

阿莫西林在牛肉中残留的高效液相色谱检测及分析

于桂阳^{1,2}

(1. 永州职业技术学院农业科学技术系, 湖南 永州 425000 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 建立了反相高效液相色谱分析牛肉样品中阿莫西林残留量的方法。对动物组织样品采用磷酸盐缓冲溶液提取、三氯乙酸沉淀蛋白、固相萃取净化和富集。研究了样品在 C_{18} 柱上的保留行为和阿莫西林的特征谱图。待测物用高效液相色谱法分离, 外标法定量分析, 标准曲线的线性良好, 相关系数为 0.99934, 线性范围为 5.0~500.0 $\mu\text{g/L}$ 。动物组织样品中阿莫西林的加标回收率为 77.3%~97.4%, 相对标准偏差为 1.2%~13.5%, 最低检出限低于 10 $\mu\text{g/kg}$ 。该分析方法具有良好的重现性。

关键词: 高效液相色谱; 固体萃取; 阿莫西林; 残留量; 牛肉

Determination and Analys of Amoxicillin Residue in Beeves with RP-HPLC

YU Gui-yang^{1,2}

(1. Department of Agricultural Technology, Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425000, China;

2. College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A reversed-phase high performance liquid chromatographic method (RP-HPLC) has been developed for the determination of amoxicillin residue in beeves. Beeves were extracted with phosphate buffer, precipitated the proteins with trichloroacetic acid (TCA) solution, and purified and enriched by solid phase extraction (SPE). The retention results on a C_{18} column and the chromatography conditions of amoxicillin were investigated. The samples were separated by RP-HPLC and quantified with external standard calibration curves. There are good linear correlations with the correlation coefficient as 0.99934 between the peak areas and concentrations of amoxicillin. The dynamic linear range is 5.0~500 $\mu\text{g/ml}$. The average recoveries of amoxicillin in spiked animal tissues range from 77.3% to 97.4%, and the relative standard deviations are between 1.2% and 13.5%. The limit of detection is below 10 $\mu\text{g/kg}$. The relative standard deviations of intra-assay and inter-assay are both within 10%. This analysis method shows good recurrence.

Key words: HPLC; solid phase extraction; amoxicillin; residue; beeves

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2008)04-0332-03

阿莫西林(amoxicillin), 化学名称为羟氨苄青霉素, 属于青霉素类 β -内酰胺抗生素, 对金黄色葡萄球菌、胸膜肺炎放线杆菌等几种常见的致病菌具有较强的抗菌活性, 兽医临床应用广泛。目前, 国外已批准使用阿莫西林治疗牛、狗和猫的疾病, 并有对猪和羊进行治疗研究的报道; 国内已批准用于猪、牛及家禽的敏感菌感染治疗。阿莫西林的过量使用会造成其在动物性食品中的残留, 导致敏感人群的过敏反应和细菌的耐药性问题, 因此阿莫西林残留量是当前欧盟和北美等国家对进口动物性食品的必检项目之一, 而且要求极其严格。欧

盟要求在动物的肌肉、肝、肾、脂肪中的阿莫西林的最高限量为 0.05mg/kg; 美国要求更低, 为 0.01mg/kg。本研究采用高效液相色谱法, 测定牛肉中阿莫西林的残留量, 从而建立反相高效液相色谱分析动物组织样品中阿莫西林残留量的有效方法。本法具有简便、快速、灵敏、试剂用量少等特点, 可用于实际样品的测定。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

Hp 1100 高效液相色谱仪 美国安捷伦公司; KQ-

收稿日期: 2007-05-06

作者简介: 于桂阳 (1965-), 男, 副教授, 高级兽医师, 博士研究生, 研究方向为兽药残留检测。

E-mail: ygy-ygy@sohu.com

1000DB 型超声波振荡器 昆山市超声波仪器有限公司;
CF-16RX 高速离心机 日本日立公司; DF 200A 200/0.1mg
电子天平; 真空抽滤机 张家港市友丰机械设备制造有限
公司; HY-5 旋涡混合器 常州国华仪器有限公司; MS1
型匀浆机; PHS-3C 精密酸度计; C₁₈ 固相萃取柱 科瑞
科技公司; RE-3000C 旋转蒸发仪 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 试剂和溶液

