

用柱后衍生荧光测定法检测食品中 土霉素和四环素残留

任一平¹,徐 威²,黄百芬¹

(1. 浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310009;2. 浙江大学医学院附属第一医院 浙江 杭州 310003)

摘 要:应用高效液相色谱(HPLC)对动物性食品中土霉素(OTC)和四环素(TC)进行测定,样品经含乙二胺四乙酸二钠的丁二酸钠缓冲液除蛋白后,由 SPE-C₁₈小柱提纯净化,经 ODS-C₁₈柱分离后,用 8% 氧氯化锆溶液柱后衍生,与锆离子的螯合物在激发波长(Ex):406 nm 和发射波长(Em):515 nm 处检测。实验优化了锆试剂的浓度和柱后衍生的条件,提高了检出的灵敏度,土霉素和四环素的回收率分别为 89.59% 和 92.59%,变异系数(CV)分别为 4.98% 和 6.74%。土霉素和四环素的最低检出浓度(信噪比 5:1)分别为 3 μg/L 和 5 μg/L,线性范围为 0.01~10 μg/L,土霉素和四环素的相关系数分别为 0.9999 和 1.0000。

关键词:高效液相色谱(HPLC);四环素;土霉素;锆螯合;荧光检测

中图分类号:O658

文献标识号:B

文章编号:1671-8798(2003)S0-0050-04

随着我国畜牧业和渔业的发展,四环素族抗生素作为一种革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌都敏感的广谱抗生素,得到了越来越广泛的应用,尤其是四环素(TC)和土霉素(OTC)等。自中国加入 WTO 后,国外对我国的食品出口实行“绿色壁垒”,例如欧盟从 2002 年 3 月 15 日起,因为抗生素超标而全面禁止进口中国的动物性食品;以及人民生活水平的不断提高,动物性食品中的抗生素残留对人体健康造成危害的问题,已受到国家更进一步的重视和群众密切的关注。为了控制四环素族抗生素在动物性食品中的残留,美国 FDA 规定四环素,土霉素在牛奶中的残留限量分别小于 80 μg/L 和 30 μg/L^[1];国际卫生组织和欧盟规定在牛奶中的最大残留限量为 100 μg/L^[2];我国在无公害畜禽肉安全要求中也作了明确的规定,肉类食品最高限量为 100 μg/kg^[3]。

对于出口食品中四环素和土霉素残留量检测的国家标准方法仍采用微生物法^[4],其周期长,灵敏度低,在实际工作中较难推广。其他方法有 TLC 法,LC-MS 法和 LC-UV 法等^[5,6]。我国常用方法的灵敏度还不到美国 FDA 的残留安全水平,并且 LC-UV 法(GB/T 14931.1-94)^[5]选择性明显低于荧光法,不适用于其他动物性食品中四环素和土霉素的残留分析。因此,在总结了国外有关资料的基础上^[6~9],利用 EDTA 和丁二酸钠缓冲液除蛋白,并应用 C₁₈小柱富集、净化;采用柱后衍生法使 TC 和 OTC 与锆离子螯合,其衍生物通过荧光检测,获得了较为满意的检测灵敏度。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Beckman 公司黄金 HPLC 系统,DIKMA ODS-3250×4.6 mm 色谱柱,RF-10AXL 荧光检测器和 RF540 荧

收稿日期:2003-10-10

作者简介:任一平(1952—),男,教授级高级工程师,山东人,主要从事食品、医药等分析监测方法的开发研究。

光扫描仪(岛津公司),氮气吹干器(美国 PIERCE 公司),Beckmam 高速离心机(美国 Beckmam 公司),PHS-3C 型精密 pH 计(上海雷磁仪器厂),超声波振荡器(上海超声波振荡器厂),抽滤装置(过滤器和真空泵),SPE-C₁₈小柱(河北省津杨滤材厂),微量进样枪及其他实验室常用仪器设备。

1.2 试剂

乙腈和甲醇(一级色谱纯)。草酸、氧氯化锆、乙二胺四乙酸二钠、丁二酸、氢氧化钠、盐酸(AR 级)。抗生素标准品:土霉素、盐酸四环素(中国药品生物制品检定所提供)。重蒸水及其他实验室常用试剂。

