

高效液相色谱法测定脂肪中11种苯并咪唑类药物残留标志物

邵琳智*, 邹游, 陈思敏

(广东检验检疫技术中心, 广东 广州 510623)

摘要:建立了同时测定脂肪中11种苯并咪唑类药物残留标志物的高效液相色谱法。样品采用正己烷溶解后,加入抗氧化剂,用0.1 mol/L 盐酸-乙腈(1:1,体积比)提取,经正己烷脱脂后再次加入抗氧化剂,以MCX固相萃取柱净化。净化液浓缩处理后进行高效液相色谱分离,以甲醇-1%乙酸为流动相梯度洗脱,流速为1.0 mL/min,紫外检测波长为292 nm,采用外标法以峰面积定量检测。11种目标物均在25.0~1 000 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性良好,方法定量下限为50 $\mu\text{g/kg}$,在3个加标水平下的回收率为82.0%~109%,相对标准偏差(RSD)为0.71%~9.9%。该方法能够满足脂肪中苯并咪唑类药物残留标志物的检测要求。

关键词:苯并咪唑类药物残留标志物;脂肪;固相萃取;高效液相色谱法

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)08-0990-05

Determination of 11 Benzimidazoles Metabolites Residues in Fat by High Performance Liquid Chromatography

SHAO Lin-zhi*, ZOU You, CHEN Si-min

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method was developed for the simultaneous determination of 11 benzimidazoles metabolites residues in fat. Samples were firstly dissolved with *n*-hexane, then extracted with antioxidant and 0.1 mol/L hydrochloric acid-acetonitrile (1:1, by volume), followed by treatments with *n*-hexane for defatting, antioxidant again and further clean-up on a MCX solid phase extraction (SPE) column. After concentration, the chromatographic separation was performed on an Atlantis T3 column by gradient elution with a mixed solution of methanol and 1% acetic acid at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 292 nm, and the external standard method was used for quantitation. The calibration curves for 11 analytes were linear in the range of 25.0-1 000 $\mu\text{g/L}$ with quantitation limits of 50 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries at three spiked levels ranged from 82.0% to 109% with relative standard deviations (RSD) of 0.71% - 9.9%. The developed method could meet the requirements for determination of 11 benzimidazoles metabolites residues in fat.

Key words: benzimidazoles metabolites residues; fat; solid phase extraction; high performance liquid chromatography

苯并咪唑类(Benzimidazoles, BMZs)药物由于特殊的化学结构而具有良好的生物活性^[1],是一种广谱、高效的驱虫药,广泛用于治疗猪、牛、羊消化道寄生虫病^[2]。作为寄生蠕虫疾病治疗的首选药物,苯并咪唑类药物发展非常迅速^[3],随之也带来了许多潜在风险。研究表明,苯并咪唑类药物具有致畸与致突变作用,其亚砷化物、羟化产物等代谢物具有胚胎毒性^[4],因此许多国家将该类药物及其代谢物同时列为牛、羊、猪的肌肉、脂肪、肝、肾以及禽肉、禽蛋和奶中的限用物质进行监控。

我国最新制定的食品安全国家标准《动物性食品中兽药最大残留限量》(征求意见稿)^[5]对农业部

235号公告^[6]进行修订,其中苯并咪唑类药物增至9种,对其残留标志物亦作了较大修改。规定非班太尔、芬苯达唑、奥芬达唑的残留标志物为芬苯达唑、奥芬达唑和奥芬达唑-2-氨基砜的总和;奥苯达唑的残留标志物为奥苯达唑;噻苯达唑的残留标志物为噻苯达唑和5-羟基噻苯达唑;三氯苯达唑的残留标志物为三氯苯达唑酮;阿苯达唑的残留标志物为阿苯达唑-2-氨基砜;氟苯达唑的残留标志物为氟苯达唑;甲苯达唑的残留标志物为2-氨基-5-苯甲酰基苯并咪唑和5-羟基甲苯达唑。修改后的残留标志物增至11种,与食品法典委员会(CAC)和欧盟的苯并咪唑类药物最大残留限量要求基本一致。