1.2.1 试剂

乙腈为色谱纯; 磷酸氢二钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钠、三氯乙酸、硫代硫酸钠均为分析纯; 实验用水为去离子水。

1.2.2 溶液

阿莫西林标准溶液: 称取阿莫西林 0.0250g (精确到 0.0001g), 用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液溶解并定容至 50ml, 此溶液每升含阿莫西林 0.5g。

0.01mol/L 磷酸二氢钠溶液 称取 1.56g (精确到 0.01g) 磷酸二氢钠溶于蒸馏水中, 定容到 100ml, 经微孔滤膜 (0.45 μm) 过滤, 备用。

0.05mol/L 磷酸盐缓冲液的配制: 称取磷酸氢二钠 6.28g、磷酸二氢钠 5.11g、硫代硫酸钠 3.11g, 加水溶解并定容于 1L 容量瓶中, 用前经 0.45 μm 滤膜过滤, 用于溶解阿莫西林纯品及待测样品。

1.3 样品处理

称取约 500g 牛肉组织, 绞碎, 匀浆, 于 -20℃ 冰箱中保存。称取约 5g 匀浆后的牛肉, 置于 50ml 离心管中, 加入 20ml 0.01mol/L 磷酸二氢钠缓冲液 (pH4.5), 涡旋充分振荡, 于 4000r/min 下离心 10min。将上清液全部转移到另一离心管中, 加入 0.5ml 75mg/L 三氯乙酸溶液, 涡旋振荡充分混合, 放置 5min 后于 4000r/min 下离心 10min, 上清液即为固相萃取所用的上样液。

1.4 固相萃取净化

依次用 5ml 甲醇、2ml 水和 2ml 2mg/L 三氯乙酸溶液活化 C₁₈ 固相萃取柱。取上述牛肉组织提取所得的上样液 10ml 上样, 依次用 2ml 2mg/L 三氯乙酸水溶液和 2ml 水淋洗, 真空将萃取柱抽干, 弃去淋洗液。用 3ml 乙腈洗脱萃取柱, 真空抽干。在上样淋洗和洗脱过程中洗脱液流速控制在 1ml/min 左右。收集洗脱液, 于 40℃ 下氮气吹干, 残留物供待测。

1.5 液相色谱分离条件

色谱柱: ODS HYPERSIL C₁₈ (100mm × 4.6mm, 5 μm);
流速: 1.0ml/min。检测波长: 230nm; 进样量: 10 μl;
流动相: 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (取磷酸二氢钾 13.6g, 加水溶解后稀释到 2L, 用 8mol/L 氢氧化钾溶液调节 pH 至 5.0 ± 0.1) - 乙腈 (体积比为 96:4)。

1.6 校正曲线

准确称取一定量的阿莫西林标准品, 加磷酸盐缓冲

溶液溶解并定容, 配制成阿莫西林的质量浓度为 5.0、10.0、25.0、225.0、450.0、500.0 μg/L 的工作溶液, 用滤膜过滤, 分别取 20 μl 供高效液相色谱分析。每个浓度点进样 3 针。以色谱峰面积对阿莫西林的质量浓度作图, 得到阿莫西林的校正曲线。

1.7 回收率和重复性实验

称取约 5g 匀浆后的牛肉样品, 分别向其中加入一定量的阿莫西林标准溶液, 然后再进行提取、沉淀蛋白、固相萃取净化以及高效液相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 校正曲线

0.005mg/ml 阿莫西林纯品的色谱峰如图 1 所示。从图 1 中可以看到, 阿莫西林的保留时间大约为 2.54min, 而牛肉空白样品提取液经过预处理和净化后的色谱图中在该处没有干扰组分峰的出现, 不会影响阿莫西林残留量的测定。

