

UPLC-MS/MS 法测定 蜂蜜中磺胺类抗生素残留

张燕¹, 赵海霞², 田甜^{1,3}, 国振¹, 李秀琴¹, 张庆合¹

(1. 中国计量科学研究院, 北京 100029; 2. 山西省食品质量监督检验研究院, 山西 太原 030012;
3. 上海工程技术大学, 上海 201620)

摘要:应用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定蜂蜜中磺胺类抗生素。针对还原糖与磺胺类抗生素结合物难以提取的问题,用添加回收率法考察 0.7 mol/L 盐酸、0.3 mol/L 柠檬酸和磷酸溶液(pH2)对结合态磺胺的水解情况,以阳性蜂蜜样品中测得的磺胺类抗生素含量为参考指标,对3种前处理方法的水解效率进行验证。结果表明,0.7 mol/L 盐酸、0.3 mol/L 柠檬酸和 pH2 磷酸溶液水解提取磺胺类抗生素的回收率分别为 59.2%~72.2%、27.8%~71.7%和 0.4%~48.9%,可见提取过程存在明显损失。采用同位素稀释质谱法(IDMS)同步校正磺胺类抗生素在提取净化过程的损失及基质效应的干扰,3种提取方法的添加回收率均提高到 95.4%~104.2%。但是,采用磺胺类药物阳性蜂蜜样品对提取方法进行验证时,盐酸、柠檬酸和磷酸的 IDMS 方法测量结果分别为 10.8~22.4、5.7~16.2 和 0.1~5.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$,后2种提取方法的测量结果比第1种的分别偏低 23.1%~57.3%和 73.8%~99.6%。表明对于结合态药物残留的测定,采用添加回收率考察方法的准确性时,需要使用阳性样品进行验证。

关键词:蜂蜜;磺胺类抗生素;定量准确度;超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)

中图分类号:O657.63 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-2997(2020)05-0480-10

doi:10.7538/zpxb.2019.0069

Determination of Sulfonamide Residues in Honey Using UPLC-MS/MS

ZHANG Yan¹, ZHAO Hai-xia², TIAN Tian^{1,3}, GUO Zhen¹,
LI Xiu-qin¹, ZHANG Qing-he¹

(1. National Institute of Metrology, Beijing 100029, China;

2. Shanxi Provincial Institute for Food Supervision and Test, Taiyuan 030012, China;

3. Shanghai University of Engineering and Technology, Shanghai 201620, China)

Abstract: Honey has been used as a food and medicine for millennia. The free aromatic amino groups of sulfonamides can easily react with the main components of honey (glucose and fructose) to form monosaccharide-bound sulfonamides, which directly affect

收稿日期:2019-05-31;修回日期:2019-08-14

基金项目:国家重点研发计划(2016YFF0201106)资助

作者简介:张燕(1993—),女(汉族),江西人,硕士研究生,从事食品安全计量分析研究。E-mail: zhy18810910346@163.com

通信作者:李秀琴(1979—),女(汉族),山西人,研究员,从事食品安全计量分析研究。E-mail: lixq@nim.ac.cn

网络出版时间:2020-01-21;网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20200121.1043.016.html>

the quantitative results of sulfonamide residues in honey. This presence of bound residues should be also a matter of concern for public health since the free drugs can be liberated by acid and enzymatic hydrolysis during the digestion in stomach. Thus, the accurate determination of masked sulfonamides content in honey is essential to comply with official residue control. Acid hydrolysis is currently the most popular approach to restore the bound sulfonamides to their free forms. And spiking recovery was widely used for the optimization of hydrolysis step. However, if binding reaction couldn't occur immediately and even not occurred after standard analytes spiking into blank matrix *in vitro*, the spiked matrix could have specific distinctions with real contaminated matrix in which the binding reaction had already reached dynamic balance. In this paper, recovery in spiked honey and quantitative result in positive honey were taken as the investigation index of hydrolysis step at the same time. To improve the accuracy of quantitative results of sulfonamide residues in honey, three typical sample preparation methods containing different hydrolysis steps were compared via ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The results showed that sulfonamides could not be fully recovered from spiked honey whatever during the extraction with 0.7 mol/L HCl or 0.3 mol/L citric acid in 45 °C water bath for 1 h followed by Oasis Prime HLB cleanup or during the extraction phosphoric acid solution (pH 2) followed by Oasis MCX and Oasis HLB column double purification. The absolute recoveries were 59.2%-72.2%, 27.8%-71.7% and 0.4%-48.9%, respectively. As matrix effect could lead to lower measurements, isotope dilution mass spectrometry (IDMS) were used to simultaneously correct the loss of sulfonamides and the interference of matrix effect. The relative recoveries of three sample preparation methods were between 95.4% and 104.2%, the correction factor of IDMS is 0.95-1.03. Hydrolysis extraction with 0.7 mol/L hydrochloric acid in a water bath for 1 h followed by Oasis Prime HLB cleanup provided the best quantitative results of 5 sulfonamides in positive honey and therefore proved to be the optimal sample preparation method. But when 0.3 mol/L citric acid or phosphoric acid solution was used instead for hydrolysis, even though the relative recovery was higher than 95.4%, the quantitative results in positive honey were still significantly lower by 23.1%-57.3% and 73.8%-99.6%, respectively. It surely means the sugar bound sulfonamides cannot be completely liberated during the hydrolysis process. This implies the hydrolysis efficiency obtained by the use of spiking recovery have less validity. Thus, positive samples are essential for the verification of hydrolysis method.

