

QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法联用测定 鸡肉中磺胺类药物残留

赵浩军^{1*}, 茶东赢², 张 燕¹, 陈朋云¹, 赵 芳¹, 赵 用¹

(1. 大理州质量技术监督综合检测中心, 大理 671000; 2. 大理大学公共卫生学院, 大理 671000)

摘 要: **目的** 建立 QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定鸡肉中磺胺类药物残留量的分析方法。**方法** 以乙腈为提取溶剂, 氯化钠盐析分层, 离心后上清液经 C₁₈ 填料萃取净化, 用乙腈和 0.1%(V:V)甲酸水溶液作为流动相进行梯度洗脱, Endeavorsil C₁₈ 柱色谱柱进行色谱分离, 在高效液相色谱-串联质谱仪上采用电喷雾正离子扫描模式(electrospray ionization, ESI+)检测, 外标法定量。**结果** 该方法在 5~200 µg/L 范围内有良好的线性关系, 8 种磺胺类药物残留的相关系数均大于 0.99, 方法检出限在 3~6 µg/kg 范围, 定量限在 10~20 µg/kg 范围。分别在 3 个浓度水平 20、100、300 µg/kg 加标, 平均回收率在 75.6%~115.2%范围, 相对标准偏差在 1.9%~12.4%范围。**结论** 本方法操作简便, 准确度和精密度好, 可快速检测鸡肉中磺胺类药物的残留量。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; QuEChERS; 磺胺类药物; 鸡肉

Determination of sulfonamides residues in chicken by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHAO Hao-Jun^{1*}, CHA Dong-Ying², ZHANG Yan¹, CHEN Peng-Yun¹, ZHAO Fang¹, ZHAO Yong¹

(1. Dali Comprehensive Inspection Centre of Quality and Technical Supervision, Dali 671000, China;
2. College of Public Health, Dali University, Dali 671000, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the determination of sulfonamides in chicken by QuEChERS combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The sulfonamides were extracted with acetonitrile, and salting out stratification by sodium chloride. C₁₈ purification material was applied to purify the supernatant after centrifugation, and separated by Endeavorsil C₁₈ chromatographic column with gradient elution of acetonitrile and 0.1% (V:V) famic acid solution. The target was determined by electrospray positive ion scanning mode (electrospray ionization, ESI+) with HPLC-MS/MS, and quantified by the external standard method. **Results** The good linear relationship was in the range of 5~200 µg/L for analyte, and the correlation coefficient square of the 8 kinds of sulfonamides residues was greater than 0.99. The limit of detection (LOD) for sulfonamides was 3~6 µg/kg, and limit of quantitation (LOQ) was 10~20 µg/kg. Three kinds of concentrations were labeled 20, 100 and 300 µg/kg, respectively, the average recoveries were 75.6%~115.2%, and the relative standard deviation (RSD) was 1.9%~12.4%. **Conclusion** This method is easy to operate, accurate and precise. The residue of sulfonamides in chicken can be detected quickly.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; QuEChERS; sulfonamides; chicken

基金项目: 市场监管总局技术保障专项(2019YJ040)

Fund: Supported by the Technical Support Project of the State Administration for Market Regulation(2019YJ040)

*通讯作者: 赵浩军, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。E-mail: 962721345@qq.com

*Corresponding author: ZHAO Hao-Jun, Senior Engineer, Dali Comprehensive Inspection Centre of Quality and Technical Supervision, Economic Development Zone 1 box, Dali 67100, China. E-mail: 962721345@qq.com

1 引言

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是化学合成的一类抗生素,主要用来预防和治疗细菌感染性疾病,具有化学性质稳定、抗菌高效和价格便宜等特点,常用于防治鸡体内白痢、球虫病和盲肠炎等疾病^[1-3]。但磺胺类药物在动物体内代谢时间较长,易造成蓄积和残留,食用含有磺胺类药物的禽畜产品会对人体造成潜在的危害,有潜在的致癌性,并且会使很多细菌产生耐药性,耐药菌株大量繁殖、破坏肠胃道微生物平衡等^[4-6]。国际食品法典委员会和欧盟等规定食品中的磺胺总量不能超过 100 μg/kg^[7]。中华人民共和国农业部公告第 235 号《动物性食品中兽药最高残留限量》规定了磺胺类药物的总残留量不能超过 100 μg/kg^[8]。

