

亚临界水萃取-HPLC法测定动物源食品中土霉素、四环素和氯霉素残留量^Δ

徐万帮*, 胡音, 洪建文, 杨立伟(广东省食品药品检验所, 广州 510180)

中图分类号 R978.1*3;R978.1*4 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2356-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.19

摘要 目的:建立一种快速、简单、灵敏的动物源食品中土霉素、四环素和氯霉素残留量的测定方法。方法:采用亚临界水(饱和硼砂水溶液)萃取-高效液相色谱法。优化萃取条件:色谱柱为ZORBAX SB-C₁₈,流动相为0.01 mol/L磷酸氢二钠+0.001 mol/L乙二胺四乙酸二钠(pH 2.5)-乙腈(75:25, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为270 nm,柱温为30 ℃。检测6种动物源样品(鸡肉、猪肉、牛肉、鱼、猪内脏、鸡内脏)共56份中的土霉素、四环素和氯霉素残留量。结果:萃取最优条件是取5 ml用盐酸调节pH至2.0的饱和硼砂水溶液为萃取剂,在100 ℃萃取5 min;此条件下土霉素、四环素和氯霉素的萃取回收率分别为104.8%、99.7%、92.1%(n=3)。方法学考察中土霉素、四环素、氯霉素的检测限分别为3.6、5.0、2.0 ng/ml,回收率分别为99.8%、100.5%、97.6%(RSD分别为0.3%、0.3%、0.5%)。共检出8份样品呈阳性。结论:建立的方法萃取时间短、准确、可靠、灵敏度高,分析效率较高。

关键词 亚临界水萃取;高效液相色谱法;土霉素;四环素;氯霉素;动物源食品;残留量

Detection of Residual Oxytetracycline, Tetracycline and Chloramphenicol in Animal Foodstuff by Subcritical Water Extraction-HPLC

XU Wan-bang, HU Yin, HONG Jian-wen, YANG Li-wei(Guangdong Institute for Food and Drug Control, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a rapid, simple and sensitive method for the determination of residual oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC) and chloramphenicol (CPA) in animal foodstuff. METHODS: Subcritical water (saturated borax solution) extraction-HPLC method was adopted. The extracting condition was optimized; ZORBAX SB-C₁₈ column was adopted, with 0.01 mol/L sodium dihydrogen phosphate+0.001 mol/L EDTA (pH 2.5)-acetonitrile (75:25, V/V) as mobile phase and flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength of 270 nm, column temperature of 30 ℃. The residual contents of OTC, TC and CPA in 56 samples from 6 kinds of animal samples (chicken, pork, beef, fish, haslet and chicken offal) were all determined. RESULTS: Optimal extraction condition was as follows: pH of 5 ml saturated borax solution adjusted to 2.0 using hydrochloric acid as extracting agent, extracting for 5 min at 100 ℃; the recovery rates of TC, OTC and CAP were 104.8%, 99.7%, 92.1% respectively (n=3). In methodology study, the limits of detection of TC, OTC and CAP were 3.6 ng/ml, 5.0 ng/ml and 2.0 ng/ml, and recovery rates were 99.8% (RSD=0.3%), 100.5% (RSD=0.3%) and 97.6% (RSD=0.5%). 8 samples were positive in the study. CONCLUSIONS: The method is accurate, reliable and sensitive with short extraction time and high analysis efficiency.

