

测定牛奶中 5 种青霉素残留量的高效液相色谱柱前衍生法

王 超, 李淑娟

(中国进出口商品检验技术研究所, 北京 100025)

摘 要: 样品采用乙腈直接提取, 离心分离及固相(C_{18} 柱)净化方式, 经衍生后, 用液相色谱紫外检测器测定牛奶中 5 种青霉素残留量。方法最小检测质量浓度 0.005 mg/L , 回收率范围在 $68.9\% \sim 101.3\%$ 之间, 相对标准偏差为 $3.21\% \sim 6.18\%$ 。

关键词: 青霉素; 残留; 液相色谱; 牛奶; 柱前衍生化

中图分类号: TS252.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2000)06-0072-03

青霉素已广泛应用于治疗奶牛疾病, 但青霉素残留在牛奶中可能会使过敏体质的人产生过敏反应, 危害人体健康。为此, 许多国家和国际组织对牛奶中的青霉素残留作了限量规定^[1], 其中欧盟对牛奶中青霉素的最高残留限量规定为青霉素 G $4 \mu\text{g/L}$, 苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素分别为 $30 \mu\text{g/L}$ 。测定牛奶中青霉素的方法已有许多报道, 通常采用酸性缓冲液或有机溶剂脱蛋白, 离心分离沉淀物, 固相柱净化, 衍生后用液相或气相色谱测定^[2, 3]。但所有这些方法多数均针对青霉素 G^[4] 或苯唑青霉素等^[2, 5] 进行测定, 目前还没有同时测定牛奶中 5 种青霉素残留量的方法报道。为此, 本文详细研究了青霉素的衍生化条件和样品提取及净化方法。样品采用直接提取、离心分离及固相净化的方式, 经衍生后, 用液相色谱紫外检测器进行测定。本法可以测定牛奶中低至 $5 \times 10^{-9}(\text{w})$ 的青霉素残留, 获得了满意的分离效果和很高的灵敏度。该法用于牛奶中青霉素残留的测定, 结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日本岛津 LC-10AD 高效液相色谱仪, RF-10A 紫外检测器, CR-7AD 数据处理机, 离心机, 恒温水浴, 旋转蒸发器, 振荡器, Visiprep 多歧管真空固相萃取装置; 净化柱为 Supelclean™ LC-18 SPE Tubes (3 mL)。磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、硫代硫酸钠、氯化汞、氯化钠、氢氧化钠为分析纯; 乙腈为色谱纯; 水为蒸馏水或相应的去离子水; 青霉素标准品及 1,2,4-三唑(1,2,4-triazole)衍生化试剂为 Sigma 试剂。

0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5, 含 0.015 mol/L 的硫代硫酸钠): 分别称取 4.96 g 磷酸氢二钠、10.14 g 磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)和 3.90 g 硫代硫酸钠置于小烧杯中, 用水溶解后, 转入 1 L 容量瓶并用水稀释至刻度, 过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后备用。

固相净化柱淋洗液: 60 mL 水加 40 mL 乙腈均匀混合, 现用现配。

衍生化试剂(2.0 mol/L 的 1,2,4-三唑和 0.01 mol/L 氯化汞)配制: 称取 13.78 g 1,2,4-三唑于 100 mL 烧杯中, 加 60 mL 水使之溶解, 再加入 10 mL 0.1 mol/L 的氯化汞溶液, 混匀, 并用 5 mol/L 氢氧化钠调节该溶液 pH 值至 9.0 ± 0.5 , 然后转入 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。在 4°C 下避光保存。该衍生化试剂至少可使用 2 个月。

标准储备液: 分别称取 0.010 0 g 青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素置于 100 mL 容量瓶中, 用水稀释至刻度。各种青霉素的质量浓度分别为 100 mg/L , 然后再根据需要制成标准工作溶液。

1.2 样品的提取和净化步骤

1.2.1 样品的提取 精密吸取 10 mL 牛奶样品于 50 mL 离心管中, 加入 30 mL 乙腈, 混匀 1 min, 然后以 8000 r/min 的速度离心 10 min ($0^\circ\text{C} < t < 5^\circ\text{C}$)。把上清液转入 150 mL 圆底烧瓶中(小心避免块状物进入), 沉淀

