

关键词

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；磺胺类化合物

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，养殖业中常将磺胺类药物作为防治动物细菌性疾病而广泛使用。但是磺胺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，使其在动物源性食品中残留引起人类健康危害的潜在威胁已备受关注，如其存在的毒副作用，可使人产生脱敏性皮炎和肠胃问题，造血及肾脏损伤等，成为人类亟待解决的问题之一。

本方案参考《GB/T 22966-2008 牛奶和奶粉中16种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》，采用高氯酸溶液对目标化合物进行提取，HLB固相萃取柱净化，甲醇洗脱，液相色谱-质谱/质谱仪测定，外标法定量。整个方法具有良好的平行性与准确性，可用于对牛奶样品中磺胺类药物的检测。

1. 仪器与耗材

仪器和耗材

睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

睿科 Auto EVA 80 全自动平行浓缩仪

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

HLB 固相萃取柱 (RayCure, 60mg/3mL, 货号: RC-204-36473)

甲醇 (色谱纯), 超纯水

0.5%高氯酸溶液 (pH=2.0): 1000mL 水中加入 5mL 高氯酸, 再调节 pH=2

甲醇-乙酸溶液 (1+19): 量取 5mL 甲醇与 95mL 0.1%乙酸溶液混合

2. 样品制备及前处理

2.1 提取

称取 2g 牛奶样品于 50mL 离心管中, 加入 20mL 高氯酸溶液, 涡旋震荡提取 1min, 超声萃取 10min, 待净化。

2.2 固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科 Fotector Plus
固相萃取柱	HLB 柱 (RayCure, 60mg/3mL)
活化	甲醇, 高氯酸溶液
淋洗	超纯水
洗脱	甲醇

分别以 3mL 甲醇和 5mL 高氯酸溶液活化 HLB 柱, 将上述提取液以 2mL/min 的速度进行上样, 并用 5mL 高氯酸溶液清洗样品瓶。用 5mL 超纯水对固相萃取柱进行淋洗除去残留的酸和其他杂质, 用气推的方式将柱子推干。最后以 3mL 甲醇洗脱目标化合物 (具体方法设置见图 2)。将洗脱液用 EVA 80 全自动平行浓缩仪在 40℃ 条件下浓缩至约 0.2mL, 加入甲醇-乙酸溶液定容至 1mL, 涡旋混匀, 过滤膜上机分析。

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	甲醇				1.5
2	活化	甲醇	有机废液	2	3	1.9
3	活化	0.5%高氯酸	废水	2	5	2.9
4	上样		废水	2	22	12.4
5	清洗样品瓶	0.5%高氯酸	废水	60	5	3.4
6	淋洗	水	废水	2	5	2.9
7	气推		废水	80	40	2.8
8	清洗注射泵	甲醇		60	3	0.4
9	洗脱	甲醇	收集	1	3	3.4
10	气推		收集	1	2	2.4
11	气推		收集	20	10	1.3
12	结束					

图-1. Fotector Plus 固相萃取净化方法

3. 检测条件

3.1 色谱柱条件

表-2 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μ m \times 21 mm \times 50mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A:10mM ammonium acetic(0.1% formic acid),B: Methanol
柱温	35 $^{\circ}$ C
进样体积	10 μ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 $^{\circ}$ C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	0.0-1.5 min, 93%流动相 A; 1.51-3.0 min, 60%的流动相 A;3.01-5.5 min 10%流动相 A, 保持 2 min; 5.51-6.0 min,93%的流动相 A,6.01-10.0 min, 93%的流动相 A。

3.2 MRM 参数

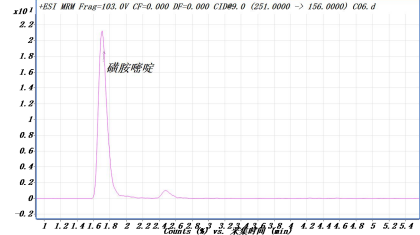
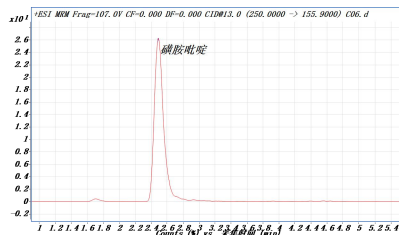
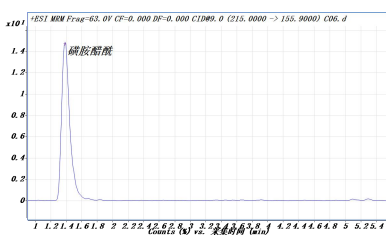
表-3. 16 种磺胺类抗生素串联质谱检测参数

