

高效液相色谱法检测鸡蛋中泰乐菌素残留

刘敬先*

(辽宁省检验检测认证中心, 沈阳 110030)

摘要: 目的 建立一种鸡蛋中泰乐菌素残留的高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC)检测方法。**方法** 样品中的泰乐菌素残留, 经二氯甲烷提取, 离心分层净化, 高效液相色谱法测定, 外标法定量。**结果** 本方法在 20 min 内完成泰乐菌素的分离。泰乐菌素在 100、200 和 500 $\mu\text{g/L}$ 添加水平的回收率为 74.59%~102.03%, 相对标准偏差小于 10%($n=6$), 方法检出限为 50 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。**结论** 该方法快速、准确, 适合测定泰乐菌素残留。

关键词: 鸡蛋; 高效液相色谱法; 泰乐菌素; 残留

Determination of tylosin residues in egg by high performance liquid chromatography

LIU Jing-Xian*

(Liaoning Inspection, Examination & Certification Centre, Shenyang 110030, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of tylosin residues in egg by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The residue of tylosin in the sample was extracted by dichloromethane, purified by centrifugation and stratification, determined by high performance liquid chromatography, and quantified by external standard method. **Results** This method could complete the separation of tylosin within 20 min. The recoveries for tylosin residues with 3 spiked levels of 100, 200 and 500 $\mu\text{g/kg}$ were ranged from 74.59% to 102.03%, with the relative standard deviations (RSDs) less than 10% ($n=6$). The limit of detection was 50 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantitation was 100 $\mu\text{g/kg}$. **Conclusion** This method is rapid and accurate, which is suitable for determination of tylosin residues in egg.

KEY WORDS: egg; high performance liquid chromatography; tylosin; residues

1 引言

泰乐菌素以酸盐形式存在, 常见酒石酸盐、磷酸盐和硫酸盐, 其中泰乐菌素的酒石酸盐和磷酸盐在养殖过程中应用广泛。如《中国兽药典》2015 年版一部中, 酒石酸泰乐菌素可溶性粉治疗革兰氏阳性菌及支原体感染, 混饮以泰乐菌素计: 每 1 L 水, 禽 500 mg, 连用 3~5 d; 磷酸泰乐

菌素预混剂用于防治细菌及支原体感染, 混饲以泰乐菌素计: 每 1000 kg 饲料, 鸡 4~50 g。酒石酸泰乐菌素在肠道中容易被吸收, 而磷酸泰乐菌素在肠道中吸收利用度很低。

因酒石酸泰乐菌素肠道吸收好、体内扩散快、血药浓度高、抗菌谱广、促生长作用明显, 在蛋鸡集中化饲养过程中, 不仅能够预防和治疗疾病, 还可作为饲料添加剂使用, 促使机体生长或者产蛋率提高。但其容易在机体或鸡

基金项目: 2013 年度农业行业(国家)标准制修订项目(2013-48)

Fund: Supported by Agricultural Industry (National) Standard Revision Project in 2013 (2013-48)

*通讯作者: 刘敬先, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为兽药、饲料、畜产品等质量安全及检测技术研究。E-mail: 13604026568@139.com

*Corresponding author: LIU Jing-Xian, Master, Senior Veterinarian, Animal Medicine and Feed Supervision Institute of Liaoning Province, Shenyang 110030, China. E-mail: 13604026568@139.com

蛋中残留,即使加热也不易分解,间接加剧细菌耐药性^[1-8]。目前,畜禽产品和投入品中泰乐菌素的检测方法以液相色谱-串联质谱法居多,高效液相色谱法较少且回收率偏低。

