Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

快速、简单、有效的水产样品净化流程用于UPLC-MS/MS多兽药残留分析

Michael S Young和Kim Van Tran
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 高效、省时的多种类兽药残留方法
- 简单、快速且有效的样品净化，适用于多种分析物
- 快速、灵敏的UPLC-MS/MS分析

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class 系统
Xevo® TQ-S质谱仪
用于SPE净化的Oasis® PRiME HLB小柱

关键词

UPLC-MS/MS，Oasis PRiME HLB小柱，
兽药，虾，三文鱼

概述

为了保障公众健康和安全，人们亟需一种可靠的分析方法对食用组织样品(如鱼类和贝类)中的兽药残留水平进行测定。样品中的目标化合物涵盖了强极性的水溶性化合物到完全非极性的脂溶性化合物。为了实现最大化的通量和最少的成本，分析人员期望能够通过一个分析方法测定组织样品中的各种兽药残留。人类摄入的水产品和肉类组织通常含有多达20%的脂肪和多达3%的磷脂。

简介

典型肉类样品的主要成分是水(高达70%)、蛋白质(15-25%)、脂肪(5-25%)和磷脂(1-3%)。在样品预处理过程中，蛋白通常通过沉淀和离心被去除。然而，大量脂肪和磷脂随着目标兽药一起被共提取出来。这些共提取物质的存在可能会干扰LC-MS分析，污染UPLC®系统的分析柱和其它组件，并且还会污染质谱仪。在过去，分析人员采用繁琐的正己烷脱脂步骤或使用反向吸附剂(如硅胶C_{18})从组织提取物中去除脂肪。虽然这些技术可以有效去除脂肪，但是均不能去除磷脂。

在本研究中，我们针对水产品样品中多种兽药残留的串联LC-MS检测开发了样品制备、净化和分析方案。该净化方案可有效去除脂肪和磷脂。我们选择了两类组织样品(对虾和三文鱼)来证实该方法的适用性。实验采用酸化乙腈/水溶剂以沉淀蛋白质并提取目标兽药。然后，使用最新多兽残专用SPE填料Oasis PRiME HLB小柱进行简单、快速的净化。我们从主要的兽药种类中选择了具有代表性的化合物，包括四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、β-内酰胺类、NSAID、类固醇类和β-肾上腺素类药物。这些化合物被加入到水产样品中作为基质加标样品。

实验

UPLC 条件

LC 系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC CSH™ C_{18}, 1.7 µm, 100 mm x 2.1 mm 色谱柱
流动相 A:	0.1%甲酸水溶液
流动相 B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
进样体积:	5 µL
进样模式:	部分定量环进样
柱温:	30 °C
弱洗针液:	10:90乙腈/水(600 µL)
强洗针液:	50:30:40水/乙腈/IPA (200 µL)
密封清洗液:	10:90乙腈/水

梯度:

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.4	85	15	初始
2.5	0.4	60	40	6
3.9	0.4	5	95	6
4.9	0.4	5	95	6
5.0	0.4	85	15	6
7.0	0.4	85	15	6

MS 条件

质谱仪:	Xevo TQ-S
正离子电喷雾(氯霉素采用负离子模式)	
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/Hr
锥孔气体流速:	30 L/Hr
碰撞气体流速:	0.15 mL/Min
数据管理:	MassLynx® 4.1版

表1汇总了本研究中使用的MRM通道和仪器参数。表1还显示了每种化合物的基质加标校准数据数据(采用虾肉基质加标样品的初级通道计算而得;三文鱼的数据也采用类似方法计算)和保留时间(RT)。

样品制备

1. 初步提取/沉淀

在50 mL离心管中加入2.5 g组织匀浆样品,然后添加一定浓度的标准品或QC样品。加入10 mL 0.2%甲酸的80:20乙腈/水溶液，漩涡混合30 s，置于摇床上30 min。在12000 rpm下离心5 min。

注：提取/沉淀步骤为大多数目标化合物提供了良好的回收率，但同时还提取出了大量的脂肪和磷脂。

2.SPE净化

Oasis PRiME HLB小柱(3 cc, 60 mg)安装在预先清洁过的真空提取装置上。不需要进行活化和平衡，本实验也未执行此步骤。真空设置为1–2 psi。

让大约0.5 mL上清液通过Oasis PRiME HLB小柱并收集滤液。取0.3 mL收集液，在UPLC-MS/MS分析之前用10 mM甲酸铵缓冲溶液(pH 4.5)稀释3倍。

