

全自动固相萃取技术同时测定水产品中 8 种磺胺类药物残留

李兆新¹, 戴相辉², 王英姿^{1,3}

(1.中国科学院水产黄海研究所, 国家水产品质量监督检验中心, 2.睿科仪器有限公司,3.中国海洋大学)

前言: 磺胺类药物 (Sulfonamides, SAs) 是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 是用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物, 在兽医临床和水产养殖中广泛使用, 但磺胺类药物对人类有一定的毒副作用, 而且食品中的低浓度残留容易诱发细菌的抗药性, 影响抗生素对人体的治疗效果^{[1]~[2]}, 因此, 中国、欧盟、美国、日本等国将磺胺类药物列为动物饲养和水产养殖中限制使用的药物, 并规定了严格的限量标准^[3], 我国现阶段的磺胺类药物检测标准分为液液萃取法^{[4]~[5]}和固相萃取法^{[6]~[7]}两类, 还有QuEChERS检测方法^[8], 液液萃取方法简单, 但是净化效果差, 容易产生假阳性; 固相萃取方法净化效果好但是步骤复杂且重现性不理想; 现阶段已经有将全自动固相萃取仪用于日常研究、检测中的报道^{[9]~[11]}。应用全自动固相萃取仪来完成固相萃取步骤, 能够实现固相萃取过程 (活化, 上样, 淋洗, 洗脱, 浓缩) 自动化, 且减少人工操作带来的误差, 是未来检测技术的发展方向。

摘要: 本研究针对兽药检测前处理繁琐的问题, 参考《农业部 958 号公告-12-2007 水产品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱法》^[12]。引入了全自动固相萃取技术, 对水产品中 8 种磺胺类药物检测方法进行了研究, 优化固相萃取的上样速度以及洗脱流速与洗脱体积; 改进了磺胺类药物残留全自动固相萃取方法; 试样用乙酸乙酯提取, 正己烷除脂后, 应用全自动固相萃取仪完成整个固相萃取流程, 用液相色谱-紫外检测器进行定量, 保留时间定性, 回收率在 70%~90%, RSD<9.3 (n=5), 检出限为 7.5 μ g/kg~13 μ g/kg, 满足日常检测的需求。

关键词: 磺胺 HLB 全自动固相萃取 液相色谱法

1. 实验部分

1.1 试剂与仪器

- 1.1.1 乙酸乙酯 (色谱纯 Merck)
- 1.1.2 正己烷 (色谱纯 Merck)
- 1.1.3 甲醇 (色谱纯 Merck)
- 1.1.4 冰乙酸
- 1.1.5 无水硫酸钠, 经650 $^{\circ}$ C灼烧6小时, 置于干燥器内备用
- 1.1.6 1%的乙酸溶液 取冰乙酸 (1.2.5) 5mL稀释至500mL
- 1.1.7 0.1%的乙酸溶液 取冰乙酸 (1.2.5) 1mL稀释至1000mL
- 1.1.8 标准储备液 取8种磺胺类药物标准品, 用甲醇配制成1mg/mL的标准储备液
- 1.1.9 混合标准使用液 取适量的标准储备液, 用甲醇稀释成1 μ g/mL的混合标准使用液
- 1.1.10 固相萃取柱 Oasis HLB 60mg/3mL (Waters. 美国)
- 1.1.11 超高效液相色谱 UPLC-PDA检测器 (Waters. 美国)
- 1.1.12 全自动固相萃取仪 Fotector (Reeko. 美国)
- 1.1.13 氮气吹干装置 N-EVAP 112型 (Organomat ionA ssoc iates. 美国)
- 1.1.14 均质器 T18 (IKA. 德国)
- 1.1.15 离心机 (Thermo 美国)

1.2 仪器分析条件

- 1.2.1 色谱柱 HyPURITY C18 100mm \times 2.1 \times 5 μ m (Thermo. 美国)
- 1.2.2 检测波长 270nm

