

磁性分散萃取液相色谱质谱联用 检测牛奶中的磺胺类抗生素

No.LCMS-012

摘要：建立了磁性分散固相萃取液相色谱质谱联用（LC-MS）测定牛奶中磺胺类抗生素的方法。十一种磺胺类抗生素在0.05–20 ng/mL的浓度范围内线性关系良好，相关系数达0.997以上；最低检测限在0.5–49.5 ng/L之间。选取0.2，2和20 ng/mL三个浓度加标考察实际样品回收率，回收率在88.6%–115.6%之间，日内、日间精密度分别在0.9–8.4%和1.6–12.6%之间。

关键词：磁性分散固相萃取（magnetic dispersive SPE） LC-MS 牛奶 磺胺类抗生素

磺胺类药物(SAs)被广泛用于预防和治疗食源性动物疾病，然而过量使用这些抗生素会导致食用动物产品中有残留，影响人类的健康，磺胺二甲嘧啶还可能使小鼠致癌。为了消费者的健康，欧盟已经规定动物源性食品中磺胺的最大残留量为100 μg/kg。

动物源性食品中磺胺类抗生素的测定需要有效的前处理技术，GB/T21316–2007动物源性食品中磺胺类残留量的测定中使用的液液萃取法前处理时间长且操作复杂，本实验采用疏水和阳离子交换混合型磁性材料作为萃取介质，磁性萃取材料吸附目标物后，受外加磁场吸引，可直接、快速地从液体样品中分离出来，分析时间短，萃取加解吸时间只需要短短一分钟。结合液相色谱—串联四极杆质谱测定，具有灵敏度高，选择性好，操作简便的优点，可满足牛奶中磺胺类药物残留分析的要求。

实验部分

1、仪器与试剂

仪器：LC-20AD×2（输液泵），SIL-20AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），DGU-20A₃（在线脱气机），CBM-20A（系统控制器），API 3200三重四极杆串联质谱。

标准品：磺胺氯吡嗪（Sulfachloropyridazine, SCP），磺胺噻唑（Sulfathiazole, STZ），磺胺吡啶（Sulfapyridine, SP），磺胺对甲氧嘧啶（Sulfamethoxydiazine, SMD），磺胺甲基嘧啶（Sulfamerazine, SMR），磺胺二甲嘧啶（Sulfamethazine, SMZ），磺胺甲氧吡嗪（Sulfamethoxypyridazine, SMP），磺胺间二甲氧嘧啶（Sulfadimethoxine, SDM），磺胺甲噻二唑（Sulfamethizol, SMT），磺胺醋酰（Sulfacetamide, SA），磺胺间甲氧嘧啶（Sulfamonomethoxine, SMM），购自Sigma-ardrich公司。

试剂：甲酸，LCMS级，Fluka公司；甲醇，HPLC级，Merck公司；高氯酸，分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

2、分析条件

流动相：A（0.2%甲酸水溶液）/B（0.2%甲酸甲醇）
=75/25 (v/v)

流速：0.2 mL/min

进样体积：10 μL

色谱柱：Shim-pack VP-ODS（2.0 mm I.D. ×
250 mmL., 5 μm）

柱温：35°C

流动相梯度见右表：

Time	Module	Action	Value (%)
5.00	Pumps	Pump B Conc.	40
20.00	Pumps	Pump B Conc.	80
22.00	Pumps	Pump B Conc.	80
22.01	Pumps	Pump B Conc.	25
30.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI；扫描方式：正离子扫描；检测方式：多反应监测；电喷雾电压：4000V；雾化气压力：60psi；TurboHeater GAS压力：60psi；气帘气压力：20psi；离子源温度：450℃；入口电压：3V；碰撞气入口电压：15 V；碰撞气出口电压：3 V；监测离子对、碰撞气能量和去簇电压见表1。

