

磁性萃取剂提取牛奶中氯霉素

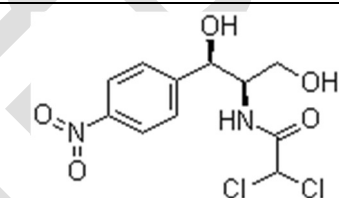
朱怀恩

关键词

乳制品、氯霉素、固相萃取、磁性固相萃取、液相色谱质谱、LC-MS、SPE、mSPE

前言

氯霉素诞生于上世纪中期。是第一种通过化学合成方法大量生产的抗生素。由于其广谱性，且成本低廉易于生产而被广泛应用，特别是医疗体系较为落后的第三世界国家。不幸的是，氯霉素也被发现有明显的不良反应，主要表现为对骨髓造血机能的抑制而引起的贫血和白血病等。因此，目前临床上对其使用有着严格的限制。与此同时，由于其通过食物链累积和传递的影响，也在畜牧和水产饲养中被禁用。



氯霉素 (CAS. 56-75-7)

目前，动物源性食品中氯霉素的提取和净化过程较为复杂。例如《食品安全国家标准 牛奶中氯霉素残留的测定 液相色谱-串联质谱法》(GB 29688-2013) 中规定，牛奶中氯霉素残留应以乙酸乙酯提取，并经正己烷脱脂和 C18 柱 SPE 净化。其过程繁琐且有毒有害试剂用量较大。

本文所述方法，仅通过简单的蛋白质沉淀和磁性固相萃取净化，且无需氮吹浓缩即可实现检测。磁性固相萃取 (mSPE) 是将传统固相萃取材料磁化，形成磁性

分散萃取剂，结合全自动提取设备，无需全程人工操作，实现了一键运行、无人值守。相对于经典的固相萃取（SPE），该方法自动化程度高、简单高效、成本低廉，适合广泛推广。

AUTO M32 是第一代自动化磁性萃取系统，结构简单、运行高效，结合方法学优化，最大上样体积可达 3mL。适用于临床小分子疾病标志物、食品安全和法医毒物检测。

MagicFlux 1000 是一种基于 mSPE 技术的全新全自动磁性固相萃取系统，可于约 40 分钟内全自动处理最多二十个样品，每个样品的上样体积可达 10mL。适用于食品安全、法医、环境污染物检测等多个领域中的样品净化。该系统使用 10 寸平板电脑，基于 Windows10 操作系统和专用的软件，从移液、提取、输出样品完全自动化操作。

	
AUTO M32 全自动提取系统	MagicFlux 1000 全自动磁性固相萃取系统

实验过程

标准曲线配置

以 30% 甲醇水配制浓度为 0.4、1、2、5、10、20ng/mL 氯霉素标准溶液，相当于原始样品中氯霉素残留量 0.08、0.2、0.4、1、2、4 μ g/Kg。

样品处理

- 一、取以乙醇活化的 4mg 磁性 HLB 萃取剂，置于萃取管内。
- 二、称取 2.0g 牛奶，置于 15mLPP 试管中，先后加入 1mL10%亚铁氰化钾溶液、1mL20%乙酸锌溶液、0.4mL 甲醇，漩涡混匀，以 8000rpm 离心 5min。

三、磁性固相萃取

1. 方法一，移取 1000 μ L 上清液为上样溶液，放置于专用 96 孔板的第 2~4 列或第 8~10 列孔内，如下图移取适当溶剂置于其余孔位内，并设置 AUTO M32 全自动提取仪，进行 mSPE 操作。

孔位	名称	加入液体	体积 μ L	振荡搅拌时间 s	静置吸磁时间 s
1 (7)	活化	水	600	60	30
2 (8)	上样	上样溶液	1000	60	30
3 (9)	上样	上样溶液	1000	60	30
4 (10)	上样	上样溶液	1000	60	30
5 (11)	淋洗	水	600	60	30
6 (12)	洗脱	60%乙腈	200	80	30
1	排废	/	600	10	0

