

高效液相色谱法同时测定海产品中四种 抗生素的分析方法

王 覃¹ 陈大舟² 汤 桦² 李 蕾^{1*}

(1. 北京化工大学 理学院, 北京 100029; 2. 国家标准物质研究中心, 北京 100013)

摘 要: 建立了同时检测海产品中土霉素、四环素、金霉素、氯霉素残留的高效液相色谱分析方法,以醋酸铵-醋酸/水缓冲液和乙腈作为流动相,通过二元梯度洗脱,使四种抗生素获得了较好的分离,以基线噪音的 3 倍计算,土霉素、四环素、金霉素、氯霉素的最低检出浓度分别为 32、15、23、19 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在添加浓度范围内,四种抗生素的加标回收率为 76%~92%,相对标准偏差为 0.8%~4.5%,该方法快速、灵敏、准确,可靠性高,可用于海产品中抗生素残留的色谱分析。

关键词: 抗生素;液相色谱;分离;检测;海产品

中图分类号: O656.22

引 言

抗生素是某些微生物代谢过程中产生的能抑制或杀灭其他病原微生物的化学物质,可用于预防和治疗动物疾病,因而被广泛应用。但是动物组织中抗生素的残留会影响食用者的健康,如:四环素类抗生素的毒性作用表现在降解产物具有溶血或肝毒的作用,对胃肠和肝脏具有一定的损害;氯霉素可抑制骨髓造血细胞线粒体内蛋白质的合成,引起再生障碍性贫血而导致死亡^[1]。因此,抗生素的残留对人体健康所造成的危害已引起世界范围广泛关注。

目前监测海产品中土霉素、四环素、金霉素、氯霉素的方法多为微生物法^[2],灵敏度较低,检测周期长,难以定量,具有一定的局限性。此外,酶联免疫法、放射分析法、液-质谱联用法^[3-4]及气-质谱联用法^[5-6]等方法,虽灵敏度高,但操作复杂,成本较高,难以广泛推广使用,因此,建立一种简单快速、灵敏度高且成本较低的检测方法势在必行。

本文采用磷酸二氢钠-EDTA-柠檬酸的缓冲液($\text{pH}=4.0$)提取,并应用 C18 固相萃取柱富集净化,

确定了以醋酸铵缓冲液和乙腈在梯度洗脱的条件下对四种抗生素进行色谱分离,通过配有紫外检测器的液相色谱仪对四种抗生素进行同时检测,结果表明四种组分不仅完全分离,而且分析时间短,并具有较高的检测灵敏度,这对抗生素残留的检测具有重要意义,可用于海产品中抗生素残留的检测,国内外尚鲜见报道。

1 实验部分

1.1 主要试剂和仪器

德国 Lumtech K-2600 高效液相色谱仪,配可变波长紫外检测器;四元低压混合单元泵。离心机,型号为 Durafuge 100;固相萃取柱型号为 LC-18 柱 3 mL (Supelco 公司);固相萃取装置,型号 14602 (Lida 公司)。

四种抗生素标准品分别为土霉素(OTC,含量为 97.0%)、四环素(TC,含量为 95.0%)、金霉素(CTC,含量为 95.0%)、氯霉素(CAP,含量为 99.0%),由国家标准物质研究中心提供,采用重量法配置。

试剂:甲醇(HPLC 级,Fluka 公司);乙腈(HPLC 级,Baker J T 公司);冰醋酸(分析纯,Fluka 公司);醋酸铵(分析纯,北京益利精细化学品有限公司);EDTA(纯度 99%,北京欣经科生物技术有限公司);磷酸二氢钠(分析纯,天津市化学试剂六厂三分厂);柠檬酸(分析纯,北京化工厂);水为超纯水。

收稿日期: 2006-03-07

基金项目: 国家“十五”重点科技攻关项目(2002BA906A28-1B)

第一作者: 女,1980 年生,硕士生

*通讯联系人

E-mail: lilei@mail.buct.edu.cn

1.2 标准溶液及流动相的配制

1.2.1 土霉素、四环素、金霉素、氯霉素标准储备液的配制 分别称取 1.00 mg 土霉素、四环素、金霉素、氯霉素标准品置于四个 100 mL 锥形瓶中,分别加入 100.0 g 甲醇溶解,此时各溶液浓度均为 0.01 mg/g,安瓿瓶分装密封后置于冰箱 4 ℃ 下保存。

