

# 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测鸡肉中的四环素类抗生素残留

梁金玲, 黄玉霞, 何金兴

(齐鲁工业大学(山东省科学院)食品科学与工程学院, 山东济南 250353)

**摘要:** 采用本体聚合法, 以盐酸四环素为模板分子, 甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈为引发剂, 合成了针对四环素类抗生素具有选择性的分子印迹聚合物。并以此材料作为固相吸附剂与高效液相色谱联用, 建立了固相萃取-高效液相色谱技术检测鸡肉中的3种四环素类抗生素痕量残留的方法。实验结果表明, 该材料具有较强的吸附性和特异识别性。在0.1 mg/L~1.0 mg/L范围内3种四环素类药物的线性关系良好( $R^2 > 0.99$ ), 土霉素、四环素、强力霉素的最低检出限分别为0.13  $\mu\text{g/L}$ 、0.12  $\mu\text{g/L}$ 、0.14  $\mu\text{g/L}$ , 5次重复实验的精密度分别为1.27%、1.31%、1.94%。在鸡肉中添加3个浓度(50  $\mu\text{g/kg}$ 、100  $\mu\text{g/kg}$ 、200  $\mu\text{g/kg}$ )的四环素类抗生素, 回收率分别为88.33%~94.95%、80.94%~88.02%、87.69%~93.08%, RSD分别为2.08%~3.63%、1.46%~2.37%、1.04%~3.03%。这项研究的结果表明目前建立的方法可以用于鸡肉中四环素类抗生素的残留检测。

**关键词:** 分子印迹聚合物; 高效液相色谱; 固相萃取; 四环素

文章编号: 1673-9078(2018)07-224-229

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.7.033

## Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Chicken by Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction Coupled with High Performance Liquid Chromatography

LIANG Jin-ling, HUANG Yu-xia, HE Jin-xing

(School of Food Science and Engineering, Qilu University of Technology Shandong Academy of Science, Jinan 250353, China)

**Abstract:** A selective molecularly imprinted polymer for separating tetracycline antibiotics was synthesized via bulk polymerization using tetracycline hydrochloride as the template, methacrylic acid as a functional monomer, ethylene glycol dimethacrylate as a cross-linker and azobisisobutyronitrile as an initiator. This synthesized material was used as the solid phase adsorbent that was coupled with high performance liquid chromatography (HPLC) to establish a solid phase extraction-HPLC system for the determination of trace residues of three tetracycline antibiotics in chicken meat. The obtained results showed that the material has high adsorption capacity and specific recognition. A good linearity of the three tetracycline antibiotics in the range of 0.1-1.0 mg/L ( $R^2 > 0.99$ ) was detected, with the minimum detection limits of oxytetracycline, tetracycline, doxycycline as 0.13  $\mu\text{g/L}$ , 0.12  $\mu\text{g/L}$ , 0.14  $\mu\text{g/L}$ , respectively, and relative standard deviation (RSD) values of the five replicates as 1.27%, 1.31%, 1.94%, respectively. When tetracycline antibiotics were added to chicken at three different concentrations (50  $\mu\text{g/kg}$ , 100  $\mu\text{g/kg}$  and 200  $\mu\text{g/kg}$ , respectively), the recoveries were 88.33%~94.95%, 80.94%~88.02%, and 87.69%~93.08%, respectively, with corresponding RSD values being 2.08%~3.63%, 1.46%~2.37%, and 1.04%~3.03%, respectively. The results of this study show that the currently established method can be used for the detection of tetracycline residues in chicken meat.

**Key words:** molecularly imprinted polymers; high performance liquid chromatography; solid phase extraction; tetracycline

四环素类抗生素是由链霉菌产生的含多环并四苯

收稿日期: 2018-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301470); 山东省优秀中青年科学家基金项目(BS2012SW018)

作者简介: 梁金玲(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 何金兴(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测

羧基酰胺母核的一类抗生素, 常见的有四环素、土霉素、强力霉素和金霉素等<sup>[1]</sup>。四环素类抗生素不仅对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和支原体有抑制作用, 甚至对衣原体和立克次氏体的活性也有影响<sup>[2]</sup>, 且价格低廉, 广泛应用于动物养殖领域。为了预防动物疾病、促进生长和繁殖, 这类抗生素经常被滥用, 导致

