

牛奶中 6 种磺胺类药物残留的 HPLC 测定

项智锋 陈军^a 张安邦^a

(河南科技学院动物科学院 河南省新乡市华兰大道 453003)

^a(河南科技学院化工系 河南省新乡市 453003)

摘 要 牛奶样经乙腈提取, 固相萃取, 高效液相色谱 (HPLC) 检测牛奶中 6 种磺胺类药物残留。考察了样品的抽提及色谱分析条件。在最佳层析条件下, 回收率为磺胺嘧啶 (SDA): 85.99%、磺胺一甲基嘧啶 (SME): 94.18%、磺胺二甲嘧啶 (SMX): 97.89%、磺胺恶唑 (SMZ): 92.35%、磺胺一甲氧嘧啶 (SMM): 88.72%、磺胺二甲氧嘧啶 (SMO): 92.94%; 检出限 SDA: 0.41ppb, SME: 0.86ppb, SMX: 0.09ppb, SMZ: 0.45ppb, SMM: 0.19ppb, SMO: 0.08ppb。

关键词 高效液相色谱, 磺胺类药物, 固相萃取, 牛奶。

中图分类号: O 657.7⁺ 2

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2008)05-0935-04

1 引言

磺胺类药物 (Sulfonamides, SAs) 是一类用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物。因其在抑菌方面高效而价廉, 所以被广泛运用。由于奶牛乳房炎的高发生率, 在奶牛业中 SAs 的应用非常普遍。而 SAs 在动物性食品中容易残留, 危及人体健康, 因此许多国家都规定了食品和饲料中 SAs 的残留限量。我国规定 SAs 总量不得超过 0.3mg/kg, 奶中磺胺二甲嘧啶不得超过 0.025mg/kg^[1]。SAs 残留的检测方法很多^[2-6], 但牛奶中的 SAs 残留检测方法报导很少。本研究建立了一种可同时检测牛奶中 6 种磺胺类药物 HPLC 法, 对色谱分离条件进行了优化, 考察了方法的检出限、回收率, 获得了良好的分析结果。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Agilent1100 高压液相色谱仪 (德国 Chanhute 公司); Pute 300 超纯水装置 (广州仪科实验室技术有限公司); RC25C, RC3C 离心机 (美国杜邦公司); RE-52A 旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); Photodiode8453 紫外光-可见光光谱仪 (德国 Chanhute 公司); V isip rep 多歧管真空固相萃取装置 (美国 Suplco 公司); LC'A lum ina-BSPETubes (3mL) 碱性氧化铝柱 (美国 Supelco 公司)。0.45 μ m 微孔滤膜。

2.2 试剂与溶液

磺胺嘧啶 (SDA), 磺胺一甲基嘧啶 (SME), 磺胺二甲嘧啶 (SMX), 磺胺恶唑 (SMZ), 磺胺一

基金项目: 河南科技学院人才引进资助项目 (No. 040123)

联系人: 电话: (0373) 3040833; 手机: (0) 15037374649; E-mail: zhifeng7809@yahoo.com.cn

作者简介: 项智锋 (1978—), 男, 湖北省武穴市人, 讲师, 主要从事畜牧兽医学科研究工作。

收稿日期: 2008-07-02; 接受日期: 2008-07-28

甲氧嘧啶(SMM), 磺胺二甲氧嘧啶(SMO) 准品: 含量 99% (美国 Sigma 公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Merck 公司); 实验用水为超纯水。

2.3 溶液的配制

准确称取 0.010g 各样品磺胺类药物, 溶于装有 25mL 甲醇的 100mL 定量瓶内, 即为 100mg/L 的磺胺储备溶液。以超纯水稀释至标线, 以棕色玻璃瓶盛装, 置于冰箱内以 4℃ 保存备用。分别取 100mg/L SDA、SME、SMX、SMZ、SMM、以及 SMO 储备溶液各 1mL, 置于 100mL 定量瓶内, 以超纯水稀释至标线, 即为磺胺剂混合样品 1mg/L 标准溶液, 此混合标准溶液于每次分析前配制。