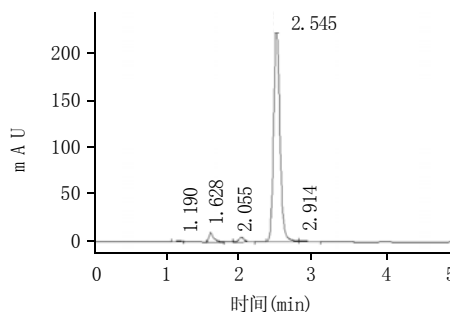


图 1 0.005mg/ml 阿莫西林标准品色谱图

Fig.1 Chromatograms of derivatives of 0.005 mg/ml amoxicillin standard

以阿莫西林的色谱峰面积 (A) 对进样前阿莫西林的质量浓度 (C, μg/L) 作图, 得到其标准曲线。线性回归方程为: $A = 12760.59C + 1.34$, 线性相关系数为 0.99934, 线性范围 5.0~500.0 μg/L。

2.2 试样测定结果

经过以上实验确定了最佳的固相萃取净化条件。牛肉空白样品经过提取、沉淀蛋白、固相萃取净化后的色谱图见图 2。

由图 2 可见, 牛肉样品提取液经过预处理和净化后的色谱图在 2.54min 处没有干扰组分峰的出现, 由于峰面积较小, 在标准溶液的配制与标准曲线的制作时要注意浓度的确定, 否则会影响最后定量结果的准确度。

2.3 回收率和检出限

称取 5g 匀浆后的牛肉组织, 加入不同量的阿莫西林标准溶液, 以确定回收率, 结果见表 1。

由表 1 可见, 不同牛肉物组织中不同浓度阿莫西林的加标回收率均在 77.34%~97.38%, 其多次测定的 RSD 对于 5.0 μg/kg 加标量时小于 15%, 15 μg/kg 加标量时小

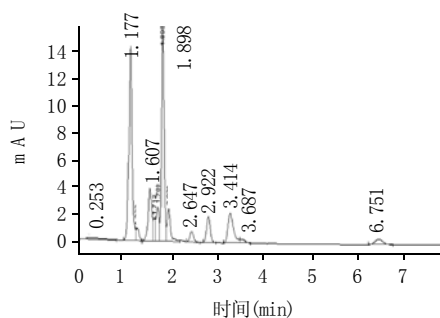


图2 牛肉样品色谱图

Fig.2 Chromatograms of beeves samples

表 1 牛肉中阿莫西林加标回收率

Table 1 Recoveries of amoxicillin in beeves

样品	加入量 (μg/ml)	测得平均值 (μg/ml)	回收率 (%)	RSD (%)
1	5	4.869	97.38	1.8
	15	13.921	92.81	3.2
	30	28.763	95.88	1.2
2	5	3.867	77.34	13.5
	15	12.988	86.59	6.8
	30	26.355	87.78	4.6
3	5	4.052	81.04	8.2
	15	13.421	89.47	3.9
	30	25.465	84.88	3.8

于 10%，30 μg/kg 加标量时小于 5%，回收率和 RSD 均符合药物残留分析的要求。

在保证仪器检出限和回收率稳定的前提下，对牛肉组织中的阿莫西林残留量检测方法的最低检出限小于 10 μg/kg (按 S/N=3 计)。

2.4 稳定性实验

阿莫西林在水溶液中容易发生二聚作用和内酰胺环的水解，主要产物为青霉素裂解酸和二聚物。将 0.1 mg/ml 阿莫西林测定液在室温下放置 2、4、6、8、10、24 h 后，分别测定，发现在 $t_R=1.36$ 及 $t_R=3.24$ 附近有小峰生成并随时间的增长而增高。根据文献和实验证明，此峰为阿莫西林青霉素裂解酸和二聚物产生的吸收峰，而阿莫西林的吸收峰有所降低。根据峰面积衰减 = ((测定时的峰面积 - 分解后的峰面积) / 测定时的峰面积) × 100%，计算其衰减分别为 0.08%、0.10%、0.13%、0.16%、0.21%、3.0%，可见在 24 h 内测定对测定值影响不大。

