

解决方案

水产品中磺胺类化合物的测定解决方案

关键词

全自动固相萃取；均质器；浓缩仪；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。水产养殖业中常将磺胺类药物作为防治细菌性竖鳞病、烂鳃病等广泛应用。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，使其在水产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。

本方案参考农业部1077号公告-1-2008《水产品中17种磺胺类及15种喹诺酮类药物残留的测定 液相色谱-串联质谱法》，采用酸化乙腈对目标化合物进行提取。由于标准中只进行了简单的除脂，提取液中仍含有大量的样品基质，容易干扰后续的液质测试。所以本方案采用HLB柱对提取液进行净化，使得整个检测结果更加具有平行性与可靠性。

1. 仪器与试剂

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站;

Raykol AH-30 全自动均质器;

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪;

Raykol MPE-16 高通量真空平行浓缩仪;

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪;

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

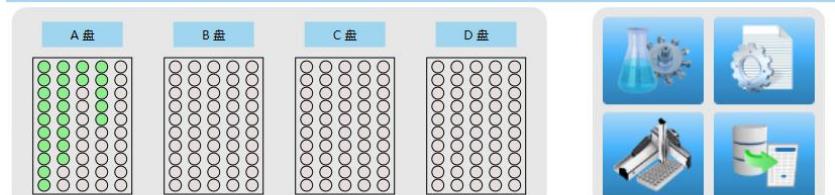
HLB 固相萃取柱 (RayCure HLB, 500 mg/6 mL, RC-204-36477);

甲醇 (优级纯), 水;

Na₂EDTA (0.1 mol/L) -McIlvaine (0.1 M) 缓冲溶液 (pH=4.0), 准确 60.2 g 乙二胺四乙酸二钠, 磷酸氢二钠 17.8 g 和柠檬酸 21.0 g 与烧杯中, 加入 1000 mL 的纯净水, 加入浓盐酸调节 pH 值至 4.0。如果该缓冲液在放置过程中易析出晶体, 那么请将浓度减半进行配制。

2. 标准溶液的配制

将 1000.0 μ g/mL 的单标储备液取出, 于室温平衡后用 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站配成浓度为 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 μ g/mL 的标准工作曲线。



序号	命令	源液位	源液浓度	源液体积(mL)	目标位	目标浓度	目标体积(mL)	溶剂	洗针溶剂
1	填充管路						3.00	10%乙腈水	
2	配液	A1-18	1000.00	1.50	A21	10.00	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
3	直接稀释	A21	10.00	1.00	A22	1.00	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
4	直接稀释	A22	1.00	1.00	A31	0.01	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
5	直接稀释	A22	1.00	1.00	A32	0.02	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
6	直接稀释	A22	1.00	1.00	A33	0.05	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
7	直接稀释	A21	10.00	1.00	A34	0.10	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
8	直接稀释	A21	10.00	1.00	A35	0.20	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
9	方法结束								

3. 样品前处理

3.1 固相萃取净化

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 甲酸水溶液
洗脱	甲醇

3.2 提取

准确称取搅碎后的新鲜鱼肉样品 5.0 g 于 50 mL 离心瓶中, 加入 2.0 g 无水硫酸钠, 加入 20 mL 酸

化乙腈进行提取, 用 AH-30 全自动均质器均质 1.0 min, 3800 rpm 离心 5.0 min, 重复一次。取上清液于 250 mL 分液漏斗中, 加入 15 mL 乙腈饱和的正己烷, 振摇 20 s, 静置取下层乙腈溶液。将所得乙腈溶液于 MPE-16 高通量真空平行浓缩仪浓缩至近干, 加入 10 mL Na₂EDTA (0.1 mol/L) -McIlvaine (0.1 M) 缓冲溶液 (pH=4.0), 摆匀备用。

分别以 5 mL 甲醇和 5 mL 甲酸水溶液 (pH4.0) 活化 HLB 柱 (Oasis 500 mg, 6 mL) 后, 将上述样品溶液以 2 mL/min 的速度进行上样, 并用 3 mL 的甲酸水溶液 (pH4.0) 溶液清洗样品瓶。以 20%的甲醇甲酸水溶液溶液 (pH4.0) 对固相萃取柱进行淋洗除去残留的无机盐和残留基质。在 20 psi 的氮气流下吹干 HLB 柱, 最后以 10 mL 的甲醇洗脱目标化合物 (具体的净化步骤请见图 2)。将所得洗脱液

用 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪浓缩至近干，加 上机测试。

入 10 %乙腈水溶液（含 0.1%甲酸）定容至 1 mL，

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	CH3OH		60	5	1.5
2	活化	CH3OH	废液1	5	5	1.4
3	活化	pH4.0 Form...	废液1	4	5	1.7
4	上样		废液1	3	10	4.1
5	清洗样品瓶	pH4.0 Form...	废液1	60	3	1.8
6	淋洗	Methol (20%...	废液1	5	5	1.4
7	气推		废液1	10	10	1.8
8	吹干					10
9	清洗注射泵	CH3OH		40	2	0.4
10	洗脱	CH3OH	收集	2	10	5.6
11	气推		收集	10	5	1.1
12	结束					

