

高效液相色谱法测定鸡蛋中呋喃唑酮的残留量

丁 岚 谢孟峡* 刘 媛 单吉浩 杨清峰 刘素英
(北京师范大学分析测试中心, 北京 100875) (农业部畜禽产品质量监督检验测试中心, 北京 100026)

摘 要 采用基体固相扩散和固相萃取相结合的技术, 对鸡蛋中呋喃唑酮残留进行了提取和净化处理, 建立了高效液相色谱法检测鸡蛋中呋喃唑酮残留量的方法。对呋喃唑酮在 C_{18} 固定相和硅胶固相萃取柱上的保留行为进行了研究。采用液相色谱分离, 外标法定量, 呋喃唑酮标准溶液的峰面积与样品浓度在 $5 \mu\text{g/L} \sim 2.5 \text{ mg/L}$ 范围内呈良好的线性关系, 线性回归系数大于 0.9999。鸡蛋样品中呋喃唑酮不同加入量的平均回收率在 $80.2\% \sim 91.1\%$; 相对标准偏差在 $2.0\% \sim 9.5\%$; 最低检出限为 $10 \mu\text{g/kg}$ 。分析方法具有良好的重现性, 批内、批间定量结果的相对标准偏差均小于 10% 。

关键词 高效液相色谱, 呋喃唑酮, 基体固相扩散, 固相萃取, 鸡蛋

1 引 言

呋喃唑酮(furazolidone)属呋喃西林类化合物, 有广泛的抗菌活性, 常用来预防和控制霍乱、球虫病、猪肠炎和火鸡黑头病等因细菌和原生物引起的感染^[1]。但近年来医学研究表明, 呋喃唑酮具有很强的致癌性。从 1997 年 1 月起, 欧盟、北美等国家已经把呋喃唑酮列为禁用药品, 在可食性动物产品进出口中, 残留限量为不得检出。

呋喃唑酮的检测方法主要有比色法、薄层色谱法、气相色谱法、反相高效液相色谱法、气相色谱-质谱联用和液相色谱-质谱联用等方法。牛奶、动物的各种机体组织、体液及血清等基体^[2,3]中呋喃唑酮的检测方法已有报道, 但鸡蛋中呋喃唑酮残留量的检测方法标准在国内仍处于空白。

基体固相扩散(matrix solid-phase dispersion, MSPD)和固相萃取(solid-phase extraction, SPE)技术因其简便快捷、样品和溶剂用量少等诸多优点已被广泛应用于食品、水果、蔬菜及动物组织中药物残留的分析^[4~11]。本文应用 MSPD-SPE 相结合对鸡蛋中的呋喃唑酮进行了提取和净化处理, 建立了高效液相色谱法定量测定鸡蛋中呋喃唑酮残留量的方法。

2 实验部分

2.1 仪器

美国 Waters 600 高效液相色谱仪; 717 自动进样器; Millennium32 数据处理系统; Waters 474 型紫外检测器; 色谱柱为 Waters nova-pak 150 mm $\times$ 3.9 mm i. d., 填料粒径为 $5 \mu\text{m}$; 美国安捷伦科技公司 10 孔固相萃取装置。

2.2 试剂及材料

呋喃唑酮(99%, SIGMA-ALDRICH 公司); 乙腈和甲醇(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 其它试剂均为分析纯; 实验用水为 MilliQ 高纯水。

C_{18} 键合固定相(preplex 40 $\sim$ 63 μm , 含碳量 18%), 取 100 g 左右 C_{18} 填料装在层析柱中, 用 100 mL 甲醇分多次淋洗后倒入烧杯中风干待用; 硅胶固相萃取柱, 500 mg, 6 mL (美国 Supelco Park 公司); 约 300 g 新鲜的无公害鸡蛋, 将蛋清和蛋黄搅拌均匀, -20°C 冰箱中储存备用。

2.3 基体固相扩散提取条件的选择

称取 3.0 g C_{18} 填料放入研钵中, 加入一定量的呋喃唑酮标准溶液, 用研杵沿同一方向轻轻研匀, 在通风柜中放置 0.5 h 左右。把 10 mL 注射器去掉活塞, 在注射器筒底部垫上两片滤纸, 将晾干后的 C_{18} 填

