

## 固相萃取串联高效液相色谱检测动物源性 食品中甲硫咪唑残留

Detection of methimazole residue in animal-derived foods by combining solid-phase extraction with high performance liquid chromatography

池永红 云雅光

CHI Yong-hong YUN Ya-guang

(包头轻工职业技术学院, 内蒙古 包头 014035)

(Baotou Light Industry Vocational Technical College, Baotou, Inner Mongolia 014035, China)

**摘要:**以动物源性食品中抗甲亢药物甲硫咪唑为研究对象, 采用 Cleanert S<sub>C18</sub> 固相萃取柱对复杂动物源性食品进行基质净化, 对上样溶剂、洗杂液、洗脱液等试验参数进行优化, 建立固相萃取净化富集与高效液相色谱联用技术, 实现对猪肾、猪肝、猪肉样品中的痕量甲硫咪唑准确、灵敏检测。在最优试验条件下, 在 3 个添加浓度的猪肾、猪肝、猪肉样品中, 分析物甲硫咪唑的回收率均大于 85%, 相对标准偏差(RSD,  $n=3$ )均小于 5%, 对 3 种样品中最低检出限( $S/N=3$ )和最低定量限( $S/N=10$ )分别为: 猪肾 0.59, 1.97  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 猪肝 0.54, 1.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 猪肉 0.49, 1.63  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。所建立的检测方法具有较高的准确度和灵敏度, 可以满足对实际样品中甲硫咪唑的分析检测。

**关键词:**甲硫咪唑; 固相萃取; 高效液相色谱; 动物源性食品; 检测

**Abstract:** The residue of antithyroid drug - methimazole in animal-derived food products was studied. The complex matrix of food products was purified by using Cleanert S<sub>C18</sub> solid-phase extraction column and the experimental parameters including the loading solvent, washing solution and the eluent were optimized in detail. The method for the accurate and sensitive detection of trace methimazole in pig kidney, liver and muscle samples was successfully developed by combining solid-phase extraction with high performance liquid chromatography. Under the optimized experimental conditions, good recoveries ( $>85\%$ ) were obtained at three spiked concentrations in chosen animal-derived samples with RSD less than 5% ( $n=3$ ). The limit of detection ( $S/N=3$ ) and limit of quantitation ( $S/N=10$ ) achieved to 0.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1.97  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (kidney), 0.54  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (liver), 0.49  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1.63  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (muscle), respectively, which

validated that the developed method with high accuracy and sensitivity could meet the requirement of methimazole detection in real samples.

**Keywords:** methimazole; solid-phase extraction; high performance liquid chromatography; animal-derived food; detection

甲硫咪唑(1-methyl-2-mercaptoimidazole, tapazole, CAS: 60-56-0, 见图 1), 易溶于水、乙醇或氯仿等有机溶剂。甲硫咪唑能够通过抑制碘化酪氨酸的偶联而抑制甲状腺激素的合成<sup>[1-3]</sup>, 进而改变动物内分泌而广泛应用于治疗甲状腺功能亢进突眼性甲状腺肿等疾病<sup>[4]</sup>, 属于咪唑类临床药物。另外, 这类药物奏效快, 且在生物体内代谢缓慢, 发挥作用时间较长。口服甲硫咪唑药物大约有 79.2% 会随着尿液被排出体外, 其余部分将会残留在组织中。甲硫咪唑在生命体中的代谢物为 N-甲基咪唑和亚硫酸盐( $\text{R}-\text{SO}_3$ ), 进而产生次磺酸( $\text{R}-\text{SOH}$ )和亚磺酸( $\text{R}-\text{SO}_2\text{H}$ )而形成细胞毒素<sup>[5-7]</sup>。

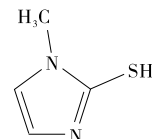


图 1 甲硫咪唑的化学结构

Figure 1 Chemical Structure of Methimazole

甲硫咪唑在临床上可引发多种不良反应如皮肤过敏, 发烧, 味嗅失聪, 甚至肾炎、肝硬化等<sup>[8,9]</sup>。另外, 甲硫咪唑可以减弱胃肠蠕动而抑制生命体新陈代谢, 增强水分在动物皮下、肌肉、肠胃等组织中的保持力。在宰杀之前使用, 会大量残留于动物组织, 极大影响肉类食品品质, 严重地危害消费者身体健康。目前, 美国、欧盟等组织已经明确禁止甲硫咪唑药物在动物源性食品生产过程中使用<sup>[10]</sup>, 由于该药物为人用临床药物, 中国政府尚未对其采取禁用措施。甲硫咪唑

