

超声辅助萃取-高效液相色谱法测定牛奶中 9种 β -内酰胺类抗生素残留*

张尹¹, 毕莉², 徐兴志¹, 杨亚玲¹

(1 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2 昆明理工大学 理学院, 云南 昆明 650093)

摘要: 建立了一种采用超声辅助萃取-高效液相色谱法检测牛奶中 9 种 β -内酰胺类抗生素残留的方法. 牛奶样品经过乙腈沉淀蛋白, 磷酸盐缓冲溶液为提取液, 20 kHz 超声处理 5 min, 离心处理, 固相萃取小柱净化, 采用 Agilent TC C18 (150 mm \times ϕ 4.6 mm, 5 μ m) 色谱柱, 选用磷酸盐-甲醇作流动相进行梯度洗脱, 流速 1.0 mL/min, 220 nm 检测, 在 22 min 内分离检测. 方法可用于牛奶中上述抗生素残留的同时检测.

关键词: 超声辅助萃取; 高效液相色谱法; 牛奶; β -内酰胺类抗生素

中图分类号: O 657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2011)03-0332-04

β -内酰胺类抗生素 (β -lactams) 系指化学结构中具有 β -内酰胺环的一大类抗生素, 主要包括临床最常用的青霉素与头孢菌素. 由于此类抗生素具有杀菌活性强、毒性低、适应症广及临床疗效好的优点, 目前已广泛运用于预防和治疗食源性动物的细菌感染性疾病. 然而, 在动物中过量使用这类药物, 会导致动物源性食品中抗生素含量超标, 容易诱发人类的“三致”疾病, 给人类身体健康带来极大的潜在危险.

牛奶中 β -内酰胺类抗生素残留量的检测方法有微生物法^[1]、酶联免疫法^[2-3]、薄层色谱法^[4]、

高效液相色谱法^[5-8]和液相色谱电喷雾串联质谱法^[9-11]. 本研究采用乙腈沉淀蛋白, 磷酸盐缓冲溶液为提取液, 采用超声辅助萃取, 固相萃取小柱净化, 最后通过高效液相色谱进行分析检测, 检测结果令人满意, 完全适用于牛奶中 9 种 β -内酰胺类抗生素残留量的检测. 该方法采用超声辅助萃取, 超声波辐射产生强烈的空化效应、扰动效应、高加速度、击碎和搅拌作用等多级效应, 加速目标成分进入溶剂, 既能让蛋白质变性, 又能够萃取出样品中的抗生素, 有效地进行牛奶中抗生素的检测.

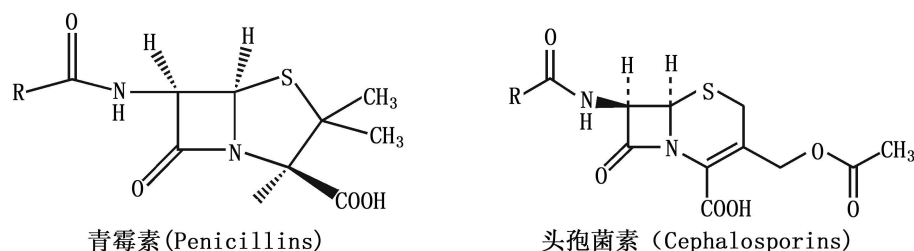


图 1 β -内酰胺类抗生素的结构

Fig 1 The structures of β -lactams

* 收稿日期: 2010-12-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20767002).

作者简介: 张尹 (1984-), 男, 四川人, 硕士生, 主要从事药物化学专业方面的研究.