化合物	MRM	锥孔电压	碰撞电压 (eV)	加标浓度 (低、高) μg/kg	线性范围 μg/kg	相关性 (R^2)	RT
阿莫西林	366.2>349.1	30	8	12.5, 50	6.25–100	0.9978	0.70
	366.2>114.0	30	20				
卡巴氧	263.0>231.0	25	15	25, 100	12.5–200	0.9978	1.43
	263.0>145.0	25	20				
头孢噻呋	524.3>241.1	30	16	250, 1000	125–2000	0.9975	2.84
	524.3>285.0	30	16				
氯霉素	321.0>152.1	30	17	25, 100	12.5–200	0.9943	1.64
	321.0>257.1	30	15				
金霉素	479.3>444.2	30	21	25, 100	12.5–200	0.9955	0.97
	479.3>462.2	30	18				
环丙沙星	332.1>288.1	30	18	25, 100	12.5–200	0.9918	2.99
	332.1>231.1	30	40				
皮质醇	363.2>121.0	42	52	50, 200	25–400	0.9989	3.45
	363.2>91.03	30	22				
地塞米松	393.2>373.2	30	10	25, 100	12.5–200	0.9980	1.09
	393.2>355.3	30	15				
恩诺沙星	360.4>245.0	50	25	50, 200	25–400	0.9961	2.26
	360.4>316.1	50	25				
红霉素	734.4>158.1	30	32	2.5, 10	1.25–20	0.9982	0.61
	734.4>576.5	30	20				
林可霉素	407.2>126.1	36	34	12.5, 50	6.25–100	0.9931	1.03
	407.2>359.3	36	20				
洛美沙星	352.1>265.1	31	22	50, 200	25–400	0.9960	3.79
	352.1>308.1	31	16				
苯唑西林	402.2>160.0	30	12	25, 100	12.5–200	0.9974	1.06
	402.2>243.1	30	15				
土霉素	461.2>426.2	30	21	25, 100	12.5–200	0.9952	1.06
	461.2>443.1	30					
青霉素	335.2>160.1	20	30	12.5, 50	6.25–100	0.9903	3.46
	335.2>176.1	20	30				
保泰松	309.4>160.0	37	20	25, 100	12.5–200	0.9915	4.29
	309.4>103.9	37	20				
莱克多巴胺	302.2>164.1	30	15	75, 300	37.5–600	0.9915	1.03
	302.2>107.0	30	27				
沙丁胺醇	240.2>148.1	30	20	25, 100	12.5–200	0.9907	0.61
	240.2>222.1	30	12				
磺胺甲基嘧啶	265.0>92.0	30	28	25, 100	12.5–200	0.9918	0.91
	265.0>156.0	30	15				
磺胺二甲嘧啶	279.1>186.0	30	16	25, 100	12.5–200	0.9971	1.56
	279.1>92.0	30	28				
磺胺	156.0>92.0	30	15	25, 100	12.5–200	0.9977	1.73
	156.0>65.0	30	25				
四环素	445.3>154.0	30	26	25, 100	12.5–200	0.9970	1.15
	445.3>410.2	30	21				
泰乐菌素	916.5>174.1	57	40	5, 20	2.5–40	0.9938	2.48
	916.5>101.1	57	45				

表1. 本研究使用的基质匹配校准数据、MRM通道（初级通道列在第一列）、仪器参数和保留时间(RT)。

结果

表2展示了对加标组织样品进行重复分析获得的回收率数据。虾和三文鱼的基质效应平均约为40%。图1所示的色谱图展示了Oasis PRiME HLB小柱的净化效果，该小柱可去除虾提取物中95%以上的磷脂。同时还可去除90%以上的正己烷提取的脂肪[1]。

	虾				三文鱼			
	低浓度		高浓度		低浓度		高浓度	
化合物	回收率 %	RSD(%) n=6	回收率 %	RSD(%) n=6	回收率 %	RSD(%) n=6	回收率 %	RSD(%) n=6
阿莫西林	BLOQ	–	67	18	BLOQ	–	59	17
卡巴氧	113	9	75	10	85	5	84	7
头孢噻呋	111	7	84	6	64	4	67	4
氯霉素	106	7	77	12	79	7	69	10
金霉素	79	7	63	17	67	5	65	7
环丙沙星	190	14	103	15	109	9	95	4
皮质醇	99	8	80	6	82	4	82	4
地塞米松	112	9	79	7	89	8	79	6
恩诺沙星	90	12	71	12	86	4	84	8
红霉素	110	7	83	8	85	9	86	7
林可霉素	104	6	99	6	90	4	92	3
洛美沙星	126	11	90	11	97	4	92	5
苯唑西林	115	5	86	2	71	2	74	5
土霉素	125	11	92	7	83	5	76	4
青霉素	112	10	86	6	70	10	71	6
保泰松	78	10	51	8	51	7	51	3
莱克多巴胺	102	9	87	8	87	3	90	4
沙丁胺醇	115	7	89	4	92	12	93	3
磺胺	BLOQ	–	82	17	BLOQ	–	95	12
磺胺甲基嘧啶	107	7	91	7	83	3	77	12
磺胺二甲嘧啶	102	8	85	9	82	3	78	8
四环素	106	7	77	12	79	7	69	10
泰乐菌素	116	10	98	4	76	7	87	3

