



# 蔬菜中二十种磺胺类抗生素残留的 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法检测

刘 畅

(哈尔滨市农产品质量安全检验检测中心,黑龙江 哈尔滨,150070)

**摘要:**建立了 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱仪检测不同种蔬菜中 20 种磺胺类兽药多残留的检测方法。称取 10.0 g 样品,以 1.0% 乙酸乙腈 10 mL 为提取剂,6 g 硫酸镁、1.5 g 醋酸钠为萃取盐,使用液-液萃取静置分层,取 8 mL 上清液经 150 mg 乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)和 900 mg 无水硫酸镁净化。再提取净化后的溶液 5 mL,在 40 ℃ 下用氮吹仪浓缩,残渣用 200  $\mu$ L 乙腈,800  $\mu$ L 水溶解。超高效液相色谱-串联质谱仪采用正离子多反应监测模式,内标法定量。结果表明:在 0.5~100  $\mu$ g/L 范围内,20 种磺胺类兽药线性良好,相关系数均大于 0.99,3 个不同添加浓度的回收率在 67.4%~116.6% 范围内,相对标准偏差在 0.1%~12.8% 范围内,均可满足定量分析要求,该方法操作简单快速,适用于大批量蔬菜样品同时检测兽药多残留。

**关键词:**QuEChERS;超高效液相色谱-串联质谱;蔬菜;磺胺;多残留

抗生素在畜禽养殖中主要起两种作用,一是预防和治疗特定疾病,二是增加产量和加速生长。然而,使用的抗生素只有一小部分被畜禽完全吸收,大部分随畜禽尿液和粪便排出体外<sup>[1]</sup>。施用未经检测的或者检测不合格的畜禽粪便发酵而成的农家肥,其中的抗生素会残留在作物中,进而影响人类对抗生素的耐药性<sup>[2-4]</sup>。

磺胺类抗生素被广泛用于畜禽养殖中。近年来,关于磺胺类抗生素在土壤、水、粪便中的残留检测多有报道。张律等<sup>[5]</sup>利用高效液相色谱-串联质谱法测定生活饮用水中包括磺胺类在内的 11 种抗生素。周爱霞等<sup>[6]</sup>建立了高效液相色谱法同时测定地下水、土壤及粪便中 4 种磺胺类抗生素。而建立果蔬中抗生素残留检测方法的研究较少<sup>[7]</sup>。QuEChERS 方法由于具有分析速度快、准确度和精确度高、操作简单等诸多优点,被越来越多的应用于农药残留<sup>[8-9]</sup>和兽药残留<sup>[10-11]</sup>检测中。本文利用改良的 QuEChERS 方法结合超高效液相色谱-串联质谱仪实现了对蔬菜中 20 种磺胺类抗生素的快速检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试仪器有超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters),电子天平(感量 0.01 g,梅特勒),

Milli-Q 高纯水发生器(美国 Millipore),高速冷冻离心机(美国 SIGMA),氮吹仪(美国 Organomation),涡旋振荡器(德国 IKA)。

供试试剂有磺胺噻唑(Sulfathiazole,ST)、磺胺甲基嘧啶(Sulfamerazine,SMR)、磺胺二甲基嘧啶(Sulfamethazine,SM<sub>2</sub>)、磺胺甲恶唑(Sulfamethoxazole,SMZ)、磺胺(Sulfanamide,SN)、磺胺索嘧啶(Sulfisomidine,SM)、磺胺吡啶(Sulfapyridine,SPY)、磺胺二甲恶唑(Sulfamoxol,SAX)、磺胺甲二唑(Sulfamethizole,SMT)、磺胺氯哒嗪(Sulfachlorpyridazine,SCP)、磺胺二甲氧嘧啶(Sulfadimethoxine,SDM)、磺胺苯吡唑(Sulfaphenazole,SPP)、磺胺硝苯(Sulfanitran,SNT)、磺胺多辛(Sulfadoxine,SDX)、磺胺嘧啶(Sulfadiazine,SDZ)、磺胺甲氧哒嗪(Sulfamethoxy-pyridazine,SMP)、磺胺醋酰(Sulfacetamide,STD)、磺胺脒(Sulfaguanidine,SG)、磺胺-5-(对)甲氧嘧啶(Sulfametoxydiazine,SMD)、磺胺-6-(间)甲氧嘧啶(Sulfamonomethoxine,SMM)、磺胺邻二甲氧嘧啶-D3,纯度均 $\geq$ 99.0%(德国 Dr Ehrenstorfer);无水硫酸钠(优级纯,天津市光复精细化工研究所);乙腈(优级纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,美国 Fisher Scientific);无水硫酸镁(优级纯,天津市光复精细化工研究所);甲酸(色谱纯,中国迪马科技);醋酸钠(优级纯,天津博迪化工股份有限公司);冰乙酸(分析纯,天津市光复精细化工研究所);乙二胺-N-丙基硅烷(色谱纯,天津博纳艾

