

李朔, 张璨, 马玲, 等. QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法同步测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 301–308. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080276

LI Shuo, ZHANG Can, MA Ling, et al. Simultaneous Determination of 24 Sulfonamide Antibiotics in Fish Products by QuEChERS with Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(9): 301–308. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080276

· 分析检测 ·

# QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法 同步测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素

李 朔<sup>1</sup>, 张 璨<sup>2</sup>, 马 玲<sup>2</sup>, 王 可<sup>1,2,\*</sup>, 杨莉丽<sup>1</sup>, 花中霞<sup>2</sup>, 张梦妍<sup>2</sup>

(1. 河北师范大学化学与材料科学学院, 河北石家庄 050024;

2. 石家庄市疾病预防控制中心, 石家庄市化学毒物检测及风险预警技术创新中心, 河北石家庄 050011)

**摘 要:** 采用 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 法建立了同时测定鱼肉制品中磺胺二甲嘧啶、磺胺脒、结晶磺胺等 24 种磺胺类抗生素的分析方法。通过对色谱、质谱条件和 QuEChERS 前处理技术的优化, 确定了最佳的实验条件。样品采用乙腈超声提取, 上清液经  $C_{18}$  和无水硫酸镁净化, 过  $0.20\ \mu\text{m}$  滤膜后经 UPLC-MS/MS 检测。以乙腈-0.1% 甲酸水溶液为流动相, 经 Eclipse XDB- $C_{18}$  色谱柱 ( $4.6\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ ,  $1.8\ \mu\text{m}$ ) 进行分离, 在电喷雾电离源 (electrospray ionization source, ESI) 正离子模式下, 进行多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM), 基质匹配外标法定量。结果表明, 在各自线性范围内 24 种磺胺类抗生素具有良好的线性关系, 相关系数 ( $r$ ) 大于 0.999, 在 5、10、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  3 个加标浓度水平下的平均加标回收率为 80.0%~116.4%, 相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 为 0.8%~9.4% ( $n=7$ )。方法检出限为 0.01~0.48  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为 0.02~1.59  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 所测样品均未检出磺胺类抗生素。该方法简单快速、选择性好、灵敏度高, 适用于鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的高通量检测。

**关键词:** 鱼肉制品, 超高效液相色谱-串联质谱, 磺胺类抗生素, QuEChERS

中图分类号: TS254.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)09-0301-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021080276



本文网刊:

## Simultaneous Determination of 24 Sulfonamide Antibiotics in Fish Products by QuEChERS with Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

LI Shuo<sup>1</sup>, ZHANG Can<sup>2</sup>, MA Ling<sup>2</sup>, WANG Ke<sup>1,2,\*</sup>, YANG Lili<sup>1</sup>, HUA Zhongxia<sup>2</sup>, ZHANG Mengyan<sup>2</sup>

(1. College of Chemistry and Materials Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, China;

2. Shijiazhuang Center for Disease Control and Prevention, Shijiazhuang Technology Innovation Center for Chemical Poison Detection and Risk Early Warning, Shijiazhuang 050011, China)

**Abstract:** A method for the simultaneous determination of 24 sulfonamide antibiotics including sulfamethazine, sulfaguanidine, sulfanilamide and so on in fish products was established by QuEChERS coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The optimal experimental conditions were determined by optimizing the chromatographic and mass spectrometric conditions and the QuEChERS pre-treatment technique. The samples were extracted by acetonitrile under ultrasonication, and then purified by  $C_{18}$  and anhydrous  $\text{MgSO}_4$ . The solvent was detected by UPLC-MS/MS after filtering through  $0.20\ \mu\text{m}$  microporous membrane. The separation was performed on an Eclipse XDB- $C_{18}$  column ( $4.6\ \text{mm} \times 100\ \text{mm}$ ,  $1.8\ \mu\text{m}$ ) using acetonitrile-0.1% formic acid aqueous solution as the

收稿日期: 2021-08-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81903322); 石家庄市科学技术研究与发展指导计划项目 (191460733)。

作者简介: 李朔 (1996-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品中兽药残留检测, E-mail: 358881341@qq.com。

\* 通信作者: 王可 (1981-), 男, 博士, 主任技师, 研究方向: 食品安全与毒物检测, E-mail: wkecdc@163.com。

mobile phase, and determined with positive ion mode of electrospray ionization (ESI) under multiple reaction monitoring (MRM). Then the matrix matching external standard method was used for quantitative analysis. The results indicated that the 24 sulfonamide antibiotics showed good linearity in the respective linear range with the correlation coefficients ( $r$ ) higher than 0.999. The average recoveries at three spiked levels of 5, 10 and 50  $\mu\text{g/kg}$  ranged from 80.0% to 116.4% with the relative standard deviation (RSD) of 0.8%~9.4% ( $n=7$ ). Moreover, the limits of detection (LOD) were 0.01~0.48  $\mu\text{g/kg}$  and the limits of quantification (LOQ) were 0.02~1.59  $\mu\text{g/kg}$ . The method was simple, rapid, selective and sensitive for the high-throughput detection of 24 sulfonamide antibiotics in fish products.

**Key words:** fish products; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; sulfonamide antibiotics; QuEChERS

磺胺类抗生素是一类具有对位氨基苯磺酰胺结构的抗生素总称<sup>[1-2]</sup>,具有较强的抗菌能力,被广泛应用于预防和控制水产养殖过程中的各种动物疾病,除此之外,还被认为是一种饲料添加剂以促进水产养殖动物生长<sup>[3-4]</sup>。其作用原理是通过竞争性抑制叶酸循环过程中的对氨基苯甲酸来达到减少和杀灭细菌核蛋白的目的<sup>[5]</sup>。此类人工合成的抗生素具有价格低、抗菌范围广、高效、不易分解<sup>[6]</sup>等特点,但其在动物体内具有作用时间较长、较慢代谢速率等问题,一部分会在动物体内残留,另一部分会随排泄物以原型或代谢物的形式排出体外<sup>[7-8]</sup>。过量使用磺胺类抗生素会对环境造成一定程度的污染,进而通过食物链在人体内蓄积从而对人体健康造成潜在威胁<sup>[9]</sup>。磺胺类抗生素长期存在于人类体内会引起急性或慢性中毒,还会影响机体的泌尿、免疫系统,破坏人体的造血系统或产生耐药性等<sup>[10-11]</sup>。针对动物组织及牛奶中的磺胺类抗生素,欧盟规定其最大残留量为 100  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[12]</sup>。我国国家标准 GB 31650-2019 制订了在动物性食品中磺胺二甲嘧啶的限量为 25~100  $\mu\text{g/kg}$ ,其他磺胺类抗生素残留总和为 100  $\mu\text{g/kg}$ <sup>[13]</sup>。

