

# 固相萃取-高效液相色谱法测定禽类可食性组织和蛋中氨丙啉残留

刘畅<sup>1,2</sup>, 王蓓<sup>3</sup>, 李康<sup>1</sup>, 徐坤<sup>1</sup>, 邱梅<sup>1</sup>, 程雪晴<sup>1</sup>, 郝智慧<sup>2\*</sup>, 曲丽华<sup>1\*</sup>

(1. 青岛农业大学化学与药学院, 山东青岛 266109)

(2. 中国农业大学动物医学院, 中兽医药创新中心, 北京 100193) (3. 青岛食品检验所, 山东青岛 266071)

**摘要:** 该文建立了固相萃取-高效液相色谱法检测鸡、鸭、鹅的可食性组织(肌肉、肝脏、肾脏、脂肪)和蛋中氨丙啉残留的分析方法。样品中的氨丙啉经三氯乙酸-乙腈溶液提取, 固相萃取柱净化。色谱柱为亲水性 C<sub>18</sub> 色谱柱, 使用甲醇-乙腈-6 mmol/L 1-庚烷磺酸钠溶液为流动相进行等度洗脱, 检测波长为 268 nm。氨丙啉在 0.1~10 μg/mL 呈良好的线性关系,  $r^2$  为 0.999。该方法对鸡、鸭、鹅的肌肉中氨丙啉的检出限为 150 μg/kg, 定量限为 250 μg/kg; 鸡、鸭、鹅的肝脏、肾脏、脂肪、蛋中氨丙啉的检出限为 250 μg/kg, 定量限为 500 μg/kg。这些空白组织中添加水平分别为定量限 0.5 倍、1 倍、2 倍最大残留限量时, 各组织中氨丙啉的平均回收率在 74.65%~96.24% 之间, 其日内和日间相对标准偏差分别小于 15%。该方法准确度和精密度高, 适用于禽类可食性组织和蛋中氨丙啉残留的检测, 为日常工作中食品质量控制提供了一种可行的方法。

**关键词:** 氨丙啉; 固相萃取-高效液相色谱法; 残留分析; 食品质量控制

文章编号: 1673-9078(2023)06-298-305

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0759

## Determination of Amprolium Residues in Edible Tissues and Eggs of Poultry by Solid Phase Extraction-high Performance Liquid Chromatography

LIU Chang<sup>1,2</sup>, WANG Bei<sup>3</sup>, LI Kang<sup>1</sup>, XU Kun<sup>1</sup>, QIU Mei<sup>1</sup>, CHENG Xueqing<sup>1</sup>, HAO Zhihui<sup>2\*</sup>, QU Lihua<sup>1\*</sup>

(1.College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2.Innovation Center for Traditional Chinese Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China) (3.Qingdao Institute for Food Control, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** An analytical method based on solid phase extraction-high performance liquid chromatography was established for the determination of amprolium residues in the edible tissues (muscle, liver, kidney, and fat) and eggs of chicken, ducks, and geese. First, amprolium in the sample was extracted by trichloroacetic acid-acetonitrile solution and purified by the solid-phase extraction column. A hydrophilic C<sub>18</sub> chromatographic column was used; methanol, acetonitrile, and 6 mmol/L sodium 1-heptanesulfonate solution were used as the mobile phase for isocratic elution, with a detection wavelength of 268 nm. Amprolium exhibited an optimum linear relationship in the range of 0.1~10 μg/mL ( $r^2=0.999$ ). The limit of detection and limit of quantification were 150 μg/kg and 250 μg/kg, respectively, for amprolium in chicken, ducks, and geese muscle, whereas the limit of detection and limit of quantification of amprolium in the liver, kidney, fat, and eggs of chicken, ducks, and

引文格式:

刘畅,王蓓,李康,等.固相萃取-高效液相色谱法测定禽类可食性组织和蛋中氨丙啉残留[J].现代食品科技,2023,39(6):298-305.

LIU Chang, WANG Bei, LI Kang, et al. Determination of amprolium residues in edible tissues and eggs of poultry by solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 298-305.

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 农业行业标准制定和修订项目(662/2319043); 山东省重点研发计划项目(2019GSF107073); 山东省双百计划项目(WST2017010)

作者简介: 刘畅(1997-), 女, 硕士, 研究方向: 兽药残留分析, E-mail: 965867359@qq.com

通讯作者: 郝智慧(1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 兽药药理学与毒理学、新兽药创制和兽医公共卫生, E-mail: haozhihui@cau.edu.cn; 共同通讯作者:

曲丽华(1987-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 药物残留分析, E-mail: qlh@qau.edu.cn

geese were 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. When the addition levels in the blank tissues had a limit of quantification 0.5, 1, and 2 times the maximum residue limit, the average recoveries of amprolium ranged from 74.65%~96.24% and the intra-day and inter-day relative standard deviations were less than 15%. This method has high accuracy and precision, and is suitable for determining amprolium residues in the edible tissues and eggs of poultry, providing a feasible method for ensuring food quality control in routine applications.

