

猪鸡组织中左旋咪唑残留的 HPLC 检测方法研究

曾 勇, 金秀娥, 卢 芳, 陈向 丹, 舒金秀

(湖北省兽药监察所, 武汉 430070)

[收稿日期] 2010-03-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2010)08-0017-05 [中图分类号] S859.84

[摘 要] 建立了猪、鸡组织中左旋咪唑残留检测的高效液相色谱法。组织试样在碱性条件下先用乙酸乙酯提取, 然后用 0.1 mol/L 盐酸反萃取, 萃取的样液用混合型阳离子固相萃取小柱净化, 采用 C_{18} (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.) 色谱柱, 用高效液相色谱仪(带紫外检测器)在 220 nm 波长处测定, 外标法定量。在此条件下, 左旋咪唑的保留时间为 12~14 min。左旋咪唑浓度在 10~1 000 μ g/L 时, 与峰面积呈良好的线性关系, 线性方程为 $y = 196.37x + 81.599$ ($r = 0.9999$)。结果表明, 左旋咪唑在猪、鸡的肌肉、脂肪和肾脏中的检测限为 2 μ g/kg, 定量限为 5 μ g/kg; 在猪、鸡的肝脏中的检测限为 2 μ g/kg, 定量限为 10 μ g/kg。在添加不同浓度水平测定下, 平均回收率在 70%~110%, 批内变异系数在 10% 以内, 批间变异系数在 15% 以内。

[关键词] 左旋咪唑; 残留; 高效液相色谱

Study on the Determination of Levamisole Residues in Pig and Chicken Tissues by HPLC

ZENG Yong JIN Xiu-e LU Fang CHEN Xiang-dan, SHU Jin-xiu

(Hubei Institute of Veterinary Drug Control, Wuhan 430070, China)

Abstract High-performance liquid chromatography method was optimized and validated for the determination of levamisole in pig and chicken tissues. A liquid-liquid extraction procedure in alkaline medium, using ethyl acetate as extraction solvent. The ethyl acetate extracts were re-extracted with 0.1 mol/L HCl, then the solution was followed by a solid-phase extraction procedure using an MCX column to clean up. The reconstituted sample was transferred to HPLC system to detect using the C_{18} column (5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.). Retention time of levamisole was 12~14 min. Linearity of the detector response was verified with robenidine standard solution in the range of 10~1 000 μ g/L, the linear regression was $y = 196.37x + 81.599$ ($r = 0.9999$). The quantitative method indicated that the LOD was 2 μ g/kg and the LOQ was 5 μ g/kg in pig's chicken muscle, fat and kidney, the LOD was 2 μ g/kg and the LOQ was 10 μ g/kg in pig's chicken liver. Recoveries of robenidine from spiked samples at different concentrations was between 70%~110%, the RSD for intra- and inter-day data were below 10% and 15%, respectively.

Key words levamisole; residue; HPLC

左旋咪唑 (levamisole, IMS) 是四咪唑的左旋体, 常用其盐酸盐, 是一种高效低毒广谱驱肠虫药

物, 主要用于控制动物胃肠道、肺中的线虫^[1-2]。随着左旋咪唑在养殖业中广泛的应用, 其在动物性

作者简介: 曾 勇 (1973年-), 女, 高级兽医师, 主要从事兽药、饲料和畜禽产品质量安全检测和管理工。E-mail: zengyong633@126.com

食品中的残留问题也日益突出。为保证动物源性产品食用安全性,保障人民群众的身体健 康,加强动物性食品中的左旋咪唑残留的监督和检验工作,建立一种简单快速、灵敏度高的左旋咪唑残留检测方法已是刻不容缓。目前国内关于左旋咪唑的残留检测的方法有气相色谱法^[3],该方法检测组织单一,不适应当前检测要求,本研究建立了检测猪、鸡组织中左旋咪唑残留的高效液相色谱方法,为该药物残留监控提供里一种灵敏、高效、简便的检测技术。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 盐酸左旋咪唑标准品,含量 99.8%,批号 H010105 购自中国兽医药品监察所。Waters2695 高效液相色谱仪(配 2487 型紫外检测器)、分析天平、离心机、电热恒温水浴锅、旋涡混合器、组织匀浆机、氮吹仪、Waters Oasis MCX 混合阳离子固相萃取小柱(3 mL, 60 mg)。二乙胺、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、无水硫酸钠、磷酸、碳酸钠、氨水、乙酸乙酯为分析纯。甲醇、乙腈为色谱纯。