1.3 抗生素标准溶液的配制

1.3.1 抗生素标准储备液:土霉素和四环素:分别准确称取 0.0050 g(精确至 0.0001 g),用甲醇溶解,并定容至 5 mL,使成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液,置冰箱中保存,一周内使用。

1.3.2 抗生素标准工作液:准确吸取 100 μ L 标准储备液分别置于 10 mL 和 100 mL 容量瓶中,用流动相定容,使成 10 μ g/mL、1 μ g/mL 的溶液。准确吸取 1 mL 的 1 μ g/mL 标准工作液分别置于 10 mL 和 100 mL 的容量瓶中,再准确吸取 0.5 mL 的 1 μ g/mL 标准工作液置于 10 mL 的容量瓶中,用流动相定容,摇匀,使其浓度分别为 0.1, 0.05, 0.01 μ g/mL。由此而得一系列的标准溶液。使用前配制。

1.3.3 混合标准工作液:在需要时各吸取适量的土霉素和四环素标准工作液于 50 mL 的棕色容量瓶中,用流动相定容至刻度。使用前配制。

1.4 样品预处理

准确移取 10 mL 牛奶或称取 10 g 切碎的动物组织样品。将样品与 20 mL 乙二胺四乙酸二钠/丁二酸钠缓冲溶液均质 2 min,在超声波振荡器中振荡 3 min。在 10℃ 环境下,12000 r/min 离心 15 min,取上清液。向残渣中再加 10 mL 乙二胺四乙酸二钠/丁二酸钠缓冲溶液,重复上述操作,合并上清液。将上清液混匀,用 0.45 μ m 的滤膜过滤,取滤液 20 mL 备用。用 10 mL 甲醇(重复使用的小柱用甲醇,15% EDTA 溶液交替冲洗,然后用甲醇浸泡)、10 mL 15% EDTA 溶液、20 mL 蒸馏水使 SPE-C₁₈小柱活化。将滤液通过活化后的 SPE-C₁₈小柱(流速 2 mL/min),分次用 20 mL 蒸馏水洗去杂质,10 mL 甲醇洗脱。氮气吹干后,用流动相定容至 1 mL。定容后,将 1 mL 溶液 12000 r/min 离心 5 min,取 100 μ L 进样。

1.5 色谱条件

5 mmol/L 的草酸溶液(pH=2.5)与乙腈和甲醇按照 80:15:10 的比例混合后,经超声波振荡器振荡 5 分钟,备用;流动相流速:0.8 mL/min;进样量:100 μ L;柱温:室温;衍生剂浓度:8%;衍生剂流速:0.8 mL/min;衍生温度:室温;检测波长:激发波长(Ex):406 nm,发射波长(Em):515 nm。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择

2.1.1 检测波长的选择:根据有关资料^[7,8],最终所得的荧光检测波长为 Ex 406 nm/Em 515 nm。

2.1.2 流动相条件的选择:用 1 经实验摸索流动相最终选择的比例为草酸:乙腈:甲醇=80:15:10。

2.2 衍生条件的选择

本次检测选择了带“Y”形三通的 Beckmam 231 型螺旋式柱后衍生器,衍生剂浓度为 8% 的氧氯化锆溶液,衍生温度为室温 20℃~30℃。

2.3 样品预处理条件的摸索

2.3.1 蛋白沉淀剂的选择:本次检测选择了由 0.1 mol/L 丁二酸溶液,用氢氧化钠溶液调 pH 值至 4.0 的丁二酸钠缓冲溶液作为蛋白沉淀剂。

2.3.2 萃取柱的选择:经过萃取方法的改良,使 SPE-C₁₈柱的回收率得以明显提高。本实验最终选用 SPE-C₁₈柱。

2.4 方法学研究

2.4.1 最低检出浓度:将标准工作液按照一定比例稀释后测定,测得最低检出浓度为 5 ng/mL,完全能满足的含量测定。

2.4.2 定性和定量 ①定性 按 1.5 分离条件得分离图谱,土霉素与四环素的保留时间分别为 7.325 min,8.853 min。②定量 将所配制的一系列的标准溶液,结果表明:线性良好,相关系数分别为 0.999 9 和 1.000 0,且此方法对土霉素和四环素在一个较宽的浓度范围内($0.01 \mu\text{g/mL} - 10 \mu\text{g/mL}$)有良好的线性。