1.2.2 混合标准液的配制 分别以移液管吸取土霉素、金霉素标准储备液各 2.00 mL,四环素、氯霉素标准储备液各 1.00 mL,置于 10 mL 的安瓿瓶中,加入 4.00 mL 甲醇,此时溶液中各组分浓度分别为:土霉素 2.0 μg/g、四环素 1.0 μg/g、金霉素 2.0 μg/g、氯霉素 1.0 μg/g,密封后置于冰箱 4 ℃ 下保存。

以移液管准确吸取上述混合标准溶液 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,分别置于 1.5 mL 样品瓶中,用甲醇定容至 1.0 mL,得到的标准溶液系列为:0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 μg/g(土霉素、金霉素);0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μg/g(四环素、氯霉素)。

1.2.3 流动相的配制 水相:0.01 mol/L 醋酸铵,用冰醋酸调节 pH = 4.5,经 0.45 μm 水相过滤膜过滤。有机相:乙腈,色谱纯。

1.3 样品前处理

将去皮、头和鳍的海虾组织或去鳞、皮和刺的鱼肉组织绞碎,准确称取 2.0 g,放入 15 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 10 mL 磷酸二氢钠-EDTA-柠檬酸的缓冲液(pH = 4.0),振荡 15 min 后,4000 r/min 离心 8 min,吸取上层清液,残渣再用 2 × 10 mL 上述缓冲液提取 2 次,合并上清液,冷却过滤。提取液经 C18 固相萃取柱净化。C18 柱首先用 5 mL 甲醇和 5 mL 水平衡,加入样品后流速控制在 70 ~ 100 滴/min,用 10 mL 水洗涤,弃去流出液,加入 3 mL 甲醇溶出,流速控制在 40 滴/min,收集的洗脱液在 40 下氮气吹扫至干,加入 1 mL 流动相(乙腈和醋酸铵的体积比为 10:90)溶解残留物,经 0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。

1.4 液相色谱分析条件

色谱柱为 Burospher-100 C18, 250 mm × 4.0 mm, 5.0 μm。进样量为 20 μL,检测波长为 268 nm,柱温为室温,流动相为醋酸铵-醋酸/水-乙腈,流速为 0.7 mL/min,梯度洗脱条件如表 1 所示。

1.5 空白实验

取 10 mL 磷酸二氢钠-EDTA-柠檬酸的缓冲液(pH = 4.0)于 15 mL 聚四氟乙烯离心管中,经过 1.3 步骤处理后,按照 1.4 中的色谱条件进行分析。

表 1 测定土霉素、四环素、金霉素、氯霉素的梯度洗脱条件

Table 1 Optimal elution condition for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and choramphenicol

时间/min	(醋酸铵-醋酸 [*] /水)/%	(乙腈)/%
0.00	90	10
2.00	85	15
7.00	70	30
15.00	70	30
20.00	90	10

*浓度为 0.01 mol/L 的醋酸铵-醋酸溶液

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的 pH 值 分别配制 pH = 3.5、4.0、4.5、5.0 的醋酸铵-醋酸/水缓冲溶液,研究了不同 pH 值的流动相对四种目标物分离效果的影响。结果表明,流动相的 pH 值对四环素、土霉素分离效果的影响较大,当 pH 值为 3.5、4.0 和 5.0 时二者的分离效果不佳,色谱柱对其有较强的吸附,而 pH 值为 4.5 时二者的分离效果最佳,故本实验选用冰醋酸调节的 pH 值为 4.5。

2.1.2 流动相的选择 实验分别选用甲醇和醋酸铵-醋酸/水缓冲液、乙腈和醋酸铵-醋酸/水缓冲液作为流动相。按不同配比进行了二元等度和梯度洗脱的研究。结果表明,在采用甲醇和醋酸铵-醋酸/水缓冲液作为流动相时,四种抗生素的色谱峰有重叠,不能够完全分离,而采用乙腈和醋酸铵-醋酸/水缓冲液作为流动相时,四种抗生素分离良好,故实验选择乙腈和醋酸铵-醋酸/水缓冲液作为流动相。此外,实验发现在二元等度洗脱时随着流动相中乙腈比例的增加,目标化合物流出速率加快,保留时间变短,土霉素和四环素的分离效果差,金霉素和氯霉素色谱峰有部分重叠;而采用梯度洗脱时,土霉素、四环素和金霉素在 10.00 ~ 15.00 min 内出峰(乙腈和醋酸铵-醋酸/水的体积比为 30:70),氯霉素在 18.00 min 左右出峰(乙腈和醋酸铵-醋酸/水的体积比为 17:83),四种被测组分基本可以达到基线分离,同时避免了杂质干扰,标准溶液和加标样品色谱图如图 1、2 所示。

