

文章编号:1006-6144(2008)06-0673-04

反相离子对液相色谱法测定欧洲鳗鲡体中丙硫咪唑及其代谢物的残留量

于慧娟*, 惠芸华, 黄冬梅, 顾润润, 王媛

(中国水产科学研究院东海水产研究所, 渔业环境与水产品加工实验室, 上海 200090)

摘要:建立了鳗鲡体中丙硫咪唑及其代谢物残留量测定方法。样品用乙腈提取, 经正己烷净化后, 液相色谱-荧光法测定, 标准加入法定量。流动相为: 甲醇、乙腈和乙酸铵, 梯度洗脱。检测波长为: 激发波长 290 nm, 发射波长 320 nm, 丙硫咪唑、2-氨基丙硫咪唑砒、丙硫咪唑亚砒、丙硫咪唑砒检出限依次为: 25、5、10、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。回收率大于 95%, 相对标准偏差小于 8%。

关键词:反相离子对液相色谱; 欧洲鳗鲡; 丙硫咪唑; 代谢物; 残留

中图分类号: O657.7⁺2

文献标识码: A

丙硫咪唑即丙硫苯咪唑 (Albendazole), 又名阿苯达唑、抗蠕敏, 是苯并咪唑类药物, 其化学名称为 5-丙硫基苯丙咪唑-2-氨基甲酸甲酯。该药为高效、广谱驱虫药, 对肝虫、吸虫、绦虫和胃肠道线虫均有显著药效。据文献报道, 丙硫咪唑在动物体中很快代谢成丙硫咪唑亚砒, 再由丙硫咪唑亚砒代谢成丙硫咪唑砒, 最终代谢为 2-氨基丙硫咪唑砒。由于丙硫咪唑是治疗线虫和绦虫的首选药物, 因此使用比较频繁, 很容易造成动物组织的残留, 危害人体健康。因此为了食品安全的需要, 欧盟和我国均规定丙硫咪唑及代谢物的总和在动物体中的最大残留量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 为满足欧盟和我国药残监控的要求, 建立同时测定丙硫咪唑和三种代谢物的方法已是当务之急。

目前国内外对丙硫咪唑及代谢物的研究主要集中在动物血浆中, 而关于动物组织和水产品中丙硫咪唑及代谢物的残留分析报导甚少。在这些研究中由于测定的重点不同, 使每一种方法都有其局限性, 不能完全满足国内外药残监控的要求。在 4 种被测物中, 文献[1]中的方法只能测定三种代谢物, 文献[2]、[3]中的方法只测定丙硫咪唑母体, 还有的方法只测定丙硫咪唑和其中的两个代谢物^[4-8]或 1 个代谢物^[9]。本文研究了用液相色谱-荧光检测器同时测定鳗鲡鱼体中丙硫咪唑和三种代谢物残留量的方法。该方法简单、快速、准确度高、重现性好, 完全满足欧盟药残检测的要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪, 配有荧光检测器; 旋转蒸发仪 (上海亚荣生化仪器厂); 离心机 (上海湘仪离心机厂)。

丙硫咪唑标准品 (Albendazol, ABZ)、丙硫咪唑砒标准品 (Albendazol sulfone, ABZ-SO₂)、丙硫咪唑亚砒标准品 (Albendazol sulfoxide, ABZ-SO) 和 2-氨基丙硫咪唑砒标准品 (Albendazol 2-aminosulfone, ABZ-NH₂): 购于 Dr. Ehrenstorfer GmbH, 纯度 $\geq 98\%$, 分别用甲醇配置成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 储备液。使用前用甲醇-水 (80 + 20) 配制浓度为: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2-氨基丙硫咪唑砒, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丙硫咪唑亚砒, 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丙硫咪

收稿日期: 2008-01-23

修回日期: 2008-03-31

基金项目: 农业部标准制定项目 (No. 169)

