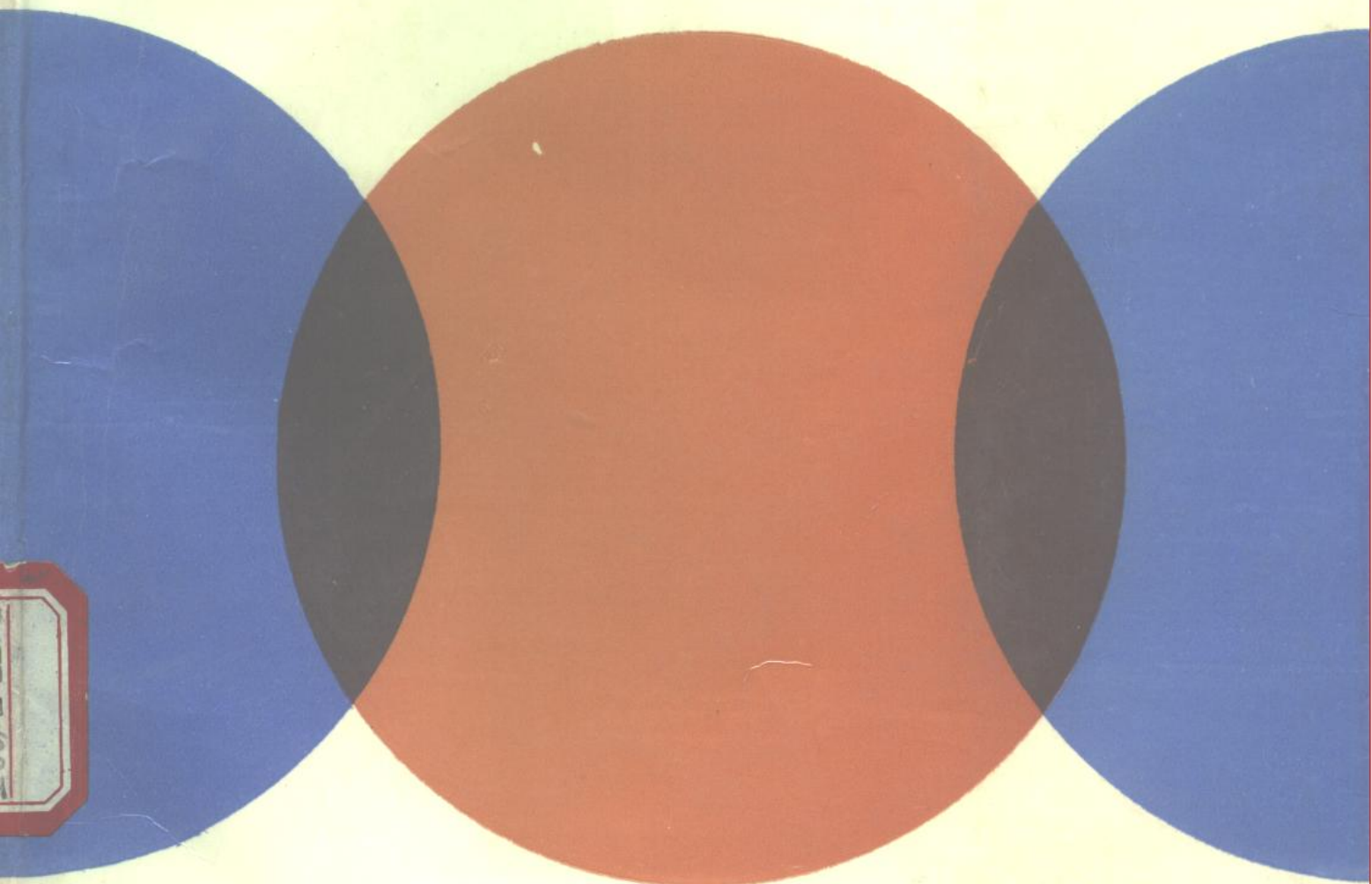


兽药残留量分析方法

上海进出口商品检验局 译

上海科学普及出版社



兽药残留量分析方法

上海进出口商品检验局 译

上海科学普及出版社

(沪)新登字第 305 号

责任编辑 夏龙年

ILS/15

兽药残留量分析方法

上海进出口商品检验局译
上海科学普及出版社出版
(上海曹杨路 500 号 邮政编码 200063)

新华书店上海发行所发行 上海长鹰印刷厂印刷

浙江上虞科技外文印刷厂排版

开本 787×1092 1/16 印张 13.25 字数 320,000

1992 年 11 月第 1 版 1992 年 11 月第 1 次印刷

印数 1—1160

ISBN 7-5427-0642-X/R·43 定价: 20.00 元

译 序

本书主要是一本分析方法手册,分析方法的对象主要是对各种供食用动物组织中兽药残留量、以及动物饲料中兽药含量的测定。原文名《Animal Drug Analytical Manual》,为使译文的书名与内容更趋一致,我们在译文的书名中加上“残留量”,以方便读者。

