

高效液相色谱-在线柱后衍生荧光检测法同时测定水产品中14种磺胺类药物残留

郑斌¹, 余海霞², 杨会成¹, 廖妙飞¹, 傅光明¹, 张小军³

(1.浙江省海洋开发研究院, 浙江 舟山 316100; 2.浙江大学舟山海洋研究中心, 浙江 舟山 316100;

3.浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100)

摘要:建立水产品中14种磺胺类药物的高效液相色谱-柱后衍生荧光检测法。均质后的水产品试样用乙酸乙酯提取、盐酸溶液反萃取、正己烷脱脂、反相色谱柱分离、在线柱后衍生、荧光检测器检测、内标法定量。14种磺胺类药物(磺胺、磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺5-甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲氧噻唑、磺胺氯噻唑、磺胺6-甲氧嘧啶、磺胺甲基异噻唑、磺胺多辛、磺胺异噻唑、磺胺二甲氧噻唑、磺胺喹噻啉)的线性范围为2.5~800 µg/L, 线性相关系数均大于0.9934; 在2.5~200 µg/kg三个添加水平范围内的平均回收率为88.9%~98.6%, 相对标准偏差均小于6.96%。14种磺胺类药物的定量检出限为2.5~20 µg/kg。方法重现性好、灵敏度高, 杂质干扰少, 广泛适用于水产品中磺胺类药物残留的检测。

关键词:水产品; 高效液相色谱; 在线柱后衍生; 磺胺类药物

Simultaneous Determination of 14 Sulfonamide Residues in Fishery Products by High Performance Liquid Chromatography with online Postcolumn Derivatization and Fluorescence Detection

ZHENG Bin¹, YU Hai-xia², YANG Hui-cheng¹, LIAO Miao-fei¹, FU Guang-ming¹, ZHANG Xiao-jun³

(1. Zhejiang Marine Development Research Institute, Zhoushan 316100, China; 2. Ocean Research Institute of Zhoushan, Zhejiang University, Zhoushan 316100, China; 3. Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316100, China)

Abstract: A new method for the determination of 14 sulfonamide (sulfanilamide, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamerazine, sulfameter, sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, sulfachlorpyridazine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfadoxine, sulfafurazole, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline) residues in fishery products using high performance liquid chromatography (HPLC) equipped with fluorescence detector was established. Homogenized samples were extracted with ethylacetate, reverse-extracted into hydrochloric acid, defatted with hexane, separated by reversed-phase column chromatography, treated by on-line post-column derivatization, detected using a fluorescence detector, and quantified using the internal standard method. The linear range of the method for detecting the sulfonamides was from 2.5 to 800 µg/L, and the relative coefficients were all above 0.9934. The mean recoveries across spike levels varying from 2.5 to 200 µg/kg were between 88.9% and 98.6% with RSDs less than 6.96%. The limits of quantification for the sulfonamides were 2.5–20 µg/kg. The method exhibited good repeatability, high sensitivity, little interference and was widely suitable for the determination of sulfonamide residues in aquatic products.

Key words: fishery products; high performance liquid chromatography; online post-column derivatization; sulfonamides

中图分类号: TS251.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)04-0230-04

磺胺类药物是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 具有抗菌谱广、疗效强等优点, 是目前水产养殖业中最常使用的抗生素之一, 广泛用于鱼类的疳疮病、细菌性败血病、肠炎病、烂鳃病、弧菌病等。

磺胺类药物在体内的作用时间和代谢时间较长, 通过任何途径摄入的磺胺都有可能蓄积在人体内, 容易产生排尿和造血紊乱等副作用。欧盟、美国、日本等国家对于磺胺类药物在动物源性食品中的残留限量要求不断提

收稿日期: 2011-03-14

基金项目: 浙江省优先主题重点农业项目(2009C12008)

*通信作者: 郑斌(1968—), 男, 教授级高级工程师, 硕士, 研究方向为水产品加工及质量安全。

E-mail: 6369958@163.com

高,许多磺胺类药物已经被列为禁用渔药,致使我国水产品出口在短时间内多次遭遇“技术壁垒”,为此需要快速、准确、廉价的多残留方法检测水产品中的磺胺类药物残留^[1]。

