

# 牛肉和牛奶中氮氨基菲啶残留高效液相色谱检测方法的建立

刘凯丽 赵岳 张素霞\* 程林丽 王莹

(中国农业大学 动物医学院,北京 100193)

**摘要** 建立检测牛肉、牛奶中氮氨基菲啶残留量的高效液相色谱法。用乙腈-甲醇(含 0.125 mol/L 甲酸铵)溶液(体积比 50:50)提取试样中的氮氨基菲啶。提取物经 40 °C 下蒸干、甲醇溶解和正己烷除脂后,采用 ODS-3 C<sub>18</sub> 色谱柱,以甲醇-0.1%(体积分数)甲酸水为流动相,梯度洗脱程序分离药物与样品基质,在 380 nm 的紫外检测波长下进行高效液相色谱检测。试验结果表明,氮氨基菲啶在 0.005~1.000 μg/mL 质量浓度范围内呈良好的线性关系( $r>0.99$ )。对空白牛肉、牛奶进行 20~500 μg/kg 的药物添加回收试验,平均回收率范围为 80.3%~93.0%,日内变异系数为 2.8%~5.3%,日间变异系数为 4.0%~8.1%。牛肉和牛奶中氮氨基菲啶的检测限分别为 8 和 6 μg/kg;定量限分别为 25 和 20 μg/kg。该方法快速、准确、灵敏,适用于牛肉、牛奶中氮氨基菲啶的残留检测。

**关键词** 牛肉; 牛奶; 高效液相色谱法; 氮氨基菲啶; 残留

中图分类号 S 859.84

文章编号 1007-4333(2011)05-0116-05

文献标志码 A

## Development high performance liquid chromatograph (HPLC) method for determination of isometamidium residue in beef and milk

LIU Kai-li, ZHAO Yue, ZHANG Su-xia\*, CHENG Lin-li, WANG Ying

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was developed for determination of isometamidium residue in beef and milk. Isometamidium was extracted with acetonitrile-methanol (containing 0.125 mol/L ammonium formate) (50:50) from sample. The extracts were evaporated to dryness at 40 °C, dissolved in methanol and then rinsed with N-hexane. Separation was performed on an ODS-3 C<sub>18</sub> column with a gradient mobile phase of methanol and 0.1% formic acid-water, and the determination was performed with UV detection at 380 nm. The calibration curve was linearity at a range of 0.005~1.000 μg/mL for the isometamidium ( $r>0.99$ ). The recoveries ranged from 80.3% to 93.0% in beef and milk at a fortified concentration of 20 - 500 μg/kg. The inter-day and intra-day coefficients of variation were ranged from 2.8% to 5.3% and 4.0% to 8.1%, respectively. The limit of detections (LOD) of isometamidium in beef and milk were 8 and 6 μg/kg, respectively, while the limit of quantitations (LOQ) of isometamidium in beef and milk were 25 and 20 μg/kg, respectively. It was a rapid, specific, and sensitive method for determining isometamidium residue in beef and milk.

**Key words** beef; milk; HPLC; isometamidium; residue

氮氨基菲啶(isometamidium, ISM)由一组复合的异构体组成<sup>[1]</sup>,其主要组成为 ISM<sup>[2]</sup>,能抑制锥虫

RNA 和 DNA 聚合酶,阻碍核酸合成<sup>[3]</sup>,是一种长效抗锥虫药,常被应用于牛羊等动物的寄生虫病的

收稿日期: 2011-03-14

基金项目: 农业行业标准项目(2008)

第一作者: 刘凯丽,硕士研究生,E-mail:qadin@126.com

通讯作者: 张素霞,教授,博士生导师,主要从事兽医药理学与毒理学研究,E-mail:suxia@cau.edu.cn

防治<sup>[4-6]</sup>,也是世界范围内唯一用作对动物睡眠病进行预防 and 治疗的化学药物<sup>[7]</sup>。但是,氮氨基嘧啶使用的副作用较大,且具有致癌、致畸和致突变作用。不合理的滥用药物不仅对动物本身造成一定的影响,它在动物性食品中的残留还会进一步对人类的健康造成潜在的威胁。我国《农业部第235号公告 动物性食品中兽药最高残留限量》规定:牛肉和牛奶中氮氨基嘧啶的最大残留限量值为100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[8]</sup>。

