

高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡脂肪中磺胺嘧啶、甲氧苄啶的残留量

李文辉¹, 李 建², 孙志文^{1*}

(1. 北京市兽药监察所, 北京 102600; 2. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037)

摘 要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)同时测定鸡脂肪中磺胺嘧啶、甲氧苄啶的残留量的方法。**方法** 样品经乙腈 2 次提取, 以乙腈和 0.1% 甲酸水溶液为流动相进行溶解后, 用正己烷 2 次脱脂, 过滤膜后用于液相色谱串联质谱仪测定, 基质添加标准溶液外标法定量。**结果** 0.5~100 ng/mL 的浓度范围内磺胺嘧啶、甲氧苄啶色谱峰面积与浓度呈良好线性相关, 相关系数均大于 0.99; 方法定量限为 1.0 μg/kg; 鸡脂肪样品中磺胺嘧啶、甲氧苄啶在 1.0~200.0 μg/kg 添加水平内的平均回收率在 66.3%~97.5% 之间, 批内批间相对标准偏差均小于 20%。**结论** 该方法回收率满足残留检测要求, 且方法的重现性良好, 满足国内外兽药残留相关法规规定。

关键词: 鸡脂肪; 磺胺嘧啶; 甲氧苄啶; 高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim residues in chicken fat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Wen-Hui¹, LI Jian², SUN Zhi-Wen^{1*}

(1. Beijing Institute of Veterinary Drugs Control, Beijing 102600, China; 2. China Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim residues in chicken fat by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted twice with acetonitrile, dissolved in acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solution as mobile phases, degreased twice with *n*-hexane, filtered through a membrane and used for determination by liquid chromatography tandem mass spectrometry, and quantified by external standard method with matrix addition. **Results** In the concentration range of 0.5–100 ng/mL, the chromatographic peak area of sulfadiazine and trimethoprim showed a good linear correlation with the concentration, and the correlation coefficients were all greater than 0.99 and limit of quantity was 1.0 μg/kg. The average recoveries of sulfadiazine and trimethoprim in chicken fat samples at the addition level of 1.0 to 200.0 μg/kg were 66.3%–97.5%, and the relative standard deviations within the batch and between batches were less than 20%. **Conclusion** The recovery rate of this method meets the requirements for residue detection, and this method has good reproducibility, which meets the relevant domestic and foreign veterinary drug residue regulations.

KEY WORDS: chicken fat; sulfadiazine; methoxil; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

*通讯作者: 孙志文, 高级兽医师, 主要研究方向为畜禽产品兽药残留检测。E-mail: sunzw673@163.com

*Corresponding author: SUN Zhi-Wen, Senior Veterinarian, Beijing Institute of Veterinary Drugs Control, 19 Xiangrui Street, Daxing District, Beijing 102600, China. E-mail: sunzw673@163.com

1 引言

磺胺嘧啶是具有广谱及较强抗菌活性的药物, 对革兰阳性及阴性菌均有抑制作用, 抗菌机制是通过与对氨基苯甲酸竞争细菌的二氢叶酸合成酶, 导致细菌体内叶酸合成受阻而使细菌的生长、繁殖受挫。甲氧苄啶是抗菌增效剂的一种, 属于二氢氨基嘧啶类药物, 它干扰细菌的叶酸代谢, 阻止细菌菌体蛋白合成中的二氢叶酸还原成四氢叶酸, 进而影响菌体合成去氧核糖核酸、核糖核酸、菌体蛋白等, 使细菌生长和繁殖不能正常进行^[1]。与此同时, 磺胺类药物利用其结构与对氨基苯甲酸相似, 可以竞争二氢叶酸合成酶, 抑制二氢叶酸的合成。所以经常将磺胺类与甲氧苄啶合用, 达到抗菌增效的效果。2000 年, 大肠杆菌对甲氧苄啶的耐药率在一些研究中达到 70%以上, 表明食品动物细菌耐药性的增长与兽医临床抗菌药的持续和大剂量的使用有关^[2]; 甲氧苄啶可以引起骨髓微核抑制和其他的不良反应^[3], 2 种药物若在动物源性食品中残留, 人类在食用后就可能在人体内形成蓄积, 对身体造成很大的危害。