该征求意见稿^[5]规定阿苯达唑的残留标志物在脂肪中的最高残留限量(MRL)为100 μg/kg;非班太尔、芬苯达唑、奥芬达唑的残留标志物在牛、羊、猪、马脂肪中的MRL为100 μg/kg,家禽中为50 μg/kg(仅芬苯达唑);奥苯达唑的残留标志物在猪脂肪中MRL为500 μg/kg;噻苯达唑的残留标志物在牛、猪、羊脂肪中的MRL为100 μg/kg;三氯苯达唑的残留标志物在牛、羊脂肪中的MRL为100 μg/kg。但相关国家标准^[7-8]、行业标准^[9]和文献报道^[2,10-16]中,主要是针对肌肉、肝、肾等动物组织或禽肉、蛋和奶中的苯并咪唑类药物及代谢物检测,极少涉及脂肪基质。由于脂肪的油脂含量大,包裹性和黏附性强^[17],导致提取非常困难,净化效果不佳。此外,脂肪含有较多饱和脂肪酸,氧化能力较强,而苯并咪唑类药物不稳定,前处理过程易发生降解,尤其是5-羟基噻苯达唑;若采用国标的净化流程,三氯苯达唑酮等残留标志物几乎不保留,加标回收率极低。本文采用更具广泛适用性的前处理方式,尤其是对易降解残留化合物的保护技术,并以极性大、穿透力强的乙腈作为提取溶剂,可有效减少脂溶性杂质的共提取^[18],从而建立了同时测定鸡、猪脂肪中上述11种苯并咪唑类药物残留标志物的高效液相色谱(HPLC)法,填补了脂肪中同时检测苯并咪唑类药物残留标志物的技术空白。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

LC-20AD 高效液相色谱仪,配自动进样器、柱温箱、紫外检测器(岛津公司);感量0.000 01 g的分析天平和感量0.01 g的天平(Sartorius公司);GM 200型肉类组织捣碎机(Retsch公司);MS 3 basic 旋涡振荡器、减压旋转蒸发仪(IKA公司);SW 30H 超声波水浴(Sono Swiss公司);3-30K 离心机(Sigma公司)。

奥芬达唑、芬苯达唑、奥芬达唑-2-氨基砜、阿苯达唑-2-氨基砜、噻苯达唑、5-羟基噻苯达唑、2-氨基-5-苯甲酰基苯并咪唑、5-羟基甲苯达唑、氟苯达唑、奥苯达唑和三氯苯达唑酮,纯度均在97%以上(德国Dr. Ehrenstorfer公司),各标准品先用10 mL N,N-二甲基甲酰胺溶解,再用甲醇配成200 mg/L标准储备溶液,使用时根据需要稀释成混合标准工作溶液。没食子酸丙酯(PG);乙腈、甲醇(HPLC级,Fisher公司),乙酸(色谱纯,Merck公司);其它未特殊说明的试剂均为分析纯;Oasis MCX 固相萃取柱(60 mg/3 mL,Waters公司)。猪脂肪和鸡脂肪均为送检样品。

1.2 实验方法

提取:称取2 g试样(准确至0.01 g)于50 mL离心管中,加入5 mL正己烷,涡旋振荡5 min,充分溶解脂肪,加入10 mL 0.1 mol/L盐酸-乙腈(1:1,体积比)和0.1 mL 20% PG 甲醇溶液,涡旋2 min,置超声波水浴中超声5 min,涡旋振荡15 min,4 000 r/min离心5 min,取下层清液5 mL于15 mL离心管中,待净化。

净化:向待净化液中加入2.5 mL 0.1 mol/L盐酸,混匀后加入3 mL正己烷,涡旋振荡2 min,10 000 r/min离心5 min,弃去上层正己烷,下层清液加入20% PG 甲醇溶液0.1 mL,混匀,转入经预处理的MCX固相萃取柱中,以小于1 mL/min的流速使样品溶液全部过柱,弃去流出液。依次用3 mL 0.1 mol/L盐酸-甲醇(2:1,体积比)、4 mL 5%氨水溶液淋洗,淋洗液全部过柱,弃去淋洗液,最后用4 mL 5%氨水甲醇洗脱。

浓缩:洗脱液以0.5 mL/min流速全部通过小柱,并收集于带刻度的浓缩瓶中,38 °C水浴下减压旋转蒸发至约500 μL后,以0.1 mol/L盐酸定容至1 mL,涡旋2 min,溶液以10 000 r/min离心5 min后,供测定。

1.3 液相色谱分析条件

Atlantis T3 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 检测波长: 292 nm; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 40 μL; 流动相: A 为甲醇, B 为 1% 乙酸; 梯度洗脱程序: 0~10.0 min, 10%~45% A; 10.0~15.0 min, 45%~40% A; 15.0~25.0 min, 40%~75% A; 25.0~35.0 min, 75%~90% A; 35.0~35.1 min, 90%~100% A; 35.1~45.0 min, 100% A; 45.0~45.1 min, 100%~10% A; 45.1~60.0 min, 10% A。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化剂的优化

