

董恒涛, 艾芸, 李月琪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留量[J]. 环境化学, 2023, 42(2): 671-674.

DONG Hengtao, AI Yun, LI Yueqi, et al. Determination of sulfonamides in water from aquaculture environment by UHPLC-MS/MS[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (2): 671-674.

## 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留量

董恒涛<sup>1</sup> 艾芸<sup>2</sup> 李月琪<sup>1</sup> 邓晓丽<sup>1</sup> 彭艺芳<sup>1</sup> 黄涛宏<sup>1</sup>

(1. 岛津企业管理(中国)有限公司, 西安, 710065; 2. 西安市食品药品检验所, 西安, 710054)

**摘要** 本文建立了一种使用超高效液相色谱和三重四极杆质谱仪联用测定水产养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留量的方法. 水体样品经过 Oasis HLB 固相萃取柱净化后, 使用 C<sub>18</sub> 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. 使用内标法定量, 磺胺脒等 21 种磺胺类抗生素在 5—50 ng·mL<sup>-1</sup> 范围内线性良好, 所得校准曲线线性相关系数在 0.995 以上. 本方法在养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留的定量限均为 0.63 ng·mL<sup>-1</sup>, 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, 水体, 磺胺类抗生素, 固相萃取法.

### Determination of sulfonamides in water from aquaculture environment by UHPLC-MS/MS

DONG Hengtao<sup>1</sup> AI Yun<sup>2</sup> LI Yueqi<sup>1</sup> DENG Xiaoli<sup>1</sup> PENG Yifang<sup>1</sup>  
HUANG Taohong<sup>1</sup>

(1. Shimadzu (China) Co., Ltd., Xi'an, 710065, China; 2. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, 710054, China)

**Abstract** To establish a quick and sensitive analytical method for the determination of 21 sulfonamides in water samples from aquaculture environment by ultra high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). The water samples were extracted and cleaned by Solid Phase Extraction through Oasis HLB columns, and then Velox SP-C<sub>18</sub> column was used for separation. The target compounds were determined by multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by internal standard method. It was shown that the analysis of one sample needed only 12.5 minutes. The calibration curve of 21 sulfonamides residues were constructed with correlation coefficients (*r*) more than 0.995, respectively. Good reproducibility on both retention time and peak area were observed. The quantitation limit of 21 sulfonamides were all 0.63 ng·mL<sup>-1</sup> in this method. The method could be used for fast and accurate quantitative determination of 21 sulfonamides residues in water.

**Keywords** tandem mass spectrometry, water, sulfonamides, solid phase extraction.

磺胺类抗生素(sulfonamides, SAs)是一类具有对氨基苯磺酰胺结构的抗菌药物,因其抗菌谱广、使用方便、价格低廉,在饲料添加剂或渔药中被经常使用.水产养殖中,无论将药物混合在饲料中,还是直接池塘泼洒,药物都会溶于水,而水体中残留的药物容易污染周围的河流、湖泊等自然水域<sup>[1-2]</sup>.水环境中抗菌药物较高浓度的残留,可能会诱导细菌耐药性,对人体产生健康风险<sup>[3]</sup>.

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>[4-5]</sup>、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)<sup>[6-8]</sup>、酶联免疫分析法(ELISA)<sup>[9]</sup>等.我国农业农村部发布了SC/T 9436-2020《水产养殖环境(水体、底泥)中磺胺类药物的测定》,该标准提出对水产养殖环境中磺胺类药物使用液相色谱-串联质谱法进行测定<sup>[10]</sup>.由于水体中抗生素的浓度

较低,且存在大量的干扰物,因此在上机分析前需要对目标物进行分离和富集.超高效液相色谱-串联质谱法因其检测灵敏度高、结果选择性好的特点,已广泛应用于复杂基质中痕量物质的检测.本文使用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术,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,供相关检测人员参考使用.

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

LC-30A 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); LCMS-8045 三重四极杆质谱仪,配置有加热型电喷雾离子源(HESI)及 LabSolutions Ver.5.96 色谱数据处理系统(日本岛津公司);超纯水仪,Milli Q 型(美国 Millipore 公司); Oasis HLB 固相萃取小柱,500 mg,6 mL(美国 Waters 公司).