收稿日期:2018-03-06

作者简介:刘畅(1988-),女,硕士,农艺师,从事药残检测研究。E-mail:y150030@126.com。

杰尔)。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 准确称取黄瓜样品 10.00 g (精确至 0.01 g) 至于 50 mL 离心管中,加入 1.0% 乙酸乙腈 10 mL,两颗玻璃珠,再加入 6 g 硫酸镁、1.5 g 醋酸钠,水平震荡 30 min,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。提取上清液 8 mL 于装有 150 mg 乙二胺-N-丙基硅烷(PSA)和 900 mg 无水硫酸镁的净化管中,用力摇匀净化管 30 s,8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min。提取经过净化的液体 5 mL 于 40 ℃ 下氮气吹干。残渣用 200 μL 乙腈,800 μL 水溶解,过 0.22 μm 滤膜,装瓶待测。

1.2.2 液相色谱分析条件 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱,柱温: 40 ℃。流动相: A 为乙腈, B 为 0.1% 甲酸-水(v/v)。流速: 0.30 mL·min<sup>-1</sup>, 进样体积 5.0 μL。梯度洗脱程序: 0~2 min, 10% A~25% A; 2~3 min, 25% A~45% A; 3~4 min, 45% A~90% A; 4.0~5.5 min, 90% A; 5.5~5.6 min, 90% A~10% A。

1.2.3 质谱分析条件 电喷雾离子源(ESI), 源温 110 ℃, 正离子扫描; 多反应监测模式(MRM); 毛细管电压 3.0 kV; 脱溶剂气流速 750 L·h<sup>-1</sup>; 脱溶剂气温度 400 ℃; 锥孔气速 50 L·h<sup>-1</sup>。测定 20 种磺胺类抗生素定性定量离

子对及对应碰撞气能量。

1.2.4 标准曲线的制作 称取一定量的 20 种磺胺类药物标准品, 分别用甲醇溶解, 配制成 2 mg·L<sup>-1</sup> 的储备液, 再用乙腈-水(2:8, V:V) 分别稀释成 1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 μg·L<sup>-1</sup> 的标准曲线系列工作液, 按照 1.2.2 和 1.2.3 方法进行检测, 得到各参数线性方程、相关系数、检测限和定量限。

2 结果与分析

2.1 液相色谱与质谱条件的选择

由于流动相对电喷雾质谱的离子化效率、保留时间以及峰形等方面有很大影响, 所以试验多种流动相体系对 20 种目标物分离测定的影响。考察乙腈-水、乙腈-0.1% 甲酸、甲醇-水、甲醇-0.1% 甲酸 4 个流动相体系, 结果显示以乙腈-0.1% 甲酸作为流动相, 各目标物峰形良好, 响应值在 5.09 e<sup>5</sup> 以上高于其他流动相体系响应值, 所以选择乙腈-0.1% 甲酸作为流动相。将 20 种标准品分别用甲醇: 水 = 1:1 (V:V) 稀释成为 1 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液泵入质谱系统, 依次优化锥孔电压、碰撞能量, 选取丰度较高的母离子、子离子, 最终确定的定性定量离子对及对应碰撞气能量等参数(表 1)。

表 1 20 种磺胺类抗生素定性定量离子对及对应碰撞气能量

Table 1 The qualitative and quantitative ion pairs and corresponding collision energies of 20 sulfonamides

