

杨 林, 薄永恒, 高迎春, 等. 高效液相色谱法检测鸭、鹅可食组织中乙氧酰胺苯甲酯残留量[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 265–267.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.087

# 高效液相色谱法检测鸭、鹅可食组织中乙氧酰胺苯甲酯残留量

杨 林, 薄永恒, 高迎春, 陈 玲, 陆庆泉, 张呈军, 魏秀丽

(山东省兽药质量检验所/山东省畜产品质量安全监测与风险评估重点实验室, 山东济南 250022)

**摘要:**建立了鸭、鹅组织中乙氧酰胺苯甲酯残留量检测的高效液相色谱分析方法。试样中残留的乙氧酰胺苯甲酯用乙腈提取, 浓缩后用正己烷-丙酮溶解残余物, 硅酸镁固相萃取柱净化, 用甲醇洗脱, 收集洗脱液作为试样溶液供高效液相色谱测定。该方法在乙氧酰胺苯甲酯 0.05~5.0  $\mu\text{g/mL}$  的系列浓度范围内均呈良好线性关系, 相关系数( $r$ )均大于 0.990。肌肉样品中乙氧酰胺苯甲酯的检测限为 20  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 50  $\mu\text{g/kg}$ ; 肝、肾样品中乙氧酰胺苯甲酯的检测限为 50  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 100  $\mu\text{g/kg}$ ; 各组织样品中平均添加回收率均为 70%~110%, 相对标准偏差( $RSD$ )均小于 20%。该方法具有简便快捷、灵敏度高、定性准确等特点。

**关键词:**鸭、鹅可食组织; 乙氧酰胺苯甲酯; 残留; 高效液相色谱

**中图分类号:** O657.7<sup>+</sup>2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2015)03-0265-03

乙氧酰胺苯甲酯化学名为 4-乙酰胺基-2-乙氧基苯甲酸甲酯, 系一种抗球虫(球虫)药, 主要与某些抗球虫药合用作为抗球虫药的增效剂用于家禽饲料中, 如与氨丙啉、氨丙啉与磺胺喹噁啉混合用于控制鸡球虫病, 在国内养殖业应用广泛。蛋鸡在产蛋期禁用, 休药期为 3 d。如果中间停止用药, 球虫会再发育, 故连续使用才有效果<sup>[1]</sup>。由于用药时间较长, 药物必然在肉中残留, 被人食用后会直接危害人体健康, 所以我国规定了严格的休药期, 鸡在上市或开产前 3 d 必须停药。由于科学知识的缺乏和经济利益的驱使, 畜牧业中不按国家规定滥用兽药和超标使用兽药的现象普遍存在, 这不仅影响到人民群众的日常生活, 而且随着我国加入 WTO, 国内外贸易的频繁往来, 也严重影响到我国的出口创汇。

2002 年发布的中华人民共和国农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》规定乙氧酰胺苯甲酯在禽组织中的最高残留限量为: 肌肉 500  $\mu\text{g/kg}$ , 肝和肾 1 500  $\mu\text{g/kg}$ 。乙氧酰胺苯甲酯在鸡体内不发生代谢, 以药物原型排出。农牧发[2001]38 号文发布了动物源食品中乙氧酰胺苯甲酯残留检测方法——高效液相色谱法, 但是该标准只适用于鸡的肌肉、脂肪、肝脏、肾脏组织中的乙氧酰胺苯甲酯残留量的检测。因此, 我们对鹅、鸭的肌肉、肝和肾组织中的乙氧酰胺苯甲酯残留的检测方法做了研究。本试验在已有的适用于鸡组织中的乙氧酰胺苯甲酯标准<sup>[2]</sup>的基础上, 改进提取步骤, 用

高效液相色谱法检测, 使得试验操作简单、易行、耗时少。该方法具有操作简单、检测限低、重现性好、测定费用低的特点, 适用于定量检测动物性食品中乙氧酰胺苯甲酯的残留量。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器

高效液相色谱仪(配紫外检测器)(Waters 公司); MP200B 天平; 台式高速冷冻离心机(贝克曼公司); R-200 旋转蒸发器(润湿 BUCHI); 固相萃取装置; XW-80A 涡旋混合器(上海精科实业有限公司); HY-4 调速多用振荡器。

