

HPLC-MS 联用法测定猪肉组织中 5 种磺胺类药物的残留

范莹莹¹ 其鲁² 杨树民³

(1 中信国安盟固利电源技术有限公司 北京 102200)

(2 北京大学 北京 100871)

(3 国家体委兴奋剂检测中心 北京 100029)

摘要 建立一种用高效液相色谱与质谱联用法测定猪肉组织中磺胺类药物残留的方法,该方法检测猪肉中的磺胺类药物快速、准确。样品经 2% 的醋酸水溶液提取后通过固相萃取柱净化,用甲醇洗脱,吹干,然后用流动相 A 溶解,用 DAD 及 MS 检测器检测。采用 Agilent HC-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm) 色谱柱,以 0.3% 甲酸和 5% 甲醇的水溶液-0.3% 甲酸的甲醇溶液为流动相进行梯度洗脱。在添加水平为 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.5 mg/kg 时,对于不同的药物,回收率范围为 55.3% ~ 102.8%, 相对标准偏差在 0.79% ~ 10.4% 之间,方法的最低检出限为 0.1 ~ 0.5 ppb。通过大量的实验结果表明,该方法适用于猪肉组织中磺胺类药物的残留测定。

关键词 高效液相色谱-质谱(HPLC/MS) 磺胺类药物 猪肉

磺胺类合成抗菌药是一类抑制核酸合成的抗菌药^[1],是以对氨基苯磺酰胺为基本化学结构的一类合成抗菌药物,由于取代基的不同,产生许多不同的磺胺药,通常将其用于家禽以预防球虫病、霍乱等^[2],然而过量使用会导致食用动物产品中有残留,影响人类的健康。随着抗生素的发展,磺胺类药物的临床应用逐渐减少,目前,中国、欧盟、美国、日本等均将磺胺类药物列为动物饲养过程中限制使用的药物,其最大残留量一般为 50 ~ 100 μg/kg^[3]。

目前测定磺胺类药物残留的方法有许多种,其中高效液相色谱法(HPLC)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,选择性差,特别是在低浓度时样品基质干扰大,很难准确定性确认^[4];气相色谱-质谱法(GC-MS)虽然灵敏度高,特异性也很好,但是衍生过程复杂^[5]。本文建立一种采用高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS)检测猪肉组织中磺胺类药物残留的分析方法,该方法快速准确,灵敏度高。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

高效液相色谱-质谱仪(LC-MS):美国 Agilent 1100 series LC/MSD Trap; 样品浓缩仪:TECHNE DRIBLOCK DB-3D; 涡流混匀器:美国 Maxi Mix II; 匀浆机:德国 X520 CAT; 离心机:TDL-5-A; 电子天

平:德国赛多利斯 BS110S; 调速多用振荡器:HY-2; 高纯水发生器:美国 Milli-Q II 型。

甲醇、正己烷(色谱纯, Fisher 公司); 36% 醋酸溶液, 钨酸钠, 甲酸(分析纯, 北京化工厂); 标准品:磺胺嘧啶(Sulfadiazine)、磺胺噻唑(Sulfathiazole)、磺胺甲基嘧啶(Sulfamerazine)、磺胺甲氧唑(Sulfamethoxazole)、磺胺硫代异唑(Sulfafurazole), 均购于美国 Sigma 公司; 实验用水均为高纯水。

磺胺标准溶液配置:称取磺胺标准品各 0.001 g 左右,用 1 mL 甲醇溶解作为标准储备液备用,根据需要用流动相 A 稀释成混合标准工作溶液。

1.2 实验条件

1.2.1 液相色谱条件 色谱柱:Agilent HC-C₁₈ 4.6 × 250 mm 5 μm; 流动相 A:1.5 mL 甲酸和 25 mL 甲醇,用水定容至 500 mL; 流动相 B:1.5 mL 甲酸用甲醇定容至 500 mL, 流动相洗脱梯度(见表 1)。流速:1 mL/min; 检测波长:265 nm; 检测器:二极管阵列检测器(DAD); 进样量:20 μL。

表 1 流动相洗脱梯度

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	90	10
4	90	10
10	70	30

1.2.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源; 扫描方式:正离子模式; 喷雾器压力:30 psi; 干燥气温度:325 °C; 干燥气流量:8 L/min; 目标离子:300 m/z; 化

