

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106610403 A

(43) 申请公布日 2017. 05. 03

(21) 申请号 201510687285. 5

(22) 申请日 2015. 10. 22

(71) 申请人 镇江先创生物科技有限公司

地址 212009 江苏省镇江市新区丁卯经十五
路 99 号 11 幢

(72) 发明人 洪霞 张淑雅 刘静

(51) Int. Cl.

G01N 30/02(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测鸡组织中二甲氧苄啶残留量的方法

(57) 摘要

本发明属于食品学检验领域。具体涉及二甲氧苄啶残留量的测定方法。该方法经乙腈和丙酮提取，正己烷去脂肪，MCX 固相萃取小柱净化，依次用 0.1mol/L 盐酸溶液、甲醇淋洗和 10% 氨化乙腈洗脱。洗脱液浓缩后用流动相复溶，过滤。选用 C₁₈色谱柱进行高效液相色谱分析，流动相为乙腈 / 0.01mol/L, 磷酸二氢钾水溶液 (13/87v/v), 紫外检测波长为 270nm, 外标法定量。本方法检测限为 0.02mg/kg, 定量限为 0.05mg/kg, 在肌肉、肝脏的回收率分别在 73.63% — 75.09% 和 98.72% 之间，此方法对于鸡组织中二甲氧苄啶残留量的检测监控方面具有重要意义。

1. 鸡组织中二甲氧苄啶残留量的测定方法,其特征在于将待测样品预处理后,用超高效液相色谱法检测,包括以下步骤:

(1) 样品的制备与保存:1日龄白羽肉鸡用不含任何药物的全价配合饲料饲养至40日龄进行采样;取适量新鲜或冷冻的空白鸡组织(肌肉、肝脏、肾脏、皮肤+脂肪),绞碎并匀质;把制备好的组织样品放在-20℃以下贮存备用;

(2) 样品前处理:准确称取绞碎后的样品((2±0.05)g,置于50ml聚丙烯离心管中,加入4g无水硫酸钠,再加入15ml乙腈涡动1min,15000rpm匀浆1~2min,超声提取10min,5000rpm离心10min;将上清液移至100ml鸡心瓶中,然后用15ml丙酮洗匀浆机刀头并转入残渣中进行重复提取,超声提取10min,涡动3min后再次离心10min,合并上清液并加入5ml正丙醇于45℃旋转蒸发至近干;向蒸至近干的鸡心瓶中加入4ml乙腈-0.017mol/L磷酸(30/70)水溶液,涡旋振荡5min,残渣溶解后移至10ml玻璃试管中;用4ml正己烷洗涤鸡心瓶后,合并洗涤液,涡旋2min;

(3) 净化:采用MCX柱进行固相萃取净化,依次用5ml甲醇、5ml 0.1 mol/L的HCl活化、平衡MCX小柱;吸取上述下层液2ml上柱,自然重力下流出;然后依次用0.1 mol/L盐酸2ml和甲醇6ml淋洗小柱;最后用10%氨化乙腈5ml洗脱药物,洗脱液收集于50ml鸡心瓶,于45℃下旋转蒸干;残留物用1ml流动相溶解,过0.22μm有机滤膜,收集滤液供HPLC分析;

(4) 上机测定

用超高效液相色谱检测,记录色谱图,内标峰高(Hi)与二甲氧苄啶残留量峰高(Hs),用标准曲线换算浓度。

2. 前述的二甲氧苄啶残留量的测定方法,其特征在于该方法是选用C₁₈色谱柱进行高效液相色谱分析,流动相为乙腈/0.01 mol/L,磷酸二氢钾水溶液(13/87 v/v),紫外检测波长为270nm,外标法定量。

3. 本方法检测限为0.02mg/kg,定量限为0.05mg/kg,在肌肉、肝脏的回收率分别在73.63%—75.44%和75.09%—98.72%之间,此方法对于鸡组织中二甲氧苄啶残留量的检测监控方面具有重要意义。

4. 本发明的有益效果是:本发明应用高效液相色谱法检测碱性橙含量具有较好的准确度与精密度。

一种检测鸡组织中二甲氧苄啶残留量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于食品学检验领域。具体涉及二甲氧苄啶残留量的测定方法。

