

# 流穿式净化柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 19 种磺胺类药物

何洁<sup>1,2\*</sup>, 梁松<sup>2</sup>, 余婷婷<sup>2</sup>, 严义勇<sup>2\*</sup>

(1. 深圳职业技术学院集成电路关键材料研究院, 广东深圳 518055)

(2. 深圳市易瑞生物技术股份有限公司, 广东深圳 518101)

**摘要:** 该研究建立了动物源性食品中 19 种磺胺类药物残留的确证检测方法, 利用盐包和流穿式净化柱对动物源性食品进行双重净化, 并采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)进行检测分析。样品经 80% 乙腈(0.2% 甲酸)提取、盐包及 Speedy Prep<sup>®</sup>-Sulfa 流穿式净化柱净化, 使用 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 以 0.2% 甲酸水和甲醇作为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用电喷雾正离子模式和多反应监测模式采集信号, 外标法定量分析。结果表明, 该方法中流穿式净化柱可在 30 s 内完成净化, 整个前处理过程缩短至 10 min 以内。19 种磺胺类药物在其线性范围内相关系数  $r \geq 0.999 1$ , 检出限为 1.00~2.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 2.50~5.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝六种基质在 5、10、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  加标水平下, 平均回收率为 74.56%~119.28%, 相对标准偏差(RSD,  $n=6$ )为 0.91%~14.16%, 回收率和精密度良好。该方法操作简单、准确、高效, 稳定性好, 适用猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝中 19 种磺胺类药物残留的确证检测。

**关键词:** 磺胺; 超高效液相色谱-串联质谱; 动物源性食品; 流穿式; 净化柱

文章编号: 1673-9078(2023)03-331-340

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.3.0361

## Determination of 19 Sulfonamides in Foods of Animal Origin Using a Sulfonamide Capture Column and Ultra-high Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

HE Jie<sup>1,2\*</sup>, LIANG Song<sup>2</sup>, YU Tingting<sup>2</sup>, YAN Yiyong<sup>2\*</sup>

(1. Institute of Critical Materials for Integrated Circuits, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

(2. Shenzhen Bioeasy Biotechnology Co. Ltd., Shenzhen 518101, China)

**Abstract:** We developed a confirmatory detection method for 19 sulfonamide drug residues in foods of animal origin, which were double-purified using dialysis, followed by capture on a sulfonamide affinity column, and detected and analyzed using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Samples were extracted with 80 % acetonitrile (0.2 % formic acid). Extracts were partially purified using dialysis, and sulfonamides were captured on a column (Speedy Prep<sup>®</sup>-Sulfa), then separated using an ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column. Gradient elution was carried out using a gradient of 0.2 % aqueous formic acid and methanol as the mobile phase. Mass spectrometry was performed using electrospray positive ion mode and multiple reaction monitoring modes. An external standard method was used for

引文格式:

何洁,梁松,余婷婷,等.流穿式净化柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 19 种磺胺类药物[J].现代食品科技,2023,39(3):331-340.

HE Jie, LIANG Song, YU Tingting, et al. Determination of 19 sulfonamides in foods of animal origin using a sulfonamide capture column and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(3): 331-340.

收稿日期: 2022-03-30

基金项目: 广东省粤港澳大湾区联合创新领域项目(2021A0505080003); 深圳市技术攻关重点项目(JSGG20191115141601721)

作者简介: 何洁(1987-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 多孔微球材料开发及应用研究、食品安全等领域, E-mail: hjhelp@163.com

通讯作者: 严义勇(1985-), 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全检测、体外诊断等领域, E-mail: yanyy@bioeasy.com

quantitative analysis. The results indicated that the sulfonamide capture column in this method could complete purification within 30 sec, and the entire pretreatment process required less than 10 min. The 19 sulfa drug concentrations were within their linear range (correlation coefficient  $r \geq 0.999$ ), the limit of detection was 1.00~2.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and the limit of quantification was 2.50~5.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Pork, beef, eggs, shrimp, chicken skin, and pork liver were spiked at 5, 10, and 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , and average recovery ranged from 74.56% to 119.28%, with relative standard deviations (RSD,  $n=6$ ) ranging from 0.91% to 14.16%, indicating good recovery and precision. The method described herein confers several advantages, including simple operation, high accuracy, excellent reproducibility, and suitability for quantifying sulfonamides in pork, beef, eggs, shrimp, chicken skin, and pork liver.

**Key words:** sulfonamides; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; foods of animal origin; flow-through; purification column

磺胺类药物为人工合成的抗生素,因其具有化学性质稳定、抗菌谱广、价廉、使用方便等优点,广泛用于预防和治疗畜牧疾病<sup>[1]</sup>。然而,磺胺类药物滥用、误用及不遵守休药期规定,会造成动物源性食品中的磺胺类药物残留超标,磺胺类药物不易代谢,在人体内蓄积会对人体造成各种潜在危害,如严重副作用和潜在致癌性,而且其耐药性问题也日益严重<sup>[2]</sup>。我国、欧盟以及美国等大多数国家对食品中磺胺类药物的最高残留量均有明确规定,我国和欧盟规定所有食用动物的肌肉、脂肪、肝、肾食品中磺胺类药物的最大残留量为 0.1  $\text{mg}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>。

磺胺类药物残留的检测方法主要有酶联免疫法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱法<sup>[5]</sup>、高效液相色谱-串联质谱法<sup>[6]</sup>、电化学检测法<sup>[7]</sup>等。其中高效液相色谱法存在检测种类有限、电化学传感器存在设备昂贵、不方便携带以及不稳定的缺点。而免疫学技术主要用于现场检测和筛查,不能用于确证。超高效液相色谱-质谱/质谱具有专一可靠、速度快、灵敏度高以及高通量的特点,现已成为国内外定量测定的黄金方法。为了保证准确度和灵敏度,检测前的样品前处理尤为重要。由于动物源性食品的多样性及复杂性,如何选择合适的前处理方法,去除杂质,充分提取磺胺类药物,保证检测的准确性以及灵敏度是食品安全检测领域的一大重难点。

