

关键词

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；磺胺抗生素；Fotector Plus；AutoEVA-60

介绍

磺胺类药物（Sulfonamides, SAs）是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称，是一类用于预防和治疗细菌感染性疾病的化学治疗药物。SAs种类可达数千种，其中应用较广并具有一定疗效的就有几十种，常见的磺胺类药物见图-1。磺胺药是现代医学中常用的一类抗菌消炎药，其品种繁多，已成为一个庞大的“家族”了。但是磺胺药会引起人过敏性反应，且可能有致癌性，随着社会的发展，磺胺类药物的不合理使用，使其在动物性食品中残留引起生态环境污染和人类健康危害的潜在威胁已备受关注，如存在的毒副作用，可使人产生脱敏性皮炎，肠胃问题，造血及肾脏损伤等，成为人类亟待解决的问题之一。养殖场及屠宰场的废水常含有高浓度的磺胺类药物残留，因此对于水质中磺胺的检测需求日益增大。

1. 仪器和耗材

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

HLB 固相萃取柱 (RayCure HLB, 200 mg/6mL RC-204-36476 or 500 mg/6mL RC-204-36477)

高效液相色谱 (HPLC) Agilent 1260, 质谱检测器 (MS) Agilent 6410

甲醇, 甲酸, 氨水 (优级纯)

2. 样品前处理

2.1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪
固相萃取柱	HLB (RayCure, 500 mg/6 mL)

活化	甲醇
淋洗	pH=4.0 的甲酸水溶液
洗脱	甲醇溶液

2.2 富集与净化过程

依次用甲醇(10 mL)和水(10 mL)以 5.0 mL/min 的速率活化/平衡和淋洗固相萃取柱, 备用。取纯净水样 200 mL, 加入 EDTA-McIlvaine 缓冲溶剂(50 mL, 0.1 mol/L) 调节水环境的 pH 为 4.30 左右, 以 5-7 mL/min 的速率经固相萃取小柱富集后; 用甲酸水溶液 (pH=4.0) 10 mL 以 10 mL/min 速率淋洗; 气推后用 10 mL 的甲醇以 1.0 mL/min 的速率洗脱。收集的样品在 35 °C, 5 psi 条件下浓缩至近干, 流动相乙腈-水溶液 (10:90, v/v, 1 % 甲酸) 定容至 1.0 mL, 供 LC/MS-MS 分析。详细的固相萃取流程见下图-2。

No	Step	Source	Output	Flow e (mL/min)/Temp (°C)	Volume (mL)	Time (min)
1	Condition	CH3OH	Waste2	20	5	0.5
2	Condition	pH=4.0 formic...	Waste1	10	5	0.7
3	Load sample		Waste1	5	250	64.6
4	Rinse	pH=4.0 formic...	Waste1	20	10	0.8
5	Dry					14
6	Rinse Syringe	CH3OH		20	5	0.5
7	Elute	CH3OH	Collect	1	10	10.3
8	Air push		Collect	20	5	0.6
9	End					
10						

图 2. Fotector Plus 对水中磺胺类药物的固相萃取富集方法

3. 检测条件

3.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm × 2.1 mm × 50mm
流速	0.300 mL/min
流动相	A: 10mM ammonium acetic (0.1% formic acid), B: Methanol
柱温	35° C
进样体积	10 μL

检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350° C
簇电压	4000
雾化压力	35psi
梯度洗脱	0.0-1.5 min, 93% 流动相 A; 1.5-3.0 min, 60 %的流动相 A; 3.0-3.5 min, 10% 流动相 A, 保持 2 min; 5.50-6.0 min, 93%的流动相 A; 6.00-10.0 min, 93%的流动相 A。

