

鸡蛋中 7 种磺胺药物的多残留检测方法研究

刘铁铮, 王 冉, 柳伟荣, 霍晓荣

(江苏省农科院 江苏省畜禽产品安全性研究重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘 要: 本试验研究建立了高效液相色谱法测定鸡蛋中 7 种磺胺药物(磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺间二甲氧嘧啶和磺胺喹恶啉)残留的提取、净化和高效液相色谱分析条件, 鸡蛋经二氯甲烷提取、固相萃取、净化处理后上机检测, 7 种磺胺药物标准曲线的相关系数(R^2)为 0.9995~0.9999, 在 0.05~0.2mg/kg 浓度范围内, 回收率为 73.2%~102.6%, 变异系数为 1.8%~8.7%。检测限为 0.01~0.02mg/kg, 定量限低于 0.05mg/kg。

关键词: 磺胺药物; 鸡蛋; 多残留; 固相萃取; 高效液相色谱-二极管阵列检测器

Multi-residues Simultaneous Determination of Seven Sulfonamides in Eggs by HPLC-DAD

LIU Tie-zheng, WANG Ran, LIU Wei-rong, HUO Xiao-rong

(Key Laboratory of Animal-Derived Food Safety, Jiangsu Province,
Jiangsu Academy of Agricultural Science, Nanjing 210014, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography method for the multi-residues simultaneous determination of sulfadiazine, sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline in eggs was described in this paper. The egg samples were extracted with dichloromethane, and cleaned up by a C_{18} column solid-phase extraction (SPE). The calibration curves for seven sulfonamides were linear in a concentration range of 0.02~1.0 $\mu\text{g/ml}$ ($R^2=0.9995\sim0.9999$). The recoveries at levels of 0.05, 0.1, 0.2 mg/kg fortified samples ranged from 73.2%~102.6%, with coefficient of variation of 1.8%~8.7%. The limits of detection were 0.02 mg/kg and the limits of quantification less than 0.05 mg/kg.

Key words: sulfonamides; egg; multi-residues; SPE; HPLC-DAD

中图分类号 S879.3

文献标识码 A

文章编号 1002-663(2005)11-0183-04

磺胺类药物(SAs)是一类传统的合成抗菌药物,因其抗菌谱广和价廉易得等特点,一直在兽医临床和畜牧业中广泛应用,有研究表明磺胺二甲基嘧啶等可诱发啮齿类动物甲状腺增生或肿瘤,磺胺类药物毒性较高、食品中残留半衰期长,对人和环境危害显著。

鸡蛋是人们首选的“价廉质优”的营养食品,它以营养丰富、易于吸收,口感良好、价格便宜而深受消费者喜爱。近几年,我国蛋鸡业得到了飞速发展,鸡蛋产量大幅增加,但由于我国的鸡蛋主要来自于千家万户小规模蛋鸡场,由于药物的不规范使用,常造成鸡蛋兽药残留超标。NY5039-2001《无公害食品 鸡蛋》中规定鸡蛋中磺胺类药物的最高残留限量(MRL)为 0.1mg/kg^[1],但目前尚未见有关鸡蛋中磺胺类药物残留检测方

法的研究报道,在评定无公害鸡蛋时只能参照蜂蜜或出口肉制品中磺胺残留的检测方法。由于鸡蛋与蜂蜜或肉制品物质组成、化学成分、基质的脂溶性及干扰物质等不同,磺胺药物在三者间的残留机制存在较大差异^[2],Kan(2002)调查研究^[3],磺胺类药物在鸡蛋的蛋黄和蛋白的残留机制和分布差异较大。因此,鸡蛋的生产、加工、贸易、质量监控以及管理、评定均迫切需要建立鸡蛋中磺胺类药物残留的测定方法。本研究选择国内常用的 7 种磺胺类药物,采用固相萃取、二极管阵列检测器和高效液相色谱建立了鸡蛋中磺胺类药物的多残留检测方法,该方法操作简单、准确度高,回收率和灵敏度好,效果理想。

收稿日期: 2004-11-30

基金项目: 江苏省科技厅攻关项目(BE2003306)

