HPLC 同时测定牛蛙中的己烯雌酚、呋喃唑酮、磺胺类药物残留量

刘宏程，刘家富，黎其万*，邹艳红，梅文泉，黄思司
(农业部农产品质量监督检验测试中心，云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所，昆明 650223)

摘　要：建立牛蛙中己烯雌酚、呋喃唑酮、磺胺甲氧嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹恶啉残留量同时测定的高效液相色谱法。研究碱性氧化铝活性对磺胺，己烯雌酚、呋喃唑酮净化效果的影响。样品以乙腈提取，正己烷脱脂，碱性氧化铝净化，Hypersil ODS C18 (4.6 mm i.d. ×250 mm，5 μm)进行分离。回收率在 82.3 %～95.3 %，相对标准偏差为 3.3 %～5.7 %，己烯雌酚、呋喃唑酮和磺胺的检出限分别为 0.5、0.1 和 0.2 ng。

关键词：牛蛙；药物残留；己烯雌酚；呋喃唑酮；磺胺类；高效液相色谱
中图分类号：O657.7　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1000-0720(2008)04-044-04

牛蛙有较高的营养价值，已经大量的人工繁殖，受经济利益的驱动在饲养过程中经常在饲料中使用大量雌激素和抗菌素，致使牛蛙体内有多种药物残留。有关无公害水产品理化检验的国家标准中，规定了需要检测磺胺总量，呋喃唑酮和己烯雌酚等几项兽药残留的理化指标，目前有很多文献[1~8]报道了各种不同动物组织中磺胺类药物、呋喃唑酮或者己烯雌酚残留量的测定方法，但是，还没有一个方法能同时测定这些药物残留。所以，能同时测定这些药物残留有重要的意义。

本研究是在前期同时萃取磺胺总量、呋喃唑酮和己烯雌酚残留，分布收集磺胺总量和呋喃唑酮、己烯雌酚的基础上[9]，进一步研究在牛蛙中能否同时测定三类不同属性药物残留，通过控制碱性氧化铝的活性，可同时测定 3 种药物残留。

1　实验部分

1.1　仪器及试剂

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪，配置四元泵溶剂淋洗系统，自动进样系统，2487 双波长紫外/可见检测器，旋转蒸发仪(Heidolph Laborota 4000)，匀浆机(飞利浦)，低速离心机(TDL-40B，上海安亭)，固相萃取装置(SUPELCO)及，Sartorius 纯水器(Germany)。己烯雌酚(DES，Dr. Ehrenstorfer GmbH，99.5 %)、呋喃唑酮(FZD，Dr. Ehrenstorfer GmbH，99.0 %)、磺胺甲氧嘧啶(SD，Sigma-Aldrich，99.9 %)、磺胺二甲嘧啶(SM_2，Sigma-Aldrich，99.9 %)、磺胺间甲嘧啶(SMM，Sigma-Aldrich，99.9 %)、磺胺甲恶唑(SMZ，Sigma-Aldrich，99.9 %)、磺胺喹恶啉(SQ，Sigma-Aldrich，98.6 %)，甲醇和乙腈(Fisher，HPLC 级)，乙腈(分析纯)：使用前重蒸；无水硫酸钠、H_3PO_4、正丙醇及粒度 0.150～0.075 mm 碱性氧化铝均为分析纯；淋洗液：V(2 mmol/L H_3PO_4)∶V(乙腈) = 5∶95。

1.2　色谱条件

色谱柱 Hypersil ODS C_{18} (4.6 mm i.d. ×250 mm，5 μm)，柱温 30 ℃，进样 20 μL。色谱分离条件，梯度洗脱，按 0～10 min 流动相为 V (2 mmol/L H_3PO_4)∶V(乙腈) = 85∶15，10～12 min 流动相变为 V(2 mmol/L H_3PO_4)∶V(乙腈) = 75∶25，25～26 min 流动相变为 V(2 mmol/L H_3PO_4)∶V(乙腈) = 60∶40，48 min 流动相回到初始条件，流速 1.2 mL/min，波

* 收稿日期：2006-09-25；修订日期：2006-12-23
基金项目：云南省农科院课题和质标所课题(ZJ-2005-4)项目资助
作者简介：刘宏程 (1975 -)，男，助理研究员

