

# 鸡、兔组织中氯苯胍残留的检测方法研究

周昭明, 曾 勇, 金秀娥

(湖北省兽药监察所, 湖北武汉 430064)

[收稿日期] 2004-04-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2005)03-0019-04 [中图分类号] S859.84

**[摘 要]** 研究了用高效液相色谱法(HPLC)检测鸡、兔组织中氯苯胍残留量的方法。用乙酸乙酯提取后离心, 上清液减压旋转蒸干, 用正己烷溶解残渣后过弗罗里硅土固相萃取柱净化, 10% 丙酮甲醇溶液洗脱, 洗脱液蒸干后用甲醇溶解残渣并定容。HPLC 条件: 紫外检测器, 检测波长 353 nm, 外标法定量。线性范围在 5~500 ng/mL, 回归方程为  $C = 139.75A - 190.1Q$ ,  $r = 0.9999$ , 回收率为 70%~110%, 批内变异系数小于 15%, 批间变异系数小于 20%; 本方法的最低定量限为 10 ng/g。

**[关键词]** 氯苯胍; 残留; 鸡组织; 兔组织; 高效液相色谱

氯苯胍(Robenidine)是一种抗原虫药, 主要用于畜禽球虫病, 添加于饲料中预防和治疗鸡、兔急性、慢性球虫病。但在兽医临床中如不正确使用氯苯胍, 就有可能造成该药物在动物组织中残留, 最终危害人类的身体健康。农业部 2002 年第 235 号公告规定了氯苯胍在各种动物性食品中的最高残留限量<sup>[1]</sup>, 但目前国内的相关残留检测方法还没有确立, 国外报道的有关氯苯胍残留检测方法也比较少。本研究旨在建立一种简单、快速、可靠的检测动物组织中氯苯胍残留的方法。

## 1 材料和方法

1.1 仪器和设备 高效液相色谱仪: Waters 2690 型, 配备四联梯度泵, 2487 紫外检测器, 美国沃特斯公司; 色谱柱 Hypersil C<sub>18</sub>, 250 mm × 4.0 mm (i.d.), 5 μm, 大连依利特公司; 固相萃取小柱, FLORISIL, 安捷伦公司; 分析天平, 感量分别为 0.000 01 g、0.000 1 g 和 0.01 g 组织匀浆机; 离心机; 旋转蒸发仪; HY-5 型振荡器; TDL-40B 离心机。

## 1.2 试剂与溶液

1.2.1 对照品与试剂 盐酸氯苯胍对照品, 纯度 99.8%, 批号 H010499, 由中国兽医药品监察所提供。磷酸、三乙胺、磷酸二氢钾、丙酮均为分析纯, 甲醇、乙腈为色谱纯(进口分装)。水为去离子水。

1.2.2 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 取磷酸二氢

钾 6.8 g 加去离子水溶解并稀释至 1 000 mL。

1.2.3 盐酸氯苯胍标准储备液 准确称取盐酸氯苯胍对照品 10 mg 用甲醇溶解并稀释成浓度为 100 μg/mL 的储备液, 置 2~8 °C 冰箱中保存, 有效期半个月。

1.2.4 盐酸氯苯胍标准工作液 准确量取适量盐酸氯苯胍标准储备液, 用甲醇稀释成适宜浓度的标准工作溶液。

1.2.5 绘制标准曲线用工作液 准确量取适量盐酸氯苯胍标准工作液, 用流动相稀释成浓度分别为 5、10、20、50、100、200、500 ng/mL 的盐酸氯苯胍标准溶液。

1.3 色谱条件 色谱柱见 1.1 项下, 柱温为室温; 检测波长 353 nm, 流动相为乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺(2:1:0.1), 用 0.45 μm 微孔有机相滤膜过滤; 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μL。

1.4 标准曲线的绘制 将标准曲线用工作液从低浓度到高浓度依次注入液相色谱仪, 按 1.3 项下的色谱条件进行分析。每一浓度进 3 针, 按其所得峰面积的平均值与对应的浓度作标准曲线图, 并计算回归方程及相关系数。

