

固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中 甲氧苄啶残留量

孙玉慧¹, 李天宝¹, 范志超¹, 李文斌²

(1. 江门出入境检验检疫局, 广东 江门 529000; 2. 北京迪马科技有限公司, 北京 100029)

摘要: 建立固相萃取-高效液相色谱法检测水产品中甲氧苄啶残留量的分析方法。试样用 15 mL 5% 乙酸水-甲醇 (70:30, $v:v$)、1 mL 乙酸铅 (200 g/L)、7 mL 三氯甲烷混合液提取, 提取液经 ProElut PXC 固相萃取柱净化, 高效液相色谱仪对水产品中甲氧苄啶残留量进行测定。在 0.02~0.20 mg/L 范围内甲氧苄啶的质量浓度与色谱峰面积呈良好的线性关系, 相关系数为 0.999 3, 方法的检出限 ($S/N=3$) 为 0.02 mg/L, 平均回收率为 83.4%~87.0%, 相对标准偏差 (RSD) 为 3.9%~4.9%。该方法适合水产品中甲氧苄啶残留量的日常监测。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱; 水产品; 甲氧苄啶

文献标志码: A **文章编号:** 1674-5124(2016)02-0056-03

Determination of trimethoprim in aquatic products by SPE-HPLC

SUN Yuhui¹, LI Tianbao¹, FAN Zhichao¹, LI Wenbin²

(1. Jiangmen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Jiangmen 529000, China;
2. Dikma Technologies Incorporation, Beijing 100029, China)

Abstract: A method for determining the trimethoprim content in aquatic products was developed based on solid-phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC). Samples were extracted with the mixture of 5% acetic acid-methanol (15 mL, $v:v=70:30$), lead acetate (1 mL, 200 g/L) and trichloromethane (7 mL) and then purified with a solid-phase extraction column ProElut PXC. The extract liquid was determined by HPLC. The concentration of the trimethoprim was linear with the peak area in the range of 0.02-0.20 mg/L. The correlation coefficient was 0.999 3, the limit was 0.02 mg/L, the average recovery rate was 83.4%-87.0%, and the relative standard deviation (RSD) was 3.9%-4.9%. The method can be applied to determine the trimethoprim content in aquatic products.

Keywords: SPE; HPLC; aquatic products; trimethoprim

收稿日期: 2015-05-26; 收到修改稿日期: 2015-08-06

基金项目: 国家质检总局科技计划项目 (2015K063)

作者简介: 孙玉慧 (1976-), 女, 辽宁庄河市人, 主治医师, 硕士, 主要从事进出境人员疾病检查工作。

通讯作者: 李天宝 (1981-), 男, 高级工程师, 硕士, 主要从事进出口商品中有害物质的检验及研究。

0 引言

甲氧苄啶属于广谱抗菌药, 有抑制二氢叶酸还原酶的作用, 但细菌较易产生耐药性, 很少单独使用。甲氧苄啶通常作为可抑制二氢叶酸合成酶的磺胺类药物增效剂, 与磺胺类或其他抗生素配合使用, 可以使细菌的叶酸代谢受到双重阻断, 抗菌作用增强

几倍甚至几十倍^[1-7]。正是由于其独特的作用,甲氧苄啶在养殖业病害防治中被广泛应用^[8-13]。

根据中华人民共和国农业部农办质[2011]1 号文件要求,自 2011 年 4 月 1 日起,必须对所有新申报无公害农产品的淡水鱼开展甲氧苄啶含量检验项目,限量要求为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本文通过研究简化了样品前处理步骤、优化了仪器分析条件,建立了固相萃取-高效液相色谱法检测水产品中甲氧苄啶残留量的分析方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鳊鱼,去鳞、去皮,沿脊背取肌肉;冷冻虾仁,去头、去壳、去肠腺,取肌肉部分。样品充分绞碎、混匀,于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保藏。试验所用水产品均购自市场。

1.2 主要仪器设备

高效液相色谱,配有 DAD 检测器(AgiLent1100,美国安捷伦公司);旋转蒸发仪(R-210 型,瑞士步琦有限公司);离心机(3-30K 型,德国 Sigma 实验室离心机股份有限公司),超声波清洗仪(DL-720B,上海之信仪器公司);水浴恒温振荡器(金坛市开发区吉特实验仪器厂);固相萃取柱(ProElut PXC, 150 $\text{mg}/6\text{ mL}$,北京迪马科技有限公司)。

1.3 试剂

甲氧苄啶标准品(Dr.Ehrenstorfer 公司);甲醇(分析纯),三氯甲烷(分析纯),丙酮(分析纯),乙酸(分析纯),乙酸铅(分析纯);试验用水应符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水国家标准》一级水的标准。