2.1.1 抗氧化剂种类的选择 脂肪中富含氧化能力强的饱和脂肪酸, 对待测化合物尤其是 5-羟基噻苯达唑有明显的降解破坏作用, 前处理过程若不加抗氧化剂, 将导致其回收率极低甚至色谱峰完全消失。林海丹等^[11]的研究显示, 1 g/100 mL 二丁基羟基甲苯(BHT)可明显提高奥芬达唑、奥芬达唑砜等的提取效率。本实验比较了 GB/T 21324-2007^[7]中采用的 BHT 以及丁基羟基茴香醚(BHA)、特丁基对苯二酚(TBHQ)和 PG 的抗氧化效果。结果表明, BHA 和 TBHQ 的抗氧化效果不佳, 且待测化合物的色谱图中杂峰较多; BHT 的抗氧化效果差, 且由于其水溶性较差, 在洗脱液旋蒸时易析出, 导致液相色谱系统堵塞, 此外 BHT 对三氯苯达唑酮有轻微降解作用, 使其回收率在 70% 以下。而 PG 的抗氧化效果良好, 干扰物与待测化合物的色谱峰可基本分离, 且 PG 的水溶性较好, 上机溶液澄清, 对三氯苯达唑酮也有保护作用, 可将其回收率提高 15%~20%。本方法最终选择 PG 作为抗氧化剂。

2.1.2 抗氧化剂浓度的选择 本实验采用甲醇溶解 PG, 比较了 PG 含量为 5%、10% 和 20% 时的抗氧化效果。结果显示, 5% PG 甲醇溶液对鸡、猪脂肪中 5-羟基噻苯达唑的保护力度不够, 其回收率不足 50%。对于鸡脂肪, 10% PG 甲醇溶液即能很好地保护 5-羟基噻苯达唑; 但对于猪脂肪, 则需 20% PG 甲醇溶液才能保护 5-羟基噻苯达唑。本方法最终选择 20% PG 甲醇溶液作为抗氧化剂。

2.1.3 抗氧化剂加入次数的选择 对于猪脂肪, 若仅在提取或过柱前加 1 次 20% PG 甲醇溶液, 5-羟基噻苯达唑的回收率低于 80%, 而在提取和过柱前加入 2 次抗氧化剂才能确保 5-羟基噻苯达唑不被氧化。本方法最终选择分 2 次加入 20% PG 甲醇溶液。

2.2 净化方式的优化

采用 MCX 固相萃取柱进行净化, 按照 GB/T 21324-2007^[7]的过柱条件处理加标样品时, 发现 0.1 mol/L 盐酸淋洗液的除杂效果不佳, 且三氯苯达唑酮会被洗脱下来, 导致其回收率为零; 以 10% 氨水乙腈为洗脱液时, 则后续浓缩时间过长, 且会影响 2-氨基-5-苯甲酰基苯并咪唑的回收率。本方法改用 0.1 mol/L 盐酸-甲醇(2:1)为淋洗液, 可除去大部分杂质且三氯苯达唑酮不会被洗脱下来, 再配合使用 5% 氨水溶液淋洗, 能有效去除奥芬达唑-2-氨基砜和 5-羟基噻苯达唑两峰之间的杂质; 以 5% 氨水甲醇为洗脱液对各组分的洗脱比较稳定, 方法重现性较好, 后续浓缩方便快捷。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系与定量下限 在鸡脂肪和猪脂肪空白样品中, 分别添加 10.0 mg/L 的待测物标准工作溶液, 按照本方法进行测定, 以信噪比(S/N) ≥ 10 , 且回收率和相对标准偏差(RSD)均符合残留检测方法要求时的浓度为定量下限(LOQ)。采用本方法对质量浓度为 25.0、50.0、100、200、500、1 000 μg/L 的系列标准工作溶液进行测定, 以待测物的峰面积(Y)对其质量浓度(X)进行线性回归, 绘制标准工作曲线。结果表明, 11 种待测物均在 25.0~1 000 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r)均大于 0.999 8, LOQ 均为 50 μg/kg, 能够满足相关监管部门的要求。

2.3.2 准确度与精密度 准确称取 2.0 g 空白鸡脂肪和猪脂肪试样于 50 mL 离心管中, 加入标准工作溶液, 制成 3 个浓度水平的加标样品, 每个浓度做 6 个平行, 按本方法处理后进行测定。结果表明, 11 种待测物的加标回收率为 82.0%~109%, RSD 为 0.71%~9.9% (见表 1)。