目前,磺胺类药物残留检测的前处理方法有固相萃取(Solid Phase Extraction, SPE)、固相微萃取(Solid Phase Microextraction, SPME)、磁性固相萃取(Magnetic Solid Phase Extraction, MSPE)、基质分散固相萃取(Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)、分散固相萃取(Dispersive Solid Phase Extraction, dSPE)、分子印迹技术(Molecular Imprinting Technology)、分散液液微萃取(Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)、QuEChERS、微波辅助萃取等技术<sup>[8-14]</sup>。SPE 是应用较多的前处理方法,HLB 和 MCX 是常见的 SPE 填料<sup>[15]</sup>, 研究报道多种新型 SPE 填料用于磺胺类药物的提取,如复合胶束 OTMABr 涂层的二氧化

硅<sup>[16]</sup>、壳聚糖-氧化石墨烯<sup>[17]</sup>、Zr(IV)-卟啉-MOF<sup>[18]</sup>、离子液体修饰二氧化硅<sup>[19]</sup>、Zr-MOF-多孔淀粉<sup>[20]</sup>、磁性  $\text{SiO}_2/\text{P}(\text{MMA-co-EGDMA})$ <sup>[21]</sup>等。同时, QuEChERS 方法和 dSPE 是目前较为常用的前处理方法<sup>[22-24]</sup>。除有机溶剂萃取和 DLLME 外, SPE、MSPD、dSPE 等都需要采用吸附和洗脱, QuEChERS 虽然省去了吸附和洗脱,但需要额外增加离心步骤。上述的前处理操作时间较长,有机溶剂使用较多。

本文采用盐包和流穿式净化柱 Speedy Prep<sup>®</sup>-Sulfa 对动物源性食品进行双重净化,有效去除蛋白质、脂质等杂质,采用 UPLC-MS/MS 对 19 种磺胺类药物进行检测分析。该方法简捷高效,稳定性好,适用基质广泛,可用于猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝中 19 种磺胺类药物残留的确证检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

19 种磺胺类药物标准品:磺胺吡啶(Sulfapyridine, SPD)、磺胺噻唑(Sulfathiazole, STZ)、磺胺甲噁啉(Sulfamerazine, SMR)、磺胺邻二甲氧嘧啶(Sulfadoxine, SDX)、磺胺喹噁啉(Sulfaquinolone, SQX)、磺胺苯吡唑(Sulfaphenazole, SPA)、磺胺二甲唑(Sulfamoxole, SMO)、磺胺异噁唑(Sulfisoxazole, SIZ)、苯酰磺胺(Sulfabenzamide, SBA)、磺胺二甲异噁啉(Sulfisomidine, SIM)、磺胺对甲氧嘧啶(Sulfamethoxydiazine, SMD)、磺胺间二甲氧嘧啶(Sulfadimethoxine, SDT)、磺胺甲噁唑(Sulfamethoxazole, SMZ)、磺胺嘧啶(Sulfadiazine, SDZ)、磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SDM)、磺胺甲氧吡嗪(Sulfamethoxypyridazine, SMP)、磺胺间甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine, SMM)、磺胺氯吡嗪(Sulfachloropyridazine, SCP)、磺胺甲噁二唑(Sulfamethizole, SMT), 纯度  $\geq 98\%$ , 购买于德国 Dr. Ehrenstorfer 公司; Speedy Prep<sup>®</sup>-Sulfa 磺胺类药物

净化柱, 深圳市易瑞生物技术股份有限公司; ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱, 美国 Waters 公司; 甲醇 (色谱级), 购于美国 J. T. Baker 公司; 乙腈 (色谱级), 购于美国 J. T. Baker 公司; 甲酸 (色谱级, 阿拉丁试剂), 氨水 (色谱级, ≥25%, 阿拉丁试剂); 0.22 μm 尼龙滤膜, 天津艾杰尔有限公司; 色谱自动进样小瓶, 爱吉仁; 猪肉、牛肉、鸡蛋、鸡皮、猪肝、虾等基质样品购于市场。

## 1.2 仪器与设备

SCIEX QTRAP 5500+超高效液相色谱-电喷雾电离源-串联质谱联用仪, 美国 SCIEX 公司; DM0412 台式离心机, 深圳市易瑞生物; Milli-Q Synergy 纯水机, 美国默克; IKA<sup>®</sup> MS 3 basic 小型高速涡旋仪, 德国; XINW-M24 高通量组织研磨仪, 上海鑫翁科学仪器有限公司。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 标准溶液配制

称取 10 mg (精准至 0.1 mg) 19 种磺胺类药物各标准物质, 用 9 mL 甲醇溶解并定容至 10 mL, 配制成 1 mg/mL 的 19 种磺胺类药物单标储备液, 于 -18 °C 保存, 有效期 6 个月。再将 1 mg/mL 19 种磺胺类药物单标储备液用 50% (V/V) 乙腈水溶液稀释配制至 1 μg/mL 的混合标准溶液以及各单标溶液, 于 2~8 °C 保存备用, 有效期 1 个月。

### 1.3.2 样品提取

称取 5 g 经高通量组织研磨仪研磨的基质样品, 加入 20 mL 80% (V/V) 乙腈[含 0.2% (V/V) 甲酸]水溶液混匀。高速涡旋 3 min。加入 Speedy Prep<sup>®</sup>-Sulfa 磺胺类药物净化柱产品盒中的盐包, 涡旋 3 min, 放入离心机, 4 000 r/min 离心 2 min, 上清液(乙腈与水混合层)为样品提取液。

