

高效液相色谱快速检测牛奶中青霉素中间体 以及 2 种青霉素类药物

苏红晓¹, 檀华蓉², 司雄元¹, 彭超¹, 楼玥¹, 唐燕平^{3*}

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036;
3. 安徽农业大学林学与园林学院, 合肥 230036)

摘要: 采用高效液相色谱法建立了同时检测牛奶中青霉素类抗生素中间体 6-氨基青霉烷酸(6-APA)及 2 种青霉素类药物氨苄青霉素(AMP)、阿莫西林(AMO)的方法。检测条件如下: 色谱柱为 Xterra[®] MS C₁₈ 柱; 流动相为乙腈: 0.1% 氨水=5: 95 (V/V) 等度洗脱; 柱温 35℃; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 紫外检测波长 200 nm。结果表明, 6 min 内可实现 3 种青霉素类抗生素 (PENs) 的快速分离检测。方法在 0.125 ~ 10.00 mg·L⁻¹ 范围内有良好的线性, 相关系数 (r^2) 0.9972 ~ 0.9991, 加标回收率为 89.09% ~ 99.64%, 相对标准偏差为 1.21% ~ 7.35%。该方法简便、快速, 可应用于市售牛奶中 PENs 的快速检测。

关键词: 6-氨基青霉烷酸; 中间体; 青霉素类; 高效液相色谱法

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2014)01-0072-04

Determination of penicillin intermediate and two penicillins in milk by high performance liquid chromatography

SU Hongxiao¹, TAN Huarong², SI Xiongyuan², PENG Chao¹, LOU Yue¹, TANG Yanping³

(1. School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
2. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;
3. School of Forestry and Landscape Architecture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: A method was developed for simultaneous determination of penicillin intermediate and penicillins in milk, including 6-aminopenicillanic acid (6-APA), ampicillin (AMP), amoxicillin (AMO) by high performance liquid chromatography (HPLC). The detection condition was as follows. Chromatographic column, Xterra[®] MS C₁₈; mobile phase, 5:95 (V/V) of acetonitrile to 0.1% aqueous ammonia; column temperature, 35℃; flow rate, 1.0 mL/min; sample size, 10 μL; ultraviolet detector wavelength, 200 nm. The results showed that the three kinds of penicillins (PENs) were separated in 6 min. The calibration curves showed good linearity in the range of 0.125-10.00 mg·L⁻¹, and the correlation coefficients were in the range of 0.9972-0.9991. The average recoveries at three spiked levels were 89.09%-99.64% with acceptable relative standard deviations of 1.21%-7.35%.

Key words: 6-aminopenicillanic acid; intermediate; penicillins; HPLC

青霉素类抗生素是含有 6-氨基青霉烷酸中间体结构的一类 β-内酰胺类抗生素, 其中氨苄青霉素和阿莫西林等广泛用于奶牛乳腺炎和其他乳牛疾病治疗, 长期、反复不按规则使用该类药物会导致奶牛甚至环境中菌群失调^[1-3]。残留在牛奶中抗生素, 不仅会影响牛奶品质, 甚至危害人体健康^[4], 抗生

素残留已经成为国际社会关注的公共卫生问题^[5]。

随着人们对抗生素的日益重视, 国家有关部门对乳品中青霉素类抗生素最大残留量的规定也越来越严格^[6]。不法商贩为了达到国家标准, 在牛奶里添加 β-内酰胺酶(β-lactamase)^[7-8]或者是青霉素酰化酶(penicillin amidase E.C.3.5.1.11, 简称

收稿日期: 2012-12-20

基金项目: 安徽省高等学校省级自然科学基金重点项目(KT2013A114)资助。

作者简介: 苏红晓, 硕士研究生。

* 通信作者: 唐燕平, 高级实验师。E-mail: typoyy@ahau.edu.cn

PA)^[9-11], 这 2 种酶催化裂解青霉素类抗生素产生 6-氨基青霉烷酸(6-aminopenicillanic acid, 简称 6-APA), 从而掩蔽青霉素类抗生素^[12]。因此为杜绝这种行为, 迫切需要在行业标准中增加 6-氨基青霉烷酸物质的检测项目。

本试验采用乙腈提取, C₁₈ 固相萃取净化, 高效液相色谱方法同时检测牛奶中青霉素类抗生素中间体 6-APA 和另外 2 种典型青霉素类抗生素(AMO, AMP)。此方法 6 min 内可实现 3 种青霉素类抗生素(PENs) 的分离检测, 简便、快速, 且具有检测限低、适用性广的特点。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪, 配有真空脱气、四元泵、紫外检测器和自动进样器(Waters, USA); Seven Multi pH 计(S40, Metter Toledo, CH); Milli-Q 超纯水制备系统(Millipore, USA); Sep-Pak C₁₈ 固相萃取柱(3 mL/500 mg, Waters, USA)。