作者简介: 刘铁铮(1946-),研究员,主要从事畜产品安全与畜牧生产研究。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

磺胺类药物对照品: 磺胺嘧啶(SD)、磺胺二甲嘧啶(SM₂)、磺胺甲氧哒嗪(SMP)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺甲恶唑(SMZ)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺喹恶啉(SQX)(含量>99.9% 美国Sigma; 甲醇(色谱纯) 山东禹王实业有限公司禹城化工厂; 二氯甲烷(分析纯) 汕头市西陇化工厂; 乙酸(优级纯) 南京化学试剂公司; 正己烷(分析纯) 上海久意化学试剂有限公司; 柠檬酸(分析纯) 江苏鸿声化工厂; 氢氧化钠(分析纯) 南京化学试剂一厂; 流动相 乙酸(1%)+甲醇(68+32)。

磺胺标准溶液配制: 精确称取七种磺胺标准品各10mg于100ml棕色容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配成单一标准储备液浓度为100μg/ml, -20℃避光存放。吸取上述储备液各1.00ml,用流动相稀释储备液制备混合标准工作液(现配现用),用于绘制和校正标准曲线,或制备添加样品。

1.2 主要仪器

高效液相色谱系统 Agilent 1100 Series 美国 高速组织捣碎机 DS-1 上海标本模型厂; 电子分析天平 AL204 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; 旋涡混合器: XW-80A 上海琪特分析仪器有限公司; 氮吹仪 N-EVAPTM112 美国; 调速多用振荡器 HY-4 常州国华电器有限公司; 高速离心机德国 Biofuge; 固相萃取柱: AccuBOND II ODS-C₁₈ Cartridges, 500mg 6ml, (Agilent, 美国)。

1.3 样品处理与测定

将鸡蛋匀浆,称取匀浆物2.0g置50ml聚丙烯具塞离心管中,加入柠檬酸钠缓冲液0.4ml和二氯甲烷10ml,激烈震荡10min,然后中速振荡提取30min,10000×g离心10min,用5ml移液管移取下层液体5ml于离心管中,35℃水浴氮气吹干。用1ml流动相溶解残渣,涡旋混匀,加3ml正己烷,震荡去脂和色素,2000×g离心10min,弃去上层正己烷层。下层加水稀释至5ml,稀释液注入预先分别用5ml甲醇和5ml水处理的AccuBOND II ODS-C₁₈固相萃取柱,再先后用5ml水和5ml 5%甲醇溶液淋洗,最后用5ml甲醇洗脱,收集洗脱液,35℃水浴氮气吹干,用流动相溶解残渣,准确定容0.5ml,过0.22μm滤头后供液相色谱测定。

1.4 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 5μm, 250mm×4.6mm (i.d.); 流动相A: 甲醇+1%乙酸(30+70); 流动相B: 甲醇+1%乙酸(37+63); 采用梯度洗脱: 0~13min流动相A, 13~25min: 流动相B; 流速: 1.0ml/min; 检测器: 二极管阵列检测器; 检测波长: 270nm; 柱温:

35℃; 进样量: 20μl。

1.5 标准曲线

用流动相稀释储备液配制系列浓度的混合工作标准液: 0.02、0.05、0.1、0.2、0.5和1.0μg/ml 每个浓度梯度的标准液重复测定4次,取平均值绘制色谱峰面积-浓度标准曲线。采用外标标准曲线法对样品进行定量。

1.6 样品添加回收率测定

自制空白鸡蛋样品。称取鸡蛋匀浆物2.0g置于50ml聚丙烯具塞离心管中,分别加入100、200和400μl混合标准液制成样品浓度为0.05、0.1和0.2mg/kg的添加样,混匀后静置10~15min,按照“1.3”方法进行处理和测定,根据标准曲线或回归方程计算回收率。在0.05~0.2mg/kg添加浓度范围内,每个浓度梯度的样品设置4次重复。

2 结果与分析

2.1 标准曲线和线性范围

在0.02~1.0mg/ml范围内,各浓度的七种磺胺药物混合标样在选定的色谱条件下检测,得到的色谱峰面积与药物的质量浓度呈线性关系,其中y代表峰面积;x代表药物的工作液浓度(mg/ml),其回归方程和相关系数分别见表1,其线性响应范围完全满足测定的要求,证明该方法定量测定的可靠性。