目前,对鱼肉中磺胺类抗生素的检测多为其中一种或几种,同时对 20 种以上磺胺类抗生素的检测报道较少。而且与文献报道的检测鱼肉中磺胺类抗生素的液液萃取法<sup>[14]</sup>、加速溶剂萃取法<sup>[4]</sup>、固相萃取法<sup>[15-17]</sup>等前处理技术相比,QuEChERS 法具有操作简便、无需昂贵的仪器、试验成本低、应用范围广等优点。近年来,磺胺类抗生素的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)<sup>[18-20]</sup>、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[21-24]</sup>、毛细管电泳法<sup>[24-25]</sup>等。其中,液相色谱-串联质谱法具有灵敏度高、准确度高、能同时分析多种痕量物质等优点<sup>[26]</sup>,适用于多种磺胺类抗生素的检测。如:HOFF 等<sup>[27]</sup>基于液相色谱-串联质谱技术发展了一种测定牛肝中 6 种磺胺类抗生素的新方法;WANG 等<sup>[28]</sup>建立了超高效液相色谱-串联质谱法分析了畜禽粪便中 17 种磺胺类抗生素;MARTINS 等<sup>[29]</sup>发展了液相色谱串联质谱法测定牛奶中 11 种磺胺类抗生素的检测新方法。

鱼作为营养丰富、价格低廉的水产品之一,其组织中磺胺类抗生素的残留检测方法已有报道,而关于基质更加复杂的鱼肉制品中磺胺类抗生素的检测却鲜有报道,因此本文开展鱼肉制品中磺胺类抗生素的

检测研究,对完善食品安全监测体系具有重要意义。为此,本研究通过优化 QuEChERS 前处理方法、色谱和质谱条件,开发了超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的检测方法,为开展鱼肉制品中磺胺类抗生素的残留监测及风险评估提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

磺胺脒 纯度>99.0%,美国 International L-laboratory 公司;其余磺胺类抗生素标准品 纯度>97.0%,德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司;甲酸、乙酸铵 色谱纯,美国 Dikma 公司;甲醇 色谱纯,美国 Fisher 公司;乙腈 色谱纯,德国 Merck 公司;N-丙基乙二胺(PSA) 美国 Dikma 公司; $\text{C}_{18}$ (40~50  $\mu\text{m}$ ) 美国 Welch 公司;无水硫酸镁、氯化钠 分析纯,天津永大化学试剂有限公司;ZORBAX Eclipse XDB- $\text{C}_{18}$ (4.6 $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ )、ZORBAX SB-Aq(2.1 $\times$ 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ )、ZORBAX Eclipse Plus  $\text{C}_{18}$ (2.1 $\times$ 100 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) 美国 Agilent 公司;鱼肉罐头、鱼豆腐、鱼肠、鱼丸和鱼皮等鱼肉制品 当地超市。

AB SCIEX Exion 超高效液相色谱仪、TRIPLE QUAD 5500 三重四级杆串联质谱仪(配电喷雾源(ESI)及 AB SCIEX 数据处理软件) 美国 AB SCIEX 公司;EVAP-12 氮吹仪 美国 Organomation 公司;VXMNAL 涡旋振荡器 美国 OHAUS 公司;T-460/H 超声清洗器 德国 Elma 公司;Milli-Q 超纯水机 美国 Millipore 公司;CR21N 高速冷冻离心机 日本日立公司;AE240(精度 1/10<sup>5</sup>)电子天平 瑞士 Mettler Toledo 公司;GM 200 研磨机 德国 Retsch 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 称取适量的磺胺类抗生素标准品采用乙腈溶解,配制成 1 g/L 的单一标准储备液,于-20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中密封储存。取适量的各标准储备液,以乙腈定容,得到 1 mg/L 的混合标准溶液<sup>[30]</sup>。采用鱼肉罐头空白溶液逐级稀释配成各标准物质浓度均为 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50、100  $\mu\text{g/L}$  的系列混合标准工作溶液。

1.2.2 样品前处理 准确称取粉碎后的样品 1.0 g

(精确至 0.01 g), 放入 50 mL 离心管中, 加入超纯水 2 mL 和乙腈 10 mL, 充分涡旋混匀, 超声 5 min 后加入 NaCl 1.5 g, 涡旋 30 s, 以 8000 r/min 在 4 ℃ 下离心 5 min。移取 7.5 mL 上清液至盛有 C<sub>18</sub> 0.3 g 和无水 MgSO<sub>4</sub> 0.4 g 的离心管中, 涡旋混匀 30 s, 以 8000 r/min 离心 5 min, 取上层乙腈 5 mL, 在 40 ℃ 下氮吹浓缩至近干, 用 1.0 mL 初始流动相复溶, 经 0.20 μm 滤膜过滤, 供 UPLC-MS/MS 测定。

**1.2.3 液相色谱条件** ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 1.8 μm); 柱温: 40 ℃; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2 μL; 流动相: A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0.0~7.5 min, 21% B; 7.5~7.6 min, 21%~40% B; 7.6~11.0 min, 40% B; 11.0~11.1 min, 40%~75% B; 11.1~15.0 min, 75% B; 15.1~18.0 min, 21% B。

**1.2.4 质谱条件** 离子源: 电喷雾电离源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 离子化电压: 5500 V; 离子源温度: 550 ℃; 气帘气: 40 psi; 喷雾气: 50 psi; 辅助气: 50 psi。24 种磺胺类抗生素的详细质谱参数见表 1。

