

猪肉和牛奶中 10种磺胺类药物残留检测 超高效液相色谱法研究

胡海燕¹, 徐倩¹, 孙雷¹, 胡昊², 李丹¹, 朱馨乐¹, 王树槐¹, 袁汉成³

(1. 中国兽医药品监察所, 北京 100081; 2. 中国药科大学, 南京 211198; 3. 沃特世科技有限公司北京分公司, 北京 100025)

[收稿日期] 2009 - 07 - 08 [文献标识码] A [文章编号] 1002 - 1280(2009)08 - 0001 - 05 [中图分类号] S859.84

[摘要] 建立了猪肉和牛奶中磺胺嘧啶 (SD)、磺胺噻唑 (ST)、磺胺二甲嘧啶 (SM₂)、磺胺甲氧嘧啶 (SMP)、磺胺氯吡啶 (SPD)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺甲基异噁唑 (SMZ)、磺胺氯吡啶 (Esb3)、磺胺地索辛 (SDM)和磺胺喹噁啉 (SQ)共 10种磺胺类药物残留检测的超高效液相色谱 (UPLC)法。色谱条件:色谱柱为 Acquity UPLC BEH C₁₈柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm);流动相为 50%甲醇乙腈溶液 - 2%乙酸水溶液,梯度洗脱;紫外检测波长 270 nm;柱温 30 °C;进样量 4 μL;外标法定量。结果表明:10种组分在 20~1 000 ng/mL 浓度范围内,呈良好线性关系,相关系数 R²均大于 0.998;方法检出限为 20 ng/g,定量限为 50 ng/g;在猪肉和牛奶中添加浓度分别为 50、100、200 ng/g时,平均回收率为 75.1%~99.8%,批内、批间平均 RSD均小于 13.2%。

[关键词] 猪肉;牛奶;磺胺类药物;残留;UPLC

Simultaneous Determination of Ten Sulfonamides Residues in Pig Muscle and Milk by UPLC

HU Hai - yan¹, XU Qian¹, SUN Lei¹, HU Hao², LI Dan¹,
ZHU Xin - le¹, WANG Shu - hui¹, YUAN Han - cheng³

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198;

3. Waters China Ltd Beijing Branch, Beijing 100025; China)

Abstract: A UPLC method was established for ten sulfonamides including sulfadiazine (SD), sulfathiazole (ST), sulfadimidine (SM₂), sulfamethoxy pyridazine (SMP), sulfachloropyridazine (SPD), sulfamonomethoxine (SMM), sulfamethoxazole (SMZ), sulfachloropyrazine (Esb3), sulfadimethoxine (SDM) and sulfaquinoxaline (SQ) in pig muscle and milk. UPLC conditions: the chromatography column was Acquity UPLC BEH C₁₈ column of 2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm; mobile phase was acetonitrile - methanol (1:1, V/V) - water (2% acetic acid); Column temperature was 30 °C; Determination was by UV detection at 270 nm; Injection volume is 4 μL. The calibration curve was good linear between the peak areas and concentrations of sulfonamides from 20 to 1 000 ng/mL, the correlation coefficient R² > 0.998. The limit of detection was 20 ng/g. The limit of quantification was 50 ng/g. The average recoveries from spiked pig muscle and milk at the three concentrations of 50, 100 and 200 ng/g ranged from 75.1%~99.8%, and intra - day and inter - day (n=5) batch variation coefficients were less than 13.2%.

Key words: pig muscle; milk; sulfonamides drugs; residue; UPLC

作者简介: 胡海燕 (1956年 -), 女, 研究员, 主要从事兽药及兽药残留研究和检验。E - mail: huhaiyan@ivdc.gov.cn

磺胺类药物 (Sulfonamides) 是以对氨基苯磺酰胺为基本结构的衍生物 (基本结构图 1), 通过对 R、R' 不同取代剂的研究, 新型药物发展迅速, 逐渐形成以短效、中效和长效分类的系列抗菌药物, 并以疗效确切、性质稳定、价格低廉、使用方便等优势成为最广泛的临床用药之一。但由于磺胺类药物能发生过敏反应, 对泌尿系统有损害, 长期使用而耐药等副作用以及在动物抗感染治疗中不规范的使用, 造成动物源产品中的残留对人类和环境的危害和污染。欧盟、美国等发达国家及我国都规定了磺胺类药物在动物食品中的最高残留限量, 并被列入动物食品中重点监控的药物之一。