甲醇:色谱纯,德国 Merck 公司产品;甲酸:色谱纯,上海安谱实验科技有限公司 CNW 产品;乙酸:色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司产品;磺胺类药物标准物质(磺胺脒、磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑、磺胺吡啶、磺胺甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺二甲唑、磺胺甲噻二唑、磺胺索嘧啶、甲氧苄啶、磺胺甲氧嗪、磺胺氯哒嗪、磺胺甲噁唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺多辛、磺胺异噁唑、磺胺苯吡唑、磺胺地索辛、磺胺喹噁啉和磺胺邻二甲氧嘧啶-D3):德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品.

### 1.2 标准品溶液的配制

称取适量磺胺类抗生素的标准品,用甲醇稀释并定容,配制成  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  标准储备溶液,将该储备液于  $-20^\circ\text{C}$  以下冷藏密封避光保存.

准确移取适量磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 储备溶液于容量瓶中,甲醇稀释并定容,配制成  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 内标标准工作液.准确移取适量各种磺胺类抗生素储备溶液于容量瓶中,用甲醇稀释并定容,配制成  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  混合标准中间溶液.再移取混合标准中间溶液适量,使用初始流动相进行稀释,配制成浓度分别为 5、10、20、30、40、50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  标准系列工作液,其中磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 内标浓度均为  $5 \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

### 1.3 水样前处理方法

准确量取 200 mL(精确至 0.1 mL)水样于 250 mL 广口玻璃瓶中,准确加入适量磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 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 Oasis HLB 固相萃取柱,水体样品以  $2 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  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  $\mu\text{L}$  洗脱液,加 800  $\mu\text{L}$  初始流动相稀释 5 倍,混匀后过  $0.22 \mu\text{m}$  微孔滤膜后进行 LC-MS/MS 上机分析.

### 1.4 色谱-质谱条件

色谱条件: Shim-pack Velox SP-  $\text{C}_{18}$ (2.1 mm I.D. $\times$  100 mm L,  $1.8 \mu\text{m}$ ) 色谱柱;流动相: 乙酸水溶液(V/V, 1/81)(A)和 0.1% 甲酸-甲醇溶液(V/V)(B);梯度洗脱程序: 0 min(5% B)—1 min(5% B)—3.50 min(10% B)—13.00 min(45% B)—17.00 min(70% B)—18.00 min(70% B)—18.50 min(5% B);流速:  $0.45 \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;柱温  $30^\circ\text{C}$ ;进样量 3  $\mu\text{L}$ ;总分析时间为 22 min.

质谱条件: HESI 正离子检测,多反应监测模(MRM)测定,主要质谱参数为:离子喷雾电压 4.0 kV;雾化气:氮气  $3.0 \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;干燥气:氮气  $15 \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;加热气:空气  $10 \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;脱溶剂管温度  $250^\circ\text{C}$ ;加热模块温度  $400^\circ\text{C}$ ;接口温度  $400^\circ\text{C}$ ;碰撞气:氩气.磺胺类抗生素质谱参数见表 1.

表 1 磺胺类抗生素质谱采集参数

Table 1 Parameters for MS/MS analysis of sulfonamides

编号	化合物名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1 pre/V	CE	Q3 Pre/V
1	磺胺脒	Sulfaguanidine	215.05	92.05*	-16	-25	-36
				108.05	-16	-22	-22
2	磺胺醋酰	Sulfacetamide	215.05	92.05*	-23	-23	-17
				108.05	-16	-22	-22
3	磺胺嘧啶	Sulfadiazine	251.00	156.00*	-30	-15	-29
				92.05	-30	-25	-17
4	磺胺二甲嘧啶	Sulfamethazine	279.00	186.00*	-30	-17	-20
				92.05	-30	-31	-17
5	磺胺噻唑	Sulfathiazole	256.00	156.00*	-30	-14	-30
				92.05	-30	-28	-17
6	磺胺吡啶	Sulfapyridine	250.00	92.05*	-30	-27	-17
				156.00	-30	-16	-29
7	磺胺甲基嘧啶	Sulfamerazine	265.00	156.00*	-30	-17	-28
				92.10	-30	-28	-17