表 1 24 种磺胺类抗生素的质谱参数  
Table 1 Mass spectrometric (MS) parameters for 24 sulfonamides

| 序号 | 磺胺类抗生素   | 保留时间<br>(min) | 母离子<br>(m/z) | 子离子<br>(m/z)              | 去簇电压<br>(V) | 碰撞能<br>(eV) |
|----|----------|---------------|--------------|---------------------------|-------------|-------------|
| 1  | 磺胺脒      | 3.36          | 215.2        | 156.0 <sup>*</sup> /108.1 | 58.1/71.2   | 20.3/30.9   |
| 2  | 结晶磺胺     | 3.99          | 173.0        | 93.0 <sup>*</sup> /108.1  | 136.2/106.9 | 30.2/22.0   |
| 3  | 磺胺二甲基异噁唑 | 4.00          | 279.2        | 124.2 <sup>*</sup> /186.0 | 81.8/78.1   | 27.5/23.0   |
| 4  | 甲氧苄啶     | 4.46          | 291.2        | 230.1 <sup>*</sup> /261.1 | 77.0/60.3   | 31.5/34.8   |
| 5  | 磺胺醋酰     | 5.26          | 215.1        | 92.0 <sup>*</sup> /156.1  | 103.9/116.0 | 29.0/14.6   |
| 6  | 磺胺噻唑     | 5.51          | 256.1        | 156.1 <sup>*</sup> /108.2 | 83.8/83.8   | 21.0/31.8   |
| 7  | 磺胺嘧啶     | 5.64          | 251.1        | 156.2 <sup>*</sup> /108.0 | 59.7/48.9   | 22.0/33.0   |
| 8  | 磺胺吡啶     | 6.24          | 250.1        | 156.0 <sup>*</sup> /184.2 | 73.3/82.1   | 23.0/23.9   |
| 9  | 磺胺甲基噁唑   | 7.10          | 265.1        | 156.1 <sup>*</sup> /172.0 | 40.3/61.1   | 23.1/23.0   |
| 10 | 磺胺二甲恶唑   | 7.18          | 268.2        | 156.2 <sup>*</sup> /108.0 | 88.0/81.0   | 23.7/33.4   |
| 11 | 磺胺甲噻二唑   | 8.23          | 271.0        | 156.0 <sup>*</sup> /108.2 | 49.2/45.1   | 20.8/31.3   |
| 12 | 磺胺甲氧哒嗪   | 8.61          | 279.2        | 124.1 <sup>*</sup> /186.2 | 85.1/77.0   | 32.1/24.1   |
| 13 | 磺胺二甲噁唑   | 8.79          | 281.0        | 156.2 <sup>*</sup> /92.1  | 83.2/77.9   | 24.0/37.9   |
| 14 | 磺胺对甲氧嘧啶  | 9.10          | 281.1        | 156.1 <sup>*</sup> /108.2 | 55.0/61.1   | 24.9/33.2   |
| 15 | 磺胺间甲氧嘧啶  | 11.26         | 281.1        | 156.2 <sup>*</sup> /108.2 | 56.9/18.1   | 24.2/35.1   |
| 16 | 磺胺氯达嗪    | 12.17         | 285.1        | 156.2 <sup>*</sup> /108.1 | 82.0/83.1   | 21.6/34.0   |
| 17 | 周效磺胺     | 12.58         | 311.1        | 156.0 <sup>*</sup> /108.1 | 82.1/73.1   | 24.1/33.0   |
| 18 | 磺胺甲恶唑    | 12.62         | 254.1        | 156.1 <sup>*</sup> /108.2 | 106.9/84.9  | 22.3/31.9   |
| 19 | 磺胺二甲异唑   | 13.04         | 268.0        | 156.2 <sup>*</sup> /113.0 | 87.7/100.2  | 19.6/21.8   |
| 20 | 苯甲酰磺胺    | 13.98         | 277.1        | 156.1 <sup>*</sup> /92.0  | 72.9/76.9   | 17.8/38.8   |
| 21 | 磺胺噻恶唑    | 14.18         | 301.1        | 156.0 <sup>*</sup> /92.1  | 38.0/47.9   | 23.2/39.7   |
| 22 | 磺胺地索辛    | 14.25         | 371.2        | 156.2 <sup>*</sup> /108.1 | 55.0/39.8   | 27.4/37.9   |
| 23 | 磺胺苯吡唑    | 14.58         | 315.2        | 156.2 <sup>*</sup> /108.2 | 90.1/93.5   | 27.7/38.1   |
| 24 | 磺胺硝苯     | 15.16         | 336.3        | 156.2 <sup>*</sup> /294.0 | 155.2/153.8 | 17.1/16.9   |

注: \*为定量离子。

### 1.3 数据处理

采用 Analyst 软件 1.6.3 控制仪器、采集数据,

MultiQuant 3.0.2 软件进行数据处理和标准曲线建立。回收率及信噪比采用 Microsoft Office Excel 2007 软件计算。提取剂优化和净化剂优化中的回收率的计算均采用两个平行样品取平均值计算, 各个条件下回收率的比较采用 Origin 2018 软件进行分析。精密度选择低、中、高三个浓度, 每个浓度梯度取连续采集 7 针数据的峰面积进行相对标准偏差 RSD 值的计算。

## 2 结果与分析

### 2.1 质谱条件优化

磺胺类抗生素的结构中含有氨基, 容易结合 H<sup>+</sup>, 因此, 采用正离子模式, 以针泵连续进样, 首先得到 24 种磺胺类化合物的各个母离子, 分别对其单标准溶液(50 ng/mL)进行一级质谱扫描(Q1 MS)得到其母离子, 然后对其进行子离子全扫描, 选择出两个响应信号较强的碎片离子, 其中响应值较高的为定量离子, 另一个为定性离子, 再将母离子和这两个碎片离子组成检测离子对, 在 MRM 模式下优化去簇电压(DP)和碰撞能(CE), 优化结果如表 1 所示。

### 2.2 色谱条件优化

**2.2.1 色谱柱选择** 比较了 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub>(4.6 mm×100 mm, 1.8 μm)、ZORBAX SB-Aq(2.1 mm×150 mm, 3.5 μm)、ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) 3 款色谱柱对 24 种目标物的分离效果。实验结果显示, 24 种磺胺类抗生素在 ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 和 ZORBAX SB-Aq 色谱柱上分离度较差; 相比而言, 在 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱上具有较好的分离效果且峰形尖锐, 因此, 选择 ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱分离 24 种磺胺类抗生素。

**2.2.2 流动相优化** 流动相对目标物的保留时间和峰形存在一定的影响。考察了有机相为甲醇、乙腈, 水相为水、0.1% 甲酸水和 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)时的色谱分离效果。试验结果显示, 乙腈相对于甲醇而言具有较好的分离度。当有机相和水相分别为乙腈、纯水时, 24 种目标物的出现分裂峰且峰形较宽; 加入甲酸后, 峰形改善且分裂峰减少; 而引入乙酸铵后导致磺胺硝苯的响应降低, 因此, 乙腈-0.1% 甲酸水为最优流动相。图 1 为 24 种磺胺类抗生素的总离子流色谱图(TIC)。