### 1.2 试剂

乙氧酰胺苯甲酯对照品: 含量  $\geq 98.5\%$  (Dr. Ehrenstorfer 公司); 乙腈、甲醇为色谱纯(Fisher 公司); 正己烷、丙酮、无水硫酸钠(分析纯); 试验用水均为超纯水。

### 1.3 标准溶液配制

1.3.1 乙氧酰胺苯甲酯标准储备液(100  $\mu\text{g/mL}$ ) 称取乙氧酰胺苯甲酯对照品 10.0 mg(精确到 0.1 mg), 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 置 4  $^{\circ}\text{C}$  储存, 有效期为 1 周。

1.3.2 标准工作液 量取标准储备液适量, 用甲醇稀释成浓度分别为 5.0、2.5、1.0、0.5、0.25、0.10、0.05  $\mu\text{g/mL}$  的对照溶液, 供高效液相色谱分析, 临用前配制。

### 1.4 试验方法

#### 1.4.1 样品前处理

1.4.1.1 提取 称取(5.00  $\pm$  0.05) g 匀浆试样, 置于 50 mL 具塞离心管中, 加入乙腈 15 mL, 无水硫酸钠 10 g, 正己烷 10 mL, 涡旋混合 1 min, 振荡提取 5 min, 4 000 r/min 离心 10 min。用滴管吸取下层乙腈于鸡心瓶中备用。向剩余沉淀物中再加入乙腈 15 mL, 重新提取 1 次, 合并 2 次的乙腈提取液于同一鸡心瓶中, 于 45  $^{\circ}\text{C}$  下旋转蒸发至近干。取正己烷-丙酮(9:1)5.0 mL 溶解上述残留物, 超声 30 s, 摇匀, 然后转移至 10 mL 离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清液备用。

收稿日期: 2014-04-18

基金项目: 山东省自主创新专项(编号: 2013CX90202)。

作者简介: 杨 林(1971—), 男, 山东济南人, 硕士, 高级兽医师, 从事兽药质量检验与兽药残留技术研究。E-mail: yanglin@sdxm.gov.cn。

通信作者: 薄永恒, 博士, 兽医师, 从事兽药质量与兽药残留检验研究。E-mail: yongheng1980@163.com。

1.4.1.2 净化 硅酸镁固相萃取柱用甲醇 5 mL 预洗。取上述上清液 1.0 mL 过柱,用正己烷 3 mL 淋洗,挤干。用甲醇 1.0 mL 洗脱,挤干,收集洗脱液,用 0.45  $\mu\text{m}$  的有机滤膜过滤后作为试样溶液,供高效液相色谱测定。

1.4.2 色谱条件 色谱柱:  $\text{C}_{18}$  柱, 250 mm  $\times$  4.6 mm (i. d.); 流动相: 乙腈-水 (30 : 70); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 270 nm; 进样量: 10  $\mu\text{L}$ 。

1.4.3 标准曲线的绘制 配制浓度为 0.05、0.10、0.25、0.50、1.0、2.5、5.0  $\mu\text{g/mL}$  的系列标准溶液, 高效液相色谱测定后, 乙氧酰胺苯甲酯峰面积为纵坐标, 相应浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 求回归方程和相关系数。

1.4.4 灵敏度 在空白鹅、鸭的肌肉组织中添加乙氧酰胺苯甲酯对照溶液, 按确定的提取净化方法处理后, 经高效液相色谱检测, 计算信噪比。

1.4.5 准确度与精密度 采用标准加入法, 在鹅、鸭的组织中添加不同浓度乙氧酰胺苯甲酯进行回收率试验。各浓度进行 5 个平行试验, 重复 3 次, 求批内、批间相对标准偏差。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线

