

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.06.07

高效液相色谱法测定猪肉中氨基比林、安替比林和安乃近代谢物残留量的研究

李 丹, 王鹤佳*, 张玉洁, 沈 昕, 李 倩

(中国兽医药品监察所国家兽药残留基准实验室, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-10-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 06-0040-06 [中图分类号] S859.83

[摘 要] 建立了一种可同时检测猪肉中氨基比林、安替比林和安乃近代谢物 4-甲氨基安替比林药物残留的高效液相色谱-紫外检测法。猪肉样品经乙腈提取, 加入 Na_2SO_4 盐析去杂质, MCX 柱净化。色谱柱为 Phenomenex Luna C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈和水 (20 : 80), 流速 1.0 mL/min, 检测波长 265 nm。结果表明, 氨基比林、安替比林和 4-甲氨基安替比林在 50 ~ 2000 ng/mL 范围内呈良好的线性关系, R^2 均大于 0.999。方法的最低定量限为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。氨基比林、安替比林和 4-甲氨基安替比林在 20~400 $\mu\text{g/kg}$ 的浓度添加水平上, 其回收率在 60%~100%, 批内、批间的相对标准偏差小于 20%。该方法具有简便快捷、灵敏度高等特点, 适用于猪肉中氨基比林、安替比林和安乃近代谢物残留检测。

[关键词] 氨基比林; 安替比林; 安乃近; 4-甲氨基安替比林; 猪肉; 高效液相色谱法

Study on Detection Method Aminopyrine and Antipyrine and Dipyrone Metabolite Residues in Pig Muscle by HPLC

LI Dan, WANG He-jia*, ZHANG Yu-jie, SHEN Xin, LI Qian

(National Reference Laboratory of Veterinary Drugs Residues, China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: WANG He-jia, E-mail: wanghejia@ivdc.org.cn

Abstract: A method for determination of aminopyrine and antipyrine and dipyrone metabolite 4-methylaminoantipyrine in pig muscle with HPLC by UV detection was established. Aminopyrine and antipyrine and 4-methylaminoantipyrine were extracted from pig muscle with acetonitrile and spiked Na_2SO_4 , dissolved with 2% formic acid after evaporation, then the solution was purified with MCX column. The chromatography column was Phenomenex Luna C18 column of 250 mm×4.6 mm, 5 μm . The mobile phase were acetonitrile and water, the flow rate was 1.0 mL/min and detection wavelength was 265 nm. A good linearity of the calibration curve was obtained with the range of 50 ~ 2000 ng/mL ($R^2 > 0.999$), and the limit of quantification of aminopyrine and antipyrine and 4-methylaminoantipyrine was 20 $\mu\text{g/kg}$. The average recoveries of aminopyrine and antipyrine and

作者简介: 李 丹, 助理研究员, 从事兽药残留及安全评价工作。

通讯作者: 王鹤佳。E-mail: wanghejia@ivdc.org.cn

4-methylaminoantipyrine from spiked pig muscle at the three concentrations of 20, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ranged from 60% to 100% ($n=5$) respectively. In day-between days batch variation coefficients were both less than 20%. The method is simple, rapid, sensitive and accurate, and can be applied for the determination of aminopyrine and antipyrine and dipyrone metabolite 4-methylaminoantipyrine in pig muscle.

Key words: aminopyrine; antipyrine; dipyrone; 4-methylaminoantipyrine; pig muscle; HPLC

氨基比林 (Aminopyrine)、安替比林 (Antipyrine) 和安乃近 (Dipyrone, or Metamizole Sodium) 为临床常用的解热镇痛药, 属于吡唑酮类解热镇痛药^[1]。其中, 氨基比林是在安替比林的分子中引入二甲氨基得到, 安乃近是在氨基比林的结构中引入水溶性的亚甲基磺酸钠得到。安乃近在体内可迅速水解成活性产物 4-甲氨基安替比林 (MAA), 特别是经首过作用后, 几乎全部转变成 MAA, 再进入体循环, 其药理作用主要由 MAA 产生^[2]。这类药物的不良反应主要包括粒细胞减少、再生障碍性贫血、严重的过敏反应和休克虚脱等^[3-4]。在兽医领域, 这些药物主要作为一些严重疾病的辅助对症药物。由于其解热镇痛疗效确切, 价廉易得, 经常被长期过量使用, 且由于不严格遵守休药期等原因, 容易在动物体内产生蓄积残留, 进而危害人类的生命健康。为加强兽药残留监控, 保证动物性食品卫生安全, 农业部于 2002 年发布第 235 号公告《动物性食品中兽药最高残留限量》中规定安乃近的残留标示物为 4-甲氨基安替比林 (MAA), 在猪的肌肉组织中的最高残留限量 (MRL) 为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5], 欧洲药品管理局规定食源动物猪的肌肉中安乃近的最高残留限量为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6] (以 MAA 为残留标示物计算)。