### 2.3 前处理方法优化

**2.3.1 提取剂的优化** 由于样品基质的复杂性, 提取剂应满足既能很好地溶解目标化合物, 又能减少对杂质的萃取。乙腈和丙酮是 QuEChERS 法常用的提取剂, 此外酸化乙腈对许多分析物具有良好的萃取效率<sup>[31]</sup>, 因此, 本实验考察了 3 种提取剂(乙腈、0.5% 酸化乙腈和丙酮)对 24 种磺胺类抗生素的提取效率。由图 2 可知, 相比于其他两种提取剂, 乙腈对 24 种磺胺类抗生素的回收率均能达到 75.5% 以上, 而且乙腈可以很好地分离蛋白质和脂肪, 降低杂质的



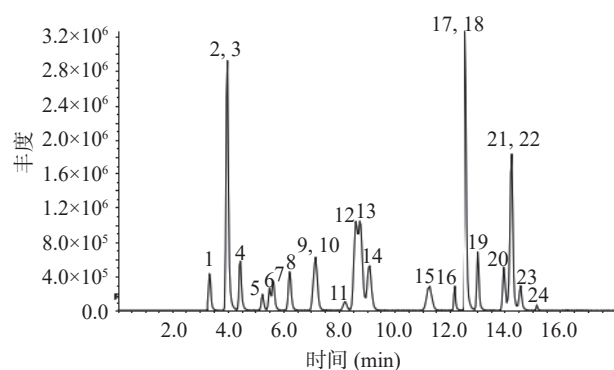


图1 24种磺胺类抗生素标准的总离子流色谱图(50 µg/L)

Fig.1 Total ion chromatograms of 24 kinds of sulfonamides standards (50 µg/L)

注: 1.磺胺脒; 2.结晶磺胺; 3.磺胺二甲基异噁唑; 4.甲氧苄啶; 5.磺胺醋酰; 6.磺胺噻唑; 7.磺胺嘧啶; 8.磺胺吡啶; 9.磺胺甲氧嘧啶; 10.磺胺二甲恶唑; 11.磺胺甲噻二唑; 12.磺胺甲氧哒嗪; 13.磺胺二甲噻唑; 14.磺胺对甲氧嘧啶; 15.磺胺间甲氧嘧啶; 16.磺胺氯达嗪; 17.周效磺胺; 18.磺胺甲恶唑; 19.磺胺二甲异噻唑; 20.苯甲酰磺胺; 21.磺胺喹恶啉; 22.磺胺地索辛; 23.磺胺苯吡唑; 24.磺胺硝苯。

干扰,因此,最终选择乙腈作为提取剂。

**2.3.2 净化剂的优化** QuEChERS 法是利用吸附剂填料与基质中的杂质相互作用,吸附杂质从而达到除杂净化的目的,其操作简便、效率高、试验成本低。QuEChERS 法常用的净化剂有 PSA、 $C_{18}$ 、石墨化碳黑等。PSA 可用于去除脂肪酸、糖类、有机酸和脂类等一些杂质,而  $C_{18}$  能有效去除脂类<sup>[32]</sup>。本文比较了 0.3 g PSA、0.3 g  $C_{18}$ 、0.3 g 无水  $MgSO_4$ +0.3 g

PSA、0.3 g 无水  $MgSO_4$ +0.3 g  $C_{18}$  对样品的净化效果(见 图 3)。试验数据显示,以 PSA 或无水  $MgSO_4$ +PSA 作为净化剂净化时,15 种磺胺类抗生素的回收率低于 70.0%,特别是苯甲酰磺胺的回收率为 7.3%,可能由于 PSA 对苯甲酰磺胺有较强的吸附作用。而以  $C_{18}$  为净化剂时,24 种磺胺类抗生素的回收率整体较高,且无水  $MgSO_4$  的加入能使 24 种目标物的回收率达到 78% 以上。在上述基础上,进一步优化了  $C_{18}$  和无水  $MgSO_4$  的用量,当无水  $MgSO_4$  为 0.3 g 时,比较了  $C_{18}$  为 0.2、0.3、0.4 g 时对目标物回收率的影响。结果显示,相比于其它用量,当  $C_{18}$  为 0.3 g 时,24 种磺胺类抗生素回收率较好,在 79.0%~112.8% 之间。固定  $C_{18}$  用量为 0.3 g,考察了 0.2、0.3、0.4、0.5 g 无水  $MgSO_4$  对目标物回收率的影响。随无水  $MgSO_4$  用量的增加,24 种磺胺类抗生素的回收率出现先升高再降低的趋势,当加入无水  $MgSO_4$  0.4 g 时,24 种目标物的回收率最好。综合上述结果,选择 0.3 g  $C_{18}$  和 0.4 g 无水  $MgSO_4$  作为净化剂,24 种磺胺类抗生素的回收率能达到 84.2%~110.5% 之间。

## 2.4 基质效应

标准曲线分别以基质空白和溶剂配制,根据基质效应计算公式:基质效应=基质标准曲线斜率/溶剂标准曲线斜率 $\times 100$ <sup>[33]</sup>,当基质效应计算值在 80.0%~120.0% 时,可认为基质效应较弱,可忽略。结果表明,磺胺脒、磺胺二甲基异噁唑、甲氧苄啶、磺胺醋酰、磺胺甲氧哒嗪、磺胺地索辛、磺胺苯吡唑的基质效应为 41.5%~77.6%,具有明显的基质抑制作用,而