2.4 样品制备与净化

准确吸取奶样 5mL, 置于 50mL 离心管中, 加适量的无水硫酸钠和 25mL 乙腈, 涡流振动 15s, 中速振荡 20min, 3000r/min 离心 5min。上清液移至 100mL 的分液漏斗中, 加入 30mL 正己烷, 振荡后静置分离乙腈层。用 25mL 乙腈将沉淀物重复提取 1 次, 乙腈层经同一份正己烷分配。合并乙腈层置于 100mL 离心瓶中, 加入 5mL 正丙醇, 50℃ 减压浓缩至近干。净化处理为: 用 20mL 水和 20mL 甲醇先后预淋洗碱性氧化铝 SPE 柱, 使之活化。用 3mL 乙腈:水(95:5)溶解离心瓶内残留物, 再分别用 2mL 乙腈:水(95:5)洗涤离心瓶 2 次, 将溶解液和洗涤液合并后过碱性氧化铝 SPE 柱, 柱后流出液不收集, 再用 10mL 乙腈:水(95:5)淋洗, 弃去淋洗液。吹去柱内滞留的液体后, 用 5mL 乙腈:水(75:25)洗脱磺胺类药物, 洗脱液收集至 10mL 容量瓶中, 用 0.017mol/L 磷酸溶液定容至 10mL, 过 0.45μm 滤膜后上机测定。

2.5 色谱条件

色谱柱为 Phenomenex Gemini C18 5μm (250 × 416mm i.d.); 流速: 1mL/min; 检测波长: 250—290nm; 进样体积: 20μL; 柱温: 30℃; 流动相 乙腈/甲醇与 0.017mol/L 磷酸(80:20, V/V)。

3 结果与讨论

3.1 检测波长的确立

对 SDA、SME、SMX、SMZ、SMM、SMO 6 种磺胺剂的水溶液进行紫外光吸收光谱的扫描, 由图 1 可知, 所探讨的 6 种磺胺剂的主要吸收区落在 250—290nm 间, 而以 260—270nm 间有较强的吸收度。当注射 1ppm 磺胺剂混合样品并采用 250nm 作为检测波长时, 磺胺剂中的 SDA、SMX 及 SME 的积分面积值较高, SMM、SMO 的吸收强度却很小; 若采用 270—290nm 作为检测波长, SMM、SMX 及 SME 的吸收度都差不多, 不过最先流析出来的 SDA 的吸收强度比较小, 在进行真实样品分析时恐会被真实样品的吸收所遮蔽。为了兼顾每个磺胺剂的吸收强度, 虽然 HPLC 可同时检测 5 个波长, 本研究以每个磺胺剂都有不错吸收的 260nm 作为检测波长。

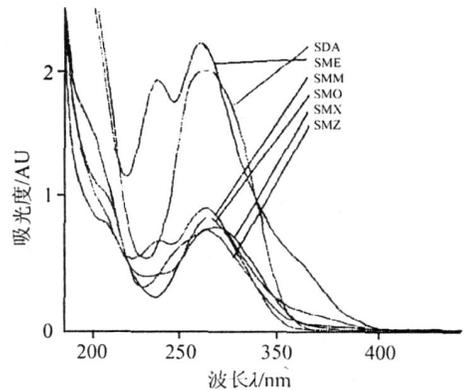


图 1 磺胺药物的紫外光吸收图

3.2 流动相中有机相的比例

增加流动相中有机相的比例, 可提高流动相的抽提能力, 缩短分析样品的滞留时间。在不添加任何有机溶剂下, 样品的滞留时间过长, 所有磺胺剂的层析时间皆超过 30min, 故添加有机溶剂是势在必行的。在本研究中曾经尝试过 10%、15%、20%、25%、30% 乙腈等不同的有机相比例, 如表 1 所示, 当加入的乙腈不到 25% 时 SMM 及 SMO 的滞留时间过长, 需要 30min 以上的分析时间才能分

析6种磺胺剂,故添加的乙腈须在25%以上。考虑到化学试剂的对环境的影响,选定25%作为流动相中乙腈的添加比例。此外也尝试用甲醇来代替乙腈操作,但使用甲醇作为有机相时,必须添加到40%—50%的比例方可达到和25%乙腈相似的滞留时间及解析度。

