

超声波-微波辅助提取-高效液相色谱法同时检测 羊肉组织中4种非甾体抗炎药物残留

康永锋* , 邹世文 , 段吴平 , 李 艳 , 孙 涛

(上海海洋大学食品学院 , 上海 201306)

摘要 :建立了超声波-微波辅助提取-高效液相色谱同时检测羊肉组织中氟尼辛葡甲胺、美洛昔康、双氯芬酸钠和酮洛芬4种非甾体抗炎药残留量的分析方法。样品前处理以酸化后的乙醇为提取剂,采用超声波-微波辅助提取,硅藻土柱净化。采用的色谱条件:色谱柱为 Hypersil C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),柱温为 30 °C,流动相为乙腈-0.2% 三乙胺水溶液(40:60, v/v, 用磷酸调节 pH 3.5),流速为 0.8 mL/min,检测波长为 255 nm。4种非甾体抗炎药能够在 20 min 内得到很好的分离,各药物线性回归方程的线性相关系数为 0.9993 ~ 0.9998,检出限(信噪比(S/N)=3)为 5 ~ 10 μg/kg,定量限(S/N=10)为 15 ~ 30 μg/kg,添加回收率为 65.3% ~ 99.6% (n=5),相对标准偏差小于 15%。该方法操作简单、快速、灵敏度高,满足定性定量分析的要求。

关键词 :超声波-微波辅助提取,高效液相色谱,非甾体抗炎药,羊肉

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)11-1056-05

Simultaneous analysis of 4 non-steroidal anti-inflammatory drug residues in mutton muscle using high performance liquid chromatography assisted by ultrasonic-microwave extraction

KANG Yongfeng* , ZOU Shiwen , DUAN Wuping , LI Yan , SUN Tao

(College of Food Science and Technology , Shanghai Ocean University , Shanghai 201306 , China)

Abstract : A method for the simultaneous determination of 4 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) residues , including flunixin meglumine , meloxicam , diclofenac sodium and ketoprofen , in mutton muscle was developed using high performance liquid chromatography assisted by ultrasonic-microwave extraction. The NSAIDs were extracted with acidified ethanol and purified by a diatomite column. The subsequent analysis of NSAIDs was achieved on a Hypersil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm , 5 μm) with the mobile phase of acetonitrile-0.2% triethylamine (40:60 , v/v , pH 3.5 adjusted by phosphoric acid) at a flow rate of 0.8 mL/min at 30 °C. The detection wavelength was set at 255 nm. The 4 NSAIDs were well separated within 20 min. The correlation coefficients for 4 NSAIDs were from 0.9993 to 0.9998 with the limits of detection (LOD , S/N = 3) of 5 - 10 μg/kg and the limits of quantification (LOQ , S/N = 10) of 15 - 30 μg/kg. The recoveries were in the range of 65.3% - 99.6% with the relative standard deviations (RSDs) less than 15%. This method is simple , rapid and highly sensitive , and can meet the requirement for the qualitative and quantitative analysis.

Key words : ultrasonic-microwave assistant extraction ; high performance liquid chromatography (HPLC) ; non-steroidal anti-inflammatory drugs ; mutton muscle

* 通讯联系人 :康永锋,博士,副教授,研究方向为食品安全分析、天然产物提取与应用、食品添加剂研究与开发。E-mail : yfkang@shou.edu.cn.

基金项目 :上海市教育委员会重点学科建设项目(项目编号 :J50704)。

收稿日期 :2010-07-14

非甾体抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs ,NSAIDs)具有抗炎、抗风湿、止痛、退热和抗凝血等作用 ,是目前处方药和非处方药中应用最为广泛的药物种类之一^[1]。随着 NSAIDs 使用的增多 ,这类药物的安全问题也越来越受到关注 ,如造成胃肠道、肝脏、肾、血液和神经系统损害的不良反^[2]。特别是近几年默沙东公司主动从全球市场撤回万络(罗非昔布)和美国食品药品监督管理局(FDA)要求 NSAIDs 药品生产厂家在其说明书中提出警示 ,更使 NSAIDs 的安全用药成为目前的热点问题^[3]。

