

关键字

EnviroSep-ABC 柱子
凝胶渗透色谱
GC
GC/MS
GPC
GPC AutoPrep 2000
5380 型 PFPD 检测器
Optima 柱子
PFPD
脉冲式火焰光度检测器
Sephadex LH-20
虾组织
磺胺类药物
半挥发性物质
USEPA 方法 3640A
WinSEP

在 2003 年匹兹堡分析
化学和应用实验室光谱会
议上展出, 奥兰多市, 佛
罗里达州, 2003 年 3 月
9-14 日



比较两种在分析虾中磺胺类药物之 前进行的用于样品净化的尺寸排斥 色谱方法

摘要

在水产业中经常采用磺胺类药物控制细菌的生长。近来已经报道在 HPLC 分析磺胺类药物之前使用 Sephadex LH-20 尺寸排斥凝胶来净化虾组织。这项研究比较了采用 Sephadex LH-20 凝胶的手工操作的柱系统与采用 EnviroSep-ABC 柱子的 OI 分析仪器公司的 GPC AutoPrep 2000 自动净化系统, 这两种方法。将磺胺类物质的混合物加标到虾组织中, 均化后采用醋酸乙脂进行萃取。萃取物干燥后重新溶解到适当的溶剂中供尺寸排斥净化系统使用。磺胺类物质在净化过程中在 254nm 处进行监测。收集的部分采用气相色谱 (GC) 配置 OI 分析仪器公司制造的脉冲式火焰光度检测器 (PFPD) (处于硫检测模式) 进行分析。

简介

磺胺类药物是一种广谱杀菌剂, 能够杀灭类似原生动物的革兰氏阳性以及革兰氏阴性细菌。它们已经广泛地应用于人类和牲畜医疗药物超过 60 多年。近年来, 磺胺类药物已经用于水产业, 以用于鱼类、龙虾和虾类的传染病防治。细菌抵抗杀菌剂作用的出现, 使我们不得不重视磺胺类药物在人类食品供应中的残留。近来, FDA 已经制定了一项计划以监控进口到美国的供食用的海产品。

开发一些方法以分析水产品中的抗生素是当前最需要解决的问题。近来已经报道了一个萃取和净化步骤, 以分析虾组织中的几种磺胺类药物 (Roybal *et al.*)。凝胶渗透色谱 (GPC) 作为一种快速萃取的净化步骤, 在 HPLC、LC/MS 或 GC 分析之前, 以去除大



图 1 GPC AutoPrep 2000 系统

分子重量的干扰物。作者采用由 Sephadex LH-20 填充的柱子。这个方法称为多次手动溶剂加入以完成有效的净化。

GPC 净化方法已经广泛地应用于大量环境样品的分析，尤其在采用 GC 和 GC/MS 分析半挥发性物质和农药之前，用于制备样品。通常，净化采用由一种苯乙烯-二乙烯苯共聚物填充的柱子，例如在 EnviroSep-ABC 柱子中采用的填料。

OI 分析仪器公司的 GPC AutoPrep 2000 GPC 净化系统是一个自动的 GPC 净化系统。它使用一台能够容纳多达 60 个样品的自动进样器，可以注入样品进行萃取，然后能够在 GPC 净化之后收集纯化后不同阶段的部分到各个收集瓶中。这项研究评估了采用 GPC AutoPrep 2000 系统和 EnviroSep-ABC 柱子，在进行磺胺类药物分析之前净化虾组织的过程。

实验

材料

所有的溶剂在玻璃容器中蒸馏以适合于 HPLC、GC、农药残留分析以及分光光度计的检测。所有的化学品为 ACS 试剂级纯度。GPC 的校准标准按照 USEPA 方法 3640A 制备，含有玉米油、邻苯二甲酸酯、甲氧滴滴涕、二萘嵌苯和硫。磺胺甲嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺嘧啶和磺胺喹噁啉购买于 Sigma-Aldrich 公司 (St. Louis, MO)。标准采用甲醇或二氯甲烷进行制备。

