

分散液相微萃取-高效液相色谱法测定 蜂蜜中的磺胺类抗生素

包锦渊 迟晓峰^a 董琦^a 胡凤祖^{①a}

(青海民族大学化学与生命科学学院 西宁市八一中路 72 号 810000)

^a(中国科学院西北高原生物研究所 西宁市新宁路 23 号 810008)

摘要 应用分散液相微萃取(DLLME)技术,建立了蜂蜜中磺胺类抗生素的高效液相色谱分析方法。考察了萃取剂、分散剂、萃取剂体积、分散剂体积、时间、盐度和 pH 等因素对分散液相微萃取的影响,并确定了最佳萃取条件为:40 μ L 1, 1, 2, 2-四氯乙烷(萃取剂)和 1mL 乙腈(分散剂),混匀后,加入水样,离心 2min,吸取 5 μ L 沉积相,进行 HPLC 分析。应用本方法对 3 批蜂蜜样品进行了测定,取得了良好的效果。

关键词 分散液相微萃取; 高效液相色谱; 磺胺; 蜂蜜

中图分类号: O657.7²

文献标识码: B

文章编号: 1004-8138(2012)03-1934-04

1 引言

磺胺类抗生素被广泛的在兽医中用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物。而磺胺类药物在食品生产中的广泛应用,其残留引起了各方面的注意,欧盟,日本等国家都制定了严格的标准,其在食品中的最大残留量不得高于 0.1ppm^[1]。在蜂蜜的生产过程中,蜜蜂幼虫极易被幼虫芽孢杆菌感染从而影响蜂蜜的产量^[2]。磺胺类药物因其低廉的价格、有效的抑菌效果被广泛的应用,因而对蜂蜜中磺胺类药物的残留显得尤为重要。本文采用分散液相微萃取技术结合高效液相色谱法,对蜂蜜中的 3 种磺胺类药物进行了分析测定,该方法简便易行、富集倍数、回收率令人满意。能够满足测定蜂蜜中的磺胺类抗生素的残留。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Waters 515 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有二元梯度泵, Waters 2996 型紫外检测器,EMPOWER 型色谱工作站。

磺胺(批号: 10024-8702)、磺胺二甲基嘧啶(批号: 100411-200501)、磺胺甲恶唑(批号: 100025-199503)纯度均大于 98%,购自中国药品质量检验所; 1, 2-二氯乙烷、1, 1, 2, 2-四氯乙烷、四氯化碳、三氯甲烷、二氯甲烷、丙酮均为分析纯; 乙腈、甲醇均为色谱纯。实验室用水为去离子水。

2.2 色谱条件

LiChrospher C₁₈ 柱(4.6mm \times 250mm, 5 μ m, 美国 Merck 公司); 流动相: A 乙腈与 B 0.05% H₃PO₄ 水溶液进行梯度洗脱, 0—5min, 15% A; 5—10min 15%—25% A; 10—14min 25%—35%

① 联系人, 电话: (0971) 6132750; E-mail: hufz@nwnipb.ac.cn

作者简介: 包锦渊(1963—), 男, 西宁市人, 教授, 主要从事植物化学研究工作。

收稿日期: 2012-02-15; 接受日期: 2012-03-23

A。紫外检测波长: 260nm; 流速: 1mL/min; 进样量 10 μ L, 柱温: 30 $^{\circ}$ C。标准品色谱图见图 1。

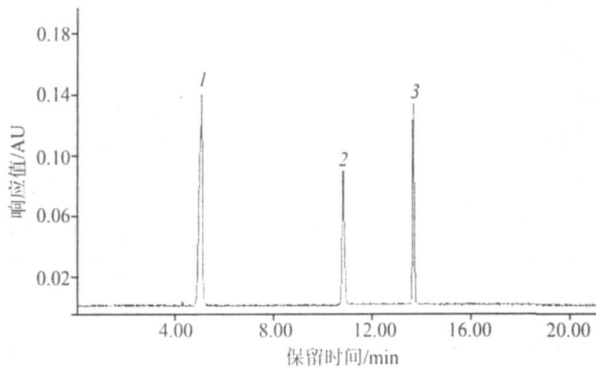


图 1 标准品色谱图

1——磺胺; 2——磺胺二甲基嘧啶; 3——磺胺甲恶唑。

2.3 样品前处理过程

将 5mL 蜂蜜的水溶液放入 10mL 的离心管中加入 1mL 的乙腈作为分散剂, 然后加入 40 μ L 的 C₂H₂Cl₄ 于漩涡振荡器上涡旋 1min, 使其充分混匀, 形成均一乳浊液。然后以 4000r/min 离心 2min, 萃取剂沉积在离心管底部, 用微量进样器吸取 5 μ L 下相, 进行 HPLC 分析。

