

高效液相色谱-荧光检测法测定茶叶中 3 种磺胺类抗生素

陈海燕, 叶文玲, 樊 霆

(安徽农业大学资源与环境学院, 合肥 230036)

摘 要: 研究茶叶中磺胺嘧啶 (SDZ)、磺胺二甲嘧啶 (SM₂)、磺胺甲噁唑 (SMZ) 3 种磺胺类抗生素 (SAs) 的检测方法, 优化了提取方法, 确定以甲醇为提取剂, 超声波提取 10 min, 浓缩仪浓缩, 衍生化后用高效液相色谱-荧光检测器测定的方法。添加回收实验结果表明, 茶叶中 SDZ、SM₂ 和 SMZ 的添加回收率为 70.5%~131.1%, 在茶叶中的检出限为 0.002~0.003 mg·kg⁻¹, 该方法的灵敏度、精确度、准确度均较高。对安徽省 13 个茶叶样品检测结果表明, 3 种 SAs 均未检出。

关键词: 茶叶; 磺胺嘧啶; 磺胺二甲嘧啶; 磺胺甲噁唑; 高效液相色谱

中图分类号: S571.1; D657.72

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0580-04

Simultaneous HPLC-FLD determination of three sulfonamides residues in tea

CHEN Haiyan, YE Wenling, FAN Ting

(School of Resources and Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: An analytical method for determining three sulfonamide antibiotics (sulfadiazine, sulfadimidine and sulfamethoxazole) in tea was developed in this paper. The analytical procedure includes extraction with methanol by ultrasound, centrifugation, and derivatization, followed by HPLC-FLD analysis. Average recoveries ranged from 70.5% to 131.1%. The detection limit of three sulfonamides was 0.002-0.003 mg·kg⁻¹ (FW). The proposed analysis method for three sulfonamide antibiotics in tea samples is characterized by simplicity, high sensitivity and accuracy. The results will provide guidance for the reasonable use of sulfonamide antibiotics. Three SAs were not detected in the tea samples from different regions in Anhui Province.

Key words: tea; sulfadiazine; sulfadimidine; sulfamethoxazole; HPLC(High performance liquid chromatography)

长期以来, 磺胺类抗生素 (SAs) 被广泛地应用于生产和医疗等领域, 尤其是畜牧水产养殖行业, 但是, 其中大部分磺胺类抗生素都不能被人类和动物利用, 而是以药物原形随粪便排出^[1], 进入环境中, 污染水体和土壤^[2-3], 最终对人体产生危害。近年来, 国内外大量文献报道了食品中磺胺类抗生素的残留检测^[4-8], 并制定了食品中磺胺类抗生素的残留限值, 但是对于有机茶叶中磺胺类抗生素的残留研究却鲜有报道。由于有机茶叶在种植过程中通常会施用有机肥^[9-11], 存在磺胺类抗生素污染的风险, 本实验研究了高效液相色谱法同时测定茶叶中的磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺甲噁唑, 为规范有机茶叶生产提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

磺胺嘧啶 (sulfadiazine, SDZ)、磺胺二甲嘧啶 (sulfamethazine, SM₂)、磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole, SMZ), 均购自 Sigma 公司, 纯度 ≥ 99%; 荧光胺 (fluorescamine) 购自 Alfa Aesar 公司; 甲醇 (LC, 天津市四友精细化学品有限公司); 柠檬酸、磷酸氢二钠、丙酮、乙酸钠和盐酸等均为分析纯, 购自西陇化工股份有限公司; 实验用水为超纯水。

抗生素标准溶液: 准确称取 0.0100 g 抗生素标准品溶于 10 mL 甲醇, 配制成 1 000 mg·L⁻¹ 的标准母液, 冷藏保存备用。

0.02% 荧光胺丙酮溶液配制: 准确称取 5 mg 荧

收稿日期: 2017-01-06

基金项目: 安徽省教育厅自然科学重点项目 (KJ2012A125) 资助。

作者简介: 陈海燕, 实验师。E-mail: chy@ahau.edu.cn

光胺, 用丙酮溶解定容至 25 mL, 冷藏保存。

1200 高效液相色谱仪-荧光检测器(美国 Agilent 公司), 配自动进样器; 循环水式多用真空泵(上海知信实验仪器技术有限公司); EYELA 旋转浓缩仪(上海爱郎仪器有限公司); 中佳 SC-3612 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司); SHA-C 数显水浴恒温振荡器(金坛市江南仪器厂); KQ-5200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DHG-9070A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司); CP214 型电子天平(奥豪斯仪器有限公司); 艾科浦 AYJ1-100Z-U 超纯水系统; HLB 固相萃取柱(3cc/60 mg, 美国 Waters 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品处理 茶叶样品为安徽省龙王井茶叶有限公司生产的云雾茶, 将茶叶样品用研钵磨碎, 收集于密封袋中, 置于干燥密封处保存。