Key words: honey; sulfonamides; quantitative accuracy; liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

磺胺类抗生素(sulfonamides, SAs)是一种具有对氨基苯磺酰胺结构的抗菌药物,常用于防治蜂病,降低蜜蜂死亡率,但其在蜂产品中的残留会危害人体健康^[1]。高效液相色谱-质谱联用法(HPLC-MS/MS)具有灵敏度高、选择性好、假阳性率低等优点^[2-4],是蜂蜜中磺

胺类抗生素的主要检测方法之一。磺胺类抗生素的对氨基苯磺酰胺基团易与蜂蜜中的葡萄糖和果糖发生脱水结合反应,生成磺酰胺基苯糖共轭类物质,这种糖键合磺胺的形成直接影响蜂蜜中磺胺类抗生素的测量结果^[5-6]。因此,需要通过水解释放出自由态磺胺类抗生素再进行

检测^[7],其中,磷酸、柠檬酸、甲酸和盐酸是常用的水解物质^[8-10]。目前,对水解步骤的优化大多是通过添加回收率(RE)进行考察,但不能确认添加的磺胺类抗生素是否能在短时间内与还原糖充分结合。另外,样品前处理过程要求在保证分析物提取效率的同时,最大化地去除基质中干扰物。蜂蜜中磺胺类抗生素残留检测常用的样品净化方法有液液萃取、固相萃取和 QuEChER 等^[11-13]。固相萃取法因其净化效果好,应用最广泛,其中常用的固相萃取小柱有 Oasis HLB、Oasis PRIME HLB 和 Oasis MCX 柱^[14-17]。

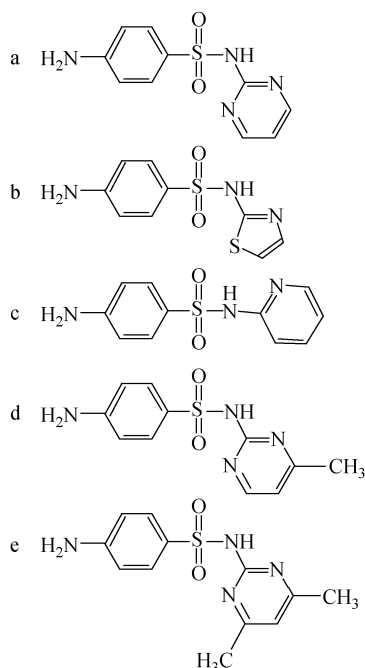
本研究拟基于液相色谱-同位素稀释质谱法(LC-ID-MS/MS),以5种典型磺胺类抗生素为代表,针对蜂蜜中与糖结合的磺胺类抗生素提取难题,比较水解、提取和净化等样品前处理和基质效应、定量校准方法等对蜂蜜中磺胺类抗生素残留测量结果的影响,系统地分析影响测量结果准确性的因素。

1 实验部分

1.1 仪器和材料

Acquity UPLC™ XEVO-TQS 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪、Oasis PRIME HLB、MCX 净化柱:美国 Waters 公司产品;ME614S 电子天平:德国 Sartorius 公司产品;CR21GIII 离心机:日本 Hitachi 公司产品;KS260 型振荡摇床:德国 IKA 公司产品;Vortex-Genie 2 型涡旋混合器:美国 Scientific Industries 公司产品;N-EVAP 111 氮吹浓缩仪:美国 Organomation Associates 公司产品;Raykol Fotector Plus 全自动固相萃取仪:美国 Reeko 公司产品;甲醇、乙腈:质谱级,美国 Fisher 公司产品;柠檬酸:分析纯,美国 Sigma Aldrich 公司产品;25% 氨水,36% 盐酸:分析纯,北京化工厂产品。

磺胺嘧啶(SDZ, GBW(E)081146)、磺胺吡啶(SPD, GBW(E)081148)、磺胺噻唑(STZ, GBW(E)100322)、磺胺甲基嘧啶(SM1, GBW(E)081147)和磺胺二甲嘧啶(SM2, GBW(E)081145)标准物质:均购自中国计量院科学研究院,结构式示于图 1。SDZ-¹³C₆, SPD-¹³C₆, STZ-¹³C₆, SM1-¹³C₆, SM2-¹³C₆ 磺胺的稳定同位素内标:纯度均大于 99%,德国 Witega 公司产品。



