

动物源性食品中四环素类药物残留量的测定

李运华

应用及技术服务部

天津博纳艾杰尔科技有限公司, 天津开发区西区南大街179号, 300462

概述

本方法重现GB 31658.6-2021标准, 采用PEP-2 500 mg/6 mL和LCX 500 mg/6 mL小柱对猪脂肪样品进行净化和富集, 结果显示添加浓度在0.4 mg/Kg下基质加标过柱回收率满足要求。

关键词

四环素; Cleanert PEP-2; Cleanert LCX; Prodigy ODS-3; LC-UV

化合物信息

表1. 化合物信息

| 中文名称 | 英文名称 | CAS号 | 分子式 | 分子量 |
|------|-------------------|----------|---|--------|
| 土霉素 | Oxytetracycline | 79-57-2 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉ | 460.43 |
| 四环素 | Tetracycline | 60-54-8 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 444.43 |
| 金霉素 | Chlortetracycline | 57-62-5 | C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ | 478.88 |
| 多西环素 | Doxycycline | 564-25-0 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ | 444.43 |

实验部分

3.1 仪器、试剂与材料

3.1.1 主要仪器设备

液相色谱仪(Agilent 1100);
固相萃取装置
氮吹浓缩仪

3.1.2 试剂材料

固相萃取柱:
Cleanert PEP-2, 500 mg/6 mL, P/N: PE5006-2;

Cleanert LCX, 500 mg/6 mL, P/N: LCX5006;
微孔滤膜: 0.22 μm水系滤膜;
实验用水、乙腈、甲醇均为色谱级, 三氟乙酸、二氯甲烷、乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸、磷酸氢二钠、草酸为分析纯。

3.1.3 样品

猪脂肪带皮, 搅碎备用。

3.1.4 标准品

土霉素、四环素、金霉素、多西环素混标(1 mg/mL)外购, 避光-18 °C保存;

柠檬酸溶液: 柠檬酸一水合物21.01 g水稀释至1 L

磷酸氢二钠溶液: 磷酸氢二钠十二水合物71.63 g水稀释至1 L

Mcllvain缓冲液: 柠檬酸溶液1 L, 磷酸氢二钠溶液625 mL混匀, 盐酸货氢氧化钠调pH至4.0±0.05

EDTA•2Na-Mcllvaine缓冲液: 乙二胺四乙酸二钠 60.5 g加Mcllvain缓冲液1625 mL混匀

草酸溶液 (0.01 M): 取草酸1.26 g水稀释至1 L

草酸溶液 (1M): 取草酸12.6 g水稀释至1 L

草酸-乙腈溶液: 草酸溶液 (1 M) 20 mL乙腈稀释至100 mL

3.2 样品前处理方法

提取: 取5 g (准确至±0.02 g), 加二氯甲烷15 mL, 涡旋1 min振荡5 min, 加EDTA•2Na-Mcllvaine缓冲液15 mL, 涡旋1 min振荡5 min, 8000 r/min离心5 min, 取上清液。下层溶液用EDTA•2Na-Mcllvaine缓冲液重复萃取2次, 每次15 mL, 合并上清液, 备用

净化: PEP-2依次用甲醇水和EDTA•2Na-Mcllvaine缓冲液各5 mL活化。提取液全部上样, 依次用水、5%甲醇溶液各10 mL淋洗, 抽干

30 s, 甲醇6 mL洗脱, 收集洗脱液于离心管中, 向内加2 mL 8 mM磷酸二氢钠水溶液 (pH5.0) 混匀, 过甲醇5 mL、水5 mL活化的LCX小柱, 待上样液全部流出后, 用水、甲醇各5 mL淋洗, 抽干1 min, 草酸-乙腈溶液6 mL洗脱。

洗脱液浓缩: 收集洗脱液于40 °C氮吹至0.5-1 mL, 用草酸溶液 (0.01 M) 定容至2 mL上样检测。

3.3仪器检测条件

色谱柱: Prodigy ODS-3 (4.6×150 mm, 5 μm) ; P/N:00F-4097-E0

流动相A相: 0.08%三氟乙酸水溶液;

流动相B相: 乙腈;

流速: 1 mL/min;

柱温: 30 °C;

检测器: 350 nm

进样量: 50 μL;

梯度程序见表2:

