

高效液相色谱法测定水产品中四环素类抗生素残留

陆梅,高翔,李淑文

(淮安市环境监测中心站,江苏 淮安 223001)

摘要:建立了固相萃取-高效液相色谱测定水产品中四环素类抗生素残留的方法,优化了前处理方法和色谱条件。方法在 0 mg/L ~ 1.0 mg/L 范围内线性良好,四环素、土霉素和金霉素的检出限分别为 0.02 mg/kg、0.01 mg/kg 和 0.05 mg/kg,样品测定的 RSD 分别为 6.8%、7.2% 和 8.5%,加标回收率分别为 55.2% ~ 81.0%、60.5% ~ 70.5% 和 52.5% ~ 73.5%。

关键词:四环素;土霉素;金霉素;高效液相色谱法;水产品

中图分类号: O657.7⁺2

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2008)05-0038-02

水产品中抗生素残留来源于饲料中添加的抗生素,通过生物富集作用积蓄于人体,使机体内病菌耐药性增加,造成免疫系统功能降低。饲料中添加的抗生素达 23 种,其中四环素类占 57%。测定四环素类抗生素的方法很多,高效液相色谱法是常用的一种^[1]。今采用高效液相色谱法测定水产品中的四环素、土霉素和金霉素,分离效果好,定量准确。

1 试验

1.1 主要仪器与试剂

Waters-2695 型高效液相色谱仪,配 2996 型二极管阵列检测器,美国 Waters 公司;Waters Oasis HLB 固相萃取柱,1.0 g/L 四环素、土霉素、金霉素标准储备液(土霉素溶剂为 0.1 mol/L 盐酸溶液,四环素和金霉素的溶剂为水);乙腈、甲醇、正己烷、二氯甲烷,色谱纯;磷酸、磷酸二氢钠、无水硫酸钠,分析纯。

1.2 色谱条件

Nova-Pak C18 (4 μm, 3.9 mm × 150 mm) 色谱柱;流动相为 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液-乙腈混合溶液(体积比为 4:1),pH 值 = 3;流量 1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长 350 nm;进样体积 10 μL。

1.3 试验方法

1.3.1 样品前处理

取 10 g 样品,加 10 g 无水硫酸钠和 40 mL 二氯甲烷,匀浆,超声萃取 10 min,离心 5 min,取上清液于 250 mL 棕色分液漏斗中。沉淀物再加入

20 mL 二氯甲烷,搅拌,超声 10 min,离心 5 min。合并二氯甲烷液,加入正己烷 25 mL,振提 3 min。弃去正己烷层,将二氯甲烷液旋转蒸发至近干,加入 5 mL 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 = 3)溶解残渣,过 HLB 柱,用 10 mL 甲醇洗脱,氮气吹干,用流动相定容至 2 mL,经 0.45 μm 滤膜过滤后待测。

1.3.2 标准曲线绘制和样品测定

用流动相配制 0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L 四环素、土霉素、金霉素标准溶液系列,按上述条件测定,以峰面积对质量浓度绘制标准曲线,同时测定样品和试剂空白,由标准曲线计算结果。

2 结果与讨论

2.1 前处理方法

2.1.1 提取溶剂的选择

水产品中药物残留常用的提取溶剂有乙腈、乙酸乙酯和二氯甲烷。乙腈沸点高,提取液浓缩耗时较长,且过高的温度会影响药物的稳定性^[2];乙酸乙酯提取时浸出杂质多,过 HLB 柱后仍有基质干扰。试验表明,用二氯甲烷提取,浸出杂质少,易排除基质干扰,效果理想。

2.1.2 脱脂方法的选择

样品采用二氯甲烷提取,而二氯甲烷属中等极性溶剂,有可能提取出脂类物。因此,提取液需脱除脂类物。该试验选择用正己烷液-液萃取脱脂,效果较好。

收稿日期:2007-12-07;修订日期:2008-06-03

作者简介:陆梅(1975—),女,江苏淮安人,工程师,本科,从事环境监测工作。

2.1.3 固相萃取柱的选择

单纯的液-液萃取很难保证色谱分析时不出现基质干扰。试验选择普通的 C18 固相萃取柱, 净化效果不理想, 可能是硅羟基活性的原因^[31]。经筛选, 改用 Waters Oasis HLB 固相萃取柱(二乙烯基苯-N-乙烯基吡咯烷酮共聚物), 杂质去除效果好, 回收率和重现性均较好。四环素、土霉素和金霉素的标准色谱峰见图 1。

