



饲料中洛克沙肿的固相萃取——高效液相色谱法检测技术研究

作者:王金荣 张丽英 马永喜

期号: 2005年第14期

摘要 建立了固相萃取(SPE)——高效液相色谱(HPLC)法测定饲料中洛克沙肿的分析方法,优化了提取方法、净化参数、萃取容量、流速和洗脱溶剂等条件。饲料采用20g/l的磷酸氢二钾溶液作提取液,用阴离子交换柱萃取净化的方法;色谱条件为:在266nm波长下检测,色谱柱为Symmetry ShieldTMRP18柱(150mm×4.6mm),流动相为含0.1%甲酸的0.05mol/l磷酸二氢钾溶液-甲醇(体积比95:5),流速为1ml/min,洛克沙肿的浓度在0.2~10.0mg/l范围内含量与峰面积呈良好的线性关系,相对标准偏差为0.5%~1.07%,回收率为87.5%~96.7%。饲料中洛克沙肿的定量检出限为5mg/kg。

关键词 洛克沙肿;液相色谱;固相萃取;饲料

中图分类号 S816.17

洛克沙肿(Roxarsone, 化学名称 4-羟基-3-硝基苯肿酸)属于我国允许使用的药物添加剂,也是我国目前使用量比较大的有机砷制剂之一,主要用于提高猪、鸡日增重和改进饲料利用率,改善皮肤营养,促进色素沉积。有机砷制剂还具有抗菌作用,对治疗和防治猪的下痢腹泻有疗效。在猪鸡饲料中允许添加量为50mg/kg,产蛋期禁用,在宰前5d应停止使用。但目前生产中有机砷制剂盲目超量使用严重,有的甚至在100mg/kg以上。同时超量使用造成严重的环境污染,并且由于有机砷制剂的用量不能直接测定而导致饲料中无机砷是否超标无法判断,因此准确定量饲料中洛克沙肿含量具有重要意义。但目前国内外有关饲料中洛克沙肿的测定方法报道很少,仅Robert等(1993)采用活性炭萃取小柱净化,用HPLC方法检测饲料中的洛克沙肿含量,测定的结果与AOAC方法标准规定的分光光度计方法没有差异。邓志祥等(2003)、杨永嘉等(2001)用液相色谱方法测定了含有洛克沙肿的预混料中洛克沙肿的含量,得到较高的回收率和精密度。

由于饲料样品成分复杂,尤其是预混料中含有较高含量的各种饲料添加剂,为了更有效地去除杂质的干扰,本研究拟采用近年来发展起来的固相萃取技术,在HPLC上定量分析饲料中洛克沙肿的含量,以期减少样品处理程序,提高分析效率,减少样品前处理时间并提高定量测定的准确性。

1 测定试验

1.1 主要仪器

高效液相色谱仪LC10A(日本岛津公司),配有紫外检测器(SPD-10A);固相萃取仪(美国安捷伦公司);离心机(上海安亭科学仪器厂);电热恒温水浴(上海精密实验设备有限公司);超声波KQ32(昆山市超声仪器有限公司仪器公司);超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 试剂

甲醇(色谱纯);甲酸;0.05mol/l磷酸二氢钾溶液;20g/l磷酸氢二钾溶液;0.05mol/l乙酸钠-甲醇溶液(V:V, 95:5);pH7;100g/l硫酸铜溶液。试剂除特殊说明外均为分析纯,使用前用0.45μm的微孔滤膜过滤。制备标准贮液,准确称取500mg洛克沙肿标准品(购自百灵威公司,纯度在98%以上)于1L棕色容量瓶,用0.05mol/l磷酸二氢钾溶液超声波溶解,配制成500μg/ml的标准贮液,使用前将其逐级稀释至5μg/ml用于液相色谱分析。

2 结果与讨论

2.1 最佳波长的选择

由于洛克沙肿具有苯环等紫外吸收基团,因此选用紫外检测器作为检测器。用含洛克沙肿20g/l的磷酸氢二钾水溶液在波长200~400nm范围进行扫描(图1),结果表明在222nm处有最大吸收,266nm处吸收值很高。根据饲料样品的特点,蛋白质含量较高,同时含有维生素等多种饲料添加剂,这些物质在紫外区也有很强的吸收,尤其在波长222nm处饲料中的干扰物质较多,因此本试验选择266nm处为分析的最佳吸收波长。色谱柱采用常用的反相C18分离柱,本研究采用的分离柱为Symmetry ShieldTMRP18柱(150mm×4.6mm, 5μm, 美国Waters公司)。

