

高效液相色谱 电化学阵列检测器 检测 10 种磺胺类药物在鸡肉中的残留

李曙光¹ 赵静玫¹ 王文霞¹ 金 郁^{1,2} 杜昱光^{*1}

¹ (中国科学院大连化学物理研究所, 大连 116023)

² (辽宁师范大学, 大连 116029)

摘 要 建立了一步有机溶剂提取、HPLC 分离、多孔石墨电极阵列检测器检测 10 种磺胺类药物在鸡肉中残留量的方法。采用乙腈-氯仿混合液 (乙腈:氯仿 = 10:1) 提取, 10 种磺胺药物的提取收率均大于 50%; 研究了磺胺类药物在多孔石墨电极上的氧化还原特征, 确定检测电势为 455, 560, 630, 670 和 710 mV; 优化了 HPLC 分离条件, Hypersil BDS C-18 色谱柱, pH 5, 30 mmol/L 磷酸二氢钠、8.5% ~ 37.5% 乙腈 (V/V) 线性梯度洗脱, 40 min 内实现 10 种磺胺药物的基线分离, 鸡肉中提取的杂质不干扰样品分离; 方法的检出限 ($S/N = 3$) 为磺胺二甲异噁唑 (SA) 40 $\mu\text{g/kg}$ 及磺胺 (SA)、磺胺嘧啶 (SDZ)、磺胺甲基嘧啶 (SMR)、磺胺二甲基嘧啶 (SMZ)、磺胺吡啶 (SPD)、磺胺噻唑 (STZ)、磺胺甲噻二唑 (SMTZ)、磺胺氯哒嗪 (SCP) 和磺胺甲基异噁唑 (SMX) 等分别为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。在 0.1 ~ 2.0 mg/L 浓度范围内各磺胺类药物与其响应信号呈现良好的线性关系, 相关系数 (r) 均大于 0.9978; 电极再生方法简单, 可实现在线清洗, 适用于食用畜禽产品中磺胺类药物残留量的分析。

关键词 高效液相色谱, 电化学 (库仑) 阵列, 磺胺类药物

1 引 言

磺胺类药物是一大类 4-氨基苯磺胺 N 衍生物, 因其具有促进生长作用及用以预防和治疗微生物引起的疾病而广泛应用于畜禽动物的饲养, 这类药物的过量使用必然会导致其在食用畜禽产品中的残留。近年来随着人们对食物安全的关注, 食物中抗生素残留的毒副作用亦随之凸现, 例如某些磺胺类药物可能具有致癌性、食品中磺胺药物的残留可引起过敏性体质人的过敏反应、使病原菌产生抗药性等等。因此许多国家对食品中磺胺药物的最大残留量作了严格的限定, 如欧洲和美国肉类产品的最大残留量为 100 ng/g , 牛奶中为 10 ng/g 。

食用畜禽产品中磺胺药物残留的分析检测方法有多种, 包括滴定法^[1]、分光光度法^[2]、气相色谱^[3]、液相色谱、毛细管电泳^[4]及生物分析方法 (如 ELISA 法^[5]) 等, 每种方法均有其优势及缺陷。最常用的是液相色谱法, 液相色谱常用的检测方法有紫外吸收^[6,7]、荧光^[8,9]、电化学检测^[10~13]及质谱法^[14,15]等方法。紫外吸收的检测波长多选择在 226 ~ 360 nm 之间, 灵敏度通常为 0.1 mg/L, 若在柱后进行衍生反应, 检测灵敏度可至 0.01 mg/L^[6]。紫外吸收可适用于各种磺胺类药物, 对于多组分磺胺类药物的同时分析很方便, 但其选择性较差。磺胺类药物本身没有或具有弱的荧光, 通过柱前或柱后衍生, 生成强荧光物质, 可利用荧光检测器检测, 但衍生化过程较繁琐, 不适用于批量样品的分析。相比较而言, HPLC-MS 联用技术是最灵敏的磺胺类药物分析检测方法, 检出限可达 $\mu\text{g/L}$ 级, 只是仪器设备昂贵, 限制其应用范围。电化学检测技术是 HPLC 检测技术中灵敏和便宜的检测方法, 王建华^[10]、You 等^[11]用 Ag/AgCl 电极检测禽肉、胶囊和人尿样中磺胺类药物, Carrazone 等^[12]用玻碳电极 (glass-carbon-electrode) 研究磺胺类药物的电化学特性及在药物中含量的分析, 均有较高的灵敏度。但上述方法 (除文献 [10], 该文献未讨论电极的特性) 均有一个值得关注的问题是磺胺类药物对电极污染并使其失活, 需对电极进行预处理或采用脉冲循环电位扫描再生电极^[11], Rao 等^[13]利用掺硼的宝石电极试图解决这个问题, 但未见有商品化的该电极。本实验利用多孔石墨电极 (porous graphite electrode), 库仑阵列检测方式及简单的在线清洗方法, 同时检测 10 种磺胺类药物, 解决了电极的污染及再生问题, 具有很高的灵敏度及稳定性, 适用于食用畜禽产品中磺胺类药物残留量的分析。

