

· 监测技术 ·

# 高效液相色谱法测定鸡蛋清和蛋黄中磺胺类药物残留

吴翠琴, 陈迪云, 黄燕屏, 谢棣君, 邓红梅

(广州大学环境科学与工程学院, 广东 广州 510006)

**摘要:** 采用高效液相色谱法测定鸡蛋清和蛋黄中磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺甲恶唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶琳等 7 种磺胺类药物残留, 优化了色谱条件和样品预处理方法。7 种磺胺类药物在 0.050 mg/L ~ 10.0 mg/L 范围内线性良好, 检出限和定量限分别低于 0.02 mg/kg 和 0.04 mg/kg, 在 0.250 mg/kg 和 0.500 mg/kg 两个添加水平, 蛋清中的回收率为 81.0% ~ 100%, RSD 为 0.8% ~ 4.8%, 蛋黄中的回收率为 72.2% ~ 94.1%, RSD 为 1.1% ~ 6.9%。

**关键词:** 磺胺类药物; 高效液相色谱法; 鸡蛋清; 鸡蛋黄

中图分类号: O657.7<sup>+</sup>2

文献标识码: B

文章编号: 1006-2009(2010)03-0043-03

## Determination of Residual Sulfonamides in Egg White and Yolk by HPLC

WU Cui-qin, CHEN Di-yun, HUANG Yan-ping, XIE Di-jun, DENG Hong-mei

(School of Environmental Science and Engineering, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

**Abstract:** A high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the multi-residues simultaneous determination of sulfadiazine, sulfapyridine, sulfamethazine, sulfamethoxypridazine, sulfamethoxazole, sulfamonomethoxine, sulfaquinolaxine in egg white and yolk was described. The test parameters of HPLC and sample pretreatment were optimized. The results indicated that a good linearity was in range from 0.050 mg/L to 10.0 mg/L. The detection limits and quantity limits were lower than 0.02 mg/kg and 0.04 mg/kg. At levels of 0.250 mg/kg and 0.500 mg/kg, the spiked recoveries of egg white were between 81.0% and 100%, RSDs were between 0.8% and 4.8%; and the spiked recoveries of yolk were between 72.2% and 94.1%, RSDs were between 1.1% and 6.9%.

**Key words:** Sulfonamides; HPLC; Egg white; Yolk

磺胺类药物 (Sulfonamides, SAs) 是一类传统的合成抗菌药物, 因其抗菌谱广和价廉易得等特点, 在国内外兽医临床和畜牧业中广泛应用<sup>[1]</sup>。磺胺类药物毒性较高, 在食品中残留半衰期长, 对人和环境危害显著, 有研究表明磺胺二甲嘧啶等可诱发啮齿类动物甲状腺增生或肿瘤<sup>[2]</sup>。磺胺类药物在养鸡生产中常用于防治白痢、球虫病、盲肠炎、肝炎及其他细菌性疾病, 我国的鸡蛋主要来自小规模鸡蛋场, 由于药物的不规范使用, 极有可能造成鸡蛋兽药残留超标。《无公害食品 鸡蛋》(NY 5039-2001) 中规定鸡蛋中磺胺类药物的最高残留限量 (MRL) 为 0.1 mg/kg<sup>[3]</sup>。鸡肉和鸡蛋中磺胺类药物的检测已见相关报道<sup>[4-7]</sup>, 而鸡蛋清和蛋黄中常用磺胺类药物残留的同时检测方法报道较少。

有研究采用高效液相色谱法测定鸡蛋清和蛋黄中 5 种磺胺类药物残留, 为排除杂质峰干扰, 蛋清和蛋黄需用不同比例的流动相, 样品预处理较为复杂<sup>[8]</sup>。今在相同的色谱条件下测定鸡蛋清和蛋黄中 7 种磺胺类药物残留, 样品预处理方法较为简单, 结果令人满意。