**Key words:** amprolium; solid phase extraction-high performance liquid chromatography; residue analysis; food quality control

在现代家禽养殖场中, 家禽饲养条件拥挤且饲养不规律<sup>[1]</sup>。在这种饲养环境中极易产生的球虫卵囊, 会导致家禽腹泻, 甚至死亡<sup>[2]</sup>。因此, 球虫病是家禽养殖过程中的重要问题之一。氨丙啉别名为氨丙基嘧啶, 20 世纪 50 年代被发现并被广泛用于球虫病的治疗和预防<sup>[1]</sup>。与天然辅酶相比, 氨丙啉对焦磷酸硫酸素相关酶有很大的亲和力, 在高效和安全的抗球虫病的同时, 不易引起球虫的耐药性<sup>[3]</sup>。但氨丙啉长期大量施用会导致家禽体内的疾病, 如雏鸡多发性神经炎, 同时造成组织内的高浓度残留, 随食物链进入人体内, 对人体健康会造成潜在威胁<sup>[4,5]</sup>。随着这一食品安全问题的凸显, 中国、美国、日本等国家相继规定了动物可食性组织中氨丙啉的最大残留限量。我国农业农村部 GB 31650-2019 文件明确了不同鸡组织中氨丙啉的最大残留限量 (Maximum Residue Limit, MRL), 在肌肉中为 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 肝、肾中为 1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 鸡蛋中为 4 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[6]</sup>。在美国, 鸡组织的 MRL 与我国 GB 31650-2019 规定相一致。日本对鸡组织的 MRL 限制是最严格的, 肌肉、肝脏和肾脏为 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 鸡蛋为 5 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这些报道引起了公众广泛关注如何建立高效、可行的检测方法。

近年来, 世界各国报道了许多检测氨丙啉残留的方法<sup>[1,4,5,7-22]</sup>, 主要包括液相色谱-质谱联用 (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[1,5,7-17]</sup> 和高效液相色谱法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)<sup>[4,17-22]</sup>, 检测的禽源食品主要包括鸡肉、鸡肝脏、鸡蛋<sup>[8-15,19-22]</sup>。在家禽食品中, 不只有鸡组织及其蛋被广泛作为可食性产品, 较为常见的还有鸭、鹅可食性组织及其蛋。目前我国已有动物性食品中氨丙啉残留检测的相关行业标准 3 个 (SN/T 3144-2011<sup>[14]</sup>、SN/T 4583-2016<sup>[15]</sup>、SN/T 4812-2017<sup>[16]</sup>) 和国家标准 1 个 (GB 31613.1-2021<sup>[17]</sup>), 但缺少检测这些禽类动物组织及其蛋的 HPLC 方法。使用 HPLC 检测方法对家禽组织中氨丙啉进行检测, 可为监管部门食品安全监测提供一种简便易行的方法。样品前处理是残留检测中的关键组成部分, 是衡量残留检测方法先进性和实用性的关键指标。目前已经开发了几种净化过程以减少动物食品提取物的干扰, 如固相萃取法<sup>[11-15,19-21]</sup>, 液-液萃取

法<sup>[10]</sup>。与液-液萃取法相比, 固相萃取法 (Solid Phase Extraction, SPE) 减少了有机溶剂和杂质的干扰, 对色谱分析的适应性也更强。因此, 固相萃取法对样品净化具有重要的作用。

根据氨丙啉作为抗球虫病的研究现状, 本研究建立了一种高效、稳定的 SPE-HPLC 法检测禽类可食性组织和蛋中氨丙啉残留的方法, 以控制氨丙啉的残留, 确保禽类可食性组织的食品安全。方法按照 GB 31650-2019 要求进行验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

甲醇和乙腈 (色谱纯), 美国 Tedia 公司; 1-庚烷磺酸钠 (纯度 98%), 麦克林公司; 三氯乙酸 (Trichloroacetic Acid, TCA)、冰醋酸、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾和三乙胺 (分析纯), 中国医药集团有限公司; Oasis<sup>®</sup>PRiME HLB 固相萃取柱 (200 mg/6 cc), 美国 Waters 公司; ACES C18 AQ Plus 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 美国 Aces 公司; 0.22  $\mu\text{m}$  有机溶剂过滤器, 天津津隆医药科技发展有限公司; 盐酸氨丙啉标准品 (纯度 $\geq$ 99%), 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

1% TCA 溶液: 称取 10 g TCA, 加水溶解并定容至 1 000 mL。

0.3% TCA~70% 乙腈溶液: 取 300 mL 1% TCA 溶液, 加入乙腈定容至 1 000 mL。

磷酸盐缓冲液: 称取 2 g 磷酸氢二钾和 8 g 磷酸二氢钾, 加水溶解并定容至 1 000 mL。

6 mmol/L 1-庚烷磺酸钠溶液: 称取 1.2 g 1-庚烷磺酸钠, 加入 500 mL 水完全溶解后, 加入 24 mL 冰醋酸和 6 mL 三乙胺并定容至 1 000 mL。

流动相: 将甲醇、乙腈、6 mmol/L 1-庚烷磺酸钠溶液按照体积比为 35:5:60 混合并混匀并抽滤, 即得甲醇-乙腈-6 mmol/L 1-庚烷磺酸钠溶液 (35:5:60, V/V/V)。