由于氨基比林、安替比林和安乃近均为兽医临床最广泛使用的三种解热镇痛药, 且结构极为类似。目前, 国内外关于测定羊肉、牛肉、猪肉中安乃近代谢物的 LC-MS/MS 法、HPLC 法等已有报道^[7-9], 但采用高效液相色谱法同时测定猪肉中氨基比林、安替比林、安乃近残留的检测方法尚未见报道。本研究旨在建立一种操作步骤简单, 并可满足同时检测猪肉中氨基比林、安替比林、安乃近残留的检测方法, 从而使方法的普适性更好。

1 材料与方法

1.1 标准品、主要试剂及其配制 安替比林对照品: 中国兽医药品监察所, 含量 $\geq 99.9\%$; 氨基比林对照品: 中国食品药品检定研究院, 含量 $\geq 99.9\%$; 4-甲氨基安替比林对照品: 中国食品药品检定研究院, 含量 $\geq 96.6\%$ 。乙腈 (色谱纯)、甲醇 (色谱纯), 美国 Fisher 公司; 无水硫酸钠 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; 氨水、甲酸, 北京化工厂。水: 美国 Millipore 超纯水仪制备, 符合 GB/T 6682-1992 规定的一级水。

氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林混合标准储备液 (1 mg/mL): 分别称取氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林对照品约 10 mg , 精密称定, 于 10 mL 量瓶中, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林混合标准工作液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确量取适量标准储备液, 用甲醇溶解并稀释成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2 主要仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (配紫外检测器), 美国安捷伦公司; AE 240 型分析天平; Biofuge Stratos 高速冷冻离心机, 德国贺利氏公司; IKEA 涡动混合仪; IKA-WERKE 振荡器; MCX 固相萃取柱: 60 $\text{mg}/3\text{mL}$ 。

1.3 方法

1.3.1 样品的提取 称取 (5 $\pm$ 0.05) g 试料, 置 50 mL 离心管中, 乙腈 8 mL , 涡旋混匀, 中速振荡 5 min , 8000 r/min 离心 5 min , 上清液转入 50 mL 离心管中, 残渣再用乙腈 8 mL , 提取一遍, 合并两次提取液, 加无水硫酸钠 4 g , 10000 r/min 离心 5 min , 上清液再转入 50 mL 离心管中, 于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴下氮气吹至近干。加 2% 甲酸水溶液 5 mL 溶解, 备用。

1.3.2 样品的净化 MCX 柱用甲醇 3 mL、2%甲酸水 3 mL 预洗。取备用液过柱,用 2%甲酸水、甲醇各 3 mL 淋洗,挤干,5%氨化甲醇 5 mL 洗脱,于 40 ℃水浴下氮气吹干。加流动相 1.0 mL,混匀,过滤膜,供高效液相色谱法测定。

1.3.3 色谱操作条件及参数 色谱柱: Phenomenex Luna C18 250 mm×4.6 mm (i.d), 粒径 5 μm,或相当者; 流动相为乙腈 - 水 (20 + 80, V/V); 流速 1.0 mL/min; 检测波长 265 nm; 柱温 30 ℃, 进样量 20 μL。

1.3.4 标准曲线的制备 准确量取适量氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林标准工作液,用流动相稀释成浓度分别为 50、100、200、500、1000、2000 ng/mL 的系列混合标准溶液,将此系列混合标准溶液,依次从低浓度到高浓度按液相色谱条件进行分析,每一浓度进样三次,按其所得三次峰面积的平均值与对应的对照溶液的质量浓度做标准曲线,并计算回归方程及相关系数。

1.3.5 回收率及精密度的测定 采用标准添加法,称取匀浆后的组织样品,置于 50 mL 离心管中,添加适宜浓度的氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的混合标准工作液,使猪肉中的药物浓度分别为 20、100、400 μg/kg。每种浓度 5 个样品,重复 3