注:a. 磺胺嘧啶;b. 磺胺噻唑;c. 磺胺吡啶;
d. 磺胺甲基嘧啶;e. 磺胺二甲嘧啶

图 1 5种磺胺类抗生素分子结构

Fig. 1 Molecular structures of five sulfonamides

1.2 标准溶液的配制

精密称取适量的磺胺类抗生素(STDs)和¹³C₆取代的同位素内标(ISTDs),以甲醇为溶剂配制成 100.00 mg/kg 的标准储备液,避光保存于-20 °C 冰箱。将上述标准储备液以甲醇为溶剂,配制 STDs 和 ISTDs 混合中间工作液。用初始流动相甲醇作为溶剂,将上述中间工作液稀释,配制含有 STDs 和 ISTDs 的混合标准使用液,避光保存在 4 °C 冰箱中,有效期 3 个月。

1.3 样品前处理

前处理方法 1:称取 2 g 均质化的蜂蜜样品于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 0.7 mol/L 盐酸溶液,涡旋至蜂蜜完全溶解,45 °C 水浴 1 h 后,冷却至室温,用适量氨水调至 pH5.0,加入约 35 mL 水,稀释提取液,使提取液体积达到约 45 mL,过 Oasis Prime HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL),依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化,25 mL 水洗涤,6 mL 乙腈洗脱,40 °C 氮吹至近干,用 2 mL 初始流动相复溶,混匀,过 0.22 μm 聚丙烯(GHP)滤膜。

前处理方法 2(参考 GB/T18932.17—2003):称取 5 g 均质化的蜂蜜样品,置于 50 mL

离心管中,加入 45 mL 磷酸溶液(pH2),涡旋至蜂蜜完全溶解,过 Oasis MCX(500 mg, 6 mL)强阳离子交换柱。用 5 mL 甲醇、10 mL 水活化,5 mL 磷酸溶液、5 mL 水淋洗,40 mL 磷酸盐缓冲溶液(pH8)洗脱,收集洗脱液于 50 mL 离心管中。向洗脱液中加入 1.5 mL 庚烷磺酸钠溶液,用磷酸调至 pH6,过 Oasis HLB 柱(200 mg, 6 mL),用 3 mL 甲醇和 6 mL 水活化,3 mL 水淋洗,10 mL 甲醇溶液洗脱,40 °C 氮吹至近干,用 2 mL 初始流动相复溶,混匀,过 0.22 μm GHP 滤膜。

前处理方法 3:取 2 g 均质化的蜂蜜样品于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 0.3 mol/L 柠檬酸溶液,涡旋至蜂蜜完全溶解,摇振 10 min,加入适量氨水调至 pH5.0,加入约 35 mL 水稀释提取液,使提取液体积达到 45 mL,过 Oasis Prime HLB 固相萃取柱(200 mg, 6 mL),依次用 5 mL 甲醇、5 mL 水活化,25 mL 水洗涤,

6 mL 乙腈洗脱,40 °C 氮吹至近干,用 2 mL 初始流动相复溶,混匀,过 0.22 μm GHP 滤膜。

1.4 实验条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱:Waters Acquity UPLC CSHTM C18 柱(100 mm×3 mm×1.7 μm);进样体积 2 μL;色谱柱温度 38 °C;样品温度 10 °C;流速 0.3 mL/min;流动相:A 为水,B 为乙腈-甲醇溶液(1:1,V/V);梯度洗脱程序:0~1.0 min(15%B),1.0~6.0 min(15%~30%B),6.0~7.0 min(35%~100%B),7.0~9.0 min(100%B),9.0~9.1 min(100%~15%B),9.1~11.0 min(15%B)。

1.4.2 质谱条件 Waters UPLC 串联 Waters XEVO TQS 三重四极杆质谱仪;Z 型电喷雾离子源,正离子多反应监测扫描(MRM)模式;毛细管电压 3.5 kV;干燥气(氮气)温度 550 °C;流速 650 L/h;磺胺类抗生素及相应¹³C₆标记物的质谱参数列于表 1。

表 1 磺胺类抗生素及相应¹³C₆标记物的质谱参数
Table 1 MS/MS parameters of sulfonamides and ¹³C₆ labeled sulfonamides

化合物 Compounds	前体离子 Precursor ions (<i>m/z</i>)	产物离子 Product ions (<i>m/z</i>)	碰撞能 Collision energy/V	保留时间 Retention time/min
磺胺嘧啶	251.1	156.1*	12	4.0
		92.1	22	
磺胺嘧啶- ¹³ C ₆	257.0	162.0*	12	4.0
		98.1	28	
磺胺吡啶	250.1	156.0*	16	4.9
		92.0	26	
磺胺吡啶- ¹³ C ₆	256.1	162.0*	16	4.9
		98.1	26	
磺胺噻唑	256.1	156.0*	15	4.5
		92.1	26	
磺胺噻唑- ¹³ C ₆	262.1	162.0*	15	4.5
		98.2	28	
磺胺甲基嘧啶	265.0	156.0*	14	5.3
		92.1	28	
磺胺甲基嘧啶- ¹³ C ₆	271.0	162.1*	14	5.3
		98.1	26	
磺胺二甲嘧啶	279.0	186.0*	16	6.5
		92.0	30	
磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆	285.0	186.0*	16	6.5
		98.1	32	