本方法是对现行标准《农业部 1163 号公告-6-2009 动物性食品中泰乐菌素残留检测 高效液相色谱法》的修订,原标准的固相萃取净化步骤中使用水和甲醇 2 次淋洗,而实际样品中酒石酸泰乐菌素易溶于水、极易溶于甲醇,因相似相溶原理泰乐菌素将在洗脱前被淋洗至废液,且重复性实验中实际平均回收率低于 20%;本方法旨在提高方法回收率和使高效液相方法检测泰乐菌素具备良好的可操作性,同时优化了提取液、提取净化方式、流动相、复溶剂等重要内容,使本方法的平均回收率高于 70%,同时具有可接受的定量限和检测限。推广修订后的新标准,可对全国的超市和农贸市场中的鸡蛋进行监测,以确保大环内酯类药物泰乐菌素无残留或不超限,从而达到规避生物耐药性风险和规范市场的目的。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent1100 液相色谱仪(安捷伦科技有限公司);EZ-2 溶剂蒸发仪(英国 GeneVac 公司);Thermo Biofuge D-37520 冷冻离心机(美国赛默飞公司);Athena C18-WP 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, 上海安谱实验科技股份有限公司)。

对照品:酒石酸泰乐菌素(tylosin tartrate, 纯度≥99.0%, 批号:128316, 德国 DR.Ehrenstorfer GmbH 公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯, Fisher 公司);盐酸、二氯甲烷、高氯酸钠(分析纯, 国药集团试剂有限公司);0.45 μm PTFE 微孔滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司);实验室用水为屈臣氏蒸馏水。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

泰乐菌素对照品储备液:精密称定酒石酸泰乐菌素对照品 20 mg, 含泰乐菌素 18.48 mg, 用甲醇溶解定容至 100 mL, 配制成 184.8 mg/L 的储备液。于 2~8 °C 冷藏保存, 有效期 30 d。酒石酸泰乐菌素对照品中间液:取泰乐菌素对照品储备液 5.0 mL, 用甲醇溶解定容至 100 mL, 配制成 9.24 mg/L 的中间液, 有效期 7 d。注:酒石酸泰乐菌素折算系数 F 值见产品说明书, 因分子式不同分别为 0.924(双聚 916.10×2/1982.31)或 0.859(单聚 916.10/1066.2)

高氯酸钠溶液:称取高氯酸钠 200 g, 加 800 mL 水溶解后, 用盐酸调节 pH 值至 2.5, 转移至 1000 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 摇匀, 0.45 μm 微孔滤膜过滤后即得。

流动相:乙腈与高氯酸钠溶液按体积比(2:3, V:V)混合超声脱气即得。

复溶剂:乙腈与水按体积比(1:1, V:V)混合超声脱气即得。

2.2.2 样品前处理

(1) 采样和试样制备

取 6 枚新鲜、冷冻或冷藏的空白鸡蛋、供试鸡蛋, 去壳, 匀浆使均匀, 装入离心管于 -20 °C 以下贮存备用。

(2) 提取

称取鸡蛋试料 1 g(精确至 0.01 g), 置于 10 mL 离心管中, 加二氯甲烷 5 mL 旋涡混合提取 1 min, 中速振荡 5 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取出下清液, 残余试料用 5 mL 二氯甲烷重复提取一次, 合并下清液。

(3) 净化

静置约 1 min 待提取液分层清晰, 去杂, 转移澄清液至 10 mL 离心管, 10000 r/min 离心 5 min, 取澄清液置于溶剂蒸发仪, 在 30 °C、50 mbar 低速离心条件下蒸干。用 1.0 mL 复溶剂溶解残余物, 涡旋混合 1 min, 10000 r/min 离心 5 min 后, 用一次性注射器吸取复溶剂中澄清部分, 经 0.45 μm 微孔滤器过滤, 收集至进样小瓶中, 供高效液相色谱测定。

2.2.3 液相色谱条件

上海安谱 Athena C18-WP 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相:乙腈与高氯酸钠溶液(2:3, V:V)混合超声脱气即得, 流速:1.5 mL/min, 进样体积:25 μL, 柱温:30 °C, 检测波长 290 nm。

2.3 方法的线性范围确定

依次准确移取对照品中间液 1.00、2.00、3.00、4.00、5.00 mL 置于 50 mL 容量瓶中, 复溶剂稀释得到上机浓度分别为 200、400、600、800、1000 μg/L 的系列混合标准溶液, 经高效液相色谱测定, 每个浓度重复 2 次, 以泰乐菌素峰面积与对应浓度, 绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