### 1.3.3 样品净化

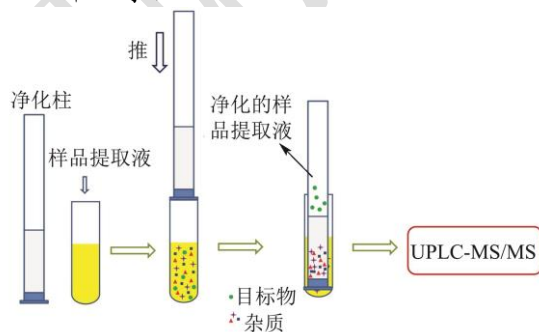


图 1 净化柱净化样品提取液过程示意图

Fig.1 Scheme of using clean-up column to purify the sample extract

向离心管中加入 5 mL 样品提取液, 将净化柱橡胶头从离心管顶端插入, 并向下压净化柱至离心管底端。将净化柱上部净化后的样品提取液倒出至 EP 管中, 得到净化提取液。取净化提取液用初始流动相 [0.2% (V/V) 甲酸水:甲醇=85:15] 稀释 10 倍, 稀释后样品进行 UPLC-MS/MS 分析。具体净化柱操作见图 1。

### 1.3.4 UPLC-MS/MS 分析条件

#### 1.3.4.1 液相条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 流动相 A: 0.2% 甲酸水溶液; 流动相 B: 甲醇; 梯度洗脱程序: 见表 1; 流速: 0.35 mL/min; 进样体积: 10 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The gradient elution program

时间/min	A%	B%
0.00	85	15
5.00	73	27
7.00	60	40
7.10	5	95
10.00	5	95
10.10	85	15
13.00	85	15

#### 1.3.4.2 质谱条件

采用电喷雾正离子 (ESI<sup>+</sup>)、多反应监测模式 (MRM), 喷雾电压 IS: 5.5 kV; 喷雾气压力 (GS1): 379.2 kPa; 辅助气压力 (GS2): 379.2 kPa; 气帘气压力: 241.3 kPa; 离子源温度: 550 °C; 将 100 ng/mL 的标准溶液注入质谱仪中, 以待测物的准分子离子峰为母离子, 通过优化碰撞能量、去簇电压等质谱参数, 找出信号较强的 2 个特征子离子作为定性离子和定量离子, 确定每种化合物的定性和定量离子对。

### 1.3.5 方法学考察

#### 1.3.5.1 空白基质的选择

购买于市场的各种基质样品按照 1.3.2~1.3.3 的方法进行提取净化, UPLC-MS/MS 进行定性及定量检测, 未检测出 19 种磺胺类药物定性及定量离子对的样品为空白基质, 用于后续的方法学验证。

#### 1.3.5.2 基质效应

空白标曲溶液配制: 将 1 μg/mL 的 19 种磺胺类药物混合标准溶液用初始流动相 [0.2% (V/V) 甲酸水:甲醇=85:15] 进行梯度稀释成最终质量浓度 0.05、0.1、0.2、0.5、1、2 ng/mL 的标准溶液。

基质标曲溶液配制: 利用空白基质样品按照 1.3.2~1.3.3 进行前处理净化, 再添加 1 μg/mL 的 19 种磺胺类药物混合标准溶液, 配制成最终浓度 0.05、0.1、

## 0.2、0.5、1、2 ng/mL 基质标准溶液。

基质效应的计算:

$$a = \frac{b}{c} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

$a$ ——基质效应, %;

$b$ ——基质标曲斜率;

$c$ ——空白标曲斜率。

## 1.3.5.3 线性范围、检出限及定量限的测定

以空白猪肉基质为样品, 参照 1.3.2~1.3.3 的步骤得到净化提取液, 进行低浓度添加回收, 进行 UPLC-MS/MS 分析, 根据 3 倍信噪比的峰响应值得到该方法得检出限, 根据 10 倍信噪比的峰响应值得到该方法的定量限和线性范围下限。同时, 向空白基质样品净化提取液中添加一系列梯度的 19 种磺胺类药物标准溶液, 配制成基质标准曲线, 确定线性范围。

## 1.3.5.4 添加回收率和精密度的测定

以空白基质为样品, 添加一定量的 19 种磺胺类药物混合标准溶液, 参照 1.3.1~1.3.4 的前处理方法和仪器分析条件, 进行 5、10、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  三水平六平行添加回收实验, 并计算 RSD。

## 2 结果与讨论

## 2.1 色谱参数和质谱参数的优化

优化后的母离子、子离子、去簇电压、碰撞能量等相关参数见表 2。

采用 ACQUITY UPLC BEH  $\text{C}_{18}$  (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ) 色谱柱进行 19 种磺胺类药物的分离, 比较了不同流动相组成对磺胺类药物分离效果的影响, 以 0.2% 甲酸水-乙腈和 0.2% 甲酸水-甲醇为流动相, 通过梯度洗脱条件的优化, 19 种磺胺类药物中的 4 组同分异构体都能够实现分离, 但乙腈作为有机相时, 磺胺对甲氧嘧啶和磺胺甲氧哒嗪的分离度不如甲醇(图 2)。由于甲醇的毒性小于乙腈, 且较为便宜, 综合考虑, 本文采用甲酸水-甲醇体系为优选的流动相组成。同时, 本文对比了甲酸添加浓度对响应强度的影响(图 3), 可以发现, 0.2% 甲酸水-甲醇的响应强度明显高于 0.1% 甲酸水-甲醇, 将甲酸比例提高至 0.5%, 部分化合物响应强度降低, 部分化合物响应强度升高, 效果不明显。因此, 0.2% 甲酸水-甲醇为最终优选的流动相组成。