通讯作者: 杨亚玲 (1964-) 女, 云南人, 教授, 主要从事药物化学方向的研究.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 UV765型紫外分光光度计(上海精密仪器有限公司); Agilent双泵液相色谱仪: LC-20AT泵, SPD-M20A二极管阵列检测器, Agilent TC-C18色谱柱(150 mm \times ϕ 4.6 mm); H-1650高速台式离心机(长沙湘仪离心机有限公司); KQ100DB超声仪(昆山市超声仪器有限公司)。阿莫西林、氨苄西林、头孢氨苄、头孢拉定、头孢噻吩钠、头孢唑啉、头孢哌酮、头孢呋辛、头孢噻吩(均购于中国药品生物制品检定所); 磷酸二氢钾(分析纯, 汕头市西陇化工厂有限公司); 乙腈(分析纯, 广东光华化学厂有限公司); 娃哈哈矿泉水, 牛奶(超市购买的某品牌纯牛奶); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck公司)。固相萃取小柱 C18 硅胶、FL-RP(均购于美国 Agilent公司)。

1.2 色谱条件 流动相为: A 为 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液; B 为甲醇; 梯度洗脱: 0~5 min B 10%~15%; 5~12 min B 15%~25%; 12~25 min B 25%~55%。流速: 1.0 mL/min; 进样量: 25 μ L。

1.3 标准工作溶液的配制 准确称取每种头孢菌素标准物质, 分别用水配制成质量浓度为 1 g/L 的标准储备溶液。取适量头孢菌素标准储备溶液, 用空白样品提取液配制成适当浓度的基质混合标准工作溶液。

配制 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液, 用 2 mol/L NaOH 调节 pH 至 5.0。

1.4 样品处理 取待测样品 6 mL 于离心管中, 加入乙腈 2 mL, 0.05 mol/L 磷酸二氢钾 2 mL, 于超声波清洗器上超声处理一定时间, 置离心机内, 以 3000 r/min 离心 5 min, 移取离心上清液过固相萃取小柱, 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 氮气吹干, 用 0.5 mL 流动相溶解残渣, 过 0.45 μ m 滤膜, 然后取 25 μ L 注入 HPLC 进行检测。

2 结果与讨论

2.1 检测波长与色谱分离条件确定 9 种 β -内酰胺抗生素的最大紫外吸收波长为 220~273 nm, 考虑到近紫外的末端吸收, 故实验选取 220 nm 作为检测波长, 在此波长处分析物的吸收都比较强, 与文献报道相似^[12-13]。

实验分别考察了水-乙腈/甲醇、磷酸盐-甲醇/乙腈流动相体系对 9 种 β -内酰胺类抗生素分离的影响。水-乙腈/甲醇体系不能有效地分离上述 9 种 β -内酰胺类抗生素。采用缓冲盐能够优化峰型, 并且使上述抗生素能够有效地分离。通过实验分析, 最终确定采用磷酸盐-甲醇体系, 并确定最适的缓冲盐浓度。

同时选用 Agilent Extend C18 色谱柱。随后进一步考察了梯度洗脱和等度洗脱 2 种不同的洗脱方式对 9 种抗生素分离的影响, 结果表明: 9 种 β -内酰胺类抗生素的紫外最大吸收在 220 nm, 采用梯度洗脱模式时该波长处检测会有基线漂移, 但影响不大, 基本能够满足上述抗生素的有效分离。

2.2 超声处理条件的确定 分别考察了甲醇、乙腈及甲醇-磷酸盐、乙腈-磷酸盐等洗脱溶剂的影响, 研究表明 10% 乙腈体系的萃取效果比较好, 考虑到溶剂对环境的影响, 故选择乙腈-磷酸盐溶液为萃取溶剂。考虑到超声处理对牛奶中抗生素的分解作用^[14], 以及样品稳定、节能的角度考虑, 选择超声处理的时间和频率分别为: 5 min, 20 kHz。

2.3 固相萃取柱的选择 分别考察了 water Oasis HLB 柱、Agilent Strata C18-E 柱、Agilent Strata FL-PR 柱、Agilent Silica 柱对水样进行测试, 比较 4 种萃取柱的吸附性能。配制 10 mL 质量浓度为 50 μ g/mL 的标准混合液过柱, 5 mL 甲醇洗脱, 氮气吹干, 流动相定容, 过 0.45 μ m 滤膜, HPLC 测定。water Oasis HLB 柱效果明显优于其他几种固相萃取柱, 且回收率高于 70%。故选用 water Oasis HLB 萃取柱。