这些残留量检验方法都是目前美国官方机构“美国卫生和健康服务部”(U.S. Department of Health and Human Services)所属食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)兽医药剂中心(Center for Veterinary Medicine)所采用和制定的法定方法,都经协同试验、确证和确认试验后认为可靠和实用的方法。美国食品药品监督管理局在国际上有一定权威性,它所采用和制定的方法也常被某些国家所接受。

日前国际上对食品的安全卫生要求愈来愈高,不仅对农药残留量有严格的规定,对兽药残留量也有很高的要求。为此,国际上对食品都加强了检验,而可靠、实用的检验方法就显得非常重要。目前我国每年有大量食品出口,为使适应输入国要求,在出口前必需加强检验,就对国内消费的食品来说也在加强安全卫生检验。本书所提供的检验方法很有参考价值。

本书可供广大食品检验人员,尤对从事与进出口食品有关的检验人员、食品科研人员和有关院校师生参考。

译 者

《兽药残留量分析方法》

主 审 钱 毅
副 主 审 赵国君
吴传熙 赵国君 钱 毅 译
程逢治 葛秀丽 严家辉

前 言

食品药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)负责管制用于动物的药物。这些药物可用于玩赏动物(猫和狗)、供食用动物(牛、羊、猪、鸡、火鸡、鱼),动物园中动物和其他次要种类的动物(海狸、兔子、鸟类等)。

食品药物管理局所属的“兽医药剂中心”(Center for Veterinary Medicine)负责保证兽药的合理和安全使用。在批准一种药物可用于某种动物前,需要由药物保证人提供一份证实该药物安全和效用的综合报告。

作为审批程序的一个部分,申请人必须提供该药物供市售药剂及在动物组织和器官内残留量的检测和测定分析方法。对前者,方法的制定是为了产品在生产时的品质控制,以及药物制品进入市场后的监控管理目的。为管理目的的方法,对监控药物制品并保证其符合标准是必须的。为检测药物在动物器官和/或组织内残留量的方法,仅对供食用动物是必须的。属食品加工种类的动物是提供人类食品的主要来源(肉和肉副产品)。

本手册虽称作《兽药分析手册》,但所列方法仅用于检测动物组织内药物残留量和测定含药混合料及成品饲料(药物转移到动物体内的媒介物)中的药物量。目前不打算包括,除含药饲料制品外的,成品药剂的测定方法。

目前对动物组织和器官中药物残留量及含药饲料产品的法定分析方法仅来自1973年版的《食品添加剂分析手册》(Food Additives Analytical Manual, FAAM),该手册可从“公开听取意见员”(Public Hearing Clerk)办事处(FDA 的文件管理办事处)查到。1973年版FAAM原系食品添加剂方法。当《兽药分析手册》中包含有FAAM所列的方法后,FAAM中的就无效了。“公开听取意见员”办事处将继续保留使用有效的方法文本。

提供确认的方法是FDA意图。然而,手册中有很多方法被批准可使用是在机构确认概念开始之前。不管怎样,所列方法均被认为对指定的药物和含药产品是最好的方法。这些方法被认为是法定的和可采纳使用的。当更多新方法被开发和行之有效时,它们将被收集进手册中去。

方法的确认是通过对申请者提供的方法操作进行验证来完成的。确认的实现是通过一个已建立起来的体系,它包括一些政府机构对动物体内的药物残留量的监控和实施合适的法律。这些政府机构包括“食品药物管理局”和“美利坚合众国农业部”(United States Department of Agriculture, USDA)。USDA负责对日常供应的动物和肉的监控,FDA负责对报给他们的残留量结果的确证,并对违反规定者进行起诉。

这些经过正常确认的方法将包括一份合适的确认资料的总结或参考文献的来源。确认也可通过AOAC协同试验来完成。这种AOAC协同试验是药物发起人或申请人的义务。经过这种试验的任何方法均标明恰当的依据。

除所提供的新兽药所需的方法以外,手册还包括从其他杂志或手册中可找到的合适方法的参考文献。但分析者在应用和评价后面这些方法时必须小心谨慎。使用责任依赖于个人对被试产品所用方法的可靠性的判断上。

导 言

食品药物管理局(Food and Drug Administration, 简称FDA)的主要目标之一是,在和美国的其它机构合作下,建立和保持对国家食品供应的广泛监视和评估,以保证不含不安全的兽药残留和它们的代谢物。为达此目的,被各实验室所采用的具有最好再现性和准确度的统一的化学方法是很重要的,这样方可精确地提供分析结果的报告。使用合适的分析方法也能提供有用的资料供需要时有可能作条例上的修改。

《兽药分析手册》的编制同时提供了操作步骤和方法,这些步骤和方法被认为是法定的、用作对肉、肉副产品、奶和饲料样品进行规定的检查,以决定是否符合“美国食品、药物和化妆品法规”(U.S. Food, Drug and Cosmetic ACT)。

本手册只包括对食用动物作医疗用药物的方法。这些方法用来测定从食用动物的组织和器官样品中、以及含药动物饲料制品(混合料、粗料、全饲料等,通过它们使药物转入动物体内)中存在的药物残留量。

