

豬肉中青黴素類抗生素殘留同時檢測方法之開發

林金梅 劉敏主 郭美月 林士鈺

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

應用高效液相層析法同時檢測豬肉中青黴素類抗生素 cephalothin、penicillin G、penicillin V、oxacillin、cloxacillin、nafcillin、dicloxacillin 等 7 種，檢測時間約 50 分，可一齊檢出，回收率各平均為 69.8%、72.8%、59.2%、58.7%、56.2%、51.6%、42.7%。

關鍵字：青黴素、同時檢測、高效液相層析法

緒言

青黴素類抗生素會引起人類過敏情形，而動物用藥青黴素類抗生素使用又相當廣泛，基於維護人體及動物健康的重要性，如能開發簡易快速之試驗方法及配合青黴素類抗生素微生物法與 penicillinase 之檢測，則對預防豬肉中青黴素類抗生素殘留方面能達到進一步追蹤確認，實為現行檢測的重要工作之一。世界各國都已有此方面，肉品中青黴素類抗生素殘留同時檢測方法之發表；在日本〔1,4〕，加拿大〔2〕，美國〔3〕，丹麥〔5〕，德國〔6〕，法國〔8〕，還有其他地方〔4,7〕，都已有報告，本實驗即在開發此一方面之檢測方法，以便實地檢測時使用。

材料及方法

試藥

各對照標準品中除 penicillin G sodium (PnG) 為 USP 級，其餘 cephalothin sodium (Cephalo)、penicillin V (PnV)、oxacillin sodium (Oxa)、cloxacillin sodium (Cloxa)、nafcillin sodium (Nafa)、dicloxacillin sodium (Dicloxa) 皆為 Sigma 公司產品。

甲醇、正丁醇、乙醇、乙醚等為 E.Merck 公司產品。

儀器設備及器材

- (1) 褐色玻璃定量瓶 (配製標準劑用)
- (2) 褐色玻璃離心試管 (含蓋子)
- (3) 褐色濃縮瓶
- (4) 均質機：YSTRAL GmbH 7801 Dottingen
- (5) 離心機：Kubota 5100 型
(Hongz, Bankyo-Ka, Tokyo, Japan)
- (6) 減壓濃縮器 Heidolph VV 2011
- (7) 0.45 μ m, nylon 材質過濾膜
- (8) 液相層析儀 (HPLC) Hitachi：幫浦 L-6000 型, 檢測器 L-7420 型, 記錄器 D-7200 型。
- (9) 高效液相層析分離管柱：Phenomenex 5 μ C8 150 \times 4.6 mm 5 μ m 分離管。

1. 標準曲線之建立

- (1) 標準品原液：精取 Cephalo、Oxa、Cloxa、Nafci、Dicloxa 對照標準品各 20mg(力價)，PnG 及 PnV 各 50,000 IU(力價)，各以移動相稀釋成濃度為 200 μ g/mL 與 200 IU/mL。
- (2) 混合標準溶液：量取各標準品原液 1ml 混合再以移動相稀釋使濃度為 Cephalo、Oxa、Cloxa、Nafci、Dicloxa 皆為 10 μ g/mL，PnG 及 PnV 皆為 10 IU/ml; 再將上述溶液稀釋為 5 μ g/mL 與 5 IU/mL; 2.5 μ g/mL 與 2.5 IU/mL; 1.25 μ g/mL 與 1.25 IU/mL; 1 μ g/mL 與

* 抽印本索取作者
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

1 IU/mL ; 0.5 µg/mL 與 0.5 IU/mL; 0.25 µg/mL 與 0.25 IU/mL; 0.125 µg/mL 與 0.125 IU/mL。標準溶液須新鮮配製以免分解成多支波峰。

2. 檢體前處理：

精確稱取經細切之豬肉各 10 g，分別置於 50 mL 褐色玻璃離心瓶中，各分別加入 1 mL 之混合標準溶液，使添加於肉中其含量為 1、0.5、0.25 ppm，每個濃度重複取 3 個樣品做回收率試驗。處理流程為樣品加無水硫酸鈉 3 g，甲醇 24 mL，以均質機均質 1 分鐘，以 3000 rpm 離心 20 分鐘，上清液置入減壓蒸餾瓶中，殘渣同樣操作再以甲醇 25 mL 再處理一次，二次上清液混合加入減壓濃縮蒸餾瓶中，再加入 n-butanol 2 mL 及 ethanol 20 mL，50°C 下減壓濃縮乾涸，殘留物以 3 號緩衝液 10 mL 溶解，再加入 ethylether (乙醚) 10 mL，振盪 10 分鐘，3000 rpm，10 分鐘遠心分離，取水層約 7 mL，0.45µm 過濾入褐色小玻璃瓶，再取 1 mL 置入小支塑膠離心瓶，加入 0.5 mL acetonitrile 飽和之 n-hexane 於 4000 rpm 3 分鐘遠心分離，取下層液經 0.45µm 過濾後，注入 HPLC 分析。