**作者简介:**池永红(1980—), 男, 包头轻工职业技术学院讲师, 硕士。  
E-mail: chiyonghong2@126.com

**收稿日期:**2015-07-01

是临床常用的抗甲状腺药物,治疗效果较好,但治疗周期较长,容易出现病情反复,而且会导致白细胞下降、肝脏受损及皮疹等不良反应。为减少甲硫咪唑残留对食品品质和人们健康的影响和威胁,建立一种实用、快捷、准确可靠的甲硫咪唑检测技术是非常有必要的。迄今为止,针对不同样品(尿样、血浆、组织等)中甲硫咪唑的检测,已报道的方法有液质联用<sup>[11]</sup>、液相紫外检测<sup>[12,13]</sup>、固相萃取串联高效液相色谱<sup>[14]</sup>等。在可食性动物组织中甲硫咪唑检测方面,潘明飞等<sup>[15]</sup>开发了甲硫咪唑分子印迹聚合物作为固相萃取材料,结合高效液相色谱对猪肉等产品中甲硫咪唑净化、富集和分析的检测方法,但由于分子印迹材料本身特性,虽然提高了萃取过程的选择能力,但在目标物吸附量上有所限制。

固相萃取方法<sup>[16-18]</sup>是目前针对复杂食品样品基质进行净化、对低浓度分析物进行分离、选择性富集和净化的的一种重要的前处理方法<sup>[19,20]</sup>。这种方法需要萃取溶剂少,可操作性强,易于实现自动化,而且试验回收率和重现性较好<sup>[21-25]</sup>,是目前食品安全检测中常用的基质前处理方法<sup>[26,27]</sup>。

本研究拟以抗甲亢药物甲硫咪唑为研究对象,结合固相萃取与高效液相色谱检测技术<sup>[28,29]</sup>,通过对固相萃取过程中的上样溶剂、洗杂液和洗脱液进行优化,建立一种准确、灵敏、快速的动物源性食品中甲硫咪唑残留分析检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

甲硫咪唑:纯度 99.2%,浙江国邦药业有限公司;

甲醇、乙腈:色谱纯,天津康科德科技有限公司;

正己烷、乙醇、冰乙酸:分析纯,天津化学试剂一厂;

磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )、氢氧化钠、无水硫酸钠:分析纯,天津北方天医化学试剂厂;

高效液相色谱柱: Hypersil-ODS  $\text{C}_{18}$  反相柱(31605-254630, 4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 美国 Thermo 公司;

高效液相色谱仪(配紫外检测器): LC-20A 型, 日本岛津公司;

$\text{C}_{18}$  固相萃取柱: Cleanert  $\text{S C}_{18}$ , 100 mg, 3 mL, 中国 Agela Technologies 公司;

pH 计: MP220 型, 梅特勒—托利多仪器(上海)有限公司;

台式冷冻离心机: Centrifuge 5804R 型, 德国 Eppendorf 公司。

### 1.2 主要溶液配制

准确称取甲硫咪唑标准品 0.030 0 g, 溶于 100 mL 无水乙醇中, 得到 300 mg/L 的标准储备液, 4  $^{\circ}\text{C}$  储存 1 个月。试验中各工作溶液均由标准储备液准确稀释得到。

高效液相色谱流动相: 准确称取  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.360 0 g 溶于 500 mL 二次去离子水中, 用 NaOH 溶液调节 pH 到 3.2, 过 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 脱气。色谱纯甲醇, 过膜脱气后双泵进入液相体系, 比例为水相: 有机相 = 7 : 3(V/V)。