目前国内外关于氮氨基嘧啶残留检测的报道很少,相关文献中氮氨基嘧啶的测定方法有高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱法等<sup>[9]</sup>,其中前者仪器操作简单、普及面广,是最常用的氮氨基嘧啶检测方法。王国明<sup>[10]</sup>等采用乙腈、甲醇-甲酸铵(0.25 mol/L)混合溶液提取动物源性食品中的氮氨基嘧啶,用液相色谱-质谱/质谱仪进行测定,此方法中,动物组织和牛奶样品需要采用不同的前处理方法,前处理过程中包括提取液定容等繁琐步骤,并且液相色谱-质谱/质谱仪价格较高,导致方法的可推广性低。Kondo<sup>[11]</sup>等采用相同的提取液提取牛组织及牛奶中的氮氨基嘧啶,但是此方法的前处理过程也比较繁琐。张春艳<sup>[12]</sup>等采用乙腈-甲酸铵进行样品提取后测定了乳及乳粉中的氮氨基嘧啶,用高效液相色谱仪进行测定。这个方法的前处理过程简单、易操作,但是仅适用于乳及乳粉中氮氨基嘧啶的测定。针对上述方法存在的问题,本试验拟在前人研究<sup>[9-12]</sup>的基础上,旨在建立能够快速检测牛肉和牛奶中的氮氨基嘧啶残留量的高效液相色谱检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂及药品

氮氨基嘧啶标准品(纯度 $\geq 93\%$ (质量分数)),美国 Fisher 公司生产;甲醇、乙腈为色谱纯,美国 Sigma 公司生产;甲酸、正己烷、无水硫酸钠、甲酸铵为分析纯,美国 Fisher 公司生产;Millipore 超纯水,实验室自制。

400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氮氨基嘧啶标准储备液:准确量取氮氨基嘧啶 20 mg,用甲醇溶解定容至 50 mL。

50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氮氨基嘧啶标准储备液:准确量取 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氮氨基嘧啶 6.25 mL,用甲醇定容至 50 mL。

以上 2 种储备液均于 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下贮藏。

氮氨基嘧啶标准工作液:分别量取 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的氮氨基嘧啶标准储备液 0.001、0.002、0.004、0.010、0.020、0.040、0.100 和 0.200 mL 于 10 mL 容量瓶中,用样品提取液定容稀释成质量浓度为 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100、0.200、0.500 和 1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液。

样品提取液:乙腈和甲酸铵-甲醇溶液(0.25 mol/L)各 500 mL,混匀(甲酸铵-甲醇溶液(0.25 mol/L)为称取 15.8 g 甲酸铵溶于 1 000 mL 甲醇中)。

### 1.2 仪器设备

组织匀浆机,AM-6 型(日本 NISSEI 精机制作所);电子天平,AE240 型(美国塞多利斯科技发展有限公司);漩涡混合仪,WH-1 型(上海沪西分析仪器厂);超纯水仪,Mili Q 型(美国 Millipore 公司);离心机,LD4-2A 型(北京医用离心机厂);旋转蒸发器,BUCHI R-200 型(瑞士 BUCHI 公司);氮吹仪,N-EVAP 112 型(美国 Organomation Associates 公司);微孔滤膜,0.2  $\mu\text{m}$ (美国 Waters 公司);高效液相色谱仪,Waters 2695 型/配 Waters 2996 型二极管阵列检测器(美国 Waters 公司)。

### 1.3 样品前处理

取适量新鲜或解冻的空白或供试动物组织,剪碎,置于组织匀浆机中高速匀浆。准确称取(5.00 $\pm$ 0.05)g 样品于 50 mL 离心管中,加入 2 g 无水硫酸钠(牛奶样品除外),加入 20 mL 提取液,涡动 1 min,3 800 r/min 离心 5 min,取上清于 100 mL 鸡心瓶中。下层用提取液重复提取 1 次,合并两次提取液。40  $^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸发至干,用 1.0 mL 甲醇溶解残渣,旋涡 30 s,转移至 10 mL 试管中,加 1 mL 饱和了 80% 甲醇水的正己烷溶液,旋涡 1 min,3 000 r/min 离心 3 min,弃上层正己烷。再用饱和了 80% 甲醇水的正己烷溶液,旋涡 1 min,3 000 r/min 离心 3 min,取下层溶液过膜,进 HPLC 分析。

