

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中磺胺类药物残留量

杨 梅, 孙 思, 王安波, 汪 俭, 洪之国, 刘文锋\*

(黔东南州农产品质量安全检测中心, 凯里 556000)

**摘 要:** **目的** 建立检测猪肉中磺胺氯哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺嘧啶及磺胺吡啶等药物残留的超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)。**方法** 样品采用乙腈提取后, 浓缩提取物用正己烷脱脂净化, 正离子多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)测定, 外标法定量。**结果** 磺胺类药物在 5~200  $\mu\text{g/L}$  质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数  $R^2$  均大于 0.996。5 种磺胺的检出限均为 5  $\mu\text{g/kg}$ , 在添加量为 10.0~150.0  $\mu\text{g/kg}$  时回收率为 90%~105%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)  $\leq 7\%$ 。**结论** 建立的方法精密度高、准确度较高, 选择性好, 操作快速、简便, 能对猪肉中的磺胺类药物残留进行定性和定量分析。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 磺胺类; 残留; 猪肉

## Determination of sulfonamides residues in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YANG Mei, SUN Si, WANG An-Bo, WANG Jian, HONG Zhi-Guo, LIU Wen-Feng\*

(Examining and Inspection Center for Agricultural Products Safety and Quality of Qiandongnan Prefecture, Kaili 556000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for rapid detection of 5 sulfonamides, including sulfachloropyridazine, sulfamonomethoxine, sulfathiazole, sulfadiazine and sulfapyridine in pork by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** After the extraction of acetonitrile, the concentrated extract was purified with hexane, and the positive ion multiple reaction monitoring (MRM) was measured and the external standard method was quantified. **Results** Sulfonamides had good linear relationships within the range of 5~200  $\mu\text{g/L}$ , with correlation coefficients more than 0.996. The limits of detection (LODs) were 5  $\mu\text{g/kg}$ , and the recovery rates were 90%~105% with relative standard deviations (RSDs) less than 7% when the spiked amounts were 10.0~150.0  $\mu\text{g/kg}$ . **Conclusion** The established method is accurate, selective, rapid and simple, which can be used for qualitative and quantitative analysis of sulfonamides residues in pork. This method can detect the sulfonamides residues in pork, with a better precision, higher accuracy, better specificity, and the result is satisfied.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; sulfonamides; residue; pork

\*通讯作者: 刘文锋, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全检测。E-mail: 952853352@qq.com

\*Corresponding author: LIU Wen-Feng, Agricultural Products Safety and Quality, Examining and Inspection Center for Agricultural Products Safety and Quality of Qiandongnan Prefecture, Kaili 556000, China. E-mail: 952853352@qq.com

1 引 言

磺胺类药物是具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称,被广泛用于畜牧业和兽医临床中预防和治疗食源性动物疾病。磺胺类药物在体内的作用时间和代谢时间较长,长期或过度使用可能导致在人体中蓄积,对人体机能产生危害,破坏人的造血系统,造成溶血性贫血,并导致病原体产生抗药性<sup>[1,2]</sup>。近年来,动物源食品中磺胺类药物残留量超标现象十分严重,其残留问题已经引起国际上的高度重视,世界各国对其残留限量均有严格的规定。美国及欧盟等国家规定动物性食品中磺胺总量的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)为 0.1 mg/kg<sup>[3]</sup>,我国农业部 2002 年发布的 235 号公告也明确规定在动物性食品中的磺胺总量的 MRL 为 0.1 mg/kg<sup>[4]</sup>。因此加强对动物源性食品中磺胺类残留的检测监控和检测方法的研究,提高检测结果的准确性是非常必要的。

目前,磺胺类药物残留的检测方法主要有酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[5]</sup>、气相色谱法(gas chromatography, GC)<sup>[6]</sup>、气相色谱-质谱联用法(gas chromatograph-mass spectrometer, GC-MS)<sup>[7]</sup>、液相色谱法(liquid chromatography, LC)<sup>[8,9]</sup>、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[10-13]</sup>等。各种方法的检出限和鉴定的简捷方便程度逐渐成为关注的焦点。LC-MS/MS 因其良好的检测限和较高的精确性等特点而被各检测部门广泛采用。