目前,国家标准和行业标准中检测磺胺类药物的方法主要包括:高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)、高效液相色谱法、酶联免疫法和放射受体分析法等^[9-12]。近年来,关于检测磺胺类药物的研究论文较多,检测方法除了常用的色谱质谱联用法,还有胶体金免疫层析法、毛细管电泳法和微生物法等^[13-15],样品前处理方法有固相萃取法、液液萃取法和多壁碳纳米管净化法等^[16-18]。这些检测方法和前处理方法都各有优点,适合运用于不同基质的样品检测。近年来,在食品检测领域发展起来的 QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe)前处理净化技术^[19,20]方便快捷、高效稳定。GB/T 21316-2007《动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》^[9]关于检测磺胺类药物的前处理方法步骤繁琐,需要通过旋转蒸发浓缩样品,不利于快速批量检测。本研究结合 QuEChERS 前处理净化技术,改进了国家标准中的前处理方法,优化了仪器检测条件,用于测定鸡肉中磺胺类药物的残留量,可节省分析时间,提高检测效率,以期对鸡肉品质的监控提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

鸡肉样品购于当地市场。
磺胺类药物混合标准溶液(浓度 100 mg/L)、十八烷基硅烷(octadecylsilane, C₁₈)和乙二胺-N-丙基硅烷(ethylenediamine-n-propylsilane, PSA)净化填料(规格为 40~63 μm, 60 Å)、0.22 μm/13 mm 尼龙针式滤头(上海安谱科学仪器有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);实验室用水为超纯水。

QTRAP 4500 串联质谱联用仪、Ekspert ultraLC 100-XL 超高效液相色谱仪(美国 AB SCIEX 公司);Endeavorsil C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 北京迪科马科技有限公司);AL204 电子天平(瑞士 Mettler toledo 公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

2.2 样品前处理

取鸡肉样品可食用部位约 200 g,用搅拌机搅碎,准确称取 5.0 g 试样(精确到 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈和 5 g 氯化钠,涡旋振荡 1 min,以 5000 r/min 的转速离心 5 min,吸取上清液 1.0 mL 于玻璃试管中,加入 C₁₈ 净化填料 50 mg,涡旋振荡 1 min,0.22 μm/13 mm 尼龙针式滤头过滤,供仪器分析测定。

2.3 混合标准溶液的配制

分别吸取磺胺类药物混合标准溶液(100 mg/L)10 μL,用乙腈定容至 1.0 mL,配制成浓度为 1.0 mg/L 混合标准中间液,再用乙腈逐级稀释配制成标准工作液,标准曲线浓度为 5、10、25、50、100、150、200 μg/L,以此来绘制标准曲线。

2.4 仪器分析条件

质谱离子源选用电喷雾正离子扫描模式(electrospray ionization, ESI+);多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM);离子源温度为 110 °C;喷雾电压为 5500 eV;脱溶剂温度为 450 °C;质谱分析参考条件参见表 1。

表 1 质谱分析参数
Table 1 Parameter of mass spectra

化合物	保留时间/min	监测离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
磺胺二甲异噁唑(sulfisoxazole, SIZ)	5.23	268.0/156.0*	80	13
	5.23	268.0/108.0	80	22
磺胺吡啶(sulfapyridine, SPD)	2.77	250.0/156.0*	40	16
	2.77	250.0/184.0	40	18
磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMZ)	4.81	254.0/156.0*	80	16
	4.81	254.0/108.0	80	22

续表 1				
化合物	保留时间/min	监测离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
磺胺甲噁二唑(sulfamethizol, SMT)	3.71	271.0/156.0*	40	14
	3.71	271.0/107.0	40	30
磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR)	2.94	265.0/156.0*	80	17
	2.94	265.0/172.0	80	17
磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)	2.31	251.0/156.0*	80	16
	2.31	251.0/108.0	80	25
磺胺氯吡嗪(sulfachloropyridazine, SCP)	4.36	285.0/156.0*	80	15
	4.36	285.0/108.0	80	24
磺胺喹噁啉(sulfachinoxalin, SCX)	6.17	301.0/156.0*	80	17
	6.17	301.0/108.0	80	25

注: *标注的为定量离子对。

液相色谱分析条件: 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 1 μ L; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1%(V:V)甲酸水, 梯度洗脱条件如表 2。

