

工作简报

# 高效毛细管电泳法检测鸡肉中青霉素类药物残留量

陈汀汀<sup>1</sup>, 孟欢欢<sup>2</sup>, 祁克宗<sup>2</sup>, 何东旭<sup>2</sup>

(1. 安徽农业大学 生物技术中心, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学 动物科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 用4种不同的样品前处理方法,即①磷酸二氢钠萃取法(SE)、②磷酸二氢钠萃取-固相萃取法(SE-SPE)、③基质固相分散萃取法(MSPDE)和④基质固相分散萃取-固相萃取法(MSPDE-SPE)对鸡肉样品做前处理,用高效毛细管电泳测定试液中青霉素、氨苄青霉素和阿莫西林等3种药物的残留量。回收试验和色谱分离结果表明:方法②用于高效毛细管电泳法同时测定鸡肉样品中3种青霉素类药物的样品前处理更为合适。方法的加标回收率在73.1%~95.9%之间,相对标准偏差( $n=5$ )在2.9%~9.8%之间。

**关键词:** 样品前处理方法; 高效毛细管电泳法; 鸡肉; 青霉素; 氨苄青霉素; 阿莫西林

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2011)11-1293-03

## High Performance Capillary Electrophoretic Determination of Residual Amounts of Penicillin Drugs in Chicken

CHEN Ding-ding<sup>1</sup>, MENG Huan-huan<sup>2</sup>, QI Ke-zong<sup>2</sup>, HE Dong-xu<sup>2</sup>

(1. Center of Biotechnology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China;

2. School of Zoological Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

**Abstract:** Chicken samples were pretreated by the following 4 methods separately: ①  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -extraction (SE), ②  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -solid phase extraction (SE-SPE), ③ matrix solid-phase dispersion extraction (MSPDE) and ④ matrix solid-phase dispersion extraction-SPE (MSPDE-SPE). The contents of penicillin, ampicillin and amoxicillin in the sample solutions were determined by high performance capillary electrophoresis (HPCE). As shown by the results obtained by recovery tests and chromatographic separation, the pretreatment method ② was more suitable to be used for simultaneous determination of the 3 penicillin drugs. Tests for recovery and precision of the proposed method were tested, values of recovery and RSD's ( $n=5$ ) found were in the ranges of 73.1%–95.9% and 2.9%–9.8% respectively.

**Keywords:** Pretreatment methods of sample; HPCE; Chicken; Penicillin; Ampicillin; Amoxicillin

青霉素类抗生素在动物疾病预防与治疗上使用广泛,对其在动物性食品中的残留监测已成为保障动物性食品安全的一个重要环节<sup>[1]</sup>。欧盟、美国、日本等均已规定了一些青霉素类抗生素在动物组织中

的最大残留限量,我国2002年发布的《动物性食品中兽药最高残留限量》规定了青霉素(PEN)、氨苄青霉素(AMP)、阿莫西林(AMO)等最大残留限量。

动物性食品中兽药残留的分析由于样品待测物痕量、基质复杂、干扰物质多,除了要求检测技术灵敏度高、线性范围宽,同时对样品的前处理过程要求简单、速度快、选择性强和回收率高<sup>[2]</sup>。目前,药物残留分析中的前处理技术主要有溶剂萃取(SE)、固相萃取(SPE)<sup>[3]</sup>、基质固相分散萃取(MSPDE)<sup>[4-7]</sup>、

收稿日期: 2010-12-07

基金项目: “十一·五”国家科技支撑计划”分课题(2006BAK02A08-4)

作者简介: 陈汀汀(1962—),女,福建惠安人,副研究员,研究方向为食品安全检测技术。

凝胶层析(GPC)、加速溶剂提取(ASE)和固相微萃取等,检测方法多为高效液相色谱法<sup>[8-10]</sup>。用毛细管电泳法同时检测多种青霉素类药物残留量国内外鲜见报道。