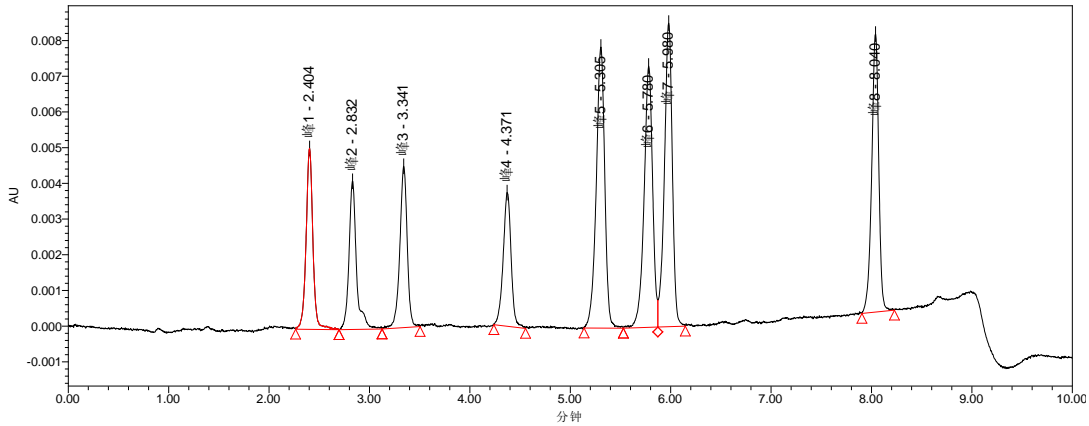
- 1.2.3 进样量 10 μ L
 1.2.4 柱温 35 $^{\circ}$ C
 1.2.5 流动A为甲醇；流动相B为0.1%乙酸溶液
 1.2.6 洗脱梯度 详见表1

表1 8种磺胺色谱梯度洗脱条件

时间	A %	流速 mL/min
0.0	10	0.3
4.5	25	0.3
8.0	45	0.3
8.1	10	0.3
10.0	10	0.3

1.2.7 8种磺胺标准样品图谱 (200 μ g/L)

图1: 8种磺胺标准样品图谱 (200 μ g/L)



磺胺嘧啶	2.404	磺胺甲基嘧啶	3.341	磺胺甲噁唑	5.035	磺胺二甲异恶唑	5.98
磺胺噻唑	2.832	磺胺二甲基嘧啶	4.371	磺胺而二氧嘧啶	5.78	磺胺喹恶林	8.04

1.3 样品前处理方法

1.3.1 提取

称取样品5.0g置于50mL离心管内，加入10g的无水硫酸钠(1.1.5)，加入20mL乙酸乙酯，在漩涡混匀器混匀2min后超声萃取1min；4000r/min离心10min，将上清液小心转移至另一50mL离心管中，残渣用20mL乙酸乙酯重复萃取一遍，合并乙酸乙酯层；将提取液用氮气吹干装置浓缩至近干。

1.3.2 净化

加入1mL甲醇溶解上述残渣，再加入4mL 1%的乙酸溶液漩涡混匀，加入8mL正己烷，充分萃取后，8500r/min离心5min，将下层水相转移到Fotector上样瓶中，并用6mL超纯水分两次洗涤离心管，将洗涤液全部转移至上样瓶中。