图2. Fotector Plus固相萃取净化方法

4. 检测条件

4.1 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 °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 °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。

4.2 MRM 参数

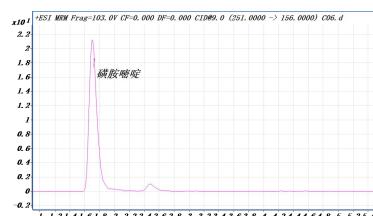
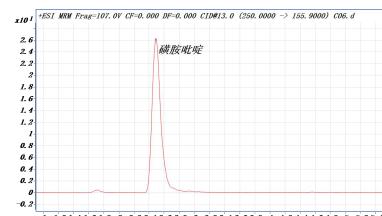
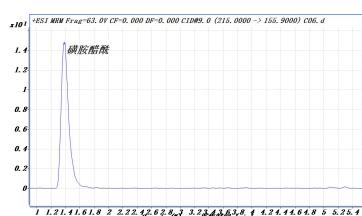
表 1. 18 种磺胺类抗生素串联质谱检测参数

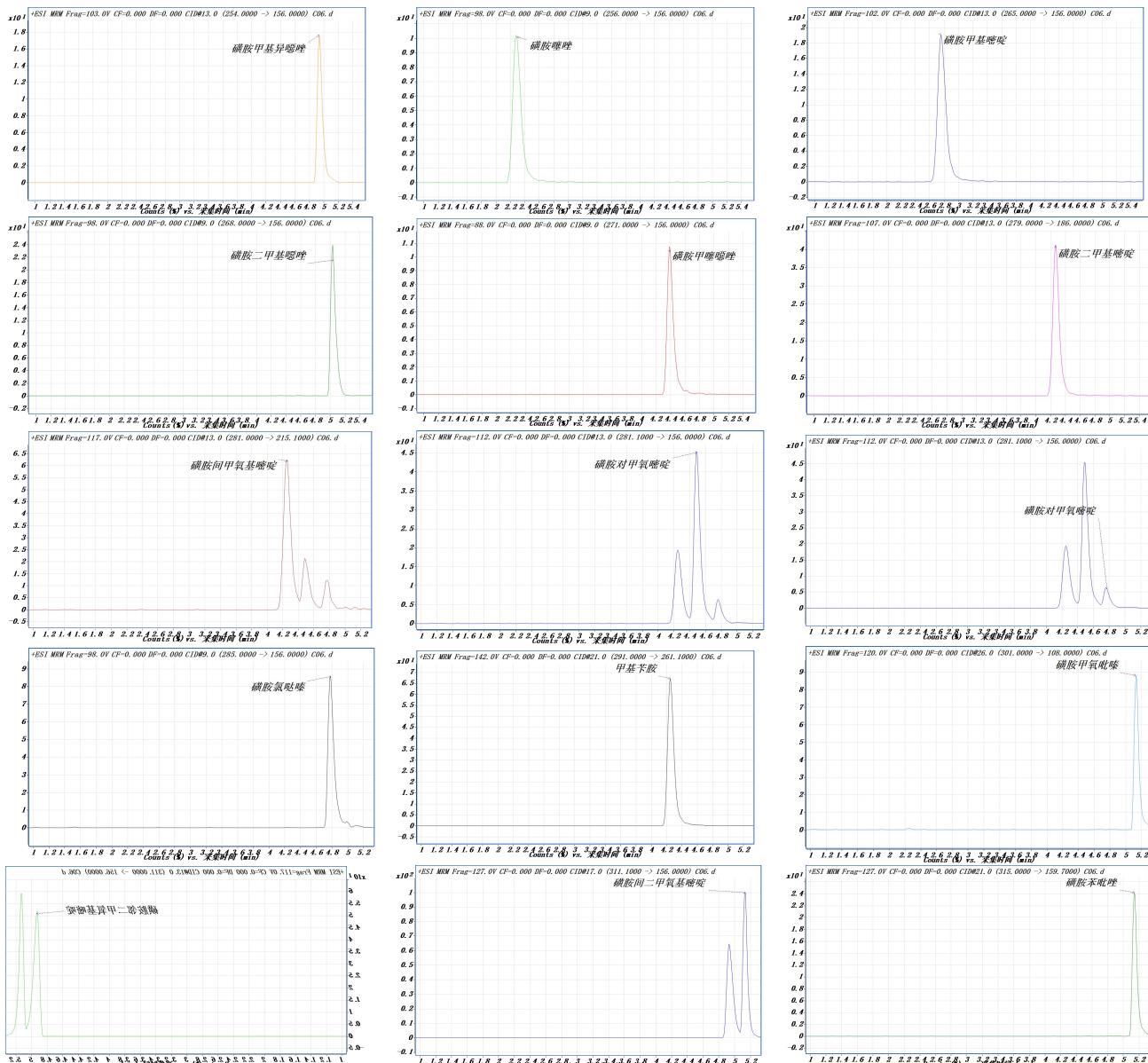
Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
磺胺醋酰	215	155.9	15	63	9	4