磺胺类药物残留的检测方法主要有酶联免疫法^[2]、气相色谱法^[3]、高效液相色谱法^[4-6]、气相色谱-质谱法^[7]、高效液相色谱-串联质谱法^[8-10]、毛细管电泳法^[11]、生物免疫法^[12]等。酶联免疫法和放射免疫法主要用于大规模的筛选工作,一般不用于定量,容易出现假阳性;气相色谱法用电子捕获检测器进行定量分析,具有较高的特异性,但该方法较为繁琐,不易操作;高效液相色谱紫外检测法和毛细管电泳法灵敏度低,特异性差,特别是在低浓度检测时样品基质干扰大,很难准确地定性确认;气相色谱-质谱法虽然灵敏度和特异性都很高,但衍生过程繁琐,带选择离子监控的高效液相色谱-串联质谱法克服了这些问题,但液质联用仪价格昂贵,不利于推广普及。本研究对水产品中磺胺类药物残留采用稀盐酸反萃取方法进行提取净化,在线柱后衍生荧光法进行检测,建立了一种同时检测水产品中14种磺胺类药物残留的分析方法。本方法准确、灵敏度高且操作简便,对14种磺胺类药物的定量检出限均低于20 μg/kg,能够满足农业行业标准^[13]和欧盟委员会规定^[14]中磺胺类总量0.1 mg/kg的限量要求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

磺胺(sulfanilamide)、磺胺嘧啶(sulfadiazine)、磺胺噻唑(sulfathiazole)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine)、磺胺5-甲氧嘧啶(sulfameter)、磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine)、磺胺甲氧哒嗪(sulfamethoxypyridazine)、磺胺氯哒嗪(sulfachlorpyridazine)、磺胺6-甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine)、磺胺甲基异噁唑(sulfamethoxazole)、磺胺多辛(sulfadoxine)、磺胺异噁唑(sulfafurazole)、磺胺二甲氧哒嗪(sulfadimethoxine)、磺胺喹噁啉(sulfaquinoxaline)和内标物磺胺吡啶(sulfapyridine)(纯度≥99%) 美国Sigma公司;荧光胺(fluorescamine,纯度大于99.0%);实验用水为Milli-Q高纯水;甲醇、乙酸乙酯和乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

标准储备液和内标储备液均用甲醇配制,4℃避光保存,保存期为一个月;用乙酸乙酯配制含磺胺1.0 mg/L、磺胺嘧啶2.0 mg/L、磺胺噻唑2.0 mg/L、磺胺甲基嘧啶2.0 mg/L、磺胺5-甲氧嘧啶4.0 mg/L、磺胺二甲基嘧啶2.0 mg/L、磺胺甲氧哒嗪4.0 mg/L、磺胺氯哒嗪4.0 mg/L、磺胺6-甲氧嘧啶4.0 mg/L、磺胺甲基异噁唑4.0 mg/L、磺

胺多辛4.0 mg/L、磺胺异噁唑4.0 mg/L、磺胺二甲氧哒嗪4.0 mg/L、磺胺喹噁啉8.0 mg/L的混合标准工作液;用乙酸乙酯(色谱纯)配制磺胺吡啶2.0 mg/L的内标工作液。

1.2 仪器与设备

Prostar230 高效液相色谱仪(配荧光检测器和柱后衍生装置) 美国瓦里安公司;IKA MS1 旋涡混匀器 德国IKA公司;高速离心机;AL204 电子天平 瑞士梅特勒-托利多公司;N-EVAP 氮吹仪 美国Organomation公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: ODS-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈、甲醇和2% 乙酸溶液, 梯度洗脱条件见表1; 流动相流速0.6 mL/min、衍生试剂流速0.1 mL/min、柱温40℃、柱后反应器温度70℃、进样量50 μL、荧光检测器激发波长405 nm、发射波长495 nm。

表1 流动相梯度条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	0	15	30	45	45.1	55
乙腈/%	5	5	20	20	5	5
甲醇/%	10	10	10	10	10	10
2% 乙酸溶液/%	85	85	70	70	85	85

1.3.2 样品处理

称取10.00 g样品置于50 mL离心管中,加入磺胺吡啶内标使用液250 μL,然后加入乙酸乙酯30 mL,均质机14000 r/min均质1 min,振动2 min,3000 r/min离心10 min,将乙酸乙酯层小心转移到100 mL梨形瓶中。再向原离心管中加入乙酸乙酯20 mL,旋涡混匀30 s,振动2 min,3000 r/min离心10 min,将乙酸乙酯层小心转移到原100 mL梨形瓶中,40℃减压浓缩至约1 mL。然后将梨形瓶中的溶液转移至15 mL刻度离心管,再用4 mL乙酸乙酯分两次清洗梨形瓶,溶液合并至15 mL刻度离心管。在离心管中加入2.00 mL 2 mol/L盐酸溶液,旋涡混匀1 min,加盖后振动2 min,3000 r/min离心8 min,移去乙酸乙酯层,在余液中加入正己烷5 mL,旋涡混匀30 s,3000 r/min离心8 min,移去正己烷层,0.45 μm微孔滤膜过滤。取200 μL滤液、200 μL乙酸钠溶液、50 μL乙腈和50 μL甲醇加入到试样瓶中,旋涡混匀1 min,样品用高效液相色谱柱后衍生荧光检测。

