

高效液相色谱法测定牛奶中氯霉素残留量的研究

蒋定国¹ 杨大进¹ 方从容¹ 文玉雪² 王玉莲³ 王竹天¹

(1. 中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021;2. 珲春市卫生防疫站,吉林 珲春 133300;
3. 泰安市卫生防疫站,山东 泰安 271000)

摘 要:为了快速、简便、灵敏地测定牛奶中的氯霉素残留,建立了高效液相色谱分析法。牛奶样品先用含有 1 %高氯酸的乙酸乙酯沉淀蛋白质和提取氯霉素,提取液浓缩干后用 0.5 mol/L 高氯酸溶液溶解,以正己烷去除脂溶性杂质,在波长 278 nm 处用高效液相色谱仪测定氯霉素。

本方法最低检出浓度为 1.1 $\mu\text{g/kg}$,氯霉素浓度在 20 $\mu\text{g/kg}$ ~ 100 $\mu\text{g/kg}$ 范围内,方法平均回收率为 88.0 % ~ 97.7 %,RSD 为 5.3 % ~ 6.4 %。本方法适于牛奶中氯霉素残留的监测。

关键词:乳;氯霉素;色谱法;高压液相;兽医药;药物残留物

Study on the rapid determination of chloramphenicol residues in milk by HPLC

Jiang Dingguo ,et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety ,China CDC ,Beijing 100021)

Abstract : A rapid ,simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of chloramphenicol residues in milk has been established. The protein in milk was first precipitated by 1 % HClO_4 in ethyl acetate ,then the chloramphenicol was extracted by ethyl acetate. The residues was cleaned up by 0.5 mol/L HClO_4 and n-hexane. The purified solution was examined at UV 278 nm by HPLC. The minimum detectable limit of this method was 1.1 $\mu\text{g/kg}$,the recovery rate was 88.0 % ~ 97.7 % ,and the RSD was 5.3 % ~ 6.4 %.

Key Words : Milk ;Chloramphenicol ;Chromatography ,High Pressure Liquid ;Veterinary Drugs ;Drug Residues

氯霉素 (Chloramphenicol) 作为一种广谱的抗生素广泛用于动物各种传染性疾病的治疗,特别是用于奶牛乳腺炎的治疗,从而易使奶及奶制品中存在氯霉素残留^[1]。由于氯霉素有严重的副作用,它能抑制人体骨髓造血功能而引起再生障碍性贫血症和粒状白细胞缺乏症等疾病,因此它对人类的健康构成了潜在的危害。世界各国都禁止在动物饲养过程中使用氯霉素。为了保障我国人民的身体健康和国际贸易的需要,有必要建立牛奶中氯霉素残留量的测定方法来对市场上的牛奶产品进行监测管理,预防氯霉素的污染。

测定牛奶中氯霉素残留的方法在国外有放射免疫法、色谱法和酶免疫分析法,在国内还未见报道。Arnold 报道了在奶中氯霉素的放射免疫的痕量分析

方法,奶中氯霉素残留在 1 $\mu\text{g/kg}$ 以上的能被准确定量,回收率高于 95 %^[2]。但放射免疫法具有同位素半衰期短、存在放射性污染及需要复杂仪器设备等缺点。1980 年 Wal J. M. 首次报道了牛奶中氯霉素残留测定的液相色谱法,但方法繁杂费时,回收率为 72 % ~ 99.5 % ,检出限量为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。^[3]1984 年 Schwartz 等报道了柱色谱在净化和富集牛奶中氯霉素的应用,检测限量为 4 $\mu\text{g/kg}$ 。^[4]还有人采用单克隆抗体制备的亲合层析柱对样品中氯霉素进行特异性提取和富集,再用高效液相色谱法测定其含量,该方法在牛奶中检出限量可达 0.02 $\mu\text{g/kg}$ 。^[5]荷兰推出了测定氯霉素残留的酶联免疫测定试剂盒 Quik-card,现又称 La cart test 试剂盒,用它检测牛奶中氯霉素的残留,样品不经预处理检出限量为 5 ~ 10 $\mu\text{g/kg}$,样

基金项目:科技部社会公益研究专项资金项目

作者简介:蒋定国 男 助理研究员 硕士

This work was supported by the Special Funds of Ministry of Science and Technology ,China

品经预处理及浓缩后检出限量可达 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。^[6]
另外,还有人用单克隆抗体亲和素—生物素酶联免疫法测定猪肌肉组织中和牛奶中氯霉素的残留^[6]。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(附 481 型紫外检测器和 Waters 510 泵)。超声波清洗器 KS-500D,宁波科生仪器厂生产。离心机 LD4-2,北京医用离心机厂生产。旋转蒸发器 461,美国 Waters 公司生产。漩涡式混合器 XW-80A,上海医科大学仪器厂制造。

