

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.01.05

高效液相色谱法检测育肥猪配合饲料中孟布酮

刘雪红

(大连市检验检测认证技术服务中心, 辽宁大连 116037)

[收稿日期] 2022-04-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 01-0038-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 应用高效液相色谱技术,建立了育肥猪配合饲料中孟布酮的检测方法。样品经乙腈提取后,通过 WAX 固相萃取柱净化;采用 0.5% 磷酸乙腈溶液作为流动相进行梯度洗脱,经 C_{18} 色谱柱分离,通过二极管阵列检测器进行测定。在 0.2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内线性关系良好,相关系数大于 0.999。在 0.2, 0.4, 2 mg/kg 添加水平下,平均回收率为 78.1% ~ 90.6%,相对标准偏差均小于 10%。检测限为 0.06 mg/kg ,定量限为 0.2 mg/kg ,该法准确、简单、快速。

[关键词] 育肥猪配合饲料;孟布酮;高效液相色谱

Detection of Menbutone in Compound Feed for Finishing Pigs by HPLC

LIU Xue-hong

(Dalian Center for Certification and Food and Drug Control, Dalian 116037, China)

Abstract: A HPLC method was developed to determine menbutone in compound feed for finishing pigs. The samples were extracted by acetonitrile and purified by a WAX solid phase extraction column. The HPLC separation was performed on C_{18} column with a linear gradient elution program of 0.5% phosphoric acid acetonitrile solution as the mobile phase. PDA was used for the selective detection. There was a good line correlation in the range of 0.2 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the correlation coefficient was greater than 0.999. The average recovery was 78.1% ~ 90.6% and *RSD* were both less than 10%. The limit of detection was 0.06 mg/kg and limit of quantification was 0.2 mg/kg . The method was accurate, convenient and fast.

Key words: compound feed for finishing pigs; menbutone; HPLC

孟布酮(4-(4-甲氧基萘-1-基)-4-氧代丁酸)属于动物专用利胆药^[1-2],具有刺激动物胃肠等消化液分泌的作用,适用于猪、羊、牛、马、犬等的消化不良、食欲减退、便秘腹胀等胃肠机能障碍,辅助治疗肠炎、中毒性肝功能受损及肝营养不良等疾病。长期大量使用易在动物体内残留,农业

农村部公告第 284 号^[3] 公布了最高残留限量 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (参照日本肯定列表制定)。兽药主要是预防、诊断、治疗动物疾病的物质,具有极强的针对性,能够调节动物的身体机能。但随着摄入量的增多,最终导致对人体慢性中毒^[4]。根据《关于停止生产、进口、经营、使用部分药物饲料添加剂的公

告》(农业农村部公告第 194 号^[5]),允许在商品饲料中使用的兽药包括两类:抗球虫类药物和中药类药物,孟布酮是不允许添加到饲料中的。但由于孟布酮能促进胃肠内脂肪、蛋白质和淀粉等的消化吸收,调节胃肠机能,促进动物生长发育,提高生产性能,很可能被添加到饲料中^[6]。目前,未查到饲料中孟布酮的检测方法^[7],本文采用 WAX 固相萃取柱净化^[8],C₁₈ 色谱柱分离,高效液相色谱法检测饲料中孟布酮^[9]。分析速度快、回收率高,能满足育肥猪配合饲料中孟布酮检测定性、定量的要求。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备 电子天平 RD-200,德国 Sartorius 公司;超声波清洗器 KQ-250B,昆山市超声仪器有限公司;离心机 CF16RN,日立公司;氮吹仪 N-EVAP,美国 Organomation;数显强力涡旋混合器 MS3,德

国 IKA 公司;液相色谱质谱联用仪 2695,美国 Waters 公司;色谱柱 Sunfire C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm),美国 Waters 公司;固相萃取柱 Oasis WAX 3 mL 60 mg,美国 Waters 公司。

1.2 药品与试剂

1.2.1 标准品 孟布酮(C₁₅H₁₄O₄,CAS 号:3562-99-0)批号 11462103 76654,含量 99.90%,坛墨质检科技股份有限公司。

1.2.2 供试品

1.2.2.1 空白样品 育肥猪配合饲料,经检测不含孟布酮。

1.2.2.2 空白添加样品 分别按照 0.2 mg/kg、0.4 mg/kg、2 mg/kg 的比例在空白样品中添加孟布酮,混匀。

1.2.3 试剂 甲醇、乙腈色谱纯,氨水、磷酸分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

1.2.3.1 0.5% 磷酸溶液:量取 5.0 mL 磷酸于 1000 mL 水中,混匀。

1.2.3.2 0.5% 氨水溶液:取氨水 0.5 mL,加水至 100 mL,混匀即可。

1.2.3.3 9% 氨化甲醇溶液:取氨水 9 mL,加甲醇至 100 mL,混匀即可。

1.2.4 标准储备液(1 mg/mL):精密称取孟布酮标准品 10 mg 于 10 mL 容量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度。保存于 -20 °C,有效期为 3 个月。

