

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定水产养殖水体中 21 种磺胺类药物残留量

LCMSMS-615

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用系统测定水产养殖水体中 21 种磺胺类药物残留量的方法。水体样品经过 HLB 固相萃取柱净化后，使用 C18 色谱柱进行分离。采用正离子模式进行电离，通过多反应监测模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用内标法定量，磺胺脒等 21 种磺胺类药物在 5 ng/mL ~ 50 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.995 以上，各校准点准确度在 87.7% ~ 112.8% 之间，且精密度和不同浓度水平的加标回收率实验结果良好。

关键词： 三重四极杆质谱 养殖水体 磺胺类药物

水产养殖过程中，为预防和治疗鱼、虾等动物的细菌疾病，减少经济损失，相关从业人员经常会使用磺胺类等抗菌药物。磺胺类药物 (sulfa drugs) 是一类人工合成的抗菌药。因磺胺类药物抗菌谱广、使用方便、价格低廉，为了提高养殖产量，在饲料添加和水产动物生长中被广泛使用。水产养殖中，无论将药物混合在饲料中，还是直接往池塘中泼洒，药物都会溶于水，而水体中残留的药物会容易污染周围的河流、湖泊等自然水域。水体环境中抗菌药物较高浓度的残留，会影响生态环境的平衡，还可能诱导细菌耐药性，危害人类的健康。

我国农业农村部 SC/T 9436-2020 《水产养殖环境（水体、底泥）中磺胺类药物的测定 液相色谱 - 串联质谱法》已于 2021 年 1 月 1 日开始实施，该标准提出了水产养殖环境中磺胺类药物的测定方法，对规范和指导水产养殖中磺胺类药物的使用具有重要意义。为应对该标准，本文使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用系统，建立了水产养殖水体中 21 种磺胺类药物残留量的测定方法，为监控水产养殖过程中磺胺类药物的使用情况，评估其对水产品的质量安全风险提供实用的技术手段。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

检测器：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.96

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP- C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 1.8 μm, P/N: 227-32001-03, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 - 乙酸水溶液 (v/v = 1/81)； B 相 - 0.1% 甲酸 - 甲醇溶液

流速：0.45 mL/min

进样体积：3 μL

柱温：30°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	5
3.50	Pumps	Pump B Conc.	10
13.00	Pumps	Pump B Conc.	45
17.00	Pumps	Pump B Conc.	70
18.00	Pumps	Pump B Conc.	70
18.50	Pumps	Pump B Conc.	5
22.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，正离子模式

离子源接口电压：4.0 kV

雾化气：氮气 3 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

加热气：空气 10 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：200℃

加热模块温度：400℃

接口温度：400℃

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

驻留时间：10~20 ms

1.3 样品前处理方法

准确量取 200 mL（精确至 0.1 mL）水样于 250 mL 广口玻璃瓶中，准确加入 125 μ L 氘代磺胺邻二甲氧嘧啶内标标准工作液，混合均匀。无需提取，待浓缩净化。

用 5 mL 甲醇和 5 mL 水依次活化和平衡 HLB 固相萃取柱，水体样品以 2 mL/min 流速过柱，1 mL 实验用水淋洗，用 0.1% 甲酸 - 甲醇溶液分 2 次洗脱至 10 mL 离心管中，洗脱液最终定容至 5 mL。取 200 μ L 洗脱液，加 800 μ L 初始流动相稀释 5 倍，混匀后过 0.22 μ m 微孔滤膜后进行 LC-MS/MS 分析。

