

doi: 10. 11751/ISSN. 1002 - 1280. 2019. 09. 10

# 土霉素在鸡蛋中的残留消除研究

张崇威<sup>1</sup>, 邱瑾丽<sup>2\*</sup>, 李红娇<sup>2</sup>

(1. 河南省兽药饲料监察所, 郑州 450008; 2. 郑州福源动物药业有限公司, 郑州 450001)

[收稿日期] 2019 - 06 - 17 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280 (2019) 09 - 0065 - 07 [中图分类号] S859. 84

**[摘要]** 研究临床使用常规剂量及养殖环节加大盐酸土霉素可溶性粉剂量后其在鸡蛋中的残留消除规律。对产蛋期蛋鸡分别给予 500 mg/L 和 667 mg/L 50% 盐酸土霉素可溶性粉, 集中饮水给药, 每日 1 次, 连续 5 d。分别采集停药后 1~12 d 的鸡蛋样品, 采用 UPLC - MS/MS 测定鸡蛋中土霉素的残留量。按上述方法给药后, 低、高剂量组分别在停药第 1 天和停药第 2 天达到土霉素残留量最高。低、高剂量组的最高残留量分别为 142. 72、82. 84  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 均低于国家规定的最高残留限量 (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), 不会造成土霉素残留超标。本试验通过研究土霉素可溶性粉在鸡蛋中的残留情况, 确定弃蛋期前后土霉素残留量, 以期为蛋鸡产蛋期安全用药, 保障食品安全提供科学依据。

**[关键词]** 盐酸土霉素; 残留消除; 鸡蛋

## Study on the Degradation of Oxytetracycline in Chicken Eggs

ZHANG Chong - wei<sup>1</sup>, QIU Jin - li<sup>2\*</sup>, LI Hong - jiao<sup>2</sup>

(1. Henan Institute of Veterinary Drugs and Feed Surveillance, Zhengzhou 450008, China;

2. Zhengzhou Fuyuan Animal Pharmaceutical Co., LTD, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** This study aimed to study the degradation of the residues in eggs after clinical use of oxytetracycline hydrochloride soluble powder. Two groups of layers took 50% oxytetracycline hydrochloride soluble powder of 500 mg/L and 667 mg/L concentrations respectively at water - drinking times for 5 days consecutively, one time per day. Eggs were collected on day 1 through day 12 after the withdrawal of the drug, and the residues were tested by UPLC - MS/MS method. The study showed that the peak level of drug residual for the lower dose group and higher dose group were reached on day 1 and day 2 after drug withdrawal; and the maximum amount of residue in the lower lose group and higher dose group were 142. 72  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 82. 84  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively, both of them were lower than the maximum residue limit (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) in the state provisions, the level of the oxytetracycline residue did not exceed the standard. By studying the residue of oxytetracycline hydrochloride soluble powder in eggs, this experiment determined the residual amount of oxytetracycline before and after egg abandoning period so as to provide scientific basis for the safe use of drugs in laying period and ensuring food safety.

作者简介: 张崇威, 硕士, 兽医师, 从事兽药残留检测研究。

通读作者: 邱瑾丽。E - mail: qjlqhwqq@163. com

**Key words:** oxytetracycline hydrochloride; degradation of residue; eggs

盐酸土霉素可溶性粉为四环素类广谱抗菌药物制剂,能迅速抑制细菌的生长繁殖。临床上常用于治疗猪、鸡敏感大肠埃希菌、沙门氏菌、巴氏杆菌及支原体引起的感染性疾病。盐酸土霉素可溶性粉可用于产蛋期,治疗产蛋率下降或停止产蛋,以及因输卵管炎造成的蛋壳上带有血迹、产畸形蛋和软壳蛋、输卵管排出黄白色脓样分泌物等<sup>[1]</sup>。根据在养殖环节的调查,养殖场常以高于常规剂量给药,给药剂量为 667 mg/L 50% 盐酸土霉素可溶性粉,饮水给药,高于国家规定的 500 mg/L 给药剂量。人体长期摄入含少量抗生素的食品后,会造成药物的蓄积,产生毒性作用,严重的会出现致癌、致畸、致突变等,因此,对食品安全带来极大的潜在危害<sup>[2]</sup>,我国农业农村部规定了土霉素在鸡蛋中的最高残留限量标准为 200 μg/kg,弃蛋期 2 d。目前,我国关于鸡蛋中土霉素的研究主要针对残留检测方法的研究,包括超高效液相色谱-串联质谱法<sup>[3]</sup>、高效液相色谱法<sup>[4]</sup>、固相萃取-高效液相色谱法<sup>[5]</sup>、毛细管电泳-电化学检测法<sup>[6]</sup>等,尚未见关于盐酸土霉素可溶性粉按国家规定剂量和增加剂量使用后在鸡蛋中残留消除规律的研究,本试验通过研究盐酸土霉素可溶性粉在鸡蛋中的残留情况,确定弃蛋期前后土霉素残留量,以期为蛋鸡产蛋期安全用药,保障食品安全提供科学依据。

