

崔晓娜,葛爱民,李汝春,等. 磁性石墨烯固相萃取-高分辨质谱法快速测定动物源性食品中磺胺类药物残留[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):151-154.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.042

磁性石墨烯固相萃取-高分辨质谱法快速测定动物源性食品中磺胺类药物残留

崔晓娜¹, 葛爱民¹, 李汝春¹, 董彦莉²

(1. 山东畜牧兽医职业学院, 山东潍坊 261061; 2. 河北农业大学理学院, 河北保定 071000)

摘要:采用高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱技术,建立了动物源性食品中 13 种磺胺类药物残留的磁性石墨烯固相萃取-高分辨质谱分析方法。样品采用 0.1% 的甲酸/乙腈提取,目标物通过磁性石墨烯粉吸附,除去杂质,然后再解析目标物的方法获得干净的样品基质。经 Waters UPLC BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离,液相色谱-高分辨质谱仪进行检测。结果表明,13 种目标物在 2.0 ~ 50.0 μg/L 范围内线性关系良好($r^2 > 0.99$)。在动物源性食品基质中,目标化合物在 2、5、10 μg/kg 3 个加标水平的平均回收率在 77.8% ~ 98.4%,相对标准偏差(RSD)为 4.1% ~ 10.1%。该方法净化速度快、效率高,可用于动物源性食品中磺胺类药物残留筛查检测。

关键词:磁性石墨烯固相萃取(MSPE);高分辨质谱法;动物源性食品;磺胺

中图分类号: TS207 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)09-0151-04

磺胺类药物为合成的广谱抗菌剂,对多数革兰氏阳性菌和阴性菌有效。由于磺胺类药物在体内作用时间和代谢时间较长,通过任何途径摄入的磺胺都有可能在人体中蓄积,蓄积到一定值的药物对人体机能是有害的^[1]。目前,我国对磺胺类及其增效剂的使用有比较明确的规定。我国农业部第 235 号公告中规定,禽肉类产品中磺胺类总量不得超过 0.1 mg/kg;日本肯定列表中将动物源性食品的最低限量定为 0.02 mg/kg;欧盟 2377/90/EEC 中明确规定,在所有动物源性食品中磺胺类残留总量不能超过 0.1 mg/kg^[2-3]。

磁性石墨烯是由石墨烯化学制备而成,磁性石墨烯纳米

粒子因具有很多特殊的磁性质,比如超顺磁性、高矫顽力、低居里温度、高磁化率等,并且在磁流体、数据存储、催化、污染物处理等很多方面都已有广泛的研究和实际应用。所以石墨烯与磁性纳米粒子复合合成的磁性石墨烯受到了极大的关注,并为石墨烯的应用研究发展出了新的方向^[4-6]。

目前,磺胺类及其增效剂残留的测定方法有高效液相色谱法配合紫外检测器、荧光检测器和质谱检测器^[7]。液相色谱-三重四极杆串联质谱(LC/MS/MS)可以在一次分析中定量和鉴定数百种目标化合物,具有很高的选择性和灵敏度。但是,这种方法需要采用多种已知化合物优化仪器参数,因此不能用于筛查未知化合物。基于 Orbitrap 技术,Exactive 具有极高的质量分辨率,从而保证了分析结果高质量准确度,并可以准确地区分复杂样品中同时洗脱出的具有相同质量数的化合物,高达 3 个数量级的动态线性范围,可轻松分析受复杂基质干扰的痕量化合物^[8-10]。

本研究建立了动物源性食品中 13 种具有代表性的磺胺类药物增效剂的快速前处理和高分辨质谱法联用的测定方法,该方法快速、准确,为监控动物源性食品中磺胺类药物增

收稿日期:2016-06-03

基金项目:河北省科技支撑计划(编号:14227115D);山东省潍坊市科技支撑计划(编号:2015GX044)。

作者简介:崔晓娜(1980—),女,硕士,讲师,主要从事动物源食品卫生检验。E-mail:sdwfen@163.com。

通信作者:董彦莉,硕士,副教授,主要从事分析化学研究。E-mail:dy19810314@126.com。

[19] 姚炳佳. 基于非离子型表面活性剂的新型浊点萃取的研究[D]. 上海:上海交通大学,2008:8-9.

