

# 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

林海丹<sup>1</sup>, 谢守新<sup>1</sup>, 冯德雄<sup>2</sup>, 杨培慧<sup>2</sup>

(1. 广州出入境检验检疫局 食品实验室, 广东 广州 510623; 2. 暨南大学 化学系, 广东 广州 510632)

**摘要:** 研究了动物源性食品中磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹 啉药物残留的提取、净化和高效液相色谱分析条件, 建立了高效液相色谱法同时测定动物源性食品中磺胺类药物残留的方法, 该法检出限为  $0.010 \times 10^{-6} \sim 0.020 \times 10^{-6}$  (w), 添加回收率为 71% ~ 83%。

**关键词:** 固相萃取; 高效液相色谱法; 磺胺; 动物源性食品; 残留物分析

中图分类号: R155.55; R978.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2003)01-0094-03

磺胺类药物是一类广泛使用的预防性和刺激动物生长的抗菌药。磺胺类药物有过敏、引起排尿和造血紊乱等副反应。磺胺二甲嘧啶还可能使小鼠致癌<sup>[1]</sup>。为了消费者健康, 必须监控各种动物源性食品药物残留, 为此需要可靠的分析方法来监测这些药物残留。

作者对高效液相色谱法同时测定动物源性食品中磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹 啉的残留方法进行了研究, 应用液-液分配的经典样品处理方法结合固相萃取技术建立了合适的样品提取、净化、浓缩的前处理方法, 确保高效液相色谱分析测定时无样品基质干扰; 并对高效液相色谱条件进行优化, 建立了最佳色谱条件。该法简便、准确, 回收率和检出限令人满意。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

Waters 高效液相色谱仪: 510 泵, 490E 紫外检测器, 717 自动进样器, Waters Temperature Control Module 柱温箱, Millennium<sup>32</sup> 色谱数据系统; ZYMARK 水浴氮气吹干仪(配有 200 mL 浓缩瓶); IKA<sup>®</sup> IL TRA TURRAX T18basic 匀质机。

### 1.2 试剂

磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹 啉均为从 Sigma 公司购置的对照品。实验用水为去离子蒸馏水; 乙酸(优级纯); 甲醇(色谱纯); 二氯甲烷、正己烷、无水硫酸钠(分析纯); Waters Oasis<sup>®</sup> HLB(3 mL/60 mg) 固相萃取柱。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 校准曲线绘制** 准确称取各磺胺对照品于容量瓶中, 以甲醇定容作为标准贮备液, 吸取各标准贮备液, 以甲醇稀释至质量浓度为 0~18 mg/L 的标准系列, 各取 20  $\mu$ L 进样分析, 据峰面积与相应质量浓度进行线性回归, 绘制校准曲线。

**1.3.2 样品处理** 称取 10 g 已灼烧的无水硫酸钠、5.0 g 匀浆动物组织样品于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 二氯甲烷, 匀质提取 1 min, 4 000 r/min 离心 2 min, 上清液经 10 g 已灼烧的无水硫酸钠脱水过滤到 200 mL 氮气吹干浓缩瓶中, 残渣用 25 mL 二氯甲烷重复提取一次, 合并二氯甲烷, 35  $^{\circ}$ C 水浴氮气吹干, 用 1 mL 流动相溶解残渣, 涡旋混匀, 加 3 mL 正己烷, 涡旋混匀, 静置分层, 弃去上层正己烷层, 加入 3 mL 正己烷重复操作一次, 下层加水稀释至 5 mL 注入已预先用 3 mL 甲醇、3 mL 水处理的 Waters Oasis<sup>®</sup> HLB 固相萃取柱, 再先后用 2 mL 水和 2 mL 7.5% ( $\phi$ ) 甲醇淋洗, 最后用 5.0 mL 甲醇洗脱, 35  $^{\circ}$ C 水浴氮气吹扫浓缩至 1.0 mL, 过 0.45  $\mu$ m 滤膜供高效液相色谱分析。

**1.3.3 色谱条件** 色谱柱: Hypersil C<sub>18</sub> 柱, 250 mm  $\times$  4.6 mm (id); 流动相: 甲醇-1% ( $\phi$ ) 乙酸(体积比 35:65); 流速: 1.0 mL/min; 检测器: 紫外检测器; 检测波长: 265 nm; 柱温: 35  $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ L。