1.2.5 标准中间溶液(100 μg/mL):准确量取标准储备溶液 1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,保存于 -20 °C,有效期为 3 个月。

1.2.6 标准工作液:精密量取孟布酮标准中间液,用甲醇稀释成浓度为 0.2、0.5、2.0、5.0、10.0 μg/mL 的系列标准工作液。

1.2.7 微孔滤膜:有机系,孔径 0.22 μm。

1.3 样品检测

1.3.1 样品处理

1.3.1.1 提取:准确称取饲料样品 2.00 ± 0.02 g,加乙腈 10 mL,超声 10 min,8000 r/min,离心 10 min,取上清液。重复提取 1 次。合并 2 次提取的上清液,取上清液 10 mL,50 °C 氮气吹干,残留物中加入 0.5% 氨水溶液 5 mL,涡旋 5 min,得到待净化液,备用。

1.3.1.2 净化:将 WAX 固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 进行活化;待净化液 5 mL 上样;用甲醇 3 mL 淋洗,抽干;9% 氨化甲醇溶液 3 mL 洗脱,抽干。收集洗脱液,50 °C 氮气吹干,加入甲醇 1 mL 复溶,涡旋 5 min,滤过,滤液供高效液相色谱仪测定。

1.3.2 液相色谱条件 色谱柱 Sunfire C₁₈ 柱(4.6 × 250 mm, 5 μm),柱温:30 °C,进样量:10 μL,检测波长:236 nm,流速:1.0 mL/min,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间(min)	0.5% 磷酸(%)	乙腈(%)	梯度曲线
0.00	90.0	10.0	
1.00	90.0	10.0	6
2.00	40.0	60.0	6
8.00	40.0	60.0	6
8.10	10.0	90.0	6
9.00	10.0	90.0	6
9.10	90.0	10.0	

2 结果与分析

2.1 标准曲线 以色谱峰面积为纵坐标,标准溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 为横坐标,绘制标准曲线: $y = 78664x - 552.56$,线性相关系数 r 为 0.999 8,孟布酮的线性范围为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 检测限和定量限 添加适量标准液于空白饲料中,经提取后测定。根据信噪比 $S/N > 3$ 为检测限,信噪比 $S/N > 10$ 为定量限,检测到孟布酮的检测限为 0.06 mg/kg ,定量限为 0.2 mg/kg 。空白饲料中添加 0.2 mg/kg 的孟布酮色谱图见图 1。

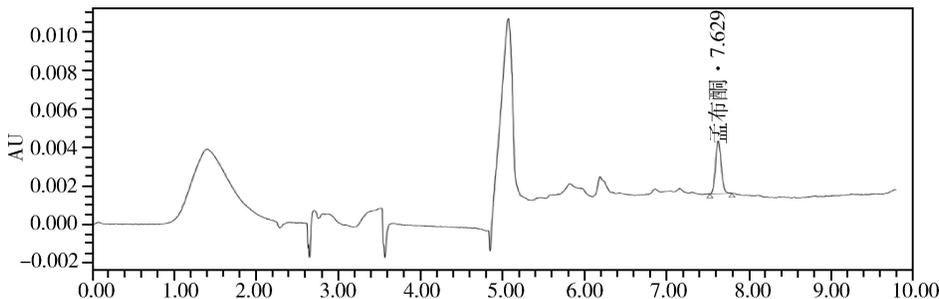


图 1 空白饲料中添加 0.2 mg/kg 的孟布酮色谱图

Fig 1 Chromatogram of 0.2 mg/kg montebutone added to blank feed

2.3 回收率及重复性试验 在空白饲料中进行 3 浓度(0.2,0.4,2 mg/kg)回收率试验,每个添加浓度 6 个平行,连续测定 3 批,其平均回收率、相对标准偏差见表 2。从表看出孟布酮的添加回收率在 78.1% ~ 90.6% 之间^[10],批内批间相对标准偏差均小于 10%。