除另有标注外, 本研究里溶液中所涉及的符号“%”均为溶液 100 mL 中含有的溶质若干毫升, 即为 (V/V)。

## 1.2 仪器与设备

DIONEX Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 美国 Thermo Fisher 公司; 分析天平 (感量 0.000 01 g 和 0.01 g), 赛多利斯科学仪器有限公司; 氮吹仪, 北京康林科技有限责任公司; 匀浆机, 金坛市白塔新宝仪器厂; MS3 涡旋混匀器, 德国 IKA 公司; 离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 样品采集与前处理

所有鸡、鸭和鹅组织和蛋均经青岛农业大学伦理委员会批准, 在当地各大超市采购 (批准文号: SYXX (SD)20170005), 采集的样品经匀浆混合均匀后, 置于密封的离心管中, 于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下冷冻保存。

(1) 提取: 称取  $2\text{ g}$  ( $\pm 0.02\text{ g}$ ) 均质样本于  $50\text{ mL}$  离心管中, 加入  $5\text{ mL}$   $0.3\%$  TCA-70% 乙腈溶液, 涡旋  $1\text{ min}$ , 超声  $10\text{ min}$ ,  $8\ 000\text{ r/min}$  离心  $5\text{ min}$ , 上清液转移至清洁的离心管中。然后在残渣中再加入  $3\text{ mL}$   $0.3\%$  TCA-70% 乙腈溶液, 按前述方法提取, 并将两次提取上清液合并。在  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中用氮气吹至近干, 加入  $2\text{ mL}$  磷酸盐缓冲液涡旋  $1\text{ min}$  复溶, 作为备用液。

(2) 净化与浓缩: 将全部备用液过柱, 待备用液液面到达柱填料表面时, 用  $3\text{ mL}$  水淋洗, 抽干。随后, 用  $3\text{ mL}$   $0.3\%$  TCA-70% 乙腈溶液洗脱到干净的试管中并抽干, 得到洗脱液。在  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中用氮气吹至近干。最后, 用  $2\text{ mL}$  流动相涡旋  $1\text{ min}$  复溶, 经  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  微孔膜过滤后供高效液相色谱仪测定。

### 1.3.2 标准溶液配制

标准储备液: 取盐酸氨丙啉标准品适量 (相当于氨丙啉  $10\text{ mg}$ ), 用甲醇溶解并定容至  $10\text{ mL}$ , 配制为  $1\text{ mg/mL}$  的标准储备液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下保存, 有效期 3 个月。

标准工作液: 移取  $1\text{ mg/mL}$  的氨丙啉标准储备液  $1\text{ mL}$ , 用甲醇定容至  $10\text{ mL}$ , 配制为  $100\text{ }\mu\text{g/mL}$  的标准工作液,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下保存, 有效期 1 个月。

### 1.3.3 色谱条件

色谱柱为 ACES C18 AQ Plus ( $250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}$ ,  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), 柱温  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 进样量  $20\text{ }\mu\text{L}$ , 流动相为甲醇-乙腈- $6\text{ mmol/L}$  1-庚磺酸钠溶液 ( $35:5:60, \text{V/V/V}$ ) 等度洗脱, 流速  $1.0\text{ mL/min}$ , 检测波长  $268\text{ nm}$ 。

## 1.4 数据分析

利用 Microsoft Excel 2019 软件对实验数据进行分析处理, 画图软件对图谱进行处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化

氨丙啉的极性很强, 导致其在色谱柱上的保留时间较短, 降低基质干扰非常困难。离子对试剂可以对氨丙啉的保留时间产生影响, 因此选择水相为一定浓度的庚磺酸钠溶液, 提高保留时间。尽管使用了离子对试剂, 水相仍然需要较大的比例才能将氨丙啉更好的分离, 因此选择亲水性的色谱柱, 能进一步提高氨丙啉的专属性, 保证更好的分离效果。进而对流动相中有机相的种类和比例进行了考察。甲醇- $6\text{ mmol/L}$  1-庚磺酸钠溶液 ( $40:60, \text{V/V}$ )<sup>[20]</sup>和甲醇-乙腈- $6\text{ mmol/L}$  1-庚磺酸钠溶液 ( $35:5:60, \text{V/V/V}$ )<sup>[4]</sup>两种流动相的检测结果显示, 前者保留时间为  $5.5\text{ min}$ , 后者保留时间为  $5.9\text{ min}$ , 后者流动相条件下, 氨丙啉具有更好的专属性, 氨丙啉的峰形和分离度良好。柱温测定结果表明,  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  柱温条件下, 氨丙啉信号强度增强, 峰形对称。最佳检测波长为  $268\text{ nm}$ 。上述条件下, 氨丙啉的标准溶液色谱图见图 1。

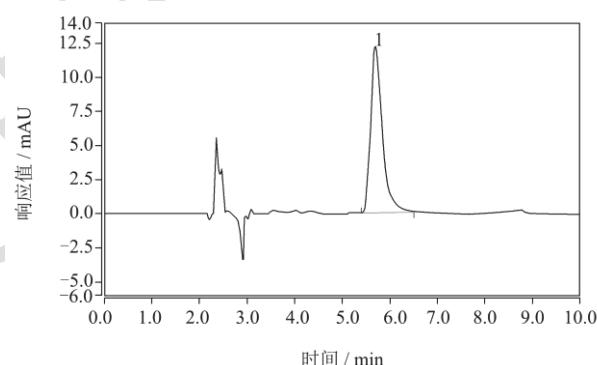


图 1 氨丙啉  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$  标准溶液色谱图

Fig.1 Characteristic chromatogram of amprolium  $5\mu\text{g/mL}$  standard solution