3.2 MRM 参数

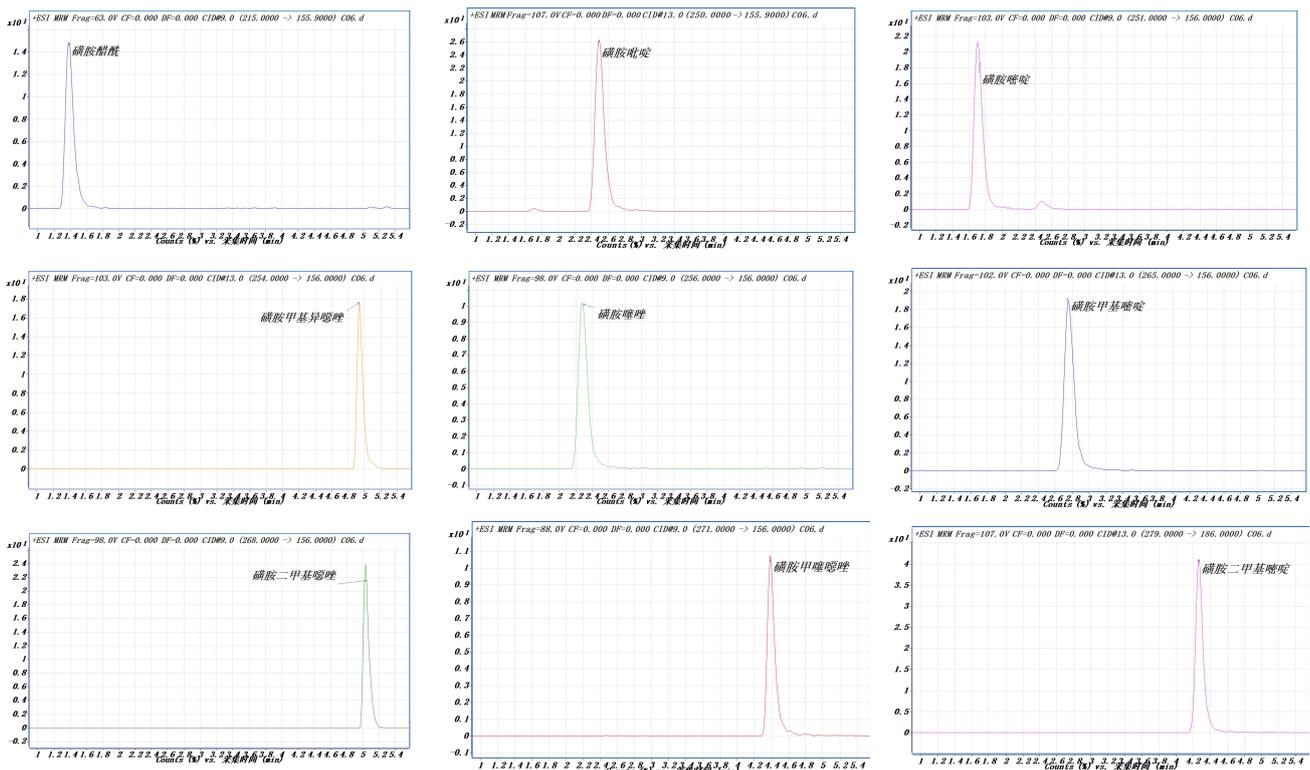
Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
磺胺醋酰	215	155.9	15	63	9	4
		108	15	63	17	4
磺胺嘧啶	251	185.1	15	103	13	4
		156	15	103	9	4
磺胺噻唑	256	156	15	98	9	4
		108.1	15	98	21	4
磺胺吡啶	250	184.1	15	107	13	4
		155.9	15	107	13	4
磺胺甲基嘧啶	265	172	15	102	13	4
		156	15	102	13	4
甲基苄胺	291	261.1	15	142	21	4
		230.1	15	142	21	4
磺胺二甲基嘧啶	279	186	15	107	13	4
		155.9	15	107	13	4
磺胺甲噻噁唑	271	156	15	88	9	4
		108	15	88	21	4
磺胺对甲氧嘧啶	281.1	126	15	112	21	4
磺胺 6-甲氧基嘧啶	281	215.1	15	117	13	4