[20] 余益军,孙兆海,鲜放鸣,等. 浊点萃取在环境有机分析中的影响因素及应用[J]. 理化检验:化学分册,2008,44(7):696-700.

[21] 孙梅,刘桂建,吴强华. 浊点萃取技术在环境样品痕量元素分析中的应用研究进展[J]. 环境化学,2013(6):1016-1024.

[22] 姜蕾,贾林贤,林靖凌,等. 浊点萃取-超高效液相色谱法检测水中戊菌唑残留量[J]. 分析实验室,2015,34(2):155-158.

[23] Paleologos E K, Giokas D L, Karayannis M I. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction[J]. Trac Trends in Analytical Chemistry,2005,24(5):426-436.

[24] 马岳,黄骏雄. 浊点萃取在环境化学方面的应用[J]. 上海环

境科学,2000,1(7):319-324.

[25] 李燕,张新艳,张晓霞. 浊点萃取-原子吸收光谱法测定水和花粉中痕量铜、铅、镉[J]. 环境监测管理与技术,2016,28(3):37-40.

[26] 黄海霞,谭雪晴. TritonX-100 对废水中 Cd²⁺、Co²⁺ 的浊点萃取研究[J]. 绵阳师范学院学报,2015(2):47-50.

[27] 姜蕾,贾林贤,林靖凌,等. 土壤中戊菌唑残留的分析方法[J]. 农药,2015,54(3):197-200.

[28] 戴媛媛,牛海凤,董玉波,等. 壬基酚对水生生物的毒性研究进展[J]. 环境与健康杂志,2012,29(10):948-951.

[29] 李艳霞,段晓勇,李先国,等. 水中壬基酚光降解机理研究[J]. 化学学报,2012,70(17):1819-1826.

效剂残留提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 标准物质 磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺-5-(对)甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺-6-(间)甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺甲基异噻唑、磺胺喹噁啉,均购自 DR. 公司,纯度均大于 99%。

1.1.2 试剂与耗材 乙腈,甲醇均为色谱纯(Fisher);无水硫酸钠,分析纯(烟台市双双化工);甲酸,色谱纯(TEDIA);水,GB/T 6682 规定的一级水;磁性石墨烯,实验室制备;硫酸铜,优级纯(天津市北联精细化学品开发有限公司);1-(2-吡咯偶氮)-2-萘酚(PAN),分析纯(北京化学试剂有限公司);C₁₈粉(天津艾杰尔)。

1.1.3 仪器 液相色谱仪,Thermo UltiMate3000,静电场轨道阱质谱仪(Thermo EXACTIVE);分析天平,感量 0.1 mg 和 0.01 g 各 1 台;离心机,5810 型(Eppendorf 公司);均质器(T25 型,IKA 公司);振荡器(MMV-1000W,ETELA 公司);氮吹仪(N-EVAP);涡流混匀器(IKA MS basic)。

1.1.4 标准溶液配制 磺胺嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺-5-(对)甲氧嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺甲氧哒嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺-6-(间)甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺甲基异噻唑、磺胺喹噁啉:用乙腈溶解,按纯度标示折算配制成 100 μg/mL 的标准储备液。

1.2 试验方法

1.2.1 样品提取 准确称取 2.00(±0.02)g 待测样品置于 100 mL 离心管中,加入 5 g 无水硫酸钠,2 g 氯化钠,10 mL 0.1% 甲酸/乙腈,均质 2 min,10 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入另一干净离心试管中,重复提取残渣 1 次,取上清液合并,加入 10 mL 正己烷,振荡 5 min 后静置,去掉上层正己烷层。将提取液旋转蒸发至干,加入 3 mL 乙腈/水溶解,待净化。

