

文章编号: 1004-7271(2009)01-0072-05

水产品中甲苯咪唑测定方法的研究

曹爱英^{1,2}, 吴成业², 刘海新²

(1. 北京市水产技术推广站, 北京 100024;

2. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361012)

摘要: 研究了利用高效液相测定水产品中甲苯咪唑残留的检测方法。采用乙酸乙酯-氨水作为提取剂, 提取液蒸干后的残留物用二氯甲烷进行溶解, 并采用 SiliaBond NH₂ SPE 柱进行净化, 净化后蒸干洗脱液, 用流动相溶解最后的蒸干物, 过 0.45 μm 滤膜, 最后利用高效液相进行测定。色谱条件: RP18 色谱柱, 用磷酸溶液和乙腈为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温 35 °C; 247 nm 下紫外检测器检测。结果表明: 采用本方法对水产品中甲苯咪唑的残留进行测定, 平均回收率为 80%~98%, 相对标准偏差为 0.5%~2.5%; 方法定量检测限(信噪比 S/N=3)为 10 μg/kg。

关键词: 甲苯咪唑; 残留; 高效液相; 水产品

中图分类号: S948 **文献标识码:** A

Study on the determination of mebendazole residue in aquatic product

CAO Ai-ying^{1,2}, WU Cheng-ye², LIU Hai-xin²

(1. Aquatic Product Technology Promotion Department of Beijing, Beijing 100021, China

2. Fisheries Research Institute of Fujian, Xiamen 361012, China)

Abstract: A method of determination of mebendazole residue in aquatic product by high-performance liquid chromatography (HPLC) was established. Mebendazole residue was extracted with ethyl acetate ammonia, the extracts was vaporized and the leftover was dissolved with methylene chloride, followed by sample cleanup with SiliaBond NH₂ solid-phase extraction cartridge, then vaporized the eluate using the mobile phase to dissolve the final leftover, through 0.45 μm membrane, the solute was quantified by HPLC. Liquid chromatographic separations were performed by using a RP18 chromatogram column and phosphate acetonitrile as mobile phase, flow rate is 1.0 mL/min and column temperature is 35 °C. UV detector is used to determine the mebendazole at 247 nm wavelength. The recoveries were between 80%—98%, the relative standard deviations were between 0.5%—2.5%, and the limits of detection (S/N=3) was 10 μg/kg.

Key words: mebendazole; residue; HPLC; aquatic product

甲苯咪唑^[1-2]有三种晶体类型, 分别为 A 型、B 型、C 型, 临床表明 C 型具有广谱的杀虫性质, 对哺

收稿日期: 2008-05-17

基金项目: 国家科技支撑计划 (编号 2006BAD05A18)

作者简介: 曹爱英 (1983-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为水产品加工及安全性。Tel: 010-87701502 E-mail: cay_001@126.com

通讯作者: 吴成业, Tel: 0592-6016604 E-mail: wcy@fjrcs.ac.cn

乳动物低毒,适合作为控制动物及鱼体消化道寄生虫病的药物。在水产养殖的过程中经常会用来杀死鱼类当中的环虫类^[3-4]。目前已报道的检测甲苯咪唑的方法主要有:滴定法^[5-6]、紫外分光光度法、比色法、磷光分光光度法、荧光分光光度法、红外分光光度法、薄层色谱法、高效液相色谱法等^[7-8],但这些方法多是测定甲苯咪唑片剂或是血液中的甲苯咪唑含量,针对水产品中的甲苯咪唑残留的测定不多,并且这些测定方法的检测限都比较高,难以满足国际上规定的检测限为 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 的要求。为满足对水产品中甲苯咪唑残留测定的需要,本文研究了用高效液相色谱检测水产品中甲苯咪唑残留方法。其检测原理是,采用乙酸乙酯-氨水作为提取剂从水产品中提取甲苯咪唑,固相萃取柱净化后采用液相色谱进行检测。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