2.4 稳定性试验

表 2 孟布酮回收率及重复性试验结果

Tab 2 Recovery and repeatability test

results of menbutone($n = 6$)

添加浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
0.2	78.1, 79.2, 90.0	6.0, 7.5, 6.2	8.0
0.4	83.3, 79.6, 83.6	5.6, 5.5, 5.6	2.8
2	90.6, 83.3, 83.0	8.6, 5.6, 8.3	5.1

2.4.1 标准溶液的稳定性试验 对标准储备溶液 (1 mg/mL) 进行了为期 3 个月的稳定性试验。每次试验时,临时稀释,每周配置标准系列溶液 (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$),按照上述仪器条件测定,记录峰面积,取峰面积与浓度做线性回归。共进行了 14 次标准曲线测定,见图 2。3 个月内每个浓度溶液的峰面积无显著变化。同时对储存的标准中间溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行同样试验,结果一致。因此,标准储备溶液 (1 mg/mL) 和标准中间溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的保存条件均为: $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存时间为 3 个月

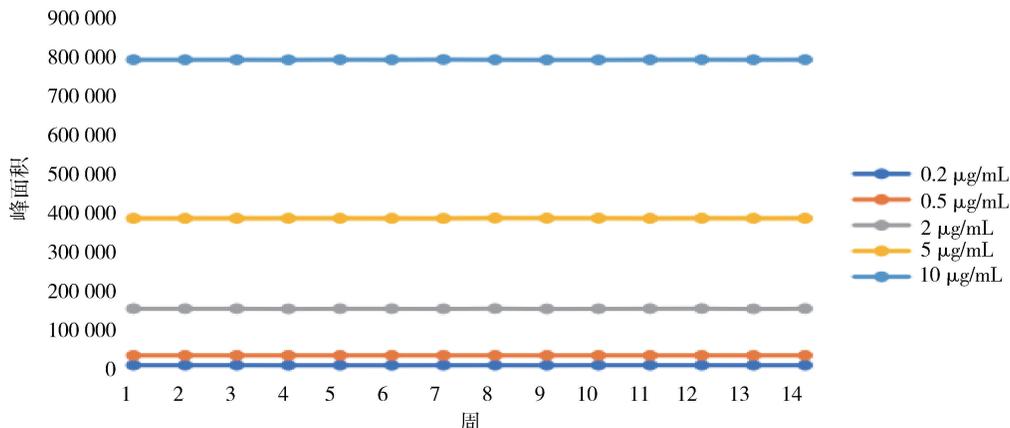


图 2 孟布酮标准储备溶液保存时间与峰面积比较图

Fig 2 Comparison of storage time and peak area of montebutone standard solution

2.4.2 上机测定用标准工作液及试样液的稳定性试验 分别对标准工作溶液(2 μg/mL)和试样溶

液(2 μg/mL)进行了 24 小时的稳定性试验。试验结果表明,室温条件下 24 小时内稳定,见表 3。

表 3 标准工作溶液及试样液稳定性试验结果

Tab 3 stability test results of standard working solution and sample solution(n=6)

时间 Hr	0	2	4	8	16	24	平均值	RSD(%)
标准工作液峰面积	156 776	148 790	152 311	158 436	150 078	149 333	152 620	2.7
试样峰面积	117 582	112 899	119 031	118 483	110 845	113 190	115 398	3.1

3 讨论与结论

3.1 流动相中有机相的确定 考察两种最常用有机相:乙腈和甲醇。结果显示,二者对孟布酮的响应及分离效果基本一致;但选用甲醇时,系统压力较高,同时噪声较乙腈大。因此,本实验选择乙腈为流动相。

3.2 流动相组成中水相的确定 考察 2 种水相体系对结果的影响:0.2% 甲酸,0.5% 磷酸,2.0 μg/mL 标准溶液液相色谱图见图 3 和图 4。结果显示以 0.2% 甲酸,0.5% 磷酸为水相,分离效果及响应值基本一致,但含甲酸时基线向下漂移,不稳定,且有明显杂质峰。因此在上机过程中,在流动相中引入磷酸。