合物稳定度:50%;离子阱驱动水平:100%。

以上色谱及质谱条件下标准样品混和液的分

图(见图1),该条件下分离效果较好,信噪比较高,适合于以下5种磺胺类药物的分析。

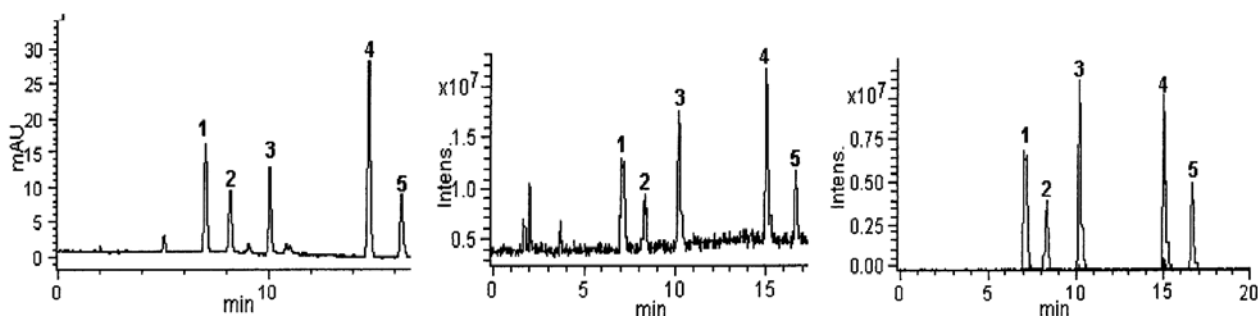


图1 5种磺胺类药物标准溶液的色谱图总离子流图及选择离子色谱图

- 1 磺胺嘧啶(Sulfadiazine); 2 磺胺塞唑(Sulfathiazole); 3 磺胺甲基嘧啶(Sulfamerazine);
4 磺胺甲氧唑(Sulfamethoxazole); 5 磺胺硫代异唑(Sulfafurazole)。

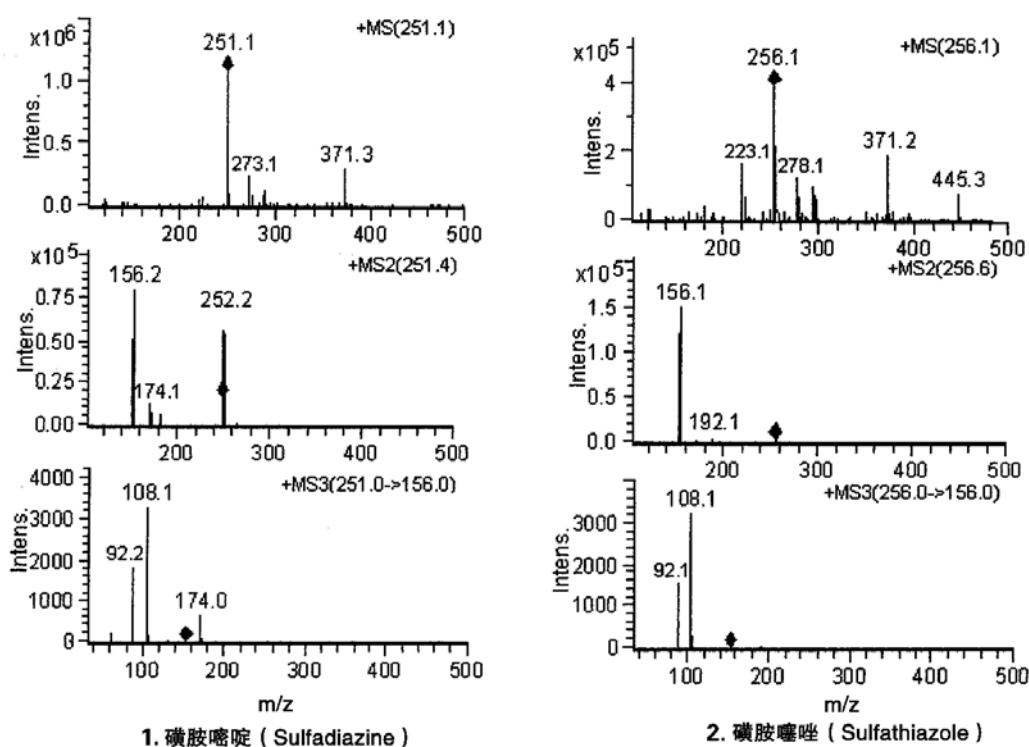
5种磺胺类药物各自的质谱棒状图、准分子离子的二级质谱图及三级质谱图(见图2),M+1峰为准分子离子峰,且丰度较高,分子中对氨基苯磺酰胺结构在S-N处发生断裂,均产生质量数为156的碎片离子,继续对碎片离子156进行三级质谱的碎裂发现,碎片离子分别为108和92,猜测为分别断掉SO和SO₂。