表 1 脂肪样品中 11 种目标分析物的加标回收率及相对标准偏差 ($n=6$)
Table 1 Recoveries and relative standard deviations of 11 analytes in fat samples ($n=6$)

Compound	Chicken fat			Pig fat		
	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	RSD (%)	Spiked ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	RSD (%)
Albendazole-2-aminosulfone (阿苯达唑-2-氨基磺)	50	93.4	7.2	50	90.5	9.9
	100	90.5	4.7	100	90.1	7.5
	200	96.7	4.5	200	97.4	5.5
5-Hydroxythiabendazole (5-羟基噻苯达唑)	50	101	2.7	50	109	5.9
	100	90.4	5.8	100	97.8	9.3
	200	89.0	4.3	200	93.1	5.5
Thiabendazole (噻苯达唑)	50	99.7	5.6	50	100	9.9
	100	90.4	4.0	100	98.6	5.0
	200	99.4	2.6	200	98.1	4.9
Mebendazole-amine (2-氨基-5-苯甲酰基苯并咪唑)	50	94.1	5.3	50	100	4.8
	100	90.3	5.7	100	99.7	2.3
	200	95.6	3.8	200	96.9	4.4
5-Hydroxymebendazole (5-羟基甲苯达唑)	50	103	3.6	50	99.8	6.3
	100	98.6	7.0	100	102	6.0
	200	102	1.4	200	95.7	3.8
Oxibendazole (奥苯达唑)	50	98.3	3.1	50	96.1	8.2
	100	88.5	6.7	500	94.7	9.6
	200	101	0.72	1 000	95.7	0.71
Oxfendazole (奥芬达唑)	50	87.7	6.2	50	96.7	4.4
	100	85.1	5.4	100	95.4	6.3
	200	95.1	4.0	200	97.2	4.8
Oxfendazole sulphone (奥芬达唑-2-氨基磺)	50	93.5	7.6	50	97.5	7.1
	100	88.4	3.2	100	97.1	5.5
	200	96.4	3.7	200	96.1	3.7
Flubendazole (芬苯达唑)	50	96.1	7.8	50	97.8	6.8
	100	88.9	5.1	100	101	6.2
	200	96.6	1.1	200	96.0	2.6
Fenbendazole (氟苯达唑)	50	93.5	3.3	50	102	9.6
	100	92.9	4.0	100	95.7	7.2
	200	92.1	2.4	200	94.3	7.6
Ketotriclabendazole (三氯苯达唑酮)	50	89.2	5.7	50	92.8	7.8
	100	82.0	4.4	100	91.2	9.2
	200	90.6	4.0	200	90.1	6.3

2.4 实际样品测定

采用本方法检测了广州市售的鸡脂肪和猪脂肪样品各 30 份, 均未检出以上 11 种苯并咪唑类药物残留标志物, 猪脂肪空白加标样品的色谱图见图 1。本实验室对猪、鸡的肌肉、肝脏、肾脏的日常检测显示, 11 种苯并咪唑类药物残留标志物的检出率极低, 说明养殖行业对该类药物的使用较为规范。

3 结论

本文对抗氧化剂和净化方式进行了优化, 建立了同时测定鸡脂肪和猪脂肪中 11 种苯并咪唑类药物残留标志物的高效液相色谱法。虽然本方法的灵敏度与选择性会明显低于液相色谱-串联质谱法, 但液相色谱仪在基层实验室较为普及, 因此适用性更广泛。本方法的定量下限为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率为 $82.0\% \sim 109\%$, 相对标准偏差为 $0.71\% \sim 9.9\%$, 方法定量准确、抗干扰能力强、重现性好, 能够满足我国相关监管部门的最新技术要求。

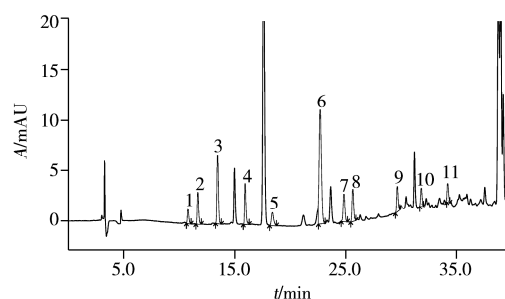


图 1 猪脂肪空白加标样品的色谱图 ($100 \mu\text{g}/\text{L}$)

Fig. 1 Chromatogram of spiked pig fat sample ($100 \mu\text{g}/\text{L}$)

1. albendazole-2-aminosulfone; 2. 5-hydroxythiabendazole;
3. thiabendazole; 4. mebendazole-amine; 5. 5-hydroxymebendazole;
6. oxibendazole; 7. oxfendazole;
8. oxfendazole sulphone; 9. flubendazole;
10. fenbendazole; 11. ketotriclabendazole

