

水产品中 14 种磺胺类药物残留的 HPLC 法同时测定

徐维海^{1, 3}, 林黎明², 朱校斌¹, 王新亭¹

(1. 中国科学院海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 青岛出入境检验检疫局, 山东 青岛 266002;
3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 建立了 HPLC 法同时分离并检测鱼、虾等水产品中 14 种磺胺类抗菌药物。样品经无水硫酸钠脱水后, 乙腈提取药物, 再用乙腈饱和的正己烷脱脂净化。以乙腈-3% 冰醋酸为流动相, 采用梯度淋洗, 于 268 nm 波长处检测。该法的检出限为 0.01~0.02 mg/kg, 样品的加标回收率为 66%~92%。

关键词: 高效液相色谱; 水产品; 磺胺类药物

中图分类号: O657.72; R978.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2004)05-0122-03

Simultaneous Determination of 14 Sulfonamides Residues in Aquatic Products by HPLC

XU Wei_hai^{1, 3}, LIN Li_ming², ZHU Xiao_bin¹, WANG Xin_ting¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Science, Qingdao 266071, China; 2. Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 3. Graduate School, Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of 14 sulfonamides residues in aquatic products by HPLC was established. Sulfonamides in samples were first extracted with acetonitrile after dehydration with anhydrous sodium sulfate, then purified from fats by extraction with acetonitrile saturated *n*-hexane, and finally determined by HPLC with a UV detector at a wavelength of 268 nm. Gradient elution with a mobile phase of 3% acetic acid-acetonitrile was employed at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection limits were found to be 0.01~0.02 mg/kg, and recoveries of 66%~92% were obtained.

Key words: HPLC; Aquatic products; Sulfonamides

磺胺类药物是应用最早的一类人工合成抗菌药物, 具有抗菌谱广、疗效强、方便安全等优点, 在水产养殖中应用非常广泛, 但是磺胺类药物能够产生排尿和造血紊乱等副作用。随着我国加入 WTO, 欧盟、美国、日本等国家对我国水产品中磺胺类药物的残留量提出了更高的要求, 使我国水产品出口在短时间内多次遭遇“绿色壁垒”, 为此需要快速、准确、可靠的分析方法检测水产品中磺胺类药物的残留。

目前磺胺类药物多达几十种, 高效液相色谱法是检测磺胺类药物常用的方法^[1], 并且多为磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶等几种磺胺类药物的同时检测^[2], 样品的前处理多采用固相萃取法^[3], 操作较烦琐, 耗时长。作者采用高效液相色谱法同时分离并检测了水产养殖中经常用到的 14 种磺胺类药物。通过乙腈提取和简单的液-液萃取, 很好地实现了药物的提取与净化, 且样品基质干扰小。该法与常规过柱方法相比^[4, 5], 样品的提取、净化等前处理简单、快速、准确, 且低毒性。作者并对色谱条件进行优化, 建立了最佳色谱条件, 检出限和回收率令人满意。该法适合快速、大量的样品检测。

1 实验部分

1.1 仪器与设备

Waters 2695 高效液相色谱仪, 配有二极管阵列检测器和柱温箱; 均质器 (ULTRA TURRAX); 氮气浓缩装置 (PIERCE MODEL 1878); 超声波发生器; 快速混匀器 (美国 MODEL M37610-26); 旋转蒸发器 (备温控水浴, 配有棕色蒸发瓶); 高速台式离心机 (EPPENDORF, 5810R); 电子分析天平

收稿日期: 2003-09-27; 修回日期: 2004-06-10

基金项目: 973 课题 (2002CB412402); 中国科学院重大项目 (KJXC315W-215)

作者简介: 徐维海 (1978-), 男, 江苏干于人, 硕士研究生; 朱校斌, 联系人。

(SARTORIUS R200D, 精确至 0.000 1 g); 称量天平(PB602- N, 精确至 0.01 g); 一次性注射器; 过滤膜(0.45 μm , DURAPORE)等。

