鸡肉中多种磺胺兽药残留量测定的高效液相色谱- 电化学检测法

王建华, 林黎明, 陈长法

(青岛出入境检验检疫局 食品实验室, 山东 青岛 266002)

摘 要: 采用液相色谱电化学法测定了鸡肉中磺胺类药物残留量; 磺胺用氯仿提取后, 取部分提取液用氮气吹干, 残渣溶于 KH_2PO_4 中, 用正己烷脱脂, 水相进样, 液相色谱分析用 C_{18} 柱, 流动相为甲醇- 0.01 mol/L KH_2PO_4 (pH 6, 体积比 25∶75), 检测电位 1.0 V; 与紫外检测器相比, 电化学检测器(ECD) 有更高的灵敏度和选择性, ECD 的检出限为磺胺嘧啶 0.02 ng, 磺胺甲氧哒嗪 0.06 ng, 磺胺甲基异 唑 0.07 ng。

关键词: 高效液相色谱; 安培电化学检测; 磺胺类药物; 残留物; 鸡肉

中图分类号: TS251.55 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2002)04- 0079- 03

磺胺类药物(SAs) 广泛用于预防和治疗食源性动物的疾病, 然而过量使用这些抗生素会导致在食用动物产品中残留。这些残留物对人体有不良影响。因此, 欧盟将磺胺类药物列为必须严格监控的药物, 并制定了动物源食品中磺胺的最大残留限量为 100 μg/kg[1]。

GC 和 GC- MS 对肉、奶中磺胺类药物残留的测定灵敏度高而且专属性强, 但需要繁冗的净化和衍生步骤[2], 不适合大量样品的分析。液相色谱紫外检测法也有许多应用[3], 但灵敏度低。有些分析方法基体干扰严重。

美国农业部食品安全检查局(FSIS) 采用荧光胺衍生的薄层色谱(TLC) 筛选方法[4]。这种方法灵敏度、选择性较好, 但重复性不够好。

近年来, 用荧光胺柱前衍生或柱后衍生, 进行磺胺测定的液相色谱荧光检测法已成为测定动物组织多种磺胺快速分析方法[5], 这种方法灵敏度、选择性都较好。液相色谱与大气压化学离子或热喷雾质谱联用技术已成为确证生物组织中磺胺兽药残留的方法[6], 但一般实验室很难配置这样的仪器。

本文提出了采用液相色谱电化学检测器(ECD) 测定禽肉中多种磺胺残留方法。通过与二极管阵列检测器(DAD) 进行比较, 发现 SA 在 ECD 上响应比 DAD 至少高一个数量级。本法具有灵敏度高、专属性好的优点。

收稿日期: 2001- 08- 05; 修回日期: 2002- 03- 19

作者简介: 王建华(1968-), 男, 山东青岛人, 工程师, 硕士.

(上接 78 页)

Determination of Ligustilide in Radix Angelicae Sinensis by SFE- Capillary GC

HUANG Bao_hua[1], ZHANG Kun[1], GUAN Yan_qiong[1], ZHOU Xiao_hui[2]

(1. Light Industry and Chemical Engineering School, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China;
2. Experiment Research Center, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China)

Abstract: Ligustilide is one of the main active constituents in Radix Angelicae Sinensis. A capillary gas chromatographic method for the determination of ligustilide was proposed hoping to optimize conditions for supercritical fluid extraction of ligustilide. The extracts were separated by a SE_54 column with second order programmed temperature. Ligustilide was quantitatively analyzed by using octadecane as an internal standard. There was a good linear relationship between the peak area and concentration of ligustilide in the range of 0.7~ 1.8 g/L. A RSD of 2.2% (n= 6) and recoveries of (96±2)% were obtained.