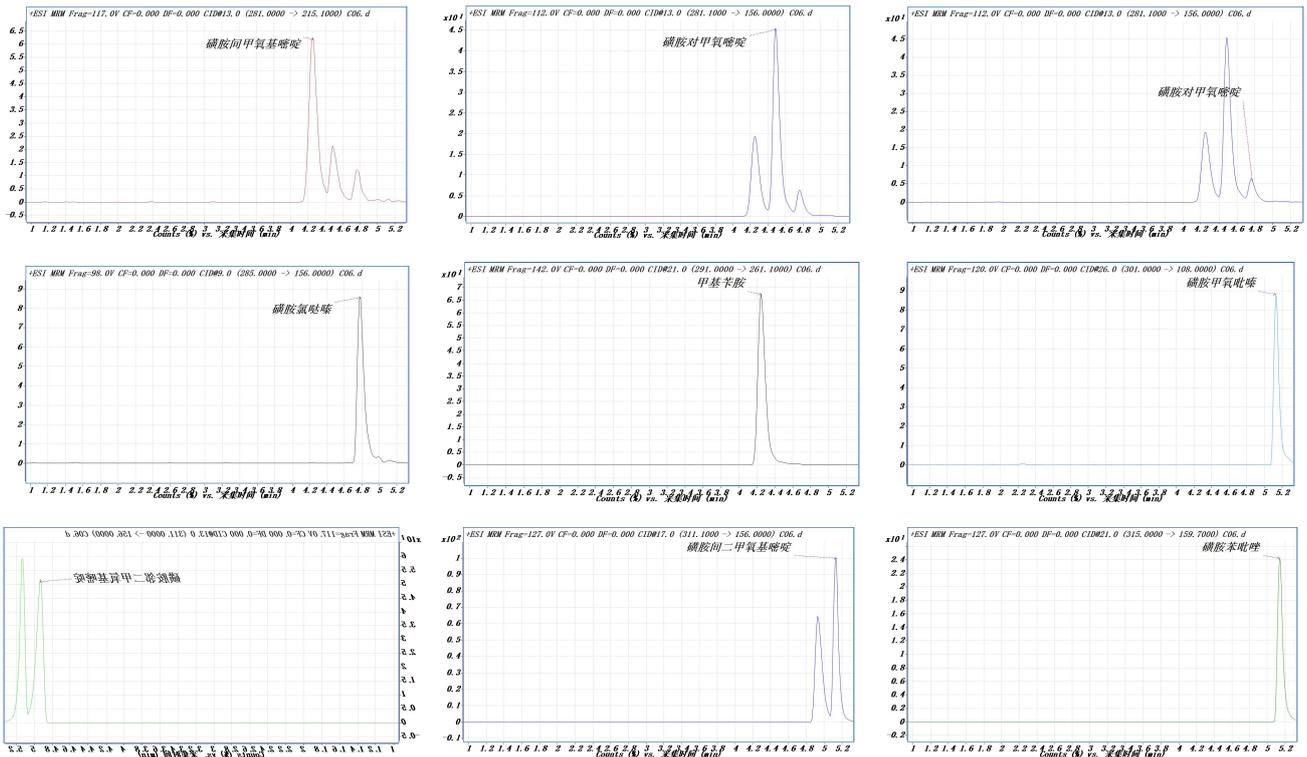
		156	15	117	13	4
磺胺甲氧哒嗪	281	156	15	107	13	4
		108	15	107	25	4
磺胺氯哒嗪	285	156	15	98	9	4
		108.1	15	98	21	4
磺胺间二甲氧基嘧啶	311.1	245.1	15	127	13	4
		156	15	127	17	4
磺胺邻二甲氧基嘧啶	311	156	15	117	13	4
		108	15	117	25	4
磺胺甲基异噻唑	254	156	15	103	13	4
		147.1	15	103	9	4
磺胺二甲基噻唑	268.1	156	15	105	12	4
		113.1	15	105	20	4
磺胺硝苯	336.1	294	15	130	10	4
		198	15	130	17	4