其在动物体内大量残留, 经人食用后具有损害牙齿、骨骼、消化道和肝肾, 甚至严重危及人体生命安全的潜在风险<sup>[3-6]</sup>。美国食品药品监督管理局规定肌肉中四环素残留总量不超过 0.2 mg/kg, 牛奶中不超过 0.4 mg/kg<sup>[7]</sup>。欧盟和我国规定在动物肌肉组织和奶中的最大残留量为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[8,9]</sup>。因此, 建立方便有效的方法来检测动物源性食品中的四环素类抗生素具有重要意义。

目前, 四环素类抗生素检测方法主要有微生物法<sup>[10]</sup>, 高效液相色谱法<sup>[11]</sup>, 免疫层析法<sup>[12]</sup>, 毛细管电泳法<sup>[13]</sup>, 液相色谱-质谱联用法<sup>[14]</sup>等。其中, 高效液相色谱法是最常用的方法。但由于食品基质的复杂性, 检测前必须进行复杂的样品前处理程序。固相萃取技术因操作简便、效率高, 溶剂用量少等优点, 克服了传统液-液萃取法的缺点, 成为目前普遍应用的样品前处理方法。由于食品基质的干扰, 如何获得高选择性的固相萃取材料是目前限制固相萃取样品前处理技术的关键。分子印迹技术是以抗原抗体原理为依托, 制备对目标分子具有高选择性聚合物的方法, 是目前研究的热点之一。

本文以盐酸四环素为模板, 甲基丙烯酸为功能单体, 乙二醇二甲基丙烯酸酯为交联剂, 偶氮二异丁腈作为引发剂, 合成了针对四环素类抗生素的分子印迹聚合物, 并以此材料作为固相吸附材料, 建立固相萃取技术对鸡肉样品中的四环素类抗生素进行提取、富集、净化, 并与高效液相色谱联用检测鸡肉样品中四环素类抗生素残留。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪-SPD 检测器, 日本 Shimadzu 公司; 固相萃取仪, Supelco USA; TU1901 双光束紫外-可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司。

盐酸四环素 (TC)、磺胺二甲嘧啶 (SMZ)、磺胺氯哒唑 (SCP), Sigma 公司; 盐酸土霉素 (OTC), Solarbio 公司; 盐酸强力霉素 (DC), 上海源叶生物科技有限公司; 甲基丙烯酸 (MAA), 偶氮二异丁腈 (AIBN), 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 乙二醇二甲基丙烯酸酯 (EGDMA), 分析纯, 上海阿拉丁; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 冰醋酸, 分析纯, 天津市富宇精细化工有限公司; 一水合柠檬酸、无水磷酸氢二钠、乙二胺四乙酸二钠, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 水

为超纯水, MAA 和 EGDMA 在使用前需要减压蒸馏纯化, AIBN 需用 95%乙醇重结晶后使用。

标准溶液的配制: 准确称取 TC、OTC、DC 标准品各 10.0 mg, 用甲醇定容至 100 mL, 配置成 100 mg/L 的混合溶液。其他标准溶液均由此稀释而来。

0.1 mol/L 的柠檬酸溶液的配制: 称取 21.01 g 柠檬酸, 用水定容至 1000 mL。

0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液的配制: 称取 71.63 g 磷酸氢二钠, 用水定容至 1000 mL。

Mcllvaine 缓冲溶液的配制: 将 1000 mL 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液与 625 mL 0.2 mol/L 的磷酸氢二钠溶液混合, 用 1 mol/L 的盐酸或 NaOH 调 PH 至 4.0 $\pm$ 0.05。

0.1 mol/L 的 Na<sub>2</sub>EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液的配制: 称取 60.50 g 乙二胺四乙酸二钠放入 1625 mL Mcllvaine 缓冲溶液中, 使其溶解, 摇匀。

实验所用的鸡肉取自当地超市。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil ASB-C18(4.6 mm $\times$ 250 mm); 检测器: 二极管阵列检测器; 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$  进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 流速: 1 mL/min; 检测波长: 357 nm; 流动相: A (甲醇:乙腈=3:7) :B (0.01 mol/L 柠檬酸水溶液)=27:73。

