液相荧光法检测乳制品中9种氨基糖苷类药物残留

钱 疆,余孔捷,陈 健,刘正才,张玉燕,潘迎芬

(福建省检验检疫局,福建 福州 350001)

摘 要:本文建立了高效液相色谱荧光检测乳制品中的9种氨基糖苷类药物残留方法。样品用10%三氯乙酸提取,采用MCX固相萃取小柱净化,C_{18}色谱分离,流动相采用乙腈:庚烷磺酸钠缓冲溶液梯度淋洗,柱后用次氯酸钠溶液氧化,邻苯二醛(OPA)衍生,荧光检测。9种氨基糖苷类药物加标回收率在69.8%-110.2%之间,方法的定量限为0.008-0.04mg/kg,精密度RSD在1.2%-10.1%之间。

关键词:氨基糖苷类;乳制品;液相色谱-荧光法;柱后衍生;残留

中图分类号:O657.72 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-8143(2011)03-0013-05

Determination of Nine Aminoglycosides Drug Residues in Dairy Products with HPLC-Fluorescence Detection

Qian Jiang, Yu Kong-jie, Cheng Jian, Liu zheng-cai, Zhang Yu-yan, Pang Ying-feng

(Fujian Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou, Fujiang35001, China)

Abstract: In this article, a HPLC-fluorescence method for determination of nine aminoglycosides drug residues in dairy products were studied. The sample was extracted with 10% trichloroacetic acid, then purified on MCX SPE column, aminoglycosides were detected by fluorescence detection after oxidized with sodium hypochlorite and post-column derivated with OPA. The separation was performed on C_{18} column with an elution system of acetonitrile and heptanesulfonic acid sodium buffer solution. The spiked recovery rates ranged form 69.8%-110.2%, the quantification limit was at 0.008-0.04mg/kg and the precision of RSD was 1.2%-10.1%.

Keywords: aminoglycosides; dairy products; HPLC-fluorescence detection; post-clumn derivatization; residue

氨基糖苷类抗生素指结构上由半个氨基糖苷以一个糖苷键与一个氨基环多醇相连接的一类广谱抗生素,在畜牧业中被广泛用于治疗各种革兰氏阴性菌感染引发的疾病,还以亚剂量给药方式添加在饲料中用于预防疾病和提高饲料利用率。已有文献报道不当使用氨基糖苷类抗生素会损害颅神经,引起失明和损害肾脏[1]。因而各国对于食用动物中氨基糖苷类药物残留都做了严格的规定,目前主要用于奶牛养殖业的该类药物有新霉素、庆大霉素、链霉素等。此类药物对动物组织有很强的亲和力,且具有耐酸碱和热处理特性,如果不加以合理的用药和停药期控制,在乳制品中易出现未代谢的药物残留。为此有必要建立相应的检测方法以评估该类药物残留带来的危害。

目前国内外检测氨基糖苷类药物的方法主要有酶联免疫法、放射免疫法、液相法、液相质谱方法[2]。免疫法优点是快速、灵敏度高,缺点是属于半定量方法,存在交叉干扰和假阳性。质谱法可以准确定性,但投入大。相比较而言,液相色谱方法更适合常规分析实验室使用,目前文献报道主要是采用柱前或柱后衍生检测单一的氨基糖苷类药物残留方法。本文采用离子对梯度分离,邻苯二甲醛(OPA)柱后衍生同时检测乳制品中9种氨基糖苷类药物(包括链霉素、双氢链霉素、新霉素、壮观霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素、阿泊拉霉素、托普霉素、萘替米星),针对OPA无法衍生仲胺类氨基糖苷药物如

收稿日期:2010-12-20

基金项目:福建省检验检疫局科技项目支持(编号FK2006-15)。

作者简介:钱疆(1975-),男,高级工程师,主要从事食品理化分析工作。Email:tigerqj@163.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

壮观霉素,而采用在线先用次氯酸钠氧化为伯胺再OPA衍生的方式,目前国内尚无相关文献方法报道。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

安捷伦1200型液相色谱仪器配荧光检测器,柱后衍生装置(Pickering Vector);旋转蒸发仪;高速离心机,氮吹仪。

氨基糖苷类标准品:链霉素、双氢链霉素、新霉素、壮观霉素、卡那霉素、丁胺卡那霉素、阿泊拉霉素、托普霉素、萘替米星,均来自德国Dr.Ehrenstorfer公司;Oasis MCX固相萃取小柱,填料为反相C_{18}和阳离子混合类型,200mg,3mL,waters公司,使用前采用3mL甲醇,3mL2%乙酸活化。柱后衍生溶液(A),配置50mM NaoH溶液500mL,加入10mL次氯酸钠溶液(含有效次氯酸钠质量7%)。柱后衍生溶液(B):50mg OPA用5mL甲醇溶解,用0.05M的硼酸缓冲液(硼砂配制)定容至500mL,过0.2μm尼龙滤膜(whatman公司),并用氮气脱氧气后加入2-巯基乙醇2mL,避光保存。

