

Определение 19-ти сульфаниламидных антибиотиков в воде

Ключевые слова:

Автоматизированная система ТФЭ, ВЭЖХ-МС, антибиотики, Fotector Plus, Auto EVA-60

Введение

Сульфониламиды

(СА) название класса препаратов со структурой п-аминобензолсульфонамида. Это класс химиотерапевтических препаратов, применяемы для профилактики и лечения бактериальных инфекционных заболеваний. Существуют тысячи видов СА, среди которых есть десятки типов, которые широко используются и имеют определенные лечебные эффекты. Распространённые сульфаниламидные препараты показаны на рис.1. Сульфонамидные препараты представляют собой тип антибактериальных и противовоспалительных препаратов, обычно используемых в современной медицине. Существует много разновидностей СА. Сульфониламидные препараты могут вызывать аллергические реакции и могут быть канцерогенными. Нерациональное использование этих препаратов привело к тому, что их остаточные содержания в продуктах животного происхождения уже наносят сред окружающей среде, кроме того, они способны вызывать аллергический дерматит, проблемы ЖКТ, нарушение процесса кроветворения, проблемы с почками и др. Стоки ферм и скотобоев часто содержат высокие концентрации сульфаниламидных препаратов, поэтому растёт потребность в постоянном контроле качества проб воды.

1. Инструменты и расходные материалы

- Автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus
- Автоматизированный упариватель в токе азота AutoEVA-60
- Картридж ТФЭ HLB (RayCure HLB, 200 мг/6 мл RC-204-36476 или 500 мг/6 мл RC-204-36477)
- ВЭЖХ Agilent 1260, масс-спектрометрический детектор (МС) Agilent 6410
- Метанол, муравьиная кислота, аммиак (хч)

2. Базовые приготовления

2.1 Условия проведения ТФЭ

Система ТФЭ	Fotector Plus высокопроизводительная автоматизированная
Картридж ТФЭ	HLB (RayCure, 500 mg/6 mL)

Кондиционирование Промывка Элюирование	Метанол
	Водный раствор муравьиной
	Метаноловый раствор

2.2 Экстракция и концентрирование

Кондиционируйте/уравновесьте и промойте картридж ТФЭ метанолом (10 мл) и водой (10 мл) со скоростью 5,0 мл/мин. Отложите в сторону. Возьмите 200 мл образца чистой воды, добавьте буферный растворитель EDTA-McIlvaine (50 мл, 0,1 моль/л), чтобы довести pH водной среды примерно до 4,30, и пропустите через картридж ТФЭ со скоростью 5 -7 мл/мин; Элюируйте 10 мл водного раствора муравьиной кислоты (pH=4,0) со скоростью 10 мл/мин; после продувки воздухом используйте 10 мл метанола для элюирования со скоростью 1,0 мл/мин. Собранные экстракты упарьте почти досуха при 35 °С и давлении 5 фунтов на квадратный дюйм, а раствор подвижной фазы ацетонитрил-вода (10:90, об./об., 1% муравьиной кислоты) доведите до 1,0 мл для анализа ЖХ/МС-МС. Подробный процесс ТФЭ показан на рисунке 2 ниже.

номер	этап	растворитель	слив	скорость потока (мл/мин)	объем (мл)	время (мин)
1	кондиционирование	СНЭОН	слив-2	20	5	0.5
2	кондиционирование	pH=4.0 formic...	слив-1	10	5	0.7
3	загрузка образца		слив-1	5	250	64.6
4	промывка	pH=4.0 formic...	слив-1	20	10	0.8
5	сушка					14
6	промывка шприца	СНЭОН		20	5	0.5
7	элюирование	СНЭОН	сбор	1	10	10.3
8	продувка		сбор	20	5	0.6
9	окончание программы					
10						

Рисунок 2. Проведение ТФЭ Fotector Plus сульфаниламидов в воде

3. Условия анализа

3.1 Условия колонки

Колонка	Waters XBridge BEH HILIC 2.5µm×2.1 mm×50mm
Скорость потока	0.300 mL/min
Мобильная фаза	A: 10mM ammonium acetic (0.1% formic acid), B: Methanol
Температура колонки	35°C
Объем впрыска	10 µL

Детектор	Agilent 6410
Ионный режим	ESI ⁺
Продувочный газ	11 L/min
Температура азота	350°C
Напряжение кластера	4000
Давление распыления	35psi
Градиентное элюирование	0,0-1,5 мин, 93% подвижной фазы А, 1,5-3,0 мин, 60% подвижной фазы А; 3,0-3,5 мин, 10% подвижной фазы А, выдержка 2 мин, 5,50-6,0 мин, 93% подвижной фазы А, 6,00-10,0 мин, 93% подвижной фазы А.