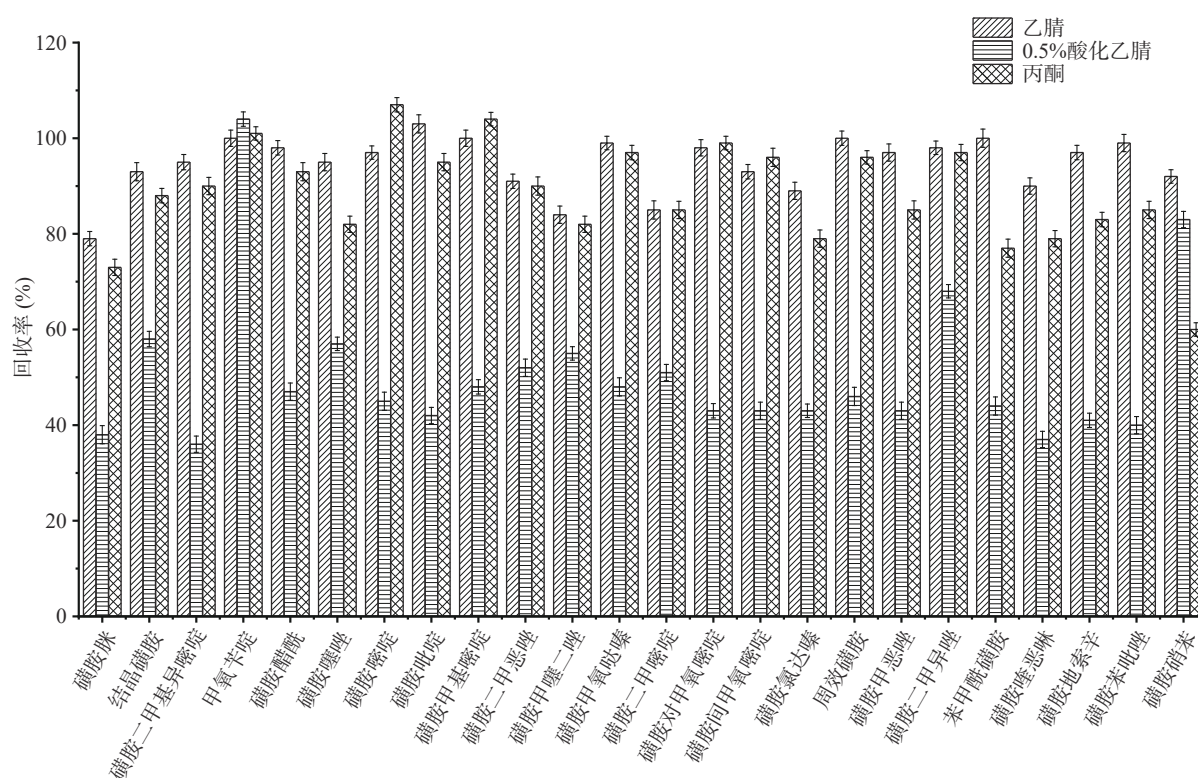


图2 不同提取剂对 24 种磺胺类抗生素回收率的影响

Fig.2 Effect of different extractant on the recoveries of 24 sulfonamide antibiotics

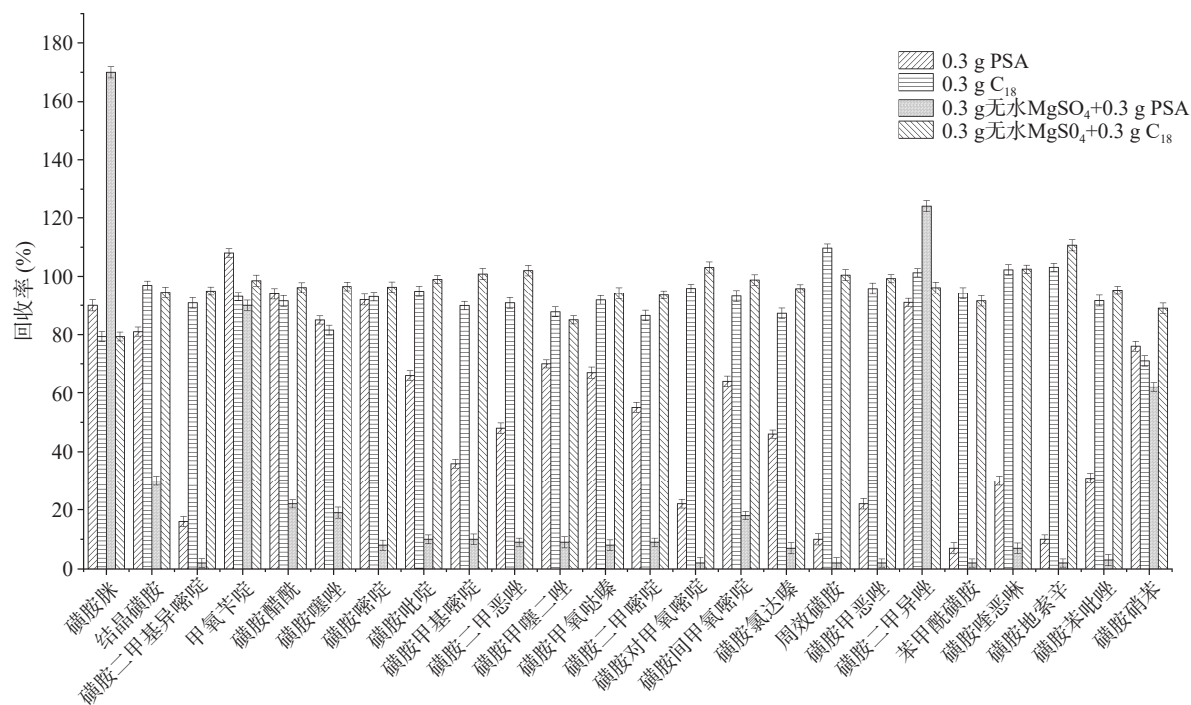


图 3 不同净化剂对 24 种磺胺类抗生素回收率的影响

Fig.3 Effect of different purification on the recoveries of 24 sulfonamide antibiotics

其它 17 种磺胺类抗生素的基质效应在 82.0%~100.9% 之间, 基质效应较弱。为了能精准的定量分析, 标准曲线采用基质空白提取液配制, 以减少因基

质效应引起的误差。

2.5 方法学验证

2.5.1 标准曲线、检出限和定量限 在优化的色谱

表 2 24 种磺胺类抗生素的线性范围、线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients, limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) for detection of 24 kinds of sulfonamides