羊肉营养价值高 ,纤维细嫩 ,其所含的主要氨基酸的种类和数量能完全满足人体的需要。因此 ,随着社会经济的发展 ,人们出于饮食营养和健康的考虑 ,肉食类食品结构也逐渐从快速生产的鸡肉、猪肉转向味美、质优、安全、保健的牛羊肉。根据国家肉羊产业技术研发中心调查 ,我国已是羊肉生产和消费大国 ,羊肉生产已成为我国畜牧业发展的支柱产业。而 NSAIDs 作为一类兽药 ,在牛羊养殖中应用广泛 ,而且据报道 ,由于 NSAIDs 具有抗凝血的作用 ,一些不法商贩在肉中掺合 NSAIDs 以保持肉质鲜嫩^[4]。因此 ,羊肉中 NSAIDs 兽药残留的检测问题显得尤为重要。

目前国内针对非甾体抗炎药物的检测方法主要是参照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准(SN/T 2190-2008)以及欧盟标准(2002/657/EC) ,还没有制定相应的国家标准 ,也没有羊肉中 NSAIDs 兽药残留的检测方法 ,所以对羊肉中 NSAIDs 残留的检测进行研究很有必要。

氟尼辛葡甲胺、美洛昔康、双氯芬酸钠和酮洛芬是使用较广的几种非甾体抗炎药物^[5]。根据国内外报道 ,目前对这 4 种 NSAIDs 的检测方法主要有气相色谱法^[6]、气相色谱-质谱联用法^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8]、高效液相色谱-质谱联用法^[9-11]、毛细管电泳法^[12]等。这些方法大多数针对药片制剂、水体、牛奶、血液中 NSAIDs 的测定。羊肉中 NSAIDs 残留的检测方法还未见报道。

采用气相色谱法进行分析时 ,样品需要进行柱前衍生反应 ,步骤烦琐 ,而气相色谱-质谱联用法、高效液相色谱-质谱联用法所需要的仪器价格高 ,配置不易 ,并且需要专人操作。另外 ,这些分析方法大多采用常规的样品前处理方法 ,自动化程度不高 ,并且主要使用乙腈等作提取剂 ,溶剂使用量较多、毒性较大 ,实验废弃物对环境污染较重 ,且操作时间长 ,成本高^[13]。超声波-微波辅助提取是近年来发展起来的提取天然产物和药物残留的方法 ,具有溶剂用量

较少、提取时间短、提取效率高和操作简单的优点 ,已得到大量的应用^[14,15]。本文对样品的前处理方法进行了改进 ,建立了超声波-微波辅助提取-高效液相色谱同时检测羊肉组织中上述 4 种 NSAIDs 残留的分析方法 ,方法的检出限、精密密度、回收率等结果均令人满意。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

Waters e2695 高效液相色谱仪 ,配备四联梯度泵 ,2998 二极管阵列检测器 ,Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司) ;Mettler AE240 型分析天平(梅特勒-托利多公司) ; μ H-300A 祥鹄电脑微波超声波组合合成/萃取仪(北京祥鹄科技有限公司) ;PT3100D 均质器(桑翌技术(北京)有限公司) ;RE-52AA 旋转蒸发仪(上海雅荣生化设备仪器有限公司) ;H-2050R-1 高速冷冻离心机(湘仪离心机仪器有限公司)。

氟尼辛葡甲胺、美洛昔康、双氯芬酸钠、酮洛芬标准品 ,纯度大于 99% ,购于中国药品生物制品检定所 ;乙腈、甲醇为色谱纯 ,无水乙醇、正己烷、甲酸、无水硫酸钠(650 ℃ 下干燥 4 h)、三乙胺、磷酸为分析纯 ,Florisil 硅藻土填料(100 ~ 200 目 ,上海化学试剂采购供应站试剂厂) ,实验用水均为去离子水。

