

HPLC-MS/MS法检测中华鳖中磺胺类药物残留

张永正¹ 徐晓林² 张海琪² 方美娟¹ 潘立新¹ 陆红法¹

(1. 浙江海洋学院萧山科技学院, 杭州 311258 2. 浙江省水产技术推广总站, 杭州 310012)

摘要: 建立了一种液相色谱-电喷雾串联质谱同时测定中华鳖中21种磺胺类药物残留的方法。均质样品先后用乙腈、二氯甲烷提取, 合并提取液, 取部分提取液经氮吹浓缩。残渣用1mL流动相溶解, 饱和正己烷脱脂净化。采用ZORBAX Eclipse XDB-C₈色谱柱, 以含0.2%乙酸的水溶液和甲醇(7:3)为流动相, 梯度洗脱, 在电喷雾-多反应监测离子模式下, 进行定量定性分析。方法的定量限为4μg/kg, 以标准加入法计算回收率, 在4—40μg/kg添加范围内, 平均回收率为75.2%—104%; 相对标准偏差为0.16%—9.98%。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 中华鳖; 磺胺类药物; 检测

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2008)05-0669-11

磺胺类药物(SAS)是具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称, 具有芳氨基和磺酰胺基, 是常用的广谱抗菌素, 在水产养殖中广泛应用。但是磺胺类药物能够产生排尿和造血紊乱等副作用。近年来人们对食品中药物残留越来越关注, 国际食品法典委员会(CAC)、欧盟和欧美等大多数国家规定食品和饲料中磺胺类药物总量不得超过0.1mg/kg。2006年5月29日起新实施的日本《肯定列表》规定: 磺胺喹噁啉的限量为0.05mg/kg, 磺胺甲基嘧啶为0.02mg/kg, 磺胺二甲嘧啶为0.01mg/kg, 磺胺二甲氧嘧啶为0.04mg/kg, 磺胺二甲基嘧啶为0.01mg/kg, 其他采用一律标准即0.01mg/kg。

中华鳖(*Trionyx sinensis*)俗称甲鱼, 营养丰富, 富含蛋白质、脂肪、维生素和矿物质等多种营养成分, 有良好的滋补功效, 是深受消费者喜爱的高档水产品。随着养殖规模的不断扩大, 中华鳖养殖过程中病害时有发生, 磺胺类药物对中华鳖的腐皮病等细菌性疾病有较好的治疗效果^[1—3, 10]。然而磺胺类药物在生物体内作用时间和代谢时间较长, 过量使用必会导致磺胺类药物在生物体中的蓄积。国内外对水产品中磺胺类残留分析的报道主要集中在磺胺甲基异恶唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶等几种常见磺胺类药物的测定, 有HPLC^[4—6]、LC-MS/MS^[7, 8]、HPLC-MS/MS^[9, 11, 12]等方法, 但水产品中磺胺类多

组分同时检测方法很少。

本研究应用液相色谱-串联质谱仪研究了同时检测中华鳖人工养殖中可能用到的21种磺胺类药物, 优化了色质谱条件, 方法的灵敏度和准确度较高, 可以满足日常检测需求。

1 材料与方法

1.1 材料 APB000串联四极杆质谱仪(美国AB公司), 配有电喷雾离子源(ESI源)。磺胺、磺胺甲氧哒嗪、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺氯哒嗪、磺胺喹噁啉、磺胺吡啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺-6甲氧嘧啶、磺胺醋酰、磺胺二甲嘧啶、磺胺噻唑、磺胺胍、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺硝苯、磺胺二甲异嘧啶、磺胺苯吡唑、磺胺甲基异恶唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲异恶唑为Sigma公司试剂, 用甲醇分别配制成100mg/L标准储备液; 乙腈、甲醇为色谱纯(Merck试剂); 水为Milli-Q超纯水; 其他试剂为分析纯(上海试剂厂)。

1.2 检测样品的提取方法优化 分别采用乙腈和二氯甲烷作为磺胺类药物残留的提取液。准确称取5.00g样品于50mL离心管中, 加入20mL乙腈或二氯甲烷, 均质3min(10000r/min), 离心5min(5000r/min), 将乙腈或二氯甲烷层转移至50mL棕色容量瓶中, 再用20mL乙腈或二氯甲烷重复提取残渣一

收稿日期: 2008-03-05 修订日期: 2008-06-12

基金项目: 浙江省科技厅重点科研项目基金项目(No.2005C23067)资助

通讯作者: 张永正(1964—), 男, 浙江义乌人; 硕士, 副教授; 主要从事水产养殖、渔业资源及渔业生态环境教学与研究。E-mail: Zyz36@

次, 合并提取液, 用乙腈或二氯甲烷定容至 50mL。

1.3 样品净化方法优化 分别选用中性氧化铝柱、HLB柱和正己烷净化法进行净化方法筛选。¹ 中性氧化铝柱净化法: 先活化中性氧化铝柱, 然后上样, 再用 3mL 甲醇冲洗, 合并接液, 40℃水浴氮吹至干, 加入 1mL 流动相 (0.2% 乙酸: 甲醇 = 7: 3) 定容, 溶液过 0.2μm 滤膜收集于进样瓶中, HPLC-MS/MS 检测。^④ HLB柱净化法: 活化 HLB柱, 然后上样, 用 1mL 水淋洗, 真空抽干, 弃接液。洗脱: 方法一, 用 5mL 甲醇和 5mL 乙酸乙酯洗脱; 方法二, 用 5mL 乙腈和 5mL 二氯甲烷洗脱。将洗脱液置于 40℃ 水浴氮气吹干后, 用 1mL 流动相 (0.2% 乙酸: 甲醇 = 7: 3) 定容, 溶液过 0.2μm 滤膜收集于进样瓶中, HPLC-MS/MS 检测。

1.4 流动相选择 同流动相配比为: 0.2% 乙酸 + 甲醇 (7+3); 0.2% 乙酸 + 乙腈 (7+3); 0.2% 甲酸 + 甲醇 (7+3); 0.2% 甲酸 + 乙腈 (7+3)。分别取 1mL 的混合标准液于 4 个 10mL 离心管中, 40℃ 水浴氮吹干, 用上述不同配比的流动相溶解残渣, 旋涡混匀后经 0.2μm 滤膜过滤, 供 HPLC-MS/MS 分析。