1.2 试剂

1.2.1 乙酸乙酯(分析纯)。乙腈(色谱纯)。正己烷(分析纯)。磷酸氢二铵(优级纯)。高氯酸溶液(优级纯)。无水硫酸钠(分析纯)。氢氧化钾(分析纯)。氯化钠(分析纯)。

1.2.2 氯霉素标准品(纯度 99.99%,SIGMA 公司)。

氯霉素标准储备溶液 称取 0.0100 mg 氯霉素置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,此溶液浓度为 1.00 mg/mL,置于冰箱冷藏室保存。

氯霉素标准中间液 准确吸取 0.5 mL 储备液于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,此溶液浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置于冰箱冷藏室保存。

1.3 方法

1.3.1 提取 准确量取 30 mL 牛奶试样于 100 mL 的具塞量筒中,再加入 30 mL 乙酸乙酯高氯酸的混和液(100:1),轻轻颠倒数次,放置 5 min,用布氏漏斗抽滤。用少量乙酸乙酯洗涤比色管和蛋白质沉淀物,将滤液用 10 mol/L 的氢氧化钾溶液调节 pH 值为中性。将滤液转入 100 mL 的分液漏斗中,剧烈振摇 1 min,静置分层,如有乳化现象可加入 1.0 mL 正己烷消除乳化。有机层通过无水硫酸钠过滤到浓缩瓶中,再用乙酸乙酯提取水层两次,每次 25 mL,同法转入浓缩瓶。在 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴的旋转蒸发器上浓缩至干。

1.3.2 净化 准确加入 1.0 mL 0.5 mol/L 高氯酸溶液于浓缩瓶中,使用漩涡式混合器回旋 1 min,再加入 2 mL 正己烷回旋 1 min,将全部溶液转移于 5.0 mL 试管中,静置分层,用尖嘴吸液管吸掉正己烷层,再加入 1.0 mL 正己烷涡流振荡 10 s,弃去正己烷。水层溶液过 0.45 μm 滤膜后供 HPLC 测定。

1.3.3 测定

液相色谱测试条件

色谱柱 Hypersil C₁₈ 25 cm \times 4.6 mm, 5 μm ,

预柱 Guard-pak C₁₈,

流动相 乙腈:0.005 mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 溶液 =

24:76,

流速 1.0 mL/min,

检测波长 278 nm,

柱温 室温,

进样量 20 μL 。

氯霉素校正曲线绘制

准确量取中间标准溶液 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中分别用 0.5 mol/L 高氯酸溶液定容,得到 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液系列,在上述色谱条件下进行 HPLC 测定。

样品测定

吸取样品溶液 20 μL 进样,记录氯霉素的保留时间和峰面积。根据氯霉素的保留时间定性,峰面积定量。

1.3.4 计算

按标准曲线外标法计算样品中氯霉素的含量。

公式:

$$X = \frac{A \times f}{m}$$

X —试样中氯霉素的含量($\mu\text{g}/\text{kg}$); A —试样中色谱峰的面积对应的氯霉素质量(ng); f —试样溶液的稀释倍数; m —试样的取样量(g)。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

提取与净化过程的优化

由于氯霉素易溶于乙酸乙酯,不溶于正己烷,因此选用乙酸乙酯可从含水样品中提取氯霉素,同时减少水溶性杂质干扰,用无水硫酸钠脱去乙酸乙酯中的少量水分,可进一步减少水溶性杂质,浓缩干后加入 0.5 mol/L 高氯酸溶液可以溶解氯霉素,除去存在的少量蛋白质,加入正己烷可以除去脂溶性杂质。

牛奶中蛋白质沉淀方法的选择

对于牛奶样品,由于它是含有大量蛋白质、脂肪和水的均一胶体。要从牛奶中提取氯霉素,必须破坏其胶体状态,选用 0.5% 的高氯酸沉淀蛋白质效果理想,简便易行,高氯酸用量少,前处理过程简单,回收率高。

2.2 色谱条件中流动相的选择

由于牛奶基质复杂,尽管前处理净化步骤除去很多杂质,仍有一些杂质干扰氯霉素的定量,这就需要选择合适流动相来解决。本方法通过试验选择流动相为乙腈:0.005 mol/L 磷酸氢二铵缓冲液 = 24:76 (体积比)。它可将空白样品在色谱图上的杂质峰与氯霉素峰达到基线分开,见如下色谱图(氯霉素标准溶液浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,峰面积为 4827,加标度为 9 ng/mL ,峰面积为 11821)。

