

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.10.01

鸡组织中多西环素残留量测定的 高效液相色谱法建立

张 青¹, 李慧素², 吴宁鹏², 彭 丽², 吴志明^{2*}

(1. 河南农业大学动物医学院, 郑州 450002; 2. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008)

[收稿日期] 2020-03-31 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020) 10-0001-09 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 为检测鸡组织中多西环素残留, 保障禽产品的质量安全, 建立了鸡肌肉、肝脏、肾脏和皮 + 脂 4 种组织中多西环素残留量的高效液相色谱法。肌肉、肝脏、肾脏样品经 $\text{Na}_2\text{EDTA} - \text{Mcllvaine}$ 缓冲液提取, 硫酸和钨酸钠沉淀蛋白; 皮 + 脂样品经二氯甲烷溶解后, $\text{Na}_2\text{EDTA} - \text{Mcllvaine}$ 缓冲液萃取, HLB 固相萃取柱净化, 高效液相色谱法测定, 以 0.01 mol/L 三氟乙酸 - 乙腈为流动相, 梯度洗脱, 检测波长为 350 nm。结果表明: 多西环素在 0.05 ~ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内呈良好的线性关系, R^2 大于 0.999。本方法在肌肉组织中的检测限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在肝脏、肾脏和皮 + 脂组织中的检测限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在各空白组织中添加 50 ~ 1200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内, 多西环素的平均回收率在 61.05% ~ 90.90% 之间, 批内、批间相对标准偏差均在 0.7% ~ 14.1% 范围之内。本方法适用于鸡组织中多西环素残留量的测定。

[关键词] 多西环素; 鸡组织; 残留; 高效液相色谱法

Determination of Doxycycline Residues in Chicken Tissues by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Qing¹, LI Hui-su², WU Ning-peng², PENG Li², WU Zhi-ming^{2*}

(1. College of Animal Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Zhengzhou 450008, China)

Corresponding author: WU Zhi-ming, E-mail: wuzhiming6@sina.com

Abstract: In order to detect the doxycycline residues in chicken tissues and ensure the quality and safety of poultry products, a method for determination of doxycycline was developed by high performance liquid chromatography. The samples from chicken muscles, livers and kidneys were extracted by $\text{Na}_2\text{EDTA} - \text{Mcllvaine}$ buffer solution, precipitated protein by sodium tungstate and sulfuric acid. And the samples from skin with fat tissues were extracted by dichloromethane and then $\text{Na}_2\text{EDTA} - \text{Mcllvaine}$ buffer solution, then ecartridged by

作者简介: 张 青, 硕士研究生, 从事兽医预防学研究。

通讯作者: 吴志明。E-mail: wuzhiming6@sina.com

HLB column, and determined by HPLC. The mobile phase were trifluoroacetic acid and acetonitrile with gradient elution, and detection wavelength was 350 nm. The calibration curve of doxycycline was linear in the range of 0.05 ~ 5 $\mu\text{g/mL}$ ($R^2 > 0.999$). The limit of detection was 25 $\mu\text{g/kg}$ for muscles, 50 $\mu\text{g/kg}$ for livers, kidneys and skin with fat. The limit of quantification was 50 $\mu\text{g/kg}$ for muscles, 100 $\mu\text{g/kg}$ for livers, kidneys and skin with fat. The average recoveries ranged from 61.05% to 90.90%, which spiked at the concentrations range from 50 $\mu\text{g/kg}$ to 1200 $\mu\text{g/kg}$ in chicken tissues. The inter-run and between-run relative standard deviations were in the range of 0.7% ~ 14.1%. This method can be applied for the determination of doxycycline residues in chicken tissues.

Key words: doxycycline; chicken tissues; residues; HPLC

多西环素 (Doxycycline) 是由链霉菌产生的四环素类抗生素,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌均有抑制作用,具有高效、广谱、长效等优点,在兽医临床中被广泛用于防治畜禽支原体病、大肠杆菌病、沙门氏菌病、巴氏杆菌病、布氏杆菌病及细菌引起的呼吸道感染等疾病^[1]。然而,在养殖业生产中存在超剂量、超范围等不合理使用和不遵守休药期的现象,造成了耐药菌株的出现和畜禽产品中药物残留超标的问题。多西环素在动物源食品中残留,会对人体的肝脏、牙齿和骨骼等造成损害,给人类的健康造成潜在危害^[2-3]。因此,我国和欧盟均规定多西环素在家禽组织中最大残留限量 (Maximum residue limit, MRL) 为 100 ~ 600 $\mu\text{g/kg}$ ^[4]。目前,国内外关于多西环素药物残留检测主要是水产品、牛奶^[5]、鸡蛋^[6]及部分家畜的肌肉^[7]、肝脏组织^[8]中残留量测定,未见肾脏和皮+脂组织中多西环素残留量测定方法的报道,现有的标准方法中组织也涵盖不全。本研究旨在建立一种高效液相色谱法,可以同时测定鸡的肌肉、肝脏、肾脏和皮+脂等组织中多西环素残留量,以期全面监控鸡组织中多西环素残留提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪 Waters 2695, 配 Waters 2487 检测器,美国 Waters 公司;台式冷冻高速离心机,美国 Sigma 公司;电子天平(感量 0.00001 g 和 0.01 g),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;IKA MS3 basic 漩涡仪,艾卡(广州)仪器设备有限公司 (IKA 中国);Milli-QA10 超纯水仪,美国

