

离子液体在无抗奶检测中的应用

Application of ionic liquids in the detection of antibiotic negative milk

周鑫魁^{1,2} 洪霞^{1,2} 钱滢文^{1,2} 邓丽娟^{1,2}

ZHOU Xin-kui^{1,2} HONG Xia^{1,2} QIAN Ying-wen^{1,2} DENG Li-juan^{1,2}

王杰斌^{1,2} 高志莹^{1,2} 何海宁^{1,2} 刘琦^{1,2}

WANG Jie-bin^{1,2} GAO Zhi-ying^{1,2} HE Hai-ning^{1,2} LIU Qi^{1,2}

(1. 甘肃省商业科技研究所, 甘肃 兰州 730010; 2. 甘肃中商食品质量检验检测有限公司, 甘肃 兰州 730010)

(1. Gansu Institute of Business and Technology, Lanzhou, Gansu 730010, China;

2. Gansu Zhongshang Food Quality Test and Detection Co., Ltd., Lanzhou, Gansu 730010, China)

摘要:采用复分解方法合成疏水性离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐[(C₈MIM)(PF₆)], 用活性炭和大孔树脂固相萃取小柱净化该离子液体, 得到无色透明的[(C₈MIM)(PF₆)], 产率 87.6%。利用该离子液体萃取乳及乳制品中的青霉素及其酶解产物青霉素噻唑酸, 并优化萃取条件。通过自建的高效液相色谱方法检测青霉素及青霉素噻唑酸的含量, 间接判断乳及乳制品中是否为真正的“无抗奶”。离子液体萃取方法青霉素回收率为 87.4%~92.6%, RSD 为 1.8%, 检出限 5 ng/mL; 青霉素噻唑酸回收率为 83.5%~90.8%, RSD 为 2.4%, 检出限 5 ng/mL, 通过与杯碟法和液相质谱法作比较, 更说明了该方法的优越性。

关键词:离子液体; β -内酰胺酶; 青霉素; 青霉素噻唑酸; 高效液相色谱; 乳及乳制品

Abstract: Hydrophobic ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate [(C₈MIM)(PF₆)] was synthesized using metathesis method, and then the ionic liquid was purified by activated carbon and macroporous resin solid phase extraction column, to get a colorless, transparent product [(C₈MIM)(PF₆)] with a yield of 87.6%. The ionic liquids was used to extract penicillin and penicillin-thiazole acid hydrolysates in milk and dairy products, and its extracting condition was optimized. After that the content of penicillin and penicillin thiazole acid were detected by utilizing self-developed HPLC method, and it could be indirectly determined whether the milk and dairy products were true antibiotic negative milk. In this study, the recovery rate of penicillin by ionic liquid extraction method was 87.9%~92.6%, with RSD 1.8%,

and the detection limit was 5 ng/mL. Moreover, the recovery rate of penicillin thiazole acid was found to be 83.5%~90.8%, with RSD 2.4%, and the detection limit was also 5 ng/mL. Compared with both plate and liquid chromatography mass spectrometry methods, our method here is more predominant.

Keywords: ionic liquid; penicillin; penicillin-thiazole acid hydrolysates; HPLC; milk and dairy products

青霉素作为一种高效、廉价的抗生素, 是禽畜饲养治疗、抵抗炎症首选的药物。抗生素滥用的危害在于加剧细菌耐药性, 正成为目前全球最迫切的公共卫生问题之一。如何严格控制、合理使用抗生素必须引起全社会的重视。在乳及乳制品的生产过程中, 不法企业为了避免检查出过量使用青霉素, 人为地使用 β -内酰胺酶去降解牛乳中残留的青霉素, 使青霉素酶解生成青霉素噻唑酸, 生产人造“无抗奶”。所以判断产品是否为真正的“无抗奶”, 需要同时检测青霉素和 β -内酰胺酶是否残留。目前检测 β -内酰胺酶的方法有微生物法, 该方法灵敏度高, 检出限低, 但是重复性不好, 检测周期过长^[1]; 碘量法操作简便、快捷, 为实验室普遍使用, 但是对反应时间要求严格, 灵敏度和重现性不好^[2-4]; 酶联免疫法^[5-6]快速、高效, 但是成本太高。高效液相色谱法具有高性能的检测设备和先进的操作控制系统, 自动化程度高、结果重复性好, 但在检测基质复杂的乳及乳制品时, 需要对样品进行比较繁琐的前处理工作, 而且处理过程一般为稀释样品, 所以灵敏度不高^[7-8][9]31-38[10-11]; 液相色谱—串联质谱法所需仪器价格昂贵^[12]。因此建立一种简单、快捷, 灵敏度高的乳及乳制品的前处理方法是很有必要的。

