并定容至 1 000 mL。McIlvaine 缓冲溶液:将 1 000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液和 625 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液混合。EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(0.1 mol/L):称取 60.5 g 乙二胺四乙酸二钠,溶解于 1 625 mL McIlvaine 缓冲溶液中。乙腈、甲醇均为色谱纯,其余试剂为分析纯。实验用水均为二次蒸馏水。

收稿日期:2011-09-19

修回日期:2011-03-24

* 通讯作者:李 涛,女,硕士,助理研究员,研究方向为食品安全。

1.2 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈(250×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-咪唑缓冲溶液(体积比为 20:80);柱温 30℃;流速:1.0 mL/min;荧光检测器:Ex=380 nm,Em=520 nm;进样量:20 μL。

1.3 分析步骤

准确称取猪肉样品 5 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,用 20 mL 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液涡旋提取 5 min,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液于 50 mL 容量瓶中,在残渣中加入 20 mL 0.1 mol/L EDTA-McIlvaine 缓冲溶液再按同样的方法提取一次。合并上清液,并用 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液定容至 50 mL,混合均匀,备用。

固相萃取小柱分别用 5 mL 甲醇和 5 mL EDTA-McIlvaine 活化,取 20 mL 提取液过柱,待样液完全流出后,依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇淋洗,真空抽干,不收集。再用 10 mL 甲醇-乙酸乙酯洗脱,并收集全部洗脱液于 10 mL 试管中。置于 40℃水浴中氮气吹干,用 1 mL 流动相溶解,在漩涡混合器上混匀,过 0.25 μm 微孔滤膜后,用于高效液相色谱测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱分离

在上述色谱条件下,分析得到二甲胺四环素标准溶液的色谱图,见图 1。从图 1 可以看出,目标物可以得到很好的分离,而且峰形对称,保留时间适中。测定四环素类抗生素常用的检测器是二极管阵列检测器或者是紫外检测器,这两种检测器的缺点是灵敏度不高;而将二甲胺四环素用盐溶液提取后再经荧光检测器测定,灵敏度可提高 100 倍以上。

2.2 流动相的选择

实验比较了甲醇-水、乙腈-水及甲醇-咪唑缓冲溶液作流动相时的情况。结果表明,以甲醇-水和乙腈-水为流动相都会出现色谱峰拖尾现象,当用甲醇-咪唑缓冲溶液作为流动相时,谱峰拖尾现象得以改善,而当甲醇-咪唑缓冲溶液体积比为 20:80 时,二甲胺四环素的保留时间适中,峰形对称。

2.3 线性范围与检出限

将二甲胺四环素标准溶液稀释为 0.02、0.10、0.20、1.00、10.0 mg·L⁻¹ 标准系列,按上述色谱条件测定,以进样量(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标建立标准曲线。线性回归方程为:Y=1 021X+361.2,相关系数为 0.9992,在 0.4~200 ng 范围内有良好的线性关系。本方法的检出限为 0.01 mg/kg。

2.4 方法的准确度与精密度

在猪肉中添加不同水平的标准溶液,进行添加回收率试验,分别添加系列浓度的待测药物标准溶液,按照上述实验方法进行添加回收试验,重复测定 5 次,添加回收试验结果见表 1。结果表明,该方法具有较好的准确度和重现性,平均添加回收率为 89.6%~94.0%,相对标准偏差(RSD)为 3.1%~6.5%。

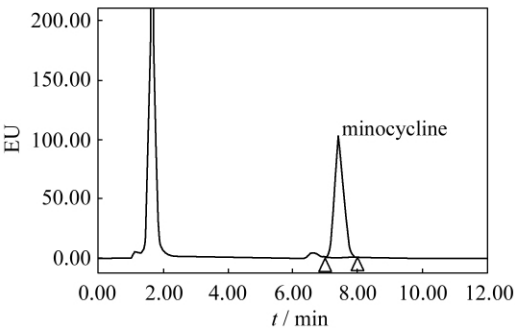


图 1 二甲胺四环素标样色谱图
Fig. 1 Chromatogram of standard minocycline

表 1 猪肉中二甲胺四环素添加回收率和精密度(n=5)

Table 1 Recoveries and precisions of minocycline from fortified meat samples(n=5)

Spiked level(mg/kg)		Found(mg/kg)					Average recovery(%)	RSD(%)
0.1	0.092	0.096	0.091	0.098	0.093		94.0	3.1
1.0	0.912	0.837	0.904	0.850	0.812		86.3	5.0
5.0	4.71	4.41	4.55	4.43	4.50		89.6	6.5

参考文献:

- [1] LI Jun-suo(李俊锁), QIU Yue-ming(邱月明), WANG Chao(王 超). Veterinary drug residue analysis(兽药残留分析)[M]. Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 2002. 365.
- [2] CHOU Yi-qun(仇益群), ZHAO Ming-hua(赵明华), HUANG Zhong-yi(黄仲义). Sichuan Journal of Physiological Sciences(四川生理科学杂志)[J], 1998, **20**(3): 44.
- [3] De Leenheer A P. Journal of Pharmaceutical Science[J], 1979, **68**(12): 1527.
- [4] GB/T 21317-2007, Determination of Tetracycline Residues in Food of Animal Origin LC-MS/MS Method and HPLC Method(动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法)[S].

Determination of Minocycline in Meat Using Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography

WANG Xiao-fang¹, LI Tao^{*1}, YANG Chun-liang^{*1}, XIAO Qian², LIN Ling¹

(1. Agriculture Products Processing Research Institute of South China, Zhanjiang 524001;

2. Zhanjiang Agricultural Science Research Institute, Zhanjiang 524001)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method for the determination of minocycline in meat was investigated. The samples were extracted with EDTA-McIlvaine and cleaned up with Oasis HLB SPE and analyzed by HPLC with fluorescence detector. In the method, the mobile phase was imidazole buffer solution and methanol (80:20). The relative standard deviation and recoveries were 3.1%~6.5% and 89.6%~94.0%, respectively, and the detection limit was 0.01 mg/kg. The method is precise, simple and convenient.

Keywords: Minocycline; High performance liquid chromatography; Meat