考虑到超高效液相色谱法-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)的高灵敏度、高效率、精确性<sup>[14,15]</sup>,本研究采用乙腈提取样品中的磺胺类残留,浓缩提取物用正己烷脱脂净化,用超高效液相色谱-三重四级杆质谱联用仪测定,采用外标法定量,建立猪肉中磺胺类药物残留的快速检测方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

UPLC H-Class/TQ-S Micro 超高效液相色谱/三重四级杆质谱联用仪(美国 Waters 公司);氮气发生器(英国 Peak 公司);RE2000B 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);T18 分散机(德国 IKA 公司);TDZ5-WS 离心机(湖南迈克实验仪器有限公司);SCQ-151104E 超声波清洗器(上海声彦超声波仪器有限公司)。

磺胺氯哒嗪(sulfachloropyridazine, SCP)、磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMM)、磺胺噻唑(sulfathiazole, ST)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SD)及磺胺吡啶(sulfapyridine, SPD)(浓度 100 μg/mL,农业部环境保护科研监测所);甲

醇、乙腈(色谱纯,美国 TEDIA 公司);甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司);无水硫酸钠(分析纯,天津科密欧公司);水(超纯水,威立雅水处理技术(上海)有限公司)。

2.2 标准溶液配制

标准品储备液:精密量取磺胺氯哒嗪、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺噻唑、磺胺嘧啶及磺胺吡啶(100 μg/mL)1 mL 置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得相应磺胺标准储备液(10 μg/mL),保质期 6 个月。

混合标准品工作液:精密量取上述磺胺标准储备液(10 μg/mL)各 1 mL 置 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,作为磺胺混合标准工作储备液溶液(1 μg/mL)。

2.3 样品处理

2.3.1 样品制备

取样品肌肉组织 400 g,制成不大于 2.0 cm×2.0 cm×2.0 cm 方块,直接搅碎,高速匀浆机匀浆,装入样品瓶中,-20 ℃保存。

2.3.2 样品提取

精密称取(5±0.01) g 样品,置于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈,匀质提取 2 min,再加入 10 g 无水硫酸钠,立即剧烈振摇,4000 r/min 离心 5 min,上清液转移至 50 mL 比色管中。残渣再加入 20 mL 乙腈,重复上述操作,合并全部上清液至 50 mL 比色管中,用乙腈定容至 50 mL。摇匀后移取 20 mL 乙腈提取液,用 10 mL 正己烷除脂,弃掉上层正己烷,再加 10 mL 正己烷涡旋混合 30 s,静置分层,弃去上层正己烷,从中精密分取 10 mL 乙腈提取液,45 ℃氮吹至干,1 mL 乙腈-水(50:50, V:V)溶解残渣,超声 5 min,以 13000 r/min 离心 5 min,过 0.22 μm 滤膜,上机检测。

2.4 色谱条件

采用 ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);柱温 30 ℃;流动相为乙腈+0.1%甲酸水溶液(V:V);梯度洗脱模式;流速 0.3 mL/min;进样量 2 μL。具体参见表 1。

表 1 磺胺类药物洗脱梯度  
Table 1 Elution gradient of sulfonamides

| 时间(min) | 流速(mL/min) | 乙腈(%) | 0.1%甲酸水(%) |
|---------|------------|-------|------------|
| 0       | 0.3        | 5     | 95         |
| 2.0     | 0.3        | 15    | 85         |
| 5.0     | 0.3        | 40    | 60         |
| 7.0     | 0.3        | 95    | 5          |
| 7.1     | 0.3        | 5     | 95         |
| 9.0     | 0.3        | 5     | 95         |