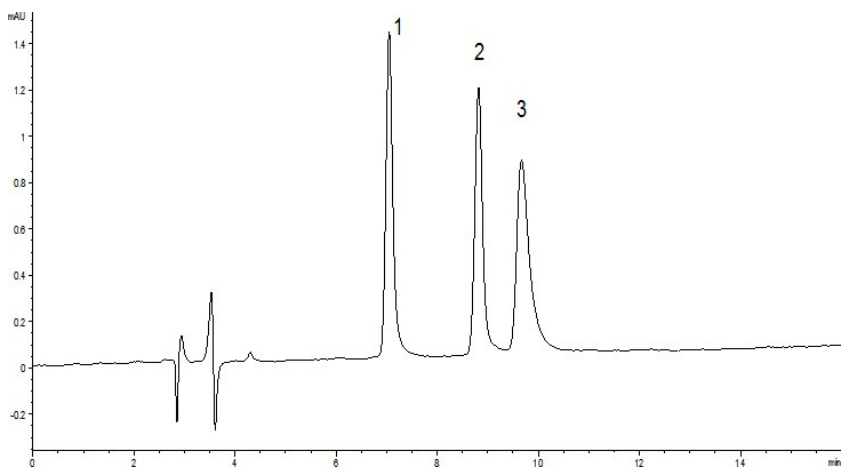
批次,按照 1.3.1 项和 1.3.2 项的方法处理后,供 HPLC 测定,外标法定量,计算回收率和批内、批间变异系数。

1.3.6 检测限和定量限的测定 对氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林标准工作液,进行 HPLC 分析,并逐渐降低氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的浓度,以溶液检测时的信噪比 (S/N) 分别大于等于 3 和 10 作为药物的检测限和定量限,并计算定量限浓度点的回收率及批内、批间相对标准偏差,验证其可靠性^[10]。

2 结果与分析

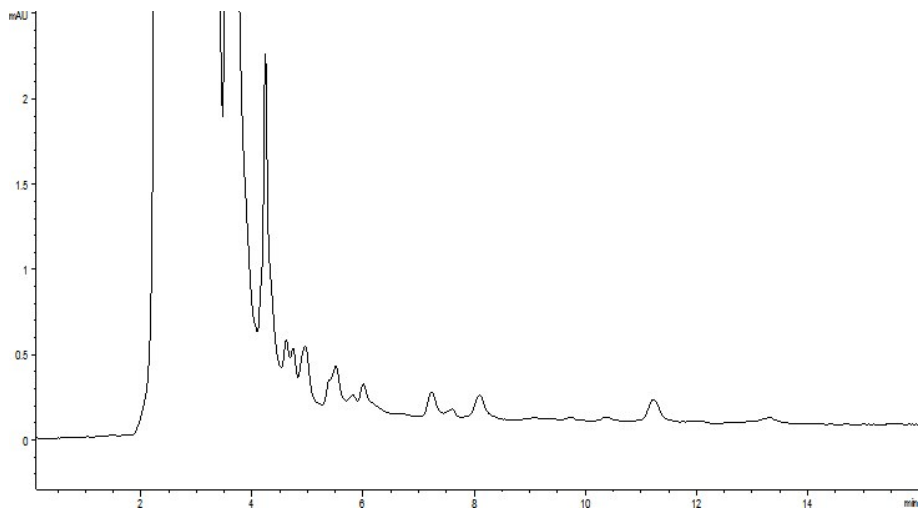
2.1 色谱分离 在优化的色谱条件下,测得猪肉中氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林色谱峰峰形好,峰间隔时间较长,且均达到基线分离。空白组织样品在上述时间无干扰峰出现(图 1)。

2.2 标准曲线 分别以氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的色谱峰面积与其对应的对照溶液的质量浓度做图,得到氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的标准曲线。氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林在 20~400 μg/kg 的质量浓度范围内,色谱峰面积与浓度呈良好的线性关系。线性回归方程、相关系数见表 1。



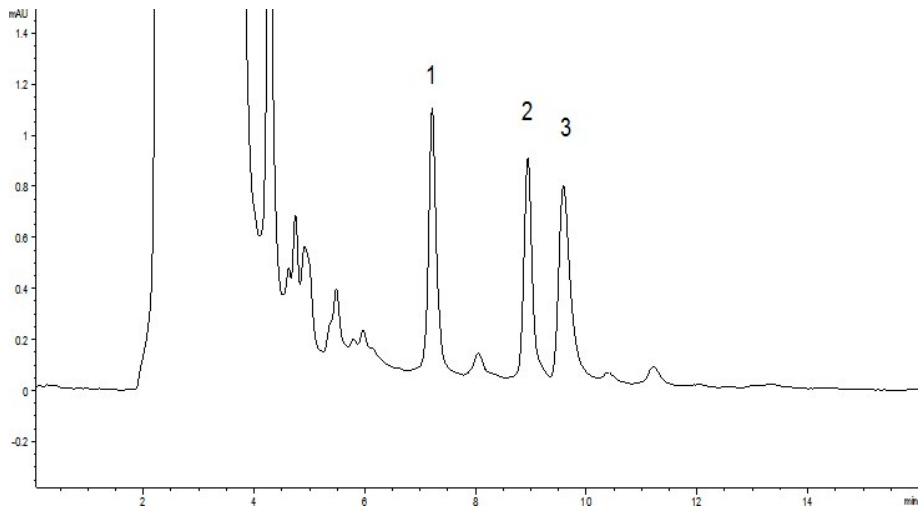
A. 氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林 500 μg · L⁻¹对照溶液色谱图
(1. Antipyrine ,2. 4-methylaminoantipyrine ,3.Aminopyrine)

