

改良的 QuEChERS/UPLC 法测定鱼组织中磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑与甲氧苄啶

刘永涛^{1,2,3}, 韩刚², 宋金龙², 董靖^{1,3}, 胥宁^{1,3},
杨移斌^{1,3}, 杨秋红^{1,3}, 艾晓辉^{1,2,3*}

(1. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 武汉 430223; 2. 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141; 3. 湖北省水产品质量安全工程技术研究中心, 湖北 武汉 430223)

摘要:建立了快速检测鱼体自然比例的带皮肌肉、肝脏、肾脏、鳃和血浆中磺胺甲噁唑(SMZ)及其代谢物乙酰磺胺甲噁唑(N-ac-SMZ)和增效剂甲氧苄啶(TMP)的超高效液相色谱法(UPLC)。自然比例的带皮肌肉、肝脏、肾脏和鳃组织采用改进的 QuEChERS 方法进行样品前处理; 血浆样品采用液液萃取法进行前处理。以甲醇-0.1%乙酸水溶液为流动相, Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 为分离柱, 检测波长为 270 nm, 数据采集模式为吸光度-基线中值滤波(MBF), 外标法定量。结果表明, 3种目标物在 0.05~10 mg/L 范围内线性良好, 相关系数 $r^2 \geq 0.9989$, 方法检出限和定量下限分别为 25、50 μg/kg。在 0.05~2.00 mg/kg 加标水平下, 回收率为 68.2%~97.3%, 相对标准偏差为 1.7%~13%。该方法操作简便、准确、灵敏, 适用于鱼体各组织中此 3 种目标物残留量的检测和药代动力学及组织分布规律研究。

关键词:改良的 QuEChERS; 磺胺甲噁唑; 代谢物; 甲氧苄啶; 鱼组织; 超高效液相色谱

中图分类号: O657.7; TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2019)08-0973-06

Determination of Sulfamethoxazole, N-acetyl Sulfamethoxazole and Trimethoprim Residues in Fish Tissues by Ultra-high Performance Liquid Chromatography with Modified QuEChERS

LIU Yong-tao^{1,2,3}, HAN Gang², SONG Jin-long², DONG Jing^{1,3}, XU Ning^{1,3},
YANG Yi-bin^{1,3}, YANG Qiu-hong^{1,3}, AI Xiao-hui^{1,2,3*}

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2. Key Laboratory of Control of Quality and Safety for Aquatic Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100141, China; 3. Hubei Freshwater Aquaculture Collaborative Innovation Center, Wuhan 430223, China)

Abstract: An ultra-high performance liquid chromatographic (UPLC) method was established for the rapid determination of sulfamethoxazole (SMZ), N-acetyl sulfamethoxazole (N-ac-SMZ) and trimethoprim (TMP) in fish tissues, including muscle and skin in natural proportions, liver, kidney, gill and plasma. Samples of muscle and skin in natural proportions, liver, kidney and gill tissues of fish were prepared using the modified QuEChERS, and plasma sample was prepared by a liquid-liquid extraction procedure. The analytes were separated on an Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with methanol and water containing 0.1% acetic acid as mobile phases, at a detection wavelength of 270 nm, using an absorbent minus median baseline filter (MBF) in data acquisition mode. The external standard method was used for quantitation. Results showed that there were good linear relationships for SMZ, N-ac-SMZ and TMP in the range of 0.05–10 mg/L with correlation coefficients (r^2) not less than 0.9989. The detection limits and quantitation limits for the analytes in fish tissues were 25 μg/kg and 50 μg/kg, respectively. Recoveries for the target compounds at spiked levels of 0.05–2.00 mg/kg were between 68.2% and 97.3% with relative standard deviation

收稿日期: 2019-03-23; 修回日期: 2019-05-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1600704); 现代农业产业技术体系专项资金资助项目(CARS-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(2018JBF02)

* 通讯作者: 艾晓辉, 博士, 研究员, 研究方向: 水产动物药理及药残控制技术, E-mail: thinat2005@sina.com

tions of 1.7% - 13%. The method is simple, accurate and highly sensitive, and is suitable for the residue determination, pharmacokinetic and tissue distribution study of SMZ, N-ac-SMZ and TMP in fish.

