

使用Ostro样品制备板结合LC-MS/MS对牛奶中的兽药多残留进行筛查

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

- 快速、简单的样品制备可实现高效的多种类/多残留分析
- 从制备的样品中除去潜在的磷脂干扰物
- 快速、灵敏的UPLC®-MS/MS分析

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC®

Xevo® TQ MS

CORTECS® UPLC 1.6 µm色谱柱

Ostro™ 样品制备板

关键词

牛奶，UPLC-MS/MS，兽药，磷脂

简介

Ostro样品制备板可对生物样品中的碱性药物和相关化合物进行简单、快速的LC-MS测定。Ostro样品板为液液萃取、蛋白质沉淀、过滤以及后续从最终萃取物中清除磷脂提供了方便。本文运用Ostro样品板对牛奶中的兽药多残留进行了筛查。使用此样品板只需简单的几个步骤即可有效沉淀蛋白质并除去潜在的干扰物质，从而完成牛奶样品的制备。萃取的样品通过样品板时，蛋白质通过过滤被去除，而磷脂干扰物则通过被保留在专利的吸附剂上被去除。完成简单的样品制备步骤之后，使用UPLC-MS/MS对复溶样品进行分析。为了证明本方法的适用性，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、氟喹诺酮、磺胺类、大环内酯、β-内酰胺和β-肾上腺素能药物。

实验

LC条件

LC系统: ACQUITY UPLC
 色谱柱: CORTECS UPLC® CSH™ C₁₈+,
 1.6 µm, 100×2.1 mm
 流动相A: 0.1%甲酸水溶液
 流动相B: 0.1%甲酸
 乙腈溶液
 进样体积: 7 µL
 进样模式: 部分定量环进样
 柱温: 30 °C
 弱洗针液: 乙腈/水 (10:90) (600 µL)
 强洗针液: 水/乙腈/IPA (50:30:40)
 (200 µL)
 密封清洗液: 乙腈/水 (10:90)
 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 MS
 离子源温度: 150 °C
 脱溶剂温度: 500 °C
 脱溶剂流速: 1000 L/h
 锥孔气体流速: 30 L/h
 碰撞气流速: 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。

化合物	MRM通道	锥孔电压	碰撞能量(eV)
环丙沙星	332.3>288.0	28	18
	332.3>314.0	28	22
金霉素	479.4>444.1	25	25
	479.4>462.1	25	16
恩诺沙星	360.3>316.3	30	25
	360.3>342.3	30	25
红霉素	734.5>158.9	25	30
	734.5>576.2	25	20
林可霉素	407.4>126.2	30	25
	407.4>359.4	30	20
苯唑西林	402.1>159.9	25	10
	402.1>243.1	25	15
土霉素	461.4>381.0	22	22
	461.4>426.3	22	20
青霉素	335.5>160.2	20	15
	335.5>176.1	20	10
莱克多巴胺	302.4>107.0	22	25
	302.4>284.2	22	15
沙丁胺醇	240.4>48.1	20	25
	240.4>222.2	20	10
磺胺甲基嘧啶	265.3>92.1	25	25
	265.3>155.9	25	20
磺胺甲噁唑	279.3>92.0	32	30
	279.3>186.1	32	15
四环素	445.5>154.0	25	25
	445.5>410.0	25	20
泰乐菌素	916.5>174.1	55	35
	916.5>772.4	55	35

(斜体MRM通道用于定量分析)

表1. 用于本研究的MRM通道及相关锥孔电压和碰撞能量。

样品制备

将125 μL 牛奶转移至样品板孔中（样品体积不得大于125 μL ）。加入375 μL 0.2%甲酸的乙腈（ACN）溶液。抽吸几次以使其充分混合。洗脱至收集板中。加入100 μL 200 mM甲酸铵的甲醇/ACN（50:50）溶液，充分混合。蒸干并复溶于100 μL ACN/25 mM甲酸铵水溶液（25:75）中。图1展示了使用Ostro样品板时的SPE典型设置。



图1. Ostro样品板用于牛奶分析时的典型设置。

结果与讨论

多残留分析

Ostro样品板的结果与之前发表的方法¹相当。然而，Ostro样品板操作耗时更少，并且更适用于高通量分析。使用此方法，一般分析人员可在几分钟内制备10个甚至更多的样品，而采用之前的方法则需几个小时。图2显示了恩诺沙星（10 $\mu\text{g/L}$ ）基质匹配标准品的典型LC-MS色谱图。尽管对于大部分其它化合物来说，使用该方法分析时表现出相似的分析性能，但仍然无法对10 $\mu\text{g/L}$ 浓度的金霉素、土霉素和林可霉素进行定量分析。最近研发了一种四环素的替代方法²。表2示出了观察到的多残留牛奶分析的回收率数据。

