

肉食品中常见 4 种抗生素残留的 高效液相色谱分析

纳鹏军, 龚波林

(宁夏大学 化学化工学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要: 建立了同时测定肉食品中泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考的高效液相色谱方法, 样品经乙腈提取, 正己烷脱脂, HLB 小柱净化后, 以 C_{18} 反相色谱柱为分离柱, 甲醇-磷酸二氢钠缓冲溶液 (pH 3.0, 含体积比为 10% 的甲醇溶液) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 λ 为 275 nm. 泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考的线性范围是 0.1 ~ 20.0 mg/L, 相关系数分别为 0.9987、0.9992、0.9985、0.9970. 其平均回收率为 75% ~ 87%, 相对标准偏差为 1.35% ~ 5.41%, 泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考的检出限分别为 20、32、19、16 $\mu\text{g/kg}$. 方法满足肉食品中泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考的残留量测定.

关键词: 大环内酯类; 氯霉素类; 高效液相色谱

中图分类号: O657.7

文献标识码: B

文章编号: 1006-3757(2011)02-0065-04

大环内酯类与氯霉素类药物是两类应用广泛的广谱抗生素, 由于这两类抗生素能够有效预防和治疗家畜传染病和寄生虫病的发生, 有些还具有促进动物生长发育的功用^[1-5], 因此, 为了降低养殖成本, 提高经济效益, 在家畜养殖中广为使用. 但是, 近年来由于在禽畜养殖过程中过量使用抗生素又不遵守休药期的规定, 在牛羊肉、猪肉以及鸡鸭鱼肉中检测出了各种抗生素, 这种残留可以通过食物链进入人体, 进而对人体造成各种危害^[6-9]. 红霉素、泰乐菌素等大环内酯类可致肝损害和听觉障碍^[1-5], 更严重的是长期大量滥用广谱抗生素会导致肠道微生物菌群被抑制, 使人体产生抗药性. 这种抗药性导致人类感染疾病之后治疗难度加大, 治疗成本升高.

为了保障人类的生命健康, 世界各国卫生组织以及食品药品监督管理部门都已经将肉食品中各种抗生素残留量作了严格规定^[10], 并且以抗生素在肉食品中的残留量作为产品进口的贸易壁垒. 如美国和欧盟对阿维菌素在肉食品中的最高残留限量为 25 $\mu\text{g/kg}$, 泰乐菌素为 100 $\mu\text{g/kg}$, 替米考星为 100 $\mu\text{g/kg}$, 伊维菌素为 40 $\mu\text{g/kg}$.

目前, 肉食品中大环内酯类抗生素常用液-质联用进行全面分析^[11-12], 氯霉素类药物常用气相色谱及液相色谱分析^[13-16], 而用高效液相色谱 (HPLC) 法同时分析肉食品中两类常见抗生素还未见文献报道.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (LC-20AT, 日本岛津公司); 超声波清洗仪 (昆山市超声仪器有限公司); Symmetry C_{18} 反相色谱柱 (5 μm , 4.6 $\times$ 250 mm, waters 公司), Oasis HLB 固相萃取柱 (3 mL/60 mg, waters 公司); 泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考标准品均为天津市科密欧化学试剂开发中心监制; 乙腈、正己烷均为优级纯, 购自天津市北联精细化学品开发有限公司. 其它试剂均为分析纯, 实验用水均为二次蒸馏水. 新鲜牛肉与鸡肉均为超市所购.

1.2 色谱条件

Symmetry C_{18} 反相色谱柱; 柱温: 25 $^{\circ}\text{C}$; 流速: 1 mL/min; 进样量: 25 μL ; 梯度洗脱条件: A 相为甲

醇,B 相为 0.2 mol/L 磷酸二氢钠含 10% (体积比) 甲醇,调节 pH 为 3.0;梯度洗脱程序:0~2 min 10% A,2~8 min 10%~40% A,8~9 min 40%~10% A;检测波长 λ 为 275 nm.

1.3 标准溶液的配制及标准曲线的制备

分别准确称取各标准品 0.01 g (精确至 0.001 g),用甲醇分别溶解并定容至 100 mL,配制成 100 mg/L 标准储备液,于 -4 ℃ 冰箱中冷藏.测定时将各标准溶液混合后稀释成 0.1、0.2、0.5、1.0、5.0、10.0、15.0、20.0 mg/L 的溶液.分别以泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数(r).