3.1.1 流动相条件优化

流动相采用乙腈与高氯酸钠溶液按体积比混合。

引入高氯酸钠溶液的目的是为了稳定 pH 值和修饰泰乐菌素的峰形, 在合理范围内应将高氯酸钠的比重降到最低, 以减轻高盐流动相对液相和色谱柱的损伤, 对比高氯酸钠溶液比重为 50、100、150、200 g/L 时的色谱图, 随着高氯酸钠的比重升高, 泰乐菌素的峰形愈变得尖锐且峰宽变小, 但基线噪音也随之增大。为追求峰形最优和定量准确, 故确定泰乐菌素流动相中高氯酸钠溶液的比重为 200 g/L。

调节乙腈和高氯酸钠溶液体积比为 1:1、2:3、1:2、1:3, 对比相应色谱图发现, 提高乙腈的比例可加强流动相的洗脱能力和缩短泰乐菌素的出峰时间, 当体积比为 1:1 时泰乐菌素的出峰时间已缩短至 6 min 以内, 不利于泰乐菌素峰与杂质峰的分离;当体积比为 1:2 或 1:3 时泰乐菌素出峰时间延迟至 15 min 之后且拖尾加剧和基线噪音增强, 不利

于检测定量; 当体积比为 2:3 时, 泰乐菌素峰于 7~12 min 范围内出峰且峰形尖锐、能与相邻干扰峰与基线分离, 故确定流动相中乙腈和高氯酸钠的体积比为 2:3^[9,10]。

3.1.2 检测波长选择

进行波长扫描(如图 1), 显示泰乐菌素在 280~290 nm 处, 杂质干扰小, 响应值最大, 实际比较泰乐菌素色谱图响应值, 最后确认波长为 290 nm^[11,12]。

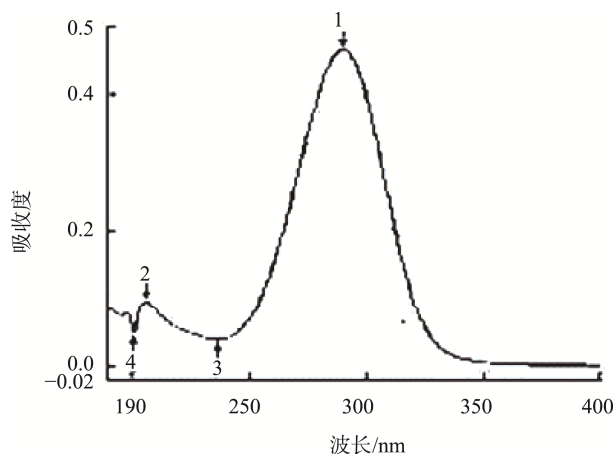


图 1 泰乐菌素紫外吸收图谱

Fig.1 The UV absorbance spectrum of tylosin

3.2 前处理条件优化

3.2.1 提取条件优化

鸡蛋基质较为特殊, 选择提取液时, 本研究实际比较了甲醇、乙腈、三氯甲烷、二氯甲烷等提取液的提取效率, 提取效率排序为甲醇 > 乙腈 > 三氯甲烷 > 二氯甲烷。随着提取效率的提高, 提取液中所含杂质质量明显提高, 净化难度大大提升, 为泰乐菌素峰不受杂质干扰且能在色谱图上达到基线分离, 最终确定提取液为提取效率偏低的二氯甲烷, 实测经 2 次重复提取, 泰乐菌素的提取效率约为 80%。

在确定了提取液后, 还需考虑乳化程度、蛋白质变性程度与提取液用量的关系, 实际比较鸡蛋的质量(g)和提取液体积(mL)的比例为 1:2、1:3、1:5、1:6 时的提取分层效果, 例如称取 5 g 鸡蛋分别加入 10 mL、15 mL 二氯甲烷涡旋振荡提取, 结果蛋白质变性不充分且乳化严重, 提取液浑浊提取无法顺利进行; 称取 1 g 鸡蛋分别加入 5 mL、6 mL 二氯甲烷涡旋振荡提取, 蛋白质变性充分且基质乳化收敛呈流线型, 可将提取液倒出, 故最终确定提取液用量为 1:5(m:V)。

