

流动注射-化学发光分析法测定磺胺脲^{*}

程 轲¹, 赵 悅¹, 谭 玄¹, 肖钰杰¹, 张罗一览², 郑 红¹, 杨 宪¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 401331; 2. 重庆市水利投资(集团)有限公司中心实验室, 重庆 401331)

摘要:为了实现快速测定样品中磺胺脲含量并降低检测成本,联合流动注射技术,建立了一种测定磺胺脲含量的新方法。基于在酸性条件下磺胺脲对高锰酸钾-甲醛体系的发光信号有明显的增强作用而建立了磺胺脲的检测体系并优化了各项参数。结果显示:在优化条件后,磺胺脲的线性范围为 $5 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹;对浓度为 2×10^{-4} mol·L⁻¹的磺胺脲溶液进行11次平行测定,计算出检出限为 6×10^{-7} mol·L⁻¹,检测结果的相对标准偏差为1.1%;加标回收实验测得的回收率为97%~103%。该方法检测快速、灵敏度高且成本较低,可成功应用于样品中磺胺脲的测定。

关键词:磺胺脲;流动注射;化学发光;高锰酸钾-甲醛体系

中图分类号:O657.3

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)01-0133-06

磺胺脲(Sulfadiguaniole)是一种性质较为稳定、生产成本低且具有广谱抗菌作用的磺胺类药物,能用于多数细菌性痢疾的防治,在临幊上还可用于防止肠道手术前感染^[1]。但过量的磺胺类药物残留不仅会对动物脏器产生损伤,引起过敏、泌尿和造血系统失调等副作用;而且还会通过粪便、尿液等方式被机体排入外界环境而造成生态毒理学污染^[2-3]。为了确保人们的健康,很多国家和国际组织都对磺胺类药物残留量做出限量规定,例如国际食品法典委员会规定食品和饲料中磺胺类药物残留量不得超过0.1 mg·kg⁻¹^[4]。目前磺胺类物质的测定方法主要有高效液相色谱-质谱法^[5]、酶联免疫吸附分析^[6]、薄层色谱法^[7]、毛细管电泳法^[8]、免疫化学方法^[9]、生物传感器^[10]等。这些方法所使用的仪器维修维护成本高,且对操作者有较高技术要求,推广难度较大。因此,为了准确测定动物性食品中磺胺类药物残留量,还需要建立更加快捷^[11]、有效和灵敏的检测方法。

化学发光法灵敏度极高且线性范围宽,有关实验装置具有设备简单、操作简便、可连续测定、重现性好等优点,因此这一方法在近些年来被广泛应用于无机化学、有机化学、生物分析等领域。将化学发光法与具有分析快速、稳定性高、高精度、低消耗等优势的流动注射技术^[12]相结合而形成的流动注射-化学发光分析法具有检测快速、适应范围广、易实现自动化等长处,目前已在药物分析^[13]、临床诊断^[14]、环境监测^[15]、食品安全、生命科学^[16]等领域得到了广泛的应用。

本研究经过大量实验,发现在酸性条件下磺胺脲对高锰酸钾-甲醛体系的发光信号有明显增强作用,然后以此建立了磺胺脲的检测体系并优化了各项参数,为磺胺脲的快速、准确和低成本测定提供了一种新方案。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

本研究所用主要仪器为IFFM-D型流动注射化学发光仪(西安瑞迈电子科技有限公司生产)、FA1004A型精密电子天平(上海精天电子仪器有限公司生产)和KQ-50E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产)。主要实验试剂中高锰酸钾、盐酸、硫酸、磷酸和硝酸均为分析纯且均为重庆万盛川东化工有限公司生产;分析纯甲醛为成都市科龙化工试剂厂生产;磺胺脲购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;复方磺胺脒片购自吉林省鹿王制药股份有限公司。

* 收稿日期:2023-03-30 修回日期:2023-07-17 网络出版时间:2024-02-22T19:50

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 11572063);重庆市教育委员会科学技术研究项目(No. KJQN202100545);重庆市自然科学基金面上项目(No. cstc2021jcyj-msxmX0377);重庆市教育科学“十三五”规划2018年重点课题(No. 2018-GX-184)