#### 1.2.2 标准曲线的绘制

取浓度为 10 mg/L 的四环素类抗生素混合标准溶液, 以甲醇为溶剂, 逐级稀释为 1.0 mg/L、0.8 mg/L、0.5 mg/L、0.2 mg/L、0.1 mg/L。以浓度为横坐标, 对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

#### 1.2.3 分子印迹聚合物的制备

取 119 mg TC、175  $\mu\text{L}$  MAA、3 mL 乙腈、2 mL 甲醇置于 50 mL 圆底烧瓶中, 振荡 30 min; 向圆底烧瓶中加入 760  $\mu\text{L}$  EGDMA, 振荡 15 min; 再加入 50 mg AIBN, 振荡 5 min; 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴聚合 48 h。反应完成后将聚合物材料研磨至粉末状, 利用甲醇乙酸混合溶液 (9:1, V/V) 洗脱至无 TC 检出。用去离子水反复冲洗 2~3 次, 60  $^{\circ}\text{C}$  烘干至恒重, 待用。非印迹材料除了不加模板分子外, 其他的步骤相同。

#### 1.2.4 材料吸附性能表征

##### 1.2.4.1 吸附动力学实验

准确称取 25.0 mg 分子印迹聚合物材料, 加入 5 mL 30 mg/L 的 TC-甲醇溶液, 分别在室温下振荡 5 min、10 min、20 min、30 min、60 min 后, 5000 r/min 离心 15 min。在波长 357 nm 条件下, 采用紫外-可见分光光度计测定上清液中 TC 的吸光度。按照公式(1) 计算聚合物对 TC 的吸附量。

$$Q_t = (C_0 - C_t)V/m \quad (1)$$

式中,  $C_0$  和  $C_t$  分别代表吸附前和吸附后 TC 的浓度 (mg/L),  $V$  表示加入 TC 的体积 (mL),  $m$  为聚合物质量 (mg)。

#### 1.2.4.2 平衡结合实验

为了考察所制备的分子印迹聚合物对 TC 的结合能力, 准确称取 25.0 mg 印迹材料和非印迹材料, 分别加入 5 mL 不同浓度的 TC-甲醇溶液 (20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L、70 mg/L、100 mg/L) 振荡 30 min, 5000 r/min 离心 15 min。在 357 nm 的波长下, 采用紫外-可见分光光度计测定上清液中 TC 的吸光度, 按照公式 (1) 计算聚合物对 TC 的吸附量。

#### 1.2.4.3 选择性结合实验

为了考察聚合物对 3 种四环素类抗生素的特异性吸附, 选择与四环素类抗生素结构类似的 SMZ、SCP 作为竞争物。准确称取 25.0 mg 印迹材料和非印迹材料于 50 mL 容量瓶中, 各加入 5 mL 10 mg/L 的 TC、OTC、DC、SMZ、SCP 的混合甲醇溶液, 振荡 30 min, 5000 r/min 离心 15 min。通过 HPLC 检测上清液中各分析物浓度, 四环素类抗生素的测定波长为 357 nm, 磺胺类药物为 270 nm。通过比较吸附前后上清液与标准溶液浓度, 计算每种物质的吸附量、分配系数 ( $K_d$ )、选择性系数 ( $K$ ) 和相对选择性系数 ( $K'$ )。计算公式如下:

$$K_d = (C_0 - C_t)V/C_tM \quad (2)$$

$$K = K_d(TC)/K_d(Interferent) \quad (3)$$

$$K' = \frac{K_{MMIPs}}{K_{MNIPs}} \quad (4)$$

#### 1.2.5 样品处理

准确称取 5.0 g 鸡肉样品置于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 0.1 mol/L 的  $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$  缓冲溶液, 涡旋混合 1 min, 冰水浴超声提取 10 min, 3000 r/min 离心 5 min; 重复提取两次, 合并上清液, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 待净化。

准确称取 0.25 g 聚合物材料, 填充于 5 mL 的空的聚丙烯固相萃取柱中的底端筛板上, 顶端用聚丙烯筛板压实。填充完毕后, 用 5 mL 的甲醇和 5 mL 水预处理, 保持柱体湿润; 取待净化的样品, 以 1 mL/min 的速度过固相萃取柱, 待样液完全流出后, 依次用 5 mL 水和 5 mL 5% 甲醇水溶液淋洗, 弃去全部流出液; 用 10 mL 甲醇和乙酸混合溶液 (9:1, V/V) 洗脱, 收集洗脱液; 将洗脱液在  $\text{N}_2$  下吹干, 用 1 mL 甲醇复溶, 过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜, 待测。