1.2.2 样品净化 准确称取 20 mg 磁性石墨烯于 10 mL 离心管中,分别加入 2 mL 丙酮、甲醇和去离子水,依次清洗磁性石墨烯。取 5 mL 上清液入离心管中,涡混 10 min,静止萃取 5 min。用磁铁将磁性石墨烯聚集到离心管底部,弃去上清液,将磁性石墨烯转移至另 1 个干净的离心试管中,加入 1 mL 乙腈-氨水(体积比为 95:5),涡旋 2 min 洗脱,重复洗脱 4 次,合并洗脱液,氮气吹干,流动相定容至 1 mL,过 0.22 μm 滤膜,进行质谱测定分析。

1.2.3 液相色谱条件 色谱柱:Waters UPLC BEH C₁₈(2.1×100 mm,1.7 μm);柱温:40 ℃,流速:0.3 mL/min,进样量:20 μL;流动相:A:0.1% 甲酸水,B:甲醇,梯度洗脱程序:0→2.0 min,由 5% B→20% B;2.0→6 min,由 20% B→80% B;6.2 min,5% B,平衡 3 min。

1.2.4 质谱条件 全扫描正离子模式(质量范围 100~1 500);分辨率:50 000;自动增益控制(AGC)目标值:10^{e6};加热点喷雾离子源条件:喷雾电压:2 200 V,离子传输管温度:280 ℃,鞘气气压:32 au,气化室温度:200 ℃。13 种化合物的质谱参数详见表 1。

表 1 13 种化合物的质谱参数

化合物名称	CAS 号	分子式	质荷比理论值 (<i>m/z</i>)	出峰时间 (min)
磺胺嘧啶	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	251.059 7	4.24
磺胺噻唑	72-14-0	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S	256.020 9	4.33
磺胺吡啶	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	250.064 5	4.49
磺胺甲基嘧啶	127-79-7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	265.075 4	4.64
磺胺二甲基嘧啶	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	279.091 0	4.93
磺胺-5-(对)甲氧嘧啶	651-06-9	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	281.070 3	4.82
磺胺甲噻二唑	144-82-1	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	271.031 8	4.83
磺胺甲氧哒嗪	80-35-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.070 3	4.97
磺胺氯哒嗪	80-32-0	C ₁₀ H ₉ CLN ₄ O ₂ S	285.020 8	5.14
磺胺-6-(间)甲氧嘧啶	1220-83-3	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S	281.070 3	5.24
磺胺邻二甲氧嘧啶	2447-57-6	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₃ S	311.080 9	5.67
磺胺甲基异噻唑	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	254.059 4	5.11
磺胺喹噁啉	59-40-5	C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S	301.075 4	5.78

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择 本研究检测的 13 种磺胺类药物中磺胺-5-(对)甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺-6-(间)甲氧嘧啶分子量相同,因此,不同目标物的分离要考虑化合物性质,在提高分离速度和灵敏度的同时,达到最佳的目标物分离效果。通过比较 Waters UPLC BEH C₁₈(粒径 1.7 μm)和 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(粒径 1.8 μm),以及柱长分别为 2.1×100 mm、3.0×100 mm 的 2 种不同规格的色谱柱,在

分离效率和目标物响应值方面,柱长为 2.1×100 mm Waters UPLC BEH C₁₈更好一些。

2.1.2 流动相的选择 磺胺类药物在正离子模式下响应值较高,通过在水溶液中加入酸性溶液的方式测试其响应值。分别比较了甲醇/0.1% 甲酸水溶液、乙腈/0.1% 甲酸水、乙腈/10 mmol/L 乙酸铵、甲醇/10 mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相,在电喷雾源 ESI+ 方式下,在甲醇/0.1% 甲酸水溶液组成的流动相中,质谱的离子化效率较其他流动相条件响应值高,峰形好,因此本研究选择甲醇/0.1% 甲酸水作为流动相。

通过改变甲醇/0.1% 甲酸水不同的起始比例,经多次进

样分离,结果表明,在采用梯度洗脱的条件下,起始流动相甲醇比例在 5% 时,磺胺-5-(对)甲氧嘧啶、磺胺甲氧嘧啶、磺胺-6-(间)甲氧嘧啶能够得到较好地分离。在本研究的色谱条件下,13 种化合物的出峰情况见图 1。