3 结果与讨论

3.1 萃取剂与分散剂的选择

萃取剂的选择对萃取效率以及富集倍数起着重要的作用, 萃取剂一般要具备以下特征: (1) 密度比水大; (2) 对待测物有较好的萃取效果; (3) 水中溶解度小; (4) 能形成稳定的两相系统^[3]。根据这些特性本实验中按 2.3 项下步骤选择考察了 CH₂Cl₂ (1.32g · mL⁻¹)、CHCl₃ (1.47g · mL⁻¹)、CCl₄ (1.59g · mL⁻¹)、C₂H₄Cl₂ (1.25g · mL⁻¹) 和 C₂H₂Cl₄ (1.54g · mL⁻¹) 5 种萃取剂的效果。实验结果表明, 当用 CH₂Cl₂ 和 C₂H₄Cl₂ 作为萃取剂时, 不能形成两相系统, 这可能与这两者密度较小以及其较大的溶解性有关; 采用 CCl₄ 萃取时色谱上并未检测到磺胺类, 这可能与其较小的极性有关。采用 CHCl₃ 作为萃取剂是所形成的两相系统稳定性较差; 采用 C₂H₂Cl₄ 获得了较好的萃取效果, 综上本实验中采用 C₂H₂Cl₄ 作为萃取剂。

分散剂作用是使萃取剂和水样溶液的接触面积最大化, 从而使萃取效率最大化。本实验选用丙酮、乙腈、甲醇作为分散剂对其分散效果进行了考察。实验结果见图 2。从图 2 中可看出, 采用乙腈作为分散剂时 3 种磺胺类药物的富集倍数都较高, 因此本文选用乙腈作为分散剂。

3.2 萃取剂体积的影响

萃取剂体积对萃取过程中的富集倍数影响较大。本实验考察了 C₂H₂Cl₄ 体积 (10、20、30、40、50、60、70 μ L) 对萃取效率及富集倍数的影响。随着 C₂H₂Cl₄ 体积的增长, 萃取效率变化不明显, 而当体积增大到 40 μ L 以后富集倍数急剧下降, 原因是随着萃取剂的加入量的增大使有机相的体积变大, 从而使有机相中的目标物的浓度变小, 从而影响目标物的富集倍数使得方法灵敏度也降低。当萃取

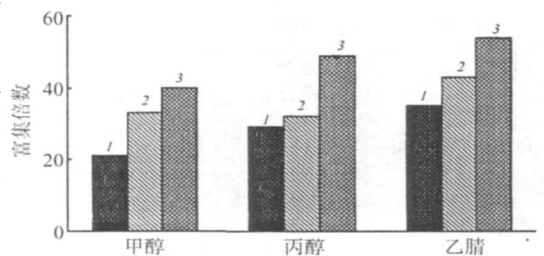


图 2 不同萃取剂对富集倍数的影响

1——磺胺; 2——磺胺二甲基嘧啶; 3——磺胺甲恶唑。

剂体积为 $40\mu\text{L}$ 时, 有机相的体积 $60\mu\text{L}$ 左右, 在这一条件下既可以有较好的萃取效率又有较高的富集倍数, 因此确定萃取剂的体积为 $40\mu\text{L}$ 。

3.3 分散剂体积的影响

分散剂体积是分散液相微萃取中又一个重要影响因素。分散剂体积小的时候会使萃取剂很难在水相中形成均一的乳浊液从而影响萃取效率, 而当分散剂体积较大时则会影响到有机相在水中的溶解性, 因此, 选择合适的分散剂体积显得尤为重要。本实验考察了乙腈不同体积 (0.5 、 1.0 、 1.5 、 2.0mL) 对微萃取的影响。实验结果显示, 萃取效率先随乙腈体积的增加而增加, 在 1.0mL 时达到最大值, 而后又随乙腈体积的增加而减小。因此选择分散剂乙腈体积为 1.0mL 。

3.4 提取时间的影响

提取时间是指分散剂与萃取剂加入到水样中到离心前的一段时间。本实验中选择 2 、 4 、 6 、 8 、 10min 进行考察。实验结果显示提取时间对萃取效率没有明显的影响。说明当萃取剂加入到水相体系中能迅速形成均一的乳浊液, 待测物可以从水相中迅速转移至有机相中, 从而达到两相平衡。本实验选取提取时间为 2min 。

3.5 离子强度与 pH 的影响

本实验中考察了加入不同浓度 NaCl 对萃取效率的影响。实验结果显示当 NaCl 浓度从 2% 增加至 6% 时富集倍数成增加趋势且萃取效率基本不受影响; 但当浓度继续增加时富集倍数则急剧减小。导致这一结果的原因可能是当 NaCl 浓度过高时会使有机相在水相中溶解性降低, 使得有机相体积增大从而影响到富集倍数。鉴于此本实验中确定 NaCl 浓度为 6% 较为适宜。