2.5 质谱条件

采用电喷雾离子源; 正离子扫描, 多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 脱溶剂温度 500 ℃, 脱溶剂气氮气流速 1000 L/h, 离子源温度 150 ℃, 锥孔气流量 50 L/h, 毛细管电压 3.0 kV, 碰撞气为氩气。其它质谱参数见表 2。

3 结果与分析

3.1 前处理条件优化

采用标样添加法, 在空白基质样品中添加浓度为 10 μg/kg 的标准品, 考察甲醇、乙腈、乙酸乙酯作为提取剂提取猪肉中磺胺类药物, 结果发现乙腈具有沉淀蛋白的作用, 极性适中, 有助于提高目标物的电离效率, 提取也更为完全, 回收率最高, 是提取磺胺类药物的合适溶剂。

提取时, 比较了称样后立即加入无水硫酸钠和第一次乙腈提取后加入无水硫酸钠, 结果发现前者所测结果偏低, 特别是在批量做样时更为明显, 可能是因为混匀力度不到或者混匀不及时, 无水硫酸钠遇到样品和乙腈中的水分迅速结块, 加之将部分样品被包裹在无水硫酸钠结块中, 造成提取不充分。反之, 若在样品用乙腈匀质提取后再加入无水硫酸钠, 并且立即剧烈振摇, 造成的损失会明显减少。

除脂时, 比较了提取液旋蒸浓缩后除脂和先除脂再氮吹 2 种方式, 结果发现提取液旋蒸浓缩后除脂方式其检测值偏低。可能是因为鸡心瓶旋蒸至干后, 鸡心瓶表面积较大, 样品多附着在瓶壁上, 加入 1 mL 流动相溶解难以充分溶解样品, 造成损失; 除脂后, 定容体积会发生改变, 造成样品浓度发生改变, 结果不准确。因此我们采用的是在第一次分取 20 mL 提取液时, 用正己烷除脂, 除脂后精密分取 10 mL 氮吹, 再溶解上机检测, 此法最大限度减少了因除脂造成的损失。

3.2 色谱条件优化

比较了甲醇-水、甲醇-0.1%甲酸水、乙腈-水、乙腈-0.1%甲酸水、甲醇-0.03%甲酸铵水、乙腈-0.03%甲酸铵水对目标物的色谱峰及离子化的影响, 结果发现乙腈-0.1%甲酸水、乙腈-0.03%甲酸铵水作为流动相对 5 种化合物的分离度较好, 峰形较好, 且目标化合物的响应较高。UPLC-MS/MS 仪器管路较细, 色谱柱粒径小, 采用缓冲盐作为流动相容易造成仪器堵塞, 所以选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

3.3 质谱条件优化

将磺胺分别配成 100 μg/L 的标准溶液, 不经色谱柱, 直接质谱进样, 进行母离子扫描和子离子扫描, 通过自动和手动调谐相结合, 优化二级碎片离子信息, 获得定性离子和定量离子最佳质谱条件, 具体见表 2。

3.4 基质标准曲线绘制

实验采用基质匹配标准曲线消除基质效应, 称取 (5±0.01) g 空白样品基质于 50 mL 离心管中, 称取 8 份, 按 2.3.2 项样品提取进行操作制备得到空白基质溶液。按浓度 5、10、50、100、150、200 ng/mL 的系列空白基质标准溶液, 以标准溶液质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。5 种磺胺类药物的浓度在 5~200 μg/L 范围内时, 其线性方程, 相关系数见表 3。

3.5 准确度和精密度试验

采用基质匹配标准溶液-外标法定量, 取猪肉空白样品基质(5±0.01) g, 分别添加 3 个不同浓度的磺胺类化合物, 加标水平 10、50 和 150 μg/kg, 按照 2.3 的方法进行操作, 每个加标水平重复 6 次, 结果如表 3。磺胺类标准溶液 MRM 色谱图见图 1, 空白样品加标 MRM 图见图 2。