标准工作曲线 (图 1) 回归方程为:  $y = 45\,828x + 177.61$ ,  $r$  为 0.999 9。

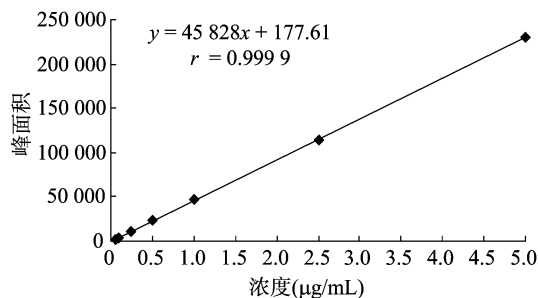


图1 乙氧酰胺苯甲酯对照溶液标准曲线

### 2.2 方法灵敏度

在空白鹅、鸭的肌肉组织中添加乙氧酰胺苯甲酯对照溶液, 按上述提取净化方法处理后, 经高效液相色谱检测。结果表明, 当添加浓度为 20  $\mu\text{g/kg}$  时, 色谱峰的信噪比 ( $S/N$ ) 均大于等于 3; 当添加浓度为 50  $\mu\text{g/kg}$  时, 色谱峰的信噪比 ( $S/N$ ) 均大于等于 10。因此将 20  $\mu\text{g/kg}$  定为该组织检测方法的检测限, 50  $\mu\text{g/kg}$  定为该组织检测方法的最低定量限 (图 2 至图 5)。

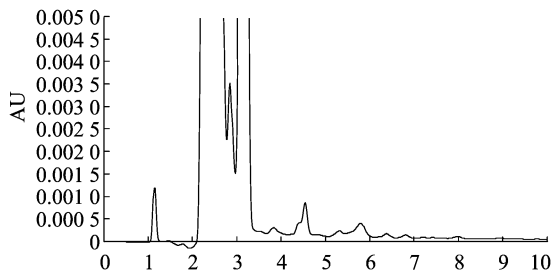


图2 鹅肉空白试样色谱图

在空白鹅、鸭的肝脏、肾脏组织中添加乙氧酰胺苯甲酯对照溶液, 按上述提取净化方法处理后, 经高效液相色谱检测。

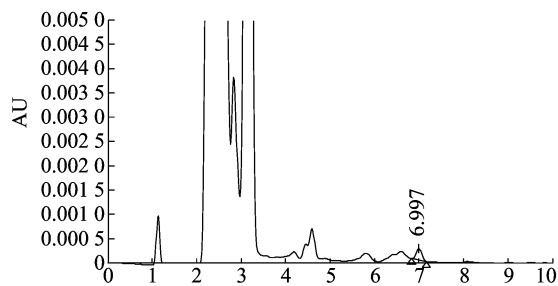


图3 鹅肉空白添加乙氧酰胺苯甲酯色谱图 (50  $\mu\text{g/kg}$ )

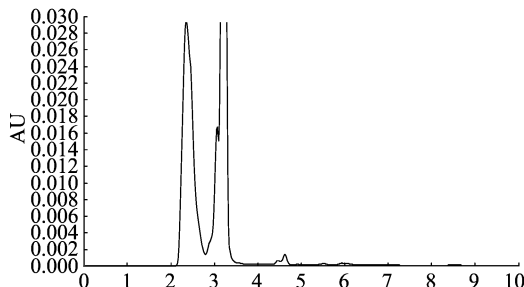


图4 鸭肉空白试样色谱图

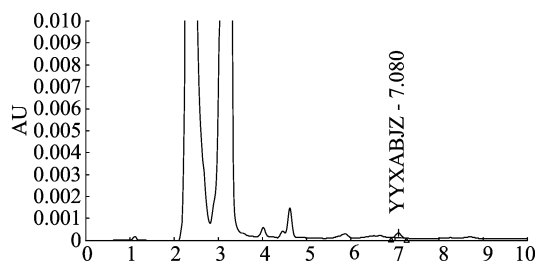


图5 鸭肉空白添加乙氧酰胺苯甲酯色谱图 (50  $\mu\text{g/kg}$ )

结果表明, 当添加浓度为 50  $\mu\text{g/kg}$  时, 色谱峰的信噪比 ( $S/N$ ) 均大于等于 3; 当添加浓度为 100  $\mu\text{g/kg}$  时, 色谱峰的信噪比 ( $S/N$ ) 均大于等于 10。因此将 50  $\mu\text{g/kg}$  定为该组织检测方法的检测限, 将 100  $\mu\text{g/kg}$  定为该组织检测方法的最低定量限 (图 6 至图 13)。