1.2.2 标准曲线的绘制 分别配制浓度为 0.01、0.05、0.1、0.2、1 和 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 3 种磺胺类抗生素的标准混合样品, 衍生化后用 HPLC 进行测定。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标作图, 绘制标准曲线。

1.2.3 提取方法的确定 本实验选择了振荡和超声提取法, 分别选择振荡 10 min、振荡 20 min、振荡 30 min、超声 10 min、超声 20 min、振荡 10 min 超声 10 min 进行提取, 通过对 3 种磺胺类抗生素的回收率的对比, 确定提取方法。

1.2.4 添加回收实验 准确称取 0.50 g 茶叶样品至 50 mL 离心管中, 在样品中加入 1 mL 的抗生素标准溶液, 添加浓度分别为 0.1、0.25 和 0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 静

置过夜。加入 25 mL 甲醇^[12], 拧紧盖子, 提取后离心, 将提取液转移至浓缩瓶, 残渣重复提取 1 次, 合并提取液, 浓缩。每个添加水平样品重复实验 3 次。

1.2.5 检出限的测定 以 3 倍信噪比求得 3 种磺胺类抗生素的仪器检出限 (LOD), 以 10 倍信噪比求得茶叶中 3 种磺胺类抗生素的定量限(LOQ)。

1.2.6 衍生化方法及色谱检测条件 向浓缩瓶中准确加入 5 mL 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解残渣(可用超声助溶), 过 0.45 μm 滤膜。准确吸取 0.5 mL 滤液于 2 mL 样品瓶中, 加 0.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸钠缓冲溶液(用 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl 调节 pH=3) 0.5 mL, 摇匀, 加入 0.02% 荧光胺丙酮溶液 0.2 mL, 盖紧盖子, 摇匀, 置于 18 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中衍生化 30 min 后用 HPLC 测定, 选择 Hypersil ODS 柱 (0.46 \times 250 mm, 5 μm), 进行梯度洗脱^[12]。

1.2.7 结果计算 方法的准确度 (accuracy) 用添加回收率 (recovery) 来表示:

$$\text{回收率}/\% = C_1/C_0 \times 100$$

式中: C_1 为空白样品中添加抗生素后的测定值, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; C_0 为抗生素添加量, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

以浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 得到 3 种磺胺类抗生素的回归线性方程和 R^2 值(表 1)。由表 1 可以看出, 3 种抗生素在 0.01~2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内浓度与峰面积具有良好的线性关系。

表 1 标准曲线和检出限

Table 1 The linear range and detection limit of three SAs

抗生素 Antibiotic	线性方程 Linear equation	R^2	检出限 Detection limit ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $S/N=3$)	定量限 Limit of quantitation ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $S/N=10$)
磺胺嘧啶 SDZ	$Y=294.82X-4.4288$	0.9998	0.002	0.003
磺胺二甲嘧啶 SM ₂	$Y=244.89X-4.3114$	1.0000	0.001	0.002
磺胺甲恶唑 SMZ	$Y=320.51X-8.2924$	0.9989	0.002	0.003

2.2 仪器检出限和定量限

由表 1 可知, 按照 3 倍信噪比求得 3 种 SAs 的仪器检测限 LOD 为 0.001~0.002 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 以 10 倍信噪比求得茶叶样品中 3 种 SAs 的定量限 LOQ 为 0.002~0.003 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.3 提取方法的确定

由表 2 可知, 当添加浓度为 0.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 3 种 SAs 的回收率均较高, 除了超声 20 min 磺胺嘧啶的回收率为 59.4%, 其余均高于 70%, 其中磺胺二甲