本工作以含青霉素、氨苄青霉素、阿莫西林 3 种青霉素类药物残留的鸡肉样品为研究对象,采用高效毛细管电泳(HPCE)分离,二极管阵列检测器检测,以磷酸二氢钠萃取法(SE)、磷酸二氢钠萃取-固相萃取法(SE-SPE)、基质固相分散萃取法(MSP-DE)和基质固相分散萃取-固相萃取法(MSPDE-SPE) 4 种方法对其前处理后进行测定,并比较 4 种方法的回收率和净化效果,提出了鸡肉中青霉素、氨苄青霉素和阿莫西林残留量同时检测的 SE-SPE-HPCE 方法。

## 1 试验部分

### 1.1 仪器与试剂

P/ACE MDQ 高效毛细管电泳仪,配二极管阵列检测器,固相萃取装置;D37520 冷冻离心机;T18 组织匀浆机;PHS-3C 精密 pH 计;Strata C<sub>18</sub> 固相萃取柱(200 mg/3 mL)。

混合标准溶液:称取青霉素标准品(纯度为 98.8%) 100.00 mg、氨苄青霉素标准品(纯度为 86.5%) 115.61 mg、阿莫西林标准品(纯度为 86.6%) 115.47 mg,分别用水溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶中,置于 4℃ 冰箱保存。使用时分别取这 3 种标准品储备溶液各 10.00 mL 置于 100 mL 容量瓶中,用水定容并摇匀,配成 100 mg·L<sup>-1</sup> 的混合标准溶液。

pH 7.8 的硼砂缓冲溶液:称取硼砂 0.572 6 g 于 50 mL 容量瓶中,加水溶解,并用 1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液调 pH 值为 7.8,其浓度为 30 mmol·L<sup>-1</sup>。

甲醇、乙腈和正己烷为色谱纯,其余试剂为分析纯;试验用水为超纯水(电阻率 18.2 MΩ·cm)。

### 1.2 仪器工作条件

弹性石英毛细管柱(75 μm×50 cm),分离电压 18 kV,检测波长 198 nm,柱温 25℃。每次进样前均以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液冲洗 2 min,水洗 3 min,用 pH 7.8 的 30 mmol·L<sup>-1</sup> 硼砂缓冲溶液冲洗 5 min。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 样品采集

选 20 日龄三黄鸡,饲喂不含抗生素药物的全价

日粮二周。宰杀后,采集肌肉组织,洗净滤纸吸干,置于-20℃ 冰箱保存备用。

#### 1.3.2 样品前处理

称取空白匀浆鸡肌肉组织 0.500 0 g 于 7 mL 离心管中,加入混合标准溶液 1.00 mL,涡旋后室温下放置 30 min,加入 pH 4.5 的 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液 2 mL,涡旋振荡提取后,以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 转速离心 10 min。移取上清液至另一离心管中,加入乙腈 2 mL,涡旋振荡,放置 5 min 后,以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 转速离心 10 min。取上清液在 40℃ 下氮气吹干,再用纯水 1.5 mL 溶解。将此溶解液过已活化好的 C<sub>18</sub> 固相萃取柱,用正己烷 3 mL 洗涤,乙腈-水(4+1)溶液 3 mL 洗脱,收集洗脱液在 40℃ 下氮气吹干。用纯水 1.00 mL 溶解,过 0.22 μm 滤膜,供毛细管电泳分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 萃取溶剂的选择

试验考察了甲醇、乙腈和不同用量的磷酸二氢钠溶液作为萃取剂的萃取效果,结果表明:甲醇对青霉素、氨苄青霉素和阿莫西林等 3 种药物的萃取率较低,在 65.6%~69.1% 之间,3 种药物之间的萃取率差异不大。乙腈对 3 种药物的萃取率差异比较明显,对青霉素的萃取率最高,为 88.1%,氨苄青霉素和阿莫西林的萃取率则较低,分别为 68.8% 和 65.2%。选用磷酸二氢钠溶液进行萃取<sup>[10]</sup>,发现其用量对萃取率的影响很大,0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液对 3 种药物的萃取率分别为 112.0%, 112.3%, 99.7%。试验选择 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠溶液为萃取溶剂。