3. HPLC 分析條件

- (1) 移動相：0.01M KH₂PO₄ 以 2N NaOH 調 pH 至 6.5；acetonitrile：methanol(72：18：10)
- (2) 檢測波長：UV 225nm
- (3) 流速：1mL/min
- (4) 注入量：30µl

4. 3 號緩衝液：

KH₂PO₄ 0.7 g、Na₂HPO₄ 0.6 g，精製水 75mL，1 分鐘煮沸溶解，以磷酸調 pH 為 6.0±0.1，再加水至 100mL。

5. 回收率試驗：

取豬肉 10g 3 份，置 50 mL 褐色離心瓶，各別加入 Cephalo、Oxa、Cloxa、Nafci、Dicloxa 皆為 10µg/mL，PnG 及 PnV 皆為 10 IU/ml 之混合標準溶液 1 mL 使添加於肉中其含量為 1、0.5、0.25ppm。依上述檢體前處理方法及分析條件測試回收率。

結果

七種混合青黴素類抗生素標準品溶液 (0.25µg/mL、0.5µg/mL 及 1µg/mL) 依分析條件操作之層析圖，由其滯留時間得知，cephalothin 約在 6 分鐘，penicillin G 約在 7 分鐘，penicillin V 約在 10 分鐘，oxacillin 約在 13 分鐘，cloxacillin 約 22 分鐘，nafcillin 約在 28 分鐘，dicloxacillin 約在 49 分鐘左右(圖 2、3)。

依檢體前處理方法操作，七種青黴素類抗生素添加於肉中，使成 1.0、0.5、0.25、0.125ppm 並於波長 225nm，移動相以 0.01M KH₂PO₄ 以 2N NaOH 調 pH 至 6.5；acetonitrile：methanol(72：18：10) 可得良好之分離效果(圖三、四)線性良好，R 值接近於 1，0.125ppm 時只積分出 5 支波峰，penicillin G 及 dicloxacillin 有波峰但無面積。添加 Cephalo、PnG、PnV、Oxa、Cloxa、Nafci 及 Dicloxa 之檢體回收率介於 40~70%之間(表一)且線性良好(圖 3、5)。

表 1 各種不同濃度添加之回收率及 CV 值

藥名	添加物濃度 ppm					
	1.0		0.5		0.25	
	回收率 %	CV 值	回收率 %	CV 值	回收率 %	CV 值
Cephalo	73.6	5.3	64.8	4.7	71.0	4.9
PnG	76.1	4.6	68.5	4.3	73.8	4.5
PnV	59.3	2.4	59.5	2.4	58.8	2.7
Oxa	60.5	3.3	62.7	3.5	52.9	3.8
Cloxa	58.1	4.6	53.7	4.1	56.8	4.0
Nafci	53.7	2.0	50.4	1.8	50.7	1.5
Dicloxa	45.6	2.9	41.2	2.8	41.3	2.7

討論

本試驗方法，想一次可以同時檢測豬肉中青黴素，但 methicillin 已無生產，而豬肉檢體中，由於豬肉本身的波峰在滯留時間較前面的位置，此會影響到 amoxicillin、ampicillin 及 cephalothin、penicillinG 的檢測，經嘗試降低移動相中之有機相或改變移動相為 25mM KH₂PO₄ pH4.6:MeoH(45：55)或變換其有機相與水相之比率或改變波長為 254nm 檢測，波峰都未比以 0.01M KH₂PO₄(pH6.5)：acetonitrile：methanol(72：18：10)作移動相，225nm 檢測分析結果來得好，波峰不是變小就是豬肉本身干擾波峰也延後出現或波峰變胖甚至減少檢測波