*通讯联系人: 于慧娟, 女, 研究员, 主要从事水产品质量安全检测。

唑砜,5.0 μg/mL 丙硫咪唑的混合标准工作液。此溶液 4 避光保存,保存期 1 个月。甲醇、乙酸乙酯为色谱纯(Sigma 公司)。

1.2 基质标准工作液的制备

称取 4 个阴性样品,每个样品 2 g(精确至 0.01 g)置于 50 mL 离心管中,分别加入 10 μL、25 μL、100 μL 和 200 μL 的混合标准工作液,放置 30 min,使其充分渗透。加入 15 mL 乙腈,均质 30 s,震荡 5 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液倒入 100 mL 梨形瓶中,残渣备用。另取 50 mL 离心管加入 15 mL 乙腈,清洗均质机 30 s,将此液倒入上述残渣中震荡提取 5 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液合并至 100 mL 梨形瓶中,于 35 ℃减压蒸干,加入 1 mL 甲醇-水(80+20)溶解残渣。

将上述溶液移入 10 mL 离心管中,加入 1 mL 正己烷,震荡 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,去除正己烷层,再加入 1 mL 正己烷,按上法重复操作。下层溶液用 0.45 μm 滤膜过滤,用做定量标样,供液相色谱分析。

1.3 待测样品溶液的制备

称取待测样品 2 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,除不加标准溶液外,按 1.2 的方法操作。

1.4 色谱条件

色谱柱:Agilent SB-C18 柱(150 ×4.6 mm),流速:1.0 mL/min,柱温:30 ℃,波长:激发波长 290 nm,发射波长 320 nm。流动相:甲醇 乙腈 0.05 mol/L 乙酸铵=8 10 82(V/V/V),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

Time (min)	Acetonitrile (%)	Methanol (%)	0.05 mol/L Ammonium acetate(%)
0.00	10	8	82
30.0	40	17	43
30.1	10	8	82
35.0	10	8	82

2 结果和讨论

2.1 提取剂的选择

为了最大效率地将水产品中残留的丙硫咪唑及其代谢物提取出来,先后比较了乙酸乙酯、乙腈和甲醇三种提取剂对水产品中丙硫咪唑及其代谢物的提取效果。试验结果表明乙腈提取效率高,杂质干扰少。

2.2 样品净化方法的优化

本试验采用正己烷-液萃取的方法对提取液进行去脂净化,以去除提取液中脂肪等杂质。丙硫咪唑与代谢物 2-氨基丙硫咪唑砜性质差别较大,丙硫咪唑属脂溶性物质,在正己烷中有一定的溶解度,而 2-氨基丙硫咪唑砜属水溶物质,在有机溶剂中溶解性不好,所以在净化时如对被萃取液选择不当,就会使丙硫咪唑或 2-氨基丙硫咪唑砜在净化时产生损失,影响丙硫咪唑及代谢物的回收率,导致准确度下降。为最大效率的去脂并保证丙硫咪唑及代谢物最小的损失率,对不同比例的甲醇-水进行考察,通过测定甲醇-水中丙硫咪唑及代谢物的剩余量,确定最佳的甲醇-水配比。具体方法为:取 1 mL 不同比例的甲醇-水,分别加入 20 ng 2-氨基丙硫咪唑砜,20 ng 丙硫咪唑砜,20 ng 丙硫咪唑亚砜和 60 ng 丙硫咪唑,混合均匀,然后用 1 mL 正己烷进行液-液萃取(萃取 2 次),弃掉正己烷层,用液相色谱分析甲醇-水溶液中丙硫咪唑及代谢物的量,并计算回收率,回收率测定结果见表 2。从表 2 确定最佳的甲醇-水的比例为 80:20。