本手册的内容主要限于那些被批准可使用的药物,即由“美国食品、药物和化妆品法规”512节所批准并列入“美国联邦法规”(Code of Federal Regulations)标题21,副章E,篇目500中者。

本手册所制定的方法是按“食品、药物和化妆品法规”512节审批新兽药申请时所需要而提交给食品药物管理局的。每一方法都列出了对该特定药物的相应的CFR参考资料。这些方法被认为是可接受的主要执行方法,或称“法定方法”。其他操作方法也可能被用来测定药物。但使用后者应由分析者负责。当被试样品不能用主要的或法定的方法来分析时,可采用这些方法。

列于本手册中的有的操作步骤和参考文献尚未经“公职分析化学家协会”(Association of Official Analytical Chemists)进行足以达到可接受程度的协同研究和试验。凡是这样的方法被采纳和使用均作为选用方法。这些方法在AOAC“公认分析方法”的现行版本或合适的版本中都提及。

按食品药物管理局(经三个政府实验室成功地测定过)或AOAC要求,在任何一种情况下,对方法的确认都适当地加以标明。

当需要和可能时,也提供确证方法,特别对动物组织和器官。

本手册是为药物残留量分析有经验的分析者使用而制定的。有经验的分析者必须注意到干扰因素,并认识到,对所有偏离操作方法的结果作出确证试验的必要性。

为强制执行目的而对方法所作的改变,当它们成为可采用时,手册将采用之。

本新手册的导言仅包括八种化合物的方法。FDA的意图是从1973年版本的“食品添加剂分析手册”(Food Additives Analytical Manual)(不再出版)中,将有关兽药方法分出来并将它们列入本手册中。当另有方法被制定和更新时,手册的持有者将会得到它们。

如有意见和建议,请通知出版者以便转交给代理处。

列于本手册中的方法无版权问题,因此可随意复制。

目 录

卡巴氧(Carbadox)

一、简介	1
二、方法	2
三、组织	3
I. 猪肝中卡巴氧残留量的电子俘获-GC 测定法:定量和确证操作方法	3
II. 猪组织中卡巴氧残留量的法定的电子俘获-GC测定法	16
四、饲料	21
I. 饲料中卡巴氧的比色测定法	21
II. 猪饲料中卡巴氧的分光光度测定法	24
III. 饲料和固定饲料物料中卡巴氧的 HPLC 测定法	29

己烯雌酚(Diethylstilbestrol)

一、简介	33
二、方法	33
三、组织	34
I. 牛组织中 DES 残留量的电子俘获-GC 测定法	34
四、饲料	43
I. 饲料中 DES 的分光光度测定法	43
II. 饲料中 DES 的 GC 测定法	48
III. 饲料中 DES 的 TLC 鉴定法	52

拉沙里菌素(Lasalocid)

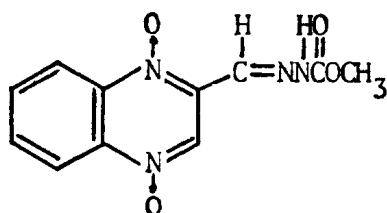
一、简介	55
二、方法	56
三、组织	57
I. 牛肝中拉沙里菌素残留量的 HPLC 法定量和 GC/MS 法确证	57
II. 鸡组织中拉沙里菌素残留量的 TLC-生物自显影测定法	71
四、饲料	79
I. 饲料中拉沙里菌素的微生物测定法	79
II. 饲料中拉沙里菌素的分光荧光测定法	86

乙酸甲烯雌醇(Melengestrol Acetate)

一、简介	91
二、方法	92
三、组织	92
I. 电子俘获-气相色谱法测定牛组织中残留的 MGA, 气相色谱/质谱法 (GC/MS)进行鉴定	92

酒石酸甲噻吩嘧啶(Morantel Tartrate)	
一、简介	103
二、方法	104
三、组织	105
I. 牛肝中酒石酸甲噻吩嘧啶残留量的电子俘获-GC 测定法	105
II. 牛肝中酒石酸甲噻吩嘧啶残留量的 GC/MS 鉴定和确证法	118
尼卡巴嗪(Nicarbazin)	
一、简介	128
二、方法	128
三、组织	129
I. 鸡组织中尼卡巴嗪残留量的极谱测定法	129
四、饲料	136
I. 动物饲料中尼卡巴嗪的液相色谱测定法	136
酒石酸噻嘧啶(Pyrantel Tartrate)	
一、简介	139
二、方法	140
三、组织	140
I. 猪组织中酒石酸噻嘧啶残留量的电子俘获-GC 测定法	140
II. 猪肝中酒石酸噻嘧啶残留量的 GC/MS 鉴定和确证法	153
四、饲料	159
1. 饲料中酒石酸噻嘧啶的分光光度测定法	159
磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine)	
一、简介	162
二、方法	163
三、组织	164
I. 猪和牛组织中磺胺二甲嘧啶残留量的 GC 测定法	164
II. 猪组织中磺胺二甲嘧啶残留量的 GC/MS 测定法	176
四、饲料	187
I. 饲料中磺胺药物的测定	187
附 1 缩写词的说明	197
附 2 仪器和试剂来源的单位通讯录	201