2.2 前处理条件的优化与比较

2.2.1 提取试剂的选择 磺胺类药物其结构中均含有多个胺基团,在酸性条件下容易形成正离子,因此,在提取试剂中加入酸性溶液,可以提高提取效率和离子化效果^[11]。在提取试剂选择方面,分别比较了 0.1% 的甲酸乙腈、0.1% 的甲酸甲醇、0.1% 的甲酸乙酸乙酯的提取效率,结果表明,0.1% 的甲酸乙腈提取效率较高,同时加入 2 g 氯化钠能够使乙腈层

和水层较好地分离,避免乳化现象出现。

2.2.2 净化吸附剂的优化 QuEChERS(分散固相萃取)方法的原理是通过吸附粉末的吸附作用而达到净化的效果,此种净化方法主要去除的是极性中小分子杂质,而液质联用残留分析中主要用到的电喷雾电离源(ESI 源)分析的就是极性化合物,因此二者相互结合,可以发挥最大的检测效率^[12-13]。利用质谱在全扫描方式下对 ODS C18 和 MSPE 净化效果进行考察,从图 2 可以看出,MSPE 方法净化完后一些中极性和分子量较大的杂质被除去,综合比较,在杂质净化方面 MSPE 要优于 C₁₈。

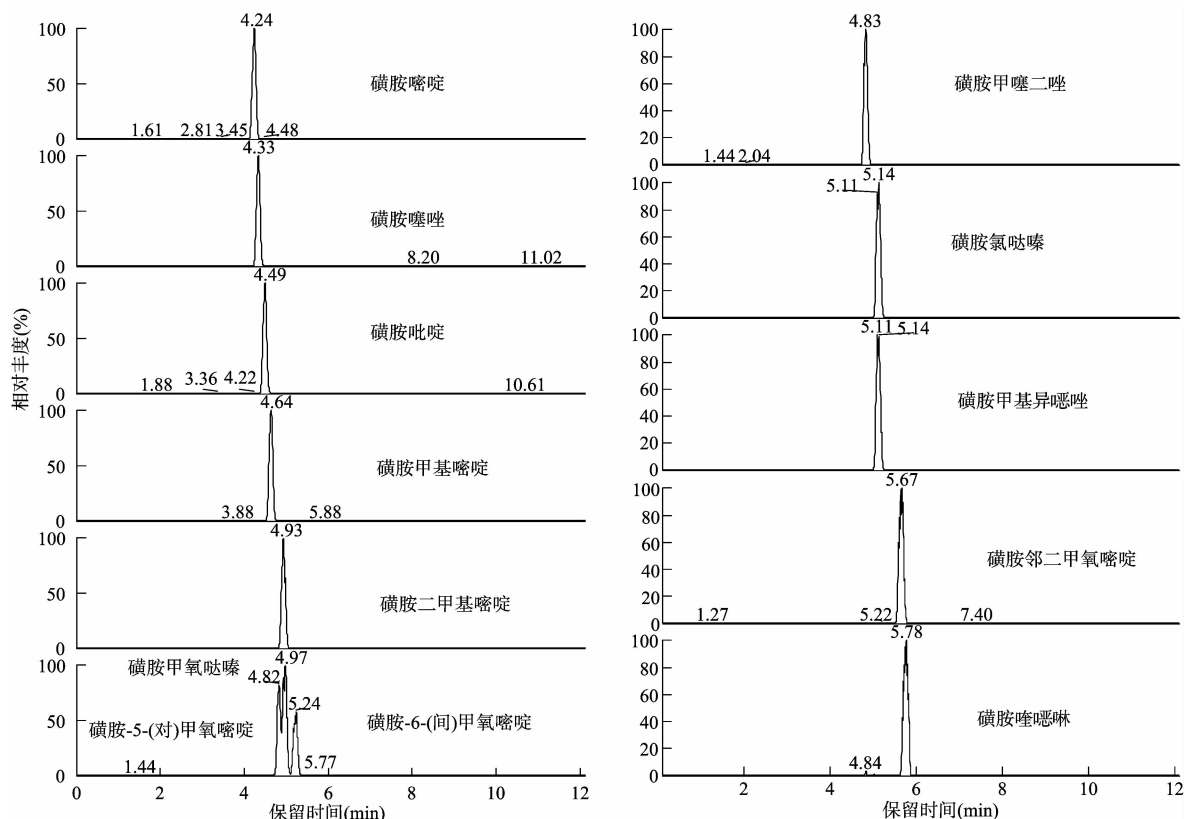