1.5 流动相优化 配制含 0.2% 乙酸水溶液与甲醇 (8+2 7+3 6+4 1+1) 的四种流动相, 分别取 1mL 的混合标准液 (100ng/mL) 于 4 个 10mL 离心管中, 40℃ 水浴氮吹至干, 分别取 1mL 流动相来定容, 然后进行 HPLC-MS/MS 分析。

1.6 液相色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB-C₈ 色谱柱 (4.6mm × 150mm, 5μm, 美国 Agilent 公司)。流动相: 含 0.2% 乙酸水溶液和甲醇, 梯度洗脱条件 (表 1)。流速: 200μL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20μL。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Tab 1 Flow gradient conditions

时间 T in e (min)	甲醇 M ethanol (%)	含 0.2% 乙酸的水溶液 0.2% A cetic acid solution (%)	
		0	70
0	30	70	
10	30	70	
15	80	20	
20	80	20	
21	30	70	
35	30	70	

1.7 质谱条件 根据磺胺类药物分子的结构特征, 我们选择 ESI (+) 作为电离模式, 采用半自动进样方式, 以 5μL/min 将每种 0.1mg/mL 的磺胺标准工作储备液分别注入离子源中, 在多级反应监测 (MRM) 模式下对每一种磺胺进行一级质谱分析

(Q1 扫描), 得到每种磺胺的分子离子峰, 选取相应的母离子峰, 对其子离子进行二级质谱分析 (Q2 扫描), 得到碎片离子信息, 然后再对得到的每种磺胺的二级质谱对去簇电压 (DP)、聚焦电压 (FP)、碰撞气 (CAD)、碰撞能量 (CE)、电喷雾电压 (IS) 等质谱参数进行优化。

2 结果

2.1 检测样品的提取

本实验分别用乙腈、二氯甲烷作为样品提取溶液, 对空白样品添加 200μg/kg 标准溶液进行提取实验。结果发现: 有些磺胺药物用乙腈提取效果好, 而有些磺胺用二氯甲烷提取效果好, 但总的效果还是用乙腈提取好。因此, 综合考虑, 本实验最终确定采用一次乙腈加一次二氯甲烷提取。

2.2 样品的净化

采用三种方法对样品进行净化, 净化结果 (图 1—3)。用中性氧化铝柱净化去脂后出峰效果差, 而用 HLB 柱净化的峰型好, 各种磺胺的离子对强度正常, 且洗脱液用 5mL 甲醇和 5mL 乙酸乙酯比用 5mL 乙腈和 5mL 二氯甲烷洗脱效果好, 并且用饱和正己烷去脂后出峰差的物质, 用 HLB 柱去脂后出峰效果也很好, 但是由于 HLB 柱价格贵, 也可采用正己烷脱脂净化, 并过 0.2μm 的滤膜, 进行 HPLC/MS/MS 分析, 能取得良好的效果。

2.3 样品前处理条件的优化

优化后的样品前处理条件如下: 准确称取 5.00g 样品于 50mL 离心管中, 加入 20mL 乙腈和 10g 的无水硫酸钠, 均质 3m in (10000r/min), 离心 5m in (5000r/min), 将乙腈层转移至 50mL 棕色容量瓶中。再用 20mL 二氯甲烷重复提取残渣一次, 合并提取液, 用二氯甲烷定容至 50mL。准确移取 10mL 于 40℃ 水浴下氮吹浓缩至干后, 用 1mL 含 0.2% 乙酸水溶液与甲醇 (7:3) 混合溶液溶解残渣, 加 2mL 乙腈饱和的正己烷溶液, 涡旋混匀, 4000r/min 离心 5m in, 弃去正己烷层, 将底层溶液过 0.2μm 滤膜后移入棕色进样瓶中, 供 HPLC-MS/MS 分析。

2.4 液相条件优化

本研究实验结果表明, 含 0.2% 乙酸水溶液与甲醇 (7:3) 混合溶液可以很好地将 21 种磺胺类药物分离开来。不同的甲醇比例也会改变保留时间, 由图 4 可以看出随着甲醇的比例逐渐地增大, 所有磺胺的峰形都向前移, 很多峰都紧凑在一起不易分离。综合比较分离效果得出用 7:3 的比例磺胺类

