

关键词

全自动固相萃取；均质器；浓缩仪；高效液相色谱-串联质谱法；四环素抗生素

介绍

四环素类抗生素（图1）是由放线菌产生的一类广谱抗生素，由于实用性高且价格低廉，在畜禽养殖和饲料添加剂等方面得到了广泛的应用。近年来，我国水产养殖业发展迅速，鱼类疾病越来越复杂，渔药和抗生素饲料添加剂的使用量也日渐增加。由于药物滥用，导致了水产品中有大量的抗生素残留，严重影响了水产品的质量安全。如果人类长期食用这种抗生素残留的水产品，可能导致牙齿变黄，形成“四环素牙”，甚至会使指甲和巩膜变色，对身体健康产生严重伤害。

本实验参考国标GB/T 21317-2007《动物源性食品中四环素类兽药残留量检测方法 液相色谱-串联质谱法与高效液相色谱法》，建立了基于Raykol Fotector Plus固相萃取分析水产品中四环素类抗生素的检测方法。



图1. 四种四环素类抗生素结构图

1. 仪器与试剂

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol MPE 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/6mL,

RC-204-36477)

甲醇 (优级纯), 水;

Na₂EDTA (0.1 mol/L) -McIlvaine (0.1 M) 缓冲溶液 (pH4.0), 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。

2. 标准溶液的配制

将 1000.0 µg/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 0.02、0.04、0.10、0.20、0.50 µg/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								
2	配液	A1-4	1000.00	1.50	A21	10.00	3.00	30%甲醇水	30%甲醇水
3	直接稀释	A21	10.00	1.00	A22	1.00	1.00	30%甲醇水	30%甲醇水
4	直接稀释	A22	1.00	1.00	A31	0.02	1.00	30%甲醇水	30%甲醇水
5	直接稀释	A22	1.00	1.00	A32	0.04	1.00	30%甲醇水	30%甲醇水
6	直接稀释	A21	10.00	1.00	A33	0.10	1.00	30%甲醇水	30%甲醇水
7	直接稀释	A21	10.00	1.00	A34	0.20	1.00	30%甲醇水	30%甲醇水
8	直接稀释	A21	10.00	1.00	A35	0.50	1.00	30%甲醇水	30%甲醇水
9	方法结束								

3. 样品前处理

3.1 提取

方法 1: 称取 5 g 匀浆好的新鲜鱼肉样品于 50 mL 离心管中, 分别用 20 mL、20 mL、10 mL 上述 Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液漩涡 1 min, 冰水浴超声 10 min, 提取三次; 3000 r/min 离心后合并上清液, 定容至 50 mL, 混匀。再次以 6000 r/min 离心 (温度低于 15 °C), 用快速滤纸过滤; 准确量取 10 mL 上清液转移至 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪上样瓶中待净化。

方法 2: 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 乙腈进行提取, 用 AH-30 全自动均质器均质 1.0 min, 4000 rpm 离心 5.0 min, 取上清液于 250 mL 分液漏斗中。残渣用 20 mL 乙腈重复提取一次, 合并 2 次提取液。往分液漏斗中加入 20 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 高通量真空平行浓缩仪浓缩至近干, 加入 10 mL 的 Na₂EDTA(0.1 mol/L)-McIlvaine (0.1 M) 缓冲溶液 (pH=4.0), 摇匀备用。

3.2 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 甲酸水溶液
洗脱	甲醇溶液

3.3 净化

分别以 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化 HLB 柱 (Oasis 500 mg/6 mL) 后, 将上述提取液以 1 mL/min 的速度进行上样, 并用 3 mL 水清洗样品瓶。以 5 mL 水和 5 mL 5% 甲醇水对固相萃取柱进行淋洗。在 20 psi 的氮气流下吹干 HLB 柱, 最后以 10 mL 甲醇洗脱目

标化合物（具体的净化步骤请见图 2）。将所得洗脱液在 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪上浓缩至近干，以 30% 甲醇水溶液定容至 1 mL，上机测试。

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				4.3
2	活化	CH3OH	有机废液	5	5	1.4
3	活化	H2O	有机废液	5	5	1.4
4	上样		有机废液	1	10	10.8
5	清洗样品瓶	H2O	有机废液	60	3	3.8
6	淋洗	H2O	有机废液	2	5	2.9
7	淋洗	5%CH3OH-H2O	有机废液	2	5	2.9
8	气推		有机废液	80	10	0.9
9	吹干					5
10	清洗注射泵	CH3OH		40	5	0.6
11	洗脱	CH3OH	收集	2	10	5.6
12	气推		收集	80	10	0.9
13	结束					
14						