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
磺胺脒	Sulfaguanidine	215.05	92.05*	-16	-25	-36
			108.05	-16	-22	-22
磺胺醋酰	Sulfacetamide	215.05	92.05*	-23	-23	-17
			108.05	-16	-22	-22
磺胺嘧啶	Sulfadiazine	251.00	156.00*	-30	-15	-29
			92.05	-30	-25	-17
磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	279.00	186.00*	-30	-17	-20
			92.05	-30	-31	-17
磺胺噻唑	Sulfathiazole	256.00	156.00*	-30	-14	-30
			92.05	-30	-28	-17
磺胺吡啶	Sulfapyridine	250.00	92.05*	-30	-27	-17
			156.00	-30	-16	-29
磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	265.00	156.00*	-30	-17	-28
			92.10	-30	-28	-17
磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	281.10	156.10*	-30	-17	-29
			108.10	-30	-26	-21

化合物名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
磺胺二甲唑	Sulfamoxole	268.10	156.10*	-30	-15	-29
			92.10	-30	-28	-17
磺胺甲噻二唑	Sulfamethizole	271.00	156.00*	-23	-14	-16
			108.00	-22	-23	-19
磺胺索嘧啶	Sulfisomidine	279.00	156.00*	-27	-19	-16
			186.00	-30	-17	-19
甲氧苄啶	Trimethoprim	291.10	230.15*	-14	-23	-26
			123.10	-14	-24	-24
磺胺甲氧哒嗪	Sulfamethoxy-pyridazine	281.00	156.00*	-30	-17	-30
			92.05	-30	-30	-17
磺胺氯哒嗪	Sulfaclorazina	285.00	156.00*	-30	-14	-29
			92.05	-30	-29	-17
磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	254.00	156.00*	-30	-16	-29
			92.00	-30	-28	-17
磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	281.00	156.00*	-12	-18	-16
			108.00	-23	-18	-22
磺胺多辛	Sulfadoxine	311.00	156.00*	-28	-26	-16
			108.00	-30	-30	-19
磺胺异噁唑	Sulfisoxazole	268.10	156.00*	-20	-13	-18
			113.10	-20	-15	-24
磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	315.10	158.10*	-30	-28	-30
			92.05	-30	-21	-30
磺胺地索辛	Sulfadimethoxine	311.00	156.05*	-23	-22	-29
			92.05	-23	-35	-17
磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	301.00	155.95*	-23	-17	-29
			92.05	-23	-30	-17
氘代磺胺邻二甲氧嘧啶-D3	Sulfadoxine-D3	314.05	92.05*	-23	-35	-17
			156.00	-28	-26	-16

注：* 表示定量离子对

1.4 混合标准溶液的配制

1 µg/mL 的 21 种磺胺类药物混合标准品贮备溶液，取适量，使用初始流动相进行稀释，配制成浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL 和 50 ng/mL 标准系列工作液，其中氘代磺胺邻二甲氧嘧啶内标浓度均为 5 ng/mL，按 1.2 分析条件上机分析并绘制标准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