## 1.5 组织样品的提取和净化

1.5.1 提取 称取(5±0.05) g 组织样品, 置 50 mL 离心管中, 加乙酸乙酯 20 mL, 10 000 r/min 匀浆

1 min, 用 5 mL 乙酸乙酯冲洗刀头, 洗液接入离心管中。涡旋 3 min, 振荡混合 10 min, 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液转入茄形瓶中, 用 15 mL 乙酸乙酯将沉淀物重复提取一次, 合并上清液于同一茄形瓶中, 40 ℃ 减压浓缩近干。用 10 mL 正己烷溶解残渣, 作为备用液。

1.5.2 净化 依次用 2 mL 含 10% 丙酮的甲醇溶液和 2 mL 正己烷润洗 FLORISIL 固相萃取小柱, 润洗完毕后, 取备用液过柱, 用 2 mL 正己烷洗茄形瓶, 过柱, 挤干。加 5 mL 10% 丙酮甲醇溶液洗脱, 挤干。洗脱液 40 ℃ 减压蒸干, 精密加入 2 mL 甲醇溶解残渣, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 供高效液相色谱分析。

1.6 回收率及变异系数的测定 取空白组织样品加入盐酸氯苯胍标准液适量, 制得 10、20、50、100 ng/g 组织的 4 个浓度水平的添加试样, 按 1.5 项下方法处理后进行 HPLC 分析。根据峰面积值计算氯苯胍的含量, 以加入量和测得量之比计算回收率。每一浓度做 5 个重复, 共做 3 个批次。分别求出各浓度的批内和批间变异系数 (CV)。

1.7 结果计算 按下式计算试样中盐酸氯苯胍的残留量 (μg/kg):

$$X = \frac{AC_s V}{A_s M}$$

式中:

$X$ ——组织中盐酸氯苯胍的残留量 (ng/g);

$A$ ——试样溶液中盐酸氯苯胍的峰面积;

$A_s$ ——标准工作液中盐酸氯苯胍的峰面积;

$C_s$ ——标准工作液中盐酸氯苯胍的浓度 (ng/mL);

$V$ ——试样溶液体积 (mL);

$M$ ——组织样品的质量 (g)。

## 2 结果

2.1 标准曲线及回归方程 盐酸氯苯胍的标准工作液线性范围在 5~500 ng/mL, 浓度对峰面积的回归方程为  $C = 139.75A - 190.10$  相关系数  $r = 0.9999$ 。标准曲线见图 1, 盐酸氯苯胍标准溶液色谱图见图 2。

2.2 回收率及变异系数 在鸡、兔的肌肉、肝脏和肾脏组织中各添加 4 种不同浓度氯苯胍, 其回收率及变异系数测定结果分别见表 1、表 2。鸡肝、鸡肌肉空白组织添加样品 (10 ng/g) 提取液的色谱图分别见图 3 和图 4。