表1 七种磺胺药物的标准曲线回归方程

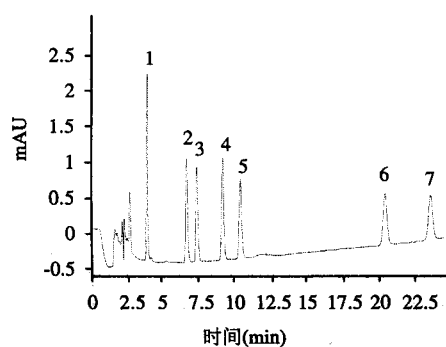
Table 1 The linear regression equations of calibration curves for seven sulfonamides

药物	回归方程	相关系数
磺胺嘧啶(SD)	$y = 89.68x + 0.251$	$R^2 = 0.9998$
磺胺二甲嘧啶(SM ₂)	$y = 75.56x + 0.187$	$R^2 = 0.9998$
磺胺甲氧哒嗪(SMP)	$y = 67.85x + 0.09$	$R^2 = 0.9999$
磺胺间甲氧嘧啶(SMM)	$y = 86.64x + 0.513$	$R^2 = 0.9995$
磺胺甲恶唑(SMZ)	$y = 80.91x + 0.315$	$R^2 = 0.9999$
磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)	$y = 59.18x + 0.2246$	$R^2 = 0.9999$
磺胺喹恶啉(SQX)	$y = 56.32x + 0.1965$	$R^2 = 0.9999$

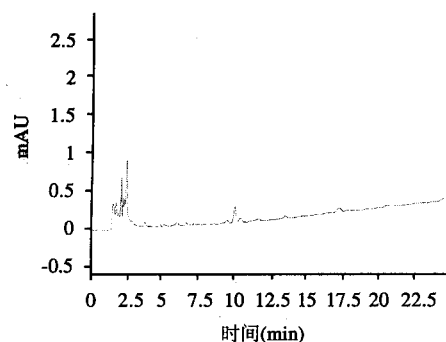
2.2 色谱图和保留时间

在试验选定的色谱条件下,测得7种磺胺的保留时间依次为: SD: 4.071min, SM₂: 6.839min, SMP: 7.553min, SMM: 9.355min, SMZ: 10.594min, SDM: 20.689min, SQX: 23.863min。色谱峰形较好,7种磺胺分离度较好(见图1)。

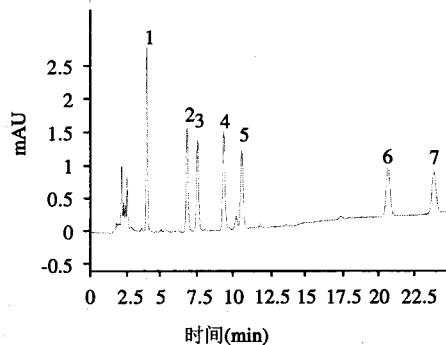
2.3 鸡蛋样品添加回收率和检测限



A. 0.2 μg/ml 混合标准工作液



B. 空白鸡蛋样品



C. 0.2mg/kg添加样品

1.磺胺嘧啶;2磺胺二甲基嘧啶;3.磺胺甲氧哒嗪;4.磺胺间甲氧嘧啶;5.磺胺甲恶唑;6.磺胺间二甲氧嘧啶。

图1 7种磺胺药物的HPLC色谱图

Fig.1 Typical chromatograms of 7 sulfonamides

空白鸡蛋中添加不同浓度的7种磺胺药物后,经样品提取、去脂、净化,HPLC检测,通过标准曲线计算样品回收率和不同批次样品处理的变异系数,结果见表2。

从表2看出,本试验七种磺胺药物在0.05~0.2mg/kg添加浓度范围内,鸡蛋样品回收率的范围分别SD: 73.8%~98.8%,SM₂: 81.5%~96.6%,SMP: 73.2%~84.4%,SMM: 74.6%~87.1%,SMZ: 84.9%~102.6%,SDM: 76.9%~84.1%,SQX: 79.8%~84.6%。变异系数低于9%,在1.8%~8.7%之间。按照检测限的定义^[4](分