离子液体在室温或近于室温情况下是由有机阳离子和无机阴离子组成的熔融盐体系构成。由于离子液体独特的性质, 被广泛应用在富集、分离、合成、催化、电化学等方

基金项目: 甘肃省科技计划资助 (编号: 1504WKCA094, 1309RTSA025, 1009FTGA018, 1505JTCA017)

作者简介: 周鑫魁, 男, 甘肃省商业科技研究所工程师, 硕士。

通讯作者: 洪霞 (1966—), 女, 甘肃省商业科技研究所高级工程师, 硕士。E-mail: lzhongxia@126.com

收稿日期: 2015—12—14

面^[13-16]。其中烷基咪唑类离子液体常被用于萃取和富集水溶液中的苯及苯的衍生物等^[17]。并且烷基咪唑类离子液体与液相色谱柱及其流动相有很好的兼容性,可以作为样品溶剂进入液相色谱仪^{[18]12-17}。

但如何将离子液体应用到“无抗奶”的检测中,同时检测青霉素及其酶解产物青霉素噻唑酸却很少有研究。赵洪秋^{[18]22-23}利用 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐,液-液微萃取的形式,萃取并检测牛乳中青霉素的含量,得到较好的效果。但对于添加 β -内酰胺酶,将青霉素分解为青霉素噻唑酸的人造“无抗奶”并没有加以研究。而且 1-丁基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐的色谱行为与目标物近似,所以在赵洪秋色谱图中,目标物周围杂质较多。根据对“无抗奶”的检测需求,合成并净化得到无色透明的离子液体 1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐。该离子液体疏水性更强,极性更弱。本身的色谱行为不影响目标物出峰。将 $[(C_8MIM)(PF_6)]$ 液-液分散萃取技术应用在乳及乳制品中青霉素及青霉素噻唑酸的检测试验中,可以提高离子液体对目标物的富集程度,增加回收率。同时快速地对目标物进行净化、萃取、浓缩。从而使样品前处理更快捷,检测结果更稳定,方法检出限更低,灵敏度更高。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

- N-甲基咪唑:分析纯,阿拉丁试剂上海有限公司;
- 1-氯正辛烷:优级纯,上海麦克林生化科技有限公司;
- 六氟磷酸钾:分析纯,阿拉丁试剂上海有限公司;
- 青霉素标准品:标准品(97.5%),德国 Dr. Ehrenstorfer 公司;
- β -内酰胺酶:分析纯(500 U/mL),阿拉丁试剂上海有限公司;
- 甲醇:色谱纯,北京百灵威科技有限公司。
- 大孔树脂固相萃取柱:4 g,12 mL,迪马科技有限公司;
- 牛奶阴性样品:兰州庄园乳业有限责任公司。

1.2 仪器与设备

- 液相色谱仪:安捷伦 1260 型,配二级管阵列检测器,安捷伦科技有限公司;
- 旋转蒸发仪:RE-52AA 型,上海亚荣生化仪器厂;
- 离心机:RX-II 型,天美中国科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 离子液体合成 根据文献^[13]修改如下:1-辛基-3-甲基咪唑氯化盐的合成 $[(C_8MIM)Cl]$:称取 0.25 mol(20.53 g) N-甲基咪唑和 0.258 mol(23.88 g)1-氯正丁烷于 100 mL 烧瓶中,加热回流 24 h,用热乙酸乙酯多次洗涤反应后的液体,弃去乙酸乙酯,70 ℃ 旋转蒸发,得到淡黄色粘稠液体,备用;1-辛基-3-甲基咪唑六氟磷酸盐的合成 $[(C_8MIM)[PF_6]]$:称取 1-辛基-3-甲基咪唑氯化盐 35 g 溶于 200 mL 蒸馏水中,加入六氟磷酸钾 47 g,搅拌 1 h,分为两层,弃去上层后,用蒸馏水反复洗涤除去氯离子,在洗涤过离子液体的水中滴加 0.1 mol/L 的硝酸银溶液,直到不产生白色沉淀,证明氯离子

