

液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱法测定 鸡肉中 17 种磺胺类药物的残留

董 丹^{1,2}, 邵 兵¹, 吴永宁³, 吴国华¹, 薛 颖¹,
徐淑坤², 涂晓明¹, 张彦锋⁴

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100013; 2. 东北大学化学系, 辽宁 沈阳 110004;

3. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100025; 4. 北京桑德环境工程股份有限公司, 北京 100015)

摘要 :建立了鸡肉中 17 种磺胺类药物残留量的液相色谱-电喷雾串联四极杆质谱测定方法。以稳定同位素¹³C₆-磺胺二甲基嘧啶作为内标,采用多反应监测定量。样品经过匀浆、乙腈提取、正己烷脱脂、硅胶柱净化后进行液相色谱-质谱分析。采用 Capcell Pak C₈ DD 色谱柱,以均含 0.2% 甲酸的水和甲醇为流动相进行梯度洗脱。方法检出限为 0.02 ~ 1 μg/kg, 17 种磺胺类药物的加标回收率为 52.3% ~ 124.9% (添加水平为 1, 5, 10 μg/kg), 相对标准偏差为 1.0% ~ 17.6%。

关键词 :液相色谱-电喷雾串联质谱法;固相萃取;磺胺类药物;残留;鸡肉

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)04-0404-04

Simultaneous Determination of Seventeen Sulfonamide Residues in Chickens by Liquid Chromatography- Electrospray Tandem Mass Spectrometry

DONG Dan^{1,2}, SHAO Bing¹, WU Yongning³, WU Guohua¹, XUE Ying¹,
XU Shukun², TU Xiaoming¹, ZHANG Yanfeng⁴

(1. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100013, China;

2. Department of Chemistry, Northeast University, Shenyang 110004, China;

3. Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100025, China; 4. Beijing Sound Environmental Protection Enterprise, Beijing 100015, China)

Abstract : A liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the simultaneous determination of seventeen commonly used sulfonamide (SA) residues in chickens has been developed. Stable isotopic compound ¹³C₆-sulfamethazine was used as internal standard. Multi-reaction monitoring mode was employed for the quantitative determination. The separation was performed on a Capcell Pak C₈ DD column (150 mm × 2.0 mm i. d., 5 μm) with a gradient system of water (containing 0.2% formic acid)-methanol (containing 0.2% formic acid) as mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min. Samples were prepared by homogenizing the chicken, extracting with acetonitrile, defatting with *n*-hexane and cleaning-up with Sep-Pak Silica solid-phase extraction. The detection limits of 0.02 - 1 μg/kg proved to be much better than the previously reported ones. Average recoveries of seventeen SAs (spiked at the levels of 1, 5, 10 μg/kg) ranged from 52.3% to 124.9%, with relative standard deviations between 1.0% and 17.6%. Intra-day and inter-day variations of the method were all within the acceptable ranges. The results demonstrated that the method is simple, accurate and suitable for the identification and quantification of these sulfonamide residues in chickens.

Key words : liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry; solid-phase extraction; sulfonamides; residues; chicken

收稿日期 2004-07-05

作者简介:董 丹,女,硕士研究生。

通讯联系人:邵 兵,男,博士,助理研究员, Tel (010)64212461-503, Fax (010)64214405, E-mail shaob@bjcdc.org.

基金项目:北京市自然科学基金重点资助项目(No. 7041004)。

磺胺类药物(SAs)被广泛用于预防和治疗源性动物疾病,然而过量使用这些抗生素会导致食用动物产品中有残留,影响人类的健康,磺胺二甲嘧啶还可能使小鼠致癌^[1]。为了消费者的健康,欧盟已经规定动物源性食品中磺胺的最大残留量为100 μg/kg。

目前测定食品中磺胺类药物残留的分析方法有高效液相色谱法(HPLC)^[1-5]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[6]、毛细管电泳法(CE)^[7]、荧光胺衍生化薄层色谱法(TLC)^[8]。HPLC和CE虽然能够满足欧盟对动物源性食品中磺胺类药物最大残留量的测定要求,但是灵敏度低,选择性、特异性差,特别是在低浓度时样品基质干扰大,很难准确地定性确认。GC-MS虽然灵敏度和特异性都很高,但衍生过程繁琐。TLC虽然选择性较好,但灵敏度、重复性差。液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)是检测动物源性食品中兽药残留的一种重要方法,这种方法灵敏度高,选择性和特异性好,能够对低浓度的样品进行很好的定性确认。LC-MS和LC-MS/MS已经用于测定不同样品基质中的磺胺类药物^[9-12]。这些方法中样品的前处理基本采用固-液提取、液-液萃取脱脂等前处理步骤,样品净化不够彻底,样品基质干扰比较大,因而灵敏度只能达到5 ng/g。本文应用液-液萃取结合固相萃取净化,建立了17种磺胺类药物的残留量的LC-MS/MS检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪、Micromass[®] - Quattro UltimaTM Pt 质谱仪(Waters, USA);匀浆机(PRO300A, PRO公司, USA);离心机(AllegraTM X-22R型, Beckman公司);旋转蒸发仪(LABOROTA 4000, Heidolph公司);Waters Sep-Pak[®] Silica 固相萃取(SPE)小柱(500 mg, 3 mL)。