KEY WORDS Subcritical water extraction; HPLC; Oxytetracycline; Tetracycline; Chloramphenicol; Animal foodstuff; Residual

抗生素的滥用将导致环境中细菌等产生耐药性,而目前对人体获得耐药菌引致的感染治疗比较困难。四环素作为一种广谱杀菌剂已被广泛应用于动物疾病的治疗和药物添加剂中,由于部分厂家和农场对抗生素类药物的不合理使用与滥用等,以及其他原因,导致动物性食品中药物残留问题不断出现。根据国家相关标准与法律法规^[1-2],动物源食品中抗生素残留必须控制在适当的范围内。国家卫生和计划生育委员会、质检系统及广东药检系统已经在动物源食品中发现多起非法添加土霉素、四环素和氯霉素的阳性样品实例。

对于食品样品中目标分析物的萃取,建立避免使用有毒有机溶剂、省时、简便的萃取技术已受到广大分析工作者的关注。近年来,采用亚临界水萃取技术对食品中目标分析物的

萃取研究已有较多文献报道^[3]。Sara等^[4]采用基质固相分散技术结合亚临界萃取技术,控制萃取温度,实现了萃取牛肉、鱼肉、牛奶和鸡蛋中的磺胺类药物残留,以及牛奶和酸奶中的大环内酯类药物和林可霉素等抗生素残留^[5-6]。

本文以市售动物源食品为研究对象,采用亚临界水萃取其中的土霉素、四环素和氯霉素等多种抗生素,简单过滤后直接于高效液相色谱(HPLC)仪进样,通过对萃取及检测条件的优化研究,建立了一种可同时萃取动物源食品中多种残留抗生素,且简单、快速的分析方法。

1 材料

1200 HPLC仪(含配套高压泵与自动进样器)、二极管阵列检测器(DAD)、6890型顶空加热器(美国Agilent公司);CP225D万分之一电子天平(德国Satorius公司);TU-1900紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。

土霉素对照品(批号:130454-200604,纯度:98.6%)、氯霉素对照品(批号:130450-200705,纯度:99.6%)、四环素对照品

Δ 基金项目:广东省食品药品监督管理局系统课题资助项目(No.ZA20101518)

* 主管药师,博士。研究方向:药品质量标准化。电话:020-81886161。E-mail:wbxu@163.com

(批号:130451-200302,纯度:84.9%)均来源于中国食品药品检定研究院;乙醇为色谱纯;磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、盐酸、硼砂、硝酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA)等其他试剂均为分析纯;试验所用水为去离子水;所有动物源食品样品均购自农贸市场,其中鸡肉、猪肉、牛肉、鱼、猪内脏分别收集了10份,鸡内脏收集了6份。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的配制

精密称取土霉素、四环素和氯霉素对照品适量分别置于10 ml量瓶中,加流动相稀释,配制成1 mg/ml的对照品溶液。分别精密量取上述对照品溶液1 ml至10 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀备用。

采用逐步稀释的方法,用流动相配制3种成分质量浓度均为2、10、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ 的系列对照品溶液。

2.2 样品前处理

采用亚临界水萃取法对动物源食品中3种抗生素进行萃取,并优化了萃取条件:称取约1.0 g经绞碎的样品置于10 ml顶空瓶中,加入水溶液,压紧管塞,振荡混匀后放入顶空加热器中加热萃取;萃取结束后将顶空瓶取出并冷却,将上清液经0.45 μm 醋酸纤维微孔滤膜过滤即得。

2.3 检测波长的选择

分别取“2.1”项下3种成分对照品溶液,于紫外-可见分光光度计上扫描。结果,土霉素、四环素分别在270、356 nm波长处有1个吸收峰,而氯霉素在279 nm波长处有最大吸收峰。分别选择270、279、356 nm为检测波长,在色谱仪上测试上述混合对照品溶液,结果,在270 nm波长下3种成分的色谱峰分离较好且测定的灵敏度明显高于其他2个波长,同时还发现在此波长条件下的溶剂峰对上述混合溶液的测定无影响,故选择检测波长为270 nm。

