

(6):709-713.

[6] 聂建荣,朱铭立,连槿,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测动物尿液中的 15 种 β -受体激动剂[J]. 色谱,2010,28(8):759-764.

[7] 王凤美,张鸿伟,庞士平,等. 超高效液相色谱-串联质谱测定动物源性食品和尿液中 4 种 β -受体激动剂残留[J]. 分析化学,2008,36(12):1629-1635.

[8] 李晓雯,沈宝华,江峥,等. HPLC-LTQ Orbitrap MS 对血液、尿液中精神药品的筛选及确证[J]. 法医学杂志,2012,28(1):44-48.

[9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. SN/T 2624—2010 动物源性食品中多种碱性药物残留量的检测方法-液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

[10] 张毅,岳振峰,蓝芳,等. 分散固相萃取净化与液相色谱/串联质谱法测定牛奶中 8 类禁用药物残留[J]. 分析化学,2012,40(5):724-729.

[11] 郭洁,洪子雯,方晓玲. Box-Behnken 实验设计法优化表阿霉素脂质体的处方工艺[J]. 复旦学报:医学版,2007,34(6):816-820.

实验技术与方法

超高压液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中 4 种硝基呋喃代谢物残留

刘柏林,谢继安,单晓梅
(安徽省疾病预防控制中心,安徽 合肥 230601)

摘 要:目的 建立超高压液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)同时测定鸡蛋中 4 种硝基呋喃代谢物的方法。方法 鸡蛋中与蛋白质结合的硝基呋喃代谢物经盐酸水解后,与邻硝基苯甲醛(2-NBA)反应,产生稳定的衍生物,用乙酸乙酯提取,4℃冷冻离心后取下层澄清液测定。待测物采用电喷雾电离正离子、多反应监测模式检测,基质内标法定量。结果 4 种待测物浓度在 0.1~50.0 μg/L 范围内与其峰面积比值呈良好的线性关系,相关系数均不低于 0.995,回收率范围为 74.1%~97.6%,RSD<13.4%。氨基脒(SEM)与 1-氨基-乙内酰脲(AHD)最低检出限均为 0.1 μg/kg,5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮(AMOZ)与 3-氨基-2-恶唑烷基酮(AOZ)最低检出限均为 0.05 μg/kg。结论 该方法具有样品前处理简单、灵敏度高、重现性好等优点,满足鸡蛋中 4 种硝基呋喃代谢物残留定量检测的要求。

关键词:超高压液相色谱-串联质谱法;鸡蛋;硝基呋喃代谢物;兽药残留;食品安全

中图分类号:R155;R155.56;TS207.3;S859.79⁺6 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0469-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.008

Determination of four nitrofuran residues in eggs using ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Bo-lin, XIE Ji-an, SHAN Xiao-mei
(Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Anhui Hefei 230601, China)

Abstract: Objective A rapid analytical method for the simultaneous detection of four metabolites of nitrofuran in eggs by the ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established. **Methods** The metabolites in egg samples were released in HCl solution, and reacted with the 2-nitrobenzaldehyde (2-NBA). The stable derivatives were extracted by ethyl acetate, and centrifuged at. The transparent liquid was detected. The identification was achieved by electro spray ionization in positive mode using multiple reaction monitoring. The quantification was performed by the matrix matched internal standards. **Results** The calibration curves of the four analytes showed a good linearity between 0.1 and 50 μg/L, and the correlation coefficient was above 0.995. Recoveries were between 74.1% and 97.6% with RSD less than 13.4%. The limits of detection of SEM and AHD were 0.1 μg/kg, and the limits of detection of AMOZ and AOZ were 0.05 μg/kg. **Conclusion** The method has the advantages of simple pretreatment, high sensitivity and good reproducibility, which is suitable for the determination of four nitrofuran metabolites in eggs.