羊肉购于家乐福超市。

1.2 分析方法

1.2.1 溶液的配制

标准储备液用乙腈配制 ,美洛昔康、双氯芬酸钠、酮洛芬和氟尼辛葡甲胺质量浓度分别为 150、40、130 和 180 mg/L ,于 2 ~ 8 ℃ 下避光保存。

标准工作液用 0.2% 三乙胺水溶液(用磷酸调节 pH 3.5)稀释标准储备液得到 ,现用现配。

1.2.2 样品处理

取适量的羊肌肉组织 ,去除脂质和结缔部分 ,以 12 000 r/min 的转速匀浆 2 min。准确称取 5.0 g 匀浆后的羊肉组织 ,置于 30 mL 离心管中 ,加入 2.0 g 无水硫酸钠和 15 mL 乙醇-磷酸(200:1 ,v/v)溶液 ,超声波-微波辅助提取(超声波、微波同时作用 ,功率均为 500 W)10 min 后 ,以 10 000 r/min 转速离心 10 min ,移取上层清液于 100 mL 的圆底烧瓶中。残留物中加入 15 mL 乙醇-磷酸(200:1 ,v/v)后在相同的条件下再提取 1 遍。合并上层清液 ,旋转蒸发浓缩至近干。残留物用 1 mL 乙腈溶解 ,移至 10 mL 分液漏斗中 ;再分别用 1 mL 乙腈清洗烧瓶 2 次 ,并将其倒入分液漏斗中。在溶解液中加入

3 mL 乙腈饱和的正己烷,漩涡振荡 5 min,静置 20 min,取下层清液备用。

在 10 cm × 0.8 cm 玻璃柱管底部填充少许玻璃棉,压紧,再依次填装无水硫酸钠 1 g、Florisil 硅藻土 2 g、无水硫酸钠 1 g,用 10 mL 甲醇淋洗,然后将下层清液上柱,用 5 mL 甲醇洗脱,流速为 2 mL/min。洗脱液用氮气吹干,用乙腈溶解并定容至 1 mL,以 10 000 r/min 转速离心 10 min,取上层清液过 0.22 μm 滤膜,滤液供 HPLC 检测。

1.2.3 色谱条件

色谱柱为大连依利特公司的 Hypersil ODS2 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-0.2% 三乙胺水溶液(40:60, v/v, 用磷酸调节 pH 3.5);流速为 0.8 mL/min;紫外检测波长为 255

nm;柱温为 30 °C;进样量为 20 μL。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的筛选

常用于从动物组织中提取非甾体抗炎药的提取溶剂有乙腈、甲醇、乙醇、乙酸乙酯-磷酸、乙酸等。酮洛芬、美洛昔康和氟尼辛葡甲胺含有羟基、氨基和羧基,双氯芬酸钠为酸性盐,极性较大,容易溶于酸性提取液中。考察了采用加入不同比例磷酸化溶剂乙腈、甲醇、乙醇进行提取的提取回收率,结果见表 1。综合考虑,乙腈、甲醇的毒性较大,乙醇较为合适;而且乙醇-磷酸(200:1, v/v)与乙腈-磷酸(100:1, v/v)的提取效果相当,故本实验选乙醇-磷酸(200:1, v/v)为提取溶剂。

表 1 不同酸化溶剂对 4 种目标物的提取回收率

Table 1 Extraction recoveries of four analytes by different acidified solvents

Solvent	Solvent: phosphoric acid (v/v)	Extraction recovery/%			
		Meloxicam	Flunixin meglumine	Ketoprofen	Diclofenac sodium
Acetonitrile	1000:1	84.5	77.3	83.4	66.3
	200:1	84.9	80.3	86.2	60.4
	100:1	89.2	87.7	88.6	63.9
	50:1	80.5	86.6	83.2	50.6
Ethanol	1000:1	83.5	80.4	83.8	63.4
	200:1	84.4	88.9	84.4	62.3
	100:1	78.8	89.4	85.4	53.5
	50:1	77.6	70.3	79.3	52.4
Methanol	1000:1	80.3	76.3	70.8	54.2
	200:1	74.9	73.3	74.5	51.8
	100:1	76.5	67.3	73.5	45.2
	50:1	71.8	83.0	83.8	43.5

2.2 提取条件的优化

目前大多数分析方法采用振荡提取,但这种提取方式耗时长,效率较低。超声波-微波提取方法具有效率高、溶剂用量少和提取时间短等特点。本文考察了微波辅助提取、超声波辅助提取、超声波-微波辅助提取、漩涡振荡等提取方法对 4 种目标物回

