

解决方案

鳗鱼中沙星类化合物残留的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；沙星类化合物

介绍

沙星类（Quinones, QNs）抗生素(图-1)是一类人工合成的新型杀菌性抗菌药物，具有抗菌谱广、抗菌活性强、与其他抗菌药物无交叉耐药性以及毒副作用小、价格低廉等特点，被大量用于治疗 and 预防水生动物疾病及促生长。

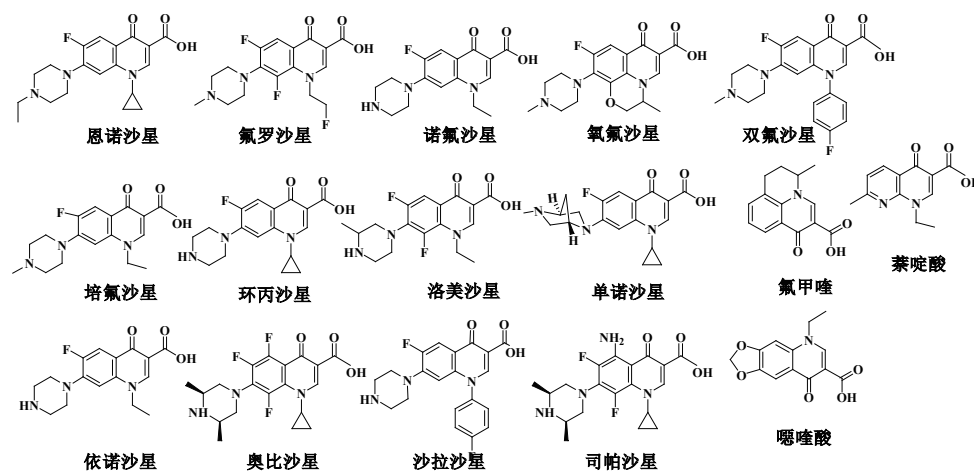


图-1. 16种沙星类抗生素的结构式

本方案参考农业部1077号公告-1-2008 《水产品中17种磺胺类及15种喹诺酮类药物残留的测定 液相色谱-串联质谱法》，采用酸化乙腈对目标化合物进行提取。由于标准中只进行了简单的除脂，提取液中仍含有大量的样品基质，容易干扰后续的液质测试。所以本方案采用HLB柱对提取液进行净化，使得整个检测结果更加具有平行性与可靠性。

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 或相当

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。

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

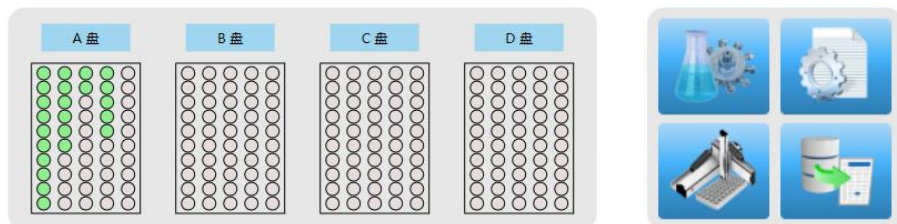
入 1000 mL 的纯净水, 加入浓盐酸调节 pH 值至 4.0。

如果该缓冲液在放置过程中易析出晶体, 那么请将浓度减半进行配制。

标准曲线配制

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 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 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						3.00	10%乙腈水	
2	配液	A1-16	1000.00	1.50	A21	10.00	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
3	直接稀释	A21	10.00	1.00	A22	1.00	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
4	直接稀释	A22	1.00	1.00	A31	0.01	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
5	直接稀释	A22	1.00	1.00	A32	0.02	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
6	直接稀释	A22	1.00	1.00	A33	0.05	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
7	直接稀释	A21	10.00	1.00	A34	0.10	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
8	直接稀释	A21	10.00	1.00	A35	0.20	1.00	10%乙腈水	10%乙腈水
9	方法结束								

2. 样品制备及前处理

2.1 提取

准确称取搅碎后的新鲜鱼肉样品 5.0 g 于 50 mL 离心管中, 加入 2.0 g 无水硫酸钠, 加入 20 mL 酸化乙腈进行提取, 用 AH-30 全自动均质器均质 1.0 min, 3800 rpm 离心 5.0 min, 重复一次。取上清液于 250 mL 分液漏斗中, 加入 15 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

2.3 固相萃取净化

分别以 5 mL 甲醇和 5 mL 甲酸水溶液 (pH4.0) 活化 HLB 柱 (技迓 RayCure™ HLB, 500mg/6mL) 后, 将上述样品溶液以 2 mL/min 的速度进行上样, 并用 3 mL 的甲酸水溶液 (pH4.0) 溶液清洗样品瓶。以 20% 的甲醇甲酸水溶液 (pH4.0) 对固相萃取柱进行淋洗除去残留的无机盐和残留基质。在 20

psi 的氮气流下吹干 HLB 柱, 最后以 10 mL 的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, 加入 10 % 乙腈水溶液 (含 0.1% 甲酸) 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		60	5	1.5
2	活化	CH3OH	废液1	5	5	1.4
3	活化	pH4.0 Form...	废液1	4	5	1.7
4	上样		废液1	3	10	4.1
5	清洗样品瓶	pH4.0 Form...	废液1	60	3	1.8
6	淋洗	Methol (20%...	废液1	5	5	1.4
7	气推		废液1	10	10	1.8
8	吹干					10
9	清洗注射泵	CH3OH		40	2	0.4
10	洗脱	CH3OH	收集	2	10	5.6
11	气推		收集	10	5	1.1
12	结束					

