

氨苄西林在鸡排泄物中的残留消除规律

王波^{1,2}, 张杨杨^{1,2}, 谢恺舟^{1,2*}, 刘建宇^{1,2}, 刘亚楠^{1,2}, 高强^{1,2},
郭辉生^{1,2}, 张跟喜^{1,2}, 戴国俊^{1,2}, 王金玉^{1,2}

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏扬州 225009)

[收稿日期] 2016-03-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 06-0033-06 [中图分类号] S859.84

[摘要] 为了研究氨苄西林(AMP)在鸡排泄物中残留消除规律,将鸡排泄物用乙腈去蛋白处理,再用饱和的二氯甲烷萃取后,在酸性条件下上清液用水杨醛沸水浴衍生化后,在激发波长 354 nm、发射波长 445 nm 处用高效液相色谱荧光检测器检测。结果显示:该方法测定鸡排泄物中 AMP 的检测限为 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 3$)、定量限为 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 10$)。AMP 在鸡排泄物样品中平均回收率为 74.96% ~ 80.41%,变异系数均低于 9.77%。试验鸡按体重以 60.0、120.0 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 剂量内服 AMP,每天给药 1 次,连续 5 d。AMP 在投药第 1 d 时,鸡排泄物中 AMP 残留量被检测到,投药第 5 d 时达到峰值。停药后 AMP 在鸡排泄物中残留量迅速降低。正常剂量组,停药第 7 d 时,AMP 在鸡排泄物中残留量低于检测限。双倍剂量组,在停药第 9 d 时,鸡排泄物中 AMP 残留量低于检测限。AMP 在鸡排泄物中的残留量与给药剂量呈正相关,鸡排泄物中高含量 AMP 残留存在较大的环境风险。

[关键词] 氨苄西林;高效液相色谱荧光检测法;残留消除;鸡排泄物

Ampicillin Residue Depletion in Chicken Excrement

WANG Bo^{1,2}, ZHANG Yang-yang^{1,2}, XIE Kai-zhou^{1,2*}, LIU Jian-yu^{1,2}, LIU Ya-nan^{1,2},
GAO Qiang^{1,2}, GUO Hui-sheng^{1,2}, ZHANG Gen-xi^{1,2}, DAI Guo-jun^{1,2}, WANG Jing-yu^{1,2}

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Key Laboratory for Animal Genetic, Breeding, Reproduction and Molecular Design of Jiangsu Province, Yangzhou 225009, China)

Abstract: A study on Ampicillin (AMP) residue depletion was conducted in chicken excrement. AMP was deproteinized from chicken excrement with acetonitrile, the analyte was extracted by saturated dichloromethane. The supernatant was reacted with salicylaldehyde under acidic and boiling conditions. Finally, AMP was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector. The excitation wavelength was set at 354 nm and emission wavelength was set at 445 nm. The average recovery in chicken excrement was 74.96% ~ 80.41% with coefficients of variation (CV) lower than 9.77%. The limit of

基金项目: 国家肉鸡产业技术体系专项(CARS-42-G23);江苏高校优势学科建设工程资助项目(201410);扬州大学"新世纪人才工程"资助项目(201406)

作者简介: 王波,硕士,从事畜产品安全生产与环境控制的研究。

通讯作者: 谢恺舟。E-mail: yzxkz168@163.com

detection (LOD) was 1.2 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 3$) and the limit of quantitation (LOQ) was 3.5 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 10$). After the chickens were orally administered successively AMP of 60.0 mg/kg and 120.0 mg/kg of body weight one time every day for 5 days, AMP residues in chicken excrements was detected at the first day, the maximum residues of AMP in chicken excrement were at the 5th day. Normal dose group, AMP residues in chicken excrement was lower than LOD at the 7th withdrawal day. Double dose group, AMP residues in chicken excrement was lower than LOD at the 9th withdrawal day. The residues of AMP in chicken excrement were all positively correlated with AMP orally administered doses. There are environmental risks with high residues of AMP in chicken excrement.

Key words: Ampicillin; HPLC with fluorescence detection; residue depletion; chicken excrement.