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

长为 270 nm 和 365 nm 双波长。

1.3 样品处理

1.3.1 **样品萃取** 取 4 只牛蛙，剔骨，切碎，用组织捣碎机匀浆。准确称取 5 g 均质动物组织样品于 50 mL 离心管中，加 20 mL 乙腈，4 g 无水 Na_2SO_4，玻璃充分搅拌以防止样品与无水 Na_2SO_4 在离心管结块，震荡 5 min，置于低速离心机上离心 10 min (3000 r/min)，转移乙腈于分液漏斗，残渣再用 20 mL 乙腈提取 1 次，合并乙腈并加入 20 mL 正己烷于分液漏斗中，收集乙腈层(下层)，加入 5 mL 正丙醇，40 ℃下在旋转蒸发仪上浓缩至干。

1.3.2 **样品净化** 取 10 mL 注射器，在其底部垫上滤纸，装入 2 g 碱性氧化铝，上层再垫一片滤纸，并把填料轻轻压紧。先用淋洗液 3 mL 冲洗柱子，不收集，用淋洗液 3 mL 溶解样品，上柱，收集洗脱液于 10 mL 具塞刻度离心管中，再用 2 mL 淋洗液洗两次柱子，真空抽干，用淋洗液准确定容到 10.0 mL，混匀，经 0.2 μm 滤膜过滤。

2 结果与讨论

2.1 碱性氧化铝活性对呋喃唑酮、己烯雌酚残留和磺胺残留的净化研究

在前面研究中[9]得到结论，含 5 %水的碱性氧化铝，能把呋喃唑酮、己烯雌酚残留和磺胺残留分离开。

本研究目标是同时净化呋喃唑酮、己烯雌酚残留和磺胺残留。由于碱性氧化铝活性高，吸附能力强；含水多，活性低，吸附能力弱。通过加入不同比例水使其失活来控制碱性氧化铝活性。利用正交实验，使用 0.5 μg/mL 的混合标样，以 V(20 mmol/L H_3PO_4) ∶V(乙腈) = 5 ∶95 为淋洗剂测定不同含水量下碱性氧化铝对呋喃唑酮、己烯雌酚残留和磺胺残留的净化能力，结果如表 1，从结果可知，10 %碱性氧化铝对磺胺中的 SD，SMM 和 SMZ 吸附能力最强，含 20 %的水时能同时洗脱呋喃唑酮、己烯雌酚和所有的磺胺残留。含 20 %水碱性氧化铝柱，使用不同体积比率 20 mmol/L H_3PO_4 和乙腈作为淋洗剂，寻找最佳淋洗剂为 V(2 mmol/L H_3PO_4) ∶V(乙腈) = 10 ∶90。

表 1 不同 Alumina B 活性对回收率影响

Tab. 1 Recoveries of different activities of Alumina B cartridges

Alumine B 含水量	回收率/ %				
	5 %	10 %	15 %	20 %	25 %
SD	0	0	0	85	86
SM_2	0	50	82	84	85
SMM	0	0	0	85	83
SMZ	0	0	0	87	84
SQ	0	20	84	85	85
DES	92	94	94	92	92
FZD	94	92	93	93	94

2.2 HPLC 色谱分离条件的选择

由于己烯雌酚极性较小，ODS-C18 色谱柱对其吸附较强，如按流动相 V(20 mmol/L H_3PO_4) ∶V(乙腈) = 85 ∶15 等度洗脱，很难把己烯雌酚洗脱，但在 V(20 mmol/L H_3PO_4) ∶V(乙腈) = 60 ∶40 条件下，则呋喃唑酮和磺胺间甲嘧啶不能完全分离，通过实验不同体积 V(20 mmol/L H_3PO_4) ∶V(乙腈) 作为流动相来分离 7 种成分，其最佳分离条件见 1.2 色谱条件，总运行时间 60 min。

磺胺和己烯雌酚的最大吸收波长为 280 nm，呋喃唑酮的最大吸收波长为 365 nm[9]。可通过设定双波长同时测定这些兽药残留量。如图 1，双波长条件下，标准样品色谱图。

2.3 定量标准曲线、检出限及日内稳定性实验

配制 0.01，0.05，0.10，0.25，0.5 μg/mL 的 SD，SMM，SM_2，SMZ，SQ 和 0.005 (0.025)，0.01 (0.05)，0.05 (0.25)，0.1 (0.5)，0.5 (2.5) μg/mL 的呋喃唑酮和己烯雌酚标准混合溶液，取 20 μL 进样，测定峰面积，以峰面积对浓度作曲线，计算出回归方程。分别测定磺胺、呋喃唑酮和己烯雌酚的色谱峰面积的精密度和日内稳定性，7 次测定峰面积的相对偏差小于 4.0 %，每 1 h 进 1 次，8 h 内峰面积的相对偏差小于 4.8 %。说明磺胺、呋喃唑酮和己烯雌酚在常温下较稳定，不容易分解(避光条件下)。磺胺甲氧嘧啶，磺胺二甲嘧啶，磺胺间甲嘧啶，磺胺甲恶唑，磺胺喹恶啉在 0.2～10 mg/L，呋喃唑酮在 0.1～10 mg/L 和己烯雌酚在 0.5～50 mg/L 范围内线性关系良好，其检出限 LOD(根据信燥比 S/N = 3)和方法的定量限 LOQ。结果见表 2。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