### 2.2 前处理方法的选择

取空白鸡肉样品添加标准品,按试验方法进行检测,考察了 SE、SE-SPE、MSPDE、MSPDE-SPE 等 4 种前处理方法对回收率的影响,结果见表 1。

表 1 4 种前处理方法的回收率

Tab. 1 Values of recovery obtained by the 4

| pretreatment methods |             |        |       |           | % |
|----------------------|-------------|--------|-------|-----------|---|
| 药物名称                 | 不同前处理方法的回收率 |        |       |           |   |
|                      | SE          | SE-SPE | MSPDE | MSPDE-SPE |   |
| 青霉素                  | 112.0       | 95.1   | 84.6  | 88.6      |   |
| 氨苄青霉素                | 112.3       | 89.7   | 86.3  | 80.3      |   |
| 阿莫西林                 | 99.7        | 77.7   | 91.1  | 66.8      |   |

由表 1 结果可知:MSPDE-SPE 方法所得的阿

莫西林回收率低于 70%, SE、MSPDE 和 MSPDE-SPE 方法之间差异不显著, 均可满足兽药残留分析的要求。

图 1 为 3 种药物经上述 4 种前处理方法萃取、净化后所得的色谱图。

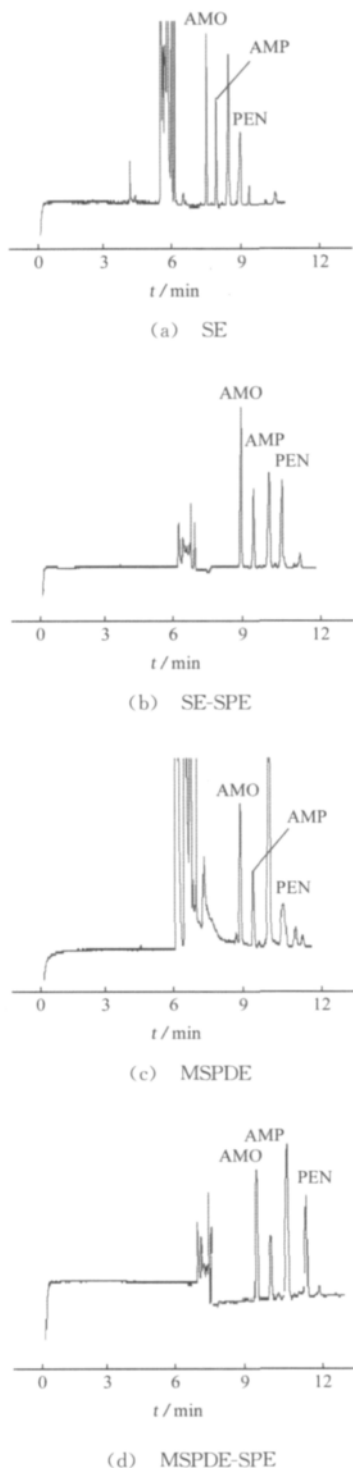


图 1 4 种前处理方法的毛细管电泳图

Fig. 1 CE grams obtained by the 4 pretreatment methods

由图 1 可知: SE 方法对样品进行处理, 由于溶剂萃取选择性不够, 导致色谱图中出现很多非目标分析物的色谱峰, 这对于痕量的兽药残留分析会造成干扰; SE-SPE 方法是在溶剂萃取的基础上, 进一步用  $C_{18}$  填料固相萃取, 起到了满意的净化作用, 减少了色谱图中的杂质峰; MSPDE 方法色谱图中也存在较多的杂质峰, 净化效果不够理想; MSPDE-SPE 方法, 虽然净化效果得到改善, 但回收率相较于 SE-SPE 低, 无法满足兽药残留分析的要求。试验选择 SE-SPE 法对样品进行前处理。