峰數。

另前處理也曾改以用 acetonitrile 代替甲醇抽取，結果並沒有比甲醇好。前處理也曾經以豬肉 5 克，加無水硫酸鈉 3 克，加乙晴及磷酸緩衝溶液(27mL : 3mL)混合之萃取溶液，以均質器將檢體充分均質，均質液移至 50mL 離心瓶中振盪 30 秒，以每分鐘 2000 轉、離心 6 分鐘，吸取上清液於 45°C 水浴槽中減壓濃縮至 2-3mL，蒸發瓶中再以磷酸緩衝溶液反覆溶洗三次，每次 1mL，濃縮液將依次通過 0.45 μ m 濾膜後的濾液，再置入 C₁₈ Sep-pak(使用前依序以甲醇、水及磷酸緩衝溶液做預洗工作)層析匣中，以磷酸緩衝溶液沖 1mL，甲醇 1mL 沖洗，以溶離抑留在管柱中的藥物，收集後 1mL 層析液並於 45°C 下以氮氣吹乾；乾涸之檢體樣本以 0.5mL 乙晴/磷酸緩衝溶液(1 : 19)溶出，並通過中性氧化鋁管柱(使用前依序以甲醇、水及磷酸緩衝溶液做預洗工作)，再陸續加入相同溶液 0.5、1、1 及 1mL(1 : 19)，收集此 4mL 溶液並加以蒸乾後，再加入 1mL 動相溶液，再經 4000rpm 離心 10 分鐘，取上清液供作 HPLC 樣品，所作結果與本試驗原檢體前處理方法結果差異不大。

筆者曾以乙晴抽取振盪 30 分鐘，再重複以乙晴抽取，收集萃取液後加 3 mL 4% NaCl 液於 45°C 下蒸乾，再經 C₁₈ Sep-Pak 使用前依序以甲醇、水、2%NaCl 溶液做預洗工作)處理，再以移動相沖出，結果與本試驗原檢體前處理方法結果，並無較好。

分析管柱也曾用 μ Bondapak C₁₈ 3.9 \times 300 mm 或 Lichrospher 100 RP-18 (5 μ m) Lichrocart 250-4 HPLC-cartridge 也可分析出，但滯留時間較長。

本次試驗嘗試各種分析方法，回收率仍然無法提高，可能是一次同時檢出之關係有待以後大家探討。

參考文獻

1. 劉敏主。青黴素類抗生素 amoxicillin、ampicillin、methicillin、penicillin G、penicillin V、oxacillin、cloxacillin、nafcillin、dicloxacillin 同時分析法。家畜衛生試所藥檢

分所研習動物用藥品品質檢定技術報告書：12，1998。

2. JO Boison and L Keng. Improvement in the multiresidue liquid chromatographic analysis of residues of mono-and dibasic penicillins in bovine muscle tissues J AOAC International 81 (6) : 1267-1272, 1998.
3. Shawky AF. Simultaneous liquid chromatographic analysis of the β -Lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil, cephalixin, ampicillin, and cephradine in solution J AOAC International 81 (2) : 381-385, 1998.
4. Ito Y, Ikai Y, Oka H, Kagami T, Takebak A. Determination of benzylpenicillin, phenoxymethyl penicillin, oxacillin, cloxacillin, nafcillin and dicloxacillin in meat using liquid chromatography with ultraviolet detection. J Chromatogr A 855 (1) : 247-53, 1999.
5. Shawky AF. Simultaneous liquid chromatographic analysis of the β -Lactam antibiotics cefazolin, cefadroxil, cephalixin, ampicillin, and cephradine in solution J AOAC International 81 (2) : 381-385, 1998.
6. Lihl S [HPLC determination of oxacillin, cloxacillin and dicloxacillin in bovine muscle with automated cleanup by on-line solid phase extraction. Z Lebensm Unters Forsch 199 (3) : 229 - 34, 1994.
7. Perez B, Prats C, Castells E, Arboix M. Determination of cloxacillin in milk and blood of dairy cows by high-performance liquid chromatography. J chromatogr B Biomed Sci Appl 698(1-2) : 155-60, 1997.
8. Verdon E. Multiresidue analytical method for the determination of eight penicillin antibiotics in muscle tissue by ion-pair reversed-phase HPLC after precolumn derivatization. J AOAC Int 82 (5) : 1083-95, 1999.
9. Moats WA. Determination of penicillin G and colxacillin residues in beef and Pork tissue by high-performance liquid chromatography, J chromatogr 317 : 311-8, 1984.