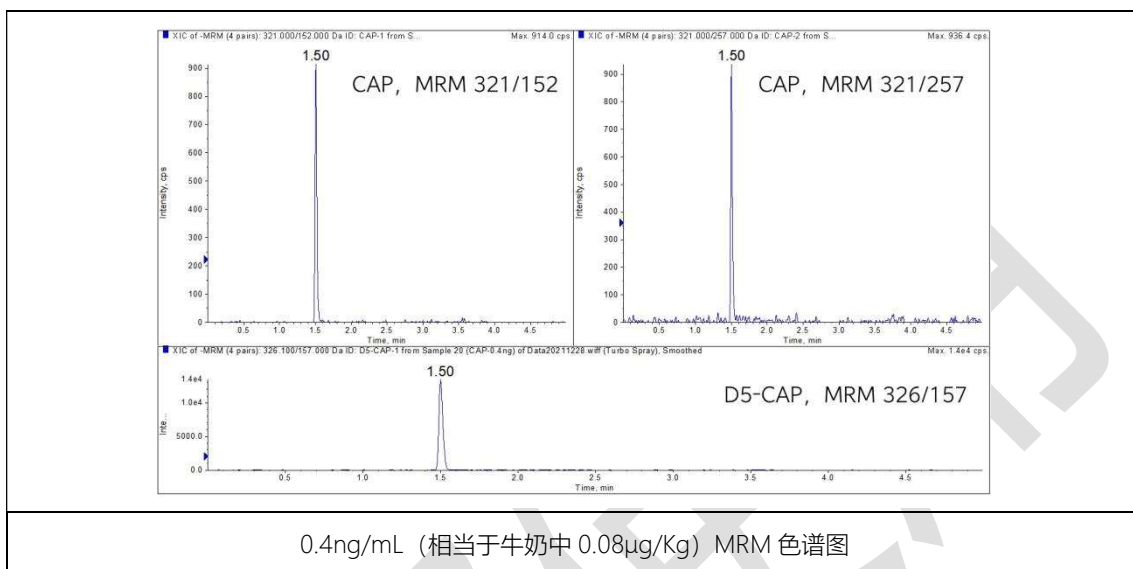
2. 方法二，将上一步完成离心后的 15mLPP 试管直接放入 MagicFlux 1000 全自动磁性固相萃取系统的上样位。参考上表在各溶剂位放入对应的溶剂，并设定运行程序。执行 mSPE 操作。

四、取上述洗脱液注入 LC-MS/MS 分析。

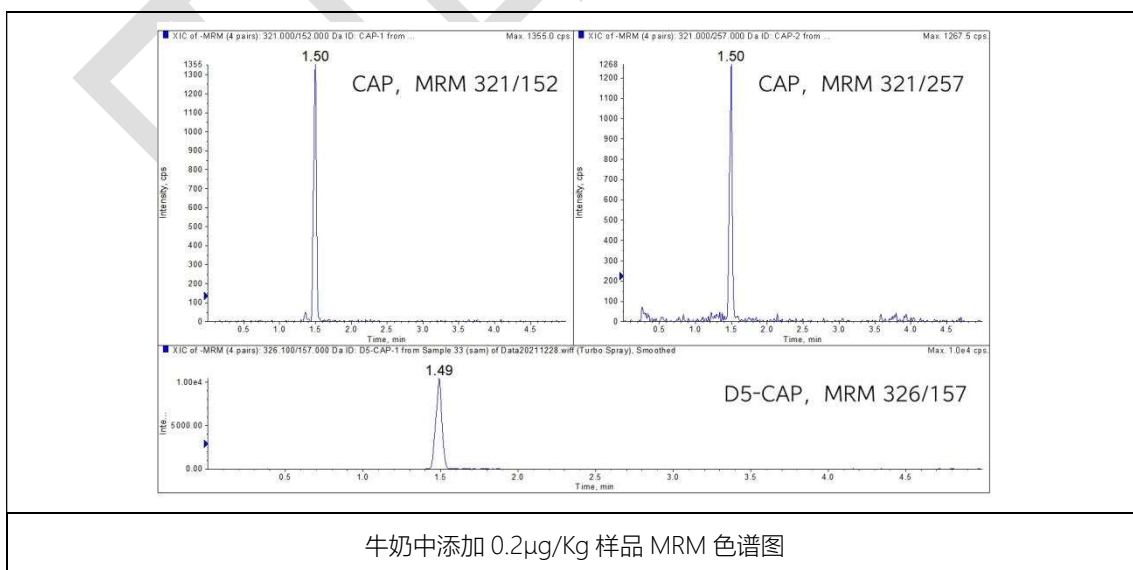
注：测试样品，准确称取 2.00g 牛奶，加入 2.0 μ L 的 200ng/mL 氯霉素标准溶液，相当于 0.2 μ g/Kg，加入 20 μ L D₅-CAP (200ng/mL) 同位素标记标准溶液。如上所述进行提取和分析。