卡巴氧(Carbadox) *



化学文摘名: 2-(2-喹喔啉基-亚甲基)肼羧酸甲酯-N', N'-二氧化物[2-(2-quinoxaliny-methylene) hydrazine-carboxylic acid methyl ester N', N'-dioxide]

化学文摘登记号: 6804-07-5

成分式: $C_{11}H_{10}N_4O_4$

分子量: 262.23

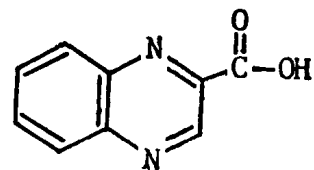
又名: 甲基-3-(2-喹喔啉基-亚甲基) 肼基甲酸酯-N', N'-二氧化物 [methyl 3-(2-quinoxaliny-methylene) Carbazate-N', N'-dioxide]; Mecadox

一、简介

概要:

对标记 ^{14}C 的卡巴氧的放射示踪代谢研究和化学测定衰减研究, 表明本药物迅速代谢变化成好几种化合物, 大多数在剂量给药后仅存在几小时。在主要的能鉴定的代谢物中, QCA(quinoxaline-2-carboxylic acid)的简称)、即喹喔啉-2-羧酸在组织中比其他代谢物持续较长, 并比最初代谢物相当地更长。放射示踪代谢研究也表明在组织中, 有关卡巴氧的残留量在肝脏中比在肾脏中更高, 在肌肉中相当地低, 在脂肪中不存在。化学测定衰减研究也表明, 猪在停止给卡巴氧药剂这天宰杀, 在肌肉中 QCA 残留量小于 30 ppb。

卡巴氧在组织中残留量的法定测定法是测定喹喔啉-2-羧酸。组织中如不存在这种代谢物就可确信不存在代谢产物的母体、即药物和它的最初代谢物。因而, 规定要求组织中不应存在有关药物的残留量, 用法定测定法测定, 是可实施的。既然代谢物残留量在肝脏中比在其他组织中更高和



喹喔啉-2-羧酸

“QCA”或CP-16,505

* 译者注: Carbadox 又名 Mecadox; 中文名又名痢立清。

更持久,化学分析该组织足可检测药物是否滥用。在猪的组织中条例管制水平为 30 PPb。

下述测定法中方法 I 比法定测定法少花时间,它采用与 GC 测定法和 GC/MS 确证法相同的净化操作。根据 FDA 实验室所作评价,认为该方法优于法定方法。法定方法 (21 CFR 556.100)在下面被列为方法 II。

用途: 21 CFR 558.115

卡巴氧被批准使用于猪饲料中,作为控制疾病(猪痢疾和猪肠炎)的助剂,和生长促进剂及饲料增效剂。

本药物于 1976 年 3 月 15 日被批准使用。

含量限度: 21 CFR 558.115

成品饲料:标示量的 75—125%。

容许量: 21 CFR 556.100

在猪的未煮过的食用组织中不允许存在本药物或它的代谢物(喹喔啉-2-羧酸)的残留量。

二、方 法

组织:

- I. 猪肝中卡巴氧残留量的电子俘获—GC测定法:定量和确证操作方法。
- II. 猪组织中卡巴氧的法定的电子俘获 —GC 测定法。

饲料:

- I. 饲料中卡巴氧的比色测定法。
- II. 猪饲料中卡巴氧的分光光度测定法。
- III. 饲料和固定饲料物料中卡巴氧的 HPLC 测定法。

三、组 织

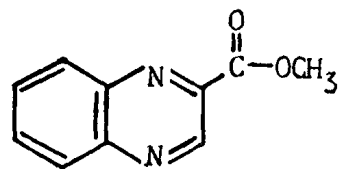
I. 猪肝中卡巴氧残留量的电子俘获—GC 测定法： 定量和确证操作方法

A. 范围

在猪肝中卡巴氧残留量以喹喔啉-2-羧酸(QCA)测定之。

B. 原理

用碱水解法将喹喔啉-2-羧酸(QCA)从猪肝中分离出来,接着用乙酸乙酯抽提并用 pH 6 缓冲液反抽提,用离子排斥色谱法分离。用氯仿抽提柱洗脱液,浓缩提取液,用甲醇化的硫酸使 QCA 衍生化,所得甲酯衍生物(CP-25, 536 或 QME)经再抽提后用电子俘获气相色谱法测定。QCA 残留物的确证用气相色谱-质谱分析法(单离子检测法)来完成。图 1 为测定方法的流程图。