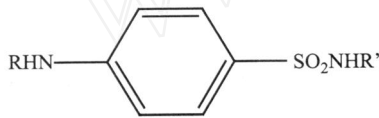


图 1 磺胺类药物基本化学结构

目前关于磺胺类药物残留检测的仪器方法有高效液相色谱法 (HPLC) 法^[1-4]和液质联用 (LC-MS/MS) 法^[5-7], 但因串联质谱仪要求条件较高, 价格昂贵, 使普及应用受到限制。超高效液相色谱是近年来美国 Waters 公司推出的一项液相色谱新技术, 其在分析速度、灵敏度和分离度方面显著优于 HPLC。目前 UPLC 的普及速度很快, 但有关兽药残留检测 UPLC 方法的研究报道不多, 本文针对中国兽药典 (2005 年版) 收载及兽医临床应用较多的磺胺嘧啶 (SD)、磺胺噻唑 (ST)、磺胺二甲嘧啶 (SM₂)、磺胺甲氧嘧啶 (SMP)、磺胺氯吡啶 (SPD)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺甲基异噁唑 (SMZ)、磺胺氯吡啶 (Esb3)、磺胺地索辛 (SDM) 和磺胺喹噁啉 (SQ) 共 10 种磺胺类药物进行了 UPLC 方法研究, 亦为兽药残留检测提供一种灵敏、快速、低成本、高通量的新方法。

1 材料与方法

1.1 仪器 超高效液相色谱仪 (Acquity™ UPLC), Waters 公司; 离心机 (biofuge Strators), Heraeus 公司; 旋转蒸发器 (Rescti-Them3), pierce 公司; Sep-Pak[®] Vac Alumina B 柱 (2 g/12cc), Varian 公司。

1.2 药品与试剂 对照品: 磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺氯吡啶钠、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺氯吡啶钠、磺胺地索辛、磺胺喹噁啉, 纯度均大于 99.0%, 中国兽医药品监察所; 磺胺噻唑、磺胺甲氧嘧啶, 纯度大于 99.0%, Dr Ehrenstorfer 公司; 乙腈、

甲醇为色谱纯, Fisher 公司; 乙酸、正己烷、正丙醇为分析纯; 水为超纯水。

1.3 标准溶液的配制 分别精密称取 10 种磺胺类药物对照品各约 25 mg 至 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度使成 1 mg/mL 标准储备液, -20 °C 冰箱中保存, 有效期为 3 个月; 分别量取标准储备液适量, 用甲醇稀释成浓度为 5 μg/mL 的标准工作液, 4 °C 冰箱中保存, 有效期为 1 个月。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件 色谱柱为 Acquity BEH C₁₈ 柱 (2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm); 流动相: 50% 甲醇乙腈溶液 (A) - 2% 乙酸水溶液 (B), 梯度洗脱见表 1; 柱温为 30 °C; 检测波长为 270 nm; 进样量为 4 μL。

表 1 流动相梯度表

时间 / min	流速 / (mL · min ⁻¹)	A / %	B / %
0	0.5	10	90
0.7	0.7	12	88
1.5	0.5	12	88
2.0	0.6	25	75
3.2	0.6	25	75
4.0	0.5	80	20
5.0	0.5	10	90
8.0	0.5	10	90

1.4.2 标液的重复性考察 准确量取 5 μg/mL 的 10 种磺胺类药物混合工作液适量, 制成 250 ng/mL 的标准溶液, 按上述色谱条件, 连续进样 5 次, 计算各组分峰面积的相对标准偏差 (RSD) 应小于 2%。

1.4.3 线性考察 精密量取标准工作液, 用流动相稀释成各组分浓度为 20、50、100、250、500、1 000 ng/mL 的系列混合对照溶液, 由低浓度到高浓度进样分析, 以绘制标准曲线, 考察各组分的线性关系。

