

# 高效液相色谱法测定饲料中氯羟吡啶含量

索德成<sup>1\*</sup>, 刘士杰<sup>2</sup>, 魏书林<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081; 2. 中国饲料工业协会, 北京 100026)

**摘要:** 本研究建立了用高效液相色谱法检测饲料中氯羟吡啶的含量方法。饲料经甲醇提取后, 用氧化铝柱净化分离, 浓缩, 用甲醇溶解, 定容。进高效液相色谱检测, 以 SB-C 正常柱(150 mm × 4.6 mm)为分离柱, 以水和乙腈(10:90, V:V)作为流动相, 用紫外检测器于 270 nm 处检测。应用此方法, 将氯羟吡啶以 1、10 mg/kg 和 100 mg/kg 含量添加到空白饲料中, 测得回收率在 90%~102% 之间, 变异系数均低于 5%, 方法的定量限为 1 mg/kg。结果表明: 该检测方法可用于饲料中氯羟吡啶的检测。

**关键词:** 氯羟吡啶; 饲料; 高效液相色谱法

**中图分类号:** S816.701.7

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0258-7033(2008)11-0049-03

氯羟吡啶(3,5-二氯-2,6-二甲基-4-羟基吡啶), 又名氯吡醇, 二氯二甲吡啶酚, 英文名为 clopi-

dol, 是一种广泛应用的抗球虫添加剂, 抑制球虫的作用比杀球虫的作用更为明显。氯羟吡啶对 9 种鸡艾美耳球虫的防治均有良好效果, 特别对柔嫩艾美耳球虫的治疗作用最强。但是其有一定的致畸性和

收稿日期: 2007-01-12; 修回日期: 2007-07-12

\* 通讯作者

以扩增, Matsunaga 等<sup>[9]</sup>对加热过的马肉中的 DNA(目的片段 439 bp)进行扩增时发现同样的问题, 所扩增的目的片段越大, 越难以扩增出来。因此, 所选择的需要扩增的目的片段应尽量短。本试验设计的引物扩增的目的片段约为 200 bp, 符合这样的要求, 建立的方法具有特异性强、灵敏度高(灵敏度均为 0.1%)、重复性好等特点, 适用于一般实验室, 可以作为鉴别、肉骨粉中源性成分种类的常规方法。

**3.3 本检测方法的应用前景** 近年来, 疯牛病、禽流感、羊瘙痒病在世界各地的蔓延和传染给人类的事例, 引起了各国政府和消费者对食品和饲料安全性的高度关注。2004 年以来, 随着数个国家高致病性禽流感的相继发生, 除鸡以外已波及到人、天鹅、猫等, 因感染禽流感而致死的人数不断增加, 禽类食品和饲料的安全性已关系到人类的安危<sup>[9,10]</sup>。为了防止高致病性禽流感的传播, 有必要对进出口禽类食品和饲料的动物源性成分作品种鉴定, 确定禽类食品和饲料的成分来源。本研究成功建立了饲料中禽类源性成分的 PCR 检测技术, 所设计的引物可以专一地从 DNA 模板中扩增到禽类的 mt-DNA 片段, 不能从其他动物组织 DNA 中扩增出 PCR 产物, 检出限为 0.1%; 所建立的检测禽类源性成分的方法特异性强、准确性好、灵敏度高, 可以应用到进出口饲料源性成分品种鉴定的工作当中, 为明确饲料的成分

