

“美婷”原料药在鱼肌肉组织中 残留检测前处理方法

马荣荣¹ 胡 鲲¹ 王印庚² 吴冰醒¹ 杨先乐¹

1. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071

摘要 对高效液相色谱法测定草鱼和鲫鱼肌肉组织中“美婷”原料药残留的前处理方法进行探讨。结果表明: 以甲醇作抽提剂、二氯甲烷作净化剂, 振荡离心, 正己烷去脂, 30℃旋转浓缩蒸发的前处理方法, 快速、准确、经济、实用性强。该方法“美婷”原料药的最低检测限可达 1.0 μg/kg; 在加标水平为 1.0~100 μg/kg 时, 回收率为 67.72%~95.52%; 相对标准偏差为 7.76%~37.81%。该前处理方法适合检测“美婷”原料药在鱼体内的残留。

关键词 “美婷”原料药; 残留; 高效液相色谱法; 前处理; 鱼体肌肉

中图分类号 S 948 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0121-05

“孔雀石绿(malachite green, MG)”替代药物“美婷”为复方制剂, 其主要成份是用生物发酵技术所获得的类似黄腐酸的物质, 是一种纯天然的植物生长调节剂, 能有效渗透霉菌组织的细胞壁, 干扰细胞间酶的相互作用, 进而起到抑制和杀灭霉菌的效果^[1]。虽然“美婷”原料药为天然绿色提取物, 来源于自然, 但本着安全负责的态度, 仍有必要对其在鱼体内的残留进行检测。由于该物质首次应用于鱼体, 所以目前国内外尚未见关于其在生物体残留的检测方法的报道。本研究试图利用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)来进行替代药物“美婷”原料药残留的检测。对于HPLC而言, 样品前处理不仅可以起到富集痕量组分、去除杂质干扰、提高方法灵敏度的作用, 还可以去除对仪器或分析系统有害的物质, 延长仪器使用寿命^[2-3], 因此, 可以说样品前处理是HPLC方法建立的关键。另外, 水产品品种的多样性及其复杂性也对建立合适的前处理方法提出了挑战。笔者针对替代药物“美婷”原料药的特点, 以草鱼、鲫鱼为检测对象, 探索了前处理提取、净化、浓缩富集温度等一系列条件对回收率的影响, 旨在为相关检测方法的建立和标准的制定提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与设备

Agilent1100 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器); Eppendorf Centrifuge 5417R 型台式高速离心机; ELGA Classic Di MK2 超纯水系统; ODS 固相萃取柱(10 mg); METTLER TOLEDO PB203-N 型电子天平; Eppendorf Concentration plus 旋转蒸发浓缩仪; Sartorius PB-10 pH 计; KINEMTICA AG 高速组织捣碎机; 超声波破碎仪。

1.2 药品与试剂

“孔雀石绿”替代药物“美婷”原料药: 纯度 > 99%。甲醇、乙腈、正己烷、乙酸乙酯(色谱纯); 二氯甲烷、H₃PO₄(分析纯); 超纯水(自制)。

1.3 样品及其制备

取新鲜草鱼和鲫的侧线上部脊背肌肉组织, 利用高速组织捣碎机打成匀浆, 放入-20℃冰箱中冷冻贮存, 测定前室温解冻。

1.4 色谱条件

色谱柱: RP-ODS 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇:(95 mL 超纯水+0.1 mL 磷酸)=5:95(V/V), pH=2.63; 检测波长为 210 nm; 流速为 1.0

收稿日期: 2013-01-03

基金项目: 国家“863”计划项目(2011AA10A216)、农业公益性行业专项(201203085)、国家自然科学基金项目(31172430)、上海市科技兴农重点攻关项目沪农科攻字(2011)第4-8号]和国家水产种质资源平台运行服务项目和上海高校知识服务平台项目

马荣荣, 硕士研究生, 研究方向: 水产疾病学. E-mail: 975105443@qq.com

通讯作者: 杨先乐, 教授, 研究方向: 水产动物医学. E-mail: xlyang@shou.edu.cn

mL/min,柱温为 30 ℃,进样量 10 μL。

1.5 标准溶液的配制

准确称取“美婷”原料药标准品 0.050 0 g,流动相溶解并定容至 500 mL 的容量瓶,配成 100 μg/mL 的标准贮备液,置于 4 ℃ 冰箱中保存。使用时,用流动相稀释成质量浓度为 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100 μg/mL 的标准工作液,上样检测,以峰面积为纵坐标、药物浓度为横坐标制作标准曲线,并求出其标准曲线的回归方程和相关系数。

