

超高效液相色谱-串联质谱同时测定畜禽粪便发酵沼液中9种磺胺类抗生素

张 敏¹, 张杨开¹, 徐宜宏², 付海滨^{2*}

(1. 沈阳农业大学工程学院, 沈阳 110866; 2. 沈阳海关技术中心, 沈阳 110016)

摘 要: 本文利用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)技术研究建立了同时测定畜禽粪便发酵沼液中9种磺胺类兽用抗生素残留的分析方法。样品经Na₂EDTA提取, Oasis HLB固相萃取柱净化, 采用电喷雾正电离源(ESI⁺)和选择性反应监测(MRM)模式进行检测, 外标法定量。结果表明: 9种磺胺类抗生素药物在0.01~5.0 μg/mL质量浓度范围内与色谱峰面积线性拟合曲线的相关系数(*r*)均大于等于0.998 4, 在0.01、0.05、0.5、2.0 mg/L 4个加标水平下平均回收率为62.3%~93.1%, 相对标准偏差为3.64%~10.90%, 检出限为0.1~0.8 μg/L, 定量下限为0.3~2.6 μg/L。该方法净化效果显著、灵敏度高、重现性好, 适用于畜禽粪便发酵沼液中9种磺胺类兽用抗生素残留的测定。

关键词: 磺胺类抗生素; 超高效液相色谱-串联质谱; 沼液; 固相萃取

中图分类号: S141; X502

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)05-0120-04

Simultaneous Determination of Nine Sulfonamides Antibiotics in Biogas Slurry Livestock and Poultry Manure by Ultra Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Min¹, ZHANG Yangkai¹, XU Yihong², FU Haibin^{2*}

(1. College of Engineering, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866; 2. Technology Center of Shenyang Customs, Shenyang 110016, China)

Abstract: A method for the analysis of nine sulfonamides antibiotics residues in biogas slurry was established by using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). The samples were extracted by Na₂EDTA. Liquid extract was purified by an Oasis HLB SPE column, Electrospray ionization (ESI⁺) and selective reaction monitoring (MRM) mode were used to detect and quantify by external standard method. The results showed that the Correlation Coefficient between the concentration range of 0.01–5.0 μg/mL, the linear curve of chromatographic peak area of 9 sulfonamide drugs were all greater than 0.9984, at the levels of 0.01, 0.05, 0.5, 2.0 μg/L, the average recovery of the samples were 62.3%–93.1%, and the relative standard deviation was 3.64%–10.90%. The detection limit was 0.1–0.8 μg/L, and the limit of quantification (LOQ) was 0.3–2.6 μg/L. This method has good purification effect, high sensitivity and reproducibility. It is suitable for the determination of nine sulfonamides in biogas slurry.

Key words: Sulfonamides Antibiotics; UPLC-MS/MS; Biogas Slurry; SPE

基于预防疾病和促进生长的目的, 兽用抗生素被广泛应用于畜禽养殖业中^[1-2], 由于兽用抗生素并不能完全被动物体所吸收, 约30%~90%抗生

素随着畜禽粪便排泄出来^[3-4]。沼气发酵是畜禽粪便减量化、无害化和资源化利用的重要途径, 沼气发酵产生的沼液含作物生长所需的氮、磷、钾、氨基酸、微量元素等营养物质, 广泛用于农业生产上。但沼气发酵不能完全去除残留在畜禽粪便中的过量抗生素, 将含有抗生素的沼液直接施用于农田会对环境造成一定的危害^[5-8]。

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是一类广谱性的抗菌药物, 具有疗效确定、使用方便、性质稳定、价格低廉等优点, 作为兽药广泛应用于畜禽、

收稿日期: 2020-03-13

基金项目: 沈阳市科技计划项目(21-108-9-37); 辽宁省教育厅科学研究经费项目(LSNJC202002); 辽宁省自然科学基金(20180550984)

