

微波萃取鳗鱼中磺胺类药物的 HPLC 测定方法

卢立泓 陶建伟 蔡藩 曹付莹 (上海应用技术学院化工系, 上海 200235)

王顺风 (上海新仪微波化学科技有限公司, 上海 200235)

本次论文采用微波萃取反相高效液相色谱的测定方法对鳗鱼中磺胺类药物的含量进行测定。实验结果表明, 采用微波萃取, 其方法的分析时间短并可排除其它基质干扰, 所用的试剂量少且污染小等优点而具有一定的优越性; 与常规的萃取法进行比较, 其精密度、重复性及方法的回收率均达到了分析要求。

关键词: 微波萃取, 磺胺类药物, 反相高效液相色谱

中图分类号:

Abstract

After researching the test conditions, we introduce the microwave extraction and setup a system method via HPLC to determine the sulfamethazine and the sulfadimethazine contained in eels. The method shows great selectivity, high sensitivity, good reproductivity. Also it shorten the length of the test and can obviate the interference come from impurities as well. Secondly, compare two different extraction methods: regular extraction and microwave extraction. The result shows that with the help of microwave extraction, the preciseness and reproductivity are up to the standard and it is pretty good in recovery.

Keywords: microwave extraction, sulfa, reversed-phase high performance liquid chromatograph

磺胺类药物作为常用抗生素, 被广泛用作饲料添加剂来预防动物疾病和提高饲料利用率, 这不仅增加了残留物在鱼体组织中蓄积的可能性, 并且还会使鱼类产生严重的抗药性, 其体内沉积物还可能以各种方式传入人体。磺胺甲基嘧啶 (Sulfamethazine, $C_{11}H_{12}N_4O_2S$) 和磺胺二甲基嘧啶 (Sulfadimethazine, $C_{12}H_{14}N_4O_2S$) 均为白色结晶性粉末, 前者MP 234~238 $^{\circ}C$, 在水中的溶解度为 1:3300, 微溶于乙醚和氯仿, 溶于稀酸和强碱溶液; 后者MP:197~199 $^{\circ}C$, 几乎不溶于水, 溶于稀酸、强碱和碳酸碱液中。文献报道测定动物肝中磺胺残留量的方法有固相萃取高效液相色谱法^{[1][2]}, 高效液相色谱质谱测定法^[3]等, 本文采用微波技术萃取鳗鱼中的磺胺类药物, 用 HPLC法对其进行测定。

1. 试验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪 (Hypersil ODS- C_{18} 色谱柱)

MDS-6 型温、压双控密闭微波消解/萃取系统 (上海新仪微波化学科技有限公司)

UV-1601pc (日本岛津)

循环水式多用真空泵 (上海豫康科教仪器设备有限公司)

磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶标样 (Riedel-dehaen)

二氯甲烷 (分析纯 AR, 国药集团化学试剂有限公司)

无水硫酸钠 (分析纯 AR, 金山化工厂)

乙酸铵 (分析纯 AR, 上海化学试剂有限公司)

乙腈 (HPLC/SPECTRO AS-1122, TEDIA COMPANY)

甲醇 (Fish Scientific, Fisher ChemAlert@Guide)

斯柏克林蒸馏水

标准溶液：称取磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶 0.0100g、0.00990g（精确至 0.0001g）分别定容于 50mL 容量瓶，用甲醇稀至刻度，其浓度分别为 200.0mg/L,198.0mg/L。

鳗鱼样品（市售）

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制备

准确吸取磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶的标准溶液 0.10、0.20、0.30、0.40 及 0.50mL 于 5 个 10mL 容量瓶，用甲醇稀释至刻度摇匀，得到磺胺甲基嘧啶浓度为 2.00mg/L, 4.00mg/L, 6.00mg/L, 8.00mg/L 和 10.00mg/L；磺胺二甲基嘧啶浓度为 1.98mg/L, 3.96mg/L, 5.94mg/L, 7.92mg/L 和 9.90mg/L 的系列标准溶液。

分别吸取不同浓度的磺胺甲基嘧啶及磺胺二甲基嘧啶标准溶液，每次进样 20 μ L（实际进样量三倍于定量管的量）采用外标法定量，以峰面积对浓度（mg/L）作图。得到磺胺甲基嘧啶线性关系为 $y=175.29x-2.2476$ ，相关系数 $R=0.99970$ ；磺胺二甲基嘧啶为 $y=169.02x-6.6429$ ，相关系数 $R=0.99930$ 。