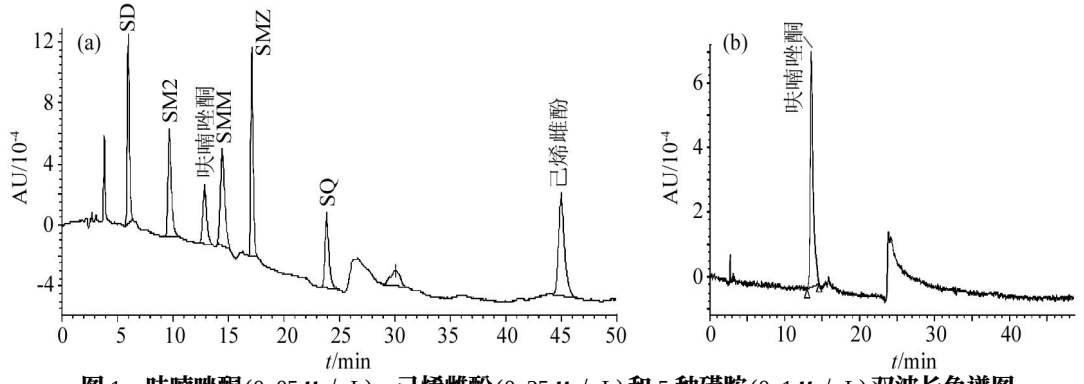

图 1　呋喃唑酮(0.05 μg/mL)、己烯雌酚(0.25 μg/mL)和 5 种磺胺(0.1 μg/mL)双波长色谱图

Fig. 1　The chromatograms of standard solutions of furazolidone, diethylstilboestrol (0.05 + 0.25 μg/mL) and five Sulfonamides (0.1 μg/mL) at two wavelengths

表 2　回归方程, 相关系数及检出限

Tab. 2　Regression equation, correlation coefficient and detection limit

组分	回归方程	相关系数	定量限 *m*/ng	检出限 *m*/ng
SD	$2.17e^3\rho + 3.24\ e^3$	0.996	0.5	0.2
SM_2	$1.79e^3\rho + 2.83e^3$	0.995	0.5	0.2
SMM	$2.26e^3\rho + 3.75\ e^3$	0.996	0.5	0.2
SMZ	$2.34e^3\rho + 5.80\ e^3$	0.993	0.5	0.2
SQ	$2.20e^3\rho + 3.78\ e^3$	0.995	0.5	0.2
DES	$1.07e^3\rho - 3.35\ e^4$	0.999	1.0	0.5
FZD	$4.68e^3\rho - 1.90\ e^3$	0.998	0.2	0.1

2.4　精密度, 回收率

准确称取牛蛙样品 2 份, 其中 1 份加入标准溶液 0.5 μg/mL SD, 0.5 μg/mL SMM, 0.5 μg/mL SM_2, 0.5 μg/mL SMZ, 0.5 μg/mL SQ, 0.5 μg/mL 己烯雌酚和 0.1 μg/mL 呋喃唑酮的混合溶液 1 mL, 另 1 份不加, 每份样品平行测定 5 次。通过加入标样的测出量除以标准加入量计算平均回收率和相对标准偏差, 见表 3。

2.5　样品测定

对昆明市某企业进行无公害认证的牛蛙 10 个样品进行抽样检查, 分别按照上述方法进行处理和分析, 所有样品均未检测出这些兽药残留量, 如图 2。样品中的杂质出峰时间在 8.12 min, 不干扰磺胺嘧啶(SD)和磺胺二甲嘧啶(SM_2)的测定。

表 3　方法的回收率和精密度实验

Tab. 3　The test of recovery and relative standard deviation (R. S. D)

组分	添加量 *m*/μg	回收率/%	RSD/%
SD	0.5	89.2	5.7
SM_2	0.5	90.5	4.7
SMM	0.5	84.1	4.4
SMZ	0.5	85.6	5.1
SQ	0.5	82.3	4.2
DES	0.5	92.6	4.5
FZD	0.1	95.3	3.3

