

食品中磺胺类兽药残留前处理技术的研究进展

王翔¹, 邓晓军², 宋国新¹, 胡耀铭^{1,*}, 朱坚²

(1.复旦大学分析测试中心, 上海 200433; 2.上海市出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: 本文概述了磺胺类兽药的物理化学性质, 并对国内外测定食品中磺胺类兽药残留的前处理技术包括样品的提取、净化和浓缩等方法进行了综述。

关键词: 磺胺兽药残留; 食品; 前处理技术

Research Progress on Pretreatment Technologies of Sulfonamides Residues in Food for Their Determination

WANG Xiang¹, DENG Xiao-jun², SONG Guo-xin¹, HU Yao-ming^{1,*}, ZHU Jian²

(1.Center of Analysis and Measurement, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

Abstract: This paper summarized the physical and chemical properties of sulfonamides (SAs), and reviewed the research progress at home and abroad on pretreatment technologies of SAs residues in food for their determination, including extraction, purification and concentration.

Key words: sulfonamides residues; food; pretreatment technology

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)07-0254-04

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 因其具有抗菌谱广、性质稳定、价格便宜等优点而被广泛用于畜牧业上细菌感染性疾病预防和治疗, 且其低剂量使用时, 还可提高饲料的利用率, 促进畜禽的生长。但不正确的用量、用药时间、方式以及用药部位会导致磺胺在畜禽体内及其排泄物的过量残留, 且磺胺类会在人体中蓄积, 导致过敏反应、泌尿系统损害、抑制白细胞生成等危害, 因此各国普遍对食品中 SAs 的限量提出了严格的要求, 其最高残留限量(MRLs)为 0.1mg/kg。食品中磺胺类药物的分析检测属复杂基质中痕量组分的分析技术, 具有样品基质复杂、目标组分浓度低、干扰物众多等特点, 其前处理技术为整个测定方法的重点和难点。近年来, 国内外学者对食品中磺胺兽药残留量的分析测定做了大量的研究, 提出了许多准确、有效地检测 SAs 的方法。王硕等^[1]已对动物性食品中磺胺类药物残留的分析方法进行了综述, 而本文则着重于介绍磺胺类残留检测的样品前处理技术研究进展, 包括样品的提取、净化、浓缩等步骤。

1 概述

收稿日期: 2008-05-06

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划项目(2006BAK02A08-9)

作者简介: 王翔(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向为色、质谱残留分析。E-mail: 062037001@fudan.edu.cn

* 通讯作者: 胡耀铭(1965-), 男, 高级工程师, 研究方向为高灵敏度色、质谱分析。E-mail: ymhu@fudan.edu.cn

磺胺类物质是对氨基苯磺酸的衍生物, 其分子中含有苯环、对氨基(N₄)和磺酰胺基(图 1), 各种化学基团取代 R 基而形成大量有效的衍生物。因其结构与细菌“生长物质”对氨基苯甲酸相似, 可与其竞争二氢叶酸合成酶, 阻止相应蛋白质的合成, 从而有效抑制细菌的生长繁殖。

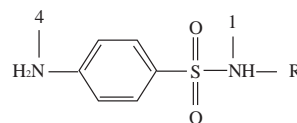


图1 磺胺结构式

Fig.1 Structure of SAs

磺胺类药物一般为白色或微黄色结晶性粉末, 遇光易变质。SAs 为极性物质, 易溶于极性有机溶剂, 而难溶于非极性溶剂。并且其在水中溶解度较低, 溶解度为 $7 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^3 \text{ mg/L}$, $\lg K_{ow}$ 在 -0.1~1.7 之间。磺胺类属于酸碱两性物质, N₄ 和 N₁ 上 H 在不同 pH 值下电离后, 得到 pK_{a1} 和 pK_{a2}。大部分磺胺类药物的 pK_{a1}=2~

3, $pK_{a2}=4\sim 8.5$, 但由于磺胺本体($R=H$) N_1 上含有两个H, 碱性较强, 其 pK_{a2} 为10.43。在酸性水溶液中, 磺胺类呈电离状态, 溶解度会增大(除了磺胺本体)。因此在前处理步骤中可通过调节溶液的pH值来提高萃取效率, 有效去除基质干扰物, 增强净化效果。

