

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.10.04

固相萃取-高效液相色谱法同时检测奶牛粪污中 5 种磺胺类抗生素

吴利军, 何 斌, 周 源, 谭珺隼, 胡修忠, 龚 萍, 邵志勇, 陈 洁,
陈夏冰, 杨文海, 童伟文, 刘 武, 金尔光*

(武汉市农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430208)

[收稿日期] 2020-04-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 10-0024-06 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 建立的固相萃取-高效液相色谱法具有灵敏度高、检测限低的特点, 可同时定量检测奶牛粪污中磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹噁啉的残留。采用 C18 色谱柱(500 mm×4.6 mm, 5 μ m), 以 0.3% 的乙酸-乙腈溶液为流动相, 在流速 1.0 mL/min、检测波长 270 nm、柱温 30 $^{\circ}$ C 条件下, 5 种抗生素均能达到基线分离; 3 倍信噪比下, 5 种抗生素的检出限均为 20 μ g/kg。在加标浓度 50 μ g/kg 条件下, 奶牛粪污样品经前处理、MCX 固相萃取小柱富集净化后, 5 种磺胺类抗生素回收率达到 75%~80%, 相对标准偏差为 2.8%~3.9%。此方法检测了某规模化奶牛场粪污中磺胺类抗生素残留, 结果显示, 磺胺嘧啶的浓度范围在 45~50 μ g/kg, 其他抗生素无检出。

[关键词] 奶牛粪污; 磺胺类抗生素; 固相萃取; 高效液相色谱

Simultaneous Determination of Five Sulfonamide Antibiotics in Excrement and Sewage of Dairy Farm Using Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography

WU Li-jun, HE Bin, ZHOU Yuan, TAN Jun-jun, HU Xiu-zhong, GONG Ping, SHAO Zhi-yong,
CHEN Jie, CHEN Xia-bing, YANG Wen-hai, TONG Wei-wen, LIU Wu, JIN Er-guang*

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430208, China)

Corresponding author: JIN Er-guang, E-mail: 523229599@qq.com

Abstract: A method for simultaneous determination of sulfadiazine (SDZ), sulfamethoxazole (SDMD), sulfamonomethoxine (SMM), sulfamethoxazole (SMZ), sulfaquinoxaline (SQ) in excrement and sewage of dairy farm using solid phase extraction and high performance liquid chromatography was established. Five antibiotics

基金项目: 武汉市农业科学院协同创新项目(CJCX201902); 湖北省自然科学基金面上项目(2018CFB678)

作者简介: 吴利军, 兽医师, 博士, 从事动物疾病诊断与防控研究。

通讯作者: 金尔光。E-mail: 523229599@qq.com。

have been separated at the baseline on the C18 cloumn (500 mm × 4.6 nm, 5 μ m) at the wavelength of 270 nm, 30 $^{\circ}$ C of column temperature after eluted by 0.3% acetate solution and acetonitrile. The limits of detection of five sulfonamide antibiotics was 20 μ g/kg. After the excrement and sewage of dairy farm samples were enriched and cleaned - up by MCX, the recovery of five antibiotics at the concentration of 50 μ g/kg in samples was 75% ~ 80% and repeatability within one day (*RSD*) was 2.8% ~ 3.9%. The method was applied to determined five antibiotics in samples collected from a dairy farm in Wuhan, only sulfadiazine has been detected and the concentration was in the range of 45 ~ 50 μ g/kg. The method has high sensitivity and low detection line, which can be used for the quantitative detection of sulfonamide antibiotics in excrement and sewage of dairy farm.