1.4.4 样品前处理 取匀浆后猪肌肉组织 (5 ± 0.05) g, 置 50 mL 离心管中, 依次加入 10 mL 乙腈和 4 g 无水 Na₂SO₄, 振荡提取 5 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 上清液转移至另一 50 mL 离心管中, 重复提取一次, 合并上清液, 加入正己烷 10 mL, 振摇脱脂, 离心, 弃去正己烷层, 50 °C 浓缩至近干, 加入 95% 乙腈水溶液 3 mL 溶解后, 过预先用 95% 乙腈水溶液 10 mL 活化的 Alumina B 萃取柱, 再加 5 mL 同溶液重复溶解后, 一起过柱, 挤干, 用 70% 乙腈水溶液 10 mL 洗脱, 收集洗脱液, 加 5 mL 正丙醇, 浓缩至干, 加 2.0 mL 流动相溶解残余物, 过滤膜后上机测定。

取牛奶 (2 ± 0.05) g, 依次加入 5 mL 乙腈、2.0 g 无

水 Na_2SO_4 振荡提取,离心,转移上清液后,残渣再加 5 mL 乙腈重复提取一次,合并上清液,加入正己烷 5 mL,其余步骤同上,最后加 1 mL 流动相溶解上机。

1.4.5 灵敏度的确定 取标准工作液适量,加入空白猪肉和牛奶中制成 10、20 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度的添加样品,经上述方法前处理后,用 UPLC 检测,观察不同浓度各组分色谱峰信噪比 (S/N), $S/N \geq 3$ 者,定其为方法的检出限; $S/N \geq 10$ 者,定其为方法的定量限。

1.4.6 准确度和精密度的确定 采用标准添加法,在空白猪肉和牛奶中添加 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度的样品,每个浓度做 5 个平行样,重复 3 次,外标法定量,考察各组分回收率和批内、批间 RSD 。

2 结果

2.1 标液的重复性 结果显示,SD、ST、 SM_2 、SMP、SPD、SMM、SMZ、Esb3、SDM、SQ 峰面积的 RSD 分别为 0.28%、0.45%、1.47%、1.41%、0.44%、0.46%、0.40%、1.15%、0.60% 和 0.25%,均小于 2%,表明在该色谱条件下检测,各组分精密度良好。

2.2 标准曲线 各组分回归方程和相关系数 (R^2) 见表 2,10 种磺胺类药物在 20 ~ 1 000 ng/mL 浓度范围内呈良好线性关系, R^2 均大于 0.998。

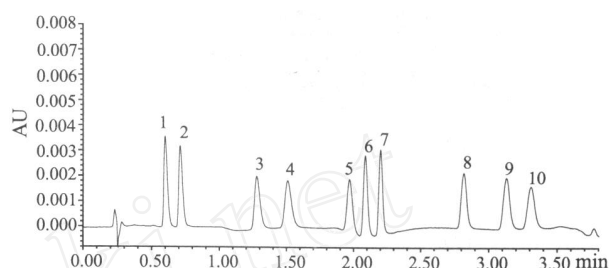
表 2 10 种磺胺类药物回归方程和相关系数

名称	回归方程	R^2
SD	$y = 26.26x + 9.509$	0.99999
ST	$y = 25.20x - 9.221$	0.99993
SM_2	$y = 20.36x - 62.15$	0.99998
SMP	$y = 21.36x - 45.65$	0.99996
SPD	$y = 23.09x + 276.4$	0.99826
SMM	$y = 27.17x + 1.194$	0.99858
SMZ	$y = 25.34x - 78.07$	0.99996
Esb3	$y = 23.77x - 4.841$	0.99991
SDM	$y = 25.83x - 51.06$	0.99995
SQ	$y = 23.37x - 69.40$	0.99993

2.3 方法灵敏度 按上述方法处理,在猪肉和牛奶中当添加浓度为 20 ng/g 时,测得各组分 S/N 符合检出限的要求;当添加浓度为 50 ng/g 时,测得各组分 S/N 符合定量限的要求。

2.4 方法准确度和精密度 10 种磺胺类药物标准溶液、空白猪肉和牛奶以及在两个基质中添加样品得到的色谱图分别见图 2~图 6。在空白猪肉和牛奶中添加三个不同浓度的 10 种磺胺类药物回收率试验结果分别见表 3、表 4。结果表明,10 种组分的平均回收率在 75.1% ~ 99.8% 之间,批内和批间的

