



液液微萃取-高效液相色谱法测定水中磺胺类药物 的实验设计

梁淑彩, 廖晓燕, 刘毅*

(武汉大学药学院, 武汉 430070)

摘要: 基于绿色分析化学理念, 设计了液液微萃取-高效液相色谱(HPLC)法测定水中磺胺类药物的实验并应用于本科实践教学。实验中采用较少的萃取溶剂对样品进行前处理, 色谱分离时选用乙醇作为绿色有机流动相, 通过优化萃取和分离条件, 建立了一种液液微萃取-高效液相色谱联用分析水样中磺胺类药物(磺胺胍(SG)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺甲噁唑(SMZ)和酞磺胺噻唑(PST))及其常用配伍药甲氧苄啶(TMP)的新方法。其结果表明测定各药物的线性范围分别为 10~1000 $\mu\text{g/L}$ (SG、SD、SDM 及 SMZ)、100~1000 $\mu\text{g/L}$ (TMP)和 50~1000 $\mu\text{g/L}$ (PST), 检测限在 50~100 ng/L ($S/N=3$)之间。对湖水样品进行测定, 加样回收率在 93.6%~105.2% 之间。该实验立足于分析化学前沿且难易适中, 可以作为化学、药学和环境等专业高年级本科生的研究性实验, 有利于学生提高创新能力、低碳意识及综合素质。

关键词: 液液微萃取; 高效液相色谱; 磺胺类药物; 研究性实验

中图分类号: O633

文献标志码: A

DOI: 10.12179/1672-4550.20230553

Experimental Design for the Determination of Sulfonamide Drugs in Water Using Liquid-Liquid Microextraction Combined with High Performance Liquid Chromatography

LIANG Shucui, LIAO Xiaoyan, LIU Yi*

(School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan University, Wuhan 430070, China)

Abstract: With the concept of green analytical chemistry, an experiment on the determination of sulfonamide drugs in water using liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography(HPLC) is designed for undergraduate experimental teaching. With a small amount of organic solvents in liquid-liquid extraction and ethanol as the green organic mobile phase for chromatographic separation, the extraction and separation conditions are optimized, and a new method of liquid-liquid microextraction combined with HPLC has been developed for determining sulfonamide drugs (sulfaguanidine(SG), sulfamethoxazole(SD), sulfamethoxazole(SDM), sulfamethoxazole(SMZ) and sulfamethoxazole(PST)) and trimethoprim(TMP, a commonly used compatible drug for sulfonamide drugs). The results indicate that the linear measurement ranges are 10~1000 $\mu\text{g/L}$ for SG, SD, SDM and SMZ, and 100~1000 $\mu\text{g/L}$ for TMP and 50~1000 $\mu\text{g/L}$ for PST, respectively. The detection limits are in the ranges of 50~100 ng/L ($S/N=3$). The recovery rates of the lake water sample are between 93.6% and 105.2%. This experiment is based on the forefront of analytical chemistry and is moderately difficult. It is suitable as a researching experiment for senior undergraduate students majoring in chemistry, pharmacy and environment, which is beneficial for students to improve their innovation ability, low-carbon awareness and comprehensive quality.

Key words: liquid-liquid microextraction; high performance liquid chromatography; sulfonamide drugs; researching experiment

随着人类环境保护意识的不断增强, 绿色低碳发展越来越受到关注。2022 年 10 月, 我国教育

部发布《绿色低碳发展国民教育体系建设实施方案》, 其中明确要求把绿色低碳发展理念全面融

收稿日期: 2023-09-22; 修回日期: 2024-05-19

基金项目: 武汉大学本科教育质量建设综合改革项目(20238302); 武汉大学专业学位特色课程“药物植物生物技术”建设项目。

作者简介: 梁淑彩(1975-), 女, 博士, 副教授, 主要从事药物分析技术研究及实验教学方面的工作。

*通信作者: 刘毅(1983-), 女, 博士, 实验师, 主要从事药物分析实验教学及实验室管理相关工作。E-mail:

liuyi2013@whu.edu.cn

入国民教育体系^[1]。绿色化学对实现绿色低碳发展有着重要作用^[2]。绿色分析化学是绿色化学的一个分支,旨在发展新的或改进旧的分析技术和方法,以减少试剂或有机溶剂在分析程序中的使用,降低有毒气体、液体或固体废物的排放及分析程序的能量消耗^[3]。目前,绿色分析化学已成为分析化学学科的前沿研究领域,在化学及相关专业本科生的实践教学中开展有关实验,是践行绿色低碳教育的有效途径之一。

