

鲟鱼肌肉中氢溴酸常山酮残留检测的高效液相色谱法

侯亚莉^{1,2}, 汤明¹, 郭利敏¹, 双阳², 江海洋², 沈建忠²

(1. 重庆市畜产品质量监督检验测试中心, 重庆 405400 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

[收稿日期] 2006-01-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2006)05-0015-04 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了检测鲟鱼肌肉中常山酮残留的高效液相色谱法。样品经胰蛋白酶酶解, 乙酸乙酯提取, 再用 0.125 mol/L 的醋酸铵缓冲液分离, 经 Oasis HLB 柱净化, 以乙腈-乙酸铵缓冲液-水为流动相 (含 0.1% 三乙胺), 反相液相色谱-紫外检测法检测, 检测波长 243 nm, 添加浓度为 20、50、100 和 200 $\mu\text{g/kg}$ 时, 回收率分别为 67.5%、77.4%、77.5% 和 71.6%, 变异系数分别为 15.6%、12.4%、0.4% 和 1.2%。方法检测限为 15 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。

[关键词] HPLC; 氢溴酸常山酮; 鲟鱼肌肉; 残留

常山酮 (结构见图 1) 是一种广谱抗寄生虫药^[1,2], 对鸡的柔嫩、毒害、堆型、变位、巨型、布氏艾美耳球虫均有效, 对球虫的子孢子、第一代和第二代裂殖体均有明显的抑杀作用; 对大多数革兰氏阳性菌也有效, 且无交叉耐药性。常山酮氢溴酸盐作为一种饲料添加剂广泛用于防治家禽的球虫病。在我国, 氢溴酸常山酮被允许以 3 mg/kg 的浓度添加在饲料里, 其休药期为 4 d^[3]。许多国家建立了常山酮的残留检测方法并对其残留限量作了规定。我国规定常山酮在牛肌肉、皮、脂、肝、肾组织中的最高残留限量分别为 10、25、30、30 $\mu\text{g/kg}$, 在鸡、火鸡的肌肉、皮、脂、肝组织中的最高残留限量分别为 100、100、130 $\mu\text{g/kg}$ ^[4]。

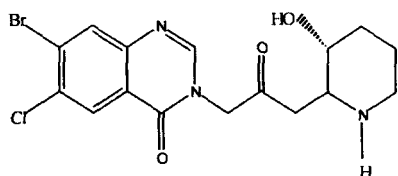


图 1 常山酮化学结构式

常山酮经家禽消化后, 在肠道被大量吸收, 广

泛代谢, 并由粪便和胆汁排泄^[5-7]。根据鸡的肠道消化特点, 鸡粪中含有大量未被消化的饲料。在我国广西、贵州等地区, 常把鸡粪作为鱼饲料来饲养鱼, 出现鱼大面积中毒事件。人如果误食因常山酮中毒死亡的鱼肉, 会出现身体不适等中毒症状。为此, 需要有一种既灵敏又精确的方法测定鱼组织中常山酮的残留量, 以确保鱼产品的质量。

目前检测鸡组织中常山酮残留量的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC-UV)^[6,7]、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[8] 和 ELISA 法^[9] 等。但鱼组织中常山酮残留量的检测方法尚未见报道。本试验拟建立鱼组织中常山酮残留检测的 HPLC 方法。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂 Waters 600E 型高效液相色谱仪, 2487 型紫外检测器, 美国 Waters 公司。氢溴酸常山酮对照品, 含量 99.7%, 由法国 Intervet 公司、美国农业部农业研究中心 Ross Beier 博士惠赠。乙腈和甲醇均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为超纯水。

基金项目: 国家科技攻关计划 (2002BA514A-14)

作者简介: 侯亚莉 (1976年~), 女, 硕士, 主要从事兽药残留分析研究。

通讯作者: 沈建忠。Tel 62732803, 62731032 (Fax); Email sjz@cau.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