收稿日期: 2002-03-02; 修回日期: 2002-09-25

作者简介: 林海丹(1970-), 女, 广东汕尾人, 工程师, 在职硕士研究生。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相 利用甲醇、乙腈、水、磷酸盐缓冲溶液等液相色谱分析常用溶剂, 采用不同配比的多溶剂体系进行一系列预试验, 结果表明磺胺噻啉组分出峰慢且有拖尾现象, 表明这些溶剂体系不适合采用。考虑到磺胺类结构式中带氨基, 有弱碱性, 其中性分子和其离子形式在有机相和水相中分配性质不同, 因此在键合相反相液相色谱的情况下, 以含水相为流动相时, 调节含水相的 pH 值抑制弱碱的离解将导致保留行为的改变。弱碱的保留值随含水流动相 pH 值的降低而减少。所以考虑添加 1% (v/v) 乙酸为流动相, 以改善磺胺噻啉保留值和峰形。选择甲醇增加流动相溶剂强度, 以甲醇-1% (v/v) 乙酸二元梯度进行不同比例洗脱试验, 表明甲醇与 1% (v/v) 乙酸最佳比例为体积比 35:65。4 种组分分离效果和峰形好 (见图 1)。

2.1.2 检测波长 综合考虑 4 种分析物的吸收光谱, 选择最佳波长为 265 nm。

### 2.2 样品预处理

2.2.1 提取溶剂的选择 动物组织中磺胺类药物残留的检测常用溶剂有乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷。乙腈沸点高, 而磺胺类药物耐热性差, 浓缩温度低于 35 °C, 故乙腈提取液浓缩耗时较长。乙酸乙酯提取浸出杂质多, 且过 HLB 固相萃取柱后仍有基质干扰。试验表明二氯甲烷提取浸出杂质少且易排除基质干扰, 效果理想。

2.2.2 脱除类脂物方法的选择 样品用二氯甲烷提取, 由于二氯甲烷属中等极性溶剂, 有可能提取出类脂物, 因此提取浓缩后需脱类脂物。我们采用甲醇-正己烷液液萃取脱脂。甲醇与正己烷有一些互溶性, 会产生轻度乳化, 考虑加水以增加甲醇相密度, 避免乳化现象, 兼顾到磺胺类药物的弱碱性, 其在酸性溶液中溶解度大, 因此最后采用甲醇-乙酸-正己烷液液萃取脱脂, 直接以 1 mL 流动相(含乙酸、甲醇)定容残渣, 各加 3 mL 正己烷萃取脱脂 2 次, 这种微量脱脂法耗试剂少, 且避免分液漏斗转移时分析物的损失。

2.2.3 固相萃取柱的选择 单纯的液液萃取很难确保色谱分析时不出现基质干扰。我们选择普通 C<sub>18</sub> 固相萃取柱, 净化效果不理想, 可能是普通 C<sub>18</sub> 固相萃取柱不尽人意的硅羟基活性。经筛选改用 Waters Oasis® HLB 固相萃取柱(二乙烯基苯-*N*-乙基吡咯烷酮共聚物)进行试验。结果除杂质效果好, 回收率高且重现性佳。

2.2.4 固相萃取净化液的选择 以不同配比甲醇-水清洗, 实验表明 7.5% (v/v) 甲醇水溶液洗脱得分析物过柱回收率大于 95%, 10% (v/v) 甲醇水溶液洗脱回收率小于 95%, 20% (v/v) 甲醇水溶液洗脱时回收率小于 85%, 结果采用 7.5% (v/v) 甲醇水作为固相萃取的净化溶剂, 回收率和除杂质理想。

### 2.3 标准色谱图和样品加标色谱图

按照以上测定方法得到 4 种磺胺类药物的标准色谱图和样品加标色谱图 (见图 1、图 2)。图中峰 1、2、3、4、分别为磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺噻啉。

### 2.4 方法线性范围

4 种磺胺组分质量浓度在 0~18 mg/L 内线性显著。峰面积( $Y, \mu V \cdot s$ )与其质量浓度( $X, mg/L$ )线性方程、相关系数见表 1。

### 2.5 检出限

在高效液相色谱条件下, 将标准溶液进行连续稀释后进样, 据 2 倍噪音的峰高响应值和方法回收率得检出限。磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶检出限为