磺胺种类 Sulfanilamide type	保留时间/min Retention time	母离子/(m·z <sup>-1</sup> ) Parent	子离子/(m·z <sup>-1</sup> ) Daughter	锥孔电压/V Cone	碰撞能量/eV Collision
ST	2.01	256.3	156.1*/108.2	37	22/15
SMR	2.26	265.1	156.1*/172.1	43	18/16
SM2	2.59	279.1	186.2*/156.1	32	18/18
SMZ	3.38	254.1	156.2*/108.2	40	23/15
SN	1.16	173.2	93.0*/156.0	32	20/8
SM	1.62	279.3	124.2*/186.2	41	23/18
SPY	2.11	250.2	156.2*/184.3	41	19/17
SAX	2.45	268.2	156.2*/108.2	35	17/22
SMT	2.63	271.2	156.2*/108.2	34	13/25
SCP	3.17	285.2	156.2*/108.2	34	13/29
SDM	3.76	311.2	156.3*/108.2	46	20/29
SPP	3.82	315.2	156.2*/108.2	46	21/29
SNT	4.10	336.2	156.1*/294.3	32	12/14

续表 1

磺胺种类 Sulfanilamide type	保留时间/min Retention time	母离子/( $m \cdot z^{-1}$ ) Parent	子离子/( $m \cdot z^{-1}$ ) Daughter	锥孔电压/V Cone	碰撞能量/eV Collision
SDX	3.33	311.1	156.1 * /108.2	41	17/25
SDZ	1.87	251.1	156.1 * /108.2	41	14/25
SMP	2.66	281.2	156.2 * /108.2	39	18/26
STD	1.71	215.2	156.2 * /108.2	25	13/21
SG	1.75	215.2	156.2 * /108.2	32	13/23
SMD	2.69	281.2	156.2 * /215.3	38	17/19
SMM	3.00	281.2	156.2 * /215.3	42	19/20

\* 为定量离子。  
\* means quantitative ion.

2.2 样品的提取

由于乙腈具有能提取大多数化合物、易于盐析、与超高效液相色谱-串联质谱仪兼容等众多优点,因此乙腈比丙酮、乙酸乙酯等常用提取溶剂更适合作为 QuEChERS 方法的分散剂。根据已知文献报道<sup>[12-13]</sup>,本文选择 0.1%、1.0%、4.0% 三个浓度的乙酸乙腈考察目标物的提取效果,在添加浓度为 30  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  水平下,20 种待测物的回收率情况见图 1。使用 1.0% 乙酸乙腈作为提取液,各个目标物的提取率在较好的范围内,随着甲酸浓度增加,有个别化合物的提取率达到 120% 以上,呈现出明显的基质增强效应,因此,选用 1.0% 乙酸乙腈作为提取液。

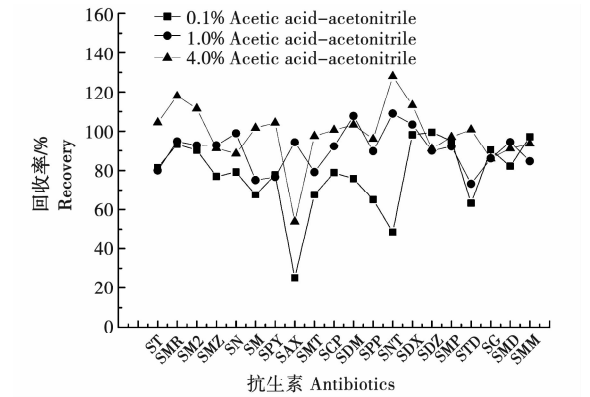


图1 三种不同浓度乙酸乙腈提取效果的比较  
Fig.1 The comparison of three different concentrations of acetic acid-acetonitriles in extraction effects

2.3 样品的净化

比较了不净化和净化后各化合物的基质效应

变化。基质效应可以用  $ME(\%) = (\text{目标物在空白基质溶液中的响应值} / \text{目标物在纯溶剂溶液中的响应值}) \times 100$  来评价<sup>[14]</sup>。由图 2 可知,即使在添加内标和配制基质标以降低基质效应的情况下,基质效应仍旧明显,所以提取后的净化步骤尤为为重要。本文选取乙二胺-N-丙基硅烷 (PSA) 和无水硫酸镁作为净化试剂,基质效应显著下降。