### 2.2 提取液和提取方式的选择

为了提高提取和检测的效率, 分别对乙腈<sup>[4,8,12-14,16,17,20]</sup>、磷酸盐缓冲液<sup>[5,17]</sup>和  $0.3\%$  TCA-70% 乙腈溶液<sup>[11,15]</sup>三种提取液对氨丙啉的提取效果进行了比较。结果见图 2, 用  $0.3\%$  TCA-70% 乙腈溶液提取的样品回收率明显高于乙腈和磷酸盐缓冲液, 且离心后上清液相对较清。同时, 提取次数的增加会对氨丙啉的回收率产生影响, 提取 2 次氨丙啉的回收率高约  $10\%$  ( $P<0.05$ ), 表明提取 2 次能够对氨丙啉更加充分的提取, 提取 2 次以上氨丙啉的回收率无显著差异 ( $P>0.05$ )。因此, 选择用  $0.3\%$  TCA-70% 乙腈溶液提取 2 次。

主要考察涡旋和匀浆两种提取方式, 这两种方法显示相似的氨丙啉回收率, 这表明 2 种方法均能有效

地提取氨丙啉, 相比而言涡旋法操作更加方便, 为简化前处理操作, 因此选取涡旋法进行提取。

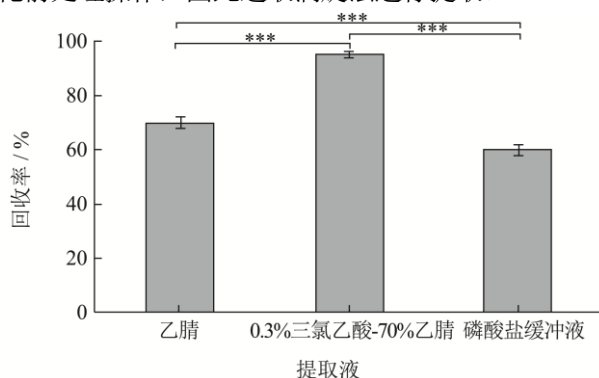


图2 三种提取液对氨丙啉的提取平均回收率

Fig.2 Average recovery of amprolium by three extracts

(5  $\mu\text{g/mL}$ ,  $n=5$ )

注: \*\*\*表示两组之间差异极显著 ( $P<0.01$ )。

### 2.3 样品净化条件优化

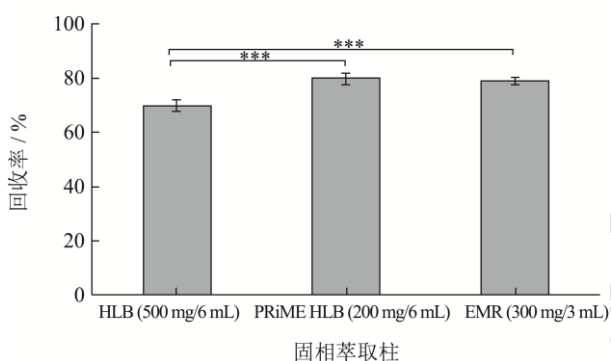


图3 固相萃取柱净化后氨丙啉的平均回收率

Fig.3 Average recovery of amprolium after purification by solid phase extraction column (500  $\mu\text{g/kg}$ ,  $n=5$ )

注: \*\*\*表示两组之间差异极显著 ( $P<0.01$ )。

为了更好地消除杂质干扰、降低噪声信号水平, 对 Oasis<sup>®</sup> HLB (500 mg/6 cc)<sup>[17]</sup>、Oasis<sup>®</sup> PRiME HLB (200 mg/6 cc) 和 Captiva EMR-Lipid (600 mg/6 cc) 的固相萃取柱对动物源可食性组织的净化效果进行了比较。结果见图3, 使用 Oasis<sup>®</sup> HLB (500 mg/6 cc) 柱进行净化, 氨丙啉的回收率不到 80%; Oasis<sup>®</sup> PRiME HLB (200 mg/6 cc) 和 Captiva EMR-Lipid (600 mg/6 cc) 净化后, 氨丙啉的回收率相似, 约 85% 左右。但 Captiva EMR-Lipid (600 mg/6 cc) 和 Oasis<sup>®</sup> HLB (500 mg/6 cc) 相比, Oasis<sup>®</sup> PRiME HLB 可以去除更多的杂质, 避免杂质干扰。这可能是由于 Oasis<sup>®</sup> PRiME HLB 柱可以针对这些动物组织更加有效的去除盐、磷脂、脂肪、蛋白质、色素、低极性杂质。不但如此, Oasis<sup>®</sup> PRiME HLB 柱无需活化, 简化操作步骤。因此, 选用 Oasis<sup>®</sup> PRiME HLB 柱对组织进行纯化。

### 2.4 复溶液种类的选择

样品经提取液提取后, 需置换试剂后再进行净化, 同时为了提高灵敏度, 洗脱液需要进行浓缩, 因此上述两步均需要选取合适的复溶液复溶, 复溶液比较了 0.3% TCA-70% 乙腈、磷酸盐缓冲液<sup>[4,17]</sup>、甲醇和流动相。结果见图 4, 相同氨丙啉添加水平条件下, 色谱图中磷酸盐缓冲液和流动相复溶样品的响应值明显高于另外两种, 同时含有更少的杂质。因此, 综合氨丙啉的响应值和杂质检测情况, 分别选择磷酸盐缓冲液和流动相作为净化步骤前后的复溶液。

