

高效毛细管电泳法测定牛奶中四环素类抗生素含量*

Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk by High Performance Capillary Electrophoresis

梁佳¹, 张琳婧¹, 卢日刚²

LIANG Jia¹, ZHANG Lin-jing¹, LU Ri-gang²

(广西食品药品检验所, 广西南宁 530021)

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:采用固相萃取-毛细管电泳法(SPE-HPCE)同时检测牛奶中四环素、氯霉素、土霉素和金霉素的含量。以 $80\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂缓冲液为电泳介质,运行电压 25kV ,压力法进样 5s ;柱温 25C ;检测波长 200nm 。结果表明,该方法能使4种抗生素在 15min 内得到完全分离,检测限($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)分别为 $0.5, 1.5, 1.0, 0.5$,回收率分别为 100.7% ($RSD = 1.3\%$), 101.7% ($RSD = 0.6\%$), 100.8% ($RSD = 1.5\%$), 101.1% ($RSD = 0.7\%$)。该方法简单、可靠,灵敏度高,适用于牛奶中四环素类抗生素残留量的检测。

关键词:高效毛细管电泳法 固相萃取 四环素 牛奶

中图分类号:O657.8 文献标识码:A 文章编号:1002-7378(2010)03-0309-03

Abstract: A solid phases extraction-high performance capillary electrophoresis method was established for the assay of four tetracycline antibiotics in milk. The run buffer was boric solution ($80\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$). The running voltage was 25kV and the detective wavelength was 200nm . Four samples were completely separated in 15 minutes. The detection limit ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) of the four compounds were $0.5, 1.5, 1.0, 0.5$, respectively. The average recoveries were 100.7% ($RSD = 1.3\%$), 101.7% ($RSD = 0.6\%$), 100.8% ($RSD = 1.5\%$), 101.1% ($RSD = 0.7\%$), respectively. The method is simple, accurate, sensitive and can be applied to determine the tetracycline antibiotics in milk.

Key words: HPCE(CZE), SPE, tetracyclines, milk

四环素类抗生素包括四环素、氯霉素、土霉素和金霉素等,它作为预防和治疗畜禽疾病的兽药或作为促进畜禽生长的饲料添加剂而广泛应用于可食性动物中。过量使用四环素类抗生素不可避免会使母体代谢产物等相关抗生素残留于动物的肌肉、蛋、奶、脏器组织中,进而通过食物链影响人体健康。

由于奶牛乳腺炎发病率较高,用四环素来治疗乳腺炎等产科疾病仍较普遍,这容易导致在牛奶中残留抗生素。国内对牛奶中四环素类抗生素检测的方法研究较多,已报道的方法有微生物法^[1],高效液相色谱法^[2,3],液相色谱-质谱法^[4]。本文采用固相萃取(solid phase extraction, SPE)净化样品,用毛细管电泳法对牛奶中四环素、氯霉素、土霉素、金霉素含

量进行了测定。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

毛细管电泳仪(P/ACE MDQ, Beckman), 二级管阵列检测(DAD), 未涂层石英毛细管柱($50\text{cm} \times 50\mu\text{m}$) (i. d) (美国 BECKMAN 公司生产), 有效长度 40cm 。微孔滤膜(上海市新亚净化器件厂生产), KQ-800 DB 超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产), XW-80A 旋涡混合器, Mikro 22R 高速冷冻离心机, B5300S 电子天平, Millipore A10 超纯水装置(美国密里博司生产), KL 512J 氮吹仪(北京康林科技有限责任公司生产)。

对照品:四环素对照品批号:30488-200403, 氯霉素对照品批号:130555-200602, 金霉素对照品批号:130489-200202, 土霉素对照品批号:130487-200302, 均由中国药品生物制品检定所提供。

收稿日期:2010-05-20

作者简介:梁佳(1986-),女,硕士研究生,主要从事药物分析方法研究。

*广西自然科学基金项目[桂科自(0832109)]资助。

1.2 溶液的制备及电泳条件

1.2.1 标准溶液的配制

分别取四环素、氯霉素、金霉素、土霉素适量,精密称定,加水溶解,制成浓度($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)分别为0.0227、0.0199、0.0222、0.0227的溶液和总浓度约为 $0.08\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的配制

取奶粉约2g,精密称定,置于30ml离心管中,加入10ml含EDTA的Mcllvain缓冲液,旋涡混匀1min,超声5min,以6000r/min在25℃时离心10min,取上清液5ml注入已用甲醇、水和提取缓冲液各3ml活化的 C_{18} SPE小柱,然后依次用水3ml和3ml20%(V/V)甲醇水溶液淋洗,真空吹干后用甲醇溶液5ml洗脱,收集洗脱液在40℃用 N_2 吹干,用1ml水溶液溶解。