表 2 磺胺类药物的质谱参数  
Table 2 Mass parameters of sulfonamides

| 化合物名称   | 离子对( <i>m/z</i> ) | 定量离子对( <i>m/z</i> ) | 锥孔电压(V) | 碰撞能量(eV) |
|---------|-------------------|---------------------|---------|----------|
| 磺胺氯哒嗪   | 285>92            | 285>156             | 20      | 28       |
|         | 285>156           |                     |         | 15       |
|         | 281>92            |                     |         | 31       |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 281>156           | 281>156             | 35      | 22       |
|         | 281>215           |                     |         | 18       |
|         | 256>92            |                     |         | 25       |
| 磺胺噻唑    | 256>156           | 256>156             | 31      | 15       |
|         | 251>92            |                     |         | 27       |
| 磺胺嘧啶    | 251>156           | 251>156             | 30      | 15       |
|         | 250>108           |                     |         | 25       |
| 磺胺吡啶    | 250>156           | 250>156             | 33      | 16       |
|         |                   |                     |         |          |

表 3 5 种化合物的线性方程、相关系数、加标回收率和相对标准偏差( $n=6$ )  
Table 3 Linear equations, correlation coefficients, spiked recoveries and relative standard deviations (RSDs) of 5 kinds of compounds ( $n=6$ )

| 化合物     | 保留时间(min) | 线性方程                 | 相关系数( $R^2$ ) | 加标浓度( $\mu\text{g/kg}$ ) | 回收率(%) | RSD(%) |
|---------|-----------|----------------------|---------------|--------------------------|--------|--------|
| 磺胺氯哒嗪   | 5.71      | $Y=25.5927X+78.2971$ | 0.9984        | 5                        | 83.45  | 5.78   |
|         |           |                      |               | 10                       | 92.07  | 3.50   |
|         |           |                      |               | 50                       | 100.93 | 2.84   |
|         |           |                      |               | 150                      | 93.40  | 3.07   |
| 磺胺间甲氧嘧啶 | 5.49      | $Y=38.6143X+101.226$ | 0.9977        | 5                        | 81.68  | 7.26   |
|         |           |                      |               | 10                       | 91.17  | 5.63   |
|         |           |                      |               | 50                       | 99.15  | 3.68   |
|         |           |                      |               | 150                      | 90.11  | 2.11   |
| 磺胺噻唑    | 4.12      | $Y=41.4486X+139.948$ | 0.9974        | 5                        | 80.51  | 6.84   |
|         |           |                      |               | 10                       | 98.67  | 2.49   |
|         |           |                      |               | 50                       | 99.71  | 2.46   |
|         |           |                      |               | 150                      | 91.18  | 2.64   |
| 磺胺嘧啶    | 3.75      | $Y=19.5655X+90.2267$ | 0.9993        | 5                        | 82.42  | 6.42   |
|         |           |                      |               | 10                       | 98.27  | 4.14   |
|         |           |                      |               | 50                       | 96.34  | 2.48   |
|         |           |                      |               | 150                      | 100.25 | 2.55   |
| 磺胺吡啶    | 4.23      | $Y=19.8381X+89.1036$ | 0.9961        | 5                        | 81.78  | 6.15   |
|         |           |                      |               | 10                       | 103.47 | 3.66   |
|         |           |                      |               | 50                       | 94.92  | 6.03   |
|         |           |                      |               | 150                      | 96.86  | 2.25   |