氨苄西林(Ampicillin, AMP), 是半合成耐酸广谱青霉素, 不仅抗菌谱广, 而且杀菌能力强。因此, AMP 被广泛用于家禽养殖中。虽然鸡的排泄物经处理后可添加到动物饲料中作为很好的蛋白质饲料来源, 但养殖户抗生素的滥用和休药期不按规定执行而导致抗生素在鸡排泄物中残留, 随着食物链的传递, 最终对人类健康构成威胁。我国农业部与欧盟都有最高残留限量(MRLs)规定, AMP 在动物可食性组织中的 MRLs 为 50 $\mu\text{g/kg}$ ^[1-2]。

目前, 国内外研究 AMP 的残留检测方法虽有微生物法^[3]、试管扩散法^[4]、HPLC 法^[5-7]、HPLC-MS/MS^[8]等报道, 但关于 AMP 在鸡排泄物中的残留消除规律研究尚未见报道。本试验按体重分别以 60.0、120.0 mg/(kg·d) 剂量给京海黄鸡每天内服 AMP 1 次, 连续 5 d, 测定从投药期到休药期不同时间 AMP 在鸡排泄物中的残留量变化, 研究鸡排泄物中 AMP 的残留消除规律, 为 AMP 环境风险的正确评估及鸡排泄物中 AMP 去除技术研究, 实现鸡排泄物的循环再利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 标准物质、主要试剂及配置 AMP 标准物质: 纯度 99.00%, 德国 Dr. Ehrenstorfer 赠送; 兽用氨苄西林钠粉剂: 江苏倍康药业有限公司; 水杨醛、三氯乙酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和二氯甲烷: 均为分析纯; 乙腈: 色谱纯, 德国 Merck 有限公司; 超纯水(本实验室自制)。

AMP 标准储备液: 准确称取 AMP 适量置于 10 mL 棕色容量瓶中, 用无菌超纯水溶解并定容至刻

度; 即成 0.5 mg/mL 的 AMP 标准液, 置于 -35 °C 冰箱中密封保存。

1.2 主要仪器 高效液相色谱仪(带两台 515 型高压泵、配 2475 型荧光检测器等, 美国 Waters 公司); 高速冷冻离心机(D-37520 型, 德国 Osterode am Harz 公司); 漩涡混合器(G560E 型, 美国 Scientific Industries 公司); 分析天平(Ax205 型, 瑞士 Mettler Toledo 公司); 超纯水制备仪(SMARTPURE, 美国 Thermo 公司)等。

1.3 方法

1.3.1 供试动物处理及样品采集 随机选取 90 只 28 周龄京海黄鸡产蛋鸡, 体重 1.8 ± 0.2 kg, 分成 3 组, 分别为氨苄西林正常剂量组 30 只, 给药剂量 60.0 mg/(kg·d)、氨苄西林双倍剂量组 30 只, 给药剂量 120.0 mg/(kg·d)、空白对照组 30 只。给药前分别称重、编号、单笼饲养。前预期 7 天, 饲喂全价饲料(不含任何药物), 自由采食、饮水。用无菌超纯水先将氨苄西林钠粉剂配成净含量 50 mg/mL 的水溶液。各试验组鸡按上述剂量分别将药物注入到鸡嗉囊中, 每天 8:30 左右内服给药 1 次, 连续 5 d, 自给药日起一直到停药后 15 d, 每天 17:30 左右采集各试验组鸡排泄物, 在 -80 °C 冰箱中保存待测。

1.3.2 样品的提取、净化与衍生化 准确称取 5 g 鸡排泄物匀浆液放入 50 mL 具塞离心管中, 加入乙腈溶液 10 mL, 漩涡混匀振荡 2 min, 以 $8000 \times g$ 的离心力在 5 °C 条件下离心 10 min。将上清液转到另一只 50 mL 具塞离心管中, 重复提取剩余的残渣

1 次,合并上清液后,加入 20 mL 饱和的二氯甲烷,漩涡混匀振荡 2 min,以 $6500 \times g$ 的离心力在 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min。转移上层水相置于 15 mL 玻璃离心管中,用真空干燥器抽干,加入 10 mL 超纯水振荡溶解。从中取 100 μL 溶解后的溶液置于 10 mL 玻璃离心管中,再分别加入 100 μL 15 % 的三氯乙酸溶液、20 μL 水杨醛后,漩涡混匀振荡 1.5 min,在沸水浴中进行衍生化反应 1 h。将衍生化样品取出冷却至室温后,转移到 2 mL 离心管中,用 500 μL 50 % 乙腈溶液分两次洗涤 10 mL 玻璃离心管,转移并合并至 2 mL 离心管中,最后再用 50 % 乙腈溶液定容到 2 mL。以 $20000 \times g$ 的离心力离心 15 min,上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后,供 HPLC 测定。

1.3.3 色谱操作条件及参数 色谱柱:Athena C18,5 μm ,250 mm $\times$ 4.6 mm, id; 荧光检测器:激发波长为 354 nm,发射波长为 445 nm; 流动相:A 相 0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液,用 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液调 pH 至 5.5; B 相乙腈溶液,梯度洗脱程序见表 1; 流速 1.0 mL/min; 进样体积:100 μL ; 柱温:40 $^{\circ}\text{C}$ 。