1.2 色谱条件 色谱柱为 Nova-Pak C₁₈ (300 mm × 3.9 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-乙酸铵 (0.125 mol/L) - 水 (5:3:12 V/V), 含 0.1% 三乙胺; 检测波长 243 nm; 柱温为室温; 流速 1 mL/min; 进样体积 50 μL。

1.3 标准贮备液的配制 精密称取 10.0 mg 氢溴酸常山酮对照品于 10 mL 棕色容量瓶中, 用 0.125 mol/L 乙酸铵溶解, 稀释至刻度, 摇匀, 其浓度为 1 mg/mL, 置 4℃ 冰箱避光保存。

1.4 标准曲线的绘制 分别准确吸取一定量的标准贮备液, 用流动相稀释成 20、50、100、200、500、1 000、2 000 μg/L 的标准工作液, 分别进样 50 μL, 得峰面积。以氢溴酸常山酮质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 采用外标法对样品进行定量。

1.5 样品处理与测定 称取鲟鱼肌肉组织匀浆样品 (2 ± 0.01) g 于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加 5 mL 胰蛋白酶水溶液 (5 mg/mL), 用 10% 的 Na₂CO₃ 溶液调 pH 在 7~8 之间, 40℃ 水浴下酶解 3 h, 取出后冷却至室温, 加 2 mL 10% Na₂CO₃ 溶液, 混匀, 加 10 mL 乙酸乙酯, 涡动 40 s 在冰水混合物中静置 3 min, 立即以 2 000 r/min 离心 2 min, 将上清液转入另一个洁净的离心管中; 再向组织酶解液中加入 10 mL 乙酸乙酯, 重复提取 1 次, 合并乙酸乙酯相。乙酸乙酯提取液中加 5 mL 0.125 mol/L 乙酸铵缓冲液, 涡动 1 min 在冰水混合物中静置 3 min, 立即以 2 000 r/min 离心 2 min, 收集水相; 再用 5 mL 0.125 mol/L 乙酸铵溶液重复提取 1 次, 合并水相。水提取液中加入 5 mL 正己烷, 轻微振摇 20 s 除去多余的乙酸乙酯, 弃去正己烷层。

依次用 3 mL 甲醇、3 mL 超纯水和 3 mL 0.125 mol/L 乙酸铵缓冲液平衡 Oasis 柱, 将上述提取液过柱, 用 3 mL 0.9% 氯化钠溶液洗涤, 用 3 mL 甲醇洗脱, 在 40℃ N₂ 气流下吹干; 加入 1 mL 流动相溶解, 涡动, 过 0.25 μm 微孔滤膜, 用 HPLC 测定。

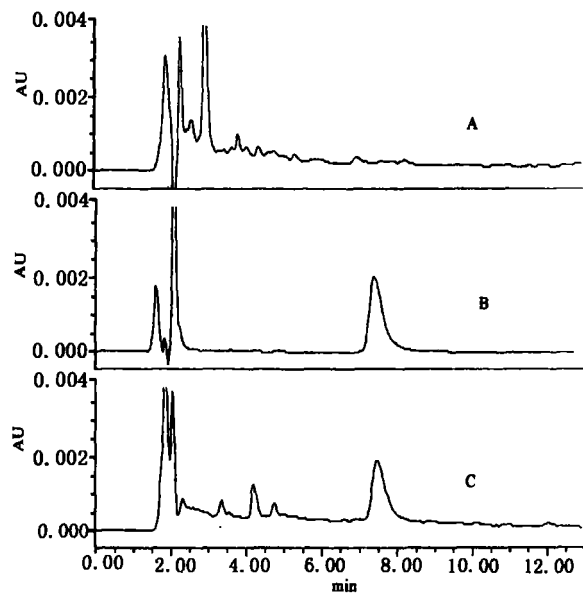
1.6 回收率测定 称取空白组织匀浆 2.0 g 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入适量的氢溴酸常山酮标准液, 使组织中药物浓度分别为 20、50、100 和 200 μg/kg, 混匀后静置 20 min, 按照 1.5 项下的方法进行处理和测定, 根据测得量与添加量计算回收率。