1.2.3 运行缓冲液和Mcllvain缓冲液^[5]的配置

称取适量硼砂于50ml试管中,制成浓度为 $80\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼砂缓冲液,测得pH值为9.0^[6]。

称取一水柠檬酸12.9g,磷酸氢二钠27.46g,依地酸二钠37.2g,去离子水定容到1L(调pH值至4.0),即为Mcllvain缓冲液。

1.2.4 电泳条件

每次开机后用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氢氧化钠溶液冲洗2min,水冲洗2min,运行缓冲液冲洗2min;两次进样之间用 $0.1\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠,水及运行缓冲液各冲洗2min。运行电压为25kV,压力法进样5s;柱温25℃;检测波长200nm。背景电解质溶液为 $80\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂缓冲液。此条件下四环素类抗生素毛细管电泳色谱见图1,四环素,氯霉素,金霉素,土霉素的对照色谱见图2。从图2可以看出,4种物质分别在11.33min,12.64min,13.59min和

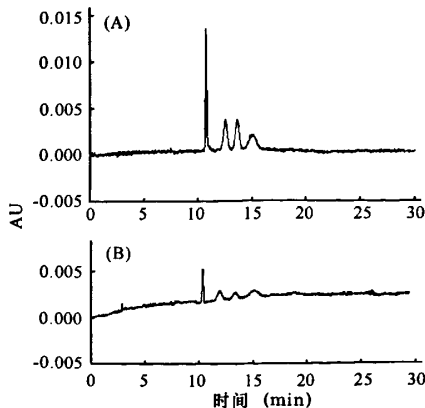


图1 对照品(A)和样品(B)的毛细管电泳色谱

14.85min出峰,因此,可以确定各峰归属。

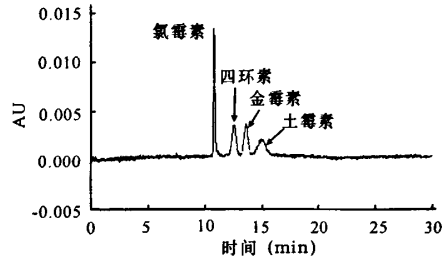


图2 4种四环素类抗生素对照色谱

2 结果与分析

2.1 线性关系

取配制好的混合对照品溶液制成总浓度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)分别为80、60、40、20、10、8的混合对照溶液,按电泳条件进样测定,以峰面积 x 对浓度 y 作线性回归,四环素、氯霉素、金霉素、土霉素的线性回归方程及线性范围见表1。由表1可以看出浓度和峰面积呈现出良好线性关系。

表1 4种四环素类抗生素的线性回归方程

组分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)
四环素	$y = 0.0002x + 0.3251$	0.9998	11.2~89.6
氯霉素	$y = 0.0002x - 1.1248$	0.9996	10.1~80.8
金霉素	$y = 0.0001x - 0.286$	0.9993	11.1~88.8
土霉素	$y = 0.0001x + 0.7464$	0.9994	11.2~89.6

2.2 检出限

取1.2.1项下的混合对照品溶液制成总浓度($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)分别为60、40、20、10、8、4、2、1混合对照溶液,按1.2.4项下电泳条件进样,得到氯霉素的检出限为 $0.5\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,四环素的检出限为 $1.5\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,金霉素的检出限为 $1\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$,土霉素的检出限为 $0.5\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

2.3 精密度

取1.2.1项下的混合对照品溶液,按1.2.4项下的电泳条件连续进样6次,得到氯霉素、四环素、金霉素、土霉素峰面积的平均值分别为142897,103992,145381,163281;RSD分别为1.7%,2.1%,1.2%,2.0%,表明仪器的精密度良好。

2.4 重复性

按1.2.1项中供试品溶液制备方法平行制备6份供试品溶液,得到重复性实验样品。按1.2.4项电泳条件进行测定,氯霉素、四环素、金霉素、土霉素的RSD分别为1.8%,1.0%,2.2%,2.0%,这表明该方法重复性好。

2.5 加样回收率

精密称定奶粉粉末 9 份于 30ml 的离心管中,每份约 2g,分别加入已按 1.2.1 项下配制好的混合对照液 1ml、1ml、1.5ml、1.5ml、2ml、2ml 于 30ml 的离心管中,再精密加入 1.2.3 项下的提取缓冲液,使离心管内液体总体积为 10ml。后旋涡混匀 1min,超声 5min,以 6000r 在 25℃ 时离心 10min,取上清液 5ml 注入已用甲醇、水和提取缓冲液各 3ml 活化的 C₁₈SPE 小柱,然后依次用水 3ml 和 3ml 20%(V/V) 甲醇水溶液淋洗,真空吹干后用甲醇溶液 5ml 洗脱,收集洗脱液于 40℃ 用 N₂ 吹干,分别用 1ml 水溶液溶解,得加样回收样品。按 1.2.4 项电泳条件进行测定,结果见表 2。