表 1 梯度洗脱程序			
时间/min	A 液/%	B 液/%	流速/(mL $\cdot$ min ⁻¹)
0.0	64	36	1.0
8.5	64	36	1.0
9.5	40	60	1.0
14.5	40	60	1.0
15.5	64	36	1.0
20.0	64	36	1.0

1.3.4 标准曲线的制备 用空白基质提取液将 AMP 标准储备液稀释成浓度分别为 3.5、12.5、62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/kg}$ 的 AMP 标准工作液。准确吸取各浓度点 AMP 标准工作液 100 μL ,按衍生化步骤衍生,重复测定每个浓度点的 AMP 衍生化产物 4 次,取色谱峰面积平均值绘制 AMP 浓度(C) - AMP 色谱峰面积(A)的标准曲线,求出 AMP 线性回归方程和相关系数。

1.3.5 添加回收率和精密度的测定 准确称取 5.0 g 匀浆的空白鸡排泄物放入 50 mL 具塞离心管

中,分别添加 AMP 低、中、高浓度的标准工作液,使 AMP 在空白鸡排泄物中含量依次为 3.5、5.0、25、125 $\mu\text{g/kg}$,经样品提取、净化和衍生化后,取 100 μL 进样,进行 HPLC 检测,计算添加回收率。按 AMP 药物的浓度高低将回收率检测后剩余的样品分别混合成 3 份,在同 1 天、同 1 星期内的不同时间,用同一台 HPLC 分别重复测定低、中、高三种药物浓度的样品 6 次,求得日内、日间变异系数。

1.3.6 检测限和定量限的测定 把一定质量浓度的 AMP 标准溶液添加到空白基质提取液中,经 1.3.2 样品的提取、净化与衍生化后,取上清液用 HPLC 进行分析测定,以样品检测时的信噪比大于等于 3 和 10 分别作为 AMP 检测方法的检测限和定量限。

1.3.7 AMP 在鸡排泄物中残留量的分析测定 按照外标定量的方法,把 AMP 在鸡排泄物中测得的峰面积带入 AMP 标准曲线回归方程(如果实测样品的含量超过标准曲线的线性浓度范围,可以对样品提取液和衍生化后溶液进行稀释后再测定),即能得到鸡排泄物中 AMP 的残留量。

2 结果

2.1 色谱分离 由图 1 显示,在筛选好的最佳色谱条件下,测得鸡排泄物中 AMP 的保留时间为 15.3 min 左右,色谱峰为基线分离峰且峰形较好,空白提取液在上述时间内无干扰峰。