| 磺胺类抗生素   | 线性范围(μg/L) | 线性方程                 | 相关系数(r) | LOD(μg/kg) | LOQ(μg/kg) |
|----------|------------|----------------------|---------|------------|------------|
| 磺胺脒      | 0.5~100    | Y=38706.0X+1285.6    | 0.9999  | 0.48       | 1.59       |
| 结晶磺胺     | 0.1~100    | Y=50961.8X+429.2     | 0.9998  | 0.07       | 0.22       |
| 磺胺二甲基异噁唑 | 0.1~100    | Y=297084.0X+227232.0 | 0.9997  | 0.01       | 0.03       |
| 甲氧苄啶     | 0.5~100    | Y=143071.0X+114250.0 | 0.9991  | 0.46       | 1.54       |
| 磺胺醋酰     | 0.1~100    | Y=31022.4X+16145.0   | 0.9991  | 0.13       | 0.44       |
| 磺胺噻唑     | 0.1~100    | Y=158857.0X+18768.8  | 0.9991  | 0.02       | 0.08       |
| 磺胺嘧啶     | 0.1~100    | Y=162054.0X+55211.6  | 0.9999  | 0.01       | 0.02       |
| 磺胺吡啶     | 0.1~100    | Y=240612.0X+145528.0 | 0.9998  | 0.01       | 0.03       |
| 磺胺甲基噻唑   | 0.1~100    | Y=171866.0X+89013.4  | 0.9993  | 0.01       | 0.02       |
| 磺胺二甲恶唑   | 0.1~100    | Y=176961.0X+10432.8  | 0.9995  | 0.02       | 0.07       |
| 磺胺甲噻二唑   | 0.1~100    | Y=87403.6X+668.0     | 0.9995  | 0.05       | 0.15       |
| 磺胺甲氧哒嗪   | 0.1~100    | Y=108254.0X+94216.9  | 0.9996  | 0.03       | 0.09       |
| 磺胺二甲噻唑   | 0.1~100    | Y=148426.0X+103685.0 | 0.9991  | 0.01       | 0.03       |
| 磺胺对甲氧嘧啶  | 0.1~100    | Y=137057.0X+11984.6  | 0.9992  | 0.04       | 0.13       |
| 磺胺间甲氧嘧啶  | 0.1~100    | Y=84598.9X+17802.8   | 0.9999  | 0.02       | 0.08       |
| 磺胺氯达嗪    | 0.1~100    | Y=94606.8X+19310.5   | 0.9997  | 0.08       | 0.28       |
| 周效磺胺     | 0.1~100    | Y=596140.0X+619509.0 | 0.9991  | 0.01       | 0.02       |
| 磺胺甲恶唑    | 0.1~100    | Y=147442.0X+60190.4  | 0.9991  | 0.02       | 0.05       |
| 磺胺二甲异唑   | 0.1~100    | Y=128310.0X+9993.8   | 0.9993  | 0.01       | 0.02       |
| 苯甲酰磺胺    | 0.1~100    | Y=263456.0X+170164.0 | 0.9990  | 0.01       | 0.02       |
| 磺胺噻恶唑    | 0.1~100    | Y=119085.0X+80723.1  | 0.9996  | 0.02       | 0.07       |
| 磺胺地索辛    | 0.1~100    | Y=500130.0X+575174.0 | 0.9992  | 0.01       | 0.04       |
| 磺胺苯吡唑    | 0.2~100    | Y=65902.4X+52926.6   | 0.9994  | 0.26       | 0.86       |
| 磺胺硝苯     | 0.5~100    | Y=11686.6X+2465.5    | 0.9998  | 0.40       | 1.33       |

和质谱条件下测定前述 1.2 部分配制基质匹配标准工作液,标准曲线的横坐标为各目标化合物的浓度,纵坐标为定量离子对峰面积,得到线性回归方程及相关系数( $r$ ),检出限(LOD)和定量限(LOQ)分别以 3 倍和 10 倍的信噪比计算,见表 2。这 24 种磺胺类抗生素的相关系数( $r$ )均在 0.999 以上,线性关系良好,LOD 和 LOQ 分别为 0.01~0.48  $\mu\text{g/kg}$  和 0.02~1.59  $\mu\text{g/kg}$ ,能够满足定量分析的要求。

**2.5.2 加标回收率和精密度** 在 3 个加标浓度分别为 5、10 和 50  $\mu\text{g/kg}$  下对空白样品进行加标回收实验,结果列于表 3。24 种待测物的平均回收率在 80.0%~116.4% 范围内,相对标准偏差(RSD)为 0.8%~9.4%,适用于鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素残留的同步快速检测。

表 3 24 种磺胺类抗生素的加标回收率及相对标准偏差( $n=7$ )

Table 3 Spiked recoveries and RSD of 24 sulfonamides ( $n=7$ )

| 磺胺类抗生素   | 加标水平( $\mu\text{g/kg}$ ) |            |            |            |            |            |
|----------|--------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|          | 5                        |            | 10         |            | 50         |            |
|          | 回收率<br>(%)               | RSD<br>(%) | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) | 回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
| 磺胺脒      | 82.4                     | 9.1        | 83.9       | 6.3        | 109.3      | 4.3        |
| 结晶磺胺     | 84.0                     | 7.2        | 81.0       | 6.6        | 94.5       | 1.8        |
| 磺胺二甲基异噁唑 | 81.3                     | 4.4        | 85.0       | 4.8        | 108.7      | 1.9        |
| 甲氧苄啶     | 88.9                     | 4.6        | 87.5       | 4.4        | 103.2      | 2.5        |
| 磺胺醋酰     | 83.8                     | 7.7        | 80.4       | 3.7        | 104.1      | 2.1        |
| 磺胺噻唑     | 83.1                     | 3.9        | 83.0       | 3.1        | 93.2       | 3.5        |
| 磺胺嘧啶     | 83.2                     | 4.5        | 94.6       | 3.0        | 114.0      | 2.3        |
| 磺胺吡啶     | 83.9                     | 4.4        | 87.9       | 3.8        | 92.6       | 4.2        |
| 磺胺甲基嘧啶   | 80.4                     | 1.7        | 81.8       | 5.7        | 101.6      | 2.7        |
| 磺胺二甲恶唑   | 85.7                     | 3.1        | 93.3       | 7.1        | 103.6      | 5.4        |
| 磺胺甲噻二唑   | 80.7                     | 2.2        | 81.0       | 4.1        | 86.5       | 4.8        |
| 磺胺甲氧嘧啶   | 80.2                     | 2.6        | 84.2       | 7.6        | 116.4      | 6.3        |
| 磺胺二甲嘧啶   | 83.3                     | 2.7        | 85.2       | 5.8        | 105.8      | 3.0        |
| 磺胺对甲氧嘧啶  | 81.6                     | 4.2        | 89.5       | 6.4        | 100.8      | 3.8        |
| 磺胺间甲氧嘧啶  | 84.6                     | 7.8        | 96.9       | 4.6        | 101.8      | 3.5        |
| 磺胺氯达嗪    | 80.0                     | 6.1        | 81.1       | 9.4        | 100.9      | 3.3        |
| 周效磺胺     | 83.6                     | 7.5        | 84.0       | 5.4        | 109.2      | 1.4        |
| 磺胺甲恶唑    | 85.2                     | 5.9        | 88.4       | 4.2        | 107.3      | 1.7        |
| 磺胺二甲异唑   | 94.0                     | 2.7        | 98.0       | 1.2        | 112.9      | 2.5        |
| 苯甲酰磺胺    | 81.8                     | 4.8        | 84.2       | 0.8        | 101.0      | 2.7        |
| 磺胺噻恶唑    | 88.6                     | 7.9        | 95.4       | 4.3        | 113.0      | 4.8        |
| 磺胺地索辛    | 85.2                     | 6.3        | 99.0       | 7.0        | 114.0      | 6.0        |
| 磺胺苯吡唑    | 84.5                     | 4.2        | 87.1       | 7.4        | 90.3       | 5.6        |
| 磺胺硝苯     | 91.0                     | 6.2        | 89.4       | 6.2        | 106.3      | 2.4        |

