

# 固相萃取- HPLC 法测定蜂蜜中残留的 10 种磺胺类药物

汤 瑶<sup>1</sup>, 何 华<sup>1</sup>, 吴 斌<sup>2</sup>, 陈惠兰<sup>2</sup>, 沈崇钰<sup>2</sup>, 蒋 原<sup>2</sup>

(1. 中国药科大学 分析化学教研室, 江苏 南京 210009, 2. 江苏出入境检验检疫局,  
食品实验室, 江苏 南京 210001)

**摘 要:** 研究了用固相萃取- 高效液相色谱法同时测定蜂蜜中 10 种磺胺类药物残留量的方法。样品经三氯甲烷溶液提取, 过 Oasis HLB C<sub>18</sub> 固相萃取柱净化, 用乙腈洗脱 10 种磺胺, 反相高效液相色谱- 紫外检测器测定。检测波长为 270 nm, 柱温 45 °C, 流动相: 磷酸水溶液- 乙腈梯度洗脱。该方法前处理简单, 梯度洗脱分离效果和重现性好, 在 0.010~ 1.0 mg/kg 添加水平, 10 种组分的回收率在 86.5% ~ 100.8% 之间, 室内相对标准偏差在 3.5% ~ 8.1% 之间, 线性范围为 0.010~ 10 µg/mL, 检出限为 0.005 mg/kg。该方法快速、灵敏、专属, 可用于食品中磺胺类药物残留量的常规检测。

**关键词:** 磺胺类药物; 固相萃取; 高效液相色谱法; 药物残留; 蜂蜜

中图分类号: O657.72; R978.2 文献标识码: A 文章编号: 1004- 4957(2005)01- 0096- 04

## Multiresidue Determination of Ten Sulfonamides in Honey by Solid-phase Extraction and High Performance Liquid Chromatography

TANG Yao<sup>1</sup>, HE Hua<sup>1</sup>, WU Bin<sup>2</sup>, CHEN Hui\_lan<sup>2</sup>, SHEN Chong\_yu<sup>2</sup>, JIANG Yuan<sup>2</sup>

(1. Department of Analytical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Food  
Laboratory, Jiangsu Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

**Abstract:** A multiresidue analytical method was developed for the simultaneous determination of ten sulfonamides in honey using solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. The whole process includes blender extraction of 10.00 g samples with chloroform, evaporation to dryness, partition with phosphorous acid buffer solvent, sample clean-up through a C<sub>18</sub> solid-phase extraction column with acetonitrile, and reversed-phase high performance liquid chromatography with a UV detector. The detection wavelength was 270 nm; the column temperature was 45 °C; and the mobile phase for gradient elution was a mixture of aqueous phosphorous acid- acetonitrile. The recoveries of the added 10 sulfonamides at levels of 0.010~ 1.0 mg/kg were found to be in the range of 86.5% ~ 100.8% with coefficients of variation of 3.5% ~ 8.1%. The linear range was 0.010~ 10 µg/mL, and the detection limit was 0.005 mg/kg. This method is simple, rapid, reproducible, sensitive and selective.

**Key words:** Sulfonamide; Solid-phase extraction; High performance liquid chromatography; Residue; Honey

磺胺类药物是以对氨基苯磺酰胺为基本化学结构的一类合成抗菌药物, 由于取代基的不同, 产生许多不同的磺胺药。这类药物广泛用作牲畜的抗菌药。在蜂产品中该药物的残留对人类健康有潜在的危害, 可在过敏性病人中引起过敏反应或者使病原体有机体产生抗药性。几种磺胺类药物同时测定的方法已有报道, 但这些方法基本上均使用长时间的萃取和洗脱过程来获得满意的灵敏度<sup>[1, 2]</sup>。用高效液相色谱- 荧光检测器对磺胺类药物残留测定<sup>[3]</sup>, 溶剂的极性、pH、溶氧量、溶剂的氢键、温度等都会影响荧光的发射强度或波长, 且线性范围窄。虽然采用荧光检测器或柱后衍生化<sup>[4]</sup>可获得一定专属性, 但这些分析手段需要昂贵的仪器和额外的设备<sup>[5~ 7]</sup>, 不利于推广和实施国家标准。