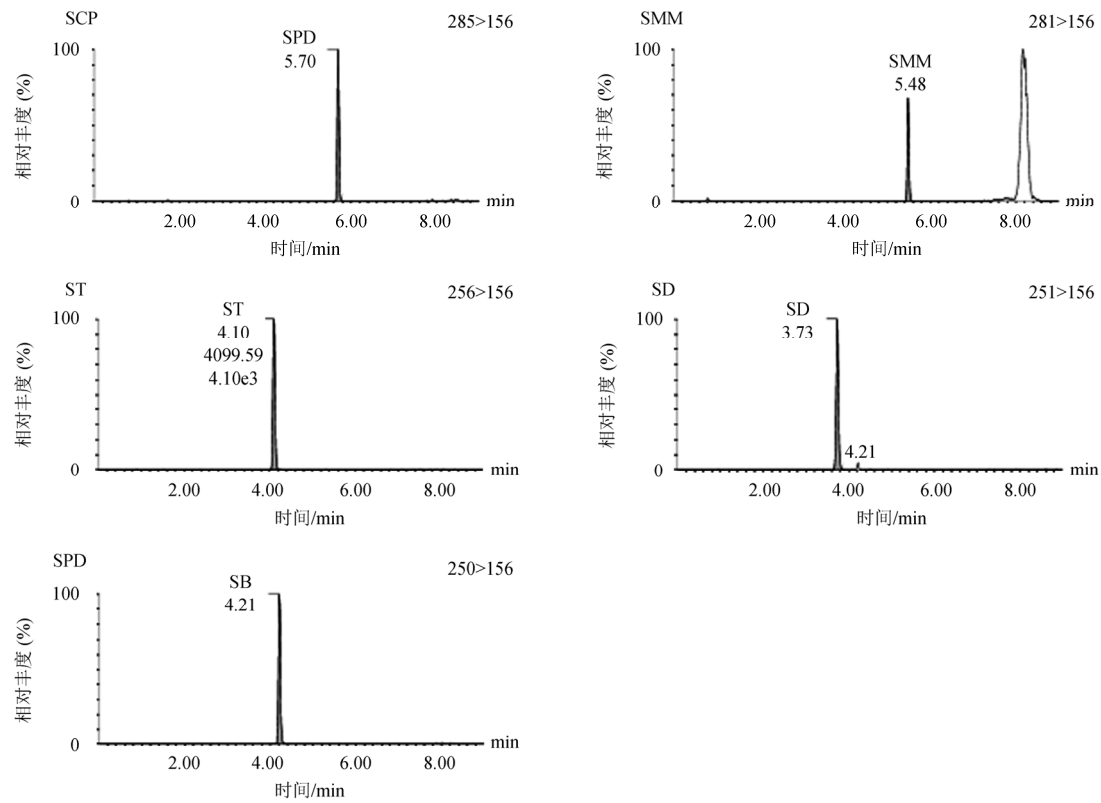


图 1 磺胺类标准溶液 MRM 色谱图(100 ng/mL)  
Fig. 1 MRM chromatograms of sulfonamides standard solution (100 ng/mL)