洗涤干净。70 ℃ 旋转蒸发去除水分,得到淡黄色粘稠液体。将该液体溶于 200 mL 色谱纯甲醇中,加入 10 g 活性炭脱色。取上清液过大孔树脂固相萃取柱,接收全部流出液,70 ℃ 旋转蒸发去除多余溶剂。得到无色透明粘稠液体,备用。

1.3.2 试剂配制 称取青霉素标准品 10 mg,用 0.05 mol/L pH 3.5 乙酸铵溶解定容至 10 mL,得到 1 mg/mL 青霉素溶液。使用时用 0.05 mol/L pH 3.5 的乙酸铵逐级稀释至适当浓度。称取青霉素标准品 10 mg,用 0.05 mol/L pH 6.0 的乙酸铵溶解,加入 1 mL 500 U/mL 的 β -内酰胺酶,37 ℃ 恒温酶解 30 min。得到青霉素噻唑酸标准溶液,使用时,用 0.05 mol/L pH 3.5 的乙酸铵逐级稀释至适当浓度。

1.3.3 样品前处理 称取 10.00 g 牛奶样品于离心管中,加入 0.05 mol/L pH 3.5 乙酸铵溶液 30 mL,涡旋、超声后,分别加入 106 g/L 亚铁氰化钾溶液和 220 g/L 乙酸锌溶液各 5 mL,涡旋震荡,使其混合均匀后,于 4 ℃,10 000 r/min 离心 5 min,取全部上清液置于另一支离心管中,分别加入 1 mL 离子液体和 5 g 氯化钠,剧烈摇动 2 min,使离子液体与上清液形成乳浊液,4 ℃,10 000 r/min 离心 5 min,目标物被离子液体萃取留在下层,取下层清液过 0.45 μ m 滤膜,进行高效液相色谱测定。

1.3.4 色谱条件 为使青霉素与青霉素噻唑酸能良好分离,并且离子液体出峰不影响目标物色谱峰。目标物在流动相 pH 范围内只有单一化合物形态。固自行建立色谱方法,色谱柱: C_{18} 4.6 μ m $\times$ 150 mm 分析柱;流动相:pH 3.5 乙酸铵缓冲液—甲醇(体积比 40:60);流速:1 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:20 μ L;检测波长:225 nm。

1.3.5 回收率及隔日试验 在牛奶阴性样品中加入不同体积的青霉素及青霉素噻唑酸(由步骤 1.3.2 配制所得)标准溶液,使样品中青霉素及青霉素噻唑酸含量分别为 10,20,40 ng/mL,按照 1.3.3 的方法测定其含量,并计算回收率。将待测样液常温放置过夜,第 2 天再次测定其含量,计算回收率。

1.3.6 样液 pH 值对离子液体萃取效果的影响 分别用 0.05 mol/L pH 值为 2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0 的乙酸铵缓冲液,配制 1 μ g/mL 的青霉素和青霉素噻唑酸溶液,取 1 mL 经离子液体萃取后,进入液相色谱仪测定。

1.3.7 标准工作曲线的线性回归方程、相关性系数、线性范围、最低检出限及精密度试验 取 50~50 000 ng/mL 不同浓度的青霉素和青霉素噻唑酸溶液进行分析,以液相色谱的峰面积对目标物浓度求得回归方程;以 3 倍信噪比为最低检出限;取 10 份阴性样品做青霉素和青霉素噻唑酸的药物添加,按 1.3.3 的方法处理、测定,测得两种物质的标准偏差。

1.3.8 方法应用 在 10 组阴性样品中,人为随机添加青霉素和 β -内酰胺酶,放置 1 d 后,分别用杯碟法^[2]、液相质谱法^[12]、离子液体萃取法检测。