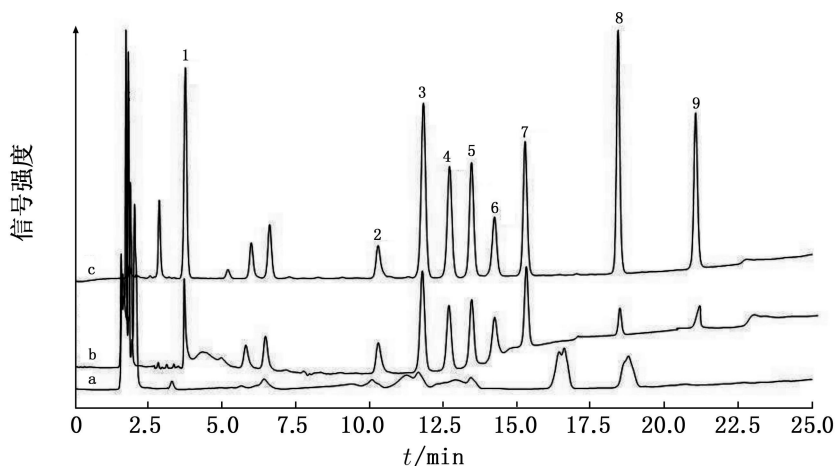
2.4 线性范围和方法检出限 配制混合标准系列质量浓度分别为 1, 5, 10, 60, 100 μ g/mL 的工作液。按照“1.2”节的最佳条件下测定, 以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标分别作标准曲线, 采用 3 倍计算检出限。相关系数、回归方程以及检出限见表 1。

2.5 样品的测定 对市购的某品牌牛奶, 按照 1.4 的处理方法进行前处理, 再通过色谱分析。取同体积牛奶样品进行加标回收实验, 分别加入 1, 5, 10 μ g/mL 3 种不同质量浓度的抗生素混合标准溶液, 每个添加水平平行做 5 次, 分别计算加标样品的平均回收率 ($n=5$) 及精密度, 所得结果见表 2。其色谱图和加标色谱图见图 2。

表 1 9种抗生素检测的线性关系和检出限

Tab 1 Linear relationships and detection limits of nine antibiotic standards

组分	线性范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程	相关系数 R^2	检出限 / ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
阿莫西林	1~ 100	$Y = 30\ 102x - 2\ 378\ 2$	0.999 89	0.6
氨苄西林	1~ 100	$Y = 25\ 532x - 1\ 274\ 1$	0.999 88	1.3
头孢氨苄	1~ 100	$Y = 38\ 498x - 2\ 289\ 2$	0.999 92	0.9
头孢拉定	1~ 100	$Y = 15\ 504x - 6\ 453\ 3$	0.999 54	2.5
头孢噻吩钠	1~ 100	$Y = 24\ 185x - 110\ 38$	0.996 34	1.3
头孢唑啉	1~ 100	$Y = 25\ 556x - 6\ 222\ 2$	0.999 88	1.3
头孢哌酮	1~ 100	$Y = 38\ 651x - 30\ 091$	0.999 76	0.5
头孢呋辛	1~ 100	$Y = 26\ 522x - 13\ 513$	0.999 74	1.3
头孢噻吩	1~ 100	$Y = 30\ 212x - 12\ 105$	0.998 96	0.9



1: 阿莫西林; 2 头孢噻吩钠; 3 头孢氨苄; 4 氨苄西林; 5 头孢呋辛; 6 头孢拉定; 7 头孢唑啉; 8 头孢哌酮; 9 头孢噻吩

图 2 实际样品 (a)、加标样品 (b) 和 9 种 β -内酰胺抗生素 ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$) 标准 (c) 色谱图

Fig 2 The chromatogram of realistic sample (a), spiked sample (b) and nine β -lactams standard solutions (c) ($100\ \mu\text{g}/\text{mL}$)

表 2 实际样品以及方法的回收率和精密度 ($n = 5$)Tab 2 Detection results of milk samples and recoveries precisions of the method ($n = 5$)