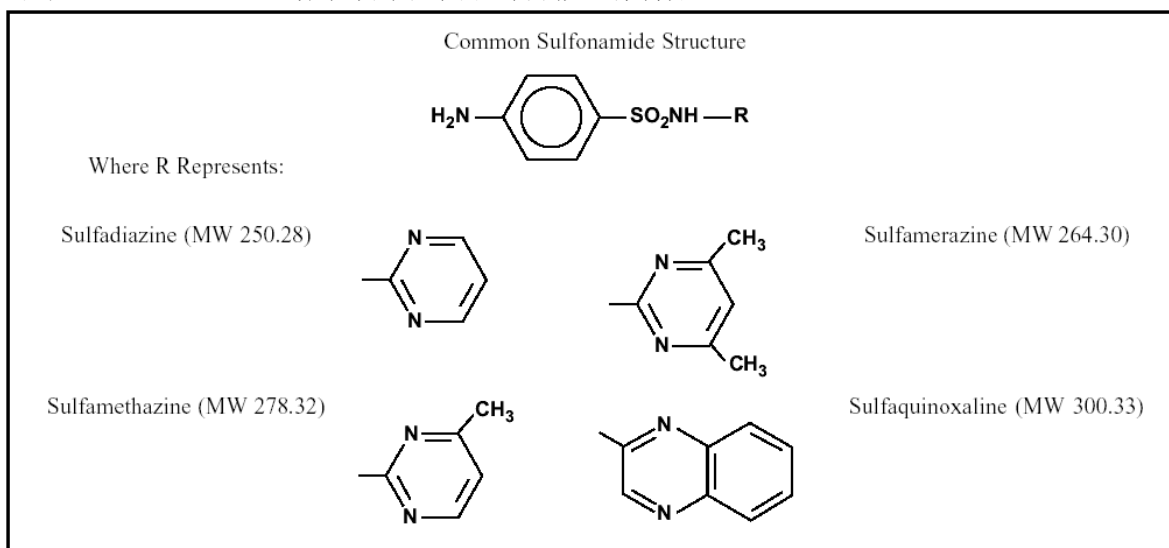


图 2 四种磺胺类药物的化学结构

萃取

在食品处理器中将虾组织 (40 克) 研碎，倒入一个无污染的烧杯中，与 400mL 醋酸乙脂混合。混合物超声 15 分钟。萃取物被过滤然后等量地倒入一个 450-mL 的 RapidVap®管中，在 RapidVap 氮蒸发系统中，采用 75°C 的温度设置以及 70% 的涡流速度蒸发至干。萃取物再制备于 10mL 的二氯甲烷 (GPC 的移动相) 中。萃取液用一个 0.45 μm 的过滤器过滤并放置于一根清洁的 10*100mm 的测试管中，以备 GPC 净化之用。

GPC 净化

虾萃取液采用 GPC 进行净化，设备为 GPC AutoPrep 2000，配置一根 350mm * 21.2mm 的不锈钢 EnviroSep-ABC 柱子 (OI 分析仪器公司部件号 308842)。系统采用 2.5mL 的采样环，移动相为二氯甲烷，4.5mL/min 的流速。洗提图形采用 WinSEP™ 软件和 OI 分析仪器公司的 UVD-1000 UV 检测器/表格记录仪 (设置为 254nm) 记录下来。GPC 柱子按照 USEPA 方法 3640A，第 7 章 (1994 年) 的规定进行校准。柱

子的流速通过在量筒中收集 10 分钟的流出液，测量体积以进行验证。玉米油、邻苯二甲酸酯、甲氧滴滴涕、二萘嵌苯和硫在柱子中的洗提时间被检测出来。同时制备一个含有玉米油和磺胺甲嘧啶的标准，以比较 GPC 的校准标准。选择一个排放时间以去除 85% 的邻苯二甲酸酯，但是收集超过 95% 的所要分析的磺胺类药物。在磺胺类药物被洗提出来之后但在硫被洗提出来之前，停止分段收集。收集的分段溶液采用 RapidVap 氮浓缩仪浓缩到 1mL，并且重新配制在 GC 或 HPLC 分析可用的适当溶剂中。每个样品批次需要运行溶剂空白。