甲醇、乙腈(Fisher公司)和正己烷(Scharlau Co. Spain)都为色谱纯,甲酸(纯度为99%, Ameisensaure),三氟乙酸(纯度为99%, Merch-Schuchardt);乙酸、甲酸铵、三氯甲烷、正丙醇、无水硫酸钠均为分析纯(北京化学试剂公司);实验用水均为超纯水。

17种磺胺类药物标准品:磺胺噻唑(sulfathiazole, ST)、磺胺(sulfanilamide, SA)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)、磺胺二甲氧哒嗪(sulfadimethoxine, SDM)、磺胺甲基噻唑(sulfamethizole, STZ)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMX)以上磺胺类药物的纯度均为99.9%);磺胺喹噁啉(sulfaquinolone, SQX, 纯度为98.6%)、磺胺氯哒酮(sulfachlo-

ropyridazine, SCP, 纯度为99.1%)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR, 纯度为99.5%)、磺胺-5-甲氧嘧啶(sulfameter, SMT, 纯度为99.8%)、磺胺二甲基异嘧啶(sulfisomidine, SMD, 纯度为99.7%)、磺胺硝苯(sulfanitran, SNT, 纯度为95.7%)、磺胺二甲基异噁唑(sulfisoxazole, SIX, 纯度为99.8%)、磺胺二甲基嘧啶(sulfadimidine, SDMD, 纯度为99.7%)、磺胺吡啶(sulfapyridine, SPD, 纯度为98.0%)、磺胺甲氧嘧啶(sulfamethoxypyridazine, SMPD, 纯度为98.1%)、磺胺二甲基噁唑(sulfamoxole, SMXL, 纯度为98.8%);17种标准品均购自SIGMA-ALDRICH公司。

内标:¹³C₆-磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine, SMZ, 纯度90%)英国剑桥同位素实验室提供。

磺胺类药物标准储备液的配制:精确称取17种磺胺类药物标准品各0.0100 g,用乙腈溶解并定容于10 mL棕色容量瓶中,混匀,17种药物的质量浓度均为1.0 g/L。放置于4℃冰箱中避光保存,有效期3个月。

¹³C₆-磺胺二甲基嘧啶内标溶液的配制:准确称取0.0100 g内标物,用乙腈溶解并定容于10 mL棕色容量瓶中,混匀,质量浓度为1.0 g/L,再用乙腈稀释至500 μg/L。

1.2 分析条件

液相色谱条件 色谱柱:日本资生堂公司CAPCELL PAK C₈ DD柱(150 mm × 2.0 mm i.d., 5 μm);柱温:20℃;样品温度:4℃;进样体积:10 μL。流动相A为含0.2%甲酸的水,流动相B为含0.2%甲酸的甲醇;流动相线性梯度洗脱,洗脱程序为97% A $\xrightarrow{13 \text{ min}}$ 85% A $\xrightarrow{9 \text{ min}}$ 60% A(保持3 min) $\xrightarrow{5 \text{ min}}$ 20% A $\xrightarrow{1 \text{ min}}$ 97% A(保持20 min)。

质谱条件 离子源:电喷雾电离(ESI(+));毛细管电压:3.5 kV;锥孔电压:78 V;射频透镜1(RF Lens1)电压:40 V;离子源温度:100℃;脱溶剂温度:300℃;脱溶剂气流量:450 L/h;碰撞梯度:1.9;碰撞腔真空度:0.3 Pa。各种磺胺类药物分析的质谱条件参数见表1。

1.3 样品前处理

称取10.0 g无水硫酸钠、10.0 g绞碎的鸡肉样品,置于30 mL离心管中,加入15 mL乙腈,匀质1 min,于10℃、4 000 r/min条件下离心10 min;分离上清液,残渣中再加入5.0 g无水硫酸钠,用15 mL乙腈重复提取2次;合并3次乙腈提取液,用40 mL正己烷进行液-液萃取;取下层溶液,在其中加入5 mL正丙醇,在30℃水浴上旋转蒸干,再用3.6 mL