#### 1.3 数据处理

实验数据处理及作图采用 Origin 8.6 软件和 Excel

2016。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的选择

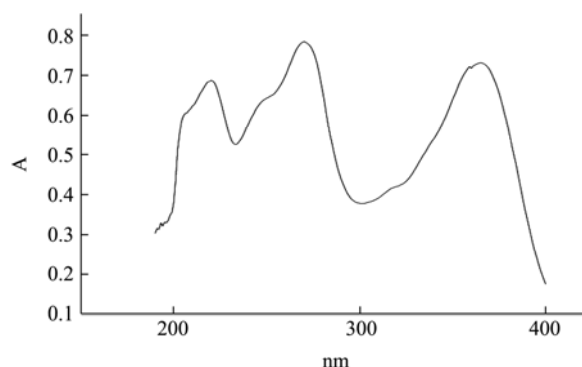


图1 四环素紫外吸收曲线

Fig.1 The UV absorption curve of TC

取 TC 标准溶液, 利用紫外-可见分光光度计在 400~190 nm 范围内进行全波长扫描。结果如图 1 所示。由图可知, TC 在 270 nm 处和 357 nm 处吸收峰较大, 但在 270 nm 处干扰物较多, 因此选择 357 nm 作为 TC 的最佳检测波长。

### 2.2 流动相的选择

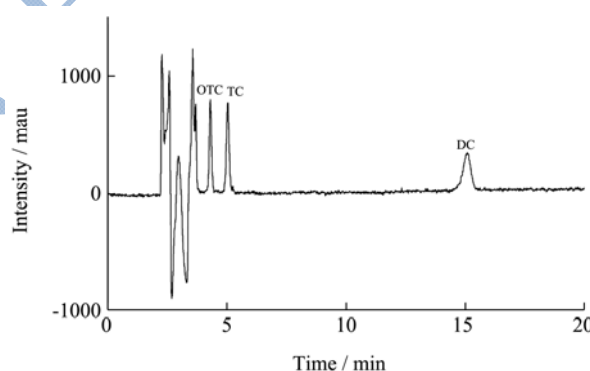


图2 1 mg/L 的 TC-甲醇标准溶液液相色谱图

Fig.2 The HPLC chromatogram of 1 mg/L TC-Methanol solution

四环素类抗生素具有酸碱两性, 但在弱酸环境中比较稳定, 过酸或碱性均易失效, 因此选用的流动相应为弱酸性。参考文献<sup>[15,16]</sup>的方法, 选择 0.01 mol/L 的柠檬酸作为水相, 甲醇和乙腈混合溶液作为有机相, 并对甲醇与乙腈的比例, 水相与有机相的比例进行了优化。实验结果表明, 当甲醇:乙腈=3:7, 有机相:水相=27:73 时, 3 种四环素类抗生素能够完全分离, 且所用时间最短。标准品色谱图如图 2 所示。

### 2.3 分子印迹聚合物吸附性能表征

### 2.3.1 吸附动力学实验

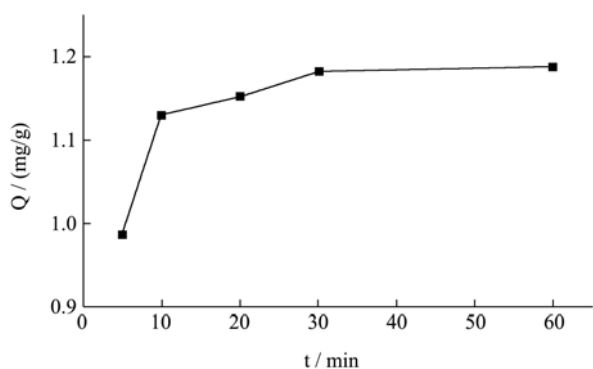


图3 30 mg/L TC-甲醇溶液在 25 mg 分子印迹材料上的吸附动力学

Fig.3 The adsorption kinetics of 30 mg/L TC-methanol solution on 25 mg molecularly imprinted materials