喹喔啉-2-羧酸甲酯
“QME”或CP-25,536

操 作	步 骤
测定操作方法:	于 5.0 g 组织中加 10 ml 3 M NaOH 于 100℃ 加热 30 分钟。冷却,用 4 ml 浓 HCl 酸化(pH ≤ 1)。
1. 于碱中水解组织使放出 QCA	
↓	
2. 继用乙酸乙酯抽提使从水解液中回收 QCA	用 3×15 ml 乙酸乙酯抽提水解产物,弃去水相,从有机层中用 2×5 ml 0.5 M pH 6.0 缓冲液反抽提。
↓	
3. 用离子排斥色谱法分离 QCA 并浓缩洗脱液的氯仿提取液	用 2 ml 浓 HCl 酸化水提出液(pH ≤ 1),冷却并加入 AGMP-50 树脂中,用 40 ml 1N HCl 洗涤树脂,弃去流出液,然后用 75 ml 10% 甲醇水溶液洗脱 QCA。用浓 HCl 酸化洗脱液(pH ≤ 1),并用 3×50 ml 氯仿抽提。蒸发提出液至干。
↓	
4. 用甲醇化硫酸进行酯化,用苯抽提以回收 QME 衍生物	将残渣和 QCA 标准用 0.2 ml 甲醇化硫酸(97:3)于 55℃ 酯化 30 分钟。加 1 ml 苯,充分混和,加 1 ml 水。
↓	
5. 用 GC-ECD 测定 QME 的浓度	稀释苯抽提液(1:10),并用装备有电子俘获检测器和 1 根 3% Silar 10C 柱子(1.8m×4mm)(于 205℃)的 GC 进行测定。
确证操作方法:	注射整分部分的标准和样品于 GC/EI—质谱仪的 3% Silar 10C 柱子(1m×2mm)中,于 200℃,顺序聚焦于 m/z = 130, 158 和 188。
用气相色谱—电子碰撞电离质谱单离子检测法测定试样	简单地比较样品和标准的峰高,以计算肝中 CP-25-536 (QME)于 m/z = 130, 158 和 188 时的离子比。

图 1 猪组织中喹喔啉-2-羧酸(QCA)的测定和确证方法示意图

C. 可靠测定的限量

方法对条例管制水平 30 ppb 的加药肝样已验证过。

D. 仪器

(在本节及以后章节中提到的市售仪器和化学品仅为描述之用,并不构成食品药物管理局或任何美国政府机构对该产品或其来源的认可或推荐;其他相当的产品均可代用。)

有 ^{63}Ni 电子俘获检测器、用作离柱注射的玻璃注射口套管及 0—1 mV 记录仪。当氮气流通过柱子及检测器时,检测器的电压应稳定在 30 伏,或是 DC 形式的可低一些。

GC 隔膜,耐高温硅酮,Teflon(聚四氟乙烯)贴面(Pierce Chemical Co.)。

离心机,国际尺寸 2, Model K。

水浴,室温下能达 100℃,精密型(Thelco, Model 83)。

吸移管,一次性的, Pasteur 型。

吸移管,自动吸移,15 ml 和 50 ml。

吸移管,有刻度的,5 ml。

吸移管,容量的,1.0 ml 和 10.0 ml。

吸移管,精密的,0.1ml 和 0.2 ml(Medical Laboratory Automation, Inc.)。

离心管,厚壁的,50 ml 刻度(60ml 容积)具有玻璃塞(R.C.Ewald, Inc.)。

容量瓶,1, 100 和 1000 ml 容积,具有玻璃塞。

色谱柱,25 cm×10.5 mm 内径,具有 Teflon 活塞和 200 ml 储蓄容量(S.G.A. Scientific, Inc., Cat. No. JC-1506)。

结晶皿,190 mm(直径)100 mm(高),油浴上用。

圆底烧瓶,单颈,250 ml 容积。

试管架。

试管混和器。

分液漏斗,60 和 250 ml 容积,具有 Teflon 活塞。

旋转式蒸发器。

热搅拌加热板。

磁性搅拌棒。

温度计,0—150℃ 范围。

电天平, Cahn, Model G-2。

E. 试剂及溶液:

氯仿,甲醇,A.C.S. 试剂级。(当心:氯仿蒸气有毒并可能是致癌物。在使用该溶剂时要特别当心。)

苯,乙酸乙酯,于玻璃器皿中蒸馏的等级(Burdick and Jackson Labs)。(当心:苯蒸气被认为是毒的和可能致癌的。在使用该溶剂时要特别当心。)

柠檬酸一水合物,U.S.P.。

氢氧化钠,粒状,试剂级。

硫酸钠,无水,A.C.S. 试剂级。

硅酮,SF—81(50) (General Electric)。

盐酸,硫酸,A.C.S. 试剂级。

喹喔啉-2-羧酸(CP-16,505,QCA,Pfizer,Inc.)。

喹喔啉-2-羧酸甲酯(CP-25,236,QME,Pfizer,Inc.)。

AGMP—50 树脂,100—200目(Bio-Rad Laboratories, No. 1430841)。

盐酸,1 M。用蒸馏水稀释 83.3ml 试剂级浓盐酸至 1000 ml。

甲醇-水(10:90 v/v)。用蒸馏水稀释 10.0 ml 试剂级甲醇至 100 ml。

甲醇-硫酸(97:3 v/v)。用无水 Na_2SO_4 干燥过的甲醇稀释 3.0 ml 试剂级浓 H_2SO_4 至 100 ml。当天制备。在加入酸中前将甲醇用冰浴冷却。

