

· 研究简报 ·

高效液相色谱-质谱同时测定大蒜素渔药中的 14 种磺胺类抗生素

杨琳¹, 邹红梅¹, 温裕云², 弓振斌^{2*}

(1. 福建省海洋环境与渔业资源监测中心, 福建 福州 350003;

2. 近海海洋环境科学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361005)

摘要: 建立了高效液相色谱-质谱联用技术同时测定常用渔药大蒜素中 14 种磺胺类抗生素的方法. 优化实验条件下, 14 种待测目标物除磺胺噻唑(ST)、磺胺醋酰(SAT)外均得到基线分离. 对方法的分析性能进行了实验. 方法的检出限在 0.12 ng(磺胺二甲氧嘧啶, SDM) ~ 1.16 ng(磺胺胍, SGN)之间, 相对标准偏差(RSD)小于 11.3% (0.5 μg/mL, n=6), 加标回收率在 86% ~ 107%之间. 该方法能应用于大蒜素中违禁磺胺类抗生素的快速测定.

关键词: 磺胺类抗生素; 大蒜素; 高效液相色谱-质谱

中图分类号: O 657.63

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)02-0293-04

渔药是水产养殖中用以预防、控制和治疗水产动植物的病虫害、促进养殖品种健康生长、增强机体抗病能力、改善养殖水体质量的一类物质. 大蒜素是一种无副作用、环境友好的绿色环保渔药, 在水产养殖中得到广泛的应用^[1]. 生产厂家有时在大蒜素中添加磺胺类抗生素以增强药效, 致使水产品中产生磺胺类抗生素残留. 加强对大蒜素等常用渔药中禁用成分的监管是提高水产品质量、保证食品安全的重要一环.

磺胺类抗生素的分析方法有高效液相色谱(HPLC)^[2-5]、气相色谱(GC)^[6]、气相色谱-质谱(GC-MS)^[7]、液相色谱-质谱(LC-MS)^[8-10]. 已经报道的方法大多集中在动物源性食品或动物饲料中磺胺类抗生素残留分析, 对常用渔药如大蒜素中磺胺类药物的快速定性、定量分析的研究尚未见报道. 本工作以文献[8-10]为基础, 采用乙腈/乙酸水溶液超声提取, 离心后直接进样测定; 通过对色谱、质谱条件的优化, 建立了样品预处理简单、快速, 适合大批量样品快速检测的方法, 并对实际样品进行了分析.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱-MSD Trap VL 质谱仪(Agilent Technologies, USA); KQ-250B 型超声波

清洗器(昆山市超声仪器有限公司); 离心机(Sigma 2-16 K).

乙腈为色谱纯; 冰乙酸为分析纯; 实验用水为 Milli-Q 高纯水; 14 种磺胺类抗生素标准物质(纯度 99%) 分别为: 磺胺胍(sulfaguanidine, SGN)、磺胺(sulfanilamide, SA)、磺胺噻唑(sulfathiazole, ST)、磺胺醋酰(sulfacetamide, SAT)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ)、磺胺吡啶(sulfapyridine, SPD)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR)、磺胺甲噻二唑(sulfamethizole, SM TZ)、磺胺二甲基嘧啶(sulfamethazine, SDMD)、磺胺-6-甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMMX)、磺胺氯吡嗪(sulfachloropyridazine, SCP)、磺胺甲基异恶唑(sulfamethoxazole, SMX)、磺胺二甲基异恶唑(sulfisoxazole, SIA)、磺胺二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine, SDM).

1.2 液相色谱分离及质谱测定条件

色谱柱: Agilent Zorbax SB-C₁₈ 柱(3.5 μm, 4.6 × 150 mm); 流动相: 乙腈(B) - 0.1% 乙酸水溶液(A), 流速 0.3 mL/min; 柱温 30 °C; 进样量 2.0 μL; 分流比 3:1; 流动相梯度程序: 0.0 ~ 3.5 min, B 从 28% 到 40%; 3.5 ~ 6.0 min, B 为 40%; 6.0 ~ 7.0 min, B 从 40% 到 50%; 7.0 ~ 16.0 min, B 为 50%; 16.0 ~ 40.0 min, B 为 100%.

