

畜禽肌肉、内脏及虾中磺胺二甲嘧啶残留量的检测技术研究

蒋定国¹ 杨大进¹ 王竹天¹ 方从容¹ 王玉莲² 文玉雪³

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021; 2. 泰安市卫生防疫站, 山东 泰安 271000;
3. 珲春市卫生防疫站, 吉林 珲春 133300)

摘要:为了快速、简便、灵敏地监测畜禽肌肉、内脏及虾中的磺胺二甲嘧啶残留,建立了高效液相色谱法快速检测技术。动物组织中的磺胺二甲嘧啶用二氯甲烷超声提取3次,提取液与2%硫酸钠水溶液进行液-液分配,下层有机相经脱水、浓缩后用0.02 mol/L 盐酸溶解浓缩瓶中残留物,以正己烷去除脂溶性杂质,经0.45 μm 滤膜过滤后供HPLC测定。结果表明本方法的线性范围为0.2~3.0 μg/mL,方法的最低检出浓度为2.1 μg/kg,在50~100 μg/kg的加标水平,方法平均回收率为76.6%~93.6%,相对标准偏差为4.4%~8.4%。该方法适用范围广,回收率高,检测限低,简单易行,易于在基层推广应用。

关键词:肉; 虾; 磺胺二甲嘧啶

Study on the determination of sulfamethazine residue in muscle and viscera of livestock, poultry and shrimp

Jiang Dingguo, et al.

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021)

Abstract: A rapid, simple and sensitive high performance liquid chromatographic method for the determination of sulfamethazine residue in muscle and viscera of the livestock, poultry and shrimp has been established. The sulfamethazine in animal tissues was extracted three times by dichloromethane with ultrasonic. The extract was cleaned up with 2% Na₂SO₄ solution, dehydrated with Na₂SO₄, and then concentrated. The condensate was dissolved by 0.02 mol/L HCl solution and further cleaned up by n-hexane. The purified solution was examined at UV 263 nm by HPLC. The detection limit of this method was 2.1 μg/kg, the recovery was 76.6%~93.6%, RSD was 4.4%~8.4%. This method can be widely applied because of its high recovery, low detection limit and simple procedure.

Key Words: Meat; Shrimp; Sulfamethazine

磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine)是一种抗组织胺类药物,它常用于畜禽球虫病的防治,也用作饲料添加剂,以提高动物的抗病能力,提高产量。磺胺二甲嘧啶超标的动物性食品损害人类的健康,如可能引起甲状腺癌,影响人体核酸的合成,产生一定的耐药性,对磺胺二甲嘧啶过敏的人会导致心悸、气短等不良反应。欧共体、中国、美国、加拿大和联合国FAO/WHO等对肉类食品中的磺胺二甲嘧啶制定了最高残留限量,规定其在肉类中不得超过100 μg/kg。^[1]为了保障我国人民的健康及扩大动物性食品的贸易往来,有必要建立动物性食品中磺胺二甲嘧啶残留量的测定方法。

动物性食品中的磺胺二甲嘧啶残留量可用微生物学方法、气相色谱法、气相色谱-质谱法、高效液相色谱法、薄层色谱法、分光光度法和酶联免疫法等测定。^[2~7]相比较而言,高效液相色谱法简便易行,在一般实验室均能进行,而且准确度和选择性好。本方法样品前处理步骤简单,选择的流动相适用范围广,对禽畜肌肉及其肝、肾、虾等样品均能分析,分析时间短,检测限低,有较好的回收率和精密度。

1 材料与方法

1.1 仪器 高效液相色谱仪(附481型紫外检测器和Waters510)water公司产品。离心机LD4-2,北京

基金项目:社会公益研究专项资金项目
作者简介:蒋定国 男 硕士

This work was supported by the Special Funds of Ministry of Science and Technology, China.

医用离心机厂生产。旋转蒸发仪 461,美国 Waters 公司生产。旋涡式混合器 XW-80A,上海医科大学仪器厂制造。超声波清洗器 KS-500D,宁波科生仪器厂生产。

1.2 试剂

1.2.1 乙腈(色谱纯)。甲醇(保证试剂)。二氯甲烷、乙酸、正己烷、乙酸铵、无水硫酸钠、氯化钠、丙二醇均为分析纯。0.02 mol/L 盐酸溶液。

1.2.2 磺胺二甲嘧啶标准溶液

磺胺二甲嘧啶标准储备液 称取 0.010 0 g 磺胺二甲嘧啶置于 10 mL 容量瓶中,加入甲醇溶解并定容至刻度,此溶液浓度为 1.0 mg/mL,置于冰箱冷藏室保存。