Key words: modified QuEChERS; sulfamethoxazole; metabolite; trimethoprim; fish tissue; ultra-high performance liquid chromatography (UPLC)

磺胺甲噁唑(SMZ)是一种广泛使用的磺胺类抗菌剂,其抗菌机制是抑制细菌的二氢叶酸合成酶。甲氧苄啶(TMP)是一种抗菌增效剂,它能抑制细菌的二氢叶酸还原酶从而阻碍四氢叶酸的合成^[1-2]。磺胺甲噁唑和甲氧苄啶按 5:1 的质量比合并用药具有较好的有效性^[3-5],美国、日本和中国已批准将两者组合用于防治水产动物的细菌性疾病^[6-7]。乙酰磺胺甲噁唑(N-ac-SMZ)是磺胺甲噁唑的主要代谢产物^[3-4,8]。磺胺类药物及其代谢物残留可通过食物链对人类健康造成潜在威胁,能够产生过敏^[9]、致畸致癌^[10]以及耐药性菌株^[11]等副反应。目前,欧盟规定所有磺胺类药物在自然比例的带皮鱼肉中最大残留限量(MRL)为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,甲氧苄啶的 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[12];我国规定磺胺类药物(以磺胺类药物的总量计)在所有食品动物肌肉中的 MRL 为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,甲氧苄啶在自然比例的带皮鱼肌肉中的 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[13];国际食品法典委员会(CAC)规定甲氧苄啶在自然比例的带皮鱼肌肉中的 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,尚未规定磺胺甲噁唑及其代谢物在水产品中的 MRL^[14]。为了人类健康和水产养殖业的可持续发展,建立鱼组织中磺胺甲噁唑及其代谢物乙酰磺胺甲噁唑和增效剂甲氧苄啶的测定方法是非常必要的。

关于水产品中磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶同时测定的方法报道较少,已报道的方法有液相色谱法和液相色谱-串联四极杆质谱法,涉及的水产动物组织包括海鲈仔鱼全鱼、大菱鲆仔鱼全鱼、2 月龄白虾和鱼肌肉^[4,15]。其中,液相色谱法具有前处理步骤繁琐和分析时间长等缺点,液相色谱-串联四极杆质谱法的仪器价格较高,且需使用快速溶剂萃取仪进行样品前处理,影响了方法的推广使用。

本实验通过对净化剂及其用量的优化,研发了一种操作简单的改良 QuEChERS 样品前处理方法,结合分析速度快、灵敏度高的超高效液相色谱(UPLC),建立了磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶的同时测定方法。该方法可在 8 min 内完成测定,且 3 种分析物均达到基线分离。该方法亦适用于上述 3 种分析物在水产动物体内的药代动力学及组织分布规律研究。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱带紫外检测器(TUV,美国 Waters 公司);Mettler-Toledo AE-240 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);Hitachi 20PR-520 型自动高速冷冻离心机(日本日立公司);FS-1 高速匀浆机(华普达教学仪器有限公司);调速混匀器(上海康华生化仪器制造厂);HGC-12 氮吹仪(Hengao T&D 公司)。

磺胺甲噁唑(纯度 $\geq 98.0\%$)、乙酰磺胺甲噁唑(纯度 $\geq 98.5\%$)、甲氧苄啶(纯度 $\geq 98.0\%$)标准品(美国 Sigma-Aldrich 公司);十八烷基键合硅胶粉(C_{18} 粉,40~60 μm ,天津博纳艾杰尔科技有限公司);乙酸乙酯、乙腈(色谱纯,美国 J. T. Baker 公司);氯化钠、冰乙酸、无水硫酸镁、三氯乙酸、磷酸二氢钠和磷酸氢二钠(国药集团化学试剂有限公司)。