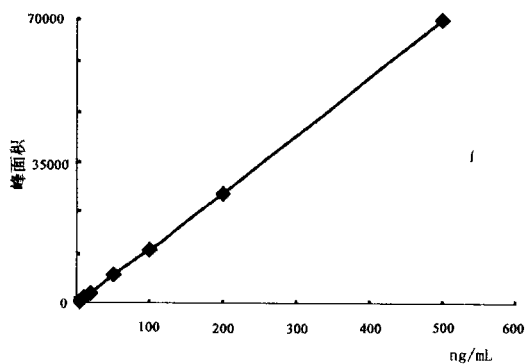


图 1 盐酸氯苯胍标准曲线

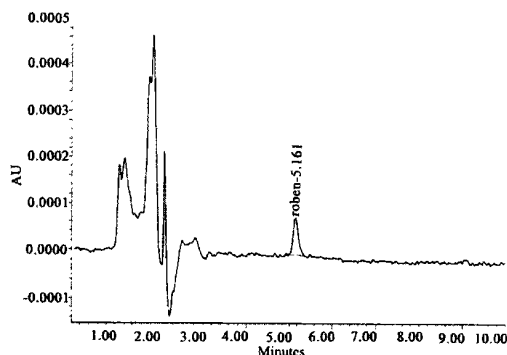


图 2 盐酸氯苯胍标准溶液 (5 ng/mL) 色谱图

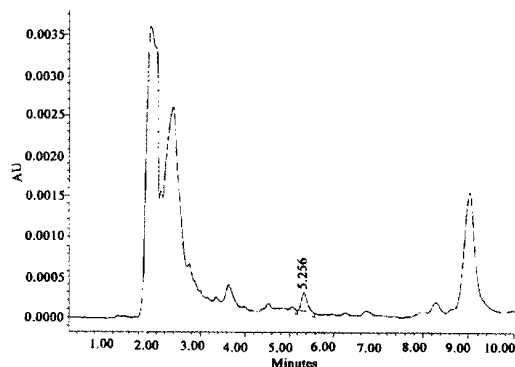


图 3 鸡肝组织提取液 (添加氯苯胍 10 ng/g) 色谱图

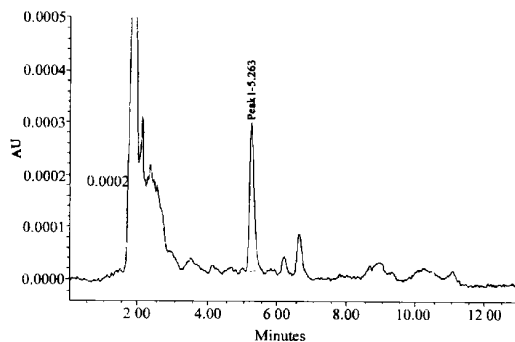


图 4 鸡肌肉组织提取液 (添加氯苯胍 10 ng/g) 色谱图

| 表 1 鸡组织中盐酸氯苯胍回收率测定结果 (n = 5) |                                          |          |                   |                       |                       |
|------------------------------|------------------------------------------|----------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| 组织                           | 添加浓度<br><i>I</i> /(ng· g <sup>-1</sup> ) | 测定<br>批次 | 回收率<br><i>R</i> % | 批内变异<br>系数 <i>R</i> % | 批间变异<br>系数 <i>R</i> % |
| 肌肉                           | 10                                       | 1        | 103. 8±2. 4       | 2. 4                  | 2. 4                  |
|                              |                                          | 2        | 102. 5±1. 8       | 1. 8                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 99. 1±7. 8        | 7. 8                  |                       |
|                              | 20                                       | 1        | 100. 9±6. 8       | 6. 8                  | 6. 2                  |
|                              |                                          | 2        | 91. 7±6. 4        | 6. 4                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 103. 2±4. 7       | 4. 7                  |                       |
|                              | 50                                       | 1        | 98. 5±7. 9        | 7. 9                  | 10. 1                 |
|                              |                                          | 2        | 81. 9±2. 7        | 2. 7                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 97. 6±9. 8        | 9. 8                  |                       |
|                              | 100                                      | 1        | 102. 3±3. 3       | 3. 3                  | 0. 8                  |
|                              |                                          | 2        | 103. 3±1. 4       | 1. 4                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 101. 6±5. 6       | 5. 6                  |                       |
| 肝脏                           | 10                                       | 1        | 73. 6±5. 5        | 5. 5                  | 4. 1                  |
|                              |                                          | 2        | 75. 5±9. 4        | 9. 4                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 79. 7±8. 5        | 8. 5                  |                       |
|                              | 20                                       | 1        | 67. 7±7. 2        | 7. 2                  | 6. 3                  |
|                              |                                          | 2        | 76. 8±5. 4        | 5. 4                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 73. 3±8. 4        | 8. 4                  |                       |
|                              | 50                                       | 1        | 84. 9±7. 8        | 7. 8                  | 4. 6                  |
|                              |                                          | 2        | 78. 5±9. 8        | 9. 8                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 85. 3±8. 9        | 8. 9                  |                       |
|                              | 100                                      | 1        | 83. 3±10. 1       | 10. 1                 | 2. 9                  |
|                              |                                          | 2        | 87. 4±8. 6        | 8. 6                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 87. 9±9. 3        | 9. 3                  |                       |
| 肾脏                           | 10                                       | 1        | 64. 7±5. 8        | 5. 8                  | 7. 9                  |
|                              |                                          | 2        | 75. 2±6. 3        | 6. 3                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 73. 6±8. 9        | 8. 9                  |                       |
|                              | 20                                       | 1        | 70. 2±7. 8        | 7. 8                  | 3. 0                  |
|                              |                                          | 2        | 72. 1±7. 0        | 7. 0                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 67. 9±5. 1        | 5. 1                  |                       |
|                              | 50                                       | 1        | 82. 4±6. 2        | 6. 2                  | 6. 6                  |
|                              |                                          | 2        | 75. 8±5. 4        | 5. 4                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 72. 5±8. 0        | 8. 0                  |                       |
|                              | 100                                      | 1        | 86. 7±6. 7        | 6. 7                  | 5. 9                  |
|                              |                                          | 2        | 82. 3±9. 7        | 9. 7                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 92. 5±5. 1        | 5. 1                  |                       |