Key words: Ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry; egg; nitrofuran metabolites; residue of veterinary drug; food safety

硝基呋喃类抗生素是一类人工合成的广谱抗菌药物,用于预防和治疗哺乳动物消化道疾病,通常作为饲料添加剂,广泛用于家禽、家畜、水产养殖,适当用药可以促进动物生长^[1]。但是动物大量用药后,体内的药物残留会给人类带来危害。硝基呋喃类药物在生物体内的半衰期短,迅速分解成氨基脒 (semicarbazide, SEM)、1-氨基-乙内酰脲 (1-aminohydantoin, AHD)、5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷基酮 (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, AMOZ) 和 3-氨基-2-恶唑烷基酮 (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ) 4 种代谢产物,这些代谢物能与生物体内的蛋白质稳定结合,而在人体胃酸条件下,又会释放出来^[2]。研究表明释放出来的这些代谢物会对人体有致癌作用^[3],引起了世界各国的关注,并纷纷颁布了相关的禁令。我国于 2002 年颁布了《食用动物禁用的兽药及其它化合物清单》,禁止使用硝基呋喃类抗生素^[4]。但是,食品中硝基呋喃代谢物残留的检出还是屡屡见报^[4-5],药物残留仍然是人们普遍关注的一个食品安全问题,建立准确可靠、灵敏、快速的检测方法是十分必要的。

近年来,食品中硝基呋喃代谢物残留的检测,主要有液相色谱法 (LC)^[3,6]、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[7-11]、酶联免疫分析法等^[12-13]。免疫分析方法虽具有灵敏度高、操作简便、检测快速的优点,但目前建立的免疫方法大多存在特异性差、假阳性率高^[14];LC 法可用于硝基呋喃代谢物的筛选,但定性较困难,对阳性结果不易确证;LC-MS/MS 虽能对硝基呋喃代谢物进行准确的检测和确证,但当药物浓度较低时,超高压液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 在灵敏度、准确度、选择性、测定时间等方面比 LC-MS/MS 有明显的优势。

本试验参照 GB/T 21311—2007《动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢药物残留量检测方法高效液相色谱-串联质谱法》^[15] 的样品前处理方法,采用盐酸水解鸡蛋中硝基呋喃代谢物,同时加入 2-硝基苯甲醛 (2-NBA),37 °C 过夜衍生化后用乙酸乙酯提取,低温离心除去表层的脂肪后进行测定,建立超高压液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中硝基呋喃代谢物 AMOZ、AHD、SEM 和 AOZ。通过实际样品的测定,4 种代谢物在 5 min 之内完成测定。该方法与 GB/T 21311—2007 相比,低温离心取代了繁琐的正己烷液液分配步骤,简化了样品前处理,提高了灵敏度,缩短了测定时间,当测定大批量样品时,具有明显的优势,可以用于鸡蛋中 4 种硝基呋喃代谢物残留的同时准确测定。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

ACQUITY™ UPLC 超高压液相色谱仪、串联质谱仪 (ZEVO TQ MS)、8010G 样品均质杯均购自美国 Waters; Milli-Q 超纯水系统、VORTEX Gnius3 漩涡混匀器、Seven Multi 精密 pH 计。

AOZ (CAS: 80-65-9)、AMOZ (CAS: 43056-63-9)、AHD (CAS: 2827-56-7)、SEM (CAS: 563-41-7)、AOZ-d₄ (CAS: 1188331-23-8)、AMOZ-d₅ (CAS: 1017793-94-0)、AHD-¹³C₃ (CAS: 957509-31-8)、SEM-¹³C-¹⁵N₂ (CAS: 1173020-16-0) 均购自美国 Sigma-Aldrich, 邻硝基苯甲醛 (2-NBA) (纯度 > 98.5%, 美国 Fluka), 甲醇、乙腈、乙酸乙酯、乙酸铵均为色谱纯, 氢氧化钠与二甲基亚砜为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

精确称取样品 1.0 g (精确至 0.001 g) 于 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 0.2 mol/L 盐酸溶液, 再依次加入 20 μl 混合内标工作液 (100 ng/ml), 100 μl 邻硝基苯甲醛溶液 (0.1 mol/L), 漩涡混匀 1 min, 置于 37 °C 水浴或 37 °C 烘箱中避光过夜反应。