表 2 19 种磺胺类药物质谱检测参数

Table 2 Mass spectrometric parameters for 19 sulfonamides

化合物	出峰时间/min	离子对( $m/z$ )	碰撞能量/eV	去簇电压/V
磺胺吡啶	2.844	250.0-156.0*	23	105
		250.0-184.3	25	105
磺胺噻唑	2.631	256.0-156.0*	22	100
		256.0-108.0	32	95
磺胺甲噻唑	3.109	265.3-156.0*	23	110
		265.3-172.3	22	120
磺胺邻二甲氧嘧啶	5.971	311.3-156.0*	25	110
		311.3-108.0	31	120
磺胺喹噁啉	8.721	301.1-156.0*	24	120
		301.1-108.0	35	120
磺胺苯吡唑	7.650	315.2-155.8*	28	130
		315.2-159.9	31	110
磺胺二甲唑	3.917	268.0-155.9*	22	120
		268.0-113.0	23	110
磺胺异噁唑	6.105	267.9-155.9*	17	105
		267.9-92.0	36	100
苯酰磺胺	6.717	277.0-156.0*	19	100
		277.0-108.0	31	100
磺胺二甲异嘧啶	2.393	279.1-124.0*	28	112
		279.1-186.0	24	120
磺胺对甲氧嘧啶	3.852	281.0-156.0*	23	110
		281.0-215.1	22	120
磺胺间二甲氧嘧啶	8.343	311.0-156.1*	28	125
		311.0-218.0	25	140
磺胺甲噁唑	5.295	254.0-156.0*	22	105
		254.0-108.0	31	105
磺胺嘧啶	2.351	251.0-156.1*	21	100
		251.0-92.0	35	100
磺胺二甲嘧啶	4.027	279.0-186.0*	25	110
		279.0-108.0	35	100
磺胺甲氧哒嗪	4.054	281.1-156.0*	23	100
		281.1-92.0	40	100
磺胺间甲氧嘧啶	4.461	281.0-156.0*	25	110
		281.0-92.0	40	110
磺胺氯哒嗪	5.352	285.0-156.0*	21	90
		285.0-92.0	35	90
磺胺甲噻二唑	4.922	271.1-155.9*	20	100
		271.1-92.0	38	100

注: \*定量离子对。

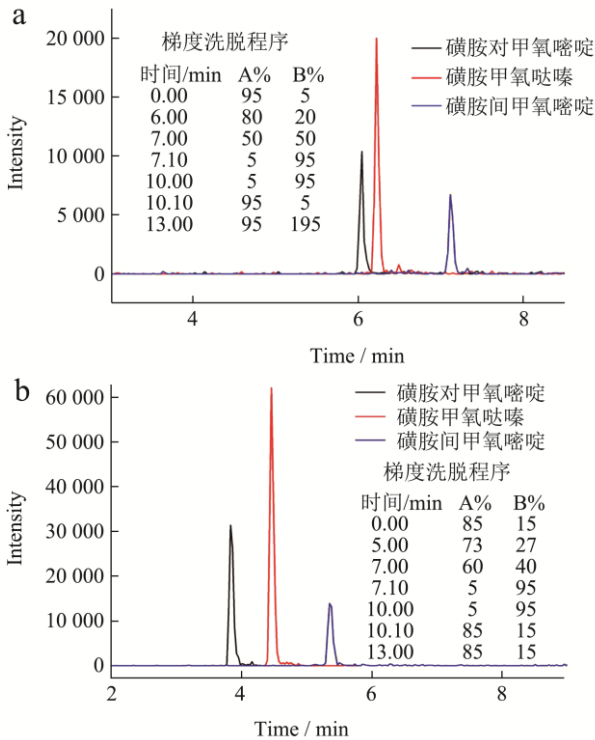


图2 不同流动相条件下磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧吡嗪和磺胺间甲氧嘧啶的MRM色谱图

Fig.2 Chromatographic spectra (MRM mode) of sulfamethoxydiazine, sulfamethoxypyridazine and sulfamonomethoxine under different mobile phase

注: (a) A: 0.2% 甲酸水, B: 乙腈; (b) A: 0.2% 甲酸水, B: 甲醇。

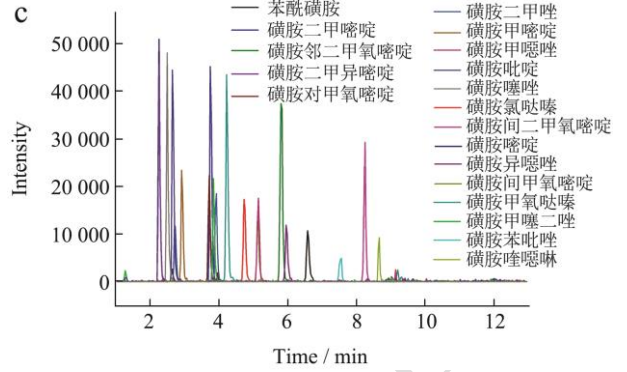
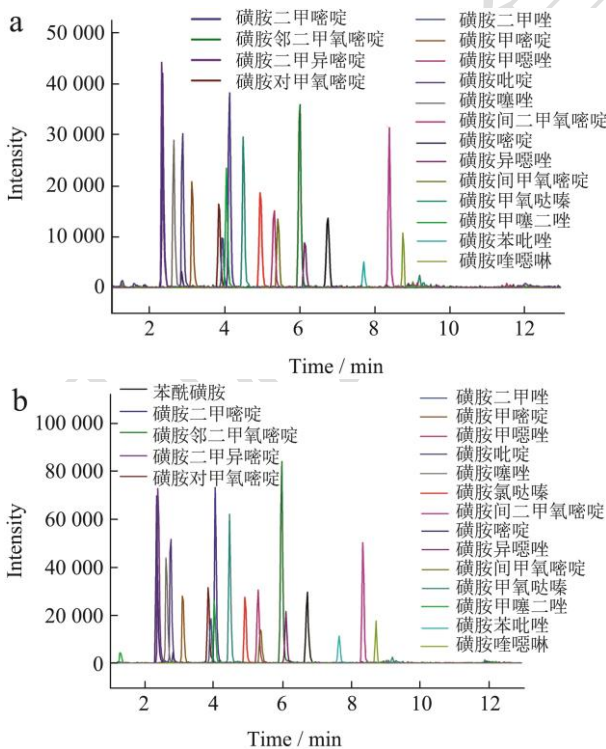


图3 不同流动相组成条件下19种磺胺类药物标准溶液(1 ng/mL)的MRM色谱图

Fig.3 Chromatographic spectra (MRM mode) of 19 sulfonamides under different mobile phase