磺胺类药物是二氢叶酸合成酶抑制剂,具有出色的抗菌活性。TMP 常作为抗菌增效剂和磺胺类药物联合用药,对细菌的生长起到双重抑制作用^[4]。它们价格低廉、毒性低,广泛用于人或动物类细菌性疾病的治疗,但未完全代谢的药物可能进入水体或土壤,也会蓄积于动物的组织器官或农产品中,通过食物进入人体而危及人类健康^[5]。

我们基于绿色分析化学理念,设计了液液微萃取-高效液相色谱法测定水中磺胺类药物的研究性实验。以磺胺类药物 SG、SD、SDM、SMZ、PST 及 TMP 为分析对象,采用液液微萃取进行样品前处理,以乙醇作为有机流动相,优化了萃取和分离条件,建立了 HPLC-紫外光谱分析检测 6 种药物的新方法,并成功用于实际水样的测定。该实验立足于分析化学前沿,内容充实且难易适中,可以用于化学、药学和环境等专业高年级本科生的实践教学。

1 实验设计依据

HPLC 作为一种高效、快速的分析技术,是分离、识别和定量复杂混合物的常用手段。目前,HPLC 分离分析主要用甲醇或乙腈作为流动相的有机组分,这些溶剂具有一定的毒性,大量流动相废液易对环境造成污染。使用小型化的分析设备及采用乙醇、水等较为环保的溶剂作为流动相是 HPLC 分析“绿色化”的重要研究方向^[6-7]。前处理是样品分析检测的重要一环,可以有效消除基体干扰并使待测物得以富集。传统的液液萃取具有样品和有机试剂使用量大、程序繁冗等缺点,随后发展的固相萃取法具有操作方便、消耗试剂少和易自动化等优点,在许多领域取代了传统的液液萃取方法^[8],但商品化的固相萃取柱成本高,

且存在不同批次间的差异,难以保证重复性等问题。液液微萃取是一种操作简单、有机溶剂和时间消耗较少、萃取效率高的新型绿色液相萃取技术,近年来应用越来越多^[9-10]。

已报道的磺胺类药物分离分析多采用传统液液萃取或固相萃取进行样品前处理,再以甲醇或乙腈作为有机流动相进行 HPLC 分离检测的方法^[11-14]。因此,基于绿色理念的液液微萃取与 HPLC 联用测定磺胺类药物和 TMP 的新方法具有重要的研究和实用价值。

2 实验方法

2.1 实验仪器和试剂

仪器:LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津制作所),配 LC solution 工作站和 SPD-20A 检测器;UV2600 紫外分光光度计(日本岛津制作所);BSA124S 电子天平(德国赛多利斯集团);Milli-Q Academic 型超纯水系统(美国默克公司)。

试剂:待测药物 SG、SD、SDM、SMZ、PST 及 TMP 对照品,购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙醇(色谱纯),购于国药集团化学试剂有限公司;乙酸、三乙胺、乙酸乙酯、二氯甲烷、三氯甲烷均为国产分析纯;水为纯化水。

2.2 分析方法

2.2.1 待测药物溶液的配制

称取一定量的待测药物,用乙醇溶解分别得到 1 mg/mL 的 SG、TMP、SDM、SMZ 及 PST 储备液和 0.5 mg/mL 的 SD 储备液,使用前用乙醇:水(1:9)溶液稀释至所需浓度。

2.2.2 紫外光谱测定

6 种药物的储备溶液分别用乙醇:水(1:9)溶液稀释至 0.01 mg/mL,然后使用紫外分光光度计进行光谱扫描。

2.2.3 色谱条件

色谱柱为 Amethyst C18(4.6 mm×150.0 mm, 5 μm);流动相的水相为 0.1% 三乙胺水溶液(使用冰醋酸调节至 pH=4),有机相为乙醇;洗脱条件为乙醇含量 20 min 内从 5% 线性增加到 30%,20 min 后为恒定 30%;流速为 1.0 mL/min;柱温为 40 °C;检测波长为 270 nm。