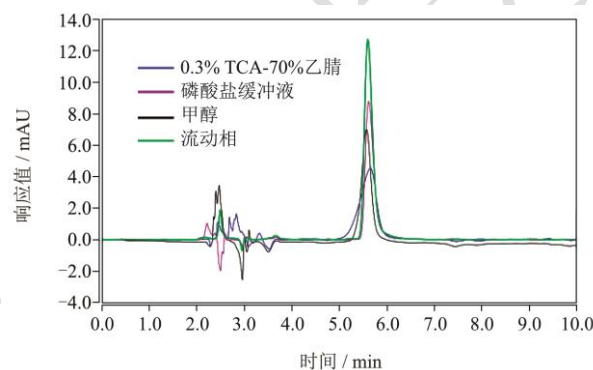


图4 不同溶剂复溶氨丙啉的色谱图

Fig.4 Chromatograms of redissolved amprolium by different solvents

### 2.5 方法学评价

#### 2.5.1 线性关系、检出限和定量限

准确移取适量的氨丙啉标准工作液, 用流动相稀释得 0.10、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0、8.0 和 10  $\mu\text{g/mL}$  共 8 种不同浓度的标准系列工作液, 用于构建标准曲线, 现用现配。以峰面积  $y$  为纵坐标, 相应的氨丙啉浓度  $x$  ( $\mu\text{g/mL}$ ) 为横坐标绘制标准曲线。结果显示氨丙啉浓度与其对应的峰面积在 0.1~10  $\mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系。线性回归方程和相关系数为  $y=0.7472x+0.0111$ , 相关系数  $r^2$  为 0.999。

选取信噪比不小于 10 时氨丙啉的质量浓度作为定量限 (Limit of Quantification, LOQ), 信噪比不小于 3 时氨丙啉的质量浓度作为检出限 (Limit of Detection, LOD), 通过检测最低浓度 (分别为基线噪声的 3 倍和 10 倍) 来评估 LOD 和 LOQ。检测结果显示, 肌肉中氨丙啉的 LOD 和 LOQ 分别为 150  $\mu\text{g/kg}$  和 250  $\mu\text{g/kg}$ , 肝脏、肾脏、脂肪和蛋中的 LOD 和 LOQ 分别为 250  $\mu\text{g/kg}$  和 500  $\mu\text{g/kg}$ 。空白组织色谱图和定量限色谱图见图 5 和图 6。在不同组织中的定量限均小于我国规定鸡组织中氨丙啉的最大残留量<sup>[6]</sup>, 满足氨丙啉在这 15 种禽可食性组织种残留检测的需要。