2 结果与讨论

2.1 离子液体对青霉素和青霉素噻唑酸的萃取效果

阴性样品、阴性样品中添加青霉素及青霉素噻唑酸的加

标样品按照 1.3.4 的方法处理,经液相色谱仪检测,得到相应的色谱图及标准品色谱图见图 1。由图 1(a)可知,离子液体从样品中萃取的非目标物,并没有在青霉素和青霉素噻唑酸的保留时间范围内出峰,说明在该试验条件下离子液体萃取的非目标物及离子液体本身对青霉素和青霉素噻唑酸的色谱峰没有产生影响。对比图 1(b)和(c)可知,青霉素出峰时间约为 2.9 min,青霉素噻唑酸出峰时间约为 2.2 min,青霉素和青霉素噻唑酸峰型对称,有良好的分离度,说明该色谱条件能完全满足青霉素和青霉素噻唑酸的检测。

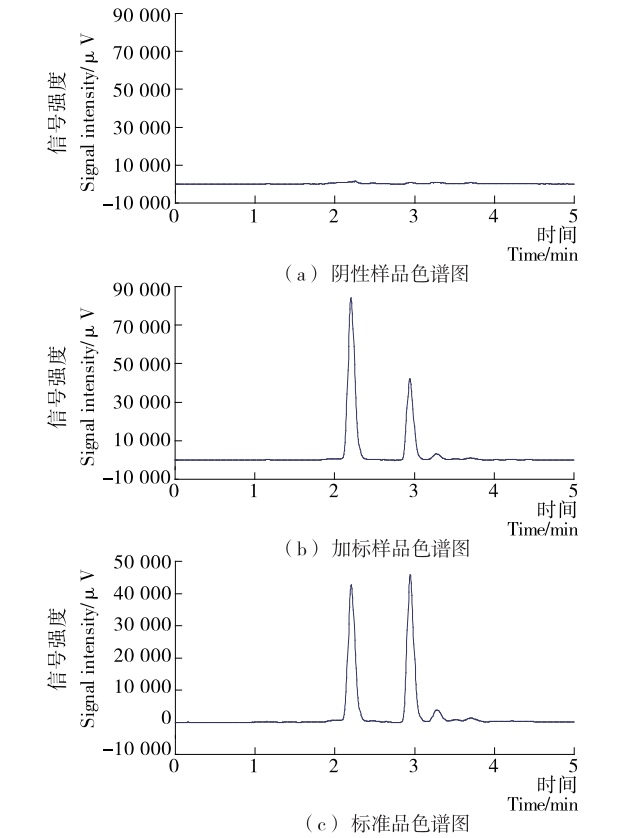


图 1 青霉素和青霉素噻唑酸液相色谱图
Figure 1 Penicillin and penicillin penicilloic acid liquid chromatogram

2.2 回收率及隔日试验

以药物添加回收率评价离子液体萃取效果,以日内结果与日间结果的对比,评价青霉素及青霉素噻唑酸在离子液体中的稳定性,见表 1。由表 1 可知,青霉素回收率为 87.4%~92.6%,和文献[18]²⁰⁻²³中所报道的 85.5%~96.0%相似;青霉素噻唑酸回收率为 83.5%~90.8%,而文献[9]³⁴⁻³⁵中所用的常规液相方法,青霉素噻唑酸回收率仅为 76.4%~81.3%。说明离子液体对青霉素和青霉素噻唑酸有良好的富集作用和萃取效果。而且日内结果和日间结果差异不大,RSD 值小于 5%。说明青霉素和青霉素噻唑酸在离子液体中较稳定。

2.3 样品溶液 pH 值对离子液体萃取的影响

每种 pH 值做 5 份平行试验,结果见图 2。由图 2 可知,青霉素和青霉素噻唑酸溶液的 pH 值在 3~4 时,离子液体

表 1 青霉素及青霉素噻唑酸药物添加回收率					
Table 1 Penicillin and penicillin drugs penicilloic acid recovery rate					
组分名称	日内结果		日间结果		
	添加值/ (ng · mL ⁻¹)	回收率/ %	添加值/ (ng · mL ⁻¹)	回收率/ %	RSD/ %
青霉素	10	88.6	10	87.9	2.4
	20	88.5	20	87.4	
	40	92.6	40	91.0	
青霉素噻唑酸	10	84.5	10	83.5	3.9
	20	88.2	20	89.8	
	40	90.8	40	90.3	