表2 7种磺胺药物的添加回收率

Table 2 Recoveries of six sulfonamides from spiked eggs

药物	添加浓度	测定浓度 ^a	回收率(%)	变异系数
磺胺嘧啶 (SD)	0			
	0.05	0.0494±0.0033	98.8	6.7
	0.1	0.0738±0.0026	73.8	3.5
磺胺二甲嘧啶 (SM ₂)	0			
	0.05	0.0483±0.0030	96.6	6.2
	0.1	0.0815±0.0024	81.5	2.9
磺胺甲氧哒嗪 (SMP)	0			
	0.05	0.1636±0.0029	81.8	1.8
	0.1	0.0422±0.0024	84.4	5.8
磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)	0			
	0.05	0.0798±0.0032	79.8	4.6
	0.1	0.1464±0.0063	73.2	4.3
磺胺甲恶唑 (SMZ)	0			
	0.05	0.04355±0.0029	87.1	6.6
	0.1	0.0746±0.0025	74.6	3.3
磺胺间二甲氧嘧啶 (SDM)	0			
	0.05	0.1496±0.0088	74.8	5.9
	0.1	0.0513±0.0034	102.6	6.7
磺胺噻恶唑 (SQX)	0			
	0.05	0.0961±0.0039	96.1	4.1
	0.1	0.1698±0.0082	84.9	4.8
磺胺二甲嘧啶 (SDM)	0			
	0.05	0.0408±0.0035	81.6	8.7
	0.1	0.0769±0.0042	76.9	5.4
磺胺噻恶唑 (SQX)	0			
	0.05	0.1682±0.0035	84.1	2.1
	0.1	0.0423±0.0032	84.6	6.3
磺胺噻恶唑 (SQX)	0			
	0.05	0.0798±0.0051	79.8	5.1
	0.1	0.1648±0.0136	82.4	6.8

Note: ^aMean ± SD, n=4。

析方法能够从样品的背景信号中检测出待测物存在时需要的最低浓度),在高效液相色谱条件下,将标样连续稀释后进样,据3倍噪音的峰高响应值和回收率计算各种SAs的检测限为:SD、SM₂、SMP、SMM和SMZ的检测限为0.01mg/kg,SDM的检测限为0.02mg/kg,SQX的检测限为:0.03mg/kg。定量限低于0.05mg/kg。

3 讨论

3.1 提取液的选择

磺胺类药物SAs含有伯胺基和磺酰胺基,呈酸碱两性,但主要呈弱酸性,等电点范围为3~5,极性较高。一般采用极性溶剂提取或碱性溶液与溶剂反萃取净化的方法处理^[5],常用的提取液有乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷等^[6~8]。鸡蛋的营养组分与动物肌肉组织或肝脏等营养成分组成不同,提取液的选择上也略有差别。本试验比较了三种提取液的提取效果,在鸡蛋样品中加入乙腈后,发现鸡蛋发生变性,提取率低,且乙腈沸点较高,磺胺药物的耐热性较差,用乙腈提取耗时较长。用乙酸乙酯作为提取液浸出的杂质较多,净化后杂质仍有干扰且回收率不高。试验表明采用二氯甲烷提取时,

浸出的杂质少,回收率高易排除基质干扰,效果理想。

在提取时,加入适量柠檬酸钠缓冲液有利于降低乳化和提高振荡提取的效率。我们曾试过加无水硫酸钠,但试验表明,均质后的鸡蛋中加入无水硫酸钠,在振荡过程中鸡蛋与无水硫酸钠包裹在一起,形成团块,大大影响了提取效率,换用柠檬酸缓冲液后提取率有很大的提高。