为了评价制备的聚合物的传质速度,测定了不同时间下(5~60 min), 25.0 mg 聚合物对 30 mg/L 的 TC-甲醇溶液的吸附量(图3)。由图3可知,吸附5 min后,吸附容量达到最大吸附容量的83.0%, 30 min基本达到吸附平衡,说明合成的材料具有较快的传质速度。如果四环素的浓度更低,达到吸附平衡的时间会更短。

### 2.3.2 平衡结合实验

为了评价合成的聚合物对模板分子 TC 的结合能力,在室温下测定印迹聚合物和非印迹聚合物对 20~100 mg/L 的 TC 吸附量的变化趋势,以 TC 浓度为横坐标,吸附量为纵坐标,绘制 TC 吸附等温线(图4)。由图4可知,随着四环素溶液浓度的增加,印迹聚合物和非印迹聚合物对 TC 的吸附量均有不同程度的增加。但印迹聚合物的吸附量要明显高于非印迹,当 TC 的初始浓度为 100 mg/L 时,印迹聚合物和非印迹聚合物对 TC 的吸附量分别为 2.30 mg/g 和 1.13

mg/g, 印迹聚合物对四环素的吸附量大约是非印迹聚合物吸附量的 2.04 倍,说明相较于非印迹聚合物,印迹聚合物对模板分子的吸附性较好。

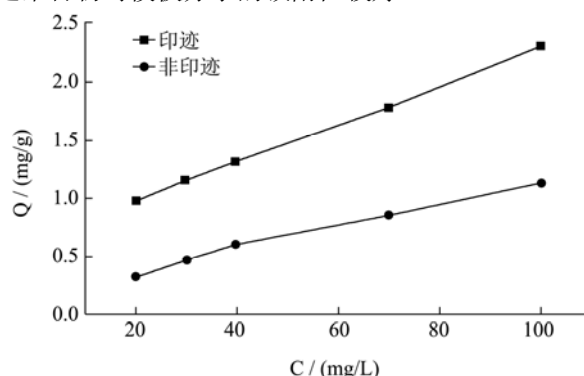


图4 印迹聚合物和非印迹聚合物对 TC 的吸附等温线

Fig.4 Adsorption isotherms of TC for imprinted polymers and non-imprinted polymers

### 2.3.3 选择性吸附

为了评价印迹聚合物对四环素类抗生素的选择性,分别选择印迹材料与非印迹材料对三种四环素类抗生素、SMZ、SCP 进行竞争吸附,结果见表1。由表1可知,印迹材料对四环素类抗生素的吸附量要大于非印迹材料对四环素类抗生素的吸附容量,且印迹材料对四环素类抗生素的吸附量大于对 SMZ、SCP 的吸附量,印迹材料的  $K_d$  大于非印迹材料的  $K_d$ , 印迹材料对四环素类抗生素的  $K$  小于 SMZ、SCP, SMZ、SCP 的  $K'$  均大于 1, 说明印迹材料对 3 种四环素类抗生素具有较强的选择识别性。其原因主要是在聚合过程中, TC 与 MAA 的键合,使配体进行有序的排列,从而形成了一定的立体化学结构。洗脱除去模板后,形成了特定的空穴,该空穴使得聚合材料具有一定的特异性。而非印迹聚合物中没有特定的空穴,只是依靠化学性或物理性吸附,所以具有较低的选择性。

表1 印迹材料与非印迹材料对四环素类抗生素、SMZ、SCP 的竞争吸附结果

Table 1 Competing adsorption results of tetracyclines, SMZ and DMP between imprinted and non-imprinted materials

分析物	印迹吸附量/( $\mu\text{g/g}$ )	非印迹吸附量/( $\mu\text{g/g}$ )	印迹 $K_d$	非印迹 $K_d$	印迹 $K$	非印迹 $K$	$K'$
OTC	746.1	240.4	0.12	0.027	0.96	1.10	0.87
TC	726.5	260.7	0.11	0.030	1	1	1
DC	723.8	175.2	0.11	0.019	1.06	1.56	0.64
SMZ	208.4	342.2	0.041	0.023	2.76	1.29	2.14
SCP	139.9	352.4	0.043	0.015	2.68	1.99	1.34