50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0):称取磷酸二氢钠 3.12 g 溶于蒸馏水,定容至 100 mL(A 液);称取磷酸氢二钠 7.17 g 溶于蒸馏水,定容至 100 mL(B 液)。量取 39 mL A 液和 61 mL B 液混合,定容至 400 mL,即得。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼组织的预处理 鱼取血后,有鳞鱼去除鳞片,取自然比例的带皮肌肉、肝脏、肾脏和鳃等组织,无鳞鱼直接取自然比例的带皮肌肉、肝脏、肾脏和鳃等组织。血液样品以 3 500 r/min 离心 5 min 后,取血浆置于离心管中,于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用;其它样品均质后,于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.2 鱼血浆样品的处理 采用液-液萃取法进行血浆样品的前处理: 取血浆样品在室温下自然解冻, 准确量取 1 mL 血浆置于 10 mL 离心管中。加入 1 mL 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0), 涡旋振荡 30 s, 再加入 5 mL 乙酸乙酯, 涡旋振荡 30 s, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上层乙酸乙酯层置于另一 10 mL 离心管中。向残渣中加入 4 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并提取液于另一 10 mL 离心管中, 置 45 °C 氮吹仪上氮吹至干, 加入 1 mL 初始流动相溶解残渣, 涡旋振荡 30 s, 10 000 r/min 离心 5 min, 液体过 0.22 μm 针式尼龙滤头后, 进行 UPLC 测定。

1.2.3 自然比例带皮肌肉、肝脏、肾脏和腮组织样品的处理 采用改良的 QuEChERS 方法进行样品前处理: 将自然比例带皮肌肉、肝脏、肾脏和腮组织样品在室温下自然解冻, 分别称取上述样品 2.0 g 置于 15 mL 离心管中, 加入 6 mL 乙腈, 涡旋振荡混匀 30 s, 超声提取 1 min, 再加入 2 g 无水硫酸镁, 涡旋振荡 30 s, 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液置于另一 15 mL 离心管中。向残渣中加入 5 mL 乙腈重复提取 1 次, 合并提取液于 15 mL 离心管中, 在该离心管中加入 500 mg 无水硫酸镁和 100 mg C_{18} 粉涡旋振荡 30 s, 5 000 r/min 离心 5 min, 将乙腈层转移至 15 mL 离心管中, 置 50 °C 氮吹仪上氮吹至干, 加入 2 mL 初始流动相溶解残渣, 涡旋振荡 30 s, 10 000 r/min 离心 5 min, 下层液体过 0.22 μm 针式尼龙滤头后, 进行 UPLC 测定。

1.2.4 标准溶液的配制 分别准确称取 0.01 g (精确至 0.000 1 g) 磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶标准品, 用乙腈溶解并定容至 100 mL, 分别配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液, -18 °C 冰箱中保存。测定时, 用流动相将储备液稀释成质量浓度分别为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.0、5.0、10 mg/L 的混合标准工作溶液。

1.2.5 色谱条件 色谱柱: Acquity UPLC[®] BEH C_{18} (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm); 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 5 μL ; 紫外检测波长: 270 nm, 数据模式: 吸光度-基线中值滤波(MBF)模式; 流动相: A 为甲醇, B 为 0.1% 乙酸水溶液。梯度洗脱程序: 0.0~1.0 min, 15% A; 1.0~2.0 min, 15%~25% A; 2.0~3.0 min, 25%~35% A; 3.0~7.0 min, 35% A; 7.0~8.0 min, 35%~15% A; 8.0~9.0 min, 15% A。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

考察了分别以甲醇-0.1% 乙酸水溶液、甲醇-1% 乙酸水溶液、甲醇-2% 乙酸水溶液为流动相对 3 种目标化合物分离效果的影响。结果表明, 以甲醇-0.1% 乙酸水溶液作为流动相时, 甲氧苄啶的峰形好, 磺胺甲噁唑和乙酰磺胺甲噁唑的峰形略差, 但均可以满足分析要求; 以甲醇-1% 乙酸水溶液和甲醇-2% 乙酸水溶液作为流动相则需要较长的平衡时间, 且后者作为流动相时待测物的保留时间会发生漂移。因此, 选择甲醇-0.1% 乙酸水溶液为流动相。在“1.2.5”色谱条件下, 3 种分析物均可实现基线分离, 且峰形对称(见图 1)。