第一作者简介:程轲,女,研究方向为生物化学与分子生物学,E-mail:2021110513039@stu.cqnu.edu.cn;通信作者:杨宪,男,教授,博士,E-mail:464997677@qq.com

网络出版地址:<https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20240222.1355.004>

1.2 实验方法

磺胺胍的检测流程如图 1 所示。在流动注射系统软件中设置基本条件后,首先主蠕动泵以 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的载流速率旋转,将酸性溶液、高锰酸钾溶液和甲醛溶液均匀地加入主泵管中,进入八通阀内发生反应并产生稳定的基线发光信号,记录该发光信号值(I_0)。然后,副蠕动泵也以 $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的载流速率旋转,匀速地载入载流和磺胺胍样品,记录反应体系产生的最大发光信号值(I_s)。最后对相对化学发光强度($\Delta I = I_s - I_0$)与磺胺胍浓度进行定量分析。

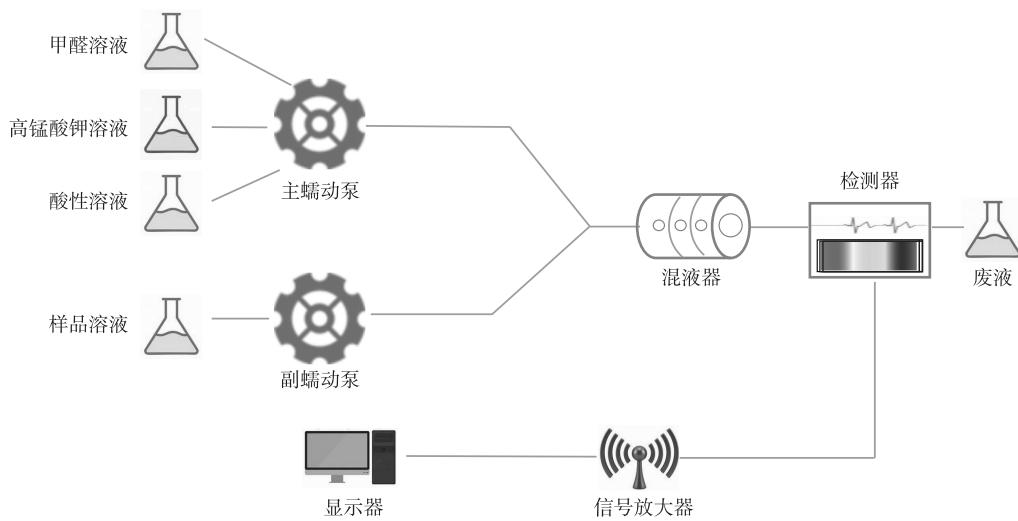


图 1 流动注射化学发光流程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of flow injection chemiluminescence analysis

2 结果与讨论

2.1 实验条件的优化

2.1.1 酸介质和浓度的选择

在不同的酸性溶液中,高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系的化学发光强度不同。选择盐酸、硝酸、硫酸和磷酸共 4 种酸性试剂进行研究,结果显示在盐酸溶液中,上述体系的发光信号最强、信噪比最佳。因此后续实验选择盐酸作为反应介质。与此同时还考察了盐酸溶液在 $0.02 \sim 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内对高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系相对化学发光强度的影响,结果如图 2a 所示:整个体系的相对化学发光强度随着盐酸浓度的增大而逐渐上升;当盐酸浓度为 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相对化学发光强度最大;当盐酸浓度大于 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,相对化学发光强度呈现出明显的减小趋势。因此,选取 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐酸溶液进行后续相关实验。

2.1.2 高锰酸钾浓度的优化

高锰酸钾在高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系中充当氧化剂,因此它的浓度对整个体系的化学发光强度和信噪比大小有着明显的影响。考察了高锰酸钾溶液在 $1 \times 10^{-5} \sim 2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内对高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系相对化学发光强度的影响,结果如图 2b 所示:整个体系的相对化学发光强度随着高锰酸钾浓度的增大逐渐上升;当高锰酸钾浓度大于 $1.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,相对化学发光强度逐渐减小。故高锰酸钾的最佳浓度为 $1.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.1.3 甲醛体积分数的优化