组分	样品 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	1 mg/L		5 mg/L		10 mg/L	
		回收率 /%	RSD	回收率 /%	RSD	回收率 /%	RSD
阿莫西林	ND	85.73	3.31	78.46	4.36	81.51	3.63
氨苄西林	ND	71.62	2.93	82.55	3.77	77.54	2.84
头孢氨苄	ND	77.63	4.13	72.84	5.36	88.47	2.78
头孢拉定	ND	68.64	5.22	71.32	3.24	74.64	3.37
头孢噻吩钠	ND	72.37	4.62	77.51	3.16	74.28	3.51
头孢唑啉	ND	89.63	2.75	88.52	2.69	84.33	5.37
头孢哌酮	ND	78.64	3.61	81.67	4.11	86.29	4.11
头孢呋辛	ND	88.39	2.78	81.57	3.31	85.42	3.48
头孢噻吩	ND	71.59	1.95	82.31	2.33	85.19	3.52

ND: 未检出

3 结 论

通过研究牛奶中 9 种 β - 内酰胺抗生素残留的检测方法, 结合超声辅助萃取和固相小柱萃取, 优化了 HPLC 色谱分析条件, 建立了完整的 HPLC 检测牛奶中 β - 内酰胺抗生素残留的分析方法。由于牛奶中基体复杂, 干扰较大, 在处理过程中不可避免的会有抗生素的损失, 本研究利用超声辅助萃取, 增强溶剂的穿透力, 从而加速目标成分进入溶剂, 促进萃取的进行, 极大的提高了抗生素的萃取率, 该方法稳定可靠, 回收率较好, 准确度较高, 各种抗生素的检出限均低于欧盟 (EU) 规定的牛奶中最大残留量 (MRLs), 适合牛奶中 β - 内酰胺抗生素的检测。

参考文献:

- [1] KRESS C, SEIDLER C, KERP B, et al Experiences with an identification and quantification program for inhibitor-positive milk samples [J]. *Anal Chim Acta* 2007, 586: 275.
- [2] Jiming You, Defa Li Development of a monoclonal antibody-based competitive ELISA for detection of β -conglycinin an allergen from soybean [J]. *Food Chemistry*, 2008, 106: 352-360.
- [3] 张建群, 刘翔, 杨扬, 等. ELISA 法测定氨苄青霉素用多克隆抗体的制备与鉴定 [J]. *中国食品学报*, 2006, 6(2): 11-19.
- [4] Ramírez A, Gutiérrez R, Díaz G, et al High-performance thin-layer chromatography bioautography for multiple antibiotic residues in cow's milk [J]. *Chromatogr B*, 2003, 784: 315.
- [5] GEE H E, K B HO, J TOOTHILL Liquid Chromatography Determination of Benzyl penicillin and Cloxacillin in Animal Tissues and Its Application to a Study of the Stability at -20°C of Spiked and Incubated Residues of Benzyl penicillin in Ovine Liver [J]. *Journal of AOAC International* 1996, 79(3): 640-644.
- [6] 杨亚玲, 周强, 刘东辉, 等. 固相萃取和高效液相色谱法测定鱼腥草中的黄酮 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 2006, 28(2): 157-160.
- [7] 方炳虎, 何绮霞, 邹潍力, 等. 牛奶中 12 种磺胺类药物残留的高效液相色谱测定方法 [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(4): 519-522.
- [8] 蔡玉娥, 蔡亚岐, 牟世芬, 等. 高效液相色谱-脉冲积分安培电化学检测牛奶中的妥布霉素 [J]. *分析测试学报*, 2006, 25(6): 117-119.
- [9] HOLSTEGE D M, PUSCHNER B, WHITEHEAD G, et al Screening and mass spectral confirmation of beta-lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS [J]. *Agric Food Chem*, 2002, 50: 406.
- [10] BECKER M, ZITTLAU E, PETZ M. Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Ana Chim Acta* 2004, 520: 19.
- [11] XU J Z, WU B, DING T, et al Determination of lincomycin residues in honey using high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2006, 24(5): 436.
- [12] Benito-Pena E, Partal-Rodera A, Leon-Gonzalez M, et al Evaluation of mixed mode solid phase extraction cartridges for the preconcentration of beta-lactam antibiotics in wastewater using liquid chromatography with UV-DA D detection [J]. *Anal Chim Acta* 2006, 556: 415.
- [13] Benito-Pena E, Uraca J L, Moreno-Bondim C. Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2009, 49: 289.
- [14] 刘丽萍, 赵丽红, 徐洁, 等. 超声波对牛奶中青霉素的分解作用研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(9): 190-192.