图 2. Fotector Plus 四环素固相萃取净化方法

4. 检测条件

4.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μ m \times 2.1 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	0.0-0.50 min, 80%流动相 A; 0.50-2.0 min, 30%流动相 A; 2.0-4.0min, 30%流动相 A; 4.00-4.10 min, 90%流动相 A; 4.10-7.0min, 90%流动相 A。

4.2 MRM 参数

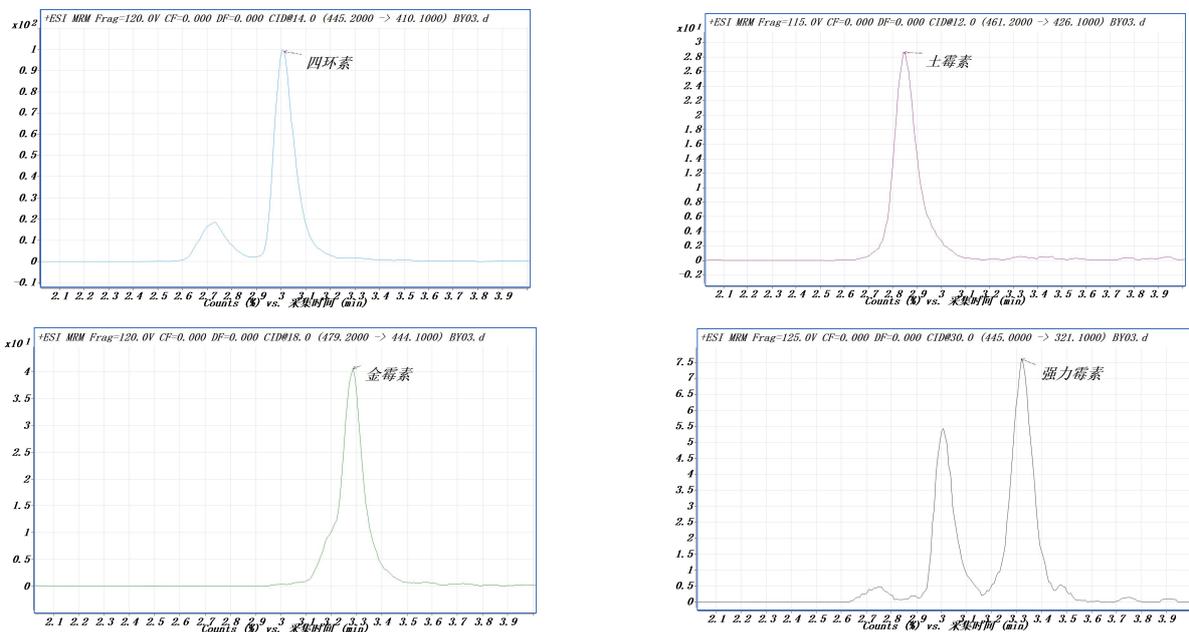
表 1.4 种四环素的串联质谱检测参数

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
四环素	445.2	427.1	40	120	6	7
		410.1	40	120	14	7

		154	40	120	26	7
土霉素	461.2	443.2	40	115	8	7
		426.1	40	115	12	7
金霉素	479.2	444.1	40	120	18	7
		462	40	120	12	7
强力霉素	445	428.1	40	125	14	7
		321.1	40	125	30	7
		267.1	40	125	38	7

4.3 MRM 色谱图

下图为四种四环素类化合物标准溶液在液质上的质谱图：



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，本实验向新鲜鱼肉样品 (5 g) 中加入上述 4 种四环素类标准品 (40 μL , 1 mg/L)，进行加标回收验证 ($n=3$)。测试结果如表-2 所示，4 种四环素回收率在 75-115% 之间，RSD 值均控制在 10% 以内。说明该方法能够很好地运用于水产品中 4 种四环素的检测。

表 2. 新鲜鱼肉中的加标回收率及 RSD 值 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

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 Recoveries (%)	RSD (%)
四环素	111.94	102.13	113.26	109.11	5.57

土霉素	110.84	94.31	107.82	104.32	8.44
金霉素	78.67	76.70	79.70	78.36	1.95
强力霉素	76.61	87.95	80.38	81.65	7.08

6. 结果与结论

6.1 样品提取过程中可以采用两种方式进行提取，但最终都必须以 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液进行 pH 值调节后，方可进行固相萃取柱净化。否则四环素类化合物容易与样品中含有的微量元素络合，导致其在固相萃取柱上无法保留，最终使得加标回收率较低。

6.2 对于洗脱液的氮吹应控制在近干状态，不可氮吹至干，否则容易导致回收率较低。

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，保证曲线的精密性和准确性。

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