MiLipore 公司;TTL-DC II 型氮吹仪,美国 Organomation Associates 公司;固相萃取装置,美国 Waters 公司;微量加样器,美国 Eppendorf 公司。

1.2 试剂与材料 多西环素对照品,含量: 85.2%,批号: K0131507,中国兽医药品监察所提供。甲醇和乙腈,色谱纯,均购自德国 Merck 公司;三氟乙酸、二氯甲烷、乙二胺四乙酸二钠、枸橼酸、磷酸氢二钠、草酸、硫酸、钨酸钠等,均为分析纯,购自天津市科密欧化学试剂有限公司。HLB 固相萃取柱 (6cc, 500 mg), 购自美国 Waters 公司。定性滤纸 (快速), 购自杭州沃华公司。

1.3 溶液的配制

1.3.1 1 mg/mL 多西环素标准贮备液 准确称取相当于多西环素 10 mg 的多西环素对照品,于 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容,配制成浓度为 1 mg/mL 的多西环素标准贮备液,于 -20 °C 以下保存,有效期 1 个月。

1.3.2 10 $\mu\text{g/mL}$ 多西环素标准工作液 准确量取 1.3.1 项下溶液 1 mL,于 100 mL 容量瓶中,用甲醇稀释并定容,配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的多西环素标准工作液,现用现配。

1.3.3 Na_2EDTA -Mcllvaine 缓冲溶液 分别取一水柠檬酸 12.9 g,十二水磷酸氢二钠 27.6 g,二水乙二胺四乙酸二钠 37.2 g,加水 900 mL 溶解,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调 pH 至 4.0,加水稀释至 1000 mL,混匀。

1.3.4 0.01 mol/L 草酸溶液 取草酸 1.26 g,用水溶解并稀释至 1000 mL。

1.3.5 30% 甲醇草酸溶液 取甲醇 30 mL,加0.01 mol/L 草酸溶液稀释至 100 mL。

1.3.6 0.34 mol/L 硫酸溶液 取硫酸 1.85 mL,用水溶解并稀释至 100 mL。

1.3.7 7% 钨酸钠溶液 取钨酸钠 7 g,用水溶解并稀释至 100 mL。

1.3.8 0.01 mol/L 三氟乙酸水溶液 取三氟乙酸 0.8 mL,用水溶解并稀释至 1000 mL,配制成 0.01 mol/L 三氟乙酸水溶液。

1.4 试验方法

1.4.1 样品前处理 肌肉、肝脏和肾脏:称取试料 5.0 g 于 50 mL 离心管中,加 Na₂EDTA – McIlvaine 缓冲溶液 20 mL,涡旋 1 min,振荡 10 min,加 0.34 mol/L 硫酸溶液 5 mL、7% 钨酸钠溶液 5 mL,涡旋 1 min,8500 r/min 离心 5 min,取上清液。残渣分别加 Na₂EDTA – McIlvaine 缓冲溶液 20 mL 和 10 mL,涡旋 1 min,振荡 10 min,8500 r/min 离心 5 min,重复提取两次。合并三次上清液,滤纸过滤后,备用。

皮 + 脂:称取试料 5.0 g 于 50 mL 离心管中,加二氯甲烷 15 mL,涡旋 1 min,振荡 5 min,加 Na₂EDTA – McIlvaine 缓冲溶液 15 mL,涡旋 1 min,振荡 5 min,8500 r/min 离心 5 min,取上层溶液。下层溶液加 Na₂EDTA – McIlvaine 缓冲溶液 15 mL 萃取,取上层溶液,重复两次。合并三次上层溶液,滤纸过滤后,备用。