2 前处理技术

由于食品样品基质的复杂性, 样品萃取时, 在保证较高的萃取效率前提下, 尽量减少共萃取的杂质, 同时为提高定性定量的准确性和延长检测仪器的寿命, 可通过适当的净化手段去除萃取液中的干扰物质。样品前处理发展的趋势为操作简便, 方法准确, 人力和时间消耗少, 有毒有害溶剂用量少, 注重环保效益。

2.1 样品提取

样品提取的经典方法为液液萃取^[2-5], 而新兴的方法, 如基质固相分散^[6-8]、超临界萃取^[9-10]、固相微萃取^[11-12]、加压溶剂萃取^[13-14]、超滤^[15]等方法则更加注重环境保护, 减少有机溶剂的使用, 同时简便实验操作, 提高自动化程度。

2.1.1 液液萃取(LLE)

因磺胺类药物不溶于非极性溶剂, 一般选用乙腈、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、丙酮等极性有机溶剂液液萃取, 同时加入等量的无水硫酸钠去除萃取液中的水分。很多研究者使用单一极性溶剂提取(如乙腈), 但有研究表明使用两种溶剂依次萃取可提高萃取效率。Stoev等^[16]比较了甲醇、乙腈、乙酸乙酯、水、二氯甲烷对鸡肉中磺胺类的提取效率, 发现乙腈和乙酸乙酯对SAs的选择性好, 共萃取杂质少。而丙酮可有效地破坏SAs中氨基与基质蛋白质的氢键作用, 因此在乙酸乙酯提取后再用少量丙酮提取, 萃取效率提高了40%, 其加标回收率($5\mu\text{g/kg}$)超过80%。张海琪等^[17]研究发现二氯甲烷对磺胺吡啶、磺胺对甲氧嘧啶等提取效率高, 乙腈对磺胺甲噻二唑、磺胺二甲异噻唑等提取效率高, 因此采用先乙腈提取后二氯甲烷提取的方式提取大黄鱼中的20中磺胺类药物。上述液液萃取法提取效率高, 操作简便, 且无需特殊的辅助仪器, 但其有机溶剂消耗量大, 共萃取杂质较多, 需额外的净化步骤。

除了应用有机溶剂提取禽肉中的SAs, 水溶液体系也成功地应用到提取牛奶中的磺胺残留。磺胺类药物属于酸碱两性物质, 在提取液中加入酸性物质, 有利于其离子化和去氢键化, 增加其溶解度。Koesukwiat等^[5]用2.0ml 20%的乙酸酸化5.0g牛奶样品, 涡旋振荡2min后加入20.0ml McIlvian缓冲液, 调节pH值至4.5, 离心后过SPE柱净化。该方法应用对环境友好的水溶液体系进行提取, 操作简便, 回收率较高(大于70%), 但其

对提取液的pH值要求严格, 需细心操作。

2.1.2 基质固相分散萃取(MSPD)

基质固相分散萃取集样品制备、萃取和净化过程于一体, 是一种优秀的样品前处理技术, 特别适用于难匀浆和均质的样品(如禽肉)。其基本原理为通过担体的剪切力和摩擦作用将样品基质彻底粉碎, 并均匀的分布于担体中, 应用不用的溶剂通过柱层析作用将目标物和干扰物分别洗脱下来, 达到分离净化的目的。Kishida等^[16]比较了 C_{18} 、硅胶、弗罗里硅土、氧化铝等担体对肌肉中SAs的萃取效果, 中性氧化铝(Alumina N-S)和硅胶获得较好的回收率(大于80%), 但硅胶活化前处理复杂, 而Alumina N-S可得到较好的精确度($RSD=2\%\sim 10\%$), 因此担体优选Alumina N-S, 用10ml 70%乙醇溶液即可将6种磺胺全部洗脱下来, 即可进样检测。MSPD法所需样品量和有机溶剂消耗少, 前处理时间短, 操作简便, 回收率高。其缺点为担体价格较贵。

2.1.3 超临界萃取(SFE)