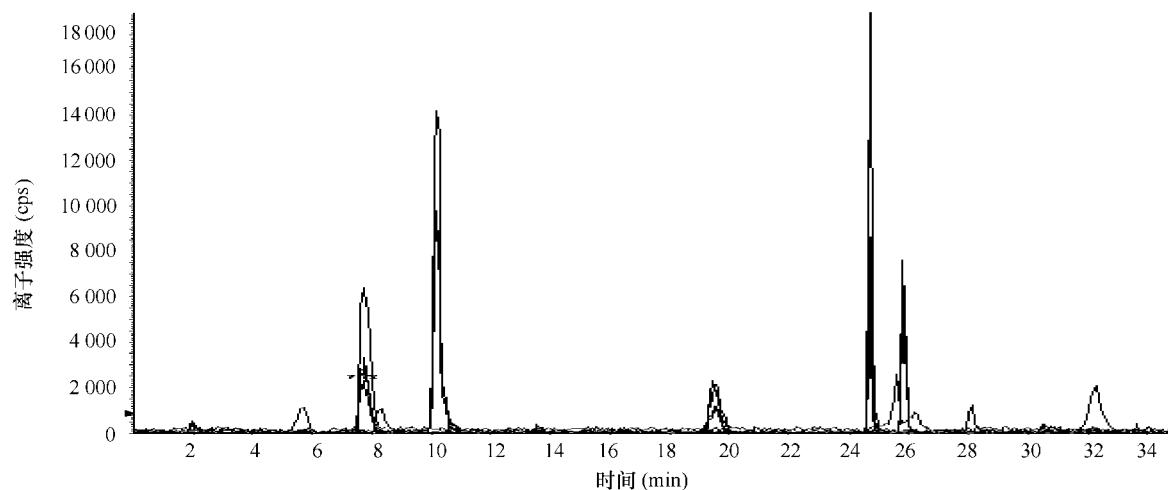


图 1 中性氧化铝柱净化的质谱图

Fig 1 Mass spectra of sample cleanup on alumina column

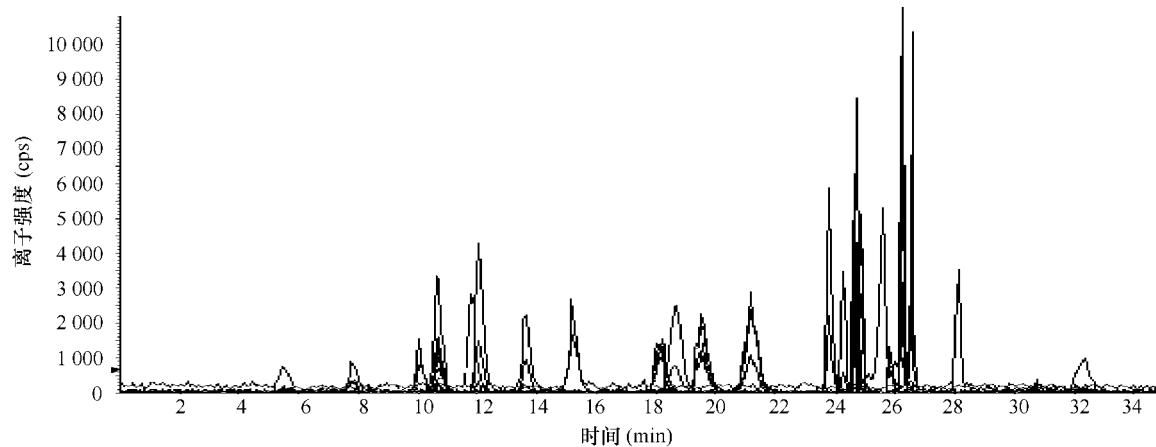


图 2 HLB 柱净化的质谱图 (方法 1)

Fig 2 Mass spectra of sample cleanup on HLB column (the first method)

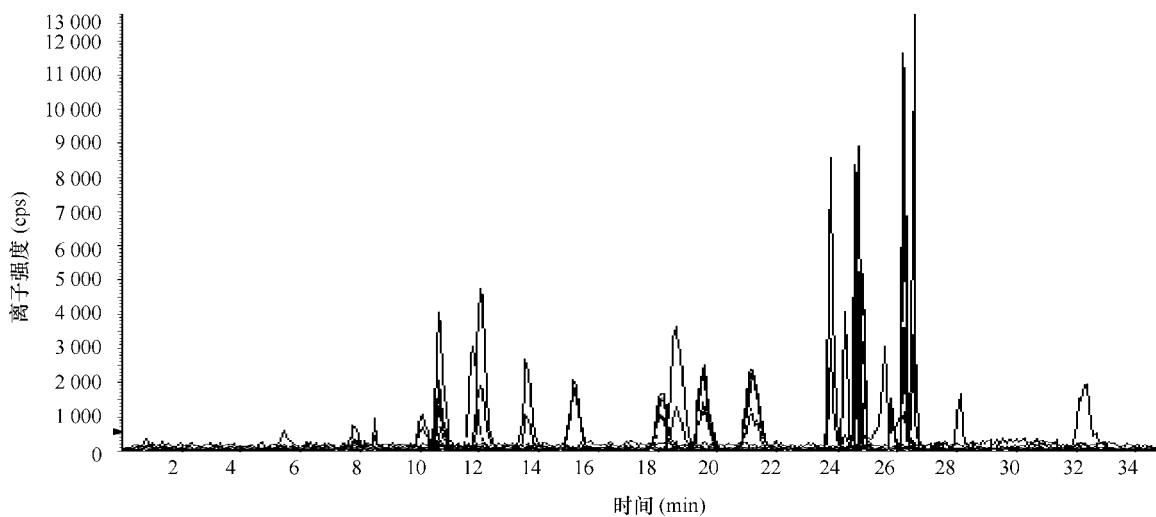


图 3 HLB 柱净化的质谱图 (方法 2)

Fig 3 Mass spectra of sample cleanup on HLB column (the second method)

药物的分离效果比较好, 虽然 8+2 的比例也能较好地分离各种磺胺, 但是它最后出峰的时间很长, 柱效低, 峰形边宽; 因此最后本实验选的流动相为含 0.2% 乙酸的水溶液和甲醇 (7+3)。

2.5 质谱条件优化

对每一种磺胺进行一级质谱分析 (Q1 扫描), 得到每种磺胺的分子离子峰, 选取相应的母离子峰, 对其子离子进行二级质谱分析 (Q2 扫描), 得到碎片离子信息 (图 5)。然后再对得到的每种磺胺的二级质

谱对去簇电压、聚焦电压、碰撞气、碰撞能量、电喷雾电压等质谱参数进行优化。优化的质谱条件如下:

离子源: 电喷雾 (ESI) 离子源, 雾化气 12mL/min, 气帘气 12mL/min, 辅助加热气 (AUX) N₂ 8L/min, 辅助气温度 450℃, 喷雾电压 5500V, 碰撞气 (CAD) 7L/min, 入口电压 (EP) 和出口电压 (CXP) 均为 10V; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测 (MRM)。检测离子对、去簇电压 (DP)、聚焦电压 (FP)、碰撞能量 (CE) (表 2)。