优化后的质谱测定工作条件见表 1.

2 结果与讨论

2.1 样品预处理

收稿日期: 2006-10-10

基金项目: 福建省自然科学基金重点项目(B0220001)资助

* 通讯作者: zbgong@xmu.edu.cn

表 1 MSD 工作条件

Tab. 1 Optimized operating conditions for MSD Trap VL

参数	工作条件
Mass Range Mode	Std/ Normal
Ion Polarity	Positive
Ion Source Type	ESI
Dry Temp (Set)	350
Nebulizer (Set)	40.00 psi
Dry Gas (Set)	9.00 L/ min
Trap Drive	52.7
Skim 1	40.8 V
Skim 2	6.0 V
Octopole RF Amplitude	150.0 Vpp
Capillary Exit	116.7 V
Cap Exit Offset	75.9 V
Scan Range	50 ~ 1000 m/z
Averages	7 Spectra
Max. Accu Time	200000 μ s
ICC Target	30000

在文献[2]的基础上拟定如下样品预处理步骤:称取 5.0 g 样品于 100 mL 离心管中,加入 50.0 mL 提取溶液(乙腈 - 0.1% 乙酸水溶液,80:20, by vol.),在 50 °C 下超声波震荡提取 20 min 后,于 4 000 r/min 离心 10 min,取上层清液用 0.22 μ m 的水相膜过滤后待测定。

通过标准加入回收实验确定样品预处理过程。实验结果表明,各组分标准加入回收实验的回收率在 86.0% 以上,基本满足痕量药物残留定量测定的要求。

2.2 色谱分离条件优化

磺胺类药物分子结构中含有氨基,具有弱碱性。调节流动相的 pH,可以抑制弱碱的解离,进而改变组分的保留时间,改善色谱分离的分离度。实验结果表明,酸度较高时 14 种磺胺类药物很难达到基线分离;酸度过低时,各组分有明显的拖尾现象;实验还表明,乙腈与水的比例除影响各组分的保留时间、出峰顺序外,酸度对电喷雾离子源的离子化效率有较大影响。综合上述各种因素,实验中采用乙腈 - 0.1% 冰醋酸为流动相,结合梯度淋洗技术,实现了 13 种待测组分的基线分离(除 ST 和 SAT 无法分离外,但用质谱定性及定量并无影响),并且各组分间分离度大,峰形尖锐,峰对称性好。大蒜素样品中添加标准的色谱图如图 1 所示。待测磺胺类抗生素在 15 min 内得到很好分离,而大蒜素样品中提取出来的部分物质在 20 min 后流出,它们对抗生素的准确测定没有干扰。

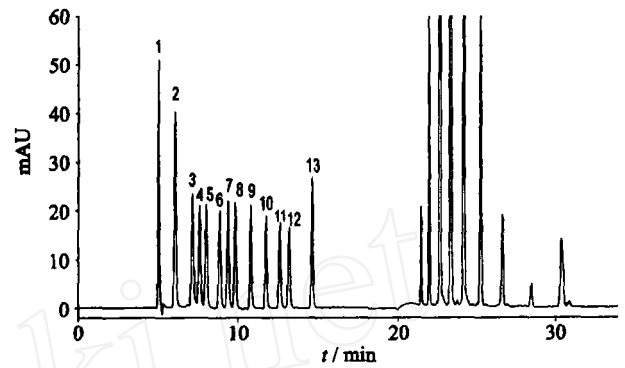


图 1 样品中添加标准色谱图

加标后的浓度为 5.0 μ g/mL, DAD 检测波长 254 nm

1: SGN; 2: SA; 3: ST/ SAT; 4: SDZ; 5: SPD; 6: SMR; 7: SMTZ; 8: SDMD; 9: SMMX; 10: SCP; 11: SMX; 12: SIA; 13: SDM

Fig. 1 Chromatogram of standard spiked sample

2.3 质谱条件的优化

根据磺胺类药物的分子结构特征选择 ESI 正离子扫描模式进行测定。通过注射泵直接进样对各待测组分的电喷雾电压、雾化气压力、干燥气温度、干燥气流速、质谱分辨率等条件进行了优化。优化后的保留时间、监测离子对和定量测定离子如表 2。

