

高效液相色谱法测定猪肉中安定残留量

王海娇 周艳明 牛 森
(沈阳农业大学,辽宁 沈阳 110161)

摘 要:为有效地监测肉类产品中的药物残留,建立了测定猪肉中安定残留量的反相高效液相色谱法。利用 Al_2O_3 层析柱对安定提取液进行净化,高效液相色谱仪测定参数: C_{18} 柱 (2 mm $\times$ 150 mm, 3 μm);流动相:甲醇 + 水 + 25 mmol/l 乙酸铵溶液 (64.8 + 35.0 + 0.2);流速 0.2 ml/min;光电二极管阵列检测器,波长 254 nm。实验结果表明,提取液中各组分分离良好,安定浓度在 100 ng/ml ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与峰面积呈线性相关, $r = 0.997\ 19$;平均回收率 80.8%; $\text{RSD} < 5\%$ 。该方法快速、简单、准确,适用于肉类产品中安定残留量的检测。

关键词:色谱法,高压液相;猪;肉制品;安定

Determination of Diazepam Residue in Pork by HPLC
WANG Hai-jiao, ZHOU Yan-ming, NIU Sen
(Shenyang Agricultural University, Liaoning Shenyang 110161, China)

Abstract: The extraction sample was purified by Aluminum oxide column for chromatography and analyzed by RP-HPLC. The HPLC analyzing parameters included ODS column (2 mm $\times$ 150 mm i. d., 3 μm), the mobile phase was methanol + water + 25 mmol/L ammonium acetate (64.8 + 35.0 + 0.2), at a flow rate of 0.2 ml/min, the DAD detection wavelength was 254 nm. The results indicated that the separation of components in the sample was good, the concentration of Diazepam within the range from 100 ng/ml to 40 $\mu\text{g/ml}$ was linearly correlated with the peak area, $r = 0.997\ 19$, the average recovery was 80.8 % and the $\text{RSD} < 5\%$.

Key word: Chromatography, High pressure Liquid; Swine; Meat Products; Diazepam

安定 (Diazepam) 属苯二氮䓬类镇静催眠药物。广泛用于临床医学,长期服用有成瘾性和依赖性。猪在饲养过程中,若食用了添加安定的饲料,可导致神经麻痹,安静嗜睡,从而达到快速催肥、缩短出栏时间的目的。近年来,随着畜牧养殖业的迅速发展,个别饲养者擅自在畜禽饲养中添加使用安定,最终导致畜产品中安定残留,从而严重影响人们的身体健康。

安定的测定方法多集中在临床医学、刑侦检测方面,如血液、尿液、胃内容物、肝中安定的测定^[1-4]。主要有固相提取、液-液提取,采用 HPLC、GC-FID、GC-NPD、GC-MS 等测定方法^[5-7],而猪肉中残留安定的检测尚未见报道。本方法利用高效液相色谱法对猪肉中的安定残留进行定性定量测定。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 Agilent 1100 高效液相色谱仪,光电二极管阵列检测器,Phenomenex C_{18} 柱 (2 mm $\times$ 150 mm i. d., 3 μm),超声波振荡器,组织搅碎机。安定

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (20030342 - T - 424)
作者简介:王海娇 女 硕士
通讯作者:周艳明 女 教授

标准品购自中国药品生物制品检定所;甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂为分析纯。层析柱填装 200~300 目 Al_2O_3 。

1.2 色谱条件 色谱柱:Phenomenex C_{18} 柱,流动相:甲醇 + 水 + 25 mmol/l 乙酸铵 (64.8 + 35.0 + 0.2);流速:0.2 ml/min。检测器:光电二极管阵列检测器;波长 254 nm;紫外扫描范围:190~400 nm;柱温:45 $^{\circ}\text{C}$;进样量:5 μl ;保留时间定性,外标法峰面积定量。

优化条件下的标准品色谱图、样品空白色谱图和添加标准品的样品含色谱图见图 1、图 2 和图 3。

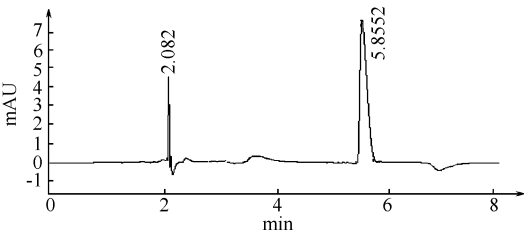


图 1 安定标准品的色谱图

1.3 标准品溶液的配制 精密称取安定标准品 10.0 mg 置于 10 ml 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取 1 ml 于 10 ml 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得 100 $\mu\text{g/ml}$ 安定标准品溶液,