2.4 流动相的选择

为了有利于色谱峰的分离,选用0.01 mol/L磷酸二氢钠溶液与乙腈的混合液为流动相。分别对两者体积比为80:20、75:25、70:30、65:35进行试验。由所得色谱图及测定数据可知,随着流动相中有机相比例的增加,3种成分测定的灵敏度升高,保留时间逐步减少,但色谱峰分离变差。权衡分离度和保留时间,本试验最终选用0.01 mol/L磷酸二氢钠-乙腈(75:25)为流动相。在实际的样品测定中发现,对于部分样品测定过程中RSD值偏大。这是因为四环素类抗生素分子中含有酚羟基和烯醇基,易与二价金属离子结合,因而造成重现性差,但流动相中加入适量EDTA可以改善这种现象。因此,本试验中流动相中加入适量EDTA,浓度为0.001 mol/L。优化流动相后3种成分的分离度和灵敏度均有所提高。

2.5 色谱条件

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(ZORBAX SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.01 mol/L磷酸二氢钠+0.001 mol/L EDTA(用30%的硝酸调节pH为2.5并经0.45 μm 水系滤膜过滤)-乙腈(75:25, V/V),流速:1.0 ml/min,检测波长:270 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μl 。

2.6 含量测定方法的方法学验证

2.6.1 液相定性鉴别。参照2010年版《中国药典》四环素类抗

生素HPLC法定性鉴别法^[3],通过对比样品与对照品的保留时间予以确定,对照品色谱图见图1。

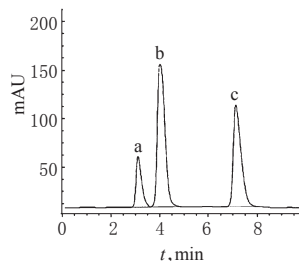


图1 对照品高效液相色谱图

a.土霉素;b.四环素;c.氯霉素

Fig 1 HPLC chromatograms of control

a. OTC; b. TC; c. CPA

从图1可以看出,土霉素、四环素、氯霉素3种抗生素均分离良好,保留时间分别为3.111、3.982、7.201 min。

2.6.2 线性范围与检测限的确定。分别量取不同质量浓度的对照品溶液注入色谱仪进行分析,以质量浓度(x)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线;检测限以噪音的3倍计算。3种成分的线性关系和检测限结果见表1。

表1 3种成分的线性关系和检测限

Tab 1 Linear relationship and detection limits of 3 components

成分	线性方程	r	检测限, ng/ml
土霉素	$y=49.879x+0.373$	0.999 9	3.6
四环素	$y=43.553x+0.134$	0.999 9	5.0
氯霉素	$y=35.576x-0.328$	0.999 8	2.0

从表1可知,3种成分的检测线性范围均为2~100 $\mu\text{g/ml}$,符合要求。在实际样品的测定中,通过加标回收等方法,同法测得土霉素、四环素、氯霉素在相同色谱条件下的样品检测限分别为0.02、0.02、0.01 mg/kg,符合国家相关标准检测的要求。

2.6.3 回收率试验。以阴性空白为基质,按《中国药典》相关方法,考察了土霉素、四环素、氯霉素的回收率,平行试验6次的情况下,得3种成分的平均回收率分别为99.8%、100.5%、97.6%,相应的RSD分别为0.3%、0.3%、0.5%。

2.6.4 精密度和稳定性试验。以空白瘦肉为本底,分别用硼砂饱和水溶液配制3种成分质量浓度为1.0、10.0、20 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液各5份,依法处理,取滤液测定。每份测定6次,取平均值,测得日内RSD;将滤液于低温(4.0 $^{\circ}\text{C}$)放置7 d内重复测定,得日间RSD,结果见表2。

表2 精密度、稳定性试验结果

Tab 2 Results of precision and stability tests

成分	质量浓度 x, $\mu\text{g/ml}$	日内精密度		日间精密度	
		\bar{x} , $\mu\text{g/ml}$	RSD, %	\bar{x} , $\mu\text{g/ml}$	RSD, %
土霉素	1.0	0.96	1.03	0.95	1.47
	10.0	9.91	0.98	9.86	0.83
	20.0	19.95	1.37	19.85	1.54
四环素	1.0	1.06	1.85	0.97	1.96
	10.0	10.02	0.99	9.99	1.03
	20.0	19.96	0.46	19.96	0.67
氯霉素	1.0	1.01	0.84	1.00	0.97
	10.0	9.98	1.43	9.98	1.38
	20.0	20.01	0.35	20.03	0.44