表2. 对加标组织样品进行重复分析所得的回收率数据(BLOQ — 低于定量限)。

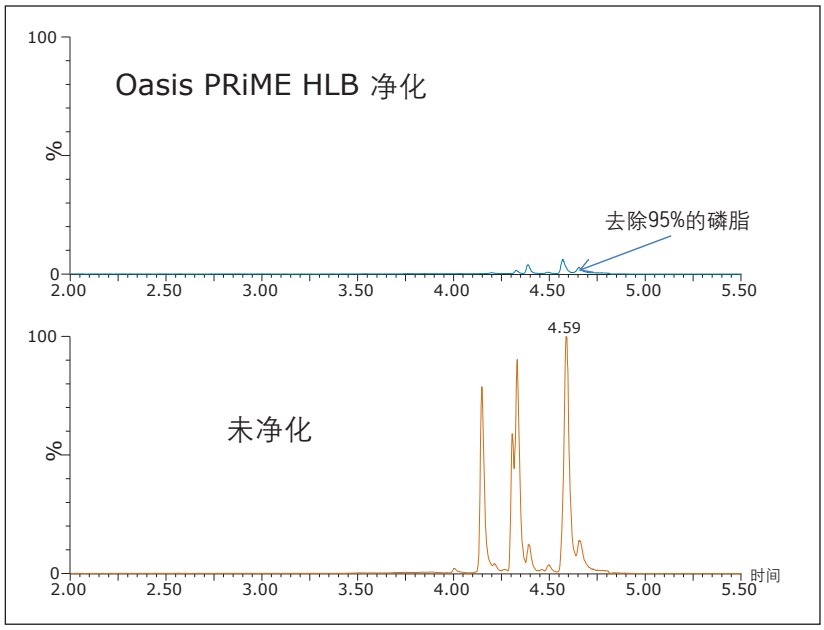

图1. LC-MS/MS色谱图显示有效去除了虾提取物中95%以上的磷脂。

讨论

我们综合Lehotay[2]提出的方法和Tran[3]的优化建立了本研究中采用的步骤。

整个方法的回收率基本上大于70%，但是一些强极性类化合物(例如四环素)的回收率非常低。然而，Oasis PRiME HLB小柱净化几乎不会对任何方法回收率造成损失。如表3所示，通过对空白基质提取液后添加分析物，进而通过SPE净化后测定的所有分析物(除保泰松外)的回收率都非常出色，具体来讲，虾中的回收率大于80%，三文鱼中大于90%。

化合物	虾 回收率%(%RSD) n=5	三文鱼 回收率%(%RSD) n=5
阿莫西林	81 (23)	97 (37)
卡巴氧	102 (3)	99 (3)
头孢噻呋	102 (2)	99 (1)
氯霉素	84 (17)	87 (5)
金霉素	98 (3)	95 (1)
环丙沙星	93 (4)	103 (5)
皮质醇	89 (2)	91 (2)
地塞米松	84 (3)	90 (4)
恩诺沙星	94 (1)	97 (3)
红霉素	83 (11)	104 (4)
林可霉素	101 (4)	103 (2)
洛美沙星	98 (2)	93 (4)
苯唑西林	100 (1)	95 (2)
土霉素	104 (4)	101 (4)
青霉素	98 (3)	97 (3)
保泰松	55 (4)	60 (1)
莱克多巴胺	98 (1)	97 (2)
沙丁胺醇	107 (2)	99 (6)
磺胺	109 (9)	95 (10)
磺胺甲基嘧啶	93 (2)	93 (2)
磺胺二甲嘧啶	93 (2)	93 (2)
四环素	99 (3)	98 (5)
泰乐菌素	84 (5)	103 (5)

表3. SPE回收率%(通过式净化之后，加标的虾或三文鱼提取物中回收到的化合物的百分比)。

结论

- 本实验在虾和三文鱼组织的分析中应用了简便有效的提取/蛋白沉淀步骤
- 通过简单的Oasis PRiME HLB小柱通过式净化方案去除了初始提取物中90%以上的脂肪和磷脂
- 通过本文的样品制备方法获得的洗脱液较澄清，且在LC-MS分析前无需进行后续的过滤操作
- 通过使用简单的Oasis PRiME HLB小柱通过式净化方案，多种兽药均表现出一致的高回收率

参考文献

1. M. Young and K. Tran, "Oasis PRiME HLB Cartridge for Effective Cleanup of Meat Extracts Prior to Multi-Residue Veterinary Drug UPLC-MS Analysis, Waters Application Brief, 2015.
2. S. Lehotay, " High-Throughput Screening Analysis by UHPLC-MS/MS of >60 Veterinary Drugs in Animal Tissues", 125th AOAC Annual Meeting, Presentation 2303, 21 September, 2011.
3. M. Young and K. Tran, "Optimized Extraction and Cleanup Protocols For LC-MS/MS Multiresidue Determination of Veterinary Drugs in Edible Muscle Tissues", Waters Application Note 2011.

扫一扫，关注沃特世微信

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters、The Science of What's Possible、UPLC、Oasis、Xevo、MassLynx和ACQUITY UPLC是沃特世公司的注册商标。CSH是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2015年 沃特世公司 中国印刷 2015年9月 720005488ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 5999
成都：028 - 6765 3588
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com