

饲料中八种磺胺药物的高效液相色谱测定

秦 燕, 张美金, 林海丹, 陈 捷

(广州出入境检验检疫局 食品检验中心, 广东 广州 510623)

摘 要: 结合液、液分配和固相萃取, 建立了同时分析食用动物饲料中磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧吡嗪、磺胺甲基异 唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶和磺胺喹 啉 8 种磺胺类药物的高效液相色谱方法。比较和优化了不同的提取方法和净化参数, 方法对饲料中磺胺的检出限为 $0.20 \times 10^{-6} (w)$, 八种磺胺添加水平为 $1 \times 10^{-6} (w)$ 时, 回收率在 68% 以上, 相对标准偏差小于 12%。

关键词: 磺胺; 饲料; 高效液相色谱

中图分类号: O657.72; R978.2 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2004)04- 0088- 04

Determination of 8 Sulfonamides in Feed by HPLC

QIN Yan, ZHANG Mei_jin, LIN Hai_dan, CHEN Jie

(Food Inspection Center, Guangzhou Entry- Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: An effective method was developed to determine 8 sulfonamide drugs in animal feed by liquid- liquid extraction (LLE), solid phase extraction (SPE) and HPLC. The analyzed compounds were sulfadiazine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxyypyrazine, sulfamethoxazole, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine and sulfaquinolaxine, respectively. The extraction and cleanup parameters were discussed and optimized. The detection limits of these SAs in feed were $0.20 \times 10^{-6} (w)$. The recoveries from spiked feed samples (spiked level = 1 mg/kg) were over 68%, the RSD was less than 12%.

Key words: Sulfonamides; Feed; HPLC

因滥用抗生素而产生耐药的人体致病菌问题已经引起了全球范围内的高度关注。研究表明兽医临床和畜牧业中广泛应用的磺胺类(sulfonamides, SAs)药物可能更易诱导菌株因选择压力而产生耐药性。此外, SAs 药物还有过敏反应、尿和造血功能紊乱等副作用。如磺胺二甲嘧啶等可能诱发啮齿类动物如鼠的甲状腺增生或肿瘤。据此和对外贸易方面的原因, 近年来欧盟及日本等国家对其使用和食品中的残留限量作出了越来越严格的限量规定。

饲料添加是 SAs 在畜牧业中主要的用药方式。较低剂量的磺胺类药物作为预防和治疗用药曾广泛地用于食用动物饲料中, 用以提高饲料转化率, 治疗慢性感染。目前这方面的应用已受到限制, 但违规使用情况仍时有发生。现今大量使用的饲料已从单一的常规饲料进入到配合饲料时代。与血清、尿液和肌肉等生物基质不同的是, 配合饲料的主要基质为碳水化合物、蛋白质原料, 并使用了各种添加剂, 主要包括营养物质、健康生长促进剂、贮存添加剂和改善饲料质量添加剂等。由于各种添加成分的干扰, 无法用酶联免疫或放射免疫进行饲料中磺胺类抗生素的快速筛选。高效液相色谱法(HPLC)对生物基质中多种磺胺残留的分析已经有很多成熟方法^[1, 2], 而针对饲料中磺胺的分析报道却很少, 药物残留检测监控对象前移迫切需要建立高效准确的筛选方法。作者结合液、液分配和固相萃取等前处理方法, 探讨了家禽、猪等食用动物饲料样品中磺胺类药物的提取、净化, 建立了饲料中 8 种常添加磺胺类药物的 HPLC 方法。

1 实验部分

1.1 主要试剂

标准品磺胺嘧啶(sulfadiazine, SD)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SM₁)、磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine, SM₂)、磺胺甲氧吡嗪(sulfamethoxyypyrazine, SMP)、磺胺甲基异 唑(sulfamethoxazole, SMZ)、磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMM)、磺胺间二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine, SDM)和磺胺

收稿日期: 2004- 02- 17; 修回日期: 2004- 04- 28

作者简介: 秦 燕(1975-), 女, 江苏淮安人, 工程师, 博士。

喹啉(sulfaquinoxaline, SQX)均购自Sigma公司,纯度为95%~99%;甲醇(色谱纯);乙酸乙酯(EtOAc)、乙酸、偏磷酸、氯化钠等(分析纯);Waters OASIS MCX(60 mg/3mL)固相萃取SPE柱。

标准溶液:用甲醇配制SAs混合贮备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光存放。校正标准工作溶液用流动相稀释贮备液,现配现用。