Blan

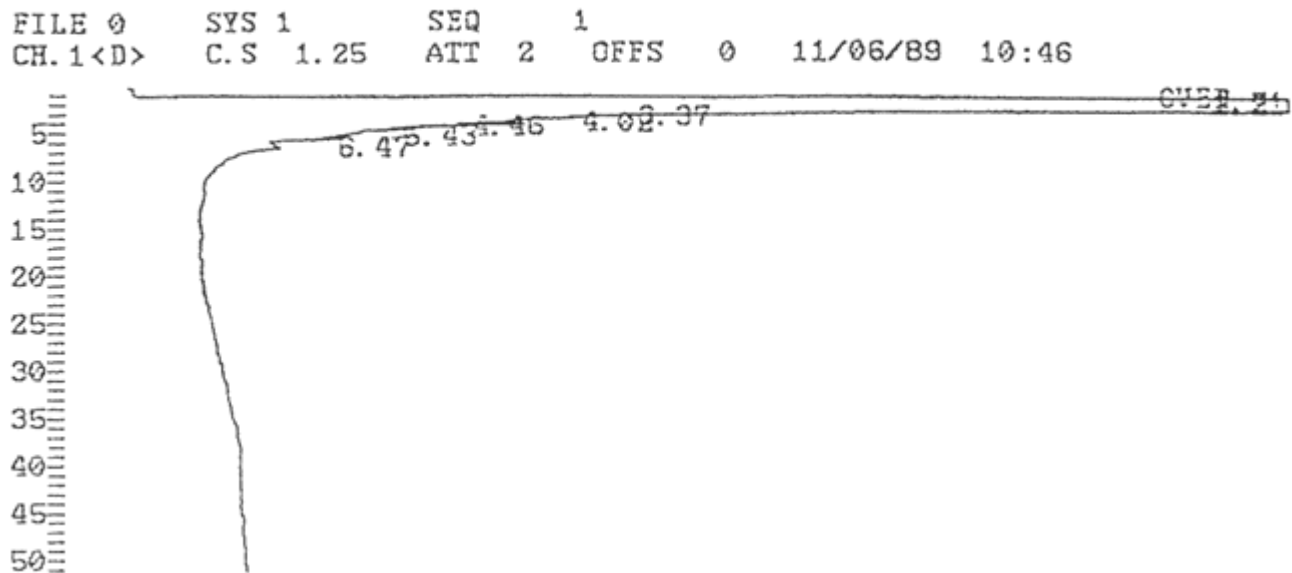
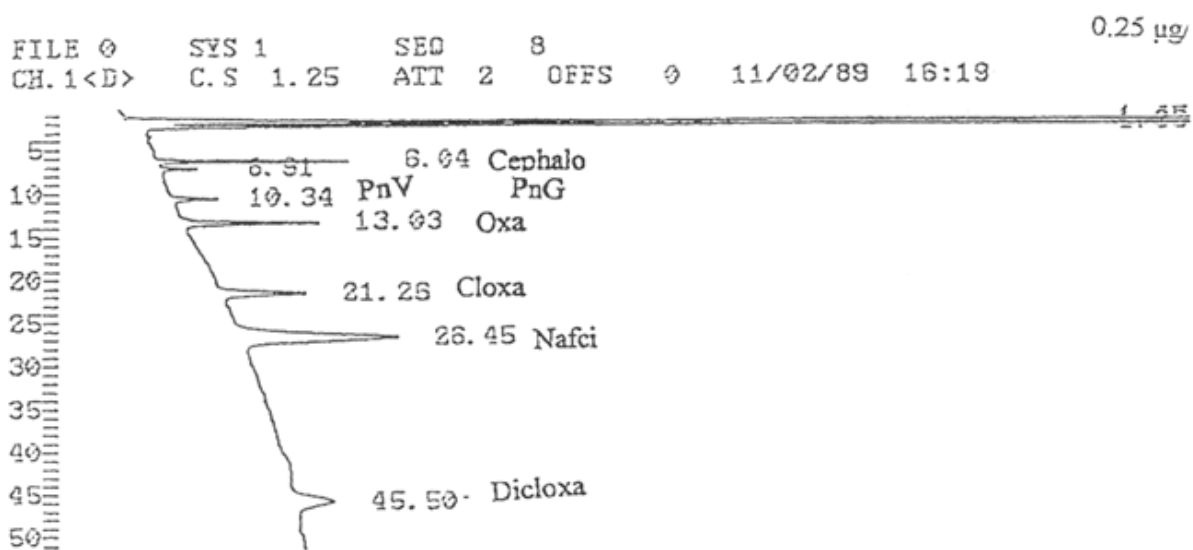


