

微萃取超高效液相色谱检测磺胺类药物的有效性探讨

王晓晖

(齐鲁制药有限公司 山东 济南 250100)

摘要:目的:探讨微萃取超高效液相色谱检测磺胺类药物的有效性。方法:选择专用的试验鸡肉进行微萃取超高效液相色谱检测,检测试验鸡肉中的磺胺类药物残留情况,以色谱分离条件、液相微萃取条件、硫酸钠浓度和萃取温度、萃取时间、搅拌速度优化,分析微萃取超高效液相色谱检测过程优化,观察微萃取超高效液相色谱检测12份鸡肉样品中磺胺类药物的有效性。结果:12份鸡肉样品中有9份样品未检出磺胺类药物,3份样品中含有磺胺类药物残留,有1份为20.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的磺胺二甲氧基嘧啶,2份为49.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、31.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的磺胺甲噁唑,符合国家磺胺类药物残留量标准。结论:微萃取超高效液相色谱检测磺胺类药物的有效性高,可有效检出动物性食品中的磺胺类药物残留类型与残留量。

关键词:磺胺类药物;微萃取;超高效液相色谱检测;有效性

磺胺类药物属于抗菌药物,主要是由人工合成,药性稳定,抗菌谱广,常用于人类与动物各种疾病防治,对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和衣原体、诺卡氏菌属等有明显的抑制作用,所以该类药物的临床应用广泛,尤其是用于动物疾病治疗时,用药剂量较大,容易在动物的体内造成残留,致使许多动物性食品中有一定量的磺胺类药物残留,这对人们的身心健康影响较大^[1]。动物性食品中残留磺胺类药物对人们的健康危害大,所以要采用科学合理的方法对药物残留情况进行检测,我国规定动物性食品中的磺胺类药物残留量每千克不超过50 μg ,实际检测要采用灵敏度高的方法对动物性食品磺胺类药物残留量进行检测,以确保检测结果准确^[2]。高效液相色谱是食品是否残留磺胺类药物的常用检测方法,但因为检测样品中常具有一定量的杂质,且食品基质复杂,检测量低,容易对检测结果造成较大影响,所以样品前处理工作非常关键,比如常用的液-液萃取、固相萃取、超声波辅助萃取等,这类萃取方法的效果良好,据临床研究显示^[3],中空纤维膜液相微萃取可更好的萃取样品,具有较好的纯化能力,可获得较高的富集倍数,用于磺胺类药物超高效液相色谱检测前处理的可行性高。本文对磺胺类药物用微萃取超高效液相色谱检测的有效性进行分析,探讨微萃取超高效液相色谱检测的应用价值。

1、研究资料

1.1 仪器和试剂 (1) 仪器:采用UHPLC-30A超高压液相色谱仪、Accurel PP聚丙烯微孔中空纤维膜和电子天平、注射器、旋涡混合器与微孔滤膜。(2) 试剂:磺胺二甲氧基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲噁唑、磺胺、甲醇、磺胺嘧啶、乙腈、超纯水,每份试剂取2mg为标准品以超纯水对试剂进行定容,定容到100ml即可获得标准储备液,将标准储备液储存在冰箱中备用,调整冰箱的温度为4℃。(3) 鸡肉样品:12份鸡肉样品,样品采购于当地农贸市场和大型超市等场地的新鲜鸡肉。

1.2 检测方法 (1) 磺胺类药物提取:取5g新鲜鸡肉作为检测样品,将鸡肉放在离心管里,随后将20ml的乙酸乙酯加入进行涡动2min即可,再将离心管放在仪器中进行离心处理5min,保持每分钟4000转的离心率,取上清液放在鸡心瓶里,对离心管中的残渣进行再次提取,将20ml的乙酸乙酯加入,重复上述涡动和离心处理。将4ml的盐酸溶液(0.1mol/L)加入提取液,将试管放在蒸发器中浓缩到3ml,随后倒在新的离心管里,对离心管涡旋处理30s,再以每分钟3000转的离心率离心处理5min,用正己烷洗鸡心瓶,取下层液作为样品备用。用甲醇和盐酸溶液对MCX柱进行活化,用提取的备用液过柱,保持每分钟1ml的流动速度,再用盐酸溶液、浓度为50%的甲醇乙腈溶液对MCX柱进行淋洗,随后用洗脱液进行洗脱处理,收集好洗脱液以40℃氮气将其吹干,将10ml的超纯水加入进行残余物溶解,以一次性滤膜过滤(滤膜孔径为0.22 μm)萃取。(2) 色谱条件:色谱柱为2.1mm \times 100mm, 1.9 μm ,控制流动速度为每分钟0.2ml,温度控制在40℃,进样量控制为10 μL 。(3) 富集条件:萃取以标准混合溶液为佳,裁剪中空纤维膜为5cm左右,将中空纤维膜放在丙酮中进行清洗,采用超声对其清洗