2 结果

2.1 标准曲线 在 20~2 000 μg/L 范围内, 色谱峰面积与药物的质量浓度呈线性关系, 其线性回归

方程为 $y = 281.35x - 434.57$ 相关系数 $R^2 = 0.9999$ 其线性响应范围满足兽药残留检测要求, 证实了该方法定量测定的可靠性。

2.2 回收率 氢溴酸常山酮标准溶液、空白鲟鱼肌肉组织提取液和添加样品提取液的色谱图见图 2。添加回收率及变异系数见表 2。用该方法测定鲟鱼肌肉组织中氢溴酸常山酮残留的检测限为 15 μg/kg (3 倍基线噪音)。



A. 空白组织提取液; B 标准溶液 (100 μg/L);
C 添加氢溴酸常山酮的样品 (50 μg/kg) 提取液

图 2 氢溴酸常山酮标准溶液及样品提取液的高效液相色谱图

表 2 HPLC 法测定鲟鱼肌肉组织中氢溴酸常山酮残留的回收率 (n = 4)

添加浓度 $I/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	实测浓度 $I/(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率 /%	CV /%
20	13.5 ± 2.1	67.5	15.6
50	38.7 ± 4.8	77.4	12.4
100	77.5 ± 0.3	77.5	0.4
200	143.2 ± 1.7	71.6	1.2

3 讨论

目前, 国外采用反相高效液相色谱法检测动物组织中常山酮残留使用较多的流动相是乙腈-乙酸铵 (0.125 mol/L) - 水 (5:3:12 V/V), 用冰醋酸调 pH 值为 4.3^[6]。笔者使用该流动相时, 常山酮的保留时间长且峰很宽, 对称性不佳。改用不调 pH 值, 1 000 mL 流动相加 1 mL 三乙胺时, 峰形改善, 得到保留时间适宜的对称峰, 分离效果良好。

最终确定流动相为乙腈-乙酸铵 (0.125 mol/L) - 水 (5:3:12 V/V), 用冰醋酸调 pH 值为 4.3^[6]。

水(5:3:12 *V/V*), 含 0.1% 的三乙胺。

常山酮与组织的结合力较强, 通常与组织中的蛋白质等形成螯合物, 需要先通过酶解使药物释放出来, 常用的酶有葡萄糖醛酸酶、胰蛋白酶^[10-11]。本试验采用胰蛋白酶酶解组织, 使常山酮完全游离出来。由于常山酮属于喹唑啉类生物碱化合物, 在强碱或高温条件下容易降解^[12], 同时要考虑胰蛋白酶的最适 pH, 在酶解时 pH 值需要严格控制在 7~8 之间, 温度 40℃, 防止常山酮的降解。

常山酮呈弱碱性, 在提取的过程中, 组织溶液被酶解后, 加入 2 mL 10% 的 Na_2CO_3 溶液使常山酮以分子状态存在。由于常山酮易溶于有机溶剂, 因此, 常山酮能够完全被乙酸乙酯提取。但常山酮在碱性条件下易降解, 为防止发生降解, 用乙酸乙酯两次提取的时间不易过长。试验发现两次提取时间间隔在 15 min 之内不会影响分析结果。

为了防止乙酸乙酯对分析方法的干扰, 文献一般采用旋转蒸发的方法除去乙酸乙酯^[8-9], 本试验采用正己烷除去乙酸乙酯, 简化了试验操作过程。

采用 SPE 净化样品时, 本试验先用 Bond Elut C_{18} 用水洗涤, 结果发现回收率很低。后采用 Oasis HLB 柱, 用 0.9% NaCl 溶液洗涤, 再以甲醇洗脱, 得到较高的回收率, 试验的重现性良好。

参考文献:

- [1] McDougall R. "Control of Coccidiosis: Chemotherapy" in *Coccidiosis of Man and Domestic Animals* [M]. CRC Press: Boca Raton, 1990: 307-320.
- [2] Kennedy M. Jr. *Coccidiosis in chickens*. Alberta Agriculture and Rural Development: Edmonton, Alberta, 1996.
- [3] Sundbø SF, Riviere JE & Craigill AL. *Food Animal Residue*

Avoidance Databank Trade Name File [Z] // *A Comprehensive Compendium of Food Animal Drugs*. 8th Ed. University of Florida: Gainesville, FL, 1992.