### 1.4 高效液相条件

色谱柱,ODS-3 C18 柱,250 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 5  $\mu\text{m}$ ;流动相,甲醇、0.1%(体积分数)甲酸水梯度洗脱(洗脱梯度见表 1);流速,1 mL/min;柱温,30  $^{\circ}\text{C}$ ;检测波长,380 nm;进样体积,100  $\mu\text{L}$ 。

表1 梯度洗脱程序表

Table 1 Gradient elution schedules

时间/min	$\varphi(0.1\% \text{甲酸水})/\%$	$\varphi(\text{甲醇})/\%$
0	90	10
8	90	10
10	50	50
12	90	10
15	90	10

### 1.5 灵敏度的测定

取空白样品,设10个平行,按上述方法处理后进样分析,得到空白样品的色谱图,测得药物保留时间处的基线噪音值,将其与标准工作溶液的响应值进行比较。以3倍信噪比(3 S/N)所对应的样品中药物浓度为检测限(LOD),以10倍信噪比(10 S/N)所对应的样品中药物的浓度为定量限(LOQ)。

### 1.6 准确度与精密度的测定

为了评价方法的准确度及精密度,根据各自定量限的不同,用空白牛肉和空白牛奶样品分别进行25、50、100、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和20、50、100、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 各4个水平的添加回收率试验,每个水平设5个平行,重复试验3次,计算药物的添加回收率、批内和批间变异系数。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测波长的选择

对氮氨菲啶标准溶液进行二极管阵列扫描,获得了200~400 nm范围内的紫外扫描图(图1)。由

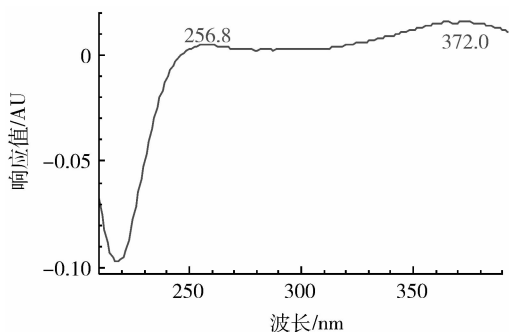


图1 氮氨菲啶紫外扫描

Fig.1 UV scan for isometamidium

图1可知,氮氨菲啶在372 nm附近的紫外可见光下有强吸收峰。因此,选择波长380 nm进行液相检测。

### 2.2 方法的线性相关性

对质量浓度为0.005~1.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氮氨菲啶系列标准溶液,在选定的色谱条件下进行测定,用峰面积与标准工作溶液的浓度做标准曲线图,结果显示两者呈线性关系。线性回归方程为 $y=0.0375x-0.1015$ ,相关系数为0.9992。

### 2.3 方法的灵敏度

按照1.5中的方法计算可得,牛肉和牛奶中氮氨菲啶的检测限分别为8和6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;定量限分别为25和20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2.4 方法的准确度与精密度

