

高效液相色谱法测定猪肌肉中乙酰甲喹的残留量

张嘉慧, 贺利民, 黄显会, 曾振灵

(农业部畜禽产品质量监督检验测试中心, 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:建立了猪肌肉中乙酰甲喹残留量的高效液相色谱检测方法。试样用双蒸水提取, 三氯乙酸沉淀蛋白质, 经 C_{18} 固相萃取小柱净化, 用高效液相色谱检测。选择甲醇-水(40:60, V:V)为流动相, 流速为 0.7 mL/min, 在 373 nm 波长处检测。该方法检测的乙酰甲喹在 0.040 ~ 2.000 mg/L 范围内线性良好, 相关系数大于 0.999; 在 50、100、400 $\mu\text{g/kg}$ 3 水平加标平均回收率在 71.1% ~ 77.4% 之间, 批内变异系数为 3.8% ~ 5.4%, 批间变异系数为 2.8% ~ 7.4%; 乙酰甲喹在猪肌肉中的检出限达 16 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 50 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词:乙酰甲喹; 残留; 高效液相色谱法; 猪肉

中图分类号:S859.7

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)04-0122-03

Determination of Mequindox Residues in Pork by High Performance Liquid Chromatography

ZHANG Jia-hui, HE Li-min, HUANG Xian-hui, ZENG Zhen-ling

(Animal and Poultry Products Quality Control Inspection and Testing Center (Guangzhou), Ministry of Agriculture, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: A method for the determination of mequindox residues in pork by high performance liquid chromatography (HPLC) is reported. The composite sample was extracted with warm water and trichloro acetic acid, centrifuged, and the supernatant was applied to LC-18 SPE cartridge successively. The drug was eluted from the cartridge with 80% methanol, and the eluate was detected by HPLC with the following conditions: the mobile phase consisted of methanol-deionized water (40:60, V:V), and flowed at a rate of 0.7 mL/min, wavelength of UV detector at 373 nm. The range of linearity was 0.040 - 2.000 mg/L, and relevant coefficient was more than 0.999. Recoveries from pork fortified at 50, 100 and 400 $\mu\text{g/kg}$ were between 71.1% and 77.4%, with all the relative standard deviations of less than 8%, and LOD of the method was 16 $\mu\text{g/kg}$, LOQ of pork was 50 $\mu\text{g/kg}$.

Key words: mequindox; residue; high performance liquid chromatography; pork

乙酰甲喹 (mequindox) 属喹恶啉类药物, 又称痢菌净, 化学名为 3-甲基-2-乙酰基-1,4-二氧喹恶啉, 是我国自行研制的 I 类兽药, 其抗菌作用机理是抑制 DNA 的合成, 对猪密螺旋体型痢疾和牛、猪细菌性肠炎有很好疗效^[1]。自 20 世纪 80 年代以来, 国内外对卡巴氧 (carbadox)、喹乙醇 (olaquinox)、卡西多 (cyadox) 进行了较多的特殊毒理学方面的试验, 有报道显示以上 3 种化合物的致突变实验显阳性结果^[2-3]。国内在对乙酰甲喹的特殊毒理学试验

中, 也得类似结果^[4]。我国市场上的乙酰甲喹产品很多, 应用广泛。但目前我国尚未制定乙酰甲喹在动物食品中的残留限量标准。为此, 本研究讨论了高效液相色谱 (HPLC) 法测定猪肌肉中乙酰甲喹残留的方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100 Series 高效液相色谱仪; 配四元梯

收稿日期: 2008-05-20

作者简介: 张嘉慧 (1970—), 女, 助理研究员, 硕士; 通讯作者: 曾振灵 (1963—), 男, 教授, 博士, E-mail: zlzeng@scau.edu.cn

基金项目: 国家科技攻关计划子课题 (2002BA906A75-01)

度泵、紫外检测器、自动进样器、脱气机、柱温箱及色谱工作站(美国 Agilent 公司);FJ-200 高速分散均匀机(上海标本模型厂);HS259B 振荡器(德国 IKA 公司);OA-SYS 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司);UNIVERSAL-16 高速离心机(德国 Hettich 公司)。

试剂:质量浓度为 15% 的三氯乙酸溶液;体积分数分别为 5%、40% 及 80% 的甲醇溶液。所用三氯乙酸为分析纯,甲醇为色谱纯。乙酰甲嗪对照品:质量分数为 99.7%,批号 H070904,购自中国兽药监察所。

1.2 标准溶液配制

乙酰甲嗪标准储备溶液:准确称取 50.0 mg 乙酰甲嗪对照品,用甲醇定容至 50.0 mL,即成 1 000 mg/L 的标准储备液,置 4 ℃ 冰箱中保存。

乙酰甲嗪标准工作液:准确量取适量的乙酰甲嗪标准储备液,用流动相稀释成适宜浓度的标准工作液。

1.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS- C_{18} (250 mm $\times$ 4.6 mm (i. d.), 5 μ m 粒径);流动相为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 40:60$;检测波长为 373 nm;流速为 0.7 mL/min;进样量为 20 μ L。

