

高效液相 - 紫外法检测肉鸡组织中的阿奇霉素残留

徐广伟¹, 黄春贵², 王震¹, 颜文钦^{3,*}

(1. 金华市质量技术监督检测院, 浙江 金华 321000; 2. 金华白龙桥兽医站, 浙江 金华 321000;

3. 浙江师范大学教务处, 浙江 金华 321004)

摘要: 目的: 研究建立反相液相色谱法监控肉鸡组织阿奇霉素的残留。方法: 采用 C₁₈ 柱(4.6mm × 250mm, 5μm), 乙腈-异丙醇-0.002mol/L 磷酸氢二钠(60:15:25, V/V)为流动相, 紫外检测波长 210nm, 样品用氯仿-异丙醇(95:5, V/V)提取, 氮气流吹干, 加流动相溶解后进样。结果: 阿奇霉素在 0.05~5.0 μg/g 范围内与峰面积呈线性相关, $r > 0.990$; 血清中最低检测限为 0.02 μg/ml, 组织最低定量限为 0.05 μg/g, 血清回收率 > 83%, 组织回收率 > 77%, RSD < 5%。结论: 该方法快速、精确、重复性好, 符合肉鸡组织中阿奇霉素残留检测的要求。
关键词: 阿奇霉素; 肉鸡; 残留; HPLC-UV

Determination of Azithromycin Residues in Chicken Tissues by HPLC-UV Detection

XU Guang-wei¹, HUANG Chun-gui², WANG Zhen¹, YAN Wen-qin^{3,*}

(1. Jinhua Institute of Calibration and Testing for Quality and Technical Supervision, Jinhua 321000, China;

2. Bailongqiao Veterinary Station, Jinhua 321000, China;

3. Studies Affairs Office, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China)

Abstract: Objective: A highly sensitive and specific method for determination of azithromycin residues in chicken tissues by reverse-phase high-liquid chromatography was developed. Methods: Based on separation on a C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5μm) at 210 nm with the mobile phase of acetonitrile-Isopropylalcohol-0.002 mol/L phosphate (60:15:25, V/V), samples were extracted by using chloroform-Isopropylalcohol (95:5, V/V), dried by nitrogen flow, and injected after dissolution in the mobile phase. Results: A good linear relationship was obtained in the concentration range of 0.05 to 5.0 μg/g ($r > 0.990$). The limit of detection in serum was 0.02 μg/ml and the limit of quantification in tissue was 0.05 μg/g. The average recoveries were over 83% in serum and over 77% in tissues, respectively, and both the intra-day and inter-day relative standard deviations were less than 5%. Conclusion: The method is quick and accurate, has good repeatability, and accords with the requirement for determining residues of azithromycin in chicken tissues.

Key words: azithromycin; chicken; residue; HPLC-UV detection

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)10-0195-04

阿奇霉素(azithromycin)为 15 元氮环内酯类抗生素, 化学结构是在红霉素 A 酯环的 9 α 位内插一个氮原子^[1], 彻底解决了红霉素因酸缩酮化形成 8,9-脱水红霉素-6,9-半缩酮的致命缺点。阿奇霉素对大多数耐红霉素杆菌有良好的抗菌效果^[2], 代谢物无活性, 但存在细菌耐药性^[3-4]、残留时间长、蓄积毒性大^[5]等潜在问题。农业部在 2005 年底将其列入禁用兽药名单, 目前仍未能有效控制阿奇霉素在畜禽上的违禁添加使用。因此, 有必要

建立动物性可食组织中阿奇霉素残留的检测方法。目前国外对猫^[6]、狗^[7]、马^[8-9]、羊^[10-11]、兔子^[12]、大马哈鱼^[13]、鲑^[14]等动物体内阿奇霉素残留的定量分析展开了研究, 但家禽组织中阿奇霉素的残留检测方法在国内还未见报道。本实验拟建立高效液相-紫外法(HPLC-UV)测定肉鸡组织中阿奇霉素的残留, 为保证肉制品安全提供一种快捷、灵敏、可靠、准确的检测依据, 确保动物性食品安全。

收稿日期: 2008-07-16

作者简介: 徐广伟(1964-), 男, 工程师, 本科, 研究方向为食品质量安全。E-mail: xgw@jhzjy.com

* 通讯作者: 颜文钦(1974-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为动物性食品安全。E-mail: ywq@zjnu.cn

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

阿奇霉素标准品(946 IU/mg) 中国药品生物制品检定所;阿奇霉素对照品 浙江省金华市奥奇生物化学有限公司;所用试剂除乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水外,其余均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

