

液相色谱紫外法测定鸡肉中三种硝基咪唑残留量

王建华 林黎明 崔鹤

(青岛出入境检验检疫局食品实验室 266002)

摘要 建立了测定鸡肉中二甲硝咪唑、罗硝唑、甲硝唑残留量的方法。以二氯甲烷提取,硅胶固相萃取净化,液相色谱紫外法检测。样品添加 $10 \mu\text{g}/\text{kg}, 50 \mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率为 78% ~ 91%, 相对标准偏差为 6.4% ~ 10.1%。

关键词 高效液相色谱法 紫外检测 食品分析 硝基咪唑 鸡肉

二甲硝咪唑(DMZ),甲硝唑(灭滴灵,MTZ),罗硝唑(RNZ)是硝基咪唑类兽药,有抗厌氧菌感染作用,常被用来预防、治疗家禽的原虫病等疾病。欧盟各国对硝基咪唑在禽肉中的最高残留限量作了规定。检测动物产品中二甲硝咪唑残留量的方法较多,有气相色谱法^[1,2]、液相色谱紫外检测法^[3]、还原电化学检测法^[4]及液相色谱/质谱法^[5]。但多残留检测方法较少。Aerts 等^[6]采用 HPLC 紫外法测定了 DMZ, RZN 在鸡蛋和肉中的残留。使用了大量含氯试剂,色谱运行时间长达 60 min。目前,同时测定动物产品中 DMZ, RZN, TMZ 残留量,国内外尚未见报道。

笔者综合文献方法,采用液相色谱法,通过对色谱条件和样品提取、净化的探索,建立了多残留快速检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

真空固相萃取装置:24 样位,美国 ALLTECH 公司产;

液相色谱系统:Waters 510 泵,泵控模块 PCM, 996 二极管阵列检测器(PDA), U6K 进样器(定量管 2 mL), Millennium 2010, 2.15 WINDOWS 3.1 色谱管理系统;

多功能微量样品处理仪:CNM-MST-1 型,长沙中讯电子工程研究所产;

快速旋涡混匀仪:SK-1,深圳国华仪器厂产;

固相萃取柱(SPE):Silical Gel(硅胶), 500 mg, 6 mL, 美国 SUPELCO 公司产;

水:Millipore 纯水;

乙腈,甲醇:色谱纯;

无水硫酸钠:650℃灼烧 4 h;

硝基咪唑标准品:天津出入境检验检疫局提供,分别用无水乙醇配制 0.5 mg/mL 贮备溶液,可冷冻

保存 3 个月;

混和标准溶液:用甲醇配制;

工作混标:取适量混标溶液,在 40℃ 下用氮气吹干,用 200 μL 流动相溶解而成;

其它试剂:国产分析纯级(有机试剂需重蒸馏)。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex C18(2) 150 mm × 4.6 mm i.d. 及保护柱。在室温下,以 1 mL/min 乙腈 - 0.05 mol/L 乙酸铵(pH=4.5) (1:6, V/V) 为流动相进行等度淋洗,检测波长 320 nm, 进样量 20 μL。

1.3 实验方法

取 4 g 绞碎混匀的鸡肉置于 50 mL 塑料离心管中,加入 10 mL 二氯甲烷,快速混匀 2 min, 经 3500 r/min 离心 10 min, 用角匙取出上层的肉组织,并挤干,下层溶液通过硫酸钠过滤到另一容器中。肉样再加 10 mL 二氯甲烷,重复上述操作,合并提取物, SPE 柱预先用 5 mL 甲苯活化,滴至柱上还剩 2 mm 时,加入提取液,再用 5 mL 甲苯、5 mL 正己烷淋洗,弃去流出液。真空下抽干 10 min。用 4 mL 丙酮洗脱分析物至 15 mL 塑料离心管,在多功能微量样品处理仪上(40℃)用氮气吹干。溶于 200 μL 流动相,快速混匀,过 0.45 μm 滤膜于 2.5 mL 具盖塑料管中。取 20 μL 进样,外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

选用文献^[5]的分离条件三种化合物无法分开。选用乙腈和 0.05 mol/L 乙酸铵(用乙酸将 pH 从 6.5 调至 4.0 ~ 4.5)混合溶液,配比从 1:7 ~ 1:1 三种分析物能分开。出峰顺序为 MTZ, RZN, DMZ(见图 1)。实验表明,随着乙腈含量的减少,保留时间增加;选用配比为 1:6, 分析物与杂质分离良好,且分离速度较快。用乙醇或甲醇配制的低浓度工作标准溶液进