1.4 样品处理

1.4.1 提取 称取搅碎解冻的猪肉组织 5.00 g 置于 25 mL 离心管中,加入 40 ℃ 双蒸水 15 mL 均质 1 min,振荡 15 min,加入质量分数为 15% 三氯乙酸 5 mL,振荡 10 min,以 10 000 r/min 离心 15 min,取上清液备用。

1.4.2 净化 安装好 LC-18 (1 000 mg, 6 mL) 固相萃取小柱,依次用甲醇 6 mL、水 6 mL 活化,吸取全部上清液过固相萃取柱,依次用水 12 mL、体积分数为 5% 甲醇 6 mL 洗涤。在溶剂流过固相萃取柱后,保持抽气(或 1 000 r/min)5 min,使柱中液体逐渐枯竭。用体积分数为 80% 的甲醇溶液洗脱,弃去前 0.5 mL 洗脱液,收集洗脱液 2 mL。洗脱液进行高效液相色谱分析。

2 结果与分析

2.1 方法的选择性

在选定的色谱条件下,乙酰甲嗪的保留时间为 6.9 min 左右,空白猪肉与空白猪肉添加乙酰甲嗪的色谱图比较表明,猪肉中内源性物质对样品测定无干扰。见图 1。

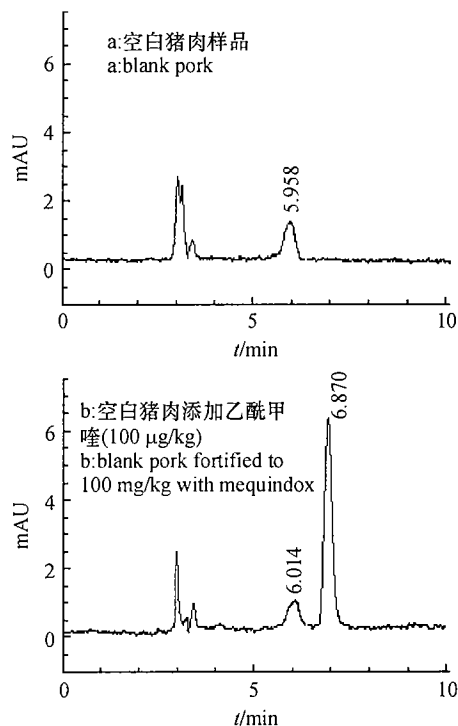


图1 空白猪肉样品与空白猪肉添加乙酰甲嗪(100 μ g/kg)提取液色谱图

Fig. 1 Chromatograms of the extract from blank pork and blank pork fortified to 100 μ g/kg with mequindox

2.2 线性范围

用流动相将标准储备液稀释成乙酰甲嗪质量浓度分别为 0、0.040、0.125、0.250、0.500、1.000、1.500、2.000 mg/L 的标准溶液,按上述色谱条件进行分析。将测得的乙酰甲嗪色谱峰面积(A)与相对应的药物浓度(C)进行直线回归,求得标准曲线回归方程 $C = 9.335A + 1.732$,相关系数 $r^2 = 0.9998$ 。试验表明,在上述色谱条件下,乙酰甲嗪在 0.040 ~ 2.000 mg/L 的范围内呈良好线性。

2.3 回收率与精密度

取空白猪肉 5 g,进行 50、100 及 400 μ g/kg 3 个水平的乙酰甲嗪添加回收试验,每个水平设 5 个平行($n = 5$)。日间精密度每日测定 1 次,连续测定 3 d,结果见表 1。

表1 乙酰甲嗪的回收率和精密度
Tab. 1 Recovery and precision of mequindox

^{14}C 乙酰甲嗪 mequindox /(μ g $\cdot$ kg $^{-1}$)	回收率 mean recoveries/%	日内精密度 RSD of intra-day/%	日间精密度 RSD of inter-day/%
50	74.1	5.4	5.6
100	71.1	3.8	2.8
400	77.4	5.0	7.4

2.4 灵敏度检测

通过样品加标试验,以 3 倍信噪比(S/N)计算检测限(LOD),10 倍 S/N 计算定量限(LOQ),猪肉中

乙酰甲喹 LOD 为 16 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 为 50 $\mu\text{g/kg}$.

