

牛奶中四环素类药物多残留分析方法研究 ——MSPD-HPLC-UV

张素霞, 李俊锁, 钱传范

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 本文建立了牛奶中四环素类药物的 MSPD-HPLC-UV 分析法。将 C₁₈-EDTA-Na₂、草酸和样品研磨混合, 制成半固态装柱、淋洗、反相 HPLC 测定。在 0.10~0.50 μg/ml 添加浓度范围内, 4 种四环素类药物的平均回收率为 78.7%~90.2%, 变异系数在 2.4%~18.8% 之间, 方法检测限为 0.02 μg/ml~0.05 μg/ml。

关键词: 牛奶; 四环素类药物; 基质固相分散 (MSPD); 高效液相色谱 (HPLC)

中图分类号: S859.84 文献标识码: A 文章编号: 0366-6964(2002)01-0051-04

近十几年来, 四环素类药物被广泛用作饲料添加剂来预防动物疾病和提高饲料利用率。用药动物食品中药物的残留会对消费者的健康造成威胁, 并且长期用药会产生耐药菌株。在许多国家食品中四环素类药物残留都是重要的监控对象。

已报道四环素类药物残留的分析方法有微生物学方法^[1]、薄层色谱法^[2]、毛细管区域电泳法^[3]和高效液相色谱^[4-11]等。高效液相色谱法是四环素类药物残留的主要分析方法, 但需要一系列繁琐的样品提取和净化步骤。四环素类药物稳定性差, 对样品处理方法要求严格。

Long 等^[4,8] (1989) 首次提出了基质固相分散净化技术, MSPD 集样品匀化、提取和净化过程于一体, 操作简单。本试验以 MSPD 和 HPLC 为基础建立了一种牛奶中 4 种四环素类药物的多残留快速分析法。

1 试验材料

1.1 标准品 四环素类药物购自 Sigma 公司: 土霉素 (OTC) 90%, 四环素 (TC) 92.4%, 金霉素 (CTC) 84%, 强力霉素 (DMC) 84%。

1.2 主要试剂 C₁₈ 填料 (40μm, 美国 Alltech 公司), 甲醇和乙腈 (色谱纯, 天津四友生物技术开发公司), 正己烷 (分析纯, 北京化工厂), 乙酸乙酯 (色谱纯, 天津四友生物技术开发公司), 依地酸二钠盐 (EDTA-Na₂) (分析纯, 北京市红星化工厂), 草酸

(分析纯, 北京市红星化工厂), 乙二醇 (分析纯, 上海试剂三厂), 重蒸水 (全玻璃仪器重蒸)。

1.3 主要仪器 高效液相色谱仪 (SP8810 泵, SP8450UV-Vis 检测器, SP4270 积分仪, Spectra-Physics, Inc., USA), 旋转蒸发仪 (X2-6, 北京科龙仪器厂), 涡动混合器 (MVS-1, 北京北德科学器材有限公司), 离心机 (LD4-2A, 北京医用离心机厂), 电子天平 (d=0.01 mg, Sartorius 公司), 真空泵 (2XZ-0.5, 浙江黄岩求精真空泵厂), 磁力搅拌器 (79HW-1, 浙江乐成电器厂)

1.4 HPLC 条件 色谱柱: C₁₈, 5 μm, 250 × 4.6 mm id (Supelco, USA), 流动相: 甲醇-乙腈-0.01 mol/L 草酸 (2+3+5), 流速: 1.0 ml/min, 检测波长: 365 nm, AUFS: 0.05, 进样体积: 20 ul。

2 试验方法

2.1 C₁₈填料的预处理

称取 22 g C₁₈ 填料, 装入 50 ml 玻璃注射器, 分别用两个柱体积的正己烷、二氯甲烷和甲醇依次洗涤, 真空干燥, 贮于磨口玻璃容器内, 备用。

2.2 标准贮备液的配制

分别准确称取一定量的各种药物, 用甲醇溶解配制成 100 μg/ml 的贮备液 (-20℃ 下避光存放)。

2.3 标准曲线的绘制

用流动相将 4 种四环素类药物贮备液稀释, 配制成系列浓度工作液: 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.50 和 1.0 μg/ml。按上述色谱操作条件用 HPLC 测定, 绘制出 4 种四环素类药物的标准曲线。