- [4] 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]. 2002.
- [5] Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a Request from the Commission on the Reevaluation of Coccidiostat Sienoro I in Accordance with Article 9G of Council Directive 70/524/EEC [J]. *The EFSA Journal* 2003, 8: 1-45.
- [6] USDA FSIS. Science and Technology. Analytical Chemistry Laboratory Guide Book. Residue Chemistry. Washington, 1991.
- [7] Yamamoto Y, Kondo E. Determination of Halofuginone and Ampromium in Chicken Muscle and Egg by Liquid Chromatography [J]. *JAOAC Int* 2001, 84: 43.
- [8] Parise RA, Spanow BR, Merrill JW, *et al*. Liquid Chromatography-electrospray Tandem Mass Spectrometric Assay Suitable for Quantitation of Halofuginone in Plasma [J]. *J Chromatogr B* 2004, 810: 35-40.
- [9] Beier RC, Dutko TJ, Buckley SA, *et al*. Detection of Halofuginone Residues in Chicken Liver Tissues by HPLC and a Monoclonal Immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46: 1049-1054.
- [10] Anderson A, Goodall E, Bliss GW. Analysis of the Anticoccidial Drug Halofuginone in Chicken Tissue and Chicken Feed Using High Performance Liquid Chromatography [J]. *J Chromatogr* 1981, 212: 347-355.
- [11] 曹莹, 黄士新, 沈富林, 等. 高效液相色谱法测定鸡肝组织中的氢溴酸常山酮残留 [J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(4): 11-13.
- [12] Anderson A, Christophers DH, Woodhouse RN. Analysis of the Anticoccidial Drug Halofuginone in Chicken Feed Using Gas Liquid Chromatography [J]. *J Chromatogr* 1979, 168: 471-480.

Determination of Halofuginone Residues in Sturgeon Muscle by HPLC

HOU Ya-Li¹, TANG Ming¹, GUO Liming¹, DENG Shuang-yang², JIANG Haiyang², SHEN Jian-zhong²

(1 College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

2 Chongqing Animal Products Quality Inspection & Testing Center, Chongqing 405400)

Abstract A high performance liquid chromatography (HPLC) method had been developed to determine halofuginone in sturgeon muscle. Halofuginone was extracted from trypsin-digested tissues as a free base into ethyl acetate and partitioned into ammonium acetate buffer, purified by Oasis HLB cartridges, separated by HPLC and measured by ultraviolet detector at 243 nm with acetonitrile-ammonium acetic buffer-water (containing 0.1% triethylamine) as the mobile phase. Fortified halofuginone at 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/kg}$ in sturgeon muscle, the

recovery was 67.5%, 77.4%, 77.5% and 71.6% with variation coefficient of 15.6%, 12.4%, 0.4% and 1.2% respectively. The limit of detection was 15 µg/kg the limit of quantification was 20 µg/kg.