2.3 定量方法的研究

经大量的试验得知:丙硫咪唑母体不稳定,在蒸发、浓缩过程中发生分解,部分转变成丙硫咪唑亚砜,丙硫咪唑亚砜又会部分转变成丙硫咪唑砜,因此采用外标法定量时丙硫咪唑回收率较低,而代谢物丙硫咪唑亚砜和丙硫咪唑砜回收率则很高,通常超百,因此严重影响了丙硫咪唑及代谢物定量的准确性。为解决此问题,采用标准加入法对丙硫咪唑及代谢物进行定量,以提高定量的准确性,消除由于丙硫咪唑分解对定量产生的影响。标准加入法即为将一定量的丙硫咪唑及代谢物标样加入到阴性样品中,使其参与样品

表 2 丙硫咪唑及代谢物在甲醇-水中的回收率

Methanol-Water (V/V)	Recovery (%)			
	ABZ	ABZ-SO ₂	ABZ-SO	ABZ-NH ₂
40 60	59.7 %	78.5 %	84.5 %	83.5 %
80 20	94.5 %	84.0 %	86.5 %	87.5 %
100 0	98.2 %	76.0 %	84.0 %	67.0 %

的前处理过程 ,然后用此做标样对被测物进行定量分析。

2.4 液相色谱分析条件的研究

本试验采用 Agilent SB-C18 为色谱分离柱 ,用不同的流动相对丙硫咪唑及其代谢物进行分离 ,实验结果显示 :甲醇、乙腈和乙酸铵三元混合体系为最佳分离体系 ,由于丙硫咪唑同 2-氨基丙硫咪唑砒的性质差别较大 ,采用等度洗脱 ,丙硫咪唑出峰较晚 ,在保证有很好的分离效果前提下 ,运行一个样品大约需要 1 小时 ,为缩短分析时间 ,经优化确定采用梯度洗脱的方式进行分析。洗脱程序见表 1 ,标样分离谱图见图 1。

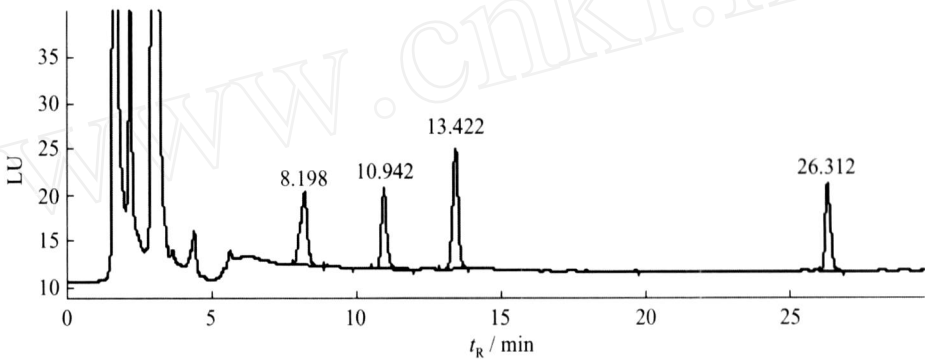


图 1 丙硫咪唑及代谢物色谱分离谱图

Fig.1 Chromatogram of albendazol and its metabolites standard
8.19 min:ABZ-NH₂,10.94 min:ABZ-SO,13.42 min:ABZ-SO₂,26.31 min:ABZ.

2.5 方法回收率和精密度

以阴性欧洲鳗鲡为测试对象 ,进行不同浓度加标试验和精密度试验 ,以考察方法的准确性和稳定性。试验中丙硫咪唑及代谢物的加标水平分别为 2-氨基丙硫咪唑砒 :5、25 和 100 μg/ kg ,丙硫咪唑亚砒 :10、50 和 200 μg/ kg ,丙硫咪唑砒 :1、5 和 20 μg/ kg ,丙硫咪唑 :25、125 和 500 μg/ kg。每个水平做 6 次 ,实验结果表明 :无论何种被测物 ,加标回收率均大于 95 % ,相对标准偏差 < 8 %。方法准确度和精密度均满足分析检测的要求。

2.6 方法检出限及线性范围

本方法经实际加标测得方法检出限为 :2-氨基丙硫咪唑砒 :5 μg/ kg ,丙硫咪唑 :25 μg/ kg ,丙硫咪唑亚砒 :10 μg/ kg ,丙硫咪唑砒 :1 μg/ kg ;在此浓度下丙硫咪唑及代谢物信号明显 ,信噪比大于 5 ,回收率大于 95 %。