1.3.3 加标回收率实验

加标回收率实验所用样品为南美白对虾,样品前处理同1.3.2节。磺胺的添加量为2.5、10、25 μg/kg和

50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶和磺胺二甲基嘧啶的添加量为 5.0、20、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 磺胺 5- 甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺 6- 甲氧嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺二甲氧哒嗪、磺胺喹噁啉的添加量为 10、40、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每个添加水平进行 6 次重复实验, 计算回收率和相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 提取条件选择

磺胺类药物难溶于水, 较易溶于稀酸、稀碱和有机溶剂。用丙酮作为萃取溶剂得到的平均回收率只有 50.1%~78.3%; 而乙腈作为萃取溶剂需要脱水, 增加了样品前处理的步骤; 相比之下, 乙酸乙酯萃取效果较好, 平均回收率可达 74.6%~98.9%。实验发现, 与其他酸、碱溶液相比, 稀盐酸从有机相中反萃取磺胺类药物效果最好, 反萃取平均回收率在 81.6%~94.7%。因此采用乙酸乙酯萃取、2mol/L 盐酸溶液反萃取的提取方法, 操作步骤相对简单, 14 种磺胺均有较高的回收率。

2.2 在线柱后衍生化

荧光胺是荧光试剂, 对初级脂肪族胺和芳香族胺具有特异性, 与磺胺类药物结合后产生高荧光效应和选择性的荧光体, 具有激发-发射光谱特性($\lambda_{\text{ex}} = 395 \sim 405 \text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{em}} = 490 \sim 510 \text{nm}$), 荧光胺及其水解产物则没有荧光性。荧光胺与磺胺类药物的反应如图 1 所示。利用这一特性, 本研究采用磺胺类药物经荧光胺在线柱后衍生荧光检测, 缩短了分析时间, 避免了样品处理中过多的净化步骤, 消除了基质干扰。

2.3 色谱分离条件选择

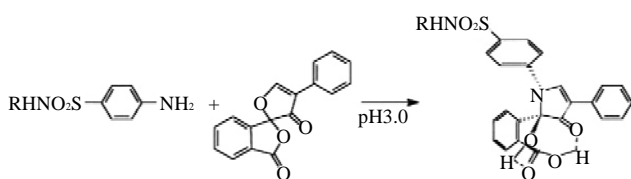
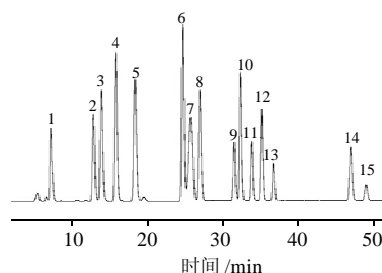


图 1 磺胺类药物衍生化反应式

Fig.1 Derivatization reaction of sulfonamide

磺胺类药物结构中含有氨基, 具有弱碱性, 流动相中的酸度对磺胺类药物的色谱分离有很大的影响。流动相的酸度过高, 很难将 14 磺胺类药物完全分离, 特别是磺胺二甲嘧啶与磺胺氯哒嗪, 磺胺甲氧哒嗪与磺胺甲基异噁唑, 保留时间几乎完全一致; 流动相酸度过低, 则会造成明显的峰拖尾现象。本研究采用乙腈、甲醇和 2% 乙酸溶为流动相, 通过梯度洗脱使 14 种磺胺

类药物均能得到良好的分离, 峰型尖锐且对称。14 种磺胺类标准溶液的色谱图如图 2 所示。磺胺类药物的保留时间分别为 7.344min(磺胺)、12.830min(磺胺嘧啶)、13.817min(磺胺噻唑)、18.214min(磺胺甲基嘧啶)、24.386min(磺胺 5- 甲氧嘧啶)、25.382min(磺胺二甲基嘧啶)、26.480min(磺胺甲氧哒嗪)、31.099min(磺胺氯哒嗪)、31.756min(磺胺 6- 甲氧嘧啶)、33.470min(磺胺甲基异噁唑)、34.672min(磺胺多辛)、36.296min(磺胺异噁唑)、46.048min(磺胺二甲氧哒嗪)、48.011min(磺胺喹噁啉)。