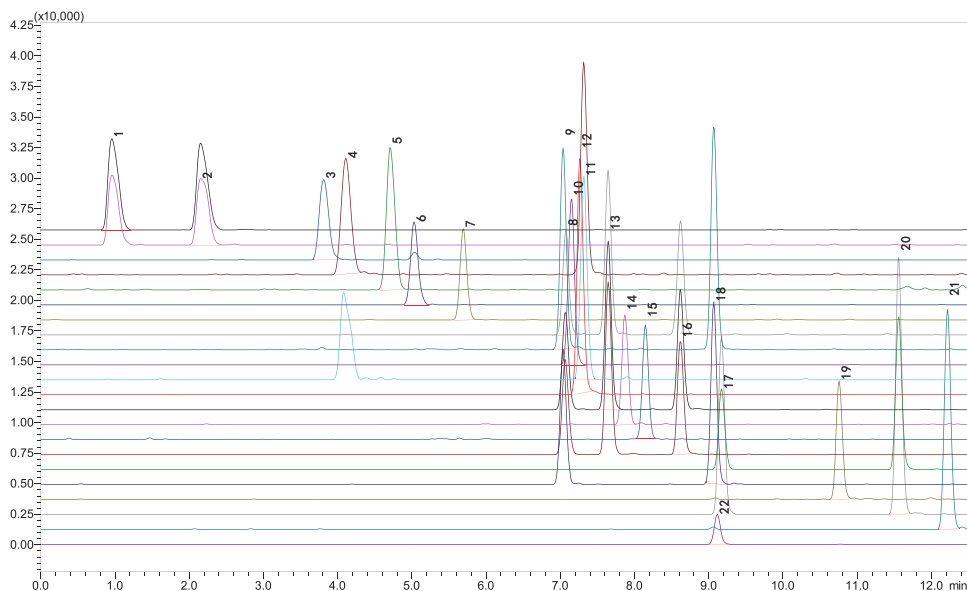


图 1 21 种磺胺类药物混合标准样品 MRM 图谱 (10 ng/mL)

(1、磺胺脒; 2、磺胺醋酰; 3、磺胺嘧啶; 4、磺胺二甲嘧啶; 5、磺胺噻唑; 6、磺胺吡啶; 7、磺胺甲嘧啶; 8、磺胺对甲氧嘧啶; 9、磺胺二甲唑; 10、磺胺甲噻二唑; 11、磺胺索嘧啶; 12、甲氧苄啶; 13、磺胺甲氧嗪; 14、磺胺氯噻嗪; 15、磺胺甲噻唑; 16、磺胺间甲氧嘧啶; 17、磺胺多辛; 18、磺胺异噻唑、19、磺胺苯吡唑; 20、磺胺地索辛; 21、磺胺喹噁啉; 22、磺胺邻二甲氧嘧啶 -D3)

2.2 线性范围与检出限

将 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、30 ng/mL、40 ng/mL 和 50 ng/mL 的不同浓度的磺胺类标准系列工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用内标法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