3.2 Параметры MRM

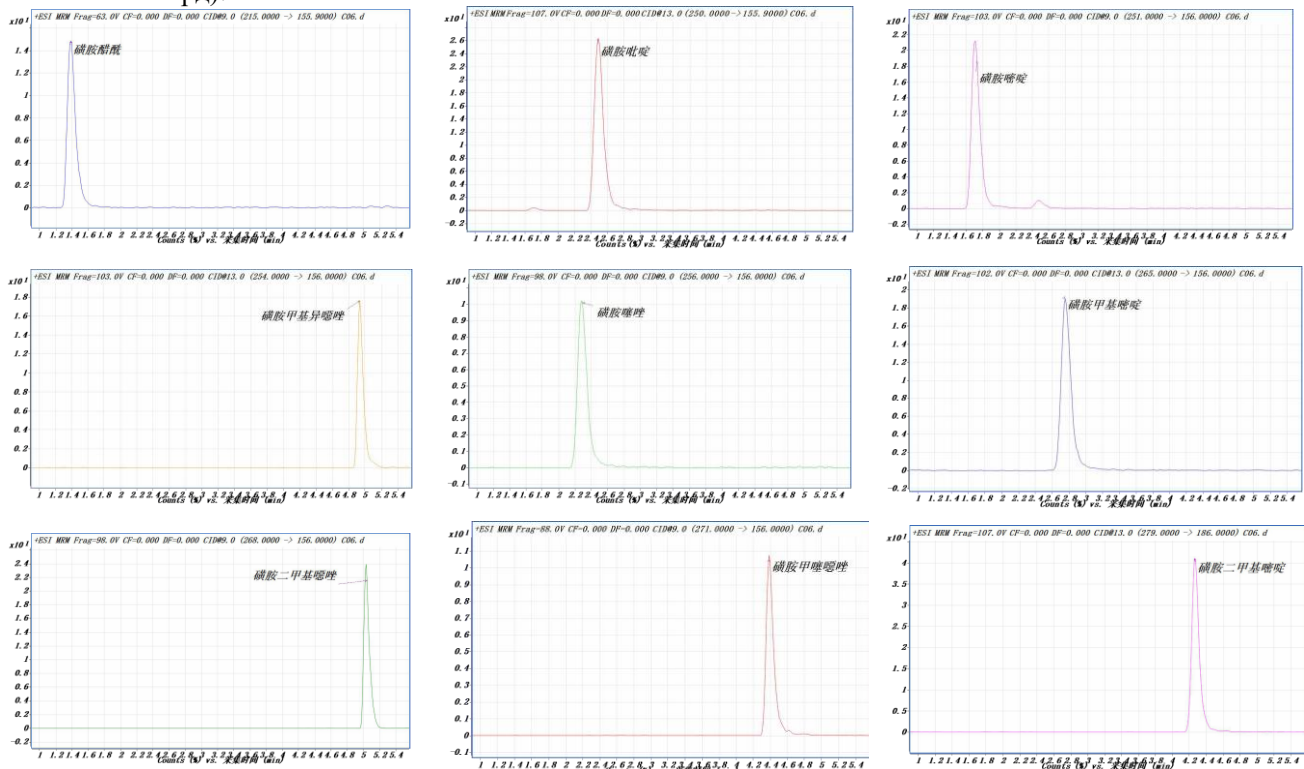
Компонент	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
сульфацетил	215	155.9	15	63	9	4
		108	15	63	17	4
сульфадиазин	251	185.1	15	103	13	4
		156	15	103	9	4
Сульфатиазол	256	156	15	98	9	4
		108.1	15	98	21	4
Сульфапиридин	250	184.1	15	107	13	4
		155.9	15	107	13	4
сульфаметилпиримидин	265	172	15	102	13	4
		156	15	102	13	4
Метилбензиламин	291	261.1	15	142	21	4
		230.1	15	142	21	4
Сульфадиметин	279	186	15	107	13	4
		155.9	15	107	13	4
Сульфаметоксазол	271	156	15	88	9	4
		108	15	88	21	4
сульфаниламид	281.1	126	15	112	21	4
Сульфонамид 6-метоксипиримидин	281	215.1	15	117	13	4