1.6 回收率和相对标准偏差

测定后的样品药物峰面积代入标准曲线回归方程,可得测定药物浓度。

样品处理后利用 EXCEL 软件按下式计算回收率、平均值及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD):

回收率 = 样品中药物峰面积 / 溶于流动相的药物峰面积 × 100%;

样品标准误 = SD/\sqrt{n} ;

相对标准偏差 $RSD = SD/\bar{x}$ 。

式中,SD 为标准差。

1.7 浓缩温度的影响

分别取 3 个平行的 100、50 μg/mL 标准贮备液 0.5 mL 于 10 mL 离心管中,振荡后倒入 1.5 mL 离心管中,利用旋转浓缩蒸发器分别于 45 ℃ 和 30 ℃ 条件下旋转浓缩蒸干,0.5 mL 流动相溶解残留物,振荡,0.45 μm 滤膜过滤,滤液供 HPLC 检测,测定回收率和批间样品的相对标准偏差。

1.8 抽提溶剂、去脂质溶剂的比较

1) 抽提溶剂。取 0.5 mL 质量浓度为 100 μg/mL 的标准贮备液于离心管中,分别加入 1 mL 甲醇、1 mL 乙腈,同时进行 3 个平行,振荡后倒入 1.5 mL 离心管中,30 ℃ 旋转浓缩蒸干,取 0.5 mL 流动相溶解,0.45 μm 滤膜过滤,上样测定,计算回收率。

2) 去脂质溶剂。取 100 μg/mL 的标准贮备液 0.5 mL 于离心管中,加入 1 mL 甲醇,振荡后分别加入 1 mL 正己烷、乙酸乙酯,同时进行 3 个平行,振荡后倒入 1.5 mL 离心管中,30 ℃ 旋转浓缩蒸干,溶解,过滤,上样测定。

1.9 组织样品的回收率

1) 准确称取草鱼空白肌肉组织 0.50 g,置于 10 mL 离心管中,分为 2 个组,每组 3 个平行,第 1 组中加入 0.5 mL 的流动相作为对照,第 2 组加入 100 μg/mL 的标准贮备液 0.5 mL,静止 2 h 后,依次加

入 1 mL 甲醇,漩涡振荡 1 min,8 000 r/min 离心 10 min,加入 1 mL 正己烷,漩涡振荡后,静止 10 min,取下层溶液,30 ℃ 蒸干,0.5 mL 流动相溶解,过 0.45 μm 滤膜,上样测定。

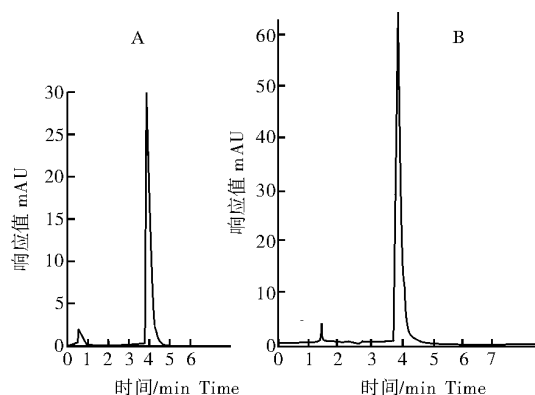
2) 准确称取异育银鲫空白肌肉组织 0.50 g,处理方式同以上草鱼组织,编号为 3、4 组。

3) 称取草鱼空白肌肉组织,编号为 5、6 组,第 5 组加入 0.5 mL 流动相作为对照,第 6 组加入 100 μg/mL 的标准贮备液 0.5 mL,静止 2 h,加入 1 mL 甲醇后,另加入 1 mL 二氯甲烷,漩涡振荡离心后,取下层溶液,处理后,上样测定。

2 结果与分析

2.1 “美婷”原料药色谱图

“孔雀石绿”替代药物“美婷”原料药标准品色谱图见图 1,标准品色谱图对应的质量浓度分别为 50、100 μg/mL。保留时间为 3.98 min,其色谱图基线平稳,药物峰分离效果良好。