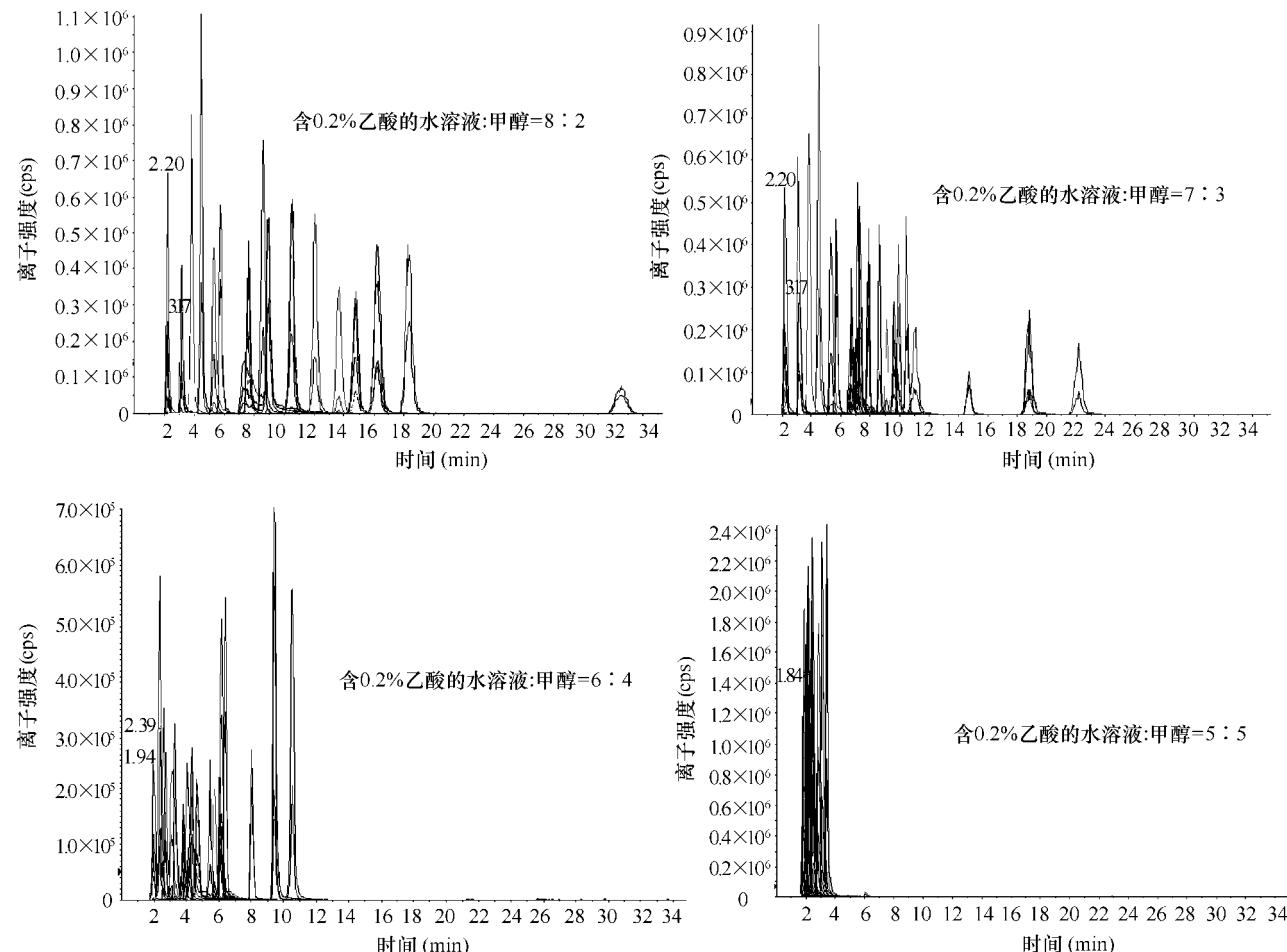


图 4 各种磺胺在不同比例流动相下的分离效果图

Fig. 4 Iso lation effect of 21 sulfonam ide s under d ifferent proportion of m obile phases

表 2 21 种磺胺类药物的 MRM 粒子对和 DP、FP、CE 的优化结果

Tab. 2 Selected multiple reactions monitoring (MRM) transitions for 21 sulfonamides and the optimization of DP, FP and CE

名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	DP(V)	FP(V)	CE(V)
磺胺	173.2/156.3	173.2/156.3	40	260	11
Sulfanilamide	173.2/92.0		35	260	26
磺胺甲氧嘧啶	281.0/156.3	281.0/156.3	40	260	26
Sulfamethoxypyridazine	281.0/108.3		40	260	37
磺胺对甲氧嘧啶	281.0/156.3	281.0/156.3	60	400	25
Sulfamer	281.0/215.4		60	400	25

续表

名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	DP(V)	FP(V)	CE(V)
磺胺氯哒嗪	285.1/156.3	285.1/156.3	50	250	23
Sulfadloropyridazine	285.1/108.3		50	250	35
磺胺喹噁啉	301.3/156.3	301.3/156.3	45	260	24
Sulfachinoxalin	301.3/92.0		45	260	45
磺胺毗啶	250.2/156.3	250.2/156.3	50	250	25
Sulapyridine	250.2/184.4		50	250	25
磺胺二甲基嘧啶	265.3/156.3	265.3/156.3	50	250	23
Sulfanerazine	265.3/172.2		50	250	22
磺胺甲噻二唑	271.3/156.2	271.3/156.2	50	250	20
Sulfmethizol	271.3/108.3		50	250	34
磺胺二甲氧嘧啶	311.2/156.3	311.2/156.3	50	400	31
Sulfadimethoxine	311.2/108.3		70	400	42
磺胺-6-甲氧嘧啶	281.0/156.3	281.0/156.3	55	250	26
Sulfamonomethoxine	281.0/215.4		60	250	26
磺胺醋酰	215.4/156.2	215.4/156.2	40	250	18
Sulfacetamide	215.4/108.3		45	250	18
磺胺二甲嘧啶	279.0/186.3	279.0/186.3	55	400	25
Sulfanethiazine	279.0/156.3		55	400	27
磺胺噻唑	256.0/156.3	256.0/156.3	60	250	22
Sulfathiazole	256.0/108.3		55	250	33
磺胺胍	215.2/156.3	215.2/156.3	45	400	21
Sulfaguanidine	215.2/108.3		45	400	33
磺胺邻二甲氧嘧啶	311.1/156.3	311.1/156.3	55	250	26
Sulfadoxine	311.1/108.3		55	250	35
磺胺硝苯	336.0/156.2	336.0/156.2	52	260	19
Sulfanilamide	336.0/294.3		52	260	19
磺胺二甲异嘧啶	279.2/124.1	279.2/124.1	48	260	31
Sulfisomidine sodium	279.2/186.3		40	260	25
磺胺苯吡唑	315.2/156.3	315.2/156.3	55	250	30
Sulfaphenazole	315.2/160.4		55	250	33
磺胺甲基异噁唑	254.1/156.3	254.1/156.3	55	250	23
Sulfamethoxazole	254.1/147.2		55	250	22
磺胺嘧啶	251.1/156.3	251.1/156.3	50	250	23
Sulfadiazine	251.1/185.4		50	250	27
磺胺二甲异噁唑	268.3/156.3	268.3/156.3	45	250	20
Sulfisoxazole	268.3/113.2		45	250	23