A. Chromatogram of Aminopyrine , Antipyrine and 4-methylaminoantipyrine 500 μg · L⁻¹ reference solution



B.猪肉组织空白色谱图

B. Chromatogram in blank pig muscle



C. 猪肉组织中添加 100 µg/kg 氨基比林、安替比林、4-甲基氨基安替比林药物色谱图

C. Chromatogram of Aminopyrine , Antipyrine and 4-methylaminoantipyrine 100 µg · kg⁻¹ added in pig muscles

(1. Antipyrine ,2. 4-methylaminoantipyrine ,3.Aminopyrine)

图 1 猪肉中氨基比林、安替比林、4-甲基氨基安替比林的高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of Aminopyrine , Antipyrine and 4-methylaminoantipyrine in pig muscles

表 1 药物回归方程及相关系数

Tab 1 Standard curve equation and Correlation coefficient

药物 Drug	线性范围/(µg · L ⁻¹) Linear range	回归方程 Standard curve equation	相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient
氨基比林	50~2000	$y=0.0465x-1.1736$	0.9998
安替比林	50~2000	$y=0.0567x-1.2424$	0.9998
4-甲基氨基安替比林	50~2000	$y=0.0437x-0.9228$	0.9996

2.3 样品的回收率及精密度 由表 2 可以看出,猪肉组织中添加浓度水平分别为 20、100、400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的平均回收率分别在 71.1% ~ 85.1%、71.8% ~ 78.9%、70.7%~83.6%范围内,批内、批间的 *RSD* 分别低于 10.6%、10.9%。结果表明该方法可靠,重复性高。

表 2 猪肉中添加氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的回收率测定结果 (n=5)

Tab 2 Recovery rate and precision of the drugs added in pig muscles				
药物 Drug	添加值/($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) Additive concentration	平均回收率/% Average recovery rate	批内 <i>RSD</i> /% Intra assay <i>RSD</i>	批间 <i>RSD</i> /% Inter assay <i>RSD</i>
氨基比林	20	71.1	10.6	9.72
	100	71.8	9.54	8.56
	400	73.5	9.20	7.78
安替比林	20	85.1	9.76	9.49
	100	78.9	10.4	9.06
	400	83.6	8.89	7.66
4-甲氨基安替比林	20	73.6	10.2	10.9
	100	72.4	8.65	8.55
	400	70.7	9.08	8.67

2.4 灵敏度 应用本试验建立的检测方法,测得猪肌肉组织中氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林的检测限、定量限分别为 6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 3$)、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($S/N \geq 10$)。由表 2 可见,添加浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林在猪肌肉组织中的平均回收率均大于 71.1%,批内、批间的 *RSD* 分别低于 10.6%、10.9%。表明该方法在定量限水平的可靠性好,且灵敏度高,完全满足氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林在猪肌肉组织中残留检测的需要。

3 讨论与小结

3.1 仪器条件的优化 色谱条件的优化过程中,对流动相的种类及比例进行了考察,采用乙腈-水较甲醇-水的分析时间短,峰形好。调整流动相比例,发现乙腈-水比例为 20 : 80 时,分析时间控制在 20 min 内,且三种目标化合物均达到完全分离。因此,流动相确定为乙腈-水(20 : 80, *V/V*)。

3.2 提取溶剂的选择 在研究过程中,对样品的提取溶剂进行了实验摸索。采用乙腈、甲醇、硫酸钠+亚硫酸钠溶液分别进行提取实验,结果发现三种药物经乙腈提取,效果非常理想,对不同浓度的