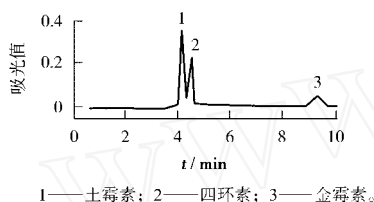


图 1 标准色谱峰

2.2 色谱条件的选择

四环素类抗生素呈弱极性, 在弱酸性条件下较稳定, 大多采用磷酸二氢钠作为缓冲溶液, 但缓冲液浓度和流动相 pH 值差别较大^[4-5]。试验发现, 随着缓冲液浓度增加, 分析时间缩短, 但土霉素和四环素不能分离; 缓冲液浓度降低, 分离改善, 但峰形变差; 缓冲液浓度为 0.01 mol/L 时, 3 种物质能较好分离且峰形较好。考虑四环素类抗生素在弱酸性条件下较稳定, 选择流动相 pH 值为 3。

采用二极管阵列检测器分别测定 3 种物质的最佳吸收波长, 确定测定波长为 350 nm。

2.3 标准曲线

四环素、土霉素和金霉素的标准曲线见表 1。

表 1 标准曲线

化合物	标准曲线	相关系数 <i>r</i>
四环素	$y = 2.11 \times 10^5 x - 2.82 \times 10^5$	0.999 1
土霉素	$y = 2.42 \times 10^5 x - 1.14 \times 10^5$	0.999 4
金霉素	$y = 5.76 \times 10^4 x - 9.80 \times 10^4$	0.998 2

2.4 检出限

将烘箱中于 105 °C 烘烤 5 h 的洁净石英沙作

为空白, 取 10 g 加入 0.1 μg 标准物质, 平行测定 7 次, 按 3 倍标准偏差计算四环素、土霉素、金霉素的检出限分别为 0.02 mg/kg, 0.01 mg/kg, 0.05 mg/kg。

2.5 精密度与加标回收试验

对同一样品平行测定 5 次, 四环素、土霉素、金霉素测定的 RSD 分别为 6.8%、7.2%、8.5%。

同时称取两份 10 g 样品, 一份加入 0.5 μg 标准物质作加标回收试验, 四环素、土霉素、金霉素的回收率分别为 55.2% ~ 81.0%、60.5% ~ 70.5%、52.5% ~ 73.5%。

2.6 实际样品测定

对洪泽湖周边地区 3 个主要水产养殖基地的水产品采样检测, 样本数为 13 个, 四环素均未检出, 土霉素有 6 个样本检出, 测定值分别为 35 μg/kg, 35 μg/kg, 74 μg/kg, 27 μg/kg, 69 μg/kg, 37 μg/kg, 金霉素有 2 个样本检出, 测定值分别为 21 μg/kg, 25 μg/kg。实际样品色谱峰见图 2。

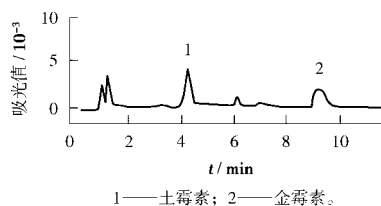


图 2 实际样品色谱峰

[参考文献]

- [1] 李明远. 高效液相色谱及其在食品分析中的应用 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1988: 133 - 141.
- [2] 叶树德. 食品中兽药残留卫生技术 [M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1998: 77 - 79.
- [3] 王梅, 张莘明. 我国环境中有机物分析方法及痕量富集技术的进展 [J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16(1): 13 - 16.
- [4] 杨惠芬, 李明元, 沈文. 食品卫生理化检验标准手册 [M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 267 - 268.
- [5] 阎勇, 芦桂华, 张华, 等. 卫生理化检验文集 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1990: 9 - 11.