背景技术

[0002] 二氨基嘧啶类抗菌增效药的发现,使得磺胺类药物和该类药物联合使用后,不仅抗菌谱扩大,而且抗菌活性大大增强,加之价格低廉等优点,因而被广泛用于畜禽生产中。随着磺胺类药物在兽医临幊上不合理的使用,甚至滥用,以至于抗菌增效剂类药物在动物源性食品中的残留也会不可避免地发生。人们长期食用含有二甲氧苄啶残留的动物性食品及其制品,将有可能对人类健康产生危害。

[0003] 国际食品委员会 (CAC) 和欧美等大多数国家规定了动物性食品中甲氧节睫的最高残留限量 (MRL) 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 我国于 2002 年农业部颁布新修订的动物性食品兽药残留限量中, 对 TMP 残留限量的规定同 CAC。除日本外,CAC、欧盟各国以及我国均未对 DVD 在动物性食品的最高残留限量作出规定。日本肯定列表中规定 DVD 在鸡可食性组织 (肌肉、肝脏、肾脏和皮脂) 的残留限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0004] 伴随着该类药物在动物性食品中的应用而导致的残留问题已引起了人们的关注。因此为了加强对动物性食品中有关兽药的监控,建立一种动物组织中二甲氧苄啶残留量的检测方法很有必要。目前,国内外有关二甲氧苄啶残留检测的分析方法虽已有报道,但我国对二甲氧苄啶在动物组织中残留量的检测方法研究尚未见报道。基于以上认识,本研究拟建立鸡组织中二甲氧苄啶残留量的 HPLC 检测方法,旨在为今后对该类药物的残留实施监控提供技术手段。

发明内容

[0005] 高线液相色谱法具有灵敏度高、定性定量准确等优点, 本项目该方法建立鸡组织中二甲氧苄啶残留量检测确证方法, 为该类药物的残留监控提供了科学依据。

[0006] 本发明包括以下步骤:

(1) 样品的制备与保存:1 日龄白羽肉鸡用不含任何药物的全价配合饲料饲养至 40 日龄进行采样。取适量新鲜或冷冻的空白鸡组织 (肌肉、肝脏、肾脏、皮肤 + 脂肪), 绞碎并匀质; 把制备好的组织样品放在 -20°C 以下贮存备用;

(2) 样品前处理: 准确称取绞碎后的样品 ((2 ± 0.05) g, 置于 50ml 聚丙烯离心管中, 加入 4g 无水硫酸钠, 再加入 15ml 乙腈涡动 1min, 15000rpm 匀浆 1 ~ 2min, 超声提取 10min, 5000rpm 离心 10min; 将上清液移至 100ml 鸡心瓶中, 然后用 15ml 丙酮洗匀浆机刀头并转入残渣中进行重复提取, 超声提取 1 0min, 涡动 3 min 后再次离心 1 0min, 合并上清液并加入 5ml 正丙醇于 45°C 旋转蒸发至近干;

向蒸至近干的鸡心瓶中加入 4 ml 乙腈 -0.017mol/L 磷酸 (30/70) 水溶液, 涡旋振荡 5min, 残渣溶解后移至 1 0ml 玻璃试管中; 用 4ml 正己烷洗涤鸡心瓶后, 合并洗涤液, 涡旋 2min;

(3) 净化：采用 MCX 柱进行固相萃取净化，依次用 5ml 甲醇、5ml 0.1 mol/L 的 HCl 活化、平衡 MCX 小柱。吸取上述下层液 2ml 上柱，自然重力下流出。然后依次用 0.1 mol/L 盐酸 2ml 和甲醇 6ml 淋洗小柱；最后用 10% 氨化乙腈 5ml 洗脱药物，洗脱液收集于 50ml 鸡心瓶，于 45℃ 下旋转蒸干。残留物用 1ml 流动相溶解，过 0.22 μm 有机滤膜，收集滤液供 HPLC 分析；