实验数据

如下图所示，本方法定量下限为 0.4ng/mL（相当于牛奶中 0.08 μ g/Kg）。可以看到各 MRM 通道的氯霉素色谱峰信号稳定清晰。



下图为测试样品 (0.2 μ g/Kg) 色谱图。该样品的氯霉素含量相当于《食品安全国家标准 牛奶中氯霉素残留的测定 液相色谱-串联质谱法》(GB 29688-2013) 所规定的定量下限。可以认为 LC-MS 结合磁性固相萃取法的整体灵敏度比上述标准方法提高了约 2.5 倍。



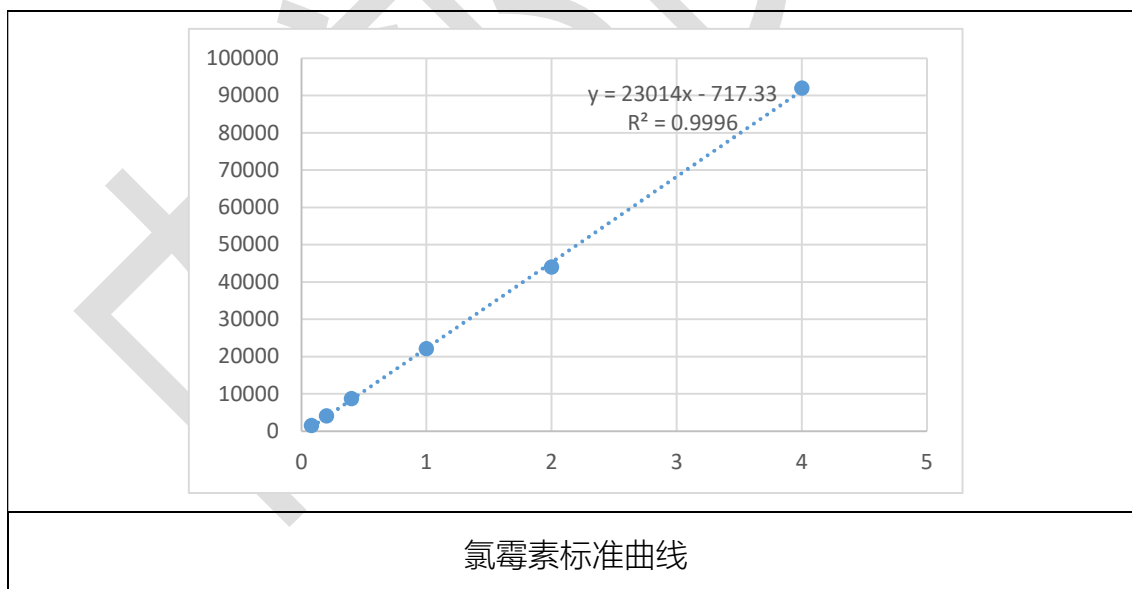
如下表所示, 牛奶中添加 0.2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ 样品, 准确度 (添加回收率) 为 90.9~116%, 相对标准偏差为 10.1%。

名称	峰高	峰面积	计算浓度 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	准确度 (%)
测试样品 1	1710	4890	0.231	116
测试样品 2	1740	4630	0.22	110
测试样品 3	1390	3780	0.182	90.9
测试样品 4	1480	4320	0.206	103
平均值			0.21 (RSD10.1%)	105

如下表, 标准曲线各点的准确度为 97.6~104.5, 精密度为 0.8~7.3%。

序号	浓度 ng/mL	平均峰面积	RSD% (n=2)	准确度%
1	0.08	1540	7.3	104.5
2	0.2	4090	5.5	97.7
3	0.4	8710	3.7	99.6
4	1	22100	5.8	98.9
5	2	44000	5.1	97.6
6	4	92000	0.8	101.5

下图为定量 MRM 通道的氯霉素色谱峰标准曲线。



结果与讨论

综上所述可以看出, 使用 HLB 磁性萃取剂, 结合 AUTO M32 全自动萃取仪或 MagicFlux 1000 全自动磁性固相萃取仪, 提取和净化牛奶中的氯霉素。经

LC-MS/MS 分析测试, 线性良好, 结果准确精密, 符合基本定量测试的方法学要求。同时, 磁性固相萃取技术 (mSPE) 结合全自动提取系统 AUTO M32 或 MagicFlux 1000, 大幅度减少传统 SPE 的移液操作和人为实时监测, 节约了人力成本, 并显著降低人为因素在前处理中的影响。

参考信息

点击 http://www.pureton.com.cn/prolist_t53.html 获取产品信息, 或致电 4001-520-260 联系普敦实验室设备 (上海) 有限公司。

内部使用