1.2 试剂

醋酸(分析纯); 乙腈(色谱纯); 乙腈-水溶液(体积比 1:1); 正己烷(分析纯, 经乙腈饱和); 正丙醇(分析纯); 无水硫酸钠(500 $^{\circ}\text{C}$ 灼烧 4 h, 置于干燥器中备用); 磺胺醚、磺胺、甲氧卡氨嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺氯吡嗪、磺胺 5_甲氧嘧啶、磺胺 6_甲氧嘧啶、磺胺甲氧达嗪、磺胺甲基异 唑、磺胺喹 啉、磺胺苯吡唑标准品均从 Sigma 公司购置。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理 称取 5.0 g 样品, 置于 50 mL 棕色离心管中, 加入 25 mL 乙腈和 10 g 无水硫酸钠, 高速均质 3 min 后以 6 000 r/min 离心 10 min, 将乙腈层移入 100 mL 棕色分液漏斗中。离心后的沉淀物再加入 25 mL 乙腈于混匀器摇匀, 超声波提取 30 s, 以 6 000 r/min 离心 5 min, 合并乙腈提取液, 加入 25 mL 乙腈饱和正己烷溶液, 振摇 5 min, 将底层乙腈溶液移入 100 mL 棕色茄形瓶中, 加入 5 mL 正丙醇, 40 $^{\circ}\text{C}$ 旋转蒸发至近干后用氮气吹干。然后加入 1.0 mL 乙腈-水溶液超声 30 s 溶解残渣; 将溶解液移入 10 mL 棕色离心管中, 加 0.5 mL 乙腈饱和正己烷溶液, 以 3 000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷层, 将底层乙腈水溶液过 0.45 μm 滤膜后移入棕色样品瓶中, 供 HPLC 测定。

1.3.2 液相色谱条件 色谱柱: ODS- C₁₈(4.6 mm \times 250 mm); 检测器: 二极管阵列检测器(DAD 检测); 波长: 268 nm; 进样量: 30 μL ; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 乙腈-3% 冰醋酸, 采取梯度淋洗: 0~15 min, 流速 0.6 mL/min, $V(\text{乙腈}) : V(3\% \text{ 冰醋酸}) = 20 : 80$; 在 1 min 内, 流速提高至 1.0 mL/min, $V(\text{乙腈}) : V(3\% \text{ 冰醋酸}) = 40 : 60$, 在此条件下保持 9 min。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

磺胺类药物结构式中含有氨基, 具有弱碱性。调节流动相中的 pH, 可以抑制弱碱的离解, 从而导致保留时间的改变。结果表明酸度过高, 很难将 14 种磺胺类药物完全分离, 特别是磺胺二甲嘧啶与磺胺氯吡嗪, 磺胺甲氧达嗪与磺胺甲基异 唑, 保留时间几乎完全一致; 酸度过低, 有明显的拖尾现象。乙腈与水的比例会影响保留时间及出峰顺序。本文采用乙腈-3% 冰醋酸为流动相, 采取合适的梯度淋洗条件, 不但很好地实现了 14 种磺胺类药物分离, 并且各峰间分离度大, 峰形尖锐, 峰对称性好(见图 1 和图 2)。

2.2 样品前处理

磺胺类药物一般采用二氯甲烷进行提取, 但二氯甲烷有可能提取出类脂物, 浓缩后不容易脱脂。乙腈是提取磺胺的合适溶剂, 它在沉淀样品中蛋白质方面要优于甲醇和丙酮, 加入无水硫酸钠可以有效防止样品中的水分及干扰成分进入提取液, 同时硫酸钠的存在可促使蛋白质变性分散, 防止样品形成块状影响提取。提取液经乙腈饱和正己烷脱脂净化, 可以脱去脂肪, 减少杂质的干扰, 操作简单。加入正丙醇可以加快蒸馏的速度, 并且能够减少药物的损失, 提高回收率。

2.3 标准曲线

取不同浓度的磺胺类药物标准溶液, 在上述的色谱条件下进行测定。在 0~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含量范围内线性显著, 色谱峰高与质量浓度的相关系数(r)为 0.998 1~0.999 9。

2.4 标准色谱图以及方法检出限

在上述的色谱条件下得到 14 种磺胺类药物的标准色谱图(见图 1)。将磺胺类药物标准溶液进行稀释后进样, 得到方法检出限(3 倍基线噪音): 甲氧卡氨嘧啶、磺胺喹 啉、磺胺苯吡唑检出限为 0.02 mg/kg , 其余均为 0.01 mg/kg 。