### 1.3 液相色谱条件

液相色谱柱采用 Hypersil-ODS  $\text{C}_{18}$  反相柱(4.6 mm  $\times$  250 mm, 5  $\mu\text{m}$ )。紫外检测器检测波长: 254 nm, 流速: 0.5 mL/min。采用保留时间定性, 外标法峰面积定量。流动相组成为 0.02 mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH = 3.2) 与甲醇混合溶液(7 : 3, V/V), 进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。

### 1.4 固相萃取条件

试验采用  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱进行预富集、分离, 萃取过程:  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱均由 5.0 mL 二次去离子水和 5.0 mL 甲醇活化; 100 mL 甲硫咪唑样品溶液上样, 完毕后, 抽干; 以 1.5 mL 乙醇—水溶液(8 : 2, V/V) 洗杂, 并以 5.0 mL 甲醇—冰乙酸溶液(9 : 1, V/V) 洗脱被吸附的分析物;  $\text{N}_2$  吹干后, 1.0 mL 甲醇复溶, 过膜, HPLC 上样分析。

### 1.5 样品基质前处理过程

从本地超市购买的为样品(空白), 进行基质添加回收试验。准确称取粉碎的新鲜猪肉, 猪肝, 猪肾样品 5.000 g, 置于离心管中。甲硫咪唑添加浓度分别为 0.01, 0.02, 0.03  $\mu\text{g/g}$ 。在阴暗处静置 10 min, 加入 10.0 mL 乙腈进行提取。振荡, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下离心 5 min, 分离上清液。重复提取, 合并两次上清液, 加 30 mL 乙腈饱和的正己烷以去除脂肪, 振荡 3 min, 分离乙腈相, 加无水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  干燥, 并用 2 mL 乙腈洗涤  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 。将所得到的乙腈相在 40  $^{\circ}\text{C}$  条件下旋蒸至干, 以无水乙醇复溶残留物, 并转移到 100 mL 的容量瓶中, 乙醇定容至刻度, 进行固相萃取过程。

## 2 结果与讨论

### 2.1 固相萃取条件确定

采用  $\text{C}_{18}$  固相萃取柱用作动物源性食品样品基质净化和目标物富集与分离, 并对固相萃取过程中的上样溶剂、洗杂液和洗脱溶剂进行了详细系统的分析, 以建立动物源性食品中痕量甲硫咪唑残留分析方法。

2.1.1 上样溶剂及其体积 上样溶剂在固相萃取过程中是非常重要的。不仅要保证被分析物的稳定性, 同时决定着萃取材料与目标物之间的结合微环境。为了选择合适的上样溶剂, 选定甲醇、乙醇、乙腈及其与不同比例  $\text{H}_2\text{O}$  (30%, 50%, 75%, V/V) 混合溶液为上样溶剂, 进行优化试验, 结果见图 2。

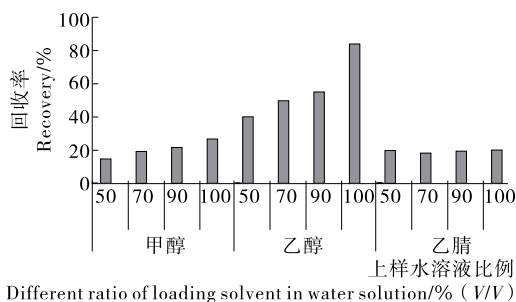


图 2 固相萃取过程中不同上样溶剂条件下甲硫咪唑的回收率

Figure 2 Recoveries of methimazole in SPE procedure with different sample loading solvent ( $n=3$ )

对浓度为 1.0 μg/L 的甲硫咪唑标准溶液,在相同的试验条件下,以乙醇(或含乙醇)为上样溶剂时,回收率明显高于甲醇和乙腈上样时的。而且随着上样液中 H<sub>2</sub>O 的比例的增加,回收率逐渐降低。当以 100% 无水乙醇上样时,回收率相对较高,达到 87.2%。这是由于在乙醇存在的微环境下,固相萃取填料与目标物的结合能力增加;由于甲醇、乙腈、水具有比乙醇更高的极性,干扰了固相填料对甲硫咪唑的结合,造成吸附效果下降。因而,选定无水乙醇为固相萃取过程中的上样溶剂。