为了控制磺胺和甲氧苄啶的使用, 中国、欧盟等国家和组织对它们的最高残留限量做出了规定, 我国农业农村部 2019 年颁布的 GB31650-2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》^[4], 对磺胺类药物的规定是所有食品动物中脂肪的最大残留限量 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 对甲氧苄啶的规定是禽的肌肉、皮脂、肝脏、肾脏中的最大残留限量 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 并且规定日允许量为 0~4.2 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}/\text{d}$ 。目前磺胺类药物的检测方法主要有: 酶联免疫法^[5]、液相色谱法^[6-9]、液相色谱串联质谱法^[10-14], 甲氧苄啶的检测方法主要是液相色谱法^[15], 单独检测磺胺嘧啶或者甲氧苄啶的方法比较多, 同时进行动物源性 2 种药物的液相色谱-串联质谱方法较少, 并且灵敏度不够高, 尤其是鸡脂肪组织中 2 种药物检测的方法鲜有报道。

现今食品安全问题已经成为与人们生活密切相关的问题, 动物性食品中抗生素等有毒有害物质一旦超过限量, 将严重威胁人类的身体健康。因此, 本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法 (high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) 同时测定鸡脂肪中甲氧苄啶和磺胺嘧啶的检测方法, 以期方便日常检测工作, 帮助检测体系的建立。

2 材料与方法

2.1 仪器

Waters Xevo-TQ-XS 高效液相色谱串联质谱仪(美国 Waters 公司); PB602-N 电子天平(瑞士 Mettler 公司); CF16RN 高速冷冻离心机(日本 HITACHI 公司); 氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司); MS 3 basic 涡旋混合器水平振荡器(德国 IKA 公司); 溶剂过滤器(美国 PALL 公

司); Milli-Q academic 超纯水仪(美国 Millipore 公司); 微量加样器(德国 Eppendorf 公司)。

2.2 试剂

磺胺嘧啶(99.1%)、甲氧苄啶标准品(99.2%)(德国 Dr.Ehrenstorfer 公司); 甲醇、乙腈、甲酸(质谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 正己烷(分析纯, 北京化工试剂厂)。所用水为超纯水。

2.3 标准溶液配制

分别精密称取甲氧苄啶、磺胺嘧啶标准品约 10 mg, 用甲醇溶解, 转移至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成 1 mg/mL 磺胺嘧啶、甲氧苄啶的标准储备液; 准确吸取 0.1 mL 标准储备液至另一 10 mL 容量瓶中, 用乙腈+0.1%甲酸水溶液(20:80, V:V) 溶解并稀释至刻度, 配制成 10 g/mL 标准工作液。

2.4 样品的前处理

称取鸡脂肪试样(2±0.02) g, 置于 50 mL 塑料离心管, 加乙腈 15 mL, 50 °C 水浴 5 min, 涡旋混匀, 涡旋振荡 10 min, 8000 r/min 离心 10 min, 取上层液体于另一离心管中; 10 mL 乙腈重复提取一次, 合并上清液, 于 50 °C 水浴氮气吹干。

在残留物加入 0.1%甲酸水溶液 2 mL 溶解, 加入 5 mL 正己烷, 涡旋 10 s, 8000 r/min 离心 5 min, 弃去正己烷, 用正己烷重复脱脂 1 次, 用 0.22 μm 滤膜过膜, 供高效液相色谱-串联质谱测定。

2.5 仪器条件

2.5.1 色谱条件

色谱柱为 BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为乙腈溶液, B 为 0.1%甲酸水溶液; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 5 μL ; 柱温 30 °C。色谱梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of liquid chromatography

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	0.25	5	95
0.8	0.25	20	80
2.0	0.25	60	40
2.9	0.25	95	5
3.0	0.25	5	95

2.5.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(multiple response monitoring, MRM); 电离电压: 2.0 kV; 源温: 150 °C; 雾化温度: 450 °C; 锥孔气流速: 150 L/h; 雾化气流速: 650 L/h, 质谱参数见表 2。

表 2 磺胺嘧啶和甲氧苄啶定性定量离子对、锥孔电压和碰撞能量
Table 2 Qualitative and quantitative ion pair, cone hole voltage and collision energy of sulfadiazine and trimethoprim

