

同时检测 2 种均三嗪类抗球虫药物残留的样品前处理方法的比较

施祖灏^{1,2}, 葛庆联², 陆俊贤², 刘学贤², 龚建森²,

朱良强³, 祁克宗^{1*}, 陈玎玎⁴, 彭开松¹

(1. 安徽农业大学动物科技学院, 安徽 合肥 230036; 2. 中国农业科学院家禽所, 农业部家禽品质监督
检验测试中心, 江苏 扬州 225003; 3. 安徽省动物疫病预防与控制中心, 安徽 合肥 230036;
4. 安徽农业大学生物技术中心, 安徽 合肥 230036)

摘要 :以均三嗪类抗球虫药物地克珠利和妥曲珠利的鸡组织残留样品为研究对象,采用高效液相色谱(HPLC)分离,紫外(UV)检测,采用乙腈萃取-蒸发浓缩、乙腈萃取-固相萃取(SPE)、基质固相分散萃取(MSPD)和MSPD-SPE 4种方法对鸡组织中含地克珠利和妥曲珠利残留的样品的前处理效果进行了比较。前3种方法的平均回收率均达到70%以上,能满足残留分析的要求。其中MSPD方法与其他方法相比,节约时间60%以上,节约溶剂也达60%。鉴于此,采用基质固相分散萃取作为鸡组织样品的前处理方法,建立了鸡组织中地克珠利和妥曲珠利残留的MSPD-HPLC/UV同时分析检测方法。在优化的色谱条件下,方法的线性范围为50~1 000 $\mu\text{g/L}$;在50, 500, 1 000 $\mu\text{g/kg}$ 的添加水平下,地克珠利和妥曲珠利在鸡组织中的回收率为71.13%~84.02%,相对标准偏差(RSD)为3.76%~12.11%;方法的日内和日间测定的RSD范围为3.70%~6.77%。地克珠利和妥曲珠利的检出限均小于10 $\mu\text{g/g}$,定量限均小于20 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法在准确度、精密度的均达到了残留分析的要求。

关键词 :基质固相分散萃取;高效液相色谱;样品前处理;地克珠利;妥曲珠利;残留;鸡组织

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2009)03-0303-05 栏目类别 :研究论文

Comparison of pretreatment methods for the simultaneous determination of diclazuril and toltrazuril residues in chicken tissues

SHI Zuhao^{1,2}, GE Qinglian², LU Junxian², LIU Xuexian², GONG Jiansen²,

ZHU Liangqiang³, QI Kezong^{1*}, CHEN Dingding⁴, PENG Kaisong¹

(1. College of Animal Science & Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Quality Inspection Center for Poultry of Ministry of Agriculture, Poultry Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Yangzhou 225003, China; 3. Anhui Province Center for Disease Control & Prevention, Hefei 230036, China; 4. Center for Biotechnology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract : The effects of four pretreatment methods (acetonitrile extraction-evaporation concentration, acetonitrile extraction-solid phase extraction (SPE), matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction and MSPD-SPE) for the simultaneous analysis of diclazuril and toltrazuril residues in chicken tissues were compared. The average recovery of 70% for the former three methods as achieved. In comparison with other methods, the MSPD method saved more than 60% in time and solvent. So, MSPD as the sample pretreatment method, an MSPD-high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (MSPD-HPLC/UV) method was established for the analysis. Under the optimal chromatographic conditions, the linear range was between 50 and 1 000 $\mu\text{g/kg}$. At the added levels of 50, 500, 1 000 ng/g , the recoveries of diclazuril and toltrazuril in chicken tissues ranged from 71.13% - 84.02% with the relative standard deviations (RSD) in the range of 3.76% - 12.11%, and the RSDs of intra- and inter-day analyses ranged from 3.70% - 6.77%. The detection limits of diclazuril and toltrazuril were less than 10 $\mu\text{g/g}$. The quantitative limits of diclazuril and toltrazuril were less than 20 $\mu\text{g/kg}$. The method meet the requirements of the residue analysis on accuracy and precision.

Key words : matrix solid-phase dispersion extraction; high performance liquid chromatography (HPLC); sample pretreatment; diclazuril; toltrazuril; residues; chicken tissues

* 通讯联系人: 祁克宗, 博士, 教授, 主要从事动物源性食品安全研究. E-mail: jwcqkz@ahau.edu.cn.

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划课题的子课题(2006BAK02A08-4).