2.2.4 液液微萃取方法

取 8.0 mL 待测水样置于离心管中,加入 1 200 μL

乙酸乙酯和 800 μL 三氯甲烷, 涡旋混合后, 静置分层。弃去水相溶液, 有机相中加入 0.1 mol/L 的 HCl 溶液 10 μL , 涡旋混合后静置, 待水珠聚集后吸出水珠置于离心管中。继续在有机层溶液中加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 μL , 涡旋混合后静置待水珠聚集吸出水珠, 与前述的酸萃取液滴合并后用于色谱分析。

2.2.5 样品测定

湖水取自湖北省武汉市东湖, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 在优化的条件下进行萃取后进行色谱分析, 同时进行加样回收率测定。

2.3 结果与分析

2.3.1 检测波长的选择

紫外光谱扫描结果表明 SG、SD、TMP、SDM、SMZ、PST 的最大吸收波长分别为 259、264、280、262、265、285 nm。各药物在 270 nm 下吸收度都相对较强, 因此实验中将检测波长设置为 270 nm。

2.3.2 色谱条件优化

乙醇的毒性和挥发性比乙腈和甲醇小, 其废液处理成本也相对较低, 是常用的绿色替代有机溶剂^[15], 本实验中以乙醇作为流动相的有机组分。前期实验表明, 水相中加入冰醋酸溶液可以使药物分离, 但 TMP 峰拖尾, 加入 0.1% 三乙胺可以避免这一现象。因此, 选择以 0.1% 三乙胺水溶液作为流动相水相, 并用冰乙酸调节水相酸度。采用梯度洗脱, 系统考察了流动相中乙醇含量变化、流动相 pH 值、色谱柱温度及流动相流速对待测药物分离的影响, 优化了色谱分离条件。

1) 乙醇含量变化的影响

考察了 20 min 内流动相中乙醇含量变化分别为 5%~20%、5%~30%、5%~40%、5%~50% 和 5%~60%, 此后 10 min 内保持不变的条件下待测药物的色谱分离效果。如图 1 所示, 当流动相中乙醇含量 20 min 内从 5% 升高到 20%、30%、40% 及 50% 时, 分离时间依次缩短, 且所有药物都可以较好分离; 当乙醇含量变化为 5%~60% 时, SMZ 和 PST 无法完全分离。本实验选择 20 min 内流动相中乙醇含量从 5% 升高到 30%, 此后保持不变进行后续实验。

2) 流动相 pH 值的影响

流动相 pH 值对 6 种药物的色谱保留时间影响

如图 2 所示。当流动相 pH=3 和 pH=4 的时候色谱分离效果较好; pH=5 时, SMZ 与 PST 的峰以及 TMP 与 SDM 的峰无法完全分离; pH \geq 6 时, 虽然各药物也能完全分离, 但分离时间较长, 且 SMZ 及 PST 的峰出现前延现象。本实验选用 pH=4 作为最佳流动相 pH 值。

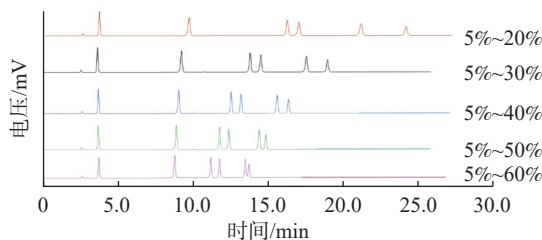


图 1 流动相中乙醇含量变化对色谱分离的影响 (有机相—乙醇; 水相—0.1% 三乙胺溶液, 用冰乙酸调节至 pH=4; 流速—0.7 mL/min; 柱温—40 $^{\circ}\text{C}$; 出峰顺序—SG、SD、TMP、SDM、SMZ、PST。)

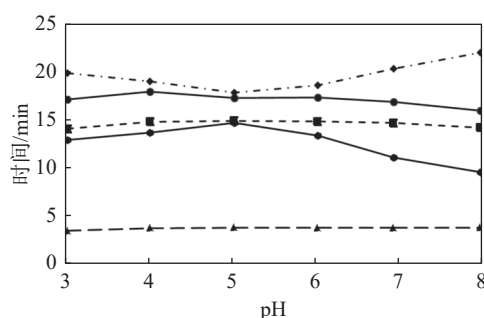


图 2 流动相 pH 值变化对药物保留时间的影响 (流速 0.7 mL/min; 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 。)