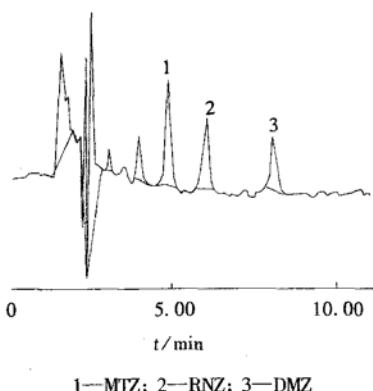


图1 鸡肉样品的色谱图

样,峰形差且较宽;而用流动相配制的溶液则峰形窄且对称。采用二极管阵列检测器对采集的200~400 nm的数据进行扫描,选择最佳检测波长320 nm。除采用保留时间定性,还可采用在线光谱图比较,对样品色谱峰进行纯度鉴别。

2.2 提取和净化条件的选择

样品提取并离心后,二氯甲烷提取液在下层,为较干净的无色溶液,肉在上层并聚集在一起。提取液通过无水硫酸钠,不仅可除去微量固体杂质,还可吸附水分。本法选用硅胶SPE柱净化^[5],因提取液可直接过SPE,无需浓缩蒸发,减少了分析物损失和检测的时间。固相萃取分四个步骤:固定相活化、样品上柱、淋洗和分析物洗脱。SPE活化液不能滴干,到柱上5 mm时,加入提取液。整个过程不需要抽真空,且分次加2 mL,以保持每个步骤的流速为2秒1滴,流速快则回收率低,净化效果差;因淋洗液正己烷与洗脱液丙酮互不相溶,洗脱前采用抽真空充分干燥柱床。加硝基咪唑标准溶液到玻璃管,吹干后测得的色谱峰明显低于加到塑料管的,这是因为硝基咪唑在玻璃器皿上吸附。故提取、净化都采用聚乙烯塑料管。

2.3 回收率试验

在相当于0~200 ng/g样品浓度范围内,硝基咪

唑浓度与峰高呈线性关系,相关系数均大于0.998。采用添加法进行回收率和重复性试验。在4 g样品中添加相当于0.01,0.05 mg/kg两个水平的三种混标,测定6次,测定结果见表1。色谱图见图1、图2。

表1 本方法的回收率(n=6)

样品	相对标准偏差/%	加入量/mg·kg ⁻¹	平均回收率/%
DMZ	10.1	0.01	78
	8.5	0.05	82
MTZ	6.4	0.01	87
	7.2	0.05	83
RNZ	9.0	0.01	87
	6.6	0.05	91

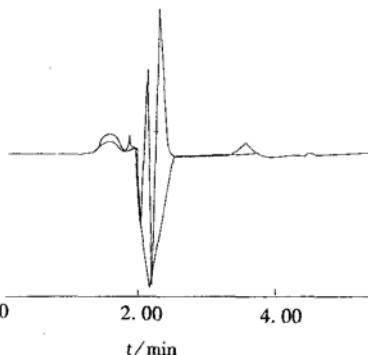


图2 添加0.01 mg/kg 硝基咪唑鸡肉样品的色谱图

3 结论

本法采用固相萃取净化法一次可处理24个样品,提高了效率,加快了分析速度,测定结果符合动物产品中兽残检测要求^[7],可作为常规快速筛选检测方法。

参考文献

- Newkrik D R, et al. J Assoc off Anal Chem, 1990, 702
- SN 0289-93 中华人民共和国进出口行业标准.北京:中国标准出版社,1993.
- Mallinson E T, et al. J Assoc off Anal Chem, 1992, 75(5):790
- Carignan G, et al. J Assoc off Anal Chem, 1988, 71(6):1141
- Cannavan A, et al. Analyst, 1997, 122:963
- Aerts R M, et al. J Assoc off Anal Chem, 1991, 74:46
- SN/T 0001-95 中华人民共和国进出口行业标准.北京:中国标准出版社,1995.

DETERMINATION OF THREE KINDS OF NITROIMIDAZOLE RESIDUES IN CHICKEN MUSCLE BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Wang Jianhua, Lin Liming, Cui He

(Food Laboratory of Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau 266022)

ABSTRACT A HPLC method for determining metronidazole(MTZ), ronidazole(RNZ) and dimetridazole(DMZ) in chicken muscle was developed. Nitroimidazole compounds were extracted with dichloromethane, followed by solid phase extraction cleanup using silica gel cartridges. Nitroimidazole were eluted with acetone and the eluants were evaporated to dryness at 40℃ under nitrogen. The residue was redissolved in the mobile phase. HPLC separation was done on an ODS column with ACN/0.05 mol/L ammonium acetate buffer(pH 4.5)(1:6,V/V) as mobile phase. Ultraviolet detection was performed at 320 nm. The mean recoveries of nitroimidazoles spiked at 0.01 mg/kg and 0.05 mg/kg was MTZ 85%, RNZ 89%, DMZ 80%, with RSDs of 6.8%, 7.8% and 9.3%.

KEYWORDS high performance liquid chromatography, ultraviolet detection, food analysis, nitroimidazole, chicken muscle