从表2可以看出,本法精密度较好,且土霉素和四环素在低温贮存下也有良好的稳定性,尤以氯霉素最稳定,不容易降解。

2.7 亚临界水萃取条件的优化

为建立动物源食品中3种抗生素的静态亚临界水萃取技术,对影响萃取效率的辅助液、萃取时间、萃取温度、水的体积、pH值等因素进行了单因素测试优化研究。由于采用热水作为萃取剂,有可能会造成土霉素和四环素的热分解或水解。因此亚临界水萃取试验中采用加标制备含有10 μg/ml的混合对照溶液的供试品溶液,然后通过计算每种抗生素的萃取回收率的高低来评价萃取条件的好坏。取1.0 g经检验含有土霉素和四环素的阳性样品,并加入混合对照溶液,萃取体系含10 μg/ml混合对照溶液,进行样品的前处理。精密量取20 μl萃取液,进样分析,每样品平行测定3份,取平均值,计算每种抗生素的萃取回收率。

2.7.1 萃取剂。由于硼砂具有渗透作用,可使动物源食品中的抗生素浸提更充分;同时,硼砂对蛋白质具有沉淀作用,更有利于动物源食品中抗生素的提取与分离。因此本试验研究了饱和硼砂水溶液与纯水对萃取效率的影响。结果显示,纯水萃取效率相对较低,土霉素、四环素和氯霉素回收率分别为77.3%、81.6%、80.7%;采用饱和硼砂水溶液后萃取效率明显提高,在优化条件下回收率达到了85.6%、91.6%、93.7%,故采用此溶液为萃取剂。

2.7.2 萃取时间。固定其他参数,分别在萃取1、2、3、4、5、6、7 min条件下进行回收率测试,结果见图2。

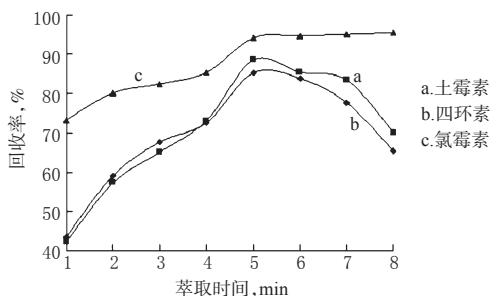


图2 萃取时间-回收率关系

Fig 2 Relationship of extraction time with recovery rate

由图2可知,萃取时间从1 min延长至5 min,萃取效率逐步提高;在萃取时间为5 min时,土霉素、四环素和氯霉素的回收率均达到最高值,分别为88.6%、85.3%和94.2%;但继续延长萃取时间,前两者的回收率急剧下降,而氯霉素的回收率略有提高。这是因为氯霉素比较稳定,随着亚临界水萃取的时间延长,萃取效率提高;而土霉素、四环素对热不稳定,随着萃取时间的延长,容易分解。试验结果表明,最佳萃取时间为5 min。

2.7.3 萃取温度。固定其他参数,分别在60、70、80、90、100、105、110、120 °C的萃取温度条件下,萃取5 min,分别测定并计算3种抗生素的萃取回收率,以选择适宜的萃取温度,结果见图3。

由图3可知,萃取温度从60 °C升至100 °C时,3种抗生素的萃取回收率逐步提高;但当温度进一步升高,土霉素、四环素的回收率开始逐渐下降,氯霉素的萃取回收率稍有提升,其