## 2.3 标准曲线与检出限

按试验方法对 0.5, 1, 2, 10, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 3 种药物混合标准溶液进行测定, 3 种药物的质量浓度在 0.5~100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  范围内与峰面积呈线性关系, 青霉素的线性回归方程为  $y = 3\,127.0\rho + 3\,014.5$ , 相关系数为 0.998 8; 氨苄青霉素的线性回归方程为  $y = 2\,780.1\rho - 844.99$ , 相关系数为 0.999 7; 阿莫西林的线性回归方程  $y = 3\,291.1\rho + 2\,306.8$ , 相关系数为 0.999 8。青霉素、氨苄青霉素和阿莫西林的检出限 ( $3S/N$ ) 分别为 0.2, 0.3, 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.4 回收试验

取 0.500 0 g 匀浆后的鸡肉样品添加不同浓度水平的青霉素、氨苄青霉素和阿莫西林混合标准溶液, 按试验方法进行处理后, 在仪器工作条件下进行测定并计算回收率, 结果见表 2。

表 2 回收试验结果 ( $n=6$ )

Tab. 2 Results of test for recovery

| 药物名称  | 加标量<br>$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ | 回收量<br>$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ | 回收率<br>/% | RSD<br>/% |
|-------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------|-----------|
| 青霉素   | 10                                           | 9.50                                         | 95.0      | 2.9       |
|       | 50                                           | 47.21                                        | 94.4      | 5.8       |
|       | 100                                          | 95.93                                        | 95.9      | 6.2       |
| 氨苄青霉素 | 10                                           | 8.48                                         | 84.8      | 4.2       |
|       | 50                                           | 45.85                                        | 91.7      | 8.0       |
|       | 100                                          | 92.72                                        | 92.7      | 6.7       |
| 阿莫西林  | 10                                           | 7.31                                         | 73.1      | 6.6       |
|       | 50                                           | 39.05                                        | 78.1      | 9.8       |
|       | 100                                          | 82.03                                        | 82.0      | 8.8       |

取添加了 10  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  青霉素、氨苄青霉素和阿莫西林的鸡肉样品, 按试验方法进行处理, 分别于同日内 5 个不同时间和 5 个不同日进行重复测定, 计算日内和日间相对标准偏差。结果表明: 青霉素、氨

(下转第 1298 页)

## 2.6 标准曲线、检出限和测定下限

取  $10.000\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  甲醇标准储备液  $0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10.0\text{ mL}$  于  $50\text{ mL}$  容量瓶中,分别加入乙醇  $0.99, 0.97, 0.90, 0.70, 0\text{ mL}$ ,用纯水定容至刻度,此系列甲醇标准溶液质量浓度分别为  $20.0, 60.0, 200.0, 600.0, 2\ 000.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。移取标准溶液系列  $2\ \mu\text{L}$  按色谱条件进行测定。以甲醇的质量浓度( $\rho$ )为横坐标,峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,线性范围为  $20.0 \sim 2\ 000.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,线性回归方程为  $y=1\ 038.2\rho-276.3$ ,相关系数为  $0.999\ 9$ 。将甲醇标准溶液逐级稀释,以最小出峰量(甲醇在仪器上响应的最小量)进行测定,重复测定  $13$  次,以峰面积对应浓度的  $3$  倍标准偏差为检出限, $10$  倍标准偏差为测定下限,甲醇检出限为  $6.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,测定下限为  $20.0\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

## 2.7 方法的精密度

按试验方法对花露水和摩丝样品进行测定,相对标准偏差结果见表 1。

表 1 方法的精密度( $n=6$ )

Tab. 1 Precision of the method

| 样品  | 测定平均值<br>$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | 标准偏差<br>$\rho/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | RSD<br>/% |
|-----|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-----------|
| 花露水 | 0.194                                             | 0.008                                            | 4.12      |
| 摩丝  | 1.60                                              | 0.048                                            | 3.00      |