图1 磺胺类化合物的总离子流谱

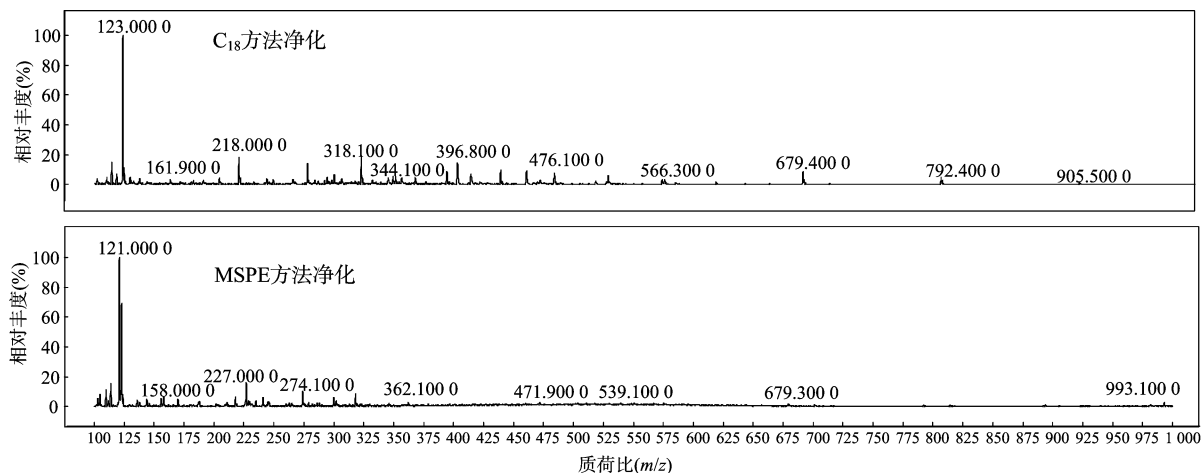


图2 C₁₈和 MSPE 净化质谱全扫描

2.3 磁性石墨烯净化方法与国标、行标的比较

在 GB/T 21316—2007 中前处理净化采用的是液液萃取方法,SN/T 3155—2012 中肉及肉制品的净化采用的是过 C₁₈ 固相萃取柱的方法^[14-15],根据 3 种前处理方法,分别添加质量浓度为 0.01 mg/kg 的标准物质在空白样品当中,磺胺类药物的平均回收率见表 2。

2.4 方法的线性、精密度、检测限和定量限

考察了试验方法及仪器条件的线性及精密度,选取不同的动物源性食品,分别添加质量浓度为 2.0、5.0、10.0 μg/kg

表 2 磺胺类药物的平均回收率

净化方法	添加浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)
GB/T 21316—2007	0.01	79.1
SN/T 3155—2012	0.01	82.7
MSPE	0.01	86.9