1.2 溶液配制 标准贮备液:精密称取适量的左旋咪唑对照品,用甲醇溶解并定容,配制成 0.2 mg/mL 的贮备液,密封,4~8℃保存。0.02 mol/L NaH_2PO_4 二乙胺缓冲液:3.12 g NaH_2PO_4 加 997 mL 水溶解,加 3 mL 二乙胺混合,用磷酸调 pH 至 7.5。4% 氨水-甲醇混合溶液:氨水 4 mL,加甲醇 96 mL,混匀。碳酸盐缓冲溶液:碳酸氢钠饱和水溶液 90 mL,加 10 mL 碳酸钠饱和水溶液,混匀。

1.3 色谱条件 色谱柱为 Agilent TC-C₁₈ 色谱柱,250 mm × 4.6 mm (i.d.),粒径 5 μm,或相当者;进样量 50 μL;流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钠·二乙胺缓冲液-乙腈(7:3 V/V);流速 1.0 mL/min;检测波长 220 nm。

1.4 标准曲线的绘制 准确量取适量左旋咪唑标准贮备液,用流动相稀释成 10、25、50、100、250、500、1 000 μg/L 的标准工作液,供高效液相色谱分析。以左旋咪唑的峰面积为纵坐标,以左旋咪唑浓度为横坐标,绘制标准曲线,拟合,求标准曲线方程和相关系数。

1.5 样品前处理

1.5.1 提取 称取匀浆组织(5 ± 0.05) g 于 50 mL 离心管中,加入 5 g 无水硫酸钠,搅拌均匀后加 1 mL 碳酸盐缓冲液,加 15 mL 乙酸乙酯,漩涡 2 min 混匀,5 000 r/min 离心 5 min 吸取上层有机层于离心管中,在残渣中再加 15 mL 乙酸乙酯重复提

取一次。合并两次提取液。在乙酸乙酯提取液中加入 0.1 mol/L 盐酸 10 mL,振摇 5 min,静置,分取下层,按上述同样条件重复萃取一次,合并两次萃取液,作为备用液。

1.5.2 净化 MCX 柱依次用 3 mL 甲醇、3 mL 0.1 mol/L 盐酸活化,取 1.5.1 中备用液过柱,弃去流出液,依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗柱子,抽干,用 3 mL 4% 氨水甲醇溶液洗脱,收集洗脱液。洗脱液于 40℃ 下氮气吹干,用 1.0 mL 流动相溶解,作为试样溶液。

1.6 定量限和检测限的测定 最低检测限和最低定量限的确定,是根据信噪比(S/N)的值来确定的。称取 6 份空白组织,按照 1.5 项下步骤处理后,测得基线噪音值,求其平均值。按照信噪比 S/N = 3 时相对的添加浓度为检测限, S/N = 10 时相对的添加浓度为定量限^[4]。

1.7 添加回收率和精密度测定 称取匀浆组织(5 ± 0.05) g 于 50 mL 离心管中,加入适量标准贮备液,使其各组织添加浓度分别为 5、10、20 μg/kg 每个添加浓度设 5 个平行,按照 1.5 项下步骤操作进行测定,根据峰面积计算添加回收率和批间、批内变异系数。

2 结果与分析

2.1 线性关系 在浓度为 10~1 000 μg/L 的范围内,左旋咪唑的峰面积与其浓度呈线性相关,且线性关系良好,线性回归方程和相关系数见图 1。

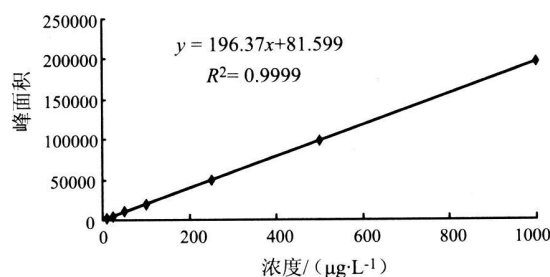


图 1 左旋咪唑标准曲线方程

2.2 检测限和定量限 根据 6 个空白组织的基线噪音平均值,按信噪比 S/N = 3 为检测限, S/N = 10 为定量限,求得在猪、鸡的肌肉、脂肪和肾脏中的检测限为 2 μg/kg 定量限为 5 μg/kg 在猪、鸡的肝脏中的检测限为 2 μg/kg 定量限为 10 μg/kg

2.3 添加回收率和精密度 在猪、鸡的肌肉、脂肪和肾脏中添加浓度为 5、10、20 μg/kg 在猪、鸡的肝脏中添加浓度为 10、20、100 μg/kg 进行添加回收试