嘧啶的回收率均高于 100%; 当添加浓度为 0.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 使用超声 10 min 的提取方法时 3 种 SAs 的回收率均为最高; 当添加浓度为 1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 磺胺嘧啶的回收率在使用超声 10 min 的提取方法时最高, 磺胺二甲嘧啶的回收率在使用振荡 10 min 的提取方法时最高, 磺胺甲恶唑的回收率在使用超声 10 min 的提取方法时最高, 且只有在使用超声 10 min 的提取方法时 3 种 SAs 的回收率均在 70% 以上。综合考虑, 最终确立超声 10 min 作为本实验的

提取方法,当添加浓度为 $0.2\sim 1.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,茶叶中3种SAs的回收率为 $70.5\%\sim 131.1\%$,能够满足实际样品分析要求。

2.4 色谱分析

在液相色谱分析条件下,3种SAs混合标准品和茶叶样品添加回收实验的色谱图见图1(a)和

(b),可以看出,(a)和(b)中3种SAs都得到了较好的分离,出峰顺序和保留时间依次为:磺胺嘧啶(9.8 min)、磺胺二甲嘧啶(10.2 min)、磺胺甲噁唑(12.2 min),茶叶基体不干扰3种SAs的检测,不产生干扰峰。

表2 茶叶中3种磺胺类的抗生素的加标回收率
Table 2 Recoveries of three SAs in the tea samples ($n=3$)

浓度/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Concentration	提取方法 Extraction method	平均回收率/% Average recovery rate		
		磺胺嘧啶 SDZ	磺胺二甲嘧啶 SM ₂	磺胺甲噁唑 SMZ
0.2	振荡 10 min	72.7±2.8	125.8±3.2	79.3±8.2
	振荡 20 min	72.5±1.0	135.6±3.9	78.7±1.9
	振荡 30 min	74.8±1.8	133.1±7.4	79.6±2.6
	超声 10 min	73.7±3.9	131.1±2.1	81.8±1.5
	超声 20 min	59.4±5.7	119.2±3.1	70.2±3.2
	振荡超声各 10 min	73.8±2.5	151.7±2.8	83.2±3.4
0.5	振荡 10 min	63.1±8.1	91.1±2.8	68.6±3.1
	振荡 20 min	63.9±5.4	86.2±3.1	66.8±9.2
	振荡 30 min	52.3±2.5	70.0±3.4	59.8±3.5
	超声 10 min	81.9±4.2	112.6±2.8	87.2±2.9
	超声 20 min	65.0±3.6	100.5±2.5	73.6±1.3
	振荡超声各 10 min	58.0±1.5	80.8±6.5	63.9±3.4
1.0	振荡 10 min	68.1±5.2	84.9±3.6	63.6±4.5
	振荡 20 min	63.5±8.5	79.7±3.1	69.4±5.3
	振荡 30 min	57.5±5.7	70.9±1.2	59.9±3.5
	超声 10 min	70.5±3.4	75.4±3.7	72.9±2.6
	超声 20 min	59.7±6.4	76.4±2.1	63.7±3.2
	振荡超声各 10 min	54.8±3.3	78.1±5.8	60.2±2.6

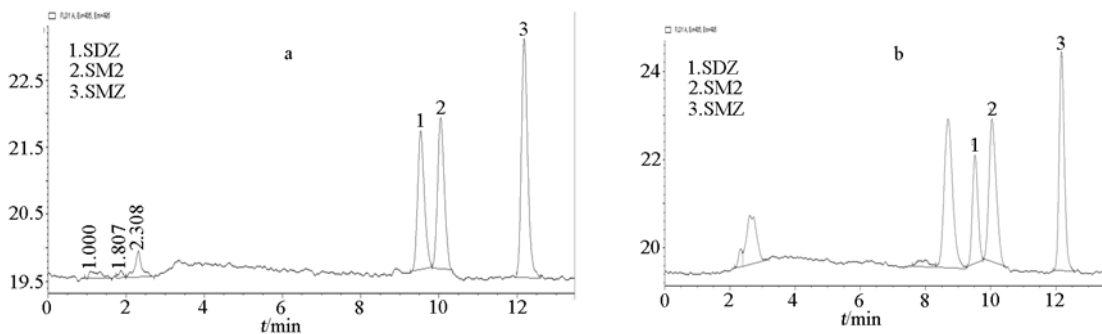


图1 3种SAs标准品和添加回收实验色谱图
Figure 1 Chromatograms of standards (a) and samples (b)