A. 50 μg/mL “美婷”原料药色谱图 Mei-ting's raw of 50 μg/mL; B. 100 μg/mL “美婷”原料药色谱图 Mei-ting's raw of 100 μg/mL.

图 1 “美婷”原料药标准色谱图

Fig.1 Chromatogram of Mei-ting's main component standard samples

2.2 “美婷”原料药标准曲线

“美婷”原料药在 1.0~100 范围内线性关系良好,标准曲线为 $y = 6.281x - 2.338$,相关系数 $r^2 = 0.999$ 。

2.3 浓缩温度的影响

由表 1 可知,未加入鱼体组织的 100、50 μg/mL 标准液在 45 ℃ 条件下旋转蒸发后回收率分别为 16.37%、18.60%,而在 30 ℃ 时回收率分别可达到 75.64%、63.71%。由此可见 45 ℃ 和 30 ℃ 旋转浓缩蒸发后的回收率表现出差异,且差异极显著

表1 不同浓缩温度对测定的影响

Table 1 The effects of the different dry temperature on recovery($n=3$)

温度/℃ Temperature	质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) Mass concentration	测定值/ (mg/kg) Measured value	回收率/% Recovery	相对标准 偏差/% RSD
45	100	16.37 \pm 1.34	16.37 \pm 1.34	14.18
	50	9.30 \pm 2.03	18.60 \pm 4.06	37.81
30	100	75.64 \pm 3.81	75.64 \pm 3.81	8.72
	50	31.86 \pm 1.99	63.71 \pm 3.98	10.82

($P<0.01$)。表明原料药溶于流动相后,在30℃条件下较稳定。故选择30℃作为浓缩温度。

2.4 抽提溶剂、去脂质溶剂的比较

由表2可知,作为常用抽提去蛋白溶剂的甲醇和乙腈在回收率上都达到70%以上,虽然回收率表现出差异,但差异不显著($P>0.05$),两者均符

合检测的要求,所以都可作为去蛋白溶剂。而作为常用去脂质的正己烷和乙酸乙酯,由于乙酸乙酯不能很好使脂质分层,且利用正己烷去脂后,回收率在60%以上,故选择正己烷作为去脂溶剂。

表2 抽提溶剂、去脂质溶剂的比较¹⁾Table 2 The comparison of the commonly deproteination and delipid solvents($n=3$)

提取剂作用 Action of extraction agents	提取剂 Extraction agents	回收率/% Recovery	相对标准 偏差/% RSD
抽提 Extraction	甲醇 Methanol	82.67 \pm 4.12	8.63
	乙腈 Acetonitrile	78.32 \pm 3.71	8.20
去脂质 De-fat	正己烷(上层) n-Hexane	0.00	—
	正己烷(下层) n-Hexane	87.04 \pm 3.90	7.76
	乙酸乙酯 Ethylacetate	—	—

1)“—”表示没有具体结果 “—”means no concrete results.

表3 不同前处理方法测定鱼肉“美婷”原料药残留的回收率¹⁾

Table 3 The different pre-treatment method for the determination of Mei-ting recovery of raw materials residues

项目 Items	分组 Groups					
	1	2	3	4	5	6
0.5 mL 流动相 Mobile phase 0.5 mL	+	—	+	—	+	—
0.5 mL 贮备液 Stock solution 0.5 mL	—	+	—	+	—	+
1 mL 二氯甲烷 Dichloromethane 1 mL	—	—	—	—	+	+
回收率 Recovery	>10 倍 >10 times	>10 倍 >10 times	>10 倍 >10 times	>10 倍 >10 times	0	0.677 2

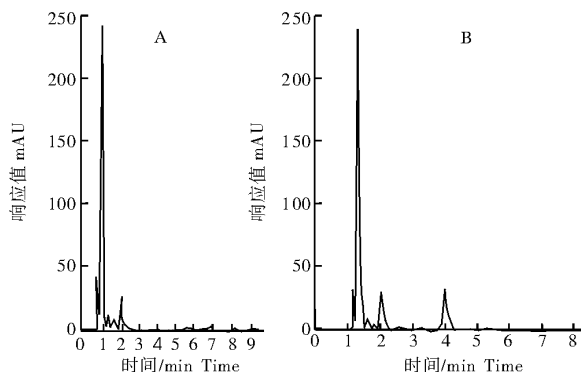
1)1、2、5、6组为0.5g草鱼空白肌肉组织;3、4组为0.5g鲫鱼空白肌肉组织;“—”表示没有添加对应的试剂;“+”表示添加了一定量对应试剂。The groups of 1,2,5,6 are blank grass carp muscle tissue of 0.5 g; the groups of 3,4 are blank crucian muscle tissue of 0.5 g; “—” means no added corresponding reagent; “+” means to add a certain amount corresponding reagents.

