

食品虾仁中土霉素、四环素、金霉素含量测定方法的建立

邢俊生, 张彬, 李倩 (山西省食品药品检验所, 太原 030001)

摘要 目的: 建立高效液相色谱法测定虾仁中土霉素、四环素、金霉素的含量。方法: 采用 C18 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 梯度洗脱, 以甲醇为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 10 mmol·L⁻¹ 三氟乙酸为流动相 C; 流速 1.5 mL·min⁻¹; 检测波长为 350 nm。结果: 土霉素、四环素、金霉素检出限分别为 0.005、0.005 和 0.020 mg·kg⁻¹, 土霉素、四环素线性范围为 0.05 ~ 1.00 μg·mL⁻¹, 相关系数为 0.9996 及 0.9995, 金霉素线性范围为 0.20 ~ 4.00 μg·mL⁻¹, 相关系数为 0.9998; 加标回收率为 73.5% ~ 94.2%。结论: 本方法简便、灵敏、专属, 重复性好, 可用于同时测定虾仁中土霉素、四环素、金霉素的含量。

关键词: 食品安全监测; 土霉素; 四环素; 金霉素; 高效液相色谱; 梯度洗脱

中图分类号: R927.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)10-1199-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.10.018

Establishment of the Method to Determine Terramycin, Tetracycline and Chlorotetracycline in Shrimp Meat

Xing Junsheng, Zhang Bin, Li Qian (Shanxi Institute for food and Drug Control, Taiyuan 030001, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method to determine Terramycin, Tetracycline and Chlorotetracycline in shrimp meat. **Methods:** The column was C18 (250 mm×4.6 mm, 5μm). The gradient elution program was used with a flow rate of 1.5 mL·min⁻¹ and UV detection at 350 nm. Mobile phase A was methyl alcohol; mobile phase B was acetonitrile; mobile phase C was 10 mmol·L⁻¹ trifluoroacetic acid. **Results:** The detection limit of Terramycin, Tetracycline and Chlorotetracycline was 0.005 mg·kg⁻¹, 0.005 mg·kg⁻¹ and 0.020 mg·kg⁻¹, respectively. The linear range of Terramycin and Tetracycline was 0.05-1.00 μg·mL⁻¹. The correlation coefficients were 0.9996 and 0.9995, respectively. The linear range of Chlorotetracycline was 0.20-4.00 μg·mL⁻¹, The correlation coefficient was 0.9998. The recovery rate was 73.5%~94.2%. **Conclusion:** This method was simple, sensitive, exclusive and reproducible, which could be used for simultaneous determination of Terramycin, Tetracycline and Chlorotetracycline in dried shrimp meat.

Keywords: food safety monitoring; Terramycin; Tetracycline; Chlorotetracycline; HPLC; gradient elution

虾仁富含蛋白质、碳水化合物、脂肪及钙、磷、铁等微量元素,具有补肾壮阳、滋阴健胃、通畅血脉之功效,临床上用于治疗肾虚阳痿、筋骨疼痛、皮肤瘙痒、脾胃虚弱等症^[1]。目前,在虾仁生产源头虾的养殖过程中,由于养殖户不规范不正确使用药物,四环素族抗生素如土霉素(OTC)、四环素(TC)、金霉素(CTC)可能被超限量应用于水产生物的养殖中,造成这类药物在水产品中的超量残留。人若长期食用,药物不断在体内蓄积,当浓度达到一定量后,就会对人体产生不良作用,主要表现为对胃、肠、肝脏的损害及牙齿的染色等,还会造成过敏反应、二重感染、致畸胎等作用^[2]。对畜、禽肉类中土霉素、四环素、金霉素的测定,有国家标准方法GB·T5009 116-2003^[3];对于非干制品水产品中土霉素、四环素、金霉素的测定,虽然也有报道^[4-5],但这些方法用于水产干制品的处理效果都不太理想。基于以上情况,本文在这些研究内容的基础上,通过改变色谱条件和样品前处理方法,建立了一种同时测定土霉素、四环素、金霉素3种抗生素的高效液相色谱方法。该法不仅能有效去除样品中的干扰杂质从而保护色谱柱,而且使检测限大大降低,适用于测定水产干制品中土霉素、四环素、金霉素含量,也为制定虾仁的质控标准提供了参考依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

2010AHT型高效液相色谱仪(日本岛津公司),TDL-50B离心机(北京亚泰科隆公司),LV型自动蒸发浓缩仪(美国,TurboV ap),AS3120B型超声波清洗器(天津,奥特赛恩斯仪器有限公