2.4 添加回收试验

收稿日期: 2000-06-12

作者简介: 张素霞 (1964-), 汉, 吉林市人, 博士, 副教授, 从事兽药残留分析。

2.4.1 样本前处理: 称取 2 g C_{18} 填料置于玻璃研钵中, 分别加入 0.05 g EDTA- Na_2 和草酸, 将 0.5 ml 牛奶样品加至 C_{18} 填料上, 用玻璃杵轻轻研磨 30s, 使样品与填料均匀混合; 取 5 ml 玻璃注射器, 下端垫一片滤纸, 加无水硫酸钠至 0.2 ml 体积, 将样品装入, 上垫一片滤纸, 压至体积为 4.2 ml; 8 ml 正己烷洗涤, 真空抽干后用乙酸乙酯-乙腈(1+3)洗脱药物于鸡心瓶中, 加 0.1 ml 乙二醇, 用旋转蒸发器除去溶剂(50℃); 残留物用 0.4 ml 流动相溶解(涡动混合 15 s), 转至玻璃离心管中, 2 000 g 离心 10 min, 取上清液进样测定。

2.4.2 添加回收率的测定: 称 2g C_{18} 填料置于玻璃研钵中, 分别加入 0.05 g EDTA- Na_2 和草酸, 再量取 0.5 ml 牛奶样品加到研钵中的 C_{18} 填料上, 分别向样品中添加 5~25 μ l 标准液, 放置平衡数分钟后, 用玻璃杵轻轻研磨 30 s, 使均匀混合, 经上述方法净化后, HPLC 测定。计算四环素类药物的回收率。

3 试验结果

3.1 标准曲线 在 0.05~1.0 μ g/ml 浓度范围内色谱峰高与浓度呈线性关系, 其回归方程和相关系数(r^2)见表 1。四环素类药物的高效液相色谱图见图。

3.2 添加回收率 试验结果见表 2, 在 0.1, 0.2 和 0.5 μ g/ml 的添加浓度上, 牛奶样品中四环素类药物平均回收率为 83.2% \pm 7.58%, 检测限为 0.02~0.05 μ g/ml。

4 讨论

4.1 色谱条件的选择 根据文献资料的报道, 测定四环素类药物的反相 HPLC 流动相体系主要为草酸-乙腈/甲醇。Long 等^[4]采用草酸-乙腈流动相对奶中 3 种四环素类药物进行了有效分离。草酸能与金属离子螯合, 有效的消除金属离子对四环素类药物分析的干扰。在现有色谱柱条件下, 本试验采用草酸溶液-乙腈流动相对 HPLC 色谱条件进行了摸索, 结果对 4 种四环素类药物不能有效分离。改变流动相中乙腈和草酸比例, 分离效果无明显提高, 但加入甲醇后, 药物的出峰位置发生改变。通过多次试验确定了甲醇-乙腈-0.01 mol/L 草酸(20+30+50)为流动相, 4 种四环素类药物得到了较好的分离效果, 在 10 min 之内即全部流出。4 种四环素类药物的高效液相色谱图见图 1。

4.2 样品处理 土霉素、四环素、金霉素和强力霉素在一定的 pH 和温度条件下稳定性有差异, 在水溶液中的降解特性不同。另外, 四环素类药物易与无机离子结合, 从而使生物基质的分离更加困难。通过向提取液中加入 EDTA 可以克服这个问题。

表 1 四环素类药物的标准曲线
Table 1 Calibration curves of tetracyclines

药物 Drug	回归方程 Equation of regression	相关系数 r^2
土霉素 OTC	$y = 5.679x + 0.152$	0.992
四环素 TC	$y = 3.579x + 0.114$	0.991
金霉素 CTC	$y = 1.650x + 0.075$	0.984
强力霉素 DMC	$y = 1.464x + 0.020$	0.997