注:*表示定量离子

1.5 基质效应的评价

A组:在空白溶剂中加入 STDs 和 ISTDs; B组:前处理后,在空白蜂蜜提取溶液中加入 STDs 和 ISTDs; C组:前处理前,在空白蜂蜜中加入 STDs 和 ISTDs; D组:前处理后,在实际蜂蜜样品中加入 ISTDs。通过4组样品系统监测评价加入 STDs 和 ISTDs 在水解、提取净化以及分离、检测过程中对测量结果的影响。

基质效应评价: $ME\% = (B/A) \times 100$, 其中 B 和 A 为同一目标分析物在两组样品中的质谱响应峰面积。ME 大于 100 或小于 100 分别表示基质增强或基质抑制, ME 越接近 100, 表明净化效果越好。同位素稀释质谱法 (IDMS) 校正因子 $\theta = ME_{STD}/ME_{ISTD}$, 其中 ME_{STD} 和 ME_{ISTD} 分别表示目标物和同位素内标的基质效应; $\theta > 1$ 表示测量结果偏高, $\theta < 1$ 表示测量结果偏低, $\theta = 1$ 表示目标物与同位素内标基质效应没有差异; IDMS 定量结果不受基质影响。

IDMS 溶液校准方法:将 A 组样品用于校准溶剂, 计算 D 组中 STDs 浓度; IDMS 基质匹配校准方法:将 B 组样品用于校准溶剂, 计算 D 组中 STDs 浓度; 溶液曲线校准法:用空白溶剂配制系列浓度的分析物, 绘制溶液校准曲线, 通过回收率校正后, 计算 D 组中 STDs 浓度; 基质匹配曲线校准法:用空白基质匹配溶液配制系列浓度的分析物, 绘制溶液校准曲线, 通过回收率校正后, 计算 D 组中 STDs 浓度。

2 结果与讨论

2.1 提取方法比较

据文献报道^[5], 蜂蜜中残留的 50% 以上磺胺类抗生素能够与还原糖键合并稳定存在, 因此, 需要通过水解释放出自由态磺胺类抗生素, 优化水解条件以尽可能完全解离是保证方法准确性的关键。

本实验选取磺胺类抗生素添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的蜂蜜样品和天然污染的蜂蜜样品 (实际样品), 考察盐酸、磷酸、柠檬酸 3 种酸水解提取下的绝对回收率、相对回收率和测量结果。3 种酸提取的磺胺类抗生素回收率数据列于表 2。可见, 5 种磺胺类抗生素的绝对回收率范围分别为 59.2%~72.2%、0.4%~48.9% 和 27.8%~71.7%。分别采用前处理方法 1 和 3 进行提取, SDZ、SPD 和 STZ 的绝对回收率差异不大; 采用前处理方法 2 提取, 5 种磺胺类抗生素的绝对回收率明显低于另外 2 种方法, SPD、STZ、SM1 和 SM2 分别为 0.4%、4.1%、20.1% 和 1.5%, 表明该方法不能有效提取蜂蜜中磺胺类抗生素。尽管绝对回收率不理想, 但是采用 IDMS 方法测量时, 3 种前处理方法下 5 种化合物的相对回收率范围分别为 98.6%~103.1%、95.4%~102.2% 和 97.0%~104.2%, 均接近 100%。表明磺胺及其同位素标记物在添加样品中的绝对回收率接近, 添加的磺胺在提取过程中的损失可以通过添加同位素稀释剂同步校正。

表 2 3 种样品前处理方法的添加回收率比较 ($n=4$)

Table 2 Spiking recoveries of 5 sulfonamides using three sample pretreatment methods ($n=4$)

化合物 Compounds	回收率 Recoveries/%					
	方法 1 Method 1		方法 2 Method 2		方法 3 Method 3	
	绝对 Absolute	相对 Relative	绝对 Absolute	相对 Relative	绝对 Absolute	相对 Relative
SDZ	65.3±4.1	103.1±4.6	48.9±1.9	96.9±4.9	71.7±7.7	97.0±5.4
SPD	72.2±6.0	98.9±2.3	0.4±0.2	95.4±10.7	52.9±6.9	97.2±5.0
STZ	59.2±2.1	98.6±3.7	4.1±1.0	99.8±3.5	63.3±6.7	100.7±4.5
SM1	60.8±3.2	100.0±2.8	20.1±3.4	102.2±3.7	34.4±2.8	104.2±2.3
SM2	60.8±1.8	101.5±2.9	1.5±0.6	100.6±13.8	27.8±3.2	97.2±4.2

注:绝对回收率:采用基质匹配曲线校准法测得 C 组样品中目标物的浓度,除以其相应的添加浓度值;

相对回收率:采用 IDMS 基质匹配校准法测得 C 组样品中目标物的浓度,除以其相应的添加浓度值

将该方法应用于多种磺胺类药物污染的实际蜂蜜样品,检测结果列于表3。可见,应用前处理方法1时,SDZ、SPD、STZ、SM1和SM2等5种磺胺类兽药的测量结果分别为20.2、21.1、10.8、20.4和22.4 μg/kg;应用前处理方法2时,测量结果分别为5.3、0.1、1.4、2.8和0.1 μg/kg;应用前处理方法3时,测量结果分别为8.6、16.2、5.7、10.0和12.7 μg/kg。由此可见,与前述加标回收实验相比,三种前处理方法的测量结果差异显著,前处理方法1的测量结果最高,前处理方法2的测量结果最低。