表 1. 18 种磺胺的串联质谱检测参数

3.3 色谱图

下图为 18 磺胺类化合物标准溶液 (20 ppb) 在液质中的色谱图:





4. 方法可行性验证

为了验证该方法的回收率，本实验向纯净水(200 mL)中加入上述 19 种磺胺类标准品(10 uL, 1 mg/L)进行加标回收验证(n=4)。测试结果如表-2 所

示，17 种磺胺的回收率在 80.00–120.00%之间，只有磺胺醋酰和甲基苄胺的回收率分别在 73.94%和 75.07%。19 种磺胺 4 平行样的相对标准偏差均控制在 15%以内。说明该方法能够很好地运用于水样中 19 种磺胺类样品的检测。

化合物 (Compound)	回收率 (%) 样品-1 Sample-1	回收率 (%) 样品-2 Sample-2	回收率 (%) 样品-3 Sample-3	回收率 (%) 样品-4 Sample-4	平均回收率 Average Recoveries (%)	RSD (%)
磺胺醋酰	76.12	71.42	72.48	75.73	73.94	3.17
磺胺嘧啶	102.04	111.53	82.20	88.42	96.05	13.78
磺胺噻唑	88.06	106.16	86.27	84.85	91.33	10.92
磺胺吡啶	91.66	114.36	90.79	97.87	98.67	11.07
磺胺甲基嘧啶	90.51	116.31	92.22	96.55	98.90	12.02
甲基苄胺	69.17	84.20	75.14	71.76	75.07	8.74
磺胺二甲嘧啶	99.44	108.02	99.53	87.70	98.67	8.46
磺胺甲噻噁唑	114.98	117.08	117.74	112.59	115.60	2.01
磺胺对甲氧嘧啶	102.96	117.69	94.35	96.66	102.92	10.20
磺胺邻甲氧嘧啶	102.96	117.69	90.61	86.66	99.48	14.06

磺胺甲氧哒嗪	104.92	115.71	100.90	89.26	102.70	10.64
磺胺氯哒嗪	89.10	98.40	91.74	97.00	94.06	4.65
磺胺间二甲氧嘧啶	106.12	114.66	96.60	88.92	101.58	11.03
磺胺邻二甲氧嘧啶	106.12	114.66	96.60	88.92	101.58	11.03
磺胺甲基异噁唑	105.28	114.09	97.87	90.44	101.92	9.93
磺胺二甲基噁唑	110.83	121.61	96.63	90.43	104.88	13.39
磺胺二甲氧基噁唑	110.83	121.61	96.63	90.43	104.88	13.39
磺胺喹噁啉	101.33	118.79	96.63	96.81	103.39	10.15
磺胺苯吡唑	78.56	93.02	96.63	71.24	84.86	14.11

表 2. 19 种磺胺的加标回收率及 RSD 值 (50 ng/L)

5. 结果与讨论

6.1 对于磺胺类的两性化合物，在 pH=7.0 左右时，主要以带负电荷的形式存在水溶液中，此时进行富集，固相小柱无法对目标物进行吸附。因此需要进行 pH 调节至 4.0 左右，使其羧酸根部分不电离，增强其在固相萃取柱上的吸附能力。

6.2 淋洗时采用甲酸酸化的水溶液，利于将固相萃取小柱中残留的 EDTA 除去，避免其在后续的洗脱液中干扰沙星类化合物的检测。

6.3 氮吹浓缩过程中应控制吹至近干，不可过分干燥。

6. 解决方案的优势

Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪能同步进行 6 个样品处理，自动连续处理 60 个样品，从活化、上样、淋洗到洗脱等多种基础命令全部实现自动化，大大提高了仪器精度和可靠性，保证了回收率。

Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪可自动完成对样品的快速，平行浓缩。



全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020年5月版