1.2 色谱条件

色谱柱Purospher Star PR-18e,硅羟基封尾150×4.6mm 5μm,merck公司;流动相A:乙腈;B:缓冲液(含10mM庚烷磺酸钠,采用乙酸调pH=3.3);梯度条件,流动相B初始75%,20min内过渡到60%,2min过渡到50%,维持1min后,13min内过渡恢复到75%,维持2min,流速0.8 ml/min。采用荧光检测激发波长340nm,发射波长435nm,进样量50μL。

串联柱后衍生双泵,泵A,衍生液A,含次氯酸钠的NaOH,衍生温度50℃,流速0.3 ml/min,柱后衍生液B,含OPA缓冲溶液,流速0.3 ml/min,衍生温度室温,衍生管体积500μL。

1.3 样品前处理

奶粉等固体乳制品称5.00g,加入10mL70℃热水溶解,10%三氯乙酸20mL,漩涡振荡1min并超声提取20min,提取2次,置于冷藏冰箱静置,蛋白沉淀后,4000rpm离心5min,合并上清液,转移到鸡心瓶,60℃旋转蒸发至体积到1-3mL,转移到10mL高速离心管,定容平衡后,18000rpm高速离心10min,吸收取澄清液,过活化好的MCX小柱,2%乙酸,甲醇分别淋洗2mL后,用含10%体积比的氨水甲醇2mL洗脱,洗脱液用氮气吹至近干,用乙腈:2%乙酸=10:90(V/V)定容1mL,过滤膜上机。

液体乳品样品称取5.00g添加10%三氯乙酸20mL,漩涡振荡,静置蛋白沉淀后,离心取澄清溶液,以下处理同固体样品。

1.4 标准曲线的制作

各称取上述9种氨基糖苷类标准10mg,除壮观霉素外,用20%甲醇溶解定容至100mL,浓度为100μg/mL,4℃保存,壮观霉素标准品需采用甲醇溶解,-18℃保存。使用前用去离子水稀释相应浓度的工作液,外标法定量,制作工作曲线。

2 结果及讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的优化

氨基糖苷亲水性强,常规反相柱不保留,需要采用离子色谱柱或者反相离子对检测[2]。采用梯度分离多种氨基糖苷类的文献并不多见,本试验采用庚烷磺酸钠作为离子对,通过调节有机相比例梯度淋洗,使得9种氨基糖苷类的保留因子控制在$1<k<15$范围内,标准图谱参见图1,为了避免键合硅胶残余的硅羟基对极性的氨基糖苷类梯度淋洗的重现性的影响,采用硅胶上羟基封尾的色谱柱。

2.1.2 检测模式的选择

由于氨基糖苷类缺乏荧光或紫外的生色基团,不能直接采用荧光或者紫外检测器检测,目前国内外相关文献报告采用荧光柱前或柱后衍生[2],蒸发光散射[3],电化学检测[4],质谱[5]检测氨基糖苷类药物,相比质谱设备的大投入和电化学检测不稳定,蒸发光检测器受样品基体干扰大,荧光检测具有灵敏度高,抗干扰的优点,适合残留分析,本文采用常用的柱后荧光检测。

2.1.3 衍生试剂的选择

在选择荧光衍生剂上,有采用1,2-萘四磺酸钠(NQS)衍生链霉素和双氢链霉素的胍基[6],还有采用邻苯二甲醛(OPA)或氯甲酸芴甲酯(FMOCCl)衍生氨基糖苷类的氨基[2]。由于NQS只能衍生胍基,而