作为高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系的增敏剂,甲醛能使体系的化学发光强度明显提升。在固定盐酸、高锰酸钾和磺胺胍浓度分别为 0.8 、 1.8×10^{-4} 和 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下,对 $1\% \sim 10\%$ 体积分数范围内的甲醛溶液进行考察,结果如图 2c 所示:当甲醛体积分数在 $1\% \sim 7\%$ 时,甲醛体积分数与高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系的相对化学发光强度成正相关关系;当甲醛体积分数超过 7% 时,随着甲醛体积分数的增大,整个体系的相对化学发光强度逐渐下降。所以,甲醛的最佳体积分数为 7% 。

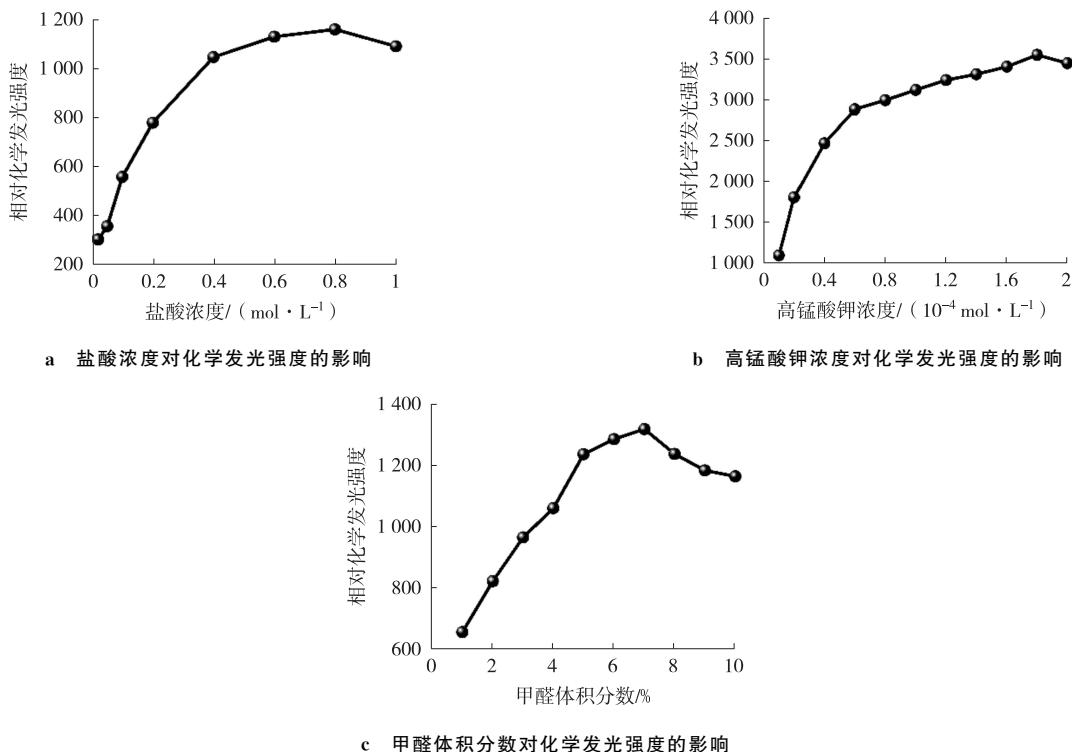


图 2 盐酸、高锰酸钾和甲醛对化学发光强度的影响

Fig. 2 Effects of hydrogen chloride, potassium permanganate, and formaldehyde on chemiluminescence intensity