作者简介: 张 敏(1978-), 女, 副教授, 博士, 主要从事畜禽粪便等农业废弃物的无害化处理及资源化利用研究。

通讯作者: 付海滨, 男, 博士, 研究员, E-mail: fhbcq@126.com

水产养殖业中^[9-10],由于磺胺类药物在畜禽养殖中的长期过量使用,造成畜禽粪便中含有残留^[11-13]。近年来,国内外学者利用液相色谱法或质谱法,针对土壤、畜禽粪便、肉制品、奶制品、蜂蜜、水产品等不同基质中磺胺类抗生素残留量检测技术进行相关研究^[14-19],但对畜禽粪便发酵沼液中磺胺类抗生素的残留检测技术研究却鲜有报道。为此,本研究针对复杂基质-畜禽粪便发酵沼液中磺胺类抗生素检测方法存在不足的现状,运用UPLC-MS/MS技术,建立了同时测定畜禽粪便发酵沼液中磺胺喹噁啉(Sulfaquinoxaline, SQ)、磺胺嘧啶(Sulfadiazine, SD)、磺胺二甲嘧啶(Sulfadimidine, SM2)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR)、磺胺噻唑(sulfathiazole, STZ)、磺胺甲噁唑(新诺明 Sulphamethoxazole, SMX)、磺胺苯甲酰(Sulfabenzamide, SBZ)、磺胺氯吡嗪(sulfachloropyridazine, SCP)、磺胺苯吡唑(Sulfaphenazolum, SPZ)9种磺胺类兽用抗生素残留的检测方法,方法学考察结果表明,该方法重现性好、灵敏度高、回收率高,适用于畜禽粪便发酵沼液中磺胺类兽药残留的检测,为治理环境中磺胺类抗生素污染和沼液的农田安全利用提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

仪器:Waters Quattro PremierXE UPLC-MS/MS (ACQUITY 超高效液相色谱仪、Quattro micro API 三重四级杆串联质谱仪、MassLynx 数据处理系统,美国 Waters 公司)、固相萃取仪(美国 Supelco 公司)、Oasis HLB SPE 柱(500 mg/6 cc,美国 Waters 公司)、Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)、0.45 μm 纤维滤膜(美国 Millipore 公司)、0.22 μm 微孔滤膜(美国 Millipore 公司)、离心机、氮吹仪、涡旋仪、电子天平等。

试剂:磺胺喹噁啉(SQ)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、磺胺甲基嘧啶(SMR)、磺胺噻唑(STZ)、磺胺甲噁唑(新诺明 SMX)、磺胺苯甲酰(SBZ)、磺胺氯吡嗪(SCP)、磺胺苯吡唑(SPZ)化学标准品(购自德国 Dr. Ehrenstorfer,纯度 $\geq 96\%$),乙腈、甲醇、甲酸为色谱级(购自美国 Fisher 公司),其他化学试剂为分析纯,试验用水均为超纯水。

标准溶液的配制:分别精确称取 10 mg 的 SD、STZ、SMR、SM2、SCP、SMX、SBZ、SPZ、SQ 标准品(精确到 0.000 1 g)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇配制 成 1 mg/mL 的标准储备液,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.2 样品提取与净化

试验用沼液取自辽宁省沈阳市某畜禽养殖基地沼气工程,采集的沼液静置后,先通过滤纸过滤掉悬浮物,再通过 0.45 μm 纤维滤膜后,准确量取 10 mL 滤液到试管中,加入 0.25 g 的 Na_2EDTA ,用 HCl 调节样品 pH 为 4.0 左右,滤液经过漩涡均质后,准备进行固相萃取。

采用 Oasis HLB SPE 萃取柱(Waters, 500 mg/6 mL),依次用 5.0 mL 甲醇及 10.0 mL 超纯水活化柱子,上样后,用 5 mL 超纯水淋洗萃取柱并抽干,再用 10.0 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下氮气吹干后,20% 甲醇 2 mL 定容,过 0.22 μm 的微孔滤膜,待测定。

1.3 测定

1.3.1 色谱条件

色谱柱为 Waters Acquity UPLC BEN C_{18} 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为 0.2% 甲酸, B 为甲醇,梯度洗脱顺序为:0~2 min, 5%B; 2~8 min, 5%~25%B; 8~14 min, 25%~42%B;柱温度:40 $^{\circ}\text{C}$;流速:0.2 mL/min;样品体积:10 μL 。