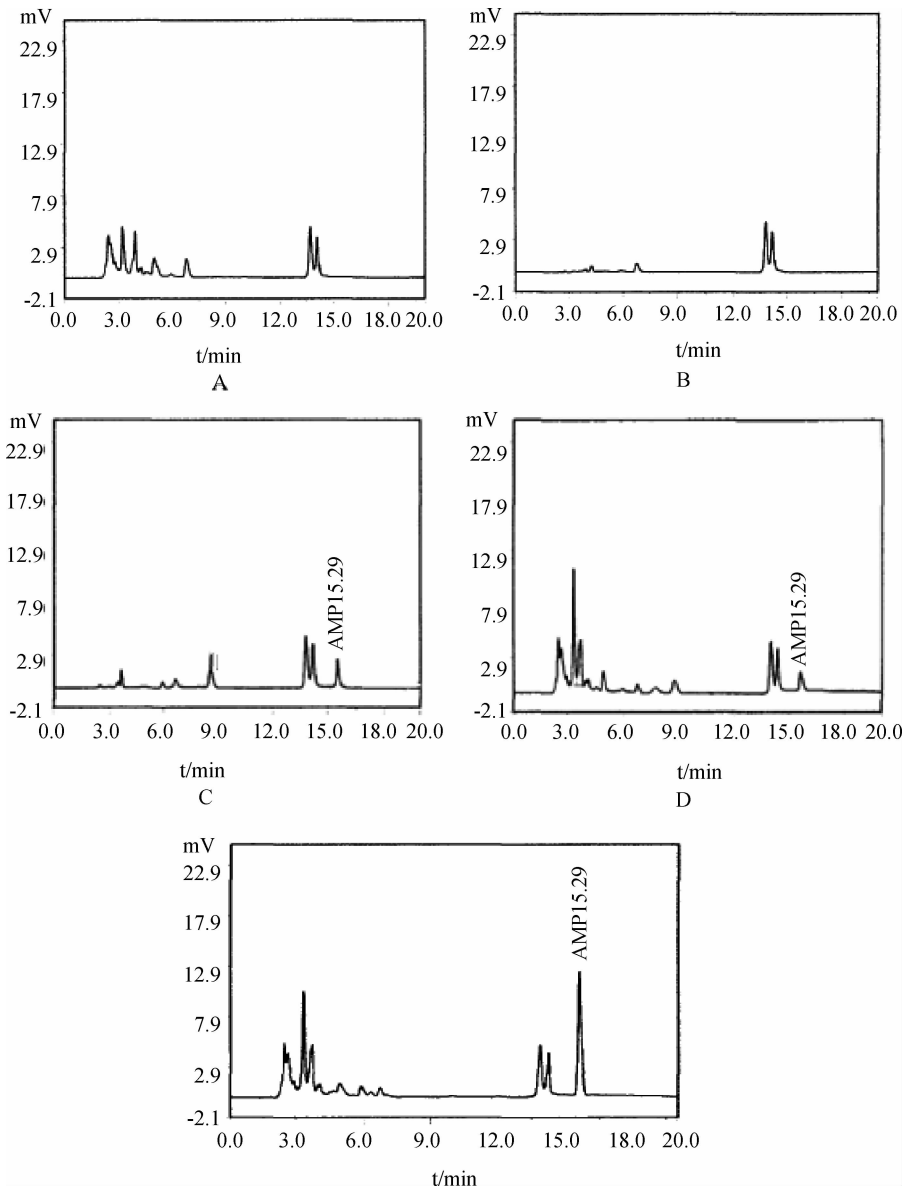
2.2 标准曲线 以 AMP 的色谱峰面积(A)为横坐标、进样前 AMP 的质量浓度(C, $\mu\text{g/kg}$)为纵坐标作图,得到 AMP 标准曲线。AMP 在 3.5 $\mu\text{g/kg}$ ~ 250.0 $\mu\text{g/kg}$ 线性范围内,其线性回归方程为 $C = 0.0181 A - 1.7605$,相关系数 r 为 0.9998。

2.3 样品的添加回收率和精密度 由表 2 可知,当 AMP 在空白鸡排泄物样品中添加水平分别为 3.5、5.0、25.0、125.0 $\mu\text{g/kg}$ 时,鸡排泄物样品中 AMP 平均添加回收率为 74.96 % ~ 80.41 %,变异系数均低于 9.77 %。其日内、日间变异系数分别均低于 8.74 %、11.59 %。结果表明:该检测方法可靠性、重复性均符合要求。

2.4 灵敏度 用本试验建立的分析测定方法,测得 AMP 在鸡排泄物中的检测限为 1.2 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 3$)、定量限为 3.5 $\mu\text{g/kg}$ ($S/N \geq 10$),表明此方法的灵敏度能满足 AMP 在鸡排泄物中残留检测的要求。

2.5 鸡排泄物中 AMP 残留量的分析测定 AMP

在鸡排泄物中的残留量测定结果及其消除曲线分 别见表 3、图 2。



A. 空白鸡排泄物;B. 水杨醛;C. AMP(20.0 ng/mL) 标准品
D. 添加 AMP(25.0 µg/kg)标准品的空白鸡排泄物;E. AMP 给药后的鸡排泄物

图 1 鸡排泄物中 AMP 的 HPLC 图

表 2 鸡排泄物中 AMP 的添加回收率和精密度 (n = 6)				
添加浓度/(µg · kg ⁻¹)	回收率/%	变异系数/%	日内变异系数/%	日间变异系数/%
3.5	74.96 ± 4.61	6.15	7.36	11.59
5.0	76.53 ± 4.54	5.93	7.19	11.23
25.0	76.69 ± 7.49	9.77	8.74	10.56
125.0	80.41 ± 6.21	7.72	5.68	9.57

由表3、图2可见,试验组鸡按体重分别以60.0、120.0 mg/(kg·d)剂量内服给药AMP,每天1次,连续5 d。投药第1 d时,在鸡排泄物中就能检测到AMP残留,第5 d时,AMP残留量达峰值。

正常剂量组在休药第5 d时,鸡排泄物中AMP残留量低于检测限;双倍剂量组在休药第7 d时,鸡排泄物中AMP残留量低于检测限。鸡排泄物中AMP的残留量与给药剂量的大小呈正相关。