化合物	母离子	子离子	锥孔电压/V	碰撞能量/V
磺胺嘧啶	251	185	22	15
		92	22	25
甲氧苄啶	291	230	22	22
		261	22	15

2.6 方法的灵敏度和精密度

采用空白组织中添加目标化合物的方法,依据特征离子质量色谱峰信噪比 $S/N > 10$ 为方法定量限,添加适量标准溶液于 2 g 空白试样中,分别制备得到 0.5 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的添加样品,经前处理后检测,在相应的保留时间,空白试样对所测药物无干扰,测定灵敏度。

采用标准添加法,分别准确称取空白样品 2 g,添加一定体积的标准工作溶液,使组织中磺胺嘧啶、甲氧苄啶浓度分别为 1.0、25、50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按上述样品前处理方法处理后进行测定,一日内每种药物的每个添加浓度取 5 个平行样品分别进行测定,每个添加浓度设 5 个平行,重复测定 3 d,计算回收率、批内相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)和批间相对标准偏差,测定精密度。

2.7 标准曲线的绘制

精密量取磺胺嘧啶和甲氧苄啶标准工作液适量,制成空白添加试样,和空白试样一起经前处理后,用流动相 2.0 mL 溶解并过 0.22 μm 微孔滤膜,制成添加试样和空白试样,用空白试样将添加试样溶液稀释成含待测药物浓度,0.5、2.5、5.0、20、50、100 ng/mL 系列浓度的添加标准溶液,依次上机测定,以基质添加标准溶液浓度为横坐标,特征离子质量色谱峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1 线性结果

在空白基质中添加适量的标准工作液配制成 6 个不同浓度(0.5、2.5、5.0、20、50、100 ng/mL),以浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,线性回归方程及相关系数见表 3。