收稿日期: 2008-09-30

目前畜禽生产中使用的均三嗪类抗球虫药物主要有两种:地克珠利(diclazuril)和妥曲珠利(toltrazuril)。二者都具有高效、低毒、广谱的驱球虫的特点,其抗球虫效果优于莫能菌素、氨丙啉、拉沙菌素、尼卡巴嗪和氯羟吡啶等抗球虫药物。二者因抗鸡球虫效果显著,已广泛应用于畜禽球虫病的防治^[1-3]。国际食品添加剂联合专家委员会(JECFA)在1996年及1998年和欧盟药品管理局(EMA)在1996年及2004年分别在地对地克珠利和妥曲珠利的毒理学研究数据评估后,制定了二者的日允许摄入量和最高残留限量。EMA在其评估报告中推荐使用气相色谱-电子捕获检测法(GC- μ ECD)检测羊、猪和牛的可食性组织中地克珠利的残留^[4-6]。由于地克珠利和妥曲珠利在紫外吸收光谱(UV)上的差异,目前尚未见同时分析地克珠利与妥曲珠利药物残留的报道。

动物性食品中兽药残留的特点是样品中残留物浓度很低,样品基质复杂,干扰物质多,不易从样品中分离、纯化残留物。因此,兽药残留分析是对复杂生物样品基质中痕量组分的分析,样品的分离纯化是兽药残留分析中最费时和劳动强度最大的步骤。基质固相分散(matrix solid-phase dispersion, MSPD)是由Barker等^[7,8]于1989年在固相萃取(SPE)基础上提出并给于理论解释的一种样品处理技术,该方法现已被用于近40种兽药的残留分析^[9-12]。

本实验以地克珠利和妥曲珠利残留的鸡组织样品为研究对象,采用高效液相色谱(HPLC)分离,紫外检测,以乙腈萃取-蒸发浓缩、乙腈萃取-SPE、MSPD和MSPD-SPE 4种方法对鸡组织中含地克珠利和妥曲珠利残留的样品进行前处理,并对样品前处理效果进行比较,最终选择萃取效果和净化效果均较好的MSPD方法建立了鸡组织中地克珠利和妥曲珠利残留同时检测的MSPD-HPLC/UV方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),配低压四元泵、脱气泵、紫外检测器、自动进样器和柱温箱;12 孔固相萃取装置(美国 Supelco 公司);AM-6 组织匀浆机(日本 Nihonseiki Kaisha Ltd.);RE-52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化有限公司);D-37520 冷冻离心机(德国 Osterode am Harz 公司)。

C18 填料(粒径 40 μ m,美国 Alltech 公司);地克珠利(纯度为 99.7%),妥曲珠利(纯度为 99.8%)(美国 Sigma 公司);乙腈、甲醇和四氢呋喃(色谱

纯,美国 Fisher 公司);其他试剂均为分析纯,Millipore 高纯水(18.2 M Ω ·cm)。

1.2 实验方法

1.2.1 填料和标准溶液的制备

C18 填料:取 22 g C18 填料,装入 50 mL 玻璃注射器,分别依次用两倍柱体积的正己烷、二氯甲烷和甲醇洗涤,真空干燥,贮存于磨口玻璃干燥器内备用。

混合标准溶液:精密称取地克珠利和妥曲珠利标准品各 10.0 mg,置于 100 mL 容量瓶中,用 25 mL 四氢呋喃溶解后,用 60% 乙腈水溶液定容,摇匀 2~8 $^{\circ}$ C 避光存放,使用时用 60% 乙腈水溶液稀释至所需浓度。

1.2.2 色谱条件

Symmetry C18 色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m,美国 Waters 公司);流动相为 0.05 mol/L 磷酸(用三乙胺调 pH 至 3.0)-乙腈(体积比为 40:60),流速 1.0 mL/min;检测波长 240 nm,满量程吸光值(AUFS)0.05,进样体积 20 μ L,柱温 20 $^{\circ}$ C。

1.2.3 样品采集

健康爱拔益加(AA)肉鸡,饲喂不含抗球虫药物的全价日粮。10 d 后,采集肝脏、肾脏、肌肉样品,置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。

1.2.4 乙腈萃取-蒸发浓缩(方法一)