10min,置入通风橱里自然风干,对一端进行热封,加接收液到中空纤维膜里,再将另一端热封,确保中空纤维膜得到完全封闭。萃取采用1.0mmol/L的盐酸,375g/L的硫酸钠,0.2mol/L的氢氧化钠,控制温度在30℃,保持每分钟300转的搅拌速度,4h的萃取,保持给出相体积为8ml,接收相体积为8 μL 。

2、结果与讨论

2.1 色谱分离条件优化

以甲醇和乙腈为流动相,优化色谱分离条件,主要针对流动相种类与含量等,调整流动相的体积含量分别为15%、25%和35%、45%,结果显示流动相会影响磺胺类药物的分离,乙腈具有较好的洗脱能力,可观察到较好的流动相时峰,45%的乙腈能快速分离六种磺胺,2-6min的保留时间,说明将45%的乙腈作为流动相的有效性高,能防止缓冲盐溶液损伤色谱柱,可有效缩短色谱分析时间。

2.2 液相微萃取条件优化

(1) 接收相与给出相溶液浓度:磺胺类药物具有两性电解质的特点,离子化过程通常有两步^[4]。pH能对磺胺类物质的亲水-疏水性进行调节,采用HF-LPME萃取与富集的效果显著,可对给出相的pH进行适当的调节,促使磺胺类药物表现为分子状,再对接相pH进行调节,使其呈离子状态,以此形成pH差异,这能为磺胺类药物由给出相到接收相提供动力。以接收相的氢氧化钠溶液浓度调整进行试验,浓度分别为0.10mol/L、0.15mol/L、0.20mol/L、0.25mol/L、0.30mol/L,结果显示六种磺胺类药物在氢氧化钠溶液浓度为0.20mol/L时,富集倍数最大,采用0.20mol/L氢氧化钠溶液为萃取浓度的有效性高;以给出相的盐酸溶液浓度调整进行试验,浓度分别为0.1mmol/L、0.5mmol/L、1.0mmol/L和5.0mmol/L、10.0mmol/L,观察盐酸溶液浓度对磺胺类药物造成的影响,结果显示给出相的盐酸溶液浓度升高,六种磺胺类药物的EFs升高,盐酸溶液浓度调整为1.0mmol/L,磺胺类药物有下降的趋势,说明给出相采用浓度为1.0mmol/L盐酸浓度的有效性高。

(2) 硫酸钠浓度优化:盐析效应可使样品中的待测物质溶解度降低,对待测物质萃取相分配有明显的提高作用,通过盐析效应可有效提高萃取效率,试验过程中给样品溶液中添加硫酸钠能使溶液离子强度有效增强^[5]。以硫酸钠浓度调整进行试验,浓度调整范围为每升200-400g,结果显示六种磺胺类药物EFs因给出相硫酸钠浓度提高而加大,浓度调整到>375g/L时,有五种磺胺类药物EFs有明显下降趋势,磺胺二甲氧基嘧啶的EFs未见明显变化,说明盐浓度高时,磺胺类药物分子通过膜到有机相速率明显降低,这种情况会对萃取造成较大影响,在实际检测中给试验样品添加375g/L硫酸钠能有效改善萃取效率。

(3) 萃取温度优化:萃取的效率与萃取温度密切相关,通常随着萃取温度升高而增强^[6]。温度升高可使待萃取样品质量传递系数变大,这时萃取物质扩散速度随之加快,而萃取温度过高会对给出相稳定性造成较大影响,甚至明显影响支撑液膜的稳定程度,致使给出相的水分快速挥发,较大程度影响富集效果。以萃取温度调整进行试验,分别调整温度为25℃、30℃和35℃、40℃、50℃,