Water液相色谱仪(主要包括2487双波长紫外-可见检测器,717自动进样器,1525泵),Mightysil RP18柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),Silabond NH₂ SPE小柱(500 mg \times 3 mL),固相萃取装置(美国奥泰科技(中国)有限公司),氮吹仪(安谱DC12)。

甲苯咪唑标准品:纯度 $\geq 97\%$,上海安谱提供;正己烷、二氯甲烷、乙酸乙酯、乙腈、甲醇均为色谱纯,购于美国Tedia公司;磷酸、甲酸、氨水、无水硫酸钠、三乙胺均为分析纯;去离子水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Mightysil RP18柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm),流动相:0.3%磷酸溶液-乙腈混合溶液(65:35)(0.3%的磷酸溶液用三乙胺调pH值至2.5),流速:1 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$,检测波长:247 nm;进样量:20 μL 。

1.3 样品提取

称取10 g样品(精确至0.01 g)置于50 mL离心管中,加入15 mL乙酸乙酯-氨水(98:2)溶液,均质30 s,加入5 g无水硫酸钠,震荡10 min,2000 r/min离心10 min,将乙酸乙酯-氨水层移入100 mL圆底烧瓶中,残渣备用。然后用15 mL乙酸乙酯-氨水溶液提取残渣2次,每次均质30 s,震荡5 min,2000 r/min离心10 min,将乙酸乙酯-氨水层移入100 mL圆底烧瓶中。于40 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸干乙酸乙酯-氨水,用10 mL二氯甲烷溶解蒸干后的残留物,在超声波仪中超声5 min。

1.4 样品净化

选用正相柱NH₂ SPE进行净化,使用前依次用2 mL甲醇、3 mL正己烷活化。将溶解有样品的二氯甲烷以2 mL/min的速度通过已活化的NH₂ SPE柱,样液全部流出后,用10 mL正己烷淋洗,弃去淋洗液,吹干,然后用4 mL 5%甲酸-甲醇的洗脱液洗脱,收集洗脱液。洗脱液于40 $^{\circ}\text{C}$ 下通氮气吹干,以流动相定容至1 mL,过0.45 μm 滤膜,待测。

2 结果与分析

2.1 检测波长

用紫外检测器在190~700 nm波长范围内对甲苯咪唑标准溶液进行扫描,最大吸收波长为247 nm。因此,实验中选择247 nm作为检测波长。

2.2 前处理方法的选择

2.2.1 提取剂的选择

在样品提取时比较了乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷三种有机溶剂对甲苯咪唑的提取效果。发现乙酸乙酯的提取效果最好,不仅回收率高,而且杂质少、干扰小;而二氯甲烷、三氯甲烷提取的杂质较多、回

收率低(表 1)。另外,从分子结构上看,甲苯咪唑属于碱性化合物,因此考虑在提取剂中加入少量氨水,所以最后选择乙酸乙酯-氨水作为提取剂。

2.2.2 提取后蒸干物质溶剂的选择

在样品提取蒸干后残留物的溶液溶剂选择时,开始时参照资料^[8-9]采用正己烷来溶解,发现平均回收率只有 60%,利用超声波辅助提取后可以将平均回收率提高到 63%,但仍然不能达到分析的要求。因此选择其他的溶剂来溶解蒸干后的残留物,由于甲苯咪唑属于极性比较强的物质,并且用正己烷并不能够将蒸干后的残留物完全溶解,导致回收率较低,所以应该选择极性在乙酸乙酯和正己烷之间的溶剂。常用溶剂的极性:甲醇>乙醇>丙酮>乙酸乙酯>乙醚>三氯甲烷>二氯甲烷>苯>甲苯>四氯化碳>正己烷。实验选择二氯甲烷和三氯甲烷来代替正己烷溶解蒸干后的残留物,结果显示二氯甲烷的溶解效果较好。回收率较高,达到 80%以上。