平均 RSD 13.2%。



1 - SD; 2 - ST; 3 - SM_2 ; 4 - SMP; 5 - SPD; 6 - SMM; 7 - SMZ; 8 - Esb3; 9 - SDM; 10 - SQ。图 5、图 6 同。

图 2 250 ng/mL 磺胺类药物标准溶液色谱图

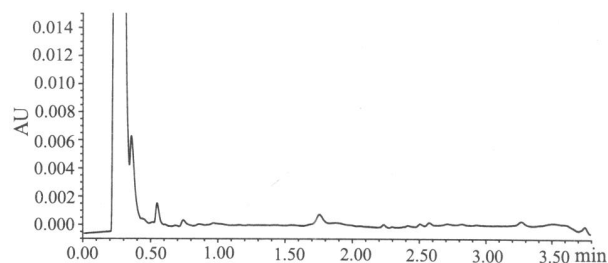


图 3 空白猪肉组织色谱图

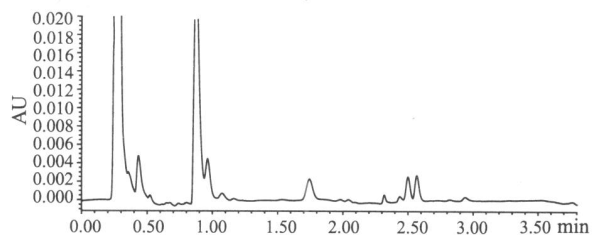


图 4 空白牛奶色谱图

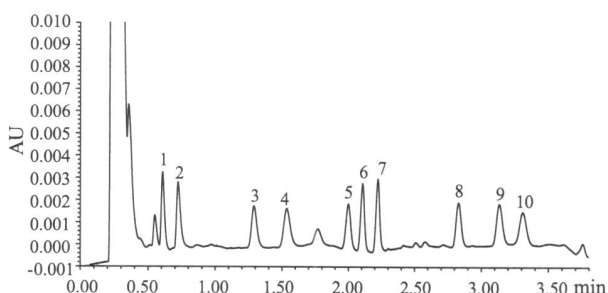


图 5 100 ng/g 空白猪肉添加样品色谱图

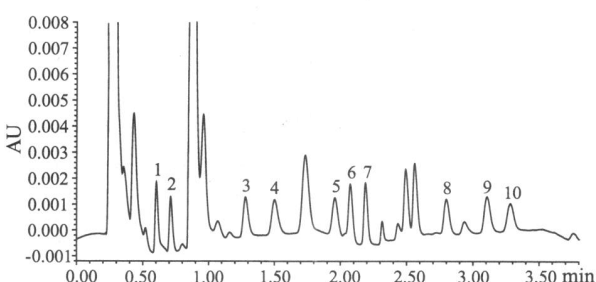


图 6 100 ng/g 空白牛奶添加样品色谱图

表 3 空白猪肉中添加 10 种磺胺类药物

回收率试验结果 ($n=5$)

名称	添加浓度 /($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均回 收率 / %	批内平均 RSD / %	批间平均 RSD / %
SD	50	80.7	4.94	2.00
	100	89.6	6.27	7.44
	200	84.0	7.25	6.64
ST	50	98.9	10.2	8.16
	100	99.8	6.97	1.65
	200	77.4	10.7	3.20
SM ₂	50	86.8	6.85	2.85
	100	91.8	6.55	5.87
	200	89.8	6.18	3.78
SMP	50	95.7	7.11	7.33
	100	96.7	7.74	3.75
	200	76.7	6.72	2.20
SPD	50	91.4	5.96	7.27
	100	91.0	5.93	12.8
	200	80.7	5.71	7.28
SMM	50	82.5	6.94	5.61
	100	95.0	7.61	4.59
	200	82.9	4.75	1.80
SMZ	50	90.3	13.2	5.09
	100	98.8	4.63	3.12
	200	81.7	3.99	0.69
Esb3	50	86.3	8.89	8.45
	100	90.4	9.31	3.41
	200	77.7	4.81	1.28
SDM	50	84.5	7.48	4.33
	100	92.0	9.67	2.21
	200	77.3	5.87	0.88
SQ	50	84.4	6.36	1.33
	100	93.3	9.31	4.03
	200	78.2	8.91	4.70

表 4 空白牛奶中添加 10 种磺胺类药物

回收试验结果 ($n=5$)