将上样瓶与固相萃取柱固定在Fotector全固相萃取仪上，按照图2程序运行，残渣用1mL流动相进行溶解，上液相色谱仪检测。

2. 实验结果与讨论

2.1 上样流速的选择

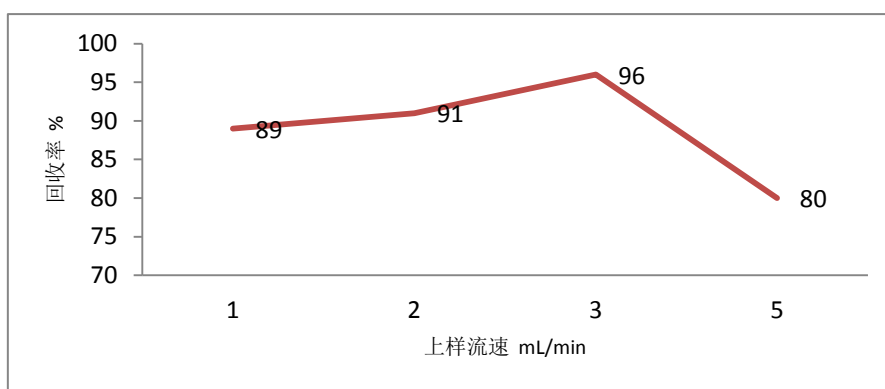
在相同的实验条件下，对比了上样流速为1ml/min、2 ml/min、3 ml/min以及5ml/min，实验结果如图3所示，当上样速度为3 ml/min回收率达到到最大值，当上样速度达到5ml/min，

回收率大幅度的下降，因此本方法选择以3 ml/min作为上样流速。

图2: Fotector自动固相萃取仪运行程序

No.	操作命令	溶剂	流速 (ml/min)	体积 (ml)	时间(min)	排出
1	活化	甲醇	2.0	3	1.8	废液1
2	活化	水	3.0	5	2.2	废液2
3	上样		3.0	12	5.2	废液1
4	清洗样品瓶	水	80.0	5	2.7	废液2
5	气推		10.0	10	1.0	废液2
6	淋洗	5%甲醇水	1.0	2	2.2	废液1
7	气推		10.0	10	1.0	废液1
8	吹干				5.0	
9	清洗溶剂泵	甲醇	10.0	2	0.4	
10	清洗溶剂泵	甲醇	10.0	2	0.4	
11	洗脱	甲醇	1.0	4	4.4	收集试管
12	气推		10.0	10	1.0	收集试管
13	浓缩样品				30.0	
14	结束				57.3	

图3 上样流速与回收率相关性



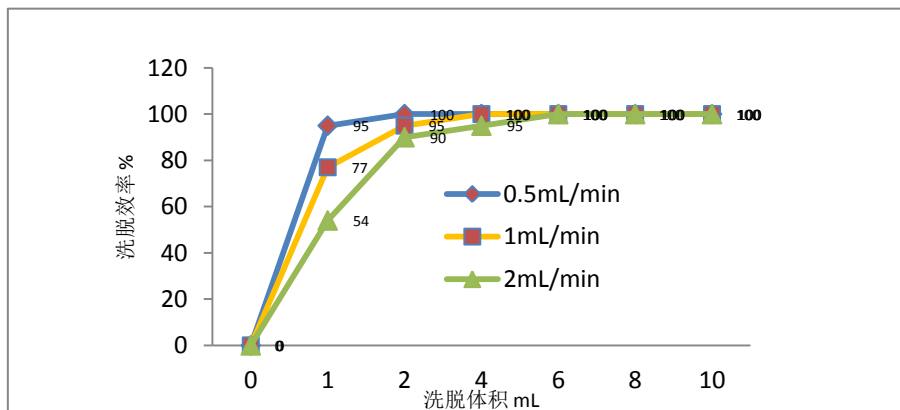
2.2 洗脱体积以及洗脱流速的选择

2.2.1 在相同的实验条件下，对比洗脱流速为0.5 ml/min、1 ml/min、2 ml/min，

2.2.2 取1mg/kg混标250 μ L，用0.75mL甲醇，4mL乙酸溶液（1.1.6），6mL水稀释，过固相萃取；上样完成后，将10mL洗脱液分为1mL，1mL，2mL，2mL，2mL，2mL共6次对固相萃取柱进行洗脱，分别收集上述6份洗脱液浓缩至近干，用流动相溶解，液相检测，当测定色谱图上无任何响应则认为完全洗脱。