1.2 主要仪器

Waters 高效液相色谱仪:515泵,2487紫外检测器,717自动进样器,Waters TCM柱温箱,Millennium²软件数据系统;ZYMARK水浴氮气吹干仪;半自动固相萃取仪;MilliQ纯水发生器(Bedford公司,USA)等。

1.3 实验方法

1.3.1 样品提取 称取5g已研磨的饲料样品,加入50mL提取溶液甲醇-1.0%(φ)偏磷酸(体积比20:80),振摇湿润后置于水浴中超声5min。取上层液4000 r/min下离心10min。

1.3.2 净化 吸取离心上清液10mL,用4mol/L NaOH调节溶液pH至6.5~7.0左右,加入约0.5g NaCl和10mL乙酸乙酯,涡动30s,4000 r/min离心5min。移取上清液,再重复乙酸乙酯萃取两次,转移合并上层有机相,过无水硫酸钠后用氮气流 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴吹干。用2mL 0.1mol/L盐酸溶液涡动溶解残留物,取1mL上样于预先已分别用3mL甲醇、3mL水和0.04mol/L盐酸活化处理过的SPE柱,保持自然流速过柱。然后分别用3mL水、3mL 0.04mol/L盐酸和甲醇洗涤SPE柱,最后用5mL 5%(φ)氯化甲醇洗脱,收集洗脱液。取1mL洗脱液用氮气流 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴浓缩至近干后用流动相溶解至1.0mL,必要时过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜,清液进行HPLC测定。

1.3.3 液相色谱条件 Cloversil C₁₈ 250mm \times 4.6mm i. d., $5\text{ }\mu\text{m}$ 色谱柱;柱温 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$;流动相: pH 3的1%(φ)乙酸(A)和甲醇(B);洗脱梯度: 0.01min 35%(φ)B, 21.5min 65%(φ)B,保持至32min;流速: 1.0 mL/min;紫外检测波长: 270 nm;进样量: 20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 八种磺胺的HPLC行为

SAs属酸碱两性物质,为防止键合相表面残余的硅醇基因氢键键合和离子交换导致的次级保留效应,选择填料中游离硅醇基含量较小的碱性色谱柱,并采用酸性流动相(离子抑制)。按上述HPLC梯度洗脱条件,随有机相比例增加,8种极性差异较大的磺胺得到了很好的基线分离,峰形对称,保留时间合适,避开了饲料中极性杂质的干扰峰,见图1。

SAs标准曲线的回归方程见表1。在0.02~1.0 mg/L的质量浓度范围内,8种磺胺的峰面积($Y, \mu\text{V}\cdot\text{s}$)与质量浓度($X, \text{mg}/\text{L}$)呈显著线性相关。

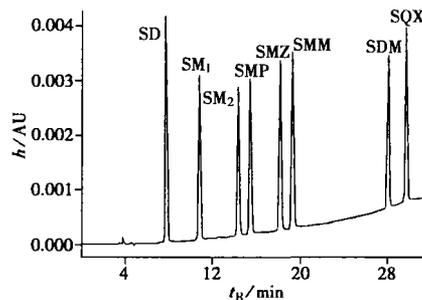


图1 8种磺胺的液相色谱图
Fig. 1 HPLC chromatogram of 8 SAs

表1 8种磺胺校准曲线的回归方程

Table 1 The linear regression equations of calibration curves for eight SAs

Compound	Linear equations	Correlation coefficient r
SD	$Y = 1.66 \times 10^6 X + 1.87 \times 10^3$	0.9997
SM ₁	$Y = 1.29 \times 10^5 X + 1.13 \times 10^3$	0.9998
SM ₂	$Y = 1.20 \times 10^5 X + 1.29 \times 10^3$	0.9999
SMP	$Y = 1.22 \times 10^5 X + 1.09 \times 10^3$	0.9998
SMZ	$Y = 1.29 \times 10^5 X + 1.23 \times 10^3$	0.9998
SMM	$Y = 1.43 \times 10^5 X + 1.19 \times 10^3$	0.9998
SDM	$Y = 1.08 \times 10^5 X + 8.27 \times 10^2$	0.9999
SQX	$Y = 1.19 \times 10^5 X + 6.89 \times 10^2$	0.9999

2.2 样品前处理

2.2.1 提取溶剂的选择 比较了各种单一有机溶剂、酸碱缓冲液和缓冲液-有机溶剂混合体系的提取效果。单一的有机溶剂提取杂质多,给后续的净化带来困难。根据饲料样品中的脂肪、蛋白和水含量均比较低和SAs的弱碱性特点,采用酸性缓冲液提取,同时加入适量的有机溶剂,可沉淀有机质,改善提取液的浊度,但比例不宜过高,以免带入过多的共萃取杂质。选择1.0%偏磷酸-甲醇(体积比80:20)为提取溶剂。