取适量空白组织,以 15 000 r/min 匀浆 1 min。准确称取 5.0 g(肌肉、肝脏)或 2.0 g(肾脏;鸡肾体积小,样本量少)组织于 30 mL 离心管中,添加药物标准溶液 1.0 mL(空白对照样品添加 1.0 mL 乙腈)及 5 g 无水 Na_2SO_4 。再加入 10 mL 乙腈、5 mL 正己烷,涡旋振荡,以 5 000 r/min 离心 5 min,移取乙腈层至另一离心管。重复提取一次,合并乙腈层。加入 5 mL 正丙醇,50 $^{\circ}$ C 下旋转蒸发,浓缩至近干。用 1 mL \times 4 流动相润洗鸡心瓶,一并转入 5 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,取 1 mL 过 0.22 μ m 滤膜,待 HPLC 检测。

1.2.5 乙腈萃取-SPE 净化(方法二)

空白添加组织样(同“1.2.4”节)经乙腈萃取后,加入 5 mL 正丙醇,于 50 $^{\circ}$ C 下旋转蒸发,浓缩至近干。用 2 mL 甲醇溶解残渣,再加入 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液 8 mL 溶解残留物,过 C18 小柱(预先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化),用 8 mL 正己烷洗涤,8 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液。加入 3 mL 正丙醇,50 $^{\circ}$ C 下旋转蒸发,浓缩至干。用 1 mL 流动相溶解残留物,过 0.22 μ m 滤膜,待 HPLC 检测。

1.2.6 MSPD(方法三)

称 2 g C18 填料置于玻璃研钵中,将 0.5 g 剂

碎的鸡组织样品加到研钵中的 C18 填料上,向鸡组织中添加药物标准溶液 1.0 mL,研匀,在通风柜中放置 2~5 min 后,将其转入色谱柱中。色谱柱自下而上依次装入玻璃棉、1.5 g 无水 Na_2SO_4 、样品与 C18 填料的混合物、0.5 g 无水 Na_2SO_4 ,压紧。分别用 8 mL 正己烷、8 mL 甲醇-水(体积比为 1:4)溶液淋洗,然后用 8 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,50 °C 下旋转蒸发至干,用 0.5 mL 流动相溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜,待 HPLC 检测。

1.2.7 MSPD-SPE(方法四)

空白组织添加样(同“1.2.6”节)经 MSPD 萃取后,50 °C 下旋转蒸发至干,用 2 mL 甲醇溶解残渣,加入 8 mL 0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液,过 C18 小柱(预先用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化),用 8 mL 正己烷洗涤,8 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液。加入 3 mL 正丙醇,50 °C 下旋转蒸发,浓缩至干。用 0.5 mL 流动相溶解残留物,过 0.22 μm 滤膜,待 HPLC 检测。

上述 4 种处理方法中每种方法制备 3 个平行样,同时制备空白对照样品。

2 结果与讨论

2.1 萃取溶剂的选择和回收率的比较

采用空白肌肉添加标准品的方法(添加量 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$),比较了乙腈萃取、乙腈萃取-SPE 净化、MSPD 和 MSPD-SPE 4 种方法的样品添加回收率,结果见表 1。

表 1 在不同样品前处理方法下的添加回收率($n=3$)

Table 1 Recoveries of different pretreatment methods ($n=3$) %

Drug	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4
Diclazuril	95.18	79.09	83.55	62.69
Toltrazuril	85.22	73.26	78.57	60.79

Methods: 1. acetonitrile extraction; 2. acetonitrile extraction-SPE; 3. MSPD; 4. MSPD-SPE.

从表 1 的结果可以看出,前 3 种方法的平均回收率均达到了 70% 以上,都可以满足残留分析的要求。对于地克珠利,方法一单纯使用乙腈萃取-蒸发浓缩方法,回收率最高,与其他 3 种方法相比差异显著($P < 0.05$);方法 2 与方法 1,4 差异显著($P < 0.05$)和方法 3 的差异不显著,但方法 3 的回收率略高于方法 2。对于妥曲珠利,方法 1 的回收率也是最高,但其与方法 3 的差异不显著,而方法 2 与方法 3 的差异显著($P < 0.05$)。

在选择萃取溶剂时,参照郭永刚等^[13]报道的方法采用乙酸乙酯进行萃取,结果发现在乙酸乙酯的挥干物中含有一种杂质,其保留时间在选定的色谱条件下与地克珠利相似,干扰检测。改用乙腈萃取