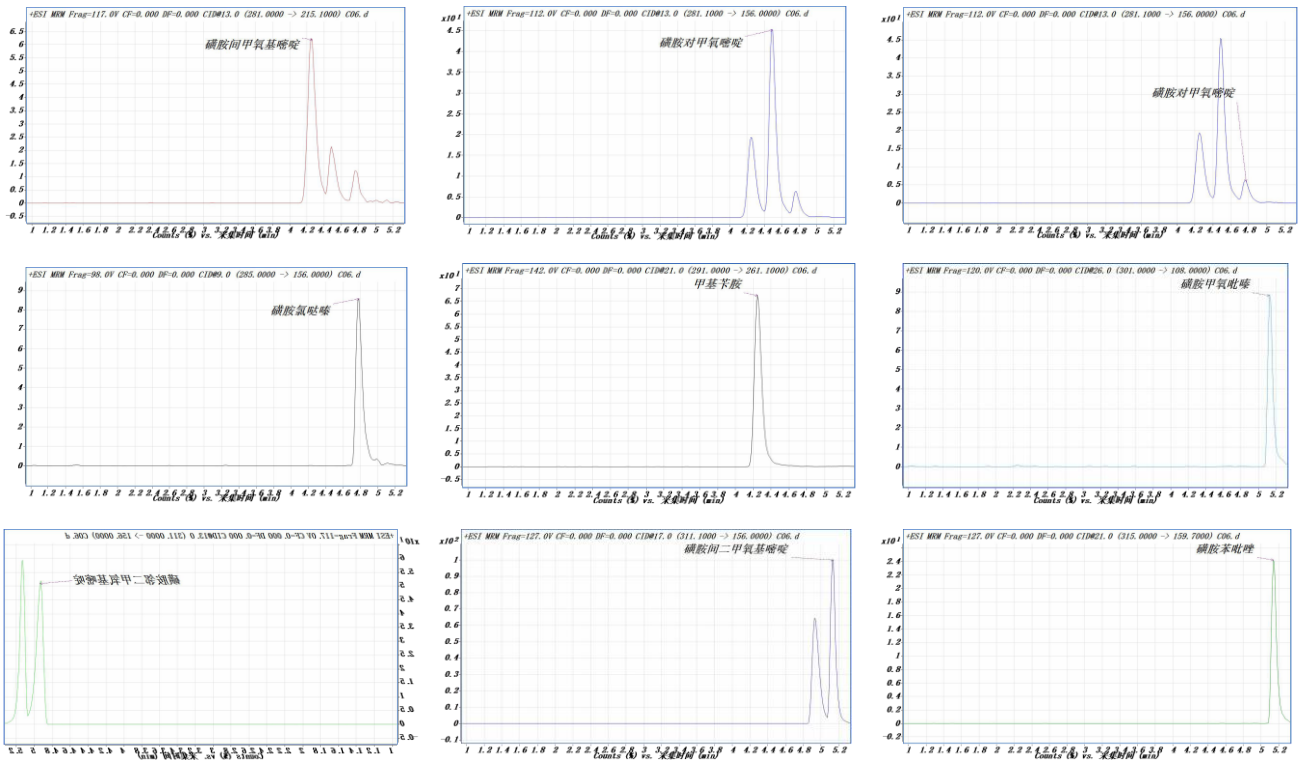
сульфаметоксипиридазин	281	156	15	117	13	4
		156	15	107	13	4
Сульфалорпиридазин	285	108	15	107	25	4
		156	15	98	9	4
сульфаметоксипримидин	311.1	108.1	15	98	21	4
		245.1	15	127	13	4
Сульфа-диметоксипримидин	311	156	15	127	17	4
		156	15	117	13	4
Сульфаметоксазол	254	108	15	117	25	4
		156	15	103	13	4
Сульфадиметилотксазол	268.1	147.1	15	103	9	4
		156	15	105	12	4
сульфаниламид	336.1	113.1	15	105	20	4
		294	15	130	10	4
		198	15	130	17	4

Таблица 1. Параметры обнаружения 18 сульфаниламидов тандемной масс-спектрометрией

3.3 Хроматограмма

На рисунке ниже представлена хроматограмма стандартного раствора 18-сульфонамидного соединения (20 частей на миллиард):





4. Проверка осуществимости метода

Чтобы проверить степень извлечения этого метода, в этом эксперименте были добавлены вышеуказанные 19 стандартов сульфонамидов (10 мкл, 1 мг/л) к очищенной воде (200 мл) для проверки извлечения стандартных добавок (n = 4). Результаты испытаний показаны в Таблице-2.