## 1 材料与方 法

1.1 主要试剂 土霉素对照品,批号:130305,中国食品药品检定研究院;盐酸土霉素可溶性粉,规格:50%,生产批号:201708003,郑州福源动物药业有限公司苏可乐(批准文号:兽药字 160256691);甲醇,乙腈为色谱纯;乙二胺四乙酸二钠为分析纯,超纯水,所需溶液配制见 GB/T 21317<sup>[7]</sup>。

1.2 主要仪器 Acquity UPLC-XEVO TQ-S 质谱联用仪(美国 Waters 公司);3K-30 台式高速冷冻离心机(Sigma 公司);R215 Professional 旋转蒸发器(瑞士 Buchi 公司);IKAMS3. Basic 圆周振荡器(广州仪科实验室技术有限公司);ALC-2100.2 电

子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司);VX-III 多管涡旋振荡器(北京踏锦科技有限公司);TTL-DC II 氮气吹干仪(北京同泰联科技发展有限公司);TD 系列固相萃取柱,TD-TPS-00603(天津市兴达科技有限公司)。

1.3 试验动物及分组 试验选用三棚蛋鸡,品种为京红,362 日龄,购自山西省阳城县浩博养殖有限公司,常规饲养,进行常规免疫程序,试验前不使用任何药物。三棚蛋鸡随机分为空白对照组(15000 只),常规剂量组(14000 只),加大剂量组(15000 只)。饲喂不添加任何抗菌药物的全价饲料,自由采食饮水。试验前后各组蛋鸡饲养条件相同。

1.4 给药和样品采集 常规剂量组以 500 mg/L,加大剂量组 667 mg/L 集中饮水给药 5 d,空白对照组不给药。根据农业部文件农医发[2018]2 号中畜禽产品兽药残留抽样要点<sup>[8]</sup>,在停药后 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 d,每个时间点分别从不同剂量组的鸡棚前中后位置的产蛋架随机采集鸡蛋,每个时间点 10 个样本,每个样本 10 枚鸡蛋。样本标记,冰箱 4 ℃ 保存,待测。

1.5 色谱条件 色谱柱:Waters Acquity UPLC™ BEH C18(1.7 μm,2.1 × 100 mm);柱温 30 ℃;流动相 A:乙腈,B:0.1% 甲酸溶液;进样量 5 μL;梯度洗脱程序见表 1。

表 1 色谱梯度洗脱程序

Tab 1 Procedure of gradient elution

时间 time/min	流速 Flow rate /(mL · min <sup>-1</sup> )	A/%	B/%	曲线类型 Curve
1 Initial	0.300	10.0	90.0	/
2 4.00	0.300	40.0	60.0	6
3 5.00	0.300	10.0	90.0	1

1 为即时变化,6 为线性变化

1.6 质谱条件 电喷雾离子源;正离子扫描;多反应监测 MRM;离子源温度 150 ℃;脱溶剂气容量 800 L/h;锥孔电压 25 V;锥孔气流速 150 L/h;毛细

管电压 3.3 kV;定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 定性、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量

Tab 2 Qualitative and quantitative ion pair and the corresponding cone volt and collision energy

药物 Compound	定性离子对(m/z) Qualitative	定量离子对(m/z) Quantitative ion pair	锥孔电压/V Cone volt	碰撞能量/eV Collision energy
土霉素	461.2 > 426.1	461.2 > 426.1	38	18
	461.2 > 337.0		38	26