图-2 fotector plus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 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	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	0.0-1.0 min, 90%流动相 A; 1.0-4.0 min, 50%的流动相 A; 4.01-6.0 min, 50%流动相 A 保持 2 min; 6.01-7.0 min, 90%的流动相 A; 7.01-10.0 min, 90%的流动相 A 保持 3 min。

3.2 MRM 参数

表-1. 16 种沙星类抗生素串联质谱检测参数

Compound Name	Precursor Ion	Product Ion	Dwell	Fragmentor	Collision Energy	Cell Accelerator Voltage
依诺沙星	321.2	303.2	20	125	20	7
		232.1	20	125	36	7
氟罗沙星	370.0	370.0	20	135	13	7
		326.2	20	135	25	7
诺氟沙星	320.2	302.2	20	130	18	7
		233.1	20	130	22	7
氧氟沙星	362.2	318.2	20	140	16	7
		261.1	20	140	26	7
培氟沙星	334.2	316.2	20	145	18	7
		290.3	20	145	14	7
环丙沙星	332.2	314.2	20	125	18	7
		231.1	20	125	40	7
洛美沙星	352.3	308.2	20	120	14	7
		265.1	20	120	22	7
丹诺沙星	358.2	340.2	20	135	20	7
		255.1	20	135	42	7
恩诺沙星	360.2	342.2	20	135	20	7
		316.2	20	135	16	7
奥比沙星	396.4	396	20	135	21	7
		295.1	20	135	37	7
沙拉沙星	386.2	342.2	20	125	18	7
		299.2	20	125	30	7
双氟沙星	400.2	356.3	20	135	18	7
		299.1	20	135	30	7
司帕沙星	393.3	349.3	20	150	18	7
		292.2	20	150	26	7
氟甲喹	262.1	262.1	20	105	13	7
		244.1	20	105	33	7
噁喹酸	262.2	262	20	100	13	7
		244	20	100	29	7
萘啶酸	233.2	233	20	90	9	7
		215.1	20	90	25	7

3.3 色谱图

下图为 16 种沙星类抗生素的标准品在液质上的色谱图：

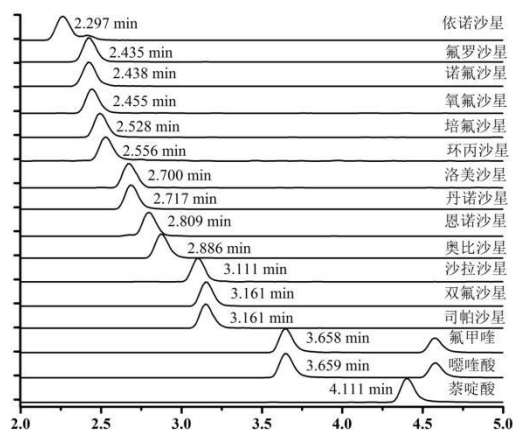


图-3 16种沙星类抗生素的保留时间与色谱图

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，本实验向鳗鱼样品（5 g）中分别加入上述 16 种抗生素类标准品（20 μ L，1 mg/L，n=4）进行加标回收验证。测试结果如表

-2 所示，16 种抗生素回收率在 82-95%之间，RSD 值小于 15%。说明该方法能够很好地运用于鳗鱼样品中 16 种沙星类抗生素的检测。

表-2. 鳗鱼样品中的加标回收率及 RSD 值（20 μ g/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	回收率 (%) 样品-4 Sample-4	平均回收率 Average Recoveries (%)	RSD (%)
伊诺沙星	79.19	83.90	87.55	93.05	85.92	6.82
氟罗沙星	81.92	82.88	86.77	92.46	86.01	5.56
诺氟沙星	95.93	83.79	104.05	93.87	94.41	8.83
氧氟沙星	83.78	83.70	90.62	88.27	86.59	3.96
培氟沙星	96.26	88.60	99.10	95.31	94.82	4.69
环丙沙星	86.06	80.45	94.96	90.50	87.99	7.05
洛美沙星	74.20	81.65	77.98	95.38	82.30	11.22
丹诺沙星	84.64	79.41	89.02	85.00	84.52	4.67
恩诺沙星	79.85	82.26	86.53	84.14	83.19	3.41
奥比沙星	92.61	100.04	81.03	96.77	92.61	8.96
沙拉沙星	82.43	89.91	104.67	97.31	93.58	10.22
双氟沙星	78.91	88.30	97.19	89.37	88.44	8.47
司帕沙星	88.20	80.15	86.39	81.70	84.11	4.52
氟甲喹	79.77	88.47	75.89	87.20	82.84	7.26

噻嗪酸	78.77	88.47	79.89	87.20	83.59	5.93
萘啶酸	92.26	87.57	82.64	91.29	88.44	4.93

5. 结果与讨论

水产品及其制品成分复杂，应采用 20% 的酸化甲醇进行淋洗，可以有效地除去部分杂质，降低样品分析步骤的基质抑制效应。

洗脱液氮吹应至近干，磺胺和沙星类化合物的

回收率稳定。但氮吹时间如果过长，样品浓缩干燥后待测化合物可能以固态颗粒的形式随着氮吹气流飞走而损失。

6. 总结

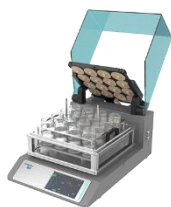
本解决方案操作方便、提取和浓缩效率高、回收率好。使得整个检测结果更加具有平行性与可靠性。

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；MPE-16 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。独特的尾管设计方便用户观察剩余体积和定容；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；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，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。



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
标液制备



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