后获得较好的萃取效果,回收率与 Kanda 等^[14]和 Hormazabal 等^[15]报道的基本一致,达到 90% 以上。但单纯的溶剂萃取对鸡组织中杂质的净化效果差,易堵塞柱头,导致柱效下降、柱压不稳和色谱柱老化。将乙腈萃取与 SPE 净化结合后,大大改善了对样品的净化效果,虽然其回收率较单纯的溶剂萃取有明显的下降($P < 0.01$),但也达到了残留分析的要求。

2.2 不同前处理方法萃取时间和溶剂消耗的比较

比较了 4 种前处理方法在处理单个样品和批量(10 个)样品时萃取时间和溶剂消耗的差别,结果见表 2。可以看出 MSPD 方法在时间消耗和溶剂消耗上均明显少于其他几种方法,与最常用的乙腈萃取-SPE 净化方法相比,其节约时间 60% 以上,节约溶剂也达 60% 左右。

表 2 不同前处理方法的萃取时间和溶剂消耗的差别
Table 2 Extraction time and solvent consumption of different pretreatment methods

Method ^a	Number of sample	Extraction time/min	Solvent consumption/mL
1	1	25-30	35
	10	150-180	350
2	1	55-60	65
	10	300-360	650
3	1	20-25	18.5
	10	100-120	185
4	1	50-55	38.5
	10	180-220	385

* For methods, see Table 1.

2.3 不同前处理方法的色谱分析结果的比较

在兽药残留分析中,不同的样品前处理方法对样品的净化效果有着很大的差别(见图 1)。综合表 1 的回收率数据和图 1 所示可以看出,样品前处理方法一单纯地使用乙腈萃取,即使经过蒸发浓缩后,鸡组织样品中的杂质还是很多,虽然地克珠利和妥曲珠利能够获得较好的分离,回收率也较高,但在色谱图上会出现很高的杂质峰,对于低水平残留分析会造成干扰;且样品中含有的杂质对液相色谱柱也会造成损害,减少其使用寿命。在方法二中,鸡组织样品经乙腈萃取后,再经 C18 固相萃取柱净化,不仅可以获得良好的回收率,而且样品的净化效果也达到了令人满意的程度。方法三采用 MSPD 进行样品前处理,虽然样品的净化效果要较方法二差一些,但回收率较方法二高,且方法三操作简单方便,有机溶剂消耗少,在分析速度、成本和环境友好性上相对于方法二有较大的优势。方法四的回收率较低。所以,本研究后续试验中采用 MSPD 方法作为鸡组织样品的前处理方法。