		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
磺胺甲基异噁唑	254	156	15	103	13	4
		147.1	15	103	9	4
磺胺二甲基噁唑	268	156	15	105	12	4
		113.1	15	105	20	4
磺胺苯吡唑	315	158	15	130	10	4
		159	15	130	17	4
磺胺喹噁啉	301	156	15	105	15	4
		208	15	105	9	4

4.3 色谱图

以下为 18 种磺胺类化合物标准品的色谱图：





5. 样品测试

5.1 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，需用空白样品提取液来配制标准工作曲线。如果基质加标浓度准确，则可以直接用标准曲线对样品进行定量；如果不准确，请使用基质加标做工作曲线进行定量。

选择定量离子的峰面积作为纵坐标，浓度作为横坐标，做相关曲线，曲线为线性回归，各点权重

相等，拟合出工作曲线，要求 $R^2 > 0.995$ ；此曲线两周需要重新配置一次。

5.2 样品基质加标测试

为了验证该方法的回收率，本实验向鳗鱼样品 (5 g)中分别加入上述 18 中磺胺类抗生素 (20 μ L, 1 mg/L, n=3) 进行加标回收验证，测试结果如表 2 所示。18 种磺胺类抗生素的回收率在 84–96% 之间，RSD 值均小于 10%，说明该方法能够很好地运用于水产品中 18 种磺胺类抗生素的检测。

表 2. 18 种磺胺的加标回收率及 RSD 值 (20 ng/L)

化合物 (Compound)	回收率 (%) 样品-1	回收率 (%) 样品-2	回收率 (%) 样品-3	平均回收率 Average	RSD (%)

	Sample-1	Sample-2	Sample-3	Recovery (%)	
磺胺醋酰	101.36	95.04	93.83	96.74	4.18
磺胺嘧啶	97.67	85.82	81.12	88.20	9.67
磺胺噻唑	95.59	87.27	82.01	88.29	7.75
磺胺毗啶	99.44	89.13	86.31	91.63	7.54
磺胺甲基嘧啶	92.89	84.50	84.78	87.39	5.45
甲基苄胺	97.27	89.24	87.22	91.25	5.83
磺胺二甲嘧啶	94.02	87.77	84.89	88.89	5.25
磺胺甲噻唑唑	92.77	84.78	83.41	86.99	5.81
磺胺对甲氧嘧啶	93.25	88.79	87.59	89.88	3.32
磺胺邻甲氧嘧啶	91.64	87.29	82.25	87.06	5.40
磺胺甲氧哒嗪	92.10	85.41	80.74	86.09	6.63
磺胺氯哒嗪	87.86	83.50	80.97	84.11	4.15
磺胺间二甲氧嘧啶	97.13	90.29	81.86	89.76	8.53
磺胺邻二甲氧嘧啶	102.92	96.92	87.91	95.92	7.88
磺胺甲基异噻唑	91.23	89.34	85.72	88.76	3.15
磺胺二甲基噻唑	88.69	88.64	84.53	87.29	2.73
磺胺喹噁啉	91.03	86.70	82.55	86.76	4.89
磺胺苯毗唑	97.45	95.33	87.83	93.54	5.40

6. 结果与结论

7.1 水产品及其制品成分复杂，应采用 20% 的酸化甲醇进行淋洗，可以有效地除去部分杂质，降低样品分析步骤的基质抑制效应。

7.2 洗脱液氮吹应至近干，磺胺和沙星类化合物的回收率稳定。但氮吹时间如果过长，样品浓缩干燥，则待测化合物可能以固态颗粒的形式随着氮吹气流飞走而损失。

7. 解决方案的优势

睿科 AH-30 全自动均质器实现多任务的高通量均质，完全取代了手动均质的过程。一次最多处理 32 个样品，大大提高工作效率。

睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作

站能够实现混标制备、标准曲线制备、样品添加和分液等液体样品处理功能，全程无需人员值守，极大减轻工作量并且保护实验人员的身体健康；同时仪器程序化运行可以有效避免人为误差，保证曲线的精密度和准确性。

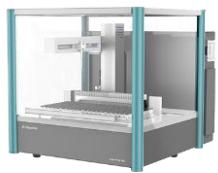
Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，可以排除人员操作带来的误差，从活化到上样、洗脱一步到位，六通道同时进行；同时 Fotector Plus 能够实现高通量处理，最多一天能够处理 180 个样品，省时省力，真正为批量检测提供帮助。

MPE 真空平行浓缩仪/AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪，大大地提高了样品前处理效率，真正完全解放实验室人员劳动。



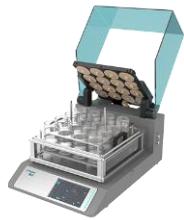
全自动均质器

均质



全自动液体样品处理工作站

标曲配制



高通量真空平行浓缩仪

预浓缩



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