2.5 组织样品的回收率

由表3可得,第1、2、3、4组在特定的保留时间,其回收率大于添加药物浓度的10倍以上,即只是添加甲醇、正己烷不能有效把药物分离出来或者药物在鱼体肌肉组织中转化为一种鱼体自身含有的物质。而3、4组异育银鲫空白肌肉组织的回收率排除了因物种的特异性而不能有效分离的可能性。5、6组草鱼空白肌肉组织加入二氯甲烷后,加入流动相而未加入药物的第5组的回收率为0%,而加入了0.5 mL(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)标准贮备液的第6组回收率为67.72%(图2分别为空白、加标草鱼肌肉组织色谱图),说明药物在加入到组织后并未转化为鱼体肌肉本身含有的物质,也说明二氯甲烷可有效地使药物得到净化。

2.6 最低检测限

采取以二氯甲烷做提取剂振荡离心提取、甲醇抽提,正己烷去脂、30℃旋转浓缩蒸发的前处理方法



A. 空白对照 Blank control; B. 加标草鱼肌肉 Mark muscle tissue of grass carp.

图2 空白肌肉组织、加标草鱼肌肉组织色谱图

Fig. 2 The chromatogram of blank and mark muscle tissue

法,以引起 2 倍基线噪音的药量确定最低检测限,可达 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$,适用于残留量的检测。

3 讨 论

3.1 提取方法

水产动物组织成分复杂,科学、合理的检测方法不仅要考虑技术要求(如灵敏度、准确性、重复性、适用性等),还必须充分考虑社会需求(如推广性、实用性、经济性等)^[4]。样品前处理过程一般包括样品的采集、提取、净化和衍生化^[5]。运用高效液相色谱法,来测定鱼体肌肉组织中药物残留的前处理提取溶剂的选择不但要遵循相似相溶规则,还要充分考虑溶剂性质对随后处理步骤的影响^[4]。通常所用抽提、脱脂溶剂有甲醇、乙腈和正己烷、乙酸乙酯^[6-10]。由于该“美婷”原料药易溶于甲醇、乙腈等水溶性有机溶剂,故采用甲醇、乙腈脱蛋白;正己烷、乙酸乙酯脱脂。试验结果证明,甲醇、乙腈对回收率并无明显差异,而乙腈的毒性为甲醇的 5 倍且价格相对较高,从安全、经济有效的角度建议选择甲醇作为去蛋白溶剂。另外,在溶解原料药的流动相中含有可与水、乙酸乙酯以任意比例互溶的甲醇,导致利用乙酸乙酯作为去脂溶剂不能分层,不能很好地达到去除脂质的效果。虽然加入甲醇去蛋白后可蒸干再加入乙酸乙酯,达到去脂的目的,但无疑会使步骤繁琐化,从简化步骤的角度建议选择正己烷作为去脂溶剂。

3.2 净化剂

净化是将待测物与提取液中的样本干扰杂质分离^[11]。前处理中净化的工作量最大,但一个具有强大分离效能或高选择性检测能力的测定体系可大大降低对净化的要求。兽药残留分析中常用的净化方法是液-液分配和固相萃取^[12]。本试验选用经典的液-液分配净化手段。很多检测方法通常采取添加提取液来达到同时脱蛋白、脱脂和提取药物的目的,但所得提取液中往往又含有许多与待测组分溶解性相似的杂质或共萃物,需进一步进行净化和浓缩^[6]。“美婷”原料药经甲醇、正己烷处理后,在草鱼和鲫的肌肉组织中其回收率在特定保留时间都大于 10 倍,排除了因鱼体的特异性而不能有效分离药物的可能性,需进一步探索有效的净化剂。萃取法是利用药物与溶剂极性的不同进行分离、萃取^[13-14],且“美婷”原料药易溶于甲醇而不溶于正己烷,故本试验试图

选择极性与甲醇和正己烷不同的二氯甲烷来进行药物萃取,最终可以使“美婷”原料药与溶解性相似的杂质、共萃物有效分离,该检测值满足测定要求,至于是否为最优净化溶剂需进一步探索。

3.3 浓缩条件

浓缩是待测物富集或转溶的常用方法^[15]。样品前处理中,为了提高检测灵敏度,一般会采取浓缩步骤^[4],而前处理中以浓缩过程待测物损失最大。由于该“美婷”原料药在一定温度条件下的稳定性未确定,本试验设计了在 30、45 °C 下利用旋转浓缩仪进行浓缩烘干,45 °C 下回收率低于 20%,而 30 °C 时回收率达到 60% 以上,说明在 45 °C 药物部分分解或者同流动相一起蒸发,即该“美婷”原料药溶于流动相后在 30 °C 相对稳定,故笔者建议选择 30 °C 作为浓缩温度。至于是否最佳浓缩温度,有待进一步验证。