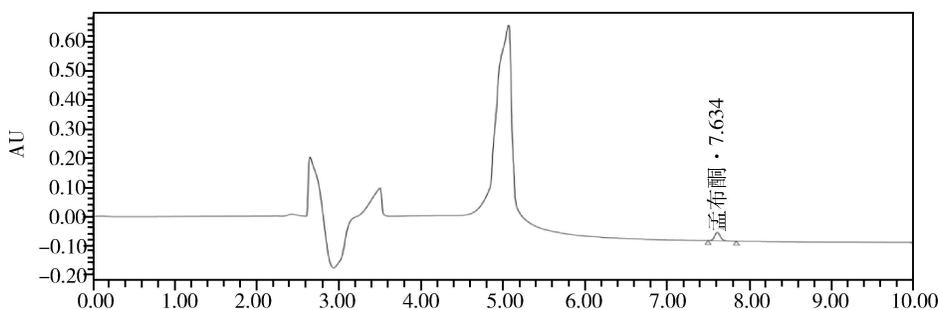


图 3 2.0 μg/mL 标准溶液液相色谱图(0.2%甲酸为流动相)

Fig 3 Chromatogram of 2.0 μg/mL standard solution(mobile phase by 0.2%formic acid)

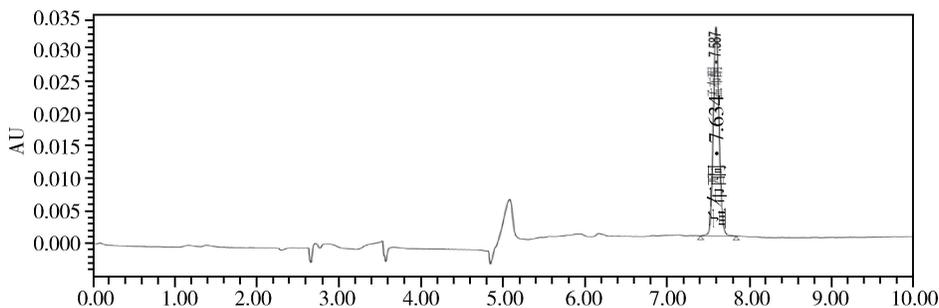


图 4 2.0 μg/mL 标准溶液液相色谱图(0.5%磷酸为流动相)

Fig 4 Chromatogram of 2.0 μg/mL standard solution(mobile phase by 0.5% phosphoric acid)

3.3 流动相洗脱方式的确定 比较了等度(0.5% 磷酸:乙腈 = 64:36)和梯度(表 1)两种洗脱方式,考察了 2.0 μg/mL 标准溶液在两种洗脱方式下情况,见图 4 和图 5。结果表明,两种洗脱方式下孟布

酮与杂质都能达到有效分离,峰形好;但等度洗脱孟布酮保留时间较长为 19 min,梯度洗脱保留时间为 7 min。考虑试验效率,本研究选择梯度洗脱方式。

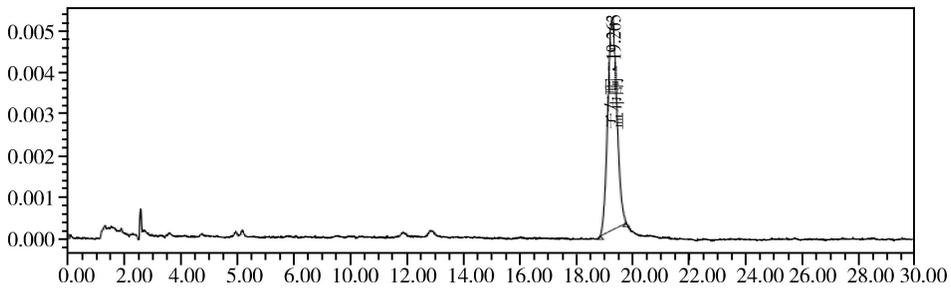


图 5 等度 2.0 µg/mL 标准溶液液相色谱图

Fig 5 Chromatogram of 2.0 µg/mL standard solution (isocratic elution)

3.4 检测波长的选择 对孟布酮 2 µg/mL 标准溶液进行紫外扫描, 见图 6, 最大吸收波长为 235.8 nm。本实验选择检测波长为 236 nm。

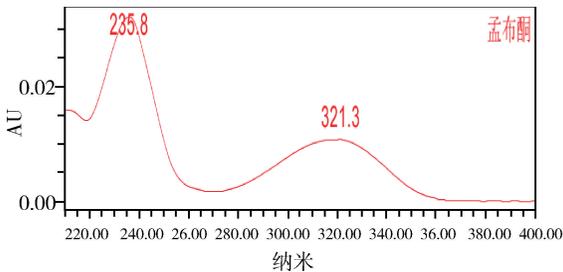


图 6 孟布酮光谱图

Fig 6 Spectrum of menbutone

3.5 提取溶剂的选择 乙腈对大多数兽药提取效果较好, 提取样品时提取液基质效应较低, 而且乙腈能较好地使蛋白质凝聚变性从而沉淀蛋白; 与纯乙腈相比, 在提取液中加入酸, 使呈酸性, 提高提取