收率的影响,结果见表 2。从表 2 中可以看出超声波-微波辅助提取(500 W + 500 W)的提取效果较好。

2.3 净化条件的确定

通过超声波-微波的作用,羊肉组织细胞破碎,释放出大量的极性(如氨基酸类)和非极性(如脂

表 2 不同提取方法对 4 种目标物的提取回收率

Table 2 Extraction recoveries of four analytes by different extraction methods

Extraction method	Power/W	Extraction recovery/%			
		Meloxicam	Flunixin meglumine	Ketoprofen	Diclofenac sodium
Ultrasonic	400	73.4	78.3	92.3	63.2
	500	89.3	79.5	87.6	50.3
	600	83.5	82.9	95.5	68.2
Microwave	400	84.0	75.4	82.8	60.3
	500	83.3	83.5	84.3	72.3
	600	80.5	84.8	87.3	68.3
Ultrasonic-microwave	400 + 400	89.7	80.3	83.4	70.7
	500 + 500	85.3	85.4	99.6	69.1
	600 + 600	84.2	83.4	93.5	63.4
Vortex turbulence	100	70.3	82.3	85.3	40.4

类)杂质,因此,本文采用在酸化的乙醇提取液中加入正己烷进行萃取,以除去提取液中的脂质。考察了采用 C₁₈ 固相萃取(SPE)柱净化的效果。结果发现,虽然杂质减少了,但目标化合物的回收率也大大降低。采用 SN/T 2190-2008 标准方法进行提取和净化,结果也不理想。因此本实验又分别考察了以氧化铝、硅胶、硅藻土为填料的色谱柱(填料高度为 2.5 cm,用甲醇活化)的净化效果,结果表明硅藻土柱能较好地分离目标物。故本文选择采用硅藻土柱净化样品。

2.4 色谱条件的优化

本文所测定的 4 种非甾体抗炎药物结构式中同时含有羧基和氨基,属于两性化合物,采用文献[13]报道的乙腈-0.1% 甲酸(含 0.5 mmol/L 乙酸铵)为流动相会导致峰形较宽。本文经过实验优化,选择乙腈-0.2% 三乙胺水溶液(40:60, v/v,用磷酸调节 pH 3.5)作为流动相。流动相中加入三乙胺能消除色谱柱填料表面硅羟基的作用,改善了 4 种 NSAIDs 的峰形。通过二极管阵列检测器全波段扫描,得到美洛昔康、氟尼辛葡甲胺、双氯芬酸钠和酮洛芬的最大吸收波长分别为 355、253、276 和 255 nm。为了使干扰峰影响最小,本文选择 255 nm 作为检测波长。在优化的色谱条件下,4 种非甾体抗炎药物在 20 min 内能得到很好的分离。羊肉组织空白样品和空白加标样品的色谱图分别见图 1 和图 2,4 种非甾体抗炎药物标准品的谱图见图 3。由图 1、图 2 所示,空白样品和空白加标样品的杂质峰相似度不高,可能的原因一是对于动物肌肉组织进行兽药农残检测,本身样品基质比较复杂,干扰物多,难于处理干净;二是本研究采用超声波-微波辅助提取,由于超声波-微波具有催化化学反应的作用,而

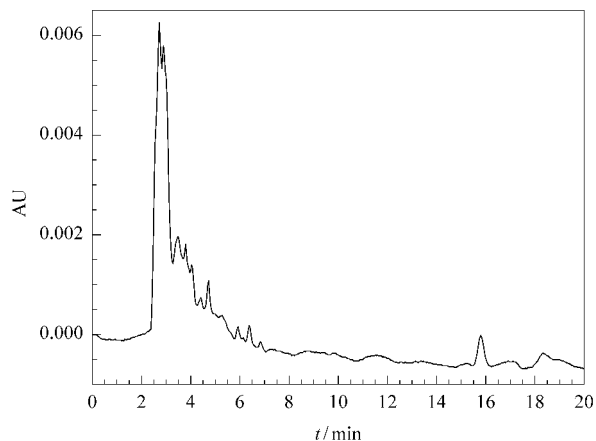


图 1 空白羊肉组织提取液的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a blank mutton muscle sample