1.2.2 样品处理与测定

将市售鳗鱼去除内脏后洗净，粉碎，加入磺胺甲基嘧啶和磺胺二甲基嘧啶的标准溶液各 2 毫升，充分混匀，冷冻保存 7 天备用。

准确称取 5g 鳗鱼样品（精确至 0.001g），加入 25mL 二氯甲烷，控制一定的温度和时间进行微波萃取。加入适量无水硫酸钠，静置并过滤，滤液置 50mL 梨形烧瓶中，真空泵去除二氯甲烷。于其中加入 2mL 流动相，移入刻度试管中，超声波混匀，离心，其水相经滤膜过滤至 10mL 容量瓶中。油相中再加入流动相进行萃取，如此重复操作 4 次，合并滤液并用流动相稀至刻度，进行 HPLC 分析。

2. 结果与讨论

2.1 HPLC 测定的色谱条件

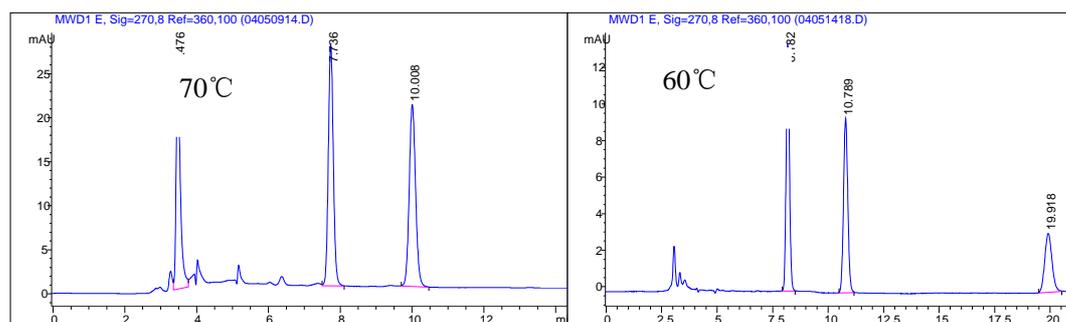
分别吸取标准溶液各 0.50mL 于同一刻度试管中，在不同的色谱条件下，用相应的流动相稀释一倍。连续注入数针，用配制的标准溶液，采用峰保留值比较法进行定性，确定色谱条件（流动相的配比、流速及检测波长）。根据对实际样品进行的 HPLC 分析，对此色谱条件再进行优化，确定最佳色谱条件。数据处理均由惠普高效液相色谱化学工作站完成。

经过实验，HPLC 测定的色谱条件确定为：检测波长 270nm，流速 0.5mL/min，流动相为乙腈：水=25：75（用乙酸铵调节 PH 至 5.1）。

2.2 微波萃取的实验条件

分别吸取标准溶液各 0.50mL 于同一萃取罐中，加入 25mL 二氯甲烷，控制一定的温度和时间进行微波萃取。用真空泵去除二氯甲烷，加入 2mL 流动相，移入刻度试管中稀至刻度进行 HPLC 分析，用外标法测定其回收率。

提高微波萃取的温度，有利于萃取过程的进行。然而，由于磺胺甲基嘧啶和磺胺二甲基嘧啶遇热易分解，所以温度提高很有可能使回收率反而降低。实验中分别于 70 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C、50 $^{\circ}$ C、45 $^{\circ}$ C 和 35 $^{\circ}$ C 下，萃取时间 4~5min，做空白实验，得到如下的色谱图和测定结果。