表 2 流动相的梯度洗脱程序 Table 2 Gradient of mobile phase		
时间/min	A/%	B/%
0.0	2	98
3.0	20	80
11.0	45	55
11.1	2	98
14.0	2	98

3 结果与分析

3.1 仪器条件的优化

实验考察了磺胺类药物在不同流动相体系下的分离效果, 包括纯水-乙腈、0.1%(V:V)甲酸水-乙腈、纯水-甲醇、0.1%(V:V)甲酸水-甲醇等体系对目标物响应值及峰型的影响, 图 1 为 8 种磺胺类药物在此条件下的多反应监测图。结果显示采用 0.1%(V:V)甲酸水-乙腈时磺胺类药物的整体响应值最强且峰型较好, 因此最终选择 0.1%(V:V)甲酸水-乙腈体系作为流动相, 并对流动相的梯度洗脱程序进行了优化, 使各组分获得较好的分离效果。

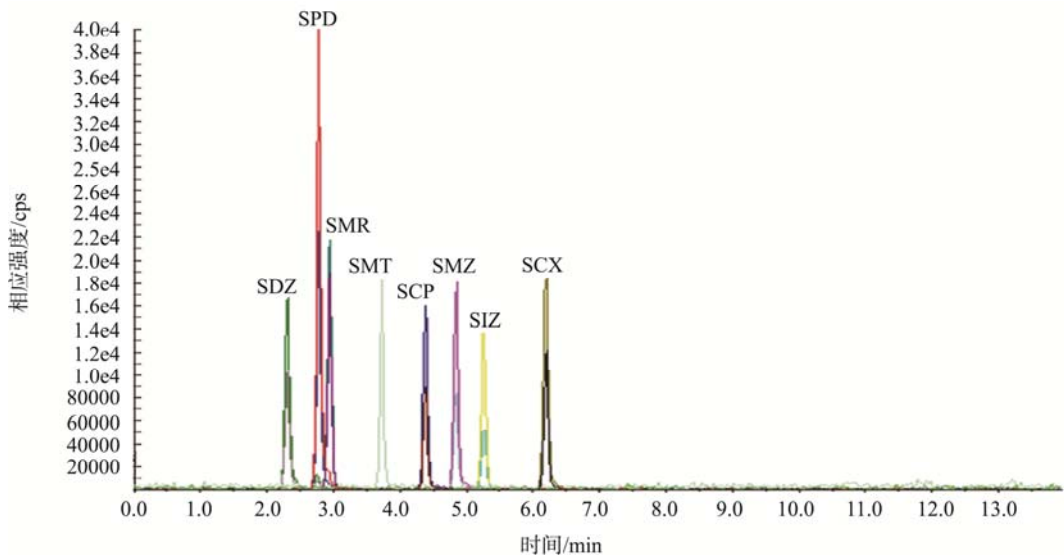


图 1 多反应监测色谱图
Fig.1 Multiple reaction monitoring chromatogram

3.2 样品前处理条件的选择

本实验采用 QuEChERS 的前处理方法,分别考察了 C₁₈ 和 PSA 这 2 种常用的吸附剂材料对磺胺类药物的净化吸附效果(图 2)。由图 2 可以看出,仅用 C₁₈ 净化的回收率在 80%~110% 范围,与不用吸附剂净化的回收率(70%~110%)接近,说明 C₁₈ 对磺胺类药物没有明显的吸附作用。而仅用 PSA 净化以及 C₁₈+PSA 净化这 2 种方式的回收率明显要低很多,说明 PSA 吸附剂对磺胺类药物有吸附作用,特别是 SIZ 和 SCP 在经过 PSA 净化后,回收率不足 60%,说明 PSA 对其吸附作用明显。PSA 是通过极性相互作用及离子交换作用,以达到去除样品中有机酸、脂肪酸等干扰物,而 C₁₈ 则通过非极性相互作用,来吸附极性较弱的烯烃类、脂肪酸、色素等大分子基质干扰物。样品前处理的目的是既要保证目标物被顺利提取,也要尽可能地除去样品中的杂质以保护仪器,因此根据实验结果选定 C₁₈ 作为净化吸附剂。