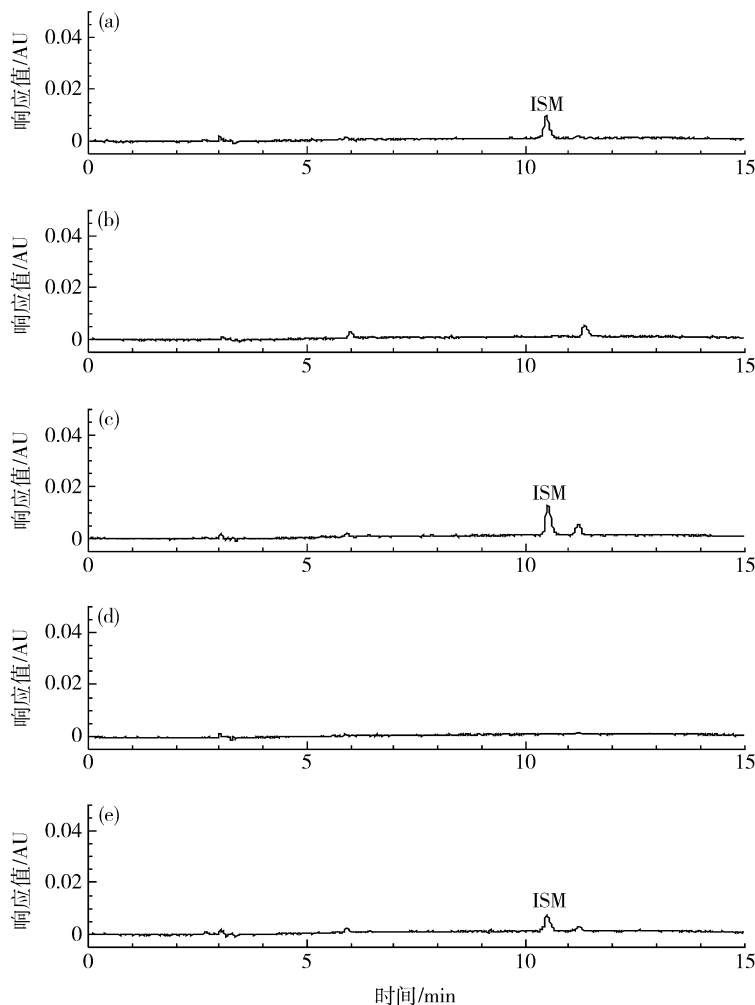
用空白牛肉及空白牛奶样品分别进行25、50、100和500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以及20、50、100和500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 各4个水平的添加回收率试验,重复试验3次,计算药物的添加回收率、批内和批间变异系数(表2)。由表2可知,本方法的平均回收率为80.3%~93.0%,日内变异系数为2.8%~5.3%,日间变异系数为4.0%~8.1%,符合残留分析的要求。

表2 牛肉和牛奶中氮氨菲啶添加回收率和变异系数

Table 2 Recoveries and coefficient variation of Isometamidium in beef and milk

样品类别	添加质量比/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率/%	日内变异系数/% ( $n=4$ )	日间变异系数/% ( $n=3$ )
牛奶	20	93.0	5.3	5.6
	50	85.4	4.7	5.4
	100	83.2	4.2	4.7
	500	81.6	3.6	8.1
牛肉	25	89.7	4.2	4.0
	50	81.6	2.8	6.2
	100	84.5	3.9	5.0
	500	80.3	4.2	4.8

氮氨菲啶的色谱保留时间约为10.5 min,峰形良好,与样品中的杂质峰以及溶剂峰都能很好的分离(图2)。



(a) 为 100 ng/mL 标准溶液；(b) 为空白牛肉样品；(c) 为 25 ng/g 空白添加牛肉样品；(d) 为空白牛奶样品；(e) 为 20 ng/g 空白添加牛奶样品；ISM：氮氨基菲啶。

图 2 药物添加牛肉、牛奶样品中氮氨基菲啶的 HPLC 色谱

Fig. 2 HPLC chromatograms of isometamidium in spiked beef and milk

## 3 讨论

### 3.1 提取条件的选择

仅有的文献报道氮氨基菲啶样品前处理过程大多类似。如张春艳<sup>[11]</sup>等采用乙腈-甲酸铵进行样品提取，虽然简单方便，但不适用于对牛肉样品的提取。王国明等<sup>[10]</sup>采用乙腈、甲醇-甲酸铵(0.25 mol/L)等体积混合的溶液提取样品，适用于牛肉、牛奶等多种动物源性食品样品的提取，但是其样品前处理过程包括提取液定容、氮吹浓缩等步骤操作费时、不方便。本研究中选用的方法，使前处理过程简单、易操作，适用于牛肉及牛奶中氮氨基菲啶的测定，使用的高效液相色谱仪普及面广。

### 3.2 净化条件的选择与优化

在进行残留检测时，组织中的脂肪会影响检测结果，有报道可采用正己烷进行除脂<sup>[10]</sup>。然而试验中发现使用纯正己烷虽然能达到良好的除脂效果，但是会降低回收率。而使用饱和甲醇水的正己烷不仅不会影响回收率，同时也能达到很好的除脂效果，因此本试验中采用饱和甲醇水的正己烷进行除脂。