HPLC 和 GC 分析

样品采用 UVD-1000 UV 检测器/表格记录仪和一台配置了用于硫物质检测的 Agilent 气相色谱进行分析，GC 的柱子为 J&W Scientific 的 DB5-MS，30m * 0.50 μm 膜厚。分流比为 9：1。

结果

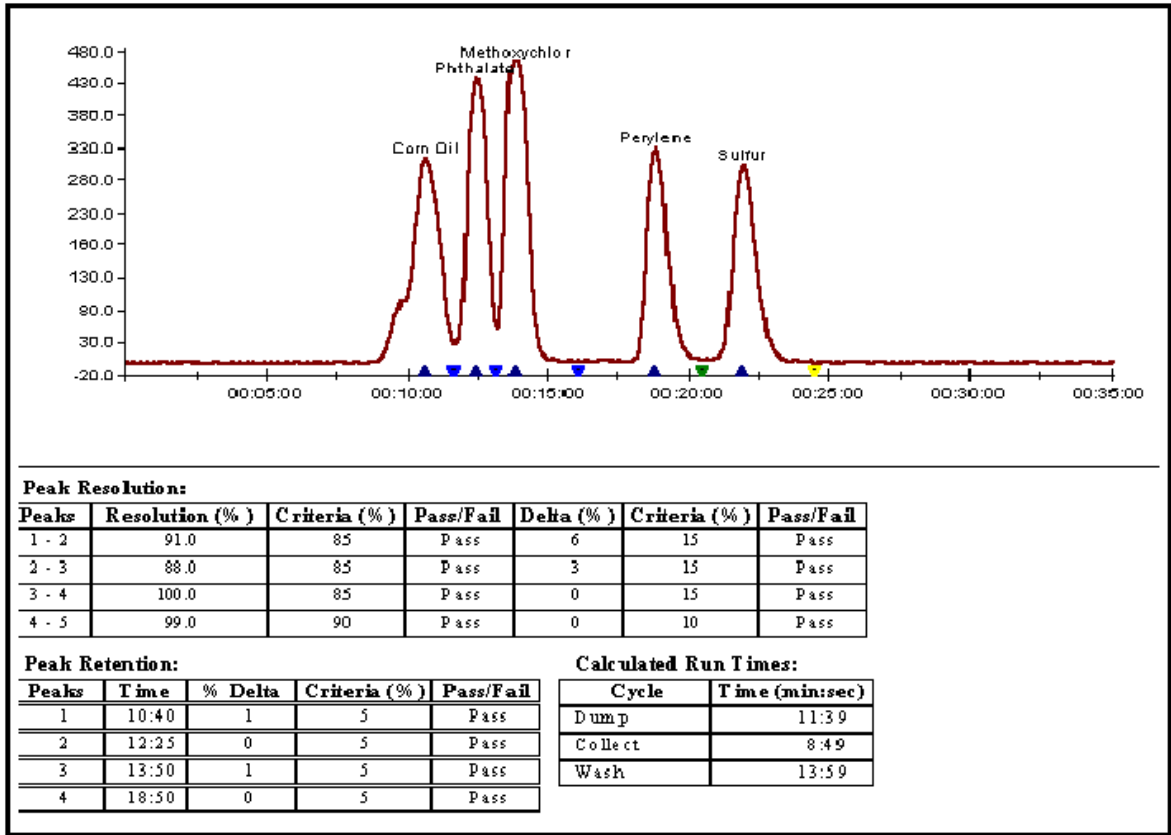


图 3 USEPA 的 GPC 校准标准 (2.5mL) 色谱图，采用一根 350mm * 21.2mm 的不锈钢 EnviroSep-ABC GPC 净化柱子，移动相为 100% 的二氯甲烷，流速为 4.5mL/min。紫外检测器设置为 254nm，1.000AUFs。这个标准含有 125mg 玉米油、5mg 邻苯二甲酸酯、1mg 甲氧滴滴涕、0.1mg 二萘嵌苯和 0.4mg 硫。WinSEP 软件计算并且跟踪每次校准运行的保留时间和峰分辨率的改变，色谱图显示如下。