超临界萃取因具有环保、快速、无副反应、选择性高等优点, 而越来越受到残留分析方法的青睐。用于食品中SAs的超临界提取的流体主要包括二氧化碳和三氟甲烷。相比于三氟甲烷的毒性, CO_2 对人体无害, 对环境友好。但 CO_2 的极性小, 对极性物质磺胺类的提取效率低, 因此可加入甲醇等物质来调节超临界流体的极性。Arancibia等^[10]考察了加入不同量甲醇对磺胺提取的影响, 加标回收率随甲醇量的增加而逐渐增加, 当加入甲醇3ml于10ml萃取槽中, 在压力17.237MPa、炉温160℃下, 其回收率可达95%。尽管SFE具有其他方法所无法比拟的优势, 但其需专门的仪器和熟练的操作人员, 运行和维护费用昂贵。

2.1.4 固相微萃取(SPME)

固相微萃取具有操作简便、分析时间短、溶剂用量少、选择性强等优点, 被广泛用于食品中挥发性或半挥发性农(兽)药残留的检测。而SAs的挥发性较低, 其固相微萃取主要采用浸入方式: 将纤维萃取头浸入水相中吸附待测物, 而后在有机/水混合相中解吸。Lu等^[11]比较了不同纤维萃取头对猪肉中8种磺胺的萃取效率, 发现65 μm PDMS/DVB纤维萃取效率较高。而SAs在不同的pH值下会呈离子态, 对纤维萃取的影响较大。因此有效调节水相的pH值会显著地改变纤维的萃取效率。但不同SAs的 pK_a 相差较大, 要使每种磺胺获得良好的回收率比较困难。相比于其他萃取方法, SPME方法相对标准偏差较大, 检测限较高。但其具有的操作简便性是其其他方法所无法比拟的, 且纤维萃取头可重复使用, 有机溶剂用量极少, 单次检测成本低。

2.1.5 加压溶剂萃取(PLE)

加压溶剂萃取的原理与液液萃取类似,但温度和压力的提高会大大地减弱由范德华力、氢键、偶极作用所引起基质对目标物的吸附作用,提高对目标物的溶解能力。Gentiu 等^[13]与 Font 等^[14]已成功应用 PLE 提取牛奶、鸡蛋、肉类等食品中的磺胺,样品中加入分散剂(如硅藻土^[13]或 C₁₈^[14]等),用热水或甲醇/水混相提取。由于水对基质中脂肪和蛋白质的低亲和性,PLE 提取后可无需净化而直接进样 LC-MS 分析。典型的热水的参数为:160℃、1500psi、静态萃取 5min。PLE 法操作简单,其所用萃取剂经济环保,且其可与检测仪器在线联用,自动化程度高。但加速溶剂萃取仪(ASE)价格较贵。

2.1.6 超滤法

2003 年 Furusawa^[15]提出了用超滤法(ultra filtration)提取牛奶中的磺胺二甲基嘧啶。样品经高氯酸酸化后超声均质,12000 × g 高速离心,过滤后即可直接进样 HPLC 测定。该方法不消耗任何有机溶剂,高速离心杜绝了乳化现象,减少了磺胺的损失,其加标回收率(1 μg/ml)达到 90%。但对一些不稳定的磺胺,应用高氯酸酸化可导致其发生降解。将该方法用于多种磺胺的同时测定还有待进一步验证。

2.2 样品净化浓缩

食品基质复杂,样品经提取后需进一步净化后才能进行仪器检测。应用最广泛的净化方法为液液分配萃取(LLE)和固相萃取(SPE)。MSPD 和 SPME 则将萃取和净化步骤同时进行,缩短了处理时间。而一些新兴的方法,如分散固相萃取(Dispersive-SPE)^[18]和超滤法(ultra filtration)等,操作更加简便,有机溶剂消耗少,符合经济环保的趋势。

液液萃取(LLE)主要利用磺胺在极性溶剂和非极性溶剂中的分配系数不同,以乙腈饱和的正己烷萃取乙腈提取液中的大量脂肪,而磺胺类则留在乙腈中,达到去

除大量脂肪杂质的目的,同时在萃取时加入等量的无水硫酸钠吸水以减少乳化现象产生。由于磺胺的热不稳定性,在旋转蒸发浓缩过程中应加入少量的正丙醇或异丙醇共蒸,以避免磺胺的分解。