表1 11种磺胺的监测离子对、碰撞气能量和去簇电压

磺胺名称	监测离子对 m/z	碰撞气能量 eV	去簇电压 V	磺胺名称	监测离子对 (m/z)	碰撞气能量 eV	去簇电压 V
SCP	285.0/156.1	19	45	SMP	281.1/156.0	22	45
STZ	256.0/156.0	18	60	SDM	311.0/156.1	27	50
SP	250.1/156.0	20	40	SMT	271.0/156.1	17	45
SMD	281.1/156.0	22	45	SA	215.0/125.0	18	40
SMR	265.1/156.0	21	45	SMM	281.1/156.0	22	45
SMZ	279.1/186.0	21	50				

3、标准品溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：

准确称取11种SAs各10 mg于10 mL容量瓶中，甲醇定容至刻度，冷冻保存。配制100 μg/mL SAs的混标溶液，逐级稀释到0.05、0.2、1、2、5、10、20 ng/mL制作标准曲线。

前处理步骤：

取1 mL牛奶样品，加入10%高氯酸溶液100 μL后用蒸馏水稀释至10 mL。涡旋1 min，1000 rpm 离心5 min。取上清液，加入50 mg磁性吸附材料，萃取涡旋30 s。靠磁铁倾出上清液，残留材料加入1 mL 5%氨水丙酮，解析涡旋30 s。靠磁铁分离上清液，氮吹至近干，0.5 mL初始流动相定容，过滤后注入LCMS分析。

结果与讨论

1、线性范围及检出限

加标浓度为1 ng/mL的空白牛奶得到图谱如下图1所示。图中所示，11种SAs样品峰形尖锐，无基质干扰。

以空白牛奶添加0.05、0.2、1、2、5、10和20 ng/mL标样制作校准曲线，11种目标组分的标准曲线信息见表2，相关系数达0.997以上；SAs的LOD和LOQ范围分别在0.5–49.5 ng/L和1.7–165.0 ng/L。