表1 流动相中有机相比例对抽提时间的影响

磺胺剂种类	添加不同比例乙腈磺胺剂的作用时间(m in)				
	乙腈(10%)	乙腈(15%)	乙腈(20%)	乙腈(25%)	乙腈(30%)
磺胺嘧啶	5.353	4.142	3.373	2.678	2.232
磺胺-甲基嘧啶	6.459	5.036	4.069	3.194	2.614
磺胺二甲嘧啶	7.211	5.946	4.718	3.672	3.097
磺胺-甲氧嘧啶	10.595	7.138	5.668	4.381	3.671
磺胺二甲氧嘧啶	> 30	> 30	9.044	6.374	5.288
磺胺噻唑	> 30	> 30	> 30	9.331	7.679

3.3 缓冲液的浓度及酸碱度

添加于流动相中的缓冲溶液,主要是用以稳定液相层析过程中的酸碱度,考虑到磺胺剂的两个质子化常数落在4.5—7.5间,故选择缓冲能力范围相近的磷酸二氢钠作为缓冲溶液,考虑到缓冲能力的大小,故使用的浓度为0.01mol/L。为使分析的磺胺剂皆保持在分子态,动相的酸碱度必须维持在两个质子化常数之间。实验上分别选择数个在此范围内的pH值,分别是pH=3.0,4.0,5.0,6.0,7.0进行动相的酸碱度与相对分析强度及滞留时间的比较。结果显示,样品的吸收强度差异不大,而滞留时间之间的差异皆在0.01s内,故在酸碱度的选择上,选用大多文献都采用的pH=5.0作为流动相的酸碱度^[7-9]。

3.4 色谱分离

在上述色谱条件下,6种各磺胺类药物组分及药物峰与杂质能很好分离,且峰形较好,在15min内能完成样品的检测,色谱图见图2A与图2B。

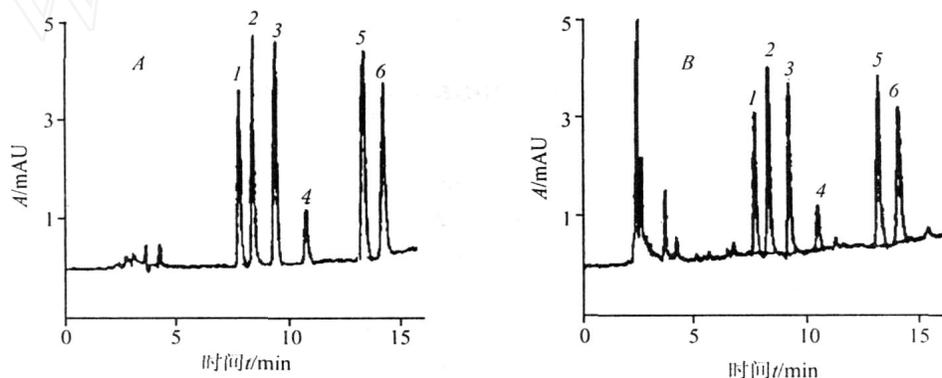


图2 磺胺标准样A及空白样添加磺胺B的液相色谱图

流析顺序为:1—磺胺嘧啶(SDA);2—磺胺-甲基嘧啶(SME);3—磺胺噻唑(SMX);
4—磺胺二甲嘧啶(SMZ);5—磺胺-甲氧嘧啶(SMM);6—磺胺二甲氧嘧啶(SMO)。

3.5 样品的浓度校准曲线测定

样品的浓度校准曲线测定选择浓度分布在0.005—10ppm的待测6种标准磺胺剂混合分析样品,进行浓度校准曲线的测定。表2是磺胺剂标准实验样品浓度校准曲线列表,其相关系数 r^2 值大于0.999,以响应值为2倍噪声时所需的样品量计算药物的检出限,SDA、SME、SMX、SMZ、SMM、SMO的检出限完全可以满足牛奶中6种SAs残留的定量测定要求。在所选定的色谱条件下,精确