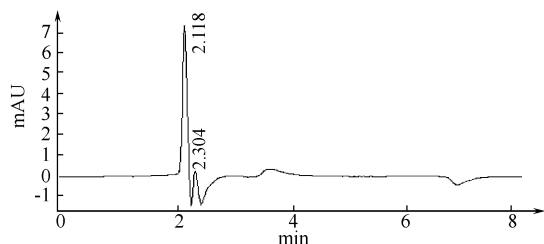


图2 样品空白的色谱图

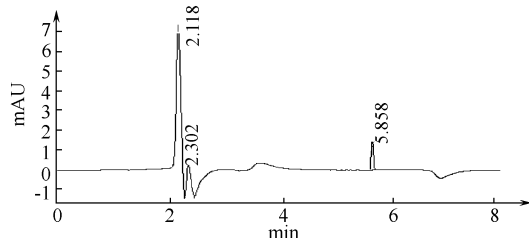


图3 添加标准品的样品色谱图

以此来配制系列浓度的标准品溶液。

1.4 方法 将从市售购得的猪肉用组织粉碎机粉碎到60目以下,取试样2.00 g(精确至0.01 g),加入10 %碳酸钠溶液调pH 9~10。准确加入氯仿+异丙醇(9+1)提取液5 ml ×3,超声振荡5 min ×3,合并提取液,浓缩蒸干,用5 ml 乙醚溶解准备上层析柱。

Al₂O₃ 层析柱自制,量取15 ml 乙醚润洗,注入试样提取液,加入25 ml 二氯甲烷淋洗,15 ml 甲醇洗脱,收集洗脱液,浓缩蒸干,色谱纯甲醇1 ml 定溶,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,HPLC 测定。

2 结果与讨论

2.1 分离条件的选择

2.1.1 提取溶液的确定 比较纯氯仿、正己烷、二氯甲烷、异丙醇等有机溶剂的提取效果,结果(见表1)表明,只有氯仿与异丙醇在9+1的混合下,提取率在90 %以上。

表1 不同提取溶剂的安定残留提取率 %

试样编号	正己烷+二氯甲烷 (5+3)	氯仿	氯仿+异丙醇 (9+1)
1	73	42	89
2	70	47	92
3	69	44	93
均值	71	44	91

2.1.2 溶剂pH值的调节 安定在弱碱条件下易溶于有机溶剂中,用10 %碳酸钠溶液调节pH在9~10时,可以获得较高的回收率,提取率可达98 %。

2.1.3 层析柱的选取 由于试样中的主要干扰物质是脂类,而除脂类杂质的方法主要有液-液萃取、固相萃取等,通过实验比较各方法,用Al₂O₃ 层析法净化的效果比较好。

2.2 检测条件的选择

2.2.1 流动相的选择 用纯甲醇做流动相时,安定在3 min 左右出峰,在用甲醇+水为80+20时,在4 min 处出峰,考虑到试样中杂质干扰,选用甲醇+水为70+30,安定在5.8 min 附近出峰。加入少量乙酸铵,即流动相为甲醇+水+25 mmol/l 乙酸铵为64.8+35.0+0.2 可明显改善安定的峰型,以此配比溶剂作为流动相。

2.2.2 检测波长的选择 在190~400 nm 范围内对安定的标准溶液进行扫描,结果在254 nm 处有较强吸收,最终确定254 nm 为检测波长。

2.2.3 线性范围、检出限、精密度和准确度 在该试验条件下,安定标准溶液的浓度在0.1~40 μg/ml 范围内与峰面积呈线性相关。线性回归方程为: $y = 152.985302x - 17.366161$, $r = 0.99719$,最低检出限:0.05 μg/g。以10 μg/ml 安定标准溶液,连续进样5次,其峰面积的RSD为0.79 %,精密度良好。选取6个添加水平(0.1、0.5、1、5、10、20 μg/2g 试样),每个水平均做3次重复,6个浓度水平的平均回收率分别为71.4 %、80.6 %、84.5 %、88.3 %、79.1 %、76.6 %,RSD < 5 %。

2.2.4 方法的适用性 分别对猪肝、猪血、鸡肉、牛肉进行了方法适用性试验,每个试样选一个添加水平(1 μg/2g),平均回收率分别为89.4 %、96.3 %、92.1 %、87.4 %,RSD < 5 %。

参考文献

- [1] 张吟,陈一农,郑兴中.固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定人血清中地西泮及氯硝西泮[J].中国医院药学杂志,2002,22(6):337-339.
- [2] 黄波,李焕德,阎小华.人体中几种镇静催眠药的快速分析[J].药物分析杂志,1991,11(2):108-109.
- [3] 张继宗,张春水,李玉兰,等.埋葬4年的开棺腐败尸体中安定、氯丙嗪等6种安眠药物的检验[J].刑事技术,2004,(4),14.
- [4] 郭幼梅,郭胜才,郑力行,等.酶水解后高效液相色谱法测定尿中地西泮及其代谢物[J].中国临床药学杂志,2001,10(5):302-304.
- [5] 张东升,龚燕,蔡建荣,等.安定检测方法的研究进展[J].饲料工业,2003,24(6):39-41.
- [6] 黄士新,沈富林,曹莹.饲料中违禁药物安定的HPLC测定[J].中国饲料,2001,(11):21-22.
- [7] 李玉兰,徐建宁,刘耀.生物试样中安定、利眠宁、舒宁药物及其代谢降解物的GC/MS分析[J].现代仪器,1999,(5),12-15.

[收稿日期:2005-11-14]