1.磺胺; 2.磺胺嘧啶; 3.磺胺噻唑; 4.磺胺吡啶(内标); 5.磺胺甲基嘧啶; 6.磺胺 5- 甲氧嘧啶; 7.磺胺二甲基嘧啶; 8.磺胺甲氧哒嗪; 9.磺胺氯哒嗪; 10.磺胺 6- 甲氧嘧啶; 11.磺胺甲基异噁唑; 12.磺胺多辛; 13.磺胺异噁唑; 14.磺胺二甲氧哒嗪; 15.磺胺喹噁啉。

图 2 14 种磺胺类药物的色谱图

Fig.2 HPLC separation profile for 14 sulfonamides

2.4 线性范围和检出限

表 2 14 种磺胺的线性范围、线性方程、相关系数和定量检出限

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients and limits of quantitation for 14 sulfonamides

磺胺类药物	线性范围/($\mu\text{g}/\text{L}$)	线性方程	相关系数	定量检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
磺胺	2.5~100	$y = 1.7589x$	0.9999	2.5
磺胺嘧啶	5.0~200	$y = 0.84115x$	1.0000	5.0
磺胺噻唑	5.0~200	$y = 1.0053x$	0.9999	5.0
磺胺甲基嘧啶	5.0~200	$y = 1.1160x$	1.0000	5.0
磺胺 5- 甲氧嘧啶	10~400	$y = 0.82673x$	0.9996	10
磺胺二甲基嘧啶	5.0~200	$y = 0.70654x$	0.9934	5.0
磺胺甲氧哒嗪	10~400	$y = 0.50376x$	1.0000	10
磺胺氯哒嗪	10~400	$y = 0.27538x$	1.0000	10
磺胺 6- 甲氧嘧啶	10~400	$y = 0.58109x$	0.9998	10
磺胺甲基异噁唑	10~400	$y = 0.26488x$	0.9999	10
磺胺多辛	10~400	$y = 0.43025x$	0.9999	10
磺胺异噁唑	10~400	$y = 0.18308x$	0.9998	10
磺胺二甲氧哒嗪	10~400	$y = 0.24444x$	0.9999	10
磺胺喹噁啉	20~800	$y = 3.2998 \times 10^{-2}x$	0.9999	20

取南美白对虾空白样品, 按 1.3.2 节操作步骤处

理, 分别添加混合标准工作液 25、100、250、500、1000 μL , 以磺胺峰面积与内标物峰面积的比值为纵坐标, 磺胺含量为横坐标, 绘制工作曲线, 并按照 10 倍信噪比计算每种磺胺的定量检出限。线性回归方程和定量检出限见表 2。14 种磺胺的标准工作曲线的相关系数均大于 0.9934, 定量检出限在 2.5~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。

2.5 方法回收率和精密度

表 3 对虾肌肉中 14 种磺胺类药物添加回收率和精密度($n=6$)
Table 3 Results of recovery and repeatability for 14 sulfonamides in shrimp muscle ($n=6$)

磺胺名称	添加量/ (mg/kg)	平均回 收率/%	RSD/%	磺胺名称	添加量/ (mg/kg)	平均回 收率/%	RSD/%
磺胺	0.0025	93.0	5.77	磺胺	0.01	95.1	5.17
磺	0.01	92.0	5.21	氯	0.04	94.9	5.43
胺	0.025	90.8	4.07	噻	0.1	94.9	5.82
	0.05	96.0	5.63	嗪	0.2	96.4	5.75
磺	0.005	94.3	5.93	磺胺	0.01	92.0	5.06
胺	0.02	93.0	5.65	6-	0.04	93.2	5.73
噻	0.05	92.2	4.79	甲氧	0.1	95.8	6.47
啉	0.1	95.6	6.06	啉	0.2	96.2	5.02
	0.005	89.0	3.82	磺胺	0.01	91.3	6.48
磺胺	0.02	95.3	6.64	甲基	0.04	96.8	6.80
噻	0.05	93.5	5.10	异噻	0.1	94.5	6.64
啉	0.1	92.6	7.01	啉	0.2	94.5	6.96
磺	0.005	89.4	5.27	磺	0.01	90.7	6.29
胺	0.02	90.1	6.41	胺	0.04	95.7	5.27
甲基	0.05	92.0	5.89	多	0.1	90.0	4.84
啉	0.1	90.8	5.63	辛	0.2	93.0	5.14
磺胺	0.005	88.9	4.63		0.01	94.1	4.71
二甲	0.02	92.7	4.51	磺胺	0.04	96.0	5.11
基噻	0.05	93.4	6.21	异噻	0.1	96.7	4.12
啉	0.1	94.3	6.35		0.2	97.4	3.47
磺胺	0.01	98.6	5.03	磺胺	0.01	94.1	6.26
5-	0.04	92.5	5.48	二甲	0.04	91.8	5.69
甲氧	0.1	95.7	6.54	氧	0.1	93.0	6.50
啉	0.2	92.0	6.90	噻	0.2	94.7	6.44
	0.01	93.7	4.37		0.02	93.0	6.21
磺胺甲	0.04	92.6	6.09	磺胺	0.08	94.2	5.88
氧噻	0.1	95.1	4.37	啉	0.2	92.1	6.82
啉	0.2	95.6	4.72		0.4	92.0	6.26