2003-02-27 收稿; 2003-07-30 接受

料装入其中,上层再垫一片滤纸,用注射器活塞将填料轻轻压实至 3.5 mL 左右。用 15 mL 正己烷分 3 次淋洗 C_{18} 填料柱,分别收集淋洗液。将各步收集到的淋洗液分别用 N_2 吹干,用 0.5 mL 乙腈定容后进行液相色谱分析。分别用二氯甲烷或乙酸乙酯作为洗脱剂重复上述实验步骤,并分别收集洗脱液用 N_2 吹干,0.5 mL 乙腈定容后进行液相色谱分析。每个实验平行做 3 次。

2.4 加标回收及检出限实验

同 2.3 节步骤,准确称取 1.0 g 鸡蛋,添加适量呋喃唑酮标准品,用研杵将鸡蛋和呋喃唑酮溶液稍加研磨混合均匀,加入 C_{18} 填料,研匀,在通风柜中放置 1 h 左右晾干后装柱。用 15 mL 正己烷淋洗柱子,弃去淋洗液,再用 15 mL 乙酸乙酯洗脱柱子,真空抽干,收集洗脱液并用 N_2 吹干。

依次用 5 mL 乙酸乙酯和 5 mL 正己烷活化硅胶柱。用 100 μ L 二氯甲烷/正己烷 ($V/V = 50/50$) 将上述残渣溶解并定量转移到硅胶柱上。用 5 mL 二氯甲烷/正己烷混合液淋洗硅胶柱子,弃去淋洗液;用 5 mL 乙酸乙酯洗脱,真空抽干,收集洗脱液,保持淋洗和洗脱的流速在 1~2 mL/min。用 N_2 吹干洗脱液,残渣用 0.5 mL 乙腈微热溶解,涡悬震荡后,冷却,过 0.22 μ m 滤膜,供高效液相色谱分析。

2.5 液相色谱分离条件

流动相为乙腈和 0.05 mol/mL 磷酸-三乙胺缓冲体系 (pH 2.4) ($V/V = 50/50$);流量为 1.0 mL/min;紫外检测器波长 367 nm;进样量 20 μ L。

2.6 标准曲线

准确称取 12.6 mg 呋喃唑酮标准品,置于 50 mL 容量瓶中,用乙腈溶解配成浓度为 252 mg/L 的呋喃唑酮标准溶液母液。用流动相将母液依次稀释成浓度为 0.005、0.01、0.025、0.05、0.10、0.25 和 2.5 mg/L 的系列标准溶液,进行液相色谱分析,每个浓度点进样 3 次。

3 结果与讨论

3.1 高效液相色谱分析

在乙腈磷酸-三乙胺缓冲体系 ($V/V = 50/50$) 的分离条件下,呋喃唑酮的色谱峰峰形良好,保留时间约为 4.5 min (见图 1)。

在上述色谱条件下测定了呋喃唑酮色谱峰面积的精密度和日内稳定性,7 次测定峰面积的相对标准偏差小于 2.0%,每 1 h 进针 1 次,8 h 内峰面积的相对标准偏差小于 3.0%。

3.2 定量标准曲线

按所配制的标准溶液系列浓度进行液相色谱测定。以呋喃唑酮的色谱峰面积 (Y) 和浓度 (C : μ g/L) 做线性回归,得到的线性方程为 $Y = 64.6C + 5.9$,在 5 μ g/L ~ 2.5 mg/L 浓度范围内呈良好的线性关系,回归系数大于 0.9999。

3.3 样品预处理条件的优化

因鸡蛋样品经基体固相扩散提取以后,提取物成分复杂,不能直接用于液相色谱分析。所以必须选择合适的提取条件。首先用呋喃唑酮标准品模拟提取,考察其在 C_{18} 固定相上的保留行为,初步确定了呋喃唑酮的提取条件。

表 1 列出了不同体积、不同强度的洗脱剂洗脱 C_{18} 填料柱上呋喃唑酮的回收率。其数据显示:正己烷洗脱强度非常弱,只能洗掉 C_{18} 柱上结合力很小的一些杂质,适于作为淋洗液淋洗 C_{18} 柱。为洗掉尽可能多的杂质又不引起呋喃唑酮的损失,采用 15 mL 正己烷淋洗 C_{18} 柱;二氯甲烷可以洗脱出部分呋喃唑酮,不利于呋喃唑酮的富集,既不适于做淋洗剂,也不适于做洗脱剂;用 15 mL 乙酸乙酯洗脱,平均回收率可以达到 100%。