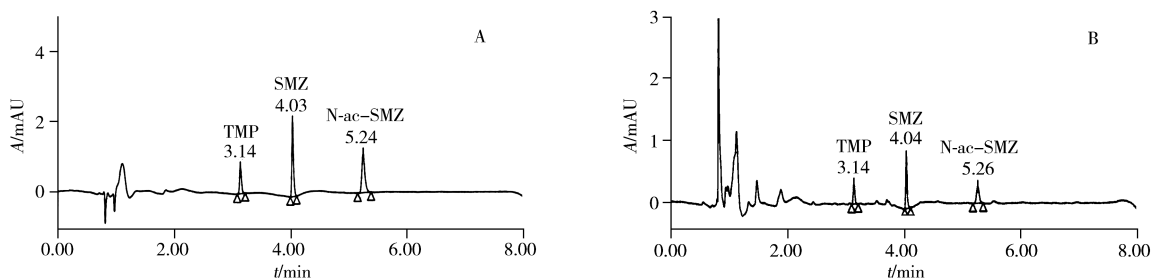


图 1 0.1 mg/L 标准溶液(A)与 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 斑点叉尾鲷自然比例带皮肌肉空白加标(B)的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of 0.1 mg/L standard solution(A) and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ spiked channel catfish muscle and skin in natural proportions(B)

Chair 等^[4]采用高效液相色谱分析了海鲈仔鱼全鱼、大菱鲆幼体和 2 月龄的白虾样品中磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶残留, 但其流动相组分复杂、配制过程繁琐, 且流动相中三乙胺与色谱柱填料的硅醇基会发生反应而改变色谱柱的性质^[16]。该方法分析 1 个样品的时间大于 24 min^[4], 而

本方法的分析时间仅为 8 min, 且流动相组分简单。

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 血浆样品前处理条件的优化 甲氧苄啶、磺胺甲噁唑和乙酰磺胺甲噁唑为白色或微黄色结晶粉末, 难溶于水, 易溶于乙腈、甲醇、乙酸乙酯和二氯甲烷等有机溶剂。由于乙腈或甲醇与水互溶, 而鱼血中含有大于 80% 的水分, 如果采用乙腈或甲醇作为提取剂, 会同时提取出鱼血浆样品中的水分和水溶性蛋白, 增加了样品浓缩的难度^[17]。乙酸乙酯和二氯甲烷均与水不互溶, 但提取剂二氯甲烷在样品的下层, 难于将二氯甲烷转移, 且提取液浓缩后定容时易产生乳化。有研究报道磺胺类药物易溶于稀酸中^[18], 因此, 本实验分别选择乙酸乙酯、乙酸乙酯含 0.1% 乙酸和乙酸乙酯含 1% 乙酸作为提取剂, 对血浆样品(加标水平为 1.0 mg/kg)进行提取。结果表明, 乙酸乙酯作为提取剂时, 甲氧苄啶、磺胺甲噁唑和乙酰磺胺甲噁唑的平均回收率分别为 62.6%、76.5% 和 70.5%; 以乙酸乙酯含 0.1% 乙酸为提取剂时的平均回收率分别为 65.9%、70.6% 和 64.8%; 以乙酸乙酯含 1% 乙酸为提取剂时的平均回收率分别为 55.7%、74.6% 和 67.3%。综合考虑, 最终选择乙酸乙酯作为血浆样品的提取剂。