氢氧化钠,3 和 5 M。各溶解 120 和 200 g 粒状 NaOH 于适量水中并稀至 1000 ml。

柠檬酸,1 M。溶 21.0 g 柠檬酸一水合物于 1000 ml 蒸馏水中。

柠檬酸缓冲液,0.5 M。用 5 M 氢氧化钠(约用 55 ml)和一事先校准过的 pH 计,调节 100 ml 1 M 柠檬酸溶液至 pH 为 6.0。用蒸馏水调节终体积至 200 ml。在作最终 pH 调节前,缓冲液需冷却至室温。

喹喔啉-2-羧酸(QCA)溶液。

储备溶液A。溶 1.50 mg 喹喔啉-2-羧酸于甲醇中并用甲醇稀释至 100.0ml (浓度为 $15.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或 $15.0\text{ ng}/\mu\text{l}$)。该溶液在室温稳定一周。

标准工作液B。用蒸馏水稀释 1.00 ml 储备溶液 A 至 100.0 ml (浓度为 $0.150\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或 $150\text{ pg}/\mu\text{l}$)。按需要新鲜配制。

标准工作液C。用甲醇稀释 1.00 ml 储备溶液 A 至 100.0 ml (浓度为 $0.150\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或 $150\text{ pg}/\mu\text{l}$)。按需要新鲜配制。

喹喔啉-2-羧酸甲酯(QME)溶液。

储备溶液 1。溶 1.50 mg 喹喔啉-2-羧酸甲酯于苯中,并用苯稀至 100.0 ml (浓度为 $15.0\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或 15.0 ng/ml)。此溶液在室温下稳定。

标准工作液2。用苯稀释 0.10 ml 储备溶液 1 至 100.0 ml (浓度为 $0.015\text{ }\mu\text{g/ml}$ 或 $15\text{ pg}/\mu\text{l}$)。此溶液在室温下稳定。

F. 分析:

1. 分离步骤:

a. 溶解和水解:

取 5.0g 新切成薄片的冻组织置于 50 ml 离心管中。吸移 10.0 ml 3 M 氢氧化钠于管中,松松地加塞,将其置于已预热至 95—100°C 的硅酮油浴中,加热 30 分钟。浴中硅酮油面应高于组织试样。

b. 水解产物的抽提:

将碱性水解产物于冰浴中冷却,用 4 ml 浓 HCl 酸化至 $\text{pH} \leq 1$ (至酸碱试纸呈深红色)。于酸化的水解产物中加 15 ml 乙酸乙酯,加塞,振摇 20 秒钟以进行抽提。在 1500 rpm 下离心混合物 5 分钟,使乙酸乙酯层清晰。用一具有吸球的吹出吸移管,将乙酸乙酯提出液移入具有 Teflon 活塞的 60 ml 分液漏斗中。另用两份 15 ml 乙酸乙酯再抽提水解产物,合并有机提出液。在进行上述抽提时切勿使乙酸乙酯层中混有界面物质。

于乙酸乙酯抽提液中加入 5 ml 0.5 M 柠檬酸缓冲液(pH 为 6.0),振摇,并使上层清晰(约 10 分钟)。将水相收集于 50 ml 具有玻塞的离心管中。另用 5 ml pH 6 的缓冲液再抽提乙酸乙酯相一次。使水相清晰。合并水提出液于离心管中。加 2 ml 浓 HCl。混和。

提出液备作下述色谱分离用。

c. 离子排斥色谱分离:

(1) 柱的制备:

制备离子排斥柱如下:

将 7.0 g AGMP-50、100—200 目树脂于 1 N HCl 中调成浆,并将其移入含有一小团玻璃绒塞的 10.5 mm 内径的玻璃柱中。用一根玻璃棒将柱子装填至 4 英寸(10.1 cm)高,并用玻璃绒盖住树脂床。保持液面在树脂的上面。

(2) 试样洗脱:

将 b 节(见上)中所得酸化的水提出液移入离子排斥柱中。放出提出液使液面至树脂床顶部。用 20 ml 1 N HCl 淋洗离心管及树脂。经柱放出。另用 20 ml 1 N HCl 再淋洗柱子。弃去流出液。于柱子下面放置一 250 ml 分液漏斗,用 75 ml 甲醇-水(10:90 v/v)洗提柱子。此时可将柱子放净。流出液的流速应约 1.2 ml/min。树脂在每次使用后可弃去,或经用甲醇、水和 1 N HCl 相继淋洗后再使用。

d. 喹喔啉-2-羧酸洗脱液的浓缩:

于 c 节(见上)中所得洗脱液中加 1.0 ml 浓 HCl,用 3 份 50 ml 氯仿抽提。收集提出液于一 250 ml 圆底烧瓶中。于 45—50℃ 旋转式蒸发器中蒸发至干。用 3 份少量(各约 1.0 ml)甲醇将残渣洗入 15 ml 离心管中。转移甲醇溶剂时使用一次性的 Pasteur 吸移管。将管浸入定温于 55℃ 的水浴中,在氮的气流下蒸发溶剂至干。残渣可在室温下保存。按下述继续进行残渣的酯化反应。

e. 喹喔啉-2-羧酸的酯化反应:

用 0.2 ml 新配制的甲醇-硫酸(97:3 v/v)转化残渣。加塞,并于 50—55℃ 水浴中加热 30 分钟。从水浴中取出离心管,于温热的酯化溶液中加入 1.0 ml 苯,用试管混和器充分混和。离心至清晰。用苯稀释 0.1 ml 苯提出液至 1.0 ml。用电子俘获气相色谱法分析此溶液及按下述制备的标准液。此稀释液及双相提出液如果储藏在低温勿使其由于蒸发而遭损失则可稳定至少三个月。未稀释的苯提出液可被用来作确证试验,(用 GC/MS—SIM 法,见 F.4 节)。

2. 测定步骤:

a. GC 工作条件:

进出口温度: 230—235℃

柱温: 205℃

电子俘获器温度: 225—240℃

氩-甲醇(9:1)载气流速: 80 ml/min

记录纸速度: 0.5 in/min

检测器脉冲参数: RF 型,输出电压 55 eV,脉冲重复频率 270 μ sec,脉冲宽度 3.0 μ sec

衰减: 10×64

b. GC 操作标准的制备:

吸移 1.0 ml 喹喔啉-2-羧酸标准工作液 C(0.150 μ g/ml)置于 15 ml 离心管中,在氮气流下、于 55℃ 蒸发至干。加 0.2 ml 甲醇-硫酸(97:3 v/v),加塞,于 55℃ 保温 30 分钟。抽提和稀释(1:10)均按上述步骤 e 进行。酯化标准与酯化样品应同时进行。

c. 样品的分析:

注射 $4\ \mu\text{l}$ (60 pg) 喹啉-2-羧酸甲酯(QME)标准工作液于气相色谱仪中以测定该化合物的保留时间(约 2 分钟)和评价 EC 检测器的响应情况。

重复注射,此标准的峰高应稳定在满刻度偏转的 40% 左右。随着 QME 标准溶液 2 后面,注射 $4\ \mu\text{l}$ 操作标准的苯提出液及样品的苯提出液。样品之间注射有 10 分钟间隔以清除仪器的本底峰。测量样品及标准的峰为 (mm),并按下述计算结果。在有效性研究中所 得典型色谱图列于图 2 中。