2.2.3 实验结果如图4所示，当洗脱流速为0.5mL/min时需要洗脱2mL可以将目标化合物完全洗脱，当洗脱流速为1mL/min时需要洗脱约3mL甲醇洗脱，而洗脱流速为2mL/min时需要洗脱约6mL甲醇洗脱，因此基于洗脱效率与洗脱效果的考虑，本方法选择以1 ml/min的速度，洗脱体积为4mL。

图4 不同洗脱速度的洗脱曲线



2.3 工作曲线以及检出限

配制系列浓度的混合标准工作溶液，按1.2中选定的实验条件进行测定，并绘制工作曲线。结果表明，8种磺胺浓度在20~500 ng/mL范围与其色谱峰面积 y 呈线性关系。线性回归方程、相关系数及以3倍信噪比计算各组分的检出限列于表2。

表2 8种磺胺药物标准工作曲线与检出限

化合物名称	检出限 $\mu\text{g/kg}$	工作曲线	相关系数
磺胺嘧啶	13	$y=1.26 \times 10^2 x - 3.5 \times 10^2$	0.999 7
磺胺噻唑	11	$y=1.24 \times 10^2 x - 7.76 \times 10^2$	0.999 9
磺胺甲基嘧啶	9.5	$y=1.30 \times 10^2 x - 6.38 \times 10^2$	0.999 1
磺胺二甲基嘧啶	11	$y=1.21 \times 10^2 x - 3.5 \times 10^2$	0.999 8
磺胺甲噁唑	8.5	$y=2.63 \times 10^2 x - 5.36 \times 10^2$	0.999 9
磺胺而二氧嘧啶	9.5	$y=2.44 \times 10^2 x - 1.14 \times 10^2$	0.999 4
磺胺二甲异恶唑	7.5	$y=2.68 \times 10^2 x - 1.06 \times 10^3$	0.999 8
磺胺嘧啶	8.5	$y=2.41 \times 10^2 x - 1.34 \times 10^3$	0.999 1

2.4 样品加标回收率以及精密度

2.4.1 对虾基底加标回收率以及精密度

称取5.0 g 对虾空白样品，分别添加适量的磺胺混合标准溶液，使其含量为25.0 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ ，于冰箱中冷藏平衡4 h，然后按上述选定的样品分析方法进行样品分析，结果列于表3。表中数据表明，该方法在检测对虾样品时具有较高的准确度和精密度。

2.4.2 草鱼基底加标回收率以及精密度

称取5.0 g 草鱼空白样品，分别添加25.0 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 的磺胺混合标准溶液，于冰箱中冷藏平衡4 h，然后按上述选定的样品分析方法进行样品分析，结果列于表3。表中数据表明，该方法在检测草鱼样品时具有较高的准确度和精密度。