HLB 柱依次用甲醇 5 mL、水 5 mL 和 Na₂EDTA – McIlvaine 缓冲溶液 5 mL 活化,取备用液过柱,待全部备用液流出后,依次用水 10 mL、5% 甲醇溶液 10 mL 淋洗,抽干,用甲醇 6 mL 洗脱,收集全部洗脱液于刻度试管中,抽干,于 40 ℃ 水浴氮气吹至约 1.0 mL,用 0.01 mol/L 草酸溶液定容至 2.0 mL,过滤,供高效液相色谱测定。

1.4.2 色谱条件 色谱柱:Waters Xbrige C18 柱 (150 mm × 4.6 mm,粒径 5 μm);流动相 A:0.01 mol/L 三氟乙酸水溶液,B:乙腈;梯度洗脱,见表 1;检测波长:350 nm;进样量:50 μL;柱温:30 ℃。

1.4.3 标准曲线的绘制 准确量取多西环素标准工作液适量,用 30% 甲醇草酸溶液稀释成浓度为

0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5 μg/mL 的系列标准溶液,从低浓度到高浓度依次进样,供高效液相色谱测定。以测得峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

1.4.4 检测限与定量限 按 1.4.1 项样品前处理方法处理样品,再按 1.4.2 项液相色谱条件进行分析测定。依照信噪比 S/N ≥ 3 为检测限 (Limit of detection, LOD),S/N ≥ 10 为定量限 (Limit of quantification, LOQ)。

1.4.5 精密度与准确度 取空白鸡组织样品,以定量限和最大残留限量为依据,添加 4 个不同浓度 (LOQ、1/2MRL、MRL、2MRL) 的多西环素标准溶液,按 1.4.1 项样品前处理方法处理样品,再按 1.4.2 液相色谱条件进行 HPLC 分析测定,每个浓度 5 个平行样品,进行 3 次重复试验。求回收率和批内、批间变异系数。

表 1 流动相梯度洗脱

Tab 1 Mobile phase compositions for gradient elution			
时间/min	流速/(mL · min ⁻¹)	A /%	B/%
0	1.0	90	10
5	1.0	80	20
15	1.0	65	35
16	1.0	90	10
17	1.0	90	10

2 结果与分析

2.1 标准曲线 在 0.05 ~ 5 μg/mL 的浓度范围内,多西环素色谱峰面积与浓度呈线性相关,回归方程为 $y = 81.63x + 22461.60$,权重是 $1/x^2$,相关系数 r 大于 0.999,见图 1。

2.2 检测限与定量限 按照信噪比 S/N ≥ 3 为检测限,S/N ≥ 10 为定量限,求得鸡各组织中多西环素的检测限分别为肌肉 20 μg/kg,肝脏、肾脏和皮 + 脂 50 μg/kg;定量限分别为肌肉 50 μg/kg,肝脏、肾脏和皮 + 脂 100 μg/kg,色谱图见图 2 ~ 图 10。

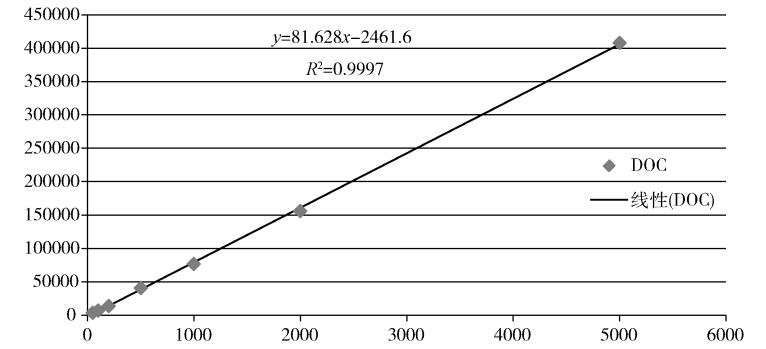


图 1 多西环素标准曲线图

Fig 1 Standard curve of doxycycline solution

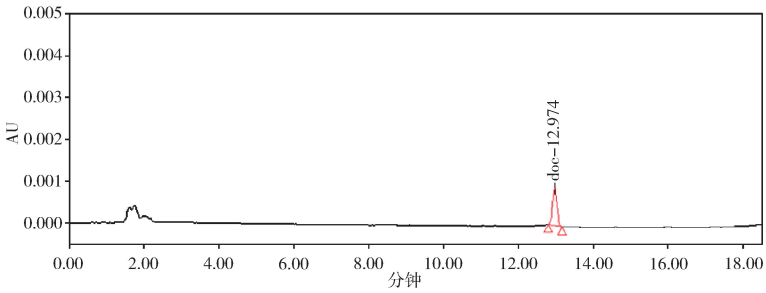


图 2 多西环素标准溶液色谱图(100 $\mu\text{g/L}$)