标准曲线回归方程及相关系数结果表明,在 0.5~100 ng/mL 的浓度范围内磺胺嘧啶、甲氧苄啶色谱峰面积与浓度呈良好线性相关,相关系数均大于 0.99。

表 3 线性回归方程及相关系数

名称	线性方程	r^2
甲氧苄啶	$Y=47372.9X+94.561$	0.9967
磺胺嘧啶	$Y=2664.18X-368.9$	0.9994

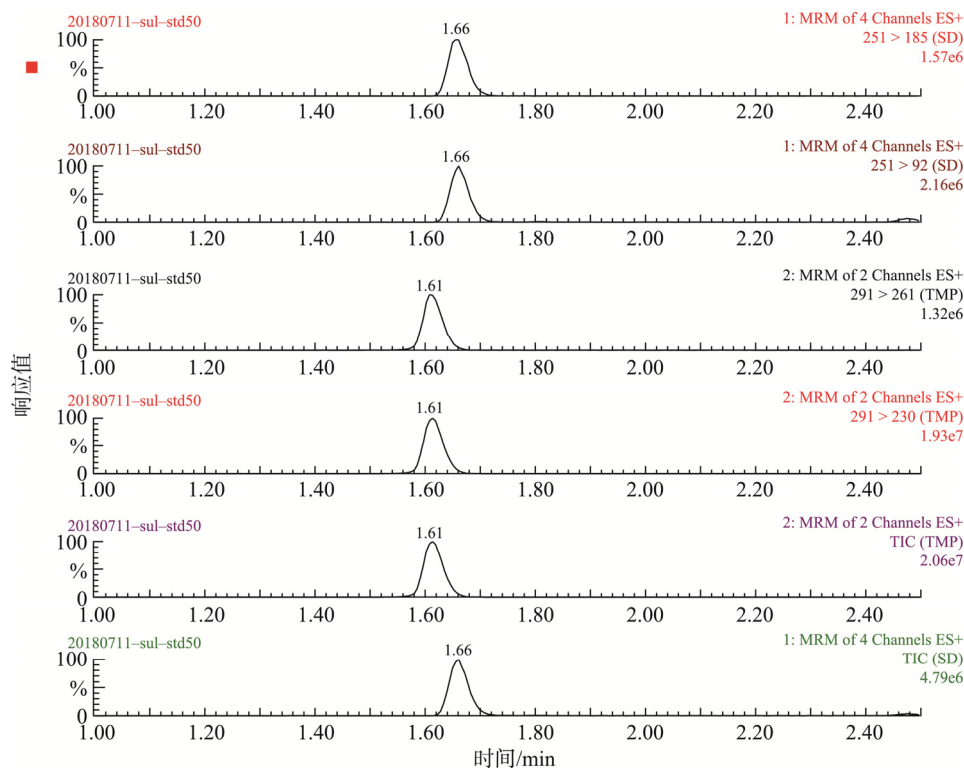


图 1 50 ng/mL 磺胺嘧啶和甲氧苄啶基质匹配标准溶液 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of 50 ng/mL sulfadiazine and trimethoprim matrix matching standard solution