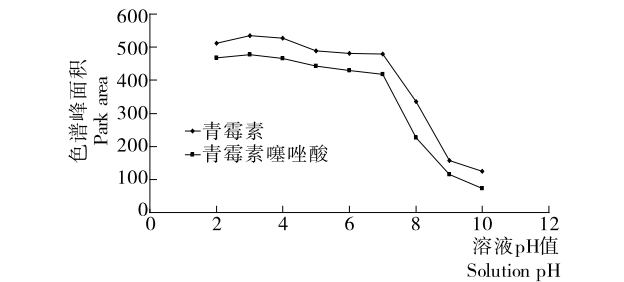


图 2 pH 值对萃取效果的影响
Figure 2 Effect of pH value on extraction effect

对目标物的萃取效率最高;pH 值在 5~7 时,离子液体对目标物的萃取效率有所降低;pH 值在 7~10 时,离子液体对目标物的萃取效率大幅降低。因为样品溶液中的青霉素和青霉素噻唑酸在碱性条件下会转化为青霉素盐和青霉素噻唑酸盐,而离子液体对盐的吸附能力非常微弱。所以样品应该用 pH 为 3~4 的缓冲液进行稀释。

2.4 标准工作曲线的线性回归方程、相关性系数、线性范围、最低检出限及精密度

以线性范围评价该方法的检测浓度范围,以相对标准偏差评价精密度和稳定性,结果见表 2。由表 2 可知,该方法线性范围宽,适合不同浓度样品的分析。样品前处理方法采用浓缩 10 倍的形式,当青霉素和青霉素噻唑酸最低响应浓度分别为 46, 49 ng/mL 时,方法检出限分别为 4.6(≈5), 4.9(≈5) ng/mL。较林楠^[9]³⁷⁻³⁸所使用的常规液相方法检出限 20 ng/mL 更低。而青霉素和青霉素噻唑酸的 RSD 值均于 3%,说明该方法符合检验的要求。

2.5 方法应用

经微生物法^[2]检测 β-内酰胺酶完成的样品 10 组,其中 2 组为含有 β-内酰胺酶的阳性样品,再经液相质谱^[12]确认,除含有 β-内酰胺酶的阳性样品外,其余 9 组仍有 1 组含有青霉素噻唑酸,1 组含有青霉素。

对上述 10 组用 1.3.3 的方法处理、测定。其中 6 组未检出青霉素和青霉素噻唑酸,4 组含有青霉素或青霉素噻唑酸,检测数据见表 3。由于 β-内酰胺酶在产品加工过程中可能分解、变质,所以用杯碟法判断是否含有 β-内酰胺酶,很容易产生假阴性的结果。所以本方法能更准确地判断样品是

表 2 线性回归方程、相关性系数、线性范围、检出限及精密度数据

Table 2 Linear regression equation, linear coefficient, linear range, detection limit and precision data

组分名称	线性范围/ (ng·mL ⁻¹)	回归方程	相关系数 (R ²)	3 倍信噪比/ (ng·mL ⁻¹)	RSD/ %
青霉素	50~50 000	y=51.967x+9.491	0.999 7	46	1.8
青霉素噻唑酸	50~50 000	y=49.216x+8.650	0.999 1	49	2.4

表 3 该方法在实际样品中的应用[†]

Table 3 The application of the method in real samples

样品 编号	杯碟法	液相质谱法		离子液体萃取法	
	β -内酰胺酶	青霉素	青霉素 噻唑酸	青霉素	青霉素 噻唑酸
1	—	+(3.98)	—	+(4.22)	—
2	+	—	+(3.84)	—	+(3.51)
3	+	—	+(3.01)	—	+(3.28)
4	—	—	+(2.38)	—	+(2.64)
5	—	—	—	—	—
6	—	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—
9	—	—	—	—	—
10	—	—	—	—	—