2.2 流动相的选择

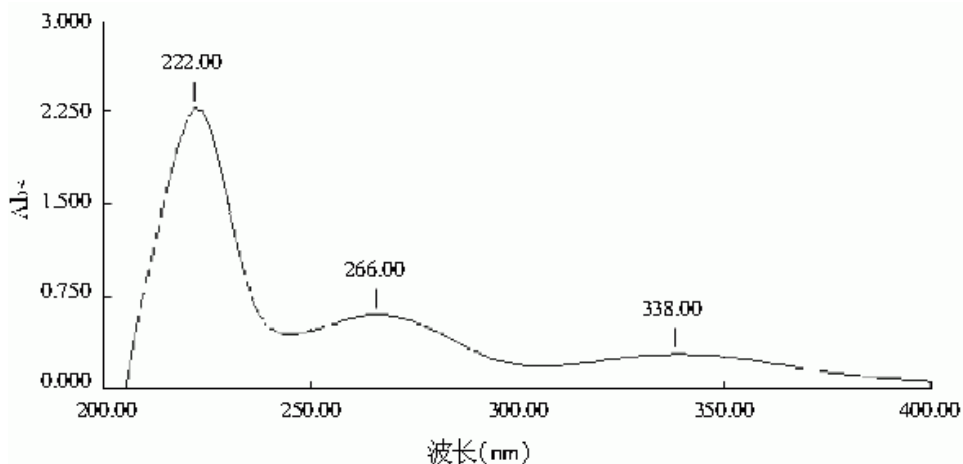


图1 洛克沙肿的紫外光谱扫描曲线

利用甲醇、乙腈、水、磷酸盐缓冲溶液等液相色谱分析常用的溶剂,对不同配比的多溶剂体系及不同pH值系统进行了一系列预试验。根据洛克沙肿的特性及结构特点,其化学结构中带有酚羟基和电负性较强的氧元素,有弱酸性,其中性分子和

会员登录

用户名:

密码:

验证码: 6148

相关文章

- 高效液相色谱法测定饲料中安...
- 饲料中微量元素硒的测定方法...
- 植酸酶活性测定应注意的几个...
- 不同原料中菜籽油、豆油氧化...
- 饲料中氢氰酸含量测定方法的...
- 氯化胆碱产品质量鉴定及掺假...
- 近红外光谱分析技术在饲料工...
- 饲料中磺胺二甲嘧啶、磺胺六...
- 几种蛋白质原料体外消化率测...
- 动物性饲料体外蛋白质消化率...

合作伙伴



离子形式在有机相和水相中分配性质不同，因此在键合相反液相色谱的情况下，以含磷酸盐缓冲液为流动相时，调节缓冲液的pH导致洛克沙肿色谱保留行为的改变。实验表明提高流动相的pH导致洛克沙肿组分出峰晚且有拖尾现象，而增加流动相中有机相的比例也会导致峰形不好且出峰时间延迟。所以选择在流动相中添加0.1%甲酸（V/V），以改善洛克沙肿的峰形。结果表明以含0.1%甲酸的0.05mol/l磷酸二氢钾溶液-甲醇（体积比为95：5）为流动相，洛克沙肿组分的分离效果和峰形最好，且保留时间适宜。图2为浓度为10μg/ml的洛克沙肿标准溶液在此流动相条件下的色谱图。

2.3 样品的提取

制备洛克沙肿含量为50mg/kg的饲料样品，粉碎过20目筛。提取剂选用0.05mol/l的氢氧化钠溶液和20g/l的磷酸氢二钾溶液，在不同温度下进行提取，重复测定8次。具体操作：称取5g的饲料样品于50ml离心管中，加入40ml提取剂，在恒温水浴上提取30min，并不停振荡；在4000r/min下离心10min；上清液倾入100ml容量瓶中，残渣再分别用30ml和20ml提取剂提取5~15min，离心，合并上清液于同一容量瓶中。向容量瓶中加入2ml 100g/l的硫酸铜溶液沉淀蛋白，定容后过滤。测定结果见表1。

表1 不同提取剂和提取温度对洛克沙肿回收率的影响(n=8)

项目	20g/l K ₂ HPO ₄ 溶液		0.05mol/l NaOH 溶液	
	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
20℃	87.6	7.2	85.3	6.9
40℃	92.3	3.5	90.4	2.9
60℃	96.7	0.9	92.3	1.2
70℃	96.0	2.6	92.4	3.9