3) 色谱柱温度的影响

乙醇的黏度比甲醇和乙腈大, 使用其作为流动相时应关注系统压力变化。溶液的黏度与温度有一定关系, 可以通过提高温度来降低流动相的黏性, 以减少系统压力。实验中探究了流动相 pH=4、流速为 0.7 mL/min, 色谱柱温度分别为 30、40、50 $^{\circ}\text{C}$ 下的系统压力及色谱分离效果。实验表明, 降低柱温, 色谱系统压力明显升高, 但各测试温度下的压力均不超过 8.6 MPa, 远低于仪器所能承受的系统压力。各温度下 6 种药物均能较好分离, 且随着温度升高, 分析时间略有缩短, 如图 3 所示。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 时, 各分析物均能在 20 min 内出峰。综合考虑系统压力及分析时间, 最终选取 40 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳色谱柱温度。

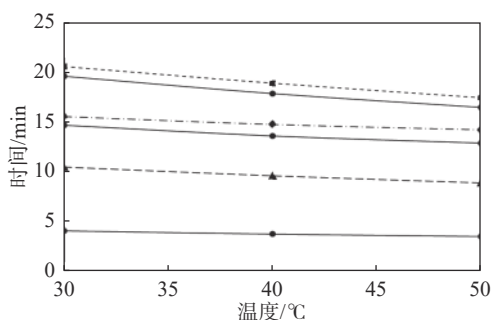


图3 色谱柱温度对药物保留时间的影响
(流动相 pH=4; 流速 0.7 mL/min。)

4) 流速对分离的影响

增加流速能缩短分析时间,但也会降低分离效果及增大系统压力。实验表明,柱温 40 °C,流速从 0.7 mL/min 增大到 1.0 mL/min 时,系统最大压力从 8.6 MPa 升至 10.0 MPa,仍远低于仪器最大承受压力。随着流速的增加,所有药物的保留时间均缩短,但依然能够基线分离。考虑到分析时间和分离效果,选择 1.0 mL/min 为流动相流速。

2.3.3 萃取条件优化

二氯甲烷、三氯甲烷和乙酸乙酯为常用的萃取剂,但传统液液萃取条件下,萃取剂的用量较大,本实验尝试采取液液微萃取方法。预实验结果表明当萃取剂体积较小时,有机相与水相不易分层,因此我们选择萃取剂总体积为 2.0 mL 进行微萃取实验。单一使用二氯甲烷或三氯甲烷仅能萃取出 SD、TMP、SDM 和 SMZ 这 4 种药物,且二氯甲烷对药物的富集倍数低于三氯甲烷;乙酸乙酯能萃取所有药物,但对 TMP 的萃取效率较低,而且会影响药物分离。此外, TMP 在酸中溶解性较好,而 PST 在碱中溶解性较好。为了提高萃取效率及避免萃取剂对测定的影响,后续采用萃取-反萃取方法,即利用 2.0 mL 乙酸乙酯与三氯甲烷混合溶剂进行萃取后,再依次使用 10 μL 酸溶液及 10 μL 碱溶液分别进行反萃取,将有机相中的药物再萃取到水中。实验中详细考察了萃取剂组成、漩涡时间及反萃取的酸碱浓度对萃取效率的影响。

1) 萃取剂组成的影响

考察了三氯甲烷与乙酸乙酯比例分别为 7:3、6:4、5:5、4:6、3:7 时对各药物的富集效果。如图 4 所示,当二者比例为 4:6 时,6 种药物的富集倍数均较高,因此使用该比例的混合溶剂作为最佳萃取剂。

2) 漩涡时间的影响

固定反萃取漩涡时间为 10 s,考察了混合溶剂萃取漩涡时间分别为 30、40、50、60、70 s 时药物的富集倍数。结果表明,漩涡 60 s 时 6 种药物的富集效果最好。固定萃取漩涡时间为 60 s,考察了反萃取漩涡时间分别为 5、10、15、20、25 s 时药物的富集倍数。随着反萃取漩涡时间的增加,各药物富集倍数增大,15 s 时 SD、SDM 和 SMZ 的富集倍数最大,增加漩涡时间它们的富集倍数略有降低。因此,选择 15 s 作为反萃取漩涡时间。