Key words: excrement and sewage of dairy farm; sulfonamide antibiotics; solid phage extraction; high performance liquid chromatography

抗生素类药物的广泛应用推动了规模化、集约化畜禽养殖业的快速发展,但抗生素类药物在动物体内吸收性差,约 30 ~ 90% 以原形或初级代谢物形式随畜禽粪尿排出体外,从而产生大量抗生素残留的粪污。畜禽粪污还田利用是当前资源化利用的主要途径,还田利用过程中粪污残留的抗生素可通过地表径流、渗滤等方式进入环境,对地表水、农田土壤和地下水造成污染,对生态环境和人类健康造成严重危害^[1-4]。

目前用于分析抗生素痕量的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)和高效液相 - 串联质谱法(LC - MS)^[5]。LC - MS 法虽然可以提高定量分析的精密度和灵敏度,但对畜禽养殖粪污中的复杂成分存在较强的基质效应,且操作复杂,使用及维护成本较高。HPLC 技术与之相比具有检测成本低、易于操作且检测速度快等特点,已成功用于不同环境基质中抗生素的定量分析^[6]。目前建立的抗生素检测方法主要集中在食品、土壤、城市污水及养殖废水等,而对奶牛场粪污中抗生素残留的检测方法的报道较少^[7-9]。奶牛场粪污主要指奶牛排泄的粪便、尿液、降温与挤奶厅冲洗等产生的污水及生活污水等组成的混合物,由于其成分复杂,样品前处理显得冗杂而费时费力,因此探索一种简单、快捷的样品前处理技术十分必要。固相萃取是近年发展起来的一项样品前处理技术,主要通过固相填料对样品组分的选择性吸附及解吸过程,降低样品基质干扰,提高检测灵敏度,实现样品的分离、纯

化和富集^[10]。本研究以畜禽粪污抗生素检出率和检出浓度较高的 5 种磺胺类抗生素作为目标分析化合物,建立了一种固相萃取 - 高效液相色谱法,可同时定量测定奶牛粪污中的五种磺胺类抗生素的痕量残留,研究结果对加强奶牛粪污的安全处理与资源化利用的安全评价具有积极的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 Agilent - 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);超声波破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司);涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);固相萃取装置(天津市富城达科技有限公司);氮吹仪(杭州聚同电子有限公司);MCX 固相萃取柱(上海安谱实验科技股份有限公司);pH 计(上海佑科仪器仪表有限公司);AgiLent SB - C18 色谱柱(500 mm × 4.6 nm, 5 μ m);离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);0.22 μ m 的微孔滤头(天津津腾实验设备有限公司)。

1.1.2 试剂 磺胺嘧啶(SDZ)、磺胺二甲嘧啶(SDMD)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺甲恶唑(SMZ)、磺胺喹噁啉(SQ)标准品,均购自美仑生物有限公司,纯度 $\geq 98\%$;乙腈、甲醇色谱纯,购自美国 Themo 公司;氯化钠、氨水、盐酸和冰乙酸等试剂均为分析纯,购自上海国药集团化学试剂有限公司;实验用水为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制 分别称取 0.0100 g 的抗生素标准品,加入乙腈溶解并定容至 100 mL 棕色容量瓶,配制成 100 mg/L 的标准储备液,放置 -20 ℃ 冰箱避光保存。准确称取各种单标储备液,用乙腈定容至 1 mL,得 10 mg/L 混合标准工作液,备用。

1.2.2 样品前处理 在某奶牛养殖场多点采集奶牛粪浆,混合均匀,取约 1000 g 作为代表性样品。样品采集后用黑色塑料袋密封,并立即存放于冰盒中运回实验室,并进行冷冻干燥处理。冻干后的样品避光保存,分析前用高速粉碎机将其粉碎,过筛,使其粒径小于 2 mm 孔径试验筛,混合均匀后均分至 100 g,储存于样品瓶中, -20 ℃ 密闭保存,供检测用^[11]。

在奶牛粪浆样品中加入抗生素混合标准溶液,加标浓度为 50 μg/kg,混合均匀后放置 24 h,使抗生素与样品介质充分接触,以模拟实际情况,按照上述步骤进行样品前处理。