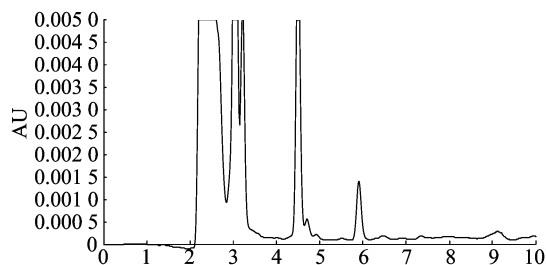


图6 鹅肝空白试样色谱图

### 2.3 方法准确度与精密度

采用标准加入法, 在鹅、鸭的肌肉空白匀浆组织中添加 50  $\mu\text{g/kg}$  (定量限)、100  $\mu\text{g/kg}$ 、250  $\mu\text{g/kg}$  (1/2MRL)、500  $\mu\text{g/kg}$  (MRL)、1 000  $\mu\text{g/kg}$  (2MRL) 等 5 个不同浓度, 通过对结果的计算, 添加回收率在 85% ~ 104% 范围内, 批内变异系数  $CV \leq 10\%$ , 批间变异系数  $CV \leq 20\%$ 。在鹅、鸭的肝脏、肾脏空白匀浆组织中添加 100  $\mu\text{g/kg}$  (定量限)、250  $\mu\text{g/kg}$ 、750  $\mu\text{g/kg}$  (1/2MRL)、1 500  $\mu\text{g/kg}$  (MRL)、

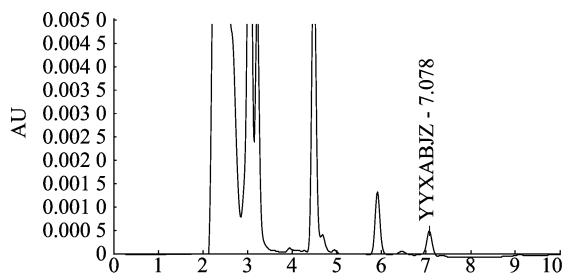


图7 鹅肝空白添加乙氧酰胺苯甲酯色谱图 (100 µg/kg)

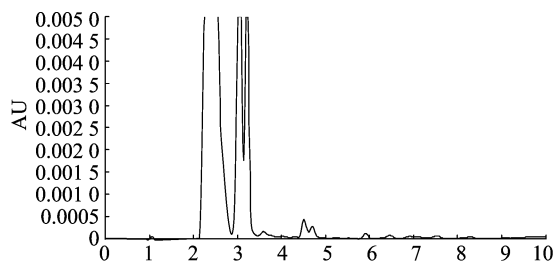


图12 鸭肾空白试样色谱图

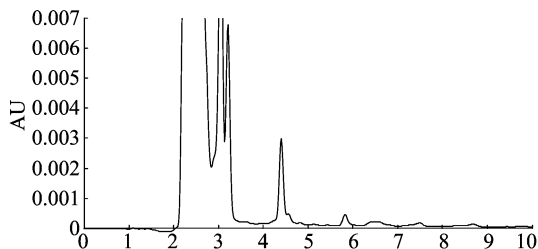


图8 鸭肝空白试样色谱图

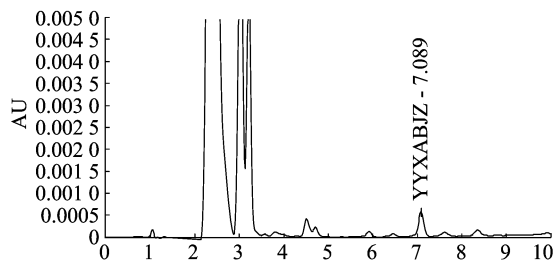


图13 鸭肾空白添加乙氧酰胺苯甲酯色谱图 (100 µg/kg)