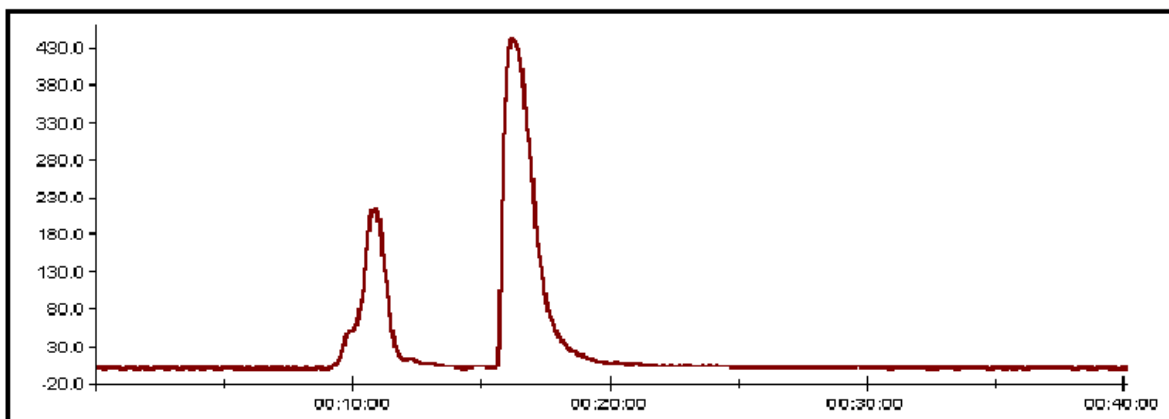


图 4 一个含有玉米油 (125mg) 和磺胺甲嘧啶的标准, 采用 EnviroSep-ABC 柱子和 GPC AutoPrep 2000 系统净化后得到的色谱图。流速为 4.5mL/min, 移动相为 100%的二氯甲烷。紫外检测器设置为 254nm。

表 1 流速为 4.5mL/min, 移动相为 100%的二氯甲烷, 在 EnviroSep-ABC 柱子上的相对分析物洗提时间

分析物	保留时间
玉米油	10.9 分钟
邻苯二甲酸酯	12.9 分钟
甲氧滴滴涕	14.5 分钟
磺胺甲基嘧啶	15.0 分钟
磺胺喹噁啉	15.2 分钟 *
磺胺甲嘧啶	15.5 分钟
磺胺嘧啶	15.8 分钟
二萘嵌苯	18.5 分钟
硫	22.5 分钟

* 标准在二氯甲烷中列出来两个峰

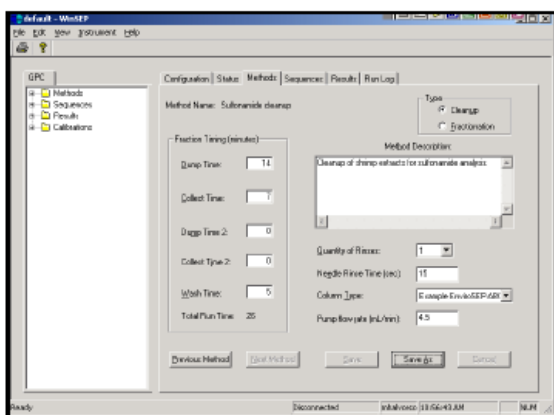


图 5 WinSEP 方法屏幕显示了 GPC AutoPrep 2000 系统采用 EnviroSep-ABC GPC 柱子用于收集来自虾萃取磺胺类药物收集液的排放时间 (至废液)、收集时间 (至收集容器) 和清洗时间 (至废液)。流速为 4.5mL/min, 移动相为二氯甲烷。