Fig 2 Chromatogram of doxycycline standard solution(100 $\mu\text{g/L}$)

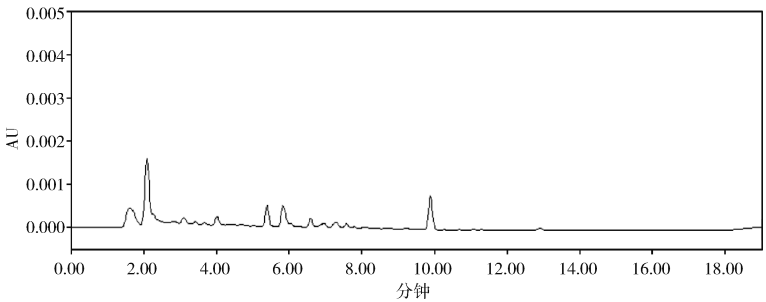


图 3 鸡肉组织空白色谱图

Fig 3 Chromatogram of blank chicken muscles

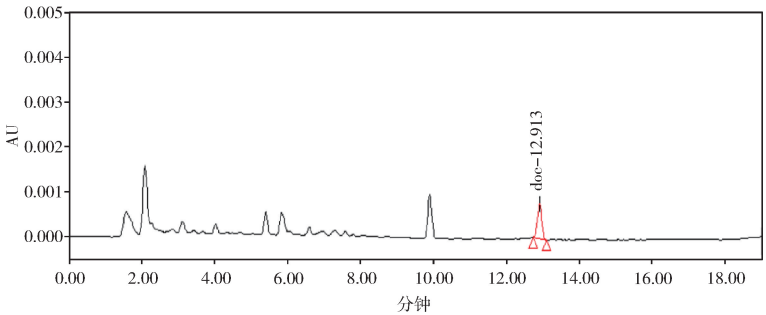


图 4 鸡肉组织空白添加 50 $\mu\text{g/kg}$ 多西环素色谱图

Fig 4 Chromatogram of doxycycline 50 $\mu\text{g/kg}$ added in chicken muscles

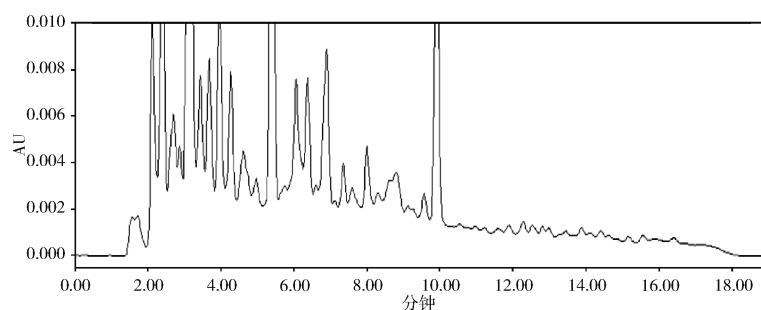


图 5 鸡肝脏组织空白色谱图

Fig 5 Chromatogram of blank chicken livers

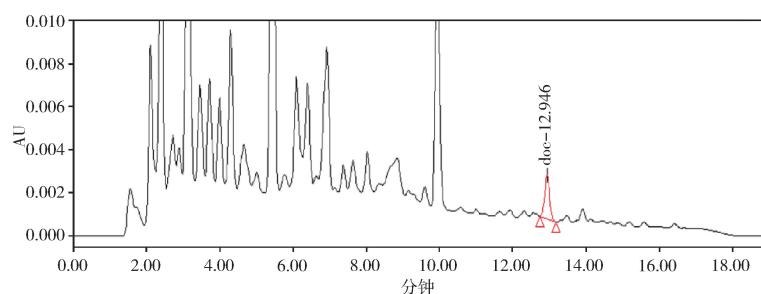


图 6 鸡肝脏组织空白添加 100 µg/kg 多西环素色谱图

Fig 6 Chromatogram of doxycycline 100 µg/kg added in chicken livers

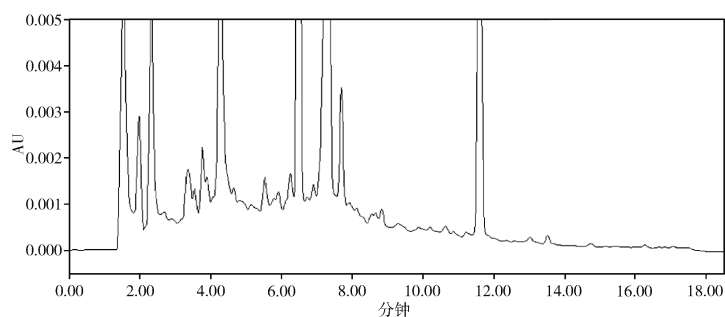


图 7 鸡肾脏组织空白色谱图

Fig 7 Chromatogram of blank chicken kidneys

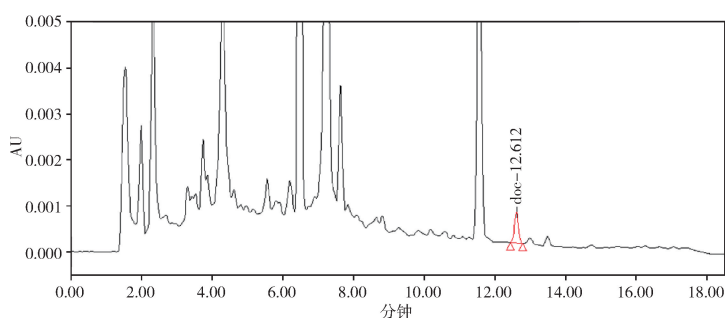


图 8 鸡肾脏组织空白添加 100 µg/kg 多西环素色谱图