2.2.3 洗脱液体积的选择

在样品净化时选择 NH_2 SPE小柱对样品进行净化,并对洗脱液的体积进行选择。发现 3 mL的洗脱液就可以将 95.6%的甲苯咪唑标准品洗脱下来,为了能够比较完全地将标准品洗脱下来,选择洗脱液的体积为 4 mL。洗脱曲线见图 1。

2.3 图谱分析

在确定的色谱条件下,甲苯咪唑的出峰图谱见图 2。如图 2所示,在确定的色谱条件下分离效果较好,能够达到定性定量分析的要求。且杂质峰远离甲苯咪唑的出峰位置,不会对分离形成干扰。

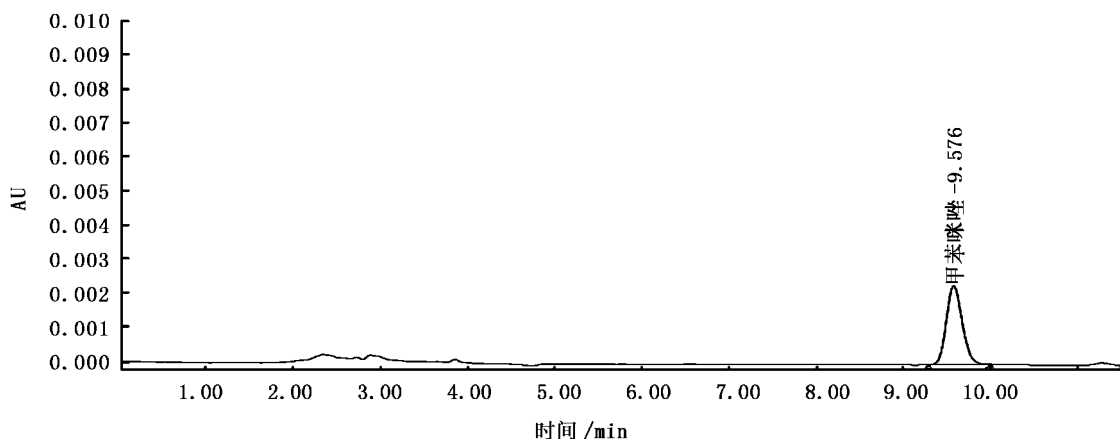


图 2 甲苯咪唑标准色谱图

Fig 2 HPLC Profile of the MEB

2.4 线性范围与检测限

配制浓度为 0.1, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4 $\mu\text{g/mL}$ 的甲苯咪唑标准溶液,按 1.2的色谱条件进行

表 1 不同提取剂的加标回收率

Tab 1 Recoveries of different extraction solvent

提取剂	回收率 (%)	平均回收率 (%)
二氯甲烷	67.55	55.30
	45.20	
	53.14	
乙酸乙酯-氨水	82.32	82.38
	82.40	
	82.43	
	40.27	
三氯甲烷	46.31	50.42
	48.25	

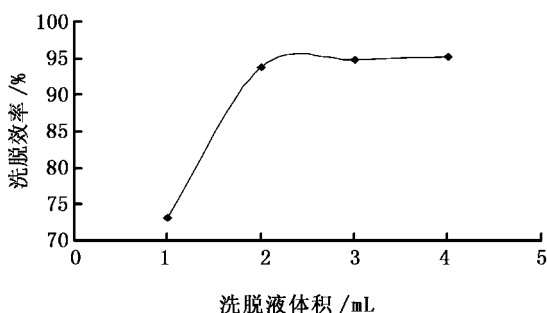


图 1 洗脱曲线

Fig 1 Eluting curve

测定。以峰面积对质量浓度作图, 得到工作曲线。 $Y=0.8219X-0.0511$, $R=0.9995$, 其中 Y 为测定的峰面积, X 为质量浓度。本方法在加标量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时信噪比为 6 大于 3 回收率大于 70%, 精密度小于 15% (结果见表 2), 所以本方法的定量检出限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。此检测限低于日本肯定列表中规定的甲苯咪唑残留的标准。