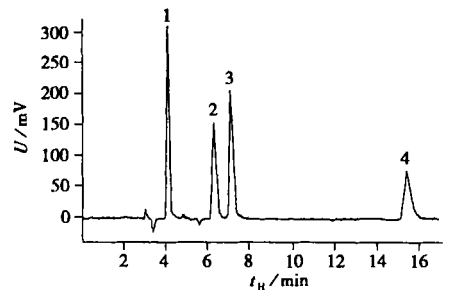


图 1 对照品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of reference sample

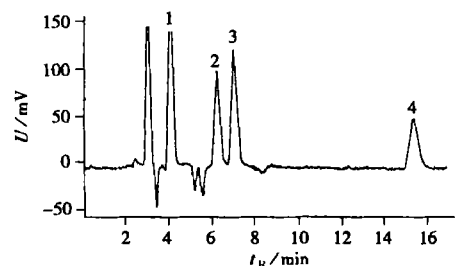


图 2 样品加标色谱图

Fig. 2 Chromatogram of spiked sample

$0.010 \times 10^{-6}$  ( $w$ ); 磺胺喹 啉检出限为  $0.020 \times 10^{-6}$  ( $w$ )。

表 1 校准曲线的线性方程与相关系数

Table 1 Linear equations, correlation coefficients for the correlation curves

| Compound                    | Linear equation                             | Correlation coefficient |
|-----------------------------|---|-------------------------|
| Sulfadiazine(磺胺嘧啶)          | $Y = 1.03 \times 10^4 X + 1.83 \times 10^4$ | 0.999 4                 |
| Sulfadimidine(磺胺二甲嘧啶)       | $Y = 7.28 \times 10^4 X + 1.34 \times 10^4$ | 0.999 4                 |
| Sulfamonomethoxine(磺胺间甲氧嘧啶) | $Y = 8.53 \times 10^4 X + 1.46 \times 10^3$ | 0.999 4                 |
| Sulfaquinoxaline(磺胺喹 啉)     | $Y = 6.85 \times 10^4 X + 6.28 \times 10^3$ | 0.999 4                 |

## 2.6 方法准确度

在虾肉样品(湛江)中分别添加一定量磺胺类标准,测定回收率,重复测定 5 次,计算平均回收率,结果见表 2。

表 2 样品加标平均回收率( $n=5$ )

Table 2 Average recovery of standard additions( $n=5$ )

| Compound                    | Added amount<br>$w / 10^{-6}$ | Average recovery | RSD       |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------|-----------|
|                             |                               | $\bar{R} / \%$   | $s. / \%$ |
| Sulfadiazine(磺胺嘧啶)          | 0.05                          | 72               | 7.0       |
| Sulfadimidine(磺胺二甲嘧啶)       | 0.05                          | 83               | 5.7       |
| Sulfamonomethoxine(磺胺间甲氧嘧啶) | 0.05                          | 80               | 6.6       |
| Sulfaquinoxaline(磺胺喹 啉)     | 0.05                          | 71               | 12        |

## 3 结 论

作者研究了高效液相色谱测定动物源性食品中磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶和磺胺喹 啉药物残留的提取、净化和分析条件,应用液-液萃取的经典样品处理方法结合固相萃取建立了合适的样品提取、净化、浓缩的前处理方法,并对高效液相色谱条件进行优化,建立了最佳色谱条件,可同时测定动物源性食品中上述 4 种磺胺类药物残留量。方法简便、准确,适用于该类兽药残留监控。

参考文献:

- [1] 特奈普西得. 动物源性食品中药物残留分析方法[M]. 于 竞, 王进喜, 白 宏, 等译. 天津: 科技翻译出版公司, 1991. 404.

## Determination of Sulfonamides Veterinary Drugs Residues in Food of Animal Origin by SPE- HPLC

LIN Hai\_dan<sup>1</sup>, XIE Shou\_xin<sup>1</sup>, FENG De\_xiong<sup>2</sup>, YANG Pei\_hui<sup>2</sup>

(1. Guangzhou Entry- Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China;

2. Department of Chemistry, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** A method for the simultaneous determination of sulfonamides veterinary drugs residues in food of animal origin, including sulfadiazine, sulfamonomethoxine, sulfaquinoxaline and sulfadimidine, was established by HPLC in a column of Hypersil C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm) with a mobile phase consisting of 1% acetic acid- methanol (65: 35 by volume). The drugs in homogenized tissue samples were abstracted by dichloromethane extraction coupled with solid phase extraction of HLB column. The chromatographic conditions were optimized. The detection limits of  $0.010 \times 10^{-6}$  ~  $0.020 \times 10^{-6}$  ( $w$ ) and recoveries of 71% ~ 83% were obtained for the method.

**Key words:** Solid phase extraction; HPLC; Sulfonamides; Food of animal origin; Residue analysis