参考文献:

- [1] Zhang X F, Xu Z Z, Wang Y W, Cao Y, Wang Y. *Guangdong Chem. Ind.* (张晓峰, 许志忠, 王延伟, 曹毅, 王艳. 广东化工), **2014**, 41(19): 265 - 266.
- [2] Yan H, Zeng Y B, Luo L G. *Heilongjiang Anim. Sci. Veter. Med.* (严寒, 曾艳兵, 罗林广. 黑龙江畜牧兽医), **2012**, 10: 68 - 71.
- [3] Zhang Q C, Yang Y Q, Su Y, Li H M, Li M G, Wu S Q. *J. Instrum. Anal.* (张仟春, 杨燕群, 苏姚, 栗慧敏, 李明刚, 吴诗琪. 分析测试学报), **2017**, 36(6): 718 - 724.
- [4] Zhao C Q, Liu Z, Xu X Y, Luo J W. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (赵超群, 刘柱, 徐潇颖, 罗金文. 理化检验 - 化学分册), **2017**, 53(7): 765 - 770.
- [5] Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Animal Derived Food (Exposure Draft). National Food Safety Standard (动物性食品中兽药最大残留限量(征求意见稿). 食品安全国家标准), **2017**.
- [6] Ministry of Agriculture. No. 235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China(农业部. 中华人民共和国农业部公告第235号). [2008 - 06 - 29].
- [7] GB/T 21324 - 2007. Method for the Determination of Benzimidazoles Residues in Edible Animal Muscle and Liver. National Standards of the People's Republic of China(食用动物肌肉和肝脏中苯并咪唑类药物残留量检测方法. 中华人民共和国国家标准).
- [8] GB/T 22955 - 2008. Determination of Benzimidazoles Residues in Fugu, Eel and Baked Eel—LC - MS - MS Method. National Standards of the People's Republic of China(河豚鱼、鳗鱼和烤鳗中苯并咪唑类药物残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [9] SN/T 2559 - 2010. Determination of Benzimidazole Pesticides Residues in Foodstuffs for Import and Export—LC - MS/MS. Entry - Exit Inspection and Quarantine Industry Standards of the People's Republic of China(进出口食品中苯并咪唑类农药残留量的测定 液相色谱 - 质谱/质谱法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准).
- [10] Zhai W J, Xu Z D, Chen J. *China Poultry*(翟纹静, 徐振东, 陈娟. 中国家禽), **2018**, 40(18): 40 - 44.
- [11] Lin H D, Lin F, Zhang M J, Xie S X, Wu Y X, Shao L Z, Yao Y X. *Food Sci.* (林海丹, 林峰, 张美金, 谢守新, 吴映璇, 邵琳智, 姚仰勋. 食品科学), **2011**, 32(2): 231 - 236.
- [12] Liu Q, Zhu X L, Sun L, Wang S H, Wang X. *Chin. J. Veter. Med.* (刘琪, 朱馨乐, 孙雷, 王树槐, 汪霞. 中国兽药杂志), **2010**, 44(2): 1 - 6.
- [13] Zhang S X, Li J S, Qian C F. *Chin. J. Veter. Sci.* (张素霞, 李俊锁, 钱传范. 中国兽医学报), **2000**, 20(6): 569 - 571.
- [14] Guo Q, Chang X Y. *J. Henan Agric. Sci.* (郭强, 常孝勇. 河南农业科学), **2012**, 41(2): 152 - 156.
- [15] Jia T. *China Dairy*(贾涛. 中国乳业), **2015**, 165(9): 54 - 59.
- [16] Li R, Yang L Q, Luo Y D, Zhang P J, Gao Y Q. *J. Instrum. Anal.* (李蓉, 杨璐齐, 罗阳丹, 张朋杰, 高永清. 分析测试学报), **2018**, 37(5): 547 - 555.
- [17] Gao J, Zhu L P, Ni Y F, Tian X L, Li X P. *J. Food Saf. Qual.* (高洁, 朱莉萍, 倪永付, 田晓林, 李修平. 食品安全质量检测学报), **2015**, 9(6): 1362 - 1368.
- [18] Li X D, Wang J M, Wang X J, Yang H, Ji X F, Xu J, Qian M R. *Chin. J. Anal. Chem.* (李晓丹, 汪建妹, 王向军, 杨华, 吉小凤, 徐杰, 钱鸣蓉. 分析化学), **2019**, 47(2): 297 - 305.

(责任编辑: 丁 岩)