2.6 方法的线性范围和检出限

本实验 6 点不同浓度工作曲线全部采用空白样品添加磺胺混合标准工作液。按照优化方法制备样品溶液, 在本法所确定的实验条件下进样, 测定其峰面积, 以质量浓度 X 为横坐标, 峰面积的比值 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线。在 $4\text{--}250\mu\text{g/L}$ 浓度范围内, 即相当于样品浓度 $4\text{--}250\mu\text{g/kg}$ 的范围内, 色谱峰面积与质量浓度的相关系数 (r) 为 $0.9943\text{--}0.9999$ 。在样品浓度为 $4\mu\text{g/kg}$ 时, 所有磺胺的 S/N 均大于 10。因此, 方法的定量限均为 $4\mu\text{g/kg}$ 。

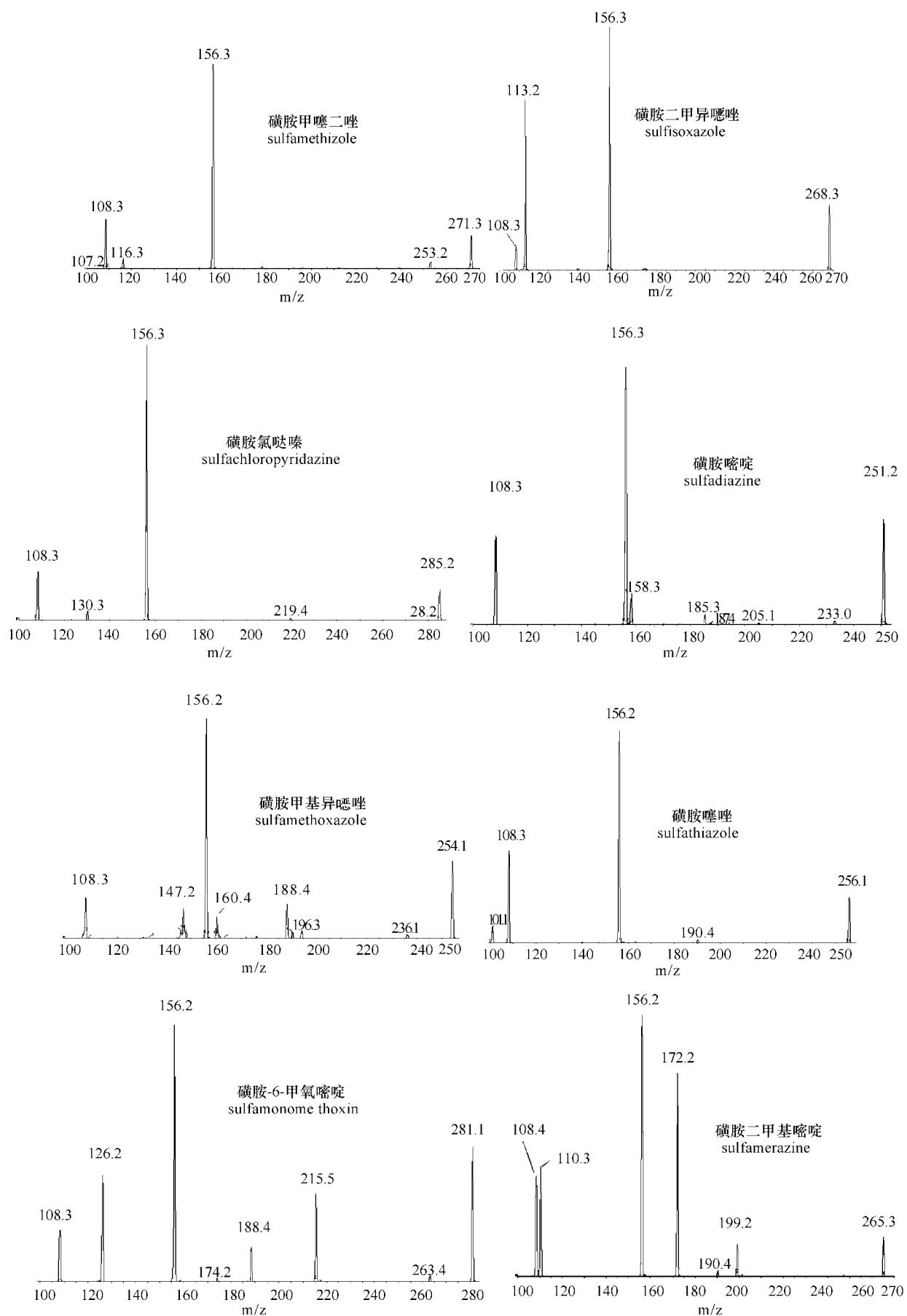
2.7 回收率和精密度实验

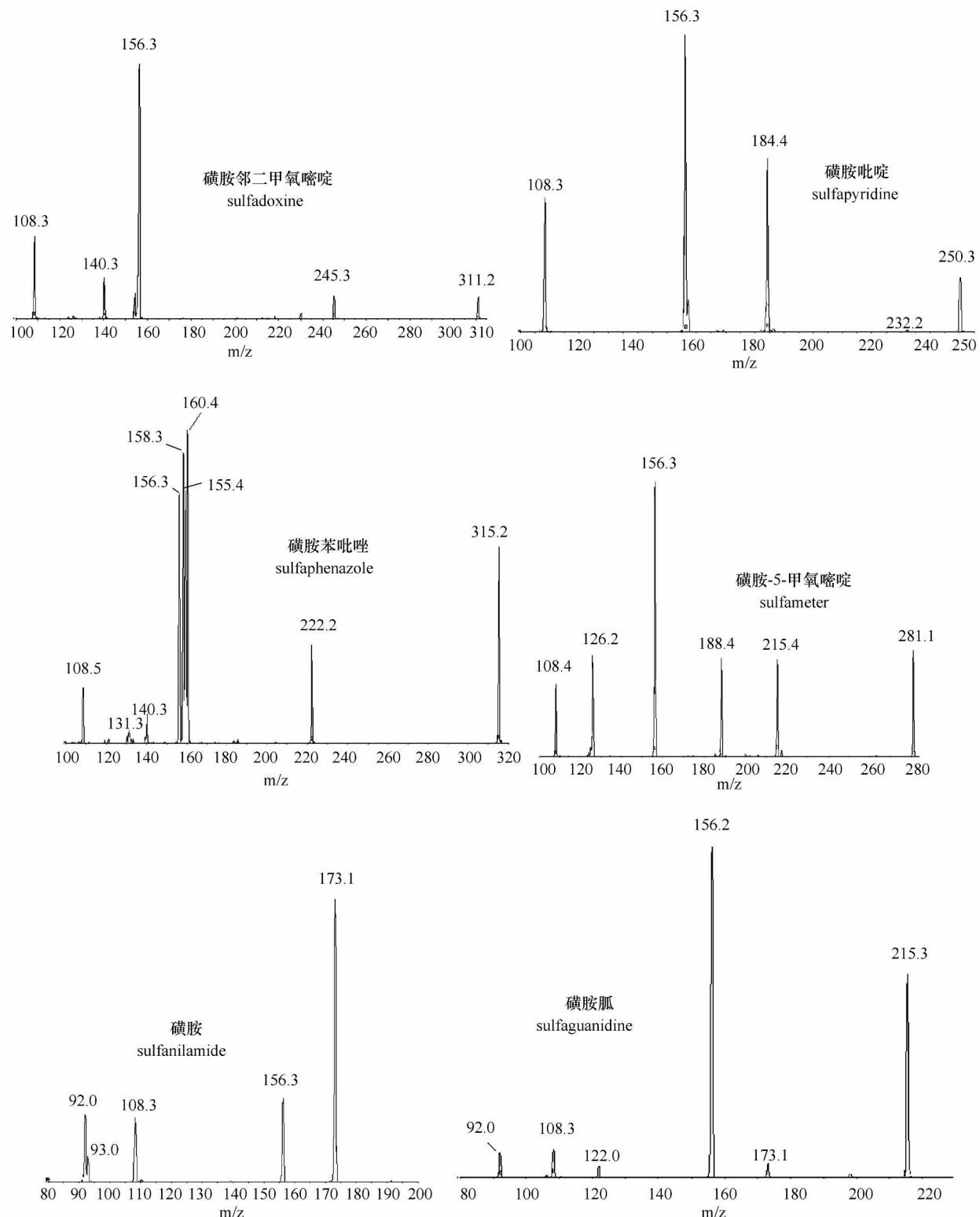
在 5.00g 中华鳖空白样品中添加不同量的混合标准溶液 (添加水平分别为 $4.8\text{--}16.32\text{--}40\mu\text{g/kg}$), 按所选条件进行处理和测定, 采用标准加入法计算得到各种磺胺类药物的平均回收率为 $75.2\%\text{--}104\%$ ($n=6$); 相对标准偏差 (RSD) 为 $0.16\%\text{--}9.98\%$ 。

