

关键词

全自动固相萃取；高效液相色谱法；黄曲霉毒素M1

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，我国畜牧业发展迅速，动物疾病越来越复杂，兽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，导致了畜禽中有大量的抗生素残留，严重影响了乳制品的质量安全。如果人类长期食用这种含有抗生素残留的乳制品，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》，建立了基于睿科Fotector Plus全自动固相萃取分析乳制品中四环素类抗生素的检测方法。

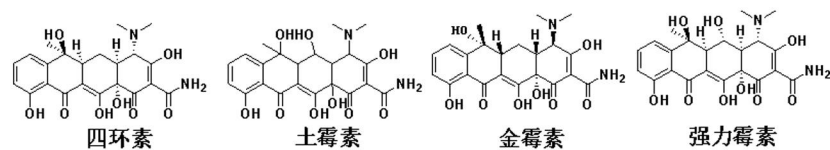


图-1. 四种四环素类抗生素结构图

1. 仪器与耗材

仪器和耗材

睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

睿科 Auto EVA 80 全自动平行浓缩仪

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

HLB 固相萃取柱 (RayCure, 60mg/3mL, 货号: RC-204-36473)

甲醇 (优级纯), 乙酸乙酯 (优级纯), 超纯水

5%甲醇水溶液: 量取 5 mL 甲醇用超纯水定容至 100mL

10%甲醇乙酸乙酯溶液: 量取 10 mL 甲醇用乙酸乙酯定容至 100mL

Na₂EDTA-McIlvaine (0.1mol/L) 缓冲溶液 (pH=4.0): 准确 60.2g 乙二胺四乙酸二钠, 磷酸氢二钠 17.8g 和柠檬酸 21.0g 与烧杯中, 加入 1000mL 的纯净水, 加入浓盐酸调节 pH 值至 4.0

2. 标准曲线配置

将 1000.0μg/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、0.50μg/mL 的标准工作曲线。



图-2. Auto Prep 200 液体工作站配标程序

3. 样品制备与净化

3.1 样品提取

称取 5g 牛奶样品置于 50mL 比色管中，用 0.1mol/L Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲液溶解并定容至 50mL，涡旋混合 1min，冰水浴超声 10min，转移至 50mL 离心管中。以 8000r/min 离心 10min（温度设置为 4℃），准确量取 10mL 上清液转移至 80mL 玻璃上样管中，待净化。

3.2 固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科 Raykol Fotector Plus
固相萃取柱	HLB 柱 (RayCure, 60mg/3mL)
活化	甲醇，超纯水
淋洗	水，5%甲醇水溶液
洗脱	10%甲醇乙酸乙酯溶液

分别以 5mL 甲醇和 5mL 水活化 HLB 柱，将上述提取液以 2mL/min 的速度进行上样，并用 3mL 水清洗样品瓶。以 3mL 水和 5mL 5%甲醇水对固相萃取柱进行淋洗。用气推将柱子推干，最后以 10mL 10%甲醇乙酸乙酯溶液洗脱目标化合物(具体的净化步骤请见图-3)。将洗脱液用 Raykol EVA 80 全自动平行浓缩仪于 40℃ 条件下浓缩至近干，以 30%甲醇水溶液定容至 1mL，涡旋混合，过滤膜上机检测。

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	甲醇				2.8
2	活化	甲醇	有机废液	3	5	2.1
3	活化	水	废水	3	5	2.1
4	上样		废水	2	10	5.8
5	清洗样品瓶	水	废水	60	3	2.3
6	淋洗	水	废水	3	3	1.4
7	淋洗	5%甲醇水	有机废液	3	5	2.1
8	气推		有机废液	80	30	2.2
9	清洗注射泵	10%甲醇乙酸乙酯		60	3	0.5
10	洗脱	10%甲醇乙酸乙酯	收集	2	10	5.8
11	气推		收集	10	10	1.8
12	结束					

图-3. Fotector Plus 四环素固相萃取净化方法

4. 检测条件

4.1 液相色谱条件

表-2 色谱检测条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μ m \times 21 mm \times 50mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A:10mM ammonium acetic(0.1% formic acid),B: Methanol
柱温	30 $^{\circ}$ 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。