用不含磺胺类药物的南美白对虾样品进行添加回收率和精密度实验, 其结果见表 3。从表 3 可知, 本方法中磺胺类药物在各自的添加水平 2.5~50、5.0~100、10~200、20~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内, 其平均回收率在 88.9%~98.6% 之间, 相对标准偏差均小于 6.96%。另

取美国红鱼、鲫鱼样品分别做 2.5~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内的添加回收率实验, 美国红鱼平均回收率在 90.4%~97.9%, 鲫鱼平均回收率在 91.0%~97.5%, 相对偏差均小于 7%。由此可见本方法回收率好, 精密度高, 有较好的重现性, 广泛适用于水产品中磺胺类药物的检测。

3 结 论

建立水产品中 14 种磺胺类药物的高效液相色谱-柱后衍生荧光检测法测定测定方法。本方法采用盐酸溶液反萃取提高了净化效果; 优化的色谱条件可将 14 种磺胺类药物完全分离; 采用柱后衍生实现了在线检测, 缩短了分析时间, 提高了方法灵敏度。本方法具有重现性好、精密度高、杂质干扰少等优点, 广泛适用于水产品中磺胺类药物残留的检测。

参考文献:

- [1] 张小军, 郑斌, 陈雪昌. 高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中 4 种磺胺类药物残留量[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 235-237.
- [2] NURIA P N, ESTER G I, ANGEL M, et al. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides application to bee honey analysis[J]. Talanta, 2007, 71(2): 923-933.
- [3] 林海丹, 谢守新, 吴映璇. 高效液相色谱法同时测定鳗鱼及其制品中八种磺胺类药物[J]. 食品科学, 2005 26(1): 176-179.
- [4] SO Y W, CHANG H L, HYE S C, et al. Monitoring of 14 sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS[J]. Food Control, 2011, 22: 1101-1107.
- [5] 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]. J Chromatography B, 2006, 840(2): 132-138.
- [6] KRISTOF E M, ZHANG G F, WILLY E L, et al. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection[J]. J Chromatography A, 2004, 1047(1): 85-92.
- [7] CANNAN A, HEWITT S A, BLANCHFLOWER W J, et al. Gas chromatographic-mass spectrometric determination of sulfamethazine in animal tissues using a methyl trimethylsilyl derivative[J]. Analyst, 1996, 121 (10): 1457-1461.
- [8] THOMAS S T, DONALD K N. Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2005, 551(1/2): 168-176.
- [9] DAL-HO K, DAI W L. Comparison of separation conditions and ionization methods for the liquid chromatography-mass spectrometric determination of sulfonamides[J]. Journal of Chromatography A, 2003, 984 (1): 153-158.
- [10] 孙伟红, 冷凯良, 王志杰, 等. HPLC-MS/MS 内标法同时测定水产品中 18 种磺胺类药物残留量[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 294-296.
- [11] FUH M R, CHU S Y. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis[J]. Anal Chim Acta, 2003, 499(1/2): 215-221.
- [12] WILLEM H, MONIQUE B P, URPO L, et al. Application of a multi-sulfonamide biosensor immunoassay for the detection of sulfadiazine and sulfamethoxazole residues in broiler serum and its use as a predictor of the levels in edible tissue[J]. Anal Chim Acta, 2005, 552(1/2): 87-95.
- [13] NY5070—2002 无公害食品: 水产品中渔药残留限量[S].
- [14] Commission regulations(EEC). No.2377/90 Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin[S]. 1990.