的标准物质,线性回归方程、相关系数、回收率、RSD 值见表 3。

表 3 磺胺类药物回归方程、相关系数、回收率和变异系数

化合物名称	回归方程	决定系数 (r ²)	添加 2.0 μg/kg 标准物质		添加 5.0 μg/kg 标准物质		添加 10.0 μg/kg 标准物质	
			回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
磺胺嘧啶	y = 0.909 5x + 0.005 6	0.999 7	84.3	8.1	82.6	7.6	81.6	7.1
磺胺噻唑	y = 0.941 9x - 0.018 6	0.998 6	80.2	81.3	79.6	9.6	10.1	9.1
磺胺吡啶	y = 0.662 8x - 0.009 2	0.999 1	81.2	8.0	81.9	80.0	8.7	7.9
磺胺甲基嘧啶	y = 1.027 1x - 0.027 5	0.994 9	90.6	93.4	91.2	6.0	6.5	6.2
磺胺二甲基嘧啶	y = 0.892 7x - 0.005 3	0.998 6	93.6	92.8	94.1	5.5	5.1	6.0
磺胺-5-(对)甲氧嘧啶	y = 1.621 1x - 0.030 4	0.999 5	89.7	91.7	88.6	4.1	4.3	5.0
磺胺甲噻二唑	y = 2.151 7x + 0.047 4	0.998 4	95.6	96.7	96.1	7.6	8.9	8.3
磺胺甲氧哒嗪	y = 0.191 9x - 0.012 6	0.992 8	77.8	78.6	79.1	8.2	9.1	9.2
磺胺氯哒嗪	y = 1.204 0x - 0.009 8	0.999 6	79.6	79.1	80.1	7.7	7.9	7.1
磺胺-6-(间)甲氧嘧啶	y = 0.808 9x - 0.009 0	0.999 0	86.4	86.1	85.6	8.9	10.6	9.6
磺胺邻二甲氧嘧啶	y = 0.696 7x - 0.014 9	0.999 1	90.3	92.7	91.2	8.0	7.2	8.1
磺胺甲基异噻唑	y = 2.301 9x + 0.059 6	0.999 9	97.6	98.1	98.4	7.6	7.1	8.0
磺胺噻唑咪	y = 0.582 9x - 0.008 8	0.999 2	92.1	8.2	91.4	7.6	92.0	6.6

3 结论

本研究采用高效液相色谱-静电场轨道阱高分辨质谱,磁性石墨烯净化技术,建立了动物源性食品中磺胺类药物残留的液相色谱-高分辨质谱分析检测方法。采用磁性石墨烯固相萃取作为净化材料,提高了样品前处理效率,降低了环境污染,为监控动物源性食品中磺胺类药物增效剂残留提供了有力的技术支持。

参考文献:

[1] 沈建忠,谢联金. 兽医药理学[M]. 北京:中国农业大学出版社,2000.

[2] 农业部. 动物性食品中兽药最高残留限量(农业部 2002 年 235 号公告)[J]. 中国猪业,2010(8):10-12.

[3] 蒋原,沈崇钰,姚义刚,等. 动物源性食品中磺胺类药物增效剂残留的高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报,2009,28(7):834-837.

[4] Liu Q, Shi J B, Zeng L X, et al. Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(2): 197-204.

[5] Hummers W, Offeman R. Preparation of graphite oxide[J]. Journal of American Chemical Society, 1958, 80(6): 1339.

[6] Luo Y B, Shi Z G, Gao Q, et al. Magnetic retrieval of graphene: extraction of sulfonamide antibiotics from environmental water samples[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(10): 1353-1358.

[7] 庞国芳. 农药兽药残留现代分析技术[M]. 北京:科学出版社,2007:366-367.

[8] Jia Q N, Zhao G C. Preparation of graphene-based solid phase microextraction fiber and its determination of polychlorinated biphenyls[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 32(5): 541-546.

[9] 李佐卿,倪梅林,俞雪钧,等. 液相色谱-串联质谱法检测水产品中磺胺类和喹诺酮类药物残留[J]. 分析测试学报,2007,26(4): 508-510,514.

[10] 杨艳伟,朱英. HPLC 法测定化妆品中 11 种磺胺类化合物[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(11):1343-1344.

[11] 宁骏驰,王丁林,虞成华,等. UPLC-MS/MS 同位素内标法测定食品中对位红、苏丹红 I~IV 的研究[J]. 质谱学报,2009,30(1):41-46.

[12] Fischer J, Kelly M T, Smyth M R, et al. Determination of ivermectin in bovine plasma by column-switching LC using on-line solid-phase extraction and trace enrichment[J]. Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis, 1993, 11(3): 217-223.

[13] McKellar Q A, Benchaoui H A. Avermectins and milbemycins[J]. Journal of Veterinary Pharmacology & Therapeutics, 1996, 19(5): 331-351.

[14] 国家质量监督检验检疫总局. 动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法:GB/T 21316—2007[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

[15] 国家质量监督检验检疫总局. 出口猪肉、虾、蜂蜜中多种药物残留量的测定:SN/T 3155—2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.