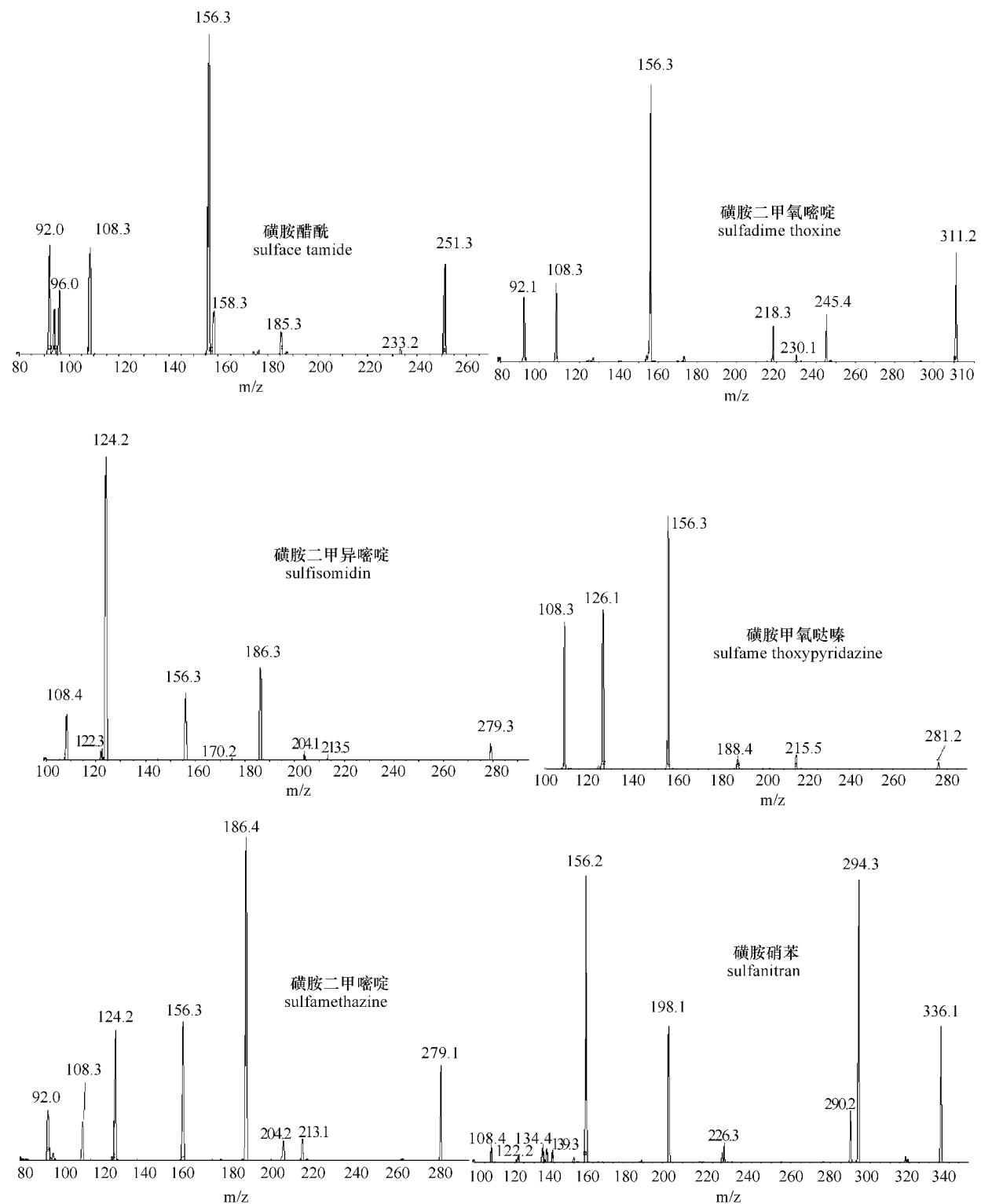
3 讨论

3.1 样品前处理的优化

在现代动物源性食品磺胺类药物残留检测技术







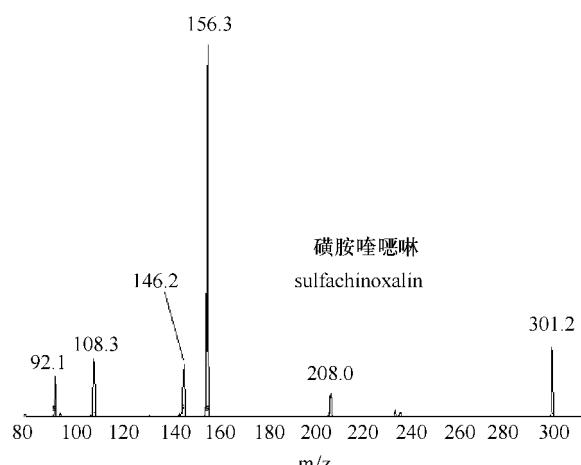


图 5 21种磺胺类药物的二级质谱图

Fig. 5 Production spectra of 21 sulfonamides

中, 最常用最主要的提取液有二氯甲烷、乙腈。本论文就这两种提取液作比较研究。二氯甲烷、乙腈各有优缺点: 乙腈沸点高, 而磺胺类药物耐热性差, 浓缩温度低于 35℃, 故乙腈作提取液浓缩时间长, 但它共提的杂质少; 二氯甲烷有可能提取出类脂物, 浓缩后不容易脱脂, 但是二氯甲烷提取浸出杂质少而且易排除基质干扰。总的效果还是用乙腈提取好, 以 4 种磺胺为例(表 3)。本实验最终确定采用一次乙腈加一次二氯甲烷提取。

样品的净化原则上是用 HLB 小柱效果好, 但是由于 HLB 柱价格贵, 考虑到实验成本, 也可采用正己烷脱脂净化, 并过 0.2μm 的滤膜, 进行 LC/MS/MS 分析, 也能取得良好的效果。

本实验采用标准加入法, 即采用空白样品添加

表 3 四种磺胺在不同提取液中的回收率突出显示部分加注英文

Tab. 3 Recoveries data by different extract liquids of four sulfonamides(%)

提取液 Extract liquid	磺胺吡啶 Sulfapyridine	磺胺氯哒嗪 Sulfadchlorypyridazine	磺胺对甲氧嘧啶 Sulfa methoxydiazine	磺胺噻唑 Sulfa thiazole
乙腈 Acetonitrile	77.8	70.6	92.4	95.9
二氯甲烷 Dichloromethane	93.2	51.9	81.8	78.4