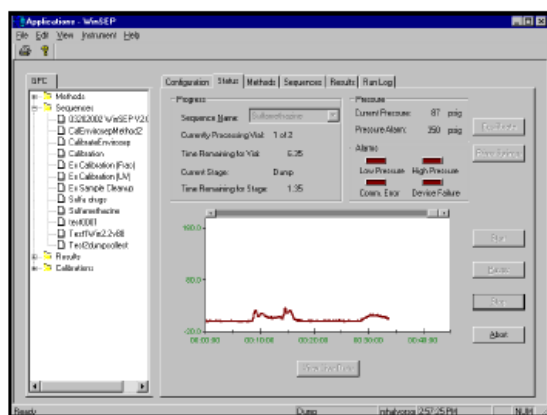


图 6 WinSEP 状态屏幕显示了一个受控的紫外色谱 (254nm)。流速为 4.5mL/min, 移动相为二氯甲烷。

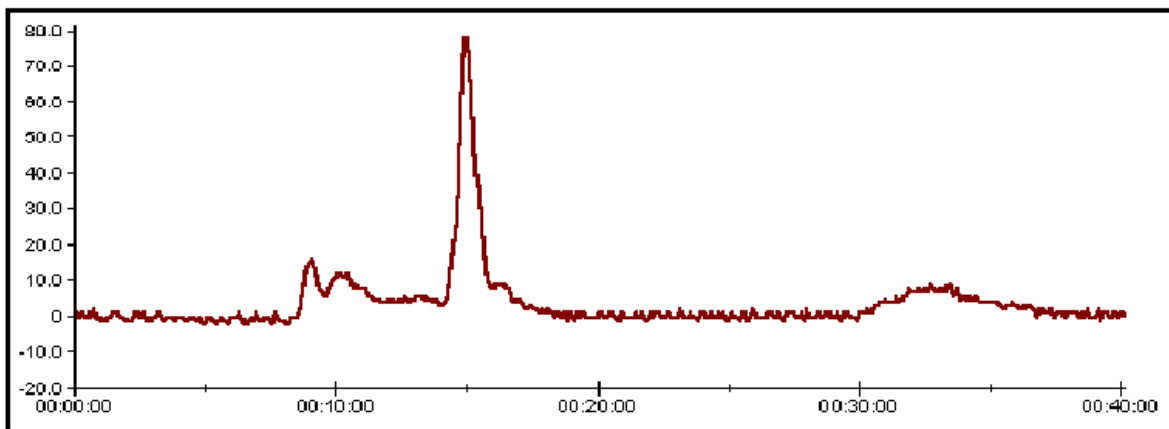


图 7 一个含有大量磺胺甲基嘧啶（大约 0.5mg/mL）的受控虾提取物的色谱图。
UV 检测器设置为 254nm。

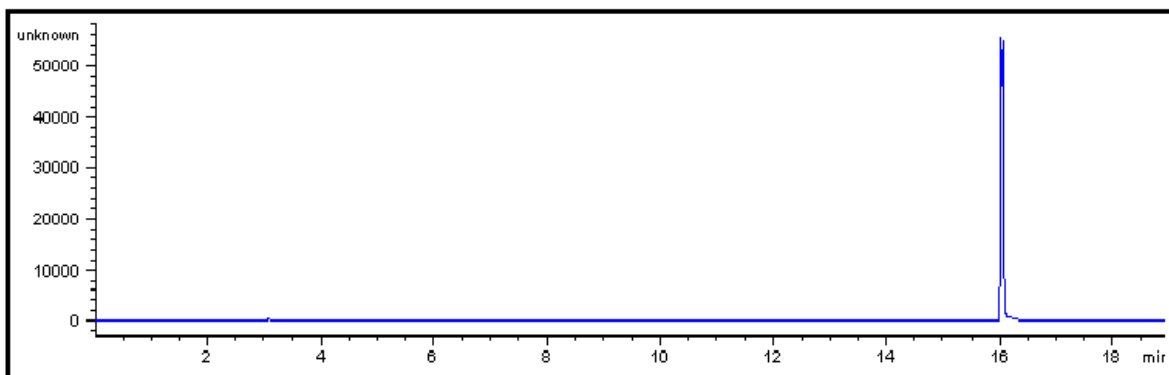


图 8 一个磺胺甲基嘧啶标准（二氯甲烷中的浓度为 0.1mg/mL）的 GC/PPFD 色谱图

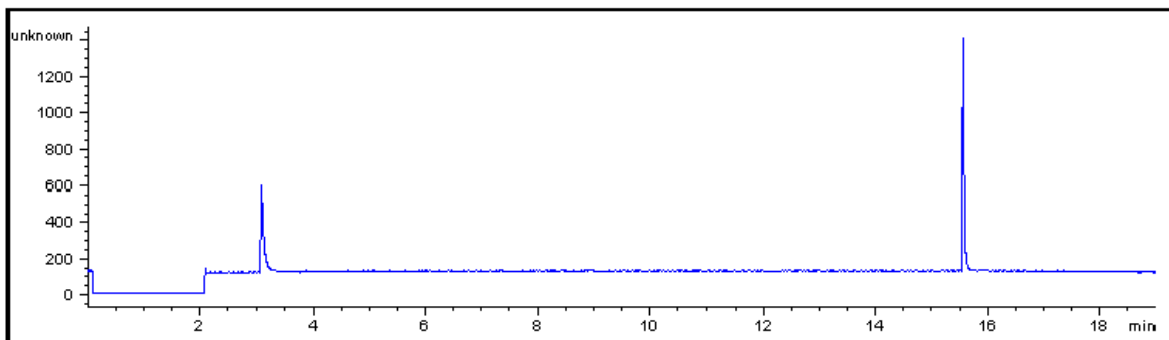


图 9 一个磺胺嘧啶标准（浓度为 0.1mg/mL）的 GC/PPFD 色谱图

结论

GPC AutoPrep 2000 系统配合上 EnviroSep-ABC 柱子，完全能够从需要测试的四种磺胺类药物——磺胺甲基嘧啶、磺胺喹噁啉、磺胺甲嘧啶和磺胺嘧啶中分离出大分子重量的干扰物质，例如油脂。这项研究采用 100%的二氯甲烷作为移动相进行虾组织的萃取净化。当前正在进行大量的研究以评估采用二氯甲烷和甲醇混合物作为移动相，以改进一些强极性的磺胺类药物——例如磺胺喹噁啉的净化和溶解性

的问题。Roybal *et al.* 已经报道成功地采用了 35% 的二氯甲烷/甲醇作为移动相。EnviroSep-ABC 柱子相比于 Sephadex LH-20 柱子具有更多的优势，因为不同的移动相可以应用于同一根柱子上，而且具有快速的 30 分钟的净化时间。四种磺胺类药物的回收率研究正在进行。样品采用一台气相色谱配置 PFPD——特定硫物质检测器进行定量。初步的研究已经证实，磺胺类药物标准能够采用这种检测方法进行检测。

参考

Roybal J.E.; Pfenning, A.P.; Turnipseed, S.B.; Gonzales, S.A. 应用尺寸排斥色谱分析虾组织中的残留磺胺类药物。于 2002 年 9 月 24 日，在加利福尼亚州洛杉矶市的 AOAC 年会上发表。

EnviroSep-ABC 是 Phenomenex 公司的注册商标

Sephadex 是 Amersham Biosciences AB 公司的注册商标

RapidVap 是 Labconco 公司的注册商标



P.O. Box 9010
College Station, Texas 77842-9010
Tel: (979) 690-1711 • FAX: (979) 690-0440 • www.oico.com