

关键词

高效液相色谱/串联质谱；全自动固相萃取；均质器；浓缩仪；氯霉

介绍

氯霉素类药物是一类广谱性抗生素，作为药物常用于家禽疾病治疗和预防。由于氯霉素对人体有严重的毒副作用，目前美国、日本、韩国和欧盟等国家和地区均已禁止在食用性动物中使用氯霉素，并规定在动物源性食品中不得检出。本实验采用GB/T22338-2008中的方法，均质样品后采用全自动固相萃取仪实现自动化净化浓缩样品，大大提高效率。采用HPLC-MS/MS电喷雾（ESI⁻），多反应监测（MRM）模式检测。氯霉素和氟甲砜霉素在添加浓度为0.1~5.0 μg.Kg⁻¹范围内，回收率分别为84.95~97.95%，72.57~91.7%之间；甲砜霉素在添加浓度为1.0~5.0μg.Kg⁻¹范围内，回收率在69.93~91.75%之间；相对标准偏差RSD（n=4）在4.2~12.3%之间。方法的准确度和精密度均符合残留分析要求。

1. 仪器与试剂

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 高通量真空平行浓缩仪

Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

液相色谱-质谱联用仪 (Agilent1260+Agilent 6410, ESI 负离子模式)

离心机 (湘仪, H-2050R)

涡旋混合器 (IKA@MS3 basic)

硅胶固相萃取小柱 (RayCure Silica, 500mg/3mL, RC-204-16843)

丙酮 (色谱纯, sigma 公司), 正己烷 (色谱纯, sigma 公司), 乙腈 (色谱纯, sigma 公司), 无水硫酸钠 (AR., 国药)。氯霉素、甲砒霉素和氟甲砒霉素标准物质 (sigma 公司)

2. 样品前处理

2.1 提取、浓缩

称取 5.00g (± 0.01) 新鲜鱼肉试样, 加入 5 g 左右的无水硫酸钠; 加入一定量氯霉素类混合标准物质工作液, 加入 20 mL 乙腈, 用 AH-30 全自动均质器均质 1 min, 再用 20 mL 乙腈清洗均质器刀头,

以 5500 r/min 离心 5 min, 转移上清液于分液漏斗中, 加 15 mL 乙腈饱和正己烷。残渣中再加入 20 mL 乙腈, 振荡 3 min, 以 5500 r/min 离心 5 min, 取上清液转移至同一分液漏斗, 振荡 5 min, 静置分层, 取下层乙腈层于浓缩瓶中, 加入 5 mL 异丙醇, 用 MPE 高通量真空平行浓缩仪浓缩至近干。加入 5 mL 丙酮+正己烷 (1:9), 振荡后转移到上样瓶中, 过柱净化。

2.2 净化

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	硅胶柱 (RayCure, 500mg/3mL)
淋洗	丙酮/正己烷混合溶液 (1:9)
洗脱	丙酮/正己烷混合溶液 (6:4)

硅胶固相萃取小柱用 10 mL 丙酮+正己烷 (1+9) 以 10 mL/min 的速度活化; 5 mL 丙酮+正己烷 (1+9) 溶解上步提取液残留物以 1 mL/min 上样; 2 mL 丙酮+正己烷 (1+9) 淋洗, 5mL 丙酮+正己烷 (6+4) 溶液洗脱。洗脱液用 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪在 40 °C 条件下浓缩至近干, 用 1 mL 30% 甲醇水定容。操作程序见下图 1 所示。

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	丙酮正己烷 (1:9)				3.2
2	活化	丙酮正己烷 (1:9)	有机废液	10	10	2.3
3	上样		有机废液	1	5	5.6
4	清洗样品瓶	丙酮正己烷 (1:9)	有机废液	60	3	4.2
5	淋洗	丙酮正己烷 (1:9)	有机废液	2	2	1.5
6	清洗注射泵	丙酮正己烷 (6:4)		30	3	0.5
7	洗脱	丙酮正己烷 (6:4)	收集	1	5	5.4
8	气推		收集	1	2	2.4
9	结束					
10						

图 1. Fotector Plus 氯霉素固相萃取净化方法

3. 液相色谱-质谱联用仪条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm×2.1 mm ×50mm
流速	0.200 mL/min
流动相	A: H ₂ O B: Methanol
柱温	30 °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	35psi
洗脱梯度	0-1.5 min, 5%流动相 B; 2-3.5 min, 70% 流动相 B; 5.0-6.0 min, 5% 流动相 B