磺胺二甲嘧啶标准中间液 准确吸取 0.5 mL 储备液于 50 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,此溶液浓度为 10 μ g/mL,置于冰箱冷藏室保存。

1.3 方法

1.3.1 试样制备 除去畜禽肉中的脂肪组织并将肌肉组织、肝脏和肾脏切碎、分装于保鲜袋中;虾须去壳,取其肌肉组织并切碎分装于保鲜袋中。将所有样品置于冰箱冷藏室保存。

1.3.2 试样提取 准确称取 10 g 左右捣碎的试样,置于 100 mL 三角瓶中,加入 25 mL 二氯甲烷,超声波提取 20 min 后过滤。残渣加入 20 mL 二氯甲烷超声波提取 15 min 后过滤。残渣依上再提取 1 次。

1.3.3 试样净化 合并全部滤液,转入分液漏斗并加入 10 mL 2% 的硫酸钠溶液,剧烈振摇,静置分层,将下层有机相通过无水硫酸钠滤入浓缩瓶中,水相用 15 mL 二氯甲烷提取 1 次,同样转入浓缩瓶中,在 60 $^{\circ}$ C 水浴旋转蒸发仪上浓缩,当提取液浓缩近干时加入 0.2 mL 丙二醇,继续浓缩使二氯甲烷全部除去。向浓缩瓶中准确加入 0.8 mL 0.02 mol/L 盐酸溶液(含 10 mg/mL 氯化钠),使用旋涡式混合器回旋 1 min,再加入 2 mL 正己烷回旋 1 min,将全部溶液转移于 5.0 mL 试管中,静置分层,用尖嘴吸液管吸掉正己烷层,再加入 1.0 mL 正己烷涡流振荡 1 min,弃去正己烷。水相过 0.45 μ m 滤膜后供 HPLC 测定。

1.3.4 试样测定 液相色谱参考测试条件,色谱柱 Hypersil C₁₈, 25 cm \times 4.6 mm, 5 μ m; 预柱 Guard-pak C₁₈, 4 mm \times 4.5 cm; 流动相 乙腈 + 甲醇 + 0.05 mol/L 乙酸铵水溶液 + 乙酸 = 8 + 8 + 84 + 0.25; 流速 1.0 mL/min; 紫外检测器 波长 263 nm, 量程 0.02; 温度柱温和检测器均为室温; 进样量 20 μ L。

磺胺二甲嘧啶校正曲线绘制 准确量取中间标准溶液 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 mL, 分别置于 10 mL 容量瓶中分别用 0.02 mol/L 盐酸溶液定容, 得到 0.2、

0.5、1.0、2.0、3.0 μ g/mL 的标准溶液系列,在上述色谱条件下进行 HPLC 测定,作峰面积-磺胺二甲嘧啶浓度的校正曲线或求出直线回归方程。

试样测定 吸取试样溶液 20 μ L 进样,记录磺胺二甲嘧啶的保留时间与峰面积。根据磺胺二甲嘧啶的保留时间定性,峰面积定量。

1.3.5 计算 按校正曲线外标法计算试样中磺胺二甲嘧啶的含量。公式为:

$$X = \frac{A \times f}{m}$$

X—试样中磺胺二甲嘧啶的含量, μ g/kg; A—试样中色谱峰的面积对应的磺胺二甲嘧啶浓度, μ g/mL; f—试样的最后定容体积, mL; m—试样的取样量, g。

2 结果与讨论

2.1 试样前处理条件的选择 由于磺胺二甲嘧啶不溶于水,易溶于稀酸、乙酸乙酯和二氯甲烷,不溶于正己烷,因此可选用乙酸乙酯或二氯甲烷从含水试样中提取磺胺二甲嘧啶,同时减少水溶性杂质干扰。用无水硫酸钠脱去提取液中的少量水分,可进一步减少水溶性杂质;浓缩后加入稀酸溶液能完全溶解磺胺二甲嘧啶;加入正己烷可以除去脂溶性杂质。

对于肉类试样,用乙酸乙酯提取时,提取液在色谱图上干扰峰多,无法通过调节流动相来解决。而选用二氯甲烷提取后,色谱图较为干净。而且用水与二氯甲烷提取液液-液分配,可以除去大量极性大的杂质。在浓缩近干前加入 0.2 mL 丙二醇,可以保护磺胺二甲嘧啶和溶解磺胺二甲嘧啶,从而提高回收率。