鱼血浆样品的净化主要是去除样品中的蛋白质干扰。比较了 5% 三氯乙酸、10% 三氯乙酸、4% 氯化钠和 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)对加标血浆样品(加标 1.0 mg/kg)的净化效果。结果表明, 采用 5% 三氯乙酸净化时甲氧苄啶、磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑的平均回收率分别为 86.4%、47.2% 和 50.2%; 10% 三氯乙酸净化时的平均回收率分别为 88.6%、54.7% 和 59.0%; 4% 氯化钠净化时的平均回收率分别为 55.8%、85.1% 和 80.7%; 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)净化时的平均回收率最高, 分别为 94.9%、88.5% 和 85.9%。因此, 选择 50 mmol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.0)为鱼血浆样品的净化剂。

2.2.2 带皮肌肉、肝脏、肾脏、鳃样品前处理条件的优化 对于鱼的带皮肌肉、肝脏、肾脏等样品, 干扰测定的主要成分为脂肪和蛋白质等物质。分别考察了甲醇、乙腈和乙酸乙酯作为提取剂的效果, 发现甲醇作为提取剂时提取液很难挥干。乙酸乙酯作为提取剂时, 提取液中脂肪浓度高, 增加了净化难度。而乙腈对脂肪的提取率低, 且可以沉淀蛋白被推荐作为提取剂^[19]。本实验最终选择乙腈作为带皮肌肉、肝脏、肾脏、鳃样品的提取剂。

QuEChERS 方法的常用净化剂有无水硫酸镁、 C_{18} 粉和 N-丙基乙二胺(PSA)。其中, 无水硫酸镁可除去样品中的水分和沉淀部分蛋白; C_{18} 粉可吸附溶液中弱极性的脂肪、多环芳烃等干扰物; PSA 主要用于去除糖类、脂肪酸等极性干扰物, 但其对磺胺类药物有明显吸附^[20]。因此, 本实验选择无水硫酸镁作为除水和蛋白沉淀剂, 无水硫酸镁 + C_{18} 粉作为净化剂, 除去提取液中的水分和脂肪。以自然比例带皮肌肉组织中标 0.5 mg/kg 的回收率作为指标, 对无水硫酸镁(200、500、900 mg)和 C_{18} 粉用量(50、100、150 mg)进行了优化。由图 2 可知, 以 500 mg 无水硫酸镁 + 100 mg C_{18} 粉为净化剂时的效果最佳, 因此选其作为带皮肌肉、肝脏、肾脏、鳃样品的净化剂。

2.2.3 定容溶液的选择 分别采用乙腈-甲醇-2% 乙酸水溶液(5:10:85, 体积比)^[21-22]和初始流动相甲醇-0.1% 乙酸水溶液(15:85, 体积比)作为样品残渣的定容溶液, 样品定容后过 0.22 μm 针式尼头滤头进行 UPLC 分析。结果表明, 以前者为定容溶液时, 定容液中的杂质对 TMP 的定量造成干扰。而以甲醇-0.1% 乙酸水溶液(15:85)为定容溶液时, 3 种分析物的峰形对称且无干扰峰(见图 1B)。因此, 最终选择甲醇-0.1% 乙酸水溶液(15:85)为定容溶液。

2.3 方法的线性关系

采用本方法对 3 种目标物质量浓度为 0.05、0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0、10 mg/L 的混合标准工作溶液进行分析, 分别以上述分析物的质量浓度(X , mg/L)和对应的峰面积(Y)作线性回归,

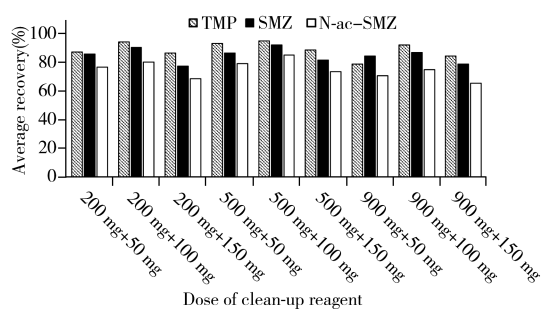


图 2 组合净化剂的用量对目标物回收率的影响
Fig. 2 Effect of combined clean-up reagent amount on the recoveries of target compounds