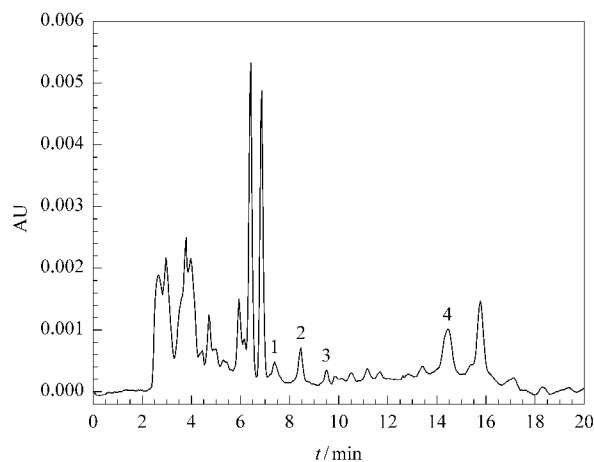


图 2 空白羊肉组织中添加 4 种 NSAIDs 的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of mutton muscle sample spiked with four NSAIDs

1. ketoprofen (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 2. meloxicam (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 3. flunixin meglumine (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$); 4. diclofenac sodium (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

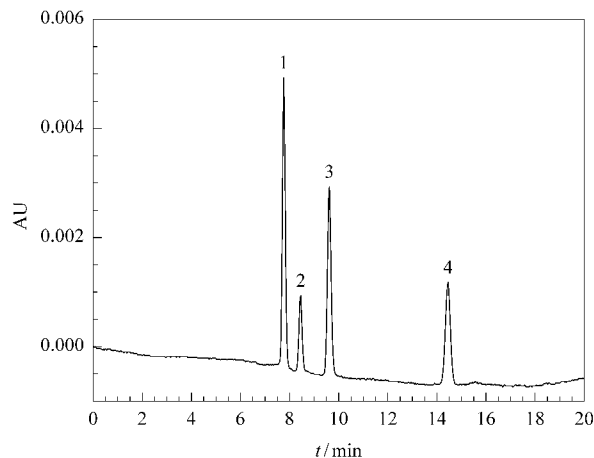


图 3 4 种非甾体抗炎药物混合标准溶液的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a mixed standard solution of four NSAIDs

1. ketoprofen; 2. meloxicam; 3. flunixin meglumine; 4. diclofenac sodium.

非甾体抗炎药物结构式中含有羧基和氨基,属于两性化合物,当在羊肌肉组织中加入非甾体抗炎药物时,非甾体抗炎药物在超声波-微波作用时可能起催化作用,使羊肌肉组织中更多的物质降解或释放出来,造成两个谱图干扰峰不一致。但干扰峰基本未对 4 种非甾体抗炎药物峰造成影响,因此不影响分析结果的可靠性。

2.5 标准曲线的制作

配制系列浓度的标准溶液并分别进行测定,以峰面积(y)对药物质量浓度(x , mg/L)作线性回归,得到的线性关系见表 3。从表 3 可以看出 4 种 NSAIDs 的相关系数都达到了 0.999 以上,具有很好的线性相关性。

表 3 4 种非甾体抗炎药物的线性回归方程、线性范围和相关系数
Table 3 Regression equations, linear ranges and correlation coefficients (r^2) for 4 NSAIDs

Compound	Regression equation	Linear range/ (mg/L)	r^2
Meloxicam	$y = 93015x - 4472$	0.01 - 10	0.9996
Flunixin meglumine	$y = 31372x + 253.1$	0.01 - 1	0.9998
Diclofenac sodium	$y = 55946x - 15810$	0.02 - 20	0.9993
Ketoprofen	$y = 68937x + 493.5$	0.01 - 4	0.9999

y : peak area; x : mass concentration, mg/L.