方法一: 取出样品, 冷却至室温, 用氢氧化钠溶液 (2.0 mol/L) 调 pH = (7.4 ± 0.2), 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入另一个 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 乙酸乙酯, 漩涡混匀提取 1 min, 以 10 000 r/min 离心 10 min, 收集乙酸乙酯层。残留物用 10 ml 乙酸乙酯再提取 1 次, 合并乙酸乙酯层。收集液在 40 °C 下用 N₂ 吹干, 准确加入 1.0 ml 10% 甲醇水溶液 (含 0.1% 甲酸), 漩涡混匀 30 s, 4 °C 4 700 r/min 低温离心 10 min, 取下面澄清液过 0.22 μm 滤膜, 供 UPLC-MS/MS 测定。

方法二: 取出样品, 冷却至室温, 用 NaOH 溶液 (2.0 mol/L) 调 pH = (7.4 ± 0.2), 10 000 r/min 离心 10 min, 将上清液转入另一个 50 ml 离心管中, 加入 10 ml 正己烷, 手动混合均匀, 4 °C 4 700 r/min 离心 10 min, 除去上层的正己烷, 下层液体接入 SPE 柱 (HLB, 30 mg, 3 cm³), 上柱前, HLB 依次用 3 ml 乙酸乙酯、3 ml 甲醇、3 ml 水活化后上样, 3 ml 水淋洗 HLB 柱, 抽干柱中的水后, 加入 5 ml 乙酸乙酯洗脱收集, 洗脱液 40 °C 下用 N₂ 吹干, 加入 1.0 ml 10% 甲醇水溶液 (含 0.1% 甲酸) 溶解残留物, 过 0.22 μm 滤膜, 供 UPLC-MS/MS 测定。

1.2.2 标准溶液的配制

4 种硝基呋喃代谢物标准储备液: 称取适量的 4 种硝基呋喃代谢物标准物质 (AOZ、AMOZ、AHD、SEM), 分别用乙腈溶解, 并定容至刻度, 配制成

100 $\mu\text{g/ml}$ 的标准储备液,避光保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

4种硝基呋喃代谢物内标标准储备溶液:称取适量的4种硝基呋喃代谢物内标标准物质(AOZ- d_4 、AMOZ- d_5 、AHD- $^{13}\text{C}_3$ 、SEM- ^{13}C - $^{15}\text{N}_2$),分别用乙腈溶解,并定容至刻度,配制成100 $\mu\text{g/ml}$ 的标准储备液,避光保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。

4种硝基呋喃代谢物混和标准工作溶液:分别准确移取上述标准储备液10 μl 至10 ml容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,混匀,配制成100 ng/ml的工作液。避光保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

4种硝基呋喃代谢物内标混和标准工作溶液:分别准确移取上述内标标准储备液10 μL 至10 ml容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,混匀,配制成100 ng/ml的工作液。避光保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱内。

标准应用液系列:分别准确移取上述代谢物混和标准工作溶液(100 ng/ml)5、10、50、100、200、500、1 000、5 000 μl 到10 ml容量瓶中,加入200 μl 内标混和标准工作溶液,用10%甲醇水溶液(含0.1%甲酸)定容至刻度,配制成0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:流动相A:0.1%甲酸(含5 mmol/L乙酸铵),B:乙腈;梯度洗脱:0~3 min,80% A;3~3.5 min,45% A;3.5~4.5 min,5% A;4.5~5.0 min,80% A;流速0.3 ml/min,柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$,样品室 $8\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样10 μl 。

质谱条件:毛细管电压3.0 kV,源温度 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$,去溶剂温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气温度 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$,脱溶剂气流量800 L/h,碰撞气体为氩气,气流量为0.15 ml/min,电喷雾电离正离子方式、多反应监测方式检测。

1.2.4 工作曲线与加标试验

分别称取已搅碎均匀的阴性样品1.0 g(精确到0.001 g)于8个50 ml离心管中,分别加入标准应用液系列各1.0 ml(标准应用液系列的浓度为0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$,内含2 $\mu\text{g/L}$ 的4种代谢物的内标),另取2个50 ml离心管做溶剂空白样品,用以评价背景污染,其余步骤同样品前处理方法。

加标试验:分别称取已绞碎均匀的阴性样品1.0 g(精确到0.001 g)于4个50 ml离心管中,分别按0.5、2.0、5.0和10.0 $\mu\text{g/L}$ 准确添加4种硝基呋喃代谢物混和标准工作液,提取步骤同样品前处理。