2.1.3 检测波长 土霉素、四环素、金霉素分别于 268、355 nm 附近有两个最大吸收峰,氯霉素在 278 nm 处有最大吸收,分别在波长 268、278、355 nm 下

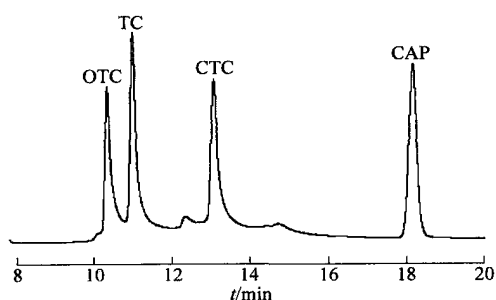


图1 土霉素、四环素、金霉素、氯霉素的标溶液色谱图

Fig. 1 Chromatogram of standard solution of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and chloramphenicol

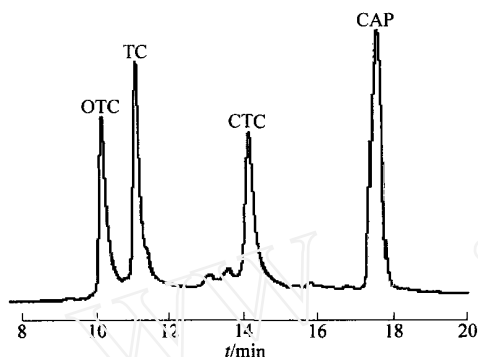


图2 加标样品中土霉素、四环素、金霉素、氯霉素的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and chloramphenicol in spiked sample

对标准混合溶液进行测定。结果表明在 268 nm 下四种被测组分分离较好且灵敏度明显高于 278 nm 和 355 nm,故选择 268 nm 作为本方法的检测波长。

2.1.4 流速的影响 分别以 1.0、0.8、0.7、0.5 mL/min 流速进行了实验,发现流速为 1.0 和 0.8 mL/min 时,杂质色谱峰与目标化合物的色谱峰不能完全分离,而流速为 0.7 和 0.5 mL/min 时,四种被测组分达到了很好的分离,但是流速为 0.5 mL/min 时,分析时间较长,故实验选择流速为 0.7 mL/min。

综上所述,本实验以 0.01 mol/L 醋酸铵-醋酸/水缓冲液(冰醋酸调节 pH 为 4.5)和乙腈作为流动相,采用二元梯度洗脱,检测波长为 268 nm,流速为 0.7 mL/min,土霉素、四环素、金霉素、氯霉素四种被测组分达到了很好分离,分离度 > 1.5。

2.2 空白实验

取 10 mL 磷酸二氢钠-EDTA-柠檬酸的缓冲液(pH = 4.0)于 15 mL 聚四氟乙烯离心管中,经过 1.3

步骤处理后,按照 1.4 中的色谱条件进行分析,结果未发现四种抗生素,说明在样品处理的过程中未引入土霉素、四环素、金霉素和氯霉素。

2.3 方法的线性范围及最低检出浓度

采用土霉素、金霉素浓度分别为 0.2、0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 $\mu\text{g/g}$,四环素、氯霉素浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{g/g}$ 的标准溶液在 1.4 的色谱条件下分别进样 20 μL ,以各抗生素已知质量浓度(X)为横坐标,以对应峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,实验表明土霉素和金霉素在 0.2 ~ 2.0 mg/kg 范围内线性关系良好,四环素和氯霉素在 0.1 ~ 1.0 mg/kg 范围内线性关系良好;以基线噪声的 3 倍计算方法的检出限。线性回归方程、相关系数和最低检出浓度如表 2 所示。

表2 土霉素、四环素、金霉素和氯霉素的回归方程、相关系数及最低检出浓度

Table 2 Regression equations, correlation coefficients and limit of detection (LOD) for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and chloramphenicol