正己烷和 0.4 mL 三氯甲烷混合液溶解,溶液用于固相萃取。

表 1 各种磺胺类药物质谱分析的条件参数
Table 1 LC-MS/MS parameters for the sulfonamide analysis

Compound ¹⁾	t_R / min	[M - H] ⁺	Daughter ions/ (m/z)	$E_{\text{Collision}}$ ²⁾ / eV
SA	4.15	173.2	156.0 132.0	9
SMD	13.87	279.3	124.1 186.1 156.0	18
SDZ	15.90	251.3	156.1 108.1 92.1	15
SPD	17.61	250.3	156.0 184.2	15
ST	18.54	256.4	156.1 108.1 92.1	19
SMR	19.72	265.3	156.0 172.1 110.1	15
SDMD	22.16	279.2	186.0 124.1 156.0	20
SMT	23.55	281.3	156.0 126.1 108.0	15
STZ	23.50	271.2	156.0 108.0 92.0	14
SMPD	23.59	281.3	156.0 126.1 108.1	15
SCP	24.93	285.2	156.0 207.1	12
SMX	25.70	254.3	156.0 108.1 92.1	13
SIX	26.72	268.2	156.0 113.1 108.1	15
SMXL	26.73	268.3	156.0 113.1 108.1	16
SDM	30.50	311.4	156.1 108.1 92.1	19
SQX	31.56	301.2	156.0 107.9	15
SNT	33.75	336.4	156.0 294.3 198.1	10
SMZ	22.13	284.5	185.8 123.9 161.2	19

1) SA: sulfanilamide; SMD: sulfisomidine; SDZ: sulfadiazine; SPD: sulfapyridine; ST: sulfathiazole; SMR: sulfamerazine; SDMD: sulfadimidine; SMT: sulfamer; STZ: sulfamethizole; SMPD: sulfamethoxypyridazine; SCP: sulfachloropyridazine; SMX: sulfamethoxazole; SIX: sulfisoxazole; SMXL: sulfamoxole; SDM: sulfadimethoxine; SQX: sulfaquinolaxine; SNT: sulfanitran; SMZ: ¹³C₆-sulfamethazine, internal standard. 2) $E_{\text{Collision}}$: collision energy.

Silica 固相萃取柱用 3 mL 正己烷活化后,加入上述溶液,用 5 mL 正己烷淋洗,再用 6 mL 甲醇-丙酮(体积比为 1:1)的混合液和 6 mL 丙酮洗脱。收集洗脱液,在微弱的氮气流下吹至近干,用初始的流动相溶液定容至 1 mL,加入 2 mL 正己烷,涡旋混合 1 min,静止 2 min,取下层液用于 LC-MS/MS 测定。

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

采用不同比例的甲醇、乙腈、水等混合溶剂体系进行一系列预实验,结果表明以不同比例的甲醇-水为流动相时仪器响应信号较高。但是采用这种流动相体系时所有的磺胺类药物几乎在同一时间被洗脱,不能达到较好的分离,这可能是由于这些化合物在中性流动相中具有相同的保留因子。在甲醇-水中加入一定量的添加剂可以改变磺胺类药物的保留因子,使 17 种磺胺类药物得到较好的分离。添加剂可能对电喷雾电离产生影响,因此分别考察了在流动相中加入 0.2% (体积分数,下同)甲酸、0.2% 乙酸、0.1% 三氟乙酸和 5 mmol/L 甲酸铵的分离效果。

实验结果表明甲醇和水中都加入 0.2% 的甲酸,方法具有较高的灵敏度和分辨率。为了找到最佳的甲酸添加量,考察了甲酸浓度对灵敏度的影响。甲酸的添加量从 0.1% 变化到 0.25% 的实验结果表明,0.2% 时的灵敏度最高,分离效率最好,酸度过高则会抑制磺胺类药物离子化。

2.2 固相萃取柱的选择

对于动物源性样品,脂肪等杂质是主要的干扰物质,由于用正己烷进行液-液萃取只能去除部分脂肪等杂质,因此需要用 SPE 法进一步净化。我们考察了硅胶、氨基、氰基等正相固相萃取柱的萃取效果,结果表明硅胶固相萃取柱的萃取效果最好,回收率较高。

