

高效液相色谱法检测海水中磺胺类药物残留

周明莹¹ 马 健² 高湘萍³ 陈碧鹃^{1*} 乔向英¹ 谭志军¹ 郭萌萌¹

(¹农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室

中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²青岛国家海洋科学研究中心, 266071)

(³青岛海洋地质研究所, 266071)

摘 要 研究建立了海水中 5 种磺胺类药物残留检测方法。样品经 Oasis HLB 固相柱萃取, 磺胺类药物与干扰物分离, 利用高效液相色谱法, 采用紫外检测器检测。以乙腈(pH≈3): 水(pH≈3)=20:80 作为流动相, 于 270nm 波长处对 5 种磺胺类药物进行同时检测。结果表明, 5 种药物在 0.05~5.00mg/L 范围内均呈良好线性关系, 两个添加浓度的平均回收率范围为 75%~92%, 相对标准偏差皆小于 10%。该方法海水中最低检出浓度为: 磺胺嘧啶(SD)20 ng/L、磺胺甲基嘧啶(SM1)20 ng/L、磺胺二甲基嘧啶(SM2)20 ng/L、磺胺甲基异恶唑(SMZ)30 ng/L、磺胺喹恶啉(SQ)40ng/L。

关键词 高效液相色谱 海水 磺胺类药物 残留

中图分类号 S931 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2011)02-0102-04

Determination of sulfonamides residues in seawater by using high performance liquid chromatography

ZHOU Ming-ying¹ MA Jian² GAO Xiang-ping³ CHEN Bi-juan^{1*}
QIAO Xiang-ying¹ TAN Zhi-jun¹ GUO Meng-meng¹

(¹Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²National Oceanographic Center, Qingdao 266071)

(³Qingdao Institute of Marine Geology, 266071)

ABSTRACT An analytical method was established for the determination of residues of five sulfonamides in sea water by high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet detector. The five drugs showed good linear relationship in the range of 0.05~5.00mg/L. The average recovery was 75%~92% at two concentration levels. The relative standard deviation was less than 10%. The minimum detection concentrations were as follows: sulfadiazine, 20 ng/L; sulfamerazine, 20 ng/L; sulfamethazine, 20ng/L; sulfamethoxazole, 30ng/L; sulfaquinoxaline, 40 ng/L. The results indicate that this HPLC assay is specific, accurate and reproducible.

农业部公益性行业专项(nyhyzx07-047)和国家海洋局项目[DOMEP(MEA)-02]共同资助

* 通讯作者。E-mail: chenbj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2010-06-04; 接受日期: 2010-07-28

作者简介: 周明莹(1964-), 女, 副研究员, 主要从事海洋生态环境检测和研究。E-mail: zhoumy@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836341

KEY WORDS High performance liquid chromatography Seawater Sulfonamides Residue

近年来水产养殖业已成为我国经济发展的支柱产业,然而随着养殖规模的不断扩大,各类水产病害不断发生。为了预防、控制和治理鱼类各种疾病,加快鱼类生长,抗生素在水产养殖中的应用越来越广泛。长期以来,由于人们还没有彻底搞清药物的药效对水体生态环境的影响,养殖户超量用药、滥用渔药现象严重。目前水产养殖最常用的给药途径为随饵料口服或药浴浸泡。公布的数据表明,投放到水中的抗生素仅有20%~30%被养殖动物吸收,其余部分未被食用或食用后又随粪便排泄到养殖环境中(胡莹莹等 2004)。虽然这些物质的大多数不是生物富集性的,但由于源源不断地进入养殖环境中,使得它们能够持续长久地存在,给人类和环境造成慢性、远期和累积的危害,如致癌、体内蓄积、免疫抑制、致敏和诱导耐药菌株等。据报道,磺胺类(Sulfonamides, SAs)药物能破坏人体的造血系统,造成溶血性贫血症,甚至有引起潜在致癌性的可能(王绪聊等 2004)。

磺胺类药物为常见的合成抗菌剂,用于渔业生产的磺胺类药物主要有:磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲基嘧啶(SM1)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺甲基异恶唑(SMZ)、磺胺喹恶啉(SQ)。它们主要用于治疗鱼类的赤皮病、肠炎、链球菌病、弧菌病等(无公害食品 渔用药物使用准则 2002)。

目前,磺胺类药物的检测方法主要有:酶联免疫吸附法、气相色谱法、液相色谱法、气相色谱-质谱法和液相色谱-串联质谱法等(万春花等 2008)。酶联免疫吸附法容易出现假阳性;气相色谱法检测需要先将其极性部分衍生化,操作复杂;气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法仪器昂贵,要求技术水平高,目前很难在国内用于水环境中抗生素的常规性检测。通过实验证明,高效液相色谱法是分离抗生素的有效方法,可用来检测水体中微量抗生素。