注: (a) 0.1% 甲酸水-甲醇; (b) 0.2% 甲酸水-甲醇; (c) 0.5% 甲酸水-甲醇。

### 2.2 提取溶剂确定

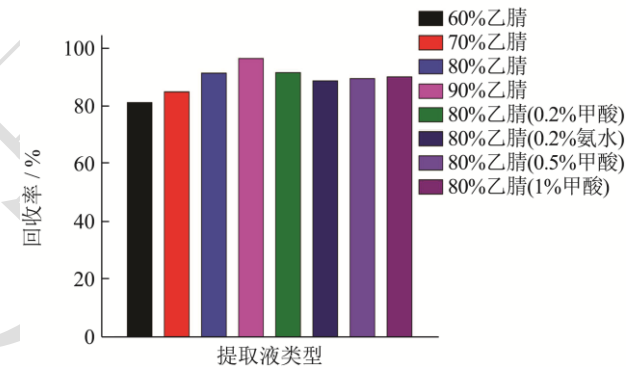


图4 不同提取溶剂提取时19种磺胺类药物的平均回收率对比图

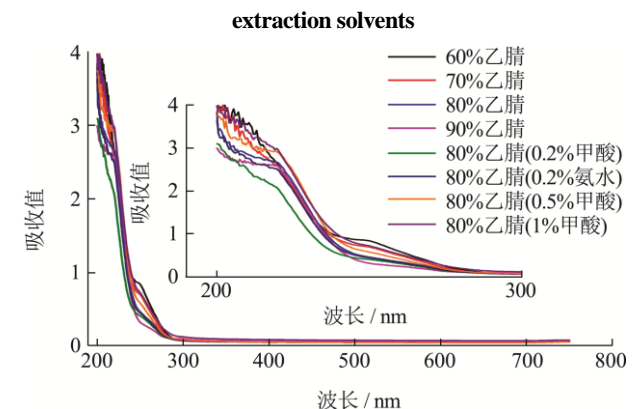


图5 不同提取溶剂的猪肉提取液紫外吸收图谱

常见的磺胺类药物提取溶剂有乙酸乙酯、乙腈以及乙腈水溶液等<sup>[23]</sup>。由于磺胺类药物分子式中含有氮

基和磺酰胺基结构,是酸碱两性化合物,提取液中加入酸、碱可能会提高回收率。同时,相对于乙酸乙酯,乙腈更不容易提取磷酸酯类杂质。因此本文以猪肉为基质,主要考察 60%乙腈、70%乙腈、80%乙腈、90%乙腈、80%乙腈(0.2%甲酸)、80%乙腈(0.2%氨水)、80%乙腈(0.5%甲酸)、80%乙腈(1%甲酸)8种提取溶剂对19种磺胺类药物的提取回收率以及对杂质提取效果。19种磺胺类药物不同提取溶剂的平均提取回收率结果见图4,可以看出,当乙腈比例低于80%时,乙腈浓度越低,回收率越低。添加氨水时,回收率有所下降。甲酸浓度提高至0.5%以及1%时,回收率也有所下降。80%乙腈、90%乙腈、80%乙腈(0.2%甲酸)的平均回收率都可达到90%以上。图5为不同提取溶剂的猪肉提取液紫外吸收图谱,随着乙

腈溶剂比例的提高,提取液的紫外吸收逐渐降低,说明提取杂质逐渐减少。根据相似相溶的原理,乙腈比例逐渐提高,水比例逐渐降低,提取液中水溶性杂质如蛋白质也会随着减少。添加甲酸浓度越高,提取的杂质都有所提高。80%乙腈(0.2%甲酸)提取的杂质最少,综合平均回收率和提取杂质效果来看,我们选择80%乙腈(0.2%甲酸)为提取溶剂,既能保证19种磺胺类药物的回收率,又能最大程度地减少杂质的提取。

### 2.3 方法检出限和定量限

以猪肉基质为样品,19种磺胺类药物的检出限(LOD)、定量限(LOQ)、线性范围及相关系数见表3。在各自的线性范围内,相关系数 $\geq 0.9991$ 。

表3 19种磺胺类药物的检出限、定量限、线性范围及相关系数

Table 3 The limits of detection (LODs), limits of quantification (LOQs), linear range and correlation coefficients of 19 sulfonamides

分析物	检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	线性范围/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	相关系数 $r$
磺胺吡啶	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9998
磺胺噻唑	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9996
磺胺甲噁啉	2.00	5.00	5.00~500.00	0.9996
磺胺邻二甲氧嘧啶	1.00	2.50	2.50~100.00	0.9992
磺胺喹噁啉	2.00	5.00	5.00~500.00	0.9997
磺胺苯吡唑	2.00	5.00	5.00~500.00	0.9995
磺胺二甲唑	2.00	5.00	5.00~500.00	0.9994
磺胺异噁唑	2.00	5.00	5.00~500.00	0.9993
苯酰磺胺	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9993
磺胺二甲异噁啉	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9992
磺胺对甲氧嘧啶	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9991
磺胺间二甲氧嘧啶	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9995
磺胺甲噁唑	2.00	5.00	5.00~500.00	0.9996
磺胺嘧啶	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9997
磺胺二甲嘧啶	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9994
磺胺甲氧吡嗪	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9998
磺胺间甲氧嘧啶	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9993
磺胺氯吡嗪	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9998
磺胺甲噻二唑	1.00	2.50	2.50~250.00	0.9997

### 2.4 基质效应

本文采用盐包和净化柱对基质进行双重净化,盐包的加入会产生盐析效应,沉淀部分蛋白,也导致乙腈层与水相的分层,从而水溶性杂质会更少进入有机层。同时,盐溶于水,会置换磺胺类化合物更多溶于乙腈中<sup>[25]</sup>。Speedy Prep<sup>®</sup>-Sulfa磺胺类药物净化柱是由多种复合填料组成,可有效去除色素、蛋白质、脂肪、有机酸等杂质,减少基质效应。基质效应由各基质溶