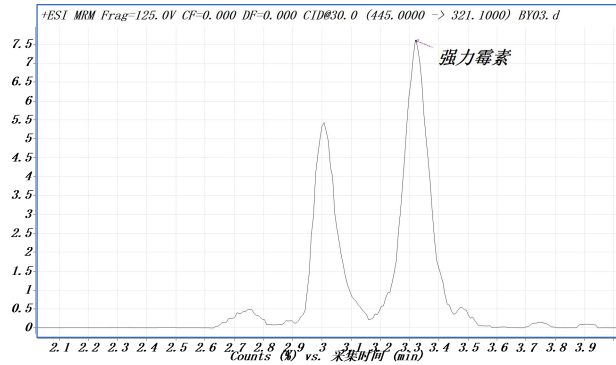
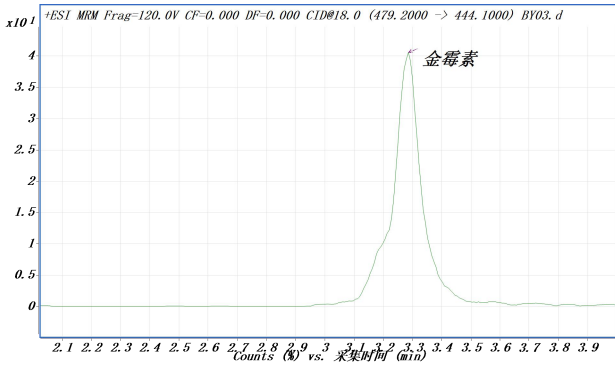
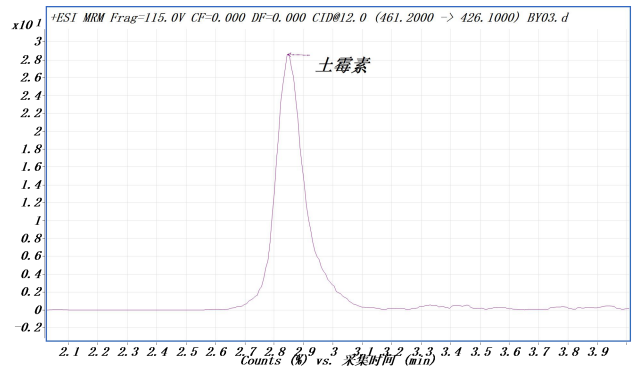
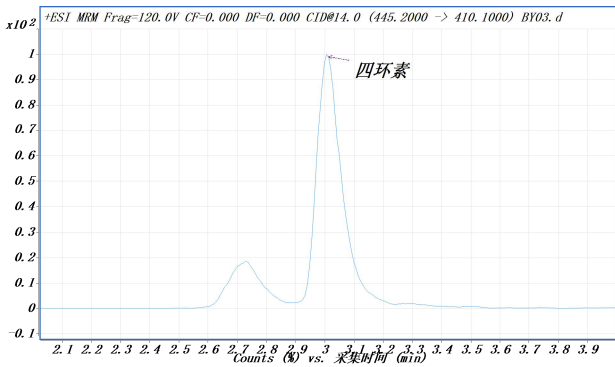
4.2 MRM 参数

表-3. 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

为了验证该方法的回收率，本实验向牛奶样品 (5g) 中加入 4 种四环素标准品 (40 μ L, 1mg/L) 进行加标回收验证 (n=3)。测试结果如表-2 所示，4 种四环素的回收率在 71%-89% 之间，RSD 值均控制在 10% 以内。说明该方法能够很好地用于牛奶中 4 种四环素的检测。

表-4. 牛奶样品加标回收率及 RSD 值(40 μ g/kg)

化合物	回收率 (%)	回收率 (%)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD(%)
	样品-1	样品-2	样品-3		
四环素	84.1	82.3	76.2	80.9	5.1
土霉素	85.2	88.3	80.4	84.6	4.7
金霉素	83.5	76.2	77.8	79.2	4.8
强力霉素	71.8	79.3	73.3	74.8	5.3

6. 结果与讨论

使用睿科 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、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。

睿科 Fotector Plus 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。

睿科 EVA 80 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调节氮吹针高度带来的麻烦。



全自动液体样品处理工作站
标曲配制



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.

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

2021年10月版