阿莫西林(纯度>98.5%, 批号: H010204, 购自中国兽药检验所), 氨苄青霉素(纯度>98.5%, 批号: 1129802, 购自中国兽药检验所); 6-氨基青霉烷酸(纯度>98%, 批号: 551-16-6, 购自武汉远城科技发展有限公司); 溴化四丁基铵, 磷酸二氢钾, 硼砂(均为分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

牛奶样品: 超市购买。

1.2 样品的前处理方法

1.2.1 样品的提取 准确量取 10.00 mL 牛奶样品, 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 3.2 g·L⁻¹ 溴化四丁基铵乙腈溶液, 漩涡震荡 1 min, 接着超声波提取 10 min 后, 在 5 000 r·min⁻¹ 速度下离心 10 min, 分离上清液。下层残渣再重复提取 2 次, 合并 3 次上清提取液。在提取液中加入 10 mL 正己烷, 振荡混匀萃取, 静置 10 min 后, 除去正己烷层, 用 50 °C 水浴旋转蒸发干后, 再用 5 mL 0.5 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液使之充分溶解, 待净化^[13]。

1.2.2 样品的净化 C₁₈ 固相萃取柱依次用甲醇、超纯水、0.5 mmol·L⁻¹ 氯化钠、0.5 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液各 3 mL 活化, 将上述样品提取液加载到活化后的 C₁₈ 柱上, 控制流速为 1.0 mL·min⁻¹。用 3 mL 水淋洗, 弃去淋洗液, 然后用 4 mL 乙腈-水(70:30, V/V)洗脱, 收集全部洗脱液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 供 HPLC 分析用^[13]。

1.3 标准曲线的配制

称取上述 3 种 PENs 标准品各 10.00 mg, 用超

纯水溶解并定容到 10 mL, 分别配制成 1.00 g·L⁻¹ 的标准贮备液; 测定前混合 3 种标准贮备液并用超纯水稀释, 制得质量浓度分别为 10.00、5.00、2.50、0.50、0.25 和 0.125 mg·L⁻¹ 的混合标准工作液, 备用。

1.4 色谱条件

色谱柱: Xterra[®] MS C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, Waters 公司)。流动相: 乙腈:0.1%氨水=5:95 (V/V) 等度洗脱; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 35 °C; 进样量: 10 μL。紫外检测器: 检测波长 200 nm。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 检测波长的选择 图 1 为 3 种 PENs 标准溶液在 190~400 nm 波长范围内的紫外扫描图。结果表明, 3 种 PENs 在 190~210 nm 处均有较大吸收, 综合考虑各因素, 选择用 200 nm 作为最佳检测波长。

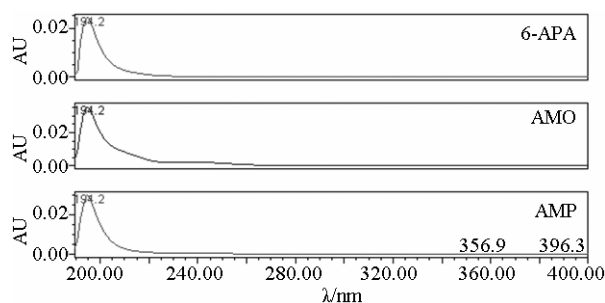


图 1 3 种 PENs 的紫外光谱图

Figure 1 Ultraviolet spectrograms of 3 PENs

2.1.2 流动相种类的选择 在检测波长、流速不变的情况下, 实验分别考察了甲醇-水、磷酸二氢钾-甲醇和氨水-乙腈 3 种流动相体系对 3 种 PENs 分离的影响。实验结果表明, 采用甲醇-水作为流动相时, 3 种物质保留时间相近, 分离效果不佳; 0.01、0.02 和 0.03 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾-甲醇作流动相时, 发现基线漂移严重, 而且分析物吸收信号不强; 采用 0.05%、0.1% 和 0.2% 氨水-乙腈做流动相时, 其中 0.1% 氨水分离效果最好, 基线略有漂移, 但影响不大, 分析物吸收信号较强, 3 种物质得到基线分离。故选择乙腈-0.1% 氨水为流动相。

2.1.3 流动相比的选择 在检测波长、流速、流动相种类不变的情况下, 以不同体积比(30:70, 15:85, 5:95)的乙腈-0.1% 氨水为流动相, 以混合标准溶液进样分析。结果表明, 当乙腈的比例为 5% 时, 在 6 min 内各组分能得到较好的分离, 且分析时间较短(见图 2), 故实验选择乙腈-0.1% 氨水(5:95)为流动相。