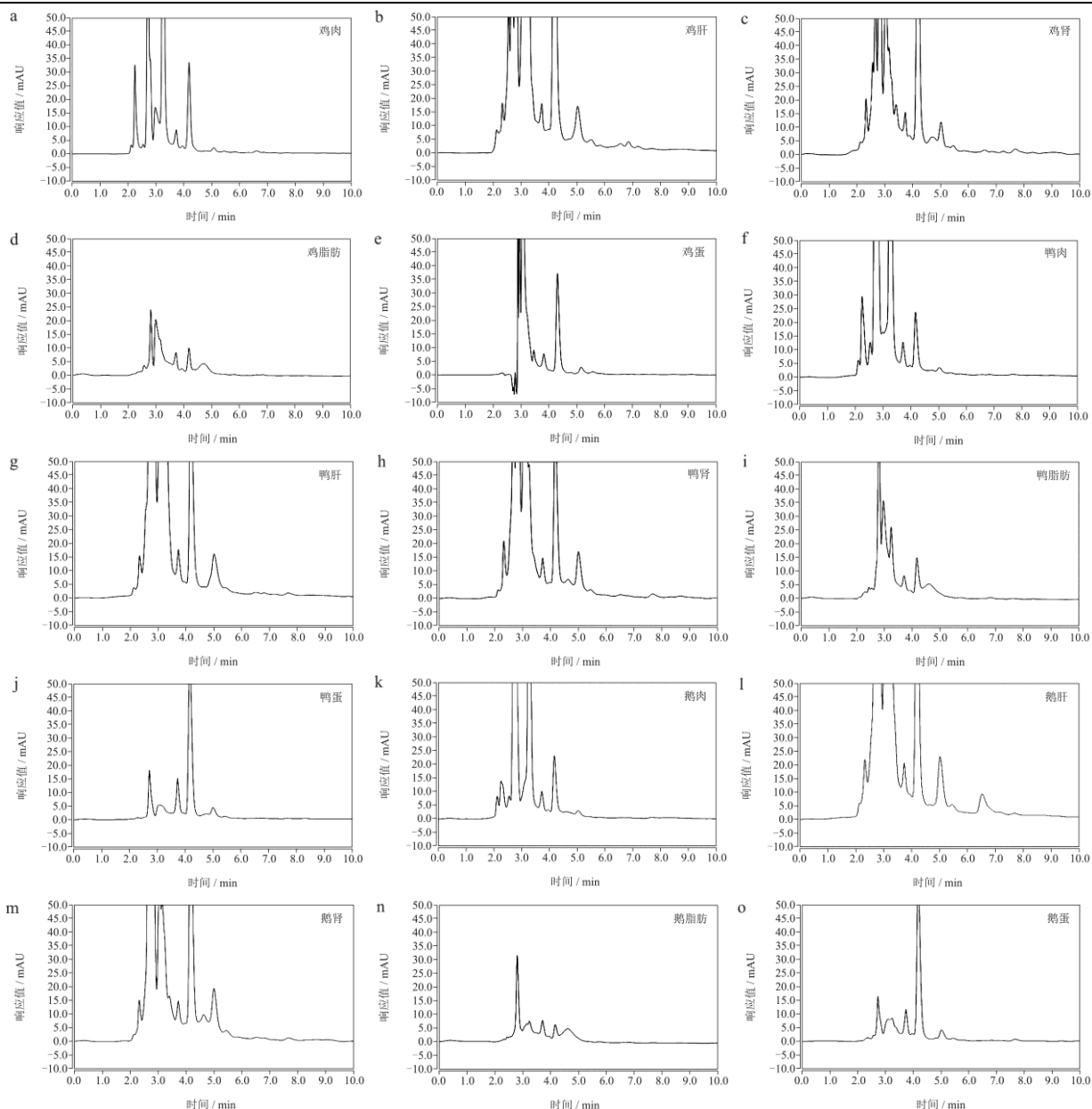
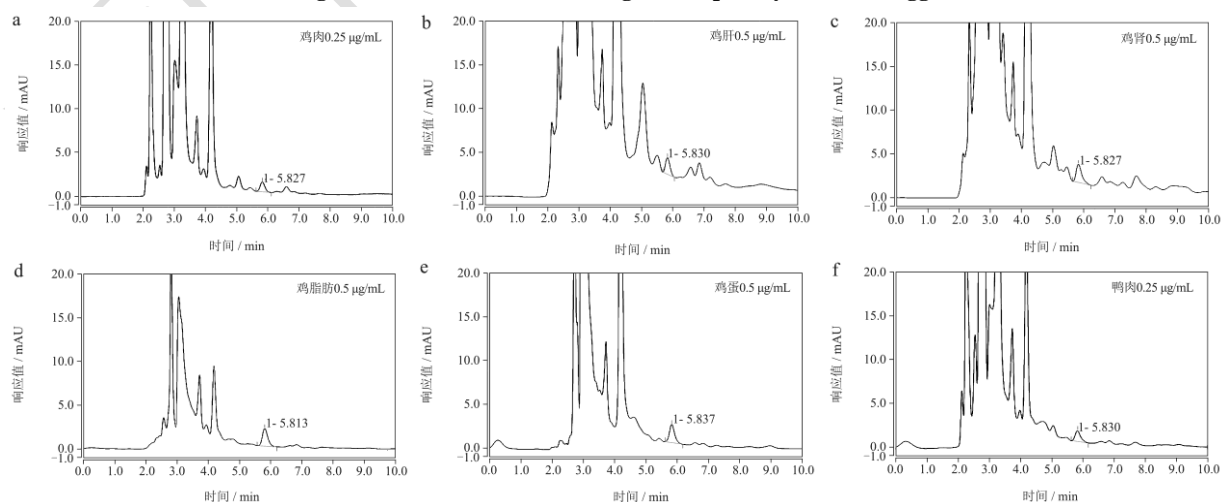