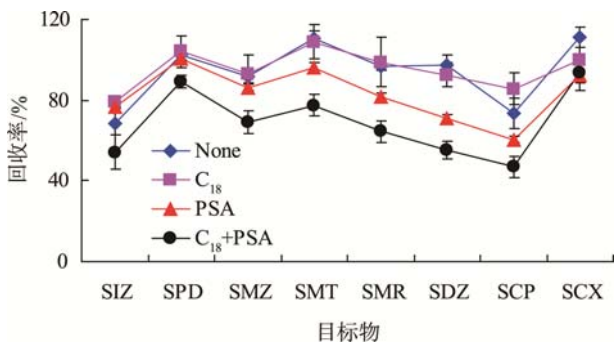


图 2 吸附剂对目标物回收率的影响
Fig.2 Effect of sorbent on target recovery

3.3 方法的线性范围与检出限

标准溶液浓度范围为 5~200 μg/L 时,磺胺类药物的校准曲线回归方程和相关系数如表 3 所示,其中 Y 为目标物与内标的峰面积之比, X 为目标物的浓度(μg/L)。根据 3 倍和 10 倍信噪比(S/N)分别计算该方法的检出限和定量限,在鸡肉的实际样品中添加检出限浓度的目标物,可以检出,结果见表 3。

3.4 方法回收率与精密度

分别向鸡肉样品中添加浓度为 20、100 和 300 μg/kg 三水平的回收率实验,每个浓度重复测定 6 次,结果见表 4,其平均回收率在 75.6%~115.2%范围,相对标准偏差在 1.9%~12.4%范围,方法的准确度和精密度都符合分析要求。

3.5 实际样品测定

采用此法检测了当地市场上的 24 个鸡肉样品,其中有 1 个样品检测出磺胺嘧啶,且检出数值为 127 μg/kg,已超过农业部公告第 235 号规定≤100 μg/kg 的限量要求,其余样品未检出磺胺类药物残留。

4 结 论

本文建立了针对鸡肉中磺胺类药物的检测方法,采用乙腈提取, C₁₈ 吸附剂净化试样, 外标法定量, 定量检测结果准确。此方法与现行的国家标准相比, 前处理过程更加方便、快捷, 精密度和准确度符合分析要求, 可节省分析时间, 提高检测效率, 可以为鸡肉中磺胺类药物的检测提供科学依据。

表 3 回归方程和相关系数
Table 3 Regression equation and correlation coefficients

目标物	回归方程	相关系数/r	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
SIZ	Y=1210X+1120	0.9985	6	20
SPD	Y=3590X+14100	0.9971	3	10
SMZ	Y=1540X+6760	0.9977	6	20
SMT	Y=2740X-642	0.9994	6	20
SMR	Y=3460X+8770	0.9984	6	20
SDZ	Y=2670X+15600	0.9975	6	20
SCP	Y=2520X+17600	0.9940	6	20
SCX	Y=3610X+24400	0.9940	6	20

表 4 在鸡肉中的回收率和精密度试验(n=6)
Table 4 Recoveries and precision tests in chicken (n=6)

目标物	加标浓度/(μg/kg)	平均回收率/%	精密度/%
SIZ	20	85.4	8.3
	100	83.1	5.1
	300	87.0	3.2
SPD	20	75.6	10.4
	100	104.8	5.8
	300	104.4	5.7
SMZ	20	82.7	6.2
	100	97.7	8.0
	300	100.7	4.0
SMT	20	115.2	5.1
	100	110.6	6.4
	300	107.0	5.4
SMR	20	81.8	12.4
	100	100.9	8.6
	300	100.1	3.54
SDZ	20	77.6	8.0
	100	93.7	4.1
	300	96.7	2.0
SCP	20	76.8	3.7
	100	85.1	7.8
	300	84.8	4.9
SCX	20	98.7	5.9
	100	104.7	8.8
	300	100.3	1.9

参考文献

[1] 刘怡君, 边海涛, 曲宝成, 等. 食品中磺胺类药物检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(9): 3420–3430.
Liu YJ, Bian HT, Qu BC, *et al.* Research progress on detection of sulfonamides in food [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(9): 3420–3430.

[2] 阎姣姣, 阎培安, 杨金宝. 兽药残留与抗生素的使用注意事项[J]. 现代畜牧科技, 2019, 49(1): 139–140.
Yan JJ, Yan PA, Yang JB. Notes on veterinary drug residues and antibiotic use [J]. Mod Anim Sci Technol, 2019, 49(1): 139–140.