表 2 加标回收结果
Tab 2 The result of the recovery

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	标准偏差	相对标准偏差 RSD (%)
0.10	80.62	80.96	3.94	4.16
	77.78			
	84.49			
0.60	82.32	82.38	0.057	0.069
	82.40			
	82.43			
1.00	81.87	85.10	2.89	3.40
	87.44			
	85.99			

2.5 添加回收率与精密度

本实验采用在 10 阴性样品中分别添加 $0.10 \mu\text{g}$ 、 $0.60 \mu\text{g}$ 和 $1.00 \mu\text{g}$ 的甲苯咪唑, 添加量相当于 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 测定回收率。图 3 为甲苯咪唑加标回收的色谱图。

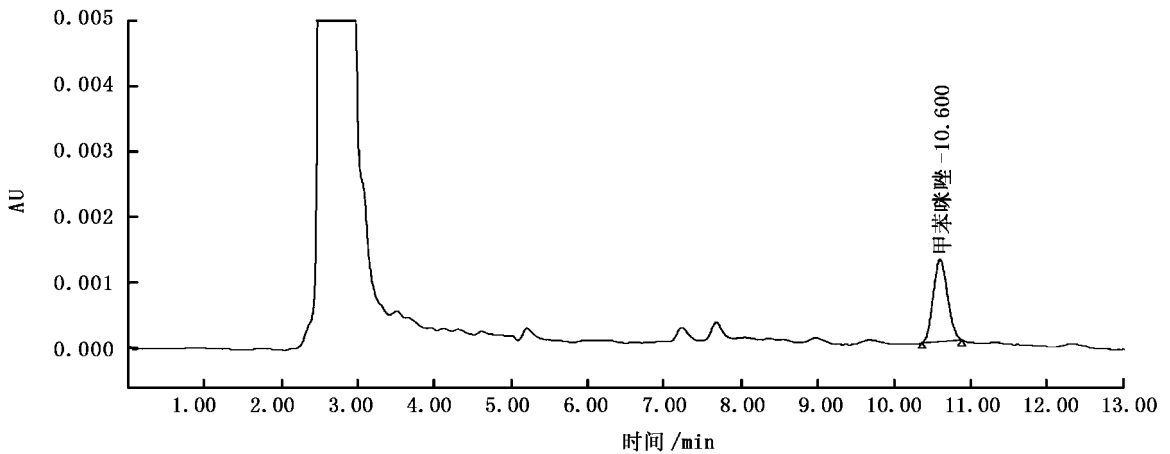


图 3 甲苯咪唑加标回收色谱图

Fig 3 HPLC Profile of the MEB recovery

实验结果表明: 加标回收率为 80% ~ 90%, 说明实验方法的准确度高。并且从图 3 中可以看出加标回收得到的色谱图对称性较好, 附近杂峰较少, 能将甲苯咪唑较好地分离出来, 可以满足水产品的甲苯咪唑残留测定。从表 2 中可以看出, $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的相对标准偏差比较大, 这可能是由于浓度比较低, 操作中误差比较大。但相对标准偏差均小于 5%, 说明精密度较高, 重复性好。

为了更好地对所确定的方法进行验证, 选择了常见的水产品, 按照按 1.2.1.3.1.4 确定的试验方法进行加标回收试验, 测定其回收率。选择的水产品有: 鲈鱼、草鱼、鳊鱼、罗非鱼、金鲳鱼、大黄鱼, 并且均为阴性。分别称取 10 样品, 在样品中添加 1 mL 浓度为 $0.45 \text{ mg}/\text{mL}$ 的甲苯咪唑标准品, 添加标准为 $45 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。测定结果如表 3 所示。