从表1可以看出，随着温度的升高，饲料中洛克沙肿的回收率逐渐提高。但在温度为70℃时，由于饲料样品中淀粉含量较高，容易糊化，不利于洛克沙肿的提取和过滤，本研究采用60℃为提取最佳提取温度。两种提取剂对洛克沙肿的提取回收率没有显著差异，但因本研究的流动相采用0.05mol/l的磷酸缓冲盐，因此为保持溶剂与流动相组成的一致性，同时氢氧化钠溶液的缓冲能力低，故选用20g/l的磷酸氢二钾溶液作为提取剂。

2.4 固相萃取条件的优化

单纯的液液萃取或直接提取的样品溶液很难确保色谱分析时不出现基质干扰。根据洛克沙肿的性质，选用适合弱阴离子交换萃取的固相萃取小柱，本试验采用Waters OasisR MAX (1cc, 100mg美国Waters公司)固相萃取柱，分别用1ml 甲醇和1ml 水活化，固相萃取净化液的选择是依据MAX柱的特点，淋洗液选用0.05mol/l乙酸钠-甲醇溶液（pH7）和纯甲醇，淋洗损失小于1%；洗脱液用2%甲酸（V/V）-甲醇溶液洗脱时回收率小于70%，增加甲酸的浓度可以提高洗脱回收率，因此采用5%甲酸（V/V）-甲醇溶液作为固相萃取的洗脱液。标准品直接过柱的回收率大于98.5%，符合分析要求。净化流速以1ml/min最佳。洗脱液在65℃水浴上氮气吹干，吹干后加入1ml 20g/l磷酸氢二钾溶液，振荡并超声溶解后直接上机测定。利用此类小柱萃取样品，能有效除去饲料中的干扰物质，样品加标回收率达95%以上，且重现性好。

2.5 线性关系

用外标峰面积法测定线性关系。准确吸取一定体积的洛克沙肿的标准溶液配制成10个不同浓度的标准溶液（0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、和10.0μg/ml）进行测定，以其浓度X(μg/ml)为横坐标，相应的峰面积(A)为纵坐标，得到标准曲线的回归方程： $A=1.11 \times 104X-9.25 \times 102$ ，在浓度为0.2~10 μg/ml范围内线性良好，相关系数R²=0.999 5（图3）。同时还对猪全价料和中猪预混料进行不同添加水平的回收率试验及线性试验，结果回收率在不同添加水平条件下猪全价料中均达到95%以上，中猪预混料的不同添加水平的回收率平均达到87.5%。两种饲料添加的线性关系其相关系数都达到了0.99以上。

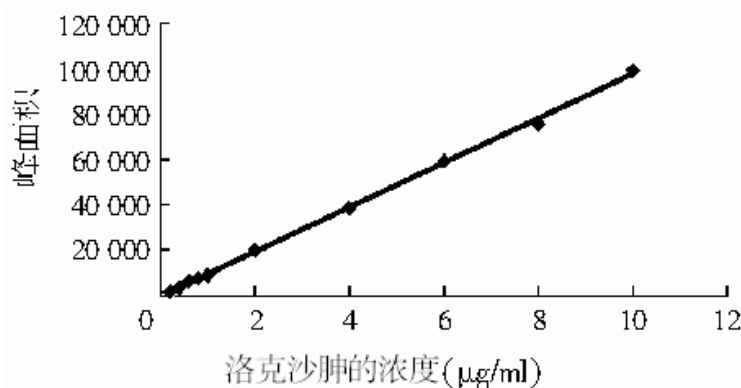


图3 洛克沙肿标准曲线

2.6 精密度及再现性试验

精密度试验是以洛克沙肿的添加量为50mg/kg的饲料为样品，分别测定7次，计算测定结果的相对标准偏差（RSD）；本试验的重现性试验是将上述样品在不同时间用不同仪器分别测定7次，计算其测定结果的相对标准偏差，结果见表2。

表2 方法的精密度及重现性(n=7)

项目	Waters 600	Waters 2690	LC-10A
测定结果*(mg/kg)	48.2	48.6	48.3
RSD (%)	1.8	0.71	0.91

注：* 7次测定结果的平均值。

2.7 回收率的测定

本试验对6种不同的饲料样品采用加标回收法,添加洛克沙肿的含量及回收率结果见表3。每一种样品做7个平行,结果取平均值。从表中可以看出,对于全价料,无论是猪料还是鸡料,其测定的回收率均较高,达到92.6%~96.7%;而对于预混料回收率仅达到85.2%~89.4%。虽然预混料中的添加剂含量较高,可能干扰洛克沙肿的提取,但样品的色谱分离的很好,在洛克沙肿峰附近没有干扰(图4)。因此该方法适合对饲料中洛克沙肿的检测。