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
甲氧苄氨嘧啶	291	261.1	15	142	21	4
		230.1	15	142	21	4
磺胺二甲嘧啶	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
磺胺邻二甲氧嘧啶	311	156	15	117	13	4
		108	15	117	25	4
磺胺甲基异噁唑	254	156	15	103	13	4
		147.1	15	103	9	4
磺胺二甲异噁唑	268	156	15	105	12	4
		113.1	15	105	20	4
磺胺喹噁啉	301	156	15	105	15	4
		208	15	105	9	4

3.3 色谱图

以下为 16 种磺胺类化合物标准品的质谱图：





4. 样品测试

4.1 基质效应验证

为了消除基质带来的离子抑制对定量测定的影响，本实验需用空白基质提取液来配制标准工作曲线。

4.2 样品基质加标测试

为了验证该方法的回收率，本实验向牛奶样品(2g)中加入 16 种磺胺类标准品(20 μ L, 1mg/L, n=3)进行加标回收验证，测试结果如表-4 所示。所有化合物的回收率在 79%–96%之间，RSD 值均小于 8%，说明该方法能够很好地用于牛奶样品中 16 种磺胺类抗生素的检测。取奶粉 1g，添加标准品(100 μ L, 1ppm)进行

上述样品前处理过程，实验结果如下表-2 所示。回收率在 87%–97%之间，RSD=4.76% (n=4)，符合回收率以

及相对标准偏差的要求。

表-4. 18 种磺胺的加标回收率及 RSD 值(20ng/L)

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	平均回收率 Average Recovery(%)	RSD(%)
磺胺醋酰	80.4	75.0	82.4	79.3	4.8
磺胺嘧啶	77.7	85.8	81.1	81.5	5.0
磺胺噻唑	95.6	87.3	82.0	88.3	7.8
磺胺吡啶	99.4	89.1	86.3	91.6	7.5
磺胺甲基嘧啶	92.9	84.5	84.8	87.4	5.5
甲氧苄胺嘧啶	97.3	89.2	87.2	91.3	5.8
磺胺二甲嘧啶	94.0	87.8	84.9	88.9	5.3
磺胺甲噻噁唑	92.8	84.8	83.4	87.0	5.8
磺胺对甲氧嘧啶	93.3	88.8	87.6	89.9	3.3
磺胺 6-甲氧嘧啶	91.6	87.3	82.3	87.1	5.4
磺胺甲氧哒嗪	92.1	85.4	80.7	86.1	6.6
磺胺氯哒嗪	87.9	83.5	81.0	84.1	4.2
磺胺邻二甲氧嘧啶	102.9	96.9	87.9	95.9	7.9
磺胺甲基异噁唑	91.2	89.3	85.7	88.8	3.2
磺胺二甲异噁唑	88.7	88.6	84.5	87.3	2.7
磺胺喹噁啉	91.0	86.7	82.6	86.8	4.9

5. 结果与讨论

牛奶中蛋白质含量比较高，本方法将高氯酸的浓度比例提高到 0.5%，可以更加有效的沉降蛋白，同时可减少提取液用量，节省过柱时间。

样品提取后若溶液比较浑浊，可以用高速离心机离心后再上全自动固相萃取仪过柱，防止堵塞 12 通阀或 SPE 小柱。

6. 总结

睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。

睿科 Auto EVA 80 全自动平行浓缩仪通过独特的针自动追随液面技术，可以极大地减少氮气使用量，同时避免手动氮吹需要经常去调节氮吹针高度带来的麻烦。



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.

智能化、自动化实验室整体解决方案

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

2021年10月版