600E 高效液相色谱仪(包括 Waretts1525 泵、Waters 2487 紫外检测器、Breeze System 色谱分析软件) 美国 Waters 公司;超纯水器、旋涡混合器、离心机、匀浆机、超声波清洗器、恒温水浴锅等。

1.3 色谱条件

色谱柱 C₁₈ 柱(4.6mm × 250mm, 5 μm);流动相:乙腈-异丙醇-0.002mol/L 磷酸氢二钠(60:25:15, V/V);流速 1.2ml/min;柱温为室温;紫外检测波长 210nm;进样量 20 μl。

1.4 动物处理

本地鸡场 55 日龄体重 1.05 ± 0.03kg 的麻花肉鸡,雌雄各半,买入后单笼饲养,自由饮水,采样 7d 前饲喂不含任何抗菌药物的自配料(参照美国 NRC 营养标准),每天 3 次,每天更换饮用水。

采样时将鸡侧卧固定,分离左侧翅膀下静脉,采静脉血 5ml 于离心管中,待血液凝固后,分离(4000r/min)出血清;宰杀后迅速取胸肌(10g)、肝脏、肾脏、脾脏组织,滤纸吸净脏器表面血液并剔除筋膜,迅速生理盐水漂洗,放入 -20℃ 冰箱保存至测定。

1.5 标准曲线的制备

1.5.1 血清标准曲线的制备

精确称取阿奇霉素标准品 10mg 置于 100ml 量瓶中,用甲醇溶解定容,得到含阿奇霉素 100 μg/ml 的储备液,4℃ 保存备用。实验时将储备液用甲醇稀释至所需浓度,即得阿奇霉素工作液。

取 10 支具塞离心管分别加入空白血清 0.4ml,并加入不同浓度的阿奇霉素标准工作液 0.1ml,得血清中阿奇霉素浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.2、0.8、1.0、2.5、5 μg/ml 的系列标准血清样品,涡旋振荡 2min,加入 0.2mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.5) 0.1ml, 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 100 μl,涡旋振荡 2min,加含 5% 异丙醇的氯仿 4ml,涡旋振荡萃取 10min, 4500r/min 离心 10min,精密吸取有机层,45℃ 水浴氮气流吹干,加流动相 100 μl 涡旋 2min,用 0.45 μm 滤膜过滤,取 20 μl 进样分析,以阿奇霉素的峰面积对阿奇霉素浓度作标准曲线。

1.5.2 组织标准曲线的制备

精确称取 2.0g 解冻的空白组织样品,剪碎后加入匀浆介质 4g 磷酸盐缓冲液(pH7.5), 10000r/min 匀浆 10min,

制成空白匀浆组织液;准确称取 1.5g 匀浆液(相当于 0.5g 组织)于 10ml 离心管中,加入阿奇霉素工作液适量,后续操作与血清样品处理方法相同。

1.6 组织回收率测定

取空白的血清和组织样品,加入阿奇霉素工作液配制成 0.10、0.80、2.50 μg/ml(μg/g)三个水平的血清、肝脏、肾脏、肌肉、脾脏样品,按标准曲线制备方法处理后进样测定,同时将对三个水平的阿奇霉素用流动相溶解作反相 HPLC 分析,每一样品均重复 8 次,按峰面积的比值求得药物浓度。

$$\text{组织回收率} = \frac{\text{药物浓度}}{\text{工作液配制的浓度}}$$

1.7 稳定性实验

按 1.6 方法制得 0.10、0.80、2.50 μg/ml(μg/g)三个水平的阿奇霉素浓度,日内作 8 个重复,日间作 5 个重复,按标准曲线制备的方法,测得实际浓度,求出每个质量浓度的批内和批间变异系数(RSD)。

2 结果与分析

2.1 色谱行为

在本实验选定的优化色谱条件下,阿奇霉素保留时间在 2.520~2.592min 之间,添加标准品的样品色谱峰峰形较佳,为基线分离峰;空白组织样品在上述保留时间附近无干扰峰出现,药物峰与溶剂峰分离良好,见图 1、2(以血清为例)。

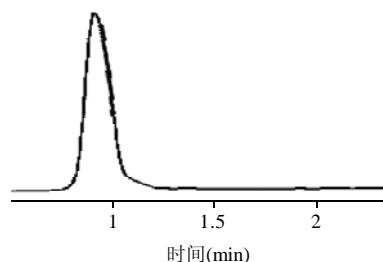


图1 空白血清 HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of blank serum

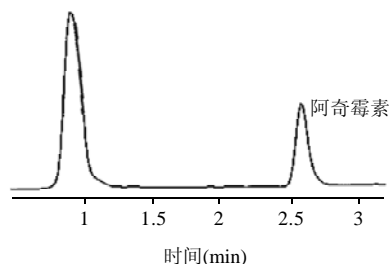


图2 阿奇霉素血清标准品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of standard azithromycin added to serum