[3] 陈永亮, 刘丹丹. 抗生素在鸡体内残留及控制技术[J]. 家禽科学, 2018, (12): 55–58.
Chen YL, Liu DD. Residues and control of antibiotics in chicken [J]. Poul Sci, 2018, (12): 55–58.

[4] 于森. 养殖业中磺胺类药物残留的危害及现状[J]. 现代畜牧科技, 2015, (2): 133–135.

Yu M. Harm and current status of sulfonamide residues in aquaculture [J]. Mod Anim Husb Sci Technol, 2015, (2): 133–135.

[5] Baynes RE, Dedonder K, Kissell L, *et al.* Health concerns and management of select veterinary drug residues [J]. Food Chem Toxicol, 2016, 88: 112–122.

[6] 刘健华, 陈杖榴. 动物性食品中兽药残留对人体肠道菌群的影响及其研究模型与方法[J]. 动物医学进展, 2003, 24(2): 37–48.
Liu JH, Chen ZL. Effects of veterinary drug residues in animal foods on human intestinal flora and their research models and methods [J]. Adv Anim Med, 2003, 24(2): 37–48.

[7] Codex Alimentarius Commission. CAC/MRL 2-2015 Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residue of veterinary drugs in foods [S].

[8] 中华人民共和国农业部. 农业部公告第235号 动物性食品中兽药最高残留限量[Z].
The Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Announcement of the ministry of agriculture No. 235 The maximum residue limit of veterinary drugs in animal food [Z].

[9] GB/T 21316-2007 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S].
GB/T 21316-2007 Determination of residues of sulfonamides in foodstuffs of animal origin-Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [S].

[10] GB 29694-2013 食品安全国家标准 动物性食品中 13 种磺胺类药物多残留的测定 高效液相色谱法[S].
GB 29694-2013 National standard for food safety-Determination of multiple residues of 13 sulfanilamide drugs in animal food-High performance liquid chromatography [S].

[11] 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 determination of sulfonamides residues in animal original food for import and export-Enzyme linked immunosorbent assay method [S].

[12] GB/T 21173-2007 动物源性食品中磺胺类药物残留测定方法 放射受体分析法[S].
GB/T 21173-2007 Determination of sulfa drugs residues in animal derived food-Radio-receptor assay method [S].

[13] 谢瑜杰, 呼秀智, 孙晓铮, 等. 胶体金免疫层析技术在水产品磺胺类药物残留检测中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(2): 375–379.
Xie YJ, Hu XZ, Sun XZ, *et al.* Research progress of application of colloidal gold assay in determination of sulfonamides residues in aquatic products [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(2): 375–379.

[14] Fuh MRS, Chu SY. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis [J]. Anal Chim Acta, 2003, 499: 215–221.

[15] 刘兴泉, 冯震, 姚蕾, 等. 采用高通量微生物法检测四种抗生素在鸡肉中的残留[J]. 现代食品科技, 2011, 27(4): 465–467.
Liu XQ, Feng Z, Yao L, *et al.* High throughput microbiological method was used to detect the residues of four antibiotics in chicken [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(4): 465–467.

[16] 刘桂英, 宋广军, 王召会, 等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法测定水产品中磺胺类药物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(8):

- 2241–2246.
- Liu GY, Song GJ, Wang ZH, *et al.* Determination of sulfonamide drugs residues in aquatic product by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(8): 2241–2246.
- [17] 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 in pork by two-step liquid-liquid extraction-solid phase extraction purification coupled with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(10): 1098–1104.
- [18] 宋伟, 赵暮雨, 韩芳, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法测定克氏螯虾中 39 种兽药残留[J]. *色谱*, 2018, 36(12): 1261–1268.
- Song W, Zhao MY, Han F, *et al.* Determination of 39 veterinary drug residues in *procambarus clarkii* by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(12): 1261–1268.
- [19] Herbert M, Luke C, Vusumzi EP, *et al.* Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis [J]. *J Food Compos Anal*, 2019, 84: 103314.
- [20] Rosa P, Pedro S, Priscilla PF, *et al.* QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. *Anal Chim Acta*, 2019, 1070: 1–28.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



赵浩军, 高级工程师, 主要研究方向
为食品质量与安全检测。
E-mail: 962721345@qq.com