1.3.2 质谱条件

电离方式:电喷雾电离源(ESI^+);电离电压 3.0 KV;离子源温度 100 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂温度 300 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气体流速 500 L/h(高纯 N_2 , 纯度 $\geq 99.999\%$);锥孔气流量 50 L/h(高纯 N_2 , 纯度 $\geq 99.999\%$);正离子扫描下多反应监测方式(MRM)分析。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

由图 1 可知,经过色谱条件优化后,10 min 内分离出了 9 种磺胺类抗生素药物,且色谱峰形对称。

2.2 质谱条件的优化

首先采用一级质谱对浓度为 0.1 mg/L 的 9 种磺胺类抗生素药物单标标准液进行全扫描,确定准分子离子峰,然后二级质谱以分子离子为母离子,选择定量和定性两个子离子,同时优化参数,最终确定质谱参数,如表 1 所示。

2.3 线性范围和方法检出限

准确量取标准储备液,配制 9 种抗生素药物混合标准溶液,浓度分别为 0.01、0.02、0.05、0.2、0.5、2.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$,依照上述 2.2 质谱条件进样检测分析,绘制 9 种抗生素的标准拟合曲线,9 种磺胺类抗生素的线性回归方程、相关系数、检出限和定量下限见表 2。检出限(LOD)按照 3 倍信噪比计算,定量下限(LOQ)按照 10 倍信噪比计算。从表 2