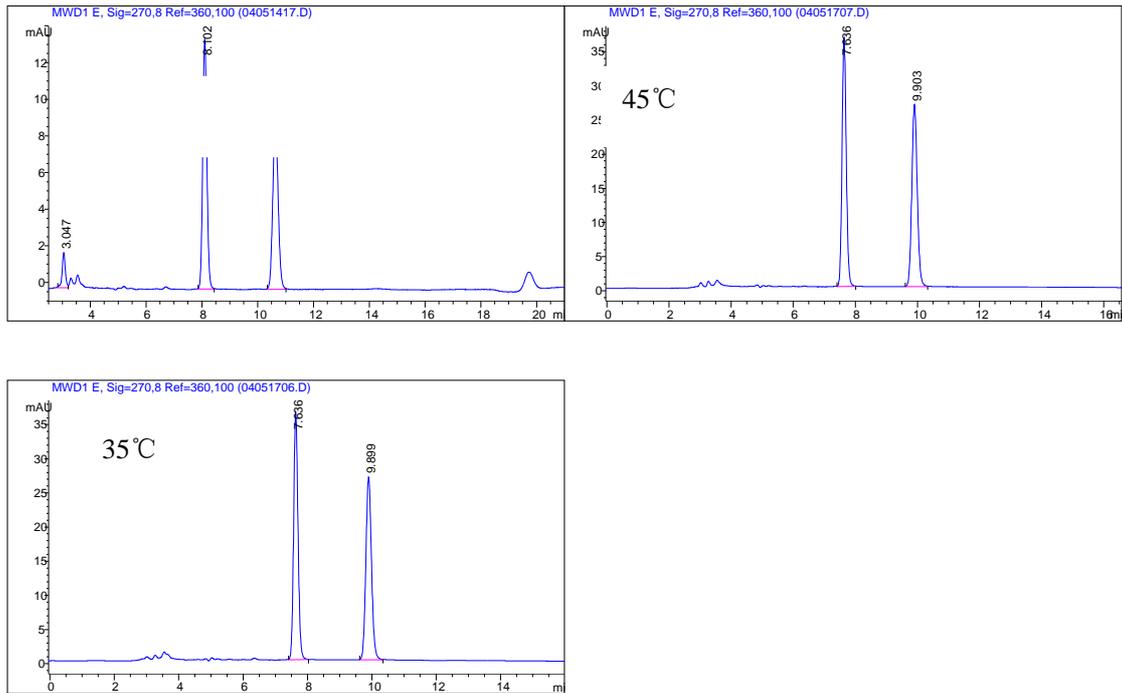


图 1. 微波萃取不同温度下空白试验的色谱分离图

表 1. 微波萃取温度对空白试验回收率的影响

温度 (°C)	含量 (ppm)		回收率	
	磺胺甲基嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺二甲基嘧啶
70	1.523	1.550	76.2%	77.5%
60	0.8216	0.8020	82.2%	80.2%
50	0.8158	0.7729	81.6%	77.3%
45	1.986	1.961	99.3%	98.0%
35	1.978	1.965	98.9%	98.3%

从图谱和表格可见，70°C、60°C、50°C下，待测物质都有一定程度的分解，空白回收率不高。在45°C、35°C下，待测物质没有分解，回收率都达到98%以上，完全符合要求。因此，确定微波萃取条件为：45°C，5min，800W。

2.3 微波萃取法与常规萃取法的比较

2.3.1 方法的精密度比较

取一个样品，分别进行常规萃取法和微波萃取法处理后，各重复进样5次，根据其峰面积的大小，计算回收率及RSD，进行精密度的比较。

表 2. 两种方法的精密度比较

方法	平均回收率 (%)		RSD (%)	
	磺胺甲基嘧啶	磺胺二甲基嘧啶	磺胺甲基嘧啶	磺胺二甲基嘧啶
常规萃取法	83.06%	84.62%	0.89%	0.36%
微波萃取法	77.04%	85.58%	0.37%	0.96%

2.3.2 方法重复性及回收率比较

在上述色谱条件及处理方法下，分别选用常规萃取和微波萃取两种方法，对同一批样品平行处理五份，进行方法重复性的验证及回收率的比较。

表3 两种方法的重复性比较

方法	平均加入标样量 (mg)		平均测得量 (mg)		平均回收率 (%)		RSD (%)	
	A	B	A	B	A	B	A	B
常规萃取	7.00	7.02	5.95	6.04	84.9	85.5	1.41	3.18
微波萃取	9.75	9.74	7.89	8.26	80.9	84.8	2.55	1.63

注：A 为磺胺甲基嘧啶；B 为磺胺二甲嘧啶。

结果表明，从精密度、重复性、回收率来看，微波萃取基本可以达到萃取要求，回收率较高，方法可行。因其具有节省时间、节省试剂和污染小等优点，所以此方法具有一定的优越性，可应用于萃取工作中。

参考文献

- 熊芳, 戴华, 袁智能. 固相萃取高效液相色谱法测定动物肝中四种磺胺残留量. 《分析科学学报》. 2002, 18 (5); 415-417
- 林海丹, 谢守新, 冯德雄, 杨培慧. 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. 《分析测试学报》. 2003, 22 (1); 94-96
- 吴西梅, 杨业, 梁春穗, 杜达安. 高效液相色谱质谱测定肉品中的磺胺二甲嘧啶. 《中国卫生检验杂志》. 2004, 14 (2); 164-165
- 刘天才. 试谈微波技术在分析测试中的应用. 《广石化科技》. 2002, 3; 40-43
- Nagaraja Padmarajiah, Yathirajan Hemmige S, Sunitha Kallanchira R, Vasantha Ramanathapura A. A new, sensitive, and rapid spectrophotometric method for the determination of sulfa drugs. 《Journal of AOAC International》. 2003, 85(4); 869-874
- Furusawa N, Kishida K. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk. 《Fresenius` Journal of Analytical Chemistry》. 2003, 371(7); 1031-1033