表3 三种样品前处理方法测量阳性样品结果比较(n=4)

Table 3 Quantitative results of 5 sulfonamides using three sample pretreatment methods (n=4)

化合物	方法1	方法2	方法3
Compounds	Method 1	Method 2	Method 3
SDZ	20.2±0.1	5.3±0.4	8.6±0.2
SPD	21.1±0.6	0.1±0.03	16.2±0.6
STZ	10.8±0.1	1.4±0.3	5.7±0.02
SM1	20.4±0.3	2.8±0.1	10.0±0.3
SM2	22.4±0.2	0.1±0.1	12.7±0.4

注:上述结果均采用IDMS基质匹配校准方法测量

比较实际样品测试和添加回收的结果可以发现,虽然添加回收实验的绝对回收率和相对回收率均接近100%,但实际样品的IDMS测量结果会随前处理方法不同而出现明显差异。如SDZ在方法1和方法3中的绝对回收率分别为65.3%和71.7%,相对回收率分别为103.1%和98.9%,相差均不到7%,但实际样品测量结果却分别为20.2和8.6 μg/kg。这是因为方法1和方法3除分别为盐酸和柠檬酸水解外,其他实验条件均相同,表明柠檬酸无法将蜂蜜中与糖结合的磺胺类抗生素完全水解,且水解效率低于前处理方法1,按照测量结果比值推测,其水解效率约为盐酸水解的40%。测量阳性样品时,样品中磺胺类抗生素的提取效率低于添加的同位素标记物的提取效率。方法2采用磷酸溶液涡旋提取1 min,测量结果比其他2种方法低,原因可能是水解时间不足,提取液中自由态磺胺类抗生素的含量低。

采用3种前处理方法处理阳性蜂蜜样品中磺胺吡啶的提取离子流色谱图示于图2。应用方法2处理实际样品,SPD的质谱响应(2.5×10^4)远低于另外2种方法,仅为方法1中SPD响应的1.7%左右,基本在检测限水平测量。鉴于方法2来源于国标方法GB/T18932.17—2003,本研究选择5家实验室采用前处理方法1和2分别对高、低浓度水平的阳性样品进行

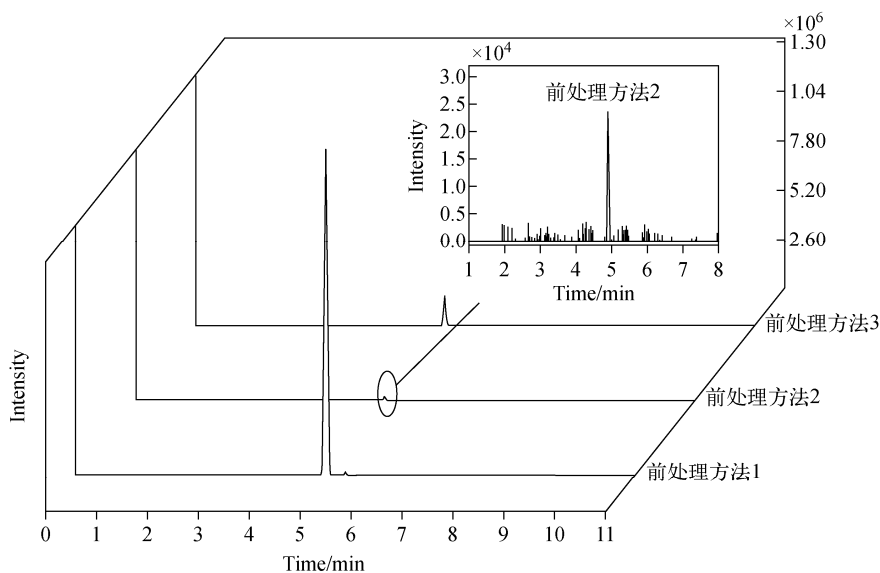


图2 采用3种前处理方法处理阳性蜂蜜样品中磺胺吡啶的提取离子色谱图

Fig. 2 UPLC-MS/MS chromatograms of SPD in positive honey treated by different pretreatment methods

测定,结果列于表4。5家实验室应用前处理方法2时,2种浓度水平的阳性蜂蜜样品中5种磺胺类抗生素的测量结果均比方法1低,RSD

大于50%,表明方法2重现性不理想,为保证阳性蜂蜜样品的磺胺类兽药残留测量结果,需要进行方法优化。

表4 前处理方法1和2在不同实验室的方法验证结果

Table 4 Validation results of pretreatment method 1 and method 2 in different laboratories