司),MS2型迷你振荡器(德国IKA公司)。

1.2 试剂

标准物质:土霉素批号130487-200703、四环素批号130303-201419、金霉素批号130489-200202,购自中国食品药品检定研究院。5批样品分别为日本对虾(标示产地山东乳山)、凡纳滨对虾(标示产地山东乳山)、中国对虾(标示产地山东乳山)、北极虾(标示产地山东烟台)和脊尾白虾(标示产地山东乳山),均购自山西省太原市水产品市场,经山西省农业科学院植物保护研究所动物专家鉴定。

试剂:乙腈、甲醇(进口色谱纯)购自迪马公司。

自配:乙二胺四乙酸二钠(EDTA)-Mcllvaine缓冲液,配置方法:[取乙二胺四乙酸二钠37.2 g,加Mcllvaine缓冲溶液(pH 4)溶解至1000 mL。Mcllvaine缓冲溶液(pH 4)配置方法:称取磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 276 g、柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 129 g,用水溶解后稀释并定容至1000 mL]。三氯乙酸-水(1:1)

色谱柱为Inertsil ODS-3液相色谱柱C18(填料十八烷基硅胶 250 mm × 4.6 mm, 5 μm;日本岛津);液固萃取柱(Waters Oasis HLB 6cc/200 mg固相萃取柱WAT106202;美国waters公司);0.45 μm微孔滤膜(美国agela公司) 13 mm。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:C18色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温:30 ℃;流动相:甲醇-乙腈-10 mmol · L⁻¹三氟乙酸,梯度洗脱程序见表1。检测波长:350 nm;进样量:20 μL。

表1 梯度洗脱中流动相组分比率变化与时间对应表

时间/min	甲醇/%	乙腈/%	10 mmol · L ⁻¹ 三氟乙酸溶液/%
0	1	4	95
5	6	24	70
9	7	28	65
12	0	35	65
15	0	35	65

2.2 供试品溶液的制备

精密称取本品粉末（过4号筛）5.0 g，置50 mL离心管中，加入25 mL EDTA-McIlvaine缓冲液[McIlvaine缓冲溶液（pH 4）：称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）276 g、柠檬酸（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）129 g、乙二胺四乙酸二钠372 g，用水溶解后稀释并定容至1000 mL]，冰水浴振荡10 min后，加入5 mL三氯乙酸-水（1:1），以2000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速度离心2 min，等静置分层后，5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min，取上清液，向残渣中再加入10 mL缓冲液，2 mL三氯乙酸-水（1:1），经冰水浴超声波振荡提取10 min，5000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min，重复上述操作，合并上清液。

取新的固相萃取小柱（重复使用的小柱用甲醇、5% EDTA-2Na溶液交替冲洗，甲醇浸泡保存），用3 mL甲醇清洗小柱，再用10 mL 5%EDTA-McIlvaine溶液、10 mL蒸馏水依次淋洗，然后将上述滤液分次通过固相萃取小柱（流速2 mL·min⁻¹），再用20 mL 5%甲醇溶液冲洗除去杂质，最后用50 mL甲醇洗脱，收集洗脱液，于自动蒸发浓缩仪上45℃氮吹浓缩至0.2 mL，用0.01 mol·L⁻¹柠檬酸溶液定容至1 mL，经0.45 μm微孔滤膜过滤，供HPLC分析。

2.3 对照品溶液的制备

准确称取适量土霉素、四环素、金霉素标准物质，用甲醇溶解，使成为1.0 mg·mL⁻¹的标准储

备液，于0~4℃避光保存。

分别吸取上述土霉素、四环素、金霉素储备液各0.50 mL，于50 mL容量瓶中用甲醇定容至刻度，混合对照品溶液含土霉素、四环素、金霉素各10.0 μg·mL⁻¹。

2.4 精密度试验

取对照品溶液，按上述方法进行重复测定（n=6），计算精密度，其相对标准偏差（RSD）分别为土霉素1.42%，四环素1.37%，金霉素2.10%。

2.5 方法的检出限

以3倍信噪比计算检出限，四环素、土霉素为5 μg·kg⁻¹，金霉素为20 μg·kg⁻¹；四环素、土霉素比国标方法^[3]降低10倍，金霉素降低2.5倍。

2.6 线性关系考察

准确吸取上述混合对照品溶液0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 mL分别置于100 mL容量瓶中，加甲醇2 mL，用0.01 mol·L⁻¹柠檬酸溶液定容至刻度，得到含土霉素、四环素、金霉素0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、4.00 μg·mL⁻¹，的标准系列溶液。在上述色谱条件下测定，以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标绘制标准曲线。