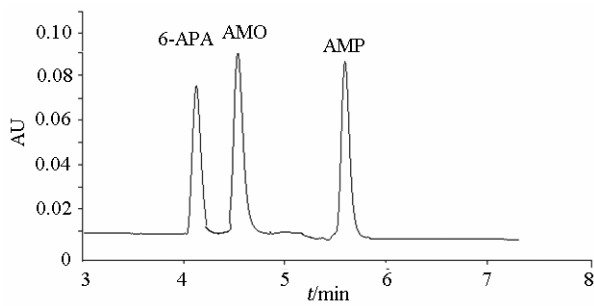


图2 在最佳流动相条件下3种PEN混合标液的色谱图
Figure 2 Chromatography of 3 PENs in the condition of the best mobile phase

2.2 线性关系和精密度

在优化的电泳条件下对质量浓度范围为0.125~10.00 mg·L⁻¹的3种PENs混合标准液进行分析,考察峰面积(Y)与药物质量浓度(X)的线性关系和

方法的精密度。3种PENs的回归方程及相关系数(r^2)见表1。由表1可以看出,本方法具有良好的线性,各分析物标准曲线相关系数均大于0.99;峰面积的相对标准偏差RSDs($n=6$)小于3%;迁移时间的RSDs($n=6$)小于1%。

2.3 回收率实验

为了验证方法的准确性进行加标回收实验,分别向空白牛奶样品(图3a)中添加0.625、1.250和2.500 mg·L⁻¹3个质量浓度水平的PENs混合标准液,按照“1.2”制备样品溶液,进行加标回收率实验,在最佳的实验条件下,得到加标牛奶样品的色谱图(图3b)。每个添加水平重复测定6次,3种PENs的平均回收率为94.18%~95.66%,RSD为3.11%~4.20%(见表1)。回收率和精密度均能够满足牛奶质量监测对3种PENs的检测要求。

表1 AMO、AMP和6-APA的线性方程、线性系数、加标回收率与相对标准偏差

Table 1 Calibration curves, correlation coefficients and spiked recoveries and the RSDs of AMO, AMP and 6-APA

成分 Element	回归方程 Regression equation	r^2	RSD s_r /%		添加量/mg·L ⁻¹ Added	回收率/% Recovery	RSD s_r /%
			Peak area	Migration time			
6-APA	$Y=20.82X+3443.90$	0.9972	2.22	0.07	0.625, 1.250, 2.500	95.66	3.11
AMO	$Y=21.09X-1254.70$	0.9991	2.94	0.25	0.625, 1.250, 2.500	94.87	3.80
AMP	$Y=24.82X-1114.80$	0.9988	2.98	0.39	0.625, 1.250, 2.500	94.18	4.20

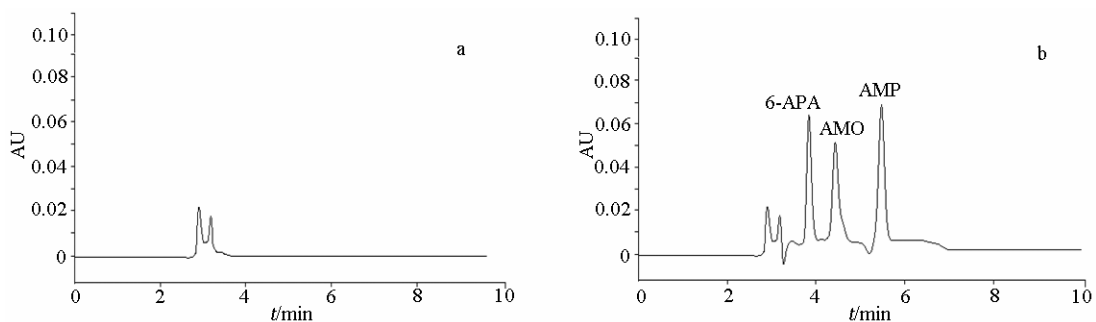


图3 空白牛奶样品(a)和加标牛奶样品(b)的色谱图
Figure 3 Electropherograms of blank milk sample (a) and the spiked blank milk sample (b)