添加实验其回收率均高于 70%,达到了残留检测的要求,因此,确立乙腈作为提取液。

3.3 样品提取与净化方法的优化 参考文献的方法对猪肌肉组织中的氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林进行了提取实验,但效果不理想,干扰杂质太多,达不到基本分离的要求,因此,样品经乙腈提取后,加入了无水硫酸钠进行盐析去杂质,并对无水硫酸钠加入的先后进行了对比实验,实验结果发现,无水硫酸钠与乙腈一起加入进行提取,样品溶液中杂质干扰依然很大,分离效果不太理想,但样品经乙腈提取完成后再加入无水硫酸钠进行净化,测定结果显示三种药物的回收率高,且均达到良好分离。实验过程中采用液-固提取的方法,对 MAX、MCX、PCX、C18 等不同类型的固相萃取柱进行摸索,结果表明三种药物经 MCX 柱净化后回收率最高。因此,本实验采用加入无水硫酸钠和 MCX 柱对样品进行净化。在进一步摸索洗脱条件时,比较了 2%、5%、10%氨化甲醇的洗脱效果,结果表明 5%氨化甲醇的洗脱能力最强,效果最好。因此,确立 5%氨化甲醇作为洗脱溶液。

3.4 回收率及灵敏度 试验中氨基比林、安替比

林、4-甲氨基安替比林的添加浓度范围为 20 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率在 70.7%~85.1% 范围内,批内和批间 *RSD* 分别低于 10.6%、10.9%,符合农业部对兽药残留试验规范中的要求^[11]。通过添加定量限浓度点对其可靠性进行验证,结果发现氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林在猪肉中的回收率均大于 71.1%,批内、批间的 *RSD* 分别低于 10.6%、10.9%。该方法在定量限水平的可靠性好,且灵敏度高,完全满足氨基比林、安替比林、4-甲氨基安替比林在猪肉中残留检测的需要。

本研究建立了一种同时检测猪肉氨基比林、安替比林及安乃近代谢物的多残留分析方法,该方法灵敏可靠,完全满足猪肉中氨基比林、安替比林及安乃近代谢物的残留检测要求。

参考文献:

- [1] Levy M, Zylber K E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyrone and its metabolites [J]. Clin Pharmacokinet, 1995, 28 (3): 216-234.
- [2] Toblas R, Christina S, Agnes P, *et al.* Novel bioactive metabolites of dipyrone (metamizol) [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012, 20(1): 101-107.
- [3] Sabbaga J, Osawa C, Paul F H. Acute agranulocytosis after prolonged high-dose usage of intravenous dipyrone—a different mechanism of dipyrone toxicity [J]. Annals of Hematology, 1993, 66 (3): 153-155.
- [4] Maria J G, Carla S, Milagros M, *et al.* Photodegradation study of three dipyrone metabolites in various water systems: Identification and toxicity of their photodegradation products [J]. Water Research, 2008, 42(10): 2698-2706.
- [5] 中华人民共和国农业部 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
Announcement No.235 of the Ministry of agriculture of the People's Republic of China. Maximum residue limit of veterinary drugs in animal derived foods[S].

- [6] European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. EMEA/MRL/878/03-FINAL, Metamizole summary report [R]. European: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, 2003.
- [7] 张崇,薛飞群,张丽芳,等. 亲水液相色谱-串联质谱法测定羊肌肉组织中安乃近代谢物的残留量[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 158-162.
Zhang C, Xue F Q, Zhang L F, *et al.* Simultaneous Determination of Residues of Four Dipyrone Metabolites in Goat Muscle by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-Mass Spectrometry [J]. Food Science, 2014, 35(10): 158-162.
- [8] 沈金灿,庞国芳,谢丽琪,等. 牛和猪肌肉组织中安乃近代谢物残留的液相色谱-串联质谱分析[J]. 分析化学, 2007, 35(11): 1565-1569.
Shen J C, Pang G F, Xie L Q, *et al.* Study on Detection Method for Dipyrone Metabolites in cattle and pig muscles by HPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2007, 35(11): 1565-1569.
- [9] 沈金灿,庞国芳,谢丽琪,等. 高效液相色谱法分析牛和猪肌肉组织中残留的安乃近药物的三种代谢物[J]. 色谱, 2007, 25(6): 844-847.
Shen J C, Pang G F, Xie L Q, *et al.* Study on Detection Method for Three Dipyrone Metabolites in cattle and pig muscles by HPLC [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2007, 25(6): 844-847.
- [10] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 40.
Li J S, Qiu Y M, Wang C. Analysis of Veterinary Drug Residues [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 40.
- [11] 中华人民共和国农业部. 关于发布《兽药残留试验技术规范(试行)》的通知[S].
Ministry of agriculture of the People's Republic of China. Notice on the publication of the technical specification for veterinary drug residue test (Trial) [S].

(编辑:侯向辉)