2.2 工作曲线、精密度与检出限

高锰酸钾-甲醛-磺胺脲体系化学发光曲线图如图 3a 所示。在进一步优化后的实验条件下, 即盐酸、高锰酸钾浓度分别为 $0.8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.8 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及甲醛体积分数为 7% 时对磺胺脲的线性范围进行了测定。图 3b 显示: 当磺胺脲浓度为 $5 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 高锰酸钾-甲醛-磺胺脲体系相对化学发光强度随着磺胺脲浓度的增大而上升, 磺胺脲浓度($C_{\text{磺胺脲}}$)与相对化学发光强度呈良好的线性关系。线性回归方程为: $\Delta I = 1.0797 \times 10^{-4} C_{\text{磺胺脲}} + 81.498$ ($R^2 = 0.9928$)。使用浓度为 $2 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磺胺脲溶液进行 11 次平行测定, 所得结果的相对标准偏差为 1.1%, 并计算出检出限为 $6 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2017 年, 谭利等人^[17]用高锰酸钾-甲醛化学发光体系联用分子印迹聚合物测定磺胺脲, 得到的检出限是 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 同年, 段捷等人^[18]用高效液相色谱与 Ag(Ⅲ)-Luminol 体系和 Ni(Ⅳ)-Luminol 化学发光体系联用测定磺胺脲, 得到的检出限分别为 7×10^{-6} 和 $7 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与上述文献提到的检测方法相比, 本研究提出的检测方法的检出限有明显降低且操作更加方便快捷。

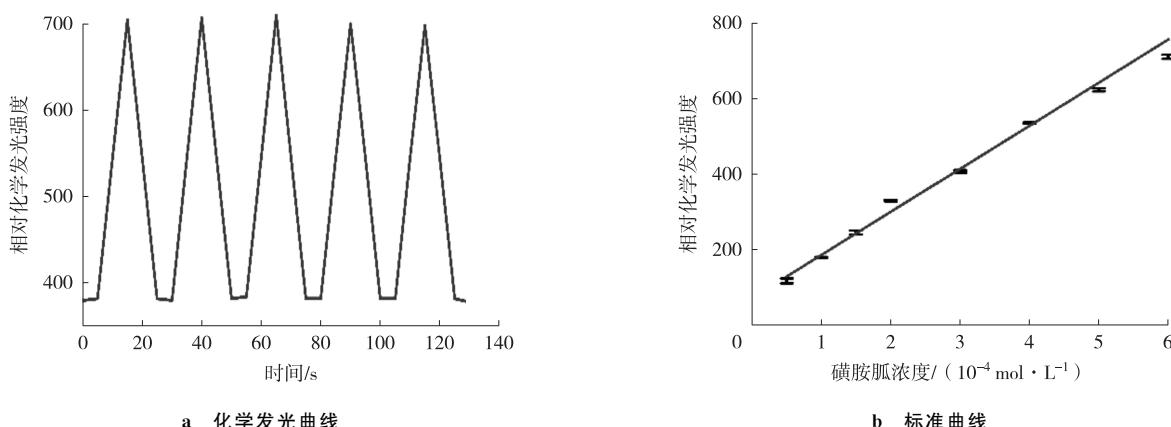


图 3 磺胺脲的化学发光曲线和标准曲线

Fig. 3 The standard curve and of chemiluminescence curve sulfaguanidine

2.3 干扰实验

在盐酸、高锰酸钾浓度分别为 0.8 、 1.8×10^{-4} mol·L⁻¹ 以及甲醛体积分数为 7% 的最佳实验条件下考察了多种干扰物质对 2×10^{-4} mol·L⁻¹ 的磺胺胍溶液的相对化学发光强度的影响。实验结果显示 500 倍于磺胺胍浓度的 H⁺、K⁺、Na⁺、Cu²⁺、NH₄⁺、Cl⁻、SO₄²⁻、CO₃²⁻、H₂PO₄²⁻、HPO₄²⁻ 和葡萄糖, 以及 100 倍于磺胺胍浓度的 Al³⁺、Mg²⁺、NO₃⁻ 和 HCOO⁻ 对磺胺胍检测实验无干扰。