1.3 样品处理

称取1g猪肉(里脊肉),置于50mL的塑料离心管中,加入2%的醋酸溶液10mL,匀浆两次,每次约30s,至溶液变为乳白色牛奶状,然后加入0.5g(5%)钨酸钠,在涡流混匀器上混匀10s,至钨酸钠

溶解,然后放置振荡器上振荡10min,取下静止10min,放入离心机中在转速4200r/min下离心20min,取出上清液,在下部沉淀中再加入10mL提取液,将沉淀充分溶解,重复上述步骤,对样品进行充分提取,然后合并两次提取液,将其通过固相萃取柱。

固相萃取柱采用XAD-2填料自填入玻璃管中,柱床约2cm左右,分别将4mL甲醇和4mL水流过固相萃取柱,每次1mL,使其固相萃取柱达到净化,然后再将4mL 2%的醋酸溶液条件化固相萃取柱,每次1mL,使其充分饱和并保持柱体湿润,然后将提取液快速通过柱子,待溶液全部流出后,用4mL水



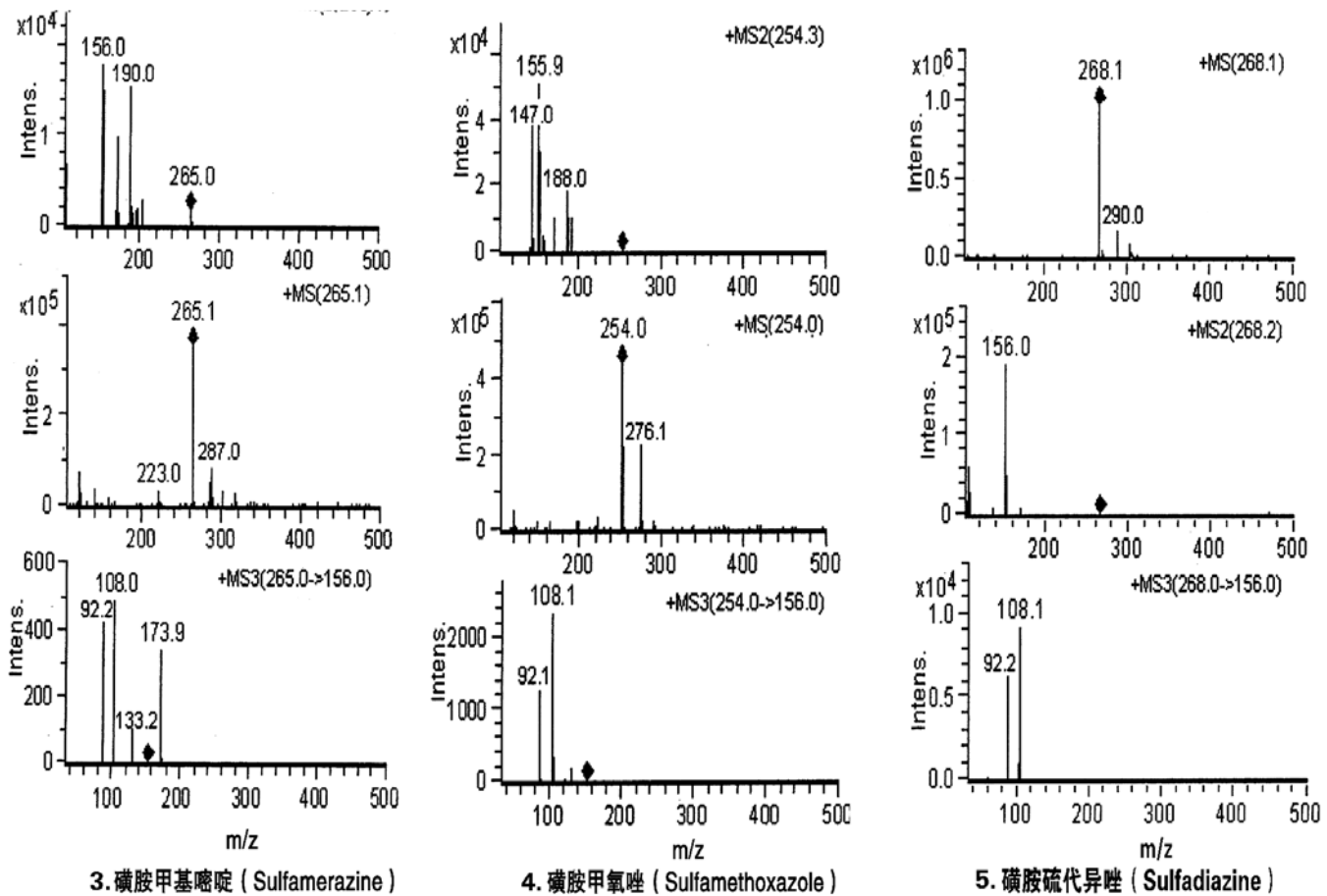


图2 5种磺胺类药物分子离子的一级、二级及三级质谱图

溶液洗柱4遍,弃去流出液,将柱子挤干。将2 mL 酸化甲醇流经萃取柱,洗脱磺胺类药物,然后用样品浓缩仪将洗脱液在氮气保护下吹干,用流动相A溶解样品待上机测定。

2 结果与讨论

2.1 蛋白沉淀剂的选择

