

固相萃取-高效液相色谱法同时 测定牛奶中的多种四环素残留

秦燕, 陈毓芳, 林峰, 张美金

(广州出入境检验检疫局食品实验室, 广东 广州 510623)

摘要: 目的: 建立牛奶中四环素族抗生素残留的高效液相色谱法。方法: 样品 5g 经 20ml EDTA-McIlvain 缓冲液提取, 离心后取 5ml 上清液于预平衡的 Sep-Pak Waters™ Sep-Pak® C₁₈ 固相萃取柱净化, 用 10mmol/L 的草酸甲醇溶液洗脱, 并于 40℃ 用 N₂ 浓缩仪吹干, 流动相 0.5ml 溶解残渣进行 HPLC 分析。结果: 标准校准曲线在 0.05~1.0mg/L 的范围内, 相关系数 $r > 0.99$ 。牛奶中土霉素、四环素-金霉素和强力霉素的定量检测限(LOQ)依次是 0.025、0.025、0.05、和 0.05mg/L; 添加水平分别为 0.1、0.1、0.2 和 0.2mg/L 时, 样品加标回收率为 84%~110%, RSD < 10%。结论: 方法简便可行、净化效果好、检测灵敏度、准确度及精密度均满足检测要求。

关键词: 牛奶; 多四环素残留; 固相萃取; 高效液相色谱法

Application of SPE-HPLC for Simultaneous Determination of Multi-tetracyclines Residues in Milk

QIN Yan, CHEN Yu-fang, LIN Feng, ZHANG Mei-jin

(Food Laboratory of Guangzhou Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective: To establish a SPE-HPLC method for the simultaneous determination of multi-tetracyclines(TCs) residues in milk. Method: The TCs in 5g milk sample was extracted with 20ml EDTA-McIlvain buffer, then after centrifugation, the 5ml supernatant liquid was loaded on an preconditioned SPE Sep-Pak® C₁₈ cartridge. The TCs was eluted with 3ml 10mmol/L oxalic acid methanol following the rinse clean-up. Then eluant was evaporated with N₂ to dryness at 40℃, and the residues was redissolved with 0.5ml HPLC flow phase and detected with HPLC method. Results: The calibration curve was linear in the range 0.05-1.0mg/L and $r > 0.99$. The limit of quantification (LOQ) was 0.025, 0.025, 0.05 and 0.05mg/L respectively for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline residues in milk, and at the corresponding spike level 0.1, 0.1, 0.2 and 0.2mg/L respectively. The recovery rates were 84%~110% and RSD < 10%. Conclusion: The method was applicable for the detection of TCs residues in milk. The clean-up effect, sensitivity, accuracy and prevision have all met the analysis requirement.

Key words: milk; multi-tetracyclines residues; SPE; HPLC

中图分类号: 657.72

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)03-0202-03

四环素族(tetracyclines, TCs)抗生素广泛作为畜牧业中饲料的药物添加剂, 用于防治动物肠道感染和促生长。在奶牛养殖业中由于 TCs 的滥用和不遵从停药期规定, 其可在肝肾组织富积并随乳汁分泌而排泄, 并随食物链流入人体, 其最明显的残留毒性是诱导耐药菌株的产生。许多国家对 TCs 在牛奶中的残留实施监控。本文采用固相萃取(solid phase extraction, SPE)净化样品, 对牛奶中的四环素(tetracycline, TC)、土霉素(oxytetracycline, OTC)、金霉素(chlortetracycline, CTC)和强力霉素(doxycycline)进行了 HPLC 测定。

1 材料与方法

1.1 标准品 盐酸四环素(纯度 97.1%)、盐酸土霉素(纯度 96.2%)、盐酸金霉素(纯度 84.4%)购自 Riedel-de haen 公司; 强力霉素购自中国药检所。

1.2 主要试剂 含 EDTA 的 McIlvain 缓冲液: 一水柠檬酸 12.9g, Na₂HPO₄ · H₂O 27.46g, 37.2g EDTA 钠盐, 去离子水定容到 1L (调 pH 至 4.0); NaH₂PO₄: 分析纯; 甲醇、乙腈 色谱纯; Waters™ Sep-Pak® C₁₈ SPE 柱(3ml)。

1.3 主要仪器 Waters 高效液相色谱仪: 515 泵, 717 自

收稿日期: 2004-05-31

作者简介: 秦燕(1975-), 女, 博士, 研究方向为生物化学和分析化学。

动进样器, Waters TCM 柱温箱, 2487 紫外检测器, Millenium³² 软件数据系统; ZYMARK 水浴氮气吹干仪; 12 通道半自动固相萃取仪; MilliQ 纯水发生器 (Bedford 公司, USA)等。