土霉素、四环素在0.05~1.00 μg·mL⁻¹浓度范围内呈线性关系，金霉素在0.20~4.00 μg·mL⁻¹浓度范围内呈线性关系，其线性方程和相关系数见表2。

表2 土霉素、四环素、金霉素的线性方程和线性相关系数

名称	线性方程	线性相关系数
土霉素	$Y=980296X+68418$	0.9996
四环素	$Y=954491X+52307$	0.9995
金霉素	$Y=314827X+13695$	0.9998

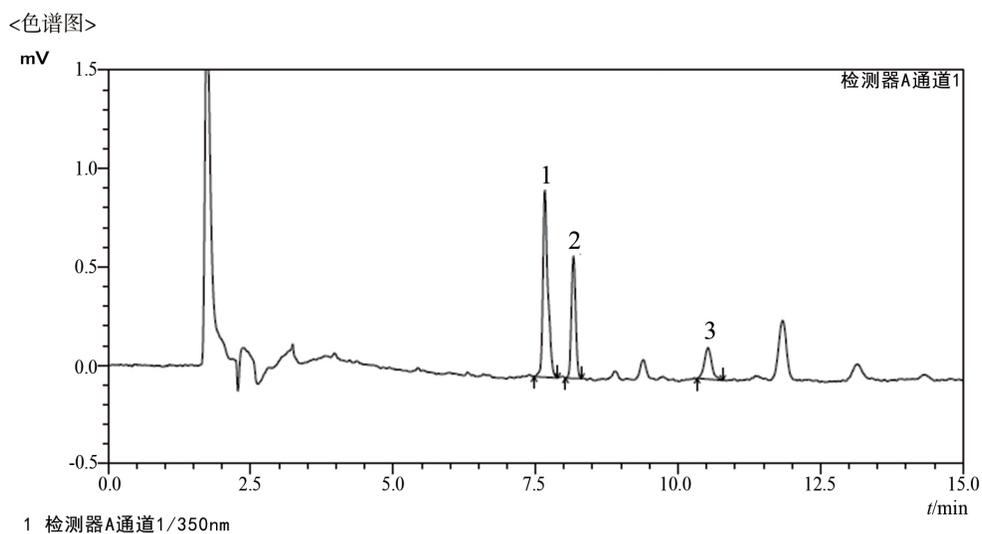
2.7 加样回收率试验

在不含3种四环素类抗生素的虾仁样品中，加入不同浓度范围的土霉素、四环素和金霉素标准

品，再按样品提取和测定方法，测定3种抗生素含量，计算加标回收率。结果见表3、图1~2。

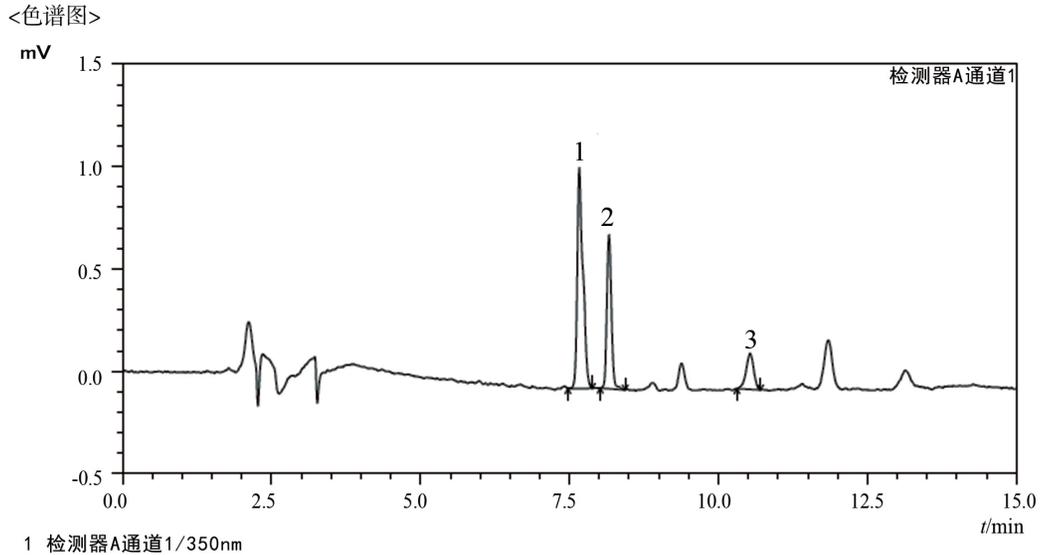
表3 回收率试验结果

被测组分	本底值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	加标量 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	测定值 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	回收率 / %
土霉素	0	20	16.9	84.5
		50	45.3	90.6
		100	94.2	94.2
四环素	0	20	17.6	88.0
		50	45.4	90.8
		100	93.6	93.6
金霉素	0	20	14.7	73.5
		50	42.7	85.4
		100	89.1	89.1