2.3 固相萃取洗脱液的选择

由于 17 种磺胺类药物的极性范围较宽,所以用单一的洗脱剂很难将其完全洗脱。用不同比例的甲醇和二氯甲烷混合液分段洗脱,回收率普遍都很低。改用甲醇和丙酮混合液进行洗脱,以体积比为 1:1 的甲醇和丙酮混合液洗脱时大部分物质的回收率比较满意,再用丙酮洗脱,回收率较低的几个物质被洗脱。故选用 6 mL 体积比为 1:1 的甲醇-丙酮溶液和 6 mL 丙酮溶液作为洗脱液。

2.4 质谱条件的优化

根据磺胺类药物分子的结构特征我们选择 ESI (+) 作为电离模式,通过流动注射直接进样对各种物质的毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂温度、碰撞腔真空度、射频透镜 1 的电压、碰撞能量、质谱分辨率等条件进行了优化。

由表 1 可知,所有的磺胺类药物都有 m/z 156 特征离子,但是相对丰度不同;SMT 和 SMPD 的 [M - H]⁺ 和子离子都相同,但是它们的保留时间不同,所以很容易区分。图 1 为磺胺嘧啶的诱导解离图。

2.5 回收率、精密度、检出限及线性范围

配制 17 种磺胺类药物质量浓度分别为 1, 10, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/L}$ 且内标质量浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准溶液。以目标组分的峰面积对内标物的峰面积之比 y 对相应的质量浓度 x ($\mu\text{g/L}$) 做标准曲线。各种磺胺类药物的线性关系、相关系数、仪器检测限如表 2 所列。结果表明,各种磺胺类药物的质量浓度为 1 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 时具有较好的线性关系,相关系数大于 0.999 (SA 除外)。除 SA (40 pg) 外,仪器检测限 ($S/N = 3$) 均低于 4 pg (0.1 ~ 4 pg)。日内标准偏差 2.5% ~ 4.6%, 日间标准偏差 3.1% ~ 7.4%。

在 10 g 鸡肉中添加不同量的混合标准溶液(添加水平分别为 1, 5, 10 $\mu\text{g/kg}$), 按所选条件进行处

理和测定,得到的各种磺胺类药物的回收率、相对标准偏差(RSD)和方法检出限($n = 5$)如表 3 所示,图 2 为样品加标后的色谱图。

表 2 各种磺胺类药物的线性关系和检出限

Table 2 Linearity, detection limit of each component

Compound ¹⁾	Calibration equation ²⁾	<i>r</i>	DL ³⁾ /pg
SA	$y = 9106.3x - 4.8318$	0.9922	40
SMD	$y = 50.135x - 1.5454$	0.9991	2
SDZ	$y = 27.496x - 1.1378$	0.9990	1
SPD	$y = 84.341x - 0.1284$	0.9999	1
ST	$y = 268.7x - 0.06$	0.9997	2
SMR	$y = 100.76x + 0.4244$	0.9998	1
SDMD	$y = 131.23x + 0.4416$	~ 1	0.6
SMT	$y = 126.17x - 2.5103$	0.9973	0.1
STZ	$y = 0.0237x - 0.0259$	0.9974	0.2
SMPD	$y = 0.0057x - 0.0092$	0.9993	5
SCP	$y = 0.0089x + 0.0011$	0.9995	2.5
SMX	$y = 0.0079x + 0.004$	0.9995	0.1
SIX	$y = 0.0077x - 0.0122$	0.9995	0.3
SMXL	$y = 0.0064x - 0.0122$	0.9993	2.5
SDM	$y = 0.016x + 0.0059$	0.9998	0.6
SQX	$y = 0.0066x - 0.002$	0.9999	1.3
SNT	$y = 0.0015x + 0.0032$	0.9999	4

1) For compounds, see Table 1. 2) Linear range : 1 - 200 $\mu\text{g/L}$; y : peak area ratio of the compound and internal standard ; x : mass concentration of the compound , $\mu\text{g/L}$. 3) DL : detection limit the instrument ($S/N = 3$).