液标曲与空白溶液标曲的斜率比值来计算,该比值越接近于1,表示基质效应越小。一般来说,该比值介于0.8~1.2之间,说明基质效应影响不大,若超出该范围,说明基质效应影响较大。以猪肉基质为样品,19种磺胺类药物的基质效应见表4,可以看出,采用本文的净化方法,基质效应可控制在0.8~1.2之间,基质干扰较小。因此,本文的回收率数据是根据空白溶液标曲计算而得,无需基质标曲校正。



表4 猪肉中19种磺胺类药物的基质效应

Table 4 Matrix effects of 19 sulfonamides in pork

分析物	基质效应	分析物	基质效应
磺胺吡啶	0.92	磺胺对甲氧嘧啶	0.97
磺胺噻唑	0.95	磺胺间二甲氧嘧啶	0.93
磺胺甲嘧啶	1.01	磺胺甲噁唑	0.87
磺胺邻二甲氧嘧啶	0.89	磺胺嘧啶	0.94
磺胺喹噁啉	0.94	磺胺二甲嘧啶	0.96
磺胺苯吡唑	0.88	磺胺甲氧哒嗪	1.08
磺胺二甲唑	1.06	磺胺间甲氧嘧啶	1.12
磺胺异噁唑	1.11	磺胺氯哒嗪	1.06
苯酰磺胺	1.02	磺胺甲噻二唑	0.95
磺胺二甲异嘧啶	0.99		

### 2.5 回收率与精密度

本文研究所用的基质样品均购买于当地市场,未检出19种磺胺类药物残留。以空白基质为样品,进行5、10、50 μg/kg三水平六平行添加回收实验,因基质效应较小,回收率数据无需用基质标曲校准,回收率

和RSD结果见表5。对于猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝六种基质,19种磺胺类药物在5、10、50 μg/kg三水平下的平均回收率为74.56%~119.28%,RSD为0.91%~14.16%,准确度和精密度良好。说明本文的检测方法适用基质广泛、准确度高和稳定性好。

### 2.6 方法性能对比

表6给出了本文磺胺类药物检测方法与其他文献在磺胺类药物检测种类、适用基质、线性范围、检出限、前处理时间以及回收率方面的对比情况。可以看出,其他对比文献方法采取固相萃取填料富集以及氮吹浓缩的形式,检出限较低,本方法因整个前处理过程未进行任何浓缩,所以检出限会比其他文献高,但足以满足国家监管检测需求。回收率与其他文献基本处于同一水平,本方法的最大优势在于净化简单,前处理时间可控制10 min以内,而其他文献至少需要30 min,甚至长达130 min,效率较低。同时,本方法可适用基质广泛,猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝回收率和精密度都较为良好。

表5 不同基质中19种磺胺类药物三水平添加回收率及精密度

Table 5 Recoveries and precision of 19 sulfonamides in different matrices at three spiked level

分析物	加标浓度 (μg/kg)	猪肉		牛肉		鸡蛋		虾肉		鸡皮		猪肝	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
磺胺吡啶	5	102.05	5.71	92.01	7.10	80.17	8.10	107.04	5.74	94.40	8.11	86.06	4.90
	10	101.29	7.62	87.81	9.20	81.05	8.31	106.05	6.20	98.10	7.03	88.41	8.11
	50	88.05	4.60	91.18	5.28	81.58	3.30	88.50	6.93	98.27	5.84	95.95	7.83
磺胺噻唑	5	83.11	12.42	104.06	11.70	84.90	11.01	108.06	9.18	97.09	9.90	91.08	9.36
	10	83.38	6.44	92.08	9.51	87.43	9.33	93.28	7.52	95.48	5.05	89.05	7.23
	50	84.31	3.81	90.24	4.90	81.06	3.06	81.19	4.90	96.48	5.50	96.42	7.75
磺胺甲嘧啶	5	92.32	12.30	111.42	7.21	95.29	10.11	105.08	12.4	86.59	10.58	91.36	9.42
	10	96.26	8.91	96.10	7.33	88.26	6.80	96.04	8.00	109.09	8.18	98.72	6.59
	50	88.62	3.49	86.01	3.60	87.18	3.63	82.46	8.23	108.06	4.23	98.71	4.48
磺胺邻二甲氧嘧啶	5	92.37	9.10	80.98	3.82	88.21	7.13	105.34	9.66	83.88	12.06	83.26	2.30
	10	88.78	6.10	87.47	5.60	84.33	7.48	90.41	4.63	91.26	11.08	84.03	8.14
	50	86.34	5.27	81.78	4.20	83.58	5.00	84.58	8.69	101.25	5.13	84.35	4.72
磺胺喹噁啉	5	109.16	14.16	87.81	9.21	112.03	5.96	83.80	4.82	89.40	12.70	83.48	12.10
	10	95.46	8.16	110.98	8.69	102.06	8.71	107.25	9.19	103.36	5.92	113.25	11.50
	50	86.21	6.11	88.31	5.42	89.95	7.53	90.39	8.72	97.69	9.08	87.08	6.51
磺胺苯吡唑	5	119.28	9.70	84.90	2.10	97.78	5.98	98.65	7.48	81.43	7.06	111.05	10.65
	10	104.50	14.13	97.44	7.74	90.38	10.72	95.17	10.70	112.20	13.85	97.63	12.33
	50	105.05	5.63	88.33	8.00	88.69	7.80	92.08	5.33	98.07	8.43	91.30	5.10
磺胺二甲唑	5	87.35	12.33	103.09	9.53	113.08	12.61	109.54	7.29	113.09	10.48	115.68	9.91
	10	93.19	5.70	93.25	5.81	118.02	8.61	112.58	5.01	114.45	6.90	108.04	8.00
	50	91.13	4.03	86.06	4.81	101.97	7.12	92.36	9.04	115.39	6.22	90.21	7.32