水产养殖中抗生素的使用对生态环境的影响,已经引起有关部门的关注和重视。但是,科研人员在研究药物残留的环境行为时,缺少能客观评价养殖环境中抗生素含量水平的检测方法,阻碍了工作的顺利开展。因此,本文的目的是利用高效液相色谱建立海水中磺胺类药物残留检测方法,为研究磺胺类药物在海洋环境中的分布、归趋及环境行为提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 试剂

实验用水为 Milli Q 系统生产的超纯水;甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷皆为色谱纯;甲酸为分析纯。

磺胺标准品(纯度 $\geq 99\%$):磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲基嘧啶(SM1)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺甲基异恶唑(SMZ)、磺胺喹恶啉(SQ)购自美国 Sigma 公司。

磺胺标准溶液:磺胺标准贮备液(1 mg/ml)、磺胺标准中间工作液(10.0 mg/L)用乙腈配制。

混合标准工作液(0.05~5.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$):用流动相配制。该工作液当日新配。

1.2 主要仪器及设备

Agilent 1100 液相色谱仪(配有紫外检测器);旋转蒸发设备(上海亚荣生化仪器厂);旋涡振荡器(德国 IKA 仪器公司);Milli Q 超纯水仪(密理博公司);氮吹仪(美国 Organomation 公司);VisiprepTM-DL 型固相萃取装置(美国 Supelco 公司);Oasis HLB 固相萃取小柱(6ml/500 mg,美国 Waters 公司);LC-C₁₈固相萃取小柱(6ml/1g, Supelco);棕色梨形瓶:50ml。

1.3 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈, 250mm \times 4.6mm (i. d.);色谱柱温度:40 $^{\circ}\text{C}$;流动相:乙腈(pH \approx 3):水(pH \approx 3)=20:80;流速:1.0ml/min;检测器:紫外检测器;检测波长:270nm;进样量:20 μl 。

1.4 分析步骤

1.4.1 固相萃取小柱活化

实验前,依次用 5 ml 二氯甲烷、5 ml 甲醇、10 ml 水淋洗 Oasis HLB 萃取小柱。

1.4.2 富集

用真空泵将 500 ml 水样(样品中如有悬浮颗粒杂质,应预先用玻璃纤维或 $0.45\mu\text{m}$ 水相膜过滤除去)以 4 ml/min 流量通过固相萃取小柱(约 2 滴/s)。然后用 10ml 水清洗小柱,继续抽真空,将小柱抽干。

1.4.3 洗脱浓缩

用 10 ml 二氯甲烷/甲醇混合溶剂(体积比 1:1)洗脱,保持流速小于 1 滴/s。收集洗脱液于棕色梨形瓶中,并在 30°C 水浴中浓缩至约 1 ml,再用柔和的氮气吹干,准确加入 1.00 ml 乙腈($\text{pH}\approx 3$),旋涡混合振荡溶解残留物, $0.22\mu\text{m}$ 油性滤膜过滤,滤液供色谱测定。同时做基质空白试验。

注意,为了减少磺胺类药物损失,旋蒸时水浴温度不能太高,氮气流速要小,并尽可能在短时间内测定完毕。

1.4.4 色谱测定

分别向液相色谱仪注入 $20\mu\text{l}$ 标准工作液和样液,记录色谱峰高,并与相应的标准峰高进行比较,外标法定量。在结果计算中,将空白值扣除。

2 结果与讨论

2.1 波长的选择

通过在 $200\sim 300\text{ nm}$ 波长范围内进行扫描,并综合考虑标准样品的吸收情况和各峰的响应情况,选用 270 nm 作为测定波长。

2.2 流动相的选择

SAs 具有弱酸性,流动相的 pH 值对 SAs 在色谱柱上的分离和保留影响很大,本实验考察了不同 pH 值、不同流动相组成对待测组分保留时间及峰形的影响。结果表明,采用甲酸来控制流动相的 pH 值,可以在保持较好分离度的前提下获得理想的色谱峰。

对于流动相中的有机相,分别比较了甲醇和乙腈的影响,结果发现用甲醇作为流动相时容易造成色谱峰拖尾,而且保留时间不稳定。而乙腈作为流动相可以更好地提高检测的灵敏度和分离效果。实验发现,用乙腈作流动相时,必须将其 pH 用甲酸调至 3 左右,否则易造成前伸峰。本方法将乙腈和水两种流动相组分用甲酸调 pH 至 3 左右,样品峰均能彼此很好地分离,峰对称性好,保留时间重现性稳定。图 1 为 5 种磺胺类药物标准液相色谱。