收稿日期: 2000-03-15; 修订日期: 2000-08-29

作者简介: 王 超(1960-), 男, 北京人, 高级工程师。

物按上述方法再用 20 mL 乙腈提取一次。合并提取液后,加入 30 mL 40 g/L 的氯化钠溶液,混合后在旋转蒸发器上 50 ℃减压浓缩至约 30 mL。

1.2.2 净化 依次用 10 mL 甲醇、10 mL 水、5 mL 20 g/L 的氯化钠水溶液,预淋洗 SPE C_{18} 净化柱(在淋洗过程中不能使柱子变干)。把处理好的试样浓缩液转入净化柱中,使该试液以 3 mL/min 的速度通过 SPE C_{18} 净化柱。然后加入 1.5 mL 淋洗液,浸泡 1 min,再以 3 mL/min 的速度洗脱被测物,收集洗脱液。

1.2.3 柱前衍生化 取 0.8 mL 衍生化试剂(用前摇匀)加入到洗脱液中,盖上试管塞子,摇匀,于 60 ℃水浴中反应 10 min。然后从水浴中取出试管,快速浸入冷水中放置 10 min。衍生化的青霉素在 30 ℃避光放置至少可稳定 5 h。

1.3 色谱条件

色谱柱:分离柱 Waters NOV-PAK C_{18} (150 mm × id 3.9 mm);柱温:室温;检测波长:325 nm;流动相:乙腈-磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5,含 0.015 mol/L 的硫代硫酸钠),梯度洗脱;流速:1.0 mL/min,进样体积:20 μ L。梯度条件: $V(\text{乙腈}):V(\text{磷酸盐缓冲溶液})$ 为 43:57(0.01 min)→45:55(12 min)→55:45(28 min)→43:57(32 min)→43:57(38 min)。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

文献[2]中使用 C_8 分离柱,在乙腈-磷酸盐缓冲液流动相中加入离子对试剂,对苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素进行了分离。在本实验中发现使用该流动相,对所要分析的 5 种青霉素并不能获得满意的分离效果。为此,对流动相和色谱分离柱进行了筛选,发现使用 Waters NOV-PAK C_{18} 分离柱和 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 6.5,含 0.015 mol/L 的硫代硫酸钠)与乙腈作流动相,采用梯度洗脱,青霉素 G、青霉素 V、苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素可以获得满意的分离。图 1 为样品添加青霉素标准后得到的色谱图。

2.2 衍生化条件试验

取 1.0 mL 混合标准工作液,通过改变衍生化试剂用量、反应时间、反应温度等条件,按本文实验条件进行试验,结果表明,当衍生化试剂用量在 0.3~1.0 mL 之间,反应时间在 5~15 min 之间,反应温度控制在 55~65 ℃之间,5 种青霉素的响应值变化不大。综合考虑不同试验条件下各种青霉素的响应值,本试验选择衍生化试剂用量为 0.8 mL、反应时间为 10 min、反应温度为 60 ℃。

2.3 提取液的选择

选择磷酸盐缓冲液(pH 4.0)作为牛奶中青霉素的提取液,发现邻氯青霉素、双氯青霉素的回收率较低,这可能是由于提取过程中,两种青霉素与蛋白质吸附作用较强所致,这与文献报道的结果基本一致^[2]。改用乙腈作提取液,结果所有青霉素的回收率都有不同程度的提高。为此本实验选择乙腈作提取液。

2.4 洗脱液用量的选择

文献[4]报道净化时使用的洗脱液体积为 1 mL,但在实验中发现,使用 1 mL 淋洗液只能使 70%~80% 的青霉素洗脱下来;使用 1.5 mL 洗脱液可将青霉素定量洗脱下来(见图 2)。

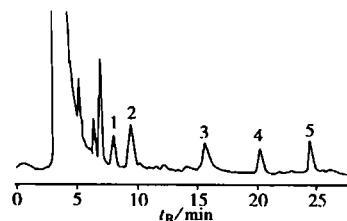


图 1 样品添加青霉素后的色谱图
Fig.1 Chromatogram of sample spiked penicillins
1. 青霉素 G (penicillin G), 0.005 μ g/L; 2. 青霉素 V (penicillin V), 0.015 μ g/L; 3. 苯唑青霉素 (oxacillin), 0.015 μ g/L; 4. 邻氯青霉素 (cloxacillin), 0.015 μ g/L; 5. 双氯青霉素 (dicloxacillin), 0.015 μ g/L

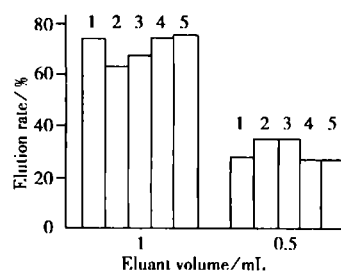


图 2 洗脱曲线
Fig.2 Elution curves of penicillins
1. penicillin G; 2. penicillin V; 3. oxacillin; 4. cloxacillin; 5. dicloxacillin