2.2 色谱条件中流动相的选择 由于动物性食品基质复杂,尽管前处理净化步骤已除去很多杂质,仍有一些杂质干扰磺胺二甲嘧啶的定量,这就需要选择合适流动相来解决。文献报道的测定磺胺二甲嘧啶的反相 HPLC 流动相体系主要有:乙酸水溶液 + 甲醇 + 乙腈,乙酸水溶液 + 甲醇/乙腈,乙酸铵水溶液 + 甲醇/乙腈,磷酸盐水溶液 + 甲醇/乙腈,磷酸水溶液 + 甲醇/乙腈。通过反复对比试验,选择流动相体系为:乙酸 + 乙酸铵水溶液 + 甲醇 + 乙腈。该体系能使磺胺二甲嘧啶在较短时间内与试样杂质峰分开,而且柱压低。磺胺二甲嘧啶属于两性化合物,可以通过调节流动相的 pH 值来控制磺胺二甲嘧啶的保留时间。本方法选择 0.05 mol/L 乙酸铵 + 乙酸 + 甲醇 + 乙腈 = 84 + 0.25 + 8 + 8 (pH 3.1) 为流动相,在此条件下,能使所有空白试样的杂质峰与磺胺二甲嘧啶峰在色谱图中达到基线分开,并在 14 min 内完

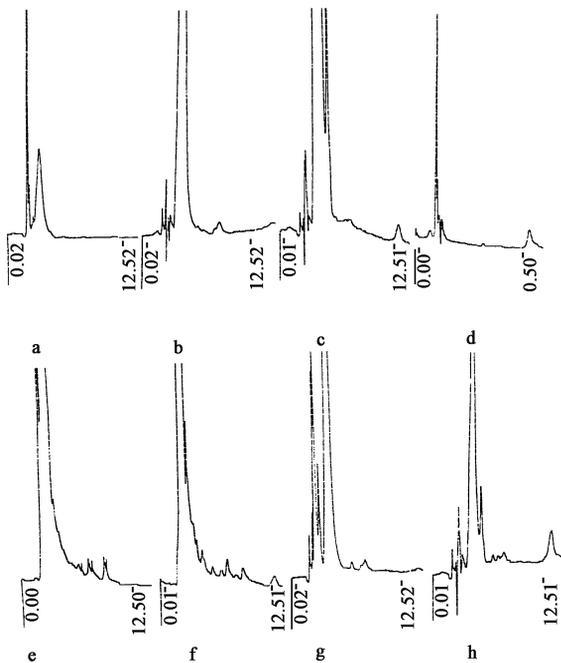


图1 标准品、空白试样和空白试样加标准品色谱图
a, b, e, g 分别为猪肾、猪肝、龙虾和猪肉空白试样的色谱图; d 为磺胺二甲嘧啶标准的色谱图(浓度为 0.5 µg/L, 峰面积为 35834); c, f, h 分别为猪肝、龙虾和猪肉空白试样加标准品后的色谱图。

图1 标准品、空白试样和空白试样加标准品色谱图

成。见如下标准品、空白试样和空白试样添加标准品后的色谱图。

2.3 方法的线性范围和最低检测浓度

用浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、3.0 µg/mL 的磺胺二甲嘧啶标准溶液系列,在规定的色谱条件下,进样 20 µL 测定,求磺胺二甲嘧啶的响应峰面积 - 磺胺二甲嘧啶浓度的线性回归方程,其方程为 $y = 71712x - 21$,相关系数 $r = 0.9999$,表明在该浓度范围呈线性关系,符合定量要求,其对应试样的残留量范围为 0.02 ~ 0.3 mg/kg,结果见表 1。

表1 磺胺二甲嘧啶的校正曲线

测定浓度 µg/mL	0.2	0.5	1.0	2.0	3.0
峰面积	14302	35834	71715	143412	215104
回归方程	$y = 71712x - 21$ $r = 0.9999$				

注:以基线噪音的 3 倍计算方法的最低检出浓度为 2.1 µg/kg。

2.4 方法的回收率和精密度 以空白猪肉、猪肾、猪肝、牛肉、虾等试样作为本底,在试样中添加不同浓度的磺胺二甲嘧啶标准品,测定方法的加标回收率及精密度(每个试样平行测定 6 次),结果见表 2。
2.5 方法的适用性 为了考察本方法的适用性,对市场上的样品进行了调查,样品包括猪肉、猪肾、猪

表2 试样的加标回收率及精密度

食品种类	添加水平 µg/kg	回收率 %						平均	RSD %
		1	2	3	4	5	6		
猪肝	50	69.2	78.1	83.2	86.2	68.4	74.3	76.6	7.3
	100	83.6	86.2	70.1	73.5	89.2	70.9	78.9	8.4
猪肾	50	81.2	84.6	74.5	70.6	85.8	72.4	78.2	6.5
	100	91.0	82.4	75.0	76.3	85.6	77.0	81.2	6.3
猪肉	50	83.2	99.1	80.2	89.1	95.3	85.8	89.8	7.2
	100	96.3	88.0	84.2	87.2	87.5	93.2	89.4	4.5
牛肉	50	87.0	98.0	84.1	80.5	93.0	82.6	87.5	6.7
	100	90.1	86.3	96.5	93.2	83.5	92.5	90.4	4.8
虾	100	95.3	92.1	85.7	88.3	90.5	83.3	89.2	4.4