Key words HPLC; halofuginone; sturgeon muscle; residue

兽医药品与科学发展高层论坛在青岛隆重召开

由中国畜牧兽医学会动物药品学分会主办, 山东省畜牧办公室和山东省兽药监察所承办的“中国畜牧兽医学会动物药品学分会第三届全国会员代表大会暨 2006 学术年会和兽医药品与科学发展论坛”于 2006 年 4 月 16~18 日在青岛隆重召开, 动物药品学界业界的高层领导、专家、学者、企业家、知名人士和广大科技工作者云聚一堂, 围绕“兽医药品与科学发展”这一主题, 共同探讨学界、业界、产业和学会的发展问题。

农业部兽医局李长友副局长、防疫处王长江处长、药政处耿玉亭处长; 中国兽医药品监察所王泰健所长、高光副所长; 山东省畜牧办公室刘炳谭副主任、戴文超处长、鲍霞副处长; 山东省兽药监察所高迎春所长、邵兵副所长、刘光茂副所长; 青岛市兽医局孙德胜局长、孙丕峰副局长、刘玉航处长; 中国畜牧兽医学会阎汉平秘书长、朱延永副秘书长、李传业主任; 动物药品学分会第二届理事会杨心瑞副理事长兼秘书长、赵荣材、刘建、沈建忠、杨松沛等副理事长, 新一届理事会候选人, 以及来自全国各省、市、自治区的兽医行政管理部门、兽药监察所、大专院校、科研院所、企事业单位等各方面的领导、专家和会员代表共三百多人出席了大会。

开幕式由第二届副理事长杨心瑞主持, 刘炳谭副主任、阎汉平秘书长、李长友副局长、王泰健所长、耿玉亭处长、孙德胜局长分别致辞, 青岛易邦生物工程有限公司陈洪亮总经理代表企业致辞。

会议成功的进行了理事会换届, 选举理事 206 人、常务理事 83 人、理事会领导班子 11 人。新一届理事会理事长: 高光; 副理事长: 张春新、沈建忠、杨松沛、高迎春、杨志强、潘春刚、赵彦岭、蒋公建、陈贵才; 秘书长: 朱明文; 副秘书长: 薛飞群、毕昊容、欧阳林山。

杨心瑞副理事长代表第二届理事会作了工作报告, 回顾了学会在推进兽医药品事业和学术交流、学会发展建设等方面做出的成绩。第三届理事

会高光理事长代表新一届理事会作了“发挥学会作用, 推进动物药品行业健康发展”的重要讲话, 科学客观地分析了动物药品业的现状和发展趋势, 提出了推进和发展动物药品业的“三点”建议, 学会要发挥好“四项”职能作用, 重点是做好“五个方面”的工作, 将尽职尽责、自律自强, 积极努力工作, 充分相信和依靠理事会和会员, 努力办好学会, 为国家、社会和广大会员服务。

第三届理事会为表彰杨心瑞、赵荣材对学会工作所做出的积极贡献, 特颁发了“特别贡献奖”奖杯和证书。为鼓励科学研究和学术交流, 特评选出 6 篇优秀论文, 颁发了“易邦杯”奖杯和证书, 另有 25 篇论文获“易邦杯”优秀论文提名。

会议特别邀请了王长江、崔治中、沈建忠、李泰兴、杨志强、曾中良、陈贵才、董义春、徐士新、郭筱华、陈光华等知名专家、学者和官员, 以及王祝伟、蒋宏健、潘峰云、顾琦等仪器设备专家和部分优秀论文作者, 在会上作了主题报告和学术技术交流等, 其内容涉猎广泛, 有动物疫病形势、防控政策、动物疾病研究、药物研究、畜产品安全、残留检测、国内外动物药品市场趋势分析、监督管理和兽药国家标准及检测新技术等。

会议分别由杨心瑞、杨松沛、沈建忠、张春新、杨志强、赵彦岭、高迎春和潘春刚主持, 开幕式隆重热烈, 致辞讲话热情洋溢、高瞻精辟; 主题报告博古通今、融贯中西, 聚焦热点、释疑解惑; 专题技术交流内容广博精深, 显示出此次会议是兽医药品业界难得一见的高水平的学术会。

会议主办方为大会主编出版了论文集, 承办方以《合作经济》杂志为大会编辑出版了 2006 年兽药特刊。为表彰承办单位成功筹办本届大会, 会议特设“组织特别奖”授予山东省兽药监察所。

在与会代表和有关方面的共同努力下, 大会取得了圆满成功。