表3 鸡排泄物中AMP的残留量

时期	天数/d	残留量/(μg·g ⁻¹)	
		60.0/(mg·(kg·d) ⁻¹)	120.0/(mg·(kg·d) ⁻¹)
投药期	1	30.87±1.41	60.69±1.08
	2	33.16±0.53	63.37±1.74
	3	55.42±1.32	98.66±2.90
	4	60.35±1.76	112.84±1.38
	5	61.26±1.61	115.30±3.30
休药期	1	8.55±1.43	13.86±0.60
	3	0.39±0.04	0.38±0.02
	5	0.20±0.01	0.32±0.03
	7	ND	0.15±0.02
	9	ND	ND
	11	-	ND

注:ND. 未检测到,“-”未检测

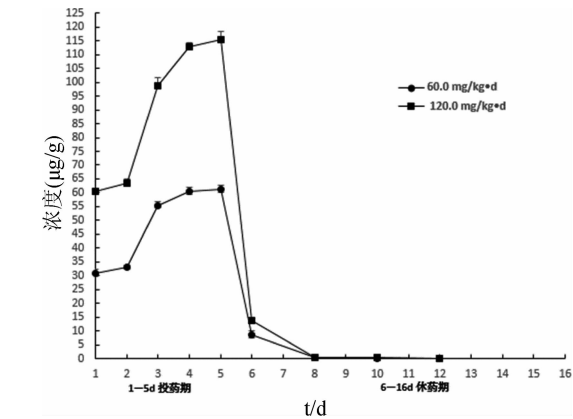


图2 鸡排泄物中AMP的残留消除曲线

3 讨论

3.1 检测器的选择与衍生条件的优化 目前,氨苄西林(AMP)的HPLC检测方法国内外虽有不少报道^[9-10],但选择的检测器有紫外检测器、荧光检测器等。本试验选择荧光检测器(Waters 2475型)进行检测,采用衍生化反应使AMP的母体β-内酰胺产生荧光发色基团。通过邻苯二甲醛、水杨醛、苯甲醛、甲醛等衍生化试剂进行比较发现,目标物与水杨醛的衍生产物具有较高的灵敏度,所以本

试验选用水杨醛作为衍生试剂。AMP衍生化条件为:100 μL 15%三氯乙酸、水杨醛20 μL、100℃沸水浴1 h。

3.2 鸡排泄物中AMP的残留消除规律 试验组鸡按体重分别以60.0、120.0 mg/(kg·d)剂量内服给药AMP,每天1次,连续5 d。试验结果表明:在投药第1 d时,AMP在鸡排泄物中残留量被检测到,投药第5 d时达到峰值。休药后AMP在鸡排泄物中残留量迅速降低,AMP在鸡排泄物中的半衰期较短。正常剂量组,休药第7 d时,AMP在鸡排泄物中残留量低于检测限。双倍剂量组,在休药第9 d时,AMP在鸡排泄物中残留量低于检测限。鸡排泄物中的AMP残留量与给药剂量的大小呈正相关,AMP在鸡排泄物中高含量残留存在较大的环境风险。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
[2] Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification re-

- garding maximum residue limits in food stuffs of animal origin [Z].
- [3] 李文平, 阙鹿枫, 马 浩. 微生物法测定鸡肉组织中的氨苄西林残留[J]. 中国兽药杂志, 2004, 38(9): 20-22.
- [4] 吴 遐, 绍 辉, 王 鑫, 等. 试管扩散法检测牛乳中 β -内酰胺类抗生素残留研究[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(5): 31-35.
- [5] Heeyong L, Jung S L, Hye S L. Simultaneous determination of ampicillin and metampicillin in biological fluids using high-performance liquid chromatography with column switching[J]. Journal of Chromatography B, 1995, 664: 335-340.
- [6] Valentina G, Guglielmo D. Liquid chromatography with fluorescence detection of amoxicillin and ampicillin in feeds using pre-column derivatization[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 69-72.
- [7] Verdon E, Couedor P. Determination of ampicillin residues in milk by ion-pair reversed phase high performance liquid chromatography after precolumn derivatization[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1996, 14: 1201-1207.
- [8] Sun L R, Jia L F, Xie X, *et al.* Quantitative analysis of amoxicillin, its major metabolites and ampicillin in eggs by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2016, 192: 313-318.
- [9] Luo W H, Jr Catharina Y W, Harold C T. Rapid method for the determination of ampicillin residues in animal muscle tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 1997, 694: 401-407.
- [10] Luo W H, Eugene B H, Jr Catharina Y W, *et al.* Simultaneous determination of amoxicillin and ampicillin in bovine milk by HPLC with fluorescence detection [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45: 1264-1268.

(编辑:陈 希)