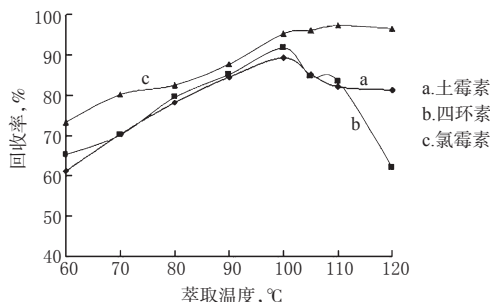


图3 萃取温度-回收率关系

Fig 3 Relationship of extraction temperature with recovery rate

原因可能是前两者在过高的温度下发生分解。因此,100 °C为最佳萃取温度,此时土霉素、四环素和氯霉素的萃取回收率分别为85.3%、88.6%、94.2%。

2.7.4 萃取体积。为研究萃取剂饱和硼砂水溶液的体积对萃取效率的影响,分别加入不同体积(3.0、4.0、5.0、6.0 ml)的水,在100 °C条件下萃取5 min,分别计算3种抗生素的萃取回收率。结果表明,水的加入体积对萃取效率的影响并不显著。在试验条件下,萃取体积从3.0 ml增加到5.0 ml,3种抗生素的萃取回收率约提高3%;体积再增加,萃取回收率略有下降。综合考虑,选择水的加入体积为5.0 ml。

2.7.5 萃取剂pH值。四环素类抗生素对环境pH值比较敏感,过酸或过碱都容易造成四环素类抗生素的分解,因此,选择合适的pH值对体系萃取效率有重要的影响。采用盐酸调节萃取剂的pH值,在100 °C条件下,加入5.0 ml萃取剂,萃取5 min。在上述条件下,分别在萃取剂pH值为2、3、4、5、6、7的条件下,测定3种抗生素的萃取回收率,结果见图4。

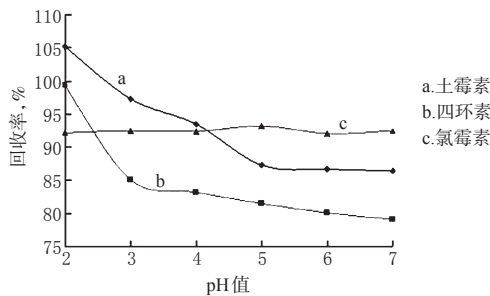


图4 萃取剂pH值-回收率关系

Fig 4 Relationship of pH value of extracting agent with recovery rate

由图4可知,萃取剂的pH值变化对氯霉素的萃取效率几乎没有影响,但土霉素、四环素的萃取回收率随着pH值从2到7逐渐降低。这是因为大多数的四环素类抗生素在高酸度(pH<2)条件下不稳定,在水中容易发生质子迁移而造成结构变化。因此,选择pH=2为萃取剂的最佳pH值。

综上,采用亚临界水萃取动物源食品中土霉素、四环素和氯霉素的最优条件为:取5 ml用盐酸调节pH至2的饱和硼砂水溶液为萃取剂,在100 °C萃取5 min。此时土霉素、四环素和氯霉素的回收率分别为104.8%、99.7%、92.1% (n=3)。

2.8 样品测定

分别吸取对照品溶液和样品溶液注入色谱仪进行分析,

记录3种抗生素的峰面积,根据保留时间和峰面积分别进行定量分析。

采用亚临界水萃取-HPLC法对所购得共56批动物源食品进行3种抗生素残留量的测定。结果,检出7份阳性样本,分别有1份鸡肉和1份猪肉样品土霉素呈阳性,2份鱼肉样品氯霉素呈阳性,2份猪肉样品氯霉素呈阳性,1份鸡内脏样品土霉素和氯霉素呈阳性,具体见表3。鱼肉样品色谱图见图5。

表3 样品测试结果汇总(mg/kg)

Tab 3 Summary of sample test(mg/kg)

试样/数量	土霉素	四环素	氯霉素
鸡肉/10	3.46	0	0
猪肉/10	4.41	0	0
牛肉/10	0	0	0
鱼/10	0	0	1.73, 2.11
猪内脏/10	0	0	5.65, 2.30
鸡内脏/6	2.13	0	7.18