肝、羊肉、鸡肉、鸡肝、虾、牛肉,共计 44 份。测定结果见表 3,从实际测定结果看本方法适用于这类试样的测定,且在磺胺二甲嘧啶出峰处无干扰峰存在。

表3 动物性食品的调查结果

样品种类	检测份数	未检出数	检出数	磺胺二甲嘧啶浓度 µg/kg
猪肉	6	6	0	<2.1
猪肾	6	6	0	<2.1
猪肝	6	5	1	3.1
鸡肉	3	3	0	<2.1
鸡肝	6	6	0	<2.1
虾	7	7	0	<2.1
羊肉	4	4	0	<2.1
牛肉	6	5	1	3.4

参考文献:

- [1] 庄无忌,主编. 各国食品和饲料中农药兽药残留大全 [M]. 北京:中国对外经济贸易出版社,1995,982—1014.
- [2] 杨红. ELISA 测定牛奶、猪血浆、猪尿中的磺胺二甲嘧啶[J]. 华西药理学杂志,1999,14(4):238—241.
- [3] Ram B P, Singh P, Mnartins, et al. High-volume enzyme immunoassay test system for sulfamethazine in swine [J]. J Assoc of Anal Chem, 1991,14(4):238—241.
- [4] 王群,马向东,李绍伟. HPLC 法研究磺胺类药物在水产动物体内的代谢和残留[J]. 海洋科学,1999,6:33—36.
- [5] 张素霞,李俊锁,钱传范. 猪肌肉组织中磺胺类药物的 MSPD 净化和 HPLC 测定[J]. 畜牧兽医学报,1999,30(6):531—535.

- [6] Austin R L. Multi-residue method for the determination of sulfonamides in port tissue[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38:423—426.
- [7] Joe O B. Determination of sulfadimethoxine and sulfonamide

residues in animal tissues by liquid chromatography and thermospray mass spectrometry [J]. J AOAC Int, 1995, 78: 651—658.

[收稿日期:2003-03-11]

中图分类号:R15;O657.72 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)06-0492-04

消除乳化现象的简易方法

宋健男 王永洁 郝学清
(哈尔滨市卫生防疫站,黑龙江 哈尔滨 150018)

食品的酸水解法是对试样加热、加酸水解破坏蛋白质及纤维组织,使结合脂肪游离后,再用乙醚提取,然后进行测定。在测定过程中,用乙醚提取时会遇到不同程度的乳化现象。为消除这一现象,我们在实际工作中摸索出简单易行的处理方法。

按照国标检验方法(GB 5009.6—1985)中的 8.3 “……并用石油醚-乙醚等量混合液冲洗塞及筒口

附着脂肪。静置 10~20 min 进行操作,如发现乳化现象,可将量筒内全部溶液倒入一离心管中,于离心机中以 2 500 r/min 速度离心 5 min 后,吸上清液于已恒重的锥形瓶中待测用。

采用简单易行的离心法,可有效地消除乳化现象,缩短分析时间,提高分析结果的准确性。

[收稿日期:2003-05-11]

中图分类号:R15;O65 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2003)06-0495-01

生牛内脏中违法添加甲醛的调查

文罗华 黎 斐
(湘潭市疾病预防控制中心,湖南 湘潭 411100)

根据消费者举报,湖南省湘潭市卫生监督所在该市某批发市场采购生牛杂碎 1 kg,送湘潭市疾病预防控制中心和湘潭市雨湖区防疫站检验。在样品检出甲醛后,对销售现场依法进行管理。对现场的食品再次采样送检,并对当事人作询问调查。

当日共采样 7 份,5 份阳性。

据调查,4 名加工者是将批发来的牛杂碎放入明矾、甲醛或双氧水配制的浸泡液中浸泡 1 h 左右

后送批发市场零售。加工者认为双氧水能漂白牛内脏,甲醛能防腐、软化,易于牛内脏销售。已经以此种方式销售牛杂碎近一年。

湘潭市卫生局根据有关规定对当事人进行了处罚。此事提示要加强为生食品生产经营摊贩的食品卫生教育,加强对他们的监督管理。

[收稿日期:2003-04-14]

中图分类号:R15 文献标识码:C 文章编号:1004-8456(2003)06-0495-01