将 0.5 mg/L 阿莫西林测定液放置在室温下，每隔 1 d 进样一次，进样 6 次，发现阿莫西林标准溶液主成分的色谱峰面积减小甚多，含量降低较大 (如图 3 所示)。所以在不进行衍生化而进行阿莫西林含量测定时，样品经过处理后，必须快速进行检测，否则会影响结果的准确性。

3 讨论

3.1 流动相的 pH 值

流动相的 pH 值影响被分析物的分离效果。但考虑到阿莫西林水溶液的不稳定性，故用磷酸盐缓冲溶液配制流动相。通过改变流动相的 pH 值，分别实验了流动

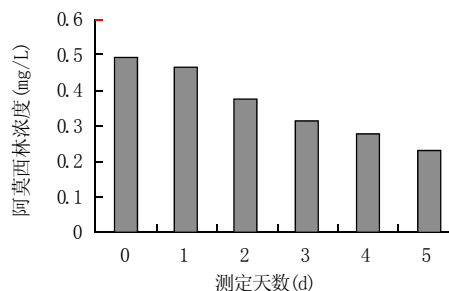


图3 不同测定时间阿莫西林含量变化柱形图

Fig.3 Plane diagram of amoxicillin content changes

相的 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 时，阿莫西林标准溶液的稳定性。实验结果表明，当 pH 为 5.0 时，阿莫西林比较稳定。因此本实验选择流动相的 pH 值为 5.0。

3.2 衍生化

在大多数的参考文献当中都采用了衍生化技术，不但操作繁琐，分析时间长，并且衍生化产物受衍生时间的影响较大，因而本实验没有采用衍生化技术，样品处理后立即上机测定，同样也得到了十分理想的结果。这即简化了实验步骤，又大大缩短了分析时间。

3.3 样品的预处理方法

动物组织样品提取液中含有大量的蛋白质等干扰组分，这些干扰组分不但影响阿莫西林在固相萃取柱上的保留，使其回收率降低，而且阿莫西林能与蛋白分子形成共价键，阻碍衍生反应的进行，所以固相萃取净化和富集前必须对提取液进行脱蛋白处理。脱蛋白常用的有机溶剂有甲醇、乙腈、硫酸和钨酸钠、酸化乙腈等，但是这些溶剂大多会使青霉素产生一定程度的降解。本实验采用三氯乙酸 (2 mg/L) 沉淀蛋白，得到了理想的效果。

阿莫西林抗生素在畜禽产品中残留比较普遍，本实验对阿莫西林残留量检测方法进行了探究与优化，可以在较短时间内准确的对畜禽产品中阿莫西林残留进行定量。目前滥用抗生素的现象比较严重，因此抗生素的合理使用是迫在眉睫需要解决的问题，不仅要每个消费者意识到这个问题，更需要政府、全社会的通力合作，才能保证我们的饮食安全。

参考文献：

- [1] 武晋孝, 李淑琴, 柴桂珍, 等. 高效液相色谱法测定复方阿莫西林各组分含量[J]. 兽药与饲料添加剂, 2003, 8(6): 30-31.
- [2] 刘媛, 丁岚, 谢孟峡, 等. 动物组织中阿莫西林残留的液相色谱分析方法研究[J]. 色谱, 2003(6): 541-544.
- [3] 庄无忌. 各国食品和饲料中农药兽药残留量大全[M]. 北京: 中国对外经济贸易出版社, 1995.
- [4] JOSE A M, JUAAN R, JOSE M L, et al. Determination of amoxicillin and cephalixin in mixtures by second-derivative spectrophotometry[J]. Analyst, 1990, 115(8): 1117-1119.
- [5] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.
- [6] 中华人民共和国农业部公告第235号 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
- [7] 傅若农. 色谱分析概论[M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 123-124.
- [8] SHAKOOR O, TAYLOR R B, MOODY R R. Analysis of amoxicillin in capsules and oral suspensions by high performance liquid chromatography [J]. Analyst, 1995, 120(8): 2191-2194.