### 1 试验

#### 1.1 主要仪器与试剂

收稿日期: 2009-12-07; 修订日期: 2010-03-05

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (8451009101001037); 国家自然科学基金资助项目 (40803026); 广州大学新苗计划项目; 广州大学引进人才科研启动项目

作者简介: 吴翠琴 (1977—), 女, 福建龙岩人, 讲师, 博士, 主要从事环境监测教学与科研工作。

Agilent 1200 型高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD),美国 Agilent 公司;Laborota 4000 型旋转蒸发仪,德国 Heidolph 公司;SK-1 型快速混匀器,金坛市荣华仪器制造有限公司;SB 3200DT 型超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司;Anke TDL-5-4 型离心机,上海安亭科学仪器厂;0.45  $\mu\text{m}$  滤膜和针式过滤器,安谱公司;玻璃仪器使用前洗净放入马弗炉中,于 440  $^{\circ}\text{C}$  灼烧 4 h。

磺胺嘧啶(SD)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺甲氧嘧啶(SMP)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺甲恶唑(SMZ)、磺胺喹恶啉(SQX)、磺胺吡啶(SP)标准品(>99.9%),购自美国 Sigma 公司;100 mg/L 磺胺单一标准储备液:准确称取 7 种磺胺标准品各 10 mg 于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇溶解后定容,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  避光密封保存,临用时用甲醇配制成混合标准工作液;甲醇(色谱纯),德国 Merck 公司;乙腈(一级色谱纯),天津四友生物医学技术有限公司;其他试剂均为分析纯。

## 1.2 色谱条件

Agilent Extend-C<sub>18</sub> 色谱柱(5  $\mu\text{m}$ , 250 mm  $\times$  4.6 mm);流动相 A 为甲醇, B 为 0.5% 冰乙酸水溶液,采用梯度洗脱, A 相在 15 min 内由 10% 线性增加至 30%, 在 7 min 内继续线性增加至 50%, 再在 1 min 内下降至 20%, 2 min 内下降至 10%, 保持 5 min;流量 1.00 mL/min;检测波长 272 nm;柱温 25  $^{\circ}\text{C}$ ;进样体积 5  $\mu\text{L}$ 。

## 1.3 样品预处理

称取 2.0 g 匀浆的鸡蛋清/蛋黄样品,置于 50 mL 具塞离心管中,加入 2 g 无水硫酸钠,混匀后加入 8 mL 乙腈,于快速混匀器上剧烈漩涡匀质 5 min 后,以 4000 r/min 离心 3 min,上清液倒入鸡心瓶中。向渣中加入 6 mL 乙腈,重复提取一次,合并上清液,于 35  $^{\circ}\text{C}$  水浴旋转蒸发浓缩至近干。用 0.8 mL 初始流动相 [V(甲醇):V(0.5% 冰乙酸水溶液) = 1:9] 溶解蛋黄残渣,加入 3 mL 正己烷,振荡、静置 5 min,用吸管移去正己烷层,加入 3 mL 正己烷重复去脂一次,再用初始流动相定容至 1.00 mL,过 0.45  $\mu\text{m}$  水相滤膜,供液相色谱分析。蛋清无需去脂,直接用初始流动相定容至 1.00 mL,过 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜后供液相色谱分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件优化

#### 2.1.1 流动相的选择

分别考察了甲醇-水溶液、甲醇-乙酸溶液、甲醇-磷酸溶液 3 种流动相体系对 7 种磺胺类药物分离效果的影响。

以甲醇-水二元体系进行不同比例的洗脱试验时,发现 7 种组分的分离效果较差,其中磺胺喹恶啉保留时间过长且峰形差。考虑到磺胺类药物结构中含有氨基,具有弱碱性,其中性分子与离子形式在有机相和水相中分配性质不同,因而在键合相反相液相色谱条件下,以水相为流动相时,调节水相 pH 值,抑制弱碱离解,将导致保留行为改变。弱碱的保留时间随含水相 pH 值的降低而缩短,可在水相中添加酸来调节流动相 pH 值。试验发现添加乙酸的效果比添加磷酸好,且乙酸添加量与分离效果相关。分别考察了甲醇-1% 乙酸水溶液、甲醇-0.5% 乙酸水溶液、甲醇-0.1% 乙酸水溶液 3 种流动相对分离效果的影响,结果表明,以甲醇-0.5% 乙酸水溶液为流动相时,样品的洗脱效果最好,色谱峰形也较对称。