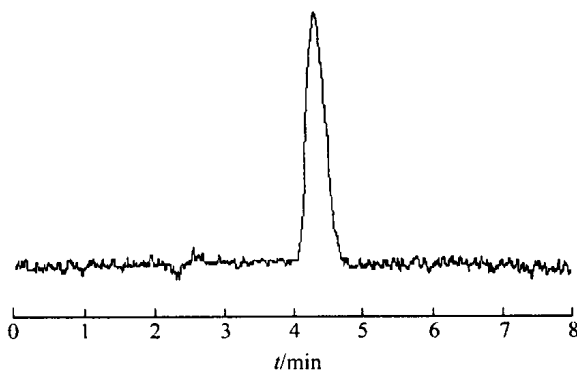


图 1 呋喃唑酮标准溶液 (0.05 mg/L) 的高效液相色谱图

Fig.1 The chromatograms of standard solution of furazolidone (0.05 mg/L)

表 1 不同洗脱条件下呋喃唑酮在 C₁₈固定相上的回收率
Table 1 The recoveries of furazolidone on C₁₈ column under different eluting conditions

洗脱体积 Elution volume (mL)	正己烷 n-Hexane (%)	二氯甲烷 Dichloromethane (%)	乙酸乙酯 Acetic ester (%)
5	0	26.3	78.1
10	0	47.6	95.6
15	0	60.8	100.8

鸡蛋的基体固相扩散提取物,仍然含有较多的脂类成分,需用硅胶固相萃取柱进一步净化处理。用呋喃唑酮标准品在硅胶柱上实验其淋洗和洗脱条件,结果表明:用 5 L 体积比为 11 的二氯甲烷/正己烷和 5 mL 乙酸乙酯分别作为淋洗液和洗脱液可以保证呋喃唑酮 95 %以上的回收率。

3.4 呋喃唑酮在鸡蛋中的加标回收率及检出限

根据以上确定的预处理条件,对不含呋喃唑酮的阴性鸡蛋样品和加标样品进行提取和净化处理,结果显示,选定的样品预处理条件对阴性鸡蛋样品和加标样品均得到了很好的净化效果(图 2,图 3),不同加标量的回收率数据见表 2。在加标量为 8 ~ 500 ng 的范围内,鸡蛋中呋喃唑酮的平均回收率都在 80 % 以上,相对标准偏差都在 10 %以内,符合药物残留分析的要求。根据对低浓度下呋喃唑酮的回收实验证明,此方法的检出限为 10 μg/ kg。

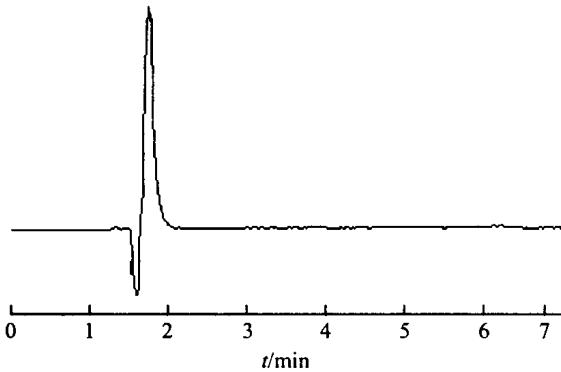


图 2 阴性鸡蛋样品(1.0 g)的色谱图
Fig. 2 Chromatogram of the drug-free egg sample

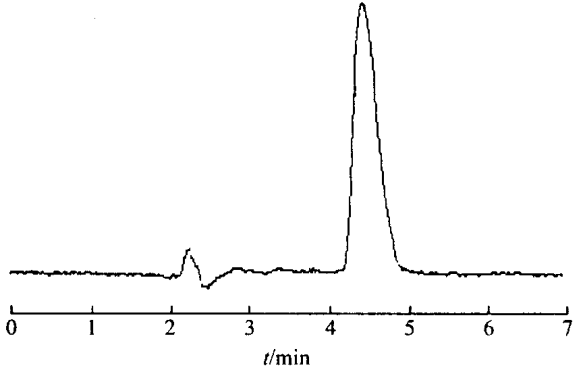


图 3 呋喃唑酮加标(200 ng)的鸡蛋样品(1.0 g)色谱图
Fig. 3 Chromatogram of egg fortified with furazolidone(200 ng)