续表 1

编号	化合物名称	英文名称	前体离子	产物离子	Q1 pre/V	CE	Q3 Pre/V
8	磺胺对甲氧嘧啶	Sulfameter	281.10	156.10*	-30	-17	-29
				108.10	-30	-26	-21
9	磺胺二甲唑	Sulfamoxole	268.10	156.10*	-30	-15	-29
				92.10	-30	-28	-17
10	磺胺甲噻二唑	Sulfamethizole	271.00	156.00*	-23	-14	-16
				108.00	-22	-23	-19
11	磺胺索嘧啶	Sulfisomidine	279.00	156.00*	-27	-19	-16
				186.00	-30	-17	-19
12	甲氧苄啶	Trimethoprim	291.10	230.15*	-14	-23	-26
				123.10	-14	-24	-24
13	磺胺甲氧吡嗪	Sulfamethoxy-pyridazine	281.00	156.00*	-30	-17	-30
				92.05	-30	-30	-17
14	磺胺氯吡嗪	Sulfaclorazina	285.00	156.00*	-30	-14	-29
				92.05	-30	-29	-17
15	磺胺甲噁唑	Sulfamethoxazole	254.00	156.00*	-30	-16	-29
				92.00	-30	-28	-17
16	磺胺间甲氧嘧啶	Sulfamonomethoxine	281.00	156.00*	-12	-18	-16
				108.00	-23	-18	-22
17	磺胺多辛	Sulfadoxine	311.00	156.00*	-28	-26	-16
				108.00	-30	-30	-19
18	磺胺异噁唑	Sulfisoxazole	268.10	156.00*	-20	-13	-18
				113.10	-20	-15	-24
19	磺胺苯吡唑	Sulfaphenazole	315.10	158.10*	-30	-28	-30
				92.05	-30	-21	-30
20	磺胺地索辛	Sulfadimethoxine	311.00	156.05*	-23	-22	-29
				92.05	-23	-35	-17
21	磺胺喹噁啉	Sulfaquinoxaline	301.00	155.95*	-23	-17	-29
				92.05	-23	-30	-17
22	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

## 2 结果与讨论(Results and discussion)

### 2.1 质谱条件优化

磺胺类抗生素都是以对位氨基苯磺酰胺为基本结构的衍生物,在质谱电喷雾电离(ESI)正离子模式下易形成  $[M+H]^+$  加合离子.采用流动注射分析法,分别对 21 种磺胺类抗生素和磺胺邻二甲氧嘧啶-D3 的单标标准溶液 ( $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 进行一级质谱扫描(Q1 MS),得到磺胺类抗生素的前体离子.使用 LabSolutions 软件自动方法优化功能,对碰撞能量和 Q1、Q3 预杆电压进行优化,优化后 MRM 参数参见 1.4 节.将  $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  浓度的磺胺类抗生素混合标准工作液按 1.4 节进行测定,所得 21 种磺胺类抗生素的标准样品图谱如图 1 所示.由图 1 可知,21 种磺胺类抗生素在 12.5 min 之前全部出峰,各化合物峰形良好,且同分异构体均达到了基线分离.

### 2.2 线性范围与定量限

将 5、10、20、30、40、50  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的磺胺类抗生素标准溶液,按 1.4 节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.所得校准曲线线性关系良好,相关系数  $r$  范围在 0.995—0.999.各磺胺类抗生素校准点准确度在 87.7%—112.8%,其中,校准点准确度由  $A(\%)=C_i/C_s\times 100\%$  计算( $C_i$  表示曲线回归方程计算得到的校准点浓度值,  $C_s$  表示真实校准点浓度值).结果表明,21 种磺胺类抗生素在线性范围内线性关系良

好,校准点准确度较高.以待测化合物的定量离子对色谱峰的信噪比大于或等于 10( $S/N \geq 10$ )的溶液浓度为该磺胺类抗生素的定量限(LOQ),本方法在水产养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留的定量限均为  $0.63 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