在试验中,同时对上样体积进行了优化。将不同体积的甲硫咪唑—乙醇溶液(浓度为 1.0 μg/L)上样到固相萃取小柱中。结果发现当上样体积低于 100 mL 时,回收率呈上升趋势;在 100 mL 时有明显的拐点;高于 100 mL 时,回收率没有显著变化而趋向于平衡。所以,在试验中选定 100 mL 为上样体积。

2.1.2 洗杂液及其体积 固相萃取洗杂的主要目的在于最大化分析物与固相萃取材料结合位点的特异性吸附,同时减少固相萃取材料对杂质的非特异性吸附。在试验中,不同比例的乙醇—水溶液(19:1,9:1,8:2,7:3,5:5,V/V)上样至固相萃取柱用于洗杂,结果见图 3。

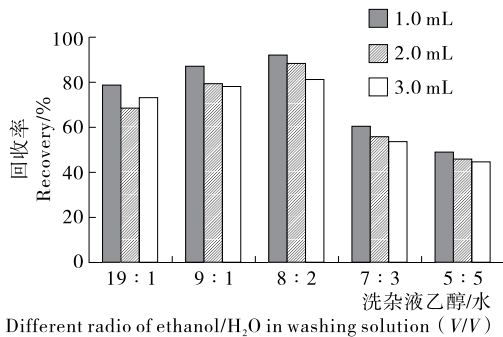


图 3 固相萃取过程中不同洗杂液条件下甲硫咪唑回收率的比较

Figure 3 Comparison of recoveries of methimazole with different washing solution (n=3)

由图 3 可知,当洗杂液为 1.0 mL,乙醇/水比例为 19:1,9:1 和 8:2 时,分析物甲硫咪唑的回收率分别为 78.3%,86.8% 和 91.7%。当乙醇/水比例为 7:3 和 5:5 时,回收率有明显下降。分别以 1.0,2.0,3.0 mL 乙醇—水溶液(8:2,V/V)为洗杂液时,回收率明显增高。为保证杂质尽可能的完整洗脱,同时不影响分析物在固相萃取柱上的保留,因而,洗杂过程中选择 2.0 mL 体积比为 8:2 的乙醇—水溶液为洗杂液。

2.1.3 洗脱剂及其体积 对于固相萃取过程,必须选择一种合适的洗脱剂将分析物从吸附材料上完全地洗脱下来。试验以水、甲醇、乙醇及其与冰乙酸、氨水不同比例的混合溶液为洗脱液,考查了在不同洗脱剂条件下对分析物的洗脱情况。结果见图 4。

当洗脱剂为甲醇/冰乙酸(9:1,V/V)时,在固相萃取柱上有良好的回收率(92.8%)。酸性洗脱剂下的回收率普遍高

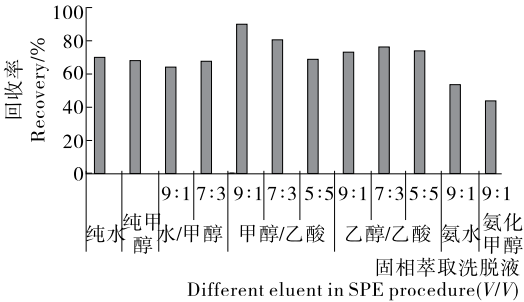


图 4 固相萃取过程中不同洗脱剂条件下甲硫咪唑回收率比较

Figure 4 Comparison of recoveries of different eluent in SPE procedure (n=3)

于碱性洗脱剂。在水、甲醇极性较大的溶剂作洗脱剂时,回收率结果相差不大,说明在洗脱过程中,洗脱剂的酸碱性质对洗脱效果的影响远大于其极性所造成的影响。通过对不同洗脱体积(1.0~8.0 mL)回收率结果的比较,当洗脱液体积为 5 mL 时,回收率为 93.9%,与 6.0~8.0 mL 时回收率相当,因而选定 5.0 mL 甲醇/冰乙酸(9:1,V/V)为洗脱液,可以将分析物从固相萃取柱中洗脱下来。