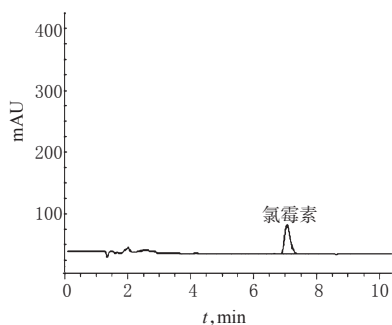


图5 鱼肉样品高效液相色谱图

Fig 5 HPLC chromatograms of fish samples

从表3可知,动物源食品中3种抗生素的残留阳性率不高,但是内脏样品中阳性样品较多,这可能与动物的代谢主要由内脏完成有关。从表3还可以发现1份样品中同时检出多种抗生素残留的现象,这可能与动物饲养过程中同时投放多种抗生素有关,应引起食品药品监督管理部门的注意。

3 讨论

本试验采用亚临界水萃取-HPLC法测定动物源食品样品中土霉素、四环素和氯霉素的残留量,方法准确、可靠、灵敏度高,测定结果令人满意。亚临界水萃取法相对于其他提取方

法(如固相萃取法等)更绿色、环保,因为前者采用的萃取剂为水,其他方法多为有机溶液;同时,前者萃取时间一般在5 min内,速度较快,能极大地提高分析效率。因此,本法是动物源食品抗生素检测手段的有效补充,为餐饮食品的评审检验和技术监督提供了一条新的途径。

参考文献

- [1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T21315-2007 动物源性食品中青霉素族抗生素残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S].2008-03-01.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.GB/T21317-2007 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱法[S].2008-03-01.
- [3] José AM, Miguel H, Alejandro C, et al. Use of compressed fluids for sample preparation: food applications[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1152(1/2):234.
- [4] Sara B, Antonio DC, Aldo L, et al. A simple and rapid confirmatory assay for analyzing antibiotic residues of the macrolide class and lincomycin in bovine milk and yoghurt: hot water extraction followed by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007, 21(2):237.
- [5] Bogialli S, Coradazzi C, Di CA, et al. A rapid method based on hot water extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry for analyzing tetracycline antibiotic residues in cheese[J]. *Journal of AOAC International*, 2007, 90(3):864.
- [6] Giorgio B, Sara B, Roberta C, et al. Evaluation of a method for assaying sulfonamide antimicrobial residues in cheese: hot-water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(13):537.

(收稿日期:2013-01-14 修回日期:2013-04-02)

第66届世界卫生大会在瑞士日内瓦举行

本刊讯 2013年5月20日-27日,第66届世界卫生大会在瑞士日内瓦举行。国家卫生和计划生育委员会主任李斌率由国家卫生计生委、外交部、国家食品药品监督管理总局、驻日内瓦代表团及港澳特区卫生部门组成的中国代表团与会。

本届大会讨论了“世卫”组织改革、《世界卫生组织第十二个工作总规划(2014-2019)》、《2014-2015年双年度规划预算方案》、《国际卫生条例(2005)》实施、《大流行性流感防范框架》实施、非传染性疾病、卫生研发筹资和协调、卫生相关千年发展目标、健康社会决定因素等42项技术和管理议题,通过了29项决议和决定。

我国代表团与“世卫”组织秘书处共同举办了“人感染

H7N9禽流感进展通报”边会,积极参加了全体会议、委员会会议、起草小组会议以及技术介绍会等各项活动,全面参与了各项议题的发言和讨论,为大会做出了积极贡献。

世界卫生大会是“世卫”组织的年度例会,是“世卫”组织的最高决策机构。来自约194个“世卫”组织成员国、相关国际组织、非政府组织代表约2000人参会。日本代表团团长、厚生劳动省国际事务特别助理尾身茂(Shigeru Omi)博士当选大会主席。非洲联盟委员会主席祖玛(Nkosazana Dlamini Zuma)博士、瑞典国际发展合作部长卡尔森(Gunilla Carlsson)女士、世界银行集团行长金镛(Jim Yong Kim)博士作为特邀嘉宾发表讲话。