(4) 上机测定

用超高效液相色谱检测，记录色谱图，内标峰高 (Hi) 与二甲氧苄啶残留量峰高 (Hs)，用标准曲线换算浓度。

[0007] 前述的二甲氧苄啶残留量的测定方法，其特征在于该方法是选用 C₁₈ 色谱柱进行高效液相色谱分析，流动相为乙腈 / 0.01 mol/L，磷酸二氢钾水溶液 (13/87 v/v)，紫外检测波长为 270nm，外标法定量。本方法检测限为 0.02mg/kg，定量限为 0.05mg/kg，在肌肉、肝脏的回收率分别在 73.63% — 75.09% 和 44% — 98.72% 之间，此方法对于鸡组织中二甲氧苄啶残留量的检测监控方面具有重要意义。本发明的有益效果是：本发明应用高效液相色谱法检测碱性橙含量具有较好的准确度与精密度。

附图说明

- [0008] 图 1 为标准溶液色谱图。
- [0009] 图 2 为空白鸡肉色谱图。
- [0010] 图 3 为空白鸡肉添加 (0.05 μg/g) 色谱图。
- [0011] 图 4 为空白肝脏色谱图。
- [0012] 图 5 为空白肝脏添加 (0.05 μg/g) 色谱图。

具体实施方式

[0013] 下面将详细说明本发明的具体实施方式：

1. 仪器与试剂：

仪器：

高效液相色谱仪 Agilent 1200 系列，配安捷伦 LC 和 CE 系统化学工作站和紫外检测色谱柱依利特 ODS-2 色谱柱 (250×4.6 mm, 5 μm)；

组织匀浆机 POLYTRON PT 1200；

旋涡混合器 WH-1；

低速离心机 LDS-2A；

电子分析天平 BP110S；

循环水真空泵 SHB-III 型；

电热恒温鼓风干燥箱；

自动双重纯水蒸馏器 SZ-93；

旋转蒸发仪 RE-52 型；

紫外 / 可见分光光度计 ND-1000；

超声波清洗器 KQ-250B；

针头式过滤器，有机系，孔径 0.45 pm；

MCX 固相萃取小柱 (60mg /3ml) ;
可调微量移液器, 1-10 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l ;

试剂 :

乙腈 :色谱纯 ;
甲醇 :色谱纯 ;
磷酸 :优级纯 ;
丙酮 :分析纯 ;
氨水 :分析纯 ;
盐酸 :分析纯 ;
正己烷 :分析纯 ;
超纯水 ;

2. 溶液的配制

试液的配制

标准储备液 : 分别精密称取适量二甲氧节咜和甲氧节陡, 置于 50ml 棕色容量瓶中, 先用少量 0.1 mol/L 的盐酸溶解, 再用乙睛定容至刻度, 配成浓度均为 100 μ g/ml 的二甲氧芐咜标准储备液, 置 4℃ 冰箱中保存, 有效期六个月。

[0014] 混合标准工作液 (40 μ g/ml) : 分别量取二甲氧芐咜标准储备液 (100 μ g/ml) 4ml, 共同置于 10ml 棕色容量瓶中, 用乙睛定容, 即成为 40 μ g/ml 的二甲氧芐咜的标准混合储备液。置于 4℃ 冰箱保存。

[0015] 其它溶液的配制 : 0.1 mol/L 盐酸溶液 : 取 826 川盐酸置于 100ml 容量瓶中, 用超纯水定容, 混匀即得 ; 0.017mol/L 磷酸水溶液 : 取 0.49ml 磷酸置于 500ml 容量瓶中, 用超纯水定容, 混匀即得 ; 10% 氨化乙睛 : 取 1.0ml 氨水置于 100ml 容量瓶中, 用乙睛定容, 混匀即得 ; 0.01mol/L 磷酸二氢钾水溶液 : 取 0.68g 磷酸二氢钾, 置于 500ml 容量瓶中, 用超纯水定容, 混匀即得。

[0016] 3、方法与结果

色谱条件 : 色谱柱 : 伊利特 ODS-2 色谱柱 (250 × 4.6 mm, 5 μ m) ; 流动相 : 乙睛一含 0.01 mol/L 磷酸二氢钾水溶液 (13/87 v/v) ; 检测波长 : 270 nm 流速 : 1 ml/min ; 进样量 : 20 μ l ; 柱温 : 35 0℃ , 在建立的色谱条件下, 能很好地将鸡肉组织中二甲氧芐咜与溶剂峰及组织中其他基质组分完全分离。二甲氧芐咜保留时间在 9min 左右, 二甲氧芐咜对照品、空白组织、药物添加样品色谱图分别见图 1-5。