圖 1 豬肉空白試驗之液相層析圖。



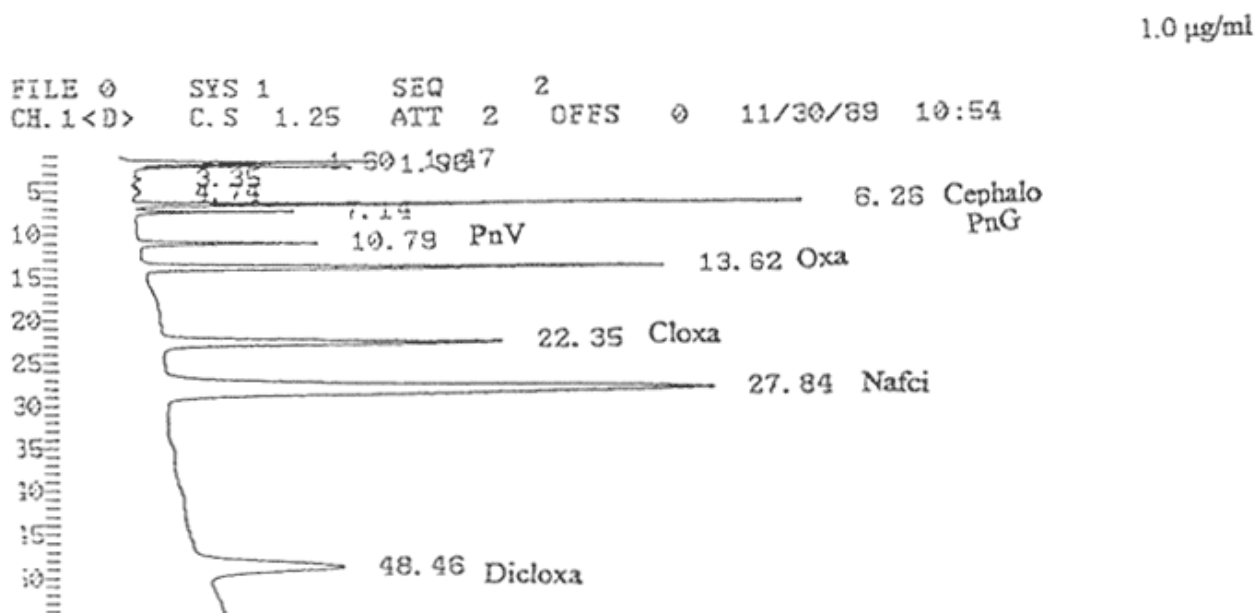