2.2 标准曲线与最低检测限

不同组织中的阿奇霉素工作液在选定的色谱条件下用反相 HPLC 测定, 当标准品浓度在 $0.02 \mu\text{g/ml}$ 时, 血清样品在 2.562 min 出现一小峰, 可作为最低检测限 (LOD)。当药物浓度在 $0.05 \sim 5.00 \mu\text{g/ml}$ 范围内时, 色谱峰面积(S)与各组织中阿奇霉素浓度(C)呈良好的线性关系, 得到各组织标准曲线的线性回归方程和相关系数, 分别为血清: $S = 5.30 \times 10^3 + 0.92 \times 10^3 C$, $r = 0.991$; 肝脏: $S = 4.04 \times 10^3 + 1.14 \times 10^3 C$, $r = 0.998$; 肌肉: $S = 3.56 \times 10^3 + 0.882 \times 10^3 C$, $r = 0.990$; 肾脏: $S = 3.92 \times 10^3 + 0.95 \times 10^3 C$, $r = 0.992$; 脾脏: $S = 3.91 \times 10^3 + 1.04 \times 10^3 C$, $r = 0.991$; 阿奇霉素的最低定量限 (LOQ) 为 $0.05 \mu\text{g/ml}$ 。

2.3 回收率

在选定的反相 HPLC 测定条件下, 鸡血清及组织的相对回收率见表 1。由表 1 可知, 在 0.10 、 0.80 、 $2.50 \mu\text{g/ml}$ 添加水平时, 血清回收率最高, 其次为肝脏、脾脏、肾脏和肌肉。

表 1 肉鸡组织中阿奇霉素的回收率($n = 8$) (%)

Table 1 Recoveries of azithromycin in chicken serum and tissues ($n = 8$) (%)

组织	药物浓度($\mu\text{g/ml}$ 或 $\mu\text{g/g}$)		
	0.10	0.80	2.50
血清	83.20 ± 2.80	85.24 ± 2.71	88.19 ± 1.86
肌肉	77.48 ± 2.02	79.19 ± 2.19	81.23 ± 2.17
肝脏	81.33 ± 3.02	83.12 ± 2.60	85.34 ± 2.28
肾脏	79.39 ± 2.83	81.75 ± 2.69	84.51 ± 2.53
脾脏	80.08 ± 3.14	82.15 ± 3.06	85.22 ± 2.15

2.4 稳定性实验结果

日内和日间的变异系数(RSD)见表 2。由表 2 可知, 各组织的日间变异系数都大于日内的变异系数; 此外随着药物浓度的增加, 各组织的变异系数普遍存在逐渐变小的趋势, 表明稳定性与药物浓度存在正相关关系。

表 2 肉鸡组织中阿奇霉素的日内和日间变异系数(%)

Table 2 Intra-day and inter-day RSDs for determination of azithromycin in chicken serum and tissues (%)

药物浓度 (g/ml 或 $\mu\text{g/g}$)	血清		肌肉		肝脏		肾脏		脾脏	
	日内	日间	日内	日间	日内	日间	日内	日间	日内	日间
0.10	3.37	3.90	2.61	2.92	3.71	4.04	3.56	4.45	3.92	4.51
0.80	3.18	3.51	2.77	2.93	3.13	3.36	3.29	3.35	3.72	3.82
2.50	2.11	3.00	2.67	2.76	2.67	2.82	2.99	3.01	2.52	3.25

3 讨 论

动物性可食组织中阿奇霉素定量检测大多采用经典的微生物效价法^[8,10-13], 但存在重复性差、检测限高、操作繁杂等缺点; 进而国外有学者采用高效液相 - 电化

学法(HPLC-EC)^[9]、高效液相 - 质谱法(HPLC-MS)^[14]来提高精密度, 但所用仪器和检测环境要求较高, 一般实验室难以满足, 而无法在食品监管检测部门普及应用。阿奇霉素为大环内酯类抗生素, 结构中无共轭体系, 紫外吸收较弱, 但在 210 nm 处有较强吸收, 适合用反相 HPLC 来分析。本研究结果表明, 反相 HPLC 法测得的阿奇霉素最低定量限比国外文献^{[11]~[13]}报道的微生物法要低一些 ($0.074 \mu\text{g/ml}$), 明显低于国内制定的其他大环内酯类在可食组织中的最高残留量(MRLS)^[15]。而阿奇霉素在安全性上优于红霉素和罗红霉素^[16], 因此可确定阿奇霉素在可食组织中的停药期可参照红霉素和罗红霉素^[17]的最高残留量 $0.10 \mu\text{g/g}$ 。

