

摘要

依据农业部 1025 号公告-23-2008 动物源食品中磺胺类药物残留检测液相色谱-串联质谱法，建立基于 Fotector-06 固相萃取分析猪肉中磺胺类药物的检测方法，试样用乙酸乙酯提取后加入盐酸溶液萃取，使用 Fotector-06 进行阳离子交换固相萃取柱净化后，用液相色谱-质谱/质谱法测定和确证，外标法定量，回收率于 60%-110%之间，RSD<6(n=3)

简介

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，其中应用较广有几十种。但是磺胺类药物在摄入体内后主要经肝脏代谢灭活，形成乙酰化代谢物后经尿排出。由于上述化合物一旦溶解度降低，易在尿液中析出，从而伤及尿路，所以，可能导致血尿、结晶尿及肾脏损害，近年来世界各国都加大了对动物源性食品中磺胺类药物残留的检测。

仪器与耗材

Reeko Fotector-06 全自动固相萃取仪，液质联用仪 Agilent 1260+Agilent 6410 ESI, 氮气吹干装置。

Waters MCX 固相萃取柱 (60mg/3mL)，乙酸乙酯 (色谱纯 TEDIA)、正己烷 (色谱纯 TEDIA)、甲醇 (色谱纯 TEDIA)、乙腈 (色谱纯 TEDIA)、甲酸、盐酸、氨水。

标准品：纯度 ≥99%，磺胺甲恶唑、胺甲噻二唑、磺胺吡啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺二甲基异嘧啶、磺胺醋酰、磺胺二甲异恶唑、磺胺邻二甲嘧啶。

实验方法

称取匀浆好的猪肉样品 5g 于 50mL 离心管中，加入 15mL 乙酸乙酯，涡动 2min，5000r/min 离心

10min，将上清液经无水硫酸钠层转移到鸡心瓶/Fotector 上样瓶中，残渣用同样的方法再提取一次；向提取液中加入 0.1M 的盐酸溶液 5mL，45℃下将乙酸乙酯蒸干，将盐酸层转移到一 10mL 离心管中，鸡心瓶/Fotector 上样瓶用 2 次 2mL 0.1M 盐酸洗涤，合并；再用 5mL 正己烷洗涤，倒入盐酸中手动震荡 20 次，3500r/min 离心 5min，弃去正己烷层，用 3mL 正己烷重复一次，将盐酸层全部转移至洁净的 Fotector 上样瓶中，并用 3mL 0.1M 盐酸分两次洗涤离心管，洗涤液并入上样瓶中；将 MCX 小柱固定在 Fotector-06 上，按照图 1 进行固相萃取净化。

No.	操作命令	溶剂	流速 (ml/min)	体积 (ml)	时间 (min)	排出
1	活化	甲醇	1.0	2	2.2	废液1
2	活化	0.1M盐酸	1.0	2	2.2	废液2
3	上样		1.0	10	11.0	废液1
4	清洗样品瓶	0.1M盐酸	100.0	5	6.1	废液1
5	淋洗	0.1M盐酸	1.0	2	2.2	废液1
6	淋洗	淋洗2	1.0	2	2.2	废液1
7	吹干				5.0	
8	洗脱		0.5	2	4.2	收集试管
9	气推		10.0	10	0.3	收集试管
10	浓缩样品				15.0	
11	结束				50.4	

注：淋洗 2 为水；甲醇：乙腈=55:25:20；洗脱为水；甲醇：乙腈：氨水=75:10:10:5

图 1 Fotector-06 运行程序

实验结果与讨论

1. 13 种磺胺类药物在质谱上都有很好的响应(图 2)

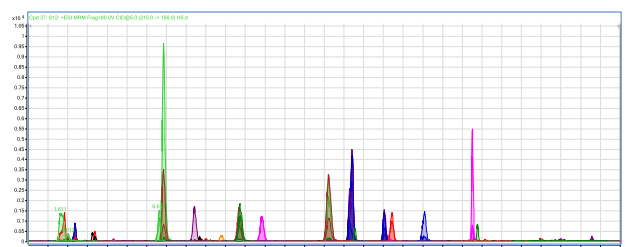


图 2 13 种磺胺类标准品(20ng/mL)MRM 图谱

2. 在 4ng/mL 的加标水平下，样品经过前处理提取，萃取后，用 Fotector-06 净化，通过 S/S5 (S5 为基底加标) 排除基底对实验结果的干扰，回收率在

60%~110%之间，RSD<6 (n=3)，满足标准对回收率的要求，回收率如表 1 所示。

表 1 加标回收率 (%)

化合物	S01	S02	S03	S04	Avg	RSD
磺胺甲恶唑	76.8	79.8	79.5	86.8	78.7	1.6
胺甲噻二唑	79.2	86.3	74.6	93.3	80.0	5.9
磺胺吡啶	72.4	73.4	80.7	93.2	75.5	4.5
磺胺氯哒嗪	76.1	85.0	77.5	87.1	79.5	4.8
磺胺甲基嘧啶	72.5	78.7	68.3	86.0	73.2	5.2
磺胺二甲氧嘧啶	80.6	77.4	86.2	91.3	81.4	4.4
磺胺间甲氧嘧啶	63.3	69.7	73.4	88.5	68.8	5.1
磺胺对甲氧嘧啶	66.9	72.7	69.9	86.5	69.8	2.9
磺胺二甲基嘧啶	70.3	77.1	80.3	97.6	75.9	5.1
磺胺二甲基异嘧啶	68.0	61.7	63.8	89.0	64.5	3.2
磺胺醋酰	102.5	109.4	105.0	112.7	105.6	3.5
磺胺二甲异恶唑	99.4	89.2	94.2	101.9	94.3	5.1
磺胺邻二甲嘧啶	80.1	89.1	84.2	93.9	84.5	4.5

3.S4 为进行固相萃取之间加标，得出的回收率处于 86%~110%之间，证明 Fotector-06 固相萃取系统对实验结果影响很小；

4. 乙酸乙酯提取液需过一下无水硫酸钠转移到鸡心瓶中或者是 Reeko 上样瓶中，因为转移乙酸乙酯层时会有基底残渣，在正己烷除脂时容易形成胶状层，使得水相与正己烷相难以分层。

5. 0.1M 盐酸溶液可以在乙酸乙酯被蒸干后再加入 Reeko 上样品/鸡心瓶中将残渣溶解，因为在氮吹/旋转蒸发过程中有可能将 HCL 蒸出，影响样品的溶液 PH 值，导致回收率降低。

6. Fotector-06 能够自动的完成整个固相萃取流程，从活化到上样，清洗样品瓶，洗脱，浓缩一步到位，省时省事。

7.Fotector-06 将固相萃取的每个流程自动化，减小了人工操作带来的误差，获得了手动固相萃取无法达到的 RSD 水平。

结论

利用 Reeko Fotector-06 自动固相萃取系统能够很好的重现《农业部 1025 号公告-23-2008 动物源食品中磺胺类药物残留检测液相色谱—串联质谱法》，回收率在 60%~110%之间 RSD<6，符合农业部 1025 号公告-23-2008 中对回收率与 RSD 的要求。