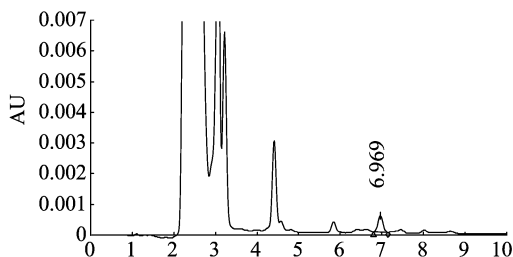


图9 鸭肝空白添加乙氧酰胺苯甲酯色谱图 (100 µg/kg)

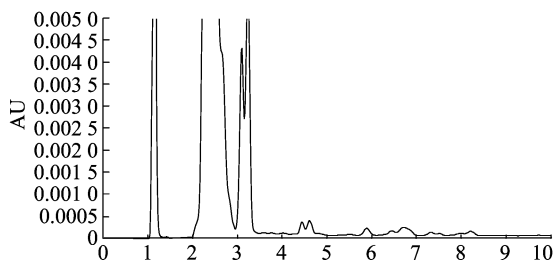


图10 鹅肾空白试样色谱图

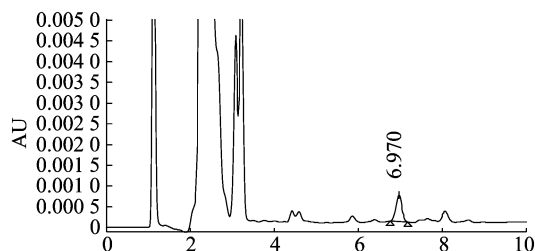


图11 鹅肾空白添加乙氧酰胺苯甲酯色谱图 (100 µg/kg)

3 000 µg/kg(2MRL)等5个不同浓度的乙氧酰胺苯甲酯进行回收率试验,通过对结果的计算,添加回收率在70%~110%范围内,批内变异系数  $CV \leq 10\%$ ,批间变异系数  $CV \leq 20\%$ 。结果均符合相关标准制定的规定<sup>[3]</sup>。

### 3 讨论

#### 3.1 样品前处理条件的优化

本试验对徐士新等的提取方法<sup>[2]</sup>进行优化改进。修订后的方法,在组织残留提取时,同时加入乙腈、无水硫酸钠和正己烷进行提取,去掉了匀浆、过滤、静置3个步骤,使耗材减少、操作更简单、减少了提取过程的损失(降低了样品的检测限和定量限),节省了时间,使用修订后的方法进行添加回收测定试验,结果回收率均在80%以上。

#### 3.2 色谱方法的优化

液相方法首先通过色谱扫描确定检测波长为270 nm时,信号强度最高<sup>[4]</sup>;采用优化流动相乙腈与水的配比,发现在30:70的条件下获得的峰形最好;流速采用常用的1.0 mL/min。综合以上色谱优化条件,可以获得良好的试验结果。

### 4 小结

本方法采用乙腈提取、硅酸镁固相萃取柱净化,高效液相色谱法测定,成功建立了动物性食品中乙氧酰胺苯甲酯的残留检测方法。在鹅、鸭的肌肉中乙氧酰胺苯甲酯的检测限为20 µg/kg,最低定量限为50 µg/kg。在鹅、鸭的肝脏、肾脏中乙氧酰胺苯甲酯的检测限为50 µg/kg,最低定量限为100 µg/kg。整个试验过程简单、快速,回收率较高,适用于动物性食品中乙氧酰胺苯甲酯残留的定量检测。

### 参考文献:

- [1] 丁佳雯,翁亚彪,朱建荣. 乙氧酰胺苯甲酯等药物防治鸡盲肠炎球虫病的疗效试验[J]. 养禽与禽病防治,2004(10):2-3.
- [2] 徐士新,仲 锋,郭文林. 乙氧酰胺苯甲酯在鸡组织中残留的检测及消除规律的研究[J]. 中国兽药杂志,1999(3):6-11.
- [3] 农业部. 兽药残留试验技术规范(试行)[S]. 1999:6-11.
- [4] Taahashi Y, Sekiya T, Nishikawa M, et al. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of amprolium, ethopazine, sulfaquinoxaline and N4-acetylsulfaquinoxaline in chicken tissues[J]. Journal of Liquid Chromatography,1994,17(20):4489-4512.