我们采用固相萃取- 高效液相色谱法建立快速、专属的蜂产品中磺胺类药物含量的测定方法。该系统不需要额外的柱后系统的仪器, 所用的试剂适合于 HPLC 方法测定, 紫外检测器受到的影响因素较小, 线性范围宽, 且灵敏度能够满足 10 种磺胺类药物含量的同时测定, 较其它方法测定磺胺类药物种

收稿日期: 2004- 01- 16; 修回日期: 2004- 03- 16

基金项目: 国家环境控制与资源化研究重点实验室基金项目 (0211H022)

作者简介: 汤 瑶 (1980- ), 女, 内蒙古阿荣旗人, 硕士研究生; 何 华, 联系人, Tel: 025- 85391167, E-mail: dochehua@163.com

类多且专属性好的优点<sup>[8,9]</sup>。

## 1 实验部分

### 1.1 试 剂

乙腈和甲醇为色谱纯, 水为 Milli-Q SP TOC 超纯水; 三氯甲烷、磷酸、磷酸二氢钠、氢氧化钠和无水乙醇等其他试剂均为分析纯。

10% 的碱性氯化钠溶液: 称取氯化钠 10.0 g, 加 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶解并稀释至 100 mL。

1.0 mol/L 的磷酸二氢钠缓冲液: 称取磷酸二氢钠 120 g, 加水溶解并稀释到 1 000 mL, 用 1.0 mol/L 的氢氧化钠溶液调节 pH 为 6.0。

磺胺标准品: 磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲基异 唑、磺胺二甲基异 唑、磺胺喹 啉标准品, 纯度  $\geq 99.0\%$  (Sigma 公司提供)。标准溶液配制: 准确称取 10 mg 的每种磺胺标准品于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并定容, 得 0.1 mg/mL 的标准储备液。保存在 4 °C 冰箱中, 有效期为 3 个月。根据需要, 临用时用流动相稀释成标准工作溶液。

### 1.2 仪器与设备

美国 Agilent\_1100 型高效液相色谱仪, 配有 G1314A 紫外检测器和 HPCHEM 色谱管理系统, 液相色谱柱: LiChrospher RP\_18e 250×4 mm i. d. 5  $\mu$ m, 预柱 Merck C<sub>18</sub> 10×4 mm i. d. 5  $\mu$ m。

瑞士 BUSHI Rotavapor R\_200 型旋转蒸发器, 配有 LAUDA WKL 230 型循环水式冷却系统。美国 SEP-ELCO Visiprep DL SPE 型固相萃取装置; 固相萃取真空装置为 SHZ\_D(III) 循环水式真空泵(巩义市英峪予华仪器厂生产); Oasis, HLB 型固相萃取小柱(3 cc(60 mg) C<sub>18</sub>, Waters)。

### 1.3 样品预处理

1.3.1 样品的提取 称取 10.00 g 样品于 50 mL 的具塞离心瓶中, 加入 5 mL 5% 的乙醇-水溶液涡旋混匀, 使蜂蜜完全溶于乙醇-水溶液中(蜂蜜如有析出结晶的现象, 在低于 60 °C 的水中加热, 使其完全溶解, 混合后再称样), 加入 15 mL 三氯甲烷, 旋涡混匀 3 min, 离心 3 min, 转移三氯甲烷于另一磨口离心管中, 残渣用 10 mL 三氯甲烷提取 1 次, 合并三氯甲烷。将三氯甲烷于 40 °C 下浓缩至干, 加入 4 mL 10% 的碱性氯化钠溶液混匀溶解残渣。加入 5 mL 磷酸二氢钠缓冲液, 于旋涡混合器上混匀 20 s。

1.3.2 样品净化 将带有阀的玻璃贮液器连接到 Oasis HLB 固相萃取柱上, 上述混匀后的溶液倒入玻璃贮液器中, 在减压条件下样液过活化好的固相萃取小柱。待样品溶液过柱完成后, 加 15 mL 超纯水淋洗, 抽真空 5 min, 然后用 5 mL 乙腈洗脱于试管中。将乙腈洗脱液于 40 °C 水浴中高纯氮气流浓缩至干, 流动相溶解并定容至 1 mL, 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤供液相色谱分析。