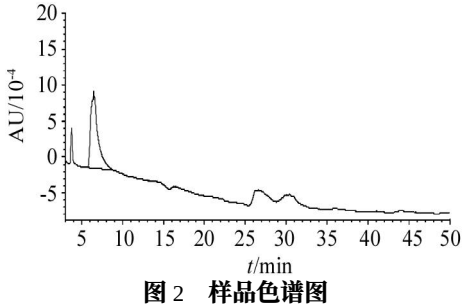

图 2　样品色谱图

Fig. 2　The chromatogram of samples

参考文献

[1] Kishida K, Furusawa N. J Chromatogr A, 2001, 937(1 - 2): 49

[2] Stoev G, Michailova A. J Chromatogr A, 2000, 871(1 - 2): 37

[3] Rodriguez-Mozaz S, de Alda M J, Barcelo D. J Chromatogr A, 2004, 1045(1 - 2): 85

[4] Martin Y. Analyst, 2000, 125(12): 2230

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[5] 丁 岚, 徐晓云, 谢孟峡等. 分析化学 2003, 31(11): 1356
[6] Leitner A, Zollner P, Lindner W. J Chromatogr A, 2001, 939(1 - 2): 49
[7] Galeano D T, Guiberteau C A, Acedo V MI *et al*. J Chromatogr A, 1997, 764(2): 243
[8] 丁 岚, 谢孟峡, 刘 媛等. 分析化学, 2004, 32(2): 139
[9] 刘宏程, 黎其万, 佴 注等. 化学通报, 2006, 1: 66

Multiresidue determination of diethylstilbestrol, furazolidone and sulfonamides in bullfrog by HPLC

LIU Hong-cheng, LIU Jia-fu, LI Qi-wan, ZOU Yan-hong, MEI Wen-quan* and *HUANG Si-si* (Supervision & Testing Center for Farm Product Quality, ministry of agriculture (Kunming), Yunnan academy of agriculture science, Kunming 650223), Fenxi Shiyanshi, 2008, 27(4): 44～47

Abstract: An analytical method for the multiresidue determination of diethylstilbestrol, furazolidone and sulfameter, sulfamethazine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfaquinoxaline in bullfrog by HPLC was developed. The purification of samples through alumina base was studied. The samples were extracted by acetonitril, and ester was removed by hexane. The samples were purified by SPE (Alumina B) and separated with a hypersil ODS C_{18} (4.6 ×250 mm, 5 μm). The recoveries of determination are 82.3 %～95.3 %. The relative standard deviations (RSD) are 3.3 %～5.7 %. The detection limits of diethylstilbestrol, furazolidone and sulfonamides are 0.5, 0.1 and 0.2 ng.

Keywords: Bullfrog; Residues; Diethylstilbestrol; Furazolidone; Sulfonamides; HPLC

首届全国原子光谱分析学术交流会征文通知

由中国有色金属学会主办、《纷析试验室》编辑部承办的“首届全国原子光谱分析学术交流会”定于 2008 年 11 月在云南省昆明市召开。

会议将就原子吸收光谱、原子发射光谱、原子荧光光谱、等离子体发射光谱、等离子体质谱、原子光谱联用分析及原子光谱样品处理技术等进行学术研讨。征文内容: 原子光谱分析进展; 金属材料、地质样品、环境样品、石油化工产品、医药食品等样品的原子光谱分析方法研究与应用等; 原子光谱分析的样品制备, 样品前处理, 实验数据处理, 新仪器应用操作, 维护经验等。会议将邀请有关专家做大会报告, 热诚欢迎全国从事原子光谱工作的科研和技术人员与会参加交流。

凡未在刊物上公开发表和未在学术会议上宣读过的反映原子光谱基础研究、新技术、新方向的发展和分析应用的论文或综述, 均可向本次会议投稿。征文写作格式详见《分析试验室》期刊。篇幅控制在 2 页内。

会议征文请在 2008 年 10 月 30 日前, 用电子邮件发送到ana-meeting @163. com (三日内收到筹备组的回复邮件方为发送成功), 并请注明联系人、详细通信地址、联系电话、手机及 E-mail 地址。

会议征文经审查录用, 将安排在《分析试验室》2008 年 12 月出版的增刊上发表; 优秀论文将安排在《分析试验室》期刊正刊正式发表。论文发表将酌收版面费。

没有论文欲参加会议的各届人士, 也请于2008 年 10 月 30 日前与会议筹备组联系, 以便继续为您寄发下一轮通知。

会议筹备组联系方式:

地址: 100088 北京新街口外大街 2 号 603 室原子光谱会议筹备组

电话: 010-82241919; **传真**: 010-82013328

联系人: 田春霞; **E-mail**: ana-meeting @163. com

2008 年 3 月 12 日

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net