

繁琐,消化时间长,不利于大批样品的处理,取样量也比较少;干灰化避免了样品在加温的情况下与玻璃仪器接触而引入污染,操作比较简单,能批量处理样品,增加取样量,提高检出率,但高温时容易造成硼的挥发损失,可能使回收率偏低,可通过加入碱性助灰剂,如 Na_2CO_3 、 MgCO_3 、饱和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 避免待测组分在干灰化时以硼酸形式挥发损失。微波消解法使用塑料消化罐,消化温度低,能很好地解决硼的挥发损失及来源于玻璃器皿中硼的污染问题,但需要专门设备,处理样品量少;本文综合考虑采用的化学改进剂选用饱和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 为助灰剂,对样品进行干灰化处理,并对干灰化和微波消解法进行了比较研究,两种方法的测定结果无显著差异(见表 4)。

3 结论

样品经干灰化或微波消解后,采用全热解石墨管联合 2 ml 硝酸钙(10 mg/ml)-硝酸铵(20 mg/ml)-柠檬酸(20 mg/ml)化学改进剂测定黄豆及其制品中的硼,克服了常规原子吸收对硼检测灵敏度低和干扰严重的问题。建立的方法操作简便易行,重现性、灵敏度和准确性能满足分析要求,适用

于黄豆及腐竹中硼含量的测定。

参考文献

- [1] 邢小茹,魏复盛,吴国平,等. 人体硼暴露及其代谢的研究进展[J]. 安全与环境学报, 2006, 6(1): 131-135.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21918—2008 食品中硼酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [3] BURGUERA M, BURGUERA J L, RONDON C, et al. Determination of boron in blood, urine and bone by electrothermal atomic absorption spectrometry using zirconium and citric acid as modifiers[J]. Spectrochim Acta Part B, 2001, 56: 1845-1857.
- [4] 张金彪,王玉璇. 石墨炉原子吸收法测定植物样品中硼的研究[J]. 分析试验室, 1996, 15(1): 37-39.
- [5] 陆建军,龚琦. 平台石墨炉原子吸收分光光度法测定柑桔中的硼[J]. 分析仪器, 2007, 29(4): 39-41.
- [6] 陆建军,韦小玲,黄玉龙,等. 石墨炉原子吸收法测定柑桔园土壤中有效硼[J]. 广西大学学报:自然科学版, 2004, 29(4): 279-281.
- [7] 邓勃. 原子吸收光谱分析的原理、技术和应用[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004: 139-147.
- [8] 崔晞,邵丽华. 原子吸收分光光度法[M]//邹学贤. 分析化学. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 236-237.

实验技术与方法

基质固相分散-高效液相色谱法测定蜂蜜中 10 种磺胺类药物

余辉菊¹, 杨晓松¹, 杨胜利²

(1. 成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610041;

2. 成都市武侯区疾病预防控制中心, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立基质固相分散-高效液相色谱法测定蜂蜜中 10 种磺胺类药物残留量的方法,包括磺胺、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯噻嗪、磺胺甲 噻和磺胺二甲异 噻。方法 蜂蜜样品与 C_{18} 固相吸附剂于玻璃研钵中研磨均匀,得半干状混合物,装入空的固相萃取管中,盖上一层滤纸,以 1+3 二氯甲烷-乙酸乙酯(V/V)为洗脱剂洗脱,洗脱液经氮气吹干,用流动相溶解残渣,经 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤,Agilent TC- C_{18} (4.6 mm×250 mm, $5\ \mu\text{m}$) 色谱柱分离,高效液相色谱法测定。结果 10 种磺胺类药物的线性范围为 0.10~10.00 mg/L,相关系数 $r>0.999$,样品加标回收率 60.0%~109.3%,相对标准偏差小于 10%,方法检出限 0.016~0.025 mg/L,样品中磺胺类检出限为 0.050~0.079 mg/kg。

关键词: 高效液相色谱; 基质固相分散; 蜂蜜; 磺胺

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)02-0147-04

收稿日期: 2010-06-20

基金项目: 成都市卫生局重大医学联合攻关项目(080808); 成都市疾病预防控制中心重点科研项目(080102)

作者简介: 余辉菊 女 副主任技师 研究方向为卫生理化检验及研究 E-mail: yuejdc@163.com

Determination of ten sulfonamide residues in honey with matrix solid phase dispersion-high performance liquid chromatography

Yu Huiju, Yang Xiaosong, Yang Shengli

(Chengdu Center for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of 10 sulfonamides in honey, including sulfanilamide, sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfameter, sulfamonomethoxine, sulfachloropyridazine, sulfamethoxazole and sulfisoxazole, with matrix solid phase dispersion and high performance liquid chromatography.