Fig 8 Chromatogram of doxycycline 100 µg/kg added in chicken kidneys

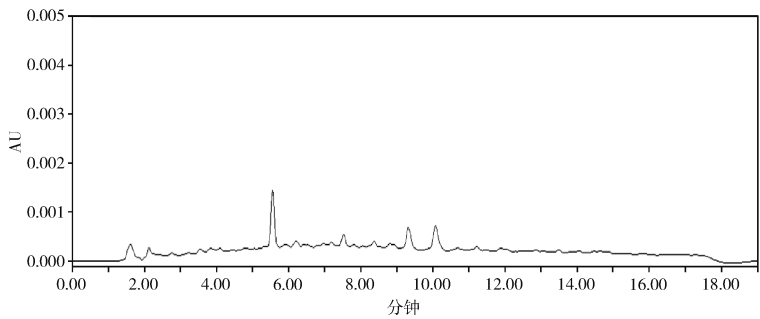


图 9 鸡皮 + 脂组织空白色谱图

Fig 9 Chromatogram of blank chicken skin with fat

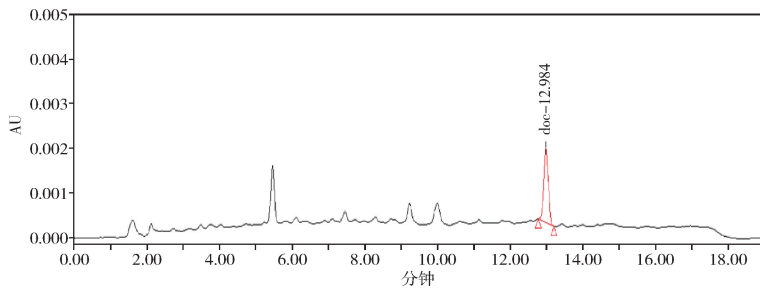


图 10 鸡皮 + 脂组织空白添加 100 µg/kg 多西环素色谱图

Fig 10 Chromatogram of doxycycline 100 µg/kg added in chicken skin with fat

2.3 精密度与准确度 从表 2 ~ 表 5 可以看出,多西环素在肌肉组织 50 ~ 200 µg/kg 添加浓度范围,平均回收率为 63.42% ~ 81.11%,批内变异系数为 2.2% ~ 9.9%,批间变异系数为 5.7% ~ 9.0%;在肝脏组织 100 ~ 600 µg/kg 添加浓度范围,平均回收率为 62.32% ~ 84.92%,批内变异系数为 1.2% ~ 11.5%,批间变异系数为 6.3% ~ 9.0%;在肾脏

组织 100 ~ 1200 µg/kg 添加浓度范围,平均回收率为 90.40% ~ 90.90%,批内变异系数为 1.5% ~ 13.5%,批间变异系数为 5.0% ~ 14.1%;在皮 + 脂组织 100 ~ 600 µg/kg 添加浓度范围,平均回收率为 70.77% ~ 74.6%,批内变异系数为 0.7% ~ 6.8%,批间变异系数为 1.4% ~ 4.8%。