### 1.4 液相色谱条件

流动相: A 为 0.01 mol/L 磷酸水溶液, B 为乙腈。AB 二元梯度洗脱程序: 0~5 min(A 与 B 体积比 85:15), 5~10 min(A 与 B 体积比 75:25), 10~14 min(A 与 B 体积比 65:35), 最后回到初始条件; 流速 1.0 mL/min; 柱温 45 °C; 紫外检测波长 270 nm。应用此色谱条件可获得良好的分离和适宜的保留时间, 各组分均在 15 min 内出峰。10 种磺胺类药物的标准色谱图见图 1。

## 2 结果与讨论

### 2.1 提取溶剂的选择

磺胺类药物一般为白色或微黄色结晶性粉末, 难溶于水, 较易溶于稀酸、稀碱和有机溶剂。分别选用乙腈、三氯甲烷和甲醇作为蜂蜜样品的提取溶液, 在同一添加水平, 相同实验条件下, 对蜂蜜样品进行回收率实验, 实验数据见表 1。

从表 1 可以看出, 使用三氯甲烷作提取剂, 10 种

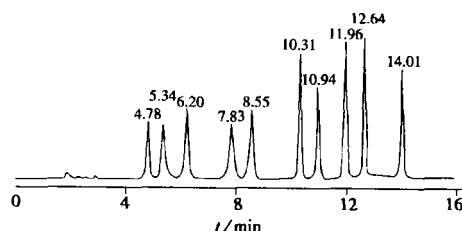


图 1 10 种磺胺类药物标准谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of a standard solution of 10 sulfonamides( 50 ng/mL, injected volume 20  $\mu$ L)  
Mobile phase: 0.01 mol/L aqueous phosphorous acid- acetonitrile(85:15 by volume); flow rate: 1.0 mL/min; column: LiChrospher RP\_18e 250×4 mm i. d., 5  $\mu$ m; wavelength: 270 nm

磺胺类药物的回收率基本上在 90% 以上, 乙腈和甲醇的回收率明显低于三氯甲烷作为提取溶剂的回收率。而且使用乙腈和甲醇, 均出现样品基底干扰大, 图谱的基线漂移现象。因此在本方法中选择三氯甲烷作为蜂蜜样品的提取溶液。

## 2.2 色谱柱的选择

实验发现, 不同型号的色谱柱对磺胺类药物的分离效果有一定的影响。我们选择了以下 5 种不同型号与长度的色谱柱: LiChrospher 100 RP<sub>18</sub>e 250×4 mm i. d., 5 μm; Kromasil KR 100\_5 C<sub>18</sub> 250×4.6 mm i. d., 5 μm; Kromasil C<sub>18</sub> 150×4.6 mm i. d., 5 μm; Agilent ZORBAX Eclipse×DB\_C<sub>8</sub> 150×4.6 mm i. d., 5 μm; ALLTIMA C<sub>18</sub> 150×4.6 mm i. d., 5 μm。实验结果表明, 长色谱柱比短色谱柱的测定效果好, 10 种磺胺类药物有效分离且峰形好, 不拖尾, 基线相对平稳。但若使用 Kromasil C<sub>18</sub> 长柱作为分析柱, 保留时间过长, 磺胺噻啉出峰需要 1 个多小时, 灵敏度也有降低。因此, 选择 LiChrospher 100 RP<sub>18</sub>e 250 mm 的长色谱柱为分析柱, 梯度洗脱, 10 种磺胺类药物在 15 min 内完全分离, 灵敏度也能满足分析的要求。

## 2.3 流动相选择

我们选择 4 种液相分离条件, 确定了合适的分离条件。所有组分在 15 min 内出峰, 满足快速分析要求。另外 3 种液相色谱条件均未能将 10 种磺胺类药物完全分离, 尤其是磺胺二甲基嘧啶和磺胺甲噻二唑, 在这 3 种条件下, 两色谱峰重合。

## 2.4 方法的线性关系

以乙腈为溶剂, 配制磺胺类药物标准系列溶液浓度为 0、0.10、0.20、0.50、0.75、1.00 μg/mL 于容量瓶中, 进样量 20 μL, 外标法定量。其线性方程和相关系数见表 2。

## 2.5 方法的精密度和回收率实验

用不含磺胺类药物的蜂蜜试样进行添加回收率和精密度实验, 样品分别添加 0.050、0.100、0.125、0.250、0.500 μg/mL 5 个浓度水平的磺胺药物标准溶液, 摇匀, 密封放置 2 h, 使标准溶液被样品充分吸收, 然后按照样品前处理方法进行提取和净化, 高效液相色谱测定(回收率实验各浓度均重复测定 5 次), 结果见表 3。