## 2.6 实际样品测定

在市内超市采集 4 份鱼罐头、2 份鱼肠、5 份鱼豆腐、4 份鱼丸、1 份鱼皮等 16 份实际样品,利用本文所建立的超高效液相色谱-串联质谱法对上述样品中 24 种磺胺类抗生素残留进行检测,16 份实际样品均未检出磺胺类抗生素。

## 3 结论

采用 QuEChERS 前处理技术,首次建立了鱼肉

制品中 24 种磺胺类抗生素的超高效液相色谱-串联质谱法检测新方法。24 种目标物在各自线性范围内具有良好的线性关系,相关系数均大于 0.999,在 3 个加标浓度水平下的平均加标回收率为 80.0%~116.4%,相对标准偏差(RSD)为 0.8%~9.4%,检出限和定量限分别为 0.01~0.48  $\mu\text{g/kg}$  和 0.02~1.59  $\mu\text{g/kg}$ 。本方法前处理简便、准确度和精密度高、灵敏度高,适用于鱼肉制品中 24 种磺胺类抗生素的同步快速检测,为开展鱼肉制品中磺胺类抗生素的监测提供了技术支持,进一步保障了鱼肉制品的质量。

## 参考文献

- [1] 张靖,吴剑平,贡松松,等.超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱同时快速筛查与确证猪粪中 33 种磺胺类及四环素类药物[J].上海畜牧兽医通讯,2019(6):28-32. [ZHANG J, WU J P, GONG S S, et al. Simultaneous rapid screening and confirmation of 33 sulfonamides and tetracyclines in swine manure by ultra performance liquid chromatography-quadrupole rod-electrostatic field orbital hydrazine high resolution mass spectrometry[J]. Shanghai J Animal Husbandry Veterinary Med, 2019(6): 28-32.]
- [2] 王乐,李海琴,王美玲,等.基于纳米金-适体结构的智能手机补色波长法检测磺胺二甲嘧啶[J].分析测试学报,2018,37(8):967-971. [WANG L, LI H Q, WANG M L, et al. Rapid detection of sulfadimethoxine using a smartphone digital colorimetric method based on aptamer/aunps structure[J]. Instrum Anal, 2018, 37(8): 967-971.]
- [3] CHEN Y, XIA S, HAN X, et al. Simultaneous determination of malachite green, chloramphenicols, sulfonamides, and fluoroquinolones residues in fish by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Anal Methods Chem, 2020, 2020: 3725618.
- [4] 赵巧灵,张薇英,汤海凤,等.快速溶剂萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定养殖鱼肌肉中 19 种磺胺类药物残留[J].食品科技,2019,44(12):335-341. [ZHAO Q L, ZHANG W Y, TANG H F, et al. Determination of 19 sulfonamides residues in cultured fish muscle with accelerated solvent extraction by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Sci Technol, 2019, 44(12): 335-341.]
- [5] 李丹,沈昕,张玉洁,等.高效液相色谱法测定鸡肉中 5 种磺胺类药物及乙氧酰胺苯甲酯增效剂残留量[J].食品安全质量检测学报,2020,11(1):202-208. [LI D, SHEN X, ZHANG Y J, et al. Determination of 5 kinds of sulfonamides and ethopabate residues in chicken by high performance liquid chromatography[J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(1): 202-208.]
- [6] 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):2240-2246. [LIU G Y, SONG G J, WANG Z H, 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): 2240-2246.]
- [7] 高振刚,梁延鹏,曾鸿鹄,等.固相萃取-超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定水中 15 种抗生素残留[J].分析试验室,2021,40(8):875-880. [GAO Z G, LIANG Y P, ZENG H H, et al. Detection of 15 antibiotics in water by solid phase extraction-ultra-