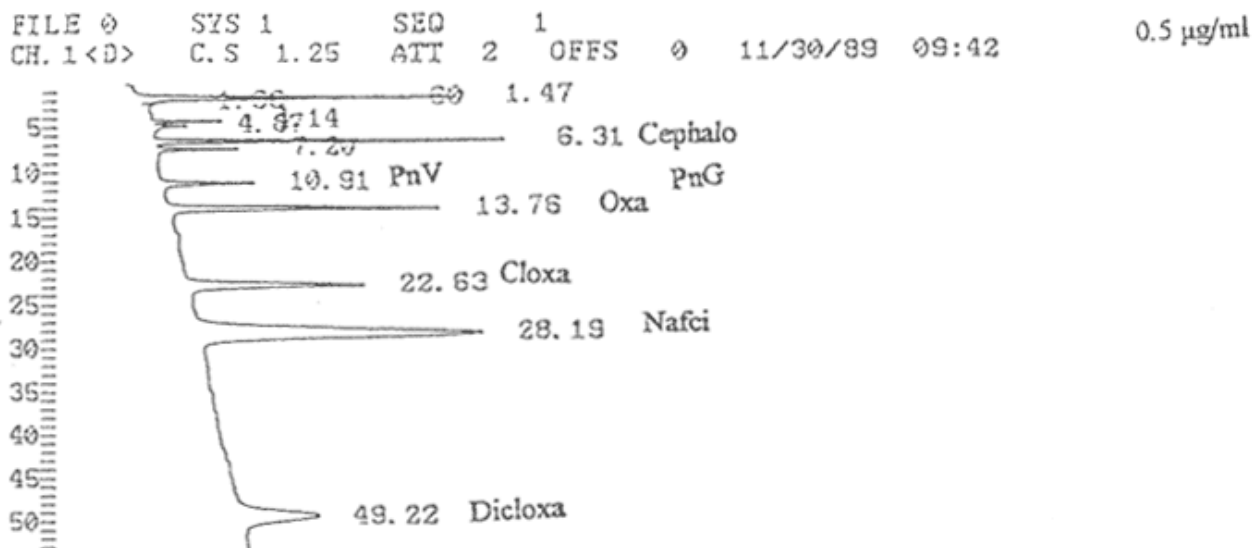
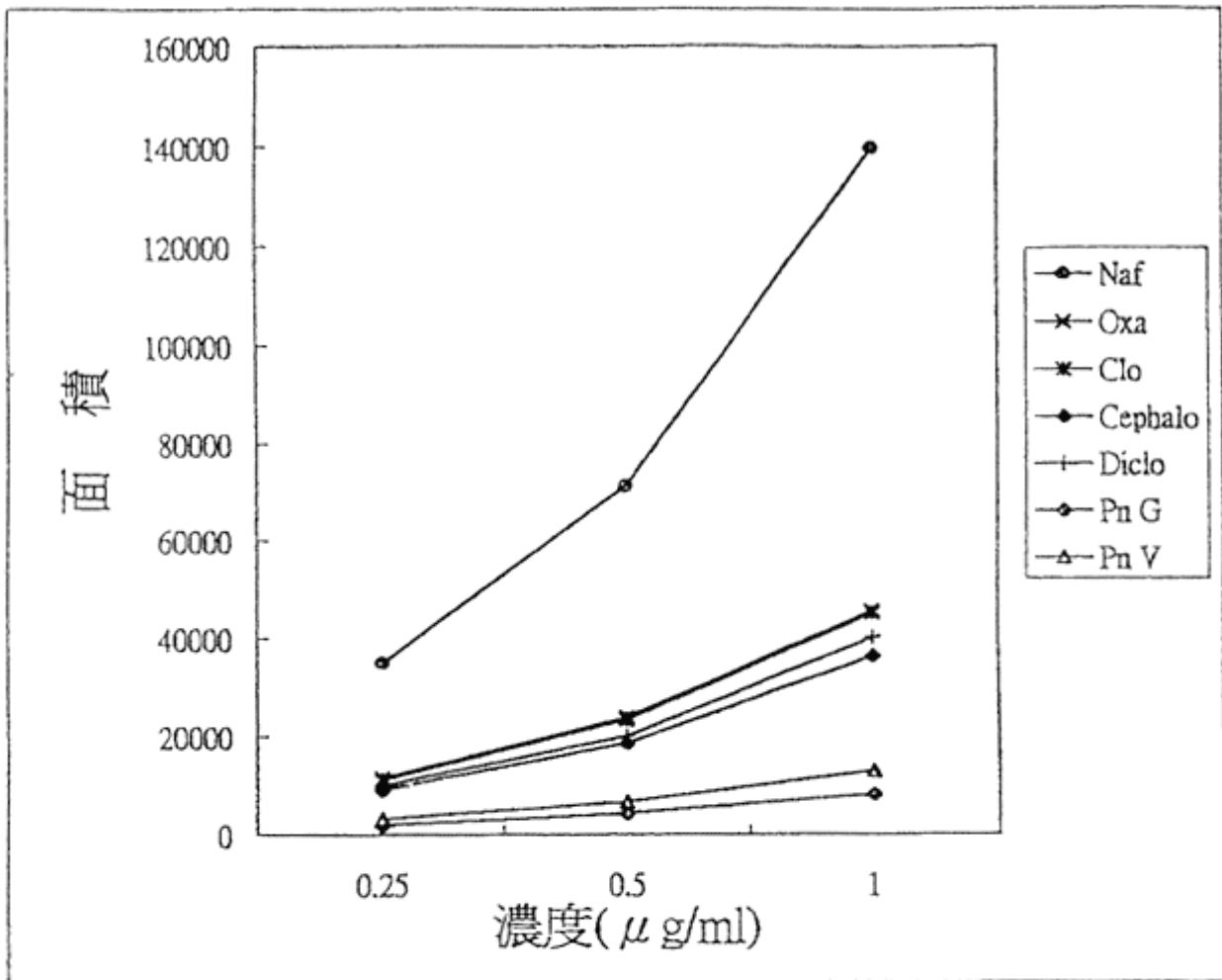