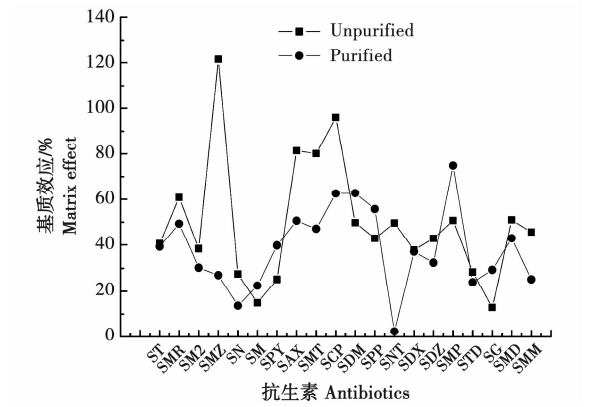


图2 净化过程对 20 种抗生素基质效应的影响  
Fig.2 The effect of purification process on the matrix effect of 20 antibiotics

2.4 方法学评价

根据 1.2.4 配制混合标准液,20 种磺胺类药物以磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 为内标,绘制标准曲线。以  $S/N=3$  时对应的含量为检出限 (LOD),  $S/N=10$  时对应的含量为定量限 (LOQ)。在 5、30、80  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  3 个浓度水平下进行空白样品加标回收试验,每个水平重复 6 次以考察本方法的回收率和精密度。以黄瓜为空白基质获得的实验数

据见表 2,在 0.5~100.0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时 20 种磺胺类药 足定量分析要求,回收率为 67.4%~116.6%,精  
物的线性良好,相关系数均大于 0.99,均可以满 密度为 0.1%~12.8%。

表 2 黄瓜中 20 种磺胺类抗生素的线性方程、相关系数、检出限和定量限及不同添加浓度下的  
回收率、精密度

Table 2 Linear equation, correlation coefficient, limit of detection, limit of quantitation in cucumbers  
of 20 sulfonamides and average recoveries precision under different concentrations

Compound	检出限/	定量限/	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient	回收率/% Recovery			精密度/% RSD		
	( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )			5	30	80	5	30	80
	LOD	LQD			$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
ST	0.03	0.10	0.01181690X+0.01021400	0.992092	85.9	80.0	91.3	1.6	1.3	1.6
SMR	0.06	0.20	0.01318520X+0.00205080	0.993545	107.2	94.8	116.2	2.7	2.3	1.7
SM2	0.07	0.24	0.02428460X+0.00988733	0.990623	98.9	92.7	102.6	1.0	2.6	0.9
SMZ	0.07	0.24	0.02155690X+0.00719772	0.999195	87.1	92.8	79.3	2.1	2.6	1.9
SN	0.18	0.57	0.00213236X+0.00049250	0.999031	99.1	99.0	102.6	4.8	5.8	4.3
SM	0.03	0.10	0.03705980X-0.08074060	0.991832	85.3	75.1	91.0	1.7	1.4	1.5
SPY	0.06	0.19	0.01748250X+0.02458940	0.990465	106.9	76.7	103.0	1.7	2.4	1.4
SAX	0.06	0.20	0.03045090X+0.02858220	0.990856	85.6	94.3	94.7	1.2	2.1	0.8
SMT	0.04	0.14	0.02092790X+0.01402710	0.996892	73.8	79.1	74.1	1.4	1.7	1.2
SCP	0.04	0.12	0.01668350X+0.00835361	0.997735	71.4	92.3	67.4	1.8	1.3	0.8
SDM	0.03	0.10	0.04225110X+0.04484670	0.990445	90.5	107.7	87.1	1.9	0.9	1.3
SPP	0.06	0.21	0.01235920X+0.00102993	0.991254	87.0	89.7	81.9	2.5	2.3	1.9
SNT	0.18	0.59	0.00061642X+0.00015800	0.997214	102.1	108.9	68.4	12.8	5.3	10.8
SDX	0.02	0.07	0.04916120X+0.02597540	0.995116	113.0	103.4	105.1	2.5	0.7	0.5
SDZ	0.01	0.03	0.03120910X+0.01992720	0.993601	111.2	90.0	94.1	2.0	0.4	2.6
SMP	0.06	0.18	0.02488770X+0.00656679	0.991583	107.4	92.2	94.6	2.3	2.0	0.1
STD	0.07	0.22	0.01271280X+0.01307160	0.996603	112.0	73.2	116.6	8.8	3.0	0.6
SG	0.03	0.10	0.02144600X+0.00069134	0.991364	103.0	86.1	96.2	7.3	6.1	3.8
SMD	0.06	0.20	0.01424350X+0.00836088	0.991518	100.0	94.4	95.9	2.7	2.1	0.6
SMM	0.03	0.09	0.01493880X+0.00788516	0.993167	99.8	84.7	98.2	4.2	1.0	1.4

3 结论

本文建立了不同种蔬菜中 20 种磺胺类兽药  
残留的超高效液相色谱-串联质谱测定法,优化了  
QuEChERS 方法的前处理条件。该方法灵敏度  
高,回收率稳定,重现性好,操作简单快速,适用于  
大批量蔬菜样品同时检测磺胺类兽药多残留。

参考文献:

[1] Economou V, Gousia P. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria[J]. Infect Drug Resist, 2015, 8(4): 49-61.