Key words: Capillary gas chromatography; Ligustilide; Supercritical fluid extraction; Radix Angelicae Sinensis

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP1050型四元梯度泵；在线真空脱气机；HP1049A电化学检测器(ECD)，工作电极为玻碳电极，参比电极为Ag/AgCl固体电极；HP1100二极管阵列检测器(DAD)；使DAD流出液进入ECD，用HPCHEM化学工作站同时采集双通道信号；多功能微量化学处理仪；SK_1涡流混匀器；水为双蒸水并过Millipore纯水器；甲醇为国产色谱纯试剂；磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、三氯甲烷为Merck公司产品；0.1 mol/L KH_2PO_4(pH为5.5)；0.01 mol/L K_2HPO_4：称1.14 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$于1 000 mL烧杯，加水至900 mL，此时pH=9，用100 g/L H_3PO_4(磷酸水溶液)调节pH至6，转入1 000 mL容量瓶，并用水定容至刻度。

所用磺胺标准品均为Sigma公司产品。标准贮备溶液的配制：各称25 mg标准物于25 mL棕色容量瓶，用甲醇定容至刻度。标准工作液的配制：标准贮备溶液用甲醇逐级混合稀释成梯度溶液。工作曲线的绘制：取不同质量浓度混合标准在<40 ℃氮气流吹干，加入0.1 mol/L KH_2PO_4 1 mL涡流混匀溶解，经0.45 μm微孔滤膜过滤至自动进样小瓶中，进样分析。

1.2 色谱条件

流动相为甲醇-0.01 mol/L K_2HPO_4磷酸盐缓冲液(体积比25∶75)，流速1 mL/min，进样量10 μL；色谱柱：分析柱为卡套柱(Agilent，4.0 mm×250 mm)，Hypersil ODS 5 μm，保护柱为5 μm ODS子弹头柱，4 mm×4 mm；DAD紫外检测波长266 nm；ECD的检测电位+1.0 V。

1.3 样品制备

收集刚宰杀喂养的小鸡，将鸡肉切成小片并均质，搅碎，样品放在塑料袋中密封冷冻保存。称取4 g肉样到50 mL具旋塞塑料离心管，加入氯仿(三氯甲烷)40 mL，于涡流混匀器上快速混匀1 min，放在卧式振荡器中振荡15 min，充分混合；3 000 r/min离心5 min，肉样在上层，用一次性吸管吸取下层溶液，用滤纸过滤，取10 mL滤液(相当于1 g肉样)于<40 ℃氮气流下吹干；残渣用5 mL正己烷溶解，加入1.0 mL 0.1mol/L磷酸二氢钾溶解，快速混匀多次，每次静置分层；最后3 000 r/min离心2 min，界面为黄色，仔细抽取水相过滤于自动进样瓶插件中。

2 结果与讨论

2.1 方法原理

HP1049A电化学检测器是薄层式检测池，工作电极为8 mm直径的圆盘式玻璃碳电极。本法采用恒电位安培模式，电活性物质在电极上发生氧化还原反应，产生电流。

2.2 标准溶液的配制

实验发现，若用甲醇配制标准直接进样，在较低浓度时，色谱峰形较差；用强酸或强碱性溶液溶解的标准无峰或峰形很差；而用流动相或0.1 mol/L KH_2PO_4配成标准溶液峰形较好。

2.3 流动相pH值的影响

改变流动相pH值在4~8，流动相pH在4~7之间无论对峰高、待测物保留时间和峰形均无影响，pH大于7峰形变差，DAD和ECD均如此。本法选择pH=6。

2.4 流动相组成的影响

国内外文献报道多采用乙腈-缓冲溶液作流动相[5]，本法改用甲醇-缓冲液作流动相，不但降低了成本，还降低了毒性，色谱峰尖锐对称，且分离度令人满意。许多文献方法是通过加入离子对试剂(如辛烷磺酸钠)来改善磺胺的峰形和分离。离子对试剂对ODS色谱柱有损害，本法不必用此类试剂，仍可得到尖锐对称的峰形。通过试验发现，甲醇在流动相中的含量对保留时间影响很大。随着甲醇含量的增加，各物质保留时间明显缩短。综合考虑，本法选择甲醇含量为25%(φ)。

2.5 电化学检测器工作电位选择

电化学检测电位依次按0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1 V设定，注射相同体积的同一浓度的标准混合液，建立动态伏安曲线，结果表明电位在1.0 V最佳。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.6　提取与净化方法的选择

探索了文献报道的提取和净化方法。参考文献[6]的方法, 采用有机溶剂提取后, 用强阳离子交换柱(PRS 或 SCX)净化后, 柱后衍生 HPLC- FLD 或 HPLC- DAD 测定磺胺嘧啶。该法只适用于磺胺嘧啶, 其它物质回收率很低。