1.4 样品处理

将新鲜牛肉及鸡肉分别匀浆后,于 -18 ℃ 冰箱中保存.测定时,将匀浆冷冻保存的牛肉与鸡肉样品于室温下自然解冻.分别准确称取 20.0 g 样品置于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 mL 乙腈,超声 10 min,转移至离心管,以 5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液.离心沉淀物用上述方法重复提取 2 次,合并上清液.向得到的清液中加入 30 mL 正己烷,用力

振荡 5 min,静置分层,弃去上层正己烷层.然后将溶液于 40 ℃ 减压旋转蒸发至约 2 mL,氮气吹干后加入 5 mL 甲醇-磷酸盐混合液超声溶解抗生素,最后定容至 10 mL.

1.5 样品净化

将 HLB 固相萃取小柱用 5 mL 甲醇、5 mL 去离子水活化后,将 1.4 得到的样品处理液上固相萃取柱(柱流速保持 1 滴/s),用 10 mL 蒸馏水、10 mL 5% 甲醇水溶液淋洗 HLB 固相萃取柱,再用 10 mL 甲醇洗脱,将洗脱液用氮气吹干后,加入流动相超声定容至 5 mL,最后,经 0.22 μ m 滤膜过滤后进样.

1.6 方法的准确度、精密度、线性范围、回收率

对于牛肉样品分别添加 0.1、0.5、1.0 mg/kg 3 个水平的混合标准溶液,按照 1.4 与 1.5 样品处理及净化方法,每个水平平行测定 4 次,进行回收率实验,并且以 3 倍信噪比分别计算泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考在牛肉样品中的检出限,在测定条件下,4 种药物在 0.1~20.0 mg/L 范围内均呈线性,线性方程与相关系数、平均回收率、相对标准偏差见表 1.

表 1 4 种抗生素精密度、检测限与回收率
Table 1 Precisions, LODs and recoveries of four antibiotics

化合物	线性方程(n=6)	相关系数	精密度(n=5)	检测限/(μ g/kg)	Recovery/%
泰乐菌素	$Y=9.385X+1.056$	0.9987	1.35	20	75
替米考星	$Y=13.262X-2.432$	0.9992	4.23	32	78
氯霉素	$Y=6.728X-0.486$	0.9985	2.04	19	77
氟苯尼考	$Y=11.445X+0.379$	0.9989	5.41	16	87

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

通过扫描几种抗生素紫外吸收光谱,氯霉素、氟苯尼考最大吸收波长在 270 nm,泰乐菌素、替米考星最大吸收波长均在 282 nm,为使得待检测各物质都具有较高灵敏度,检测波长设置 275 nm.

2.2 流动相配比的选择

采用等度洗脱方式进行分离时($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{磷酸盐}}\geq 1:1$),发现各物质不能达到基线分离,分离效果较差.如果甲醇与磷酸盐水溶液的体积比不高于 1:2,各峰严重展宽,峰形变差,同样不能达到基线分离.经过优化,采用合适的梯度程序,才可将 5 种物质进行基线分离.

2.3 流动相 pH 的选择

本实验分别比较了流动相 pH 在 3、4、5、6、7 时标准品的分离效果(以磷酸调节),结果表明,随着 pH 的降低,被分析物保留时间会缩短,峰形也会得到改善,由宽变窄.这是由于随着 pH 值降低,色谱柱硅羟基的解离受到抑制,由此产生的色谱峰拖尾减弱.在 pH 值低于 3 的流动相中,基本上可以抑制色谱柱硅羟基解离,但是考虑到大环内脂的不稳定性以及色谱柱的使用寿命,本实验选择 pH 值为 3.

2.4 前处理过程的优化

本实验对比考察了甲醇、乙腈、乙酸乙酯 3 种溶剂提取效果,发现甲醇提取所含杂质较多,使峰形变差,乙酸乙酯虽然杂质较少,但是回收率很低,用乙腈提取可以得到满意的回收率,所含的杂质也较少.