- high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry[J]. *Chin J Anal Lab*, 2021, 40(8): 875–880. ]
- [ 8 ] 宋焕杰, 谢卫民, 王俊, 等. SPE-UPLC-MS/MS 同时测定水环境中 4 大类 15 种抗生素 [J]. *分析实验室*, 2022, 41(1): 50–54. [ SONG H J, XIE W M, WANG J, et al. SPE-UPLC-MS/MS simultaneous determination of 15 antibiotics in four categories in water environment[J]. *Chin J Anal Lab*, 2022, 41(1): 50–54. ]
- [ 9 ] ZHOU X, CHEN W Q, DING Y Q, et al. Rapid determination of sulfonamides in chicken using two-dimensional online cleanup mode with three columns coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1114–1115: 110–118.
- [ 10 ] DI X, WANG X, LIU Y, et al. Microwave assisted extraction in combination with solid phase purification and switchable hydrophilicity solvent-based homogeneous liquid-liquid microextraction for the determination of sulfonamides in chicken meat[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1118–1119: 109–115.
- [ 11 ] 高洁, 陈达炜, 丁宇琦, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定畜产品中残留的 22 种磺胺类药物[J]. *中国食品卫生杂志*, 2018, 30(1): 28–34. [ GAO J, CHEN D W, DING Y Q, et al. Determination of 22 sulfonamides in livestock products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction[J]. *Chin J Food Hyg*, 2018, 30(1): 28–34. ]
- [ 12 ] SAXENA S K, RANGASAMY R, KRISHNAN A A, et al. Simultaneous determination of multi-residue and multi-class antibiotics in aquaculture shrimps by UPLC-MS/MS[J]. *Food Chem*, 2018, 260: 336–343.
- [ 13 ] 国家市场监督管理总局. GB/T 31650—2019 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量[S]. 北京: 中国农业出版社, 2019. [ State Administration of Market Supervision. GB/T 31650—2019 National food safety standard. Maximum residue limits for veterinary drugs in food[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2019. ]
- [ 14 ] GUIDI L R, SANTOS F A, RIBEIRO A C, et al. A simple, fast and sensitive screening LC-ESI-MS/MS method for antibiotics in fish[J]. *Talanta*, 2017, 163: 85–93.
- [ 15 ] 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(4): 601–608.
- [ 16 ] 张林田, 陆奕娜, 黄学泓, 等. 通过式净化-高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中 42 种兽药残留[J]. *分析科学学报*, 2020, 36(1): 81–87. [ ZHANG L T, LU Y N, HUANG X H, et al. Determination of 42 kinds of veterinary drug residues in animal-derived products by passing purification-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Anal Sci*, 2020, 36(1): 81–87. ]
- [ 17 ] 区敏霞. 高效液相色谱同时测定水产品中 7 种磺胺类药物残留的方法改进[J]. *食品安全导刊*, 2017(21): 133–135. [ QU M X. Improved method for simultaneous determination of 7 sulfonamides residues in aquatic products by high performance liquid chromatography[J]. *Chin Food Saf Mag*, 2017(21): 133–135. ]
- [ 18 ] ZHANG Y, LIAO W, DAI Y, et al. Covalent organic framework Schiff base network-1-based pipette tip solid phase extraction of sulfonamides from milk and honey[J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1634: 461665.
- [ 19 ] 李清雪, 孙王茹, 汪庆. SPE-HPLC 测定水中  $\beta$ -内酰胺类、喹诺酮类、磺胺类抗生素 [J]. *中国给水排水*, 2019, 35(18): 118–122. [ LI Q X, SUN W R, WANG Q. Determination of  $\beta$ -lactams, quinolones and sulfonamides antibiotics in water by SPE-HPLC[J]. *Chin Water & Wastewater*, 2019, 35(18): 118–122. ]
- [ 20 ] HERRERA-HERRERA A V, HERNANDEZ-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.
- [ 21 ] MA J, FAN S, SUN L, et al. Rapid analysis of fifteen sulfonamide residues in pork and fish samples by automated on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science and Human Wellness*, 2020, 9(4): 363–369.
- [ 22 ] ABAFE O A, GATYENI P, MATIKA L. A multi-class multi-residue method for the analysis of polyether ionophores, tetracyclines and sulfonamides in multi-matrices of animal and aquaculture fish tissues by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2020, 37(3): 438–450.
- [ 23 ] 庞昕瑞, 曾鸿鹤, 梁延鹏, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定地表水中 10 种磺胺类抗生素残留[J]. *分析科学学报*, 2019, 35(4): 461–466. [ PANG X R, ZENG H H, LIANG Y P, et al. Determination of 10 sulfonamide antibiotic residues in surface water by solid phase extraction-ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Anal Sci*, 2019, 35(4): 461–466. ]
- [ 24 ] XU X, XU X, HAN M, et al. Development of a modified QuEChERS method based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous determination of veterinary drugs, pesticides and mycotoxins in eggs by UPLC-MS/MS[J]. *Food Chem*, 2019, 276: 419–426.
- [ 25 ] 谭韬, 刘应杰, 唐倩, 等. 毛细管电泳对水体中多类抗生素的同时分离检测[J]. *重庆医学*, 2018, 47(35): 4530–4533. [ TAN T, LIU Y J, TANG Q, et al. Simultaneous separation and detection of multiple classes of antibiotics in water by capillary electrophoresis[J]. *Chongqing Med*, 2018, 47(35): 4530–4533. ]
- [ 26 ] WEN Y, LI J, ZHANG W, et al. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with capillary electrophoresis for simultaneous determination of sulfonamides with the aid of experimental design[J]. *Electrophoresis*, 2011, 32(16): 2131–2138.
- [ 27 ] HOFF R. Analysis of sulfonamide residues in bovine liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without chemical extraction or clean-up procedures[J]. *Anal Biochem*, 2020, 611: 114011.
- [ 28 ] WANG J, XU J, JI X, et al. Determination of veterinary drug/pesticide residues in livestock and poultry excrement using selective accelerated solvent extraction and magnetic material purification combined with ultra-high-performance liquid chromatogra-

phy-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2020, 1617.

[29] MARTINS M T, BARRETO F, HOFF R B, et al. Multiclass and multi-residue determination of antibiotics in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Combining efficiency of milk control and simplicity of routine analysis[J]. *International Dairy Journal*, 2016, 59: 44–51.

[30] 吴利军, 何斌, 周源, 等. 固相萃取-高效液相色谱法同时检测奶牛粪污中5种磺胺类抗生素[J]. *中国兽药杂志*, 2020, 54(10): 24–29. [WU L J, HE B, ZHOU Y, et al. Simultaneous determination of five sulfonamide antibiotics in excrement and sewage of dairy farm using solid phase extraction and high performance liquid chromatograph[J]. *Chin J Veterinary Drug*, 2020, 54(10): 24–29.]

[31] WANG K, ZHAO L, ZHANG C, et al. Determination of 12 insect growth regulator residues in foods of different matrixes by

modified QuEChERS and UPLC-MS/MS[J]. *RSC Advances*, 2021, 11(20): 12162–12171.

[32] 扈斌, 谢瑜杰, 蒋康丽, 等. QuEChERS结合高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法测定花椒中191种农药残留[J]. *分析试验室*, 2021, 40(10): 1154–1165. [HU B, XIE Y J, JIANG K L, et al. Quechers combined with high performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry for the determination of 191 pesticide residues in zanthoxylum bungeanum maxim[J]. *Chin J Anal Lab*, 2021, 40(10): 1154–1165.]

[33] 童兰艳, 肖昭竞, 李根容, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定化妆品中14种美白活性成分[J]. *分析试验室*, 2022, 41(1): 96–102. [TONG L Y, XIAO Z J, LI G R, et al. Determination of 14 whitening active components in cosmetics by ultra-high performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Chin J Anal Lab*, 2022, 41(1): 96–102.]