1.4 样品前处理方法

取适量新鲜或解冻的鱼、虾等水产品,用剪刀剪取适量肌肉,放入机器中搅碎并使之均质,准确称取 5.0 g 样品,依次加入 5% 乙酸水:甲醇溶液(70:30, $\nu:\nu$) 15 mL、200 g/L 乙酸铅 1 mL 和三氯甲烷 7 mL,混匀,涡旋 2 min 后超声提取 5 min,在 8000 r/min 下离心 2 min,收集上清液;将下层残留物再依次加入 5% 乙酸水:甲醇(70:30, $\nu:\nu$) 15 mL、200 g/L 乙酸铅 1 mL 按照上述步骤重复提取一次,合并两次上清液,待净化。

固相萃取柱依次加入甲醇 5 mL 及 5% 乙酸水:甲醇(70:30, $\nu:\nu$) 溶液 5 mL 进行活化,将待净化提取液全部加入经过活化的固相萃取柱,弃去流出液;再依次加入 5 mL 的 5% 乙酸水:甲醇(70:30, $\nu:\nu$) 溶液和 5 mL 甲醇进行淋洗,弃去流出液;再加入 5 mL 的 5% 氨水甲醇进行洗脱,收集洗脱液;将洗脱液在

$40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下减压蒸馏至近干,用流动相溶液重新溶解样品并定容至 1 mL,备用,供 HPLC 分析。

1.5 色谱条件

色谱柱为 Diamonsil C18(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm);进样量为 20 μL ;流量为 1.0 mL/min;柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;检测波长为 230 nm;流动相为 0.1% 甲酸水溶液:甲醇(80:20, $\nu:\nu$)。

2 结果与讨论

2.1 试验条件的优化

主要对提取条件及固相萃取柱净化条件进行了优化。在提取操作中,采用 5% 乙酸水:甲醇(70:30, $\nu:\nu$)、乙酸铅(200 g/L)和三氯甲烷的混合液对水产品中的甲氧苄啶进行了有效提取,不需调整 pH 值、二氯甲烷反萃等复杂步骤,提取步骤大大简化;在固相萃取中,经过分析发现,用 5 mL 甲醇、5 mL 5% 乙酸水:甲醇(70:30, $\nu:\nu$) 活化固相萃取柱,用 5 mL 5% 氨水甲醇溶液的洗脱效果最好;高效液相色谱检测条件的优化是使样品色谱峰取得较好的分离效果且干扰最小,并在此基础上进一步优化其他参数。对二极管阵列检测器波长扫描选择最大吸收波长,考察了 Diamonsil C18(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm)、Envirosep-CM(175 mm \times 3.2 mm \times 5 μm)、ZORBAX Eclipse XDB-C18(150 mm \times 4.6 mm \times 5 μm) 3 种色谱柱对标样的分离情况,并进行了流动相种类和流速等条件的选择,实验结果表明,色谱柱, Diamonsil C18(250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm);流动相为 0.1% 甲酸水溶液:甲醇=80:20($\nu:\nu$);流量 1.0 mL/min;检测波长 230 nm;柱温为 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,可满足分析的要求。

2.2 标准曲线和检出限

对 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50 mg/L 的标准溶液进行测定,绘制工作曲线(见图 1),相关系数 $r^2=0.9993$,可以看出其工作曲线在需要的线性范围内呈现良好的线性关系。以信噪比 $S/N=3$ 时对应的甲氧苄啶含量确定的检出限为 0.02 mg/L,检出限较低,表明该方法的灵敏度较好。

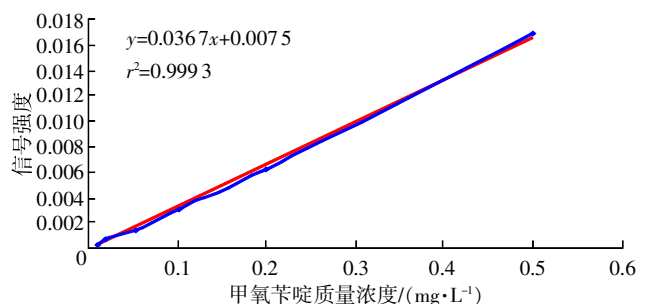


图 1 甲氧苄啶标准曲线

表1 方法回收率及精密度

标样名称	基质	添加质量浓度/(mg·L ⁻¹)	回收率/%				平均回收率/%	RSD/%	
甲氧苄啶	鳕鱼	0.02	89.5	86.1	78.2	79.7	83.6	83.4	4.6
		0.20	86.1	90.9	79.5	84.3	86.6	85.5	4.1
	虾仁	0.02	85.3	90.1	86.5	79.7	92.6	86.8	4.9
		0.20	85.1	90.4	85.9	82.2	91.6	87.0	3.9