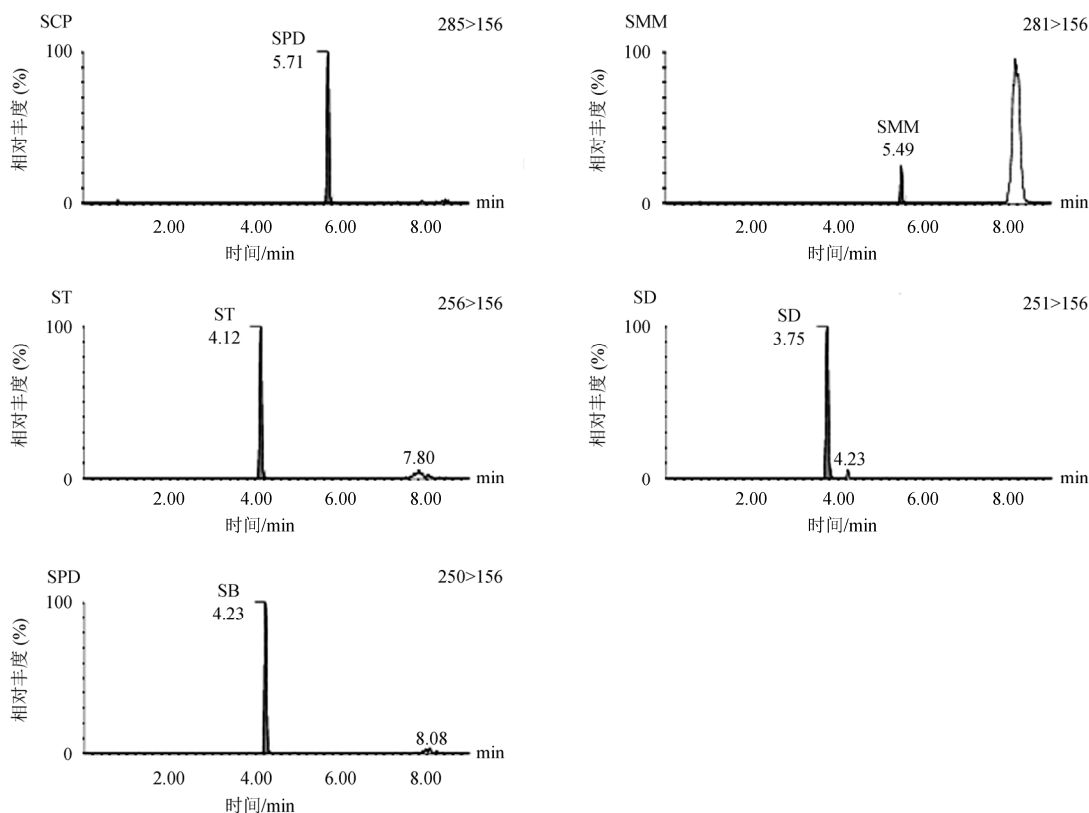


图2 空白样品加标 MRM 色谱图(50 µg/kg)

Fig. 2 MRM chromatograms of spiked blank samples (50 µg/kg)

从表3中可以看出,猪肉空白基质样品在10、50、150 µg/kg 3个不同浓度的磺胺类药物,进行添加回收加标试验,回收率为90%~105%之间,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)≤7%。说明该方法对猪肉中磺胺类药物残留的测定均有良好的准确度和精密度,符合残留分析的要求。

### 3.6 检出限

以信噪比  $S/N=3$  确定5种磺胺类药物的检出限,以信噪比  $S/N=10$  确定其定量下限。采用加标回收进行验证,符合一定的准确度和精密度要求的最低浓度,确定根据磺胺类药物残留限量要求,进行加标回收试验。试验结果表明,当添加浓度为5 µg/kg时,其信噪比  $S/N \geq 3$ ,5种磺胺类药物的检出限为5 µg/kg,当添加浓度为10 µg/kg时,其信噪比  $S/N \geq 10$ ,可以确定为该方法的定量下限为10 µg/kg。

### 3.7 样品测定

采用优化后的前处理方法和分析条件对所抽的50批猪肉样进行磺胺类药物残留检测,其中5批样品有检出但均未超过农业部235号公告中磺胺类残留限量100 µg/kg的规定,其残留量为10~30 µg/kg。

## 4 结论

本研究是采用乙腈提取样品中的磺胺类药物残留,

浓缩提取物用正己烷脱脂净化,用UPLC-MS/MS测定,采用外标法定量。优化后的方法提取效率高、净化效果好,不需固相萃取柱净化,节约成本,提高工作效率。方法能对猪肉中的磺胺类药物残留进行定性和定量分析,方法具有较高的回收率、良好的精密度、较高准确度,选择性好,操作快速、简便,满足实际工作要求。

### 参考文献

- [1] Galeano DT, Guiberteau CA, Salinas F. Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography [J]. Anal Lett, 1990, 23(4): 607-616.
- [2] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析[M]. 上海:上海科学技术出版社,2002.  
Li JS, Qiu YM, Wang C. Veterinary drug residue analysis [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002.
- [3] 杨秀娟,张曦. 磺胺二甲嘧啶残留检测方法的研究进展[J]. 中国动物保健, 2004(11): 17-18.  
Yang XJ, Zhang X. Research progress of determination of sulfamethazine residue [J]. Chin Anim Health, 2004(11): 17-18.
- [4] 农业部兽医局. 中华人民共和国农业部公告第235号[EB/OL]. [2008-03-04]. [http://www.moa.gov.cn/zwl/m/nybz/200803/t20080304\\_1028649.htm](http://www.moa.gov.cn/zwl/m/nybz/200803/t20080304_1028649.htm)  
Department of Veterinary Medicine of the Ministry of Agriculture. Announcement. No. 235th of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China [EB/OL]. [2008-03-04]. <http://www.moa.gov.cn/zwl/m/>