2.4.3 表3中数据显示，不同基底、不同浓度加标水平下回收率在70%~90%，RSD于1.2~9.3，充分说明该方法适用于对虾与草鱼中磺胺类药物的检测。

2.5 如表4中数据所示，整体回收率与方法的稳定性都要高于手动固相萃取，经分析，

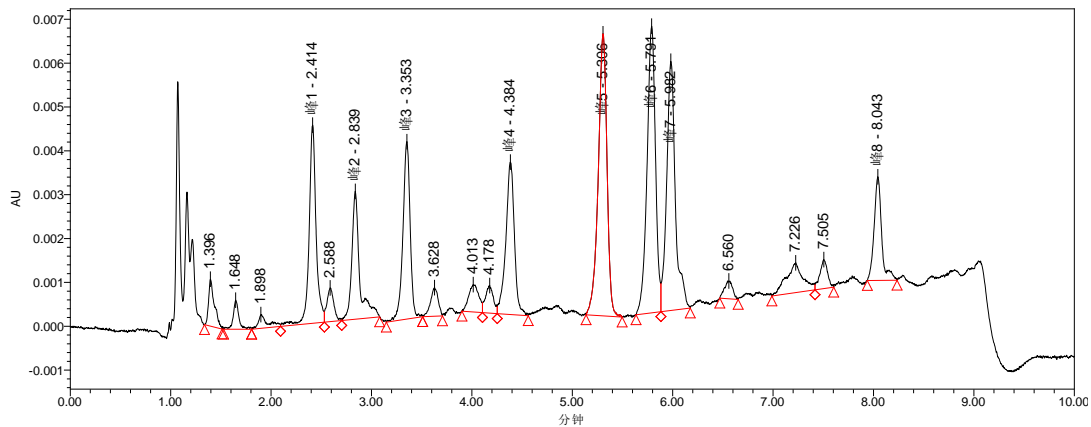
- (1) 固相萃取的流速与回收率有密切的关系，根据2.1与2.2 的实验结果可以得出，当上样流速为3mL/min时，以及洗脱体积为4mL，当洗脱流速低于1mL/min，才能得到最大的回收率；我们在进行手动处理时，会因为流速过大或者过小而造成回收率的损失，采用全自动固相萃取进行分析时则可以忽略上述因素带来的回收率损失以得到较高的回收率结果。
- (2) 同样结果的重现性与固相萃取的稳定密切相关，手动固相萃取时会因不同样品基质而带来上样阻力的不一致，造成上样流速的差别，洗脱时流速过大等诸多难以控制因素造成回收率或高或低，而全自动固相萃取仪能够实现一个可以控制的固相萃取过程，并且可以减少人工操作带来的误差，多可以得到较好的重现性实验结果。
- (3) 进行手动固相萃取检测时，往往是将所有样品的提取部分全部完成，然后统一进行固相萃取，时间大部分都浪费在等带离心机，等待旋转蒸发等步骤上，十分的浪费时间，极大的降低检测的工作效率，而Reeko全自动固相萃取仪则可以避免这种情况，首先我们可以进行一批样品的处理（6个），在第一批样品进行自动固相萃取的同时我们可以进行第二批样品的提取以实现提取与固相萃取两个过程的叠加，合理的对实验时间进行统筹安排，极大的提高了工作效率。

表3: 对虾基底以及草鱼基底加标回收率以及精密度

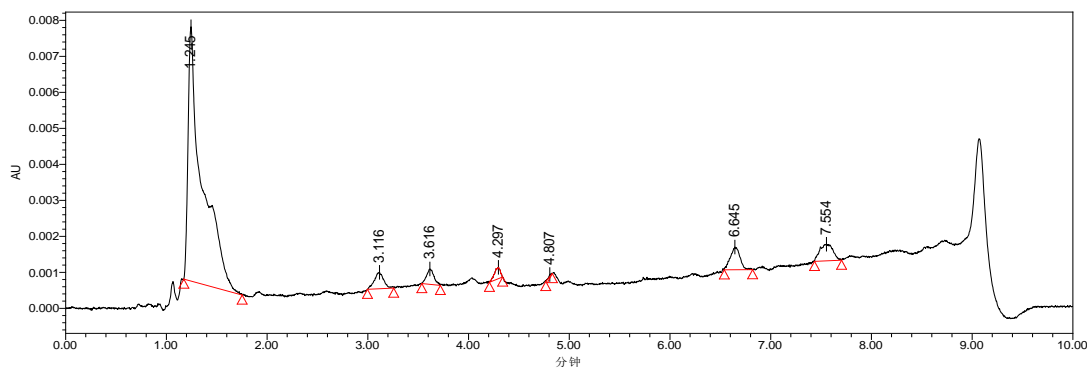
目标物化合物	加标浓度 μ g/kg	对虾		草鱼	
		回收率%	RSD%	回收率%	RSD%
磺胺嘧啶	25.0	82.2	5.3	85.1	4.1
	50.0	80.1	4.9	83.1	2.2
磺胺噻唑	25.0	79.8	6.6	76.3	6.8
	50.0	87.1	3.2	80.1	4.2
磺胺甲基嘧啶	25.0	83.1	7.2	86.2	4.1
	50.0	84.7	6.3	85.8	3.0
磺胺二甲基嘧啶	25.0	87.2	5.1	83.2	2.4
	50.0	84.1	3.3	86.9	4.6
磺胺甲噁唑	25.0	78.9	2.7	74.2	3.6
	50.0	77.4	1.2	71.4	2.5
磺胺邻二氧嘧啶	25.0	89.2	7.8	82.5	6.1
	50.0	90.9	4.6	79.7	5.4
磺胺二甲异恶唑	25.0	85.1	2.5	85.3	4.7
	50.0	88.6	4.2	84.1	4.3
磺胺喹恶林	25.0	73.6	8.4	73.3	9.3
	50.0	78.2	8.3	71.0	6.1