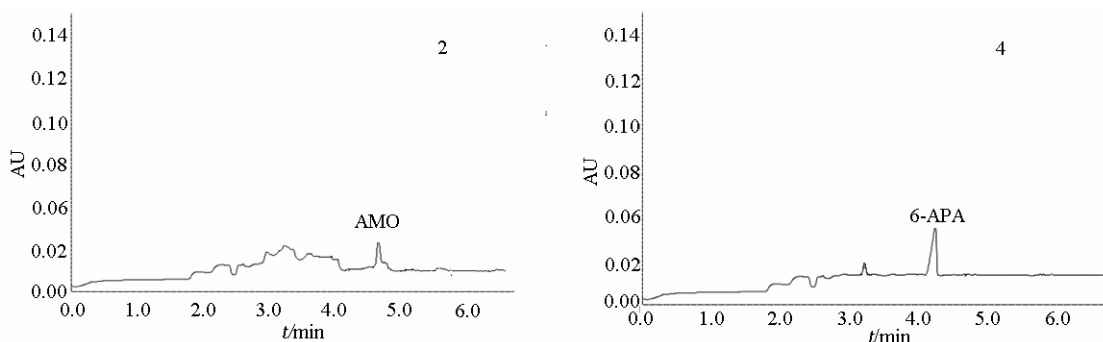


图4 2号牛奶样品和4号牛奶样品的色谱图
Figure 4 Electropherograms of the second milk sample and the forth milk sample

表 2 实际样品的测定
Table 2 Determination of the actual samples

抽样编号 Sample code	6-APA	AMO	AMP
1	未检出 Not detected	未检出 Not detected	未检出 Not detected
2	未检出 Not detected	2.75	未检出 Not detected
3	未检出 Not detected	未检出 Not detected	未检出 Not detected
4	3.25	未检出 Not detected	未检出 Not detected
5	未检出 Not detected	未检出 Not detected	未检出 Not detected
6	未检出 Not detected	未检出 Not detected	未检出 Not detected

2.4 实际样品的测定

在超市任选 6 种不同品牌的牛奶样品, 按照“1.2”制备样品溶液, 在“1.4”的色谱条件下测定, 每个样品做 2 个平行。结果见表 2, 其中 2 号样品检出氨苄青霉素, 含量为 $2.75 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 4 号样品检出 6-APA, 含量为 $3.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 而其它样品中 3 种药物均未检出 (2 号、4 号样品图见图 4)。

3 结论

本试验建立的高效液相色谱同时检测牛奶中青霉素类抗生素中间体 6-氨基青霉烷酸以及氨苄青霉素、阿莫西林的方法, 在最佳的实验条件下, 3 种 PENs 在 6 min 内达到基线分离。该方法简便、快速, 比现有的毛细管电泳仪检测方法精密度更高、重现性更好、应用性更广, 为市售牛奶中 PENs 的快速检测提供了一种新的方法。

参考文献:

- [1] 张琦, 叶能胜, 谷学新, 等. β -内酰胺类抗生素分析检测技术及其应用研究进展[J]. 化学通报, 2009 (5): 394-400.
- [2] 朱文娟, 邓干臻. 奶牛乳腺炎防治方法的研究进展[J].

- 中国兽药杂志, 2008, 42(3): 40-45.
- [3] 李慧, 谢正福. 抗生素对机体免疫功能的影响[J]. 医学综述, 2009, 15(14): 2179-2182.
- [4] 李振, 王云建. 畜禽养殖中抗生素使用的现状、问题及对策[J]. 中国动物保健, 2009(7): 55-57.
- [5] 葛竹兴, 杨海峰. 动物性食品中抗生素残留及其控制对策[J]. 中兽医医药杂志, 2008(6): 69-71.
- [6] 崔小军, 王硕. 牛奶中残留青霉素类抗生素检测方法的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(4): 113-116.
- [7] 崔生辉, 李景云, 马越, 等. “生鲜牛乳抗生素分解剂”的鉴定与检测[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(2): 113-116.
- [8] 孟静, 王锐, 祝建华. 生鲜牛乳中抗生素检测方法的新问题[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(9): 42-44.
- [9] 乌云高娃, 卢冠忠. 6-APA 合成反应中固定化青霉素酰化酶载体及固定化研究进展[J]. 分子催化, 2002, 16(1): 75-80.
- [10] 赵自成. 6-氨基青霉烷酸(6-APA)生产工艺研究[D]. 天津:天津大学, 2006.
- [11] 中华人民共和国卫生部. 食品中可能违法添加的非食用物质名单(第 2 批)[R]. 2009-02-12.
- [12] 张业旺, 谭强, 刘瑞江, 等. 青霉素酰化酶制备 6-APA 的研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2008, 33(7): 385-391.
- [13] 中华人民共和国农业部公告第 781 号. 牛奶中青霉素类药物残留的检测方法-高效液相色谱法[S]. 2006.