本研究通过比较浓缩温度、不同鱼体肌肉组织、不同脱蛋白、脱脂溶剂及净化剂下的回收率来确定较佳测定前处理条件,结果表明以二氯甲烷做提取剂振荡离心提取、甲醇去蛋白,正己烷去脂、30 °C 旋转浓缩蒸发条件下能够满足鱼肉中该“美婷”原料药残留的检测。

参 考 文 献

- [1] 夏文伟,曹海鹏,杨先乐.美婷对鱼卵水霉病的防治试验[J].科学养鱼,2010,12(8):52-53.
- [2] 陈正夫,朱坚,周亚康.环境激素的分析与评价[M].北京:化学工业出版社,2004:108-109.
- [3] 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,2002:57-64,257-264.
- [4] 胡鲲,杨先乐,唐俊,等.绒螯蟹中 3 种氟喹诺酮类药物残留检测的前处理方法研究[J].华中农业大学学报,2007,26(5):670-675.
- [5] POSTIGO C, LOPEZ M J, BARCELÓ D, et al. Analysis of drugs of abuse and their human metabolites in water by LC-MS 2: a non-intrusive tool for drug abuse estimation at the community level [J]. Trends in Analytical Chemistry, 2008, 27(11):1053-1069.
- [6] 石寅莹,梅媛,朱家文,等.高效液相色谱分析方法中渔药残留样品处理研究进展[J].现代仪器,2009(6):8-14.
- [7] 阮记明,胡鲲,章海鑫,等.两种水温条件下异育银鲫体内双氟沙星药代动力学比较[J].上海海洋大学学报,2011,20(6):858-865.
- [8] 李慧芳,殷军港,刘永明.鱼肉中喹诺酮类药物残留检测前处理

- 方法的研究[J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(1): 62-66.
- [9] 郑宗林, 唐俊, 喻文娟, 等. RP-HPLC 法测定中华绒螯蟹主要组织中的恩诺沙星及其代谢产物[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(2): 156-162.
- [10] 潘媛, 牛华, 程晓云, 等. 高效液相色谱法检测六种氟喹诺酮类兽药残留前处理的优化[J]. 分析试验室, 2011, 30(5): 67-72.
- [11] 赵轶男. 高效液相色谱技术(HPLC)影响因素的选择[J]. 分析试验室, 2007, 26(12): 340-341.
- [12] GUGGISBERG G, MOSSER A E, KOCH H. Methods for the determination of sulphonamides in meat [J]. Chromatogr, 1992, 62(4): 425-437.
- [13] WEISS G, DUKE P D, GONZALES L. HPLC method for the simultaneous analysis of sulfadi methoxine and ormeto prim in tissues and blood of cattle, chickens, and cat fish [J]. Agric Food Chem, 1987, 35(6): 905-909.
- [14] PARKS O W. Screening tests for sulf ad rugs and/or dinitro-benz amide coccidio stats and their mono amino-metabolites in chicken livers [J]. AOAC Int, 1985, 68(1): 20-23.
- [15] 李俊锁. 兽药残留分析研究进展 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(5): 81-87.

Pretreatment methods for determination of Mei-ting residue in fish muscle by high performance liquid chromatography

MA Rong-rong¹ HU Kun¹ WANG Yin-geng² WU Bing-xing¹ YANG Xian-le¹

1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences,

Qingdao 266071, China

Abstract The effects of sample pretreatment on the detection of Mei-ting in the muscle of grass carp was explored by high performance liquid chromatography. The results showed that the pretreatment methods of extraction by methanol, purification by methylene chloride, vibratory centrifugation, defatting by n-hexane, concentration at 30 °C by rotary evaporator, is rapid, sensitive, economical, safe and practical. The detection limit of Mei-ting was 1.0 μg/kg. The recovery rate ranged from 67.72% to 95.52% at the spiking level of 1.0-100 μg/kg and the relative standard deviation was 7.76%-37.81%. The method described here is suitable to measure the residue of Mei-ting in fish.

Key words raw materials of Mei-ting; residue; HPLC; pretreatment; fish muscle

(责任编辑:边书京)