从测定的结果可以看出在其它的水产品中添加甲苯咪唑回收率也比较高, 平行性较好。回收率均大于 80%, RSD 均小于 5%。说明所确定的方法适用性强, 可以用于水产品中甲苯咪唑残留量的检测。

表 3 本方法在水产品中的应用
Tab 3 The application of the method in aquatic product

样品名称	回收率 (%)	平均回收率 (%)	标准偏差	相对标准偏差 RSD (%)
鲈鱼	97.64	96.82	0.95	0.98
	95.77			
	97.05			
草鱼	93.16	95.17	1.78	1.87
	96.55			
	95.81			
大黄鱼	96.12	96.72	0.57	0.58
	96.81			
	97.24			
金鲷鱼	85.26	86.42	1.42	1.64
	88.00			
	86.00			
鳊鱼	92.61	90.69	1.79	1.98
	89.07			
	90.39			
罗非鱼	97.41	95.14	2.28	2.39
	95.17			
	92.85			

3 讨论

通过实验,优化出了适合测定甲苯咪唑的色谱条件,色谱柱: Mkh0silRH8柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 或性能相当的色谱柱;流动相: 0.3%磷酸溶液—乙腈混合溶液 (65:35);流速: 1 mL/min;柱温: 35 °C, 检测波长: 247 nm。

利用所确定的色谱条件得到的色谱图对称性较好,保留时间适中,在 0.1 μg/mL~2.4 μg/mL 范围内线性关系良好。利用得到的色谱图可以对甲苯咪唑进行定性和定量分析。对所确定的色谱条件进行稳定性分析,结果日内和日间的稳定性都很好,相对标准偏差均低于 1%。说明所选的色谱条件合适,重复性好。

系统地优化了水产品的前处理过程,结合所确定的色谱条件,确定了测定水产品中的甲苯咪唑残留的方法,并对方法的准确度和精密度进行分析。通过加标回收实验来确定其中的准确度,选择了 10 μg/kg、60 μg/kg 和 100 μg/kg 三个添加浓度,加标回收率为 85.26%~97.64%。加标回收得到的色谱图对称性较好,能将甲苯咪唑较好地分离出来,目标峰附近的干扰峰较少,可以满足水产品中的甲苯咪唑残留测定。利用本方法测定的最低检测限为 10 μg/kg,低于日本肯定列表制度中所要求的 20 μg/kg,并且精密度和准确度均较好,可以满足农药残留分析的要求。

参考文献:

- [1] 何颖娜,尚京川,张晓萍,等. 高效液相色谱法测定人血浆中甲苯咪唑含量[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(20): 2026—2027.
- [2] 刘祥宜,朱建民. C型甲苯咪唑的合成与制备[J]. 江苏化工, 2002, 30(3): 35—37.
- [3] 李志青,樊海平,曾占壮,等. 复方甲苯咪唑对拟指环虫的杀灭效果和对欧洲鳊的毒性[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(4): 221—223.
- [4] 康 硕,马锦裕,谢伯皋. 口服甲苯咪唑控制肠道线虫病效果分析[J]. 实用寄生虫病杂志, 2001, 9(4): 177—178.
- [5] United States Pharmacopeial convention. In: USP 9. 23, 1995: 934.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会编. 中华人民共和国药典[S]. 二部: 1995: 137.
- [7] Alkurdi Z, Al-Jalal T, Badwan A, et al. High performance liquid chromatography method for determination of methyl-5-benzoyl-2-benzimidazole carbamate (mebendazole) and its main degradation product in pharmaceutical dosage forms[J]. Talanta 1999, 50(5): 1089—1097.
- [8] 杨 方,李耀平,李小晶. 高效液相色谱法检测动物性食品中甲苯咪唑残留[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(5): 545—546.
- [9] 程雪梅,王长虹,孙殿甲. 甲苯咪唑制剂及体内药物含量测定方法概述[J]. 地方病通报, 2001, 16(2): 89—92.