#### 2.1.2 检测波长的选择

磺胺类药物的结构中有一个苯环,在紫外有吸收,可直接用紫外检测器检测。考察了各组分的最大吸收波长,发现 7 种磺胺类药物于 272 nm 处均有较理想的吸收。

#### 2.1.3 进样体积的选择

试验发现,进样体积对色谱峰形有较大影响,大的进样体积会使色谱峰前延。该试验选择 5  $\mu\text{L}$  进样体积,能够得到对称性良好的峰形。

## 2.2 样品预处理方法优化

### 2.2.1 提取溶剂的选择

磺胺类药物残留常用的提取溶剂有乙腈、乙酸乙酯、二氯甲烷、甲醇等。二氯甲烷有可能提取出类脂物,浓缩后不易脱脂;乙酸乙酯提取杂质多,净化后仍不能排除干扰;乙腈具有很强的沉淀蛋白质能力和较高的溶解性,能与组织非共价结合的磺胺类药物有效解离和提取,且在沉淀样品中的蛋白质方面优于甲醇等,故该试验采用乙腈为提取溶剂。加入无水硫酸钠,可以有效防止样品中的水分进入提取液。

### 2.2.2 提取方法的选择

常见的磺胺类药物提取方法有匀浆均质、漩涡振荡、超声振动等。将样品分别采用超声波萃取 15 min、摇床振荡萃取 15 min 和 30 min、漩涡匀质

萃取 5 min,发现各种方法的萃取效果大致相同,漩涡匀质法回收率相对较高,故试验采用该法萃取样品。

2.2.3 浓缩方法的选择

氮气吹干和旋转蒸发是浓缩样品常用的方法。采用氮吹仪吹干浓缩需 2 h 以上,较旋转蒸发浓缩耗时,故该试验采用旋转蒸发仪浓缩样品,提高工作效率。考虑到磺胺类药物遇热不稳定,而乙腈沸点高,故选择 35 °C 水浴减压浓缩。

2.3 色谱峰和保留时间

7种磺胺类药物的 HPLC 色谱峰见图 1(a) (b) (c) (d) (e)。目标物在上述色谱条件下得到了很好的分离,峰形较好,与样品中的杂质峰也分离良好。磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺甲恶唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶琳的保留时间依次为 7.28 min、9.48 min、13.58 min、14.53 min、16.61 min、17.25 min、23.73 min。