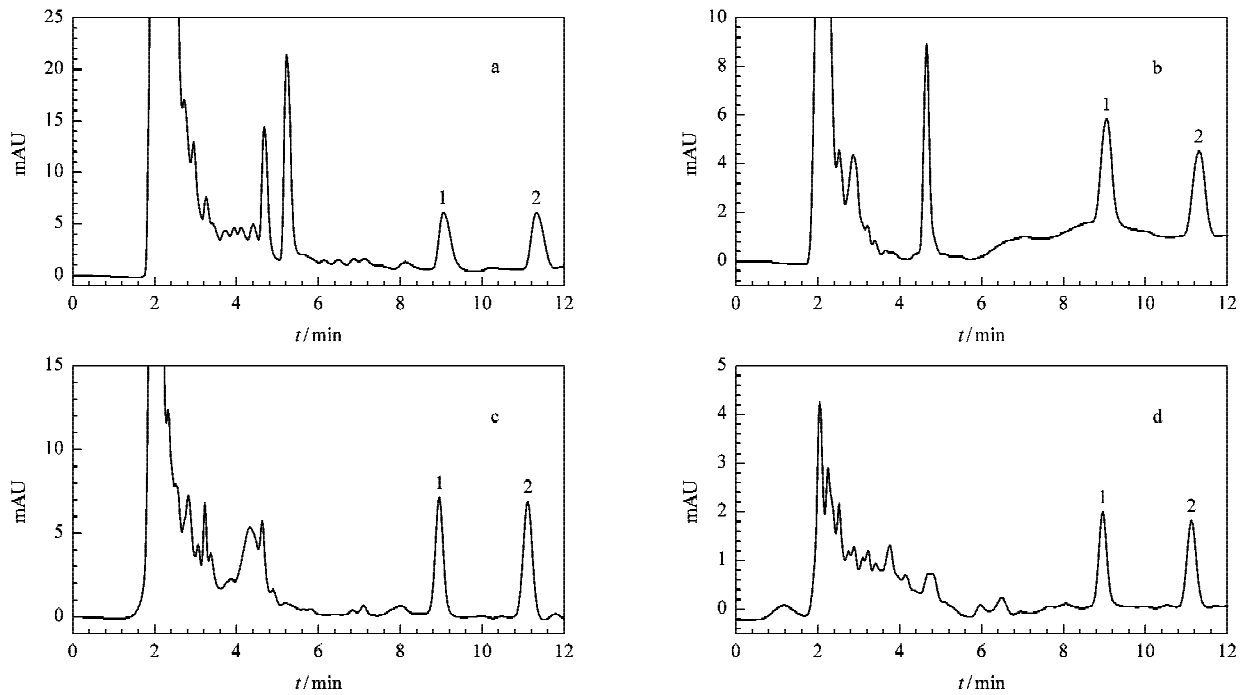


图 1 四种不同前处理方法的鸡肌肉组织的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of a muscle sample treated with the four sample pretreatment methods

Sample pretreatment methods : a. acetonitrile extraction ; b. acetonitrile extraction-SPE ; c. MSPD ; d. MSPD-SPE.
Peaks : 1. diclazuril ; 2. toltrazuril.

2.4 MSPD-HPLC 方法的建立

2.4.1 标准曲线和方法的检出限、定量限

用 60% 乙腈水溶液将混合储备标准液稀释为 50, 100, 200, 500, 1 000 $\mu\text{g/L}$ 的系列工作标准液, 并分别进行液相色谱分析。每个浓度点重复测定 4 次, 以目标药物的色谱峰面积 S (mAu \cdot s) 对质量浓度 C ($\mu\text{g/L}$) 做标准曲线, 得地克珠利的标准曲线为 $S = 0.0474C + 1.552$, $r = 0.9998$; 妥曲珠利的标准曲线为 $S = 0.0424C + 0.919$, $r = 0.9995$ 。在阴性鸡肉样品中, 以 5, 10, 15 $\mu\text{g/kg}$ 的水平添加地克珠利和妥曲珠利, 结果发现在 10 $\mu\text{g/kg}$ 的添加水平下, 地克珠利和妥曲珠利的信噪比 (S/N) 均大于 3, 因此确定 2 种目标药物的检出限 (LOD) 为 10 $\mu\text{g/kg}$ 。以 S/N 大于 10 确定方法的定量限 (LOQ), 得 LOQ 为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.4.2 精密度和准确度

称取 2 g C18 填料置于玻璃研钵中, 将 0.5 g

剁碎的鸡组织样品加到研钵中的 C18 填料上, 添加 1 mL 混合标准溶液 (25, 250, 500 $\mu\text{g/L}$), 使鸡组织中的目标药物含量分别相当于 50, 500 和 1 000 $\mu\text{g/kg}$, 研匀, 按优化后的 MSPD 方法处理。

取处理后的高、中、低 3 种含量水平的鸡肌肉组织样品各 3 份, 按优化后的 MSPD 方法处理后进行测定。分别于同日内 5 个不同时间点及 3 个不同日内重复制样测定, 计算日内相对标准偏差 (RSD) 和日间 RSD。由表 3 可以看出, 地克珠利和妥曲珠利的日内、日间 RSD 均低于 8%, 符合残留分析对精密度的要求。

取目标药物含量为 50, 100, 1 000 $\mu\text{g/kg}$ 3 种水平的加标鸡组织样品各 5 份, 按优化后的 MSPD 方法处理后进行 HPLC 测定。用测定结果与实际添加药物浓度的比值计算样品的添加回收率。由表 4 的结果可看出, 地克珠利和妥曲珠利在 3 种鸡组织中的回收率均大于 70%, 符合残留检测的要求。

表 3 地克珠利和妥曲珠利的测定精密度

Table 3 Precision of determination of diclazuril and toltrazuril

Drug	Added/(ng/g)	Intra-day (n=5)		Inter-day (n=3)	
		($X \pm SD$)/(ng/g)	RSD/%	($X \pm SD$)/(ng/g)	RSD/%
Diclazuril	50	39.71 \pm 2.09	5.27	38.30 \pm 2.59	6.77
	500	395.93 \pm 24.20	6.11	387.94 \pm 29.91	7.71
	1000	803.98 \pm 32.47	3.70	780.60 \pm 28.85	4.04
Toltrazuril	50	39.11 \pm 2.46	6.30	37.36 \pm 2.50	6.69
	500	389.02 \pm 20.86	5.36	382.82 \pm 23.62	6.17
	1000	784.00 \pm 38.15	4.87	764.33 \pm 43.73	5.72