从表 3 可以看出, 在 0.010~10 μg/mL 范围, 5 个添加水平回收率为 82.4%~95.6%, 相对标准偏差为 3.5%~8.1%。回收率较高, 相对标准偏差低, 方法的重现性较好。

## 2.6 方法检出限和最低检测浓度

10 种磺胺类药物样品添加浓度为 0.01 mg/kg, 谱图的信噪比均大于 10。因此, 在本方法操作条件下 10 种磺胺类药物定量下限为 0.005 mg/kg, 当试样称样量为 10.00 g, 定容量为 1 mL 时, 检出限为 0.5 μg/kg。其检出限标准图谱见图 2b。

表 1 不同提取溶剂对磺胺回收率的影响

Table 1 Effect of extract solvents on recoveries of sulfonamides *R*/%

| Compound             | Acetonitrile | Chloroform | Methanol |
|----------------------|--------------|------------|----------|
| Sulfadiazine         | 80.4         | 93.9       | 76.5     |
| Sulfapyridine        | 83.5         | 92.6       | 83.8     |
| Sulfamerazine        | 78.4         | 94.1       | 81.9     |
| Sulfamethazine       | 85.2         | 90.9       | 79.9     |
| Sulfamethizole       | 82.2         | 94.7       | 78.6     |
| Sulfamonomethoxine   | 79.6         | 95.3       | 80.4     |
| Sulfachlorpyridazine | 81.7         | 93.4       | 74.5     |
| Sulfisomezole        | 83.1         | 89.9       | 80.5     |
| Sulfisoxazole        | 84.1         | 94.3       | 77.6     |
| Sulfaquinolaxline    | 80.7         | 96.7       | 82.9     |

表 2 10 种磺胺类药物的线性方程

Table 2 Linear equations, correlation coefficients for the correlation curves

| Compound             | Linear equation <sup>a</sup> | Correlation coefficient <i>r</i> |
|----------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Sulfadiazine         | $Y = 43.61 X - 0.06672$      | 0.9999                           |
| Sulfapyridine        | $Y = 64.07 X - 0.1437$       | 0.9999                           |
| Sulfamerazine        | $Y = 69.16 X + 0.03528$      | 0.9999                           |
| Sulfamethazine       | $Y = 68.93 X - 0.02021$      | 0.9999                           |
| Sulfamethizole       | $Y = 82.63 X - 0.1875$       | 0.9999                           |
| Sulfamonomethoxine   | $Y = 86.80 X - 0.2714$       | 0.9999                           |
| Sulfachlorpyridazine | $Y = 77.05 X + 0.2511$       | 0.9997                           |
| Sulfisomezole        | $Y = 95.36 X - 0.3109$       | 0.9999                           |
| Sulfisoxazole        | $Y = 90.56 X - 0.2852$       | 0.9999                           |
| Sulfaquinolaxline    | $Y = 80.98 X + 0.1865$       | 0.9998                           |

<sup>a</sup> *X* is content, μg/mL; *Y* is the peak area

表 3 蜂蜜中磺胺类药物的回收率和精密度实验结果(*n* = 5)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations(*n* = 5)

| Compound             | Added level <sup>a</sup> | Average recovery <i>R</i> /% | RSD <i>s</i> /% |
|----------------------|--------------------------|------------------------------|-----------------|
| Sulfadiazine         | 5                        | 93.4                         | 3.5             |
| Sulfapyridine        | 5                        | 92.4                         | 4.2             |
| Sulfamerazine        | 5                        | 86.5                         | 6.3             |
| Sulfamethazine       | 5                        | 95.6                         | 5.4             |
| Sulfamethizole       | 5                        | 91.3                         | 5.9             |
| Sulfamonomethoxine   | 5                        | 87.7                         | 6.7             |
| Sulfachlorpyridazine | 5                        | 92.5                         | 3.8             |
| Sulfisomezole        | 5                        | 89.1                         | 8.1             |
| Sulfisoxazole        | 5                        | 91.8                         | 4.3             |
| Sulfaquinolaxline    | 5                        | 100.8                        | 7.1             |