2.2.2 液液分配净化条件优化 饲料基质复杂,提取溶剂直接进行固相萃取回收率和净化效果均不理想,可能是因为共萃取杂质影响了磺胺在固体填料上的保留和洗脱行为,甚至引起过载。因此需先进行液液萃取净化。比较了二氯甲烷、三氯甲烷和EtOAc等的反萃取效果,选择EtOAc作为萃取溶剂。

(1) pH的优化 利用SAs的两性进行水相/有机相的液-液分配萃取,水相pH的调整是关键。SAs的一般结构见图2。与S原子相连的仲胺基N(标记为N¹)在pH>5.5~7时解离出H⁺,与苯环相连的伯胺基N(标记为N⁴)在pH<2.5时质子化。因此,除磺胺脒等外,大部分磺胺在酸性条件下带正电荷,碱性条件下带负电荷,pH2.5~6的范围内呈电中性,参见表2。

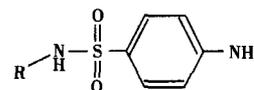


图2 磺胺药物的基本结构
Fig.2 The basic structure of SAs drugs

表2 不同pH下EtOAc的SAs液-液萃取回收率
Table 2 Recoveries of liquid-liquid extraction at different pH values with EtOAc

Compound	pK _a ^[3]	R/%				
		Deionized water buffer system*			Feed sample**	
		pH 5.0	pH 6.5	pH 9.0	pH 5.0	pH 6.5
SD	6.4	89.0	86.4	52.2	84.1	80.3
SM ₁	7.0	93.2	90.3	67.1	85.2	88.2
SM ₂	7.5	94.7	88.7	70.0	87.2	86.5
SMP	7.2	85.9	86.9	63.0	76.5	85.4
SMZ	5.4	92.6	84.6	47.9	89.7	87.4
SMM	6.5	90.4	89.7	53.4	80.3	81.6
SDM	6.2	88.7	82.2	55.8	75.0	83.1
SQX	5.5	88.1	83.6	48.2	76.6	78.8

* deionized water buffer system: NH₄Ac- AcOH (pH 5.0), Na₂HPO₄- AcOH (pH 6.5), Na₂CO₃- NaHCO₃ (pH 9.0); SAs concentration: 1.0 mg/kg ** spike level in chicken feed: 1.0 mg/kg

表2列出了不同pH的缓冲液用EtOAc萃取的效果。从表2可以看出,对于不同pH的去离子水磺胺溶液,当pH>7时,SAs N¹的解离程度增加,pH9.0时EtOAc的萃取回收率明显下降。当pH为5.0时,回收率最高,这是因为与pH6.5相比,其更小于相应磺胺的等电点,对N¹的质子解离抑制程度更高的缘故。但是实验发现,对饲料加标样品,其最佳回收时对应的pH值却发生了变化,pH6.5时回收率最高,可能是样品中其它基质的影响所致。Haller^[4]等在对湿肥料中磺胺含量分析的液-液萃取时,也发现了与纯水的磺胺溶液相比,最佳回收pH增高的现象,并认为可能是不同颗粒的吸附作用随pH变化不同而引起的。

测试的8种磺胺pK_a值接近,因此液液萃取采用合适的pH6.5~7.0时,样品回收率可达到约80%以上。要指出的是,对磺胺pK_a间差异较大时的多组分分析,尤其是含有碱性较强的SAs如氨苯磺胺或磺胺吡啶时,单一pH很难兼顾到各个组分均达到较理想的萃取率。

(2) 其它因素的优化 将萃取时间从30s延长到3min,回收率没有明显变化,这说明SAs由水相向有机相的转移主要是由其在两相间的分配系数所驱动。增加萃取次数回收率明显提高,实验表明进行3次萃取后,萃取基本完全。实验还比较了不同电解质的盐析效果。NaCl与Na₂SO₄都能促进SAs向有机相转移,但前者的共萃取杂质相比较少,因此在萃取时向水相添加约0.5g的NaCl。

2.2.3 固相萃取 比较了不同的C₁₈柱,HLB柱和MCX柱的净化效果。实验表明,对饲料基质MCX的净化效果最为理想,参见图3。它利用HLB反相填料上的强阴离子-SO₃H基团与酸性条件下荷正

电的 SAs 进行离子交换吸附, 以除去基质中的酸性或中性杂质; 利用甲醇的反相洗脱作用洗涤去除疏水性杂质, 最后通过改变 SAs 的荷电性质用溶剂将其洗脱, 选择性好。