2.5 方法的线性关系与最小检测质量浓度

取 100 μL 混合标样溶液于 5 mL 玻璃管中, 加入 900 μL 水, 按此法制备 50、100、200、400、600、800、1 000 $\mu\text{g/L}$ 等 5 个水平青霉素的标准溶液。衍生化后, 按本文设定的色谱条件测定。试验结果表明, 青霉素质量浓度在 0.05 ~ 1.0 mg/L 范围内与检测器响应值呈线性关系, 其线性回归方程与相关系数列于表 1, 其中 X 表示青霉素的含量(mg/L), Y 表示青霉素的响应值。按检测下限 0.05 mg/L , 样品量 10.0 mL, 最后体积为 1.0 mL 计算, 可以得出本法的最小检测质量浓度为 0.005 mg/L 。

2.6 方法回收率及精密度

按样品提取方法, 选择 3 个添加水平加入已知量的青霉素到牛奶空白样品中进行添加回收试验, 回收率及精密度试验结果见表 2。

2.7 实际样品测定

作者使用上述方法曾对数十种不同品牌的牛奶样品进行了测定, 尚未发现有阳性结果的样品。根据实际样品的添加回收试验结果表明, 该法的最小检测质量浓度可以满足相关法规的要求。

表 1 青霉素的线性回归方程与相关系数

Table 1 Linear equations and correlation coefficients of penicillins

Compound	Linear equation	correlation coefficient
Penicillin G	$Y = 6.45 + 651.70 X$	0.999 9
Penicillin V	$Y = 13.84 + 916.23 X$	0.999 9
Oxacillin	$Y = 11.39 + 470.25 X$	0.999 6
Cloxacillin	$Y = 10.39 + 411.51 X$	0.999 9
Dicloxacillin	$Y = 9.89 + 301.51 X$	0.999 6

表 2 空白样品添加青霉素后的回收率及精密度 ($n = 5$)

Table 2 Recovery and precision of the method for 5 penicillins in spiked milk samples ($n = 5$)

Compound	Standard added $\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Penicillin G	0.004	80.1	5.28
	0.01	89.3	3.98
	0.03	97.6	3.56
Penicillin V	0.01	89.4	5.98
	0.03	96.8	5.12
	0.10	98.5	4.31
Oxacillin	0.01	74.3	4.91
	0.03	89.7	4.03
	0.10	93.8	3.21
Cloxacillin	0.01	68.9	6.18
	0.03	89.5	4.39
	0.10	96.7	3.90
Dicloxacillin	0.01	83.5	5.12
	0.03	94.6	4.38
	0.10	101.3	3.45

参考文献:

- [1] 庄无忌. 各国食品和饲料农药兽药残留限量大全[M]. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 1995. 982 ~ 1014.
- [2] VERDON E, COUEDOR P. Determination of isoxazolylic penicillins residues in milk by ion pair reversed-phase high performance liquid chromatography after precolumn derivatization[J]. J Chromatogr, B, 1998, 705(1): 71.
- [3] MEETSCHEN U, PETZ M. Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk[J]. J Assoc of Anal Chem, 1990, 73(3): 373.
- [4] GEE H E, HO K B, TOOTHILL J. Liquid chromatographic determination of benzylpenicillin and cloxacillin in animal tissues and its application to a study of the stability at -20°C of spiked and incurred residues of benzylpenicillin in ovine liver[J]. J Assoc of Anal Chem, 1996, 79(3): 640.
- [5] CATHARINA Y W A, WENHONG L. Rapid determination of ampicillin in bovine milk by liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Assoc of Anal Chem, 1997, 80(1): 25.

Determination of 5 Penicillins in Milk by HPLC with Pre-column Derivatization

WANG Chao, LI Shu-juan

(China Import and Export Commodity Inspection Technology Institute, Beijing 100025, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method with UV detection was developed for analysis of penicillin G, penicillin V, oxacillin, cloxacillin, dicloxacillin in milk. The milk sample was treated by extraction with acetonitrile, followed by centrifugation precipitation of proteins and solid-phase (C_{18}) purification, after derivatization of the 5 penicillins with 1, 2, 4-triazole and HgCl_2 under 60°C for 10 min, the products of derivatization were determined by reverse-phase LC with UV detection. The minimum detectable mass concentration were 0.005 mg/L . Average recoveries of 5 penicillins were in the range of 68.9% ~ 101.3% and relative standard deviations 3.21% ~ 6.18%.

Keywords: Penicillin; Residue; HPLC; Milk; Pre-column derivatization