图5 各组织及其蛋的空白基质色谱图

Fig.5 The blank matrix chromatograms of poultry tissues and eggs



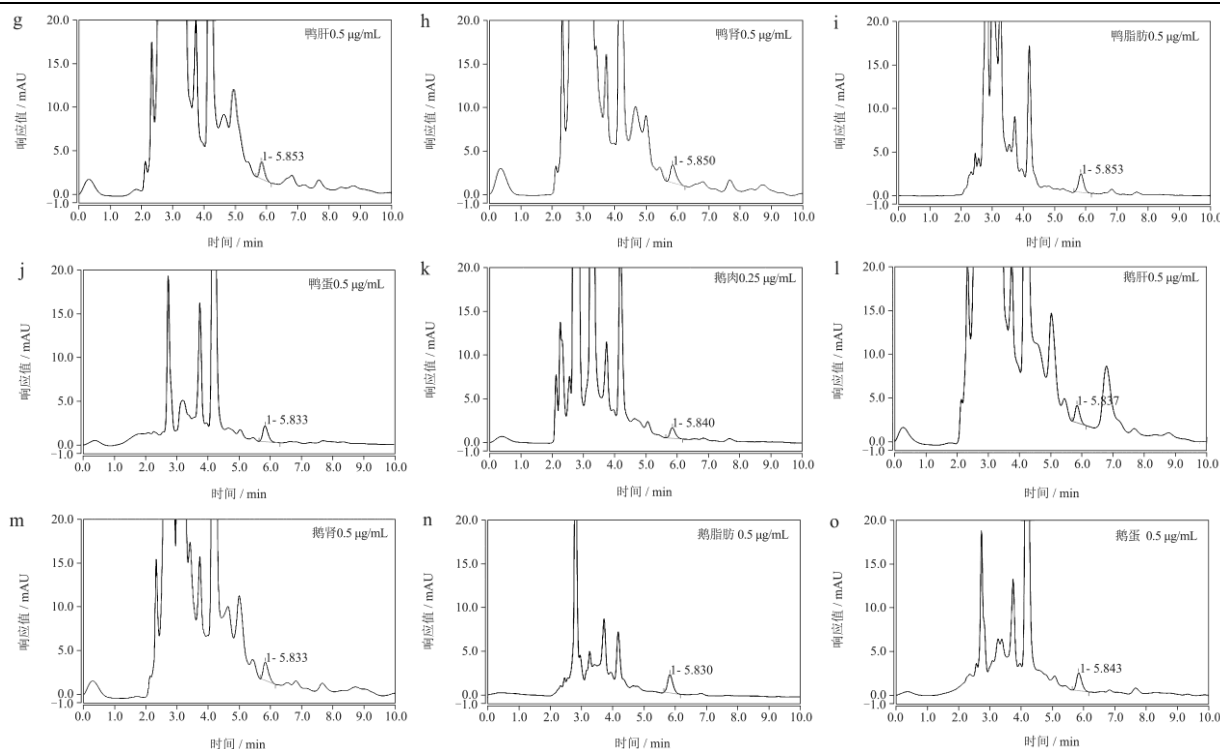


图6 氨丙啉在各组织及其蛋基质中定量限

Fig.6 LOD of amprolium in poultry tissues and eggs

表1 鸡食用组织中氨丙啉的精密度和回收率

Table 1 Precision and recovery of amprolium in edible tissues of poultry (n=5)

添加质量浓度 /(μg/kg)	组织	平均回收率±RSD /%	RSDs /%	组织	平均回收率±RSD /%	RSDs /%	组织	平均回收率±RSD /%	RSDs /%
250		82.06±7.19	6.76		78.77±2.23	6.78		72.78±2.19	3.12
500	鸡肉	95.82±7.01	5.19	鸭肉	82.75±4.00	4.48	鹅肉	85.99±5.54	2.89
1000		99.70±6.04	10.54		89.23±5.30	3.21		91.10±3.32	3.13
500		86.99±3.33	7.84		77.95±3.28	3.35		76.20±2.80	4.07
1000	鸡肝	95.14±7.97	3.67	鸭肝	87.92±2.41	2.27	鹅肝	85.80±3.33	2.53
2000		97.37±2.81	4.81		89.07±3.13	5.42		92.95±1.25	2.46
500		75.90±3.62	2.77		79.90±2.47	9.13		76.96±4.27	2.06
1000	鸡肾	88.18±0.91	2.69	鸭肾	85.11±4.28	1.96	鹅肾	85.39±1.59	3.50
2000		95.27±3.17	7.19		87.67±4.10	5.21		96.61±1.40	1.87
500		79.83±3.73	3.85		78.15±2.22	3.43		75.68±1.70	5.39
1000	鸡脂肪	89.66±2.65	2.54	鸭脂肪	89.19±1.98	1.61	鹅脂肪	85.81±5.27	4.65
2000		91.72±6.81	9.29		93.64±1.80	2.24		95.14±0.83	2.06
500		77.32±3.38	3.90		84.66±3.32	3.47		76.35±4.25	3.42
2000	鸡蛋	82.24±6.15	3.03	鸭蛋	92.33±6.93	5.52	鹅蛋	90.19±5.42	4.34
4000		94.66±7.76	6.10		89.12±1.89	3.09		92.32±1.89	3.09
8000		94.82±6.19	6.41		94.33±5.98	4.92		92.46±3.54	6.40

2.5.2 回收率和精密度

采用标准添加法，称取空白组织样品 2 g，置于 50 mL 离心管中，以 4 个浓度水平 (LOQ、0.5 MRL、MRL、2 MRL) 进行氨丙啉的添加。每个浓度水平下 5 个样品，重复 3 个批次，按“1.3.2”项制备供试品溶

液，在“1.3.3”项色谱条件下进行检测，以评价批内和批间的相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD)。结果如表 1 所示，计算得平均回收率为 74.65%~96.24%，在 70%~110% 的可接受范围内。采用批内、批间 RSD 处理方法的精密度，该方法的 RSD 分别≤

10.18%和 10.54%。检测结果显示,该方法的准确度和精密度均满足检测要求。

### 2.5.3 稳定性

以 1 mg/mL 标准溶液和 100  $\mu$ g/mL 标准溶液在 -20  $^{\circ}$ C 保存 3 个月和 1 个月计算稳定性。将特定条件下存放的标准溶液和现配现用的标准溶液分别用流动相稀释至 5  $\mu$ g/mL,在“1.3.3”项色谱条件下进行检测。根据《中华人民共和国药典》,若降率低于 2%,则说明氨丙啉是稳定的。结果表明,氨丙啉标准储备液液和工作标准液的损失率分别为 0.56%和 1.40%,均低于 2%,表明氨丙啉标准储备液在-20  $^{\circ}$ C 下保存 3 个月是稳定的,氨丙啉标准工作液在-20  $^{\circ}$ C 以下保存 1 个月是稳定的。