圖 2 七種青黴素類抗生素標準品溶液 1.0µg/mL、0.5µg/mL 及 0.25µg/mL 之層析圖。



Naf $R^2=0.999852$
 $Y=139104.9X+786.5$

Diclo $R^2=0.999994$
 $Y=40274X-53.5$

Oxa $R^2=0.998779$
 $Y=45034.29X+694$

Pn G $R^2=0.999475$
 $Y=8073.714X+51$

Clo $R^2=0.998958$
 $Y=45022.86X+267$

Pn V $R^2=0.999587$
 $Y=12763.43X+33$

Cephalo $R^2=0.999895$
 $Y=36296.29X+141.5$

圖 3 七種青黴素類抗生素標準品溶液 1.0μg/mL、0.5μg/mL 及 0.25μg/mL 之標準曲線圖。

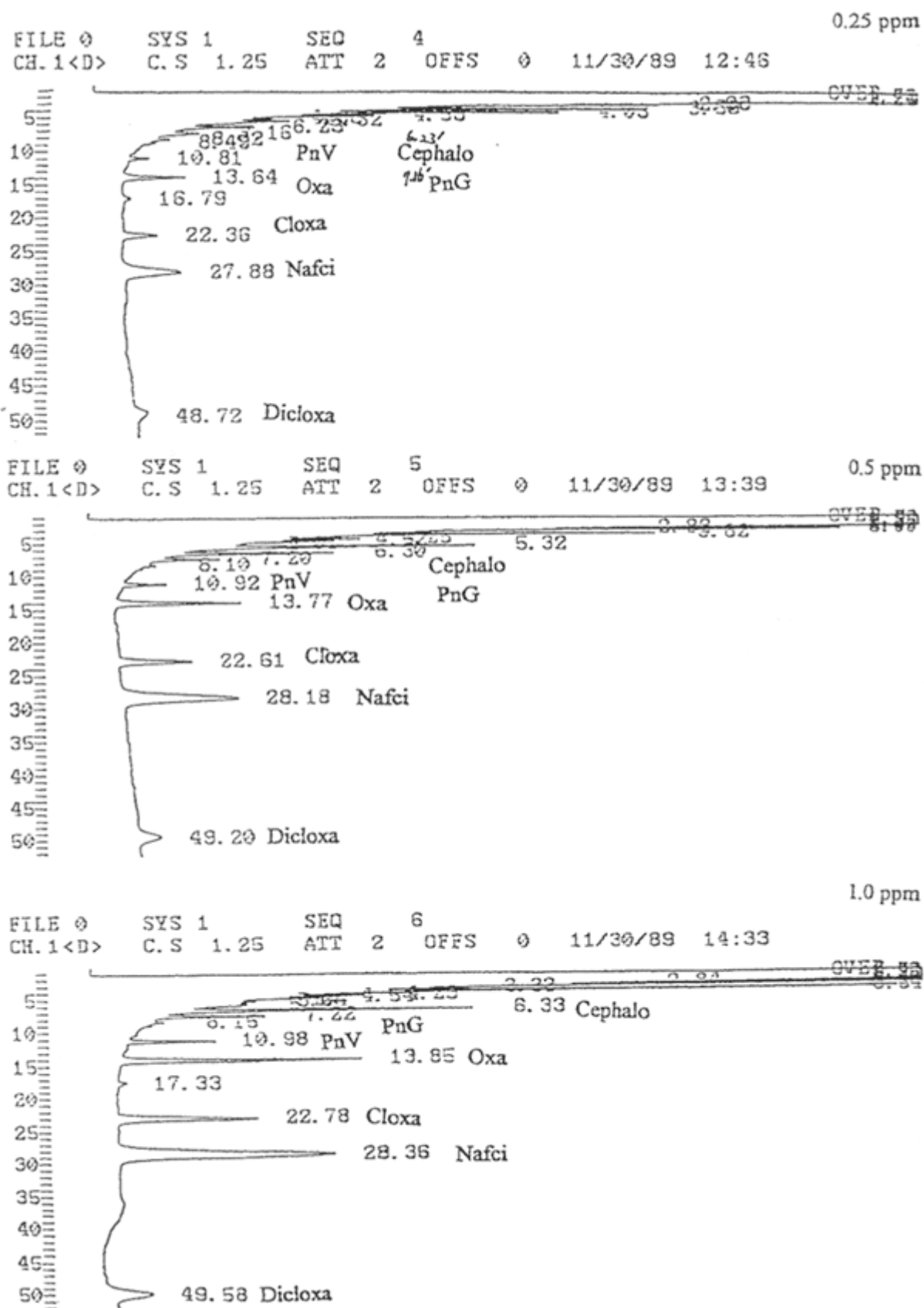
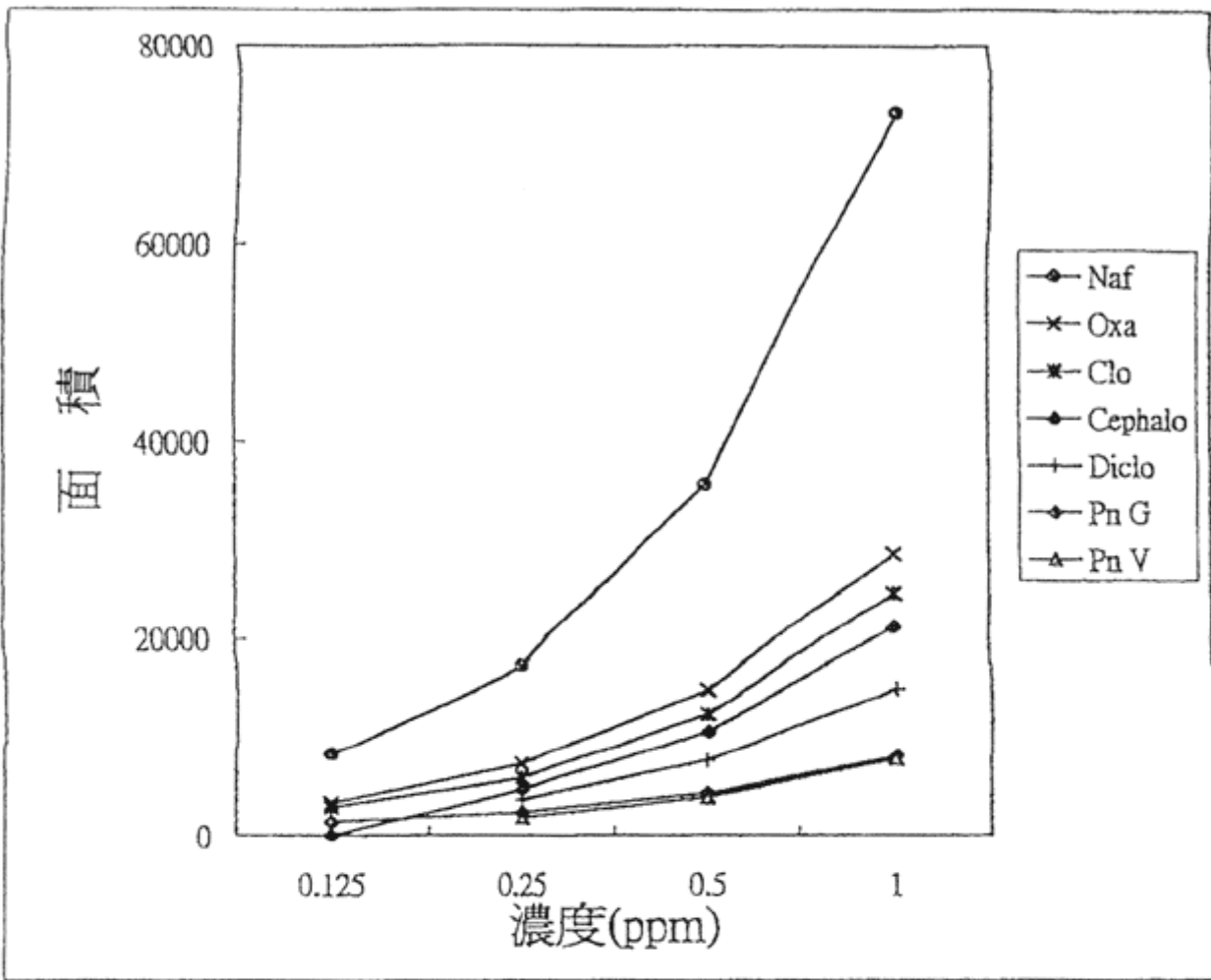