3.2.2 净化条件优化

本研究考察了固相萃取(solid phase extraction, SPE)方式净化, 测算了 HLB 小柱、SCX 小柱、C₁₈ 小柱、硅胶小柱、碱性氧化铝小柱、MCX 小柱、MAX 固相萃取小柱的预柱实验回收率(表 1), 除 HLB 和 C₁₈ 小柱外回收率均小于 60%。系统优化 HLB 和 C₁₈ 小柱的洗脱方式, 未能将回收率提高至预期 80%(实际不足 75%)且去除脂溶性杂质效果

不佳, 故放弃固相萃取净化方式, 改为去除肉眼可见杂质和增加离心次数的净化方式^[13-16]。

表 1 不同萃取柱回收率结果

Table 1 Recovery results of different extraction columns		
固相萃取小柱类型	预柱实验回收率	备注
HLB	60%~75%	通过优化洗脱方式, 未能将回收率提高至 75%以上
SCX	< 60%	回收率过低, 未进一步优化
C ₁₈	60%~75%	通过优化洗脱方式, 未能将回收率提高至 75%以上
硅胶	< 60%	回收率过低, 未进一步优化
碱性氧化铝	< 60%	回收率过低, 未进一步优化
MCX	< 60%	回收率过低, 未进一步优化
MAX	< 60%	回收率过低, 未进一步优化

3.3 鸡蛋中泰乐菌素色谱图

对照品溶液图谱、空白鸡蛋图谱、添加回收鸡蛋图谱见图 2~4。

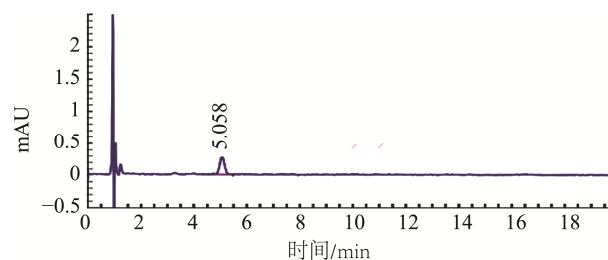


图 2 泰乐菌素标准溶液色谱图(200 µg/L)

Fig.2 Chromatogram of tylosin standard solution (200 µg/L)

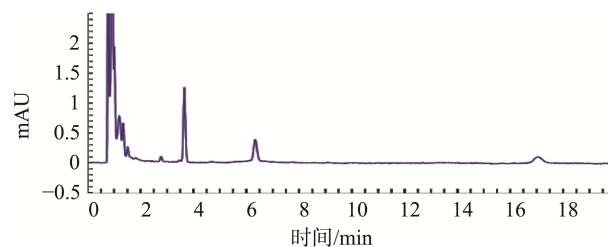


图 3 空白鸡蛋样品溶液色谱图

Fig.3 Chromatogram of blank egg samples

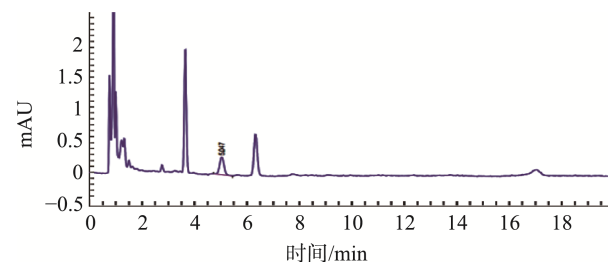


图 4 回收样品溶液色谱图(200 µg/kg)

Fig.4 Chromatogram of recovered samples (200 µg/kg)

表 2 泰乐菌素方法的标准曲线
Table 2 Standard curve of tylosin

目标组分	对照品浓度 <i>c</i> /(mg/L)	峰面积 1	峰面积 2	峰面积平均值	线性方程	相关系数 <i>r</i>	线性范围 /(μg/mL)
泰乐菌素	0.20	2.73	2.91	2.82	$A=12.58C+0.2060$	0.9985	0.20~1.00
	0.40	5.51	5.28	5.395			
	0.60	8.14	8.58	8.36			
	0.80	10.46	10.57	10.515			
	1.00	13.20	12.47	12.835			