固相萃取(SPE)是应用最广泛的净化方法。由于磺胺类具有可离子化和极性强的性质,SPE 柱可选取正相柱或离子交换柱,包括 Sep-Pak 硅胶柱^[2]、氨基键合柱^[3]、Oasis HLB^[5,14,21]、Oasis MCX^[12]、Bond-Elut C₁₈^[20]、PSA^[23]、SCX^[4,22]、氧化铝柱^[24]等,表 1 列举了一些国内外学者应用 SPE 柱净化食品基质的操作步骤。庞国芳等^[24]比较了三氯甲烷提取/硅胶柱净化、Na₂EDTA-McIlvaine 液提取/Oasis HLB 净化、乙腈提取/氧化铝净化和乙腈提取/正己烷分配 4 种提取净化体系。发现三氯甲烷提取液含脂肪较多,过硅胶柱后回收率较低,而 Na₂EDTA-McIlvaine 液提取/Oasis HLB 净化体系回收率在 40%~80% 之间,且不稳定,而后两种方法回收率和净化效果都较好。但 Koesukwiat 等^[5]通过调节萃取液和洗脱液的 pH 值,在 HLB 柱上获得了满意的回收率,其研究表明当萃取液 pH4.5,二维酸体系调节 HLB 柱后,磺胺的回收率超过 80%。因此在使用 SPE 法净化时,应适当调节柱上的 pH 值,使其获得最佳回收率。

除了采用 SPE 法净化萃取液,Posyniak 等^[18]提出了用分散固相萃取法(dispersive SPE)来净化鸡肉基质。样品经乙腈提取离心后转入 1.5ml 微离心管,加入 25mg C₁₈ 吸附剂,均质后离心过滤即可。相比于经典 SPE,D-SPE 所用吸附剂少,有机溶剂消耗量小,其回收率超过 90%,是一种很有前途的前处理技术。

对于含大量脂肪的基质,可先通过冷冻法除去大部分杂质,然后再与其他方法联用。样品经溶剂提取后置于-20℃以下半个小时,除脂率可达 50% 以上,而且 SAs 基本没有损失。

表 1 SPE 法净化食品中磺胺萃取液
Table 1 Solid phase extraction (SPE) cleanup conditions of SAs extract from different foodstuffs

样品	SPE 柱	活化处理	预淋洗	洗脱	参考文献
猪肉	Sep-Pak 硅胶柱	6ml 正己烷	5ml 正己烷	6ml 甲醇/丙酮(1:1, V/V)+6ml 丙酮	[2]
水	MCX 柱(Waters)	5ml 水+5ml 甲醇+5ml 甲醇/ 5%NaOH+5ml 水(pH=3)	4ml 0.1mol/L HCl+5ml 甲醇	2ml 甲醇/5%NaOH	[12]
肝、肾	Bond Elut PSA	—	正己烷	20% 乙腈/0.5mol/L 甲酸铵	[23]
牛奶	Oasis HLB	—	5% 甲醇+5% 甲醇/2% 乙酸	甲醇+5% 甲醇/2% 氢氧化铵	[5]
鸡肝	氨基柱	—	2ml 乙酸乙酯	2ml 洗脱液(乙腈:甲醇:水:乙酸=2:2:9:0.2, V/V)	[3]
鸡蛋	Bond Elut SCX	5ml 乙腈/5% 乙酸	5ml 甲醇+5ml 乙腈	10ml 乙腈/5% 氨水	[4]
牛奶	环己基柱	—	15ml 水	5ml 甲醇	[19]
鸡蛋	C ₁₈	乙腈+水	—	3ml 乙腈	[20]
肉类	Oasis HLB	2ml 甲醇+2ml 水	2ml 水	2ml 甲醇	[14]
水	Oasis HLB	3ml 甲醇+3ml 0.5mol/L HCl+3ml 水	1ml 水	5ml 氨化甲醇(氨:甲醇=1:19, V/V)	[21]
鱼虾类	SCX 柱	2.5ml 丙酮+2.5ml 0.2% 乙酸+2.5ml 丙酮	5ml 丙酮	5ml 丙酮:0.4mol/L 乙酸铵(50:50, V/V)	[22]