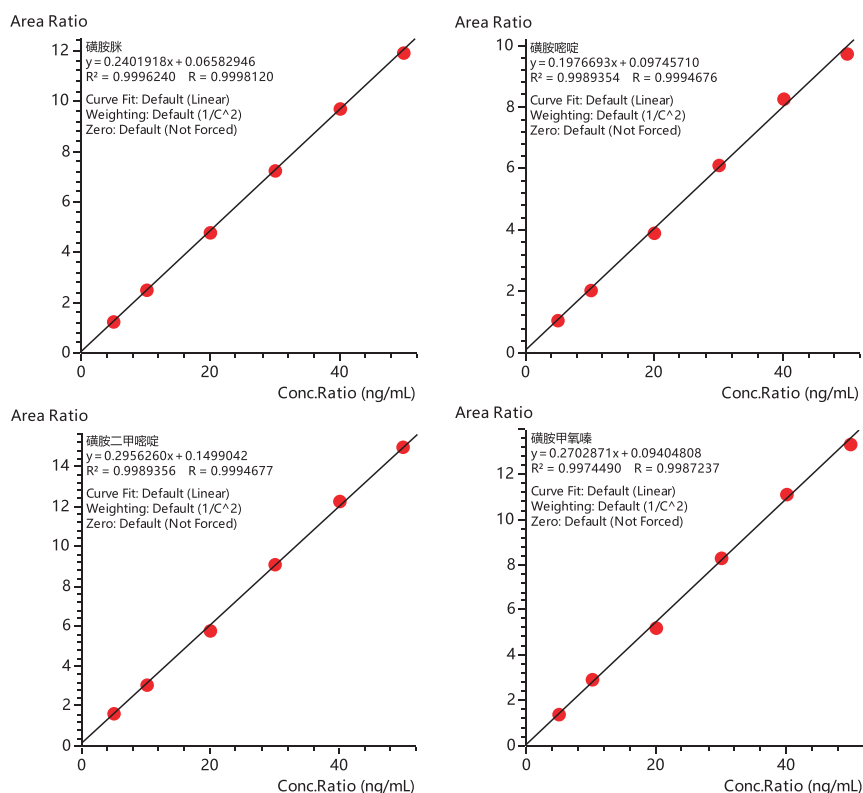


图 2 部分磺胺类药物的校准曲线

表 3 标准曲线与方法定量限信息

化合物名称	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确率 (%)	方法定量限 (ng/mL)
磺胺脒	$Y = (0.240192)X + (0.0658295)$	0.999	5~50	98.9~102.5	0.63
磺胺醋酰	$Y = (0.197440)X + (0.233655)$	0.999	5~50	96.7~104.3	0.63
磺胺嘧啶	$Y = (0.197669)X + (0.0974571)$	0.999	5~50	97.1~103.2	0.63
磺胺二甲嘧啶	$Y = (0.295626)X + (0.149904)$	0.999	5~50	95.6~102.7	0.63
磺胺噻唑	$Y = (0.317403)X + (0.173338)$	0.998	5~50	94.0~104.7	0.63
磺胺吡啶	$Y = (0.178014)X + (-0.0262361)$	0.997	5~50	92.5~109.3	0.63
磺胺甲基嘧啶	$Y = (0.150040)X + (0.174368)$	0.998	5~50	97.3~107.6	0.63
磺胺对甲氧嘧啶	$Y = (0.163882)X + (-0.0207425)$	0.996	5~50	93.7~110.8	0.63
磺胺二甲唑	$Y = (0.327635)X + (0.0278990)$	0.997	5~50	91.7~107.3	0.63
磺胺甲噻二唑	$Y = (0.311688)X + (-0.0777486)$	0.998	5~50	94.0~104.7	0.63
磺胺索嘧啶	$Y = (0.104608)X + (0.101861)$	0.995	5~50	87.7~106.6	0.63
甲氧苄啶	$Y = (0.709825)X + (0.409470)$	0.999	5~50	96.1~103.7	0.63
磺胺甲氧哒嗪	$Y = (0.270287)X + (0.0940481)$	0.998	5~50	98.0~105.8	0.63
磺胺氯哒嗪	$Y = (0.198249)X + (0.0670822)$	0.996	5~50	95.0~112.8	0.63
磺胺甲噁唑	$Y = (0.180069)X + (0.205073)$	0.998	5~50	92.2~103.8	0.63
磺胺间甲氧嘧啶	$Y = (0.194967)X + (0.0274657)$	0.998	5~50	94.8~108.2	0.63
磺胺多辛	$Y = (0.121806)X + (0.0657527)$	0.996	5~50	94.5~111.6	0.63
磺胺异噁唑	$Y = (0.400535)X + (-0.0293636)$	0.998	5~50	95.1~106.6	0.63
磺胺苯吡唑	$Y = (0.210382)X + (-0.0571352)$	0.998	5~50	96.2~103.5	0.63
磺胺地索辛	$Y = (0.407397)X + (0.253828)$	0.997	5~50	92.9~105.8	0.63
磺胺喹噁啉	$Y = (0.404946)X + (-0.0467826)$	0.998	5~50	93.9~104.2	0.63

2.3 精密度实验

对 10 ng/mL、20 ng/mL 和 40 ng/mL 不同浓度的 21 种磺胺类药物标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：磺胺脒等 21 种磺胺类药物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别小于 0.79% 和 6.61%，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

化合物名称	10 ng/mL		20 ng/mL		40 ng/mL	
	R. T.	RSD/%	R. T.	RSD/%	R. T.	RSD/%
磺胺脒	0.63	4.67	0.79	2.85	0.37	1.25
磺胺醋酰	0.65	2.96	0.35	3.11	0.50	1.65
磺胺嘧啶	0.26	4.11	0.09	4.43	0.17	2.48
磺胺二甲嘧啶	0.23	4.67	0.14	2.66	0.18	3.23
磺胺噻唑	0.17	4.47	0.06	2.39	0.11	2.58
磺胺吡啶	0.19	4.42	0.06	3.89	0.09	3.63
磺胺甲基嘧啶	0.21	6.61	0.05	3.52	0.08	6.19
磺胺对甲氧嘧啶	0.13	4.79	0.06	3.09	0.06	1.83
磺胺二甲唑	0.07	4.05	0.04	4.15	0.07	1.59
磺胺甲噻二唑	0.09	5.24	0.04	2.97	0.06	1.77