<sup>a</sup> “5” is stand for 0.050, 0.100, 0.125, 0.250, 0.500 μg/mL

## 2.7 方法的适用性

对不同蜜种的几批蜂蜜样品随机抽样得 10 个样品, 在 100、250、500 ng/mL 3 个添加水平, 分别进行 10 种磺胺类药物的添加回收率实验, 所做样品空白实验(图 2a)证明, 在 10 种磺胺类药物出峰区域里, 未见干扰峰出现, 说明方法的选择性很好。

## 3 结 论

固相萃取- 高效液相色谱法测定蜂蜜中残留的磺胺类药物, 由于前处理使用固相萃取小柱, 可以排除蜂蜜中大部分干扰物质的影响。使用紫外检测器, 能够达到很高的灵敏度, 保证了外标法定量的准确性和重现性。与其他方法相比, 本方法具有快速、灵敏、专属的特点。

致谢: 感谢南京大学环境学院王晓蓉教授和孙成教授给予支持和帮助。

### 参考文献:

- [1] KISHIDA K, FURUSAWA N. Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken[J]. J Chromatogr, A, 2001, 937(1-2): 49-55.
- [2] POSYNIK A, SNEGUCHI T. Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey[J]. Bull Vet Inst Pulawy, 2002, 46: 111-117.
- [3] STOEVE G, MICHAILOVA A. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr, A, 2000, 871(1-2): 37-42.
- [4] TAKEDA N, AKIYAMA Y. Pre-column derivatization of sulfa drugs with fluorescamine and high-performance liquid chromatographic determination at their residual levels in meat and meat products[J]. J Chromatogr, 1991, 558(1): 175-180.
- [5] COMBS M T, ASHRAF- KHORASSANI M. HPLC/atmospheric pressure chemical ionization- mass spectroscopy of eight regulated sulfonamides[J]. J of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 25(3): 301-308.
- [6] HELLER D N, NGOH M A, DONOGHUE D, et al. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography- tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatogr, B, 2002, 774(1-2): 39-52.
- [7] MOATS W A, ROMANOWSKI R D. Multiresidue determination of  $\beta$  lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean up[J]. J Chromatogr, A, 1998, 812(1-2): 237-247.
- [8] 林海丹, 谢守新, 冯德雄, 等. 动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取- 高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2003, 22(1): 94-96.
- [9] 王建华, 林黎明, 陈长法. 鸡肉中多种磺胺兽药残留量测定的高效液相色谱- 电化学检测法[J]. 分析测试学报, 2002, 21(4): 79-81.

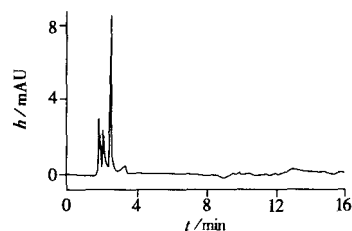


图 2 空白样品色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank sample

(上接第 95 页)

由于汞的甲基化是在微生物的作用下完成的, 而甲基汞具有强烈的亲脂性, 易与蛋白质、氨基酸作用, 极易被鱼类吸收, 并通过食物链逐级富集与迁移。因此, 当人体长期摄入大量受汞污染的鱼类时, 将间接受到汞的毒害<sup>[3, 5]</sup>。实验结果亦证实长期食用大量鱼类后人发中汞的含量与对照组比较有显著提高。

### 参考文献:

- [1] ALLOWAY B J, AYRES D C. Chemical principles of environmental pollution[M]. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1993. 162.
- [2] LOBINSKI R, MARCZENKO Z. Wilson and Wilson's comprehensive analytical chemistry[M]. Amsterdam: Elsevier, 1996(30): 517.
- [3] COSTLEY C T, MOSSOP K F, DEAN J R, et al. Determination of mercury in environmental and biological samples using pyrolysis atomic absorption spectrometry with gold amalgamation[J]. Anal Chim Acta, 2000, 405: 179-180.
- [4] WU X H, SUN D H, ZHUANG Z X, et al. Analysis and leaching characteristics of mercury and arsenic in Chinese medicinal material[J]. Anal Chim Acta, 2002, 453: 317.
- [5] BUZINA R, STEGNAR P, BUZINA- SUBOTICANEE K, et al. Dietary mercury intake and human exposure in an Adriatic population[J]. The Science of the Total Environment, 1995, 170: 199-208.