### 3.3 流动相的选择与优化

HPLC 分离氮氨基菲啶通常采用甲醇：0.2% 甲酸，梯度洗脱；或浓度 0.03 mol/L 柠檬酸溶液(含浓度为 0.005 mol/L 庚烷磺酸钠)：乙腈，体积比为 30：70，等度洗脱。此外，Schad<sup>[13]</sup>等采用乙腈：甲酸铵(体积比为 25：75)，Tettye<sup>[14]</sup>等采用乙腈：磷

酸二氢钾(pH 3.0, 体积比为 25 : 75)为流动相对氮氨基菲啶进行测定。考虑到后 2 种报道的流动相含盐浓度太高, 易引起液相流路的堵塞, 本试验对前 2 种文献报道的流动相组成进行了尝试。结果表明, 采用甲醇 : 0.2% 甲酸梯度洗脱时, 标准物质刚好与杂质峰重合, 无法分离。采用浓度为 0.03 mol/L 柠檬酸溶液(含浓度为 0.005 mol/L 正己烷磺酸钠) : 乙腈 = 30 : 70(体积比), 标准品与样品中目标物出峰时间相同, 且附近无杂质峰, 可以很好分离, 但配制起来相对要麻烦。在这些试验的基础上, 进一步研究采取不同比例的甲醇 : 甲酸水进行梯度洗脱或等度洗脱, 发现使用甲醇 : 0.1% 甲酸水进行梯度洗脱时, 氮氨基菲啶与杂质峰得到了充分的分离, 又方便配制, 因此采用它作为本方法的流动相。

本研究建立了牛肉和牛奶中氮氨基菲啶检测的高效液相色谱法, 检出限分别为 8 和 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 符合我国《农业部第 235 号公告 动物性食品中兽药最高残留限量》<sup>[8]</sup>的相关规定(最大残留限量值为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。该方法简单、准确、灵敏, 适用于牛肉、牛奶中氮氨基菲啶的残留检测。

### 参 考 文 献

- [1] Clarke E G C. Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material [J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1970, 13(2): 338
- [2] Kinabo L D B, Bogan J A. The pharmacology of isometamidium [J]. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1988, 11: 233-245
- [3] 陈杖榴, 朱蓓蕾, 袁宗辉, 等. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 294
- [4] Wesongah J O, Jones T W, Kibugu J K, et al. A comparative

study of the pharmacokinetics of isometamidium chloride in sheep and goats[J]. *Small Ruminant Research*, 2004, 53: 9-14

- [5] 中华兽药大典编辑委员. 中华兽药大典[M]. 北京: 北京科大电子出版社、中国农业出版社, 2005
- [6] Grrrets S, Diarra B, Eister M C, et al. Extension of the prophylactic effect of isometamidium against trypanosome infections in cattle using a biodegradable copolymer[J]. *Acta Tropica*, 1999, 73: 49-58
- [7] Wang C C. Molecular mechanisms and therapeutic approaches to the treatment of african trypanosomiasis[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1995, 35: 93-127
- [8] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部第 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留限量[EB/OL]. (2002)[2010-03-12]. <http://wenku.baidu.com/view/0d3b5be8551810a6f5248632.html>
- [9] 李元平, 王大宁, 唐英章, 等. 食品中农用化学品残留检测方法[M]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 77-78
- [10] 王国明, 陈冬东, 李贤良, 等. SN/T 2239-2008, 进出口动物源性食品中氮氨基菲啶检测方法 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009
- [11] Kondo K, Horie M, Murayama M, et al. Determination of residual isometamidium in cattle tissues and milk by HPLC [J]. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 1999, 40 (3): 211-217
- [12] 张春艳, 潘国卿, 白国涛, 等. 高效液相色谱法测定乳及乳粉中氮氨基菲啶[J]. *中国乳品工业*, 2009, 37(9): 32-35
- [13] Schad G J, Allanson A, Mackay S P, et al. Development and validation of an improved HPLC method for the control of potentially counterfeit isometamidium products [J]. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2008, 46: 45-51
- [14] Tetley J N A, Skellern G G, Midgley J M, et al. HPTLC and HPLC determination of isometamidium in the presence of its manufacturing and degradation impurities [J]. *Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1998, 17: 713-718

(责任编辑: 苏燕)