续表 5

分析物	加标 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	猪肉		牛肉		鸡蛋		虾肉		鸡皮		猪肝	
		回收 率/%	RSD /%	回收 率/%	RSD /%	回收 率/%	RSD /%	回收 率/%	RSD /%	回收 率/%	RSD /%	回收 率/%	RSD /%
磺胺 异噻唑	5	111.75	6.61	100.14	2.80	117.04	8.20	93.21	7.76	93.67	4.94	110.70	10.40
	10	97.27	10.12	100.39	5.29	95.35	5.56	103.06	12.14	99.03	8.16	100.43	5.63
	50	88.37	3.24	93.28	5.00	89.16	5.03	83.48	1.90	94.32	4.74	92.36	3.42
苯酰磺胺	5	110.20	11.62	100.87	11.10	94.05	8.74	116.10	7.48	98.80	5.47	103.06	8.27
	10	108.36	7.64	79.09	9.27	89.02	6.08	101.16	5.69	106.19	5.33	103.81	6.93
	50	97.56	5.53	80.38	4.70	81.90	4.28	89.39	5.84	112.31	3.58	93.81	4.36
磺胺二甲 异噻唑	5	89.42	5.80	81.09	6.40	86.80	5.88	89.50	7.63	80.59	6.04	82.18	7.55
	10	87.24	8.52	74.56	5.70	80.73	7.11	86.43	4.07	85.35	9.66	89.05	4.51
	50	85.89	4.87	82.90	9.53	85.39	5.23	82.51	6.20	80.78	6.00	88.05	5.54
磺胺对 甲氧嘧啶	5	82.14	13.51	92.15	11.30	83.27	6.18	85.01	9.74	96.09	3.84	114.32	9.30
	10	82.51	6.53	86.49	8.74	89.24	5.68	83.67	6.70	98.04	8.52	105.59	10.42
	50	83.81	4.59	84.46	4.70	90.51	4.81	87.40	4.42	108.79	3.03	100.03	4.10
磺胺间二 甲氧嘧啶	5	109.01	4.14	105.23	10.22	87.20	8.10	118.51	7.37	101.57	7.76	107.21	11.22
	10	102.48	4.59	94.32	7.88	86.05	8.14	107.59	6.53	106.91	5.31	118.36	6.43
	50	90.07	3.11	94.76	4.83	83.08	6.94	94.47	6.81	107.08	4.52	108.30	1.76
磺胺 甲噻唑	5	107.34	8.26	79.48	9.04	90.85	7.92	99.31	11.85	108.65	4.06	107.90	1.83
	10	100.02	8.79	86.88	5.60	88.01	10.47	105.63	10.71	107.31	8.43	105.08	4.44
	50	87.37	2.84	79.01	4.53	82.62	4.64	98.39	7.80	102.33	6.24	102.53	4.70
磺胺嘧啶	5	102.82	5.12	85.80	10.79	79.86	9.62	83.20	11.56	89.25	10.36	93.76	9.54
	10	83.96	7.37	86.41	6.92	86.82	10.50	80.40	10.73	99.06	10.41	92.16	5.94
	50	86.59	2.09	90.71	6.86	82.08	9.23	81.32	7.91	101.08	3.33	86.43	1.23
磺胺 二甲嘧啶	5	92.64	13.31	108.59	4.69	85.48	6.60	106.88	6.68	109.30	9.60	89.08	11.86
	10	89.71	6.03	94.38	5.11	88.49	7.83	100.32	5.11	100.14	8.40	90.32	7.80
	50	92.18	2.76	101.29	1.00	87.97	3.19	84.78	6.86	106.54	2.54	97.33	3.75
磺胺 甲氧哒嗪	5	97.14	8.36	81.99	9.30	88.07	10.15	104.22	8.37	115.48	9.55	102.47	7.68
	10	92.15	5.54	85.71	5.32	81.06	10.93	96.79	6.94	101.99	4.66	101.18	6.80
	50	91.06	0.91	91.04	6.32	87.15	5.43	84.69	8.29	101.36	6.84	96.83	1.73
磺胺间 甲氧嘧啶	5	104.08	9.32	106.40	10.30	85.98	7.33	102.38	6.66	94.59	3.10	106.39	4.59
	10	80.25	9.52	96.31	5.18	98.65	9.01	100.08	7.73	99.30	9.58	102.29	6.05
	50	93.95	5.33	90.08	7.00	86.98	1.80	82.96	5.01	97.01	3.13	94.58	4.40
磺胺 氯哒嗪	5	111.36	6.84	95.60	4.75	89.26	11.44	105.38	7.03	98.35	5.37	91.75	7.86
	10	92.10	4.81	86.40	7.53	84.22	9.33	96.43	5.86	93.36	8.21	90.36	6.58
	50	85.42	3.02	84.26	2.00	90.56	5.00	85.44	3.97	102.07	5.36	98.25	4.10
磺胺甲 噻二唑	5	105.14	9.28	95.39	10.00	79.70	6.32	85.80	11.30	90.34	8.65	81.09	10.35
	10	90.50	9.28	81.09	11.30	86.30	8.69	86.81	3.52	88.29	6.76	80.18	6.93
	50	87.39	5.30	79.99	5.41	85.90	6.77	88.38	10.82	87.66	6.80	84.88	4.54

注: 平均回收率和 RSD 按照平行 6 次计算。



表 6 本文动物源性食品中磺胺类药物检测方法与其他方法的对比

Table 6 Comparison of the proposed method with other methods of determining sulfonamides residues in animal-derived food

前处理及检测方法	磺胺数量	基质类型	线性范围/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LODs/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	前处理时间/min	回收率/%	参考文献
QuEChERS-脂质过滤柱-HPLC-MS/MS	9	猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝	0.125~12.5	0.01~0.03	60	74.0~100.3	[13]
SPE-HPLC-MS	5	猪肉	0.5~200	0.10~0.23	130	85.0~119.9	[3]
MSPE-HPLC-MS/MS	9	鸡肉	2~100	0.8~1.6	100	78.9~112.0	[9]
QuEChERS-HPLC-UV	8	鸡肉、鸡蛋	13.6~1000	4.1~25.6	30	65.9~88.1	[21]
流穿式净化柱-UHPLC-MS/MS	19	猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝	1~500.00	1.00~2.00	10	74.56~119.28	本文方法

