

解决方案

牛奶中喹诺酮类化合物的检测

关键词

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

喹诺酮类（Quinones, QNs）抗生素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，被大量用于预防和治疗动物疾病。由于喹诺酮类药物在动物机体组织中的残留，人食用动物组织、蛋或奶等动物源性食品后喹诺酮类抗生素就在人体内残留蓄积，造成人体疾病对该药物的严重耐药性，影响身体健康。

本方案参考《GB/T 21312-2007 动物源性食品中14种喹诺酮药物残留检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》，采用EDTA缓冲液对目标化合物进行提取，提取液用HLB柱经睿科Fotector Plus全自动固相萃取仪进行净化，高效液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量，整个检测结果具有良好的平行性与准确性。

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 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, 200mg/6mL, 货号: RC-204-36476)

甲醇 (色谱纯), 水

Na₂EDTA (0.1mol/L)-MCIlvaine (0.1M) 缓冲溶液 (pH4.0): 准确称取 60.2g 乙二胺四乙酸二钠, 磷酸氢二钠 17.8 g 和柠檬酸 21.0 g 于烧杯中, 加入 1000 mL 超纯水, 加入浓盐酸调节 pH 值至 4.0

2. 样品制备及前处理

2.1 提取

准确称牛奶 5.0g 于 50mL 离心管中, 加入 40mL 0.1mol/L 的 EDTA-MCIlvaine 缓冲液溶解, 涡旋混合 1.0min, 超声提取 10min, 于高速冷冻离心机上以 10000rpm 的转速离心 10min (温度为 4℃)。取上清液于 80mL 玻璃上样管中, 备用。

2.2 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 Fotector Plus
固相萃取柱	HLB 柱 (RayCure, 200mg/6mL)
活化	甲醇, 水
淋洗	5%甲醇水溶液
洗脱	甲醇

2.3 固相萃取净化

分别以 6mL 甲醇和 6mL 水活化 HLB 柱, 将上述样品溶液以 3mL/min 的速度进行上样, 用 3mL 5%的甲醇水溶液淋洗柱子, 然后用气推的方式推干柱子。最后以 6mL 甲醇洗脱目标化合物 (具体方法设置见图 1)。将洗脱液在睿科 EVA 80 全自动平行浓缩仪上浓缩至近干, 加入 1mL 0.2%甲酸水溶液定容, 涡旋混匀, 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	CH3OH				1.5
2	活化	CH3OH	有机废液	3	6	2.5
3	活化	H2O	废水	3	6	2.5
4	上样		废水	3	45	17.6
5	淋洗	5%甲醇水	有机废液	3	3	1.4
6	气推		有机废液	80	40	2.8
7	清洗注射泵	CH3OH		40	5	0.6
8	洗脱	CH3OH	收集	1	6	6.5
9	气推		收集	2	2	1.4
10	气推		收集	20	10	1.3
11	结束					

图-1 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-2. 14 种沙星类抗生素串联质谱检测参数

Compound	Precursor	Product	Dwell	Fragmentor	Collision	Cell Accelerator
----------	-----------	---------	-------	------------	-----------	------------------

Name	Ion	Ion			Energy	Voltage
依诺沙星	321.2	303.2	20	125	20	7
		232.1	20	125	36	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
沙拉沙星	386.2	342.2	20	125	18	7
		299.2	20	125	30	7
西诺沙星	263.1	244.1	20	135	18	7
		188.8	20	135	30	7
吡哌酸	304.1	271.1	20	150	18	7
		189.0	20	150	26	7
氟甲喹	262.1	262.1	20	105	13	7
		244.1	20	105	33	7
噁嗪酸	262.1	155.9	20	100	13	7
		244.1	20	100	29	7
萘啶酸	233.2	233	20	90	9	7
		215.1	20	90	25	7

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，需要用空白样品加入一系列浓度标准品，按照上述提取和净化步骤，制备基质加标曲线。

4.2 样品基质加标测试

为了验证该方法的回收率，本实验向牛奶样品(5g)中分别加入上述 14 种喹诺酮类标准品(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，14 种喹诺酮回收率在 75%-105%之间，RSD 值小于

12%。说明该方法能够很好地运用于牛奶样品中 14 种沙星类抗生素的检测。

表-3. 牛奶样品加标回收率及 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	79.2	83.9	87.6	93.1	85.9	6.8
西诺沙星	81.9	82.9	86.8	92.5	86.0	5.6
诺氟沙星	95.9	83.8	104.1	93.9	94.4	8.8
氧氟沙星	83.8	83.7	90.6	88.3	86.6	4.0
培氟沙星	96.3	88.6	99.1	95.3	94.8	4.7
环丙沙星	86.1	80.5	95.0	90.5	88.0	7.1
洛美沙星	74.2	81.7	78.0	95.4	82.3	11.2
丹诺沙星	84.6	79.4	89.0	85.0	84.5	4.7
恩诺沙星	79.9	82.3	86.5	84.1	83.2	3.4
沙拉沙星	82.4	89.9	104.7	97.3	93.6	10.2
吡哌酸	88.2	80.2	86.4	81.7	84.1	4.5
氟甲喹	79.8	88.5	75.9	87.2	82.8	7.3
噁喹酸	78.8	88.5	79.9	87.2	83.6	5.9
萘啶酸	92.3	87.6	82.6	91.3	88.4	4.9

5. 结果与讨论

牛奶样品蛋白质含量较高，离心时建议尽量采用高速冷冻离心的方式，沉降蛋白效果更好。

洗脱液氮吹应至近干或全干，沙星类化合物的回收率差别不大。但吹干时间如果过长，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

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去调节氮吹针高度带来的麻烦。



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