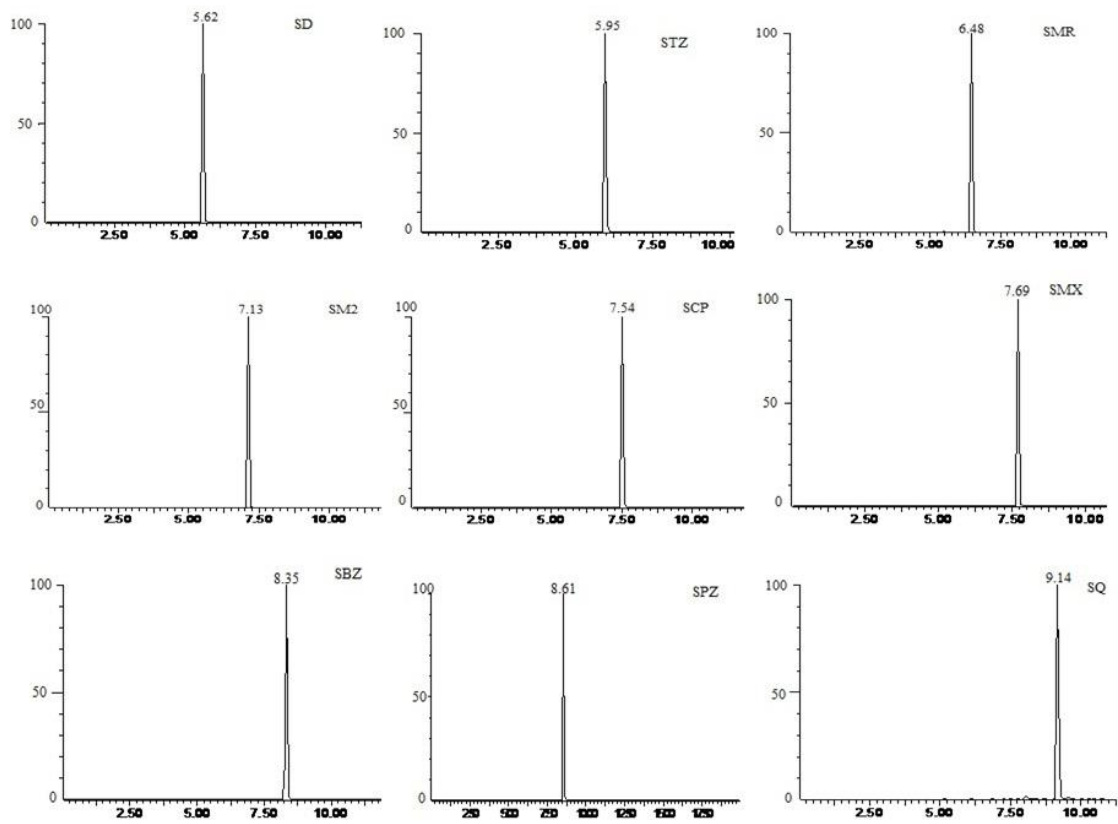


图 1 9种抗生素药物的保留时间和MRM图

表 1 9种磺胺类抗生素药物的质谱检测条件

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
SD	251.1	156.0*, 91.8	28	17,27
STZ	255.8	155.6*, 91.6	28	15,28
SMR	264.8	91.6*, 155.5	30	30,18
SM2	278.8	185.7*, 91.7	30	17,32
SCP	284.7	155.5*, 91.5	26	28,16
SMX	253.8	155.6*, 91.7	28	16,27
SBZ	277.0	155.7*, 107.7	30	13,25
SPZ	314.8	158.0*, 91.7	40	26,40
SQ	300.8	155.6*, 91.7	32	17,30

注：“*”为定量离子

可以看出,9种磺胺类抗生素药物的检出限为0.1~0.8 μg/L,定量下限为0.3~2.6 μg/L,9种抗生素药物在0.01~5.0 μg/mL质量浓度范围内与色谱峰面积呈良好的线性拟合关系,相关系数(r)均大于等于0.998 4,满足检测的技术要求。

2.4 方法的回收率和精密度

在10 mL空白沼液样品加标,加标水平分别为0.01、0.05、0.5、2.0 mg/L,每个添加水平取6个平行样,按上述方法进行实验,考察方法的准确度和精密度结果见表3。9种抗生素的平均回收率为62.3%~93.1%,相对标准偏差为3.64%~10.9%,由此可见,该方法的回收率和精密度满足检测技术要求。

表 2 9种磺胺类抗生素药物的回归方程、相关系数和检出限

化合物	回归方程	相关系数(r)	检出限(μg/L)	定量下限(μg/L)
SD	$y=4.6324\times10^6x-2361.28$	0.9986	0.8	2.6
STZ	$y=9.4693\times10^6x-1678.64$	0.9992	0.5	1.7
SMR	$y=1.5035\times10^6x-2744.06$	0.9996	0.8	2.6
SM2	$y=1.5563\times10^6x-2911.57$	0.9993	0.8	2.6
SCP	$y=1.1291\times10^6x-2736.53$	0.9989	0.1	0.3
SMX	$y=9.2787\times10^6x-1675.39$	0.9997	0.3	1.0
SBZ	$y=4.1448\times10^6x-877.43$	0.9986	0.5	1.7
SPZ	$y=9.0071\times10^6x-744.88$	0.9987	0.5	1.7
SQ	$y=9.5908\times10^6x-473.56$	0.9984	0.2	0.6

表3 9种磺胺抗生素药物的回收率和相对标准偏差(n=6) %

化合物	回收率±RSD			
	0.01 mg/L	0.05 mg/L	0.5 mg/L	2 mg/L
SD	79.2±6.15	82.3±5.33	86.1±6.38	90.1±3.64
STZ	83.6±4.66	86.8±4.75	89.1±4.32	93.1±7.32
SMR	62.3±11.8	65.8.5±10.7	68.6±10.3	74.6±10.8
SM2	75.4±6.87	83.8±10.3	85.9±9.68	89.6±7.99
SCP	75.5±7.06	82.9±10.5	84.7±9.98	88.3±6.56
SMX	73.2±10.4	83.3±7.64	86.3±7.72	90.3±6.49
SBZ	67.5±9.75	70.5±8.92	73.6±8.38	78.6±7.69
SPZ	75.8±5.87	77.9±5.75	80.3±6.48	85.3±8.28
SQ	72.3±10.5	74.6±10.7	77.8±10.9	80.8±10.2