分析前用研钵研磨,并过 2 mm 筛后进行样品前处理。称取 5.0 g 前处理样品,加入 10 mL 水,10 mL 乙腈,漩涡混匀,超声 15 min,加入 3.0 g 氯化钠,漩涡混匀后 4 500 rpm/min,离心 3 min,上层提取液转移至 100 mL 离心管中,残渣中加入 10 mL 乙腈重复提取 2 次,合并提取液,旋转蒸发近干,用 20 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解残渣,加入正己烷去脂 2 次,每次 6 mL,弃去正己烷,水层备用^[11]。

1.2.3 净化 MCX 固相萃取小柱在使用前,依次用 6 mL 超纯水和 6 mL 甲醇进行活化。将以上提取液以 2 mL/min 流速过柱,依次用 6 mL 0.1 mol/L 盐酸水溶液、6 mL 超纯水和 6 mL 甲醇冲洗 MCX 固相萃取小柱,吹干柱中残留液体,加入 6 mL 2% 氨化甲醇洗脱目标抗生素,收集洗脱液,氮吹近干,用乙酸-乙腈混合溶液定容至 1 mL,高效液相色谱仪分析^[12]。

2.5 色谱条件 Agilent SB-C18 色谱柱(500 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 0.3% 的乙酸(A)和乙腈(B),流速为 1.0 mL/min;柱温 30 ℃;梯度洗脱

程序:0 ~ 18 min, 85% A; 15 ~ 20 min, 60% A, 20 ~ 20.1 min, 85% A; 20.1 ~ 25 min, 85% A; 紫外检测波长 270 nm。

2 结果与分析

2.1 SPE 净化过程的优化

2.1.1 固相萃取柱选择 奶牛粪污样品成分复杂,基质中含有蛋白质、脂类、纤维素、有机酸、氨基酸等有机物和各种无机组分^[13]。这些复杂成分的存在对样品中抗生素的测定会产生严重干扰,样品的净化对目标抗生素的准确定量至关重要。目前,HLB 固相萃取小柱和 MCX 萃取小柱均可用于环境、食品、畜禽粪污中磺胺类药物的净化。实验结果显示,采用 HLB 固相萃取柱净化,一方面残渣溶解液所用的缓冲液配制复杂,而且需要调节 pH,检测过程相对复杂;另一方面 HLB 固相萃取柱没有选择机制,对性质相似的化合物均有保留,所以杂质相对较多,对检测结果的影响较大。采用 MCX 固相萃取小柱净化,提取残渣用酸性水溶液溶解,可以去除部分不溶于酸性溶液的杂质,不仅可以有效净化样品,而且净化步骤简单。综合考虑,本研究选用 MCX 固相萃取小柱。

2.1.2 上样过柱体积优化 提取液旋蒸近干,用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解提取残渣时,本研究尝试了不用不同体积的盐酸溶液溶解残渣,结果表明,从 5 mL 至 20 mL,目标物质的回收率呈现增长趋势,但当溶解液体积超过 25 mL 后,回收率没有明显增长,分析其主要原因是过柱体积越小,同一样品前处理所得的过柱溶液中目标物含量越高,在相同流速下,过柱时间越短,目标物与固相萃取小柱中填料结合时间越短,所以会有部分目标物未与填料结合即流出固相萃取柱,导致回收率偏低。因此,本研究选择 20 mL 作为最终的过柱溶解体积。

2.1.3 氮吹流速优化 本研究优化了氨化甲醇氮吹速度对回收率的影响,将目标物质直接用 6 mL 2% 氨化甲醇溶解,调节氮气流速,控制氮吹速度。结果表明,当氨化甲醇的流失速度大于 0.05 mL/min 时,氮吹可能导致目标物有 10% ~ 20% 的损失。所以本方法建议控制氮吹流速,保持氨化甲醇流失速