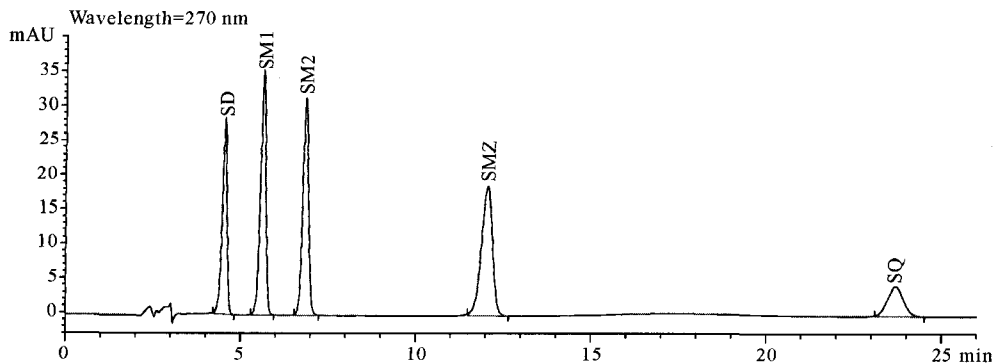


图 1 5 种磺胺类药物标准溶液液相色谱

Fig.1 Chromatograms of the five sulfonamides

2.3 提取方式的选择

磺胺类药物在水中溶解度很低,所以在选择提取方法时尝试用乙酸乙酯、正己烷、二氯甲烷进行液-液萃取,同时与 SPE 固相萃取方法进行比较。

实验发现,用乙酸乙酯进行液/液萃取,所得回收率高于正己烷、二氯甲烷,但由于有机相体积较大,浓缩时间太长,造成目标物挥发损失,使得回收率较低,重复性较差。

SPE 固相萃取时,选用 Oasis HLB 固相萃取小柱和 C₁₈ 固相萃取小柱同时进行。试验结果发现,用 Oasis HLB 小柱萃取回收率高于 C₁₈ 固相萃取小柱(表 1)。

2.4 回收率和精密度

用远洋海水作为空白海水,取 500 ml 进行高低两种浓度的加标回收试验,每个添加水平设 4 个平行,按 1.4 项下的提取方法处理后进行测定,计算目标化合物的回收率。其平均回收率和相对标准偏差见表 2。由此看出,待测组分的回收率皆在 75% 以上。

2.5 方法的线性范围

配制浓度为 0.05、0.10、0.50、1.0、5.0 mg/L 的标准系列混合溶液,按 1.3 所述色谱条件进行色谱分析,作峰高对浓度的标准曲线。结果表明,5 种 SAs 药物线性关系良好,相关系数均大于 0.99。

2.6 最低检出限

最低检出限是在色谱图上可清楚确认的分析目标物色谱峰的下限,通常为信噪比的 3 倍。在上述检测条件下,测得 5 种磺胺类药物最低检出限分别为:0.01、0.01、0.01、0.015、0.02 mg/L。换算到海水浓度分别为:20、20、20、30、40 ng/L。即海水中的 5 种磺胺类药物低于此浓度时,本方法无法检出。

3 结论

本方法利用固相萃取(SPE)技术富集海水中磺胺类药物,样品处理量大,减少了高纯有机溶剂的用量,减少了对环境的污染;与液-液萃取比较,处理过程中不会产生乳化现象,能有效去除干扰杂质,获得较高而且稳定的回收率;采用高效液相色谱,以乙腈(pH≈3):水(pH≈3)=20:80 作为流动相,于 270 nm 波长处对 5 种磺胺类药物进行同时检测。方法的加标回收率和最低检测限均能达到水质检测质量控制要求。

参 考 文 献

- 万春花,龙洲雄. 2008. 磺胺类药物残留的色谱分析进展. 现代科学仪器, (2):99~104
- 王绪聊,吴永宁. 2004. 色谱在食品安全分析中的应用. 北京:中国轻工业出版社,270~271
- 无公害食品. 渔用药物使用准则, NY5071-2002
- 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
- 胡莹莹,王菊英,马德毅. 2004. 近岸养殖区抗生素的海洋环境效应研究进展. 海洋环境科学, 23(4):76~80

表 1 使用不同萃取柱回收率比较(%)

萃取柱 Column	SD	SM1	SM2	SMZ	SQ
Oasis HLB	90	92	84	81	85
C ₁₈	83	85	81	72	78

表 2 加标回收率及其相对标准偏差(%)

添加水平 Addition level (μg/L)	回收率 Recovery rate					相对标准偏差 RSD				
	SD	SM1	SM2	SMZ	SQ	SD	SM1	SM2	SMZ	SQ
1.0	88	89	81	82	75	3.8	3.1	3.0	5.6	6.4
5.0	90	92	84	81	85	2.5	2.1	3.1	4.1	6.8