

鸡蛋中磺胺类残留物提取方法

钟子清¹, 黄卓焕², 赖卫华^{1,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047;

2.江西省农产品质量安全检测中心, 江西 南昌 330077)

摘 要: 为获得鸡蛋中磺胺类药物残留检测的提取方法, 分别在鸡蛋中添加高、中、低浓度的磺胺类药物, 根据 GB/T 20759—2006《畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定: 液相色谱-串联质谱法》的方法以及自行设计方法对样品进行前处理, 用液相色谱-串联质谱检测。结果表明: 添加量在 10~200 ng/g 范围内, 鸡蛋中回收率为 20.8%~69.29%, 回收率未能达到标准; GB/T 20759—2006 在提取、浓缩、除脂、标准曲线绘制方面对于禽蛋类食品不适用, 需根据禽蛋类的特殊性制定专门的检测标准, 而自行设计方法所得回收率为 77.92%~95.26%, 可以满足检测的要求。

关键词: 磺胺类药物; 鸡蛋; 前处理

A Comparative Study on LC-MS/MS Determination of Sulfonamide Residues in Hen's Eggs Based on Different Sample Pretreatments

ZHONG Zi-qing¹, HUANG Zhuo-huan², LAI Wei-hua^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;

2. Jiangxi Agricultural Product Quality Safety and Inspection Center, Nanchang 330077, China)

Abstract: Two different sample pretreatment methods, namely the national standard method GB/T 20759—2006 and a method developed in our laboratory were compared for their application in LC-MS/MS determination of sulfonamide residues in hen's eggs. The average recoveries of the national standard method across the spike levels of 10, 100 ng/g and 200 ng/g ranged from 20.8% — 67.7%, which could not meet the requirements. Moreover, the method was not suitable for use in the extraction, concentration, defatting, and standard curve preparation of egg foods. Therefore, the determination of sulfonamide residues in eggs requires a new specialized method due to their special characteristics. The average recoveries of the self-developed method were between 77.92% and 95.26% and could meet the requirements for the determination of sulfonamide residues.

Key words: sulfonamide; hen's egg; sample pretreatment

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)06-0154-05

磺胺类药物是兽药的一种, 广泛地用于畜牧业, 以预防疾病和提高饲料的利用率, 而相应产品中(如畜禽肉与相关产品、牛奶和奶制品等)残留的抗生素类药物将损害人类的健康, 如磺胺二甲嘧啶, 有研究^[1]表明是一种可能的致癌物。世界各国均有关于磺胺类残留的最高限量标准(maximum residue limits, MRLs), 美国及欧盟等国家规定动物性食品中磺胺总量的 MRL 为 0.1mg/kg^[1]。中国农业部也对无公害食品行动计划和动物源性食品药物残留监控计划作了有关部署, 即从 2005 年起, 农业部将把畜产品中磺胺类药物的残留情况作为继盐酸克伦特罗(瘦肉精)之后的又一个重点予以监控。加强残留的检测及监控, 建立有效的磺胺残留检测方法势在必

行, 也是控制兽药残留发生的重要措施之一^[2]。

本实验选择以鸡蛋为例, 研究鸡蛋中磺胺类药物残留提取方法。目前无公害禽蛋中磺胺类药物残留检测方法是参照畜禽肉中十六种磺胺残留的检测方法(液相色谱-串联质谱法)^[3-4], 且此方法已经实行 3 年多; 但由于禽蛋与肉制品物质组成化学成分、基质的脂溶性及干扰物质等不同, 磺胺药物在两者间的残留机制肯定存在较大差异, 而且 Kan 等^[5]调查研究表明磺胺类药物在鸡蛋的蛋黄和蛋白的残留机制和分布差异较大, 所以单纯参照畜禽肉类的方法造成检测的不准确, 导致大量假阴性结果的出现。同时值得注意的是, 产蛋期是禁用磺胺类药物的, 且禽蛋中磺胺类药物检测应更为严

收稿日期: 2011-02-28

作者简介: 钟子清(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量安全。E-mail: crystal1439@163.com

* 通信作者: 赖卫华(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品质量安全。E-mail: talktolaiwh@163.com

格, 所以制定专门的禽蛋中磺胺类药物检测标准是非常必要和急迫的。

本实验根据农业部对无公害鲜禽蛋的规定, 按 GB/T 20759—2006《畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定: 液相色谱-串联质谱法》进行样品添加回收率测定的实验, 并建立一种新的可以满足检测的要求的样品前处理方法。

1 材料与方法

1.1 试剂

磺胺类药物标准品[磺胺醋酰、磺胺二甲异噁唑、磺胺嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺噻唑、磺胺-6-甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺吡啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲氧哒嗪、磺胺二甲嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶](纯度 $\geq 99\%$); 乙腈(色谱纯); 磷酸二氢钾、异丙醇、正己烷、氢氧化钠、乙酸铵、甲醇均为分析纯。

提取液: 6.8g 磷酸二氢钾加水溶解至 500mL, 用 5.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.0; 流动相: 乙腈-0.01mol/L 乙酸铵溶液(12:88, V/V)。

1.2 仪器与设备

1200/G6410A 液质联用仪(配有电喷雾离子源) 美国 Agilent 公司; 均质机 上海弗鲁克液体机械制造有限公司; 旋转蒸发器; 液体混匀机 上海精科实业有限公司; BSZ 柱(规格: 1500mg/6mL) 江西省农产品质量安全检测中心; 分析天平(感量 0.1mg 和 0.01g); 移液枪(20~200 μ L); 鸡心瓶(100mL); 样品瓶(2mL, 带聚四氟乙烯旋盖)。

1.3 色谱检测条件

1.3.1 液相色谱检测

色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C₁₈(150mm \times 2.1mm, 3.0 μ m); 流动相: 0min 时为乙腈-0.01mol/L 乙酸铵溶液(12:88, V/V), 梯度洗脱到 15min 时为乙腈-0.01mol/L 乙酸铵溶液(45:55, V/V), 之后流动相又回到 0min 的比例; 流速: 0.3mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

1.3.2 质谱条件检测

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测; 电喷雾电压: 3500V; 雾化气压力: 35psi; 干燥气流速: 10L/min; 离子源温度: 350 $^{\circ}$ C。13 种磺胺的检测离子对、裂解电压和碰撞能量见表 1。

表 1 13 种磺胺的监测离子对、裂解电压和碰撞能量
Table 1 Monitoring ion pairs, fragmentation voltage and collision energy for 13 sulfonamides

磺胺名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	裂解电压/V	碰撞能量/V
磺胺醋酰	215/156	215/156	110	12
	215/108			12
磺胺二甲异噁唑	268/156	268/156	110	12
	268/113			12
磺胺嘧啶	251/156	254/156	110	12
	215/185			12
磺胺甲基异噁唑	254/156	254/156	110	12
	254/147			12
磺胺噻唑	256/156	256/156	110	12
	256/107			12
磺胺-6-甲氧嘧啶	281/156	281/156	110	12
	281/215			12
磺胺甲基嘧啶	265/156	265/156	110	12
	265/172			12
磺胺邻二甲氧嘧啶	311/156	311/156	110	12
	311/108			12
磺胺吡啶	250/156	250/156	110	12
	250/184			12
磺胺对甲氧嘧啶	281/156	281/156	110	12
	281/215			12
磺胺甲氧哒嗪	281/156	281/156	110	12
	271/215			12
磺胺二甲嘧啶	279/156	279/156	110	12
	279/204			12
磺胺间二甲氧嘧啶	311/156	311/156	110	12
	311/218			12

1.4 GB/T 20759—2006 的提取方法

1.4.1 标准曲线的绘制

准确称取各磺胺对照品于容量瓶中, 以甲醇定容作为标准贮备液, 吸取各标准贮备液, 以空白基质的流相稀释至质量浓度为 10、50、100、200、500、1000ng/mL 的标准系列, 进样分析, 据峰面积与相应质量浓度进行线性回归, 绘制校准曲线。

1.4.2 称样加标

称取 5g 鸡蛋样品, 精确至 0.01g, 各 10 份, 置于 50mL 离心管中。每个添加浓度设 A、B、C 三个平行, 每种样品设 1 个空白对照。添加量分别为 10、100、200ng/g。

1.4.3 样品前处理

加标后样品放置 30min。每个离心管加入 20g 无水硫酸钠和 20mL 乙腈, 均质 2min, 以 3000r/min 离心 3min。上清液倒入 100mL 鸡心瓶中, 残渣再加入 20mL 乙腈, 重复上述操作 1 次。合并提取液, 向鸡心瓶中再加入

10mL 异丙醇, 用旋转蒸发器于 50℃ 水浴蒸干, 准确加入 1mL 流动相和 1mL 正己烷溶解残渣。转移至 5mL 离心管中, 涡旋 1min, 3000r/min 离心 3min, 弃去上层正己烷相, 再加入 1mL 正己烷, 重复上述步骤。取下层清液, 过 0.2 μm 滤膜后, 用液相色谱 - 串联质谱仪测定。

1.5 自行设计的提取方法

1.5.1 标准曲线的绘制

称取 5g 同批次的鸡蛋样品 6 份, 精确至 0.01g, 将稀释了的混合标准样品添加到样品中, 使样品中添加的梯度为 10、50、100、200、500、1000ng/g 的标准系列, 进行进样分析, 据峰面积与相应质量浓度进行线性回归, 绘制校准曲线。

1.5.2 称样加标

称取 5g 鸡蛋样品 7 份, 精确至 0.01g, 置于 50mL 离心管中。添加水平为 200ng/g, 并设一空白对照。

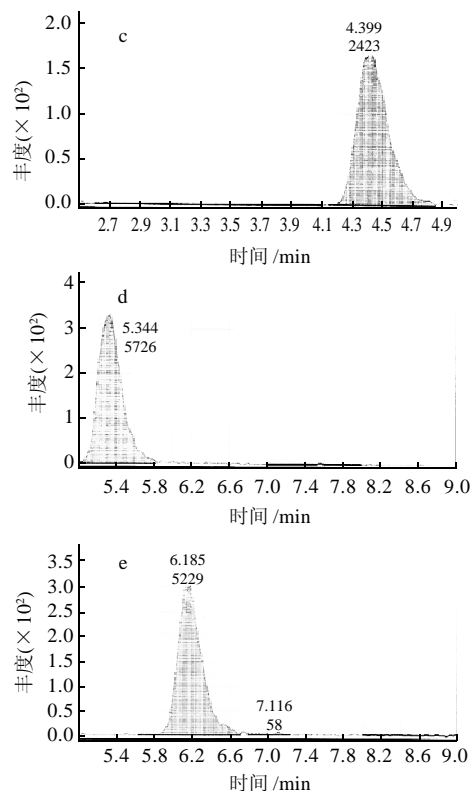
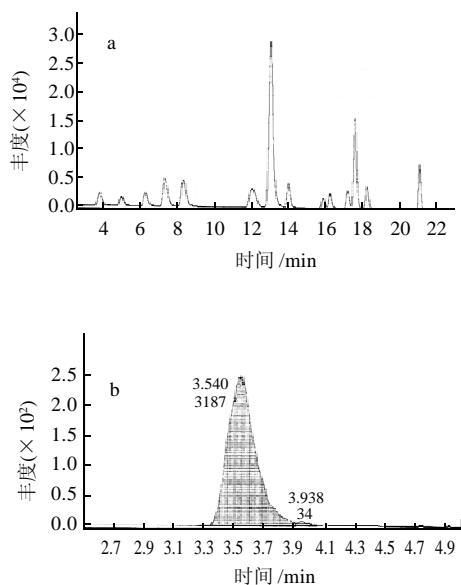
1.5.3 样品前处理

加标后样品放置 30min。加入提取液 20mL, 匀浆 40s, 8000r/min 离心 10min, 取上清液, 残渣加 20mL 提取液二次提取, 匀浆 40s, 8000r/min 离心 10min, 合并两次上清液。用甲醇 10mL、水 10mL 活化 BSZ 柱备用, 上清液过柱净化。上完样后用 5mL 水去杂, 抽干, 13mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液, 氮吹至干; 加 1mL 流动相定容, 涡旋混匀, 过 0.2 μm 滤膜后, 用液相色谱 - 串联质谱仪测定。

2 结果与分析

2.1 GB/T 20759—2006 方法色谱图及回收率

混合标准样品及单一标准品色谱图见图 1。



a. 混合标准样品(10ng/mL); b~e. 依次为磺胺醋酰、磺胺嘧啶、磺胺吡啶、磺胺甲基嘧啶标准样品。

图 1 混合标准样品及单一标准品色谱图

Fig.1 Chromatograms of individual sulfonamide standards and their mixture

在 10~1000ng/mL 范围内, 各质量浓度的 13 种磺胺类药物混合标样在选定的色谱条件下检测, 得到的色谱峰面积与药物的质量浓度呈线性关系, 其中 Y 代表峰面积、 X 代表药物的工作液质量浓度(mg/mL), 其回归方程和相关系数见表 2, 其线性响应范围完全满足测定的要求, 证明该方法定量测定的可靠性。由表可知 13 种磺胺类药物的标准曲线相关系数在 0.99 以上, 重复性较好。

表 2 13 种磺胺类药物的标准曲线及相关系数

Table 2 Linear ranges, regression equations and correlation coefficients for 13 sulfonamides

药物名称	含量/(ng/mL)	标准曲线	相关系数
磺胺醋酰	10~1000	$Y = 238.31X + 5347.61$	0.991
磺胺嘧啶	10~1000	$Y = 238.20X - 141.06$	0.998
磺胺吡啶	10~1000	$Y = 471.35X + 2482.12$	0.997
磺胺甲基嘧啶	10~1000	$Y = 448.44X + 744.21$	0.998
磺胺噻唑	10~1000	$Y = 560.12X + 65.10$	0.998
磺胺对甲氧嘧啶	10~1000	$Y = 601.97X + 2170.56$	0.997
磺胺二甲嘧啶	10~1000	$Y = 296.14X + 1130.12$	0.998
磺胺甲氧嘧啶	10~1000	$Y = 250.10X - 547.75$	0.999
磺胺-6-甲氧嘧啶	10~1000	$Y = 249.09X - 523.73$	0.999
磺胺二甲异噻唑	10~1000	$Y = 325.17X + 325.46$	0.998
磺胺甲基异噻唑	10~1000	$Y = 301.26X + 2825.13$	0.995
磺胺邻二甲氧嘧啶	10~1000	$Y = 1278.64X + 22334.57$	0.993
磺胺间二甲氧嘧啶	10~1000	$Y = 543.86X + 430.75$	0.998

表3 13种磺胺添加量及其平均回收率实验结果($n=3$)Table 3 Average spike recoveries the national standard method for 13 sulfonamides ($n=3$)

药物名称	添加量 / (ng/g)	平均回收率 / %	药物名称	添加量 / (ng/g)	平均回收率 / %
磺胺醋酰	10	39.51	磺胺甲氧哒嗪	10	48.55
	100	44.51		100	47.85
	200	47.32		200	42.83
磺胺嘧啶	10	60.17	磺胺-6-甲氧嘧啶	10	47.34
	100	61.76		100	47.86
	200	64.97		200	42.99
磺胺吡啶	10	56.80	磺胺二甲异噁唑	10	28.50
	100	67.65		100	22.21
	200	64.62		200	30.50
磺胺甲基嘧啶	10	62.27	磺胺甲基异噁唑	10	20.84
	100	69.29		100	39.88
	200	65.81		200	34.26
磺胺噻唑	10	56.20	磺胺邻二甲氧嘧啶	10	24.39
	100	55.57		100	59.22
	200	55.23		200	51.94
磺胺对甲氧嘧啶	10	50.31	磺胺间二甲氧嘧啶	10	23.35
	100	59.16		100	25.70
	200	56.68		200	20.80
磺胺二甲嘧啶	10	59.19			
	100	68.85			
	200	61.68			

由表3可知,本方法在添加量为10~200ng/g范围内,鸡蛋中回收率为20.8%~69.29%,相对标准偏差为2.33%~14.34%($n=3$),实验操作时,严格按照国标的方法进行,添加回收实验回收率不能达到标准要求。造成这个现象的主要原因是样品基质效应的影响^[6-7]。LC-MS/MS分析时的基质效应客观存在,并随生物样品的不同而不同。基质效应的消除方法有样品纯化前处理,空白基质配标准溶液校准方法,同位素内标法。可使用基质匹配标准溶液校准方法消除,用空白基质加标做标准曲线校正,回收率基本可达到要求。

样品中磺胺二甲异噁唑、磺胺甲基异噁唑、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶等磺胺类药物这4种磺胺类药物回收率明显低于磺胺醋酰等其他9种磺胺类药物的回收率。由于前者脂溶性高,会有一定量溶于正己烷。又因为卵磷脂的乳化作用,从而造成添加量的损失导致回收率降低,而后者极性较强,受卵磷脂及正己烷影响不如磺胺二甲异噁唑等大,所以回收率较高。由于鸡蛋的特殊性,使用此方法检测会造成比较大的偏差。

2.2 前处理过程中鸡蛋的特殊性

2.2.1 提取

样品提取时加入了乙腈和无水硫酸钠,在匀浆时样品与无水硫酸钠包裹在一起形成团块,较难混匀,可

能会对提取效率有一定影响,所以加入无水硫酸钠后要立即匀浆,则比较容易混匀。

2.2.2 浓缩

本方法使用乙腈作为提取试剂,要求在50℃条件下蒸干,磺胺类药物具有热不稳定性,所以温度不能设定太高。但在实际操作中还得考虑时间因素,乙腈沸点高,蒸发耗时过长,而蒸发时间过长,会使药物组分降解,回收率降低,得不偿失。所以在必要时刻在一定范围内提高旋转蒸发温度。其次在本标准中,加入鸡心瓶中蒸发的液体有50mL,需掌握好鸡心瓶的真空度,真空度太大时液体极易爆沸,提取液会溅到蒸发仪的瓶颈上,造成药物损失,从而降低回收率。

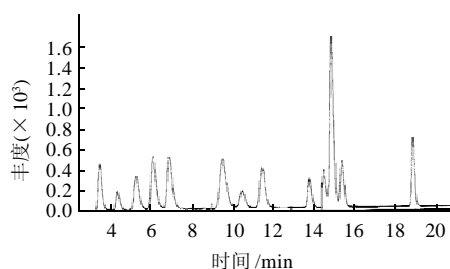
鸡蛋极易发生爆沸,可在蒸发过程及时添加一些异丙醇,减轻暴沸现象的发生;或使用鸡心瓶分次蒸干提取液,可非常有效的减轻暴沸现象,保证回收率,但操作繁琐,效率太低。

2.2.3 除脂

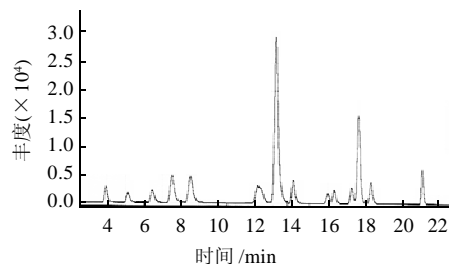
样品用乙腈提取,由于乙腈属极性溶剂,有可能提取出类脂物。因此提取液浓缩后需要去除类脂物,鸡蛋样品提取液旋转蒸干后为深黄色油状物质。本实验采用正己烷液液萃取脱脂,直接以流动相溶解残渣加正己烷萃取脱脂2次就能去除大量脂肪和大部分的色素,溶液可变得澄清,这种微量脱脂法耗试剂少且避免分液漏斗转移时分析物的损失。鸡蛋样品容易发生乳化现象,使分层不明显,可使用10000r/min离心3min,使液体澄清。

2.3 优化方法色谱图及回收率

混合加标样品、混合添加样品及单一加标样品、单一添加样品谱图举例见图2。



a. 混合标样品



b. 混合添加样品

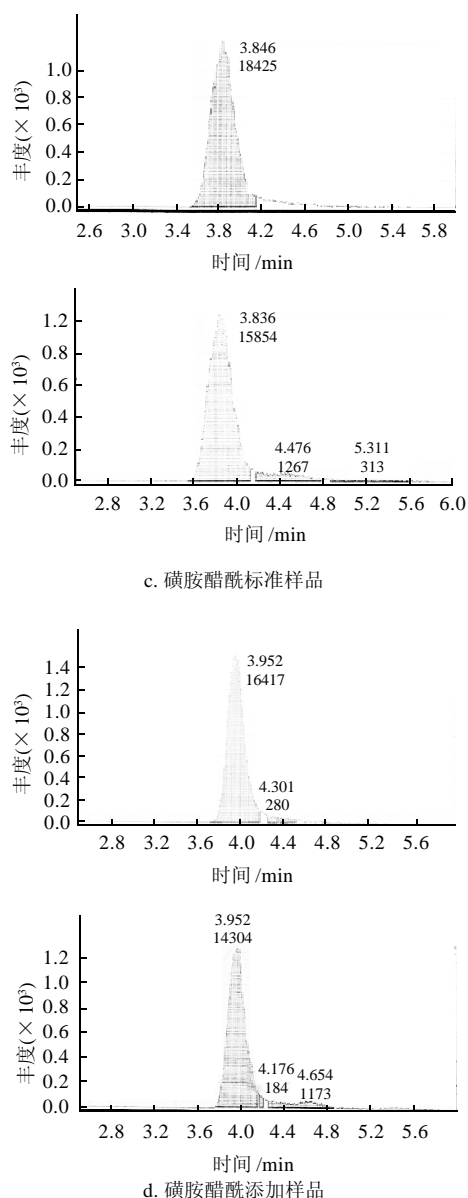


图2 混合标准样品、添加样品及磺胺酞酰标准样品、添加样品色谱图

Fig.2 Chromatograms of a mixture of sulfonamide standards, eggs spiked with the mixture, sulfacetamide standard, and eggs spiked with sulfacetamide standard

表4 13种磺胺添加浓度及其平均回收率实验结果($n=6$)

Table 4 Average spike recoveries of the self-developed method for 13 sulfonamides ($n=6$)

药物名称	添加量/(ng/mL)	平均回收率/%	药物名称	添加量/(ng/mL)	平均回收率/%
磺胺噻唑	200	90.22	磺胺甲氧嘧啶	200	90.27
磺胺嘧啶	200	93.64	磺胺-6-甲氧嘧啶	200	92.25
磺胺吡啶	200	94.98	磺胺二甲异噁唑	200	90.81
磺胺甲基嘧啶	200	91.78	磺胺甲异噁唑	200	88.71
磺胺噻唑	200	92.59	磺胺邻二甲氧嘧啶	200	94.45
磺胺对甲氧嘧啶	200	93.15	磺胺同二甲氧嘧啶	200	77.92
磺胺二甲嘧啶	200	95.26			

由表4可知,本方法所得回收率为77.92%~95.26%,相对标准偏差为2.53%~10.72%($n=6$),灵敏度高,操作相对比较便利,相应耗费有机试剂大大减少,可行性较高,可以满足检测需要。

3 讨论及结论

本研究发现GB/T 20759—2006在检测禽蛋类中磺胺类药物存在一些不足。在提取过程中使用无水硫酸钠,使得样品均质较困难,可能会影响样品的提取率。而且按照此标准标准进行前处理使用的时间过长,平均每个样品前处理所需时间在40~50min左右。因为乙腈沸点高,蒸发耗时过长,而蒸发温度不能过高容易使磺胺类药物分解造成损失;同时蒸发过程中鸡心瓶真空度不能太大,溶液易爆沸,从而损失样品。效率过低,不适合大批量样品的检测。而且鸡蛋在除脂时因为其含有卵磷脂,由于卵磷脂的助溶作用,使脂溶性较强磺胺类药物损失更严重。最主要的一点是标准未考虑到基质效应问题,并没有要求使用空白基质配标样,使用空白基质加标做标准曲线校正比只单纯的使用稀释标液做的标准曲线计算的回收率更接近真实一些。

本实验使用固相萃取前处理方法,所得回收率为77.92%~95.26%,相对标准偏差为2.53%~10.72%($n=6$),满足检测要求,灵敏度高,操作相对比较便利,色谱峰重现性好,相应耗费有机试剂大大减少,可为鸡蛋品质的监控和无公害鸡蛋的评定提供有效的提取方法。

参考文献:

- [1] 杨秀娟,张曦.磺胺二甲嘧啶残留检测方法的研究进展[J].动物食品安全,2004(11):17-18.
- [2] 赵书景,贺绍君,罗国琦,等.动物性食品中磺胺类药物残留检测方法的研究进展[J].中国畜牧兽医,2009,36(8):60-63.
- [3] GB/T 20759—2006 畜禽肉中十六种磺胺类药物残留量的测定:液相色谱-串联质谱法[S].
- [4] NY 5039—2001 无公害食品鸡蛋[S].
- [5] KAN C A, PETZ M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white[J]. J Food Agric Chem, 2000, 48(12): 6397-6403.
- [6] 向平,沈敏,卓先义.液相色谱-质谱分析中的基质效应[J].分析测试学报,2009,28(6):753-756.
- [7] 黄宝勇,欧阳喜辉,潘灿平.色谱法测定农产品中农药残留时的基质效应[J].农药学报,2005,7(4):299-305.
- [8] 庞国芳,曹彦忠,张进杰,等.液相色谱-串联质谱同时测定家禽组织中16种磺胺残留[J].分析化学,2005,33(9):1252-1256.
- [9] 邵晖,王伟,方婷,等.畜产品中的磺胺类药物残留检测方法综述[J].中国食品工业,2008(8):47-48.
- [10] 农业部.235号公告:农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量[S].2003.
- [11] 农业部.农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量(续)[J].中国兽药杂志,2003,37(3):5-11.
- [12] 鲁晓翠,侯玉泽,邓瑞广,等.磺胺类药物在动物性食品中的残留与检测[J].动物医学进展,2007,28(2):70-74.
- [13] 刘明生,甘辉群,吴敏秋,等.鸡蛋中多种磺胺类药物残留的检测方法研究[J].饲料工业,2007,28(14):50-52.
- [14] 李海燕,侯亚莉,郭平,等.鸡蛋药物残留研究进展[J].动物医学进展,2008,29(7):92-96.
- [15] AGARWAL V K. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of sulfonamides in tissue, milk and eggs[J]. J Chromatogr, 1992, 624(2): 411-423.
- [16] 罗鹏程.动物性食品磺胺类药物残留检测[J].大众科技,2009(5):180;220.