浓度 Concentration	化合物 Compounds	方法 Method	测量结果 Measured value/($\mu\text{g}/\text{kg}$)					平均值 Mean value/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对标准偏差 RSD/%
			Lab 1	Lab 2	Lab 3	Lab 4	Lab 5		
			高水平	SDZ	方法 1	94.5	86.5		
		方法 2	4.2	52.4	18.6	14.4	9.5	19.82	95.82
	SPD	方法 1	100.8	94.2	97.6	90.1	89.6	94.46	5.10
		方法 2	2.6	54.7	27.5	46.5	25.8	31.42	64.58
	STZ	方法 1	62.1	56.1	55.5	61.5	52.2	57.48	7.34
		方法 2	3.2	27.3	12.8	16.5	27.7	17.5	59.09
	SM1	方法 1	81.9	87.2	87.3	88.5	86.3	86.24	2.96
		方法 2	1.6	65.7	26.2	24	17	26.9	88.22
	SM2	方法 1	102.6	94.6	100.2	94.4	95.7	97.5	3.79
		方法 2	5.9	79.7	32.7	44.9	31.6	38.96	68.89
低水平	SDZ	方法 1	19.22	21.07	20.94	21.23	19.97	20.49	4.20
		方法 2	0.72	2.95	0.7	1.86	5.35	2.32	83.55
	SPD	方法 1	21.72	20.12	23.51	21.25	20.94	21.51	5.87
		方法 2	1.51	3.74	1.7	1.87	0.1	1.78	72.78
	STZ	方法 1	12.64	13.51	12.51	11.04	10.84	12.11	9.38
		方法 2	0.75	2.51	0.8	1.87	1.41	1.47	50.70
	SM1	方法 1	21.65	19.26	22.18	20.74	19.72	20.71	5.96
		方法 2	1.05	5.23	1.2	1.95	2.85	2.46	69.51
	SM2	方法 1	21.41	23.37	22.72	20.93	22.76	22.24	4.60
		方法 2	1.92	7.31	1.8	3.01	0.1	2.83	95.95

上述结果表明,采用添加样品模拟真实污染的阳性样品,虽然磺胺类抗生素不能与还原糖进行充分结合,个别药物结合效率极低,但在水解方法的选择或优化过程中,添加回收率均不会有显著差异,应用于实际阳性样品时可能会导致测量结果出现偏差,因此,应该采用阳性污染样品优化方法保证测量结果的准确性。

2.2 基质效应评价

蜂蜜基质复杂,共洗脱的基质杂质不仅影响方法的灵敏度和精确度,还会缩短仪器的使用寿命,因此,通常要求样品前处理方法能在保证分析物提取效率的同时,可最大化去除基质中干扰物。目前,同位素稀释质谱法是去除基质效应对测量结果影响的最有效方法,但有文献报道^[20-22],在有些测量过程中,目标物与其同

位素标记物的基质效应存在差异,而这种差异将直接影响测量结果的准确性。因此,在评估蜂蜜中磺胺类抗生素的基质效应(ME)时,同时评估了同位素标记物的基质效应,结果列于表5。采用前处理方法1、2和3处理蜂蜜样品,5种磺胺类抗生素的ME分别为65.0%~93.6%、20.6%~96.5%和62.5%~96.4%,均呈不同程度的基质抑制效应。5种磺胺类抗生素在前处理方法1和3中的基质效应差异不大,可能是这两种方法具有相同的净化条件;前处理方法2处理蜂蜜样品时,SM2与另外4种磺胺类抗生素的基质效应差异明显,ME仅为20.6%,基质抑制效应严重,这可能与分析物之间物理化学性质差异较大有关。张晓燕等^[18]采用MCX固相萃取小柱提取净化蜂蜜中

表5 3种前处理方法的基质效应比较 ($n=4$)
Table 5 Matrix effect of different sample pretreatment methods ($n=4$)

化合物 Compounds	方法 Methods	基质效应 Matrix effect		校正因子 θ Correction factors
		ME _{STD} %	ME _{ISTD} %	
SDZ	方法 1	66.4 ± 1.4	65.7 ± 1.8	1.00 ± 0.02
	方法 2	96.5 ± 2.8	96.5 ± 5.7	1.00 ± 0.04
	方法 3	62.5 ± 2.5	62.3 ± 3.7	1.01 ± 0.02
SPD	方法 1	84.9 ± 3.6	86.3 ± 2.69	0.98 ± 0.04
	方法 2	81.3 ± 2.2	82.5 ± 3.3	0.98 ± 0.02
	方法 3	76.6 ± 6.3	77.7 ± 5.8	0.97 ± 0.02
STZ	方法 1	66.7 ± 1.9	68.6 ± 1.84	0.98 ± 0.03
	方法 2	95.7 ± 7.0	93.9 ± 8.7	1.02 ± 0.02
	方法 3	92.8 ± 7.7	94.0 ± 8.9	0.98 ± 0.03
SM1	方法 1	93.6 ± 3.7	93.2 ± 3.6	1.01 ± 0.06
	方法 2	78.1 ± 6.4	82.4 ± 5.6	0.95 ± 0.02
	方法 3	88.9 ± 6.7	90.6 ± 6.9	0.97 ± 0.02
SM2	方法 1	65.0 ± 1.5	65.1 ± 1.9	1.00 ± 0.03
	方法 2	20.6 ± 3.9	18.9 ± 4.9	1.03 ± 0.11
	方法 3	96.4 ± 4.8	96.1 ± 3.7	1.00 ± 0.02

注: * ME_{STD}表示分析物的基质效应;ME_{ISTD}表示同位素稀释剂的基质效应

的链霉素,发现分析物的氨基基团与 MCX 小柱的磺酸基团作用较强,分析物不易被洗脱。赵焕英等^[19]采用UPLC法检测生物样品中 8 种单胺类神经递质,发现在流动相中加入庚烷磺酸钠离子对试剂,可以增强反相色谱柱对目标分析物的吸附能力,且庚烷磺酸钠浓度越高,分析物越难洗脱。据此推测,采用 MCX 小柱固相萃取净化,蜂蜜中碱性较强的基质杂质难以被去除,另外,SDZ、SPD、STZ、SM1 和 SM2 的 $\log P$ 值分别为 -0.12 、 0.03 、 0.05 、 0.34 和 0.80 ,SM2 极性明显弱于其余 4 种磺胺类抗生素,加入的庚烷磺酸钠溶液会增强 Oasis HLB 小柱对磺胺类抗生素及基质杂质的保留能力,3 mL 水(淋洗液)难以去除极性较弱的基质干扰物,因而极性较弱的 SM2 受基质抑制作用也相应较强。由于 IDMS 测量方法是通过磺胺与其同位素标记物的响应比值进行计算,本研究采用 IDMS 校正因子 θ 考察目标物与其同位素标记物的基质效应的差异,5 种磺胺类抗生素在 3 种前处理方法中 IDMS 校正因子 θ 值分别为 $0.98 \sim 1.01$ 、 $0.95 \sim 1.03$ 和 $0.97 \sim 1.01$,RSD 分别为 $2.3\% \sim 5.8\%$ 、 $1.7\% \sim 9.4\%$ 和 $1.6\% \sim 3.0\%$ 。表明采用这 3 种前处理方法处

理蜂蜜样品时,同位素标记物均可以校正基质效应对测量结果的影响,但基质抑制会影响质谱响应,进而降低结果的可靠性。

2.3 校准方法比较

虽然前处理方法 1 为最优方法,但依然存在程度各异的基质抑制效应。本研究以天然污染的蜂蜜样品为研究对象,比较了 IDMS 溶液校准法、IDMS 基质匹配校准法、溶液曲线校准法和基质匹配曲线校准法等 4 种定量校准方法对蜂蜜中磺胺类残留测量结果的影响,结果列于表 6。基于溶剂曲线校准法测量的结果明显低于基质匹配曲线校准方法,表明基质抑制效应会导致测量结果明显偏低,基质匹配法能够有效校正基质效应,获得可靠的测量结果。IDMS 溶液校准法、IDMS 基质匹配校准法和基质匹配曲线校准法的测量结果没有明显差异,RSD 范围分别为 $0.7\% \sim 2.3\%$ 、 $0.5\% \sim 2.7\%$ 和 $4.7\% \sim 7.8\%$,表明基质匹配曲线校准法和同位素稀释剂均可最大化消除基质效应对测量结果的影响,采用简便易行的 IDMS 溶液校准方法可以准确定量测量蜂蜜中磺胺类抗生素残留,无需配制空白蜂蜜基质匹配校准溶液。

表 6 不同校准方法对阳性蜂蜜样品中 5 种磺胺类抗生素的测量结果影响 ($n=4$)Table 6 Measurements of quantitative method of 5 sulfonamides using sample preparation method 1 ($n=4$)

化合物 Compounds	校准方法 1 Calibration method 1/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	校准方法 2 Calibration method 2/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	校准方法 3 Calibration method 3/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	校准方法 4 Calibration method 4/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
SDZ	20.4 \pm 0.1	20.2 \pm 0.1	13.3 \pm 0.6	18.4 \pm 0.8
SPD	20.7 \pm 0.5	21.1 \pm 0.6	17.0 \pm 1.3	23.9 \pm 1.3
STZ	10.5 \pm 0.1	10.8 \pm 0.1	6.7 \pm 0.4	10.4 \pm 0.5
SM1	20.3 \pm 0.5	20.4 \pm 0.3	18.7 \pm 1.5	23.0 \pm 1.3
SM2	22.5 \pm 0.2	22.4 \pm 0.2	14.3 \pm 0.6	23.0 \pm 1.11

注:校准方法 1 表示 IDMS 溶液校准方法;校准方法 2 表示 IDMS 基质匹配校准方法;校准方法 3 表示溶液曲线校准法;校准方法 4 表示基质匹配曲线校准法

2 结论

应用超高效液相色谱-串联质谱法,采用添加样品和阳性样品比较研究蜂蜜中磺胺类抗生素的 3 种前处理方法,评价提取条件、基质效应、校准方法等对测量结果的影响。结果表明,水解蜂蜜中磺胺糖结合物的最佳条件是 0.7 mol/L 盐酸水浴 1 h, IDMS 溶液校准法可最大化消除基质效应对测量结果的影响,处理过程简单高效、测量结果稳定可靠。由于添加样品中磺胺与还原糖的结合程度与阳性样品中的不同,所以仅采用添加回收率考察结合物的水解条件存在不可靠性。综上,对于结合态药物残留检测方法的建立,建议采用阳性污染样品对样品前处理方法进行验证,若没有阳性污染样品,采用添加样品时需考虑使添加样品中药物的存在状态与在阳性样品中的相同,以提高添加回收率的有效性,进而保障测量结果的准确性。

参考文献:

- [1] GENERSCH E. American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae* [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2010, 103(1): S10-S19.
- [2] BOGIALLI S, DI C A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395(4): 947-966.
- [3] MASIÁ A, SUAREZ-VARELA M M, LOPIS-GONZALEZ A, PICÓ Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by

liquid chromatography-mass spectrometry; a review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 936: 40-61.