溶液的 pH 值可能影响磺胺类抗生素的萃取效率, 由于磺胺类药物在酸性或碱性的溶液中有较大的溶解度, 从而导致萃取效率不高, 因此本实验在中性条件下对其进行微萃取。

3.6 样品测定

对市场中购买的 3 批蜂蜜在优化的条件下进行了测定。结果显示 3 批蜂蜜中 3 种磺胺类抗生素均低于检出限。对测定的样品进行了回收率实验, 计算加标回收率和相对标准偏差, 结果见表 2。从表 2 中我们可以看出, 在测定的 3 批蜂蜜中均未检出磺胺, 磺胺二甲基嘧啶和磺胺甲恶唑。方法的回收率在 85.4% — 97.1% 之间, 相对标准偏差小于 6.7% , 方法稳定性较好。

表 2 样品测定结果

检测物质	样品	样品中含量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	加标量 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	测定值 ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
磺胺	枣花蜜	ND ^a	5.000	4.270	85.4	3.5
	槐花蜜	ND	5.000	4.535	90.7	4.2
	野花蜜	ND	5.000	4.360	87.2	6.3
磺胺二甲基嘧啶	枣花蜜	ND	5.000	4.495	89.9	5.4
	槐花蜜	ND	5.000	4.530	90.6	5.9
	野花蜜	ND	5.000	4.670	93.4	6.7
磺胺甲恶唑	枣花蜜	ND	5.000	4.765	95.3	3.8
	槐花蜜	ND	5.000	4.855	97.1	5.1
	野花蜜	ND	5.000	4.835	96.7	4.3

注: a——未检出。

4 结论

本文应用分散液相微萃取技术对 3 批蜂蜜样品进行了测定, 取得了良好的效果。

参考文献

- [1] Thomson C, Sporns P. Direct ELISAs for Sulfathiazole in Milk and Honey with Special Emphasis on Enzyme Conjugate Preparation [J]. *J. Food Sci.*, 1995, **60**(2): 409—415.
- [2] Milne P. Sulphonamides and American Foul Brood Disease of Bees [J]. *Nature.*, 1945, **155**: 335—335.
- [3] Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method [J]. *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**(16): 2342—2357.

Determination of Sulfonamides in honey by DLLME-HPLC

BAO Jin-Yuan CHI Xiao-Feng^a DONG Qi^a HU Feng-Zu^a

(Department of Chemistry and Life Science, Qinghai University for Nationalities, Xining 810000, P. R. China)

^a(Northwest Institute of Plateau Biology of Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, P. R. China)

Abstract The method for analysis of sulfonamides antibiotic in honey by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) combined with high performance liquid chromatography was developed. The effects of parameters such as the extraction solvent, dispersing agent, volume of extraction solvent and dispersing solvent, extraction time, ionic strength and solution pH on dispersion of liquid phase microextraction were investigated, and the optimal extraction conditions were as follows: 1 mL of acetonitrile (as dispersive solvent) and 40 μ L 1, 1, 2, 2-tetrachloroethane (as extraction solution) were rapidly mixed, then centrifuged for 2 min after adding water solution of honey samples, and 5 μ L sedimentary facies was injected to analyze by HPLC. The method is applied to determination of 3 batches honey samples with good effects.

Key words Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; HPLC; Sulfonamides; Honey

作者联系人不得是“挂名”的, 其地址不得省略

作者联系人及其地址不得是“挂名”的、摆设”的, 因为这不仅有作假之嫌, 而且容易造成邮件无人认领和邮件丢失。联系人地址必须正确、真实、详细地写在论文中相应位置, 写在论文外无效。

某作者联系人只告诉了编辑部他单位所在的城市, 未告知街道名称和门牌号数。确实, 他单位是该城市鼎鼎有名的大单位, 所以编辑部发给他的信每次都能收到, 但是后来给他寄样刊时, 印刷品却被退回, 邮局在上盖了个戳: 地址不详, 退! 可见, 虽然你单位大名鼎鼎, 但还并不是邮局人人皆知。“退”! 还是一个好运。因为你遇上一个邮局负责任的人, 他毕竟还要花费人力物力来“退”! 也好让人清楚“退”的缘故。若碰上一个不负责任的, 将邮件丢进了垃圾箱。没有收到邮件, 作者就质问编辑部, 我们冤不冤?

有的作者联系人地址只写上他单位的大名, 好像他在单位是大名鼎鼎、人人皆知的。这种邮件, 单位的收发室, 也通常予以退回, 甚至丢进垃圾箱或集中卖废纸。所以, 请作者联系人勿将你单位的详细地址(县、区、街道名称, 门牌号)和你自己的详细地址(院、部、系、室、组)省略——举手之劳, 何乐不为?

提供的邮寄地址不详和提供的联系人是“挂名”的, 因此而造成的损失, 由提供者自己承担。

《光谱实验室》编辑部