在样品处理过程中,需要加入沉淀剂将猪肉中的蛋白沉淀,使其在上机测定中减少杂质影响,在沉淀剂的选择中,本文采用两种沉淀剂进行对比研究,即醋酸铅和钨酸钠,采用相同处理步骤进行上机测定,发现加入醋酸铅后蛋白沉淀效果较差,乳化现象严重,较难通过固相萃取柱,5种磺胺药物的加样回收率均在12%~60%之间,并且结果的重现性较差,而加入钨酸钠的回收率均在60%以上,相对较好,所以本文采用钨酸钠作为样品处理的沉淀剂。

2.2 提取液的选择

由于磺胺类药物均为两性化合物,等电点在3~5之间,所以对提取液的酸度要求比较严格,本文试验以下11种不同酸度的提取液,分别为0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、5%、7%、10%、12%、15%的醋酸溶液,发现2%的醋酸溶液作为提取液

时加样回收率最高,所以采用此浓度作为样品处理的提取液。

2.3 固相萃取柱填料的选择

研究过程中,分别采用 C_{18} (粒度为80~100 μm)、XAD-2两种填料进行实验,结果发现,用粒度为100~200 μm 的 C_{18} 填料填充的固相萃取柱对磺胺药物保留作用很差,加样回收率仅在10%左右,而XAD-2填充的固相萃取柱对磺胺类药物的保留作用相对较好,所以选择XAD-2为固相萃取的填料。

表2 各种磺胺药物的保留时间和提取离子及定量离子

药物名称	提取离子	定量离子	保留时间/ min
磺胺嘧啶	251	251	7.3
磺胺噻唑	256	256	8.5
磺胺甲基嘧啶	265	265	10.4
磺胺甲氧唑	254	254	15.1
磺胺硫代异唑	268	268	16.8