化合物名称	10 ng/mL		20 ng/mL		40 ng/mL	
	R. T.	RSD/%	R. T.	RSD/%	R. T.	RSD/%
磺胺索嘧啶	0.07	5.57	0.06	5.28	0.06	3.95
甲氧苄啶	0.08	3.75	0.05	1.82	0.05	1.91
磺胺甲氧哒嗪	0.08	3.14	0.03	3.36	0.06	1.92
磺胺氯哒嗪	0.06	5.65	0.03	3.77	0.08	3.61
磺胺甲噁唑	0.11	5.14	0.04	3.81	0.08	2.49
磺胺间甲氧嘧啶	0.07	4.83	0.04	3.41	0.06	2.98
磺胺多辛	0.06	4.18	0.03	2.87	0.07	2.29
磺胺异噁唑	0.03	3.74	0.03	3.99	0.07	2.35
磺胺苯吡唑	0.04	3.73	0.03	3.61	0.07	2.69
磺胺地索辛	0.02	1.79	0.04	5.18	0.06	1.54
磺胺喹噁啉	0.02	2.64	0.03	3.13	0.05	2.23

2.4 回收率实验

称取空白水体样，加入少量磺胺脒等 21 种磺胺类药物混合标准品贮备溶液，使水样中添加浓度为分别为 1 ng/mL、2 ng/mL 和 5 ng/mL，平行做 3 份。按照 1.3 样品前处理方法净化后，测定磺胺脒等 21 种磺胺类药物的添加回收率，各化合物的平均加标回收率结果在 70%~110% 之间（见表 5）。

表 5 21 种磺胺类药物的平均添加回收率结果 (n=3)

化合物名称	添加浓度水平		
	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL
磺胺脒	0.63	0.79	0.37
磺胺醋酰	0.65	0.35	0.50
磺胺嘧啶	0.26	0.09	0.17
磺胺二甲嘧啶	0.23	0.14	0.18
磺胺噻唑	0.17	0.06	0.11
磺胺吡啶	0.19	0.06	0.09
磺胺甲基嘧啶	0.21	0.05	0.08
磺胺对甲氧嘧啶	0.13	0.06	0.06
磺胺二甲唑	0.07	0.04	0.07
磺胺甲噻二唑	0.09	0.04	0.06
磺胺索嘧啶	0.07	0.06	0.06
甲氧苄啶	0.08	0.05	0.05
磺胺甲氧哒嗪	0.08	0.03	0.06
磺胺氯哒嗪	0.06	0.03	0.08
磺胺甲噁唑	0.11	0.04	0.08
磺胺间甲氧嘧啶	0.07	0.04	0.06
磺胺多辛	0.06	0.03	0.07
磺胺异噁唑	0.03	0.03	0.07
磺胺苯吡唑	0.04	0.03	0.07

化合物名称	添加浓度水平		
	1 ng/mL	2 ng/mL	5 ng/mL
磺胺地索辛	0.02	0.04	0.06
磺胺喹噁啉	0.02	0.03	0.05

■ 结论

本文建立了使用岛津超高效液相色谱三重四极杆质谱联用系统测定水产养殖水体中 21 种磺胺类药物残留量的方法。水体样品经过固相萃取柱净化后，采用超高效液相色谱 - 串联质谱法测定磺胺类药物。结果表明：使用内标法定量，磺胺脒等 21 种磺胺类药物在 5 ng/mL ~ 50 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.995 以上，各校准点准确度在 87.7% ~ 112.8% 之间，且精密度和不同浓度水平的加标回收率实验结果良好。该方法样品前处理过程简单，检测灵敏度高，重现性好，适用于测定养殖水体中 21 种磺胺类药物残留量。

岛津应用云