2.3 方法检出限和回收率

按照 1.3.3 条件, 将标准溶液稀释进样, 以 2 倍信噪比确定 8 种磺胺的检出限为 $0.020 \times 10^{-6} (w)$ 。考虑样品的前处理稀释因子, 方法对饲料的检出限为 $0.20 \times 10^{-6} (w)$ 。对空白猪饲料和禽饲料添加 $1 \times 10^{-6} (w)$ 时, 测定 8 种磺胺的回收率 ($n=4$)。其回收率范围分别为 68% ~ 82% 和 78% ~ 88%, 相对标准偏差范围则为 6.4% ~ 12.3% 和 5.7% ~ 9.2%。饲料中磺胺的添加一般作为预防或治疗用途, 添加水平在 $1 \times 10^{-6} (w)$ 以上, 因此此方法可满足检测要求。

3 结 论

本文研究了饲料中多种磺胺的高效液相色谱筛选方法, 结合液-液萃取和固相萃取, 可以实现多数家禽和猪饲料等样品中 8 种磺胺药物的分析, 并可串联二极管阵列检测器进行定性。但是, 对于某些饲料如养鳗饲料, 由于水产动物饲料赋形剂载体的特殊性, 净化效果不稳定, 杂质峰较多, 对 8 种磺胺的同时检测存在难度, 可选用质谱离子对(MRM)检测方式。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 王建华, 林黎明, 陈长法. 鸡肉中的多种磺胺兽药残留量测定的高效液相色谱-电化学检测法[J]. 分析测试学报, 2002, 21(4): 79-81.
- [3] 李俊锁, 李西旺, 魏广智, 等. 鸡肝组织中磺胺类药物多残留分析法[J]. 畜牧兽医学报, 2002, 33(5): 468-472.
- [4] HALLER M Y, MULLER S R, MCARDILL C S, *et al.* Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr, A, 2002, 952: 111-120

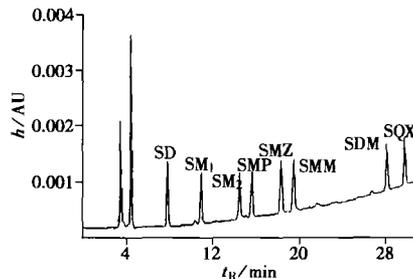


图 3 加标样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of spiked feed

Ref NO .20040422

网上仪器展览推出“仪器专场展示”

由中国分析测试协会主办、中国仪器仪表学会分析仪器学会协办、仪器信息网(www.instrument.com.cn)承办的网上仪器展览(www.netshow.com.cn)平台自开通以来, 受到广大业界人士的关注和欢迎, 大家足不出户, 即可查到所需仪器产品和厂商的详细资料。目前, 已有 260 多家国内外著名仪器厂商参展, 展出仪器 1500 多台(含图片和详细文字介绍), 发布各类仪器应用文章 700 多篇。

为更好地帮助广大仪器用户在采购仪器时, 能进行充分地比较, 选到适合的仪器, 获取足够多的相关信息和知识, 网上仪器展览推出了“仪器专场展示活动”, 目前开设的仪器专场有: 气相色谱, 液相色谱, 离子色谱, 薄层色谱, 毛细管电泳, 核磁共振, X 射线衍射仪, 粘度计, COD 测定仪, BOD 测定仪, 热分析仪, 水分测定仪, 电位滴定仪, 电导仪, 生化培养箱, 紫外可见, 原子吸收, 近红外光谱, 红外光谱, 光电直读光谱, 原子荧光, X 荧光光谱仪, 拉曼光谱, ICP-AES, 扫描探针显微镜, 电子显微镜, 红外气体分析仪, 研磨机, 热解析仪, 色差计, GC-MS, LC-MS, ICP-MS, 生物质谱, 微波消解, 甲醛分析仪, 粒度分析仪, 硬度计, 材料试验机, 天平, 离心机, PCR, 冻干机, 气体发生器, 纯水器。

近期, 还将开出“水质分析”、“农药残留”、“土壤分析”等仪器专场。

每个专场将不同型号的同类仪器进行同步展示, 可任意选择两台仪器进行比较, 并将每台仪器的样本、应用文章也发布出来, 供大家参考, 免去了大家平时选购仪器须东奔西跑找资料之苦。并可在网上直接向厂商询价。此外, 大家还可就每台仪器进行具体讨论交流。

此项活动的另一个目的是帮助广大分析工作者更好地了解仪器的最新进展, 掌握更多的仪器采购和仪器维护知识。

欢迎大家访问: www.netshow.com.cn(仪器信息网 www.instrument.com.cn 供稿)

2004-4-22