效率^[11]; 同时考虑到甲醇对孟布酮的溶解性与乙腈类似, 且其沸点较乙腈低, 更易吹干浓缩。基于以上理由, 比较 4 种提取溶剂: 乙腈、0.2% 甲酸乙腈、0.5% 磷酸乙腈、甲醇。空白饲料中添加 0.2 mg/kg, 4 种溶剂的提取效率没有显著差异。但甲醇为提取溶剂时, 提取液杂质较多、混浊呈淡黄色, 过固相萃取柱困难, 净化时间长, 因此本研究选择乙腈为提取溶剂。

3.6 提取次数选择 比较提取液量 10 mL, 提取 1、2、3 次。3 种添加浓度下孟布酮回收率及重复性情况 (0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg, 2 mg/kg), 每水平添加重复三次, 效果见表 4。提取 1 次, 在添加较低浓度 (0.2 mg/kg 和 0.4 mg/kg) 时, 回收率及 RSD 均满足要求; 但较高浓度 2.0 mg/kg, 回收率小于 70%, 且重复性差。当提取 2 次与 3 次时, 3 种添加水平回收率和 RSD 均满足要求, 选择提取 2 次。

表 4 不同提取次数考察结果表

Tab 4 Investigation results of different extraction times

提取次数		1			2			3		
0.2 mg/kg	回收率%	71.1	80.1	73.5	83.5	89.4	90.1	85.2	80.6	88.8
	RSD%		6.3			4.2			4.9	
0.4 mg/kg	回收率%	72.6	79.1	70.9	85.4	80.7	87.1	91.0	86.9	82.3
	RSD%		5.9			4.0			5.1	
2 mg/kg	回收率%	65.4	75.8	81.9	85.9	88.2	81.2	85.1	90.2	89.9
	RSD%		11.3			3.3			4.2	

3.7 离心速度与时间的确定 WAX 固相萃取柱较常用的 HLB、MCX 固相萃取柱, 溶液过柱时间长, 离心的效果对净化时间影响很大。如果离心转速低、时间短, 净化时间太长, 影响试验; 因此未选择低转速、短时间试验。离心时间 10 min 的情况下, 比较了 4 种离心速度: 6000 r/min, 7000 r/min, 8000 r/min, 9000 r/min, 提取情况见表 5。回收率没有显著差异。但前两种转速下净化时间大概需要 50 分钟, 后两种转速下净化时间约 30 分钟。因此选择 8000 r/min, 离心 10 min。

表 5 不同离心速度考察结果表

Tab 5 Investigation results of different centrifugal speeds

离心转速 r/min	600 0	700 0	800 0	900 0
净化时间 min	52	51	32	30
回收率% ²	78.6	79.1	80.1	81.9

3.8 氮吹温度选择 比较 5 种氮吹温度: 35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃、55 ℃, 对结果的影响。不同氮吹温度之间提取效率没有显著差异, 回收率均大于 70%。不同氮吹温度所用时间情况见图 7。考虑效率和成本, 本实验选择 50 ℃ 氮吹。

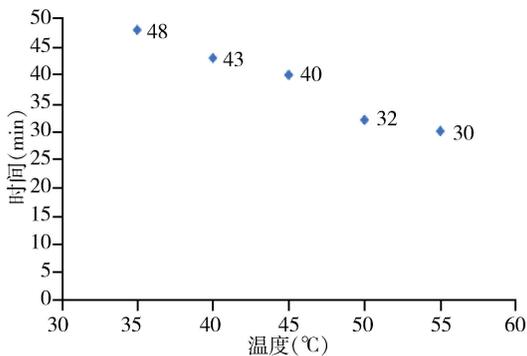


图 7 氮吹温度与时间

Fig 7 Nitrogen blowing temperature and time

3.9 复溶液的比较 考察 3 种溶剂下的复溶效率: 0.5% 磷酸 - 乙腈溶液 (64:36)、乙腈、甲醇。分别考察 3 种添加浓度下孟布酮回收率情况 (0.2 mg/kg, 0.4 mg/kg, 2 mg/kg), 效果见表 6。利用甲醇作为复溶液, 3 个水平添加孟布酮的回收率都大于 80%, 满足要求。本研究选择甲醇作为复