得到标准曲线。结果表明, 磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶在 0.05 ~ 10 mg/L 范围内均呈良好线性关系, 线性方程分别为 $Y = 42.47X - 870.4$ 、 $Y = 40.13X - 3036$ 和 $Y = 14.73X + 280.4$, 相关系数(r^2)分别为 0.999 6、0.999 4 和 0.998 9。

2.4 回收率、相对标准偏差、检出限与定量下限

分别在 5 种鱼组织空白样品中添加 5 个浓度水平的 3 种目标物混合标准溶液进行回收率实验, 每个加标浓度做 6 个平行, 结果见表 1。由表 1 可知, 3 种目标物的平均回收率为 68.2% ~ 97.3%, 相对标准偏差(RSD)为 1.7% ~ 13%。采用本方法测定加标样品, 分别以大于 3 倍和 10 倍信噪比计算方法检出限和定量下限, 结果显示, 3 种目标物在 5 种鱼组织中的检出限均为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量下限均为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。参照欧盟对磺胺类药物和甲氧苄啶在自然比例的带皮鱼肌肉中的最高残留限量 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[12], 本方法的检出限和定量下限均满足检测要求。

表 1 鱼组织中磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶的回收率与相对标准偏差($n=6$)

Table 1 Recoveries and relative standard deviations(RSD) of SMZ, N-ac-SMZ and TMP in fortified fish tissue samples($n=6$)

Tissue	Spiked (mg/kg)	SMZ		N-ac-SMZ		TMP	
		Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)	Recovery(%)	RSD(%)
Plasma	0.05	81.7 ± 5.12 *	6.3	75.7 ± 2.19	2.9	80.8 ± 2.16	2.7
	0.10	77.1 ± 4.34	5.6	70.1 ± 5.32	7.6	83.4 ± 5.41	6.5
	0.50	86.6 ± 3.60	4.2	78.6 ± 4.58	5.8	81.6 ± 3.88	4.8
	1.00	80.2 ± 3.18	4.0	83.8 ± 4.57	6.5	89.7 ± 2.36	2.6
	2.00	86.0 ± 1.48	1.7	79.2 ± 4.05	5.1	91.7 ± 5.92	6.5
Muscle and skin in natural proportions	0.05	75.2 ± 6.43	8.6	71.6 ± 7.62	11	81.3 ± 3.97	4.9
	0.10	78.5 ± 5.34	6.8	73.9 ± 9.17	12	87.4 ± 7.41	8.5
	0.50	86.7 ± 4.46	5.1	87.9 ± 9.57	11	88.6 ± 6.01	6.7
	1.00	90.7 ± 5.15	5.7	85.8 ± 6.93	8.1	93.1 ± 8.46	9.1
	2.00	91.6 ± 7.30	8.0	82.2 ± 8.81	11	95.2 ± 6.83	7.2
Liver	0.05	77.4 ± 7.44	9.6	68.2 ± 8.81	13	80.3 ± 4.69	5.8
	0.10	83.0 ± 6.19	7.5	87.5 ± 7.74	8.8	90.9 ± 4.33	4.8
	0.50	87.1 ± 2.68	3.1	79.0 ± 4.29	5.4	83.3 ± 4.70	5.6
	1.00	85.5 ± 8.05	9.4	77.1 ± 6.28	8.2	80.3 ± 7.53	9.4
	2.00	94.1 ± 7.68	8.2	90.3 ± 8.59	9.5	85.7 ± 5.57	6.5
Kidney	0.05	77.4 ± 7.44	9.6	71.2 ± 7.81	11	80.3 ± 4.69	5.8
	0.10	83.1 ± 3.57	4.3	78.4 ± 10.1	12	89.8 ± 5.36	6.0
	0.50	91.2 ± 6.89	7.7	83.9 ± 8.57	10	86.8 ± 6.88	7.9
	1.00	86.4 ± 3.35	3.9	81.6 ± 7.82	9.6	90.2 ± 10.2	11
	2.00	87.6 ± 5.81	6.6	85.0 ± 9.43	11	93.5 ± 6.39	6.8
Gill	0.05	82.7 ± 5.35	6.5	79.1 ± 3.97	5.0	87.4 ± 4.12	4.7
	0.10	88.6 ± 6.41	7.2	82.0 ± 7.84	8.8	94.0 ± 5.37	5.7
	0.50	93.7 ± 2.97	3.1	85.8 ± 6.45	7.5	91.1 ± 4.32	4.7
	1.00	95.2 ± 6.15	6.5	88.6 ± 6.77	7.6	92.3 ± 3.51	4.0
	2.00	97.3 ± 2.12	2.2	90.9 ± 8.73	9.6	96.5 ± 5.16	5.4