验, 各组织的平均回收率在 70% 以上, 批内变异系数在 10% 以内, 批间变异系数在 15% 以内。结果见表 1 和表 2 左旋咪唑标准溶液色谱图见图 2 各组织的添加色谱图选取猪肌肉添加左旋咪唑的色谱图 (图 3) 为代表。

表 1 鸡组织中左旋咪唑回收率测定结果

组织	添加浓度 / (μg• kg ⁻¹)	回收率 %					平均回收率 %	批内 RSD %	批间 RSD %
		1	2	3	4	5			
肌肉	5	94.3	95.1	89.2	88.4	91.2	91.6	3.0	4.0
		89.6	87.8	81.5	92.7	86.6	87.6	4.1	
		83.3	93.8	85.1	89.5	90.8	88.5	4.3	
	10	78.7	80.3	78.9	78.0	83.4	79.9	2.1	2.7
		80.6	85.3	82.8	79.6	82.8	82.2	2.2	
		82.4	81.9	85.2	83.2	87.6	84.1	2.3	
	20	87.8	86.7	85.9	89.3	84.7	86.9	1.8	2.9
		90.4	93.2	89.4	85.9	86.8	89.1	2.9	
		87.2	81.1	89.5	90.6	87.4	87.2	3.6	
鸡肝	10	89.0	85.4	81.2	79.5	80.3	83.1	4.0	4.2
		78.1	70.6	76.4	78.3	79.1	76.5	3.4	
		81.6	78.5	83.4	80.9	77.6	80.4	2.4	
	20	75.2	84.4	73.4	81.5	84.5	79.8	5.2	3.8
		76.3	80.7	79.9	82.3	81.4	80.1	2.3	
		80.6	84.3	86.2	79.7	75.9	81.3	4.0	
	100	74.9	81.5	73.3	79.7	82.5	78.4	4.0	3.8
		72.6	77.3	75.5	78.2	81.7	77.1	3.6	
		85.4	75.1	81.7	76.4	79.9	79.7	4.1	
鸡肾	5	95.0	90.0	92.5	95.0	93.2	93.1	2.1	5.6
		80.0	85.0	97.5	87.5	86.3	87.3	6.4	
		85.1	87.7	77.9	92.8	89.7	86.6	5.6	
	10	96.2	98.7	93.2	90.6	92.4	94.2	3.4	7.6
		79.8	91.8	84.8	70.9	77.2	80.9	7.9	
		83.7	79.6	85.4	86.1	85.5	84.1	2.6	
	20	90.7	89.8	81.3	91.6	89.4	88.6	4.1	4.2
		81.3	87.6	90.5	82.2	87.6	85.5	3.9	
		79.8	82.6	88.3	87.9	81.8	84.1	3.8	
鸡脂肪	5	73.3	79.0	71.1	94.0	74.8	76.4	5.1	7.5
		77.4	85.1	84.6	89.3	92.3	85.7	5.6	
		89.3	71.8	81.0	87.5	78.8	81.7	7.0	
	10	76.2	78.1	83.5	87.2	78.8	80.8	4.5	4.1
		75.2	78.3	85.4	86.4	86.6	82.4	5.3	
		79.7	78.8	85.1	83.8	85.4	82.6	3.1	
	20	86.5	79.2	78.8	81.4	87.2	82.6	4.0	4.2
		74.6	77.8	86.1	84.5	83.6	81.3	4.9	
		77.8	73.7	78.8	82.8	82.1	79.0	3.6	

表 2 猪组织中左旋咪唑回收率测定结果

组织	添加浓度 / (μg• kg ⁻¹)	回收率 %					平均回收率 %	批内 RSD %	批间 RSD %
		1	2	3	4	5			
肌肉	5	82.7	82.7	91.1	71.9	79.4	81.6	6.9	6.1
		88.5	70.1	81.8	76.5	81.3	79.6	6.8	
		84.6	79.8	85.1	89.2	88.8	85.5	3.8	
	10	89.7	83.1	99.3	78.3	86.7	87.4	7.9	7.7
		75.9	74.8	75.6	70.6	79.8	75.3	3.3	
		89.0	81.0	77.3	88.0	90.1	85.1	5.6	
	20	94.1	81.9	84.2	76.2	85.4	84.4	6.5	6.1
		75.1	85.4	91.2	90.3	81.6	84.7	6.6	
		76.0	81.7	77.8	79.1	74.7	77.9	2.7	

(续表)