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

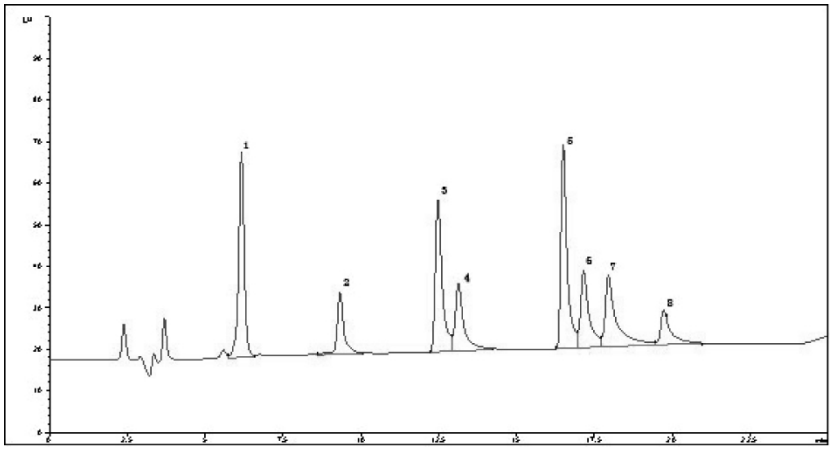

图1　9种氨基糖苷类标准衍生图谱

(0.5μg/mL,按出峰顺序分别为:1.壮观霉素;2.链霉素(双氢链霉素);3.丁胺卡那霉素;4.卡那霉素;5.阿泊拉霉素;6.托普霉素;7.萘替米星;8.新霉素)

FMOCCL的水解产物与衍生物具有相似的荧光强度,过量的衍生剂在检测前需要除去,因此更适合柱前衍生,相比较OPA衍生剂本身没有荧光,反应快速,因此选择作为本实验的柱后衍生剂。

由于OPA的衍生需要在碱性条件下并在硫醇(2-巯基乙醇)的参与下,本试验采用硼酸缓冲溶液做为衍生缓冲溶液,保持pH10左右,硼酸缓冲溶液配制完毕充分真空脱气后再加入OPA和2-巯基乙醇并用氮气密闭保护,可以使用1-2周。

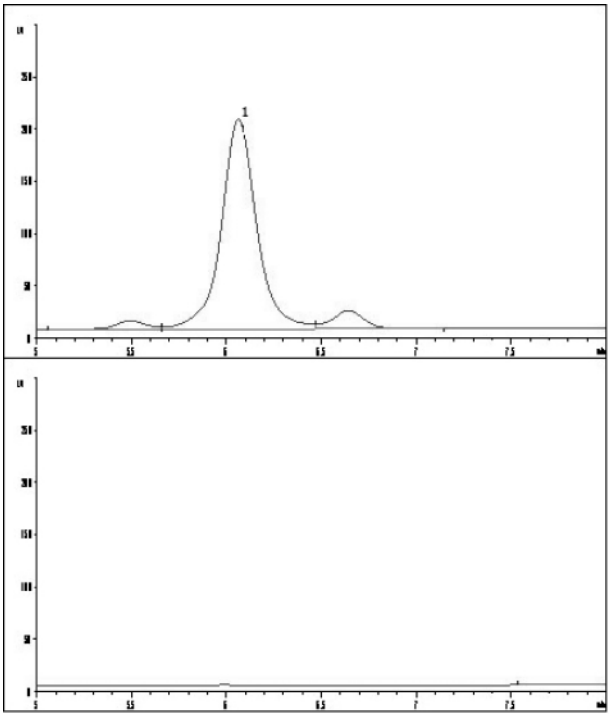

图2　壮观霉素用次氯酸氧化与否的OPA衍生图谱比较

(上.次氯酸钠氧化后衍生;下.未氧化衍生)

2.1.4　仲胺的检测

由于OPA衍生的特点只能衍生伯胺,而壮观霉素结构为仲胺,不含有伯胺基,因此需要先把仲胺氧化为伯胺,文献[7]报道使用次氯酸钠氧化仲胺为伯胺,在线衍生检测壮观霉素。本试验采用该文献报道的衍生条件,OPA衍生前先采用次氯酸钠溶液在线氧化仲胺类氨基糖苷壮观霉素,其它的几种氨基糖苷类均为伯胺类,可以直接采用OPA衍生。如图2是采用次氯酸钠氧化与否的OPA衍生图谱比较。

2.2　前处理条件的选择

2.2.1　沉淀蛋白剂的选择

由于样品是乳制品,富含蛋白,前处理需要沉淀蛋白,减少干扰,参考文献[8]结合试验比较选择三氯乙酸、高氯酸、乙腈、甲醇的除蛋白效果,最后选择10%三氯乙酸作为样品提取和蛋白沉淀剂。