表 3 17 种磺胺类药物的加标回收率、相对标准偏差(RSD)和检出限(LOD)($n = 5$)

Table 3 Spiked recoveries, relative standard deviations (RSD) and limits of detection (LOD) of 17 sulfonamides ($n = 5$)

Compound ¹⁾	Spiked level of 1 $\mu\text{g/kg}$		Spiked level of 5 $\mu\text{g/kg}$		Spiked level of 10 $\mu\text{g/kg}$		LOD/ (ng/g)
	recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%	recovery/%	RSD/%	
SA	69.7	4.1	78.5	11.5	89.3	7.1	1.0
SMD	52.3	14.3	70.2	9.9	65.1	17.6	0.03
SDZ	86.9	11.1	86.7	6.6	74.2	5.8	0.13
SPD	121.9	3.2	113.2	4.9	99.3	4.5	0.02
ST	101.4	16.0	109.3	1.0	96.6	3.3	0.09
SMR	124.5	8.8	111.5	5.3	122.4	1.4	0.05
SDMD	119.9	14.8	112.5	2.2	106.4	11.2	0.08
SMT	59.0	4.4	86.8	4.2	60.0	13.0	0.33
STZ	118.2	13.9	120.7	2.6	123.3	6.3	0.03
SMPD	114.8	14.2	90.5	5.5	95.0	8.2	0.06
SCP	114.2	16.5	124.9	4.0	112.2	11.3	0.03
SMX	73.4	16.5	76.8	7.9	66.0	14.8	0.03
SIX	111.8	12.5	105.7	8.3	89.5	11.8	0.05
SMXL	114.8	13.8	109.9	1.0	94.6	15.1	0.05
SDM	79.1	13.2	83.1	15.4	82.6	11.0	0.06
SQX	88.6	6.3	81.5	16.2	88.0	12.8	0.3
SNT	52.5	5.3	52.4	9.6	56.8	9.1	1.0

参考文献 :

[1] Lin Haidan, Xie Shouxin, Feng Dexiong, Yang Peihui. Journal of Instrumental Analysis (林海丹, 谢守新, 冯德雄, 杨培惠. 分析测试学报), 2003, 22(1) : 94
 [2] Pecorelli I, Bibi R, Fioroni L, Galarini R. J Chromatogr A, 2004, 1032 : 23
 [3] Hela W, Brandtner M, Witek R, Schuh R. Food Chemistry, 2003, 83(4) : 601
 [4] Pan Wei, Rao Qihua, Su Desen. Chinese Journal of Chromatography (潘 蔚, 饶秋华, 苏德森. 色谱), 2004, 22 (2) : 186

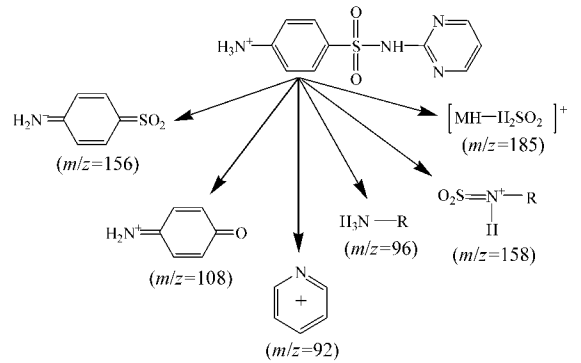


图 1 磺胺嘧啶 MH^+ 诱导解离的碎片离子

Fig.1 Proposed fragmentation scheme for collision induced dissociation of protonated sulfadiazine (SDZ)

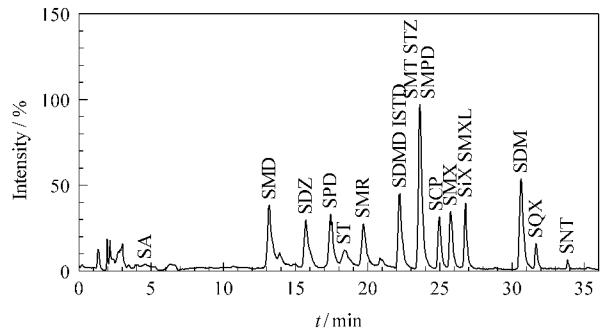


图 2 加标样品的色谱图

Fig.2 Chromatogram of spiked samples

[5] Shao Junjie, Yuan Zheneng, Nie Hongyong, Zhang Jun. Chinese Journal of Chromatography (邵俊杰, 袁智能, 聂洪勇, 张 军. 色谱), 1993, 11(6) : 373
 [6] Reeves V B. J Chromatogr B, 1999, 723 : 127
 [7] Fuh M R S, Chu S Y. Analytica Chimica Acta, 2003, 499 : 215
 [8] AOAC Official Method 983. 31
 [9] Verzegnassi L, Savoy-Perroud M-C, Stadler R H. J Chromatogr A, 2002, 977 : 77
 [10] Fuh M R S, Chan S A. Talanta, 2001, 55(16) : 1127
 [11] Fuh M R S, Chan S A, Wang H L, Lin C Y. Talanta, 2000, 52(11) : 141
 [12] Heller D N, Ngho M A, Donoghue D, Podhorniak L. J Chromatogr B, 2002, 774 : 39