3.4 方法的线性范围

由实验结果绘制标准曲线 $A=12.58C+0.2060$, 相关系数为 0.9985, 在 0.20~1.00 mg/L 范围内线性达到满意, 详细结果见表 2。

3.5 方法的检出限和定量限

参考《食品安全国家标准动物性食品中兽药最大残留限量(报批稿)》, 泰乐菌素在鸡蛋中最高残留限量为 300 μg/kg, 在实际考察了定量限 100 μg/kg 后, 回收结果达到满意。依据 3 倍基线噪音为检出限、10 倍基线噪音为定量限的对应原则, 确定本标准中的方法检出限为 50 μg/kg。

3.6 回收率及精密度实验

以空白鸡蛋为样品, 在 100、200 和 500 μg/kg 3 个水平下进行加标回收实验, 计算方法的精密度均小于 10%, 回收率在 74.59%~102.03% 之间, 在方法要求范围 70%~110% 内, 回收率达到满意, 详细结果见表 3。

表 3 泰乐菌素测定方法的精密度和回收率(%)
Table 3 The precision and recovery of the method for the determination of tylosin (%)

	低浓度	中浓度	高浓度
	100 μg/L	200 μg/L	500 μg/L
泰乐菌素	76.22	81.06	77.74
	88.40	86.49	85.26
	84.09	89.97	89.28
	102.03	91.87	85.03
	84.59	74.59	75.56
平均值	92.66	95.41	76.00
平均值	88.00	86.57	81.48
SD	0.0876	0.0763	0.0577
CV	0.099	0.088	0.070

3.7 实际样品测定

在辽宁省内的超市和农贸市场中随机抽取 15 批鸡蛋

样品, 采用本方法测定, 均未检出泰乐菌素。

4 结论

通过优化提取溶液体系, 有效提高了鸡蛋中泰乐菌素残留的回收率; 以多次离心沉降代替固相萃取净化, 减少了前处理损失; 优化流动相和检测波长, 保证了泰乐菌素与临近杂质的色谱分离效果, 建立了特殊基质鸡蛋中亲脂性药物泰乐菌素回收率高、稳定性强的高效液相色谱分析方法。该方法在 0.20~1.00 mg/L 范围内线性良好, 回归曲线方式为 $A=12.58C+0.2060$, 相关系数为 0.9985; 在 100、200 和 500 μg/L 添加水平的回收率为 74.59%~102.03%, 回收率高; 定量限为 100 μg/kg, 满足实际需要, 且方法快速、准确, 适合测定泰乐菌素残留。

参考文献

- [1] 杨娜娜, 刘聚祥, 王琳, 等. 鸡蛋中兽药残留及检测技术的研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, (2): 226-228.
Yang NN, Liu JX, Wang L, et al. Research progress of veterinary drug residues and detection technology in eggs [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2015, (2): 226-228.
- [2] 刘明生, 甘辉群. 鸡蛋中药物残留形成的原因与监控研究进展[J]. 饲料工业, 2005, (6): 32-34
Liu MS, Gan HQ. Analysis research progress on the causes and monitoring of drug residues in eggs [J]. Feed Ind, 2005, (6): 32-34.
- [3] 孙丹丹, 秦玉昌, 李军国. 鸡蛋生产质量安全问题分析及控制研究进展[J]. 中国家禽, 2015, 37(5): 45-49.
Sun DD, Qin YC, Li JG. Analysis and control technology for egg production quality and safety [J]. China Poul, 2015, 37(5): 45-49.
- [4] 马青超. 鸡蛋中兽药残留的检测方法及防控措施[J]. 现代畜牧科技, 2017, (8): 153.
Ma QC. Detection and control of veterinary drug residues in eggs [J]. Mod Anim Husb Sci Technol, 2017, (8): 153.
- [5] 张郑裴. 鸡蛋中兽药残留形成过程及防控措施研究[J]. 今日畜牧兽医, 2018, (7): 90.
Zhang ZP. Study on the formation and control measures of veterinary drug residues in eggs [J]. Today Anim Sci Vet Med, 2018, (7): 90.
- [6] 王冉, 刘铁铮. 鸡蛋中兽药残留规律及其影响因素探讨[J]. 兽药与饲料添加剂, 2004, 9(6): 1-4.