[†] +表示含有该成分；—表示不含有该成分；小括号中的数据为该物质的含量。

否为真正的“无抗奶”。而按照文献[12]液相质谱法,仪器设备需要高额成本,样品前处理过程需要经固相萃取小柱净化,操作复杂,造成试验方法的相对标准偏差较大(3.02%~9.81%)。所以离子液体萃取,液相色谱检测的方法结果准确、稳定,同时操作更方便快捷。

3 结论

离子液体[C₈MIM][PF₆]在pH为3~4时,对乳品中青霉素及青霉素噻唑酸的富集能力强。且富集效果稳定。富集后的青霉素及青霉素噻唑酸在本条件下能够得到很好的分离度,净化效果良好。整个试验操作简便快捷。克服了常规液相色谱法中操作繁琐,灵敏度低的缺点。同时该方法回收率、精密度良好,准确度高,重显性好。克服的微生物法假阴性率高,重现性不好的缺点。在实际样品中应用良好,为真正的“无抗奶”检测探索了一个很好的方法。在该方法的基础上可以选择更优的萃取条件和色谱条件,同时测定更多的抗生素。

参考文献

[1] 陈号, 马文静, 田晋红, 等. 牛奶中非法添加 β -内酰胺酶的检测方法及研究现状[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(1): 67-69.
[2] 黄士新, 商军, 顾欣. 生鲜牛乳中 β -内酰胺酶检测方法的比较试验[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2013(6): 34.
[3] 邓冬云, 余淑冰, 梁锦涛. 牛奶中抗生素残留量两种测定方法的

比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5): 661-662.
[4] 周浩, 张彪, 杨红, 等. 乳及乳制品中残留青霉噻唑酸钾的检测方法[J]. 中国乳品工业, 2012, 40(1): 63-64.
[5] THOMPSON A, SINGH A K, CHANDER Y, et al. Enzyme-linked Immunosorbent assay for ultratrace determination of antibiotics in aqueous samples [J]. Environ. Qual, 2004, 33: 250-256.
[6] FRERE J M, KLEIN D, GHUYSEN J M. Enzymatic Method for rapid and sensitive determination of β -lactam Antibiotics[J]. Antimicrobial. Agents and Chemotherapy, 1980, 18 (4): 506-510.
[7] 赵静玫, 都绛瑛, 张铭俊. 青霉素裂解液的高效液相色谱分析[J]. 色谱, 2001, 19(1): 88-90.
[8] 宋春华. 青霉素裂解液的高效液相色谱分析[J]. 黑龙江医药, 2003, 16(3): 201-202.
[9] 林楠. 乳及乳制品中残留青霉素钾酶解产物检测方法的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008.
[10] NICOLICH R S. Food safety evaluation: detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid-chromatography-tandem mass spectmmetry [J]. Analytica Chimica Acta, 2006, 565(10): 97-102.
[11] 张丽媛, 王颖, 张东杰. IL—HLLME—HPLC 法测定酸奶中磺胺类抗生素[J]. 食品与机械, 2013, 29(6): 71-75.
[12] 李玮, 艾连峰, 郭春海, 等. 高效液相色谱—串联质谱法同时测定牛奶和奶粉中的青霉素类药物及其主要酶解代谢产物[J]. 色谱, 2013, 31(10): 946-953.
[13] 张社利, 许文静. 离子液体萃取技术在样品前处理中的应用研究[J]. 化学试剂, 2012, 34(6): 519-522.
[14] 孙楠, 计建炳, 姬登祥, 等. 咪唑类[PF₆]-型离子液体萃取苯胺[J]. 化工时刊, 2008, 22(11): 1-3.
[15] 褚明杰, 张袖丽, 王磊. 离子液体在萃取和色谱分析技术中的应用[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(14): 5 720-5 723.
[16] 范云场, 张社利. 离子液体在萃取分离中的应用进展[J]. 材料导报, 2011, 25(9): 93-96.
[17] 裴渊超. 离子液体的萃取分离性能及与溶质的相互作用研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2008: 87-94.
[18] 赵洪秋. 离子液体微萃取法在兽药残留检测中的应用[D]. 河北: 河北农业大学, 2013.