

关键字

全自动固相萃取；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固相萃取分析罗非鱼中四环素类抗生素的检测方法。

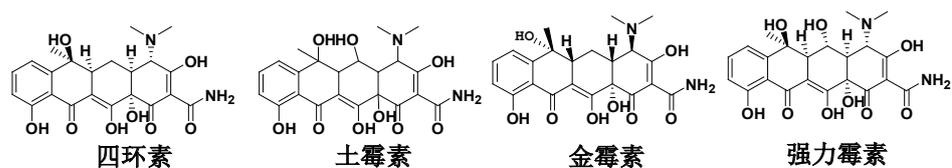


图-1.四种四环素类抗生素结构图

1. 仪器和耗材

仪器

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-16 高通量真空平行浓缩仪

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

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

耗材

HLB 固相萃取柱 (RayCure HLB, 500mg/6mL,

货号: RC-204-36477)

试剂

甲醇 (优级纯), 水

Na_2EDTA (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。

标准曲线配制

将 1000.0 $\mu\text{g/mL}$ 的单标储备液取出, 于室温平衡后用 AP-200 全自动配液仪配成浓度为 0.02、

0.04、0.10、0.20、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 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	30%甲醇水	
2	配液	A1-4	1000.00	1.50	A21	10.00	1.00	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								

2. 样品制备与净化

2.1 提取

2.1.1 方法-1

准确称取 5 g 新鲜罗非鱼肉样品于 50 mL 离心管中, 分别加入 20 mL、20mL、10mL 上述 Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液, 用 AH-30 全自动均质器均质 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 10mL 上清液转移至 Fotector Plus 上样瓶中待净化。

2.1.2 方法-2

准确称取 5 g 新鲜罗非鱼肉样品于 50 mL 离心管中, 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 20mL 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-16 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。

2.2 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	Raykol Fotector Plus
固相萃取柱	HLB柱 (RayCure, 500mg/6mL)
活化	甲醇
淋洗	pH 4.0甲酸水溶液
洗脱	甲醇溶液

2.3 净化

分别以 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化 HLB 柱 (技途 RayCure™ HLB, 500mg/6mL) 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 5mL 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 Auto EVA-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	CH ₃ OH				4.3
2	活化	CH ₃ OH	有机废液	5	5	1.4
3	活化	H ₂ O	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	H ₂ O	有机废液	60	3	3.8
6	淋洗	H ₂ O	有机废液	2	5	2.9
7	淋洗	5%CH ₃ OH-H ₂ O	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	CH ₃ OH		40	5	0.6
11	洗脱	CH ₃ OH	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

3. 检测条件

3.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm × 2.1 mm × 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 μL
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	0.0-0.50 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。

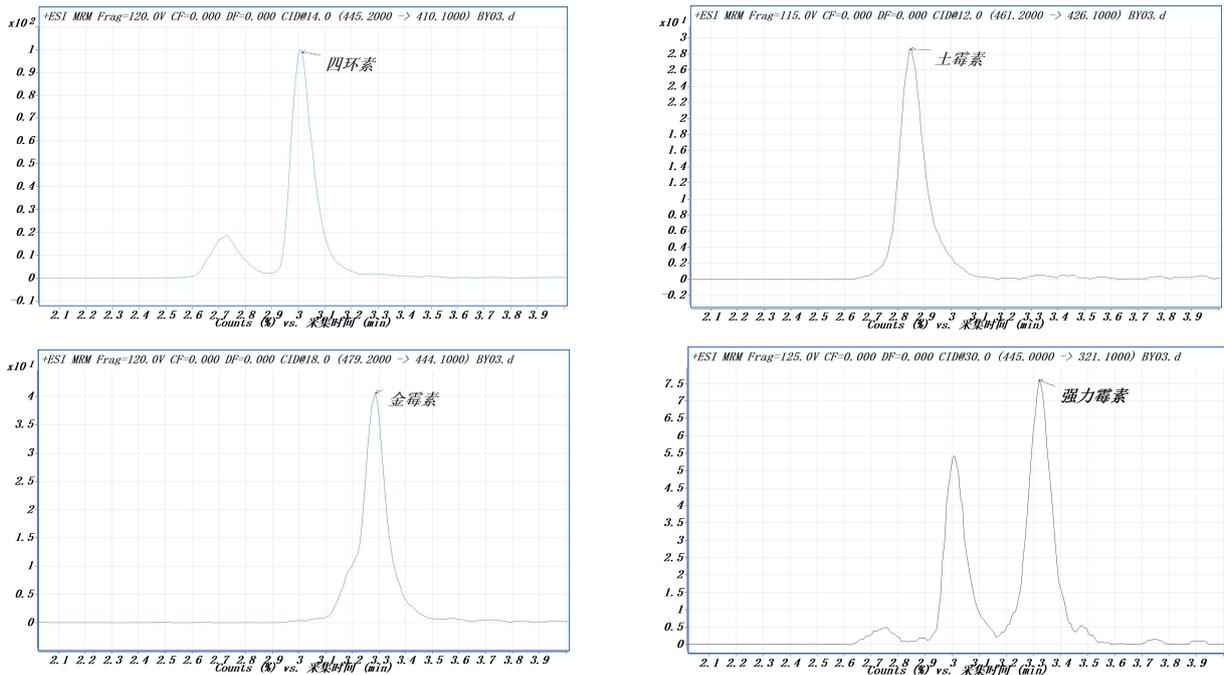
3.2 MRM 参数

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

3.3 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：



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，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。

4.2 样品基质加标测试

为了验证该方法的回收率，本实验向新鲜罗非鱼肉样品（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罗非鱼中 4 种四环素的检测。

表-2. 罗非鱼肉的加标回收率及 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

5. 结果与讨论

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 $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$ 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金属元素络合，

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。

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。

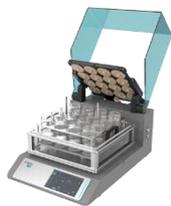
6. 总结

本解决方案操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。AH-30 全自动均质器可以自动完成 16 个样品均质，均质后能够自动清洗刀头，清洗刀头时可以采用水洗、超声洗和溶剂洗等多级清洗组合，有效防止交叉污染；MPE 高通量真空平行浓缩仪特别适用于大体积提取液的浓缩，浓缩效率是单台旋蒸的 16 倍。Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪采用全自动操作，从活化到上样、洗脱一步到位，

六通道同时进行；Auto EVA-60 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。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。能良好的按照国标完成罗非鱼中四环素类抗生素的检测。



全自动均质器
均质



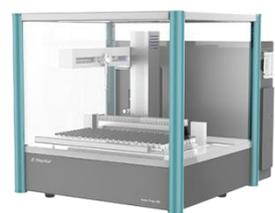
高通量真空平行浓缩仪
浓缩



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



全自动液体样品处理工作站
标液配制



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

2020年10月版