2.4 样品分析及回收率实验

在盐酸浓度为 0.8 mol·L⁻¹、高锰酸钾浓度为 1.8×10^{-4} mol·L⁻¹ 和甲醛体积分数为 7% 的实验条件下对复方磺胺脒片进行分析。该药片为复方制剂, 每片含磺胺胍 0.25 g、甲氧苄啶 0.025 g。粉碎 10 片复方磺胺脒片加入 3900 mL 的实验室三级水中, 再稀释 10 倍, 使溶液中磺胺胍浓度为 3×10^{-4} mol·L⁻¹。然后对该样品进行 12 次测定后, 测出的磺胺胍浓度在 $2.96 \times 10^{-4} \sim 3.27 \times 10^{-4}$ mol·L⁻¹ 范围内; 同时进行样品的加标回收实验, 回收率在 97%~103% 之间(表 1)。上述结果证明本研究提出的检测方法可成功应用于实际样品中对磺胺胍测定。

表 1 样品回收结果

Tab. 1 Results of sample recovery

编号	样品浓度/ (mol·L ⁻¹)	加标量/ (mol·L ⁻¹)	检测值/ (mol·L ⁻¹)	回收率	编号	样品浓度/ (mol·L ⁻¹)	加标量/ (mol·L ⁻¹)	检测值/ (mol·L ⁻¹)	回收率
1	3.01×10^{-4}	0	3.01×10^{-4}		2	3.30×10^{-4}	1×10^{-4}	3.91×10^{-4}	97%
	3.00×10^{-4}	5×10^{-5}	3.51×10^{-4}	100%		3.07×10^{-4}	1×10^{-4}	3.98×10^{-4}	99%
	3.08×10^{-4}	5×10^{-5}	3.61×10^{-4}	103%	3	3.09×10^{-4}	0	3.09×10^{-4}	
	3.06×10^{-4}	5×10^{-5}	3.53×10^{-4}	101%		3.10×10^{-4}	2×10^{-4}	5.04×10^{-4}	100%
2	3.40×10^{-4}	0	3.40×10^{-4}			3.20×10^{-4}	2×10^{-4}	5.03×10^{-4}	100%
	3.02×10^{-4}	1×10^{-4}	3.90×10^{-4}	97%		3.05×10^{-4}	2×10^{-4}	4.99×10^{-4}	99%

2.5 化学发光反应机理探讨

在本研究中, 当固定高锰酸钾和磺胺胍浓度后探究盐酸最佳浓度和甲醛最佳体积分数时, 随着溶液中盐酸最佳浓度和甲醛最佳体积分数增加, 化学发光信号随之增大, 但变化幅度较小; 而在固定其他几种成分的浓度或体积分数探究高锰酸钾最佳浓度时, 化学发光信号随着溶液浓度增加而大幅度增大。该现象表明高锰酸钾是决定整个体系化学发光信号强度的最重要的因素。

磺胺胍的化学结构中含有氨基、亚砜酰基、异氰基等官能团(图 4), 这些官能团极容易与作为氧化剂的高锰酸钾发生氧化还原反应, 反应所产生的能量使 Mn²⁺ 从基态快速跃迁至激发态并再次回到基态, 并伴随着光辐射的形式释放能量, 从而形成发光现象^[19]。因此, 本研究初步推测高锰酸钾-甲醛-磺胺胍体系发光机理如下: 在该化学发光体系中, 盐酸作为酸性介质, 高锰酸钾充当氧化剂与磺胺胍发生氧化还原反应, Mn²⁺ 变为激发态且快速生成不稳定的中间产物。在甲醛的作用下, Mn²⁺ 从激发态被还原为基态, 释放能量并发生发光反应, 同时充当增敏剂的甲醛放大了化学发光信号(图 5)。

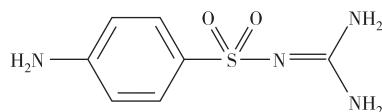


图 4 磺胺胍的结构

Fig. 4 Structures of sulfadiguanide

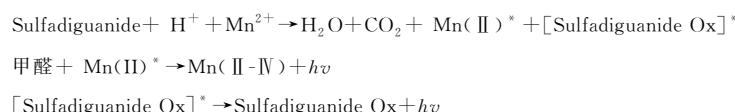


图 5 可能的化学发光机理

Fig. 5 Possible chemiluminescence mechanism

3 结束语

本研究经过大量实验发现磺胺胍能够增强高锰酸钾-甲醛体系的发光强度, 并以此为基础结合流动注射技术建立了流动注射-化学发光分析方法来检测样品中磺胺胍含量。本研究在考察了磺胺胍增强高锰酸钾-甲醛体系