[2] Danezis G P, Agagnostopoulos C J, Liapis K, et al. Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography-MS/MS in various food matrices[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 942(10): 121-138.

- [3] Chen H R, Rairat T, Loh S H, et al. Assessment of veterinary drugs in plants using pharmacokinetic approaches: The absorption, distribution and elimination of tetracycline and sulfamethoxazole in ephemeral vegetables [J]. PLoS One, 2017, 12(8):1-16.
- [4] Ahmed M B, Rajapaksha A U, Lim J E, et al. Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce [J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2015, 63(2): 398-405.
- [5] 张律, 岳亚军, 赖少阳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定生活饮用水中 11 种抗生素 [J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(6): 2204-2210.
- [6] 周爱霞, 苏小四, 高松, 等. 高效液相色谱测定地下水、土壤及粪便中 4 种磺胺类抗生素 [J]. 分析化学, 2014, 42(3): 397-402.
- [7] 吴晓莲, 包艳萍, 向垒, 等. 固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜中 8 种磺胺类抗生素 [J]. 环境化学, 2013, 32(6): 1038-1044.
- [8] 吴岩, 姜冰, 徐义刚, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中 16 种农药残留 [J]. 色谱, 2015, 33(3): 228-234.
- [9] 林涛, 邵金良, 刘兴勇, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中 41 种农药残留 [J]. 色谱, 2015, 33(3): 235-241.
- [10] 王飞, 宓捷波, 李淑静, 等. 改良的 QuEChERS 样本前处理/高效液相色谱-串联质谱法检测猪肉中四环素类兽药的残留 [J]. 分析测试学报, 2017, 36(2): 272-275.
- [11] X Li, H Yu, R Peng, et al. Determination of 19 sulfonamides residues in pork samples by combining QuEChERS with dispersive liquid-liquid microextraction followed by UHPLC-MS/MS [J]. Journal of Separation Science, 2017, 40(6): 1377-1384.
- [12] 张科明, 梁飞燕, 邓鸣, 等. QuEChERS 结合液相色谱-串联质谱法快速测定猪肉中多类兽药残留 [J]. 色谱, 2016, 34(9): 860-867.
- [13] 熊春兰, 郭平, 占春瑞, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定水产品中 8 类 38 种兽药残留 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(2): 193-198.
- [14] 胡文彦, 许磊, 杨军, 等. 基于 QuEChERS 提取的快速液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷基辅助食品中的 9 种真菌毒素 [J]. 色谱, 2014, 32(2): 133-138.

## Determination of Sulfonamides in Vegetables by QuEChERS-high Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

LIU Chang

(Harbin Examining and Inspection Center for Agricultural Products Safety and Quality, Harbin 150070, China)

**Abstract:** The methods of detection of 20 sulfonamides in different kinds of vegetables were established by improved QuEChERS combining the ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer. Samples weight in 10.0 g were extracted by 10 mL 1.0% acetic acid in acetonitrile, 6 g magnesium sulfate and 1.5 g sodium acetate and liquid-liquid extraction was used to stand stratification. 8 mL supernatant fluid were purified by 150 mg ethylenediamine-N-propyl silane (PSA) and 900 mg magnesium sulfate. Then 5 mL supernatant fluid were concentrated under 40°C with blowing nitrogen. The residues were dissolved by 200 mL acetonitrile and 800 mL water. The positive ion multi-reaction monitoring mode was used by the super high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometer and quantify was used by the internal standard method. The results showed that the range of 0.5-100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 20 sulfonamides were in good linear and the correlation coefficients were greater than 0.99. Three different recovery were between 67.4 and 116.6, standard of standard deviation were between 0.1 and 12.8, all of these were met the requirements of quantitative analysis, and the method was simply rapidly and was suitable for large quantities of vegetables samples at the same time to test veterinary drug residues.

**Keywords:** QuEChERS; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; vegetables; sulfonamides; more residuals