2.4 各种磺胺药物的保留时间

下表为采用质谱检测样品时,所提取的离子及用来定量的离子和各种磺胺药物的保留时间。

2.5 方法的线性范围及最低检出限

本文对方法的线性范围进行实验,分别利用高效液相色谱及质谱完成,最低检出限是用质谱方法在信噪比为3时计算出来,具体数据(见表3)。

表3 6种磺胺的线性范围、线性方程和检出限

药物名称	线性范围/ng	线性方程	相关系数	检出限/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
磺胺嘧啶	1.1~220	DAD: $Y = 5.0881x + 0.4867$	$R = 0.9998$	0.5
		质谱: $Y = 142.71x + 623.63$	$R = 0.9997$	
磺胺噻唑	0.9~180	DAD: $Y = 4.1226x + 1.2407$	$R = 0.9997$	0.1
		质谱: $Y = 162.56x + 550.84$	$R = 0.9998$	
磺胺甲基嘧啶	1.3~260	DAD: $Y = 3.4243x + 0.3811$	$R = 0.9997$	0.5
		质谱: $Y = 188.56x + 1008.4$	$R = 0.9998$	
磺胺甲氧唑	1.2~240	DAD: $Y = 6.2874x - 2.6002$	$R = 0.9997$	0.1
		质谱: $Y = 180.38x + 1321.5$	$R = 0.9995$	
磺胺硫代异唑	1.2~240	DAD: $Y = 3.9861x - 2.9504$	$R = 0.9996$	0.3
		质谱: $Y = 127.12x + 714.46$	$R = 0.9998$	

2.6 方法的回收率和精密度

采用不含磺胺类药物的猪肉样品进行添加回收率和精密度实验,添加水平分别为 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 及 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 三种,具体数据见表4。

表4 猪肉中磺胺药添加平均回收率(%)和精密度结果

药物名称	添加量 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		添加量 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		添加量 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	平均回收率	RSD (n=3)	平均回收率	RSD (n=4)	平均回收率	RSD (n=10)
磺胺嘧啶	79	9.81	71.5	7.7	62.9	7.71
磺胺噻唑	63.7	8.06	53.3	8.17	75.9	4.17
磺胺甲噻	73.7	5.14	51.8	9.95	73.4	10.4
磺胺甲氧唑	56.7	2.7	56	5.35	78	4.43
磺胺硫代异唑	66.7	4.99	56.8	8.06	82.2	0.79

3 结论

动物组织是一种很复杂的基质,其中微量的磺胺类药物的检测比较困难,并且磺胺类药物又是两性化合物,其等电点很不容易把握,本研究通过一系列的手段,得到一种能够快速、准确地测定猪肉组织中磺胺类药物的方法,经过大量实验,证明该方法的

有效性及可靠性。

参考文献

- Chiara Cavaliere, Roberta Curini, Antonio Di Corcia et al. A Simple and Sensitive Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Confirmatory Method for Analyzing Sulfonamide Antibacterials in Milk and Egg (J) Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51: 558~566
- Neu, H. C. The crisis in antibiotic resistance. Science 1992, 257: 1064
- Abian, J., Churchwell, M. I., Korfmacher, W. A. High-performance liquid chromatography-thermospray mass spectrometry of ten sulfonamide antibiotics. Analysis in milk at the ppb level (J) J Chromatogr 1993, 629: 267
- Sheth, H. B., Yaylayan, V. A., Low, N. H., Stiles, M. E., & Sporns, P. J. Agric Food Chem 1990, 38: 1125~1130
- Schwaiger, I., & Schuch, R. Deutsche Lebensmittel Rundschau 2000, 96: 93~98

Determination of 5 sulfonamides in swine tissues by HPLC-MS

Fan Yingying¹, Qi Lu², Yang Shumin³

(1 CITIC GUOAN MENG GULI Powder Source Technology Co. LTD, Beijing 102200, China)

(2 Peking University, Beijing 100871, China)

(3 Doping Control Center of China, Beijing 100029, China)

Abstract A simple and rapid method was developed for the determination of 5 sulfonamides in swine tissues by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. The proposed method is sensitive and selective. The samples were extracted with 2% acetic acid, purified with solid-phase extraction column, the samples were detected by DAD and MSD. The separation was performed on a Agilent HC-C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm) column with a gradient system of water (containing 0.3% formic acid and 5% methanol)-methanol (containing 0.3% formic acid) as mobile phases. At spiked levels are 0.1 mg/kg, 0.2 mg/kg, 0.5 mg/kg, the limits of detection of the method are 0.1~0.5 ppb for the various antibiotics and the recoveries of the spike experiment is from 55.3% to 102.8%, precisions are between 0.79%~10.4%. The results showed that the method is suitable for the determination of residues of sulfonamide in swine tissues.

Key words High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC/MS) Sulfonamide Swine tissues