2.2 分析特征量及实际样品分析

固相萃取填料对分析物具有较好吸附能力,能选择性吸附分离甲硫咪唑,与高效液相色谱联用,实现对复杂样品的净化和痕量甲硫咪唑的富集和检测。

为了检测所建立的分析方法的应用能力,分别以液质联用检测为空白的猪肉、猪肝、猪肾为代表性动物源性食品(添加浓度为 0.01,0.02,0.03 μg/g),上样溶液为 100 mL 乙醇基质提取液,洗杂液为 2.0 mL 乙醇—水溶液(8:2,V/V),洗脱液为 5.0 mL 甲醇/冰乙酸(9:1,V/V)。并计算回收率和相对标准偏差(RSD,n=3)、最低检出限、最低定量限。

由表 1 可知,对于选定的 3 种动物源性样品,3 个浓度添加的甲硫咪唑回收率均大于 85%,这可能是由于部分目标物存留在萃取柱上,未完全洗脱造成的。3 次测定的相对标准偏差均小于 5.0%。对 3 种样品中最低检出限(S/N=3)和最低定量限(S/N=10)分别为猪肾 0.59,1.97 μg/kg;猪肝

表 1 3 个甲硫咪唑添加浓度的猪肾、猪肝、猪肉样品的回收率

Table 1 Recoveries of methimazole in spiked pig kidney, liver and muscle samples (n=3)

| 样品 | 添加浓度/(μg·g <sup>-1</sup> ) | 回收率(RSD)/% |
|----|----------------------------|------------|
| 猪肉 | 0.01                       | 87.3(4.2)  |
|    | 0.02                       | 86.8(2.9)  |
|    | 0.03                       | 90.9(3.3)  |
| 猪肝 | 0.01                       | 85.6(6.0)  |
|    | 0.02                       | 89.1(3.2)  |
|    | 0.03                       | 92.2(4.6)  |
| 猪肾 | 0.01                       | 82.0(3.5)  |
|    | 0.02                       | 88.4(3.6)  |
|    | 0.03                       | 91.4(4.8)  |

0.54, 1.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 猪肉 0.49, 1.63  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。所建立的分子印迹固相萃取与高效液相色谱联用检测方法具有较高的准确度和灵敏度, 可以满足对实际样品中甲硫咪唑的分析检测。

### 3 结论

本研究针对抗甲亢药物甲硫咪唑在动物源性食品中的残留现状, 采用固相萃取对复杂动物源性食品进行基质净化, 并对整个固相萃取过程的试验参数进行了详细的优化, 建立了固相萃取净化富集与高效液相色谱联用技术检测多种复杂动物源性食品中甲硫咪唑的方法。按所建立的方法对猪肾、猪肝、猪肉中甲硫咪唑的含量进行测定, 测定结果具有准确度高、灵敏度强的特点。研究提出了中国动物源性食品中甲硫咪唑残留检测的新方法, 所提供的方法同时亦可用于其他食品中有害物的分析检测, 为测定和去除食品中痕量污染物提供了一条有效途径。