表 4 地克珠利、妥曲珠利在鸡组织样品中的提取回收率($n = 5$)
Table 4 Recoveries of diclazuril and toltrazuril spiked in chicken tissues ($n = 5$)

Sample	Drug	Added/(ng/g)	Found ($X \pm SD$)/(ng/g)	Recovery/%	Average recovery/%	RSD/%
Muscle	diclazuril	50	38.51 \pm 2.35	77.03	78.42	6.09
		500	412.79 \pm 20.72	82.56		5.02
		1000	756.89 \pm 75.69	75.69		9.41
	toltrazuril	50	40.95 \pm 4.96	81.90		12.11
		500	373.23 \pm 28.00	74.65		7.50
		1000	784.81 \pm 40.95	78.48		5.22
Liver	diclazuril	50	36.46 \pm 2.16	72.91	75.18	5.92
		500	357.06 \pm 40.20	71.41		11.26
		1000	812.25 \pm 41.69	81.22		5.13
	toltrazuril	50	38.65 \pm 3.73	77.29		9.66
		500	403.57 \pm 26.49	80.71		6.56
		1000	711.29 \pm 50.33	71.13		7.08
Kidney	diclazuril	50	40.03 \pm 1.58	84.06	77.63	3.76
		500	375.70 \pm 27.59	75.14		7.34
		1000	736.85 \pm 44.32	73.69		6.01
	toltrazuril	50	38.27 \pm 2.83	76.54		7.39
		500	387.51 \pm 23.56	77.50		6.08
		1000	749.84 \pm 54.20	74.98		7.23

3 结论

本实验对溶剂萃取-蒸发浓缩、溶剂萃取-C18 固相萃取、MSPD 和 MSPD-C18 固相萃取 4 种方法对含地克珠利和妥曲珠利残留的鸡组织样品的前处理效果进行了比较。其中 MSPD 处理样品耗时短、溶剂节省、样品用量少,回收率和基质净化效果均得到较为满意的结果。所建立的鸡组织中地克珠利和妥曲珠利残留 MSPD-HPLC/UV 同时检测方法,在准确度、精密度上均达到了药物残留分析的要求。

参考文献:

- [1] Calnek B W. Diseases of poultry. 10th ed. Gao F, et al. transl. Beijing: China Agricultural Press (Calnek B W. 禽病学. 10 版. 高福,等译. 北京:中国农业出版社), 1999:1 094
- [2] Taylor M A, Catchpole J, Marshall J, et al. Vet Parasitol, 2003, 116(4): 305
- [3] Mundt H C, Dauschies A, Wustenberg S, et al. Parasitol Res, 2003, 90: S160
- [4] EMEA. Veterinary medicines evaluation unit: toltrazuril, summary report (1). 1998. [2006-08-20]. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/031497en.pdf>
- [5] JECFA. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: diclazuril. WHO food additives series 36, Geneva, 1996. [2006-08-20]. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v041je08.htm>
- [6] JECFA. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food: diclazuril. WHO food additives series 41, Geneva, 1998. [2006-08-20]. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je01.htm>
- [7] Barker S A. J Chromatogr A, 2000, 885(1/2): 115
- [8] Barker S A, Long A R, Shoa C I. J Chromatogr, 1989, 475: 353
- [9] Dubois M, Pierret G, Delahaut P. J Chromatogr B, 2004, 813(1/2): 181
- [10] Berardi G, Bogianni S, Curini R, et al. J Agric Food Chem, 2006, 54(13): 4 537
- [11] Bogianni S, Di Corcia A, Lagana A, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2007, 21(2): 237
- [12] Herlrich K. Official methods of analysis of the AOAC. 15th ed. Arlington VA: AOAC International, 1990
- [13] Guo Y G, Jiang S X. Animal Husbandry & Veterinary Medicine (郭永刚, 江善祥. 畜牧与兽医), 2007, 7: 37
- [14] Kanda M, Ushiyama K, Igusa K. Shokuhin Eiseigaku Zasshi, 2003, 44(2): 110
- [15] Hormazabal V, Magne Y, Oyvin O. J Liq Chromatogr Rel Technol, 2003, 26(5): 791