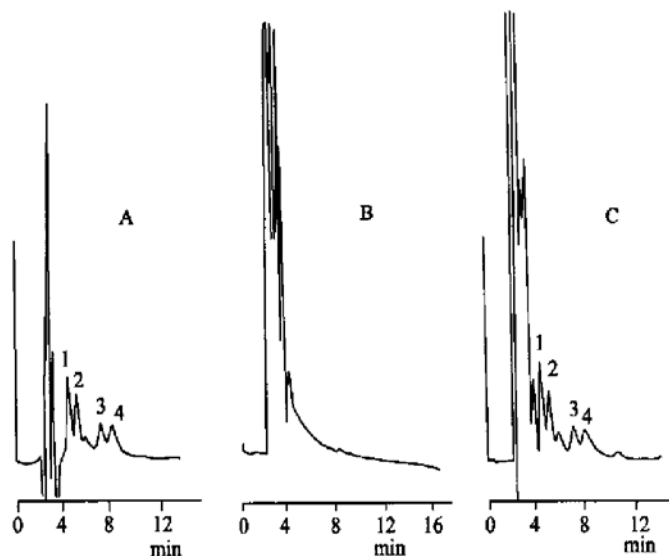


图 四环素类药物的高效液相色谱图(A)标准溶液, (B)空白样品, (C)标准添加样品(0.2 μ g/ml), (1)土霉素, (2)四环素, (3)金霉素, (4)强力霉素

Fig. Chromatograms of tetracyclines: (A) working solution, (B) blank milk, (C) tetracyclines added to milk. (0.2 μ g/ml). (1) OTC, (2) TC, (3) CTC, (4) DMC.

表 2 牛奶中四环素类药物的添加回收率
Table 2 Recoveries of tetracyclines added to milk

药物 Drug	添加浓度 Added (ug/ ml)	检测浓度 Determined(ug/ ml)	回收率 Recovery(%)	变异系数 C. V(%)
土霉素 OTC	0.1	0.09 ±0.01	93.8	12.2
	0.2	0.19 ±0.01	96.7	4.6
	0.5	0.40 ±0.01	80.0	3.3
四环素 TC	0.1	0.08 ±0.01	80.7	11.3
	0.2	0.19 ±0.04	98.9	18.8
	0.5	0.37 ±0.01	74.7	2.4
金霉素 CTC	0.1	0.08 ±0.005	79.0	6.5
	0.2	0.16 ±0.01	80.5	4.6
	0.5	0.39 ±0.02	77.5	4.9
强力霉素 DMC	0.1	0.08 ±0.004	80.8	5.5
	0.2	0.15 ±0.02	75.0	11.1
	0.5	0.40 ±0.02	80.4	5.8

* $\bar{x} \pm SD, n=3$

EDTA 与无机离子螯合从而释放出四环素类药物。还可以加入一些酸化剂如: 盐酸、磷酸和柠檬酸等调节 pH 以改善四环素类药物的提取效果。因此, 经典的四环素类药物提取方法费时费力, 繁琐的步骤和化学处理使测定结果的重现性不好。

MSPD 方法净化奶样品中四环素类药物, 采用基质改性剂 EDTA 和草酸获得了较好的效果。不加改性剂时试验条件下难以洗脱四环素类药物, 而加入 EDTA 和草酸可以明显提高四环素类药物的回收率。采用等比例的 EDTA 和草酸回收率最高。EDTA 的作用是螯合无机离子以便从基质中释放出药物。草酸既能螯合无机离子还能降低样品的 pH (3.0), 从而提高四环素类药物的洗脱效率。

通过试验还确定了最佳的溶剂洗脱程序和比例, 当加入改性剂的 C₁₈/ 奶基质混合物用 100% 的乙酸乙酯提取时, 回收率只有 50%, 用 100% 乙腈洗脱时回收率较高, 但提取液需要进一步处理后才能进 HPLC 测定。对乙酸乙酯和乙腈的比例进行试验, 表明乙腈比例加大可以提高回收率, 选择乙酸乙酯和乙腈比例为 1: 3, 这时干扰杂质少, 易蒸发, 回收率也能满足分析要求。