| 表 2 兔组织中盐酸氯苯胍回收率测定结果 (n = 5) |                                          |          |                   |                       |                       |
|------------------------------|------------------------------------------|----------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| 组织                           | 添加浓度<br><i>I</i> /(ng· g <sup>-1</sup> ) | 测定<br>批次 | 回收率<br><i>R</i> % | 批内变异<br>系数 <i>R</i> % | 批间变异<br>系数 <i>R</i> % |
| 肌肉                           | 10                                       | 1        | 89. 6±7. 2        | 7. 2                  | 4. 6                  |
|                              |                                          | 2        | 89. 6±5. 2        | 5. 2                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 82. 7±3. 7        | 3. 7                  |                       |
|                              | 20                                       | 1        | 105. 6±3. 2       | 3. 2                  | 6. 1                  |
|                              |                                          | 2        | 96. 9±9. 2        | 9. 2                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 94. 0±9. 7        | 9. 7                  |                       |
|                              | 50                                       | 1        | 83. 4±6. 5        | 6. 5                  | 6. 8                  |
|                              |                                          | 2        | 95. 5±8. 8        | 8. 8                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 91. 0±9. 5        | 9. 5                  |                       |
|                              | 100                                      | 1        | 102. 3±3. 3       | 3. 3                  | 6. 2                  |
|                              |                                          | 2        | 94. 8±6. 3        | 6. 3                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 90. 6±8. 3        | 8. 3                  |                       |
| 肝脏                           | 10                                       | 1        | 71. 4±10. 1       | 10. 1                 | 1. 1                  |
|                              |                                          | 2        | 69. 9±6. 5        | 6. 5                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 70. 8±9. 1        | 9. 1                  |                       |
|                              | 20                                       | 1        | 89. 6±10. 2       | 10. 2                 | 4. 6                  |
|                              |                                          | 2        | 95. 9±8. 2        | 8. 2                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 97. 9±7. 8        | 7. 8                  |                       |
|                              | 50                                       | 1        | 95. 9±9. 2        | 9. 2                  | 16. 6                 |
|                              |                                          | 2        | 103. 3±4. 0       | 4. 0                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 74. 2±6. 9        | 6. 9                  |                       |
|                              | 100                                      | 1        | 102. 0±4. 0       | 4. 0                  | 13. 3                 |
|                              |                                          | 2        | 83. 4±15. 3       | 15. 3                 |                       |
|                              |                                          | 3        | 80. 1±9. 3        | 9. 3                  |                       |
| 肾脏                           | 10                                       | 1        | 74. 7±5. 8        | 5. 8                  | 8. 5                  |
|                              |                                          | 2        | 73. 2±4. 3        | 4. 3                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 63. 6±7. 9        | 7. 9                  |                       |
|                              | 20                                       | 1        | 77. 3±5. 3        | 5. 3                  | 5. 3                  |
|                              |                                          | 2        | 80. 1±6. 2        | 6. 2                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 72. 1±8. 9        | 8. 9                  |                       |
|                              | 50                                       | 1        | 92. 5±7. 7        | 7. 7                  | 7. 9                  |
|                              |                                          | 2        | 80. 1±4. 8        | 4. 8                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 91. 9±3. 3        | 3. 3                  |                       |
|                              | 100                                      | 1        | 86. 7±6. 5        | 6. 5                  | 7. 5                  |
|                              |                                          | 2        | 95. 4±7. 9        | 7. 9                  |                       |
|                              |                                          | 3        | 82. 5±3. 7        | 3. 7                  |                       |

3 结 论

本方法确立的用高效液相色谱法检测鸡、兔组织中氯苯胍残留的检测方法,灵敏度较高,最低检测浓度远远低于氯苯胍在鸡、兔组织中的最高残留限量要求。在样品处理过程中,首先采用液-液萃取的方式去除杂质的效果很好,回收率也高。但液-液萃取的方法对于肝脏样品的处理效果不佳。为使各组织的提取方法一致,经反复试验,最终采用佛罗里硅土萃取柱净化,效果较为理想,检测各种组织中氯苯胍残留均能达到要求:回收率超过 70%,最低检测限为 5 ng/g 最低定量限为 10 ng/g

批内变异系数≤15%,批间变异系数≤20%。

参考文献:

[1] 中华人民共和国农业部第 235号公告. 动物性食品中兽药残留最高限量[S]. 2002

[2] Smith JE, Pasarek NR, Wyckoff JC. Polarographic determination of robenidine residues in chicken tissues, eggs, litter, soil and plant tissue[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1977, 60(6): 1310- 1317.