2.4 方法的检出限、精密度及标准加入回收试验

表 3 列出了方法的检出限、精密度以及实验浓度范围内标准加入回收的线性回归参数。需要说明的是,为了克服离子阱质谱定量测定时精密度较差的问题,数据处理时通过 LC/MSD Trap Software 对定量测定离子峰(选择性离子)进行面积积分,以该积分面积作为待测组分定量离子的强度。当然,若仅对各组分进行快速筛选时,则不必采用这种数据处理方法。

方法的检出限定义为空白样品(或含待测组分浓度较低的样品)多次测定($n=5$)标准偏差 10 倍所对应的浓度。实验中在实际样品中添加待测组分的混合标准溶液,使样品中各组分浓度为 0.5 μ g/mL,对 6 个平行样品进行测定,求得各组分的相对标准偏差(RSD, 0.5 μ g/mL, $n=6$)、检出限(以 ng 表示,10 μ L,进样量 2.0 μ L),如表 3 所示。

方法的准确度通过标准加入回收实验确定。在样品中加入标准溶液,加标后样品中各组分的浓度为 0.0、0.5、1.0、2.5、5.0 μ g/mL,按照 2.1~2.3 所述的步骤进行目标物的提取、净化、测定,计算各组分的标准加入回收结果。试验结果表明,在添加的 0.0~5.0 μ g/mL 浓度范围内,加入的 5 个浓度的能以相近的回

表 2 14 种磺胺类药物质谱分析的保留时间、监测离子对以及定量测定离子

Tab. 2 LC-MS parameters for the sulfonamides analysis

药物名称	保留时间/ min	监测离子(m/z)	定量测定离子(m/z)
SGN	5.07	215.1/156.1/108.2	215.1
SA	6.10	173.1/108.2	173.1
ST	7.12	256.1/156.1/108.2	256.1
SAT	7.12	214.2/156.1/108.2	214.2
SDZ	7.62	251.1/185.1/156.1/108.2	251.1
SPD	8.04	250.1/184.1/156.1/108.2	250.1
SMR	8.88	265.1/199.2/156.1/108.2	265.1
SMTZ	9.40	271.1/156.1/108.2	271.1
SDMD	9.85	279.2/204.1/156.1/108.2	279.2
SMMX	10.82	281.2/156.1/126.2/108.2	281.2
SCP	11.76	285.1/130.1/156.1/108.2	285.1
SMX	12.62	254.1/156.1/108.2	254.1
SIA	13.12	268.1/156.1/108.2	268.1
SDM	14.63	311.2/245.2/156.1/108.2	311.2

表 3 14 种磺胺的检出限、精密度及标准加入回收试验结果

Tab. 3 Limits of detection, relative standard deviations, and recoveries of standard addition of 14 sulfonamides

药物名称	线性回归方程	线性相关因子	回收率 / %	检出限 / ng	相对标准偏差 / %
SGN	$y = 0.5350x + 547.1$	0.9979	92	1.16	7.8
SA	$y = 3.4257x + 757.3$	0.9994	89	1.02	11.3
ST	$y = 0.7316x + 177.2$	0.9988	96	0.83	11.1
SAT	$y = 1.2651x + 234.5$	0.9956	103	1.00	9.8
SDZ	$y = 0.9541x + 367.2$	0.9998	107	0.73	8.8
SPD	$y = 2.6858x + 972.6$	0.9976	87	0.40	5.9
SMR	$y = 2.5304x + 766.0$	0.9994	92	0.17	2.5
SMTZ	$y = 1.2035x - 242.5$	0.9978	89	0.50	9.7
SDMD	$y = 6.7410x + 1880.4$	0.9994	86	0.37	5.5
SMMX	$y = 3.9348x + 1695.5$	0.9984	88	0.20	2.8
SCP	$y = 0.5866x + 274.0$	0.9999	91	1.00	11.0
SMX	$y = 0.8645x + 370.0$	0.9978	101	0.75	10.5
SIA	$y = 0.3352x + 183.4$	0.9983	98	0.47	6.2
SDM	$y = 17.099x + 8891.9$	0.9973	89	0.12	1.5

收率回收,即加入的标准溶液浓度与 LC/MSD 的响应信号之间呈线性回归.表 3 列出了各组分的标准加入回收率以及相关参数.