2004-05-24 收稿; 2004-11-29 接受

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

实验所涉及 11 种磺胺类药物,磺胺(SA)、磺胺嘧啶(SDZ)、磺胺甲基嘧啶(SMR)、磺胺二甲基嘧啶(SMZ)、磺胺吡啶(SPD)、磺胺噻唑(STZ)、磺胺甲噻二唑(SMTZ)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺喹啉(SQX)、磺胺甲基异噁唑(SMX)和磺胺二甲异噁唑(SA) 11 种磺胺类药物均系美国 Sigma 公司产品,乙腈(色谱纯,美国 TED A 公司),磷酸二氢钠(p.a 级,比利时 ACROS 公司)。实验用水均经过纯水机纯化(Water Pro Ps 9000602 型,美国 Labconco 公司),电导率为 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 。

标准品的贮存液为 100 mg/L ,配制方法为将 1 mg 各标准品溶于 10 mL 乙腈中, -18°C 保存数月内稳定;标准品工作液的配制为用水将贮存液稀释至相应的浓度。

HPLC 系统采用美国 ESA 公司的电化学(库仑)阵列检测系统,包括两个 582 型泵、PEEK 梯度混合器和脉冲阻尼器、542 型自动进样器、5600A 型 16 通道电化学(库仑)阵列检测器及 CouArray for Window 数据处理软件。该检测器具有 16 个多孔石墨电极,在本方法中,利用其中的 8 个通道,施加不同的电势,检测磺胺类药物。

2.2 色谱条件

采用反相高效液相色谱分析磺胺类药物。色谱柱为 Hypersil BDS C-18 柱, $5 \mu\text{m}$ 颗粒, $200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm i.d.}$ (大连依利特科学仪器有限公司);线性梯度洗脱方式,流动相 A 为 30 mmol/L 磷酸二氢钠, 5% 乙腈(V/V)水溶液, $\text{pH} 5.0$, 流动相 B 为 30 mmol/L 磷酸二氢钠, 70% 乙腈(V/V)水溶液, $\text{pH} 5.0$ (用磷酸和氢氧化钠调节 pH 值),洗脱程序为 $0 \sim 12 \text{ min}$, 维持 5% B, $12 \sim 40 \text{ min}$, 从 5% B $\sim 50\%$ B, 流速 1 mL/min ;柱温和电化学阵列检测器的温度维持在 30°C ;进样体积 $20 \mu\text{L}$;8 个检测电极施加的电势分别为 300 、 385 、 420 、 455 、 560 、 630 、 670 和 710 mV 。

2.3 提取方法

鸡肉样品匀浆后于 -18°C 保存。使用时,于室温解冻。取鸡肉样品 2 g ,在研钵中研磨 5 min 后,加入 0.5 mL 10% (W/V)硫酸钠水溶液和 3 mL 乙腈-氯仿混合液(乙腈-氯仿 = $10:1$),再研磨 10 min ,将样品转入离心管中,用 2 mL 乙腈-氯仿混合液清洗研钵,清洗液与样品合并,超声波处理 10 min , 4°C 保存。将该样品 3000 r/min 离心 10 min ,上清液减压除去溶剂(40°C 以下),用 5% (V/V)乙腈水溶液定容至 4 mL , $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤,滤液用 HPLC 分析,进样量 $20 \mu\text{L}$ 。

3 结果与讨论

3.1 磺胺类药物在多孔石墨电极上氧化的电化学特征

考察磺胺类药物在多孔石墨电极上氧化的电化学特征,对于优化检测方法中各电极施加的电势及方法的检测精确度是至关重要的。以磺胺(SA)为例,其余 10 种磺胺类药物的实验方法与此相同。将 0.1 mL SA 标准品的贮存液(100 mg/L)用水稀释至 10 mL ,配成 1 mg/L 的工作液;检测器的 16 个通道全部打开,使顺序排列的 16 个电极依次施加的电势为 350 、 385 、 420 、 455 、 490 、 525 、 560 、 595 、 630 、 665 、 700 、 735 、 770 、 805 、 840 及 875 mV ;工作液进样量为 $10 \mu\text{L}$ 。以施加的电势为横坐标,各通道及其上游通道峰面积和为纵坐标作图(见图 1)。由图 1 可以看出,SA 在 490 mV 开始氧化,至 595 mV ,其后至 700 mV 是平缓区, 700 mV 以后随着电势增加又开始发生氧化反应,表明 SA 在上述条件下,可能多个基团可以发生氧化反应(或是在 $490 \sim 595 \text{ mV}$ 电势区间的氧化产物在 700 mV 以上的电势又被氧化)。取第一个被氧化基团的氧化电势区间,即 $490 \sim 595 \text{ mV}$ 为 SA 的检测电势区间(因为在高电势区间,噪声也随着增大)。其余 10 种磺胺类药物的施加电势选择方法与此类似。综合 11 种磺胺类药物的电化学特征,将检测电势确定为 455 、 560 、 630 、 670 和 710 mV ,前 3 个通道施加 300 、 385 及 420 mV 电势,以“过滤”掉由鸡肉样品中提取出的可能影响磺胺类药物检测的低电势氧化的化合物。