系列浓度的标准溶液后, 按照样品的检测步骤进行操作, 在本法所确定的实验条件下进样, 测定其峰面积, 以质量浓度 X 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 然后以此进行定量分析。本方法取提取液的 1/5 量进行。

后续测定采用的是氮吹浓缩法, 与传统的较长时问、单个进行的旋转蒸发浓缩法相比, 可同时测定多个样品, 具有很好的平行性, 且可节约操作时间。由于磺胺类药物具有热不稳定性和见光分解等特点, 因此操作过程中需要避光和缩短检测时间, 本方法能保证同步性操作, 缩短检测时间。由于缩短检测时间, 也可减少磺胺类在操作过程中热和光效应损失, 从而提高了回收率。

3.2 液相色谱条件优化

由于磺胺类药物结构式中含有氨基, 具有弱碱性, 因此调节流动相中的 pH 值, 可以抑制弱碱的离解, 从而导致保留时间的改变。含 0.2% 乙酸水溶液与甲醇(7:3)混合溶液可以很好地将 21 种磺胺类药物分离开来, 不同的甲醇比例也会改变保留时间。

由于是等度进行分析的, 有些峰也不能很好地

分离(如磺胺二甲嘧啶与磺胺二甲异嘧啶, 它们的峰叠在一起不易区分), 因此本实验又进行多次梯度调节, 并最终确定最佳梯度洗脱程序。

3.3 质谱条件的优化

不同的碰撞能量 CE 对各离子对峰强度大小影响显著。因此, 为达到最佳的检测灵敏度, 对碰撞能量 CE 进行优化是至关重要的。不同的去簇电压 DP 对各离子对峰强度大小也存在一定的影响。再加上质谱检测器具有 MRM 功能作用, 因此尽管磺胺甲氧哒嗪、磺胺-6-甲氧嘧啶和磺胺对甲氧嘧啶, 磺胺胍和磺胺醋酰, 磺胺二甲氧嘧啶和磺胺邻二甲氧嘧啶以及磺胺二甲基嘧啶和磺胺二甲异嘧啶的母离子和子离子都相同, 但是它们的保留时间不同, 所以很容易区分。

3.4 结论

采用高效液相色谱串联质谱法测定中华鳖肌肉组织中磺胺类药物的残留, 具有较高的灵敏度和重现性, 方法操作简单、快速, 适合大量样品的同步测定。试验表明, 通过优化条件, 该方法可准确分析样品中多种磺胺类药物的残留, 该方法灵敏、准确,