度不大于 0.05 mL/min。

2.2 流动相的确定 流动相一般采用有机溶剂和缓冲液按照一定比例组成。有机溶剂一般采用乙腈和甲醇。相比较甲醇,乙腈具有紫外吸收低、洗脱能力强、峰型好、柱效高等优点^[12]。所以本方法采用乙腈做为有机溶剂。抗生素是一类可离子化的极性有机化合物,因此流动相的 pH 值对抗生素物质的分离和检测非常重要。调节流动相 pH 值常用甲酸、乙酸、磷酸和草酸^[11]。本研究用 0.3% (v/v) 的乙酸水溶液与乙腈做为流动相,同时测定 5 种抗生素,结果发现,可以获得良好的分离效果和适宜的保留时间,峰形尖锐,对称性良好,无拖尾现象,5 种抗生素在 20 min 内可以获得较好的分离。

2.3 方法线性范围、检出限及回收率 配置浓度范围在 0.2 ~ 10 mg/L 的系列混合标准溶液进行测定,以质量浓度(c)为横坐标,相应峰面积(S)为纵

坐标,得到了 5 种抗生素的线性范围,结果如表 1 所示,在 0.2 ~ 10 mg/L 范围内标准曲线具有良好的线性关系,相关系数 r 均大于 0.99。以 3 倍信噪比(S/N = 3)所对应的浓度为方法检出限,5 种抗生素的检出限均为 20 μg/kg。在加标量为 50 μg/kg 条件下,5 种抗生素的回收率均在 70% ~ 75% 之间,选定某一浓度的混合标准品,在最适宜条件下连续进行 10 次分离测定,5 种抗生素的保留时间和峰面积的相对标准偏差(RSD)在 2.5% 和 3.9% 之间。

2.4 实际样品的测定 按照上述建立的检测方法对某奶牛场粪污样品中 5 种磺胺类抗生素进行检测。通过多点取样,采集新鲜粪污样品经冷冻干燥,研磨过筛后按照上述建立的方法进行样品预处理和检测。结果表明,粪污样品中磺胺嘧啶的含量为 45 ~ 50 μg/kg,磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑、磺胺喹噁啉均未检出。

表 1 目标抗生素的线性关系,相关系数,检出限及回收率

抗生素	线性方程	相关系数	检出限	回收率	RSD(%)
磺胺嘧啶	$S = 86.60167 \times c$	0.999	20 μg/kg	80	2.8
磺胺二甲嘧啶	$S = 69.6386 \times c$	0.999	20 μg/kg	75	2.5
磺胺间甲氧嘧啶	$S = 66.10467 \times c$	0.999	20 μg/kg	77	3.1
磺胺甲恶唑	$S = 83.10623 \times c$	0.999	20 μg/kg	79	2.5
磺胺喹噁啉	$S = 62.96895 \times c$	0.999	20 μg/kg	75	3.9