### 参考文献

- 1 Aletrari M, Kanari P, Partassides D, et al. Study of the british pharmacopeia method on methimazole (thiamazole) content in carbimazole tablets[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1998, 16(5): 785~792.
- 2 Hollosi L, Kettrup A, Schramm K W. MMSPE—RP—HPLC method for the simultaneous determination of methimazole and selected metabolites in fish homogenates[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004, 36(4): 921~924.
- 3 杨海辰. 甲硫咪唑联合丙基硫氧嘧啶治疗甲状腺功能亢进症临床疗效研究[J]. 临床合理用药, 2014, 7(12): 92.
- 4 杨青. 甲硫咪唑联合左甲状腺素治疗儿童甲状腺功能亢进症的疗效观察[J]. 当代医学, 2010, 16(9): 9~10.
- 5 Sun J Y, Zheng C Y, Xiao X L, et al. Electrochemical detection of methimazole by capillary electrophoresis at a carbon fiber micro-disk electrode[J]. Electroanalysis, 2005, 17(18): 1 675~1 680.
- 6 Genter M B. Evaluation of olfactory and auditory system effects of the antihyperthyroid drug carbimazole in the Long-Evans rat[J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 1998, 12(5): 305~314.
- 7 杨娜. <sup>131</sup>I 与甲硫咪唑治疗老年甲状腺功能亢进症的疗效对比[J]. 河南医学研究, 2014, 23(12): 74~76.
- 8 Edward A C, Smith C M, Reynard A M. Textbook of Pharmacology[M]. Philadelphia: Saunders, 1992: 652~656.
- 9 Blanchflower W J, Hughes P J, Cannavan A. Determination of thyreostats in thyroid and urine using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry[J]. Analyst, 1997(122): 967~972.
- 10 刘长武, 翟广书, 买光照, 等. 固相萃取技术的原理及进展[J]. 农业环境与发展, 2003, 1(3): 42~44.
- 11 Wasch K De, Be Brabander H F, Impens S, et al. Determination of mercaptobenzimidazol and other thyreostat residues in thyroid tissue and meat using high-performance liquid[J]. Journal of Chromatography A, 2001(912): 311~317.
- 12 Robert Zakrzewski. Determination of methimazole in urine with the iodine-azide detection system following its separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography[J]. J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci., 2008, 869(1~2): 67~74.
- 13 Krzysztof Ku'smieriek, Edward Bald. Determination of methimazole in urine by liquid chromatography[J]. Talanta, 2007, 71(5): 2 121~2 125.
- 14 Hollosi L, Kettrup A, Schramm K W. MMSPE—RP—HPLC method for the simultaneous determination of methimazole and selected metabolites in fish homogenates[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36(4): 921~924.
- 15 Pan Ming-fei, Wang Jun-ping, Fang Guo-zhen, et al. Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer and its application as SPE enrichment sorbent for determination of trace methimazole in pig samples using HPLC—UV[J]. J. Chromatogr B Analyt Technol. Biomed Life Sci., 2010, 878(19): 1 531~1 536.
- 16 李仲谨, 李铭杰, 王海峰, 等. 腐植酸类物质应用研究进展[J]. 化学研究, 2009, 20(4): 103~107.
- 17 赵利剑, 杨亚玲, 夏静. 固相萃取技术的研究[J]. 四川化工, 2005, 8(3): 21.
- 18 李竺, 邵洪文, 陈玲, 等. 固相萃取技术在环境中农药残留分析的研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 2005, 27(5): 64.
- 19 何森. 固相萃取技术在环境有机污染物分析中的应用[D]. 北京: 中国地质科学院, 2007.
- 20 闫建秀, 虞锐鹏, 汤坚, 等. 固相萃取—反相高效液相色谱法检测太湖螺中微囊藻毒素[J]. 食品与机械, 2008, 24(5): 92~95.
- 21 韩德满. 在线固相萃取与色谱、光谱联用技术测定痕量有毒污染物[D]. 天津: 南开大学, 2007.
- 22 苏继新, 聂玉伦, 王仲鹏, 等. 固相萃取技术及其在环境上的应用[J]. 山东化工, 2005, 34(1): 13~20.
- 23 Berrueta L A, Gallo B, Vicente F. Analysis of oxazepam in urine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection by post-column derivatization[J]. Journal of Chromatography A, 1993, 616(2): 344~348.
- 24 祝伟霞, 杨冀州, 梁炜, 等. 固相萃取技术在兽药残留分析中的应用[J]. 动物医学进展, 2007, 28(8): 99~101.
- 25 洪波, 万译文, 刘伶俐, 等. 高效液相色谱法同时测定水产品中氨基甲酸酯类的残留[J]. 食品与机械, 2012, 28(6): 93~95.
- 26 Cavani L, Ciavatta C, Trubetskaya O E, et al. Capillary zone electrophoresis of soil humic acid fractions obtained by coupling size-exclusion chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Journal of Chromatography A, 2003(983): 263~270.
- 27 宋迎春, 谭洪涛. 固相萃取及其在食品分析中的应用[J]. 江西医学检验, 2005, 23(6): 583.
- 28 魏新军, 颜振敏, 陈万霞, 等. 高效液相色谱法测定鸡肉中 6 种磺胺类药物残留[J]. 食品与机械, 2009, 25(5): 114~116.
- 29 颜鸿飞, 欧阳振中, 蔡婧怡, 等. 肉类食品中乙氧喹残留的液相色谱检测及质谱确证[J]. 食品与机械, 2012, 28(5): 83~86.