表 2 鸡肉中添加多西环素的回收率测定结果

Tab 2 Recovery rate and precision of doxycycline added in chicken muscles											
添加浓度 /(μg·kg ⁻¹)	批次	1	2	3	4	5	批内		批间		
							$\bar{X} \pm SD$	<i>n</i> = 5	<i>CV</i> /%	$\bar{X} \pm SD$	<i>n</i> = 15
50	1	63.64	67.10	73.30	77.42	81.04	72.50 ± 7.17	9.9			
	2	90.34	80.72	75.78	72.96	84.26	80.81 ± 6.88	8.5	78.14 ± 7.03	9.0	
	3	84.32	77.30	78.42	85.90	79.62	81.11 ± 3.78	4.7			
100	1	61.04	66.20	62.52	70.86	63.67	64.86 ± 3.85	5.9			
	2	68.77	66.28	71.90	76.04	70.09	70.62 ± 3.66	5.2	67.97 ± 3.84	5.7	
	3	67.99	70.64	66.66	69.21	67.69	68.44 ± 1.53	2.2			
200	1	68.63	60.80	61.08	66.04	60.55	63.42 ± 3.69	5.8			
	2	63.90	64.61	65.58	61.19	66.25	64.31 ± 1.96	3.0	65.64 ± 4.13	6.3	
	3	75.19	71.87	68.04	65.63	65.22	69.19 ± 4.27	6.2			

表 3 鸡肝脏中添加多西环素的回收率测定结果

Tab 3 Recovery rate and precision of doxycycline added in chicken livers												
添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次	1	2	3	4	5	批内		批间			
							$\bar{X} \pm SD$	$n=5$	$CV/\%$	$\bar{X} \pm SD$	$n=15$	$CV/\%$
100	1	74.96	70.92	77.07	93.48	87.09	80.70	± 9.30	11.5	82.85	± 7.50	9.0
	2	80.53	77.69	90.12	86.74	79.48	82.91	± 5.28	6.4			
	3	78.51	76.03	83.18	96.29	90.61	84.92	± 8.44	9.9			
150	1	81.09	77.97	78.85	70.34	79.81	77.61	± 4.23	5.4	74.56	± 4.69	6.3
	2	67.31	74.60	73.97	66.69	75.31	71.57	± 4.21	5.9			
	3	70.59	77.83	75.94	69.23	78.83	74.49	± 4.32	5.8			
300	1	76.45	73.54	70.31	75.53	69.98	73.16	± 2.95	4.0	67.9	± 5.0	7.3
	2	67.68	65.44	59.52	67.12	63.49	64.65	± 3.30	5.1			
	3	67.71	64.47	60.28	67.04	69.92	65.88	± 3.69	5.6			
600	1	70.91	71.83	69.67	70.65	71.49	70.91	± 0.84	1.2	65.29	± 4.40	6.7
	2	64.97	65.07	60.32	60.29	60.94	62.32	± 2.48	4.0			
	3	61.91	64.30	62.39	60.99	63.62	62.64	± 1.33	2.1			

表 4 鸡肾脏中添加多西环素的回收率测定结果

Tab 4 Recovery rate and precision of doxycycline added in chicken kidneys											
添加浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次	1	2	3	4	5	批内		批间		
							$\bar{X} \pm SD$	$n=5$	$CV/\%$	$\bar{X} \pm SD$	$n=15$
100	1	91.39	82.88	95.30	84.71	97.68	90.4 $\pm$ 6.46	7.1	78.77 $\pm$ 11.14	14.1	
	2	68.07	65.98	83.59	82.54	81.91	76.42 $\pm$ 8.63	11.3			
	3	64.66	61.62	74.28	73.54	73.37	69.49 $\pm$ 5.91	8.5			
300	1	66.42	70.84	73.43	71.11	72.17	70.79 $\pm$ 2.65	3.7	65.78 $\pm$ 4.44	6.7	
	2	64.70	65.02	66.09	64.70	66.97	65.50 $\pm$ 1.0	1.5			
	3	59.97	60.53	62.30	60.12	62.33	61.05 $\pm$ 1.17	1.9			
600	1	68.43	77.53	70.47	60.89	65.05	68.47 $\pm$ 6.23	9.1	70.86 $\pm$ 9.34	13.2	
	2	76.23	67.32	85.41	67.48	90.51	77.39 $\pm$ 10.46	13.5			
	3	66.18	60.29	81.56	60.83	64.73	66.72 $\pm$ 8.67	13.0			
1200	1	70.68	63.24	68.61	59.19	67.25	65.79 $\pm$ 4.58	7.0	64.03 $\pm$ 3.19	5.0	
	2	63.47	64.87	65.23	65.01	65.72	64.86 $\pm$ 0.84	1.3			
	3	60.62	61.32	62.03	60.75	62.45	61.43 $\pm$ 0.80	1.3			