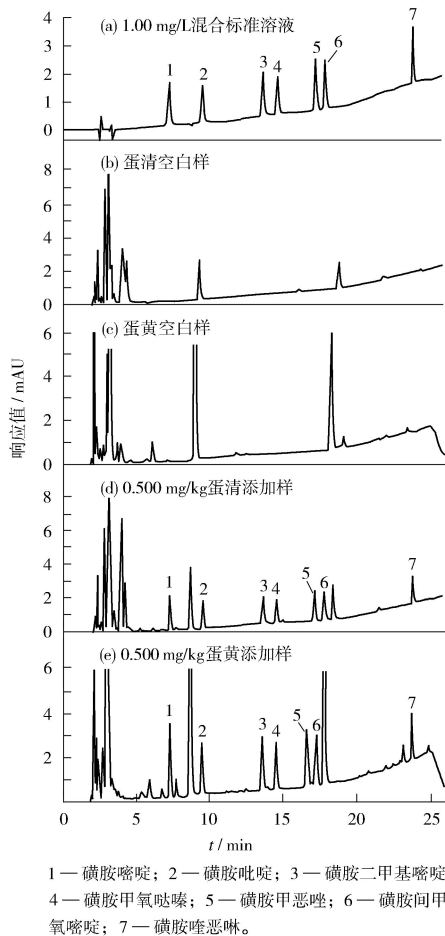


图 1 7种磺胺类药物的 HPLC 色谱峰

Fig 1 HPLC chromatogram of 7 sulfonamides

2.4 方法线性与检出限

在上述色谱条件下,平行测定 0.050 mg/L ~ 10.0 mg/L 磺胺类药物混合标准溶液系列 (n=3), 用峰面积对质量浓度绘制标准曲线,结果见表 1。

表 1 7种磺胺类药物的标准曲线

Table 1 Standard curves of 7 sulfonamides

药物	回归方程	相关系数 r
磺胺嘧啶	$y = 20.2x + 0.193$	0.999 5
磺胺吡啶	$y = 17.0x + 0.441$	0.999 8
磺胺二甲基嘧啶	$y = 18.8x + 0.838$	0.999 7
磺胺甲氧哒嗪	$y = 16.0x - 0.013$	0.999 8
磺胺甲恶唑	$y = 21.9x - 0.704$	0.999 7
磺胺间甲氧嘧啶	$y = 19.7x + 0.390$	0.999 8
磺胺喹恶琳	$y = 16.4x - 1.60$	0.999 1

在上述色谱条件下,将磺胺类药物混合标准溶液连续稀释后进样分析,得出 7种组分的仪器检出限均低于 0.02 mg/L (以噪声 3倍响应值计),方法检出限均低于 0.02 mg/kg (以 3倍信噪比、按取样 2 g 最终定容至 1 mL 计),定量限均低于 0.04 mg/kg,可以满足鸡蛋清和蛋黄中磺胺类药物残留的分析要求。

2.5 精密度与加标回收试验

在鸡蛋清和蛋黄空白样品中添加 2个水平 (0.250 mg/kg和 0.500 mg/kg)的 7种磺胺类药物混合标准溶液,用该方法平行测定 3次,做加标回收试验<sup>[9]</sup>,结果见表 2。

表 2 精密度与加标回收试验结果

Table 2 Test results of precision and recovery

药物	加标量 w (mg · kg <sup>-1</sup> )	平均回收率 / %		RSD / %	
		蛋清	蛋黄	蛋清	蛋黄
磺胺嘧啶	0.250	82.6	82.0	2.0	1.1
	0.500	95.6	92.4	2.9	3.3
磺胺吡啶	0.250	84.0	83.0	3.6	3.2
	0.500	100	92.9	1.7	4.0
磺胺二甲基嘧啶	0.250	81.0	80.6	0.8	2.2
	0.500	95.3	94.1	3.3	1.7
磺胺甲氧哒嗪	0.250	85.4	85.7	3.7	3.7
	0.500	92.6	91.3	1.0	4.6
磺胺甲恶唑	0.250	83.7	82.2	3.6	6.9
	0.500	92.8	86.2	2.7	2.2
磺胺间甲氧嘧啶	0.250	81.1	81.4	4.8	3.6
	0.500	92.2	88.6	0.9	4.5
磺胺喹恶琳	0.250	81.9	72.2	2.7	4.8
	0.500	90.0	74.8	1.5	4.3

(下转第 64页)

表 2 样品测定的精密度和加标回收率

Table 2 Precision of sample analysis and recovery of determination

组分名称	本底值 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	加入量 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	平均浓度 / ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	RSD / %	回收率 / %
1,1-二氯乙烯	—	6.05	5.98	3.9	98.8
二氯甲烷	—	92.0	87.8	5.1	95.4
反 1,2-二氯乙烯	—	43.2	41.2	4.4	95.3
顺 1,2-二氯乙烯	—	142	145	3.5	102
三氯甲烷	0.15	1.01	1.06	5.8	90.1
1,2-二氯乙烷	—	54.0	52.8	4.6	97.8
四氯化碳	0.0074	0.0500	0.0532	6.9	91.6
三氯乙烯	—	2.06	2.04	1.1	99.0
四氯乙烯	—	0.190	0.185	3.5	97.4
三溴甲烷	—	9.70	9.98	2.1	103
六氯丁二烯	—	0.200	0.208	4.5	104