的化学发光动力学曲线和优化了体系内各试剂浓度及仪器参数后得到以下结果:在最佳实验条件下且当磺胺脲浓度范围为 $5\times10^{-5}\sim6\times10^{-4}$ mol·L⁻¹时,磺胺脲浓度与整个体系的相对化学发光强度呈良好的线性关系,检出限为 6×10^{-7} mol·L⁻¹;使用 2×10^{-4} mol·L⁻¹的磺胺脲溶液进行11次平行测定,所得结果的相对标准偏差为1.1%;加标回收实验测得的回收率为97%~103%。因此,本文提出的方法检测速度快、灵敏度高且成本较低,可成功应用于样品中磺胺脲的测定。

参考文献:

- [1] 孙佳丽,刘怡,郑英帅,等. Ni(IV)配合物-鲁米诺化学发光新体系测定饲料中的磺胺脲[J]. 分析测试学报,2015,34(10):1200-1203.
- SUN J L, LIU Y, ZHENG Y S, et al. Determination of sulfaguanidine in feed sample by Ni(IV) complex-luminol chemiluminescence system coupled with flow-injection[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 34(10): 1200-1203.
- [2] 范能全. 磺胺二甲嘧啶在鲫鱼体内的药代动力学研究[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版),2010,27(3):23-26.
- FAN N Q. A study of pharmacokinetics property of sulfadimidine in crucian carp[J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science), 2010, 27(3): 23-26.
- [3] HOWE E, HARDING G. A comparison of protocols for the optimisation of detection of bacteria using a surface acoustic wave biosensor[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2000, 15(11/12): 641-649.
- [4] 李梦依,都炳强,王玉宁,等. 分子印迹电化学传感器检测鸡肉、鱼肉和牛奶中磺胺二甲基嘧啶残留[J]. 食品安全质量检测学报,2022,13(13):4125-4132.
- LI M Y, DOU B Q, WANG Y N, et al. Detection of sulfamethazine residues in chicken, fish and milk by molecularly imprinted electrochemical sensor[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(13): 4125-4132.
- [5] MELEKHIN A O, TOLMACHEVA V V, GONCHAROV N O, et al. Multi-class, multi-residue determination of 132 veterinary drugs in milk by magnetic solid-phase extraction based on magnetic hyper cross linked polystyrene prior to their determination by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chemistry, 2022, 387: 132866.
- [6] HE T, CUI P L, LIU J, et al. Production of a natural dihydropteroate synthase and development of a signal-amplified pseudo-immunoassay for the determination of sulfonamides in pork[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(9): 3023-3032.
- [7] LEGNANI C, PALARETI G, COSMI B, et al. Different cut-off values of quantitative D-dimer methods to predict the risk of venous thromboembolism recurrence:a post-hoc analysis of the PROLONG study[J]. Haematologica, 2008, 93(6): 900-907.
- [8] SEMAIL N-F, KEYON A S A, SAAD B, et al. Simultaneous preconcentration and determination of sulfonamide antibiotics in milk and yoghurt by dynamic pH junction focusing coupled with capillary electrophoresis[J]. Talanta, 2022, 236: 122833.
- [9] LI Z B, CUI P L, LIU J, et al. Production of generic monoclonal antibody and development of chemiluminescence immunoassay for determination of 32 sulfonamides in chicken muscle[J]. Food Chemistry, 2020, 311: 125966.
- [10] KAKIMOVA Z, ZHARYKBASOVA K, KAKIMOV A, et al. Study on the detection of antibiotics in food based on enzyme-free labelless aptamer sensor[J]. Food Science and Technology, 2022, 42: 70421.
- [11] 郭海燕,郑红,张晶,等. 磺胺的分子印迹流动注射化学发光方法研究[J]. 分析科学学报,2013,29(2):196-200.
- GUO H Y, ZHENG H, ZHANG J, et al. Molecular imprinting-chemiluminescence determination of sulfanilamide[J]. Journal of Analytical Science, 2013, 29(2): 196-200.
- [12] 王冬. 流动注射化学发光法测定有机胺的研究[D]. 沈阳:沈阳理工大学,2011.
- WANG D. Determination of organic amines by flow injection chemiluminescence[D]. Shenyang: Shenyang Ligong University, 2011.
- [13] 翟倩,杨文霞,李佳,等. 流动注射-化学发光法在药物分析中的应用进展[J]. 理化检验(化学分册),2022,58(8):982-992.
- ZHAI Q, YANG W X, LI J, et al. Application progress of flow injection chemiluminescence in pharmaceutical analysis[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B:Chemical Analysis), 2022, 58(8): 982-992.
- [14] 刘翠颖,段天昱,刘俊红,等. 基于流动注射化学发光法建立高灵敏检测血浆头孢哌酮的方法研究[J]. 重庆医学,2021,50(4): 670-674.
- LIU C Y, DUAN T Y, LIU J H, et al. Study on a method for the determination of cefoperazone in human plasma based on flow injection chemiluminescence[J]. Chongqing Medicine, 2021, 50(4): 670-674.
- [15] PERRIN L, COLOMBET D, AYELA F. Comparative study of luminescence and chemiluminescence in hydrodynamic cavitating flows and quantitative determination of hydroxyl radicals production[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2021, 70: 105277.