名称	添加浓度 /($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	平均回 收率 / %	批内平均 RSD / %	批间平均 RSD / %
SD	50	77.6	7.22	3.27
	100	81.2	7.58	7.02
	200	87.8	5.96	2.79
ST	50	75.1	4.28	0.32
	100	76.9	6.93	7.52
	200	81.5	6.15	8.79
SM ₂	50	81.7	7.55	2.75
	100	78.3	3.97	6.75
	200	86.6	6.83	0.29
SMP	50	98.2	10.0	3.53
	100	86.6	4.54	4.86
	200	89.8	5.60	0.94
SPD	50	93.0	7.38	3.03
	100	86.9	6.15	5.99
	200	88.8	6.92	5.02
SMM	50	92.4	12.9	1.58
	100	83.7	5.94	8.94
	200	95.3	5.70	4.40
SMZ	50	92.3	8.09	2.15
	100	86.9	4.89	5.49
	200	90.0	4.99	4.37
Esb3	50	88.0	4.59	4.55
	100	77.4	6.73	3.20
	200	84.1	8.29	5.72
SDM	50	87.5	8.07	2.17
	100	83.8	5.57	5.64
	200	87.1	5.89	3.05
SQ	50	86.5	5.93	0.49
	100	83.8	8.63	7.68
	200	83.2	7.32	5.31

3 讨论

3.1 利用 UPLC 速度快、灵敏度和分离度高的优势,依据 10 种磺胺类组分的性质选择较佳的流动相洗脱梯度及对应流速和进样量等色谱条件,使各组分在 3.5 min 内完成分离。为了保证良好的重现性,在组分完成分离后,提前增加了洗柱步骤,即在梯度 4.0 min 时,流动相 A 比例由 25% 增加至 80%,流速恢复 0.5 mL/min,以除去溶剂和富集杂质的干扰,再平衡色谱柱 2~3 min,可达到良好的效果。

3.2 本文在猪肉和牛奶两种基质中的前处理步骤参照了有关文献 [1] 方法,仅在取用量上有所不同,试验表明,猪肉和牛奶分别取用 5 g 和 2 g 样品检测在灵敏度、回收率和处理效果上较为合适。尽管对于牛奶中杂质的净化效果不够理想,但对有效成分的测定干扰不大,不影响准确定量,从而保证了

方法的良好通用性。

3.3 我国规定了 SM₂ 在牛奶中最高残留量为 25 ng/g,笔者仅对该 10 种磺胺类药物中的 SD、SM₂ 和 SMZ 做了 25 ng/g 定量限考察,结果符合定量限的要求,但由于兼顾其他组分同时完成上述回收试验,故本文未单独就 SM₂ 做相关数据报道。

3.4 采用 HPLC 法进行磺胺类药物多残留检测的研究,有很多报道,但鉴于多组分分离的困难,一般只能为分离度而牺牲分析速度,且分离组分越多,检测样品耗时越长。目前监督检验测定 5 种该类药物,需耗时 25~30 min^[1],而本文采用 UPLC 法检测 10 种 (包含前 5 种) 磺胺类药物仅需 8 min,显著缩短了检测时间。结果表明,该方法简便、快速、可操作性强,检测时效高,适合于实验室常规批量检测。

(下转第 17 页)

分是其代谢产物 MBZ - NH₂ 和 MBZ - OH;除了鳃皮肤外, MBZ和 MBZ - OH在欧鳗各脏器中降解消除速度快,但 MBZ - NH₂ 在欧鳗此五部分组织器官中残留时间长,短时间内无法彻底降解。因此,虽然目前我们关注了甲苯咪唑残留毒性,但其代谢产物 MBZ - NH₂ 残留问题也应该得到足够重视,在合理用药和制定休药期时同样需要给予考虑。

参考文献:

- [1] Tolstoj V A, Lytvynets A, Langrova I Pro - oxidant Effects of Mebendazole in Albino Rats Experimentally Infected with *Trichinella spiralis* [J]. Parasitol Res, 2007, 100: 1277 - 1280.
- [2] Stig Mellergaard Mebendazole Treatment against *Pseudodactygnus* Infections in Eel *Amguilla anguilla* [J]. Aquaculture, 1990, 91: 15 - 21.
- [3] 张宝忠, 陈会波, 翁燕珍, 等. 甲苯咪唑治疗欧洲鳗伪指环虫病的研究 [J]. 水利渔业, 1997, 1: 21 - 22.
- [4] 林炫锋. 甲苯咪唑在鳗病防治上的应用 [J]. 中国水产, 1998, 12: 29.
- [5] 殷为勇, 郑荣远, 杨学志, 等. 甲苯咪唑药物不良反应文献分析 [J]. 药物流行病学杂志, 2008, 17(2): 84 - 87.
- [6] Brugmans J P, Thienpont D C, Van Wijngaarden I, et al Mebendazole in Enterobiasis: Radio Chemical and Pilot Clinical Study in 1278 Subjects [J]. JAMA, 1971, 217: 313 - 316.
- [7] Allan R J, and Watson T R. Identification of Biliary Metabolites of Mebendazole in the Rat [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1982, 7: 131 - 136.
- [8] Meuldemans W E G, Hurkmans R M A, Lauwers W F J, et al The *In vitro* Metabolism of Mebendazole by Pig, Rat and Dog Liver Fractions [J]. Eur J Drug Metab Pharmacokinet, 1976, 1: 35 - 40.
- [9] Gottmans H, Kroker R, and Ungemach F R. Investigations on the Biotransformation of Mebendazole Using an Isolated Perfused Rat Gut System [J]. Xenobiotica, 1991, 21: 1431 - 1439.
- [10] 李志青, 樊海平, 曾占壮, 等. 复方甲苯咪唑对拟指环虫的杀灭效果和对欧洲鳗的毒性 [J]. 浙江农业学报, 2000, 12(4): 221 - 223.
- [11] 李海燕, 李桂峰. 甲苯咪唑对鱼的急性毒性试验及驱虫效果研究 [J]. 广州大学学报, 2005, 4(1): 33 - 35.
- [12] Steenbaar J G, Hajee C A, Haagsma N. High Performance Liquid Chromatographic Determination of the Anthelmintic Mebendazole in Eel Muscle Tissue [J]. J Chromatogr, 1993, 615(1): 186 - 190.
- [13] Valois M E, Takayanagi O M, Bonato P S, et al Determination of Albendazole Metabolites in Plasma by HPLC [J]. J Anal Toxicol, 1994, 18(2): 86 - 90.
- [14] Hajee C A J, Haagsma N. Liquid Chromatographic Determination of Mebendazole and its Metabolites Amino - mebendazole and Hydroxy - mebendazole in Eel Muscle Tissue [J]. J AOAC Int, 1996, 79: 645 - 651.
- [15] 乐涛, 余永新, 柳江英, 等. 固相萃取 - 反相高效液相色谱测定牛奶中米诺环素残留量的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(1): 270 - 272.
- [16] 辛丹敏, 周光明, 黄成, 等. 基质固相分散 - 高效液相色谱分析奶粉中残留的左旋咪唑和甲苯咪唑 [J]. 分析试验室, 2008, 27(S1): 365 - 367.

(上接第 4 页)

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业部. 无公害食品 猪肉 (NY5029 - 2001) 附录 E 磺胺类药物在动物可食性组织中残留的高效液相色谱检测方法 [S].
- [2] 王曼霞, 林黎明, 刘心同, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中 8 种磺胺类药物残留量 [J]. 化学分析计量, 2004, 13(2): 14 - 16.
- [3] 吴银良, 赵莉, 刘鲁军, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱法同时测定牛奶中残留的 9 种磺胺类药物 [J]. 色谱, 2007, 25(5): 728 - 731.
- [4] 林海丹, 谢守新, 冯德雄, 等. 动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取 - 高效液相色谱法测定 [J]. 分析测试学报, 2003, 22(1): 94 - 96.
- [5] 董丹, 邵兵, 吴永宁, 等. 液相色谱 - 电喷雾串联四极杆质谱法测定鸡肉中 17 种磺胺类药物的残留 [J]. 色谱, 2005, 23(4): 404 - 407.
- [6] 农业部 781 号公告 - 12 - 2006 牛奶中磺胺类药物残留测定液相色谱 - 串联质谱法 [S].
- [7] Forti A F, Scortichini G. Determination of Ten Sulphonamides in Egg by Liquid Chromatography - tandem Mass Spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2009, 637(1/2): 214 - 219.