Simultaneous determination of 9 β -lactam antibiotics in milk by HPLC with ultrasound-assisted extraction

ZHANG Yin¹, BILi², XU Xing-zhi¹, YANG Ya-ling¹

(1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650093, China

2. Faculty of Science, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

(下转第 339 页)

参考文献:

[1] 张龙. 兽医药物化学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.

[2] 蒋定国, 杨大进. 动物性食品中氯霉素残留检测技术的研究概况 (综述) [J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(2): 44-47

[3] 钟惠英, 杨佳锋, 徐开达. 气相色谱法定量分析水产品中的氯霉素 (CAP) 残留量 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006 16(2): 183-185

[4] 何方奕, 李铁纯, 李学程. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定肌肉中氯霉素的残留 [J]. 食品科学, 2006 27(12): 629-630

[5] 魏林阳, 徐金晶, 吴红军. 水产品中氯霉素残留的气质联用法检测 [J]. 光谱实验室, 2007, 24(2): 201-205

[6] 刘艳琴, 王皓, 殷晓燕, 等. 高效液相色谱 - 电喷雾离子阱质谱测定乳品中氯霉素、甲矾霉素和氟甲矾霉素残留的 [J]. 食品科学, 2008, 29(4): 344-346

[7] 周萍, 胡福良, 巩珊, 等. 液液萃取法结合高效液相色谱 - 串联质谱测定蜂王浆中的氯霉素残留量 [J]. 食品科学, 2008, 29(5): 341-343

[8] 李丹妮, 严凤, 张文刚, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法对奶粉中氯霉素残留的检测 [J]. 分析测试学报, 2008, 27(11): 161-163

[9] 冯雷, 尹丽珠, 孙文通, 等. 禽畜肉中氯霉素残留量的液质联用分析方法 [J]. 食品科学, 2010, 31(4): 243-245.

[10] 何佳琪, 段振娟, 张燕, 等. 氯霉素残留 ELISA 检测方法 [J]. 中国兽医杂志, 2008, 44(2): 88-89.

Determination of chloramphenicol residues in meat by UPLC - MS/MS

Y N Li zhu, ZHANG Xue-zhong, FENG Lei, ZHU Hong-kun, ZHU Na, NIU Zhirui
(Yunnan Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Kunming 650223, China)

Abstract A new determination of chloramphenicol in meat was introduced. Solid-phase extraction (SPE) was applied in pretreatment of samples which were separated by ultra performance liquid chromatography (UPLC) with acetonitrile-water as mobile phase afterwards. The detection of chloramphenicol residues was performed by MS/MS in ESI(-) - MRM mode. The results show that the pretreatment as well as the analytical approach, was highly efficient, sensitive and also specific to chloramphenicol.

Key words chloramphenicol; UPLC - MS/MS; meat

(上接第 335 页)

Abstract A method has been developed for the simultaneous determination of 9 β -lactam antibiotics residues in milk by high-performance liquid chromatography-ultrasonic assisted extraction (HPLC-UAE). The milk samples were extracted with acetonitrile-phosphate buffer solution under 20 kHz ultrasound for 5 min, then centrifuged. With Agilent TC C18 (150mm \times 4.6 mm id, 5 μ m) column, phosphate buffer-methanol as mobile phase, flow rate 1.0 mL/min, 220 nm detection, 9 β -lactam antibiotics were separated within 22 min. The method could be used for simultaneous determination of β -lactam antibiotics in milk.

Key words ultrasound-assisted extraction; HPLC; milk; β -lactam antibiotics