3.5 重现性实验

应用上面建立的方法测定了不同来源的 4 批阴性鸡蛋样品的呋喃唑酮加标回收率(1.0 g 鸡蛋,加标量为 100 ng),每个批次测定 5 次,结果见表 3。

表 2 呋喃唑酮在鸡蛋样品中的回收率 (n = 5)
Table 2 The recoveries of furazolidone in egg sample (n = 5)

加入量 (ng) Quantity Added	平均回收率 (%) Average recovery	相对标准偏差 RSD (%)
8	80.2	9.47
10	86.3	9.18
20	91.1	4.33
200	91.6	3.45
500	94.3	1.97

表 3 实验重现性 (n = 5)
Table 3 The experimental reproducibility (n = 5)

批次 Assays of sample	平均回收率 Average recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	批间差 (%) RSD of inter-assay
1	88.5	6.89	7.26
2	71.7	8.68	
3	80.2	2.01	
4	87.2	7.20	

表 3 中数据显示,各批次的平均加标回收率在 71.7 % ~ 88.5 %之间;批内和批间的相对标准偏差皆小于 10 %,表明本方法具有良好的重现性。

References

1 Draisci R, Gannetti L, Lucentini L, Palleschi L, Brambilla G, Serpe L, Pasquale G. J. Chromatogr. A, 1997, 777: 201 ~ 211
2 Diaz T G, Cabanillas A G, Valenzuela A M, Correa C A, Salinas F. J. Chromatogr. A, 1997, 764: 243 ~ 248

- 3 Horie M, Saito K, Hoshino Y, Nose N, Nakazawa H, Yamane Y. *J. Chromatogr. A*, **1991**, 538: 484 ~ 491
- 4 Barker S A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885:115 ~ 127
- 5 Barker S A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 880: 63 ~ 68
- 6 Boulaire S L, Bauduret L C, Andre F. *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45:2134 ~ 2142
- 7 Zhao M, Wielen F, Voogt P. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 837:129 ~ 138
- 8 Fernández M, Picó Y, Manes J. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 871:43 ~ 56
- 9 Valenzuela A I, Lorenzini R, Redondo M J, Font G. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 839:101 ~ 110
- 10 Xie Mengxia (谢孟峡), Liu Yuan (刘媛), Jiang Min (蒋敏). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2002**, 30(11):1308 ~ 1311
- 11 Ding Yayun (丁雅韵), Xu Xiaoyun (徐晓芸), Xie Mengxia (谢孟峡). *Chinese J. Anal. Chem. (分析化学)*, **2003**, 31(11): 1356 ~ 1359

Determination of Furazolidone Residue in Eggs by High Performance Liquid Chromatography

Ding Lan, Xie Mengxia^{*}, Liu Yuan

(Analytical & Testing Center, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Shan Jihao, Yang Qingfeng, Liu Suying

(Quality Control & Inspection Center for Domestic Animal Product, Ministry of Agriculture, Beijing 100026)

Abstract The determination method of furazolidone residue in eggs by high performance liquid chromatography has been developed using matrix solid-phase dispersion (MSPD) and solid-phase extraction (SPE) technologies for sample pretreatment. The retention behaviors of furazolidone on C₁₈ column and silica gel SPE cartridge were investigated. The analytes were quantified using external standard calibration curves. There is a good linear correlation between the peak areas and concentrations of furazolidone. The calibration coefficient exceeds 0.9999 and the dynamic linear range is 5 µg/L ~ 2.5 mg/L. The average recoveries of furazolidone in eggs ranged from 80.2 % to 91.1 % with the relative standard deviations between 2.0 % and 9.5 %, and the limit of detection is below 10 µg/kg. The relative standard deviations of intra-assay and inter-assay are both below 10 %.

Keywords High performance liquid chromatography, furazolidone, matrix solid phase dispersion, solid phase extraction, eggs

(Received 27 February 2003; accepted 30 July 2003)