2.3 方法的回收率和精密度

分别以鳕鱼和虾仁两种水产品为基质,在0.02, 0.20 mg/L两个质量浓度水平上做加标回收试验,每个添加做5个平行,得到方法的回收率和精密度如表1所示。可以看出,两种基质在两个浓度水平上回收率都比较好,说明该方法准确度较高;相对标准偏差RSD值均较小,表明该方法的重复性良好。

2.4 样品的测定

从市场购买了鳕鱼和虾仁各5个样品,按本文所建立的方法进行测定,结果和色谱图分别如表2和图2所示。由表可知,目前市场上鳕鱼和虾仁中甲氧苄啶残留量安全状况良好,虽然有两例阳性样品,但结果均低于我国要求的0.05 mg/L的限量值。由图2可以看出,在实际样品检测过程中,虽然甲氧苄啶含量较低,但其色谱图峰型良好,与周边杂质色谱峰能够完全分开,表明该方法具有很好的可靠性。

3 结束语

本文采用5%乙酸水:甲醇(70:30, v:v)、乙酸铅(200 g/L)、三氯甲烷混合液对水产品中的甲氧苄啶进行了有效提取,固相萃取柱净化,并建立了一种高效液相色谱法对甲氧苄啶进行了定性定量分析。所建立的方法具有良好的精密度和准确度,并且与我国国家标准GB 29702—2013《食品安全国家标准 水

产品中甲氧苄啶残留量的测定 高效液相色谱法》相比,本方法提取步骤大大简化,不需经过调整pH值、二氯甲烷反萃等复杂步骤即可完成甲氧苄啶提取;实验成本大大降低,固相萃取柱只用5 mL氨水甲醇洗脱,远低于国标方法中15 mL洗脱液用量;杂质干扰大大减少,加标回收率达80%以上,保证实验结果的准确性、重现性。该方法可为水产品的日常检测及监管部门的监督检查提供科学依据,具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 吴梅梅,常明向. 甲氧苄啶与58种中药联用抗菌增效作用的研究[J]. 中国医药导报, 2015, 12(13): 27-31.
- [2] 邵耀东,胡彬,赵小华,等. 高效液相色谱法测定甲氧苄啶含量[J]. 动物医学进展, 2012, 33(5): 81-84.
- [3] 董杰. 细菌获得性抗生素耐药基因研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16(1): 71-74.
- [4] 周红霞,杜丹丹,王颖,等. 12种兽药中非法添加甲氧苄啶的HPLC-PDA检查方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(11): 43-48.
- [5] 汪建国. 我国渔药研究与应用综述(14)[J]. 渔业致富指南, 2013(14): 68-72.
- [6] 刘灿. 嗜麦芽窄食单胞菌对磺胺类抗菌药物耐药机制的研究进展[J]. 安徽医药, 2014(5): 961-962.
- [7] 周红霞,杜丹丹,王颖,等. 12种兽药中非法添加甲氧苄啶的HPLC-PDA检查方法的建立[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(11): 43-48.
- [8] 孙玮. 一种测定水产品中残留甲氧苄啶的方法探讨[J]. 吉林农业(c版), 2011(7): 91-93.
- [9] 郑重莺,张海琪,周燕,等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中甲氧苄啶的残留[J]. 中国渔业质量与标准, 2012, 2(2): 89-93.
- [10] 梅光明,陈雪昌,张小军,等. 高效液相色谱法测定水产品中残留的甲氧苄啶[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 248-251.
- [11] 元波,郭红燕,高又文,等. 猪粪便和尿液中二甲氧苄啶的液相色谱串联质谱检测方法研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(17): 101-103.
- [12] 孙波,周洪英,吴洪丽,等. 甲氧苄啶在家蚕体内的药代动力学研究[J]. 蚕业科学, 2014(1): 59-63.
- [13] 韩冰,杨洪波,王荻,等. 复方磺胺甲噁唑在鲫鱼体内的药代动力学研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(3): 13-19.

表2 鳕鱼和虾仁样品中甲氧苄啶的分析结果

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
甲氧苄啶检出浓度/(mg·L ⁻¹)	-	-	-	0.038	-	-	-	-	0.025	-

注:-为未检出。

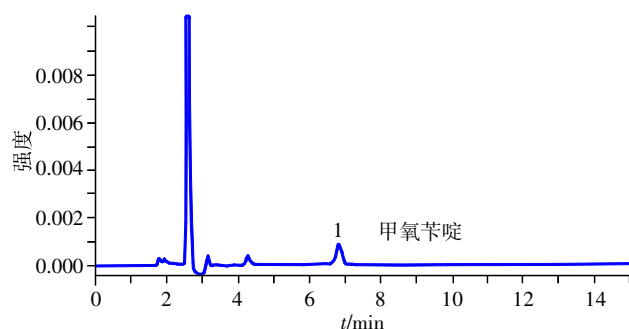


图2 鳕鱼样品中甲氧苄啶检测液相色谱图

(编辑:徐柳)