### 3 结论

本研究采用盐包和流穿式净化柱对动物源性食品中杂质进行双重净化, UPLC-MS/MS 法对净化提取液中 19 种磺胺类药物进行定性及定量分析, 建立了动物源性食品中 19 种磺胺类药物的快捷、高效、准确、稳定的确证检测方法。本方法操作简便, 整个前处理过程可缩短至 10 min 以内, 猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝在 5、10、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  加标水平下, 平均回收率为 74.56%~119.28%, RSD 为 0.91%~14.16%。因此本方法适用于猪肉、牛肉、鸡蛋、虾肉、鸡皮、猪肝中的磺胺类药物残留检测, 回收率和精密度良好, 为动物源性食品中磺胺类药物残留的监管提供强有力的支持。

### 参考文献

- [1] Nasir A N M, Yahaya N, Zain N N M, et al. Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products [J]. Food Chemistry, 2019, 276: 458-466.
- [2] Yan Z M, Hu B Q, Li Q L, et al. Facile synthesis of co-valent organic framework incorporated electrospun nanofiber and application to pipette tip solid phase extraction of sulfonamides in meat samples [J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1584: 33-41.
- [3] Shen R J, Huang L J, Liu R Q, et al. Determination of sulfonamides in meat by monolithic covalent organic frameworks based solid phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography-mass spectrometric [J]. Journal of Chromatography A, 2021, 1655: 462518.
- [4] Jiang W X, Wang Z H, Beier R C, et al. Simultaneous determination of 13 fluoroquinolone and 22 sulfonamide residues in milk by a dual-colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(4): 1995-1999.
- [5] Patyra E, Przeniosła-Siwczyńska M, Kwiatek K. Determination of sulfonamides in feeds by high-performance liquid chromatography after fluorescamine precolumn derivatization [J]. Molecules, 2019, 24: 452.
- [6] Zhang Yan, Li X Q, Guo Z, et al. Assessment of the impact of hydrolysis on bound sulfonamide residue determination in honey using stable isotope dilution ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2021, 361: 130094.
- [7] He B S, Yan X H. Modifications of Au nanoparticle-functionalized graphene for sensitive detection of sulfanilamide [J]. Sensors, 2018, 18: 846.
- [8] Balakrishnan V K, Terry K A, Toito J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1131: 1-10.
- [9] Yang Y, Li G L, Wu D, et al.  $\beta$ -Cyclodextrin-/AuNPs-functionalized covalent organic framework-based magnetic sorbent for solid phase extraction and determination of sulfonamides [J]. Microchimica Acta, 2020, 187: 278.
- [10] Wang G N, Zhang L, Song Y P, et al. Application of molecularly imprinted polymer based matrix solid phase dispersion for determination of fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in meat [J]. Journal of Chromatography B, 2017, 12(5): 104-111.
- [11] Kechagia M, Samanidou V, Kabir A, et al. One-pot synthesis of a multi-template molecularly imprinted polymer for the extraction of six sulfonamide residues from milk before high-performance liquid chromatography with diode array detection [J]. Journal of Separation Science, 2018, 41(3): 723-731.
- [12] Herrera-Herrera A V, Hernández-Borges J, Borges-Miquel T M, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the

- simultaneous determination of 25 sulfonamide and quinolone antibiotics in water samples [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 75: 130-137.
- [13] Wen C H, Lin S L, Fuh M R, Determination of sulfonamides in animal tissues by modified QuEChERS and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2017, 164: 85-91.
- [14] Chen L G, Zeng Q L, Wang H, et al. On-line coupling of dynamic microwave-assisted extraction to solid-phase extraction for the determination of sulfonamide antibiotics in soil [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 648: 200-206.
- [15] Silvia D íz-Cruz M, Jesús Garc ía-Gal án M, Barceló D. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1193: 50-59.
- [16] Li J D, Cai Y Q, Shi Y L, et al. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography-spectrophotometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1139(2): 178-184.
- [17] Lia Y Z, Lia Z Q, Wang W P, et al. Miniaturization of self-assembled solid phase extraction based on graphene oxide/chitosan coupled with liquid chromatography for the determination of sulfonamide residues in egg and honey [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1447: 17-25.
- [18] Deng Z H, Xu G J, Wang X L, et al. A Zr(IV)-based porphyrinic metal-organic framework as a solid-phase sorbent for extraction of sulfonamides prior to their quantitation by LC-MS [J]. *Microchimica Acta*, 2018, 2985: 1-8.
- [19] Da Silva M R, Langas F M. Evaluation of ionic liquids supported on silica as a sorbent for fully automated online solid-phase extraction with LC-MS determination of sulfonamides in bovine milk samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(10): 2237~2244.
- [20] Jia X Z, Zhang B, Chen C, et al. Immobilization of chitosan grafted carboxylic Zr-MOF to porous starch for sulfanilamide adsorption [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2021, 253: 117305.
- [21] Gao Q, Luo D, Ding J, et al. Rapid magnetic solid-phase extraction based on magnetite /silica/poly (methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethacrylate) composite microspheres for the determination of sulfonamide in milk Samples [J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217: 5602-5609.
- [22] Huertas-P éreza J F, Arroyo-Manzanares N, Havl íková L, et al. Method optimization and validation for the determination of eight sulfonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 124: 261-266.
- [23] Petarca M H, Braga P A C, Reyes F G R, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry as a potential combination for the determination of sulfonamide residues in complex infant formula matrices [J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1633: 461-466.
- [24] Herrera-Herrera A V, Hernández-Borges J, Afonso M M, et al. Comparison between magnetic and non-magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples [J]. *Talanta*, 2013, 116: 695-703.
- [25] Sereshti H, Khosraviani M, Sadegh Amini-Fazl M. Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction in a coupled-syringe System combined with HPLC-UV for extraction and determination of sulfanilamide [J]. *Talanta*, 2014, 121: 199-204.