2 结果与分析

2.1 样品提取净化条件的选择

硝基呋喃代谢物以蛋白结合物的形态存在于

样品中,并在适当的酸性条件下释放出来。本试验样品采用2 mol/L的盐酸溶液水解,同时加入2-NBA进行衍生16 h,使之生成具有较好质谱特性的化合物,调节pH值到中性,用乙酸乙酯提取。鸡蛋属于高脂肪样品,用乙酸乙酯提取后,脂肪会溶解在提取液中,不除去会影响测定,降低灵敏度。本试验比较了两种提取方法,一种如1.2.1所述的方法一,提取液在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 N_2 吹干,准确加入1.0 ml 10%甲醇水溶液(含0.1%甲酸),漩涡混匀30 s, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻离心10 min除去表层的脂肪,取下面澄清液测定;方法二是参考CHU等^[10]的方法,采用HLB柱净化。在试验过程中发现,用HLB柱净化时,鸡蛋的基质比较复杂,容易堵塞HLB柱,代谢物难完全洗脱下来。另外,乙酸乙酯与水是不互溶的,在洗脱样品之前HLB固相萃取小柱是否抽干会直接影响方法的回收率,同时也会由于每个样品抽干的程度并不完全一致,从而使方法的RSD较大,HLB净化的效果不理想。

2.2 工作曲线、线性范围和检出限

称取阴性样品各1.0 g,分别加入标准应用液系列各1.0 ml,制成浓度为0.05、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、50 $\mu\text{g/L}$ 的工作曲线,然后按照样品提取步骤操作,按照1.2.2的仪器条件,采用Waters预柱接Waters AcquityTM UPLC BEH C_{18} 柱,梯度洗脱,采用分段扫描方式,4种代谢物在5.0 min内完全基线分离,在目标物出峰处没有发现干扰峰,有效避免了基质干扰情况。标准色谱图见图1。

以浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标(x),代谢物峰面积与内标物峰面积比值为纵坐标(y)绘制标准工作曲线,结果表明,4种代谢物浓度在0.1~50 $\mu\text{g/L}$ 范围内与其峰面积比值呈良好的线性关系, r 均 >0.995 。另外,根据3倍信噪比($S/N\geq 3$)的方法确定了方法检出限(LOD)、线性方程、相关系数见表1。

2.3 回收率及精密度

准确称取4份鸡蛋阴性样品进行加标回收率和精密度试验,添加混合标准工作溶液适量,相当于0.5、2.0、5.0、10.0 ng的浓度水平,每个浓度水平做3个平行试验,按本方法进行提取,UPLC-MS/MS测定,结果见表2。回收率范围为74.1%~97.6%,RSD在1.13%~13.4%之间。该方法的回收率好、精密度高,适用于鸡蛋中硝基呋喃代谢物的测定。

2.4 实际样品分析

采集超市与农贸市场上的90份鸡蛋样品,按照本试验方法检测样品中的硝基呋喃代谢物含量,检测结果见表3。所有样品中AMOZ、AHD和SEM均未检出,只有AOZ在部分样品中检出,含量0~2.45 $\mu\text{g/kg}$ 。