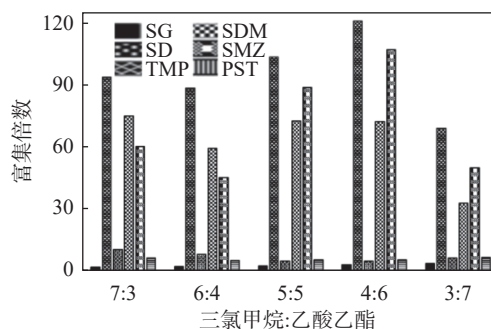


图4 三氯甲烷与乙酸乙酯比例对萃取的影响

3) 反萃取酸碱浓度的影响

待测药物在酸碱中的溶解性不同,采用先酸溶液萃取,再用同浓度碱溶液进行第二次萃取的反萃取方法。测试了酸碱浓度均为 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25 mol/L 下各药物的萃取效果。结果表明,当酸和碱浓度为 0.1 mol/L 时,6 种药物的富集倍数均较高,因此以此浓度为最佳酸碱浓度进行反萃取。

2.3.4 线性范围及检测限

配制不同浓度的待测药物溶液,在优化的条件下进行前处理及色谱分析。对方法的线性范围、相关系数及检测限进行了考察,结果如表 1 所示。测定 SG、SD、SDM 及 SMZ 的线性范围为 10~1000 μg/L,测定 TMP 和 PST 的线性范围分别为 100~1000 μg/L 和 50~1000 μg/L,各相关系数均达到 0.99 以上。该方法对待测药物的检测限在 50~100 ng/L (S/N=3)。

2.3.5 样品分析

用所建立的方法对湖水进行分析并做加样回收实验,结果如表 2 所示。在湖水中并未检测到相关药物,各药物加样回收率在 93.6%~105.2%,相对标准偏差在 1.25%~5.53%。

表1 测定药物的线性范围、线性方程、相关系数及检测限

药物	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	线性方程	相关系数($n=7$)	检测限/($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)
SG	10~1000	$y=83.969x+8523.9$	0.9946	100
SD	10~1000	$y=4861.2x+453511$	0.9901	50
TMP	100~1000	$y=20.984x+5872.6$	0.9958	100
SDM	10~1000	$y=6153.1x+229041$	0.9976	50
SMZ	10~1000	$y=14010x+266026$	0.9958	50
PST	50~1000	$y=904.47x-1037.7$	0.9826	100

表2 加样回收率分析结果

药物	加入量/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%($n=3$)
SG	100	104.3	2.48
	250	94.3	5.53
	500	96.2	4.35
SD	100	95.5	4.29
	250	95.7	2.34
	500	100.4	3.56
TMP	100	100.8	5.21
	250	97.5	3.39
	500	96.6	1.25
SDM	100	103.6	3.89
	250	94.3	4.57
	500	101.5	2.26
SMZ	100	103.9	4.58
	250	93.6	2.23
	500	96.9	2.78
PST	100	105.2	5.01
	250	97.3	2.92
	500	103.7	4.91

3 实验教学建议

该实验项目有多个步骤, 耗时较长, 建议采用开放式教学模式, 适用于化学、药学、环境等专业中具备样品前处理及 HPLC 分析技术基础理论和操作技能的高年级本科生, 每组 1~3 人。

实验前要求学生做好前期准备, 包括进一步熟悉 HPLC 基本操作及液液萃取的基本原理; 查阅文献了解绿色化学、绿色分析化学、液液微萃取及绿色 HPLC 的研究现状与发展前景; 了解待测药物的结构及性质、溶液配制方法及保存条件、建立分析方法时需要优化的条件、样品测定及加样回收实验方法等。在此基础上, 学生形成初步的设计方案, 再与教师沟通交流, 形成具有可操作性的方案后自主开展实验。实验中以学生为主导, 在保证安全的前提下允许他们自由探