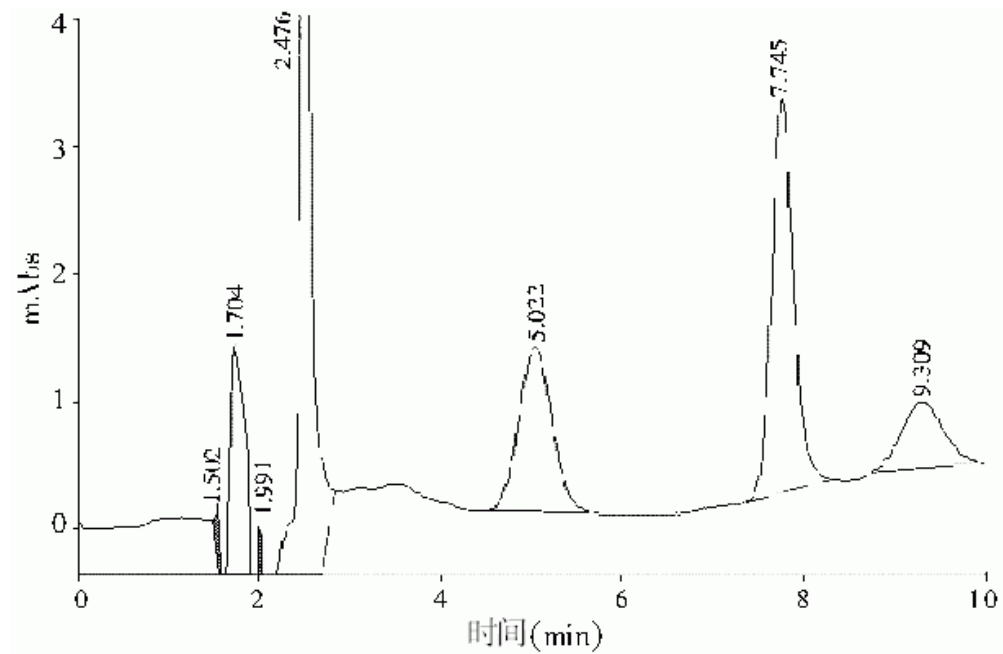


图4 添加洛克沙肿的饲料样品色谱

表3 方法回收率(n=7)

样品	添加量 (mg/kg)	测定值 (mg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
鸡全价料	50	48.2	96.4	0.69
猪配合饲料	100	95.4	95.4	0.64
猪浓缩料	250	236.4	94.6	1.20
蛋鸡浓缩料	100	92.6	92.6	1.80
猪预混料	2 500	2 188.2	87.5	1.90

3 小结

本研究优化了固相萃取和高效液相色谱方法测定饲料中的洛克沙肿的提取、净化和分析条件,并建立最佳色谱分离条件。该方法线性关系良好,有较高的精密度和回收率,并且能够有效排除饲料中杂质干扰,简化样品前处理过程,并能直接测定饲料中洛克沙肿的含量。该方法简便、准确,适用于饲料中洛克沙肿含量的测定。

参考文献

- 1 邓志祥, 吕明. 高效液相色谱测定饲料添加剂——洛克沙肿的含量. 饲料博览, 2003, (2): 20
- 2 单安山. 饲料非营养调控物质的研究与应用[M]. 东北林业大学出版社, 1999. 93~100
- 3 杨振海, 蔡辉益. 饲料添加剂安全使用规范[M]. 中国农业出版社, 2003. 262
- 4 杨永嘉, 王国忠等. 高效液相色谱测定洛克沙肿预混剂含量方法的研究. 中国兽药杂志, 2001, 35 (6): 23~26
- 5 Robert E. Sapp and Sandra Davidson. Determination of roxarsone in feeds using solid phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. Journal of AOAC Interna., 1993a

...评论...

发表
评论

*40字以内

提交

重置

[关于我们](#) | [网站导航](#) | [友情连接](#) | [联系我们](#) | [会员须知](#) | [广告服务](#) | [服务条款](#)

版权所有:饲料工业杂志社 Copyright © [Http://www.feedindustry.com.cn](http://www.feedindustry.com.cn) 2004-2005 All Rights 辽ICP备05006846号

饲料工业杂志社地址:沈阳市皇姑区金沙江街16号6门 邮编:110036 投稿:E-mail:tg@feedindustry.com.cn 广告:E-mail:ggb@feedindustry.com.cn

编辑一部:(024)86391926(传真) 编辑二部:(024)86391925(传真) 网络部、发行部:(024)86391237 总编室:(024)86391923(传真)