3 结语

通过对《地表水环境质量标准》中分析卤代烃方法优化整合,从顶空瓶和空白用水两方面入手,降低空白值。用顶空进样/气相色谱法一次性测定 10 种卤代烃,提高了分析效率。

[参考文献]

[1] 国家环境保护局. GB/T 17130 - 1997 水质 挥发性卤代烃的测定 顶空气相色谱法 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 1997.  
 [2] 宫正宇, 孙宗光, 李国刚. 吹脱捕集 GC/FID 法测定海河水中挥发性有机物 [J]. 环境监测管理与技术, 2001, 13 (2): 31

- 32

[3] 卓海华, 郑红艳. 吹扫捕集装置在测定地表水中挥发性有机物的最佳测试条件 [J]. 环境监测管理与技术, 2005, 17 (5): 43 - 45.  
 [4] 张泽林. 生活饮用水中挥发性有机物检测方法的研究及应用 [J]. 中国环境监测, 2008, 24 (1): 13 - 16  
 [5] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法 [M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002  
 [6] 国家环境保护总局. GB/T 5750. 8 - 2006 生活饮用水标准检验方法 [S]. 北京: 中国环境科学出版社, 2006.  
 [7] 姜庆利, 谭砂砾. HSGC 法测定水中微量的氯仿和四氯化碳 [J]. 山东工业大学学报, 2000, 30 (4): 341 - 345.

(上接第 45 页)

2.6 实际样品测定

用该方法测定购于博联超市、北亭村的土鸡蛋和鲜鸡蛋样品, 结果均未检出磺胺类药物残留。

3 结语

采用高效液相色谱法测定鸡蛋清和蛋黄中 7 种磺胺类药物残留, 方法操作简单、稳定, 在 30 min 内能一次性检出 7 种药物在蛋清和蛋黄中的残留, 耗时少, 灵敏度高, 精密度与准确度均能满足检测要求。

[参考文献]

[1] 张川, 胡冠九, 孙成. UPLC - ESI - MS/MS 法同时测定水中 7 种抗生素 [J]. 环境监测管理与技术, 2009, 21 (3): 37 - 40.

[2] 鲁晓翠, 侯玉泽, 邓瑞广, 等. 磺胺类药物在动物性食品中的残留与检测 [J]. 动物医学进展, 2007, 28 (2): 70 - 74.  
 [3] 中华人民共和国农业部. NY 5039 - 2001 无公害食品 鸡蛋 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.  
 [4] 王曼霞, 林黎明, 邱芳, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中磺胺类残留量 [J]. 分析化学, 2004, 32 (1): 1563.  
 [5] 张艳, 吴银良. 固相萃取 - 高效液相色谱法测定动物肉组织中磺胺类药物的残留 [J]. 色谱, 2005, 23 (6): 636 - 638  
 [6] 刘铁铮, 王冉, 柳伟荣, 等. 鸡蛋中 7 种磺胺药物的多残留检测方法研究 [J]. 食品科学, 2005, 26 (11): 183 - 186.  
 [7] AGARWAL V K. High performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue milk and eggs [J]. Journal of Chromatography, 1992, 624 (2): 411 - 423.  
 [8] 宋艳红, 王冉, 刘铁铮. 高效液相色谱法测定蛋清和蛋黄中五种磺胺类药物残留 [J]. 浙江农业学报, 2007, 19 (1): 42 - 45.  
 [9] 郭晓菲. 环境样品加标回收率的控制限探讨 [J]. 环境监测管理与技术, 2004, 16 (2): 42 - 43.