### 2.6 方法学应用

利用本方法分析了青岛市城阳区 7 家超市的 45 个样本,结果显示未测出氨丙啉残留。

## 3 结论

本研究利用 SPE-HPLC 法研究了一种高灵敏度、高准确度的检测禽类可食性组织和蛋中氨丙啉残留的方法。使用合适的固相萃取柱确保较少干扰物质的分析物,相比其他传统的净化方法更方便快捷高效,该方法具有良好的线性和精密度。在优化方法下,肌肉样品的定量限为 250  $\mu$ g/kg,肝脏、肾脏、脂肪、蛋样品的定量限为 500  $\mu$ g/kg。该方法中鸡肉定量限与文献报道的液相方法鸡肉的定量限 220  $\mu$ g/kg 接近,均低于我国标准规定的最大残留限量。相比其他检测方法,该方法覆盖的监测范围相对较广,可实现鸡、鸭、鹅三种常见禽类组织和蛋同时检测。综上所述,该方法采用简单而典型实验室提取工艺,对家禽组织和蛋中氨丙啉的提取和富集具有较高的灵敏度,为鸡、鸭、鹅组织和蛋中氨丙啉的残留检测提供了一种可行的方法。

### 参考文献

- [1] Squadrone S, Mauro C, Ferro G L, et al. Determination of amprolium in feed by a liquid chromatography-mass spectrometry method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 48(5): 1457-1461.
- [2] Bould J G, Elsheikha H M, Morsy T A. Avian coccidiosis: the basic pathology to control [J]. *J Egypt Soc Parasitol*, 2009, 39(1): 85-98.
- [3] Tylicki A, Lotowski Z, Siemieniuk M, et al. Thiamine and selected thiamine antivitamins-biological activity and methods of synthesis [J]. *Bioscience Rep*, 2018, 38(1): BSR20171148, 1-23.
- [4] 陆春波,陈慧华,林仙军,等.牛组织中氨丙啉残留的 HPLC 检测方法研究[J].*中国兽药杂志*,2012,46(8):24-27,38.
- [5] 李存,江潇潇,吴银良,等.液相色谱串联质谱法测定牛组织中氨丙啉残留量[J].*分析化学*, 2011,39(4):576-579.
- [6] GB 31650-2019,食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量[S].
- [7] Goessens T, Baere S D, Troyer N D, et al. Highly sensitive multi-residue analysis of veterinary drugs including coccidiostats and anthelmintics in pond water using UHPLC-MS/MS: application to freshwater ponds in Flanders [J]. *Croubels S Environ Sci: Processes Impacts*, 2020, 22(10): 2117-2131.
- [8] Martínez-Villalba A, Moyano E, Galceran M T. Analysis of amprolium by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(37): 5802-5807.
- [9] Barreto F, Ribeiro C, Hoff R B, et al. A simple and high-throughput method for determination and confirmation of 14 coccidiostats in poultry muscle and eggs using liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-tandem mass spectrometry (HPLC-QqLIT-MS/MS): Validation according to Europe [J]. *Talanta*, 2017, 168: 43-51.
- [10] Hormazabal V, Yndestad M. Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin and salinomycin in chicken tissues, plasma, and egg using liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2000, 23(10): 1585-1598.
- [11] 窦彩云,马育松,艾连峰,等.亲水作用色谱-串联质谱法测定动物源食品中氨丙啉残留量[J].*中国食品卫生杂志*,2016, 28:348-351.
- [12] 岳振峰,康海宁,陈小霞,等.液相色谱串联质谱法测定鸡肉中 20 种抗球虫药物多残留[J].*分析化学研究报告*,2012, 40(8):1262-1266.
- [13] 李银生,王秀红.液相色谱串联质谱法同时测定鸡肉或鸡蛋中常见抗球虫类药物残留[J].*上海交通大学学报*,2011,29 (6):16-22.
- [14] SN/T 3144-2011,出口动物源食品中抗球虫药物残留量检测方法液相色谱-质谱/质谱法[S].
- [15] SN/T 4583-2016,出口动物源食品中氨丙啉残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法[S].
- [16] SN/T 4812-2017,进出口食用动物氨丙啉药物残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法[S].
- [17] GB 31613.1-2021,食品安全国家标准牛可食性组织中氨丙

- 啉残留量的测定液相色谱-串联质谱法和高效液相色谱法 [S].
- [18] Baker M M, El-Kafrawy D S, Magdi-Khalek M M, et al. Comprehensive stability-indicating high-performance liquid chromatography coupled with diode array detection method for simultaneous determination of amprolium hydrochloride and ethopabate in powder dosage form for veterinary use [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(21): 3340-3351.
- [19] Yuzo Y, Fusao K. Determination of halofuginone and amprolium in chicken muscle and egg by liquid chromatography [J]. *J AOAC Int*, 2001, 84(1): 43-46.
- [20] 李丹,吴翠玲,张聪聪,等.亲水作用色谱柱-高效液相色谱法测定鸡蛋中氨丙啉的残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019,10(17):5648-5652.
- [21] 吴秋侠,李引乾,曹玲玲,等.离子对反相高效液相色谱法测定盐酸氨丙啉在鸡肉中残留方法的建立[J]. *畜牧与兽医*, 2007,39(3):38-39.
- [22] Furusawa N. Simplified high-performance liquid chromatographic determination of residual amprolium in edible chicken tissues [J]. *J Chromatogr Sci*, 2002, 40(7): 355-358.