- [4] BARGAŃSKA Ż, ŚLEBIODA M, NAMIEŚNIK J. Determination of antibiotic residues in honey [J]. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30(7): 1 035-1 041.
- [5] LOW N H, STANDISH J L, SPORNS P. Studies on the fate/loss of sulfathiazole in concentrated carbohydrate (honey) solutions[J]. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1989, 22(3): 212-215.
- [6] SHETH H B, YAYLAYAN V A, LOW N H, STILES M E, SPORNS P. Reaction of reducing sugars with sulfathiazole and importance of this reaction to sulfonamide residue analysis using chromatographic, colorimetric, microbiological, or ELISA methods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(4): 1 125-1 130.
- [7] SCHWAIGER I, SCHUCH R. Bound sulfathiazole residues in honey-need of a hydrolysis step for the analytical determination of total sulfathiazole content in honey[J]. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 2000, 96(3): 93-98.
- [8] HOU J, YAN J, ZHANG F, ZHAO Q, CHEN H, ZHANG Y, LI G, LI Y, DING L. Evaluation of intercalated α -zirconium phosphate as sorbent in separation and detection of sulfonamides in honey[J]. *Food Chemistry*, 2014, 150: 58-64.
- [9] WANG J, LEUNG D. The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and

- honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. *Drug Testing and Analysis*, 2012, 4(Suppl 1): 103-111.
- [10] JUAN-BORRÁS M, PERICHE A, DOMENECH E, ESCRICHE I. Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS/MS[J]. *Food Control*, 2015, 50: 243-249.
- [11] LOUPPIS A P, KONTOMINAS M G, PASTEPHANOU C. Determination of antibiotic residues in honey by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(10): 1-13.
- [12] YANG S, DING J, ZHENG J, HU B, LI J Q, CHEN H, ZHOU Z Q, QIAO X L. Detection of melamine in milk products by surface desorption atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(7): 2 426-2 436.
- [13] DUBREIL-CHÉNEAU E, PIROTAIS Y, VERDON E, HURTAUD-PESEL D. Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans; validation according to European Union Decision 2002/657/EC[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 339(37): 128-136.
- [14] ZHANG Y, LI X Q, LI H M, ZHANG Q H, GAO Y, LI X J. Antibiotic residues in honey: a review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 85: 1-16.
- [15] DEBAYLE D, DESSALCES G, GRENIER-LOUSTALOT M F. Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(3): 1 011-1 020.
- [16] TAMOŠIŪNAS V, PADARAUSKAS A. Comparison of LC and UPLC coupled to MS-MS for the determination of sulfonamides in egg and honey[J]. *Chromatographia*, 2008, 67 (9/10): 783-788.
- [17] VIDAL J, AGUILERA-LUIZ M D M, ROMERO-GONZALEZ R, FRENCH A G. Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(5): 1 760-1 767.
- [18] 张晓燕,徐锦忠,沈崇钰,陈惠兰,吴斌. 高效液相色谱柱后衍生法测定蜂王浆中的链霉素[J]. *色谱*, 2008, 26(3): 395-397.
- ZHANG Xiaoyan, XU Jinzhong, SHEN Chongyu, CHEN Huilan, WU Bin. Determination of streptomycin residue in royal jelly by high performance liquid chromatography with post-column derivatization[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2008, 26(3): 395-397(in Chinese).
- [19] 赵焕英,段春礼,范春香,刘琦,张韬,杨慧. 高效液相色谱同时检测生物样本中 8 种单胺类神经递质[J]. *分析化学*, 2009, 37(3): 330-334.
- ZHAO Huanying, DUAN Chunli, FAN Chunxiang, LIU Qi, ZHANG Tao, YANG Hui. Simultaneous determination of eight monoamine neurotransmitters in biological samples by high performance liquid chromatography[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(3): 330-334(in Chinese).
- [20] LEE S, KIM B, KIM J. Development of isotope dilution-liquid chromatography tandem mass spectrometry for the accurate determination of fluoroquinolones in animal meat products: optimization of chromatographic separation for eliminating matrix effects on isotope ratio measurement[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1 277(4): 35-41.
- [21] JEMAL M, SCHUSTER A, WHIGAN D B. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry methods for quantitation of mevalonic acid in human plasma and urine: method validation, demonstration of using a surrogate analyte, and demonstration of unacceptable matrix effect in spite of use of a stable isotope analog internal standard[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2003, 17(15): 1 723-1 734.
- [22] LEE J, JANG E S, KIM B. Development of isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry combined with standard addition techniques for the accurate determination of tocopherols in infant formula[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 787: 132-139.