3 讨论

3.1 预处理方法的选择

因为乙酰甲喹的化学结构与喹乙醇相似,本试验参照了喹乙醇在动物肉中的提取方法^[5-8]. 喹乙醇在样品中的提取方法大致分为 2 种:一种是用有机溶剂提取;另一种是用盐溶液提取,然后再用有机溶剂反萃取,该方法过程繁琐,检出限高,不能满足微量分析要求. 试验中,用甲醇、乙酸乙酯、丙酮、乙腈、饱和硫酸铵溶液作为提取剂,但都存在杂质干扰多,或回收率低等缺点,因此没被采用. 根据乙酰甲喹在水中的溶解度随温度的升高而增大的特点,经过研究和试验,采用温水直接提取的方法,能有效地把乙酰甲喹从肉中提取出来. 但水温过高,杂质干扰很大,通过试验,选择 40 $^{\circ}\text{C}$ 双蒸水提取较合适. 再用三氯乙酸沉淀蛋白,再经 LC-18 固相萃取小柱净化,洗脱液进行高效液相色谱分析. 结果表明,本方法中采用的样品前处理方法,检测结果对组织内源性物质和其他药物具有选择性,不出现干扰现象.

3.2 吸收波长的选择

取乙酰甲喹对照品适量,溶于体积分数为 40% 的甲醇溶液,对其进行紫外光谱扫描. 溶液在 254、373 nm 波长处均有吸收峰,空白猪肉在 254 nm 波长处有强干扰,所以取干扰少但也有较强吸收的 373 nm.

3.3 色谱条件的选择

分别选择乙腈-水、甲醇-水为流动相^[5-10],对样品进行分离试验. 结果表明,甲醇-水分离体系优于乙腈-水,所以选择甲醇-水为分离乙酰甲喹的流动相. 试验证明,当甲醇和水的体积比为 40:60、流动相流速为 0.7 mL/min 时,乙酰甲喹的峰形对称、尖锐,且与样品本底有良好的分离.

4 结论

本研究建立了灵敏、准确、高效的 HPLC 测定猪肉中乙酰甲喹的残留量方法,检测的乙酰甲喹在 0.040 ~ 2.000 mg/L 范围内线性良好,相关系数 >0.999 ;乙酰甲喹在猪肌肉中的检出限达 16 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 50 $\mu\text{g/kg}$.

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药规范:第一部[M]. 北京:农业出版社,1992:1-2.
- [2] YOSHIMURA H. Teratogenic assessment of carbadox in rats[J]. Toxicology Letters, 2002, 129:115-118.
- [3] HAO Li-hua, CHEN Qian, XIAO Xi-long. Molecular mechanism of mutagenesis induced by olaquindox using a shuttle vector PSP 189/mammalian cell system[J]. Mutation Research, 2006, 599:21-25.
- [4] 张平,焦万台,丁慎双,等. 种鸡喂服痢菌净引起鸡胚死亡[J]. 中国家禽,1994,4(4):40.
- [5] 白琦,王之盛. 高效液相色谱仪测定喹乙醇在鱼组织中的残留方法[J]. 四川畜牧兽医,2001,28(5):21-24.
- [6] 白琦,王之盛. 喹乙醇在鱼饲料和鲤鱼组织中的残留量[J]. 水产科学,2001,20(6):22-23.
- [7] 朱柱振. 喹乙醇在鸡体内的药物动力学及组织浓度研究[J]. 畜牧兽医学报,1993,24(3):259-264.
- [8] 孙永学,冯洪辉,董漓波,等. 喹乙醇在鸡体内的毒物动力学及其生化毒性和病理学研究[J]. 畜牧兽医学报,1998,29(6):525-530.
- [9] 张锦红,刘勇. 应用高效液相色谱法检测喹乙醇含量的研究进展[J]. 中国动物保健,2004(7):15-16.
- [10] 曾振灵,董漓波,陈杖榴. 喹乙醇在鸡组织的消除及残留研究[J]. 畜牧兽医学报,1995,26(4):327-333.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 121 页)

var. *lineaifolium* S. L. Chen in Acta Phytotax. Sin. 18 (4): 489. 1980, et in Fl. Reip. Pop. Sin.: 10 (2): 94. 1997, et in Fl. China, 22: 590. 2006.

Guangdong: Shenzhen, Fairy Lake Botanical Garden, altitude 40 m, ridge of farmland, 1989-10-20, Wang Ding-yue (D. Y. Wang) 89278 (SZG).

Distribution: Sichuan, Yunnan, and Guangxi^[1-2]. And it is the new record of Guangdong.

References:

- [1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae Agendae

Academice Sinicae. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: 10: 1/2[M]. Beijing: Science Press, 1990: 365. (in Chinese)

- [2] CHEN Shou-liang, LI De-zhu, ZHU Guang-hua, et al. Flora of China: Vol. 22: Poaceae [M]. Beijing: Science Press, 2006: 518-590.
- [3] YE Hua-gu, XING Fu-wu, CHEN Hai-shan, et al. Checklist of Guangdong Plants [M]. Guangzhou: Guangdong World Publishing Corporation, 2005: 441-451. (in Chinese)

【责任编辑 李晓丹】