表 2 样品回收率实验结果

组分	回收率(%, n=3)			平均值(%)
	低浓度	中浓度	高浓度	
四环素	100.5 (r=2.3)	101.6 (r=0.3)	100.1 (r=1.4)	100.8 (r=1.3)
氯霉素	102.7 (r=0.5)	101.2 (r=0.7)	101.2 (r=0.8)	101.7 (r=0.6)
金霉素	102 (r=0.1)	99.3 (r=1.1)	101.1 (r=0.3)	100.8 (r=1.5)
土霉素	103.4 (r=0.6)	98.1 (r=1.0)	101.9 (r=0.4)	101.1 (r=0.7)

2.6 样品含量测定

称取样品约 2.0g,精密称定,按 1.1.2 项下方法制备供试品溶液并进样,用外标法计算,测定结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果

批号	含量(mg·kg ⁻¹)			
	氯霉素	四环素	金霉素	土霉素
80606	8.6	3.5	3.3	7.5
M562	6.4	5.8	6.7	6.1
M501	7.3	6.4	5.8	4.6

2.7 电泳条件的优化

2.7.1 缓冲液浓度对分离的影响

选择 10mmol·L⁻¹, 20mmol·L⁻¹, 30mmol·L⁻¹, 40mmol·L⁻¹, 50mmol·L⁻¹, 60mmol·L⁻¹, 70mmol·L⁻¹, 80mmol·L⁻¹ 硼砂作为缓冲液,我们发现随着硼砂浓度的加大,四环素、金霉素、土霉素三组分分离度渐渐变大,再通过比较可得,当硼砂浓度为 70mmol·L⁻¹ 和 80mmol·L⁻¹ 时四组分均在 15min 内出峰,峰形都较好,但是硼砂浓度为 80mmol·L⁻¹ 时灵敏度比较好,所以选择 80mmol·L⁻¹ 的硼砂作为缓冲液。

2.7.2 缓冲液 pH 值对分离的影响

对 80mmol·L⁻¹ 的硼砂用 40% 氢氧化钠调至

pH 值分别为 9,10,11,12,13,结果发现随着 pH 值的增大,各组分分离度增大,且在 pH 值为 12 左右时四环素易与金霉素色谱峰出现重叠现象,通过比较发现 pH 值在 9 左右分离效果较好。

2.7.3 电压对分离的影响

在毛细管电泳中,电压对分离的影响效果较为明显,待测物的迁移时间和分离度都受分离电压的影响。分别比较电压为 10kV、15kV、20kV、25kV、30kV 时的出峰情况,结果发现在 25kV 时峰形和迁移时间都较为理想。

2.7.4 温度对分离的影响

在温度为 15℃、20℃、25℃、30℃ 和 35℃ 时,发现随着温度的增高,四组分整体的迁移时间缩短,最后综合考虑选择 25℃ 作为分离时的柱温。

2.8 样品提取条件的优化

2.8.1 固相萃取小柱的选择

固相萃取小柱性能主要由柱填料决定,常用的柱填料有反相填料、正相填料和离子交换填料。对比 C₁₈ 小柱和 strata-x-c 小柱,发现 C₁₈ 小柱对样品的吸附性较弱,较容易洗脱下来,所以最后选择使用 C₁₈ 小柱。

2.8.2 淋洗过程中水用量

分别用 3ml,3ml,2ml 水淋洗已上过样的 C₁₈ 小柱,分别收集以上 3 份淋洗液,在 1.2.4 电泳条件下进样,测定峰面积,结果表明 6ml 的水刚好可以把样品中水能溶解的杂质淋洗干净。

2.8.3 淋洗过程中 20%(V/V) 甲醇水的用量

分别用 3ml,3ml,2ml 20%(V/V) 甲醇水淋洗已上过样的 C₁₈ 小柱,收集以上 3 份淋洗液,在 1.2.4 电泳条件下进样,测定峰面积。结果表明,6ml 的 20%(V/V) 甲醇水刚好可以把样品中 20%(V/V) 甲醇水能溶解的杂质淋洗干净。

2.8.4 洗脱过程中洗脱剂的选择与用量

同时比较甲醇洗脱和 10mmol·L⁻¹ 的草酸甲醇洗脱,发现用 10mmol·L⁻¹ 的草酸甲醇洗脱时,洗脱物最后用氮气吹干后有肉眼可见的白色沉淀附着在试管壁上,用 1ml 的水溶解后,在 1.2.4 电泳条件下进样,样品不能电离,电流基本为零。考虑到 10mmol·L⁻¹ 的草酸甲醇酸性过强,而固相萃取小柱内的填料在酸性条件下不稳定,所以选择洗脱剂为甲醇。