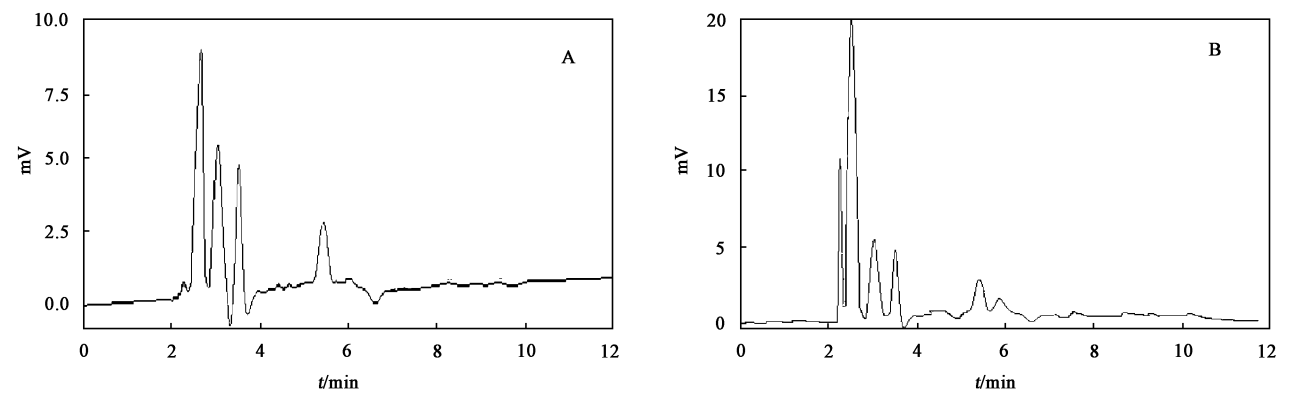


图 1 混合标准溶液(A)及牛肉样品(B)加标色谱图

Fig.1 Chromatograms of standard (A) and spiked sample (B)

氟苯尼考(2.5 min);氯霉素(3.0 min);泰乐菌素(3.4 min);替米考星(5.4 min);各物质浓度为 15.0 mg/L.

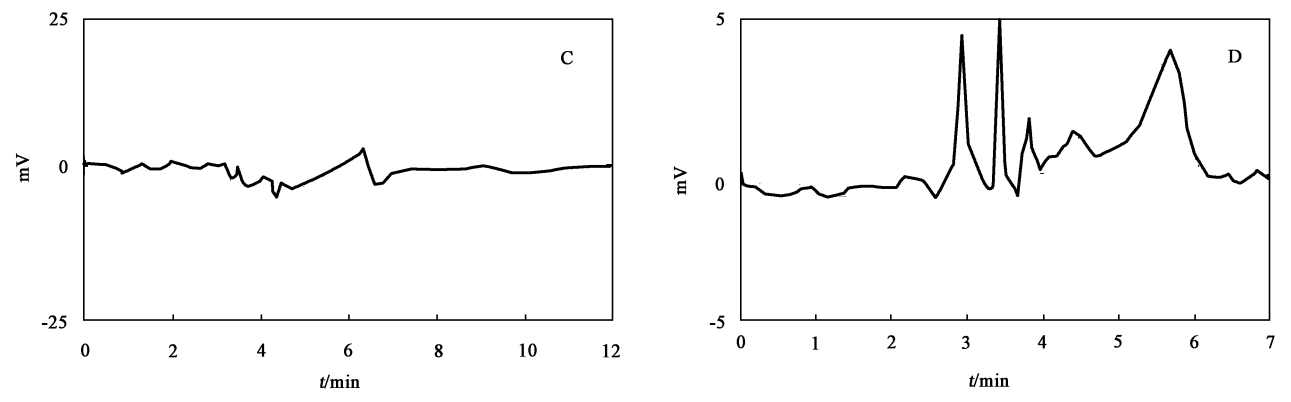


图 2 牛肉样品(C)及鸡肉样品(D)色谱图

Fig.2 Chromatograms of beef (C) and chicken(D) samples

通过对色谱条件进行优化,得到具有良好分离效果的混合标准溶液图谱及牛肉样品加标色谱图(图 1)(加标浓度为 50 $\mu\text{g/kg}$).牛肉样品及鸡肉样品的色谱图见图 2. 所得相邻物质对的分离度 R 为 1.623.

2.6 实际样品检测

本实验分别对 10 份牛肉样品和 10 份鸡肉样品中泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考进行检测,没有发现牛肉样品中含有以上抗生素,但是,在 4 份鸡肉样品中都不同程度检测到了泰乐菌素,最高为 200 $\mu\text{g/kg}$,最低为 80 $\mu\text{g/kg}$,平均含量为 120 $\mu\text{g/kg}$,高于我国动物性食品中兽药最高残留限量标准(100 $\mu\text{g/kg}$).

3 结论

我国动物性食品中兽药最高残留限量标准^[18]规定泰乐菌素、替米考星、氯霉素、氟苯尼考在肉食

品中的最高残留量(MRL)分别为:100、75、1.5、200 $\mu\text{g/kg}$. 本实验所测泰乐菌素、替米考星、氟苯尼考的检出限分别为 20、32、16 $\mu\text{g/kg}$,均在最高残留限量以下,符合残留检测分析要求. 由于氯霉素药物的特殊性,欧盟对氯霉素的检出限要求为 0.1 $\mu\text{g/kg}$,美国 FDA 对氯霉素的检出限要求为 0.3 $\mu\text{g/kg}$. 按照本实验方法,氯霉素检出限为 19 $\mu\text{g/kg}$,还未达到国际上的要求,这是因为提取方法和所用检测器所致. 今后应该发展更加灵敏的方法以提高氯霉素检出限.