表2. 梯度条件

| 时间 (min) | 流速 (mL/min) | A (%) | B (%) |
|----------|-------------|-------|-------|
| 0 | 1.0 | 90 | 10 |
| 5 | 1.0 | 80 | 20 |
| 15 | 1.0 | 65 | 35 |
| 16 | 1.0 | 90 | 10 |
| 25 | 1.0 | 90 | 10 |

3.4结果与讨论

3.4.1基质加标回收率结果

土霉素扣除基质本底计算回收率

表4. 基质加标回收实验结果 (n=3)

| 化合物 | 理论加标浓度 (μg/Kg) | 回收率% | RSD% |
|------|----------------|------|------|
| 土霉素 | 400 | 102 | 13 |
| 四环素 | 400 | 94 | 3 |
| 金霉素 | 400 | 87 | 3 |
| 多西环素 | 400 | 88 | 2 |

3.4.2标样氮吹回收率结果

标样加6mL草酸-乙腈溶液于40 °C氮吹至0.5-1 mL, 用草酸溶液 (0.01 M) 定容至2 mL上样检测。回收率土霉素94.1%四环素94.0%金霉素97.1%多西环素94.5%

3.5实验谱图

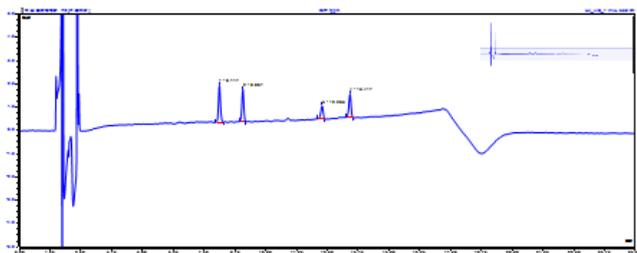


图1. 小柱空白与标样重叠色谱图

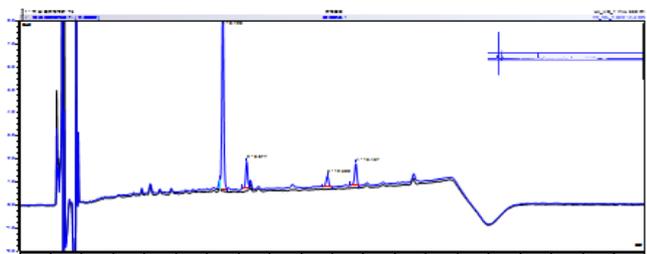


图2. 基质加标色谱图

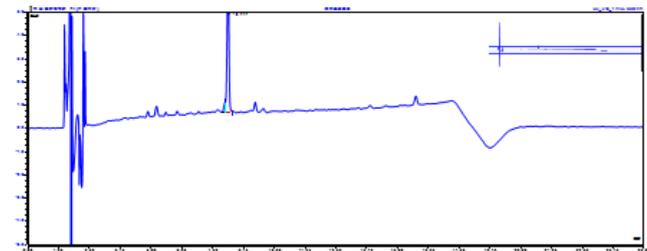


图3. 基质空白色谱图

结论

本文重现了GB 31658.6-2021动物源性食品中四环素类药物残留量的测定。使用固相萃取装置搭配Cleanert PEP-2和Cleanert LCX固相萃取小柱对猪肉样品进行净化和富集, 液相色谱检测。实验中400 μg/Kg添加回收率在85%以上, RSD值均小于15%, 能够满足标准检测方法要求。基质有土霉素本底, 影响回收率的RSD。



Xccelerator 加速服务

探索分离, 使命加速

Mission to Accelerate Separation

在新药、仿制药研发和科学研究过程中, 抢占先机越来越多被大家提及, 同时在食品、环境、临床等行业的客户也都面临着项目周期压缩的压力。基于此, 我们成立了上海和天津两个方法开发服务中心, 为客户加快项目进度提供支持。

Xccelerator 以客户为中心, 以色谱技术为中心, 为药物研发和科学研究提供全方位加速服务。

三大研发中心

中国天津

地址: 天津市开发区西区南大街179号

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

中国上海

地址: 上海市长宁区福泉北路518号1号楼1层

电话: 400-606-8099

邮箱: cninfo@phenomenex.com

美国总部

地址: 411 Madrid Avenue Torrance, CA 90501-1430, USA

Tel: +1 (310) 212-0555

Fax: +1 (310) 328-7768

Email: cninfo@phenomenex.com

仅用于研究目的, 不可用于临床诊断程序。

© 2022 天津博纳艾杰尔科技有限公司保留所有权利。