组织	添加浓度 /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率 /%					平均回收率 /%	批内 RSD /%	批间 RSD /%
		1	2	3	4	5			
猪肝	10	94.0	88.3	81.7	79.5	83.6	85.4	5.8	4.0
		83.4	82.9	88.6	85.4	80.8	84.2	2.9	
		82.7	91.3	87.2	86.1	83.6	86.2	3.4	
		84.9	70.8	85.9	79.5	88.1	81.8	6.9	
	20	80.0	71.8	77.4	81.0	86.7	79.4	5.4	5.5
		78.3	86.7	88.2	80.3	79.5	82.6	4.5	
		74.6	70.4	84.9	73.8	79.4	76.6	5.6	
		81.9	82.8	90.3	85.1	87.6	85.5	3.5	
猪肾	5	86.1	88.9	79.6	83.2	81.9	83.9	3.6	6.1
		91.3	89.4	82.1	85.3	87.6	87.1	3.6	
		75.3	80.6	81.4	89.3	80.4	81.4	5.0	
		93.4	95.2	96.2	91.2	90.2	93.2	2.6	
	10	80.5	76.5	76.9	90.5	80.8	81.0	5.6	4.8
		89.8	82.1	84.9	76.9	84.4	83.6	4.7	
		81.6	89.7	83.2	88.6	85.9	85.8	3.4	
		73.1	81.2	79.6	86.4	85.2	81.1	5.3	
	20	75.8	85.3	87.4	89.6	80.5	83.7	5.6	5.3
		77.5	83.4	89.7	90.1	86.6	85.5	5.2	
猪脂肪	5	89.7	87.2	83.3	86.5	89.1	87.2	2.5	5.1
		82.5	94.7	94.5	95.7	96.6	92.8	5.8	
		79.8	85.3	90.6	92.5	87.9	87.2	5.0	
		88.9	81.2	88.3	87.4	79.9	85.1	4.2	
	10	85.4	82.1	87.9	85.3	82.6	84.7	2.4	3.2
		86.7	78.4	86.3	83.0	84.3	83.7	3.3	
		73.1	81.2	79.6	86.4	85.2	81.1	5.3	
		75.8	85.3	87.4	89.6	80.5	83.7	5.6	
	20	77.5	83.4	89.7	90.1	86.6	85.5	5.2	5.3

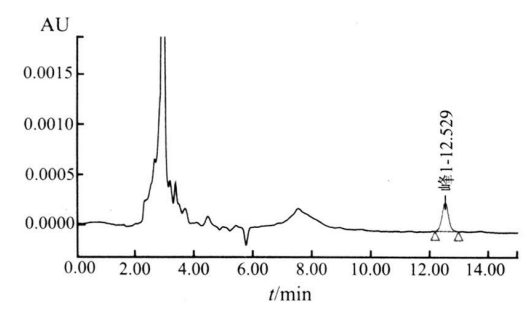


图2 左旋咪唑标准溶液(10 $\mu\text{g/L}$) 色谱图

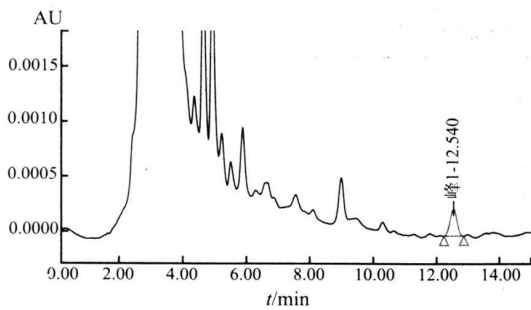


图3 猪肌肉添加左旋咪唑(5 $\mu\text{g/kg}$) 色谱图

3 讨论

3.1 色谱柱的选择及色谱条件的优化 本实验先后使用了美国戴安 C₁₈柱 (Accclaim C₁₈ 250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、安捷伦 C₁₈柱 (Eclipse Plus C₁₈ 250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。不同的流动相 0.02 mol/L 磷酸二氢钠·二乙胺缓冲液 (用磷酸调节 pH 值到 7.0) - 乙腈 (7:3) 或 0.02 mol/L 磷酸二氢钠·二乙胺缓冲液 (用磷酸调节 pH 值到 7.5) - 乙腈 (6:4) 进行了试验, 均出现主峰保留时间过短易与杂质峰混在一起。经反复试验、调整, 最后选定流动相为 0.02 mol/L 磷酸二氢钠·二乙胺缓冲液 (用磷酸调节 pH 值到 7.5) - 乙腈 (7:3)。在本色谱条件下目标药物峰与杂质峰能很好的分离, 且峰形较好, 保留时间适中。

3.2 样品的提取与净化 本方法提取与净化是采用液-液提取和固相净化相结合的方法, 左旋咪唑极易溶于水, 在碱性条件下, 左旋咪唑有一定的质子化倾向, 可以促进目标物质从组织提取。当溶液