电化学阵列检测器的另一个优势是提高检测方法的选择性。化合物被电化学阵列检测器检测时,会在连续的通道上出现检测信号,信号最强的通道为主通道,其前一通道及后一通道的信号强度与该通

表 1 检测方法的稳定性和精密度
Table 1 The reproducibility and precision for sulfa drugs from the spiked chicken meat sample

化合物 Compound	日内 Intra-day (n=8)				日间 Inter-day (n=5)			
	1.0 mg/L		0.2 mg/L		1.0 mg/L		0.2 mg/L	
	SD ($\times 10^{-2}$)	RSD (%)	SD ($\times 10^{-3}$)	RSD (%)	SD ($\times 10^{-2}$)	RSD (%)	SD ($\times 10^{-3}$)	RSD (%)
磺胺 Sulfanilamide (SA)	3.56	3.56	5.27	2.63	5.69	5.69	7.07	3.54
磺胺嘧啶 Sulfadiazine (SDZ)	3.60	3.60	11.6	5.81	3.69	3.69	8.02	4.01
磺胺噻唑 Sulfathiazole (STZ)	5.97	5.97	8.53	4.26	2.01	2.01	11.6	5.80
磺胺吡啶 Sulfapyridine (SPD)	5.34	5.34	8.55	4.28	2.23	2.23	12.5	6.25
磺胺甲基嘧啶 Sulfamerazine (SMR)	2.24	2.24	9.08	4.54	2.83	2.83	11.0	5.51
磺胺甲噻二唑 Sulfamethizole (SMTZ)	2.11	2.11	9.49	4.75	3.35	3.35	19.1	9.55
磺胺二甲基嘧啶 Sulfamethazine (SMZ)	2.24	2.02	9.24	4.62	3.54	3.54	19.1	9.54
磺胺氯哒嗪 Sulfachloropyridazine (SCP)	2.63	2.63	5.35	2.68	2.24	2.24	11.0	5.49
磺胺二甲异噁唑 Sulfisoxazole (SIA)	1.26	1.26	26.2	13.1	4.43	4.43	26.9	13.5
磺胺甲基异噁唑 Sulfamethoxazole (SMX)	2.89	28.9	8.67	4.34	3.36	3.36	11.9	5.97
磺胺喹噁啉 Sulfaquinoxaline (SQX)	3.82	3.82	8.04	4.02	2.24	2.24	13.5	6.73

3.5 电极的维护

多次进样后,各磺胺类药物在多孔石墨电极上的信号响应会逐渐衰减(见图 3),连续进样 29 次后,各磺胺类药物的信号值只达到第一次进样信号值的 57.3%~70.6%。据此推测引起信号衰减的原因源自于磺胺类药物或其氧化产物在多孔石墨电极表面上的吸附,具体机理有待进一步的研究。为了解离掉吸附于电极表面的污染物,在样品分离完成后将施加于各电极的电势变为 1000 mV 并维持 30 s,然后再变为 -1000 mV 维持 30 s。电极经过上述处理,10 次进样,各磺胺类药物信号响应的相对标准偏差为(RSD%):SA 7.45、SDZ 5.22、SMR 2.86、SMZ 4.57、SPD 3.11、STZ 3.07、SMTZ 5.44、SCP 3.32、SQX 3.10、SMX 3.43 和 SIA 4.64(未处理前,RSD 为 13%~21%,见图 3),可以满足样品分析的要求。

4 结 论

利用 HPLC 多孔石墨电极库仑阵列检测器及乙腈-氯仿混合液(乙腈:氯仿=10:1)提取方法可同时检测文中涉及的 10 种磺胺类药物(除 SQX 外,其提取收率低)。提取方法简单,选择性高,检测灵敏度高,方法稳定,适用于常规肉禽产品中磺胺类药物残留的检测。