3 结 论

本研究建立了畜禽粪便发酵沼液中9种磺胺类抗生素药物残留的超高效液相色谱-串联质谱测定方法,9种目标物在0.01~5.0 μg/mL质量浓度范围内与色谱峰面积呈良好的线性拟合关系,相关系数(r)均大于等于0.998 4,在0.01、0.05、0.5、2.0 mg/L 4个加标水平下平均回收率为62.3%~93.1%,相对标准偏差为3.64%~10.9%,9种磺胺类抗生素药物的检出限为0.1~0.8 μg/L,定量下限为0.3~2.6 μg/L。该方法定性和定量分析简单快速,灵敏度高,重现性好,满足实验分析要求,可用于畜禽粪便发酵沼液中磺胺喹噁啉、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲基嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺苯甲酰、磺胺苯吡唑9种磺胺类抗生素药物残留的同时测定。

参考文献:

[1] Zhang Min, Meng jun, Liu qingyu, et al. Corn Stovers Derived Biochar for Efficient Adsorption of Oxytetracycline from Wastewater[J]. Journal of Materials Research, 2019, 34(17): 3050-3060.

[2] 刘 锐. 嘉兴市抗生素抗性基因的污染现状调查[J]. 东北农业科学, 2016, 41(2): 109-112.

[3] 成登苗, 李兆君, 张雪莲, 等. 畜禽粪便中兽用抗生素削减方法的研究进展[J]. 中国农业科学, 2018, 51(17): 3335-3352.

[4] 余佩瑶, 刘寒冰, 邓艳玲, 等. 畜禽粪便中抗生素污染特征及堆肥化去除研究进展[J]. 环境化学, 2019, 38(2): 334-343.

[5] 张 敏, 钱金秋, 李忠洲, 等. 恩诺沙星对厌氧发酵过程中水解酶活性及沼气产量的影响[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(11): 1539-1546.

[6] 李 洁, 刘善江. 抗生素在有机肥料-土壤-农作物系统中的转化及影响的研究进展[J]. 上海农业学报, 2013, 9(4): 128-131.

[7] 张 敏, 张 俊, 付海滨, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定沼肥中六种喹诺酮类抗生素[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(4): 486-490.

[8] 涂 成, 闫 湘, 李秀英, 等. 沼渣沼液农用安全风险[J]. 中国土壤与肥料, 2018(4): 9-13, 27.

[9] Boall A B, Fogg L A, Blackwel P A, et al. Veterinary medicines in the environment[J]. Reviews in Environmental contamination and Toxicology, 2004, 180: 1-91.

[10] 刘 畅. 水产品中氯霉素残留检测两种前处理方法的比较[J]. 东北农业科学, 2018, 43(3): 52-55.

[11] 张 敏, 张 俊, 钱金秋, 等. 磺胺二甲嘧啶对沼气发酵过程中酶活性和微生物群落功能多样性的影响[J]. 农村与生态环境学报, 2017, 33(7): 653-659.

[12] 邵义萍, 罗晓栋, 莫测辉, 等. 广东省畜牧粪便中喹诺酮类和磺胺类抗生素的含量与分布特征研究[J]. 环境科学, 2011, 32(4): 1188-1193.

[13] 刘 锋, 廖德润, 李 可, 等. 畜禽养殖基地磺胺类喹诺酮类和大环内酯类抗生素污染特征[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(4): 847-853.

[14] 章明奎, 徐秋桐. 农田系统中兽用抗生素的污染及其行为研究进展[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(2): 416-424.

[15] 周爱霞, 苏小四, 高 松, 等. 高效液相色谱测定地下水、土壤及粪便中4种磺胺类抗生素[J]. 分析化学, 2014, 42(3): 397-402.

[16] 黄冬梅, 黄宣运, 顾润润, 等. 柱后衍生高效液相色谱法测定虾中14种磺胺类药物残留量[J]. 色谱, 2014, 32(8): 874-879.

[17] 顾 欣, 吴剑平, 张 鑫, 等. 阳离子交换在线固相萃取/液相色谱-串联质谱法检测牛奶中14种磺胺药物残留[J]. 分析化学, 2014, 42(12): 1759-1766.

[18] 李晓雯, 迟秋池, 夏苏捷, 等. 高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法检测猪肉中22种磺胺类兽药残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(5): 1735-1742.

[19] 徐宜宏, 李晓东, 姜玲玲, 等. 超高效液相色谱串联质谱法同时检测蜂蜜中多种抗生素残留的研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2018(12): 17-22.

(责任编辑:刘洪霞)