[3] 饶麦玲,林瑞著,李乾钟,等. 鸡肉及其肉内脏中罗苯噻啉检验方法之探讨及其残留量之调查[J]. Journal of Food and Drug Analysis 1993, 1(1): 97- 105.

## Determination of robenidine residues in chicken and rabbit tissues

ZHOU Zhao-ming ZENG Yong JIN Xiu-e

(Hubei Veterinary Pharmaceutical Supervisory Centre, Wuhan, Hubei 430064, China)

**Abstract** The high-performance liquid chromatography (HPLC) was used for the determination of robenidine residues in chicken and rabbit tissues. The drugs were extracted from tissues with dried ethyl acetate and distilled to dry. An ultraviolet detector was used at the wavelength of 353 nm. The limit of detection was 10 ng/g. A good linear relationship (concentration versus chromatographic peak area of robenidine) was showed between 5~500 ng/mL ( $r=0.9999$ ). Recoveries of robenidine from chicken and rabbit tissues were 70%~110%. RSDs were not more than 20%.

**Key words** robenidine; residue; tissues; HPLC

## 2005年全国农资打假专项治理将全面展开, 兽药专项治理列出重点

农业部于2005年2月25日在京召开全国农资打假专项治理行动新闻通气会, 据悉, 今年全国农资打假专项治理将全面展开, 重点整顿种子、农药、肥料、饲料、兽药5个农资品种, 通过专项治理使种子抽检合格率提高2个百分点以上, 农药产品的标签和质量合格率分别提高5个百分点以上, 饲料产品合格率保持在95%以上, 兽药产品合格率提高到75%以上, 兽药标签符合率达到95%以上, 基本消除假劣农资导致重大、恶性农业生产事故发生。

农资打假专项治理坚持“着力治本、标本兼治、打防结合、综合治理”原则, 从加强源头治理、狠抓市场监管、强化服务指导和加强制度建设四个方面入手, 严把生产、流通和使用三个关口, 上下联动, 打假扶优, 努力推动农资打假工作由重点抓市场检查向抓源头治理和市场检查并重转变、由重点抓案件查处向全程监管和案件查处并重转变、由重点抓打假治劣向抓促进放心农资供应和打假治劣并重转变。

2005年兽药专项治理的重点:

兽药监管工作以查处非法制售兽用生物制品为突破口, 依法取缔兽药非法生产、经营黑窝点, 净化兽药市场; 以严查严办假劣兽药大案要案为关键点, 依法打击制售假劣兽药活动, 维护兽药市场秩序; 以清查禁用兽药为重点, 进一步降低动物性产品中兽药残留检出率; 以推行兽药GMP、兽药GSP管理为措施, 建立兽药市场准入制度。

重点开展查处非法制售疫苗活动, 严厉打击走私进口疫苗活动, 严厉查处无证、无标、无文号疫苗的违法生产、经营行为, 对不具备条件的, 坚决予以取缔; 积极组织实施兽药市场专项治理活动; 集中力量及时依法严厉查处大案要案, 严惩犯罪团伙和首恶分子, 重大典型案件查处结果及时通报社会; 建立完善责任制和层级监督机制, 按照属地管理原则, 对重大案件久拖不办、发案率高的地区, 农业部兽医局将会同检察、司法部门集中力量查办, 严肃追究失职、渎职人员的责任; 加大兽药市场准入制度建设, 全面推行GMP、GSP、GLP、GCP制度, 对不具备条件的, 取消其准入资格; 全面实施生物制品批签发制度, 提高疫苗抽检覆盖率和检测数量, 保证疫苗质量; 围剿清查禁用兽药, 保证动物性食品安全; 规范兽药标签和说明书; 完善兽药质量信息公开机制, 特别对列入黑名单的重点监控企业、违法分子及假劣产品, 及时进行通报, 加大媒体曝光力度; 建立企业诚信制度和产品召回制度; 加强队伍建设, 提高执法能力。

(摘编自中国兽药信息网, <http://www.ivdc.gov.cn>)