## 2.8 方法的回收率

于不同种类香水、发胶、摩丝、啫喱水、弹力素等

样品中,加入适量甲醇标准溶液,按试验方法进行样品处理,按色谱条件测定并计算回收率,部分样品结果见表 2。

表 2 回收试验结果( $n=2$ )

Tab. 2 Results of test for recovery

| 样品  | 本底值<br>$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ | 加标量<br>$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ | 测定总量<br>$w/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ | 回收率<br>/% |
|-----|----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------|
| 花露水 | 41.0                                         | 250                                          | 287.7                                         | 98.7      |
| 弹力素 | 9.82                                         | 200                                          | 198.4                                         | 94.3      |
| 摩丝  | 1 045                                        | 1 000                                        | 2 055.5                                       | 101.0     |
| 香水  | 289.8                                        | 1 500                                        | 1 762.5                                       | 98.2      |
| 啫喱水 | 865.9                                        | 1 500                                        | 2 315.5                                       | 96.6      |

本工作建立了气相色谱法测定化妆品中甲醇含量的方法,通过稀释比例、气液相比等条件的选择,解决了不同黏度化妆品的测定需求,该方法具有操作简便、灵敏度高、回收率理想、重复性好等特点。

### 参考文献:

- [1] 张卫国,付家华,杨丽香.化学法测定化妆品中甲醇含量方法探讨[J].中国卫生检验杂志,1997,7(1):52-53.
- [2] 楼永军,陈爽.直接进样毛细管气相色谱法测定花露水中甲醇含量的研究[J].中国卫生检验杂志,2010,20(10):2465-2466.
- [3] 赵同刚.化妆品卫生规范[M].北京:军事医学科学出版社,2007:185-187.
- [4] 王立,汪正范,牟世芬,等.色谱分析样品处理[M].北京:化学工业出版社,2001:67-74.

(上接第 1295 页)

苕青霉素和阿莫西林的日内相对标准偏差分别为  $4.0\%, 8.6\%, 8.6\%$ ;日间相对标准偏差分别为  $9.7\%, 9.0\%, 12.0\%$ 。日内和日间的相对标准偏差均小于  $15\%$ ,符合残留分析对精密度的要求。

### 参考文献:

- [1] 陈杖榴.兽医药理学[M].2版.北京:中国农业出版社,2002:20-218.
- [2] 李俊锁,邱月明,王超.兽药残留分析[M].上海:上海科技出版社,2002.
- [3] 张海霞,朱彭龄.固相萃取[J].分析化学,2001,28(9):1172-1180.
- [4] 乌日娜,李建科.基质固相分散在食品安全分析中的应用[J].食品科学,2005,26(6):266-268.
- [5] 侯申军,郝向洪,申丽,等.基质固相萃取-气相色谱电子捕获检测器同时测定大米中 12 种有机氯农药残留

量[J].分析试验室,2007,26(5):115-118.

- [6] 张素霞,李俊锁,钱传范,等.牛奶中四环素类药物多残留分析方法研-MSPD-HPLC-UV[J].畜牧兽医学报,2002,33(1):51-54.
- [7] 耿志明,李鹏,陈明,等.基质固相分散-高效液相色谱法测定鱼肉中磺胺类药物残留[J].江苏农业学报,2006,22(3):310-31.
- [8] 张学炜,侯杰,吕宪禹,等.反相高效液相色谱法测定牛乳中四环素及土霉素残留量[J].药物分析,2006,26(5):667-670.
- [9] 赵军,朱晨,王晖.反相高效液相色谱法同时测定多种  $\beta$ -内酰胺类抗生素[J].山东大学学报:工学版,2006,36(3):69-72.
- [10] 方从容,蒋定国,杨大进,等.高效液相色谱法测定畜、禽肌肉中氯霉素残留量[J].中国食品卫生杂志,2002,14(6):17-19.