2.4.3 方法的精密度:一份牛奶样品取等量六组经平行处理,按照上述色谱条件,测定土霉素和四环素的含量,计算其变异系数分别为:4.98%和 6.74%。

2.4.4 方法的回收率:取三份等量牛奶样品,在样品中分别加入土霉素和四环素的标准品,量为样品含量的 1~2 倍,检测加标样品中土霉素和四环素的最终含量,计算回收率:土霉素为 89.59%,四环素为 92.59%。

2.5 实际样品的检测

经过多种牛奶,肉类等样品的检测,结果表明,该方法能够用于实际样品中土霉素和四环素的测定。见图 1~3:

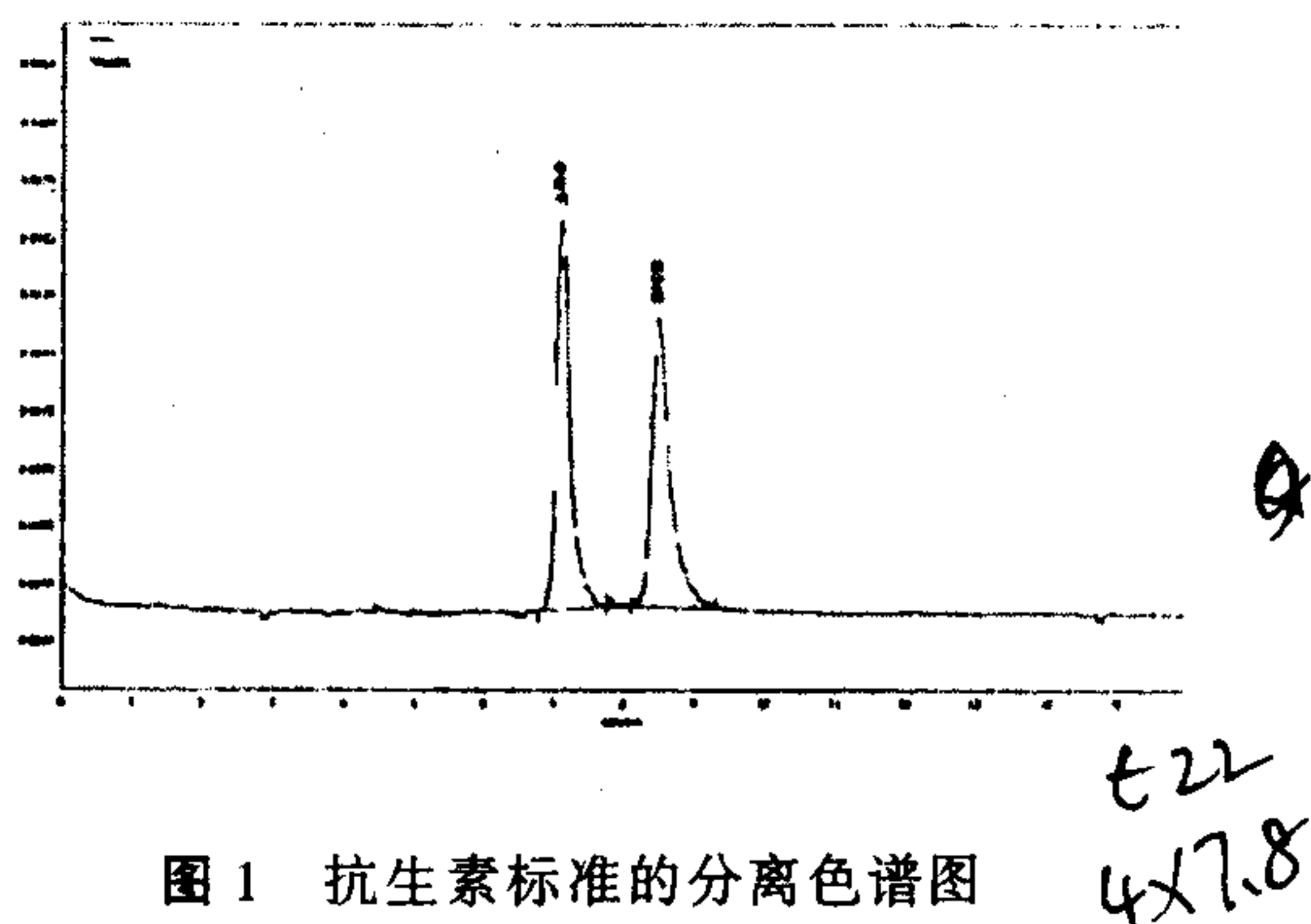


图 1 抗生素标准的分离色谱图

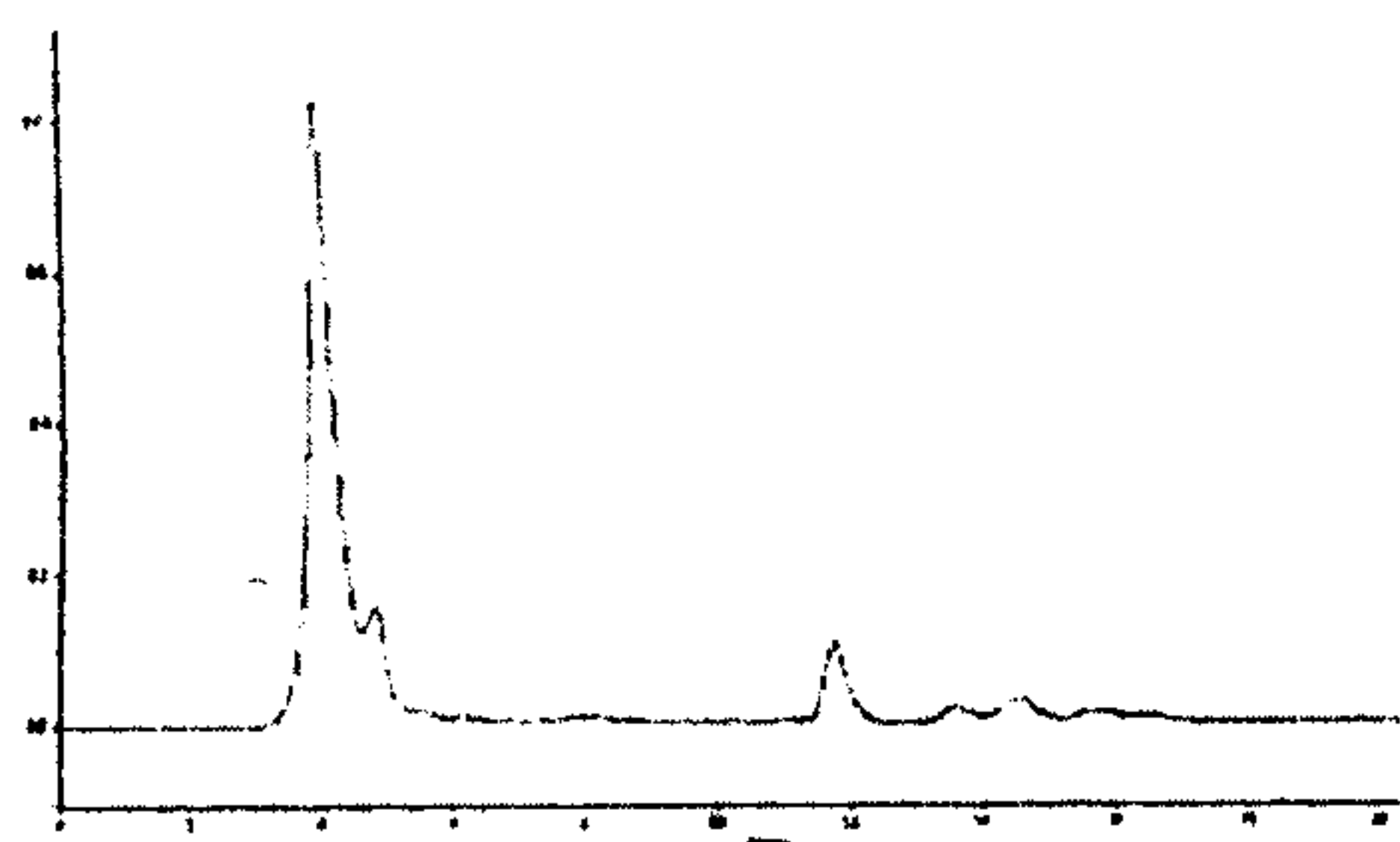


图 2 空白牛奶样品检测的色谱图

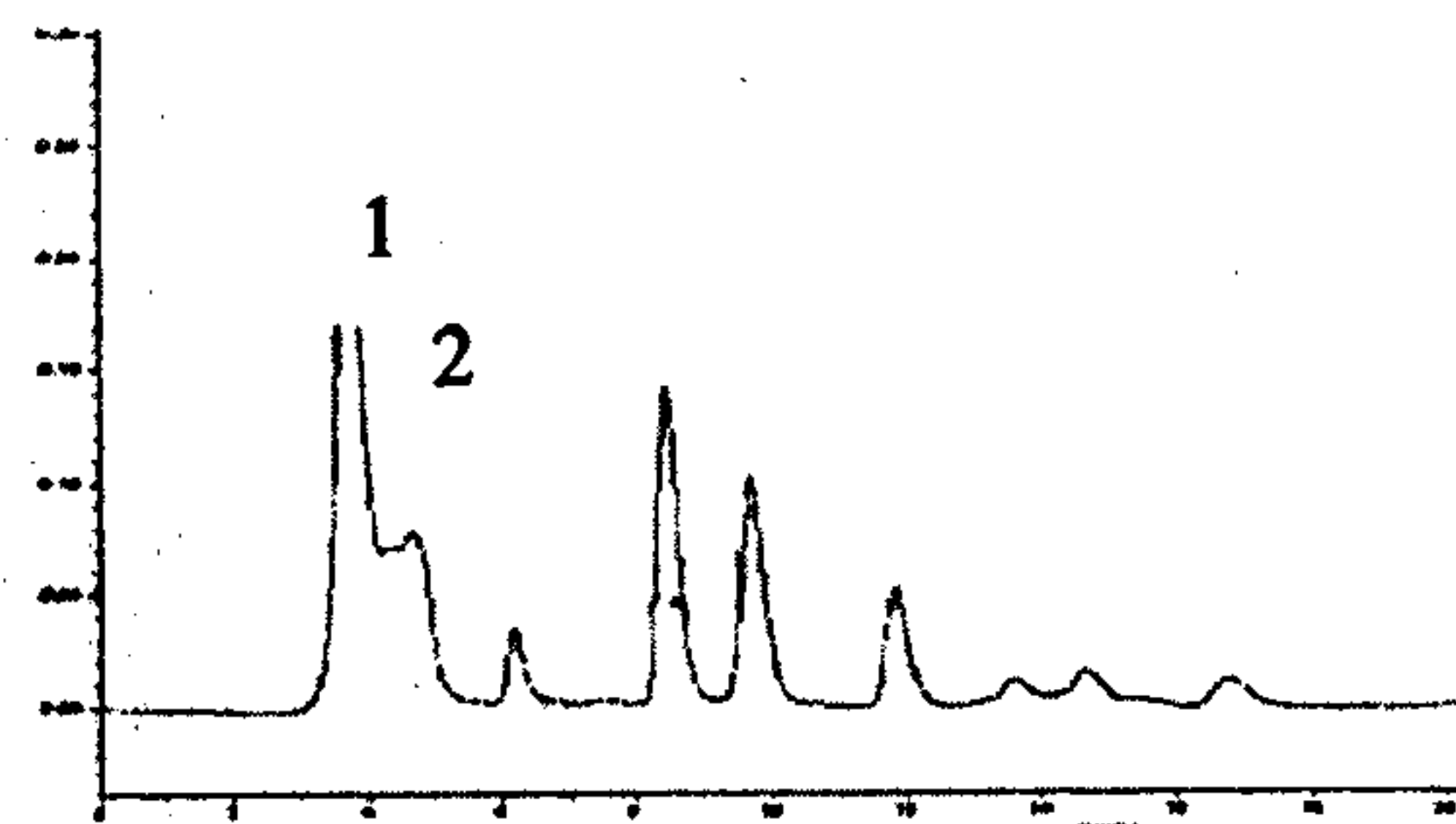


图 3 加标牛奶样品检测的色谱图 10 mL 加标牛奶样品,内含 $0.1 \mu\text{g/mL}$ 的土霉素和四环素(1. 土霉素;2. 四环素)

色谱条件:流动相:5 mmol/L 草酸($\text{pH} = 2.5$):乙腈:甲醇 = 80:15:10;色谱柱:inertsil 3u ODS— C_{18} 250 \times 4.6 mm;流速:流动相 0.8 mL/min 衍生剂 0.8 mL/min;衍生剂浓度:8% 氧氯化锆溶液;柱温:室温;荧光检测波长:Ex = 406 nm, Em = 515 nm。