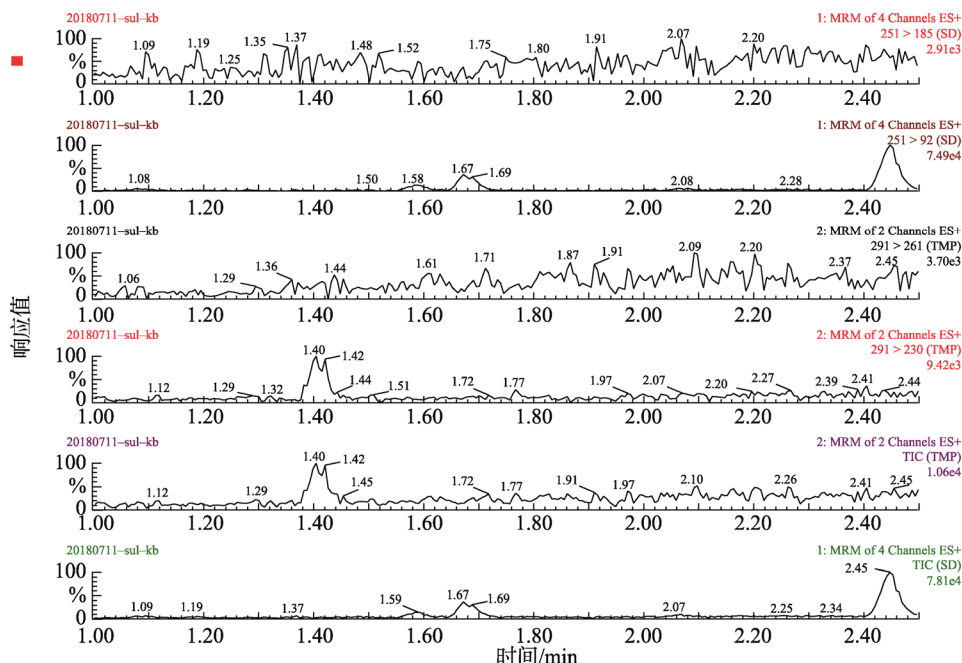


图 2 磺胺嘧啶和甲氧苄啶鸡脂肪空白 MRM 色谱图

Fig.2 Blank MRM chromatogram of sulfadiazine and trimethoprim in chicken fat

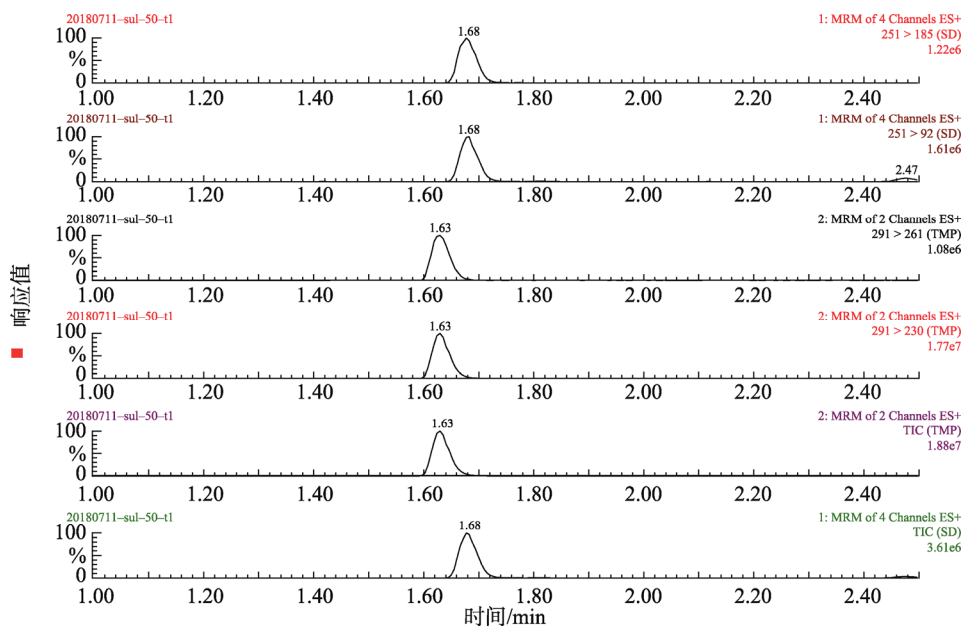


图 3 鸡脂肪添加 50 µg/kg 磺胺嘧啶和甲氧苄啶 MRM 色谱图

Fig.3 MRM chromatogram of chicken fat added with 50 µg/kg sulfadiazine and trimethoprim

3.2 灵敏度和精确度

根据方法测定定量限(limit of quantity, LOQ)满足信噪比 $S/N=10$, 该方法定量限为 1.0 µg/kg。其中 50 µg/kg 磺胺嘧啶和甲氧苄啶基质匹配标准溶液 MRM 色谱图如图 1, 磺胺嘧啶和甲氧苄啶鸡脂肪空白 MRM 色谱图如图 2, 鸡脂肪添加 50 µg/kg 磺胺嘧啶和甲氧苄啶 MRM 色谱图如图 3。

根据回收率的测定方法进行测定, 结果表明, 鸡脂肪

样品中磺胺嘧啶、甲氧苄啶在 1.0~200 µg/kg 添加水平内的平均回收率为 66.3%~97.5%, 日内相对标准偏差为 1.4%~11.4%, 日间相对标准偏差在 3.3%~9.7%, 批内批间相对标准偏差均小于 20%。结果表明磺胺嘧啶、甲氧苄啶的添加回收率及相对标准偏差均满足残留检测的相关要求, 且方法的重现性很好。鸡脂肪中磺胺嘧啶和甲氧苄啶添加回收率实验结果见表 4。

表 4 磺胺嘧啶和甲氧苄啶的添加回收率试验结果

Table 4 Results of tests on the recoveries of sulfadiazine and trimethoprim

药物名称	添加浓度范围 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围 /%	批内 RSD /%	批间 RSD /%
磺胺嘧啶	1~200	66.3~77.5	2.1~11.1	3.3~8.0
甲氧苄啶	1~200	67.0~97.5	1.4~11.4	4.8~9.7

4 结 论

本研究采用乙腈提取正己烷净化的前处理技术,以液相色谱-串联质谱建立了鸡脂肪中磺胺嘧啶、甲氧苄啶残留量检测方法。该方法在 0.5~100 ng/mL 的质量浓度范围内,线性关系良好,相关系数均大于 0.99。在 1.0~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平,平均回收率在 66.3%~97.5%之间,回收率高,方法定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法具有准确度高、精密度好、前处理简单快捷、成本低廉等特点,适用于动物源性食品中磺胺嘧啶、甲氧苄啶残留量的检测。