和来源, 为全面防御禽流感的传播提供分子生物学的检测方法。

## 参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 1-2.
- [2] 褚玲娜, 詹勇, 许梓荣. 禽流感的危害与防治[J]. 中国动物保健, 2004, (1): 30-32.
- [3] 费东亮, 杜绍范. 禽流感检测方法研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2005, (8): 52-54.
- [4] 潘良文, 陈家华. 食品和饲料中动物源成分的检测方法的进展[J]. 检验检疫科学, 2002, 12(2): 45-47.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 陈茹, 林志雄, 刘琳琳. 应用 PCR 等核酸技术检验动物饲料中牛羊组织成分[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(9): 3-8.
- [7] Ebbehøj E F, Thomsen P D. Species differentiation of heated meat products by DNA hybridization[J]. Meat Sci, 1991, 30(3): 221-234.
- [8] Ebbehøj E F, Thomsen P D. Differentiation of closely related species by DNA hybridization[J]. Meat Sci, 1991, 30(4): 359-366.
- [9] Matsunaga T, Chikuni K, Tanabe R. *et al.* A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay[J]. Meat Sci, 1999, 51(2): 143-148.
- [10] Lovatt A. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products [J]. Rev Mol Biotechnol, 2002, 82(2): 279-300.

致癌作用,在动物组织中会造成不同程度的残留,对人会造成危害。近年来,日本和欧盟等国已经禁止其在家禽中使用,大部分国家都规定了各种动物组织中氯羟吡啶残留最高限量标准。由于使用不当和对饲料中氯羟吡啶添加量无法检测,可能导致氯羟吡啶在禽肉中的残留非常严重,影响我国禽类产品质量和安全,影响禽类产品出口。为了解决这些问题,建立一种准确可靠的饲料中氯羟吡啶的检验方法是有必要的。国外一般用气相色谱法测定氯羟吡啶含量,因气相色谱费时费力,难以作为常规方法应用。高效液相色谱法具有简便快速、灵敏的特点,完全用于氯羟吡啶的测定。本项研究建立一种利用高效液相色谱法来检测饲料中氯羟吡啶含量的方法<sup>[1-6]</sup>。

## 1 材料和方法

**1.1 试剂和溶液** 氯羟吡啶标准品(纯度 $\geq 98.5\%$ , Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司);甲醇(分析纯,北京化工厂);乙腈(色谱纯, FISHER 试剂公司);氧化铝(中性、层析用、100~200 目,上海化学试剂公司):在 800℃ 灼烧 3 h,并在 130℃ 烘箱中烘烤 1 h 后,放入干燥器中备用。

**1.2 仪器** 高效液相色谱(Agilent 1100):带有紫外或二极管检测器,色谱柱为 Agilent SB-C18 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m);台式旋转振荡器(TL-2 型,上海仪器厂);旋涡混合器(Heidolph 公司);旋转蒸发器(Heidolph 公司);氧化铝净化柱(自制):10 mm $\times$ 200 mm 玻璃柱。柱底部装有 G4 砂芯板、装入氧化铝约 10 cm 的高度,使用前用 20 mL 甲醇淋洗。

**1.3 样品的制备** 精密称取样品 5 g,与 50 mL 离心管中,加入甲醇 25 mL,旋涡混合,于振荡器振荡 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

用移液管准确吸取上清液 10 mL,移入氧化铝净化柱中,用 10 mL 甲醇洗柱内壁。过柱溶液及洗脱液全部接收于 50 mL 旋转蒸发瓶中,用 50℃ 水浴的旋转蒸发器将溶剂蒸干。用适量的甲醇(1~10 mL)完全溶解残渣(可旋涡混合 1~2 min),过 0.45  $\mu$ m 滤膜,进色谱检测。

**1.4 色谱条件** 流动相为乙腈:水(90:10, V:V);检测波长为 270 nm;流速为 1.0 mL/min。

## 2 结果与分析

**2.1 色谱条件和色谱图** 应用 HPLC 检测药物残

留量时,选择合适的液相色谱操作条件是至关重要的。本试验通过改变流动相混和物的比例和流速,调节柱压和组份在色谱柱中的分离效果,使之出现较佳的保留时间。流动相为乙腈:水(10:90)及流速为 1.0 mL/min 时,氯羟吡啶于 7 min 附近出峰(见图 1)。在此条件下,连续进 10  $\mu$ g/mL 的样品 5 次,其峰面积和时间满足色谱检测的要求,分离条件良好。不同类型的色谱柱由于填料的不同可能产生不同的结果,但可以通过调节流动相的比例找到最佳的条件。