(下转第 313 页)

对 1ml 硫酸锰溶液能达到氧化沉淀效果。

2.2 氨底溶液用量的影响

取 1.0ml 硫酸锰溶液,各用 5ml,10ml,15ml,20ml 氨底溶液按实验方法测定电流,结果在 15~20ml 氨底溶液中,电流的波形良好。氨底溶液中动物胶起抑制作用,配制时不可任意改变其浓度。

2.3 放置时间的影响

加入氨底溶液后,生成大量的氢氧化物沉淀对 Zn^{2+} 有吸附作用,实验证明超过 10min 静止时间,滤液中 Zn^{2+} 浓度呈下降趋势。故应在溶液初步沉淀澄清后,用力摇匀过滤,效果较好。本文方法在标准溶液中加入近似试样浓度的 Mn^{2+} ,以求介质条件相同。

2.4 干扰离子的消除

氨底溶液测定锌时, Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 干扰测定,生产过程中硫酸锰溶液主要成分为 Mn^{2+} 、 SO_4^{2-} 、 NH_4^+ 、以及少量 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cu^{2+} 。样品中 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 可以加入氨三乙酸消除^[3]。 Cu^{2+} 大于 Zn^{2+} 10 倍时,才会影响波高,所以本样品不予考虑。测定过程中大量的 Mn^{2+} 采用双氧水氧化成沉淀物排除。

2.5 标准曲线

取 Zn 标准溶液 0 μ g、25 μ g、50 μ g、100 μ g、250 μ g、500 μ g、1000 μ g 按标准溶液实验操作,结果浓度与电流呈线性关系。

(上接第 311 页)

在确定了洗脱剂的种类后,分别用 3ml,5ml,8ml 的甲醇溶液洗脱,发现当选择用 5ml 的甲醇洗脱时刚好可以把样品完全洗脱下来,所以确定洗脱用量为 5ml。

3 结束语

以 80mmol·L⁻¹ 硼砂缓冲液为电泳介质,采用固相萃取-毛细管电泳法(SPE-HPCE)同时测定牛奶中四环素、氯霉素、土霉素和金霉素的含量。该方法简单,可靠,灵敏度高,对样品中抗生素的含量测量结果令人满意,可以适用于牛奶中四环素类抗生素残留量的检测。

参考文献:

[1] 中华人民共和国国家进出口商品检验局. SN 0179-92 出口食品中四环素族抗生素残留检验方法[S]. 北京: 中国标准出版社,1996.

2.6 样品加标回收

取两份样品编号为 1[#] 和 2[#],各重复 3 份做样品加标回收实验结果如表 1 所示。

表 1 样品加标回收实验结果

样品号	样品含锌 (μ g)	加标 Zn (μ g)	实测值 (μ g)	回收率 (%)
1 [#]	5.46	25	29.39	96.49
1 [#]	5.46	50	54.75	98.72
1 [#]	5.46	100	100.62	95.41
2 [#]	158.26	100	250.08	96.83
2 [#]	158.26	150	317.50	103.00
2 [#]	158.26	200	346.15	96.62

表 1 的结果反映在已知含量样品中的加入标准溶液测得实际含量,样品回收率在 95%~103%。

3 结束语

本方法的 Zn^{2+} 在氨底溶液中,峰电位 -1.42V 处得到良好的还原波,在 0.5~300 μ g 范围内呈线性关系。同时,起波的 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 能得到控制, Mn^{2+} 干扰也可以消除。本法克服了原子吸收等昂贵仪器在车间实验不适用这一缺点,同时解决了分光光度法测 Zn 时使用有机物和除杂,耗时又耗药的问题,使操作简便、经济、快速,适合于中控分析,能及时指导生产。

(责任编辑:邓大玉)

[2] 刘芳,白雪梅,程玉芳. HPLC 法测定牛奶中残留四环素族及土霉素含量[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(10):1782-1783.

[3] 庞国芳,曹彦忠,张进杰,等. 高效液相色谱同时测定禽肉中土霉素,四环素,金霉素,强力霉素残留的研究[J]. 分析测试学报,2005,24(4):61-63.

[4] 张纯萍,刘艳华,门立强,等. 牛奶中四环素类药物残留的确证方法-液质联用法[J]. 中国兽医学报,2005,25(6):91-93.

[5] 秦燕,陈毓芳,林峰,等. 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[J]. 食品科学,2005,26(3):202-204.

[6] 黄志东,郭福庆,杨洁. 高效毛细管电泳法分离土霉素及其相关物质的方法研究[J]. 中国抗生素杂志,2001,26(3):184-186.

(责任编辑:尹 闯)