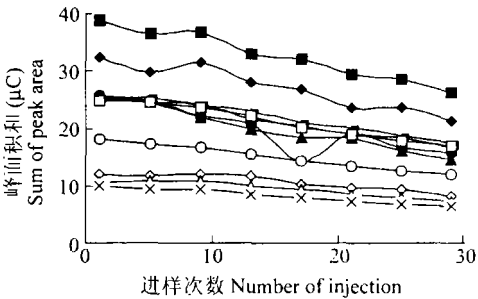


图 3 连续进样后磺胺类药物的信号衰减情况
Fig 3 The condition of signal attenuation of sulfa drugs after a series of injections
(■)磺胺(SA); (▲)磺胺嘧啶(SDZ); (●)磺胺噻唑(STZ); (■)磺胺吡啶(SPD); (●)磺胺甲基嘧啶(SMR); (○)磺胺甲噻二唑(SMTZ); (□)磺胺二甲基嘧啶(SMZ); (○)磺胺氯哒嗪(SCP); (○)磺胺二甲异噁唑(SIA); (○)磺胺甲基异噁唑(SMX); (×)磺胺喹噁啉(SQX)。图中的缩写同图 2 (the abbreviations are the same as in Fig 2)。

References

1 Coenegracht P M J, Franke J P, Metting H J. *Anal Chim. Acta*, **1973**, 65(2): 375~384
2 Padmarajah N, Kallanchira R S, Ramanathapura A V, Hemmige S Y. *Euro J. Pharm. Biopharm.*, **2002**, 53: 187~192
3 Tarbin J A, Clarke P, Shearer G. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 729: 127~138
4 Chen Yong(陈勇), Han Fengnei(韩凤梅), Yuan Zhuobin(袁倬斌). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **1995**, 23(11): 1281~1283
5 Cliquet P, Cox E, Haasnoot W, Schacht E, Goddeeris B M. *Anal Chim. Acta*, **2003**, 494: 21~28
6 Smallidge R L, Kentzer E J, Stringham K R, Kin E H, Lehe C, Stringham R W, Mundell E C. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **1988**, 71(4): 710~717
7 Hela W, Brandtner M, Widek R, Schuh R. *Food Chemistry*, **2003**, 83: 601~608

- 8 Takeda N, Akiyama Y. *J. Chromatogr. A*, **1991**, 558: 175 ~ 180
- 9 Stoev G, Michailova A. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 871: 37 ~ 42
- 10 Wang Jianhua (王建华), Lin Liming (林黎明), Chen Changfa (陈长法). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), **2002**, 21(4): 80 ~ 81
- 11 You T Y, Yang X R, Wang E K. *Analyst*, **1998**, 123(11): 2357 ~ 2360
- 12 Carrazon J M P, Recio A D, Diez L M P. *Talanta*, **1992**, 39(6): 631 ~ 635
- 13 Rao T N, Sarada B V, Tryk A D, Fujishima A. *J. Electroanal. Chem.*, **2000**, 491: 175 ~ 181
- 14 Combs M T, Ashraf-Khorassani M, Taylor L T. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1999**, 25: 301 ~ 308
- 15 Kim D H, Lee D W. *J. Chromatogr. A*, **2003**, 984: 153 ~ 158
- 16 Svendsen C N. *Analyst*, **1993**, 118: 123 ~ 129

Simultaneous Determination of Ten Sulfa Drugs in Chicken Meat by High Performance Liquid Chromatography- Coulometric Array Detector

Li Shuguang¹, Zhao Jingnei¹, Wang Wenxia¹, Jin Yu^{1,2}, Du Yuguang^{*1}

¹ (Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

² (Liaoning Normal University, Dalian 116029)

Abstract One-step extraction and high performance liquid chromatography (HPLC) with coulometric porous graphite electrode array detector method have been developed for the determination of ten sulfa drugs residues in chicken meat. The extraction recoveries of the ten sulfa drugs are higher than 50% with mixture of acetonitrile and chloroform (acetonitrile: chloroform is 10:1). The redox characteristics of the ten sulfa drugs on porous graphite electrode have been studied, and then the potential for detecting the sulfa drugs is fixed on 455, 560, 630, 670 and 710 mV on electrodes in series. The ten analytes have been separated very well on Hypersil BDS C₁₈ column with mobile phases containing acetonitrile and 30 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 5), and with a linear gradient eluting program of acetonitrile from 8.5% to 37.5% (V/V) in 40 minutes. The contaminant from chicken meat does not affect the separation of the ten sulfa drugs. The limit of detection is 40 µg/kg for SA and 20 µg/kg for SA, SDZ, SMR, SMZ, SPD, STZ, SMTZ, SCP, and SMX in chicken meat. There are good linear correlations between the peak areas and concentrations of the ten sulfa drugs, the linear range is 0.1 ~ 2.0 mg/L and the correlation coefficients are above 0.99. The electrode recovery is simple and can realize on-line cleanout. This method using HPLC-coulometric array detector is reproducible, and sensitive enough for the determination of sulfa drugs in chicken meat. It is easy to perform.

Keywords High performance liquid chromatography, coulometric array, sulfa drug

(Received 24 May 2004; accepted 29 November 2004)