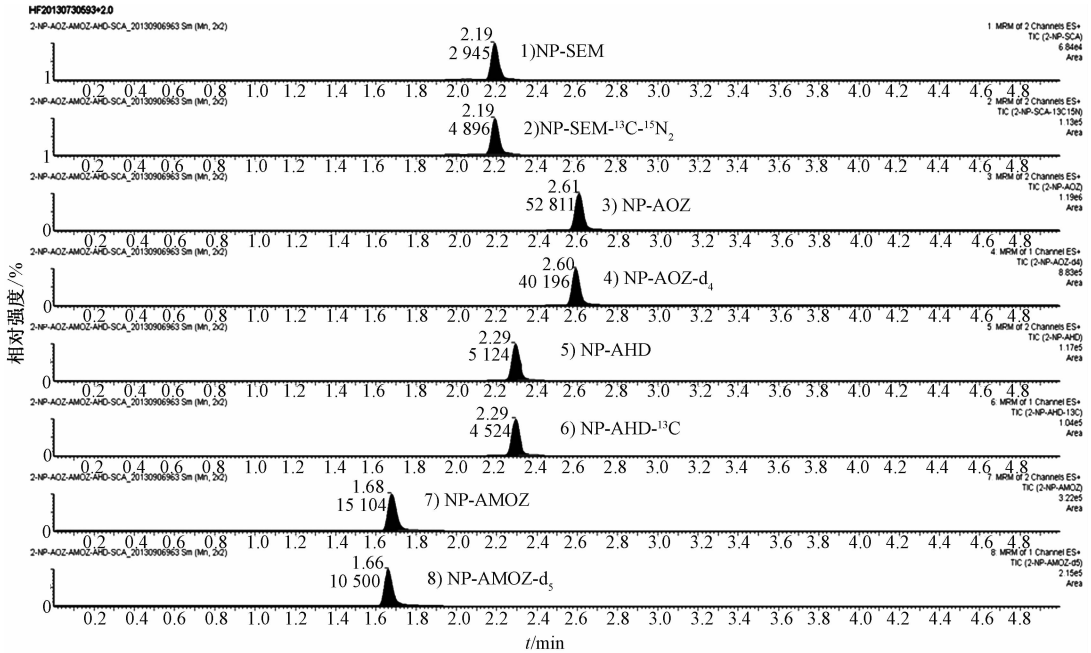


图 1 基质匹配标准及内标图谱(添加 2.0 μg/L)
Figure 1 Matrix matching and internal standard spectra

Table 1 Linear relation, correlation coefficient and LOD for metabolites of nitrofurantoin			
分析物	线性方程	r	LOD/(μg/kg)
AMOZ	$y = 0.7273x - 0.01017$	0.996	0.05
SEM	$y = 0.2248x + 0.1496$	0.995	0.1
AHD	$y = 0.5658x - 0.06364$	0.999	0.1
AOZ	$y = 0.6142x + 0.00939$	0.999	0.05

Table 2 Recoveries and the relative standard deviation of metabolites of nitrofurantoin			
分析物	添加量/ng	平均回收率/%	RSD/%
AMOZ	0.5	93.5	9.60
	2.0	97.6	8.80
	5.0	86.2	3.55
	10.0	95.1	3.51
SEM	0.5	78.6	3.69
	2.0	74.1	7.35
	5.0	77.7	1.13
AHD	10.0	78.1	3.23
	0.5	76.0	4.81
	2.0	89.1	8.12
	5.0	93.1	2.40
AOZ	10.0	90.1	3.40
	0.5	92.6	2.26
	2.0	94.1	2.97
	5.0	90.1	13.4
	10.0	93.1	9.35

3 小结

建立了鸡蛋中 4 种硝基呋喃代谢物的超高压液相色谱-串联质谱检测方法,样品经过衍生、提取、低温离心后直接上机测定,简化了样品前处理步

Table 3 Results of metabolites of nitrofurantoin in real samples				
分析物	检出率/%	硝基呋喃代谢物/(μg/kg)	最大值/(μg/kg)	最小值/(μg/kg)
AMOZ	0	ND	ND	ND
AHD	0	ND	ND	ND
SEM	0	ND	ND	ND
AOZ	3	1.40 ± 1.35	2.45	ND

注:ND 表示未检出
骤,降低了试验成本,同时 4 种代谢物内标的使用补偿了前处理对最后定量结果的影响,结果准确可靠。采用梯度洗脱,分段扫描,每个样品均能在 5 min 内完成测定,提高了测定速度与灵敏度,满足食品中微量的硝基呋喃代谢物残留物的测定要求。

参考文献

[1] McCracken R J, Blanchflower W J, Rowan C, et al. Determination of furazolidone in porcine tissue using thermospray liquid chromatography-mass spectrometry and a study of the pharmacokinetics and stability of its residues[J]. Analyst, 1995, 120(9) :2347-2351.
[2] Horne E, Cadogan A, Keefe M O, et al. Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Analyst, 1996, (121) :1463-1468.
[3] Chumanee S, Sutthivaiyakit S, Sutthivaiyakit P. New reagent for trace determination of protein-bound metabolites of nitrofurans in shrimp using liquid chromatography with diode array detector [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(5) :1752-1759.
[4] 田蕴, 罗晓琴. 水产品硝基呋喃类药物残留检测[J]. 动物保健, 2006, 107(7) :45-47.
[5] 杨爽, 邵兵. 超高压液相色谱-串联质谱法测定虾中硝基呋喃代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(1) :135-140.