1. 土霉素; 2. 四环素; 3. 金霉素。

图1 加样回收样品 HPLC 色谱图



1. 土霉素; 2. 四环素; 3. 金霉素。

图2 对照品 HPLC 色谱图

2.8 样品测定结果

对市场上购得的5批样品进行检测, 由于样品代表性问题, 5批样品中土霉素、四环素、金霉素均未检出。

3 讨论

3.1 流动相的选择

国标方法^[3]中使用乙腈-0.01 mol·L⁻¹磷酸二氢钠溶液 (pH 2.5) (35 : 65), 经试验分离效果不理想; 采用梯度洗脱, 能使3种抗生素各峰分离完全, 且峰形良好, 保留时间稳定。

3.2 固相萃取条件的选择

固相萃取条件的选择主要是洗脱液的选择。根据文献资料报道^[4], 分别用5%、20%、50%、100%甲醇溶液作洗脱液, 进行HPLC测定, 所选定的最佳洗脱液为5%甲醇溶液 (用纯甲醇配置)。

3.3 提取液的选择

经比较, 在相同的条件下, Mellvaine缓冲液的提取效率优于其他缓冲液, 因为四环素类抗生素易与二价金属离子形成配合物, 且四环素类抗生素的性质属于酸碱两性物质, 易与蛋白质发生缔合作用, 需用强酸或酸性蛋白提取, 但是酸性过强 (pH<2), 四环素类药物又易发生降解, 并且可以结合生物样品中的蛋白质, 形成不溶性、难吸收

的络合物; 在碱性条件下则易生成分子异构体; 而通常在弱酸性溶液中比较稳定, 所以应该选择含金属络合剂的弱酸性提取液。

3.4 样品前处理方法的选择

比较不经固相萃取及经固相萃取的样品HPLC谱图发现, 经过固相萃取柱纯化并浓缩的样品, 杂质峰较少, 土霉素峰、四环素峰清晰, 并可看到金霉素峰; 而未经固相萃取的样品土霉素峰、四环素峰很低, 杂质峰多, 检测不到金霉素。故本方法具有选择性强、分离时间短、使用有机溶剂少、不发生乳化现象等优点。

3.5 检测波长的选择

据报道^[6], 四环素类化合物含有苯环、酮基和烯醇组成的共轭体系, 具有两个发色团, 在近可见光区 (350 nm附近) 具有强的紫外吸收。土霉素、四环素、金霉素3种抗生素在260和350 nm 两个波长附近都有吸收峰, 在 260 nm 附近的吸收最大, 但因为杂质在短波长吸收较大, 因此选择了350 nm 为3种抗生素共同的检测波长。

采用本方法对样品前处理方法进行改进, 与国标方法相比较, 在取样量没有增加的情况下对样品进行浓缩处理, 并调整流动相比比例, 采用梯度洗脱, 能使各色谱峰避免受杂质峰的干扰, 得到良好

的分离,保留时间稳定,线性范围好,精密度和准确度均获得满意的结果,能满足水产干制品的分析要求,具有实际应用价值。

参考文献:

- [1] 山东省中药材标准:2012年版[S].2012:187
- [2] 徐熔泽,赵凤利.浅谈兽药残留的危害[J].中国畜牧兽医文摘,2012,(5):194-196.
- [3] GB/T5009,116-2003食品卫生检验方法,理化部分(二)[S].2003.
- [4] 罗晓燕,林玉娜,刘莉治.SPE-HPLC法同时测定水产品中

四种抗生素残留的研究[J].现代预防医学,2005,32(3):198-220.

- [5] 许韡,吴于.HPLC法同时检测水产品中残留氯霉素、四环素、金霉素和土霉素[J].中国卫生检验杂志,2013,23(4):819-823.
- [6] 吉彩霓,岳振峰,谢丽琪,等.高效液相色谱法同时检测水产品中7种四环素类抗生素残留的研究[J].中国兽医科技,2005,35(10):820-826.

(收稿日期 2016年4月29日 编辑 范玉明)