- nybz/200803/t20080304\_1028649.htm
- [5] SN/T 1960-2007 进出口动物源性食品中磺胺类药物残留量的检测方法 酶联免疫吸附法[S].
- SN/T 1960-2007 Screening method of sulfonamide residues in animal original food for import and export Enzyme linked immunosorbent assay [S].
- [6] 高进. 毛细管气相色谱法测定蜂蜜中磺胺噻唑残留量[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 1997, 19(4): 393-394.
- Gao J. Determination of sulfathiazole residues in honey by capillary gas chromatography [J]. J Hubei Univ (Nat Sci Ed), 1997, 19(4): 393-394.
- [7] 赵晓凤, 杨中. 气相色谱-串联质谱法检测猪肉组织中的磺胺二甲嘧啶残留量[J]. 饲料工业, 2007, 28(2): 54-57.
- Zhao XF, Yang Z. Detection sulfadimidine residue in the pork by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Feed Ind. 2007, 28(2): 54-57.
- [8] 黄冬梅, 黄宣运, 顾润润, 等. 柱后衍生高效液相色谱法测定虾中 14 种磺胺类药物残留量[J]. 色谱, 2014, 32(8): 874-879.
- Huang DM, Huang XY, Gu RR, *et al.* Determination of 14 sulfonamide residues in shrimps by high performance liquid chromatography coupled with post-column derivatization [J]. Chin J Chromatogr, 2014, 32(8): 874-879.
- [9] Maudens KE, Zhang GF, Lambert WE. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection [J]. Chromatogr A, 2004, 1047(1): 85-92.
- [10] 徐慧, 陈燕, 王柯, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中 17 种磺胺类药物的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2727-2734
- Xu H, Chen Y, Wang K, *et al.* Simultaneous determination of 17 kinds of sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2727-2734.
- [11] 杜玥, 杨慧元, 徐伟东. 液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 23 种磺胺及其增效剂残留[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(3): 471-478.
- Du Y, Yang HY, Xu WD. Liquid chromatography combined with tandem-mass spectrometry for multiresidue determination of sulfonamides and the potentiator in meat [J]. Chin J Pharm Anal, 2010, 30(3): 471-478.
- [12] 魏云计, 朱臻怡, 冯民, 等. 液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中磺胺及其增效剂残留量[J]. 肉类研究, 2015, 30(8): 22-27.
- Wei YJ, Zhu ZY, Feng M, *et al.* Determination of residues of 22 sulfonamides and one sulfonamide potentiator in chickens by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Meat Res, 2015, 30(8): 22-27.
- [13] Shao B, Dong D, Wu YN, *et al.* Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2005, 546(2-8): 174-181.
- [14] 冯楠, 路勇, 姜洁, 等. QuEChERS 超高效液相色谱串联质谱法快速筛查食品中 73 种有毒有害物质[J]. 食品科学, 2013, 34(16): 214-220.
- Feng N, Lu Y, Jiang J, *et al.* Rapid screening of 73 toxic and harmful substances in foods by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry with QuEChERS [J]. Food Sci, 2013, 34(16): 214-220.
- [15] Dong MF, Si WS, Jiang KQ, *et al.* Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction sorbents for simultaneous determination of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A. 2015, 1423: 177-82

(责任编辑: 姜 珊)

## 作者简介



杨 梅, 农艺师, 研究方向为农产品质量安全检测。  
E-mail: 510080988@qq.com



刘文锋, 研究员, 研究方向为农产品质量安全检测。  
E-mail: 952853352@qq.com