溶液。

表 6 不同复溶液考察结果

Tab 6 Investigation results of different complex solutions

添加浓度 (mg/kg)	0.5% 磷酸 - 乙腈溶液 (64:36)	乙腈	甲醇
0.2	80.6	80.6	81.2
0.4	60.9	65.7	88.9
2	55.0	53.4	85.0

3.10 实际样品检测 对 2021 年市监督抽查的 16 家企业的 22 批育肥猪配合饲料进行检测, 均未检出孟布酮。

3.11 结论 该检测方法, 定量限为 0.2 mg/kg, 在 0.2, 0.4, 2 mg/kg 添加水平下, 育肥猪配合饲料中孟布酮平均回收率为 78.1% ~ 90.6%, 相对标准偏差均小于 10%。实验流程简单、快速、有效, 适合大批量日常分析检测。

参考文献:

[1] F. Belal, Sawsan A. Abd El - Razeq, Manal M. Fouad, S. Zayed, Fatma A. Fouad. Determination of Menbutonein Bovine Milk and Meat Using Micellar LiquidChromatography: Application to Injectable Dosage Forms [J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(3): 638 - 645.

[2] 陈晓涛. 孟布酮合成工艺研究[J]. 化工技术与开发, 2021, 50(03): 22 - 24. CHEN Xiaotao. Study on Synthetic Technology of Menbutone [J]. Technology & Development of Chemical Industry, 2021, 50(03): 22 - 24.

[3] 中华人民共和国农业农村部第 284 号 [S]. Announcement No. 284 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China [S].

[4] 邱富娜, 张跃京. 饲料中常见的兽药及其检测技术探讨[J]. 湖北畜牧兽医, 2021, 42(08): 37 - 38, 48. Qiu Funa, Zhang Yuejing. Discussion on Common Veterinary Drugs in Feed and Their Detection Technology[J]. Hubei Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2021, 42(08): 37 - 38, 48.

[5] 中华人民共和国农业农村部第 194 号 [S]. Announcement No. 194 of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China [S].

[6] 胡红芹, 张坤. 饲料中药物残留及其检测方法研究进展[J].

- 农产品加工, 2017, 426(02): 65-67, 75.
- HU Hongqin, ZHANG Kun. Drug Residues in Feed and its Detection Method Research Progres [J]. Farm Products Processing, 2017, 426(02): 65-67, 75.
- [7] 罗雷, 钟红, 罗永煌, 等. 检测猪组织中孟布酮残留的方法: 中国, CN104198623B[P]. 2015-12-30.
- LUO Lei, ZHONG Hong, LUO Yonghuang, *et al.* Method for Detecting Menbutone Residue in Pig Tissue: China, CN104198623B[P]. 2015-12-30.
- [8] 国佼, 郭萌萌, 吴海燕, 等. 双固相萃取柱净化-超快速液相色谱-串联质谱法同时测定贝类组织中全氟羧酸及其前体物质[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 248-255.
- GUO Jiao, GUO Mengmeng, WU Haiyan, *et al.* Simultaneous Determination of Perfluorinated Acids and Their Precursors in Bivalve Shellfish by Double SPEColumns Purification and Ultra Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. Food Science, 2017, 38(20): 248-255.
- [9] 吕丽卿, 刘晓玥. 高效液相色谱检测技术在饲料分析中的应用和重要作用 [J]. 时代农机, 2017, 44(07): 117-118.
- LV Liqing, LIU Xiaoyue. Application and Important Role of High Performance Liquid Chromatography in Feed Analysis [J] Times Agricultural Machiner, 2017, 44(07): 117-118.
- [10] 国家质量监督检验检疫总局 GB/T 23182-2008 饲料中兽药及其他化学物检测试验规程[S].
- Inspection and Quarantine of the People's Republic of China GB/T 23182-2008 Procedure for veterinary drug and other chemicals determination in feeds General Administration of Quality Supervision[S]
- [11] 秦立得, 赵思俊, 宋翠平. QuEChERS 法在兽药残留检测中的优化与应用 [J]. 中国动物检疫, 2020, 37(12): 98-107.
- Qin Lide, Zhao Sijun, Song Cuiping. Optimization and Application of QuEChERS in Detection of Veterinary Drug Residues [J]. China Animal Health Inspection, 2020, 37(12): 98-107.

(编辑:陈希)