2.5 茶叶样品分析

在合肥市内多家茶叶商店随机购买安徽省不同品种的13个茶叶样品,用上述方法测定了茶叶样品中3种磺胺类抗生素的含量,结果表明(表3),13个茶叶样品中3种SAs均未检出。

3 结论

研究确立了利用高效液相色谱-荧光检测法同时测定茶叶干样中3种SAs的分析方法,方法检测限为 $0.002\sim 0.003\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (干重)。在 $0.2\sim 1.0$

表 3 安徽省不同品种茶叶中 3 种 SAs 含量
Table 3 Concentrations of 3 SAs in the tea samples from different regions in Anhui Province $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

茶叶品种 Varieties of tea	磺胺嘧啶 SDZ	磺胺二甲嘧啶 SM_2	磺胺甲噁唑 SMZ
黄山毛峰 Huangshanmaofeng tea	ND	ND	ND
屯溪炒青 Tunxichaoqing tea	ND	ND	ND
太平猴魁 Taipinghoukui tea	ND	ND	ND
顶谷大方 Dinggudaang tea	ND	ND	ND
敬亭绿雪 Jingtinglvxue tea	ND	ND	ND
祁门红茶 Qingmen black tea	ND	ND	ND
涌溪火青 Yongxihuoqing tea	ND	ND	ND
九华佛茶 Jiuhuafoocha tea	ND	ND	ND
六安瓜片 Luanguapian tea	ND	ND	ND
霍山黄芽 Huoshanhuangya tea	ND	ND	ND
岳西翠兰 Yuexicuilan tea	ND	ND	ND
舒城兰花 Chuchenglanhua tea	ND	ND	ND
齐山云雾 Qishanyunwu tea	ND	ND	ND

$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度范围内, 样品的加标回收率为 70.5%~131.1%。表明方法的灵敏度和准确度均能够满足实际样品分析要求。且操作方法较为简单、成本较低, 可为今后研究茶叶中磺胺类药物的检测提供参考。

安徽省 13 个不同品种茶叶中均未检出 3 种磺胺类抗生素, 调查范围有限, 今后可继续调查其他地区茶叶样品, 施用过农家肥的有机茶品种可作为重点调查对象。

参考文献:

- [1] HALLING-SØRENSEN B, NIELSEN S N, LANZKY P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review[J]. Chemosphere, 1998, 36(2): 357-393.
- [2] MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORI M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants[J]. Chemosphere, 2003, 52(7): 1233-1244.
- [3] LIU F, YING G G, TAO R, et al. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities[J]. Environ Pollut, 2009, 157(5): 1636-1642.
- [4] FURUSAWA N, KISHIDA K. High-performance liquid chromatographic procedure for routine residue monitoring of seven sulfonamides in milk[J]. Fresen J Anal Chem, 2001, 371(7): 1031-1033.
- [5] KARIMI M, ABOUFAZELI F, ZHAD H R L Z, et al. Determination of sulfonamides in chicken meat by magnetic molecularly imprinted polymer coupled to HPLC-UV[J]. Food Anal Method, 2014, 7(1): 73-80.
- [6] 李谦, 刘正华, 李拥军. 液相色谱-串联质谱法测定牛肉中磺胺类抗生素[J]. 现代农业科技, 2012 (2): 345-346.
- [7] 蔡丽萍, 刘树彬, 李梅. 液相色谱/质谱对动物源性食品中残留抗生素的检测[J]. 河北化工, 2010 (2): 60-62.
- [8] 李华. 奶制品中抗生素的检测[J]. 福建轻纺, 2001 (12): 5-7.
- [9] 任红楼. 有机废弃物的堆肥化处理及在茶园中的应用效果研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2009.
- [10] 沈星荣. 有机肥料对茶树生长、茶叶品质及经济效益的影响[D]. 北京:中国农业科学院, 2014.
- [11] 蒋清华. 有机茶叶无公害栽培管理技术[J]. 吉林农业, 2012(12): 80.
- [12] 李学德, 鲜啟明, 刘红玲, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定蔬菜中 3 种磺胺类药物残留[J]. 分析化学, 2010, 38(3): 429-433.