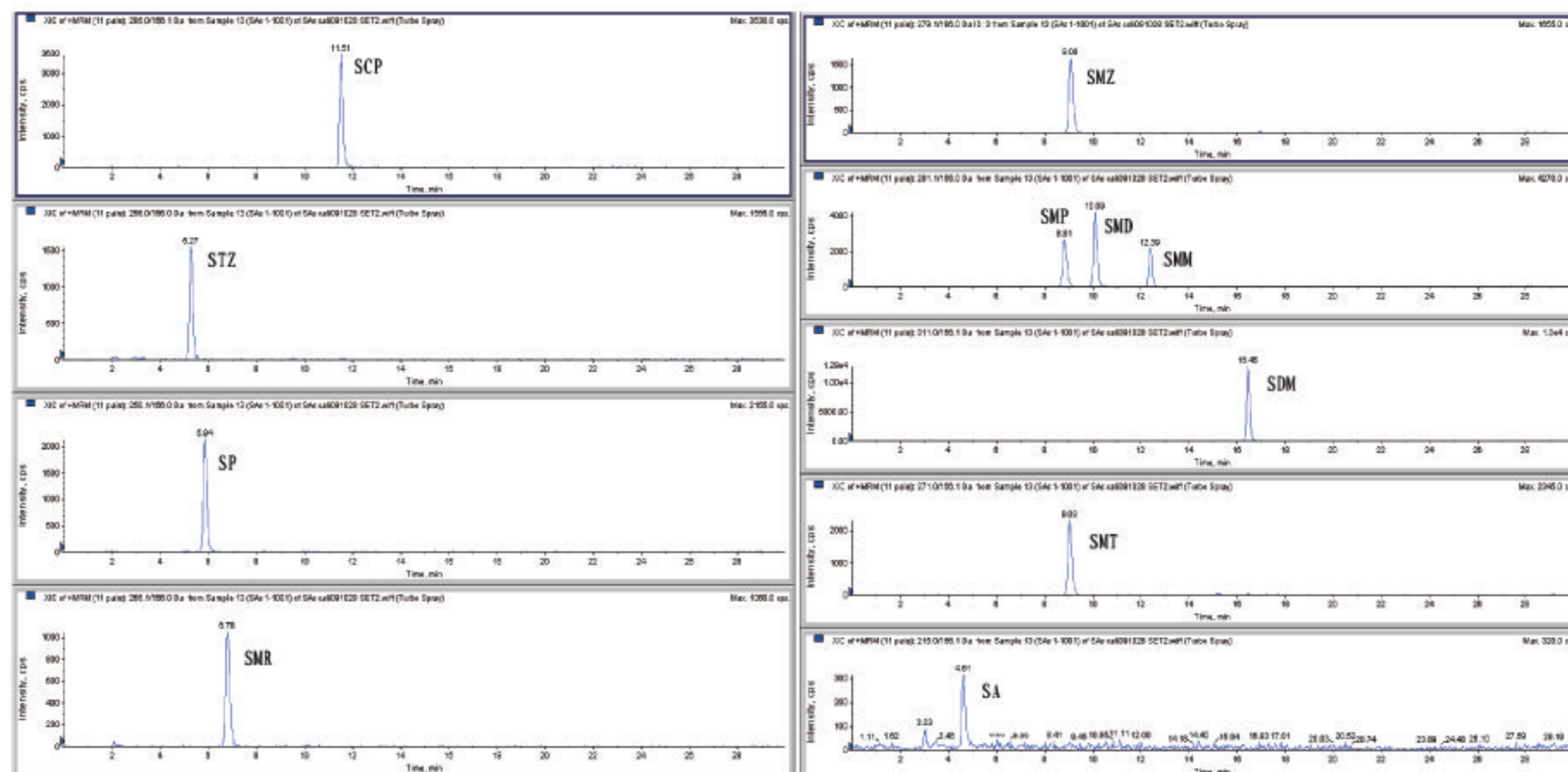


图1 空白牛奶添加1 ng/mL混标色谱图

表2 SAs的线性曲线及检测限、定量限

Compound	Linearity and sensitivity characteristics				
	Linear dynamic range (ng/mL)	Regression line		LOD (ng/L)	LOQ (ng/L)
		Linear equation	R ² value		
SCP	0.05-20	Y=-2131.83+38832.76X	0.9979	1.8	6.1
STZ	0.05-20	Y=1015.54+18666.70X	0.9975	2.5	8.4
SP	0.05-20	Y=-127.67+28535.78X	0.9982	3.1	10.3
SMD	0.05-20	Y=-10105.67+54511.63X	0.9978	0.7	2.2
SMR	0.05-20	Y=209.60+15762.16X	0.9987	3.2	10.6
SMZ	0.05-20	Y=-5404.41+25134.66X	0.9974	1.1	3.7
SMP	0.05-20	Y=-7897.4+40625.13X	0.9984	2.3	7.6
SDM	0.05-20	Y=-725.74+115929.74X	0.9992	0.5	1.7
SMT	0.05-20	Y=-1554.30+33318.96X	0.9973	2.2	7.4
SA	0.05-20	Y=-6550.41+29644.3X	0.9980	49.5	165.0
SMM	0.05-20	Y=-6449.95+27151.36X	0.9982	1.9	6.3

2、回收率及日内、日间精密度实验

取实际样品，在0.2、2、20 ng/mL的加标浓度测定其回收率及日内、日间精密度，其结果如表3所示。11种磺胺样品的加标回收率在88.6%–115.6%之间，日内、日间精密度分别在0.9–8.4%和1.6–12.6%之间。