Methods Honey sample was grinded and well-distributed with a solid-phase sorbent C_{18} in a glass mortar to form a semi-solid mixture. The mixture was packed as a solid phase extraction (SPE) cartridge, covered with a piece of paper on the top of the mixture to produce a sample/column material; and then eluted with 20ml 1 + 3 methylene-ethyl acetate (V/V). The eluted materials were collected and evaporated to dry at 40 °C by nitrogen gas. The residues were dissolved in 0.5ml of mobile phase solvent and passed through a 0.45 μm filter membrane, and then were separated by an Agilent TC- C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) and determined by HPLC. **Results** The linear ranges of 10 sulfonamides were 0.10-10.00 mg/L, $r > 0.999$. The recovery ranges were 60.0% -109.3% and $RSD < 10\%$. The detection limits were 0.016-0.025 mg/L and the quantification limits were 0.050-0.079 mg/kg.

Key words: High performance liquid chromatography (HPLC); matrix solid phase dispersion (MSPD); honey; sulfonamides

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是对具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称,是一类广谱抗菌药,具有疗效确切、性质稳定、使用简便、价格便宜、便于长期保存等优点。磺胺等药物常用于预防和治疗蜜蜂幼虫病,因而可能残留在蜂蜜中。

基质固相分散技术(matrix solid phase dispersion, MSPD)自1989年由Barker等^[1]首先提出,用于提取、净化食品样品中天然组分、添加剂、药物残留等。2007年Barker等^[2]对该技术的应用进行了较为详尽的综述。至今该技术在肉类食品兽药残留中应用越来越多^[3-7]。

本文建立了一种基质固相分散-高效液相色谱法同时测定蜂蜜中10种磺胺类药物的方法。针对蜂蜜含糖量高、粘稠度大的特点以及10种磺胺类药物的溶解性、极性、性质不同,对基质固相分散的固相吸附剂的种类、洗脱剂的种类及体积等影响提取效率和净化效果的因素进行研究,并对色谱分析条件进行优化。由于采用了二氯甲烷-乙酸乙酯混合溶剂对磺胺组分进行洗脱,蜂蜜样品中大多数极性较大的干扰物质被保留于基质中,从而与待测组分较好地分离。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100型高效液相色谱仪、氮吹仪、涡旋混匀器、固相萃取系统、6 ml带筛板固相萃取空管(Agilent公司)。

C_{18} (粒径45~75 μm ,美国Supelco公司)。甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯均为色谱纯,乙酸为分析纯,购自Fisher公司。

磺胺标准品:磺胺、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲噻唑、磺胺二甲异噻唑,含量>99%,购自Sigma公司。

磺胺标准储备液配制:准确称取上述各种磺胺标准品0.0250 g,分别用甲醇溶解并定容至25 ml,该储备液浓度为1000 mg/L,4 °C保存。

磺胺混合标准溶液配制:临用时,分别取上述磺胺标准储备液,用7+3甲醇-水稀释成50 mg/L混合标准应用溶液。

1.2 色谱条件

色谱柱 Agilent TC- C_{18} 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm);色谱柱温度 35 °C;检测器 VWD 检测器,检测波长 265 nm;流动相(25+75)乙腈-0.2%乙酸水溶液,流速 1.0 ml/min,等度洗脱;进样体积 10 μl 。

组分保留时间及光谱图定性,峰面积定量。

1.3 标准曲线

用甲醇-水(7+3)配成浓度为0.10、0.30、0.50、1.00、3.00、5.00、10.00 mg/L的磺胺混合标准溶液,过0.45 μm 微孔滤膜,作HPLC分析。

1.4 样品前处理

准确称取0.5 g蜂蜜样品和2 g C_{18} 填料于玻璃研钵中,用玻璃杵研磨约5 min,使样品均匀分散于填料中,将该混合物装入6 ml带筛板的固相萃取空

管中,盖上一层滤纸,轻轻压紧,连接在固相萃取装置上,用 20 ml 二氯甲烷-乙酸乙酯(1+3)(V/V)洗脱,控制流速约为 60 滴/min,收集洗脱液,于 40 °C 下氮气吹干。用 0.5 ml 流动相溶解,涡旋混匀 3 min,过 0.45 μm 微孔滤膜,滤液供色谱分析。

2 结果与分析

2.1 MSPD 固相吸附剂的选择

本试验分别用酸性氧化铝(100~200目、200~300目)、中性氧化铝(100~200目、200~300目)、碱性氧化铝(100~200目、200~300目)、硅酸镁、C₁₈作为固体吸附剂,依次编号为 1~8。用甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯洗脱,对吸附剂进行初筛,观察洗脱液澄清状况。当吸附剂为 6、7、8 时,洗脱液澄清效果较好,结果见表 1。

表 1 不同固相吸附剂和洗脱剂的洗脱液澄清状况

Table 1 The clarification of eluent with different solid-phase sorbents and eluting solvents