1.7 样品前处理 用匀浆机把鸡蛋制成匀浆,称取匀质样品(2 ± 0.02)g,置 50 mL 离心管中,加入 16 mL 缓冲液,漩涡震荡 20 min,14000 r/min 低温离心 5 min,静置,取上清液 8 mL 进行样品净化。HLB 固相萃取柱用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化,取上述鸡蛋待净化的 8 mL 上清液注入萃取柱中,分别依次用 3 mL 水、3 mL 5% 甲醇水溶液淋洗,弃去淋洗液后,用 3 mL 甲醇洗脱,洗脱液 50 °C 水浴中氮气吹干,残渣用 1 mL 30% 甲醇溶液复溶,充分混匀,残渣溶液过 0.22 μm 针头式过滤器后,滤液供液相色谱-串联质谱法检测,若残留量超出曲线范围,以相应空白基质稀释至曲线范围。

1.8 标准曲线 分别精密吸取 100 μg/L 的土霉素标准中间液 0.02、0.05、0.08、0.10、0.20 mL 于 1.7 项中氮气吹干后所得残渣,加 30% 甲醇溶液 0.98、0.95、0.92、0.90、0.80 mL,混匀,制成 2、5、8、10、20 μg/kg 的系列基质标准溶液,依次上机,以土霉素的质量浓度为横坐标,定量离子的色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

1.9 检测限和定量限 取匀浆后空白鸡蛋样品 2 g,添加适量的土霉素标准溶液,按照 1.7 项进行处理,经液相色谱串联质谱测定,按信号(S)与噪音(N)比值计算,S/N > 3 为检测限,S/N > 10 为定量限值。

1.10 精密度和准确度 分别取匀浆后空白鸡蛋样品 2 g,添加 4、200、400 μg/kg 水平的土霉素进行回收率试验(按照 1.7 项进行处理),每个添加水平 6 个平行,连做 3 次,并计算日内相对标准偏差及日间相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 线性关系 土霉素在 2 ~ 20 μg/kg 浓度范围内呈现良好的线性关系,其曲线方程为:  $y = 17489.07447X - 2109.07021$ , 相关系数  $r$  为 0.99968,如图 1 所示。标准溶液图谱如图 2。

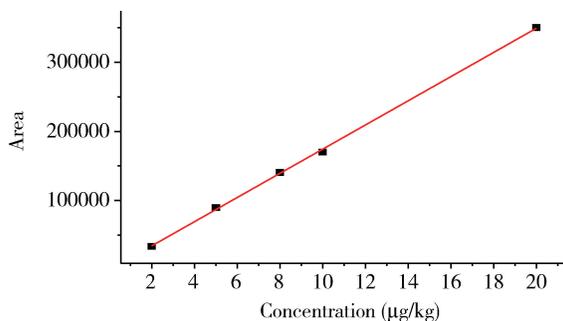


图 1 土霉素标准曲线

Fig 1 Standard curve of oxytetracycline

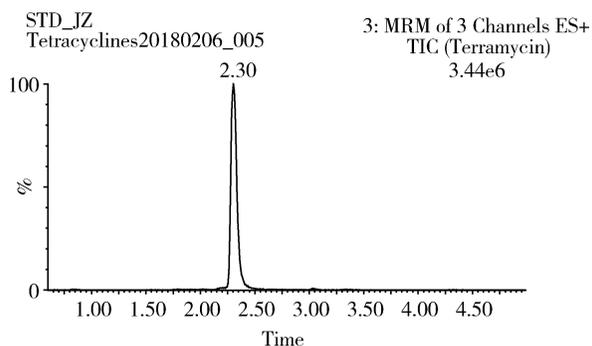


图 2 鸡蛋基质中 10 μg/kg 土霉素标准液的特征色谱图

Fig 2 chromatogram of 10 μg/kg oxytetracycline standard solution in egg matrix

2.2 检测限和定量限 根据特征质量色谱峰的信噪比 S/N > 3 为检测限,S/N > 10 为定量下限,得鸡

蛋中土霉素的检测限为 2 μg/kg,定量限为 4 μg/kg。

2.3 准确度和精密度 土霉素在 4、200、400 μg/kg 3 个添加水平上,每个添加水平做 6 平行,其平均回收率、日内相对标准偏差及日间相对标准偏差见表 3。土霉素的回收率在 79.1% ~ 93.6% 之间,日

内相对标准偏差及日间相对标准偏差均小于 10%。图 3 为空白鸡蛋的土霉素特征离子质量色谱图,图 4 为空白鸡蛋中添加 10 μg/kg 的土霉素特征离子质量色谱图。

表 3 土霉素回收率及相对标准偏差实验 (n = 6)

Tab 3 Test of recovery rate and relative standard deviation (RSD) of Oxytetracycline (n = 6)

药物名称 Name	添加量/(μg · kg <sup>-1</sup> ) Amount of addition	平均回收率/% Average recovery	日内相对标准偏差/% Intra - day RSD(%)	日间相对标准偏差/% Inter - day RSD(%)
土霉素 Oxytetracycline	4	80.5 83.9 86.4	6.7 4.1 3.4	8.1
	200	92.5 89.5 90.4	2.1 1.9 3.7	5.5
	400	90.1 91.7 89.8	2.2 1.5 2.7	5.3

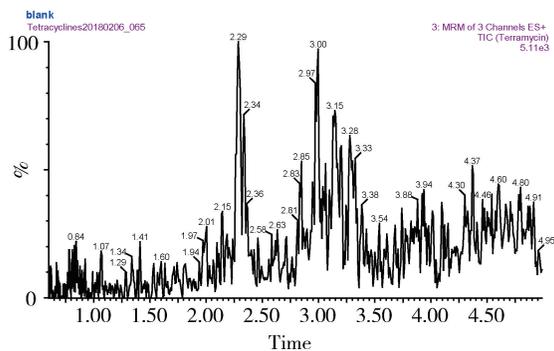


图 3 空白鸡蛋的土霉素特征离子质量色谱图

Fig 3 The characteristic ion quality chromatogram of oxytetracycline in blank eggs

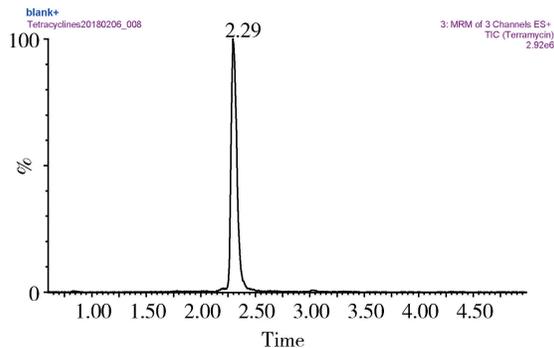


图 4 空白鸡蛋中添加 10 μg/kg 土霉素的特征色谱图

Fig 4 Chromatogram of oxytetracycline (10 μg/kg) in blank eggs

2.4 鸡蛋中土霉素的残留消除 按照前处理方法对所采集的鸡蛋中土霉素残留进行检测,外标法定量。不同采样点土霉素残留量见表 4,残留消除曲线如图 5。

表 4 高低剂量组鸡蛋中的土霉素残留量 (X̄ ± S, n = 10) (μg/kg)

Tab 4 Oxytetracycline residues in Eggs in high and low dose groups (X̄ ± S, n = 10) (μg/kg)

停药后时间/d Time after withdrawal	残留量/residues/(μg · kg <sup>-1</sup> )	
	常规剂量组 (500 mg/L) normal dose	加大剂量组 (667 mg/L) High dose
1	142.72 ± 11.602	74.71 ± 6.290
2	71.39 ± 9.786	82.84 ± 20.297
3	57.93 ± 10.462	59.47 ± 9.452
4	27.91 ± 8.449	60.17 ± 10.201
5	26.83 ± 4.695	41.86 ± 5.047
6	19.34 ± 3.014	20.48 ± 1.248
7	25.83 ± 2.043	30.86 ± 5.688
8	15.64 ± 2.598	24.75 ± 7.751
9	12.11 ± 2.766	15.33 ± 3.199
10	22.54 ± 10.523	20.41 ± 1.364
11	10.00 ± 1.857	10.54 ± 2.902
12	8.79 ± 1.223	17.00 ± 1.892

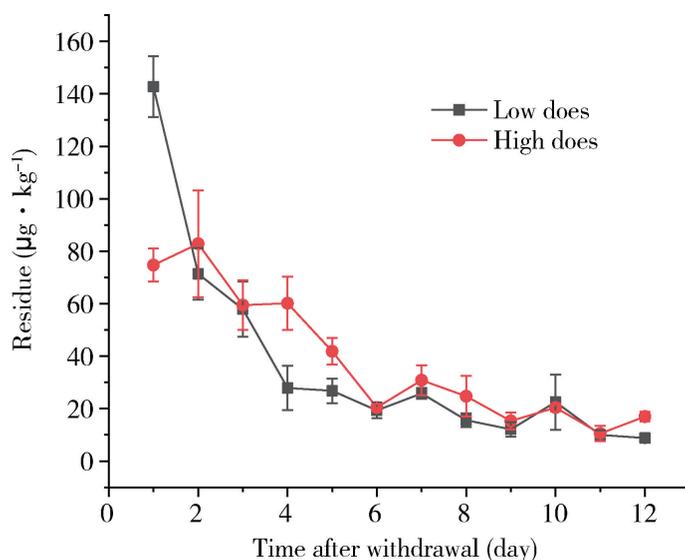


图 5 鸡蛋中土霉素残留消除曲线

Fig 5 Depletion curve of oxytetracycline residue in egg

空白对照组试验期间与各试验组饲养条件和采样时间点相同,空白对照组样品在各取样时间点均未检测出土霉素残留,表明实验动物在试验期间未受到其他来源药物的影响,实验动物在试验期间土霉素残留均来自于目的性给药。表 4 结果显示,蛋鸡产蛋期分别按 500 mg/L 和 667 mg/L 剂量,连续 5 d,每天 1 次,集中饮水给药 50% 盐酸土霉素可溶性粉。低剂量组在停药第 1 天,土霉素残留量最高,达到 142.72  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,高剂量组残留量为 74.71  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,高剂量组在停药第 2 天残留量最高,82.84  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,与我国规定的弃蛋期 2 d 符合。高、低剂量组在停药后的 1 ~ 12 d,鸡蛋中的土霉素残留量均低于国家农业部 235 公告中规定的最高残留限量(200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。以上数据经方差分析, $P > 0.05$ ,两组差异不显著。在临床病情严重时,按标签最大剂量的 1.33 倍给药后,不会造成土霉素在鸡蛋中残留超标。

### 3 讨论

3.1 药物剂量的选择 盐酸土霉素可溶性粉是我国极少数可用于蛋鸡的广谱抗生素,因此,在临床中常用于治疗蛋鸡的输卵管炎。50% 盐酸土霉素

可溶性粉根据《兽药质量标准》(2017 年版)化学药品卷<sup>[9]</sup>中用法用量为,以本品计每 1 L 水鸡 300 ~ 500 mg,连用 3 ~ 5 d。因此,本试验选用标签中最大使用浓度 500 mg/L 作为常规剂量组,由于临床使用过程中存在加大药物使用剂量现象,经在养殖环节中现场调查,加大剂量一般为 667 mg/L(每 150 kg 水 100 g 本品),因此,选用 667 mg/L 作为加大剂量组,经集中饮水给药途径,连用 5 d,研究土霉素在鸡蛋中的残留水平。

3.2 药物在鸡蛋中的残留情况 试验选用的两个剂量是盐酸土霉素可溶性粉在临床治疗输卵管炎常用剂量,在大群养殖环境中,蛋鸡通过集中饮水给药,土霉素残留情况与试验室研究存在一定差异。低剂量组与高剂量组在停药 3 d 残留量比停药 1 d 分别下降了 59.4% 和 20.4%,并且残留量均较低,说明土霉素在蛋鸡体内的代谢速率相对较快,我国规定鸡蛋中土霉素的最高残留限量(MRL)标准为 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,停药 3 d 低、高剂量组土霉素在鸡蛋中残留量仅为最高残留限量标准的 29%,两个剂量组均不会造成土霉素残留超标。

3.3 检测结果 不同给药浓度鸡蛋中残留量也不

同,停药第 1 天,常规剂量组的残留量高于高剂量组,停药第 2 天开始,常规剂量组的检出值均低于高剂量组。国内文献<sup>[10]</sup>曾报道高剂量组在鸡蛋中的残留量比低剂量组先达到高峰。本试验两个剂量组的土霉素残留量在停药后的 12 d 中,药物的残留量均出现往复现象,如低剂量组停药第 6 天的残留量 19.34  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,停药第 7 天的残留量 25.83  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,高剂量组停药第 6 天的残留量 20.48  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,停药第 7 天的残留量 30.86  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。与国外文献<sup>[11]</sup>报道相似:对罗德岛红鸡通过饮水给予 400、600、800 mg/L 土霉素连续 7 d,400 和 600 mg/L 剂量组的蛋黄中土霉素残留量在停药第 3、4 天,也出现了残留量升高的现象。

土霉素在鸡蛋中残留量出现往复的原因,一是由于鸡蛋结构的特殊性,药物向蛋黄中的移行过程是向细胞内蓄积的过程,蛋黄中的药物残留反映了卵泡快速生长期(10 d)血浆的药物水平,蛋黄中的药物残留水平因用药时间长短和开始用药时间处于卵泡生长的不同阶段而升高、稳定或下降<sup>[12]</sup>,因此,鸡蛋中药物残留量出现波动。第二个原因 Kan 等<sup>[13]</sup>推测是受药物与体内蛋白质结合率的影响,该研究在母鸡的峡部和输卵管的膨大部检测到四环素类药物,且四环素在输卵管和蛋白中的残留水平高于血液中的药物水平,等血液中药物浓度下降后,与蛋白质结合的部分药物会重新释放出来进入鸡蛋,这也会使鸡蛋中四环素类药物的残留量发生变化。本试验中土霉素在鸡蛋中的残留量虽然在后期有上升趋势,但幅度较小,远低于国家农业部 235 公告中规定的土霉素最高残留限量(200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ),不会造成土霉素残留量超标。

## 参考文献:

- [1] 崔莉莉. 浅析诱发蛋鸡输卵管炎的原因[J]. 禽病防治, 2017, (4): 35-37.
- [2] 张萍. 鸡蛋中抗生素类药物残留的研究进展[J]. 北方药学, 2015, 12(4): 90-92.
- [3] 王敏娟, 胡佳薇, 田丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中 21 种喹诺酮及四环素类抗生素残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(4): 473-476.
- [4] 吴宁鹏, 班付国, 方忠意, 等. 鸡蛋中四环素类药物残留量测定的高效液相色谱法研究[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(8): 9-12.
- [5] Olufemi O, Saraye T K. Oxytetracycline residues in retail chicken eggs in Ibadan, Nigeria[J]. Food Additives and Contaminants: Part B, 2012, 5(4): 255-259.
- [6] 邢晓平. 毛细管电泳-电化学检测法测定鸡蛋中残留四环素类抗生素[J]. 食品科学, 2007, (10): 470-473.
- [7] XING X P. Antiseptics Trace determination of tetracyclines in eggs by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. Food Science, 2007, (10): 470-473.
- [8] GB/T 21317-2007. 动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法与高效液相色谱仪[S]. GB/T 21317-2007. Determination of Tetracyclines Residues in Food of Animal Origin-LC-MS/MS Method and HPLC Method[S].
- [9] 农医发[2017]1号 农业部关于印发 2017 年动物及动物产品兽药残留监控计划的通知[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201701/t20170124\\_5465004.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201701/t20170124_5465004.htm), 2017-01-24.
- [10] Ministry of agriculture on the issuance of 2017 animal and animal products veterinary drug residue monitoring program notice[EB/OL]. [http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201701/t20170124\\_5465004.htm](http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201701/t20170124_5465004.htm), 2017-01-24.
- [11] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准 2017 年版化学药品卷, 2017[S].
- [12] CU L L. Predisposing cause of salpingitis in laying hens[J]. Poultry Science. 2017, (4): 35-37.
- [13] Kan L L. Predisposing cause of salpingitis in laying hens[J]. Poultry Science. 2017, (4): 35-37.

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committees. Quality Standard for Veterinary Drugs, Chemicals volume, 2017[S].

- [10] 李莉,高志胜,周树南,等. 鸡蛋中土霉素残留量的检测及其意义[J]. 中国食品卫生杂志,1997,(3):12-14.

Li L, Gao Zh S, Zhou S N, *et al.* Determination and significance of oxytetracycline residues in eggs [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 1997, (3):12-14.

- [11] B Omija, E S Mitema†, T E Maitho. Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens[J]. Food Additives and Contaminants, 1994, 11(6):641-647.

- [12] 王冉,刘铁铮. 鸡蛋中的兽药残留规律及其影响因素探讨[J]. 兽药与饲料添加剂,2004,(6):1-4.

Wang R, Liu T Z. Veterinary Drug Residues in Eggs and Their Influencing Factors [J]. Veterinary Pharmaceuticals & Feed Additives, 2004, (6):1-4.

- [13] K an C A, P etz M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white [J]. J Food AgriC Chem, 2000, 48:6397-6403.

(编辑:侯向辉)