在分析实际样品时, 若药物浓度超出 $0.05 \sim 5.0 \mu\text{g/g}$ ($\mu\text{g/ml}$) 范围, 可以用流动相将样品稀释至 $0.05 \sim 5.0 \mu\text{g/g}$ 之间。实验中还发现血清在 $20 \mu\text{g/L}$ 时出现了峰值, 虽与随后的浓度并不存在线性相关, 但在实际抽检中仍可作为阿奇霉素的最低检测限来判断是否在动物上违禁添加阿奇霉素。采用本法测定血清中阿奇霉素回收率在 83% 以上, 组织中阿奇霉素回收率在 77% 以上, 日内日间变异系数均小于 5%, 完全符合食品卫生监管部门对动物性食品中阿奇霉素残留的检测。

总之, 本实验建立的方法操作简便、易行, 定量限为 $0.05 \mu\text{g/g}$, 血清检测限为 $0.02 \mu\text{g/ml}$, 且检测数据重复性好, 回收率较高, 精密度和准确度均能满足残留分析的要求。由于饲养动物体内阿奇霉素的定量测定方法仅限于国外, 而国内还无这方面的报道, 因此本法为今后国内开展畜禽体内阿奇霉素的药代动力学研究提供了可参考的检测方法。

参考文献:

- [1] HUNTER R P, KOCH D E, COKE R L, et al. Azithromycin metabolite identification in plasma, bile, and tissues of the ball python (*Python regius*) [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2003, 26(2): 117-121.
- [2] 宋凤江. 阿奇霉素的药动力学特点及临床应用[J]. 中国医药卫生, 2005, 6(8): 92-93.
- [3] LARKIN C, VAN DONKERSGOED C, MAHDI A, et al. Antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario[J]. J Food Prot, 2006, 69(1): 22-26.
- [4] SÁENZ Y, ZARAZAGA M, LANTERO M, et al. Antibiotic resistance in campylobacter strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997-1998[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(2): 267-271.
- [5] 李梦云, 彭西, 李英伦, 等. 鸡阿奇霉素中毒的病理学和血液生物化学研究[J]. 中国家禽, 2005, 9(1): 166-169.
- [6] HUNTER R P, LYNCH M J, ERICSON J F, et al. Pharmacokinetics, oral bioavailability and tissue distribution of azithromycin in cats[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1995, 18(1): 38-46.
- [7] GIRARD A E, GIRARD D, ENGLISH A R, et al. Pharmacokinetic and

- in vivo studies with azithromycin (CP-62,993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1987, 31(12): 1948-1954.
- [8] JACKS S, GIGUERE S, GRONWALL P R, et al. Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals[J]. Am J Vet Res, 2001, 62(12): 1870-1875.
- [9] LDAVIS J, GARDNER S Y, LJONES S, et al. Pharmacokinetics of azithromycin in foals after i.v. and oral dose and disposition into phagocytes[J]. Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics, 2002, 25(2): 99-104.
- [10] CÁRCELES C M, FONT A, ESCUDERO E, et al. Pharmacokinetics of azithromycin after i.v. and i.m. administration to sheep[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2005, 28(5): 475-479.
- [11] CÁRCELES C M, FONT A, ESPUNY A, et al. Pharmacokinetics of azithromycin after intravenous and intramuscular administration to goats [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2005, 28(1): 51-55.
- [12] ESCUDERO E, FERNANDEZ-VARON E, MARIN P, et al. Pharmacokinetics and tissue tolerance of azithromycin after intramuscular administration to rabbits[J]. Res Vet Sci, 2006, 81(3): 366-372.
- [13] FAIRGRIEVE W T, MASADA C L, MCAULEY W C, et al. Accumulation and clearance of orally administered erythromycin and its derivative, azithromycin, in juvenile fall Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*[J]. Dis Aquat Organ, 2005, 64(2): 99-106.
- [14] COKE R L, HUNTER R P, ISAZA R, et al. Pharmacokinetics and tissue concentrations of azithromycin in ball pythons (*Python regius*) [J]. American Journal of Veterinary Research, 2003, 64: 225-228.
- [15] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告(235) [EB/OL]. [2003-02-19]. http://www.ivdc.gov.cn/yzsycc/cliiky/200302/t20030219_19631.htm
- [16] PIERO P. Adverse effect of macrolide antibacterials [J]. Drug Safety, 1998, 19(5): 340-345
- [17] LIM J H, PARK B K, YUN H I. Determination of roxithromycin by liquid chromatography/mass spectrometry after multiple-dose oral administration in broilers [J]. Journal of Veterinary Science, 2003, 4(1): 35-39.