组分	回归方程	相关系数	检测限/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
土霉素	$Y = 3389X + 14.193$	0.9975	32
四环素	$Y = 4356X + 11.47$	0.9981	15
金霉素	$Y = 2966X + 1.3988$	0.9986	23
氯霉素	$Y = 3002X + 15.767$	0.9972	19

2.4 方法的回收率与精密度

在不含有上述四种抗生素的海虾样品中添加一定量的土霉素、四环素、金霉素和氯霉素(表 3),按 1.3 的操作对样品进行前处理,在 1.4 的色谱条件下平行测定 5 次,采用外标法对四种抗生素进行定量,各组分的实际浓度、加标平均回收率和相对标准偏差(RSD)如表 3 所示。由表 3 可知四种抗生素的加标回收率为 76% ~ 92%,相对标准偏差为 0.8% ~ 4.5%,由此可见,该方法的精密度高、稳定、可靠。

表3 样品加标回收率(n = 5)

Table 3 Recovery of standard additions(n = 5)

组分	添加浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	实际浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	加标平均回收率/%	RSD/%
土霉素	2.0	1.72	86	2.9
四环素	1.0	0.92	92	2.3
金霉素	2.0	1.52	76	4.5
氯霉素	1.0	0.85	85	0.8

2.5 实际样品的测定

用1.3的样品处理方法对产自大连海域的银鲑鱼、鲷鱼、海虾和挪威海域的鳕鱼样品进行了前处理,并在1.4的色谱条件下进行了测定,结果表明各样品中土霉素、四环素、金霉素、氯霉素的残留量均在检出限以下。

2.6 溶液的稳定性

土霉素、四环素、金霉素、氯霉素容易受温度、光照等因素的影响而发生氧化降解及杂质干扰,因此进行溶液的稳定性实验,即将测定后的混合标准溶液密封存放于4℃冰箱中30d,在此期间分别对2、3、4、5、6、7、10、20、30d保存的标准溶液进行色谱分析和含量测定。

通过稳定性实验结果表明,在4℃下保存2、3d的样品测定结果变化范围很小,不影响定量结果;而7d后样品会有分解,杂质峰增多,因此,稀溶液的保存时间为5d,定量测定应在3d内完成,否则会对测定结果产生影响。

3 结论

实验建立了同时检测海产品中土霉素、四环素、金霉素和氯霉素的高效液相色谱分析方法,研究结果表明以乙腈和醋酸铵-醋酸/水缓冲液作为流动相,通过二元梯度洗脱,使四种抗生素获得了较好的分离,该方法快速、灵敏、准确性高,可应用于海产品

中抗生素残留的检测。

参 考 文 献

- [1] Masahiko T, Shigeki D, Taketoshi N. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 1011: 67 - 75.
- [2] 王克利, 李明元, 杨笑梅. 动物性食品中动物用药残留量标准及其测定方法[J]. 口岸卫生控制, 2001, 6(6): 3 - 14.
- [3] Pascal M, Veronique P, Eric G. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2003, 994: 75 - 84.
- [4] Zhu J, Snow D D, Monson S J. Analysis of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 928: 177 - 186.
- [5] 谢孟峡, 刘媛, 邱月明, 等. 固相萃取-气相色谱质谱测定动物组织中氯霉素的残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(1): 1 - 4.
- [6] 李荣, 艾晓辉, 邹世平, 等. 气相色谱法测定鱼虾肌肉组织中氯霉素的残留量[J]. 淡水渔业, 2003, 33(6): 17 - 19.

Simultaneous determination by HPLC of four kinds of antibiotics in seafood

WANG Tan¹ CHEN Da-zhou² TANG Hua² LI Lei¹

(1. School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029; 2. National Research Center for Certified Reference Materials, Beijing 100013, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and chloramphenicol in seafood was successfully developed using high performance liquid chromatography with ammonium acetate/ water and acetonitrile as the mobile phase. The results showed that the four antibiotics were well separated under the optimum conditions, with the limits of detection being 32 µg/kg for oxytetracycline, 15 µg/kg for tetracycline, 23 µg/kg for chlortetracycline, and 19 µg/kg for chloramphenicol. The recovery of standard additions was 76 % ~ 92 % and the relative standard deviation was 0.8 % ~ 4.5 %. The method is rapid, sensitive, accurate and reliable and can be applied in the analysis of antibiotic residues in seafood.

Key words: antibiotic; liquid chromatography; separation; determination; seafood