2.5 实际样品的测定

在罗非鱼样品中分别添加一定量的磺胺类标准溶液, 测定回收率, 重复测定 5 次, 计算平均值。

结果见表 1。

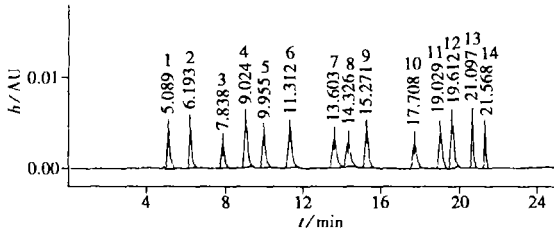


图 1 标准品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of a standard mixture

1. 磺胺脒; 2. 磺胺; 3. 甲氧卡氮嘧啶; 4. 磺胺嘧啶; 5. 磺胺吡啶; 6. 磺胺甲基嘧啶; 7. 磺胺二甲嘧啶; 8. 磺胺氯哒嗪; 9. 磺胺 5_甲氧嘧啶; 10. 磺胺 6_甲氧嘧啶; 11. 磺胺甲氧哒嗪; 12. 磺胺甲基异 唑; 13. 磺胺喹 啉; 14. 磺胺苯吡唑

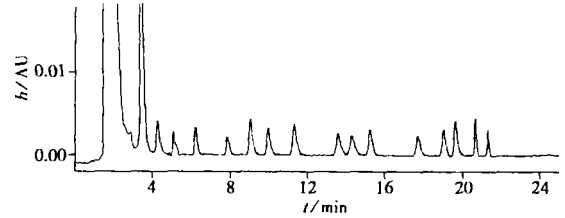


图 2 样品的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of a sample

1. 磺胺脒; 2. 磺胺; 3. 甲氧卡氮嘧啶; 4. 磺胺嘧啶; 5. 磺胺吡啶; 6. 磺胺甲基嘧啶; 7. 磺胺二甲嘧啶; 8. 磺胺氯哒嗪; 9. 磺胺 5_甲氧嘧啶; 10. 磺胺 6_甲氧嘧啶; 11. 磺胺甲氧哒嗪; 12. 磺胺甲基异 唑; 13. 磺胺喹 啉; 14. 磺胺苯吡唑

3 结 论

作者研究了 HPLC 法测定水产品中磺胺类药物的提取、净化方法, 并且建立了最佳色谱条件, 可以同时分离检测水产品中 14 种磺胺类药物, 方法简便、快速, 准确度高, 不仅能够满足日常进出口检测, 而且适用于磺胺类药物的残留监控, 并为磺胺类药物的进一步研究提供帮助。

表 1 样品加标回收率($n=5$)

Table 1 Recovery of standard additions($n=5$)

Compound	Original $w_0/10^{-6}$	Added $w_A/10^{-6}$	Found $w_F/10^{-6}$	Recovery $R/\%$
Sulfaguanidine(磺胺脒)	0	0.05	0.039	78
Sulfanilamide(磺胺)	0.021	0.05	0.058	73
Trimethoprim(甲氧卡氮嘧啶)	0	0.10	0.066	66
Sulfadiazine(磺胺嘧啶)	0.038	0.05	0.08	84
Sulfapyridine(磺胺吡啶)	0	0.05	0.404	81
Sulfamerazine(磺胺甲基嘧啶)	0.017	0.05	0.057	80
Sulfadimidine(磺胺二甲嘧啶)	0.026	0.05	0.07	88
Sulfachloropyridazine(磺胺氯哒嗪)	0	0.05	0.0375	75
5_Methoxysulfadiazine(磺胺5_甲氧嘧啶)	0	0.05	0.035	70
Sulfamonomethoxine(磺胺6_甲氧嘧啶)	0	0.05	0.0447	89
Sulfamethoxypyridazine(磺胺甲氧哒嗪)	0	0.05	0.044	88
Sulfamethoxazole(磺胺甲基异 唑)	0	0.05	0.0426	85
Sulfaquinoxaline(磺胺喹 啉)	0	0.10	0.071	71
Sulfaphenazole(磺胺苯吡唑)	0	0.10	0.069	69

参考文献:

- [1] KUNIHIO K, NAOTO F. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residues sulfonamides[J]. J Chromatogr, A, 2001, 913: 49- 55.
- [2] 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
- [3] 王建华, 林黎明, 陈长法. 肌肉中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.
- [4] JEN J F, LEE H L, LEE B N. Simultaneous determination of seven sulfonamide residues in swine wastewater by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, A, 1998, 793: 378- 382.
- [5] KISHIDA K, FURAUSA N. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken[J]. J Chromatogr, A, 2001, 937: 49- 55.