[6] 丁岚,谢孟峡,刘媛,等. 高效液相色谱法测定鸡蛋中呋喃唑酮的残留量[J]. 分析化学,2004,32(2):139-142.

[7] 彭涛,储晓刚,杨强,等. 高效液相色谱/串联质谱法测定奶粉中的硝基呋喃代谢物[J]. 分析化学,2005,33(8):1073-1076.

[8] CHU P S, Lopez M I. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans[J]. J Agric Food Chem,2005,53(23):8934-8939.

[9] Barbosa J, Freitas A, Mourao J L, et al. Determination of furaltadone and nifursol residues in poultry eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem,2012,60:4227-4234.

[10] CHU P S, Lopez M I. Determination of nitrofuran residues in milk of dairy cows using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem,2007,55(6):2129-2135.

[11] 耿士伟,朱永林,邵德佳. 高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中呋喃唑酮代谢物的残留[J]. 兽药与饲料添加剂,2005,10(5):30-31.

[12] FANG Z Y, JIANG B S, WU W, et al. ELISA detection of semicarbazide based on a fast sample pretreatment method [J]. Chem Commun,2013,49:6164-6166.

[13] Vass M, Diblikova I, Cernoch I, et al. ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination [J]. Anal Chim Acta,2008,608(1):86-94.

[14] 刘辉,梁德沛,花铁果,等. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(2):383-388.

[15] 国家标准化管理委员会.GB/T 21311—2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱-串联质谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

实验技术与方法

高效液相色谱-紫外检测法快速测定小麦面粉中偶氮甲酰胺

张桂芳,张晓瑜,宫月华,孙兆鹏,刘泽静,韩文清
(烟台市疾病预防控制中心,山东 烟台 264003)

摘要:目的 建立小麦粉中偶氮甲酰胺的高效液相色谱快速检测法。方法 样品经二甲亚砜-丙酮混合溶剂超声振荡提取,采用 Hypersil-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为 10 mmol/L H₂SO₄ 水溶液,流速为 1 ml/min,检测波长为 275 nm,进样量 20 μl,二极管阵列检测器定量。结果 偶氮甲酰胺在 0.01~1.00 mg/ml 范围内呈良好线性关系,相关系数 $r=0.999\ 2$, $RSD<4.3\%$,平均回收率为 95.9%;山东地区 85 份样品偶氮甲酰胺含量检测结果均小于检出限,符合现行限量标准。结论 本方法准确可靠,方便快捷,灵敏度高,适合于大批量小麦粉中偶氮甲酰胺的检测。

关键词:面粉;偶氮甲酰胺;高效液相色谱;快速测定;面粉处理剂;食品添加剂;食品安全

中图分类号:R155;O657.7;TS202.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0473-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.016

Rapid determination of azodicarbonamide in wheat flour by HPLC-UV

ZHANG Gui-fang, ZHANG Xiao-yu, GONG Yue-hua, SUN Zhao-peng, LIU Ze-jing, HAN Wen-qing.
(Yantai Center for Disease Control and Prevention, Shandong Yantai 264003, China)

Abstract: **Objective** To establish a method for the determination of azodicarbonamide (ADA) in wheat flour by HPLC. **Methods** The samples were extracted by acetone-dimethyl sulfoxide mixture with ultrasonic oscillations. The ADA separation was carried out on a Hypersil-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with 10 mmol/L H₂SO₄ solution as mobile phase at a flow rate of 1 ml/min, and detected at 275 nm with a 20 μl injection volume. **Results** The linear range for ADA was 0.01-1.00 mg/ml, and the correlation coefficient was 0.999 2. The average recovery was 95.9% ($RSD<4.3\%$). The ADA content of 45 samples from Shandong province were lower than the detection limit, which were in line with the current standards. **Conclusion** The method was proved to be simple and accurate with good repeatability and high sensitivity, which could apply to the determination of ADA in bulk wheat flour.

Key words: Flour; azodicarbonamide; high performance liquid chromatography; rapid determination; flour treatment agents; food additives; food safety