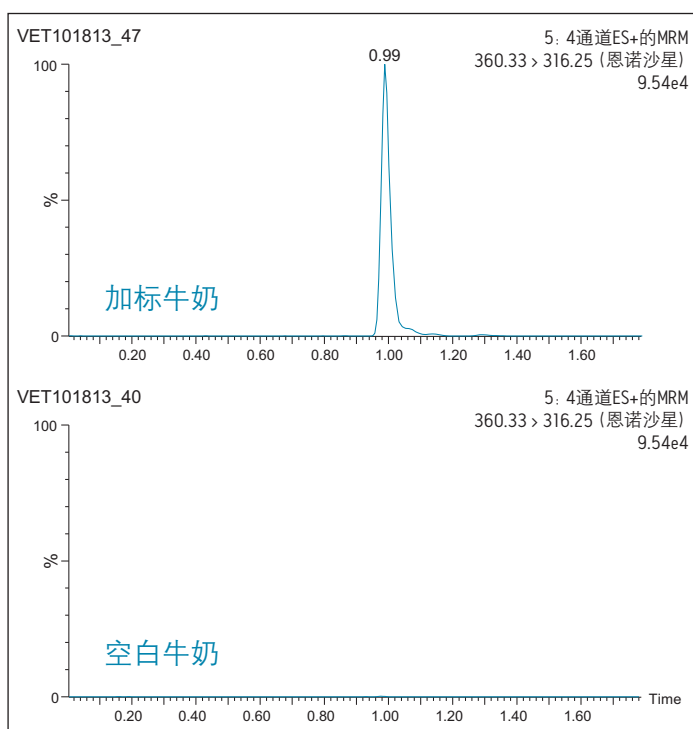


图2. 使用Ostro直通式样品板测定牛奶中的恩诺沙星 (10 $\mu\text{g/L}$)。

化合物	RT (min)	加标浓度 (ppb)	%回收率 (%RSD)
环丙沙星	0.87	10	81 (9)
		100	82 (8)
金霉素	1.54	10	bdl
		100	37 (13)
恩诺沙星	1.00	10	74 (9)
		100	83 (7)
红霉素	2.17	10	71 (14)
		100	50 (16)
林可霉素	0.60	10	bdl
		100	129 (18)
苯唑西林	3.71	10	73 (9)
		100	71 (6)
土霉素	0.97	10	bdl
		100	44 (5)
青霉素	3.36	10	54 (14)
		100	66 (8)
莱克多巴胺	0.92	10	80 (7)
		100	87 (3)
沙丁胺醇	0.60	10	94 (13)
		100	87 (15)
磺胺甲基嘧啶	1.45	10	49 (7)
		100	54 (9)
磺胺二甲嘧啶	1.61	10	51 (14)
		100	59 (11)
四环素	1.06	10	42 (15)
		100	52 (15)
泰乐菌素	2.39	10	70 (14)
		100	57 (22)

表2. 回收率数据 (n = 6, bdl = 检测下限)。

磷脂去除

牛奶中含有大量的磷脂，约占其总脂肪含量的1%³。在LC分离中，这些磷脂会直接干扰后洗脱的化合物。此外，结果表明磷脂残留的累积会使反相LC分离的性能变差⁴。图3展示了采用为鉴定磷脂而选择的MRM通道 (m/z 184>184) 对牛奶样品进行分析的UPLC-MS/MS色谱图。下图展示了使用Ostro样品板处理牛奶样品获得的结果。上图为采用蛋白质沉淀（未经SPE纯化）获得的结果。Ostro样品板可有效去除超过98%的磷脂。

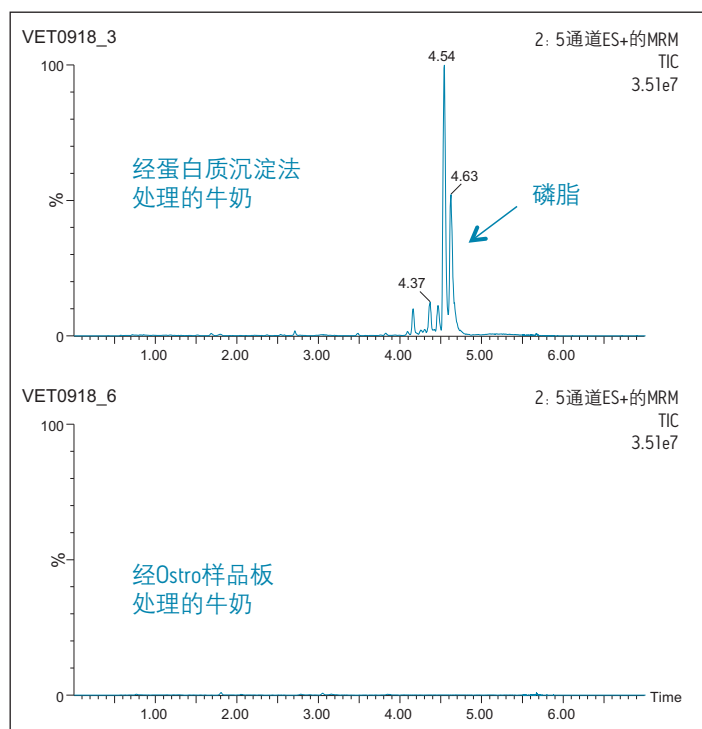


图3. 使用Ostro样品板从全脂牛奶 (3%脂肪) 中去除磷脂。

结论

- 展示了使用Ostro样品制备板从牛奶中快速萃取多种兽药。
- 除四环素外，该方法对其它所有种类的被测化合物均表现出良好的筛查分析性能。
- 使用Ostro直通式样品制备板可有效去除牛奶萃取物中的几乎全部磷脂。

参考文献

1. Optimized Extraction and Cleanup Protocols for LC-MS/MS Multi-Residue Determination of Veterinary Drugs in Edible Muscle Tissues, Waters Application Note 720004144en
2. HPLC/UV Determination of Tetracyclines in Milk Using Mixed-Mode SPE and eXtended Performance [XPL] 2.5 µm Columns, Waters Application Note 720004582en
3. Contarini, G and Povo, M., Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies, *Int. J. Mol. Sci.*, 14(2), 2808–2831(2013)
4. Eliminating Phospholipids in Drug Discovery Extractions Using a Fast, Generic Sample Clean-up Method, Waters Application Note 720004046en

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, The Science of What's Possible, CORTECS, ACQUITY UPLC, Xevo and MassLynx是沃特世公司的注册商标。
Ostro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。

©2014 年沃特世公司。印制于中国。2014年11月 720005053ZH 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 6555
成都：028 - 6578 4990
香港：852 - 2964 1800

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