Он показывает, что степень извлечения 17 видов сульфонамидов составляет 80,00-120,00%, и только степень извлечения сульфонамида ацетила и метилбензиламина составляет 73,94% и 75,07% соответственно. Относительные стандартные отклонения 19 параллельных образцов сульфата-4 находились в пределах 15%. Это показывает, что этот метод может быть хорошо применен для обнаружения 19 видов сульфаниламидов в пробах воды.

Состав	Скорость восстановления(%)				Ср. скорость восстановления Average Recoveries (%)	RSD(%)
	Образец-1	Образец-2	Образец-3	Образец-4		
сульфацетил	76.12	71.42	72.48	75.73	73.94	3.17
сульфадиазин	102.04	111.53	82.20	88.42	96.05	13.78
Сульфатиазол	88.06	106.16	86.27	84.85	91.33	10.92
Сульфапиридин	91.66	114.36	90.79	97.87	98.67	11.07
сульфаметилпиримидин	90.51	116.31	92.22	96.55	98.90	12.02
Метилбензиламин	69.17	84.20	75.14	71.76	75.07	8.74
сульфаметазин	99.44	108.02	99.53	87.70	98.67	8.46
Сульфаметоксазол	114.98	117.08	117.74	112.59	115.60	2.01
сульфонамид п-метоксиимидин	102.96	117.69	94.35	96.66	102.92	10.20
сульфа-метоприм	102.96	117.69	90.61	86.66	99.48	14.06

сульфаметоксипиридазин	104.92	115.71	100.90	89.26	102.70	10.64
Сульфаклорпиридазин	89.10	98.40	91.74	97.00	94.06	4.65
сульфаметоксин	106.12	114.66	96.60	88.92	101.58	11.03
сульфаметоксазин	106.12	114.66	96.60	88.92	101.58	11.03
Сульфаметоксазол	105.28	114.09	97.87	90.44	101.92	9.93
Сульфадиметилксазол	110.83	121.61	96.63	90.43	104.88	13.39
Сульфадиметоксиксазол	110.83	121.61	96.63	90.43	104.88	13.39
Сульфахиноксалин	101.33	118.79	96.63	96.81	103.39	10.15
Сульфафеназол	78.56	93.02	96.63	71.24	84.86	14.11

Таблица 2. Повышенное извлечение и значения RSD 19 сульфонамидов (50 нг/л)

5. Результаты и обсуждение

6.1 Амфотерные соединения, такие как сульфаниламиды, при $pH=7,0$ или около того, в основном существуют в водном растворе в отрицательно заряженной форме, поэтому картридж ТФЭ не может адсорбировать целевое соединение. Следовательно, pH необходимо довести примерно до 4,0, чтобы предотвратить ионизацию карбоксилатной части и повысить ее адсорбционную способность на сорбенте картриджа.

6.2. Во время элюирования используйте водный раствор, подкисленный муравьиной кислотой, чтобы облегчить удаление остаточной ЭДТА в картридже ТФЭ и предотвратить ее влияние на обнаружение соединений флоксацина в последующем элюенте.

6.3 Упаривание проводили в системе упаривания в токе азота почти до сухого состояния, однако не следует пересушивать пробу.

6. Преимущества решения

Высокопроизводительная, автоматизированная система твердофазной экстракции Fotector Plus может обрабатывать 6 образцов одновременно, максимальная загрузка системы – 60 образцов. В системе полностью автоматизированы основные этапы метода ТФЭ: кондиционирование картриджа, загрузка, промывка, элюирование и т. д., что значительно повышает эффективность.

Автоматизированный упариватель в токе азота Auto EVA-60 автоматически выполняет быстрое, параллельное концентрирование образцов.



Система ТФЭ
Очистка



Система упаривания в токе азота
Концентрирование



Ведущий поставщик решений для автоматизированной пробоподготовки