1.4 标准贮备液的配制 分别准确称取一定量的标准品固体, 用甲醇溶解定容配制成 100 μg/ml 的贮备液 (-20℃ 避光保存)。

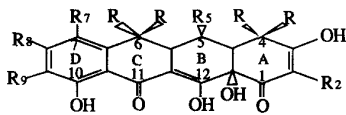
1.5 样品前处理 称取 5.0g 牛奶, 加入 20ml 提取缓冲液(pH4.0), 旋涡混匀后水浴超声 5min, 10min/4000g/15℃ 离心后, 取 5ml 上清液注入已预先用甲醇、水和提取液各 3ml 活化的 C₁₈SPE 小柱, 然后依次用 3ml 水和 3ml 20%(V/V)的甲醇水溶液淋洗, 真空吹干后用 10mmol/L 的草酸甲醇溶液 3ml 洗脱, 收集洗脱液于 40℃ 用 N₂ 浓缩仪吹干, 用 0.5ml HPLC 流动相溶解残渣进行色谱分析。

1.6 液相色谱条件 色谱柱: Discovery C₁₈ 柱, 250mm × 4.6mm(i.d.); 流动相: 乙腈 - pH2.5 的 0.01mol/L NaH₂PO₄ 溶液(体积比 23:77); 流速 1.0ml/min; 紫外检测器: λ = 360nm; 柱温 35℃; 进样量 20 μl。

2 结果与讨论

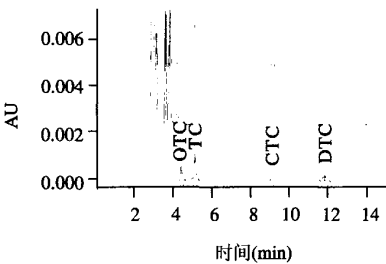
2.1 TCs 的 HPLC 分离 4 种 TCs 的结构见图 1 和表 1^[1]。因母环侧链基团的不同和空间效应, 4 种 TCs 在反相十八烷基硅烷键合相的保留和洗脱行为差异较大, OTC 与 TC 极性较强, 而 CTC 和 DOXY 极性相对较弱。为避免 TCs 与金属离子螯合并进一步发生次级保留, 采用磷酸缓冲盐作为流动相主体, 实验表明 pH 在 2.0~2.5 间较为合适, 过低或过高会导致出峰抑制或峰形拖尾。极性溶剂与水相构成流动相时, 23%(φ)乙腈或 20%(φ)甲醇分别与缓冲液组成的混合溶剂极性参数 P' 相同^[2], 但由于“溶剂诱导选择性的变化”, 前者在容量因子 k' < 5 内能实现 4 种 TCs 的基线分离, R_f 稳定, 见图 2 标准溶液分离谱图(S/N=5)。校正曲线显示, 在 0.05~1.0mg/L 的范围内, 线性相关良好, 见表 1。

2.2 样品提取与净化 TCs 属高极性的弱酸弱碱化合物, 用 1.2 的提取缓冲溶液可防止 TCs 与金属离子结合, 使牛奶中的 TCs 具有高的稳定性和满意的提取效率, 但不适宜用液 - 液分配来净化除去杂质峰尤其是极性杂质对



R₂:CONH₂; R₄:N(CH₃)₂; R₆: CH₃; R₁, R₃ and R₉:H

图 1 四环素族化合物的一般结构
Fig.1 The basic structure of TCs compound



由下至上, 依次是标准、含 TC 的阳性样本和样本加标溶液。

图 2 牛奶中 TCs 的 HPLC 色谱图
Fig.2 Chromatogram of TCs assay in milk

OTC 和 TC 的干扰^[3]。实验表明不同的烷基键合相填料的保留性能存在差异^[4,5], 如同样采用 45%(φ) 甲醇水溶液淋洗, Waters C₁₈ SPE 柱中的 OTC 开始被少量洗脱, 而 RIDAC₁₈ 柱的 TCs 仍保留在柱上, 这与填料碳和游离硅醇基的含量有关。为保证回收率, 依次用水和 20%(φ) 甲醇水溶液淋洗, 酸化的 100% 甲醇溶液洗脱。

由图 2 中一基质背景较“脏”的含 TC 的阳性牛奶样品及其对应加标的色谱图可知, 经上述净化后可实现杂质与目标物的基本分离。

2.3 方法检测限和添加回收试验 按照 2.3 条件, 将标准稀释进样, 以 5 倍信噪比确定 OTC、TC、CTC 和 DOXY 的定量检测限(LOQ)为 0.050、0.050、0.10、和 0.10mg/L。经前处理浓缩后, 牛奶中 4 种 TCs 的定量检测限(LOQ)依次是 0.025、0.025、0.05、和 0.05mg/L。满足最大残留限量 0.1 mg/L 的检测要求。表 2 是不同添加浓度的回收实验。