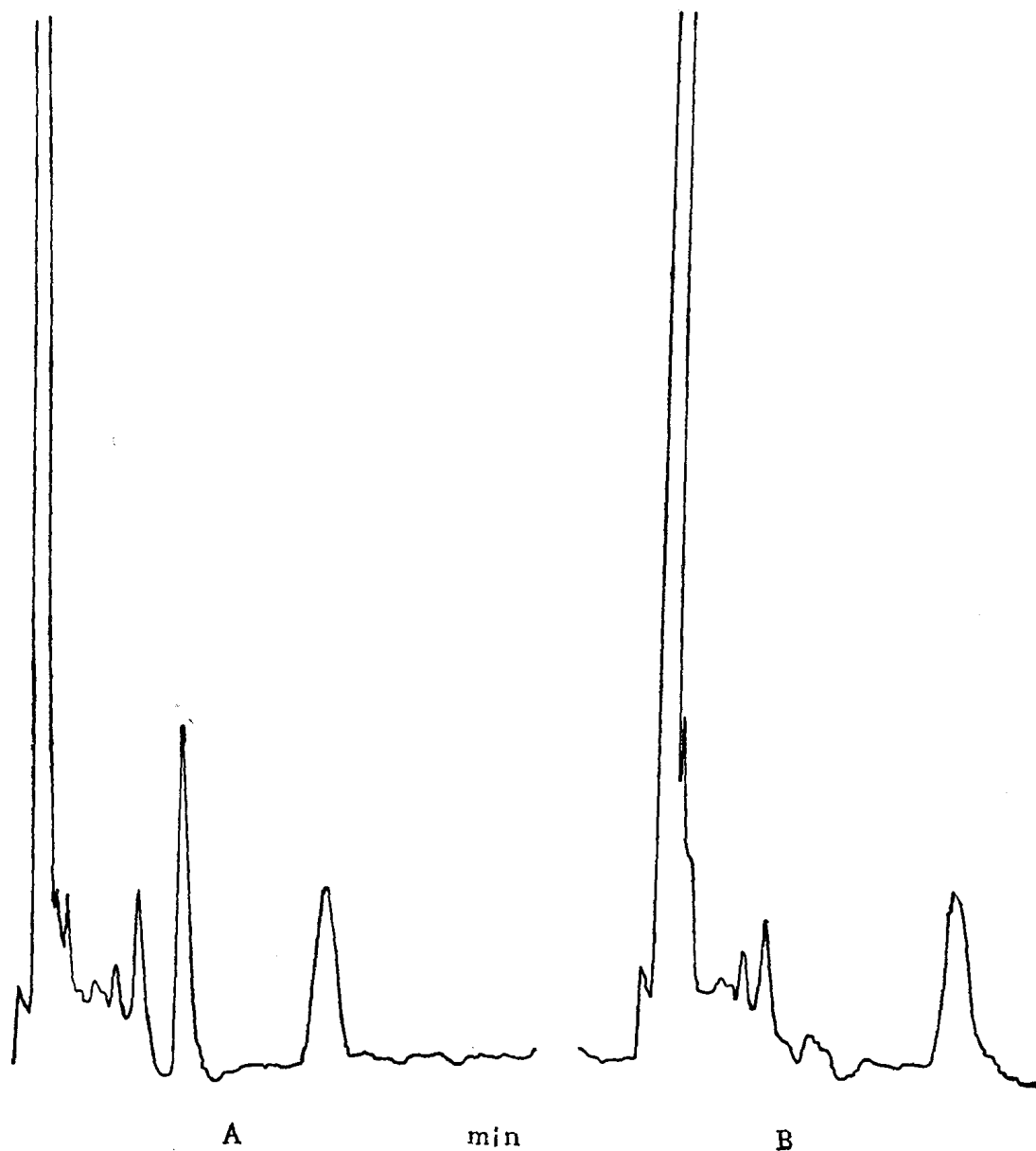


图2 按 F.2.a 节 GC 条件所得气相色谱图,
(A) 加入至 30 ppb 的 $4\ \mu\text{l}$, (B) $4\ \mu\text{l}$ 空白猪肝

d. 计算:

用下式计算样品中QCA 的浓度: $\text{ppb QCA} = \text{样品峰高} \times 30 / \text{操作标准峰高}$

3. 回收试验步骤:

为估计卡巴氧残留的回收率,于 5 g 组织中加入 150 ng 喹喔啉-2-羧酸 (1 ml QCA 标准工作液B)。加碱并操作如 F.1 节所示。

4. 确证试验步骤:

确证组织中喹喔啉-2-羧酸是用 GC/MS 选择离子检测法,检测 m/z 130 (基峰)、158 和 188 的峰(分子离子峰)。对加入到条例管制水平的肝,作方法的有效性研究,说明组织提出液中离子的峰高比相当于在上述 m/z 值检测时标准的离子强度。确证方法基本上相同于图 1 中所概述的方法,仅最后一步不同,用 GC/MS—SIM 对样品作试验需用一根 1 m 长的 Silar 10 C 柱子。

a. 试样制备:

从 F.1.a 节的分离操作方法一直操作到 F.1.e 节。至 e 节的下半部分,不用苯稀释 0.1 ml 提出液至 1.0 ml,而是直接将苯提出液连同标准按下述方法进行操作。为 GC/MS 测定而制备标准时,按 F.2.b 节所述经抽提后也不作 1:10 的稀释。

b. GC/MS—SIM 工作条件(也见 D 节和 F.2.a 节):

GC 柱子: Pyrex 玻璃,盘管形, $1\text{ m} \times 2\text{ mm}$ 内径,填充以涂有 3% Silar 10 C 硅藻土型色谱载体 Q (Gas Chrom Q), 80—100 目

柱温: 200°C

质谱仪: LKB Model 9000, 单聚焦

加速电压: 3.5 kV

倍增电压供应: 增益 4

离子源温度: 270°C

电子能: 70 eV

热丝电流: 60 μA

记录仪范围: 50—100 mV

记录仪速度: 1cm/min

对其他 GC/MS 仪器,分析样品前,用标准溶液确立最佳工作参数以获得需要灵敏度。

c. 样品的分析:

开始时用参考溶液及喹喔啉-2-羧酸甲酯的苯提出液,按上述仪器条件,进行如下:

定质量标度使 QME 基峰在 $m/z = 130$ 。注入 QME 标准工作液 2 (0.150 $\mu\text{g/ml}$) 的整分量,足以显示满刻度的 70—80% 的峰。重复注射该溶液,峰高应稳定在相同的高度值上。接着注射操作标准和样品提出液。样品间注射应有 2—3 分钟的间隔,以清除仪器上残留的虽很小但能检出的本底峰。在不变动仪器灵敏度情况下,同样操作,以记录 $m/z = 158$ 和 188 时(分子离子)标准的峰高。归一化这些结果相对于在 $m/z = 130$ 时峰的强度。

G. 方法的可靠性:

确认。由 Pfizer Inc. 对 30 个已加入至 30 ppb 的肝样作一系列双试验得平均值为 25.1 ± 2.7 ppb (表 1)。由阴性肝样或控制肝样所给出的本底并无特殊性,即无固定的峰与 QME 共洗脱出来。本底在 1 到 2 ppb 范围内(以喹喔啉-2-羧酸计)对检测 30 ppb 卡巴