2.6 检出限和定量限

在匀浆后的羊肉组织空白样品中添加一定量的标准溶液,按样品前处理方法做 5 次平行实验并进行 HPLC 分析。以信噪比(S/N)为 3 计,美洛昔康、氟尼辛葡甲胺、酮洛芬和双氯芬酸钠的检出限依次为 5、5、5 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$;以 $S/N = 10$ 计,上述 4 种 NSAIDs 的定量限依次为 15、15、15 和 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.7 回收率和精密度

称取匀浆后的羊肉组织 5.0 g,分别添加 3 个浓度水平的 4 种 NSAIDs 混合标准溶液。按实验方法进行提取、净化和检测,测定回收率;每个添加水平 1 d 内重复测定 5 次,计算日内精密度;每个添加水平 5 d 内重复测定 5 次,计算日间精密度,结果见表 4。从表 4 中可以看出 4 种 NSAIDs 的平均回收率为 65.3%~99.6%,日内相对标准偏差(RSD)小于 10%,日间 RSD 小于 15%。这表明该方法的回收率和精密度较好,能满足农残分析的要求。

表 4 羊肉中 4 种 NSAIDs 的添加回收率和日内、日间相对标准偏差(RSD)($n = 5$)

Table 4 Recoveries, intra-day and inter-day relative standard deviations (RSD) of four NSAIDs spiked in a mutton muscle sample ($n = 5$)

Compound	Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/ %	RSD/%	
			Intra-day	Inter-day
Meloxicam	25	87.3	7.3	13.7
	50	84.8	9.8	11.8
	100	85.6	7.6	9.8
Flunixin meglumine	25	89.4	9.4	12.8
	50	93.5	4.9	14.3
	100	95.6	8.3	14.3
Ketoprofen	25	94.7	5.4	9.6
	50	97.8	8.3	12.2
	100	99.6	3.6	6.8
Diclofenac sodium	50	60.7	8.2	13.7
	100	62.8	7.8	11.5
	200	65.3	4.6	9.4

3 结论

建立了同时检测羊肉组织中美洛昔康、氟尼辛葡甲胺、酮洛芬和双氯芬酸钠 4 种非甾体抗炎药物的方法,其检出限低,线性范围宽,回收率和精密度均满足检测要求。该方法可用于羊肉中上述 4 种非甾体抗炎药物残留量的检测分析,亦可为我国动物源性食品中兽药残留检测提供参考。

参考文献:

- [1] Liu W Q. Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China (刘文强. 西南国防医药), 2008, 18(3): 460
- [2] Jiang H F, Fu Q. Journal of Shenyang Medical College (江海峰, 傅强. 沈阳医学院学报), 2008, 10(4): 246
- [3] She Q S. Jiangsu Pharmaceutical and Clinical Research (余庆生. 江苏药学与临床研究), 2005, 13(5): 11
- [4] Fiori M, Farne M, Civitareale C, et al. Chromatographia, 2004, 60: 253
- [5] Xing Y, Liang J H. Evaluation and Analysis of Drug-Use in Hospitals of China (邢颖, 梁健华. 中国医院用药评价与分析), 2009, 9(1): 41
- [6] Yao R X, Xu Q Q, Du L M, et al. Journal of Analytical Science (姚如心, 许庆琴, 杜黎明, 等. 分析科学学报), 2007, 23(3): 1006
- [7] Kosjek T, Heath E, Krbavcic A. Environment International, 2005, 31: 679
- [8] Xiong H, Xie F Y. Modern Medicine Journal of China (熊海, 谢风云. 中国现代医药杂志), 2006, 8(6): 16
- [9] Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Olejnik M. Anal Chim Acta, 2008, 637: 346
- [10] Igualada C, Moragues F, Pitarch J. Anal Chim Acta, 2007, 586: 432
- [11] Grujić S, Vasiljević T, Laušević M. J Chromatogr A, 2009, 1216: 4989
- [12] Cherkaoui S, Veuthey J. J Chromatogr A, 2000, 848: 121
- [13] Peng T, Yu J, Yan M, et al. Chinese Journal of Analytical Chemistry (彭涛, 于静, 严矛, 等. 分析化学), 2009, 37(3): 363
- [14] Zhang L P, Song D W, Ma Z S. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (张丽萍, 宋大巍, 马中苏. 农业工程学报), 2010, 26(5): 379
- [15] Zhang F, Zhou F, Wang G H, et al. Spectroscopy and Spectral Analysis (张帆, 周峰, 王桂花, 等. 光谱学与光谱分析), 2008, 28(7): 1633