参考文献

- Cao J, Cross RF. The separation of dihydrofolate reductase inhibitors and the determination of pKa, I values by capillary zone electrophoresis [J]. J Chromatogr A, 1995, 695(2): 297-308.
- 宋立. 中国不同年代食品动物大肠杆菌耐药性调查研究[J]. 中国科学(C辑:生命科学), 2009, 39(7): 692-698.
Song L. Investigation and Study on drug resistance of *E.coli* in food animals in different ages in China [J]. Chin Sci (Series C: Lif Sci), 2009, 39(7): 692-698.
- Walzer PD, Foy J. Treatment of experimental pneumocystosis review of 7 years of experience and development of a new system for classifying antimicrobial drugs [J]. Antimicrob Agent Chemother, 1992, 36(9): 1945-1950.
- GB 31650-2019 食品安全国家标准 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
GB 31650-2019 National food safety standard-Maximum residue limit of veterinary drugs in animal food [S].
- 杨华生. 酶联免疫法测定畜产品及牛奶中磺胺类药物残留[J]. 今日畜牧兽医, 2019, 35(5): 5-7.
Yang HS. Determination of sulfanilamide residues in animal products and milk by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Anim Husband Vet Med Today, 2019, 35(5): 5-7.
- 李仪, 张炎, 张雅婷, 等. 液相色谱检测磺胺类药物的研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2019, (2): 156-163.
Li Y, Zhang Y, Zhang YT, et al. Study on the determination of sulfonamides by liquid chromatography [J]. J East Chin Norm Univ (Nat Sci Ed), 2019, (2): 156-163.
- 毛名祝, 张垚. 猪肉中 10 种残留磺胺药的高效液相色谱法测定[J/OL]. [2019-11-20]. 今日药学: 1-8. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1650.R.20171228.0912.002.html>.
Mao MZ, Zhang Y. Determination of 10 sulfonamides residues in pork by HPLC [J/OL]. [2019-11-20]. Pharm Today: 1-8.
- 马世柱, 陈楠, 黎小鹏, 等. 磺胺类药物残留[J]. 现代农业科技, 2018,

(11): 235-236, 239.

Ma SZ, Chen N, Li XP, et al. Sulfonamides residues [J]. Mod Agric Sci Technol, 2018, (11): 235-236, 239

- 兰承兴, 田雪莲, 周开拓. 高效液相色谱测定猪肉中 5 种磺胺类药物的残留[J]. 农技服务, 2017, 34(23): 192-193.
Lan CX, Tian XL, Zhou KT. Determination of five sulfonamides residues in pork by HPLC [J]. Agric Technol Serv, 2017, 34(23): 192-193.
- 刘培勇, 张惠, 米之金, 等. 两步液液萃取-固相萃取净化结合高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中 11 种磺胺类兽药残留[J]. 色谱, 2019, 37(10): 1098-1104.
Liu PY, Zhang H, Mi ZJ, et al. Determination of 11 sulfonamides residues in pork by two-step liquid-liquid extraction solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2019, 37(10): 1098-1104.
- 钱卓真, 汤水粉, 梁焱, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产养殖环境沉积物中磺胺类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素[J]. 质谱学报, 2019, 40(4): 356-368.
Qian ZZ, Tang SF, Liang Y, et al. Simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and macrolides in Aquaculture Environmental sediments by QuEChERS-HPLC-MS [J]. J Mass Spectrom, 2019, 40(4): 356-368.
- 汪莘, 罗杰鸿. 高效液相色谱串联质谱法同时测定猪肉中 9 种磺胺类药物残留[J]. 应用化工, 2018, 47(10): 2292-2295.
Wang P, Luo JH. Simultaneous determination of nine sulfonamides residues in pork by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Appl Chem, 2018, 47(10): 2292-2295.
- 杨梅, 孙思, 王安波, 等. 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[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(9): 3633-3638.
Yang M, Sun S, Wang AB, et al. Determination of sulfanilamide residues in pork by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(9): 3633-3638.
- 胡婷婷, 赵毓慧, 刘浩, 等. 液相色谱串联质谱法测定鸡蛋粉中 16 种磺胺类药物的残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(19): 6494-6502.
Hu TT, Zhao YH, Liu H, et al. Determination of 16 sulfonamide residues in egg powder by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(19): 6494-6502.
- 邵耀东, 胡彬, 赵小华, 等. 高效液相色谱法测定甲氧苄啶含量[J]. 动物医学进展, 2012, 33(5): 81-84.
Shao YD, Hu B, Zhao XH, et al. Determination of trimethoprim by HPLC [J]. Prog Anim Med, 2012, 33(5): 81-84.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



李文辉, 兽医师, 主要研究方向为畜禽产品兽药残留检测。

E-mail: huihui1034@126.com

孙志文, 高级兽医师, 主要研究方向为畜禽产品兽药残留检测。

E-mail: sunzw673@163.com