3 结 论

本方法与 SN0179-92 相比,大大节省了时间,缩短了检验的周期。与 GB/T 14931.1-94 比较,减少了杂质的干扰,提高了检测的灵敏度。与 S.Croubels 等人的方法对比,降低了检测的成本,更容易被大家所接受。三种方法灵敏度的比较见表 1。

表 1 三种方法灵敏度的比较

方法灵敏度	单 位	TC 最低检出限	OTC 最低检出限
SN0179-92(微生物法)	mg/L	0.025	0.025
GB/T14931.1-94(LC-UV 法)	mg/kg	0.20	0.15
本方法	mg/L	0.005	0.003

参考文献:

- [1] Mary C, Carson, Maureen A. Ngoh, Stephen w. Hardley, J. Chromatogr. B, 1988, 712:113.
- [2] Naoto Furusawa, J. Chromatogr. A, 1999, 839:247.
- [3] GB 18406.3-2001. [S]
- [4] 中华人民共和国进出口商品检验局, SN0179-92.
- [5] 中华人民共和国卫生部, GB/T 14931.1-94.

- [6] Hisao Oka, Yuko Ito, Hiroshi Matsumoto. *J. Chromatogr. A*, 2000, 882:109.
- [7] Croubels S, Van peteghem C, Baeyens W, *Analyst* 1994, 119: 2713.
- [8] Croubels S, Baeyens W, Van Peteghem C. *Anal. chim. Acta* 1995, 303:11.
- [9] Croubels S, Vermeersch H, DeBacker P, *J. Chromatogr. B*, 1998, 708:145.
- [10] Frank J. Schenck, Patrick . Callery. *J. Chromatogr. A*, 1998, 812:99.
- [11] 刘文英主编. 药物分析(第四版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1999年.
- [12] 张孝松, 刘铁春, 王蕾等. 偕铝(Ⅲ)螯合物和高效液相色谱测定四环素类药物[J]. 中国科学技术大学学报, 2001, 31(2):213.
- [13] Zhu J Snow D D, Cassada D A, *et al.* *J. Chromatogr. A*, 2001, 928:177.

Oxytetracycline and tetracycline residue analysis in original foodstuffs of animal applying post – column derivative with fluorescent detection

REN Yi-ping¹, XU Wei², HUANG Bai-feng¹

(1. ZHEJIANG center for disease prevention and control, HangZhou, 310009, China

2. First Affiliated Hospital Zhejiang University Medical College, HangZhou 310003, China)

Abstract: High – performance Liquid Chromatography was applied to determine oxytetracycline(OTC) and tetracycline(TC) in original foodstuffs of animals. The sample was eluted by SPE – C₁₈ column and separated by ODS—C₁₈ column after protein was removed. Post – column derivative was done by 8% Zirconyl chloride octahydrate to get final sample to be determined the zirconium chelation at excitation bandwidth of 406 nm and emission bandwidth of 515 nm. The zirconium reagent concentration and post – column derivative of condition were optimized. The recovery rates of OTC and TC were 89.59% and 92.59%. The coefficient of variation (CV) was found to be 4.98% and 6.74% for OTC and TC, separately. The detection limits of the assay (signal – to – noise = 5:1) were 3 µg/L and 5 µg/L for OTC and TC, respectively. The fluorescence intensity was linear in a concentration range of 0.01 ~ 10 µg/L OTC or TC ($r_{(OTC)} = 0.9999$, $r_{(TC)} = 1.0000$).

Key words: High performance liquid chromatography (HPLC); oxytetracycline; tetracycline; Zirconium chelation; fluorescence detection

(上接第 63 页)

Report of monitoring for pesticide residues in vegetables for export at Ningbo district

KANG Ji-tao, YU Xue-jun, LI Zuoqing, XIE Dong-hua, LIANG Ming-min, WEI Si-jun

(Ningbo Administration for Entry – Exit Inspection and Quarantine, Ningbo 315012 China)

Abstract: The following data files represent the 298 samples over 20 kinds of vegetables for export at Ningbo district that were analyzed under the regulatory monitoring for pesticide residues. The monitoring results indicates that BHC and DDT meet the regulation of the standard, but the organic phosphorus pesticide residues were detected at the ratio of 3.2%; cypermethrin and fenvalerate, at the ratio of 2.6%.

Key words: Ningbo; vegetable; pesticide residues; monitoring