2.2.2　净化模式的选择

目前有关氨基糖苷类药物残留检测的净化方式主要采用固相萃取的方法,有采用加入离子对试剂的反相C_{18}固相萃取小柱净化,有采用极性CN柱净化,有采用离子交换柱净化[2,9],本实验比较几种离子对C_{18}小柱和离子交换小柱的净化效果,最终选择MCX小柱,MCX柱采用反相和离子交换双保留机理,可以用100%有机溶剂淋洗,去除杂质效果更好。由于氨基糖苷药物在酸性为强阳离子,在离子柱上保留很强,单纯采用盐缓冲溶液难以将其完全洗脱,故采用氨水甲醇作为洗脱溶液,洗脱液呈强碱性,使吸附在柱上的氨基糖苷类药物离子形态发

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

生变化,从而被洗脱。

2.3 方法的适应性研究

2.3.1 方法的检测限,线性范围

通过稀释标准母液进样,9种氨基糖苷类药物:壮观霉素、链霉素、双氢链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、阿泊拉霉素、托普霉素、萘替米星、新霉素在0.04-10μg/mL浓度范围内线性良好,以信噪比S/N=10计算,最低定量浓度分别为:0.04、0.1、0.1、0.05、0.05、0.05、0.1、0.05、0.2μg/mL,以称样量5g,最终样液体积1mL计算,定量限分别为:0.008、0.02、0.02、0.01、0.01、0.01、0.02、0.01、0.04 mg/kg。

2.3.2 添加回收率和精密度

在鲜牛奶、配方奶粉、酸奶、乳饮料空白样品中做0.04、0.08、0.12mg/kg 3个水平6平行添加回收实验,以回收率计算准确度,相对标准偏差RSD计算方法的精密度。结果见表1。图3、4分别为配方奶粉的样品空白和添加回收图谱。

表1 添加回收试验(N=6)

	添加平均回收率及精密度(mg/kg)											
	牛奶			配方奶粉			酸奶			乳饮料		
	0.04	0.08	0.12	0.04	0.08	0.12	0.04	0.08	0.12	0.04	0.08	0.12
壮观霉素	82.1±7.6	79.8±6.1	86.2±3.4	69.8±8.7	82.1±3.8	89.1±2.1	70.2±10.1	87.2±6.7	92.1±2.8	81.2±9.1	82.8±6.4	83.9±2.9
双氢链霉素	79.2±6.2	80.1±5.2	89.9±3.2	92.1±4.2	80.1±5.1	96.5±3.5	88.4±8.7	86.8±5.4	96.3±2.1	90.1±8.7	89.7±3.8	94.7±2.8
链霉素	79.0±6.4	80.1±5.2	89.9±3.2	92.1±4.2	80.1±5.1	96.5±1.5	88.4±8.7	86.8±5.4	96.3±2.1	90.1±8.7	89.7±3.8	94.7±3.8
丁胺卡那	85.1±6.2	93.4±3.2	101.1±4.5	89.9±4.8	87.5±4.3	94.6±1.2	86.7±5.4	96.1±2.7	98.1±3.9	86.5±5.4	89.7±8.1	110.2±7.6
卡那霉素	83.5±6.4	87.5±2.1	93.7±2.0	90.1±6.7	97.1±2.4	95.1±2.2	92.8±3.7	92.1±2.8	98.1±1.9	90.1±4.6	94.5±4.3	94.0±2.1
阿泊拉霉素	84.1±5.2	87.4±2.1	103.2±3.8	79.9±3.9	88.6±2.8	84.2±3.0	77.9±4.3	92.3±4.3	94.4±3.4	87.9±4.3	96.5±3.8	92.2±1.9
托普霉素	82.6±5.8	87.6±8.9	89.9±3.1	88.2±3.1	94.3±1.7	90.1±1.8	86.4±3.2	80.8±2.3	93.2±5.9	93.1±4.2	87.8±5.1	87.9±3.4
萘替米星	80.8±4.3	90.7±4.8	90.4±2.1	90.1±2.9	90.5±2.2	86.2±3.2	83.7±6.7	87.1±5.4	90.7±2.1	88.6±3.8	92.1±3.4	93.1±1.9
新霉素	78.6±8.9	82.8±6.2	86.7±7.9	77.9±4.2.	88.3±1.9	91.0±3.1	80.5±6.8	86.4±3.4	90.7±1.7	83.1±6.9	90.6±4.5	90.6±5.1