* standard deviation

2.5 方法应用

采用本方法研究了磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶在雌性和雄性黄颡鱼体内的分布规律。以 72 mg/kg 鱼体重的剂量(60 mg/kg 鱼体重的磺胺甲噁唑; 12 mg/kg 鱼体重的甲氧苄啶)给黄颡鱼口灌磺胺甲噁唑和甲氧苄啶的混悬液, 水温为(22 ± 1) °C。

结果显示, 在雌性和雄性黄颡鱼体内组织中均检出 3 种目标物。在雌性和雄性黄颡鱼血浆中, 磺胺甲噁唑于 8 h 达最大浓度, 分别为(22.25 ± 3.69) mg/kg 和(24.69 ± 5.61) mg/kg; 乙酰磺胺甲噁唑于 24 h 达最大浓度, 分别为(4.29 ± 1.41) mg/kg 和(4.86 ± 1.23) mg/kg; 甲氧苄啶于 6 h 达最大浓度, 分别为(1.28 ± 0.09) mg/kg 和(1.39 ± 0.33) mg/kg。在雌性和雄性黄颡鱼自然比例的带皮肌肉中, 磺胺甲噁唑于 8 h 达最大浓度, 分别为(8.63 ± 2.30) mg/kg 和(14.66 ± 5.69) mg/kg; 乙酰磺胺甲噁唑于 10 h 达最大浓度, 分别为(2.80 ± 0.79) mg/kg 和(6.48 ± 2.15) mg/kg; 甲氧苄啶于 10 h 达最大浓度, 分别为(1.39 ± 0.73) mg/kg 和(4.26 ± 1.02) mg/kg。在雌性和雄性黄颡鱼肝脏中, 磺胺甲噁唑于 10 h 达最大浓度, 分别为(4.31 ± 0.95) mg/kg 和(3.40 ± 1.03) mg/kg; 乙酰磺胺甲噁唑于 24 h

达最大浓度,分别为(36.22 ± 8.72) mg/kg 和(66.17 ± 12.24) mg/kg; 甲氧苄啶于6 h 达最大浓度,分别为(3.27 ± 0.72) mg/kg 和(4.92 ± 1.29) mg/kg。

3 结 论

本研究分别采用液液萃取法和改进的 QuEChERS 法对不同的鱼组织进行样品前处理,结合优化的色谱条件,建立了同时测定鱼组织中磺胺甲噁唑及其代谢物乙酰磺胺甲噁唑和增效剂甲氧苄啶的超高效液相色谱法。鱼组织中3种分析物的平均回收率为68.2%~97.3%,RSD为1.7%~13%,方法检出限为25 μg/kg,定量下限为50 μg/kg。该方法操作简便、分析速度快、测定结果准确,能满足鱼体各组织中磺胺甲噁唑、乙酰磺胺甲噁唑和甲氧苄啶同时测定的要求,亦适用于鱼体药代动力学和组织分布规律研究。

参考文献:

- [1] Bedor D C G, Goncalves T M, Ferreira M L L, De Sousa C E M, Menezes A L, Oliveira E J, De Santana D P. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 863(1): 46–54.
- [2] Cancho G B, García F M S, Rodríguez C M, Simal G J. *J. Agric. Food Chem.*, **2001**, 49(7): 3145–3150.
- [3] Touraki M, Niopas I, Kastritsis C. *Aquaculture*, **1999**, 175(1): 15–30.
- [4] Chair M, Nelis H J, Leger P, Sorgeloos P, De Leenheer A P. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **1996**, 40(7): 1649–1652.
- [5] Barnes K B, Steward J, Thwaite J E, Lever M S, Davies C H, Armstrong S J, Laws T R, Roughley N, Harding S V, Atkins T P, Simpson A J, Atkins H S. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2013**, 41(6): 552–557.
- [6] Gehring T A, Griffin B, Williams R, Geiseker C, Rushing L G, Siitonen P. *J. Chromatogr. B*, **2006**, 840(2): 132–138.
- [7] China Institute of Veterinary Drugs Control. National Standard Collection of Veterinary Medicine – Local Standards for Veterinary Medicine Increased National Standards(The First Volume). Beijing: China Agriculture Press(农业部兽药评审中心. 兽药国家标准汇编 – 兽药地方标准上升国家标准(第一册). 北京: 中国农业出版社), **2010**: 80.
- [8] Andriamalala A, Vieublé – Gonod L, Dumeny V, Cambier P. *Chemosphere*, **2018**, 191: 607–615.
- [9] Yamamoto M, Ly R, Gill B, Zhu Y, Moran – Mirabal J, Britz – McKibbin P. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(21): 10710–10719.
- [10] Granja R H M M, Niño A M M, Rabone F, Salerno A G. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 613(1): 116–119.
- [11] Jia W, Shi L, Chu X G. *Food Chem.*, **2018**, 262: 427–433.
- [12] European Commission Regulation(EU) No.37/2010 of 22 December 2009 on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. *Off. J. Eur. Commun.*, **2010**, L15: 63, 67.
- [13] Ministry of Agriculture. No.235 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Maximum Residue Limit of Veterinary Drugs in Animal Foods(农业部. 中华人民共和国农业部公告第235号. 动物性食品中兽药最高残留限量). [2002–12–24].
- [14] Codex Alimentarius Commission. CAC/MRL 2 – 2018. Maximum Residue Limits(MRLs) and Risk Management Recommendations(RMRs) for Residues of Veterinary Drugs in Foods. [2019–4–27].
- [15] Liu S S, Du J, Chen J W, Zhao H X. *Chin. J. Chromatogr.* (刘思思, 杜鹃, 陈景文, 赵红霞. 色谱), **2014**, 32(12): 1320–1325.
- [16] Su T. *China's Tradit. Chin. Med. Inf.* (苏坦. 中国中医药咨询), **2010**, 2(1): 109.
- [17] Liu Y T, Ai X H, Li L, Li J C, Yang H. *Biomed. Chromatogr.*, **2018**, 32(5): 1–9.
- [18] Guo M M, Li Z X, Tan Z J, Zhai Y X, Yang S G, Yao J H. *Progress in Fishery Sciences*(郭萌萌, 李兆新, 谭志军, 翟毓秀, 杨守国, 姚建华. 渔业科学进展), **2010**, 31(5): 97–104.
- [19] Ismaiel O A, Jenkins R G, Karnes H T. *Drug Test. Anal.*, **2013**, 5(8): 710–715.
- [20] Gao Y. *Research and Application of QuEChERS Combined LC – MS/MS on Veterinary Drug Residue in Animal-derived Food*. Zhengzhou: Zhengzhou University(高彦. QuEChERS 结合 LC – MS/MS 法在动物源性食品中兽药残留分析中的应用研究. 郑州: 郑州大学), **2017**.
- [21] Ministry of Agriculture. No.958 Bulletin – 12 – 2007 of the Ministry of Agriculture. Determination of Sulfonamide Residue in Aquatic Products – High Performance Liquid Chromatography(农业部. 农业部958号公告 – 12 – 2007. 水产品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱法). [2007–12–18].
- [22] Hong B, Luo L, Liu L L, Liu L, Wan Y W. *Chin. J. Anal. Lab.* (洪波, 罗玲, 刘伶俐, 刘丽, 万译文. 分析实验室), **2013**, 32(6): 101–104.