3 结论

关于各种生物基质中 TCs 的残留已经有若干相关报道^[6], 但仍缺乏快速可行的检测方法, 能够同时兼顾检测灵敏度 and 回收率, 满足欧盟等国的药物残留检测方法

表 1 4 种四环素药物的结构和校准曲线方程
Table 1 The various side chain and calibration equation of 4 TCs

化合物	R ₅	R ₆ β	R ₇	校准曲线方程	相关系数
				X: 浓度 mg/L; Y: 峰面积 μV · s	
OTC	H	OH	H	Y=1.74e+004X+1.09e+003	0.9985
TC	OH	OH	H	Y=2.05e+004X+2.73e+003	0.9982
CTC	H	OH	Cl	Y=9.52e+003X-8.71e+000	0.9986
DOXY	OH	H	H	Y=6.98e+003X+5.75e+002	0.9987

表 2 牛奶中 TCs 的添加回收率
Table 2 Recovery rates of TCs in spiked milk

添加浓度 (mg/L)	化合物回收率(%, n=4)				变异系数 (%)
	OTC	TC	CTC	DOXY	
2LOQ	87.0~92.3	81.2~87.4	75.7~111.9	87.6~101.2	4.7~15.2
4LOQ	92.1~103.7	88.7~92.2	84.2~108.8	85.0~107.4	2.3~9.2
8LOQ	93.3~105.5	94.2~98.7	88.1~100.2	94.4~99.0	3.6~6.0

蔬菜中高毒有机磷农药多残留的检测方法研究

陈浩¹, 柳训才¹, 李胜清¹, 陈智东²

(华中农业大学理学院, 湖北 武汉 430070; 湖北省农科院测试中心, 湖北 武汉 430064)

摘要: 采用 J & WDB-1701 型毛细管色谱柱及 FPD 检测器, 建立了同时测定蔬菜中高毒有机磷农药甲胺磷、甲拌磷、氧乐果、毒死蜱、甲基对硫磷、对硫磷残留量的气相色谱法, 测定 6 种有机磷农药残留量的线性范围均为 0.05~5.00mg/L, 相关系数为 0.99868~0.99952, 检出限为 0.0184~0.0396mg/L, 加标回收率为 74.4%~98.7%, 相对标准偏差为 4.72%~2.17%。

关键词: 固相萃取 - 气相色谱; 有机磷农药; 蔬菜; 测定

Method for Multiresidue Determination of High Acute Toxicity Organophosphorous Pesticides in Vegetables

CHEN Hao¹, LIU Xun-cai¹, LI Sheng-qing¹, CHEN Zhi-dong²

(1.College of Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.Testing Center, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan 430064, China)

Abstract: A method which combined solid phase extraction (SPE) and gas chromatography for multi-residue determination of organophosphorous pesticides in vegetables was discussed in this paper. Methamidophos, phoyate, omethate, chlorpyrifos, parathion-methyl and parathion were selected as the analytic targets representing toxic organophosphorous pesticides. Satisfactory results could be obtained as the recoveries were greater than 80%, the entire analytic time was no longer than 1h, and the detection limit ranged from 0.0184 mg/L to 0.0396mg/L. The method discussed could be applied for quick and accurate determination of organophosphorous pesticides in vegetables.

Key words: organophosphorous pesticides; multi-residue determination; SPE-GC; vegetables

收稿日期: 2004-09-06

作者简介: 陈浩(1963-), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为现代农业分析、食品安全分析和药物分析。

要求。上述对牛奶中 TCs 残留的检测方法净化效果稳定、重现性好、2 倍定量检测下限添加浓度的回收率在 75% 以上, 且满精密度足要求。

参考文献:

- [1] Hisao O, Yoko I, Hiroshi M. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods[J]. J of Chromatography A, 2000, 882:109-133.
- [2] 于世林, 高效液相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001. 85-87.
- [3] Diana S A, Randall G, Pankaj K, Application of ELISA in

determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes[J]. Analyst, 2003, 128: 658-662.

- [4] Rogstad A. Optimal SPE-HPLC determination for oxytetracycline residues in fish tissue[J]. J Liquid Chromatography, 1988(11): 2337-2347.
- [5] Maria T, Pantelis R, Panayiotis P, et al. Determination of oxytetracycline in the live fish feed Artemia using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. J of Chromatography B, 1995, 663: 167-171.
- [6] 张素霞, 李俊锁, 钱传范. 牛奶中四环素多残留分析方法研究-MSPD-HPLC-UV[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(1): 51-54.