特异性强、分离度好, 可推广应用到多种水产品中磺胺类药物的残留量检测。

参考文献:

- [1] Yu X P, Ma Y Z. Study on the pathogen of a chronic infectious disease in cultured *Trionyx sinensis* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1997, **17**(5): 460—462 [余旭平, 马有智, 甲鱼病原性豚鼠气单胞菌的分离鉴定. 中国兽医学报, 1997, 17(5): 460—462]
- [2] Shi Q M, Tang S L, Gao G S, et al. Pathogen isolation and identification and treatment trial of infectious 'soft shelled' disease in turtles [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 1998, **18**(4): 346—348 [史秋梅, 汤生玲, 高桂生, 甲鱼暴发性传染病的病原分离及治疗试验. 中国兽医学报, 1998, 18(4): 346—348]
- [3] Chen X F, Lu Y F, Zhou C Y. Studies on the pathogen of stomach and intestines' ulcer and bleed disease of *Trionyx sinensis* [J]. *Journal of Jimei University Natural Science*, 2000, **5**(3): 30—34 [陈晓凤, 卢亚芳, 周常义, 甲鱼“胃肠溃疡、出血病”病原的初步研究. 集美大学学报, 2000, 5(3): 30—34]
- [4] Yue X Y, Yang S P, Cheng J, et al. Determination of sulfonamides residues in animal muscle by HPLC means [J]. *Sichuan Animal and Veterinary Sciences*, 2005, **2**: 27—28 [岳秀英, 杨松沛, 程江, 等. 用 HPLC 法测定动物肌肉中的磺胺类药物. 四川畜牧兽医, 2005, 2: 27—28]
- [5] Lin H Y, Shen Z L, Lu G P. Determination of sulfamethazine residues in milk by HPLC [J]. *Journal of China Pharmaceutical University*, 2006, **37**(2): 191—192 [林红英, 沈子龙, 陆桂萍, HPLC 法测定牛奶中磺胺二甲基嘧啶残留量. 中国药科大学学报, 2006, 37(2): 191—192]
- [6] Song Y H, Wang R, Liu T Z. Determination of the residues in five sulfonamides in egg albumen and yolk by HPLC [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2007, **19**(1): 42—45 [宋艳红, 王冉, 刘铁铮, 高效液相色谱法测定蛋清和蛋黄中五种磺胺类药物残留. 浙江农业学报, 2007, 19(1): 42—45]
- [7] Zhang P, Qin F, Wei G L, et al. Characterization of metabolites of SICI in rat by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2007, **42**(3): 219—223 [张鹏, 仇峰, 魏广力, 等. LC-MSⁿ 鉴定大鼠体内 SICI 的代谢产物. 中国药学杂志, 2007, 42(3): 219—223]
- [8] Yang X Z, Yang Y P, Tang C P, et al. Rapid identification of benzyls of stemonae sessilifolia using Hyphenated LC-UV-NMR and LC-MS methods [J]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2007, **23**(1): 48—51
- [9] Li W L, Ji Y B, Zhang D L, et al. Identification of metabolites of environmental hormone butylbenzyl phthalate in mice urine by liquid chromatography ion trap mass spectrometry [J]. *Environmental Science*, 2007, **28**(3): 627—632 [李文兰, 季宇彬, 张大雷, 等. HPLC-MSⁿ 法鉴定环境激素邻苯二甲酸丁基苯酯在小鼠尿中的代谢产物. 环境科学, 2007, 28(3): 627—632]
- [10] Chen Q S, Su Z H, Chen X W. Morphological studies on cells involved in mucosal immunity of the intestine in the Chinese soft-shelled turtle [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(6): 654—660 [陈秋生, 苏泽红, 陈晓武, 中华鳖肠道黏膜免疫相关细胞的形态学研究. 水生生物学报, 2005, 29(6): 654—660]
- [11] Pumb JA, Maestrone G, Quylan E. Use of a potentiated sulfonamide to control *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Aquaculture*, 1987, **62**: 187—194
- [12] Shao B, Dong D, Wu Y, et al. Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Acta Chimica Sinica Acta*, 2005, **54**: 174—181

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF TWENTY ONE SULFONAMIDE RESIDUES IN *TRIONYX SINENSIS* BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

ZHANG Yong-Zheng¹, XU Xiao-Lin², ZHANG Hui-Qi², FANG Mei-Juan¹, PAN Li-Xin¹ and LU Hong-Fa¹

(1. Xiaoshan Science & Technical College of Zhejiang Ocean University, Hangzhou 311258;

2. Zhejiang Fishery Technical Extension Center, Hangzhou 310012)

Abstract Sulfonamides are widely used in fisheries for prevention of diseases. With the public's increasing concern with the food safety, residues of sulfonamides in fishery products should arouse regards. Improper use or improper withdrawal time will lead to the presence of sulfonamide residues in fishery products which can influence human food security and pollute environment possibly. Many countries have established the maximum allowable residue limits for sulfonamides in fishery products. Therefore, it is necessary to establish the analysis method for the detection of sulfonamides residues in fishery products. A method of simultaneous determination of twenty-one commonly used sulfonamide residues in *Trionyx sinensis* by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS) is described. Sulfonamide residues were extracted from homogenized tissue with acetonitrile and dichloromethane. A part of the extract was taken and then dried by nitrogen. The residues were dissolved into 1mL mobile phase and defatted with *n*-hexane (saturated by acetonitrile). The 21 analytes were separated on ZORBAX Eclipse XDB-C₈ Column with mobile phases containing methanol and 0.2% acetic acid and finally determined by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). A linear gradient eluting program of methanol from 30% to 80% (V/V) was employed at a flow rate of 0.2mL/min in 35 minutes. Analytes confirmation were performed using multiple reaction monitoring (MRM) with one precursor ion and two product ions as identifiers. The quantitative limit of method was 4μg/kg. Recoveries tested by standard addition method were in the range of 75.2%—104%, RSDs were in the range of 0.16%—9.98% at a spiking level from 4μg/kg to 40μg/kg (n=6).

Key words High performance Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Trionyx sinensis*; Sulfonamides; Simultaneous determination