本方法所用样品量小, 洗涤和洗脱溶剂分别只用 8 ml, 而且不需要将四环素类药物转化成脱水形式的加热步骤。大大简化了分离步骤, 缩短了分析时间。本试验在浓缩前加入 0.1 ml 乙二醇做保持剂, 可以减少吸附, 回收率有明显提高。

4.3 添加回收率的测定 从表 2 中可以看出, 本试验在添加 0.10, 0.20, 0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度下, 牛奶样品中四环素类药物平均回收率分别为土霉素, 90.2%; 四环素, 84.8%; 金霉素, 79.0%; 强力霉素, 78.7%; 变异系数范围为 2.4% ~ 18.8%。结果表明, 该残留检测方法可靠, 重现性好, 精密度和准确度均能达到残留分析的要求。另外, 应用本试验建立的检测方法, 测定牛奶样品中 4 种四环素类药物的最低检测限均达到 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。试验结果表明, 采用基质改性的 MSPD 法分离四环素药物, 简化了分析步骤, 提高了样品分析效率, 适宜于四环素类药物多残留快速分析。

参考文献:

- [1] Korsrud G O, Boison J O, Nouws J D, et al. Bacterial inhibition tests used to screen for antimicrobial veterinary drug residues in slaughtered animals [J]. J AOAC Int, 1998, 81(1): 21~ 24.
- [2] Hisao O, Yoshitomo I, Junko H. Improvement of chemical analysis of antibiotics. Part X I X: Determination of tetracycline antibiotics in milk by liquid chromatography and thirLayer chromatography/fast atom bombardment mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 1994, 77(4): 891~ 895.
- [3] Chao L C, Xuelin G. Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum, and urine by capillary electrophoresis [J]. J AOAC Int, 1995, 78(6): 1369~ 1377.
- [4] Austin R L, Lily C H, Malbrough, et al. Matrix Solid-

- Phase dispersion (MSPD) Isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk [J]. *AOAC Int*, 1990, 73(3): 379~ 384.
- [5] Ashworth R B. Liquid chromatographic assay of tetracyclines in tissues of food-producing animals [J]. *AOAC Int*, 1985, 68(5): 1013~ 1018.
- [6] Tyczkowska K, Aronson A L. Simultaneous liquid chromatographic determination of some tetracyclines in serum [J]. *J AOAC Int*, 1986, 69(5): 760~ 762.
- [7] Okra H, Ikai Y, Kawamura J, et al. Photodecomposition products of tetracycline in aqueous solution [J]. *J Agric Food Chem*, 1989, 37(1): 226~ 231.
- [8] Long A R, Hsien L C, Malbrough M S, et al. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxytetracycline in catfish muscle tissue [J]. *J AOAC Int*, 1990, 73(6): 864~ 867.
- [9] Jeffery R M, Guy R S, William H G. Liquid Chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish [J]. *J AOAC Int*, 1998, 81(4): 702~ 708.
- [10] White C R, Moats W A, Kotula K L. Optimization of a liquid Chromatographic method for determination of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in milk [J]. *J AOAC Int*, 1993, 76(3): 549~ 554.
- [11] Carson M C, Breslyn W. Simultaneous determination of multiple tetracycline residues in milk by metal chelate affinity chromatography: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 1996, 79(1): 29.

MSPD Clean-up and HPLC Determination of Tetracyclines in Milk

ZHANG Su-xia, LI Jur-Suo, QIAN Chuan-fan

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The MSPD-HPLC-UV method for simultaneous isolation and detection of four tetracyclines residues in milk was developed. The matrix modified agents in the MSPD isolation method was also studied. Blank and tetracycline fortified milk samples were blended with C₁₈ containing 0.05 g each of oxalic acid and disodium ethylenediaminetetraacetic. A column made from the C₁₈/milk matrix was first washed with hexane. Tetracyclines were eluted with ethyl acetate acetonitrile and detected by HPLC at 365 nm. The average recovery of four tetracyclines was 78.7%~ 90.2%. The CV ranged from 2.4%~ 18.8%. The detection limit was 0.02~ 0.05 mg/kg.

Key words: Tetracyclines; Milk; Matrix solid-phase dispersion (MSPD); High performance liquid chromatography (HPLC)