## 2.4 分析方法特征量

### 2.4.1 线性关系和方法检出限

将四环素类抗生素混合标准溶液(0.1~1.0 mg/L)在选定的色谱条件下进行测定,线性方程见表2。在相同条件下,重复进样5次,验证方法的精密度

(RSD)。根据  $S/N=3$  计算方法的检出限。结果见表2。由表2可知,在 0.1~1.0 mg/L 范围内,3种四环素类抗生素的线性关系良好( $R^2 > 0.99$ ),方法对 OTC、TC、DC 3种四环素类抗生素的最低检出限分别为 0.12  $\mu\text{g/L}$ 、0.13  $\mu\text{g/L}$ 、0.14  $\mu\text{g/L}$ , RSD 分别为 1.27%、1.31%、1.94%。

表2 方法的线性范围、线性方程、相关系数、检出限及精密密度

Table 2 Linear range, linear equation, correlation coefficient, LOD and RSD of SPE-HPLC

分析物	线性范围/(mg/L)	线性方程	线性系数/R <sup>2</sup>	检出限/(μg/L)	RSD/%
OTC	0.1~1	Y=6364.1X+101.88	0.9969	0.12	1.27
TC	0.1~1	Y=9443.8X-22.163	0.9999	0.13	1.31
DC	0.1~1	Y=6731.4X+414.29	0.9984	0.14	1.94

表3 鸡肉样品的加标回收率

Table 3 The recoveries of spiked chicken sample

分析物	加标浓度/(μg/kg)					
	50		100		200	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
OTC	88.33	2.10	91.56	3.63	94.95	2.08
TC	82.37	1.57	80.94	1.46	88.02	2.37
DC	87.69	1.64	88.89	3.03	93.08	1.04

2.4.2 方法的加标回收率

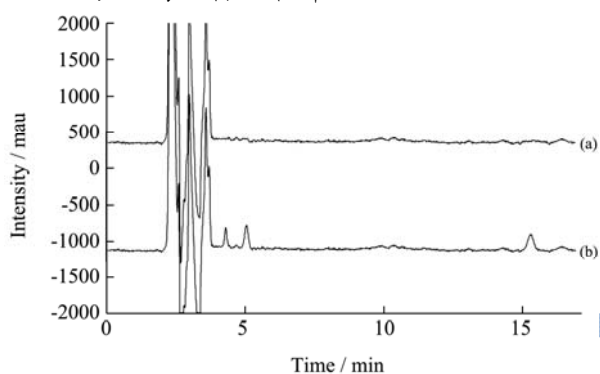


图5 空白样品 (a)、加标样品 (50 μg/kg) (b) 的色谱图

Fig.5 Chromatograms of blank samples(a), spiked samples(b)

为了评价所建立方法的准确性和适用性, 选用当地超市的鸡肉样品, 测定样品中3种分析物的残留情况。经测定, 确定鸡肉样品中未检出目标分析物。为了进一步证明所建方法的准确性, 对样品进行添加回收实验, 添加样品后3种分析物的最终浓度为50 μg/kg, 100 μg/kg 和 200 μg/kg。对样品进行提取后, 固相萃取富集净化, 收集洗脱液, 吹干后用1 mL 甲醇复溶, 过0.45 μm 滤膜, 待液相检测。每个浓度平行测定3次, 计算平均加标回收率及RSD, 见表3。实际样品的色谱图见图5。由表可知, 鸡肉中的3种四环素类抗生素的加标回收率为80.94%~94.95%, RSD为1.04%~3.63%, 可以满足鸡肉中痕量四环素类抗生素的痕量检测要求。由图5可知, 样品色谱图中的杂峰较少, 说明该样品前处理方法可以有效的去除食品基质的干扰。

3 结论

实验结果表明, 本方法合成的分子印迹聚合物对3种四环素类抗生素(四环素、土霉素、强力霉素)

具有较强的吸附性和特异识别性, 并用该聚合物材料作为固相萃取柱填料, 制备固相萃取柱, 建立了固相萃取与高效液相色谱联用技术同时检测鸡肉中3种四环素类抗生素残留的方法。该法将富集、净化和检测为一体, 简单、快速且灵敏度高, 可以用于实际样品中四环素类抗生素的检测。