吸附剂	洗脱液澄清状况			
	甲醇	乙腈	二氯甲烷	乙酸乙酯
1	-	-	+	±
2	-	-	±	±
3	-	+	+	±
4	±	±	+	+
5	±	±	+	±
6	+	±	+	+
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+

注: + 澄清, - 混浊, ± 介于澄清和混浊之间。

继续对 6、7、8 固相吸附剂再试验,样品中添加磺胺混合标准浓度为 5.0 mg/L。分别用 10 ml 甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯洗脱,结果当固相吸附剂为 C₁₈,各组分单次洗脱的回收率均 > 39%,其他组合方式各组分回收率均低至 16%,本试验选用 C₁₈为固相吸附剂。

2.2 混合洗脱液优化试验

若采用单一组分洗脱液,各组分因存在溶解性、极性的差异,回收率不理想。以选定的 C₁₈为固相吸附剂,用 10 ml 1+0、2+1、1+1、1+2、1+3、0+1 的二氯甲烷-乙酸乙酯(V/V)为洗脱液。当单独使用二氯甲烷或乙酸乙酯作洗脱液时回收率分别为 30.7% 和 37.1%,以二氯甲烷-乙酸乙酯(1+3)(V/V)为洗脱液的洗脱效果最好,回收率 > 68%,结果见图 1。

2.3 洗脱液用量试验

分别用 10、20、30、40 ml 二氯甲烷-乙酸乙酯(1+3)(V/V)作洗脱液,当洗脱液用量由 10 ml 增加到 20 ml 时,总回收率明显提高;继续增加洗脱液

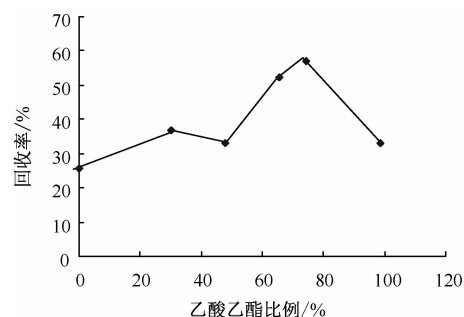


图 1 洗脱液比例-回收率

Figure 1 The percentage of ethyl acetate in eluting solvent and the extraction efficiency

的用量,回收率不再明显提高,同时增加了氮吹浓缩的时间,故选择洗脱液的用量为 20 ml,结果见图 2。

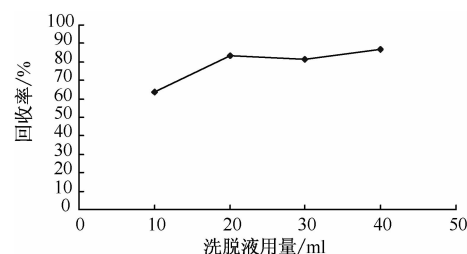


图 2 洗脱液用量-回收率

Figure 2 The volume of eluting solvent and the extraction efficiency

2.4 色谱柱的选择

比较了 Agilent Eclipse XDB-C₈(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); Hypersil ODS(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)、Agilent TC-C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 3 种色谱柱对各组分分离效果,结果 Agilent TC-C₁₈柱对 10 种磺胺分离效果最好,出峰时间在 13min 内,且组分与杂质之间、各组分之间均分离良好。

2.5 流动相的选择

比较了不同比例的甲醇或乙腈与乙酸水溶液配比作为流相对 10 种磺胺类药物的色谱分离效果,并分别对乙酸浓度进行了优化。当用乙腈-0.2% 乙酸水溶液(25+75)为流动相时,10 种磺胺类药物得到基线分离,并且无拖尾现象。

2.6 检测波长的确定

分析 10 种磺胺标准的光谱图,其最大吸收波长在 260 nm 到 275 nm 之间,综合考虑各组分色谱峰的最佳信号,选择 265 nm 为检测波长。

2.7 柱温和流速

试验设定色谱柱温度为 35 °C,能得到较好的标准色谱图,10 种磺胺类在 20 min 内完全出峰。综合考虑色谱柱对目标分析物的分离效果、分析时间、最大柱压和色谱柱寿命,选择流速为 1.0 ml/min。

2.8 线性范围、检出限

按 1.3 标准曲线绘制方法,重复 6 次试验,各组分在 0.10 ~ 10.00 mg/L 范围内呈良好线性关系, $r > 0.999$, 见图 3。以 $S/N = 3:1$ 计算仪器方法的检出限 0.016 ~ 0.025 mg/L, 以 $S/N = 10:1$ 计算样品中检出限为 0.050 ~ 0.079 mg/kg。