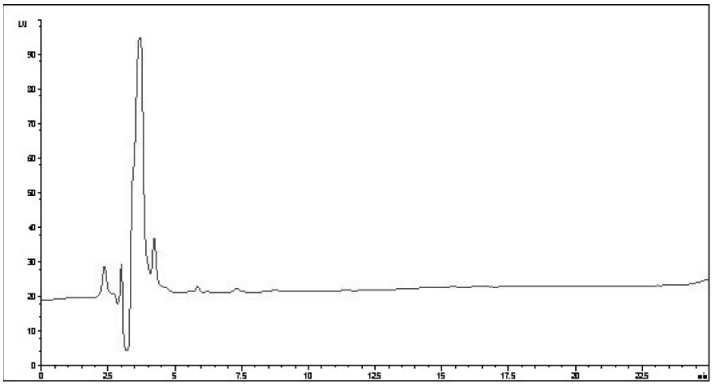

图3 配方奶粉的样品空白基体图谱

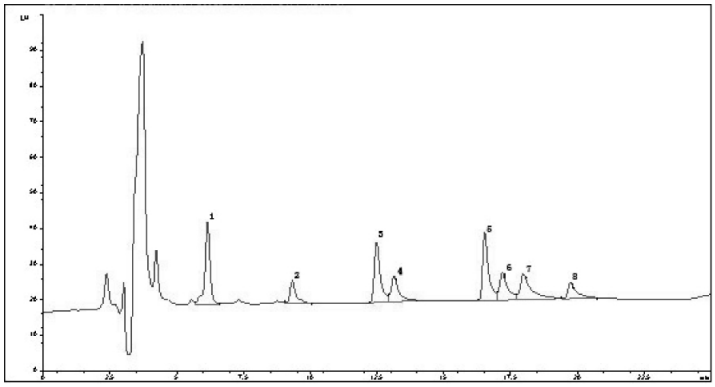

图4 配方奶粉添加图谱(0.04 mg/kg水平)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 结 论

本文建立了乳制品中的9种氨基糖苷类药物残留的高效液相柱后衍生荧光检测方法,采用次氯酸钠氧化可同时检测伯胺类和仲胺类氨基糖苷类药物。该方法的定量限在0.008-0.04mg/kg,添加回收率为69.8%-110.2%,方法的精密度为1.2%-10.1%,目前国内外氨基糖苷类在动物源性食品的最高残留限量(MRL)在0.1-0.5mg/kg,因此该方法符合氨基糖苷残留限量要求,可用于常规实验室的监控检测。

参考文献

[1] Sherri B T, Austin R L. 动物源性食品中药物残留分析方法[M].天津:天津科技翻译出版公司,1998:259-261.

[2] David A S. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides[J].Journal of Chromatography B,2000, 747:69-93.

[3] Clarot I, Chaimbault P, Hasdenteufel F. Determination of gentamicin sulfate and related compounds by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Chromatography A, 2004,1031: 281-287.

[4] Yaqi C, Yue C, Jun C. Comparative study on the analytical performance of three waveforms for the determination of several aminoglycoside antibiotics with high performance liquid chromatography using amperometric detection [J].Journal of Chromatography A,2005,1085:124-130.

[5] GB/T 21323-2007, 动物组织中氨基糖苷类药物残留量的测定-高效液相色谱-质谱质谱法[S].北京:中国标准出版社, 2007.

[6] 姜莉, 赵守成. 柱后衍生一荧光检测高效液相色谱法快速测定鲜牛奶中链霉素残留量 [J]. 分子科学学报,2005, 21(1):20-24.

[7] Rex E H, John R W. Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ion-exchange high-performance liquid chromatography with post-olumn derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical onization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A,1998, 812: 123-133.

[8] 孙毓庆. 现代色谱法及其在中药中的应用[M].北京:人民卫生出版社,1998:488-489.

[9] Andrzej P, Jan Z, Jolanta N. Sample preparation for residue determination of gentamicin and neomycin by liquid chromatography [J]. Journal of Chromatography A,2001,914:59-66.

参考文献编排规则

引用参考文献需按照引文先后在文中标出序号,并与文后参考文献序号一致,用[1],[2]…标注,正文中未标注序号的文献列于标注序号文献之后。参考文献一律置于文末。格式:

期 刊 [序号]作者. 文题[J]. 刊名,年,卷(期):起止页码.

专 著 [序号]章节作者. 书名[M]. 版次. 出版地:出版者,出版年:起止页码.

标 准 [序号]标准代号,标准名称[S]. 出版地:出版者,出版年

论 文 集 [序号]作者. 引文文题. 主编. 论文集名[C]. 出版地:出版者,出版年:起止页码.

电子文献 [序号]主要责任者.电子文献题名[文献类型/载体类型:EB/OL].电子文献的出版或可获得地址,发表或更新日期/引用日期(任选).

(参见GB/T 7714-2005 《文后参考文献著录规则》)

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net