[0017] 标准曲线的绘制 : 准确吸取配制的混合标准工作液适量, 依次用流动相稀释成 4、2、1、0.5、0.25 和 0.05 μ g/ml 的标准工作液。在选定的色谱条件下, 按浓度从低到高的顺序分别进样 2 μ l 作 HPLC 分析。每个浓度重复 5 次。以标准液浓度水平 (X) 为自变量, 各浓度水平的平均峰面积 (Y) 为因变量, 作线性回归, 绘制标准曲线, 并求出其回归方程和相关系数。

[0018] 在建立的色谱条件下, 二甲氧芐咜的标准品平均浓度与其平均峰面积的回归方程为 : $Y = 30.753X - 0.2872$ 。

[0019] 检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 的测定 : 配制系列浓度二甲氧节咜和甲氧节陡标准工作液 0.1、0.2、0.5 μ g/ml, 各取 0.2ml 于 ((2 ± 0.05) g 空白匀浆组织 (肌肉、肝脏)

中,制得 0.01, 0.02 , 0.05 μg/g 三个组织药物浓度,重复 5 次,进行 HPLC 测定。测得各样品的峰高与噪音(基线峰高),取信噪比>3 时的浓度为检测限,信噪比封≥10 时的浓度为定量限。

[0020] 准确性测定:准确性以组织添加样本的回收率表示。准确称取 4 份各 (2 ± 0.05) g 均质的空白组织样品,置于 50ml 聚丙烯离心管中,分别加入混合二甲氧节啶和甲氧节咤标准工作液 0.5、10、20、40 μg/ml 各 0.2ml,使二甲氧节咤和甲氧节咤在各组织中的浓度分别为 0.05 、1、2 和 4 μg/g,经处理后,取滤液 20 μl 进样作 HPLC 测定,同时用对应浓度的二甲氧节啶和甲氧节咤标准液 (0.05、1、2、4 μg/ml) 进样 20 μl,作 HPLC 测定。每一浓度分别重复 5 次。其中回收率的计算公式为:

$$\text{回收率} = \frac{A}{A_s} \times 100\%$$

注:式中 A 为预处理后组织中二甲氧节咤的实测峰面积;As 为对应标准液中二甲氧节咤的峰面积。

[0021] 添加回收率:在 0.05mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg 四个浓度的添加水平,对鸡组织(肌肉、肝脏)进行添加回收试验。见表 1-4。

[0022] 表 1

药物	添加浓度 (mg/kg)	回收率(%)					$\bar{x} \pm SD$	CV(%)
		1	2	3	4	5		
二 甲 氧 节 咤	0.05	75.63	75.00	76.25	75.63	70.00	74.50 ± 2.55	3.43
	1	97.13	81.21	100.0	99.36	95.54	94.65 ± 7.72	8.16
	2	92.44	97.01	88.19	93.23	75.12	89.20 ± 8.47	9.50
	4	91.76	100.2	88.16	84.00	88.80	90.58 ± 6.03	6.66

表 2

药物	添加浓度 (mg/kg)	回收率(%)					$\bar{x} \pm SD$	CV(%)
		1	2	3	4	5		
二 甲 氧 节 咤	0.05	75.00	73.13	83.13	72.50	76.25	76.00 ± 4.25	5.60
	1	71.66	78.98	72.29	73.89	73.57	74.08 ± 2.89	3.90
	2	88.50	93.54	85.93	88.82	81.26	87.62 ± 4.48	5.12
	4	85.52	96.00	89.04	90.96	85.35	89.38 ± 4.40	4.92