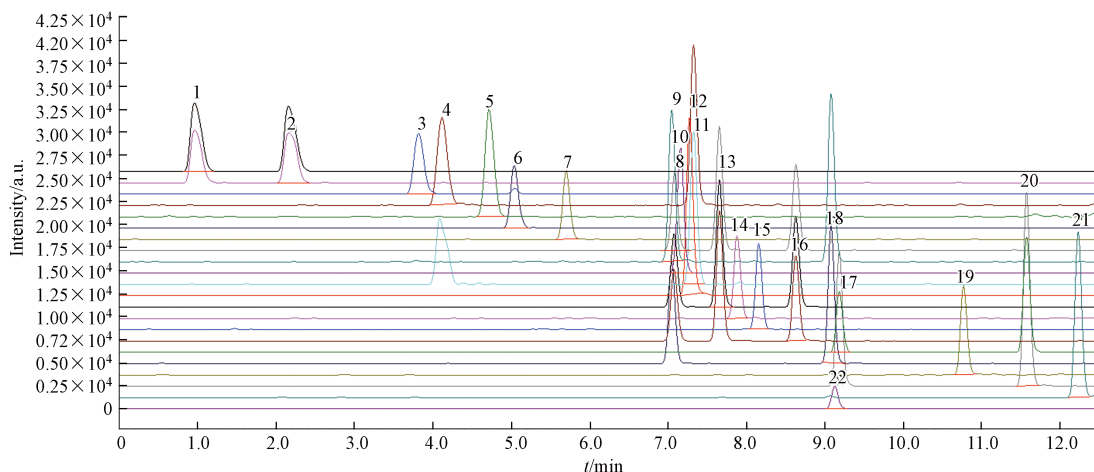


图 1 21 种磺胺类药物混合标准样品 MRM 图谱( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 编号同表 1)

Fig.1 MRM chromatograms of 21 sulfonamides( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )

### 2.3 精密度实验

取 10、20、40  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 21 种磺胺类药物标准工作液连续测定 6 次,保留时间和峰面积的重复性结果显示,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%,表明仪器精密度良好.

### 2.4 加标回收率实验

称取空白水体样品,加入少量磺胺脒等 21 种磺胺类抗生素混合标准品储备溶液,使水样中添加浓度为分别为 1、2、5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,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 种磺胺类抗生素的添加回收率,各化合物的平均加标回收率结果在 70.0%—110.0% 之间.

## 3 结论(Conclusion)

本文建立了使用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 种磺胺类抗生素残留量的方法.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抗生素.结果表明,使用内标法定量,磺胺脒等 21 种磺胺类抗生素在 5—50  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  浓度范围内线性良好,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,分析速度快,可用于养殖水体中 21 种磺胺类抗生素残留量的测定和筛查.本方法为准确评估磺胺类抗生素在环境水中残留状况提供了可靠手段.

### 参考文献 (References)

- [1] LI L, LIU D, ZHANG Q, et al. Occurrence and ecological risk assessment of selected antibiotics in the freshwater lakes along the middle and lower reaches of Yangtze River Basin [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 249: 1-8.
- [2] LI W H, GAO L H, SHI Y L, et al. Occurrence, distribution and risks of antibiotics in urban surface water in Beijing, China [J]. *Environmental Science*, 2015, 17(9): 1611-1619.
- [3] 唐娜, 张圣虎, 陈政宏, 等. 长江南京段表层水体中 12 种磺胺类抗生素的污染水平及风险评价 [J]. *环境化学*, 2018, 37(3): 505-512T.
- [4] 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.
- [5] 李柳毅, 范辉, 范磊, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定地表水中 4 种磺胺类抗生素 [J]. *化学分析计量*, 2017, 26(6): 38-40.
- [6] XU Y, DING J, CHEN H Y, et al. Fast determination of sulfonamides from egg samples using magnetic multiwalled carbon nanotubes as adsorbents followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2013, 140: 83-90.
- [7] CUI H Y, CHANG H, ZHENG H J, et al. Determination and occurrence of sulfonamide transformation products in surface waters [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 799: 146562.
- [8] CHEN Y P, XIA S D, HAN X Q, et al. Simultaneous determination of malachite green, chloramphenicols, sulfonamides, and fluoroquinolones residues in fish by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020: 3725618.
- [9] 陈曼娜. 磺胺类药物的多残留酶联免疫法检测 [J]. *质量安全与检验检测*, 2020, 30(4): 46-47.
- [10] 中华人民共和国农业农村部. SC/T 9436-2020 水产养殖环境(水体、底泥)中磺胺类药物的测定[S]. 北京: 中国农业出版社, 2020.