在此条件下,对空白样品和添加 1 mg/kg 氯羟吡啶的饲料样品进行检测,色谱见图 2、3,可见经过氧化铝净化柱净化后。排除了饲料中杂质的干扰,证明此条件满足对饲料中氯羟吡啶的检测要求。

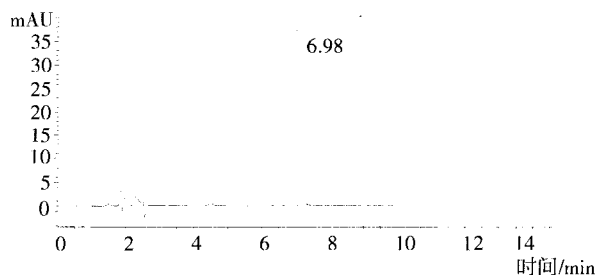


图 1 标准品谱图

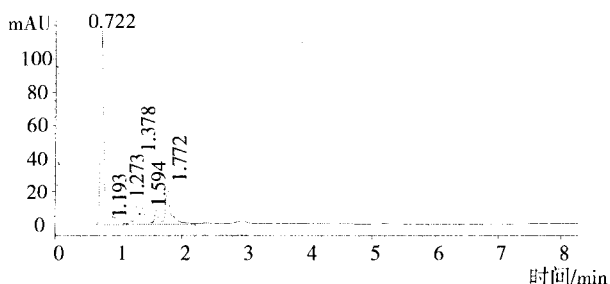


图 2 空白饲料谱图

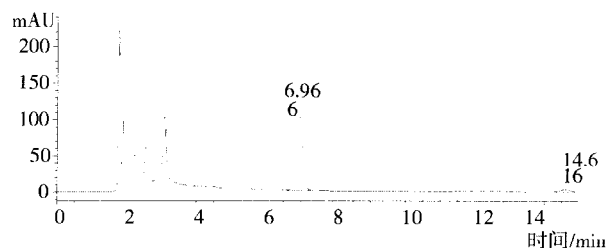


图 3 添加 1 mg/kg 氯羟吡啶的饲料谱图

**2.2 工作曲线的考察** 精密称取氯羟吡啶对照品 0.01 g 于 100 mL 容量瓶,加甲醇溶解并定容,分别从中吸取 1、2、5、10、20 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,过 0.45  $\mu$ m 的滤膜,上机测定。其回归方程为  $Y=36050X-2650$ ,  $r=0.9999$ 。氯羟吡啶浓度在

1.0~20  $\mu\text{g/mL}$  的范围内线性关系良好。

**2.3 最低检出限和最低定量限** 在本实验条件下,将标准溶液连续稀释后进行空白样品的加标回收,根据3倍噪音的峰响应值、取样量和进样量,得出方法的检出限为0.05 mg/kg。但是在实际样品的检测过程中发现在以添加量为0.05 mg/kg的饲料时,其回收率为43.5%~82.5%之间( $n=5$ ),无法满足检测的要求,而在1 mg/kg的测定结果较好,因此,将最低定量限定为1 mg/kg。

#### 2.4 回收率实验

**2.4.1 不同的提取净化方法对回收率的影响** 文献中一般采用乙腈提取后,碱性氧化铝净化或经过碱性氧化铝后,还需采用葡聚糖凝胶阴离子交换柱进行进一步的除杂处理,然后进行检测。经过实验发现。饲料用碱性氧化铝处理后,已经去除了大部分干扰物,可以满足色谱检测的要求(见图2),不需利用葡聚糖凝胶阴离子交换柱除杂。根据文献<sup>[1-3]</sup>采用乙腈提取饲料,用氧化铝柱净化,用甲醇淋洗的方法来检测发现其回收率较低(50%~80%之间)( $n=8$ )。最后经实验改为甲醇提取,用氧化铝柱净化,用甲醇淋洗,其回收率达到检测要求,见表1。