- [16] HUA Y, SUN F Y, HU F, et al. Diagnostic value of quantification of circulating free DNA for gall bladder cancer using a chemiluminescence DNA biosensor system based on DNA G-quadruplex/hemin enzyme[J]. Translational Oncology, 2021, 14(1): 100928.
- [17] 谭利,向辉,袁丝兰,等.分子印迹聚合物-流动注射-化学发光法测定磺胺脒[J].理化检验(化学分册),2018,54(3):269-274.
TAN L, XIANG H, YUAN S L, et al. Determination of sulfaguanidine by flow injection chemiluminescence based on molecularly imprinted polymer[J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis), 2018, 54(3): 269-274.
- [18] 段婕,李兴华,刘坤,等.高效液相色谱-化学发光法检测牛奶中磺胺类药物残留[J].分析化学,2017,45(7):1012-1018.
DUAN J, LI X H, LIU K, et al. Determination of sulfonamide residues in milk by high performance liquid chromatography-chemiluminescence method[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(7): 1012-1018.
- [19] 李少芳.高锰酸钾-甲醛化学发光体系测定黄芩苷[J].广州化工,2012,40(15):136-138.
LI S F. The determination of baicalin with chemiluminescence system of KMnO₄-HCHO[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2012, 40(15): 136-138.

Determination of Sulfaguanidine by Flow Injection Chemiluminescence Analysis

CHENG Ke¹, ZHAO Yue¹, TAN Xuan¹, XIAO Yujie¹,
ZHANG Luoyilan², ZHENG Hong¹, YANG Xian¹

(1. College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. Central Laboratory of Chongqing Water Conservancy Investment (Group) Company Limited, Chongqing 401331, China)

Abstract: Although sulfadiguanide has a broad-spectrum antibacterial effect as a drug used in clinical practice, excessive intake is fatal to the human body, so in order to determine the content of sulfadiguanide in drugs and reduce the cost of detection, a new chemiluminescence method for the determination of sulfadiguanide content by combined flow injection technology was established. Under the acid condition, the sulfadiguanide is determined by potassium permanganate-formaldehyde luminescent system combined with flow injection chemiluminescence analyzer. The result show that the linear range is $5 \times 10^{-5} \sim 6 \times 10^{-4}$ mol · L⁻¹, the detection limit is 6×10^{-7} mol · L⁻¹, the relative standard deviation is 1.1% ($n = 11$, $C_{\text{sulfadiguanide}} = 2 \times 10^{-4}$ mol · L⁻¹), the recovery is 97%~103%. Using this method has been successful to the detection of sulfadiguanide recognition with satisfactory result.

Keywords: sulfadiguanide; flow injection; chemiluminescence; potassium permanganate-formaldehyde system

(责任编辑 方 兴)