圖 4 豬肉中添加七種青黴素類抗生素 1.0 ppm、0.5 ppm 及 0.25 ppm 之層析圖。



Naf $R^2=0.999915$
 $Y=74437.41X-1239.31$

Diclo $R^2=0.998977$
 $Y=14734.57X+121.5$

Oxa $R^2=0.999146$
 $Y=28802.43X+26.6087$

Pn G $R^2=0.999977$
 $Y=7718.817+387.3043$

Clo $R^2=0.999843$
 $Y=24822.05X-227.087$

Pn V $R^2=0.999942$
 $Y=7910.286X-137$

Cephalo $R^2=0.999579$
 $Y=21917.43X-653.5$

圖 5 豬肉中添加七種青黴素類抗生素 1.0 ppm、0.5 ppm 及 0.25 ppm 之標準曲線圖。

Development and Application of Simultaneous Determination of Seven Penicillins in Meat

Lin, K. M., M. C. Liu, M. Y. Kueo, and S. Y. Lin

The Branch Institute of Animal Drugs Inspection, National Institute for Animal Health,
Council of Agriculture, Executive Yuan

SUMMARY

A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to determine simultaneously seven penicillins, cephalothin, penicillin G, penicillin V, oxacillin, cloxacillin, nafcillin, dicloxacillin, in pork. The HPLC detection time was approximately 50 minutes. The recovery rates were 69.8 %, 72.8 %, 59.2 %, 58.7 %, 56.2 %, 51.6 % and 42.7 %, respectively.

Keywords: Penicillin, High performance liquid chromatography, Simultaneous determination