表1 氧化铝柱的高度对回收率的影响( $n=5$ )

	柱高度/cm		
	5	10	15
回收率 /%	80.3 $\pm$ 40.3	95.0 $\pm$ 3.1	96.2 $\pm$ 3.8

**2.4.2 氧化铝柱的高度对回收率的影响** 在实验中,发现氧化铝柱的高度对净化效果和实验结果有一定的影响,在实验过程中选择了5、10、15 cm的3个不同填充高度的氧化铝柱进行实验,发现经5 cm的杂质较多,对检测结果有很大的影响,造成回收率较低,标准偏差较高,10 cm与15 cm的结果无显著差异,但是使用15 cm的柱子,必须增加洗脱的甲醇用量,才能完全洗脱下来。填充高度为10 cm氧化铝柱是最适当的选择。

**2.4.3 回收率的重复试验** 精密称取不同类型的饲料样品5 g,添加不同量氯羟吡啶标准溶液制成含1、10、100 mg/kg氯羟吡啶的样品,按上述方法进行检测,每个样品5个重复,测的回收率和变异系数见表2。

表2 添加回收实验结果

饲料类型	添加浓度 ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	回收率/%			平均值%	RSD/%
猪配合饲料	1	93.46	101.1	91.49	94.84	3.8
		95.54	92.60			
	10	90.98	95.10	93.08	94.94	3.1
		98.89	96.65			
	100	95.00	95.69	97.31	96.95	2.1
		96.45	100.3			
鸡配合饲料	1	95.31	95.69	97.31	95.62	1.5
		96.47	93.3			
	10	95.31	95.69	97.31	94.82	3.2
		96.47	89.3			
	100	95.91	101.69	100.31	98.54	2.5
		96.47	98.3			
鸡浓缩料	1	88.05	88.07	81.13	84.21	5.5
		86.2	77.61			
	100	95.36	88.21	92.61	90.38	6.8
		95.04	80.68			
	1000	98.03	95.21	92.68	95.00	4.9
		88.5	100.6			
鸡预混料	1	88.61	88.27	90.25	92.49	4.8
		97.2	98.1			
	100	99.61	88.27	91.25	90.10	8.3
		92.36	78.99			
	5000	101.2	100.2	99.65	99.14	4.0
		92.36	102.3			

### 3 结 论

从表2可以看出,在饲料中分别添加1、10  $\mu\text{g}$ 和100  $\mu\text{g/g}$ 氯羟吡啶,测得的回收率分别是90%~102%,变异系数均小于5%,本方法的最低定量限可达到1 mg/kg。结果表明,该检测方法可用于饲料中氯羟吡啶的检测。

#### 参考文献:

- [1] 农业部畜牧兽医局. 动物源食品中氯羟吡啶残留检测方法—高效液相色谱法[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36 (7): 13-14.
- [2] Nagata T, Saeki M. Simultaneous determination of 17 antibiotics in chicken tissues by high performance liquid chromatography[J]. J Food Hyg Soc Japan, 1988, 29: 13-20.
- [3] 皮雄娥, 应永飞, 费笛波, 等. 鸡肉中氯羟吡啶的高效液相色谱法测定浙江农业学报, 2005, 17(4): 200-202.
- [4] 张睿, 段宏安. 禽肉中氯羟吡啶残留量的GC/MS测定法[J]. 中国兽药杂志, 2002, (38): 39-41.
- [5] 沈建忠, 肖希龙, 朱蓓蕾, 等. 氯羟吡啶在鸡组织中的残留研究[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(3): 238-244.
- [6] Suzuki E, Matsuda M, Momose A, et al. Improved method for gas liquid chromatographic determination of clopidol in chicken tissues[J]. J AOAC, 1980, 63: 1211-1214.