附录

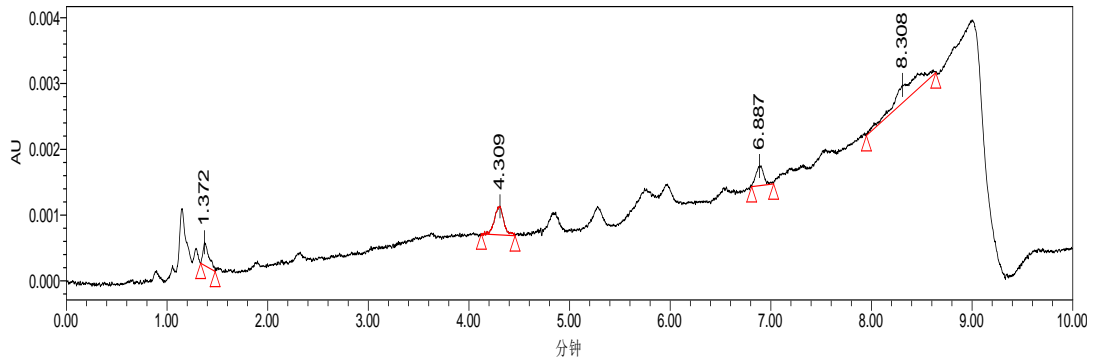
附录图1: 50 μ g/kg加标水平



附录图2 对虾空白样品



附录图3 草鱼空白基质样品



3 参考文献

- [1] 王瑞深 肉品中残留磺胺类药的危害及其监控. 《兽医导刊》 2010年第02期
- [2] 王彪 动物性食品中磺胺类药物残留的危害及检测研究进展 《兽医药品学——2010 第三届中国兽药大会论文集》 2010 年
- [3] 林维宣 各国食品中农药兽药残留限量规定[M]. 大连: 大连海事出版社, 2001: 1 309 - 1 310.
- [4] GB/T 20759-2006 畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
- [5] GB/T 22951-2008 河豚鱼、鳗鱼中十八种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法
- [6] 农业部1025号公告-23-2008 动物源食品中磺胺类药物残留检测液相色谱-串联质谱法
- [7] SN/T 1965-2007 鳗鱼及其制品中磺胺类药物残留量测定方法 高效液相色谱法
- [8] GB/T 21316-2007 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 高效液相色谱-质谱法
- [9] 何桂华、 李晓明等, 全自动固相萃取技术同时测定动物产品中9种磺胺药物残留 化学分析计量2008年, 第17卷, 第1期
- [10] 何桂华、 李晓明等, 动物产品中4种喹诺酮类药物残留同时测定的全自动固相萃取技术研究
- [11] 贾红卫, 赵玉, 自动固相萃取_高效液相色谱_紫外检测法测定肉和肉制品中的三聚氰胺残留
- [12] 农业部958号公告-12-2007 水产品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱法