

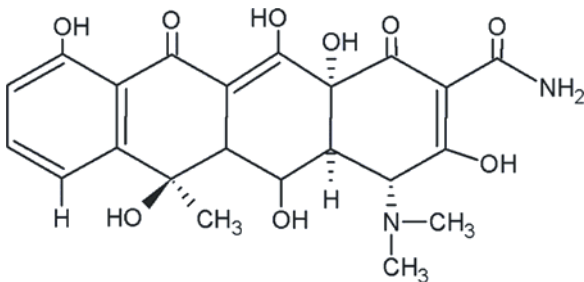
HPTLC法测定鲑鱼（三文鱼）饲料中的土霉素含量



Dr. Mario Vega教授, Mrs. Maritza Alvarado和Mario Aranda教授(右)

智利Concepcion大学Mario Vega*教授的研究团队一直致力于平面色谱技术在中南美洲的推广工作,包括为其提供培训和技术咨询。智利最近的CAMAG培训课程是在2004年由CAMAG公司的Jan Masthoff协助下进行的(详见CBS 94)。今年该课题组获邀在墨西哥Merida市举行的第11届拉丁美洲色谱年会(COLACRO XI)上举办了一个关于平面色谱的研讨班。

在1995年(CBS 75),该课题组已发表了采用TLC技术对鱼肉及鱼饲料中的喹诺酮类抗生素的测定方法的论文,以及采用平面色谱技术对更多的抗生素及抑菌剂的含量测定研究[1-4]。这些前期工作为加药饲料的质量研究提供了基础。与之前发表的方法相比,本文介绍的方法在样品制备、色谱条件和方法学验证等方面都进行了改进。



土霉素化学结构式

介绍

智利水产养殖业在2005年的出口总额达到11.5亿美元,成为国际市场中举足轻重的一员。然而,过度拥挤的养殖条件使得鱼类传播疾病的风险大为提高。因此,投喂抗生素和抗菌药已成为智利国内的行业惯例。土霉素作为一种广谱抗生素,经常用于多种鱼类疾病的预防和治疗。

抗生素可采用浸泡、注射或饲料进食的形式对鱼进行施药,其中最后一种方式由于成分最低因而在水产业中最为常用。这种给药方式的最大问题在于如何确保药物成分在鱼饲料颗粒中的均匀分布,以保证用药剂量的准确。

借助于薄层色谱的一个基本特点,该TLC方法提供非常简便的供试品制备步骤,不需要任何固相萃取(SPE)和脱脂过程。该方法主要为鲑鱼(大马哈鱼)养殖业所开发,目的在于为其开展加药鱼饲料中的例行土霉素分析提供一种亟需的、可靠和经济的高通量分析方法,而且这类饲料通常包含复杂的基质成分,如含有28-34%的脂肪和41-48%的蛋白质等。

供试品溶液的制备

市售加药鱼饲料购自智利EWOS公司。在5g粉碎后的鱼饲料样品中加入50 mL甲醇和盐酸(0.15 mol/L) 9:1 (v/v)的混合溶剂。烧瓶置于摇床震荡30min,再以超声提取20min。静置10min,取上清液1 mL作为供试品溶液。

标准品溶液的制备

盐酸土霉素对照品溶解于甲醇-盐酸 (0.15 mol/L) 9:1 (v/v) 溶剂中, 制成1mg/mL的溶液。

薄层板

商品HPTLC 硅胶G60 F₂₅₄薄层板 (Merck), 20 x 10 cm。以甲醇预洗并在120 °C干燥30 min。再以5% EDTA溶液 (pH 7.0) 浸渍, 并于120 °C干燥1 h。

点样

采用CAMAG ATS4仪器进行条带状点样, 每张板20个轨道。点样体积为样品0.2-20 μ L, 对照品0.1-0.5 μ L。条带宽6 mm, 轨道间距 8.9 mm。原点距底边8 mm, 距两侧最少15 mm。点样速度100 nL/s。

色谱条件

展开在双槽展开缸中进行, 展开剂为二氯甲烷-甲醇-5% EDTA (13:4:2)。缸饱和30 min, 展开距离自底边起50 mm。展开后薄层板在120 °C干燥10 min。

光密度扫描

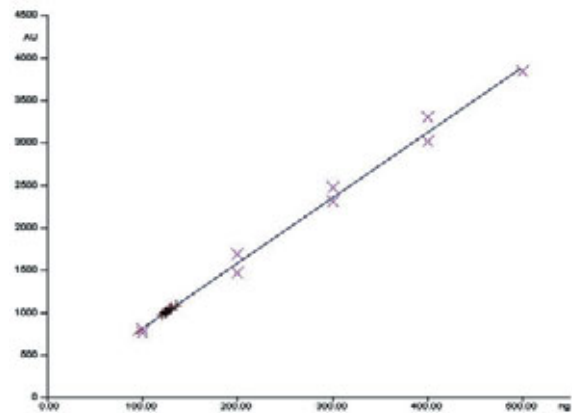
采用CAMAG TLC scanner3和winCATS工作站软件。测定UV 366/>400 nm荧光。以峰面积进行线性回归。

成像

采用CAMAG VideoStore成像系统, 在UV 366 />400 nm下拍照成像。

结果和讨论

工作曲线 (100-500 ng/斑点) 通过线性回归计算得到, 相关系数 $r^2=0.9925$ 。



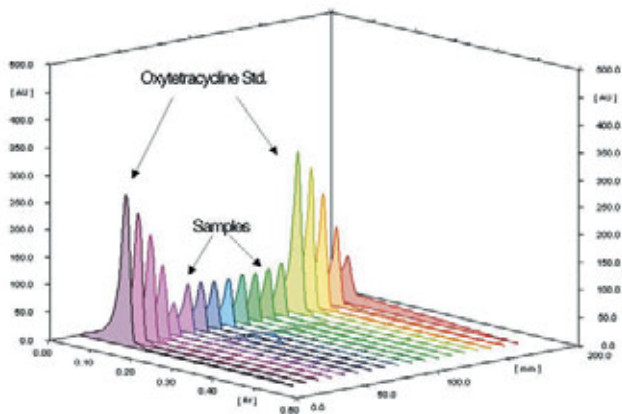
土霉素标准曲线($y = 7.687x + 42.975$; $sdv = 4.5\%$; $r = 0.9963$)



土霉素对照品轨道 (hRf 12) 和鱼饲料样品轨道

加样回收率由空白样品加入3个水平的土霉素对照品计算得到。每个不同水平的样品加样回收率每天制备测定1次, 共重复3天。500, 2500 和 5000 mg/kg的土霉素的回收率分别为73 % \pm 4.2 %, 101 % \pm 2.6 %和101 % \pm 4.0 %。中间精密度显示500、2500和5000 mg/kg水平的标准偏差分别为5.7 %, 2.6 %和4.0 %。

10 μ L点样量的样品的最低检测限LOD (S/N=3) 和最低定量限 (S/N=10) 分别为14.8 mg/kg和49.2 mg/kg。不同的样品点样量使得三文鱼饲料中的土霉素定量范围介于10 ~ 100 mg/kg之间。由于该方法采用选择性的荧光测定模式, 因此样品基质成分的色谱峰对于土霉素含量测定没有任何影响。



土霉素对照品和鱼饲料提取物样品的色谱图 (UV 366 nm)

更详细资料可向作者联系获取：

* Prof. Dr. Mario Vega, University of Concepcion, Faculty of Pharmacy, Department of Food Science, Nutrition and Dietetics, PO Box 237, Correo 3, Concepción, Chile, mveha@udec.cl

- [1] M. Vega, G. Garcia, R. Saelzer and R. Villegas, *J. Planar Chromatogr.* 7, 159-162, 1994.
- [2] M. Vega, G. Rios, R. Saelzer and E. Herlitz, *J. Planar Chromatogr.* 8, 378-381, 1995.
- [3] R. Saelzer, M. Vega, G. Ríos, M. Hepburn and E. Landskron, *Agrociencia* 13, 301-306, 1997.
- [4] S. Dhanesar, *J. Planar Chromatogr.* 12, 280-287, 1999.