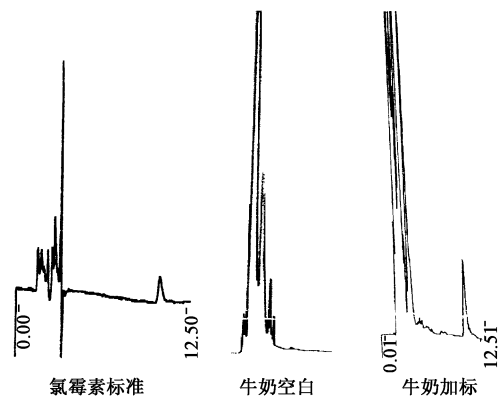


图1 氯霉素标准、牛奶空白和牛奶加标的色谱图

2.3 方法的重复性

同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值 10 %。

2.4 方法的线性范围和最低检测浓度

用浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素标准溶液,在规定的色谱条件下,进样 20 μL ,进行测定,求氯霉素的响应峰面积—氯霉素浓度的线性回归方程,其方程为 $y = 879 + 39454x$,相关系数 $r = 0.9998$,表明在该浓度范围呈线性关系,符合定量要求(见表1)。

表1 氯霉素的校正曲线

测定浓度 $\mu\text{g/mL}$	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
绝对量 ng	2	4	10	20	40
峰面积	5064	8216	20358	41247	79436
回归方程	$y = 879 + 39454x \quad r = 0.9998$				

注:以基线噪音的3倍计算方法的最低检出浓度:牛奶为 1.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.5 方法的回收率和精密度

以空白牛奶样品作为本底,在样品中添加不同

浓度的氯霉素标准,测定方法的加标回收率及精密度(每个样品平行测定6次),结果见表2。

表2 牛奶的加标回收率及精密度							$\mu\text{g/kg}$	
添加水平	1	2	3	4	5	6	平均	RSD %
10	87.4	94.8	91.7	89.2	87.6	93.8	90.7	8.6
20	88.6	96.2	80.8	84.2	85.7	92.4	88.0	6.4
50	99.2	94.5	90.2	87.5	92.1	85.9	91.6	5.3

2.6 方法的适用性

为了考察本方法的适用性,对市场上的牛奶样品进行了调查,共12份。测定结果表明有2份呈阳性,氯霉素浓度分别为 2.5 $\mu\text{g/kg}$ 和 6.0 $\mu\text{g/kg}$ 。从实际测定结果看本方法适用于牛奶样品的测定。

参考文献:

- [1] 张龙,主编.兽医药物化学[M].北京:中国农业出版社,1995,280—282.
- [2] Arnold. Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk, and meat: comparison of gas chromatography and radioimmunoassay[J]. J Assoc of Anal Chem, 1985, 68 (5): 1044—1048.
- [3] Wal J M. High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk[J]. J Assoc of Anal Chem, 1980, 63(5): 1044—1048.
- [4] Schwartz, Beek, Aerts. Practical screening procedure for chloramphenicol in milk at low parts per billion level[J]. J Assoc of Anal Chem, 1984, 67(3): 563—565.
- [5] 张存帅. 酶免疫分析法(EIA)在动物性食品中有机化学残留物测定上的应用[J]. 中国兽药杂志, 1992, 26(4): 32—34.
- [6] 刘智宏. 酶标免疫测定法(EIA)在检测动物性食品中氯霉素残留的应用[J]. 中国兽药杂志, 1995, 29(2): 47.

[收稿日期:2002-07-18]

中图分类号:R15;O657.72;S816.73

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2003)01-0036-03

欢迎订阅 欢迎投稿 联合征订启事

- 《卫生研究》 邮发代号:82-720,双月刊,单价:10元/册,全年:60元;
《中国食品卫生杂志》 邮发代号:82-450,双月刊,单价:13元/册,全年:76元;
《国外医学卫生学分册》 邮发代号:2-608,双月刊,单价:7元/册,全年:42元;
《中国医学文摘卫生学》 邮发代号:18-77,双月刊,单价:7元/册,全年:42元。

以上4种期刊系卫生部主管、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所承办的专业学术期刊及检索刊物,均为国家级科技期刊,国内外公开发行。欢迎广大读者到当地邮局订阅,您也可以直接与期刊发行部联系。从邮局汇款时请注明需订期刊刊名、订阅份数、详细的收件人地址、姓名、邮编,以便准确按时邮寄。从见到本启事起对直接从期刊发行部购刊的个人订户实行8折优惠,订购数量多的另有优惠。

地址:北京市宣武区南纬路29号 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所期刊发行部

邮编:100050 联系人:姜人怡 (也可以采用以前的方式与各编辑部联系) 电话:(010)63029546