为碱性时,左旋咪唑的电离受到抑制,在水相溶解度变低,易溶于卤代烷、醚、酯类等弱极性有机溶剂。碱性条件下,二氯甲烷、三氯甲烷、正己烷和乙酸乙酯等有机溶剂都可以用于组织中左旋咪唑的提取。为了更好地提取目标药物又不影响固相萃取小柱的净化,先后采用二氯甲烷、正己烷和乙酸乙酯作为提取剂,经反复实验,得出最佳提取剂,乙酸乙酯的提取,同时在组织中加入 5 g 无水硫酸钠,搅拌均匀后加入 1 mL 碳酸盐缓冲溶液(碳酸氢钠饱和水溶液 90 mL,加 10 mL 碳酸钠饱和水溶液,混合),这样可以缩短提取过程中所需的时间,提高效率。样品在碱性条件下先用乙酸乙酯提取,然后用 0.1 mol/L 盐酸反萃取。

3.3 固相萃取条件的选择 左旋咪唑的 pK_a 为 8.0 从化学性质上看可以用强阳离子交换柱(SCX)、弱阳离子交换柱(WCX)或混合型阳离子交换柱(MCX)来固相萃取。通过采用 SCX 柱和 MCX 柱分别对组织净化,发现本药物用混合型阳离子交换柱(MCX)来固相萃取净化较 SCX 好,用 MCX 净化后目标药物峰与杂质峰能很好的分离,杂质峰明显减少,且峰形较好。同时在实验时应注意,在过柱时样品的回收率要注意控制溶剂在小柱上的流速,不宜太快,速度一般控制在 1~2 mL/min,速度快样品在柱子上的保留效果差,影响回收率。

3.4 定量限和检测限的确定 本方法按信噪比 $S/N=3$ 为检测限, $S/N=10$ 为定量限,求得在猪、

鸡的肌肉、脂肪和肾脏中的检测限为 $2 \mu\text{g/kg}$ 定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 在猪、鸡的肝脏中的检测限为 $2 \mu\text{g/kg}$ 定量限为 $10 \mu\text{g/kg}$ 均低于国家规定的最高残留限量要求,我国规定左旋咪唑的 MRL 为牛、羊、禽类和猪的肌肉、肾脏、脂肪为 $10 \mu\text{g/kg}$ 在肝脏中为 $100 \mu\text{g/kg}$ 表明该方法可行,满足残留分析要求。

3.5 结论 本研究建立了左旋咪唑残留方法,采用乙酸乙酯提取,用 MCX SPE 小柱净化,杂质去除彻底,提取效果好,回收率在 70% 以上。在猪、鸡的肌肉、脂肪和肾脏中的检测限为 $2 \mu\text{g/kg}$ 定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 在猪、鸡的肝脏中的检测限为 $2 \mu\text{g/kg}$ 定量限为 $10 \mu\text{g/kg}$ 批内变异系数在 10% 以内,批间变异系数在 15% 以内。此方法可以为该类药物的监控提供技术支持和保障,保证国际之间正常贸易往来、保障人类健康,具有十分重要的意义和实用价值。

参考文献:

- [1] 陈杖榴. 兽医医药理学[M]. 第二版. 北京: 中国农业出版社, 2004: 7.
- [2] 中国兽药典委员会. 兽药使用指南化学药品卷二〇〇五年版[S].
- [3] SN 0349-95 出口肉及肉制品中左旋咪唑残留量检测方法-气相色谱法[S].
- [4] 李俊锁, 邱月明, 王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002.

(上接第 12 页)

- [4] Banantine J P, Baechler E, Zhang Q, et al. Genome Scale Comparison of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* with *Mycobacterium avium* subsp. *avium* Reveals Potential Diagnostic Sequences[J]. J Clin Microbiol 2002; 40(4): 1301-1310.
- [5] John P Bannantine, Janis K Hansen, Michael Paustian, et al. Expression and Immunogenicity of Proteins Encoded by Specific to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004; 42(1): 106-114.
- [6] Makeda Semret, David C Alexander, Christine Y Turenne, et al. Genomic Polymorphisms for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Diagnostics [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(8): 3704-3721.
- [7] Lyashchenko K P, Singh M, Colangeli R, et al. A multi-antigen Print Immunoassay for the Development of Serological Diagnosis of Infectious Disease [J]. J Immunol Methods 2000; 242: 91-100.
- [8] Kim T J, Kim Y S, Kim J C, et al. Studies on Molecular Biological and Immunological Diagnosis of Johne's Disease [J]. Korean Vet Res 1997; 37: 349-358.