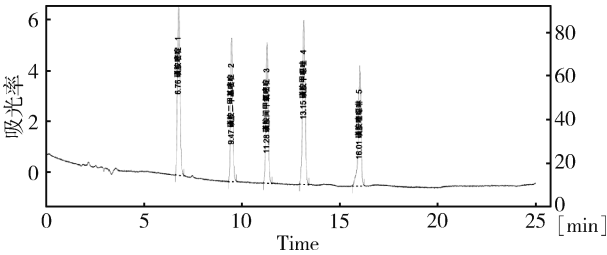


图 1 目标抗生素标准溶液的色谱图

Fig 1 Chromatgrm of 5 studies antibiotics

3 讨论与结论

目前,关于利用固相萃取-高效液相色谱法检测奶牛粪污中磺胺类抗生素的研究鲜有报道。奶牛粪污样品基质成分复杂,因此样品的前处理对目

标抗生素的准确定量至关重要。固相萃取技术是近年来发展起来的一项样品前处理技术,由液固萃取和液相色谱技术相结合发展而来,主要通过固相填料对样品组分的选择性吸附及解吸过程,实现对样品的分离、纯化和富集。主要目的在于降低样品基质干扰,提高检测灵敏度。商品化的固相萃取小柱根据填料可以分为不同的类型,需要注意的是,在选择固相萃取柱时,要考虑固相吸附层的吸附能力,避免实际操作时出现过载现象。已有的研究较多使用 HLB 固相萃取小柱对土壤、畜禽粪便、养殖水体及沉积物和沼液中的抗生素进行富集^[4,7,11,12]。本实验采用 MCX 固相萃取小柱能够对奶牛粪污中的抗生素和其他杂质进行有效分离,

并且净化步骤简单,重复性较高。

实验对色谱条件的检测波长和流动相进行了严格的优化。研究表明,磺胺类药物的结构中有一个苯环,在 270 nm 附近有较强的紫外吸收^[15]。本实验中利用二级管阵列检测器,选用 270 nm 做为检测波长对 5 种磺胺类抗生素进行检测时发现,色谱峰分离效果好,峰形较好,结果见图 1。因此,本研究选择 270 nm 作为紫外检测波长。目前从高效液相色谱法检测磺胺类抗生素含量的文献报道来看,流动相的组成主要有乙腈:甲醇:2% 乙酸^[14],0.1% 甲酸:乙腈^[12],草酸:乙腈^[7],0.1% 甲酸:甲醇^[17],本实验对以上流相进行了优化,最终确定以 0.3% (v/v) 的乙酸水溶液与乙腈做为流动相,抗生素的出峰时间较理想,峰形较好,且与杂质分离良好。

本研究建立了一种固相萃取-高效液相色谱法同时检测奶牛粪污样品中五种磺胺类抗生素的检测方法。本方法对 5 种抗生素的检出限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,回收率在 70~75% 之间。本方法灵敏度高、检出限低,能够准确对样品中磺胺类抗生素进行定量分析,对畜禽粪污残留抗生素污染评估和治理具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 陈红英,王月颖,傅思武. 抗生素在养殖业中应用现状[J]. 现代畜牧科技, 2019, 5(53): 1-3.
Chen H Y, Wang Y Y, Fu S W. Application Status of Antibiotics in Aquaculture[J]. Modern Animal Husbandry Science & Technology, 2019, 5(53): 1-3.
- [2] Ayukekbong J A, Ntemgwa M, Atabe A N, *et al.* The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies[J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2017, 6(1): 47-55.
- [3] 葛林科,任红蕾,鲁建江,等. 我国环境中新兴污染物抗生素及其抗性基因的分布特征[J]. 环境化学, 2015, 34(5): 875-883.
Ge L K, Ren H L, Lu J J, *et al.* Occurrence of antibiotics and corresponding resistance genes in the environment of China[J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(5): 875-883.
- [4] 郭欣妍,王娜,许静,等. 兽药抗生素的环境暴露水平及其环境归趋研究进展[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(09): 76-86.
Guo X Y, Wang N, Xu Jing, *et al.* Research Progress on Environmental Exposure Levels and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 37(09): 76-86. [4] 张静霞,徐明琴,张春然,等. 抗生素杂志的检测方法研究进展[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(13): 1498-1502.
Zhang J X, Xu M Q, Zhang C R, *et al.* Progress in research of detection methods for impurity of antibiotics[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2012, 21(13): 1498-1502.
- [4] 孙刚,袁守军,计峰,等. 畜禽粪便中抗生素残留危害及其研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(03): 277-279.
Sun G, Yuan S J, Ji F, *et al.* Environmental Impact of Antibiotics Contamination from Livestock and Poultry Dejecta: a Review of Recent Researches[J]. Journal of Environment and Health, 2009, 26(03): 277-279.
- [7] 杨晓蕾,李杰,李学文,等. 土壤中 10 种兽用抗生素的固相萃取-高效液相色谱-紫外测定法[J]. 环境与健康杂志, 2012, 29(04): 357-360.
Yang X L, Li J, Li X W, *et al.* Simultaneous Determination of Ten Kinds of Veterinary Antibiotics in Soil by High Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Environment and Health, 2012, 29(04): 357-360.
- [8] 金钥,孙延斌,梅连瑞,等. 水产品中 14 种抗生素药物残留检测方法的建立[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(17): 129-134.
Jin Y, Sun Y B, Mei L R, *et al.* Establishment of Determination Method of 14 Veterinary Drugs Residues in Aquatic Products[J]. Food Research and Development, 2018, 39(17): 129-134.
- [9] 周爱霞,苏小四,高松,等. 高效液相色谱测定地下水、土壤及粪便中 4 种磺胺类抗生素[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 397-402.
Zhou A X, Su X S, Gao S, *et al.* Determination of Four Sulfa Antibiotics in Groundwater, Soil and Excreta Samples Using High Performance Liquid Chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(3): 397-402.
- [10] 洪蕾洁,石璐,张亚雷,等. 固相萃取-高效液相色谱法同时测定水体中的 10 种磺胺类抗生素[J]. 环境科学, 2012, 33(2): 652-657.
Hong L J, Shi L, Zhang Y L, *et al.* Simultaneous Determination of 10 Sulfonamide Antibiotics in Water by Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography[J]. Chinese Journal of Environmental Science, 2012, 33(2): 652-657.