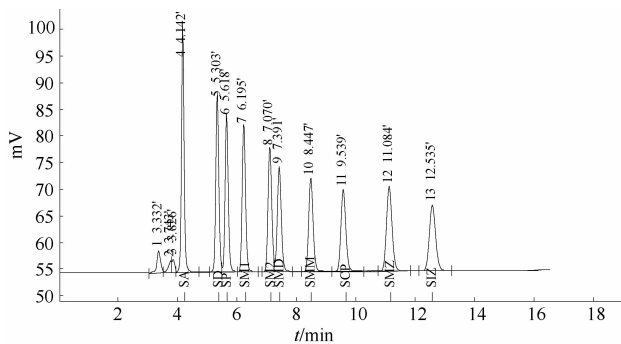


图 3 10 种磺胺标准色谱图

Figure 3 Chromatogram of ten sulfonamide standards

2.9 回收率和精密度

准确称取 4 份蜂蜜样品,一份作为空白,另外 3 份分别加入浓度为 0.1、0.5、1.0 mg/L 的磺胺混合标准溶液,重复 6 次试验,见图 4。根据 6 次平行实验的结果计算回收率及相对标准偏差,10 种磺胺类药物平均回收率在 60.0% 到 109.3% 之间,相对标准偏差 $< 10\%$ 。结果见表 2。

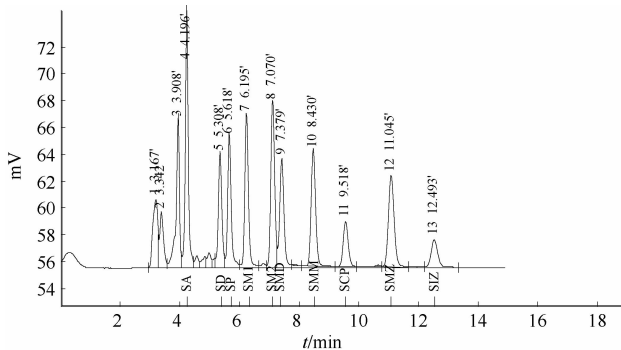


图 4 蜂蜜样品加标色谱图

Figure 4 Chromatograms of ten standard sulfonamides in honey

2.10 样品的测定

用本方法对 8 份蜂蜜样品进行检测,其中 1 份散装蜂蜜样品检测出磺胺残留量为 1.03 mg/kg,其余样品 10 种磺胺类药物均低于样品检出限。

表 2 样品加标回收率及相对标准偏差

Table 2 The recovery of ten sulfonamides added in honey and relative standard deviation (%)

组分	平均回收率	相对标准偏差
磺胺	93.7	7.90
磺胺嘧啶	60.0	5.16
磺胺吡啶	75.4	4.74
磺胺甲基嘧啶	83.8	9.75
磺胺二甲基嘧啶	109.3	4.60
磺胺甲氧嘧啶	83.7	7.52
磺胺间甲氧嘧啶	99.4	3.85
磺胺氯哒嗪	64.5	4.36
磺胺甲 唑	87.5	6.55
磺胺二甲异 唑	74.0	4.97

3 结论

基质固相分散-高效液相色谱法同时测定蜂蜜中 10 种磺胺类药物,对蜂蜜含糖量高、粘稠度大的特点,与传统的蜂蜜中磺胺类药物固相萃取法相比,无需溶解、过阳离子柱及 SPE 小柱等步骤,节约了处理时间,减少了有机溶剂的使用。本试验前处理方法具有操作简便,提取效率高,分析速度快,有机试剂用量少等优点,对蜂蜜中磺胺类药物残留的初筛具有一定的实用意义。由于紫外检测器的灵敏度所限,进一步的研究还需将基质固相分散技术与 LC/MS/MS 相结合使用,以便于磺胺类药物的准确性与定量。

参考文献

[1] BARKER S A, LONG A R, SHORT C R. Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion [J]. Chromatogr, 1989,475:353-361.

[2] BARKER S A. Matrix solid phase dispersion (MSPD) [J]. Biochem Biophys Methods, 2007, 70:151-162.

[3] 乌日娜,李建科. 基质固相分散在食品安全分析中的应用 [J]. 食品科学,2005,26(6):266-268.

[4] 张素霞,李俊锁,钱传范. 猪肌肉组织中磺胺类药物的 MSPD 净化和 HPLC 测定 [J]. 畜牧兽医报,1999,30 (6):531-535.

[5] 耿志明,李鹏,陈明,等. 基质固相分散-高效液相色谱法测定鱼肉中磺胺类药物残留 [J]. 江苏农业学报,2006,22(3):310-312.

[6] 方炳虎,何绮霞,邹滩力,等. 牛奶中 12 种磺胺类药物残留的高效液相色谱测定方法 [J]. 分析测试学报, 2007,26(4):519-522.

[7] 赵海香,邓维,尚艳芬,等. 基于低毒溶剂的 MSPD/HPLC 法同时测定鱼肉中 8 种磺胺类药物残留 [J]. 食品科学分析检测, 2009,30(4):178-181.