最后, 样品制备参考测定牛奶中新诺明(SMZ)残留的 AOAC 公定分析方法[4], 经适当改进后, 用离心管代替分液漏斗振荡提取, 肉样在溶液上层, 离心后肉样成坚实的饼状, 溶液变澄清, 取出有机相, 并取部分提取液浓缩至干, 再净化。此法适合大量样品分析。

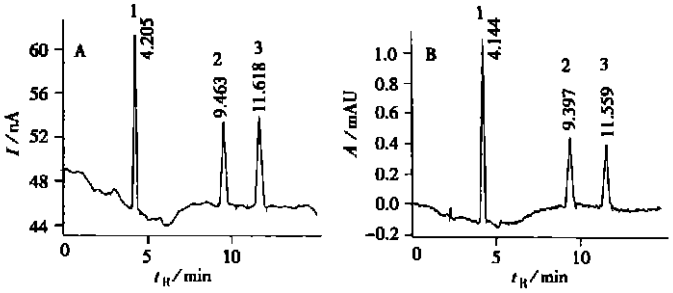

图 1　ECD(A)和 DAA(B)检测的色谱图

Fig. 1　Chromatograms detected by ECD(A) and DAD(B)

1. 磺胺嘧啶(sulfadiazine); 2. 磺胺甲氧哒嗪(sulfamethoxypyridazine); 3. 磺胺甲基异噁唑(sulfamethoxazole)

2.7　检出限

将 DAD 与 ECD 串联, 进样, 同时采集双通道信号, 得到的色谱图见图 1 A 和 B, 以 3 倍噪音计算, 磺胺嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺甲基异噁唑检出限(ng)分别为 0.24、0.96、2.2(DAD)和 0.02、0.06、0.07(ECD)。结果表明 ECD 比 DAD 检出限低一个数量级。

取空白鸡肉样添加 0.05 mg/kg 含量的 3 种混标, 按 HPLC- ECD 法重复 5 次测定, 测得回收率和 RSD 分别为: 磺胺嘧啶 75%, 11%; 磺胺甲氧哒嗪 80%, 8.0%; 磺胺甲基异噁唑 82%, 9.0%。

本法可作为常规检测方法。初步实验表明, 本法也适用于其它磺胺药物。

参考文献:

[1] Commission Regulation (EC) NO 508/1999 of 4/3/1999 amending annexes Ⅰ to Ⅳ to Council Regulation (EEC) NO 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal [J]. Off J Eur Comumun, 1999, 60(2): 16- 17.

[2] AOAC Official Method 982.40, Sulfamethazine residues in swine tissues gas chromatographic- mass spectrometric methods[S]. 1982.

[3] AOAC Official Method 992.21 Sulfamethazine residues in raw bovine milk liquid chromatographic methods[S]. 1984.

[4] AOAC Official Method 983.31, Sulfonamide residues in anincal tissues thin layer chromatographic screening methods[S]. 1984.

[5] DE BAERE S, BAERT K, CROUBEL S S, *et al*. Determination and quantification of sulfadiazine and trimethoprim in swine tissues using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection[J]. Analyst, 2000, 125(3): 409- 415.

[6] BOISON J O, KENG L J_Y. Determination of sulfadimethoxine and sulfamethazine residues in animal tissues by liquid chromatography and thermospray mass sepectrometry[J]. J AOAC Int, 1995, 78(3): 651- 658.

Determination of Residues of Sulfonamides in Chicken by HPLC with Electrochemical Amperometric Detection

WANG Jian_hua, LIN Li_ming, CHEN Chang_fa

(Qingdao Exit & Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China)

Abstract: A HPLC method with electrochemical detection(ECD) was proposed for the quantitative determination of residues of sulfonamide drugs in chicken. Sulfonamides in chicken sample were extracted with chloroform. The extract was filtered, and then evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The residue was dissolved into KH_2PO_4 solution and defatted with hexane. The aqueous sample was taken for analysis by HPLC with ECD at potential of 1.0 V after filtration. LC analysis was performed on a C_{18} column using a mobile phase of methanol- 10 mmol/L phosphate buffer(25: 75 by volume) at pH 6. Compared with ultraviolet detector ECD has a higher sensitivity and selective for sulfonamides. The detection limits of 0.02 ng, 0.06 ng and 0.07 ng were obtained for sulfadiazine, sulfamethoxypyridazine and sulfamethoxazole, respectively.

Key words: HPLC; Amperometric electrochemical detection; Sulfonamides; Residues; Chicken

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net