3.2 流动相的选择和梯度洗脱

试验依据文献资料^[7]对常用的流动相溶剂--甲醇、乙腈、水、磷酸盐缓冲溶液等不同配比的多溶剂体系进行一系列预试验,李俊锁等(2002)^[7]选择乙腈--0.017mol/L磷酸体系作为流动相,虽然6种磺胺类药物都达到基线分离,但整个出峰周期太长,要1h才能完成。考虑到磺胺类结构式中带氨基,有弱碱性,其中性分子和其离子形式在有机相和水相中分配性质不同,有机溶剂和pH对磺胺的保留有重要影响,应采用酸性流动相,所以考虑添加1%乙酸为流动相,以改善磺胺药物的保留值和峰形。选择甲醇增加流动相溶剂强度,以甲醇-1%乙酸进行不同比例洗脱试验,林海丹等(2003)在测定动物组织中磺胺药物残留时认为流动相甲醇与1%乙酸的最佳比例为35:65^[5],本试验发现,在该流动相条件下磺胺甲恶唑SMZ组分前鸡蛋样品有一杂质干扰峰,杂质峰和SMZ组分峰部分重合导致回收率超过100%,后通过变化流动相两者比例,使得杂峰与SMZ完全分开,得到甲醇与1%乙酸最佳比例为体积比30:70,又由于SMZ组分与SDM组分之间时间间隔达16min,因此考虑采用梯度洗脱,将流动相的配比变化使SDM组分的保留时间前移,通过试验确定将流动相配比变为甲醇:1%乙酸=37:63,这样将SDM的出峰时间提前到20.689min,虽然与SMZ还有时间间隔,该时间间隔再缩短将使色谱图基准线向上倾斜,使图谱变得难以积分。通过该梯度洗脱,7种组分分离效果和峰形好,整个出峰周期控制在25min之内(见图1)。

3.3 脱脂剂的选择

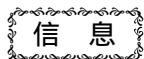
样品用二氯甲烷提取,由于二氯甲烷属中等极性溶剂,有可能提取出类脂物,因此提取液浓缩后需要去

除类脂物,特别是鸡蛋样品,提取液氮气吹干后为深黄色油状物质。本试验采用甲醇-正己烷液液萃取脱脂,甲醇与正己烷有一些互溶性,会产生轻度乳化,考虑加水以增加甲醇相密度,避免乳化现象,兼顾到磺胺类药物的弱碱性,其在酸性溶液中溶解度大,因此最后来用甲醇-乙酸-正己烷液液萃取脱脂,直接以流动相(含乙酸、甲醇)溶解残渣,加正己烷萃取脱脂2次,能去除大量脂肪和大部分的色素,溶液变得澄清,有利于下一步的净化。这种微量脱脂法耗试剂少,且避免分液漏斗转移时分析物的损失。

本试验建立了鸡蛋中7种磺胺类药物的多残留检测方法,样品的提取、净化、浓缩,以及建立的色谱条件,操作简单、方法稳定、准确度高,在25min内能一次性检出7种药物残留,耗时少,灵敏度高,为鸡蛋品质的监控和无公害鸡蛋的评定提供了有效检测方法。

参考文献:

- [1] NY5039-2001, 无公害食品 鸡蛋[S].
- [2] Agarwal V K, High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs[J]. J Chromatogr, 1992, 624(2): 411-423.
- [3] Kan C A, Petz M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white [J]. J Food Agric Chem, 2000, 48: 6397-6403.
- [4] 李俊锁, 钱传范. 残留分析中的检测限和测定限[J]. 农药译丛, 1997, 19(1): 56-60.
- [5] 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.
- [6] 王建华, 林黎明, 陈长法. 鸡肉中的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.
- [7] 李俊锁, 李西旺, 魏广智, 等. 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.
- [8] Endoh Y S, Yamaoka R Sasaki N. Liquid chromatographic determination of sulphonamides in swine tissues [J]. J AOAC Int, 1987, 70(6): 1031-1032.



菲律宾开发功能性添加剂

最近,菲律宾一家公司科研人员利用椰子油研制开发出具有特殊脂肪合成品、风味香精酯化合物和抗菌剂三种功能性新产品。

特殊脂肪合成品是将椰子油经过脂肪酶作用水解后生成的低热量的中碳链甘油三酯;风味香精酯化合物为椰子油衍生物,可作为水果蔬菜保鲜剂,能使水果蔬菜两周内免受外来细菌感染,保持水果蔬菜的风味和软硬度;单甘油酯也是椰子油的提取产品,可作为抗菌成分,抵抗引起肠胃炎、腹泻的菌类。