本实验方法的平均回收率较高(75% ~ 87%),而且步骤简单、操作容易、重现性较好,相对标准偏差为 1.35% ~ 5.41%,表明方法稳定可靠.

参考文献:

[1] 臧广田,周正. 家禽的抗菌素与化学治疗法[M]. 北

- 京:北京科学出版社,1983.
- [2] 冯静波. 饲用大环内脂类抗生素的研究与最新进展[J]. 动物科学与动物医学,2004,21(6):19-20.
- [3] 易立,汪洋. 吉他霉素对断乳仔猪肠道菌群的影响[J]. 安徽农业科学,2006,34(1):54-56.
- [4] 韦建强,王瑾,等. 抗菌新药替米考星在售药临床应用简介[J]. 医学动物防治,2006,22(7):530-534.
- [5] GROAN SHAKLEE W. Field trial of the treatment of enzootic bronchopneumonia in beef calves with a new macrolide antibiotic, tilimicosin [J]. *Praktische - Tierarzt*, 1993, 74(3):210-218.
- [6] TOLLEFSON L, MILLER M A. Antibiotic use in food animals controlling the human health impact [J]. *Journal of AOAC International*, 2000, 83(1):245-255.
- [7] CAMPBELL G S, MAGEAU R P, *et al.* Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1984, 25(2):205-211.
- [8] 侯为道,傅小鲁,杨元,等. 动物性食品中残留兽药水平及膳食安全性评价[J]. 现代预防医学,2004,31(1):47-49.
- [9] 李翠枝,刘艳辉,等. 抗生素和其它兽药残留的危害[J]. 中国乳品工业,2004,32(10):17-22.
- [10] 肖典云. 进出口食品中农兽药残留新标准技术实用手册[M]. 北京:中国科学技术出版社,2005.
- [11] 王凤美,陈军辉,等. UPLC-MS法对动物源性食品中12种大环内酯类抗生素残留的测定[J]. 分析测试学报,2009,28(7):784-788.
- [12] 夏敏,贾丽,季怡萍. 液相色谱-质谱法同时检测畜禽肉中五种大环内酯类抗生素[J]. 分析测试学报,2004,23(增刊):217-220.
- [13] 陈莹,陈辉,等. 超高效液相色谱串联质谱法对鳗鱼中大环内脂类、喹诺酮类和磺胺类兽药残留量的同时测定[J]. 分析测试学报,2008,27(5):538-541.
- [14] 张远,王永强,等. 动物性食品中氯霉素残留的定量分析研究[J]. 食品研究与开发,2006,27(4):116-118.
- [15] 贺利民,苏贻娟,曾振灵,等. 氯霉素类兽药的三甲基硅衍生物的质谱特征及其残留测定[J]. 分析测试学报,2006,25(2):43-46.
- [16] 王建华,梁成珠,刘兴敏,等. 几种动物源性食品中氯霉素残留量的气相色谱双电子俘获检测[J]. 分析测试学报,2003,22(5):105-106.
- [17] 张思群,翟惠斌,寥列文. 动物及动物源性食品中禁用药物残留检验监控研究[J]. 现代食品科技,2005,21(2):69-71.
- [18] 陈家华. 畜禽及其产品质量和安全分析技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:259-272.

Simultaneous Determination of Macrolide and Chloramphenicols Antibiotic Residues in Animal Derived Food by HPLC Method

NA Peng-jun, GONG Bo-lin

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: An HPLC method for the simultaneous determination of residues of tylosin (TYL), tilimicosin (TIL), chloramphenicol (CAP) and florfenicol (FF) in animal-derived food was developed. The muscle tissue samples were extracted by acetonitrile, then defatted with hexane, and cleaned up on a HLB SPE column. The analytes were separated on a reversed-phase C_{18} column with the methanol-20 mmol/L NaH_2PO_4 solution (pH=3.0, containing 10% methanol), the UV detector was set at $\lambda=275$ nm. The standard curves were linear in the range of 0.1~20.0 mg/L for all analytes with correlation coefficients of 0.9970~0.9992. The detection limits for tylosin, tilimicosin, chloramphenicol (CAP), and florfenicol (FF), were 20 $\mu\text{g/kg}$, 32 $\mu\text{g/kg}$, 19 $\mu\text{g/kg}$, 16 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The average recoveries of four analytes ranged from 75% to 87%. The relative standard deviations were between 1.35%~5.41%. The method can meet the requirement for the simultaneous determination of tylosin, tilimicosin, chloramphenicol (CAP), and florfenicol (FF) in beef products.

Key words: macrolides; chloramphenicols; HPLC

Classifying number: O657.7