参考文献

[1] 庄园, 彭英, 赵永刚, 等. 分子印迹固相微萃取-高效液相色谱法测定水和牛奶中三种四环素类药物[J]. 分析科学学报, 2014, 30(4): 451-456  
 ZHUANG Yuan, PENG Ying, ZHAO Yong-gang, et al. Determination of tetracyclines in water and milk by solid phase microextraction based on tetracyclines molecularly imprinted polymers coupled with HPLC [J]. Journal of Analytical Science, 2014, 30(4): 451-456

[2] 杨琳. 动物性食品中土霉素、金霉素和四环素检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2012, 8: 63-66  
 YANG Lin. Development of detection methods of oxytetracycline, chlortetracycline and tetracycline in animal derived foods [J]. Chinese Animal Quarantine, 2012, 8: 63-66

[3] Zhenglu D, Siyu Y, Hui H, et al. Proteomic profile of carbonylated proteins in rat liver: Discovering possible mechanisms for tetracycline-induced steatosis [J]. Proteomics, 2015, 15(1): 148-159

[4] Nunes B, Antunes S C, Gomes R, et al. Acute effects of tetracycline exposure in the freshwater fish *Gambusia holbrooki*: antioxidant effects, neurotoxicity and histological alterations [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2015, 68(2): 371-381

[5] Vijayasree V, Vasapalli M, Rajesh R, et al.

- Tetracycline-induced discoloration of deciduous teeth: case series [J]. *Journal of International Oral Health*, 2014, 6(3): 115-119
- [6] Karahmet F, Coskun Y, Erarslan E, et al. Extensive esophageal damage resembling carcinoma due to tetracycline intake [J]. *Endoscopy*, 2013, 45(2): E258
- [7] Yuling N, Cong'an L, Jin Y, et al. Preparation of tetracycline surface molecularly imprinted material for the selective recognition of tetracycline in milk [J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(8): 2342-2351
- [8] Council Regulation 2377/90/EEC, laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Commun. L 224* (1990)
- [9] China P R. Veterinary drug maximum residue limits in the food of animal origin. *Bulletin of Ministry of Agriculture*, 2002, 12. No. 235
- [10] 刘兴泉,冯震,姚蕾,等.采用高通量微生物法检测四种抗生素在鸡蛋中的残留[J].*现代食品科技*,2011, 27(4):465-467, 460  
LIU Xing-quan, FENG Zhen, YAO Lei, et al. Analysis of tetracycline and neomycin antibiotic residues in eggs using throughout microbial assay [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2011, 27(4): 465-467, 460
- [11] Schneider M J, Braden S E, Reyes-Herrera I, et al. Simultaneous determination of fluoroquinolones and tetracyclines in chicken muscle using HPLC with fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 846(1-2): 8-13
- [12] 檀尊社,陆恒,邵伟,等.胶体金免疫层析法快速检测水产品中四环素类药物残留[J].*西北农业学报*,2010,19(8):32-37  
TAN Zun-she, LU Heng, SHAO Wei, et al. Nanocolloidal gold-based immunoassay for rapid detection of tetracycline residue in aquatic products [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2010, 19(8): 32-37
- [13] 彭超,王萍,楼玥,等.胶束毛细管电泳法同时分离四环素与青霉素类药物的研究[J].*分析测试学报*,2014, 33(10):1129-1135  
PENG Chao, WANG Ping, LOU Yue, et al. Simultaneous separation of tetracyclines and penicillins by micelle capillary electrophoresis [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2014, 33(10): 1129-1135
- [14] 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
- [15] 方小丹,柯建明,陈振贺,等.固相萃取-超高效液相色谱法测定水中四环素类抗生素[J].*生命科学仪器*,2014,12(3):32-34,44  
FANG Xiao-dan, KE Jian-ming, CHEN Zhen-he, et al. Determination of 4 tetracycline antibiotics in water by SPE-UPLC [J]. *Life Science Instruments*, 2014, 12(3): 32-34, 44
- [16] 蔡志斌,张英,刘丽.固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中 3 种四环素类抗生素残留量[J].*中国卫生检验杂志*,2007,17(2):270-272  
CAI Zhi-bin, ZHANG Ying, LIU Li. Determination of 3 kinds of tetracyclines residues in milk by SPE -HPLC [J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(2): 270-272