索, 教师(必要时可聘请助教)适时指导, 激发他们探究问题的欲望, 鼓励他们分析和解决问题。实验结束后, 学生以论文的形式提交实验报告, 教师及时组织交流讨论, 引导学生进行总结反思, 如可以让学生交流对绿色低碳的认识; 讨论采用乙醇作为流动相的利弊、液液微萃取方法的优劣、色谱峰出现拖尾如何解决、加样回收实验如何实施等。

4 结束语

本研究性实验建立了一种 HPLC 分析测定水样中磺胺类药物的新方法。采取液液微萃取对样品进行前处理, 与传统液液萃取方法相比大大减少了有机溶剂的使用, 在色谱分离时选用乙醇作为有机流动相, 避免使用毒性较大的甲醇和乙腈, 符合绿色分析化学的理念。整个实验过程中, 学生通过文献调研、方案设计、自主实验、分析讨论、交流总结等环节, 不仅能加强理论联系实际, 学习建立实际样品中待测药物分析方法的基本程序, 提高对前沿分析技术、研究方法的认知, 还有利于培养绿色低碳意识, 提高创新能力及综合素质, 为今后从事相关领域的研究工作奠定基础。

参考文献

- [1] 中华人民共和国教育部. 绿色低碳发展国民教育体系建设实施方案[EB/OL]. [2022-10-31](2023-09-20). http://www.moe.gov.cn/srcsite/A03/moe_1892/moe_630/202211/t20221108_979321.html.
- [2] DE MARCO B A, RECHELO B S, TÓTOLI E G, et al. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review[J]. Saudi Pharmaceutical Journal, 2019, 27(1): 1-8.
- [3] TOBISZEWSKI M. Metrics for green analytical chemistry[J]. Analytical Methods, 2016, 8(15): 2993-2999.
- [4] BAKDACH D, ELAJEZ R. Trimethoprim-Sulfame-

- thoxazole: New lessons on an old antimicrobial; A retrospective analysis[J]. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research*, 2020, 11(3): 269–274.
- [5] 吴雯艳, 齐梦钰, 张泽坤, 等. 磺胺类抗生素的污染现状及检测方法研究[J]. *环境科学与管理*, 2022, 47(12): 121–126.
- [6] NAPOLITANO-TABARES P I, NEGRÍN-SANTAMARÍA I, GUTIÉRREZ-SERPA A, et al. Recent efforts to increase greenness in chromatography[J]. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 2021, 32: 100536.
- [7] KORANY M A, MAHGOUB H, HAGGAG R S, et al. Green chemistry: Analytical and chromatography[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2017, 40(16): 839–852.
- [8] KHATIBI S A, HAMIDI S, SIAHI-SHADBAD M R. Current trends in sample preparation by solid-phase extraction techniques for the determination of antibiotic residues in foodstuffs: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2021, 61(20): 3361–3382.
- [9] 张朝辉, 陈应庄, 郭宾, 等. 超声辅助分散液液微萃取-高效液相色谱法快速测定环境中马兜铃酸[J]. *分析化学*, 2023, 51(11): 1793–1801.
- [10] KOKOSA J M, PRZYJAZNY A. Green microextraction methodologies for sample preparations[J]. *Green Analytical Chemistry*, 2022, 3: 100023.
- [11] 董恒涛, 艾芸, 李月琪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留量[J]. *环境化学*, 2023, 42(2): 671–674.
- [12] QI M Y, TU C Y, LI Z Q, et al. Determination of sulfonamide residues in honey and milk by HPLC coupled with novel graphene oxide/polypyrrole foam material-pipette tip solid phase extraction[J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(10): 2885–2896.
- [13] DUAN X Y, LIU X F, DONG Y, et al. A green HPLC method for determination of nine sulfonamides in milk and beef, and its greenness assessment with analytical eco-scale and greenness profile[J]. *Journal of AOAC International*, 2020, 103(4): 1181–1189.
- [14] LI Y Y, ZHU N, CHEN T, et al. A green cyclodextrin metal-organic framework as solid-phase extraction medium for enrichment of sulfonamides before their HPLC determination[J]. *Microchemical Journal*, 2018, 138: 401–407.
- [15] OGDEN P B, DORSEY J G. Reversed phase HPLC with high temperature ethanol/water mobile phases as a green alternative method for the estimation of octanol/water partition coefficients[J]. *Journal of Chromatography A*, 2019, 1601: 243–254.

编辑 葛晋