- Wang R, Liu TZ. Study on veterinary drug residues in eggs and its influencing factors [J]. *Vet Pharm Feed Addit*, 2004, 9(6): 1–4.
- [7] 张佳兰, 杨长锁, 高玉鹏. 鸡蛋中兽药残留状况及其控制[J]. *陕西农业科学*, 2003, (5): 84–86.
- Zhang JL, Yang CS, Gao YP. Veterinary drug residues and control in eggs [J]. *Shanxi Agric Sci*, 2003, (5): 84–86.
- [8] 张眉, 龚月生, 马国际. 泰乐菌素检测方法研究进展[J]. *畜牧兽医杂志*, 2009, 28(3): 41–43.
- Zhang M, Gong YS, Ma GJ. Resarch progress on tylosin detecting method [J]. *J Animal Sci Vet Med*, 2009, 28(3): 41–43.
- [9] 罗玉莹, 王艳, 李艳萍. 高效液相色谱法检测鸡肉中泰乐菌素[J]. *石油化工应用*, 2018, 37(6): 127–130.
- Luo YY, Wang Y, Li YP. Determination of tylosin residue in chicken using high performance liquid chromatograph [J]. *Petrochem Ind Appl*, 2018, 37(6): 127–130.
- [10] 孔科, 袁宗辉, 范盛先, 等. 高效液相色谱法检测泰乐菌素在肉鸡组织中的残留[J]. *中国兽医学报*, 1999, (5): 489–491.
- Kong K, Yuan ZH, Fang SX, *et al.* Detection of tylosin residues in chicken tissues by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Vet Sci*, 1999, (5): 489–491.
- [11] 包洁华, 张金霞, 郭强功, 等. 高效液相色谱法测定酒石酸泰乐菌素有关物质的研究[J]. *中国兽药杂志*, 2015, 49(2): 35–39.
- Bao JH, Zhang JX, Guo QG, *et al.* Determination of tylosin tartrate related substances by HPLC [J]. *Chin J Vet Drug*, 2015, 49(2): 35–39.
- [12] 冯学忠, 吴广辉, 方炳虎, 等. 紫外分光光度法测定泰乐菌素注射液含量方法的建立[J]. *动物医学进展*, 2009, 30(6): 63–66.
- Feng XZ, Wu GH, Fang BH, *et al.* Determination of tylosin injection by ultraviolet spectrophotometry [J]. *Prog Vet Med*, 2009, 30(6): 63–66.
- [13] 刘勇军, 姜艳彬. 固相萃取-高效液相色谱法测定猪肉与鸡肉中替米考星、泰乐菌素残留量[J]. *肉类研究*, 2012, 26(12): 12–15.
- Liu YJ, Jiang YB. Determination of tilmicosin and tylosin residues in pork and chicken by SPE-HPLC [J]. *Meat Res*, 2012, 26(12): 12–15.
- [14] 罗燕. 超高效液相色谱-串联质谱法检测鸡肉中 6 种大环内酯类药物残留量[J]. *饲料博览*, 2018, (9): 52–56.
- Luo Y. Determination of six macrolides residues in chicken by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Feed Rev*, 2018, (9): 52–56.
- [15] 舒小华, 张倩, 杨琛, 等. 泰乐菌素的超声波降解效果及机制[J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37(2): 223–231.
- Shu XH, Zhang Q, Yang C, *et al.* The efficiency and mechanism of ultrasonic tylosin degradation [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2018, 37(2): 223–231.
- [16] 周秀锦, 张静, 林维宣, 等. 质谱检测泰乐菌素的方法研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(23): 31–34.
- Zhou JX, Zhang J, Lin WX, *et al.* Research progress of the mass spectrometry detection method of tylosin [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2016, 44(23): 31–34.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



刘敬先, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为兽药、饲料、畜产品等质量安全及检测技术研究。

E-mail: 13604026568@139.com