3.1 MRM 参数

名称	分子量 MW	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 DP/V	碰撞气流量 CE/V	保留时间 /min
氯霉素 Chloramphenicol	323	321.1/257.1	321.1/152.0	120	5	6.03
		321.1/ 52.1		120	10	
氟甲砜霉素 Florfenicol	358	356.1/184.9	356.1/184.9	135	4	3.34
		356.1/85.1		135	12	
甲砜霉素 Thiamphenicol	356	353.9/90.0	353.9/184.9	130	4	2.52
		353.9/185.1		130	15	

3.2 标准样品色谱图

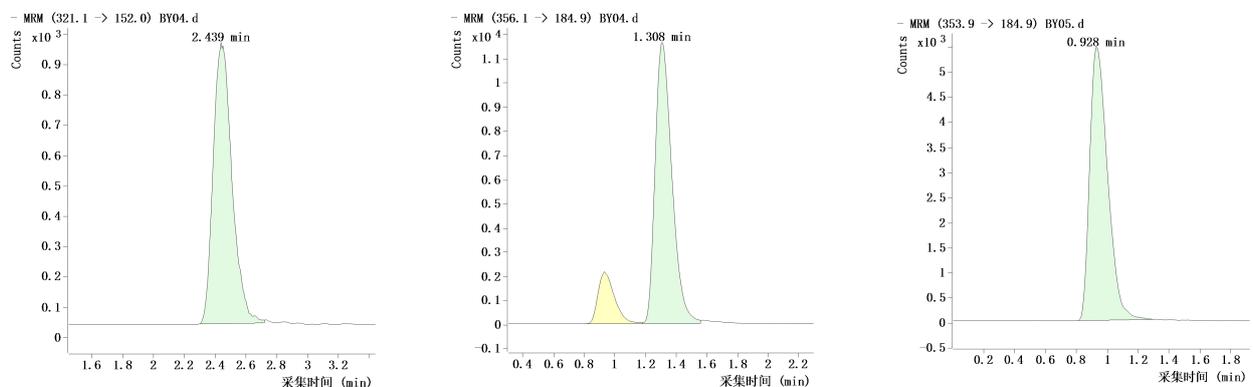


图 2. 三种氯霉素的色谱图 (5 μg/L, 左-氯霉素, 中-氟甲砜霉素, 右-甲砜霉素)

4. 方法可行性验证

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一系列混标标准工作曲线。组分系列浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以各组分的质量浓度 (X , $\mu\text{g}/\text{L}$) 对峰面积 (Y) 绘制标准工作曲线。如果基质标准曲线响应与标准曲线响应相似，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

在 5 g 空白鱼肉样品中分别添加 0.1、1.0、5.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素混标。回收率及精密度（见表 2）。从表中数据看出，3 个加标浓度的回收率均在 79–95% 之间，相对标准偏差小于 10%，符合痕量残留检测的要求；而甲砜霉素在添加浓度 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的条件下，由于杂质干扰比较大，仪器灵敏度不够高，造成未检出。

表 2. 鱼肉基质加标回收率及 RSD 值

名称	添加浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	鱼肉基质	
		回收率/%	RSD (n=4) /%
氯霉素	0.1	88.30	5.6
	1.0	87.18	8.3
	5.0	88.34	6.2
氟甲砜霉素	0.1	91.70	7.8
	1.0	82.57	5.9
	5.0	85.54	6.5
甲砜霉素	0.1	\	\
	1.0	79.93	4.4
	5.0	80.03	7.5

5. 结果与结论

5.1 氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素易溶于甲醇、乙酸乙酯、丙酮和乙腈等，文献报道多采用碱化乙酸乙酯提取，可以得到很好的回收率。本实验参考 GB/T 22338-2008 方法，用乙腈提取食品中的氯霉素类药物。

5.2 根据提取的方法不同，可选择多种净化小柱，大量文献报道多采用 HLB、C18 与硅胶小柱联用，均取得比较理想的效果。由于 HLB 和 C18 固相萃取小柱价格比较贵，洗脱溶剂比较多的特点，本实验采用硅胶小柱净化提取液，方法简便快捷，成本低，且洗脱溶剂用量少。

6. 解决方案的优势

睿科 AH-30 全自动均质器实现多任务的高通量均质，完全取代了手动均质的过程。一次最多处理 32 个样品，大大提高工作效率。

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；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。

MPE 真空平行浓缩仪/EVA-60 全自动平行浓缩仪，大大地提高了样品前处理效率，真正完全解放实验室人员劳动。



全自动均质器
均质



高通量真空平行浓缩仪
预浓缩



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.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

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5月版