2.5 实际样品分析

表 4 所示为市场上购置的 3 个大蒜素样品进行分析的结果.试验结果表明,3 个样品中有 2 个未检出抗生素,而 2# 样品中检出 3 种抗生素残留,浓度在 $\mu\text{g/g}$ 量级.

3 结 论

建立了乙腈 - 0.1% 乙酸水溶液超声提取、离心后直接测定常用渔药大蒜素中的磺胺类抗生素的方法;方法对样品前处理简单、快速,适合大量样品的快速筛选,也适合定量检测.实验条件下,可以对 14 种抗生素进行快速测定,方法的检出限在 0.12 ~ 1.16 ng 之间,相对标准偏差在 1.5% ~ 11.3% 之间 ($0.5 \mu\text{g/mL}$, $n =$

6).

表 4 实际样品分析结果

Tab. 4 Analytical results for real world samples ($\mu\text{g/g}$)

	1 #	2 #	3 #
SGN	ND*	ND	ND
SA	ND	ND	ND
ST	ND	1.2	ND
SAT	ND	1.4	ND
SDZ	ND	ND	ND
SPD	ND	ND	ND
SMR	ND	ND	ND
SMTZ	ND	ND	ND
SDMD	ND	ND	ND
SMMX	ND	0.8	ND
SCP	ND	ND	ND
SMX	ND	ND	ND
SIA	ND	ND	ND
SDM	ND	ND	ND

*ND-not detected

参考文献:

- [1] 王兆平,常东洲,雷庆铎.大蒜素在水产动物疾病防治中的应用[J].中国水产,2005,4:53-54.
- [2] 徐维海,林黎明,朱校斌,等.水产品中14种磺胺类药物残留的HPLC法同时测定[J].分析测试学报,2004,23(5):122-124.
- [3] 王曼霞,林黎明,邱芳,等.高效液相色谱法测定动物组织中磺胺类残留量[J].分析化学,2004,32(11):1421-1425.
- [4] Hela W,Brandtner M,Widek R,et al. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection[J]. Food Chemistry,2003,83:601-608.
- [5] 林海丹,谢守新,冯德雄,等.动物源性食品中磺胺类药物残留的固相萃取-高效液相色谱法测定[J].分析测试学报,2003,22(1):94-96.
- [6] 邵俊杰,袁智能,聂洪勇,等.肉中十种磺胺兽药残留量的同时测定方法[J].色谱,1993,11(6):373.
- [7] Reeves V B. Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas chromatography-positive chemical ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr B,1999,723:127.
- [8] 庞国芳,曹彦忠,张进杰,等.液相色谱-串联质谱同时测定家禽组织中16种磺胺残留[J].分析化学,2005,3(9):1252-1256.
- [9] 秦燕,张美金,林海丹.高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定动物饲料中的10种磺胺[J].色谱,2005,23(4):397-400.
- [10] Shao B,Dong D,Wu Y N,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,2005,546:174-181.

A Rapid Procedure for Determination of 14 Sulfonamides in Garlicin with High Performance Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry

YANG Lin¹, ZHOU Hong-mei¹, WEN Yu-yun², GONG Zhen-bin^{2*}

(1. Monitoring Center of Marine Environment and Fishery Resources, Fuzhou 350003, China;

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science(Xiamen University), Xiamen 361005, China)

Abstract: A rapid procedure for determination of 14 sulfonamides in garlicin with high performance liquid chromatography/ mass spectrometry was developed. The analytes, with exception of sulfathiazole and sulfacetamide, have been base-line separated in the experiment. Limits of detection ranged from 0.12 ng (sulfadi-methoxine) to 1.16 ng (sulfa-guanidine). Relative standard deviations were less than 11.3% ($0.5 \mu\text{g/mL}$, $n=6$). The recoveries for spiked standards in sample were between 86%~107% with developed method.

Key words: sulfonamides; garlicin; high performance liquid chromatography/ mass spectrometry