- [11] 李艳霞, 李 帷, 张雪莲, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱法同时检测畜禽粪便中 14 种兽药抗生素[J]. 分析化学, 2012, 40(02): 213 - 217.
- Li Y X, Li W, Zhang X L, *et al.* Simultaneous Determination of Fourteen Veterinary Antibiotics in Animal Manure Using Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography[J]. Chinese Journal Analytical Chemistry, 2012, 40(02): 213 - 217.
- [12] 贺南南, 管永祥, 梁永红, 等. 固相萃取 - 高效液相色谱同时测定沼液中 3 种四环素类和 6 种磺胺类抗生素[J]. 分析科学学报, 2017, 33(3): 373 - 377.
- He N N, Guan Y X, Liang Y H, *et al.* Simultaneous Determination of 3 TCs and 6 SAs in Biogas Slurry by Solid Phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography[J]. Journal of Analytical Science, 2017, 33(3): 373 - 377.
- [13] Loftin K A, Henny C, Adams C D, *et al.* Inhibition of microbial metabolism in anaerobic lagoons by selected sulfonamides, tetracyclines, lincomycin, and tylosin tartrate[J]. Environ Toxicol Chem, 2005, 24(4): 782 - 788.
- [14] 刘菁华, 孙振中, 黄雪玲, 等. 高效液相色谱 - 柱后衍生法检测养殖水体及沉积物中 11 种磺胺药物残留[J]. 色谱, 2015, 33(4): 434 - 440.
- Liu J H, Sun Z Z, Huang X L, *et al.* Determination of 11 sulfonamide residues in aquaculture water and sediments by high performance liquid chromatography coupled with post - column derivatization [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(4): 434 - 440.
- [15] 赵 娜. 珠三角地区典型菜地土壤抗生素污染特征研究[D]. 广州: 暨南大学. 2007.
- Zhao N. The study of antibiotics in the soil of typical vegetable fields in Pearl River Delta [D]. Chongqing: Jinan University, 2007.
- [16] 周爱霞, 苏小四, 高 松, 等. 高效液相色谱测定地下水、土壤及粪便中 4 种磺胺类抗生素[J]. 分析化学研究报告, 2014, 42(3): 397 - 402.
- Zhou A X, Su X S, Gao S, *et al.* Determination of Four Sulfa Antibiotics in Groundwater, Soil and Excreta Samples Using High Performance Liquid Chromatography[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2014, 42(3): 397 - 402.

(编辑:陈 希)