表 3

药 物	变 异 系 数	添 加 浓 度 (mg/kg)	回收率(%)					CV(%)
			1	2	3	4	5	
二 甲 醛 苯 萍	日内 (n=5)	0.05	0.048	0.046	0.048	0.046	0.047	0.0474 ± 2.327
		7	1	4	7	1	0.0011	2
		1	1.023	0.939	1.036	0.984	1.053	1.0075 ± 4.541
		3	3	9	9	1	0.0458	0
		2	1.934	1.866	1.914	1.905	1.892	1.9025 ± 1.342
		4	1	8	1	1	0.0255	6
		4	3.423	3.196	3.394	3.348	3.141	3.3209 ± 2.988
		6	0	4	9	5	0.0963	1
		0.05	0.046	0.046	0.047	0.047	0.048	0.0474 ± 2.000
		7	2	9	4	6	0.0009	2
	日间 (n=25)	1	0.967	0.982	0.982	1.040	0.997	0.9741 ± 5.988
		3	1	9	1	2	0.0580	4
		2	1.947	1.392	1.839	1.902	1.711	1.8393 ± 5.875
		4	9	9	5	3	0.1073	6
		6	3.689	3.945	3.714	3.620	3.613	3.6578 ± 6.147
		8	9	3	9	1	0.2249	9

表 4

变 异 系 数	添 加 浓 度 (mg/kg)	回收率(%)					$\bar{x} \pm SD$	CV(%)
		1	2	3	4	5		
日内 (n=5)	0.05	0.047	0.046	0.046	0.047	0.048	0.0472 ± 1.861	
		1	1	7	7	4	0.0009	8
		1	0.763	0.646	0.780	0.750	0.7379 ± 7.180	
		2	7	7	0	7	0.0531	7
		3	1.843	1.739	1.866	1.853	1.8355 ± 3.008	
		4	3	3	1	1	0.0552	0
		6	3.703	3.599	3.800	3.732	3.7238 ± 2.099	
		8	2	8	6	8	0.0783	0
		0.05	0.046	0.046	0.051	0.047	0.0481 ± 3.838	
		7	7	0	3	8	0.0018	4
日间 (n=25)	1	0.841	0.867	0.824	0.739	0.799	0.8143 ± 5.952	
		1	1	2	7	5	0.0485	4
	2	1.881	1.979	1.881	1.836	1.734	1.8623 ± 4.755	
		0	2	0	6	7	0.0886	6
	4	3.616	3.826	3.737	3.722	3.602	3.7012 ± 2.501	
		8	2	8	8	6	0.0926	8