表3 SAs的回收率及日内、日间精密度

Compound	Intra-day precision (RSD%, n=5)			Inter-day precision (RSD%, n=3)			Recovery (% , n=3)		
	0.2	2	20	0.2	2	20	0.2 ng/mL	2 ng/mL	20 ng/mL
	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL	ng/mL			
SCP	2.8	1.8	2.3	5.7	3.8	1.4	115.6 ± 3.8	104.1 ± 1.5	102.3 ± 3.8
STZ	6.9	4.9	5.4	7.2	5.6	5.5	108.5 ± 8.7	95.5 ± 7.5	101.9 ± 6.4
SP	4.1	3.1	2.5	10.8	4.1	3.2	105.1 ± 9.2	92.4 ± 2.0	98.6 ± 1.7
SMD	5.4	2.2	2.4	3.8	3.1	2.8	89.7 ± 4.6	97.7 ± 2.6	103.8 ± 1.2
SMR	5.3	3.9	2.6	8.5	3.4	2.2	109.6 ± 9.8	100.1 ± 3.5	96.3 ± 3.6
SMZ	4.1	1.8	2.9	7.5	3.0	4.3	101.8 ± 5.4	100.5 ± 1.2	108.7 ± 3.2
SMP	2.6	0.9	1.0	3.6	3.0	1.8	100.1 ± 3.6	91.3 ± 2.7	97.6 ± 1.9
SDM	1.8	1.3	2.9	5.1	4.2	3.3	87.6 ± 5.9	103.3 ± 4.6	93.1 ± 2.8
SMT	5.0	2.6	4.1	4.4	5.2	4.0	103.6 ± 5.2	93.1 ± 3.9	103.3 ± 3.3
SA	8.4	5.9	1.5	12.6	7.1	2.6	99.8 ± 10.1	96.5 ± 8.2	105.1 ± 4.9
SMM	3.8	2.3	2.0	3.2	1.6	2.0	88.6 ± 4.6	99.1 ± 2.9	102.8 ± 2.2

3、实际样品分析

超市随机购买三份牛奶样品，一份样品检出SP，一份检出SMP，但不能定量。在0.2 ng/mL的加标浓度测定三份牛奶样品的回收率，结果良好。具体检测结果见表4。

表4 实际样品检测结果

Compound	Sample 1		Sample 2		Sample 3	
	Detected (ng/mL)	Recovery (0.2 ng/mL, %)	Detected (ng/mL)	Recovery (0.2 ng/mL, %)	Detected (ng/mL)	Recovery (0.2 ng/mL, %)
SCP	n.d.	99.8	n.d.	94.1	n.d.	102.9
STZ	n.d.	95.6	n.d.	101.3	n.d.	108.7
SP	n.q.	107.2	n.d.	96.3	n.d.	102.9
SMD	n.d.	89.3	n.d.	94.9	n.d.	96.4
SMR	n.d.	98.5	n.d.	91.2	n.d.	93.7
SMZ	n.d.	83.6	n.d.	95.1	n.d.	101.6
SMP	n.d.	86.8	n.q.	91.0	n.d.	89.3
SDM	n.d.	88.4	n.d.	83.9	n.d.	91.2
SMT	n.d.	92.7	n.d.	87.5	n.d.	95.0
SA	n.d.	81.2	n.d.	90.1	n.d.	84.9
SMM	n.d.	83.6	n.d.	93.8	n.d.	97.6

* n.d., not detected; n.q.; not quantified.

■ 结论

1. 本文建立了磁性分散固相萃取液相色谱质谱（LC-MS）联用测定牛奶中磺胺类抗生素的方法。
2. 11种目标组分在0.05–20 ng/mL范围内，线性相关系数达0.997以上，最低检测限在0.5–49.5 ng/L之间。选取0.2, 2和20 ng/mL三个浓度加标考察实际样品回收率，回收率在88.6%–115.6%之间，日内、日间精密度分别在0.9–8.4%和1.6–12.6%之间。
3. 本法灵敏度高，选择性好，操作简便，可满足牛奶中磺胺类药物残留分析的要求。