3 结 语

由于磺胺的广泛应用以及食品安全问题的日益显现, 众多检测食品中磺胺类兽药残留方法被提出并被成功地应用于实际检测中, 而前处理方法更是每种方法研究的重点。在保证回收率前提下, 如何减少有机溶剂使用量, 避免二次污染, 将成为新方法开发的难点。相比于理化仪器检测, 生物和免疫检测前处理相对简单, 但其定性和定量能力较弱。将这几种方法联合使用, 各取所长, 可有效地满足日常监控体系的需求。

参考文献:

- [1] WANG S, ZHANG H Y, WANG L, et al. Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review[J]. Food Additives and Contaminants, 2006, 23(4): 362-384.
- [2] SHAO B, DONG D, WU Y N, 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]. Analytica Chimica Acta, 2005, 546: 174-181.
- [3] 吴银良, 刘素英, 单吉浩, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定鸡肝中磺胺类药物残留量[J]. 分析化学, 2005, 33: 1713-1716.
- [4] TARBIN J A, CARKE P, SEARER G. Screening of sulphonamides in egg using gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 729: 127-138.
- [5] KOESUKWIWAT U, JAYANTA S, LEEPIATPIBOON N. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1140: 147-156.
- [6] KISHIDA K, FURUSAWA N. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken[J]. Journal of Chromatography A, 2001, 937: 49-55.
- [7] BETARDI G, BOGIALLI S, CURINI R, et al. Evaluation of a method for assaying sulfonamide antimicrobial residues in cheese: hot-water extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(13): 4537-4543.
- [8] BOGIALLI S, CURINI R, CORCIA A D. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamid antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, 51(15): 4225-4232.
- [9] COMBS M T, ASHRAF-KHORASSANI M, TAYLOR L T. Comparison of supercritical CHF_3 and CO_2 for extraction of sulfonamides from various food matrices[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52: 4614-4624.
- [10] ARANCIBIA V, VALDERRAMA M, ROBRIGUEZ P, et al. Quantitative extraction of sulfonamides in meats by supercritical methanol-modified carbon dioxide: A foray into real-world sampling[J]. Journal of Separation Science, 2003, 26: 1710-1716.
- [11] LU K H, CHEN C Y, LEE M R. Trace determination of sulfonamides residues in meat with a combination of solid-phase microextraction and liquid chromatography- mass spectrometry[J]. Talanta, 2007, 72: 1082-1087.
- [12] BALAKRISHNAN V K, TERRY K A, TOITO J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1131: 1-10.
- [13] GENTILI A, PERRET D, CURINI R, et al. Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 1996, 68: 4507-4511.
- [14] FONT G, JUAN-GARCIA A, PICO Y. Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improves methodology for the determination of sulfonamide residues in meat[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1159: 233-241.
- [15] FURUSAWA N. Clean and rapid liquid chromatographic technique for monitoring of oxytetracycline and sulphadimidine in milk without use of organic solvents[J]. Chromatographia, 2003, 57: 317-320.
- [16] STOEY G, MICHAÏLOV A. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 871: 37-42.
- [17] 张海琪, 徐晓林, 侯镜德, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定大黄鱼中 20 种磺胺类药物残留[J]. 分析化学, 2007, 35: 268-272.
- [18] POSYNIK A, ZMUDZKI J, MITROWSKA K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1087: 259-264.
- [19] REEVES V B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 1999, 723: 127-137.
- [20] HELLER D N, NGOHL M A, DONOGHUE D, et al. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. Journal of Chromatography B, 2002, 774: 39-52.
- [21] MALINTAN N T, MOHD M A. Determination of sulfonamides in selected Malaysian swine wastewater by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1127: 154-160.
- [22] GEHRING T A, GRIFFIN B, WILLIAMS R, et al. Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography B, 2006, 840: 132-138.
- [23] ITO Y, OKAA H, IKAI Y. Application of ion-exchange cartridge clean-up in food analysis: V. Simultaneous determination of sulphonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 898: 95-102.
- [24] 庞国芳, 曹彦忠, 张进杰, 等. 液相色谱-串联质谱同时测定家禽组织中 16 种磺胺残留[J]. 分析化学, 2005, 33: 1252-1256.