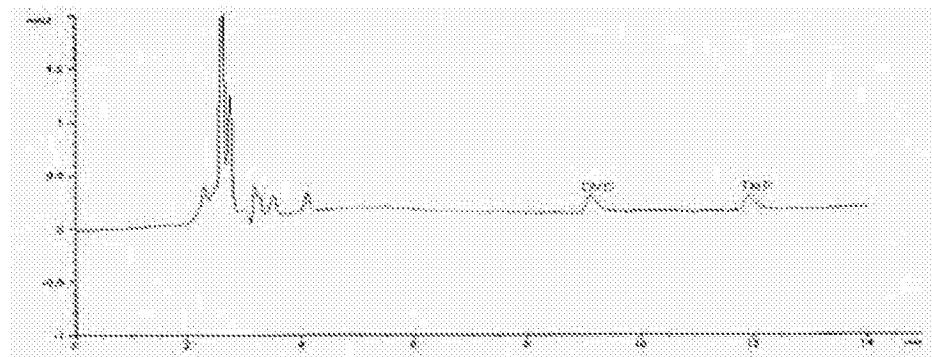


图 1

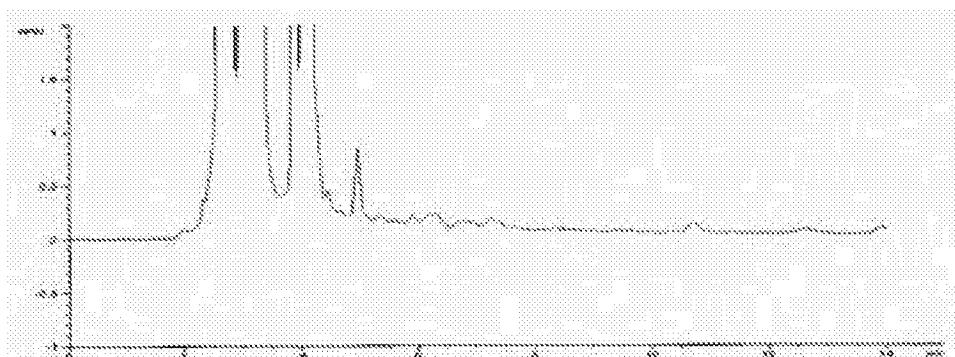


图 2

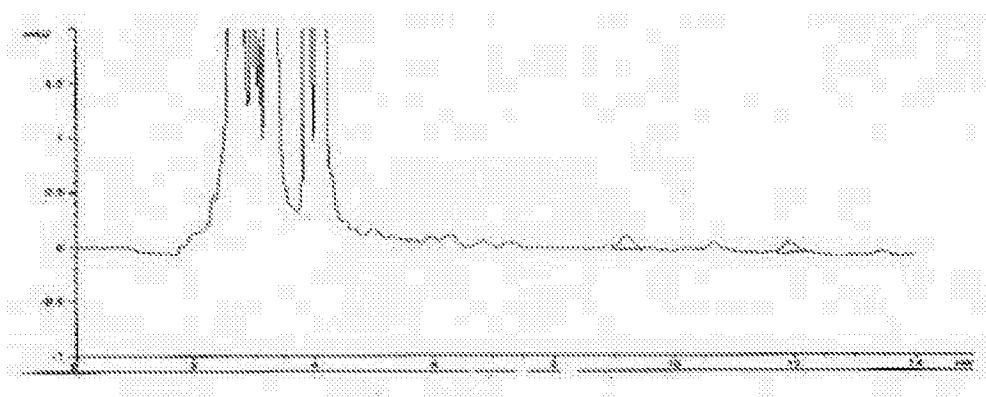


图 3

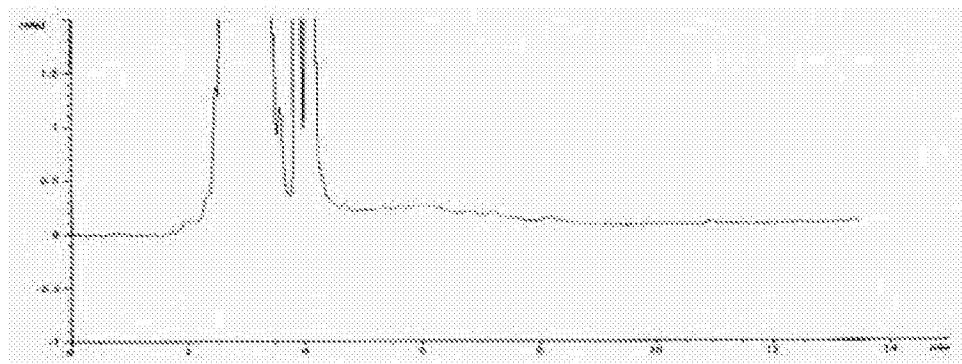


图 4

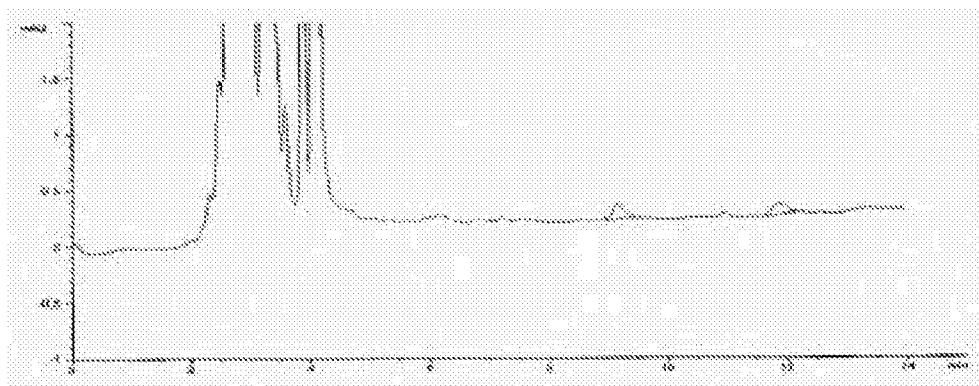


图 5