量取 4 mL 空白牛奶样品, 分别添加 0.1 mL 浓度为 5、25、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作液, 相当于样品中各药物的添加水平分别为 0.1、0.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每个水平做 3 次重复。按 2.4 方法处理后上机测定, 将两者相同成分的色谱峰面积进行比较, 得出牛奶中药物的添加回收率。结果在 0.1—1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围平均添加相对回收率均在 85% 以上, 可以满足 SA S 残留定量分析要求。

表 2 磺胺剂样品校准曲线整理表

磺胺剂种类	校准曲线	r^2	检出极限(ppb)	相对回收率(%)
磺胺嘧啶	$y = 68.537x - 0.1201$	0.99924	0.41	85.99
磺胺一甲基嘧啶	$y = 68.989x - 1.5429$	0.99918	0.86	94.18
磺胺二甲基嘧啶	$y = 54.372x - 3.1195$	0.99946	0.09	97.89
磺胺一甲氧嘧啶	$y = 61.072x - 2.8161$	0.99914	0.45	92.35
磺胺二甲氧嘧啶	$y = 323.51x + 41.663$	0.99907	0.19	88.72
磺胺噻唑	$y = 76.891x + 0.03$	0.99926	0.08	92.94

参考文献

- [1] 临维宣. 各国食品中农药兽药残留限量规定[M]. 大连: 大连海事出版社, 2001. 1309—1310
- [2] 邵俊杰, 袁智能, 聂洪勇等. 肉中 2 种磺胺兽药残留量的同时测定方法[J]. 色谱, 1993, 1(6): 373—375
- [3] 李俊锁, 李西旺, 魏广智. 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] 熊芳, 戴华, 袁智能. 固相萃取高效液相色谱法测定动物肝中 4 种磺胺残留量[J]. 分析科学学报, 2002, 18(5): 415—417
- [5] Arnold D, 聂洪勇. 猪肉中 4 种磺胺类药物残留的快速 HPLC 测定法[J]. 分析测试通报, 1992, 11(3): 56—59
- [6] 张素霞, 李俊锁, 钱传范. 猪肌肉组织中磺胺类药物的 MSPD 净化和 HPLC 测定[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(6): 531—535
- [7] Fuh MRS, Chu S Y. Quantitative Determination of Sulfonamide in Meat by Solid Phase Extraction and Capillary Electrophoresis[J]. *J. Anal. Chim. Acta*, 2003, 499(4): 215—221
- [8] Lamba S, Sangh ISK, Asthana A et al. Rapid Determination of Sulfonamides in Milk Using Micellar Electrokinetic Chromatography with Fluorescence Detection[J]. *J. Anal. Chim. Acta*, 2005, 552(3): 110—115
- [9] Shao B, Dongd L, Wu Y et al. Simultaneous Determination of 17 Sulfonamide Residues in Porcine Meat, Kidney and Liver by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *J. Anal. Chim. Acta*, 2005, 546(3): 174—181

Determination of 6 Sulfonamides in Milk by HPLC

XIANG Zhi-Feng CHEN Jun^a ZHANG An-Bang^a

(College of Animal Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan, 453003, P. R. China)

^a(Department of Chemical Engineering, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang, Henan, 453003, P. R. China)

Abstract The milk samples were extracted with Acetonitrile, and cleaned by a SXC column solid phase extraction (SPE). The amounts of Sulfadiazine (SDA), Sulfamerazine (SME), Sulfamethazine (SMZ), Sulfamethoxazole (SMX), Sulfamonomethoxine (SMM), Sulfadimethoxine (SMO) in milk were simultaneously determined by high performance liquid chromatography. Under the optimal conditions, the recoveries of micro-dialysis were obtained as 85.99%, 94.18%, 97.89%, 92.35%, 88.72%, and 92.94% with the detection limits of 0.41, 0.86, 0.09, 0.45, 0.19 and 0.08 ppb for SDA, SME, SMX, SMZ, SMM and SMO, respectively.

Key words HPLC, Sulfonamides, Milk, Solid Phase Extraction, Milk