表 5 鸡皮 + 脂中添加多西环素的回收率测定结果

Tab 5 Recovery rate and precision of doxycycline added in chicken skin with fat											
添加浓度 /(μg·kg ⁻¹)	批次	1	2	3	4	5	批内		批间		
							$\bar{X} \pm SD$	<i>n</i> = 5	<i>CV</i> /%	$\bar{X} \pm SD$	<i>n</i> = 15
100	1	74.60	73.40	73.83	73.73	73.34	73.78 ± 0.50	0.7	74.03 ± 1.0	1.4	
	2	72.67	72.28	75.14	74.19	74.22	73.70 ± 1.19	1.6			
	3	74.38	73.91	74.52	76.50	73.69	74.60 ± 1.11	1.5			
150	1	73.77	74.58	72.07	73.62	74.76	73.76 ± 1.06	1.4	73.49 ± 2.21	3.0	
	2	74.45	75.23	72.65	74.50	74.47	74.26 ± 0.96	1.3			
	3	74.07	75.09	72.51	74.37	66.27	72.46 ± 3.58	4.9			
300	1	75.50	71.71	74.41	75.87	71.61	73.82 ± 2.04	2.8	72.86 ± 2.76	3.8	
	2	74.48	74.83	75.11	71.32	71.09	73.36 ± 1.99	2.7			
	3	75.14	74.15	71.13	71.17	65.41	71.40 ± 3.79	5.3			
600	1	74.42	72.41	72.51	74.51	72.39	73.25 ± 1.11	1.5	71.70 ± 3.45	4.8	
	2	71.88	71.85	71.85	64.59	73.70	70.77 ± 3.54	5.0			
	3	73.96	75.02	71.84	71.71	62.83	71.07 ± 4.82	6.8			

3 讨论与结论

3.1 方法的选择 目前国内外多西环素残留检测方法常用的有酶联免疫法(ELISA)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)、液相色谱法(HPLC)等。其中,ELISA 法操作简单、省时、灵敏度高,但存在一定的交叉反应,易出现假阳性^[9-10],结果需要其他方法进行确证;液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、特异性强^[11-13]的特点,但存在基质效应、前处理操作复杂、定量不准等问题,在实际应用中受到一定的限制;高效液相色谱法具有简单、快捷、准确等特点^[14-16],是目前四环素类药物分析检测最普遍的方法,而高效液相色谱-紫外检测法是中国兽药典、多项国家标准及行业标准常用的方法,也是多西环素药物检测中最经典的方法。因此,选择高效液相色谱-紫外检测法测定鸡组织中的多西环素残留量,提高了方法的灵敏度、准确度和重现性,为控制可食性鸡组织中多西环素的残留提供可靠的方法保证。

3.2 色谱条件的优化 通过比较常用的甲醇-乙腈-草酸、三氟乙酸-甲醇、三氟乙酸溶液-乙腈等四环素类药物测定流动相体系,发现 0.01 mol/L 三氟乙酸溶液-乙腈作为流动相,梯度洗脱,可避免多西环素色谱峰展宽和出峰较早易受到杂质峰干扰等问题。同时,采用多西环素两个最大吸收波长 270 nm 和 350 nm 进行考察,发现选择 350 nm 为检测波长,可避免样品中杂质对多西环素的干扰,同时可获得较高的响应值,提高方法的灵敏度。

3.3 固相萃取柱的选择 组织中的多西环素用 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液提取,造成样品提取液中存在较多的极性杂质,与多西环素极性相似,进一步净化时不能用液-液分配方法进行净化。故分别选择 HLB、C18、MAX、HLB-PRS、HLB-COOH 等固相萃取柱进行考察。结果发现,C18 柱和 HLB 柱二者均能较好的净化样品,但 C18 柱在使用时会因吸附剂干涸、pH 值等问题造成结果重现性差。因此,本方法采用 HLB 固相萃取柱进行净化处理,有效去除蛋白和内源性杂质,减少了杂质干扰,提高了方法的准确度和精密度。

3.4 皮+脂组织提取方法优化 由于多西环素具有较强的极性,采用 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液直接提取皮+脂组织中的多西环素时,容易出现提取不完全、回收率低等问题。参考相关文献^[17],选择非极性溶剂将脂肪组织溶解,再用液-液萃取法进行反相萃取。通过比较叔丁基甲醚、正己烷、乙腈、丙酮和二氯甲烷等有机溶剂,发现二氯甲烷可以将脂肪组织充分溶解,再用 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液反相萃取两次,才能将皮+脂组织中多西环素完全萃取至缓冲溶液中,从而提高提取效率,准确测定皮+脂组织中多西环素的残留量。

本文建立了高效液相色谱法测定鸡四种组织中多西环素残留量的方法,特异性强,准确度高,精密度好,可满足鸡组织中多西环素残留量的检测,为动物性食品中多西环素残留监控提供了检测依据。