将丙硫咪唑及代谢物配制成不同浓度 ,以被测物的峰面积为纵坐标 (Y) ,浓度为横坐标 (X) ,绘制标准曲线 ,丙硫咪唑及代谢物的线性范围及回归方程见表 3。

表 3 丙硫咪唑及代谢物的线性范围及回归方程

Component	Linear ranges (μg/ mL)	Rgression equations
ABZ-NH ₂	0.005 ~ 1	Y = 63.54 X - 0.0832
ABZ-SO	0.01 ~ 2	Y = 15.93 X - 0.0032
ABZ-SO ₂	0.001 ~ 0.2	Y = 450.43 X - 0.078
ABZ	0.025 ~ 5	Y = 8.16 X - 0.0037

参考文献:

[1] Fletouris Dimitrios J ,Papapnagiotou Elias P ,Nakos Dimitrios S J. Agric. Food Chem. [J] ,2005 ,53(4) :893.

[2] SN0207-93 Method for Determination of Albendazole residues in Meat for Export (出口肉中丙硫咪唑残留量测定方法) [S].

[3] YANG Fang (杨 方) ,LI Yao-ping (李耀平) ,LI Xiao-jing (李水晶) . Chinese Journal of Health Laboratory Technology (中国卫生检验杂志) [J] ,2004 ,14(5) :526.

[4] FAN Sheng-xian (范盛先) ,HUANG Ling-li (黄铃利) ,YUAN Zong-hui (袁宗辉) ,CHEN Pin (陈品) ,QIU Yin-sheng (丘银生) . Scientia Agricultura Sinica (中国农业科学) [J] ,2004 ,37(8) :1229.

[5] ZENG Zhen-ling (曾振灵) ,CHEN Zheng-liu (陈杖榴) ,YUAN Zong-hui (袁宗辉) . Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志) [J] ,1990 ,10(4) :202.

[6] WU Zimei ,Medlicott Natalie J ,Razzak Majid ,Tucker Ian G. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [J] , 2005 ,39 :225.

[7] Kitzman Dennis ,Cheng Kuei-Ju ,Fleckenstein Lawrence. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis [J] ,2002 , 30 :801.

[8] XIAO Zhao-peng (肖昭彭) ,LUO Xue-nong (骆学农) ,CAI Xue-peng (才学鹏) ,WANG Pei-ya (王佩亚) ,CHEN Juan (陈 娟) . Analysis and Testing Technology and Instruments (分析测试技术与技术) [J] ,1997 ,3(4) :250.

[9] Al-Kurdi Z ,Al-Jallad T ,Badwan A. TALANTA [J] ,1999 ,50 :1089.

Determination of Albendazol and Its Metabolite Residue
in European Eel by RP- Ion- Pair Liquid Chromatography

YU Hui-juan * , HUI Yun-hua , HUANG Dong-mei ,
GU Run-run , WANG Yuan

(East China Sea Fisheries Research Institute Chinese Academy of Fishery Sciences ,Laboratory of
Fishery Environments and Aquatic Products Processing , Shanghai 200090)

Abstract : An analytical method were developed for the determination of residues of albendazol and its metabolites in fishery products by using ion-pair liquid chromatography. The sample were extracted with acetonitrile followed by a clean-up with n-hexane. The quantification was performed using standard addition method. The mobile phase for gradient elution were methanol , acetonitrile and ammonium acetate , and detection wavelengths were 290 nm for the excitation and 320 nm for the emission. The detection limits for albendazol , albendazol 2-aminosulfone , albendazol sulfoxide and albendazol sulfone were 25 , 5 , 10 and 1 μg/ kg , respectively with the recoveries more than 95 % and the RSD less than 8 %.

Keywords : High performance liquid chromatography ; European eel ; Albendazol ; Metabolites ; Residue