结果显示六种磺胺类药物在萃取温度 30℃时 EFs 最大,说明 30℃有利于磺胺类药物萃取。

(4) 萃取时间优化: 萃取过程中的待萃取物质到接收相溶液的量与萃取时间密切相关, 萃取时间长则进入量增大^[7]。以萃取时间调整进行试验, 分别调整萃取时间为 2h、3h 和 4h、5h, 结果显示萃取时间延长, 六种磺胺类药物的 EFs 增大, 如果萃取时间 > 4h, 则接收相溶液体积随之减小, 同时 EFs 有显著减少的趋势, 综合分析待萃取物进入接收相溶液量平衡后, 萃取时间的延长, 可使 SLM 不稳定性增强, 随之萃取效率明显降低, 同时萃取溶液减少, 说明萃取时间为 4h 有利于磺胺类药物检测。

(5) 搅拌速度优化: 萃取过程中的搅拌速度要进行严格控制, 通常磁力搅拌可促使给出相待萃取物质扩散到接收相溶液的速度加快, 使有机相扩散时间缩短, 萃取时间随之缩短, 可有效改善 EFs, 如果搅拌的速度过快, 则可能会导致萃取溶液分散加速, 使提取液中的萃取溶剂含量较高, 这时萃取效率明显降低^[8]。以给出相搅拌速度调整进行试验, 观察搅拌速度对萃取效率造成的影响, 调整范围为 100–400r/min, 结果显示六种磺胺类药物 EFs 最大值是在搅拌速度 300r/min 的状态下, 说明 300r/min 的搅拌速度有利于磺胺类药物检测。

2.3 鸡肉样品检测

12 份鸡肉样品中有 9 份样品未检出磺胺类药物, 3 份样品中含有磺胺类药物残留, 有 1 份为 20.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的磺胺二甲氧基嘧啶, 2 份为 49.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、31.83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的磺胺甲噁唑, 符合国家磺胺类药物残留量标准。

3、结论

微萃取超高效液相色谱检测动物性食品中磺胺类药物残留类型和残留量的效果显著, 微萃取试验样品的过程中要严格把握给出相、接收相的溶液参数, 包括 pH 和硫酸钠浓度以及萃取温度、萃取时间等参数的合理调整^[9-10]。经过本次综合分析而言, 微萃取超高效液相色谱检测的给出相盐酸溶液浓度要调整为 1.0mmol/L, 硫酸钠的浓度要调整为 375g/L, 接收相氢氧化钠溶液的浓度要调整为

0.2mmol/L, 控制温度在 30℃, 以 300r/min 的速度进行搅拌, 萃取时间控制在 4h 为宜。

参考文献

- [1]魏丹,张菊,国明,等. 基于磁性金属有机骨架材料磁性固相萃取-高效液相色谱-串联质谱测定环境中痕量磺胺类药物残留[J]. 分析试验室,2022,41(04):397-402.
- [2]成小丹,范哲锋. 聚合物整体柱微萃取/超高效液相色谱法测定蜂蜜中的 4 种磺胺类药物[J]. 分析测试学报,2022,41(03):375-380.
- [3]王晓茵,宋翠平,孙晓亮,等. 改良柱前荧光胺衍生化-高效液相色谱法测定猪肉中 11 种磺胺类药物残留[J]. 肉类研究,2022,36(02):33-38.
- [4]张敏,张杨开,徐宜宏,等. 超高效液相色谱-串联质谱同时测定畜禽粪便发酵沼液中 9 种磺胺类抗生素[J]. 东北农业科学:1-7.
- [5]乔颖,刘雪红,韩凤丽,等. SimChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定禽类产品中磺胺类药物及其增效剂[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(23):9062-9069.
- [6]张丽蓉,谢宋阳,肖紫芬,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定祛痘类化妆品中 10 种磺胺类药物[J]. 分析科学学报,2021,37(06):814-818.
- [7]许晓辉,徐惠昌,王小乔,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定海螵蛸中 9 种磺胺类药物残留量[J]. 化学试剂,2021,43 (11):1546-1550.
- [8]赵寅,卢玉,刘桂亮,等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定牛奶中 22 种磺胺类兽药残留[J]. 分析试验室,2022,41(02):187-191.
- [9]沈杨银,饶桂维,蔡婕好,等. 悬浮固化液相微萃取超高效液相色谱法测定环境水样中磺胺类药物[J]. 化学分析计量,2020,29(05):49-53+79.
- [10]周靖雯,吴友谊,殷斌. 中空纤维膜液相微萃取-毛细管电泳法测定环境水样中的 4 种磺胺类药物[J]. 理化检验(化学分册),2018,54(06):627-633.