参考文献:

- [1] 米克热木·沙衣布扎提,孟坤杰,王剑.多西环素人工抗原的合成与鉴定[J].动物医学进展,2016,(4):67-70.
Mikeremu · shayibuzhati, Meng kunjie, Wang Jian. Synthesis and identification of doxycycline artificial antigen [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, (4): 67-70.
- [2] Ebrahim Alipanahpour Dil, Mehrorang Ghaedi, Arash Asfaram, et al. A ferrofluidic hydrophobic deep eutectic solvent for the extraction of doxycycline from urine, blood plasma and milk samples prior to its determination by high-performance liquid chromatography-ultraviolet[J]. Chromatogr A, 2020, 1613: 460695.
- [3] Daghrir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: A review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2013, 11(3): 209-227.
- [4] 中华人民共和国国家标准 GB31650-2019. 食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量[S].
National Standard of the People's Republic of China GB31650-2019. National food safety standard maximum residue limits for veterinary drugs in food[S].
- [5] Yanni Chen, Dezhao Kong, Liliang Liu, et al. Development of an ELISA and Immunochromatographic Assay for Tetracycline, Oxytetracycline, and Chlortetracycline Residues in Milk and Honey Based on the Class-Specific Monoclonal Antibody [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(4): 905-914.

- [6] 王旭丹, 刘 静, 王庚南, 等. 高效液相色谱法检测鸡蛋中四环素类药物残留方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(6):1579–1584.
- Wang Xudan, Liu Jing, Wang Gengnan, *et al.* Study on Determination of tetracycline residues in eggs by high performance liquid chromatography [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2016, 43(6): 1579–1584.
- [7] 徐少华. 高效液相色谱法测定鸡肉中六种四环素的方法研究[J]. 饲料博览, 2016, (11):6–10.
- Xu Shaohua. Research on determination of six kinds of tetracycline in chicken by HPLC [J]. Feed Review, 2016, (11):6–10.
- [8] 中华人民共和国农业部公告第 958 号. 猪鸡可食用组织中四环素类残留检测方法, 高效液相色谱法[S].
- Detection method of tetracyclines residues in edible tissues of porcine and chicken, No. 958. Announcement of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China: High Performance Liquid Chromatography [S].
- [9] 刘金萍. 强力霉素单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[D]. 扬州:扬州大学, 2016.
- Liu Jinping. Preparation of Monoclonal Antibody against doxycycline and establishment of an ELISA method [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2016.
- [10] 曹金博, 王 耀, 胡晓飞, 等. 免疫分析技术在四环素类抗生素残留检测中的应用[J]. 饲料工业, 2019, 40(12):53–59.
- Cao Jinbo, Wang Yao, Hu Xiaofei, *et al.* The application of immunoassay technique in the detection of tetracycline antibiotics residue [J] Feed Industry, 2019, 40(12):53–59.
- [11] Moreno – González D, García – Campaña A M. Salting – out assisted liquid – liquid extraction coupled to ultra – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the determination of tetracycline residues in infant foods [J]. Food Chem, 2017, 221:1763–1769.
- [12] Boison J O, Lee S, Matus J. A multi – residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC – MS/MS. [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(14):1–14.
- [13] 李佩佩, 张小军, 严忠雍, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测水产品中四环素类药物及其差向异构体[J]. 中国食品学报, 2019, 19(7):275–282.
- Li Peipei, Zhang Xiaojun, Yan Zhongyong, *et al.* Determination of tetracyclines and their Epimer in aquatic products by High – performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(7):275–282.
- [14] Udalova A Y, Dmitrienko S G, Apyari V V. Methods for the separation, preconcentration and determination of tetracycline antibiotics[J]. J Anal Chem, 2015, 70(6): 661–676.
- [15] Song J, Zhang Z H, Zhang Y Q, *et al.* Ionic liquid dispersive liquid – liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for determination of tetracycline drugs in eggs[J]. Analytical Methods, 2014,6(6):6459–6466.
- [16] 杨 光, 陈 松, 周 扬, 等. 高效液相色谱技术在四环素类抗生素分析中的应用[J]. 化学工程师, 2016, 30(11):61–67.
- Yang Guang, Chen Song, Zhou Yang, *et al.* Determination of persistent tetracycline residues by high performance liquid chromatography. [J]. Chemical engineer, 2016, 30(11):61–67.
- [17] Gajda A, Posyniak A, Zmudzki J, *et al.* Determination of doxycycline in chicken fat by liquid chromatography with UV detection and liquid chromatography – tandem mass spectrometry[J]. Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences, 2013, 928C(928C):113–120.

(编辑:侯向辉)